

PhD Dissertation 07/2010

**Optimierung der Citronensäureherstellung
mit der Hefe *Yarrowia lipolytica* unter Verwendung
einer Biosensor-online-Regelung**

Lucie Moeller

ISSN 1860-0387



**Optimierung der Citronensäureherstellung
mit der Hefe *Yarrowia lipolytica*
unter Verwendung einer Biosensor-online-Regelung**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der Ingenieurwissenschaften
(Dr.-Ing.)**

vorgelegt

der Fakultät Maschinenwesen
der Technischen Universität Dresden

von Diplomingenieurin **Lucie Moeller**
geboren am 24. Juli 1980 in Pelhřimov (Tschechische Republik)

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil. Thomas Bley
Prof. Dr. rer. nat. habil. Klaus-Dieter Vorlop

„Gefördert durch das Stipendienprogramm der Deutschen Bundesstiftung Umwelt“

Meiner Familie

gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

0	Einleitung	1
1	Theoretische Grundlagen	2
1.1	Citronensäure und ihre Anwendung	2
1.2	Industrielle Herstellung von Citronensäure	4
1.2.1	Citronensäureherstellung mit <i>Aspergillus niger</i>	6
1.2.2	Citronensäureherstellung mit <i>Yarrowia lipolytica</i>	9
1.3	<i>Yarrowia lipolytica</i>	12
1.4	Überproduktion von Citronensäure in Pilzen	14
1.5	Verfahrenstechnische Herausforderungen bei der Citronensäuresynthese mit <i>Yarrowia lipolytica</i>	18
1.6	Zielstellung der Arbeit	22
2	Material und Methoden	24
2.1	Geräte	24
2.2	Chemikalien und Reagenzien	24
2.3	Kultivierungssysteme für die Produktion von Citronensäure	25
2.3.1	Verwendete Mikroorganismen	25
2.3.2	Medien für Stammhaltung und Produktion von Citronensäure	25
2.3.3	Vorkulturen	26
2.3.4	Rührkesselreaktoren	27
2.3.5	Kultivierungsbedingungen	30
2.4	Prozessanalytik	31
2.4.1	Substratanalytik mit Hilfe von Biosensoren	31
2.4.2	Produktanalytik mit Hilfe der Ionenchromatographie	32
2.4.3	Sonstige analytische Methoden	33
2.5	Ermittlung kinetischer Daten	35
2.6	Optimierung des Bioprozesses für den Wildtypstamm <i>Yarrowia lipolytica</i> H222 mit Glucose als Substrat	36
2.6.1	Einfluss der Temperatur auf den Bioprozess	36
2.6.2	Einfluss des pH-Wertes auf den Bioprozess	36
2.6.3	Einfluss der Stickstoffkonzentration auf den Bioprozess	37
2.6.4	Substrathemmung	37
2.6.5	Produkthemmung	37

2.7	Entwicklung verschiedener Prozessführungsstrategien mit Glucose als Substrat für die Citronensäureproduktion mit <i>Yarrowia lipolytica</i> H222 unter Verwendung eines Biosensor-online-Messsystems	38
2.7.1	Ermittlung der optimalen Glucosekonzentration für die biosensorgestützte Substratnachdosierung	38
2.7.2	Entwicklung semikontinuierlicher Verfahren	39
2.8	Versuche zur Anwendung von Stärkehydrolysaten zur Citronensäuregewinnung mit <i>Yarrowia lipolytica</i> H222	40
2.8.1	Auswahl des geeigneten Stärkehydrolysates	40
2.8.2	Anwendung des Stärkehydrolysates in biosensorgesteuerter Substratnachdosierung	41
2.9	Untersuchung der Substratverwertung durch den rekombinanten Stamm <i>Yarrowia lipolytica</i> H222-S4(p67ICL1)T5	41
2.9.1	Untersuchung des Abbaus von Saccharose, Glucose und Fructose in Fermentationen mit Mischsubstratansatz	41
2.9.2	Einfluss der Fructoseanfangskonzentration auf die Glucoseverwertung	42
2.10	Optimierung des Bioprozesses mit dem rekombinanten Stamm <i>Yarrowia lipolytica</i> H222-S4(p67ICL1)T5 und Saccharose als Substrat	42
2.10.1	Einfluss von pH-Wert und Zugabe von Proteosepepton auf den Bioprozess	42
2.10.2	Substrathemmung	43
2.10.3	Langzeitstabilität des rekombinanten Stammes	43
2.11	Entwicklung verschiedener Prozessführungsstrategien mit dem rekombinanten Stamm <i>Yarrowia lipolytica</i> H222-S4(p67ICL1)T5 und Saccharose als Substrat	44
2.11.1	Fed-Batch	44
2.11.2	Repeated Fed-Batch	45
2.12	Modellierung	46
3	Ergebnisse und Diskussion	50
3.1	Allgemeine Charakteristik des Bioprozesses zur Citronensäureproduktion mit <i>Yarrowia lipolytica</i> und Schlussfolgerungen für die weitere Prozessentwicklung	50
3.2	Optimierung des Bioprozesses mit dem Wildtypstamm <i>Yarrowia lipolytica</i> H222 mit Glucose als Substrat	56
3.2.1	Einfluss der Temperatur auf den Bioprozess	56
3.2.2	Einfluss des pH-Wertes auf den Bioprozess	58

3.2.3	Einfluss der Stickstoffkonzentration (Biomassekonzentration) auf den Bioprozess	60
3.2.4	Substrathemmung	64
3.2.5	Produkthemmung	65
3.3	Entwicklung verschiedener Prozessführungsstrategien mit Glucose als Substrat für <i>Yarrowia lipolytica</i> H222 unter Verwendung des Biosensor-online-Messsystems	67
3.3.1	Ermittlung der optimalen Glucosekonzentration im Medium für die biosensorgestützte Substratnachdosierung	67
3.3.2	Entwicklung semikontinuierlicher Verfahren	81
3.4	Versuche zur Anwendung von Stärkehydrolysaten zur Citronensäuregewinnung mit <i>Yarrowia lipolytica</i> H222	98
3.4.1	Auswahl des geeigneten Stärkehydrolysates.....	98
3.4.2	Anwendung des Stärkehydrolysates unter biosensorgesteuerter Substratnachdosierung.....	101
3.5	Untersuchung der Substratverwertung beim rekombinanten Stamm <i>Yarrowia</i> <i>lipolytica</i> H222-S4(p67ICL1)T5	104
3.5.1	Untersuchung des Abbaus von Saccharose, Glucose und Fructose in Fermentationen mit Mischsubstratansatz	104
3.5.2	Einfluss der Fructoseanfangskonzentration auf die Glucoseverwertung	108
3.6	Optimierung des Bioprozesses mit dem rekombinanten Stamm <i>Yarrowia lipolytica</i> H222-S4(p67ICL1)T5 und Saccharose als Substrat	110
3.6.1	Einfluss des pH-Wertes auf den Bioprozess	110
3.6.2	Substrathemmung.....	112
3.6.3	Langzeitstabilität des rekombinanten Stammes	113
3.7	Entwicklung verschiedener Prozessführungsstrategien mit dem rekombinanten Stamm <i>Yarrowia lipolytica</i> H222-S4(p67ICL1)T5 und Saccharose als Substrat	119
3.7.1	Fed-Batch	119
3.7.2	Repeated Fed-Batch.....	127
3.8	Modellierung des Bioprozesses der Citronensäureherstellung mit <i>Yarrowia lipolytica</i> H222 und Glucose als Substrat.....	136
3.9	Wirtschaftlichkeitsbetrachtung des Verfahrens mit <i>Yarrowia lipolytica</i>	141
4	Zusammenfassung und Ausblick	143
5	Literaturverzeichnis	145
6	Anlagen.....	152

ABKÜRZUNGEN UND FORMELZEICHEN

$\mu_{\max}$	Maximale spezifische Wachstumsrate (h^{-1})
<i>A.</i>	<i>Aspergillus</i>
Abb.	Abbildung
AS	Antischaummittel
BTM	Biotrockenmasse (g/L)
$\text{BTM}_{N=0}$	Biotrockenmasse, gemessen zum Zeitpunkt der Stickstoffauszehrung (g/L)
<i>c</i>	Konzentration (g/L)
CS	Citronensäure
DE	Dextrose Equivalent
Fa.	Firma
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FIA	Flow Injection Analyser
FR	Fructose
<i>G</i>	Glucose (im Modell)
GL	Glucose
GRAS	Generally Recognized as Safe
ICS	Isocitronensäure
OD600	Optische Dichte gemessen bei 600 nm
pO_2	Gelöstsauerstoffkonzentration (%)
<i>p</i>	Biomassspezifische Produktbildungsrate ($\text{g}/(\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h})$), (h^{-1})
<i>P</i>	Volumetrische Produktbildungsrate ($\text{g}/(\text{L} \cdot \text{h})$)
<i>P</i>	Produkte (im Modell)
$p_{\max}$	Maximale biomassspezifische Produktbildungsrate ($\text{g}/(\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h})$), (h^{-1})
$P_{\max}$	Maximale Produktbildungsrate ($\text{g}/(\text{L} \cdot \text{h})$)
PAT	Process Analytical Technology
QIC	Quality Indication Controller, Messeinrichtung für pH und pO_2
rpm	Rounds per minute
<i>S</i>	Substratabbaurate ($\text{g}/(\text{L} \cdot \text{h})$)
S_{CS}	Selektivität des Bioprozesses für Citronensäure (% CS)
SA	Saccharose
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TIC	Temperature Indication Controller, Messeinrichtung für Temperatur
V_0	Volumen am Fermentationsanfang
<i>X</i>	Biotrockenmasse (im Modell)
<i>Y.</i>	<i>Yarrowia</i>
$Y_{\text{BTM/GL}}$	Substratbezogene Ausbeute für Biomasse ($\text{g}_{\text{BTM}}/\text{g}_{\text{GL}}$)
$Y_{\text{CS/GL}}$	Substratbezogene Ausbeute für Citronensäure ($\text{g}_{\text{CS}}/\text{g}_{\text{GL}}$)

0 EINLEITUNG

Citronensäure ist eine Bulkchemikalie, die breite Anwendung in vielen Zweigen der Industrie findet. Zurzeit werden ungefähr 1,6 Millionen Tonnen Citronensäure pro Jahr produziert. Das derzeit verwendete Produktionsverfahren mit dem Schimmelpilz *Aspergillus niger* zeigt viele Defizite. Der Mikroorganismus weist ungünstige Eigenschaften auf, wie z. B. genetische Instabilität, Sensitivität gegenüber der Anwesenheit einiger Metallionen und gegenüber Sauerstoffunterversorgung, potentielle Toxizität. Die etablierte Methode der Citratgewinnung mittels Präzipitation ist mit der Produktion großer Mengen an flüssigem und festem Abfall verbunden. Da sich die Citronensäureproduktion aufgrund immer weiter steigender Nachfrage jährlich um 3,5-4 % erhöht, wird der Zwang, die etablierte Methode durch einen einfacheren, stabileren und umweltfreundlicheren Herstellungsprozess zu ersetzen, immer größer.

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Optimierung einer alternativen Methode der Citronensäureherstellung mit der Hefe *Yarrowia lipolytica*. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt unter anderem im breiteren Spektrum verwendbarer Substrate, größerer Robustheit des Mikroorganismus und der einfachen Prozessführung.

Die Arbeiten konzentrierten sich auf zwei Substratgruppen – Glucose (und Glucosesirupe) und Saccharose. Zunächst wurden die Produktionsbedingungen (pH, Temperatur, Biomassekonzentration) optimiert. Die Substrathemmung und die Produktinhibierung wurden untersucht. Unterschiedliche Prozessführungsstrategien teilweise unter Verwendung einer Biosensor-online-Regelung wurden im halbtechnischen Maßstab getestet. Die am besten geeignete Strategie, die Repeated Fed-Batch Prozessführung, wurde im Langzeitversuch auf die Stabilität der Citronensäurebildung und die Robustheit des Biosensors geprüft.

Ein unstrukturiertes und unsegregiertes Modell für die Beschreibung des Bioprozesses für die Citronensäureproduktion mit *Y. lipolytica* aus Glucose im Batch bzw. Fed-Batch Modus wurde erstellt.

Darüber hinaus wurde eine Wirtschaftlichkeitsbetrachtung in Auftrag gegeben, in der die Marktfähigkeit des zu entwickelnden Verfahrens der Citronensäureherstellung mit der Hefe *Y. lipolytica* von einem unabhängigen Unternehmen bewertet wurde.

1 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

1.1 Citronensäure und ihre Anwendung

Die Citronensäure oder auch Zitronensäure (systematisch nach IUPAC: 2-Hydroxypropan-1,2,3-tricarbonsäure) (Abbildung 1) ist eine organische Säure, die bei Raumtemperatur als ein weißes kristallines Pulver vorliegt. Als Citrat werden das Salz der Citronensäure und die deprotonierte Form von Citronensäure bezeichnet. Die Citronensäure ist in großen Mengen in Obst und Gemüse zu finden; der Saft von Zitrusfrüchten, Ananas, Birnen, Pfirsichen und Feigen enthält 6-8 % Citronensäure (ABOU-ZEID & ASHY 1984).

Die isomere Form von Citronensäure ist die Isocitronensäure (Abbildung 1). Aufgrund der Anwesenheit von zwei chiralen Zentren ist die Isocitronensäure optisch aktiv und bildet vier Stereoisomere. In der Natur kommt am häufigsten das Isomer *L-threo*-Isocitronensäure (oder auch (1*S*,2*R*)-Isocitronensäure) vor. Die Isocitronensäure ist in Äpfeln, Birnen, Himbeeren, Johannisbeeren und Brombeeren zu finden (STOTTMEISTER 2003, FÖRSTER 2006).

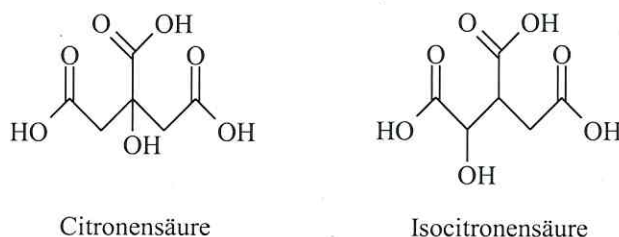


Abbildung 1: Strukturformeln von Citronensäure und Isocitronensäure

Die Citronensäure wurde bereits im achten Jahrhundert von einem arabischen Alchemisten namens Jabir Ibn Hayyan entdeckt. Die erste Isolierung von Citronensäure gelang im Jahr 1784 dem schwedischen Chemiker Carl Wilhelm Scheele aus Zitronensaft (VRBOVÁ 2001). Ihre industrielle Produktion aus Zitrusfrüchten begann im neunzehnten Jahrhundert.

Die Citronensäure ist eine der wenigen Bulkchemikalien, die ausschließlich biotechnologisch hergestellt werden (als „bulk“ werden Chemikalien bezeichnet, deren Jahresproduktionsvolumen 10.000 t überschreitet). Während im Jahr 1995 die Jahresproduktion bei 700.000 t lag (SCHMID 2003), werden heute ca. 1.600.000 t/a produziert (BEROVIC & LEGISA 2007). Für die nächsten Jahre wird aufgrund der breiten Anwendung von Citronensäure in der Industrie eine starke Zunahme des Marktvolumens in Höhe von 3,5–4 % prognostiziert (SOCCOL ET AL. 2006). Die drei größten Produzenten sind China (35-40 % des Weltmarktes), Nordamerika und Westeuropa. Die führenden Unternehmen und größten Citronensäurelieferanten sind ADM, Cargill, Inc., Tate & Lyle PLC, Hoffmann-La Roche und Jungbunzlauer in Nordamerika und Westeuropa, Gadot Biochemica Industries in Israel und

Tauglichkeit, Citronensäure in vergleichsweise hohen Ausbeuten zu produzieren (SOCCOL ET AL. 2006).

Tabelle 1: Beispiele citronensäurebildender Mikroorganismen (ABOU-ZEID & ASHY 1984, GREWAL & KALRA 1995, ROEHR ET AL. 1996, BEROVIC & LEGISA 2007, ANASTASSIADIS ET AL. 2008).

Schimmelpilze	Hefen	Bakterien
<i>Aspergillus aculeatus</i>	<i>Candida catenulata</i>	<i>Arthrobacter paraffinens</i>
<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Candida citroformans</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Aspergillus carbonarius</i>	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Corynebacterium</i> sp.
<i>Aspergillus fenicis</i>	<i>Candida fibrae</i>	
<i>Aspergillus foetidus</i>	<i>Candida intermedia</i>	
<i>Aspergillus fonsecaeus</i>	<i>Candida oleophila</i>	
<i>Aspergillus fumaricus</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	
<i>Aspergillus glaucus</i>	<i>Candida paratropicalis</i>	
<i>Aspergillus japonicus</i>	<i>Candida subtropicalis</i>	
<i>Aspergillus luchensis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	
<i>Aspergillus phoenicis</i>	<i>Candida zeylanoides</i>	
<i>Aspergillus saitoi</i>	<i>Hansenula anomala</i>	
<i>Aspergillus usamii</i>	<i>Pichia</i> sp.	
<i>Aspergillus wentii</i>	<i>Rhodotorula</i>	
<i>Citromyces</i> sp.	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
<i>Monilia</i> sp.		
<i>Mucor piriformis</i>		
<i>Penicillium janthinellum</i>		
<i>Penicillium restrictum</i>		
<i>Trichoderma viride</i>		

Im Jahr 1923 wurde die erste Großproduktion der Citronensäure mit Hilfe von *Aspergillus niger* in den USA aufgenommen (RENNEBERG 2007). Fünf Jahre später, 1928, wurden in der damaligen Tschechoslowakischen Republik das erste Mal Zuckermelassen als billige Saccharosequelle genutzt (BEROVIC & LEGISA 2007). Dieses Verfahren hat sich etabliert und wird bis zum heutigen Tage genutzt. Die Produktionsstämme von *Aspergillus* gehören zu den bestgehütetsten Schätzen der Fermentationsindustrie (KARAFFA & KUBICEK 2003). Als Substrate werden auch heute noch Saccharose aus Zuckermelassen (Abprodukte der Zuckerindustrie mit 40-55 % Saccharoseanteil) oder Glucosesirup (Zwischenprodukt der Stärkeindustrie) benutzt. Stärkehydrolysate mit mehr als 80 % Glucose sind zwar ein wenig

teurer, enthalten aber allesamt weniger Verunreinigungen als Zuckermelassen. Bis zu 90 % der in den USA produzierten Citronensäure wird aus Glucose (aus Mais) hergestellt (ANASTASSIADIS ET AL. 2008). Zu den Parametern, die für die Citronensäureproduktion mit *A. niger* wichtig sind, gehören hohe Substratkonzentration, niedriger und begrenzter Gehalt an Stickstoff und bestimmten Spurenelementen (hauptsächlich Eisen und Mangan), niedriger pH-Wert und sorgfältige Versorgung mit gelöstem Sauerstoff (SAUER ET AL. 2007). Eine Unterbrechung in der Sauerstoffzufuhr hat eine Überproduktion von Polyolen wie z. B. Glycerol, Erythritol, Xylitol und Arabitol zur Folge (DIANO ET AL. 2006). Die erwünschten Eigenschaften der Produktionsstämme von *A. niger* sind schwierig über längere Zeitspannen aufrechtzuerhalten, ohne schwere Verluste der Lebensfähigkeit und der Tauglichkeit, Citronensäure zu produzieren, zu riskieren.

Die mikrobiologisch erzeugte Citronensäure ist chemisch völlig identisch mit dem Naturprodukt aus Zitrusfrüchten. Die chemische Synthese (z. B. aus Glycerol oder Dichloraceton) ist für die Produktion von Citronensäure nicht geeignet, da sie aufgrund vieler Reaktionsschritte, niedriger Ausbeuten und hoher Preise der Ausgangsstoffe unökonomisch ist (MATTEY & KRISTIENSEN 1999). In Mexiko und Südamerika hat sich aufgrund der guten Verfügbarkeit des Rohstoffes die Produktion von Citronensäure aus Zitrusfrüchten bis zum heutigen Tage erhalten. Ihr Anteil an der weltweiten Herstellung nimmt allerdings weniger als 1 % ein (ANASTASSIADIS ET AL. 2008).

1.2.1 Citronensäureherstellung mit *Aspergillus niger*

Es gibt generell drei Verfahren für die industrielle Citronensäureproduktion mit *A. niger*: das Oberflächenverfahren, den Koji-Prozess und das Submersverfahren (CROLLA & KENNEDY 2001).

Die einfachste Methode für die Citronensäureproduktion stellt das sog. „Koji“-Verfahren dar, das in Japan entwickelt wurde (GREWAL & KALRA 1995, TSAO ET AL. 1999, AL-ABID 2006). Es handelt sich um eine Feststoff-Fermentation, bei der stärkehaltige Pulpe aus der Stärkeproduktion, wie z. B. faserige Kartoffelreste, Reis- oder Weizenkleie und Obstabfälle, als Substrate genutzt werden. Der Mikroorganismus wächst auf der Oberfläche des wasserunlöslichen Materials, das aufgequollen wurde, sodass es bis zu 70 % Wassergehalt hat. Das Verfahren nutzt die Fähigkeit des Schimmelpilzes zur Bildung der hydrolytischen Enzyme Cellulase und Amylase, die Cellulose und Stärke spalten. Die Kultivierung dauert 4 bis 5 Tage. Das Hauptproblem dieses Produktionsprozesses stellt die Anwesenheit der Schwermetalle in den Substraten dar, sodass zur Produktion spezielle, wenig empfindliche

Anhui BBBCA Biochemical in China (AL-ABID 2006, SOCCOL ET AL. 2006, ANASTASSIADIS ET AL. 2008).

Die industrielle Verwendung von Citronensäure ist sehr vielseitig (TSAO ET AL. 1999, VELÍŠEK 1999, VRBOVÁ 2001, KARAFFA & KUBICEK 2003, RENNEBERG 2007, ANASTASSIADIS ET AL. 2008, <http://das-ist-drin.de>, www.jungbunzlauer.com). Der überwiegende Teil (70-75 %) der heute jährlich produzierten Citronensäure findet Anwendung in der Lebensmittelindustrie. Sie hemmt das Wachstum von Bakterien, Hefen und Schimmel in Obstsäften und nichtalkoholischen Getränken. Sie wird auch als Geschmacksverstärker und Säuerungsmittel angewendet. Die Citronensäure bildet Chelatkomplexe mit vielen Metallionen (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+}). Dank dieser Fähigkeit verhindert sie z. B. das Sauerwerden und unerwünschte Farbänderungen bei Fetten und Ölen. Die Metallsalze von Citrat werden als Mineralstoffquelle bei Diäten und zur Behandlung von Erkrankungen, bei denen diese Metalle dem Organismus fehlen, genutzt. Außerdem gehört die Citronensäure zu den Inhibitoren der Reaktion der enzymatischen Bräunung, indem sie das Kupfer, das als Kofaktor im Enzym für die enzymatische Bräunung dient, bindet. Nach der Zugabe bei der Weinherstellung reagiert sie mit vorhandenem Eisen und verhindert die Trübungsbildung. Citronensäure stabilisiert die Farbe der Obstprodukte, inhibiert die Kristallbildung in Süßwaren, wirkt als Antioxidanssynergist und modifiziert die Textur, indem sie die Entstehung einiger Pektingele und die Milchfällung durch Chimosin ermöglicht. Sie wird in Margarinen, Konfitüren, konserviertem Gemüse, Eis, Tee- und Obstgetränkpulver, in Süß-, Back- und Milchwaren sowie in vielen anderen Lebensmitteln angewendet. Die Citronensäure (E330) und ihre Salze Natriumcitrat (E331), Calciumcitrat (E333) und Kaliumcitrat (E332) sind in der Europäischen Union zugelassene Nahrungszusatzstoffe und sie können in quantum satis (d. h. in ausreichender Menge) genutzt werden. Die amerikanische FDA (US Food and Drug Administration) erkannte Citronensäure und o. g. Salze als GRAS (generally recognized as safe) Nahrungszusatzstoffe an.

Neben der Lebensmittelindustrie wird Citronensäure auch in der chemischen, pharmazeutischen und Kosmetikindustrie verwendet, z. B. als Mittel gegen Blutgerinnung bei Blutkonserven oder als Zusatz in sog. „Weißmacher-Zahnpasten“. Da Citronensäure schnell biologisch abbaubar ist, dient sie auch als ein möglicher Ersatz für umweltbelastende Polyphosphate in Waschmitteln und Spülmitteln. In der Umweltremediation wird Citronensäure als Gaswäscher für die Entfernung von Schwefeldioxid aus Abgas angewendet. Dank ihrer Fähigkeit, Schwermetalle zu binden, wird die Citronensäure in der Notfallmedizin bei Vergiftungen eingesetzt. Als Komplexbildner wird sie in der Textilindustrie sowie bei der

Behandlung von Ölquellen benutzt und sie wirkt als Bindemittel im Feuerfestzement. Ethyl- und Butylester von Citronensäure (CITROFOL[®], Produkt der Fa. Jungbunzlauer) sind als Weichmacher aufgrund ihrer Nichttoxizität akzeptabler als Phthalate. Die Anwendungsgebiete dieser Ester reichen von Kosmetik (Parfüms und Deodorants) über Druckfarben und Filme bis zur Sicherheitsglasherstellung. Citronensäure wird auch in der Tabakindustrie verwendet, da ihre Anwesenheit in Zigaretten zur kompletten Verbrennung führt und gleichzeitig das Tabakaroma verbessert.

Die Citronensäure ist eine breit angewendete, kostengünstige und sichere Substanz. Unerwünschte Wirkungen wurden bei Tieren erst bei einer langfristigen Konsumierung in sehr hohen Dosen beobachtet. Eine langfristige Studie mit Ratten, die in der Nahrung 5 % Citronensäure zu sich nahmen, zeigte eine niedrigere Gewichtszunahme und geringere Nahrungsannahme der Tiere. Eine weitere Studie gelangte zu der Schlussfolgerung, dass Citronensäure bei Vitamin D-Mangel die Calciumresorption hindern kann. Das Calcium wird dann als Calciumcitrat aus dem Körper ausgeschieden. Hohe Dosen an Citronensäure haben den Zahnschmelz der Versuchstiere beschädigt. Häufiger und übermäßiger Verzehr von Citronensäure zusammen mit unausgewogener Ernährung kann theoretisch zu Zahnschäden führen (das Gleiche gilt auch für Zitronensaft). Trotz der angegebenen negativen Wirkungen gilt, dass Citronensäure zu den sichersten Zusatzstoffen gehört (VRBOVÁ 2001). Sie wurde als Zusatzstoff für Säuglingsnahrung, Arzneimittel, Kosmetika und Bioprodukte zugelassen (<http://das-ist-drin.de>).

1.2 Industrielle Herstellung von Citronensäure

Die kommerzielle Produktion von Citronensäure begann 1860 in England. Als Ausgangssubstanz diente Zitronensaft aus italienischen und sizilianischen Zitrusfrüchten (Zitronen und Limonen). Während des ersten Weltkrieges wurde wegen der Vernachlässigung der Zitrusplantagen Citronensäure zur Mangelware (MATTEY & KRISTIANSEN 1999, RENNEBERG 2007). Deswegen wurde nach anderen Wegen ihrer Herstellung gesucht. Die Entdeckung des deutschen Botanikers Carl Whemer im Jahr 1893, dass Schimmelpilze *Citromyces* (jetzt *Penicillium*) *pfefferianis* und *C. glaber* Citronensäure überproduzieren können, zeigte die Möglichkeit, diese Chemikalie fermentativ zu produzieren (GREWAL & KALRA 1995). Auf der Basis der Forschung von J. N. Currie wurde aus der Vielzahl der citronensäureproduzierenden Mikroorganismen (s. Tabelle 1) der schwarze Gießkannenschimmel (*Aspergillus niger*, auch Brotschimmel genannt) als am besten geeignet gefunden. Die Vorteile der Nutzung von *A. niger* gegenüber anderen Mikroorganismen sind der einfache Umgang mit ihm, seine Fähigkeit, viele billige Rohstoffe zu nutzen, und seine

Stämme genutzt werden müssen. Diese traditionelle Methode wird in Asien immer noch angewendet, um Abfälle der Lebensmittelindustrie zu verarbeiten (BEROVIC & LEGISA 2007). Durch ihre zahlreichen Vorteile, wie die Einfachheit des Verfahrens, die Nutzung der agro-industriellen Rückstände, den niedrigeren Energiebedarf und die geringere Produktion von Abwasser, genießt diese Methode zunehmendes Interesse (ANASTASSIADIS ET AL. 2008).

Das Oberflächenverfahren wurde als erste Methode für die Citronensäureproduktion im großen Maßstab entwickelt. Das Mycelium wächst auf der Oberfläche des Mediums in großen flachen Schalen aus hochreinem Aluminium oder aus Edelstahl mit der Kapazität von 50 bis 100 L, die in speziellen sterilen Fermentationsräumen gestapelt werden (GREWAL & KALRA 1995). Die Citronensäureproduktion findet an der Grenzschicht zwischen Nährlösung und Pilzkultur statt (ROEHR ET AL. 1996). Die Temperatur wird zwischen 28 und 30 °C gehalten, der pH-Wert sinkt durch die Entstehung von Citronensäure von anfänglichen 5-7 auf Werte unter 2. Eine Erhöhung des pH-Wertes während der Fermentation auf 3 verursacht die Produktion von Gluconsäure und der toxischen Oxalsäure in beträchtlichen Mengen. Die Fermentation dauert 8 bis 12 Tage, Ausbeuten von 0,70-0,85 g_{CS}/g_{Substrat} werden erreicht (GREWAL & KALRA 1995, TSAO ET AL. 1999). Das Oberflächenverfahren ist einfach aufzubauen und zu bedienen. Im Vergleich zum Submersverfahren liegt der Vorteil dieses Verfahrens in seinen niedrigen Energiekosten (MURPHY & HORGAN 2005). Deswegen wird die Oberflächenfermentation in kleinen bis mittelständischen Betrieben auch noch heute benutzt und macht 5-10 % der Weltproduktion von Citronensäure aus (AL-ABID 2006, BEROVIC & LEGISA 2007).

Es wird geschätzt, dass ca. 80 % der weltweit produzierten Citronensäure mit Hilfe des Submersverfahrens hergestellt wird (AL-ABID 2006). Pilz und Nährlösung werden zusammen in großen Tanks unter Zufuhr großer Sauerstoffmengen kultiviert. Das Submersverfahren benötigt im Vergleich zum Oberflächenverfahren weniger Platz, weniger Arbeitsaufwand und das Risiko einer Kontamination ist niedriger (MURPHY & HORGAN 2005). Die Kultivierung dauert meistens 5-10 Tage (GREWAL & KALRA 1995). In einer klassischen Fermentation mit *A. niger* werden 100-140 g/L Citronensäure mit Ausbeuten von 0,8 g_{CS}/g_{Substrat} produziert und Produktivitäten von 0,4-0,8 g/(L*h) erreicht (ROEHR ET AL. 1996, STOTTMEISTER 2003, FÖRSTER ET AL. 2007). Generell wird für die Produktion eine Batch-Kultivierung genutzt, obwohl bereits Methoden im Fed-Batch und kontinuierlichen Modus entwickelt wurden (GREWAL & KALRA 1995).

Nach der Beendigung der Citronensäureproduktion wird das Pilzmycel abzentrifugiert, getrocknet und als proteinreiches Futtermittel oder Düngemittel genutzt

(BEROVIC & LEGISA 2007). Durch Erhitzen und Zugabe von Kalkmilch ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) oder Calciumcarbonat wird das Produkt als Tricalciumcitrat aus der zellfreien Kulturlösung gefällt. Durch die Zugabe von Schwefelsäure entstehen Citronensäurelösung und Gips, der abzentrifugiert wird. Der Rohextrakt der Citronensäure wird anschließend noch durch Aktivkohle entfärbt und aufgereinigt und entspricht danach den Reinheitsanforderungen des Lebensmittelrechts (MURPHY & HORGAN 2005). Die Gewinnung von Citronensäure direkt aus der Kulturflüssigkeit durch Kristallisation ist nicht möglich, da diese viele unerwünschte Stoffe beinhaltet, die aus dem Rohstoff oder durch die Autolyse der Zellen stammen. Die amerikanische FDA empfahl im Jahr 1975 die Anwendung der Lösungsmittlextraktion mit Hilfe von *n*-Octylalkohol und Tridodecylamin für die Citronensäureisolierung (GREWAL & KALRA 1995). Es wurden auch andere Methoden der Citronensäureaufbereitung entwickelt, wie z. B. Ionenaustauschchromatographie, Elektrodialyse mit bipolaren Membranen oder Ultrafiltration (BEROVIC & LEGISA 2007). Trotzdem wird die Präzipitation von Citronensäure als Tricalciumcitrat weiterhin als Standardverfahren genutzt.

Die Umweltbelastung des *Aspergillus*-Verfahrens resultiert v. a. aus folgenden Fakten (STOTTMEISTER & HOPPE 1991, MUTZALL 1993, ROEHR ET AL. 1996, MATTEY & KRISTIANSSEN 1999, TSAO ET AL. 1999, STOTTMEISTER 2003, ANASTASSIADIS & REHM 2006, BEROVIC & LEGISA 2007):

1. Die Anfälligkeit von *A. niger* gegenüber der Anwesenheit von Schwermetallionen wie Mn^{2+} und Fe^{3+} erfordert deren Ausfällung aus der Zuckermelasse durch den Zusatz von Kalium- oder Natriumferricyanid vor dem Bioprozess. Bereits Eisenkonzentrationen von 1-1,5 mg/L und Mangankonzentrationen von 1-2 µg/L beeinflussen die Zellmorphologie des Schimmelpilzes, sodass anstelle des citronensäureproduzierenden kugelförmigen mikrobiellen Pellets die nichtproduzierende filamentöse Wuchsform gebildet wird. Wichtig ist auch die exakte Einstellung der Zinkkonzentration im Medium.
2. Die weitere Optimierung der industriellen Zuckergewinnungsprozesse führt tendenziell zu einer Senkung des verwertbaren Restzuckergehaltes in der Melasse auf 35-40 % (bei früher verwendeten Melassen war der Zuckergehalt 50 % und höher). Die in den Melassen enthaltenen Pestizide, Fungizide, Herbizide und Entschäumer von der Zuckerproduktion werden somit relativ angereichert, sind zudem meistens toxisch und beeinflussen den Bioprozess negativ.
3. Für die Citronensäuregewinnung hat sich im *Aspergillus*-Verfahren die Methode der Präzipitation etabliert (Beschreibung s. o.). Die Umweltschädlichkeit dieser Methode liegt in ihrer Abfallbilanz. Auf eine Tonne hergestellte Citronensäure fallen 13 m³ organisch belastete

Abwässer und 2,5 t trockene Abprodukte an, von denen 60 % Calciumsulfat (Gips) bildet. Dieses beinhaltet Kaliumferricyanid, Aktivkohle und organische Verbindungen aus Melassen, sodass es ungeeignet für die weitere Nutzung ist und entsorgt werden muss. Die Entsorgung auf Mülldeponien ist mit Kosten verbunden. Manchmal wird der Gips sogar ins Meer gepumpt. Es gibt allerdings Bemühungen, Methoden zur Reinigung dieses Gipses zu entwickeln, sodass dieser weiter als Baumaterial verwendet werden kann. Außer der Entsorgung von Gips gibt es noch ein weiteres Problem mit Abfällen. Das Filtrat aus der Präzipitation bei der Nachbearbeitung von Prozessen unter Verwendung von Melassen hat einen hohen biologischen Sauerstoffbedarf, sodass es nicht ohne vorherige Behandlung in Flüsse eingeleitet werden kann. Es gibt jedoch Ansätze für die weitere Nutzung dieser Abfälle, wie ihre Weiterverarbeitung zu Biokraftstoffen oder Futtermitteln.

4. Von verschiedenen Leistungstämmen von *A. niger* ist bekannt, dass sie toxikologisch nicht unbedenklich sind. Aspergillosen des Bedienungspersonals mit teilweise tödlichem Ausgang wurden bekannt. Die toxische Wirkung kann auch von Sporen ausgehen, die zur Animpfung benutzt werden.

Das klassische Citronensäureherstellungsverfahren mit *A. niger* ist verfahrenstechnisch weitestgehend optimiert, sodass keine entscheidenden Impulse hinsichtlich einer Senkung der oben beschriebenen Umweltbelastungen zu erwarten sind. Lediglich der Einsatz von teuren kohlenhydrathaltigen Rohstoffen mit höherem Reinheitsgrad anstelle von Melasse bietet das Potenzial für eine gewisse Umweltentlastung. Dieser Weg führt aber meist zu einer Verschlechterung der Wirtschaftlichkeit des Prozesses (STOTTMEISTER 2003).

Die Entsorgung der Abfälle bedeutet für die Citronensäurehersteller ein zunehmendes Problem, nicht nur aus Kostengründen, sondern auch vom regulatorischen Standpunkt her gesehen.

1.2.2 Citronensäureherstellung mit *Yarrowia lipolytica*

Mitte der 60er Jahre des 20. Jahrhunderts wurde entdeckt, dass auch bestimmte Hefen, konkret Vertreter der Gattungen *Candida* und *Yarrowia*, Citronensäure aus *n*-Alkanen (C9-C20-Fraktion) produzieren können (MATTEY & KRISTIANSEN 1999). In den 1970er und 1980er Jahren wurde in der Akademie der Wissenschaften der DDR in Leipzig die Citronensäureproduktion mit *Yarrowia lipolytica* aus *n*-Alkanen aus Erdöl erforscht (z. B. BEHRENS ET AL. 1981). Verglichen mit *A. niger* (100-140 g/L Citronensäure) wurde mit dieser Methode doppelt so viel Produkt (180-220 g/L Citronensäure) gewonnen. Die Nutzung von *n*-Alkanen als Kohlenstoffquelle wurde jedoch aus Kostengründen und niedriger

Akzeptanz der aus Erdöl hergestellten Citronensäure bald wieder eingestellt. Die Anwendung von *Y. lipolytica* hat damit aber kein Ende gefunden, da man feststellte, dass diese Hefe auch eine große Anzahl an anderen Substraten für die Citronensäurebildung nutzen kann. Neben den o. g. *n*-Alkanen können Pflanzenöle, tierische Fette, Stärkehydrolysate, Glucose, Galactose, Fructose, Ethanol, Acetat, Erythrol, Ribose, Mannitol und Glycerin eingesetzt werden. *Y. lipolytica* bildet keine Invertase und kann deswegen im Gegensatz zu *A. niger* keine Saccharose verwerten (BARTH & GAILLARDIN 1997). Dieser Nachteil wurde kürzlich mit Hilfe gentechnischer Modifizierung beseitigt (FÖRSTER ET AL. 2007). Die Hefen besitzen somit gegenüber *A. niger* eine größere Substratvarianz, die das Potenzial bietet, nach entsprechender Prozessoptimierung etwaige Preisschwankungen der Rohstoffe vorteilhaft auszugleichen.

Die Vorteile und Besonderheiten der Citronensäureproduktion mit *Y. lipolytica* liegen gegenüber der Verwendung von *A. niger* in folgenden Aspekten (MARSCHAL ET AL. 1977, HIRSCH 1981, MCKAY ET AL. 1994, BARTH & GAILLARDIN 1997, MATTEY & KRISTIANSEN 1999, MORESI & SAPPINO 2000, STOTTMEISTER ET AL. 2001, STOTTMEISTER 2003):

1. Die eingesetzten Produktionsstämme von *Y. lipolytica* besitzen eine hohe genetische Stabilität.
2. Die Zellen von *Y. lipolytica* sind weniger anfällig gegenüber Sauerstoffunterversorgung.
3. Mit *Y. lipolytica* können höhere Umwandlungsraten erreicht werden.
4. Im Bioprozess bei *Y. lipolytica* kann man im Gegensatz zu *A. niger* eindeutig eine Wachstumsphase von einer Produktbildungsphase unterscheiden. Das vereinfacht die Steuerung des Bioprozesses. Die Produktbildungsphase wird durch Stickstoff-, Phosphor- oder Schwefellimitierung ausgelöst.
5. Viele verschiedene Substrate können verwertet werden; der Einsatz von Mischsubstraten und Substratwechsel zwischen Wachstums- und Produktbildungsphase sind möglich. Außerdem werden höhere Substratanfangskonzentrationen als bei *A. niger* toleriert. Die niedrigere Empfindlichkeit von *Y. lipolytica* gegenüber der Anwesenheit von Metallionen, wie z. B. von Mangan, vereinfacht die Substratzubereitung.
6. Der pH-Wert des Prozesses ist milder als beim *Aspergillus*-Verfahren. Damit ist ein niedrigerer Aufwand für die Neutralisierung der Kulturbrühe verbunden. Die Citronensäure kann dann mit modernen Aufbereitungstechnologien wie z. B. Elektrodialyse mit bipolaren Membranen oder Extraktion isoliert werden.

7. Die Hefezellen besitzen eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischen Scherkräften. Deswegen kann bei der Kultivierung eine höhere Rührerdrehzahl eingestellt werden. Dadurch wird der Sauerstoffeintrag in die Kulturbrohe verbessert.

8. Produktionsstämme sind obligat thiaminauxotroph, benötigen aber keine komplexen Supplimente wie Hefeautolysat zum Wachstum.

9. *Y. lipolytica* wurde als nicht pathogen eingestuft.

Der Nachteil des *Yarrowia*-Verfahrens liegt in der Ausscheidung der Nebenprodukte Isocitronensäure (Abbildung 1) und Polyole bei der Citronensäureproduktion. Die Synthese von Polyolen, wie z. B. Mannitol, Arabitol und Erythritol, ist vom pH der Kulturlösung abhängig - mit steigendem pH-Wert nimmt ihre Produktion ab (ROEHR ET AL. 1996, MATHIAS 2007). Die Isocitronensäure ist zwar physiologisch unbedenklich, stört aber die Isolierung und Reinigung der Citronensäure und senkt die Ausbeuten und Produktivitäten des Bioprozesses bei der Citronensäureherstellung. Bereits ein Gehalt an produzierter Isocitronensäure von mehr als 5 % (bezogen auf Citronensäure) stört die Kristallisation während des Reinigungsprozesses (FÖRSTER ET AL. 2007). Die Isocitronensäure ist zudem kommerziell nicht interessant. Die Säureverhältnisse bei Hefen hängen von mehreren Faktoren ab, wie dem Hefestamm, dem Substrat, der Konzentration der Spurenelemente und dem pH-Wert des Mediums (RANE & SIMS 1993). Zum Beispiel erreicht das Verhältnis CS:ICS bei *n*-Alkanen 60:40, wobei bei Nutzung von Glucose oder Glycerol als Substrat weniger als 10 % Isocitronensäure (bezogen auf Gesamtsäure) entsteht (TRÉTON ET AL. 1978). Die Selektivität für Citronensäure kann aber beeinflusst werden, indem z. B. Eisen im Medium minimiert wird oder Inhibitoren des Enzyms Aconitase (z. B. Monofluoracetat oder 2,4-Dinitrophenol) benutzt werden. Die letztere Variante ist jedoch nicht für die Großproduktion geeignet. Es wurden auch Mutanten mit niedrigerer Aconitaseaktivität selektiert. Eine komplette Inaktivität der Aconitase wäre allerdings letal (MATTEY 1999).

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass die Hefen für die industrielle Citronensäureproduktion bereits Anwendung finden. BEROVIC & LEGISA (2007) wiesen daraufhin, dass in Asien das Submersverfahren mit verschiedenen Hefestämmen genutzt wird. FÖRSTER (2007) berichtete über hefegestützte Citronensäureproduktion aus Stärkehydrolysaten in den USA. MATTEY & KRISTIANSEN (1999) prognostizierten, dass die hefebasierte Citronensäureherstellung für die nächsten neuen Produktionsanlagen die Methode der Wahl sein wird.

In den letzten Jahren wächst das Interesse an der Nutzung von landwirtschaftlichen Produkten und ihren Abfällen (z. B. Trester von Mais, Äpfeln, Weintrauben, Ananas, Mandarinen, Orangen, Brauereiabfälle, Schalen von Zitrusfrüchten und Kiwi, Abwasser aus Ölmühlen) als

alternative Kohlenstoffquelle für die Citronensäureproduktion. Die Industrie sucht nach neuen und billigen Prozesstechnologien (SOCCOL ET AL. 2006, PAPANIKOLAOU ET AL. 2007).

Die Größe des Citronensäuremarktes ist massiv und wächst immer weiter, größtenteils aufgrund des expandierenden Lebensmittel- und Getränkemarktes in Entwicklungsländern, aber auch aufgrund der wachsenden Nutzung von Citratsalzen (hauptsächlich Calciumsalze) in gesundheitsbezogenen Verbrauchsgütern (GOLDBERG ET AL. 2006).

1.3 Yarrowia lipolytica

Die Hefeart *Yarrowia lipolytica* van der Walt et von Arx (Abbildung 2) ist der einzige Vertreter der Gattung *Yarrowia* und wurde im Jahr 1980 beschrieben, indem sie von der anamorphen Art *Candida lipolytica* van der Walt und von Arx abgeleitet wurde (ŠILHÁNKOVÁ 1995, www.vscht.cz). *Y. lipolytica* gehört zu den sog. nicht-konventionellen Hefen (in diese Gruppe gehören alle Hefearten außer *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*). Taxonomisch zählt *Y. lipolytica* zu den Ascomyceten, unterscheidet sich aber von anderen Mitgliedern dieser Gruppe durch den hohen Guanin- und Cytosingehalt sowie durch eine ungewöhnliche Struktur der rDNA und Fehlen der RNA Polymerase I Konsensussequenzen (BARTH & GAILLARDIN 1997). In der Literatur kann man diese Hefe auch unter dem Namen *Candida lipolytica*, *Endomycopsis lipolytica* oder *Saccharomycopsis lipolytica* finden.

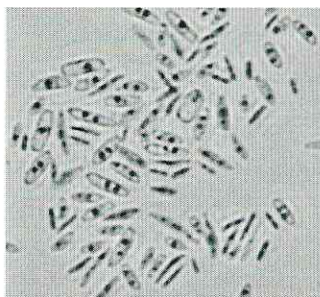


Abbildung 2: Mikroskopische Aufnahme von *Yarrowia lipolytica* H222 im Medium nach THIERSCH (1987) mit Glucose als Kohlenstoffquelle. 1000x vergrößert.

Y. lipolytica wurde aus Margarine isoliert, daher kommt auch ihr Name (griechisch λίπος bedeutet Fett und λύσις heißt Lösung) (MATTEY 1999). Sie ist aber auch in Milchprodukten und Salaten, die Fleisch und Garnelen beinhalten, zu finden. Aufgrund ihres streng aeroben Metabolismus ist *Y. lipolytica* aus den Milchprodukten einfach zu entfernen (BARTH & GAILLARDIN 1997).

Die obligat aerobe Hefe *Y. lipolytica* ist ein dimorpher Pilz, der während des vegetativen Wachstums Einzelzellen, Pseudomyzel oder ein echtes Myzel, das aus septierten Hyphen

besteht, bildet. Diese Hyphen sind 3 bis 5 µm breit und können bis mehrere Millimeter lang werden (BARTH & GAILLARDIN 1997). Die Morphologie der Hefe hängt vom Ernährungszustand der Hefe und von den Umgebungsbedingungen ab und kann sich während einer Batch-Fermentation verändern (MATTEY 1999, PAPANIKOLAOU ET AL. 2002). Ihre Zellen sind länglich oval bis fast zylindrisch. Sie bildet weiße bis cremig matte sich ausbreitende Kolonien.

Yarrowia lipolytica ist thiaminauxotroph. Ist kein Thiamin im Medium vorhanden, werden Oxosäuren, hauptsächlich 2-Oxoglutarat und Pyruvat, produziert und die Ausbeute von Citronensäure sinkt. Der Grund für diese Auxotrophie wurde bis dato nicht geklärt (MATTEY 1999).

Umfassende Übersichten zu *Y. lipolytica* wurden von HESLOT (1990), BARTH & GAILLARDIN (1997) und BARTH ET AL. (2003) gegeben.

Y. lipolytica kann eine Vielzahl an Substraten verwerten (s. Kapitel 1.2). In ihrer natürlichen Form kann sie aber keine Saccharose als Substrat nutzen, da sie das Saccharose spaltende Enzym Invertase nicht ausscheidet. Um die Nutzung von Saccharose als Standardsubstrat des *Aspergillus*-Verfahrens für Citronensäureherstellung mit der Hefe zu ermöglichen, wurde *Y. lipolytica* gentechnisch modifiziert. So ist ein rekombinanter Stamm *Yarrowia lipolytica* H222-S4(p67ICL1) T5 (*MATA [SUC2] ICL1 multicopy*) entstanden. Dieser wurde in der AG Mikrobiologie der TU Dresden entwickelt. Der Stamm wurde in zwei Aspekten gentechnisch modifiziert (AURICH & STOTTMEISTER 2002, AURICH ET AL. 2003a, FÖRSTER 2006, FÖRSTER ET AL. 2007). Um die Verwertung von Saccharose zu ermöglichen, wurde in das Genom des Wildtypstammes *Yarrowia lipolytica* H222 eine Kopie der Expressionskassette pXPR2-SUC2 integriert, sodass der erhaltene Stamm das *ScSUC2*-Gen (kodiert die extrazelluläre Invertase aus *Saccharomyces cerevisiae*) unter Kontrolle der Promotor- und Sekretionssequenzen des homologen XPR2 Gens der alkalischen extrazellulären Protease AEP enthält. Die weitere gentechnische Modifizierung zielte auf die Verbesserung der Selektivität des Bioprozesses für Citronensäure durch Reduzierung der Produktion von Isocitronensäure ab. Dies wurde durch die Erhöhung der Kopiezahl des für die Isocitratlyase kodierenden ICL1 Genes erreicht.

MANSFELD ET AL. (1995) haben eine andere Strategie für die Nutzung von Saccharose zur Citronensäuresynthese durch den Wildtypstamm *Y. lipolytica* EH59 untersucht. Die Autoren immobilisierten die Hefe mit dem Enzym Invertase und führten eine kontinuierliche Kultivierung über 800 bis 1000 Stunden durch. Die Produktivität für Citronensäure war allerdings in dieser Kombination mit 0,014 g/(L*h) sehr niedrig.

1.4 Überproduktion von Citronensäure in Pilzen

Die Stoffwechselwege, die an der Citronensäuresynthese beteiligt sind, sind in ihren Grundeigenschaften bei beiden citronensäureproduzierenden Mikroorganismen - *A. niger* und *Y. lipolytica* - ähnlich (die biochemischen Stoffwechselwege bei *Y. lipolytica* sind in Abbildung 3 dargestellt). Unterschiede gibt es eher auf der Ebene der Auslösung und Regulation der Citronensäuresynthese als in ihrem Mechanismus (ANASTASSIADIS & REHM 2005). Der Mechanismus der Überproduktion von Citronensäure in *A. niger* wurde weitestgehend untersucht, trotzdem wurden bis heute einige Aspekte bezüglich der Akkumulation und Ausscheidung von Citronensäure nicht ausreichend geklärt.

Die Akkumulation von Citronensäure ist ein Resultat einer induzierten Abnormalität im Metabolismus der Pilzzelle auf der Ebene des Tricarbonsäurezyklus. Es gibt drei metabolische Ereignisse, die diesen Zyklus mit Intermediaten versorgen und die die Zelle zur Überproduktion prädisponieren (KARAFFA & KUBICEK 2003, BEROVIC & LEGISA 2007):

- schnelle Aufnahme von Glucose,
- uneingeschränkter metabolischer Fluss durch Glykolyse,
- abgekoppelte NADH Reoxidierung.

Die Transportprozesse, wie die Substrataufnahme, Ausscheidung von Citronensäure oder der Transport zwischen Cytosol und Mitochondrien, sind ein ausschlaggebender Engpass für die Citronensäureproduktion (SAUER ET AL. 2007). Bei beiden Mikroorganismen wurde nachgewiesen, dass für den Transport von Glucose in die Zelle wenigstens zwei Transportsysteme zur Verfügung stehen, die sich voneinander in ihrer Affinität zur Glucose unterscheiden (KARAFFA & KUBICEK 2003). Beide Transporter gewährleisten anscheinend eher eine erleichterte Diffusion als aktiven Transport (LEGIŠA & MATTEY 2007). Allerdings gibt es Vermutungen, dass Glucose auch durch einfache Diffusion in die Zelle gerät (PAPAGIANNI ET AL. 1999, BEROVIC & LEGISA 2007). Diese Theorie würde erklären, warum die Glucoseaufnahme auch bei hohen Citronensäurekonzentrationen ungehemmt bleibt, obwohl nachgewiesen wurde, dass beide Glucosetransporter von Citronensäure inhibiert werden (TORRES ET AL. 1996).

Der Transport von Fructose in die Pilzzelle wurde bis jetzt nicht ausreichend untersucht. Es wurde allerdings festgestellt, dass die Fructoseaufnahme bei manchen Stämmen von *A. niger* ausbeutelimittierend ist (KARAFFA & KUBICEK 2003).

Der Transport von Citronensäure ins Medium wurde bis jetzt auch noch nicht vollkommen geklärt. Den Behauptungen, dass es sich um einen Energie fordernden Prozess handelt (in MATTEY 1999 und ANASTASSIADIS & REHM 2005), steht die Theorie von KULAKOVSKAYA ET

AL. (1994) und BURGSTALLER (2006) gegenüber, dass der Prozess der Citronensäureausscheidung nicht energiebedürftig ist. BURGSTALLER (2006) führte thermodynamische Berechnungen durch und wies nach, dass bei *A. niger* passiver Transport für die Citronensäureausschüttung ausreichen sollte. KARAFFA & KUBICEK (2003) meinten demgegenüber, dass die Tatsache, dass die Citronensäure gegen das Konzentrationsgefälle transportiert werden muss (im Zellinneren ist die Citronensäurekonzentration 4-10 mM), die Theorie des aktiven Transportes mit Hilfe citratspezifischer Permeasen unterstützt. ANASTASSIADIS & REHM (2005) bezeichneten die Citronensäureausscheidung als den wichtigsten geschwindigkeitsbestimmenden Faktor der Citronensäureüberproduktion bei Hefen.

Der uneingeschränkte metabolische Fluss durch die Glykolyse ist eine der Bedingungen der schnellen Synthese von Citronensäure. Die Geschwindigkeit der Glykolyse wird in eukaryotischen Organismen durch das allosterische Enzym Phosphofructokinase I (ATP-abhängig) reguliert. Ein starker Inhibitor dieses Enzyms ist gerade die Citronensäure (VODRÁŽKA 1992). Bis vor Kurzem wurde für *A. niger* vermutet, dass der inhibierende Effekt von Citronensäure durch Ammonium gedämpft wird (ARTS ET AL. 1987). Diese Hypothese wurde aber von PAPAGIANNI (2007) widerlegt, der feststellte, dass während der Citronensäureproduktion in der Zelle nur niedrige Konzentrationen von Ammonium vorhanden sind. LEGISA & MATTEY (2007) beschrieben eine posttranslationale Modifikation von Phosphofructokinase I in *A. niger*, die eine Spaltung des Enzyms und seine Phosphorylierung beinhaltet. Das Fragment ist hochaktiv und einerseits stark induzierbar durch Ammonium, andererseits aber weniger beeinflussbar durch Citronensäureinhibierung. Auch bei *Y. lipolytica* wurde festgestellt, dass diese Inhibierung sehr schwach ist (SOKOLOV ET AL. 1996). Damit wurde geklärt, warum die Glykolyse an dieser Stelle nicht gehemmt wird. Der Kontrollpunkt der Glykolyse wird somit im Medium mit hohen Glucosekonzentrationen zur Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (PEKSEL ET AL. 2002) verschoben.

Am Ende der Glykolyse entstehen aus einem Mol Glucose zwei Mol Pyruvat, die auf unterschiedliche Weise weiter verarbeitet werden. Aus einem Mol Pyruvat wird mit Hilfe von Pyruvatdehydrogenase Acetyl-CoA produziert und das andere Mol Pyruvat wird mit Hilfe einer anaplerotischen Reaktion unter Beteiligung von Pyruvatcarboxylase zu Oxalacetat umgewandelt. Durch die Verbindung dieser beiden Moleküle, die von Citratsynthase katalysiert wird, entsteht die Citronensäure. Es handelt sich um eine im Citratzyklus einzigartige Reaktion, in der eine Verbindung zwischen zwei Kohlenstoffen entsteht. Das

Oxalacetat für die Citronensäuresynthese kann außerdem auch aus dem Tricarbonsäurezyklus als sein Zwischenprodukt geliefert werden (MATTEY 1999). Die Pyruvatcarboxylase, die sich in Säugetieren und anderen eukaryotischen Organismen im Mitochondrion befindet, ist bei manchen (auch citronensäurebildenden) Pilzen im Zytosol gelegen, da ihr das mitochondrial-targeting Peptid fehlt. Diese Lokalisierung scheint eine wichtige Rolle für die Fähigkeit dieser Organismen zu spielen, hohe Konzentrationen an organischen Säuren anzureichern (GOLDBERG ET AL. 2006). Zusammen mit zytosolischem Malatdehydrogenase-Isoenzym katalysiert die Pyruvatcarboxylase die Umwandlung von Pyruvat zuerst zu Oxalacetat, wobei das Kohlenstoffdioxid, das entweder von Pyruvatdehydrogenase freigesetzt wurde oder aus der Luft fixiert wurde, genutzt wird, und schließlich zu Malat. Während der Citronensäureproduktion ist die Fixierung von CO_2 , katalysiert mit Pyruvatcarboxylase, eine wichtige anaplerotische Reaktion - Malat, das sich zum Zeitpunkt der Citronensäureanreicherung in erhöhter Konzentration in Zytosol befindet und diese vermutlich sogar auslöst, dient als Gegenion für den Citronensäureexport aus dem Mitochondrion mit Hilfe eines Tricarbonsäure-Transporters (Malat-Citrat Antiport) (GOLDBERG ET AL. 2006, BEROVIC & LEGISA 2007). Die im Mitochondrion produzierte Citronensäure wird also entweder von Aconitase weiter verstoffwechselt oder vom Tricarbonsäure-Transporter abtransportiert. Es wurde nachgewiesen, dass Aconitase eine viel niedrigere Affinität für Citronensäure aufweist, als es beim Tricarbonsäure-Transporter der Fall ist. Somit zeigt sich die ausreichende Lieferung von Malat für den Abtransport von Citronensäure aus dem Mitochondrium als ausschlaggebend. Diese Schlussfolgerung wurde bis jetzt experimentell nicht bestätigt (KARAFFA & KUBICEK 2003).

Auch die Eigenschaften der NAD^+ -abhängigen Isocitratdehydrogenase, die im Tricarbonsäurezyklus Isocitrat zu 2-Oxoglutarat umwandelt, sind wahrscheinlich entscheidend für die Citronensäureanreicherung. Das Isocitrat spaltende Enzym wird durch AMP allosterisch geregelt und durch ATP inhibiert. Infolge der N-, P- oder S-Limitation ist das ATP/AMP-Verhältnis in der Zelle im Laufe der Produktbildungsphase hoch und wird mit Hilfe der Bildung von energiereichen Metaboliten in Kombination mit der Drosselung des Wachstums und somit auch der Energieausnutzung aufrechterhalten (MCKAY ET AL. 1994, MATTEY 1999).

Es gibt noch einen anderen Weg der Weiterverarbeitung von Isocitronensäure - den Glyoxylatzyklus. Hier ist das Isocitrat spaltende Enzym Isocitratlyase involviert. Der Weg des Abbaus der Isocitronensäure ist durch die unterschiedlichen Aktivitäten der beiden Enzyme Isocitratdehydrogenase und Isocitratlyase geregelt. Ein Aktivitätsanstieg eines Enzyms hat

den Aktivitätsabfall des anderen Enzyms zu Folge. Der Glyoxylatzyklus wird allerdings hauptsächlich dann in Anspruch genommen, wenn Acetat oder andere C₂-Quellen und aliphatische Verbindungen als Substrat genutzt werden (THIERSCH 1987, ANASTASSIADIS & REHM 2005).

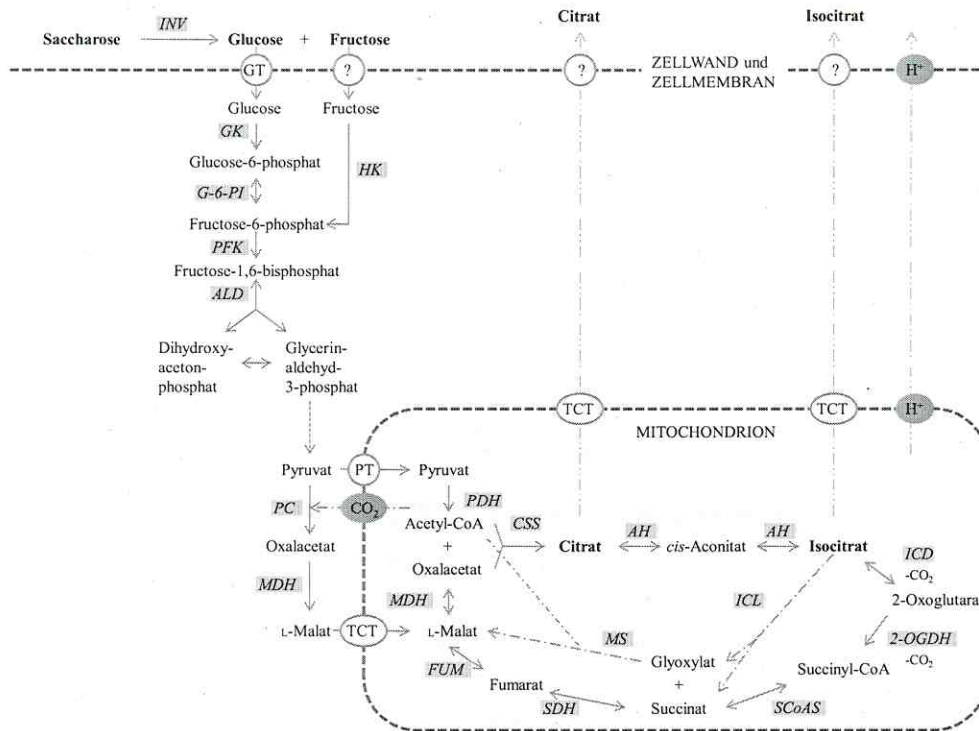


Abbildung 3: Vereinfachtes Modell zur Darstellung des Metabolismus bei der Überproduktion von Citronensäure in Pilzen. AH - Aconitathydratase, Aconitase; ALD - Aldolase; CSS - Citratsynthase; FUM - Fumarase; G-6-PI - Glucose-6-Phosphat-Isomerase; GK - Glucokinase; GT - Glucose-Transporter; HK - Hexokinase; ICD - NAD-abhängige Isocitratdehydrogenase; ICL - Isocitratlyase; INV - Invertase; MDH - NAD-abhängige Malatdehydrogenase; MS - Malatsynthase; 2-OGDH - NAD-abhängige 2-Oxoglutaratdehydrogenase; PC - Pyruvatcarboxylase; PDH - NAD-abhängige Pyruvatdehydrogenase; PFK - Phosphofructokinase; PT - Pyruvat-Transporter; SCoAS - Succinyl-CoA Synthetase; SDH - FAD-abhängige Succinatdehydrogenase; TCT - Tricarboxylat-Transporter.

In *A. niger* wird die Citronensäureproduktion durch eine hohe Tension des gelösten Sauerstoffs stimuliert. Es wurde die Existenz eines alternativen respiratorischen Weges nachgewiesen, der für die Reoxidierung von glykolytischem NADH sorgt. Das hierfür zuständige Enzym ist die sog. „alternative“ Oxidase, die in citratproduzierenden Stämmen wahrscheinlich konstitutiv vorhanden ist und die die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser katalysiert. Diese erfolgt ohne Translokation der Protonen über die mitochondriale Membran und ist damit ein nicht-Energie-konservierender Teil der respiratorischen Elektronenkette. Die Anwesenheit der abgekoppelten NADH-Reoxidierung hat einen niedrigeren Gehalt an ATP

zur Folge und bremst daher auch anabolische Reaktionen (ROEHR ET AL. 1996, BEROVIC & LEGISA 2007).

Es ist offensichtlich, dass die Fähigkeit der Pilze, Citronensäure im Medium in großen Mengen anzureichern, vom empfindlichen Gleichgewicht zahlreicher Faktoren abhängt. Ihr Zusammenhang wurde allerdings bis jetzt noch nicht vollkommen verstanden (WOLSCHEK & KUBICEK 1999).

1.5 Verfahrenstechnische Herausforderungen bei der Citronensäuresynthese mit *Yarrowia lipolytica*

Untersuchungen mit *Y. lipolytica* und anderen citronensäurebildenden Hefearten zeigten, dass die gewählten Bedingungen während der Kultivierung (pH-Wert, Temperatur, Konzentration der Stickstoffquelle) einen entscheidenden Einfluss auf die Wachstums- und Produktbildungskinetik und die ausgeschiedenen Produkte (vor allem das Verhältnis Citronensäure:Isocitronensäure) haben.

In der Literatur werden verschiedene pH-Werte für die Citronensäureproduktion aus Glucose angegeben: pH 4,7 (BRIFFAUD & ENGASSER 1979), pH 5,0 (ENZMINGER & ASENJO 1986, MORESSI 1994, ANTONUCCI ET AL. 2001, ANASTASIADIS ET AL. 2002), pH 5,5 (WOJTATOWICZ 1991, RANE & SIMS 1995) und pH 6,0 (AIBA & MATSUOKA 1979). Auch die Temperatur variiert bei verschiedenen Autoren von 27 °C (RANE & SIMS 1995) bis zu 30 °C (AIBA & MATSUOKA 1979, MORESSI 1994). Ebenso werden verschiedene Konzentrationen der Stickstoffquelle im Produktionsmedium benutzt: 2 g/L NH₄Cl (RANE & SIMS 1993), 3 g/L NH₄Cl (RYMOWICZ & CIBIS 2006), 5 g/L NH₄NO₃ (BRIFFAUD & ENGASSER 1979) und 6 g/L NH₄Cl (ISKE ET AL. 1983, WOJTATOWICZ 1991). Aufgrund der unterschiedlichen Angaben ist es wichtig, die optimalen Bedingungen in ihrem Zusammenhang für das Wachstum und die Produktbildung von Citronensäure mit der Hefe *Y. lipolytica* zu ermitteln.

Der Einfluss des Gelöstsauerstoffs auf Citronensäureproduktion mit *Y. lipolytica* wird in der Literatur umfangreich diskutiert (z. B. ANASTASIADIS & REHM 2006, KAMZOLOVA ET AL. 2003, RANE & SIMS 1994 und 1995, RYMOWICZ & LENART 2004). Aus diesem Grund kann auf die Ermittlung des optimalen pO₂ verzichtet werden.

Entscheidend für die Qualität der hergestellten Citronensäure und die Effektivität des Prozesses ist die Verfahrensführung. Verschiedene Fermentationsmethoden können auch beim gleichen Stamm zu unterschiedlichen Produktausbeuten führen (SOCCOL ET AL. 2006). In der Literatur wurden für die Citronensäureproduktion diverse Prozessführungsstrategien mit verschiedenen Substraten beschrieben: z. B. Fed-Batch mit Glucose (RANE & SIMS 1995)

und *n*-Paraffinen (CROLLA & KENNEDY 2004), Repeated Batch mit Glucose (RYWINSKA ET AL. 2008), Glycerol (RYMOWICZ ET AL. 2007) und mit Ethanol (ARZUMANOV ET AL. 2000), zweistufiges Repeated Fed-Batch mit Ethanol (CHANG ET AL. 1998), kontinuierliche Prozessführung mit Glucose (im Chemostat in ANASTASSIADIS ET AL. 2005 und KLASSON ET AL. 1989 oder mit Zellrücklauf in ENZMINGER & ASENJO 1986) und mit Ethanol (FINOGENOVA ET AL. 2002).

Darüber hinaus wurden Versuche mit immobilisierter *Y. lipolytica* durchgeführt (z. B. BRIFFAUD & ENGASSER 1979, STOTTMEISTER 1979, MADDOX & KINGSTON 1983, KAUTOLA ET AL. 1991, KIM & ROBERTS 1991, RYMOWICZ ET AL. 1993 und MANSFELD ET AL. 1995). MANSFELD ET AL. (1995), die *Y. lipolytica* EH 59 in Polyelektrolytkomplex-Mikrokapseln immobilisiert haben, gaben an, dass die abgekapselte Hefe mit 0,125 g/(L*h) eine niedrigere Produktivität auswies als freie Zellen ($P_{CS} = 0,25 \text{ g/(L*h)}$). Zum gleichen Ergebnis gelangten auch MADDOX & KINGSTON (1983), die *S. lipolytica* IFO 1658 in Polyakrylamidgel immobilisiert haben. Die Autoren stellten allerdings fest, dass die Prozedur der Immobilisierung keine Aktivitätsverluste der Hefe verursacht hat. Als Grund für die niedrigere Aktivität der immobilisierten Hefezellen wurden physikalische bzw. chemische Eigenschaften ihrer Umgebung genannt. Anders interpretierten KIM & ROBERTS (1991) die niedrigeren Ausbeuten der immobilisierten Kultur, die die Ursache in der vierstündigen Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr während der Immobilisierung (auf Glasperlen) sahen. Außerdem fanden sie heraus, dass immobilisierte Zellen nur 71 % der Glucoseaufnahmerate im Vergleich mit freien Zellen aufweisen, da die immobilisierten Zellen weniger freie Fläche für die Glucoseaufnahme zur Verfügung haben. Auch bei anderen Autoren, wie z. B. KAUTOLA ET AL. (1991) (Batch Modus mit Immobilisierung von *Y. lipolytica* A-101 auf Alginat-Beads, $P_{CS} = 0,155 \text{ g/(L*h)}$) oder BRIFFAUD & ENGASSER (1979) (Immobilisierung von *S. lipolytica* D 1805 auf Holzspänen, $p_{CS} = 0,025 \text{ h}^{-1}$) lagen die Produktivitäten nicht hoch genug, damit diese Methode industriell angewendet werden könnte.

Batch-Kultivierungen stellen noch immer die vorherrschende Prozessführungsstrategie in der biotechnologischen Industrie dar. Trotzdem zeigen kontinuierliche oder semikontinuierliche Verfahren einige Vorteile, v. a. wenn das Produkt vom high volume – low value Typ ist, wie es bei der Citronensäure auch der Fall ist. Zu den größten Vorteilen gehören die erhöhten Produktivitäten, geringerer Arbeitsaufwand und die Tatsache, dass diese Verfahren kostengünstiger sind. Allerdings ist ein einfacher Chemostat ohne Zellrückführung nicht für die Produktion von Citronensäure aus Hefen geeignet. Aufgrund des stickstofflimitierenden Mediums findet kein oder nur begrenztes Zellwachstum statt und die Hefe würde einfach aus

dem Fermenter ausgewaschen werden (RANE & SIMS 1995, ARZUMANOV ET AL. 2000). Außerdem dauert bei kontinuierlichen Kulturen die Einstellung des stationären Zustandes manchmal mehrere Monate, wobei die Einhaltung der Sterilität über so lange Zeit wie auch die für die kontinuierliche Prozessführung erforderliche komplizierte Instrumentation ein erhebliches Problem bedeuten können (ANASTASSIADIS ET AL. 2008).

Fed-Batch Kultivierung (Zulaufkultivierung) wird breit angewendet, um verschiedene Bioprodukte wie die Metaboliten des primären und sekundären Metabolismus, Proteine und andere Biopolymere zu produzieren (LEE ET AL. 1999). Meistens beginnt eine Fed-Batch Fermentation mit einem reduzierten Kulturvolumen im Batch-Betrieb. Nach Verbrauch der limitierenden Substratquelle erfolgt ein Zulauf von frischem Substrat bis das maximale Reaktorvolumen voll ausgenutzt wird oder eine Produkthemmung auftritt. Vor allem in industriellen Prozessen wird die semikontinuierliche Betriebsführung immer dann eingesetzt, wenn entweder aufgrund metabolischer Regulation ein Batch-Betrieb mit hohen Anfangskonzentrationen unerwünscht ist, oder wenn die Nachteile der Totzeiten im Batch-Betrieb ökonomisch nicht tragbar sind. Das ist der Fall bei Massenprodukten, wo die sich ändernde Substratkonzentration einen erheblichen Einfluss auf die Produktivität und Ausbeute des gewünschten Produktes hat (CHMIEL 2006). Wenn die Über- bzw. Unterfütterung des Nährstoffes schädlich für das Zellwachstum und die Produktbildung sind, ist die Entwicklung geeigneter Nachdosierungsstrategien in Fed-Batch Kultivierungen ausschlaggebend. Es gibt unterschiedliche Methoden der Steuerung/Regelung der Substratnachdosierung. In indirekt geregelten Zulaufverfahren wird der Zulauf des Substrats über Prozessparameter wie pO_2 , pH, Respirationquotient, O_2 - oder CO_2 -Konzentrationen oder die Zellkonzentration geregelt. Direkt geregelte Verfahren basieren auf Glucoseverbrauch bzw. -bedarf (LEE ET AL. 1999). Hierzu sind allerdings online-Messungen der Glucosekonzentration während der Fermentation notwendig. Eine schnelle und kostengünstige Methode dieses Nachweises bieten quasi-online Messsysteme mit Biosensoren. Obwohl bereits in früheren Jahren der Einsatz von Biosensoren in der Bioverfahrenstechnik gezeigt wurde (z. B. BROOKS ET AL. 1987, RENNEBERG ET AL. 1991, GRÜNDIG ET AL. 1993 und KIM ET AL. 1994), wurde über die Anwendung für eine online-Regelung der Glucosekonzentration im Bioprozess zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* in der Literatur bisher nicht berichtet.

Das Prinzip eines Biosensors beruht auf der direkten räumlichen Kopplung der immobilisierten biologischen Komponente zur Erkennung der nachzuweisenden Substanz mit einem Signalumwandler und einem elektronischen Verstärker (APPELQVIST & HANSEN 1990). Mit Hilfe der Erkennungsreaktion des biologisch aktiven Rezeptors (z. B. des Enzyms)

werden z. B. Substrate in Bioprozessen (wie Saccharose oder Glucose) erkannt und quantifiziert. Je nach Konzentration entsteht ein messbares Signal, das auf unterschiedliche Weise (z. B. amperometrisch) detektiert wird.

Das Funktionsprinzip eines Glucosebiosensors auf der Basis des Enzyms β -D-Glucoseoxidase (EC 1.1.3.4) beruht auf der katalytischen Oxidation der β -D-Glucose. Dabei entstehen D-Glucono- δ -lacton, das sofort zu Gluconsäure hydrolysiert, und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Dieses kann durch anodische Oxidation u. a. in zwei Elektronen umgesetzt werden, die amperometrisch detektiert werden. Für die Messung von Saccharose werden drei Enzyme gleichzeitig genutzt. Katalysiert durch Invertase entstehen aus Saccharose β -D-Fructose und α -D-Glucose. Die α -D-Glucose wird mit Hilfe von Mutarotase weiter in β -D-Glucose umgewandelt, die wie beim Glucosebiosensor von der β -D-Glucoseoxidase in Glucono- δ -lacton hydrolysiert wird. Die Detektion erfolgt ebenfalls amperometrisch. Die in Realproben vorhandene Glucose wird gleichzeitig erfasst, sodass eine parallele Messung von Glucose und die entsprechende Korrektur der Messergebnisse erforderlich sind.

In modernen Biosensoren wird das Enzym auf der Arbeitselektrodenoberfläche immobilisiert, sodass ein reagenzloses Messregime erreicht wird, das v. a. für die biosensorgestützten online-Messungen in Bioreaktoren wichtig ist (SCHELLER & SCHUBERT 1989, HALL 1995).

Als ausgezeichnetes Instrument für die kontinuierliche online-Messung von fermentativen Prozessen hat sich das FIA-Prinzip (flow injection analysis, Fließinjektionsanalyse) in Kombination mit enzymatischen Biosensoren erwiesen (RENNEBERG ET AL. 1991). Die Fließinjektionsanalyse beruht auf dem Transport eines definierten Flüssigkeitssegments, das aus einer zellfreien Probe besteht, mittels eines Transportvolumenstromes zu einem Detektor. Das definierte Probevolumen wird durch eine Probeschleife erzeugt und durch Umschalten eines Injektionsventils mit dem Trägerstrom weitergeleitet. Dank der Fließinjektionsanalyse ist es möglich, die Biosensoren für die schnelle Messung der Substratkonzentration zu nutzen, ohne dass diese in-situ sterilisiert werden müssen.

Für die Nutzung von Biosensoren in der Bioprozessführung ist die Erfüllung folgender Voraussetzungen erforderlich: schnelle Messung, präzise Detektion, hohe Selektivität, keine Interferenzen, gute Stabilität, Einhaltung der Sterilität des zu beobachtenden Prozesses, niedriger Einstandspreis (APPELQVIST & HANSEN 1990, MAO ET AL. 2008). Da diese Bedingungen nicht einfach umzusetzen sind, finden die Biosensoren in der online-Regelung der Bioprozesse trotz ihres großen Potenzials bis jetzt nur minimale Anwendung. Einen entscheidenden Impuls für die Nutzung von Biosensoren in der biotechnologischen Industrie kann die von der amerikanischen FDA im Jahr 2002 gestartete Initiative „Process Analytical

Technology“ (PAT) bringen. Diese soll u. a. Anreize zur Optimierung der bestehenden Herstellungsprozesse durch qualitative und quantitative Analyse während des laufenden Prozesses geben. Es werden Sensorsysteme mit dem Schwerpunkt auf Nicht-Invasivität, Realzeitberücksichtigung und Einfachheit gefordert. Aus diesem Aspekt scheint den Biosensoren die Zukunft zu gehören.

1.6 Zielstellung der Arbeit

Die etablierte Methode der Herstellung von Citronensäure mit dem Schimmelpilz *A. niger* ist aufgrund ihrer schlechter Abfallbilanz und der ungünstigen Eigenschaften des Mikroorganismus wenig zukunftsfähig. Eine mögliche Alternative bietet das Verfahren mit der Hefe *Y. lipolytica*. Obwohl auf diesem Gebiet bereits viel erforscht wurde, ist das Produktionsverfahren noch nicht reif für die industrielle Anwendung. Die meisten publizierten Ergebnisse wurden in Schüttelkolben, bzw. in 1 bis 2-L Bioreaktoren gewonnen, es gibt keine Einheiten in den Produktionsbedingungen. Das Ziel dieser Dissertation war es, das Verfahren zu optimieren und im halbertechnischen Maßstab geeignete Prozessführungsstrategien zu ermitteln.

Die wichtigsten Zielstellungen im Rahmen dieser Doktorarbeit waren:

1. Optimierung der wesentlicher Wachstums- und Produktionsparameter des Bioprozesses für die Citronensäureherstellung mit dem Hefestamm *Y. lipolytica* H222 aus Glucose.

Dazu soll das Optimum für pH und Temperatur während der Wachstums- und Produktbildungsphase als auch die günstigste Biomassekonzentration ermittelt werden. Die Substrathemmung und Produktinhibierung sollten untersucht werden.

2. Entwicklung und Optimierung einer weitestgehend automatisierten Prozessführung der Citronensäuregewinnung mit dem Hefestamm *Y. lipolytica* H222 aus Glucose.

Es sollten effiziente Nachdosierungsstrategien mit direkter Feedback-Kontrolle für den Substratverbrauch durch Biosensor-online-Messung und -Regelung für den Bioprozess mit dem Wildtypstamm *Y. lipolytica* H222 und Glucose als Substrat entwickelt werden.

3. Erweiterung des Substratspektrums auf Glucosesirup und Saccharose.

Die Eignung der Biosensor-online-Regelung für die Anwendung von Stärkehydrolysaten als Substrat für die Citronensäureherstellung mit dem Wildtypstamm *Y. lipolytica* H222 sollte überprüft werden. Die bereits optimierten Prozessbedingungen und entwickelten Prozessführungsstrategien sollten auf den Bioprozess der Citronensäureproduktion mit dem rekombinanten Stamm *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1) übertragen und angepasst

- werden. Die Möglichkeit der Nutzung von Biosensoren für die Regelung dieses Bioprozesses sollte überprüft werden.
4. Erstellung eines Modells zur Beschreibung des Bioprozesses der Citronensäureherstellung aus Glucose mit *Y. lipolytica* H222.
Ein unsegregiertes und unstrukturiertes Modell zur Beschreibung des Bioprozesses der Citronensäureproduktion aus Glucose im Batch- und Fed-Batch Modus sollte entwickelt werden.
 5. Wirtschaftlichkeitsanalyse der Verfahren zur Citronensäureherstellung
Der Vergleich des etablierten Verfahrens der Citronensäureproduktion mit dem Schimmelpilz *A. niger* und des alternativen Verfahrens mit der Hefe *Y. lipolytica* sollte unter Einbeziehung der in der Arbeit durchgeführten Verfahrensoptimierungen erstellt werden. Darüber hinaus sollte der Ansatz verschiedener Substrate für die Citronensäuresynthese mit *Y. lipolytica* ökonomisch beurteilt werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Geräte

- UV/VIS Spektrophotometer: Ultraspec 3100 pro, Amersham Biosciences, Fairfield, USA
- Waagen: BP 2100 und BP 221S, Sartorius AG, Göttingen
- Brutschrank Heraeus, Hanau
- Schüttler: KS-15 CONTROL und SM-30 CONTROL, Edmund Bühler GmbH, Tübingen
- Zentrifuge: Eppendorf centrifuge 5415D, Hamburg
- Vortexer: Vortex-Genie[®] 2T, Scientific Industries Inc., New York, USA
- Blockthermostat: Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg
- Autoklaven: Hiclave HV-85, BPW Vertriebs GmbH für Labortechnik, Süßen
Varioklav[®] 500, H+P Labortechnik GmbH, München
Autoclave-Steam Sterilizer 2540EL, Tuttnauer, Breda, Niederlande
- Sterilwerkbank Hera safe, Heraeus, Hanau
- Membran-Vakuumpumpe, Vacuumbrand GmbH + CO, Wertheim
- Heizrührer RCT basic, IKA Labortechnik
- FIA Ismatec[®] (zur Bestimmung von Ammonium-Stickstoff), Glattbrugg, Schweiz
- Zubereitung von bidest. Wasser: arium[®] 611, Sartorius AG, Göttingen
- Feuchtebestimmer: MA45, Sartorius AG, Göttingen

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Feinchemikalien

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| - Agar-Agar | Merck KGaA, Darmstadt |
| - Ammoniumchlorid | Merck KGaA, Darmstadt |
| - Ammoniumsulfat | Merck KGaA, Darmstadt |
| - Borsäure | Merck KGaA, Darmstadt |
| - Calciumcarbonat | Merck KGaA, Darmstadt |
| - Calciumchlorid-Hexahydrat | Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz |
| - Calciumnitrat-Tetrahydrat | Merck KGaA, Darmstadt |
| - Citronensäure | Merck KGaA, Darmstadt |
| - Cobaltsulfat-Heptahydrat | Merck KGaA, Darmstadt |
| - Dikaliumhydrogenphosphat | Merck KGaA, Darmstadt |
| - D-Glucose Monohydrat | Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz |
| - Eisensulfat- Heptahydrat | Merck KGaA, Darmstadt |

- Extran® AP31 (Antischaummittel)	Merck KGaA, Darmstadt
- D-Fructose	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
- Hefeextrakt	Merck KGaA, Darmstadt
- Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
- Kupfersulfat-Pentahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
- Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
- Mangansulfat-Pentahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
- Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
- Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
- pH-Indikatorstreifen (pH 5,2-7,2)	Merck KGaA, Darmstadt
- pH-Indikatorstreifen (pH 6,5-10,0)	Merck KGaA, Darmstadt
- Phosphorsäure	Merck KGaA, Darmstadt
- Proteosepepton	Merck KGaA, Darmstadt
- Saccharose	VWR BDH Prolabo, Darmstadt
- Tego KS 911 (Antischaummittel)	Evonik Goldschmidt GmbH
- Thiaminhydrochlorid	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
- Zinkchlorid	Merck KGaA, Darmstadt

Kitsysteme

- D-Glucose	R-BIOPHARM, Darmstadt
- Saccharose/ D-Glucose/ D-Fructose	R-BIOPHARM, Darmstadt

2.3 Kultivierungssysteme für die Produktion von Citronensäure

2.3.1 Verwendete Mikroorganismen

Für die Citronensäureproduktion aus Glucose und Glucosesirup wurde ein Hefe-Wildtypstamm *Yarrowia lipolytica* H222 eingesetzt. Für die Herstellung der Citronensäure aus Saccharose wurde der rekombinante Hefestamm *Yarrowia lipolytica* H222-S4(p67ICL1) T5 (*MATA [SUC2] ICL1 multicopy*) genutzt.

Beide o. g. Stämme wurden von Prof. Barth, Institut für Mikrobiologie an der TU Dresden, zur Verfügung gestellt.

2.3.2 Medien für Stammhaltung und Produktion von Citronensäure

Für die Herstellung der Medien wurde bidestilliertes Wasser verwendet. Alle Nährmedienbestandteile wurden separat bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert.

Hitzeempfindliche Medienbestandteile wurden über Membranfilter mit 0,22 µm Porengröße (Fa. Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne, Frankreich) steril filtriert. Die Herstellung der Medien erfolgte unmittelbar vor der jeweiligen Fermentation. Die Zusammensetzung der jeweiligen Medien sind der Tabelle 2 (für die Stammhaltung) und der Tabelle 3 (für die Vor- und Hauptkultur) zu entnehmen.

Tabelle 2: Readermedium für Hefen (Medium für Stammhaltung von *Y. lipolytica*) (THIERSCH 1987)

Bestandteile	Konzentration [g/L]
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,7
KH ₂ PO ₄	1,0
K ₂ HPO ₄	0,16
NaCl	0,5
Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O	0,4
Hefeextrakt	2,5
Glucose	20
Agar-Agar	20

2.3.3 Vorkulturen

Die Vorkulturen für die Kultivierungen im Bioreaktor wurden in 300 mL Erlenmeyerkolben unter Verwendung von 100 mL Vorkulturmedium (s. Tabelle 3) angezüchtet. Die Inokulierung erfolgte mit jeweils 2 bis 3 Impfösen von Reader-Agar über 48 h gewachsenen Agarplattenkulturen. Die Vorkulturen wurden 24 h (Versuche 2.4.1, 2.4.2, 2.4.4, 2.4.5 und 2.5.1) bzw. 72 h (Versuche 2.4.3 und 2.5.2, 2.6, 2.7, 2.8 und 2.9) auf einem Horizontalschüttler (Edmund Bühler GmbH, Tübingen) bei 30 °C und 130 rpm inkubiert und dann für die Inokulierung der Hauptkulturen verwendet.

Tabelle 3: Vorkultur- und Produktionsmedium (THIERSCH 1987)

Bestandteile	Konzentration [g/L]	
	Vorkulturmedium	Produktionsmedium
NH ₄ Cl oder (NH ₄) ₂ SO ₄	3,0	1,5 oder 3 oder 4,5 (s. einzelne Versuche) 3,71 oder 5,57 (s. einzelne Versuche)
KH ₂ PO ₄	0,7	0,4
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,35	0,35
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,02	0,02
MnSO ₄ x 5 H ₂ O	0,02	0,02
ZnCl ₂	0,0105	0,0105
CoSO ₄ x 7 H ₂ O	0,0025	
H ₃ BO ₃	0,0285	
Hefeextrakt	0,25 bzw. 2,5	
CaCO ₃	0,010	
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,0035	0,0035
Thiamin-HCl		0,001
CaCl ₂ x 6 H ₂ O		0,03
Proteosepepton (in Versuchen mit Saccharose)		0,4
Glucose oder Fructose bzw. Saccharose	30	5-150 (s. einzelne Versuche) 20-150 (s. einzelne Versuche)

2.3.4 Rührkesselreaktoren

- Multibioreaktorsystem Sixfors

Die Kultivierungen zur Optimierung der Fermentationsbedingungen der Citronensäureproduktion aus Glucose mit *Yarrowia lipolytica* H222 wurden in einem Multibioreaktorsystem Sixfors (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) (Abbildung 13) durchgeführt. Das Schema eines dieser Bioreaktoren ist in Abbildung 4 dargestellt. Jeder der sechs Bioreaktoren ist mit einer Regelungseinheit für Temperatur, pH- und pO₂-Wert, sowie mit einem magnetisch betriebenen Rührer ausgestattet.

Das Multibioreaktorsystem Sixfors wurde mit folgender Ausstattung verwendet:

Material Reaktorgefäß:	Glas
Rührer:	3x 6-Blattscheibenrührer, magnetisch angetrieben, Drehzahl 1.000 rpm
Arbeitsvolumen:	300 mL
Belüftung:	Begasungsrohr mit Einblasring, Luftbegasungsrate 0-1,6 L/min
Messinstrumente:	pO ₂ - und pH-Elektrode, PT100-Thermometer
Temperierung:	über Aluminium-Wärmeübertragerblock
Regelung:	X-DDC Kontrolleinheit und IRIS Software (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) für Temperatur, pH-Wert (über Zugabe von Säure bzw. Lauge) und pO ₂ -Wert (Gasmix mit der Begasungsrate von 0,2 slpm, bei Bedarf Erhöhung der Begasungsrate in Schritten von 0,05 slpm mit Hilfe einer Sequenz)
Vorlagebehälter:	Lauge, Säure und Antischaum
Probenahme:	steril über 3-Wegehahn und Spritze

- Multibioreaktorsystem Multifors

Für die Kultivierungen zur Optimierung der Fermentationsbedingungen der Citronensäureherstellung aus Saccharose wurde das Multibioreaktorsystem Multifors (Infors AG, Bottmingen, Schweiz), eine Weiterentwicklung des Sixfors, benutzt. Es handelt sich um ein Tischbioreaktorsystem, das aus drei Grundeinheiten mit jeweils zwei Reaktorgefäßen besteht, die über eine Kontrolleinheit geregelt werden. Eine schematische Darstellung eines Multifors-Bioreaktors kann Abbildung 4 entnommen werden.

Das Multifors-System wurde mit folgender Ausstattung verwendet:

Material Reaktorgefäß:	Glas
Rührer:	2 x 6-Blattscheibenrührer, magnetisch angetrieben, Drehzahl 1000 rpm
Arbeitsvolumen:	700 mL
Belüftung:	Begasungsrohr mit Einblasring, Luftbegasungsrate 0-1,6 L/min
Messinstrumente:	pO ₂ - und pH-Elektrode, PT100-Thermometer
Temperierung:	über Aluminium-Wärmeübertragerblock
Regelung:	X-DDC Kontrolleinheit und IRIS Software (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) für Temperatur, pH-Wert (über Zugabe von

Säure bzw. Lauge) und pO_2 -Wert (über eine Kaskadenregelung der Begasungsrate von anfänglichen 0,2 slpm bis 2 slpm)

Vorlagebehälter: Lauge, Säure und Antischaum

Probenahme: steril über 3-Wegehahn und Spritze

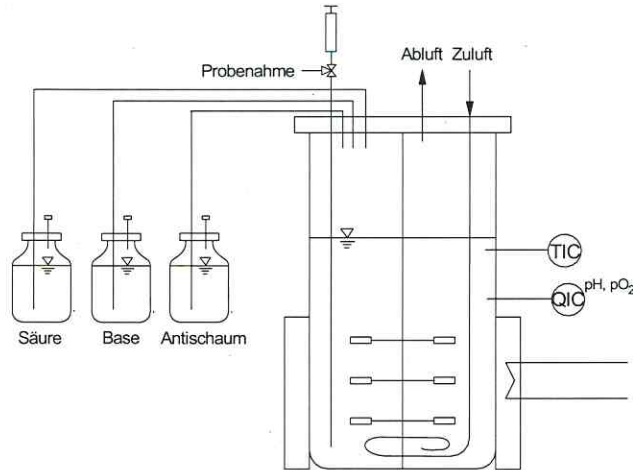


Abbildung 4: Schema eines der Bioreaktoren der Versuchsanlagen Sixfors und Multifors (Grafik: Jeanette Fahnert) (MOELLER ET AL. 2007).
(QIC - Quality Indication Control, TIC – Temperature Indication Control)

- 10L-Rührkesselreaktor Biostat ED 15

Die Kultivierungen zur Entwicklung verschiedener Prozessführungsstrategien wurden in einem Rührkesseldruckreaktor Biostat ED 15 (Fa. Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne, Frankreich) durchgeführt. Das Schema der Versuchsanlage ist in der Abbildung 5 dargestellt.

Der Bioreaktor Biostat ED15 wurde mit folgender Ausstattung verwendet:

Material Reaktorgefäß: Edelstahl

Rührer: 3x 6-Blattscheibenrührer, Drehzahl bis 1500 rpm

Arbeitsvolumen: 5 bis 10 L

Belüftung: Begasungsrohr mit Einblasring

Messinstrumente: pO_2 - und pH-Elektrode, PT100-Thermometer, Dialysesonde für ProcessTRACE

Temperierung: über temperiertes Wasser im Doppelmantel

Regelung:

- Bioreaktorsoftware MFCS/win2.1 (Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne, Frankreich)
- Biosensor-online-Messsystem ProcessTRACE zur Regelung der Substratkonzentration

- DCU 3 für Temperatur, pH (über Zugabe von Säure bzw. Lauge) und pO_2 (über eine Kaskadenregelung: Rührer 675-1500 rpm → Begasungsrate 1-2 slpm)

Vorlagebehälter: Lauge, Säure, Antischaummittel und Substrat
 Probenahme: steril über ein Probenahmeventil, im Falle der Kultivierungen mit rekombinantem Hefestamm über aerosolfreies Probeentnahmesystem
 Abgasanalyse: Xentra O_2/CO_2 Typ 4100C (Fa. Servomex, Jarvis Brook, England)

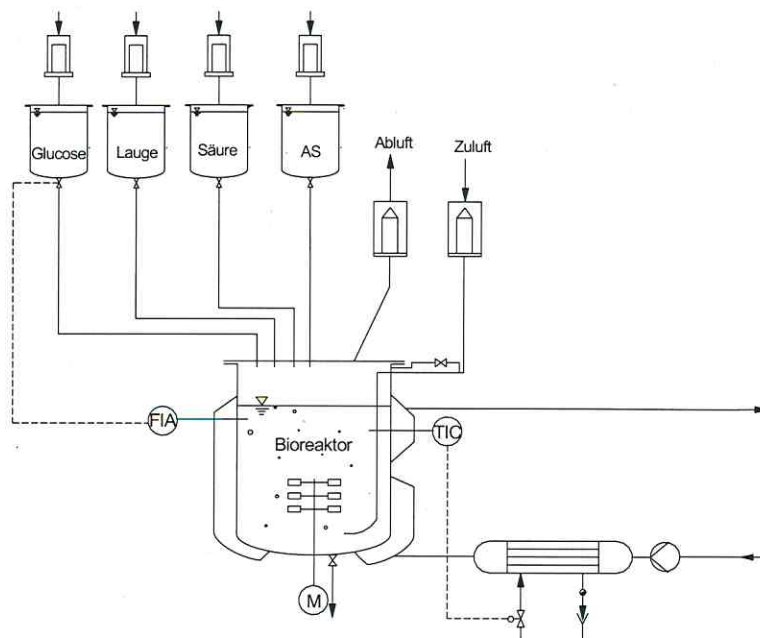


Abbildung 5: Schema der Versuchsanlage für die Fed-Batch-Fermentation mit einer Glucose-online-Messung und -Regelung mit Hilfe eines FIA-Biosensor-Messsystems (Grafik: Jeanette Fahnert).
 (AS – Antischaummittel, FIA – Fließinjektionsanalyse, M – Motor, TIC – Temperature Indication Control)

2.3.5 Kultivierungsbedingungen

Die Bioreaktoren wurden mit 10 % (v/v) Vorkultur inokuliert. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von 5 % H_3PO_4 (w/v) und 10 % bzw. 30 % NaOH (w/v) stabilisiert. Zur Schaumbekämpfung wurden die Antischaummittel Extran[®] AP31 (verdünnt mit dest. Wasser im Verhältnis 1:4) bzw. Tego KS 911 (Evonik Goldschmidt GmbH, Deutschland) benutzt. Die Rührerdrehzahl wurde bei Sixfors und Multifors auf 1.000 rpm und bei Biostat ED15 auf 675 rpm eingestellt. Falls nicht anders erwähnt, wurde der pH-Wert auf 6,0 gehalten und die Temperatur auf 30 °C

eingestellt. Der pO_2 -Wert wurde auf 50 % gehalten. Die Begasungsrate des Gasmixes wurde in den Sixfors-Reaktoren zwischen 0,2 und 2,5 slpm mittels Fermentersteuerung auf der Basis einer Sequenz in der IRIS Software (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) mit Schritten von 0,05 slpm angepasst, in den Multifors-Reaktoren wurde die Begasungsrate mit einer Kaskadenregelung zwischen 0,2 und 2 slpm reguliert. Die Begasungsrate im Biostat ED15 wurde auf 1 slpm eingestellt, der pO_2 -Wert wurde bei 50 % mit Hilfe einer Kaskade (s. 2.1.4) konstant gehalten.

Im Fall der Versuche in Schüttelkolben wurde ebenfalls das Animpfverhältnis von 1:10 (v/v) gewählt. Der pH-Wert wurde einmal täglich auf 6,0 bzw. 7,0 (s. einzelne Versuche) mit 5 % H_2SO_4 (w/v) bzw. 30 % NaOH (w/v) korrigiert. Die Kultivierung erfolgte auf einem Horizontalschüttler (Edmund Bühler GmbH, Tübingen) bei 30 °C und 130 bzw. 140 rpm.

2.4 Prozessanalytik

2.4.1 Substratanalytik mit Hilfe von Biosensoren

Das Biosensor-online-Messsystem ProcessTRACE 1.21MT ist eine Entwicklung der Fa. Trace Analytics GmbH (Braunschweig) zur quasi-online-Analyse von u. a. Glucose und Saccharose, die für die Überwachung und Regelung von Fermentationen und Zellkulturen genutzt wird. Das Messprinzip beruht auf der Fließdiffusionsanalyse, die mit einer zeitabhängigen Probenanreicherung arbeitet. Die Messung der Analytkonzentration im sterilen Umfeld ermöglicht eine Dialysesonde, ebenfalls eine Entwicklung der Fa. Trace Analytics GmbH, die im Bioreaktor installiert ist und mit dem Gerät ProcessTRACE verbunden ist. Die Dialysesonde enthält ein Fenster mit einer Dialysemembran, durch die die Analyte aus der Kulturbrühe in den Pufferstrom diffundieren, der innerhalb der Sonde fließt und für den Transport des Analyten zum Biosensor sorgt. Somit ist eine sterile und volumenfreie Probenahme gewährleistet. Die Analyse wird mit Hilfe einer Sensorikeinheit ausgeführt, die auf der Basis von amperometrischen Enzymsensoren, die von Trace Analytics GmbH hergestellt werden, funktioniert.

Für die Glucosemessung dient ein Glucose-Enzymsensor, der in die Fließzelle des ProcessTRACE eingesetzt wird. Für die Saccharosemessung wird der Fließzelle, die den Glucosebiosensor enthält, ein Enzymreaktor mit immobilisierter Invertase und Mutarotase vorgeschaltet. Der Nachteil des Systems liegt darin, dass die in der Probe enthaltene Glucose mit erfasst wird. Deswegen ist es nötig, die Glucosekonzentration parallel extern zu messen und von den angezeigten Werten abzuziehen.

Durch eine serielle Schnittstelle erfolgt eine Kopplung zwischen ProcessTRACE und der Software des Bioreaktors, die eine biosensorgestützte Substratnachdosierung ermöglicht. Die Substratlösung liegt dann im Druckvorlagebehälter vor, die Fütterung erfolgt durch ein pneumatisches Ventil, das mit einem P-Regler (P=15) gesteuert wird. Eine weitere Möglichkeit für die Substratnachdosierung bietet der analoge Anschluss des ProcessTRACE an eine externe Pumpe (Fa. Watson-Marlow, Modell 505Du). Diese Möglichkeit wurde für die Nachdosierung hochkonzentrierter Fütterungslösungen genutzt.

Zur Bestimmung von Glucose wurden zwei verschiedene Sensor-Messkits mit Messbereichen von 0,05-5 g/L (Bestellnummer: 130.100.013) resp. 0,5-40 g/L (Bestellnummer: 130.100.003) benutzt, die jeweils für 5000 Messungen ausgelegt waren. Zur Bestimmung von Saccharose wurde das Messkit mit dem Messbereich von 0,5-40 g/L angewendet, das für 5000 Messungen bestimmt war (Bestellnummer: 130.100.303).

2.4.2 Produktanalytik mit Hilfe der Ionenchromatographie

Für die quantitative Bestimmung von Citronensäure und organischen ionischen Nebenprodukten des Citratbildungsprozesses wurde das Ionenchromatographie-System DX-600 der Firma Dionex (Sunnyvale, USA) benutzt. Die Betriebsparameter sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Aus den Retentionszeiten wird ersichtlich, dass unter den gewählten Parametern eine gute Trennung der für den Prozess relevanten organischen und anorganischen Anionen erzielt wird. Die Quantifizierung der Produktbildung erfolgte anhand von Kalibriergeraden bekannter Standards. Für Citronensäure ($R^2 > 0,9987$) und Isocitronensäure ($R^2 > 0,9988$) besteht eine hohe Linearität im Bereich von 5 bis 100 mg/L.

Tabelle 4: Trennparameter in der Ionenchromatographie

Säule	IonPac AS 11 – 4 mm Durchmesser		
Flussrate	1,5 mL/min		
Injektionsvolumen	10 µL		
Eluent	KOH 0 - 2 min; isokratisch 0,5 mM 2 - 6 min; linear auf 5 mM 6 - 22 min: linear auf 40 mM 22 - 25 min: isokratisch 0,5 mM		
Retentionszeiten	Chlorid	5,7 min	Phosphat 13,8 min
	Nitrat	7,9 min	Citronensäure 15,5 min
	Carbonat	10,0 min	Isocitronensäure 15,9 min
	Sulfat	10,7 min	

2.4.3 Sonstige analytische Methoden

2.4.3.1 Probenvorbehandlung

Die in den Proben enthaltene Biomasse wurde mit einer Zentrifuge (Eppendorf 5415 D, Fa. Eppendorf AG, Hamburg) bei 15.000 rpm für 5 Minuten abgetrennt. Aus dem Überstand wurde ein aliquoter Teil der weiteren Analytik zugeführt und ein weiterer als Rückstellprobe bei -20 °C eingefroren.

2.4.3.2 Biomassebestimmung

- *Trübungsmessung*

Zur Erfassung des mikrobiologischen Wachstums der Hefekulturen wurde die optische Dichte (Trübungsmessung) bei 600 nm in Kunststoffküvetten (1 cm Schichtdicke) mit einem UV/VIS-Spektrophotometer (Ultraspec 3100 pro, Fa. Biochrom) gemessen.

- *Biotrockenmassebestimmung*

Die Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) erfolgte entweder durch Trocknung der durch Membranfiltration abgetrennten Biomasse oder indirekt auf Basis der Trübungsmessung (s. o.) mittels einer zuvor hergestellten Kalibriergeraden.

Zur gravimetrischen Bestimmung der Biotrockenmasse wurde aus je 2,5 bis 10 mL frisch entnommener Probe die Biomasse mittels einer Vakuumfiltrationseinheit (Fa. Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) über einem Membranfilter (0,2 µm Porengröße, regenerierte Cellulose, Fa. Whatman, Maidstone, England oder 0,45 µm Porengröße, Celluloseacetat, Fa. Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) abgetrennt. Zur Vermeidung der Überbestimmung der Biotrockenmasse durch lösliche Salze erfolgte eine Spülung mit destilliertem Wasser. Mit Hilfe eines elektronischen Feuchtigkeitsbestimmers MA40 mit Heizeinheit (Fa. Sartorius Stedim Biotech, MA 45, Göttingen) wurde programmgesteuert bei 105 °C die Restfeuchte des Filterkuchens bis zur Gewichtskonstanz entfernt. Aus der Gewichts Differenz zum leeren Membranfilter ergibt sich die jeweilige Biotrockenmasse.

Die indirekte Bestimmung der Biotrockenmasse bei Versuchen mit kleinem Reaktionsvolumen erfolgte durch die Bestimmung der optischen Dichte mit Hilfe einer Kalibriergeraden, die für beide in dieser Arbeit angewandten Stämme separat erstellt wurde. Eine lineare Abhängigkeit der Biotrockenmasse und der optischen Dichte mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2=0,999$ wurde für den Wildtypstamm *Y. lipolytica* H222 im Bereich von 0,05 bis 0,6 gefunden. Mit Hilfe des in Abbildung 6 dargestellten Diagramms lässt sich

folgende Gleichung zur Berechnung der Biotrockenmasse über die Messung der optischen Dichte OD 600 ermitteln:

$$\text{BTM} = 0,3657 * \text{OD } 600 + 0,0116 \text{ [g/L]} \quad [1]$$

Für den rekombinanten Hefestamm *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1) wurde ebenso eine lineare Abhängigkeit im Bereich der OD 600 zwischen 0,05 und 0,6 mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2=0,998$ gefunden und mit der Gleichung [2] beschrieben.

$$\text{BTM} = 0,3121 * \text{OD } 600 + 0,0037 \text{ [g/L]} \quad [2]$$

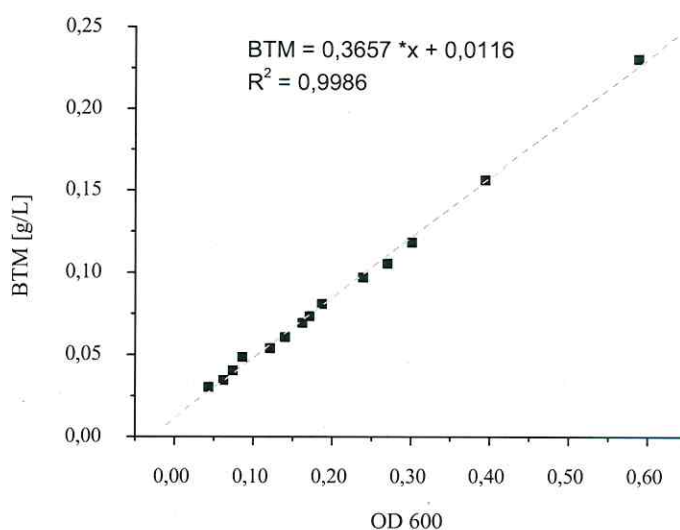


Abbildung 6: Kalibriergerade für Biotrockenmassebestimmung von *Y. lipolytica* H222

2.4.3.3 Bestimmung der Substratkonzentrationen mittels Enzymtests

Die Konzentrationen von Saccharose, Fructose und Glucose wurden im Unterschied zur online-Messung mit einem Enzymtestkit gemessen. Für die Messung aller drei o. g. Komponenten wurde das Messkit Saccharose/D-Glucose/D-Fructose (10 716 260 035) der Fa. R-BIOPHARM (Darmstadt) genutzt. Die Glucosekonzentration in Versuchen für die Citronensäureherstellung mit dem Wildtypstamm wurde mit einem Fertigtestkit (ENZYTEC™ Nr. 1002864 der Fa. Scil Diagnostics GmbH, Viernheim) ermittelt. Für die Messungen wurde ein UV/VIS Spektrophotometer (Ultraspec 3100 pro, Amersham Biosciences, Fairfield, USA) benutzt.

2.4.3.4 Bestimmung der Stickstoffkonzentration

Die Konzentration von Stickstoff wurde nasschemisch unter Verwendung von einem FIA-Gerät (Ismatec[®], Glattbrugg, Schweiz) bestimmt. Die Analyse erfolgte photometrisch bei 605 nm durch die Detektion der Farbänderung des pH-Indikators Bromkresolpurpur. Diese wurde durch das enthaltene Ammoniak ausgelöst, das durch Zugabe von Natronlauge freigesetzt wurde.

2.5 Ermittlung kinetischer Daten

Die maximale spezifische Wachstumsrate ($\mu_{\max}$), sowie die maximale volumetrische Produktivität ($P_{CS,\max}$) wurden mit Hilfe des Programms ORIGIN[®] 8 ermittelt, indem die Zeitfunktionen der Biotrockenmasse bzw. Citronensäurekonzentration mit einem Polynom verschiedenen Grades (4-7) gefittet wurden. Von diesem Polynom wurde die erste Ableitung berechnet, die dann die jeweilige Rate ausdrückt. Das Maximum der so erstellten Funktion stellte die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit bzw. maximale volumetrische Produktivität dar.

Die Selektivität (S_{CS}) des Bioprozesses für die Produktion von Citronensäure, bezogen auf die Summe der produzierten Citronensäure und Isocitronensäure, wurde wie folgt berechnet:

$$S_{CS} = \frac{c_{CS}}{c_{CS} + c_{ICS}} \cdot 100 [\%] \quad [3]$$

Der Ausbeutekoeffizient der Citronensäure (Y_{CS}) wurde mit Hilfe von Gleichung [4] ermittelt.

$$Y_{CS} = \frac{c_{CS, \text{produziert}}}{c_{GL, \text{verbraucht}}} \left[\frac{g}{g} \right] \quad [4]$$

Die volumetrische (P_{CS}) und (maximale) biomassespezifische Produktivität ($p_{CS(\max)}$) der Fermentationen wurden mit Hilfe der Gleichungen [5] und [6] berechnet.

$$P_{CS} = \frac{c_{CS, \text{Ende}}}{t_{\text{Ende}}} \left[\frac{g}{L \cdot h} \right] \quad [5]$$

und

$$p_{CS(\max)} = \frac{P_{CS(\max)}}{BTM} \left[\frac{1}{h} \right] \quad [6]$$

2.6 Optimierung des Bioprozesses für den Wildtypstamm *Yarrowia lipolytica* H222 mit Glucose als Substrat

Die Versuche zur Optimierung der Fermentationsbedingungen zur Citronensäureherstellung aus Glucose mit *Y. lipolytica* H222 wurden im Multibioreaktorsystem Sixfors mit 300 mL Anfangsvolumen durchgeführt.

2.6.1 Einfluss der Temperatur auf den Bioprozess

Der Einfluss unterschiedlicher Temperaturen zwischen 24 und 34 °C (mit Schritten von 2 °C) auf das Zellwachstum der Hefe wurde ermittelt. Der pH-Wert von 6,0 und pO₂ von 50 % wurden während der Kultivierungen konstant gehalten. Die Wachstumskurven wurden in Hinsicht auf die maximalen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten untersucht.

Die Reproduzierbarkeit der Bestimmung der maximalen spezifischen Wachstumsraten wurde ebenso ermittelt. Dafür wurde eine Serie von sechs parallelen Versuchen unter gleichen Bedingungen (30 °C; pH 7,0; pO₂ 50 %; Produktionsmedium (Tabelle 3) mit 3 g/L NH₄Cl und 100 g/L Glucose) durchgeführt.

Um den Einfluss der Temperatur auf die Produktion von Citronensäure und Isocitronensäure zu beurteilen, wurde während der Wachstumsphase eine einheitliche Temperatur von 30 °C gewählt. Nachdem das Ende der Wachstumsphase detektiert wurde, wurden Temperaturen zwischen 28 und 34 °C (mit Schritten von 2 °C) eingestellt. Die Fermentationen liefen über 92 Stunden.

Die Kultivierungen zur Temperaturoptimierung wurden im Produktionsmedium (Tabelle 3) mit 3 g/L NH₄Cl und 100 g/L Glucose durchgeführt.

2.6.2 Einfluss des pH-Wertes auf den Bioprozess

Der Einfluss des pH-Wertes auf das Zellwachstum der *Y. lipolytica* H222 wurde untersucht, indem eine Reihe von Kultivierungen bei pH-Werten zwischen 3 und 9 (mit Schritten von 0,5) durchgeführt wurde. Dabei wurde das Produktionsmedium (Tabelle 3) mit 1,5 g/L NH₄Cl und 100 g/L Glucose benutzt. Die Temperatur wurde auf 30 °C geregelt und pO₂ wurde während der Kultivierungen auf 50 % gehalten. Die Wachstumskurven wurden in Hinsicht auf die maximalen spezifischen Wachstumsraten untersucht.

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Produktion von Citronensäure wurde im Produktionsmedium (Tabelle 3) mit 3 g/L NH₄Cl und 100 g/L Glucose untersucht. Während der Wachstumsphase wurde in allen Fermentationen der Versuchsserie der pH-Wert bei 7,0 gehalten. Nach Beendigung der Wachstumsphase, die durch die Auszehrung des Stickstoffs in

der Kulturbühe detektiert wurde, wurden in den Bioreaktoren pH-Werte zwischen 5,5 und 7,5 mit Stufen von 0,5 eingestellt. Die Fermentationen liefen über 92 Stunden, die Produktion der Citronensäure und Isocitronensäure wurde beobachtet.

2.6.3 Einfluss der Stickstoffkonzentration auf den Bioprozess

Die Beeinflussungen des mikrobiellen Wachstums (bzw. der erreichbaren Biomassekonzentration) sowie der Citronensäurebildung durch die Ammoniumsulfat-Startkonzentration wurden im Fed-Batch Betrieb untersucht. Als Nährmedium wurde das Produktionsmedium (Tabelle 3) mit 150 g/L Glucose eingesetzt. Es erfolgte eine regelmäßige Nachdosierung mit einer 500 g/L-Glucoselösung. Sechs parallele Kultivierungen mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen zwischen 1,85 g/L (gleiche Stickstoffkonzentration wie in Schüttelkolben als Stickstoffquelle verwendetes 1,5 g/L NH_4Cl) und 12,36 g/L (entspricht 10 g/L NH_4Cl) wurden durchgeführt, wobei 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ einer Stickstoffkonzentration von 0,212 g/L entspricht. Um eventuelle Doppellimitationen (z. B. durch Phosphormangel) zu vermeiden, wurde der Gehalt von KH_2PO_4 und MgSO_4 der gewählten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration im Medium angepasst. Die weiteren Parameter wurden bei allen Versuchen gleich eingestellt: pH 6,0; 30 °C und pO_2 50 %. Für die pH-Regelung wurde 30 %-ige Natronlauge benutzt. Aufgrund des raschen Substratverbrauchs musste die Fermentation mit 12,36 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Startkonzentration bereits nach 44 Stunden beendet werden. Alle anderen Versuche liefen 95 Stunden.

2.6.4 Substrathemmung

Der Einfluss der Anfangskonzentration von Glucose auf das Zellwachstum von *Y. lipolytica* H222 wurde bei 30 °C, pH 6,0 und 50 % pO_2 untersucht. Das Produktionsmedium (Tabelle 3) enthielt 1,5 g/L NH_4Cl und wurde mit unterschiedlichen Anfangskonzentrationen von Glucose (40, 50, 75, 150 und 200 g/L) eingesetzt. Die Wachstumskurven wurden in Hinsicht auf die maximalen spezifischen Wachstumsraten untersucht.

2.6.5 Produkthemmung

Um eine eventuelle Produkthemmung zu ermitteln und zu charakterisieren wurde eine Versuchsreihe mit Zugabe verschiedener Mengen Citronensäure durchgeführt. Nach Beendigung der Wachstumsphase (d. h. nach 28-29 Stunden der Fermentationszeit) wurden 100 mL Lösung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Citronensäure in Form von Trinatriumcitratdihydrat zu der Kulturbühe zugefügt, sodass danach jeweils 22,5 g/L, 70 g/L und 120 g/L Citronensäure in der Fermentationslösung vorhanden waren. Der Ansatz ohne

externe Citronensäurezugabe wurde dementsprechend mit 100 mL destilliertem Wasser vervollständigt. Alle Fermentationen liefen bei 30 °C, pH 6,0 und 50 % pO₂ und es wurde das Produktionsmedium (Tabelle 3) mit 3 g/L NH₄Cl und 135 g/L Glucose eingesetzt. Die Produktion der Citronensäure während der 190 Stunden Fermentationszeit wurde beobachtet.

2.7 Entwicklung verschiedener Prozessführungsstrategien mit Glucose als Substrat für die Citronensäureproduktion mit *Yarrowia lipolytica* H222 unter Verwendung eines Biosensor-online-Messsystems

2.7.1 Ermittlung der optimalen Glucosekonzentration für die biosensorgestützte Substratnachdosierung

In allen Fermentationen, die im Kapitel 2.7.1 beschrieben sind, wurde das Produktionsmedium (Tabelle 3) mit 3,71 g/L (NH₄)₂SO₄ verwendet und gleiche Kultivierungsbedingungen eingestellt: pH 6,0, Temperatur 30 °C und pO₂ 50 %; das Startvolumen lag bei 5 L.

2.7.1.1 Fed-Batch mit konstanter Substratkonzentration

Die Glucosekonzentrationen wurden im Bioprozess während vier Fed-Batch-Fermentationen auf verschiedenen Werten konstant gehalten. Dazu diente ein Biosensor-online-Messsystem, das die Glucosekonzentration im Laufe der Versuche während der gesamten Kultivierungszeit auf einem Wert konstant hielt: 30 g/L, 20 g/L, 10 g/L (jeweils mit Nachdosierung von einer 300 g/L Glucoselösung und Nutzung eines Glucosebiosensors mit dem Messbereich von 0,5-40 g/L) sowie 1 g/L (mit Nachdosierung von einer 100 g/L Glucoselösung und Nutzung eines Glucosebiosensors mit dem Messbereich von 0,05-5 g/L). Die Glucosekonzentrationen wurden so gewählt, dass sie innerhalb des Messbereiches des benutzten Biosensors liegen. Die Fermentationen liefen 210 Stunden. Der Einfluss der verschiedenen Glucosekonzentrationen auf den Bioprozess wurde untersucht.

Darüber hinaus wurde eine Fermentation mit kontinuierlicher Glucosenachdosierung (d. h. mit konstanter Fütterungsrate und ohne Nutzung einer biosensorgestützten Regelung) durchgeführt. Dabei lag die Glucoseanfangskonzentration bei 50 g/L. Die Glucosefütterungsrate wurde nach 15 Stunden lag-Phase auf 60 g/h eingestellt. Die Kultivierung dauerte 92,7 Stunden.

2.7.1.2 Kontinuierliche Kultivierung

Es wurden zwei kontinuierliche Kultivierungen mit konstanten Glucosekonzentrationen (10 g/L und 5 g/L Glucose) durchgeführt. Die Regelung erfolgte durch ein Biosensor-online-Messsystem. Es wurde eine 300 g/L-Glucoselösung nachdosiert. Das Volumen wurde mit Hilfe der Software des Bioreaktors auf der Basis des Reaktorgewichts auf 5 L konstant gehalten, indem ein pneumatisches Ablassventil angesteuert wurde. Beide Versuche liefen 235 Stunden.

2.7.2 **Entwicklung semikontinuierlicher Verfahren**

In allen Fermentationen, die im Kapitel 2.7.2 dargestellt sind, wurde das Produktionsmedium (Tabelle 3) mit 5,57 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und 150 g/L Glucosestartkonzentration benutzt. Die Kultivierungsbedingungen wurden in allen Versuchen gleich eingestellt: pH 6,0, Temperatur 30 °C und pO_2 50 %; das Startvolumen lag bei 5 L.

2.7.2.1 Batch

Es wurde eine Kultivierung von *Y. lipolytica* im Batch Modus durchgeführt. Das Startvolumen der Kulturbrühe lag bei 5 L. Der Versuch lief 42 h bis zur Auszehrung der Glucose aus der Fermentationslösung.

2.7.2.2 Repeated Batch

Es wurde eine Repeated Batch-Fermentation in 5 Zyklen durchgeführt. Das Anfangsvolumen des jeweiligen Zyklus lag bei 7 L. Jeweils nach Beendigung eines Zyklus durch Auszehrung von Glucose aus der Kulturbrühe wurden 9/10 der Fermentationslösung abgenommen und durch frisches Medium ersetzt.

2.7.2.3 Fed-Batch

Eine Fed-Batch Fermentation mit Biosensor-online-Regelung der Substratkonzentration wurde durchgeführt. Der Start erfolgte im Batch-Modus mit einem Arbeitsvolumen von 5 L. Die Glucosekonzentration lag am Anfang bei 150 g/L. Nachdem sie dann aufgrund des mikrobiellen Abbaus auf 30 g/L gesunken war, startete eine automatische biosensorgestützte Substratnachdosierung. Zur Fütterung wurde eine 500 g/L Glucoselösung verwendet. Nach ca. 148 h Laufzeit wurde die Substratnachdosierung ausgeschaltet, da das höchstmögliche Volumen der Fermentationsbrühe erreicht war. Die Fermentation lief weitere 22 h, sodass die in der Lösung gebliebene Glucose verwertet wurde.

Die Fed-Batch Kultivierung wurde unter Benutzung einer dreitägigen Vorkultur wiederholt. Bei der ersten Fermentation kam eine eintägige Vorkultur zum Einsatz.

2.7.2.4 Repeated Fed-Batch

Zwei Repeated Fed-Batch Fermentationen wurden durchgeführt: eine in drei Zyklen und ein Langzeitversuch mit zehn Zyklen. Die Abläufe beider Fermentationen waren gleich: nachdem die Glucosekonzentration von 150 g/L auf 20 g/L gesunken war, erfolgte eine biosensorgestützte Substratnachdosierung mit einer 500 g/L Glucoselösung, um die Glucosekonzentration im Medium konstant zu halten. Das Anfangsvolumen des einzelnen Zyklus lag bei 5 L. Alle drei Zyklen der ersten Repeated Fed-Batch Kultivierung dauerten jeweils 72 Stunden. Im Langzeitversuch liefen die ersten drei Zyklen jeweils 71 Stunden, die restlichen sieben Zyklen dauerten jeweils 48 Stunden.

2.8 Versuche zur Anwendung von Stärkehydrolysaten zur Citronensäuregewinnung mit *Yarrowia lipolytica* H222

In allen in diesem Teil dargestellten Kultivierungen wurden folgende Bedingungen eingestellt: pH 6,0, 30 °C und 50 % pO₂. Es wurde in allen Fermentationen das Produktionsmedium (Tabelle 3) mit 5,57 g/L (NH₄)₂SO₄ benutzt.

2.8.1 Auswahl des geeigneten Stärkehydrolysates

Das Ziel dieser Versuchsreihe war das Austesten von drei Glucosesirupen (Stärkehydrolysate mit hohem Glucoseanteil) in Fed-Batch Kultivierungen in Hinsicht auf ihre Verwendbarkeit für die Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222. Folgende Glucosesirupe wurden verwendet:

- C*Sweet von Cargill Deutschland GmbH (Krefeld, Deutschland), der 888 g/L Glucose enthält,
- RL95 von Cargill Deutschland GmbH (Krefeld, Deutschland), der 967 g/L Glucose beinhaltet und
- Glucosesirup von Südzucker AG Mannheim/Ochsenfurt (Obrigheim, Deutschland) mit 952 g/L Glucose.

Darüber hinaus wurde eine Vergleichsfermentation durchgeführt, in der Glucosemonohydrat als Kohlenstoffquelle genutzt wurde.

Die Fermentationen wurden im Multibioreaktorsystem Sixfors mit 300 mL Arbeitsvolumen durchgeführt. Die Glucoseanfangskonzentration lag in allen Versuchen bei 150 g/L. Nach 27,5 und 51,5 Stunden der Fermentationszeit wurden in jeden Ansatz 20 g Glucose in Form

des jeweiligen Glucosesirups bzw. einer 500 g/L Glucoselösung (im Falle der Vergleichskultivierung mit Glucosemonohydrat) zugegeben. Die Versuche liefen 72 Stunden.

Das Zellwachstum und die Produktion von Citronensäure und Isocitronensäure während der Kultivierungen wurden beobachtet und verglichen.

2.8.2 Anwendung des Stärkehydrolysates in biosensorgesteuerter Substratnachdosierung

Es wurde eine Fed-Batch Kultivierung zur Anwendung des im Vorversuch (s. Kapitel 2.8.1) ausgewählten Stärkehydrolysates für die Substratnachdosierung durchgeführt. Die Fermentation startete im Batch-Modus mit 5 L Anfangsvolumen. Die Glucoseanfangskonzentration lag bei 150 g/L. Nachdem die Glucosekonzentration auf 20 g/L gesunken war, startete die biosensorgesteuerte Nachdosierung des Glucosesirups von der Südzucker AG Mannheim/Ochsenfurt (Obrigheim, Deutschland). Nachdem nach 30 Stunden der Substratnachdosierung das Fermentationsvolumen auf 7 L gestiegen war, wurde die Kultivierung auf einen kontinuierlichen Modus umgeschaltet, sodass bis zum Ende des Versuches ein konstantes Volumen von 7 L beibehalten wurde. Die Fermentation dauerte insgesamt 164 Stunden.

2.9 Untersuchung der Substratverwertung durch den rekombinanten Stamm *Yarrowia lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5

Es wurde die Verwertung von Saccharose, Glucose und Fructose durch den gentechnisch modifizierten Stamm *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 im Schüttelkolbenmaßstab untersucht. Für die Kultivierungen wurde das Produktionsmedium (Tabelle 3) mit 1,5 g/L NH_4Cl , 0,4 g/L Proteosepepton und unterschiedliche Konzentrationen von Saccharose, Glucose und Fructose genutzt. Die Inkubation der Schüttelkolben erfolgte bei 30 °C und 130 rpm. Der pH-Wert wurde täglich auf 6,0 korrigiert. Das Startvolumen des jeweiligen Versuchs lag bei 100 mL.

2.9.1 Untersuchung des Abbaus von Saccharose, Glucose und Fructose in Fermentationen mit Mischsubstratansatz

Die Startkonzentrationen der Saccharide Saccharose, Glucose und Fructose in den einzelnen Ansätzen der Versuchsserie zur Untersuchung der Substratverwertung des rekombinanten Hefestamm *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Die Saccharide wurden sowohl als Einzelsubstrate (Versuche A-D) als auch als Mischsubstrate

(Versuche E-J) angesetzt. Bis auf die Versuche C und D zur Verwertung von Glucose und Fructose als Einzelsubstrat wurden alle Untersuchungen in Doppelansatz mit jeweils verschiedenen Startkonzentrationen der Substrate durchgeführt. Die Kultivierungen dauerten 90 bis 99 Stunden.

Tabelle 5: Startkonzentrationen von Saccharose, Glucose und Fructose in Versuchen zur Untersuchung der Substratverwertung durch genetisch modifizierter *Yarrowia lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5.

Versuch	Saccharose [g/L]	Glucose [g/L]	Fructose [g/L]
A	100	-	-
B	70	-	-
C	-	100	-
D	-	-	100
E	50	55	-
F	35	35	-
G	50	-	70
H	35	-	35
I	33	33	33
J	23	23	23

2.9.2 Einfluss der Fructoseanfangskonzentration auf die Glucoseverwertung

Eine Versuchsserie zur Untersuchung des Einflusses der Fructose auf den Abbau von Glucose durch rekombinante *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 wurde durchgeführt. Der Ansatz erfolgte in vier Kultivierungen in Schüttelkolben mit 5, 25, 50 bzw. 85 g/L Fructose und jeweils 50 g/L Saccharose. Es wurde das Produktionsmedium (Tabelle 3) mit 3 g/L NH₄Cl benutzt. Die Schüttelkolben wurden bei 30 °C auf einem Horizontalschüttler mit einer Geschwindigkeit von 130 rpm inkubiert. Der pH-Wert wurde einmal täglich auf 6,0 korrigiert. Die Versuche liefen bis zur Auszehrung des Substrates 80 bis 195 Stunden.

2.10 Optimierung des Bioprozesses mit dem rekombinanten Stamm *Yarrowia lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 und Saccharose als Substrat

2.10.1 Einfluss von pH-Wert und Zugabe von Proteosepepton auf den Bioprozess

Die Untersuchungen zum Einfluss des pH-Wertes und der Zugabe von Proteosepepton auf die Citratbildung erfolgten im Multibioreaktorsystem Multifors. Für die Fermentationen wurde das Produktionsmedium (Tabelle 3) mit 3 g/L NH₄Cl und 150 g/L Saccharose benutzt. Das Anfangsvolumen lag bei 700 mL, die Temperatur wurde auf 30 °C eingestellt und der pO₂

wurde auf 50 % geregelt. Durchgeführt wurden zwei Kultivierungen mit pH 6,0 – einmal mit Zugabe von 0,4 g/L Proteosepepton und einmal ohne Zugabe von Proteosepepton – und eine Kultivierung mit pH 7,0 ohne Zugabe von Proteosepepton. Alle Versuche liefen 74 Stunden. Das Zellwachstum, die Substratverwertung und die Produktbildung wurden im Laufe der Kultivierungen beobachtet.

2.10.2 Substrathemmung

Zur Ermittlung und Beschreibung des Einflusses der Saccharoseanfangskonzentration auf den Bioprozess wurde eine Versuchsserie in Schüttelkolben angesetzt. Angewendet wurde das Produktionsmedium (Tabelle 3) mit 1,5 g/L NH_4Cl , 0,4 g/L Proteosepepton und unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen von 100 bis 300 g/L (mit Stufen von 50 g/L). Die Schüttelkolben wurden bei 30 °C auf einem Horizontalschüttler mit einer Geschwindigkeit von 140 rpm inkubiert. Der pH-Wert wurde einmal täglich auf 6,0 korrigiert. Das Startvolumen des jeweiligen Versuchs lag bei 100 mL. Die Versuche liefen bis zur Auszehrung des Substrats (94 bis 669 Stunden).

2.10.3 Langzeitstabilität des rekombinanten Stammes

Die Langzeitstabilität des gentechnisch modifizierten Stammes *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 wurde im Repeated Batch Modus mit 10 Zyklen getestet. Zur Untersuchung der Stabilität des rekombinanten Stammes unter Nutzung verschiedener Substrate (Saccharose vs. Glucose) wurde eine Versuchsserie in Schüttelkolben durchgeführt. In Ansätzen mit Saccharose wurde außerdem der Einfluss der An- bzw. Abwesenheit von Proteosepepton auf die Stabilität des rekombinanten Stammes überprüft. Zum Vergleich wurde eine Kultivierung mit dem Wildtypstamm *Y. lipolytica* H222 mit Glucose als Substrat durchgeführt. Um die Ergebnisse der Versuche abzusichern, wurden die ersten drei Zyklen der Fermentationen in doppelten Ansätzen durchgeführt. Die Übersicht der Ansätze ist in Tabelle 6 dargestellt.

Das Produktionsmedium (Tabelle 3) mit 1,5 g/L NH_4Cl und 100 g/L Zuckeranfangskonzentration wurde verwendet. Die Kulturen wurden bei 30 °C und 140 rpm auf einem Horizontalschüttler kultiviert. Das Startvolumen des jeweiligen Versuchs lag bei 100 mL. Nach dem Zyklusende wurden 10 mL der Kulturbrühe für die Animpfung des Mediums für den nächsten Zyklus genutzt. Der pH-Wert wurde einmal täglich korrigiert. Die Versuche liefen insgesamt 957 Stunden (Zyklusdauer: 5 Tage).

Tabelle 6: Übersicht der Versuchsanordnung zur Untersuchung der Langzeitstabilität des rekombinanten Stammes und des Wildtypstammes von *Y. lipolytica*.

Versuch	Mikroorganismus	Zucker	Proteosepepton	pH
I	H222-S4(p67ICL1)	Saccharose	0,4 g/L	6,0
II	H222-S4(p67ICL1)	Saccharose	-	7,0
III	H222-S4(p67ICL1)	Glucose	-	6,0
IV	H222	Glucose	-	6,0

2.11 Entwicklung verschiedener Prozessführungsstrategien mit dem rekombinanten Stamm *Yarrowia lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 und Saccharose als Substrat

2.11.1 Fed-Batch

2.11.1.1 Fed-Batch Kultivierung unter Verwendung der Biosensor-online-Regelung

Es wurden zwei Fed-Batch Fermentationen durchgeführt, in denen die Nachdosierung von Saccharose unter Verwendung eines Glucosebiosensors bzw. Saccharosebiosensors geregelt wurde. In beiden Kultivierungen wurde das Produktionsmedium (Tabelle 3) mit 3,71 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ angewendet. Die Temperatur wurde auf 30 °C eingestellt und der pO_2 auf 50 % geregelt. Das Volumen der Kulturbrühe lag in beiden Fermentationen am Anfang bei 5 L.

- Fed-Batch Kultivierung unter Verwendung des Glucosebiosensors

Es wurde eine Fed-Batch Fermentation zur Erprobung der Verwendung des Glucosebiosensors für die Saccharosenachdosierung durchgeführt. Das Medium beinhaltete am Anfang 0,4 g/L Proteosepepton und invertierte Saccharoselösung, bestehend aus 20 g/L Saccharose, 65 g/L Glucose und 65 g/L Fructose. Der pH-Wert wurde auf 6,0 geregelt. Nach 22 Stunden Kultivierungszeit startete die Nachdosierung einer Fütterungslösung, die 67 g/L Saccharose, 217 g/L Glucose und 217 g/L Fructose enthielt, gesteuert von einem Glucosebiosensor mit einem Sollwert von 1 g/L Glucose. Nach 51 Stunden Fermentationszeit wurde frisches Substrat mit 500 g/L Saccharose für die Nachdosierung vorgelegt. Der Versuch dauerte 75 Stunden.

- Fed-Batch Kultivierung unter Verwendung des Saccharosebiosensors

Es wurde eine Fed-Batch Fermentation durchgeführt. Im gesamten Verlauf wurde die Saccharosekonzentration auf 20 g/L gehalten. Hierzu wurde ein Saccharosebiosensor genutzt, mit dessen Hilfe die Zudosierung einer 750 g/L Saccharoselösung geregelt wurde. Während des Versuchs wurde der pH-Wert auf 7,0 geregelt, und der Ansatz enthielt kein Proteosepepton. Die Kultivierung dauerte 90 Stunden.

2.11.1.2 Fed-Batch Kultivierung mit ungesteuerter Substratnachdosierung

Es wurde eine Fed-Batch Fermentation unter manueller Substratnachdosierung durchgeführt. Das Produktionsmedium (Tabelle 3) enthielt zu Beginn der Fermentation 3,71 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,4 g/L Proteosepepton und 135 g/L Saccharose. Das Anfangsvolumen der Kulturbühe lag bei 5 L. Nach 26 h und 49 h Fermentationszeit wurden jeweils 500 mL einer 750 g/L Saccharoselösung der Kulturbühe zugeführt. Während der Kultivierung wurden folgende Bedingungen eingestellt: pH 6,0, 30 °C und 50 % pO_2 . Die Fermentation dauerte 72 Stunden.

2.11.2 Repeated Fed-Batch

2.11.2.1 Repeated Fed-Batch Kultivierung unter Verwendung der Biosensor-online-Regelung der Substratkonzentration

Es wurde eine Repeated Fed-Batch Fermentation in vier Zyklen durchgeführt, in der das Produktionsmedium (Tabelle 3) mit 3,71 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,4 g/L Proteosepepton und 100 g/L Saccharose zum Einsatz kam. Nach dem Absinken der Saccharosekonzentration auf 20 g/L startete die Nachdosierung einer 750 g/L Saccharoselösung, geregelt mit Hilfe eines Saccharosebiosensors. Das Anfangsvolumen lag bei 6 L. Nach jeweils 71 Stunden Zykluszeit wurde die Kulturlösung aus dem Bioreaktor bis auf 1/10 des Startvolumens abgelassen. Die restliche Fermentationsbühe wurde als Inokulum für den nächsten Zyklus genutzt. Folgende Kultivierungsbedingungen wurden für alle Zyklen eingestellt: pH 7,0, 30 °C und 50 % pO_2 .

2.11.2.2 Repeated Fed-Batch Kultivierung unter Verwendung einer programmgesteuerten Substratnachdosierung

Es wurde eine Repeated Fed-Batch Fermentation in zwei Zyklen durchgeführt, die Substratnachdosierung erfolgte mit Hilfe einer programmgesteuerten Pumpe. Im ersten Zyklus kam das Produktionsmedium (Tabelle 3) mit 5,57 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,4 g/L Proteosepepton und 150 g/L Saccharose zum Einsatz. Im zweiten Zyklus enthielt das Medium 5,57 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 120 g/L Saccharose und kein Proteosepepton. Nach einer Zykluszeit von 44 Stunden im ersten Zyklus und 24 Stunden im zweiten Zyklus startete jeweils die programmgesteuerte Nachdosierung einer 750 g/L Saccharoselösung. Diese erfolgte nach folgender Vorgabe: zyklisch 1,5 Minuten Pumpe aktiv mit Geschwindigkeit von 8 rpm, dann eine Minute Pause. Das Anfangsvolumen des jeweiligen Zyklus lag bei 5 L. Nach 71 Stunden der Zykluszeit im ersten Zyklus wurde die Fermentationslösung bis auf 500 mL abgelassen, die als Inokulum für den zweiten Zyklus dienten. Nachdem frisches Medium in den Bioreaktor eingelassen wurde, startete der zweite Zyklus, der 118 Stunden dauerte.

2.12 Modellierung

Für die Simulation eines unstrukturierten und unsegregierten Modells des Bioprozesses der Citronensäureproduktion mit *Y. lipolytica* H222 aus Glucose wurde das Programm Madonna Berkeley™ (Version 8.0.1., www.madonnaberkeley.com) genutzt. Zunächst wurden verschiedene Modelle aus der Literatur verglichen (DUNN & MOR 1975, KLASSON ET AL. 1991, MORESI 1994, WAYMAN ET AL. 1999, PAPANIKOLAOU ET AL. 2006) und basierend auf dieser Recherche wurde ein eigenes Modell entwickelt. Die Parameter der Modelle wurden unter Verwendung der gemessenen Analytenkonzentrationen mittels Kurvenfitting ermittelt. Im eigenen Modell (bezeichnet als [Moeller], s. Tabelle 7) wurden einige Annahmen und Vereinfachungen vorgenommen:

- es handelte sich um einen Idealreaktor (die Reaktoraspekte werden nicht diskutiert),
- das Absterben der Zellen wurde vernachlässigt,
- als „Produkt“ wurde die Summe von Citronensäure und Isocitronensäure bezeichnet (die Isocitronensäure als Nebenprodukt bildet im Allgemeinen ca. 10 % der Gesamtsäuremenge),
- bei der Bilanzierung der Batch-Fermentation wurde die Volumenänderung der Kulturflüssigkeit durch Zugabe der pH-Korrekturmittel nicht in Betracht gezogen,
- die lag-Phase der Mikroorganismen wurde von der gesamten Fermentationszeit abgezogen.

Die Differentialgleichungen wurden im Programm Madonna Berkeley™ mit 4-stufigem Runge-Kutta-Verfahren gelöst. Im Programm Excel 2007 wurde dafür die Euler-Methode genutzt.

Als Beispiel wird im Weiteren das entwickelte Modell dargestellt.

Unstrukturiertes und unsegregiertes Modell einer Batch Kultivierung (s. Kapitel 3.3.1.1):

```
{Programmkopf}  
starttime=0  
stoptime=40  
dt=0.001  
  
{kinetische Prozessparameter}  
um=0.3  
yxn=10  
yxs=0.45  
yps=0.61  
k=-1.2  
q=0.16  
  
{Startkonzentrationen}  
n0=0.771  
init x=0.44  
init s=101  
init n=0.771  
init p=0
```

{Differentialgleichungen zur Berechnung der Kinetik der einzelnen Analyte}

$$d/dt(x)=rx$$

$$d/dt(s)=rs$$

$$d/dt(n)=rn$$

$$d/dt(p)=rp$$

{Reaktionsgeschwindigkeiten}

$$rx=u*x$$

$$u=um*n/n0$$

$$rs=-1/yxs*rx-1/yps*rp$$

$$rn=-1/yxn*rx$$

$$rp=k*rx+q*x$$

Tabelle 7: Differenzialgleichungen des Modells zur Beschreibung der Batch und Fed-Batch Kultivierungen der Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* aus Glucose.

	Batch	Fed-Batch
Biomasse	$\frac{dX}{dt} = \mu * X$	$\frac{d(v_X)}{dt} = \mu * X * v$ $X = \frac{v_X}{v}$
Glucose	$\mu = \mu_{\max} * \frac{N}{N_{t=0}}$ $\frac{dG}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/G}} * \frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{P/G}} * \frac{dP}{dt}$	$\mu = \mu_{\max} * \frac{N}{N_{t=0}}$ $\frac{d(v_G)}{dt} = \left(-\frac{1}{Y_{X/G}} * \frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{P/G}} * \frac{dP}{dt} \right) * v + F_G * S_F$ $G = \frac{v_G}{v}$
Stickstoff	$\frac{dN}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/N}} * \frac{dX}{dt}$	$\frac{d(v_N)}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/N}} * \frac{dX}{dt} * v$ $N = \frac{v_N}{v}$
Produkt	$\frac{dP}{dt} = k * \frac{dX}{dt} + q_m * X$	$\frac{d(v_P)}{dt} = \left(k * \frac{dX}{dt} + q * X \right) * v$ $P = \frac{v_P}{v}$

Weiterhin wurde das entwickelte Modell für die Anwendung im Fed-Batch Modus angepasst (s. Tabelle 7). Da sich das Volumen der Kulturbrühe mit der Zeit verändert, müssen die Veränderungen im Bioreaktor mit einer Massenbilanz berücksichtigt werden. Die Bilanzen im Modell basieren also auf den Massenströmen. Die zeitliche Volumenänderung der Fermentationsflüssigkeit wurde über die Gewichtszunahme des Bioreaktors berechnet. Hierfür wurde im Programm Excel 2007 die zeitliche Funktion des Bioreaktorgewichts mit einem Polynom 2. Grades gefittet. Die erste Ableitung der Gleichung dieses Polynoms (vs. Zeit) drückte den gesamten Zulaufstrom F aus. Der Zulaufstrom von der Fütterungslösung mit 500 g/L Glucose wurde anhand der Gewichtsabnahme des Vorlagebehälters mit der Glucoselösung für die Nachdosierung berechnet. Die zeitliche

Funktion des Absolutwertes des Gewichts des Vorlagebehälters wurde ebenfalls mit einem Polynom 2. Grades gefittet und bei diesem Polynom wurde die erste Ableitung durchgeführt. So wurde der Zulaufstrom des Substrates F_s festgestellt. Weil die Fed-Batch Kultivierung im Batch Modus angefangen hat, wurde ein Parameter t_{feed} festgelegt, der den Zeitpunkt des Starts der Substratnachdosierung darstellt.

Unstrukturiertes und unsegregiertes Modell einer Fed-Batch Kultivierung (s. Kapitel 3.3.2.3):

```
{Programmkopf}
starttime=0
stoptime=171
dt=0.001

{kinetische Prozessparameter}
um=0.18
yn=24.2
ys=0.42
yp=0.61
k=-0.53
q=0.068

{Glucosekonzentration in der Fütterungslösung und Zeitpunkt des Nachdosierungsanfanges}
sf=500
tfeed=40

{Anfangskonzentrationen bzw. -massen}
n1=1.019
x1=2.1
s1=150
p1=0
init v=5
init vx=v*x1
init vs=v*s1
init vn=v*n1
init vp=v*p1

{Gleichungen zur Ermittlung der Zuflussrate des Substrats und der Natronlauge}
F=if time>=tfeed then F1 else 0
F1=-0.0004*time+0.0746
Fs=if time>=tfeed then F2 else 0
F2=-0.0002*time+0.0507

{Differenzialgleichungen zur Berechnung der Kinetik der einzelnen Analyte}
d/dt(v)=F
d/dt(vx)=rx*v
d/dt(vs)=rs*v+Fs*sf
d/dt(vn)=rn*v
d/dt(vp)=rp*v

{Ermittlung der Konzentrationen der Analyte}
x=vx/v
s=vs/v
n=vn/v
p=vp/v
```


{Reaktionsgeschwindigkeiten}

$rx = u \cdot x$

$u = u_m \cdot n / n_l$

$rs = -1/y_{xs} \cdot rx - 1/y_{ps} \cdot rp$

$rn = -1/y_{xn} \cdot rx$

$rp = k \cdot rx + q \cdot x$

$d = F/v$

Um alle Modelle untereinander zu vergleichen, wurde bei jedem Modell die Fehlerquadratsumme (bekannt auch als Methode der kleinsten Quadrate nach Gauß) aus der gemessenen Konzentration des jeweiligen Analyten und dem vom Modell berechneten Wert ermittelt:

$$\|e\|^2 = \sum_{i=1}^n (f(t_i, c_A) - y_i)^2$$

wobei $f(t, c_A)$ der zeitliche Ablauf der Konzentration des Stoffes A im Modell und y_i die gemessene Konzentration des Stoffes A ist. Zum Zeitpunkt t_i wird die Differenz der tatsächlichen und der mit dem Modell bestimmten Konzentration des Stoffes A berechnet und die Summe der Quadrate dieser Differenz stellt den Fehler dar. Der Wert des Fehlers $\|e\|^2$ sollte möglichst klein sein.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Allgemeine Charakteristik des Bioprozesses zur Citronensäureproduktion mit *Yarrowia lipolytica* und Schlussfolgerungen für die weitere Prozessentwicklung

Der Bioprozess der Citronensäureproduktion mit der Hefe *Yarrowia lipolytica* wird in zwei Phasen unterteilt: Wachstumsphase (auch Trophophase genannt) und Produktbildungsphase (auch als Idiophase bezeichnet) (GLAZUNOVA ET AL. 1976). Beide Phasen sind in Abbildung 7 dargestellt. Im Laufe der Wachstumsphase wird das Substrat von der Hefe allein für das Zellwachstum und die Zellteilung genutzt. Die Biomassekonzentration steigt in dieser Phase des Bioprozesses exponentiell an, wie man auch am Verlauf der Konzentrationen von Sauerstoff und Kohlendioxid in der Abluft erkennen kann (s. Abbildung 8A). Die Wachstumsphase endet mit der Auszehrung des Stickstoffs aus dem Medium. Die gemessene Biotrockenmasse steigt meistens aber weiter an, bis sie doppelt so hohe Werte erreicht als am Ende der Wachstumsphase (s. Abbildung 7). Als Grund für dieses Phänomen wurde von KOZLOVA ET AL. (1981) und THIERSCH (1987) die Reservestoffeinlagerung in den Hefezellen genannt. WENTWORTH & COOPER (1996), die *C. lipolytica* ATCC 20390 auf Glucose in synchronisierten Kulturen kultivierten, gaben an, dass die Zellen weiter gewachsen sind, die Zellzahl sich aber nicht mehr änderte. Auf der anderen Seite stellten BEHRENS ET AL. (1987) und PAPANIKOLAOU ET AL. (2003) fest, dass das reproduktive Wachstum von *Y. lipolytica* auch nach der Auszehrung des anorganischen Stickstoffs aus dem Medium weitere 2-5 Stunden fortgeführt wird.

Im Moment der Stickstofflimitierung verringert sich für ca. 2 Stunden der Sauerstoffbedarf (s. Pfeile in Abbildungen 8A und 8B), sodass die Rührerdrehzahl kurzzeitig absinkt. Im zeitlichen Verlauf der Sauerstoffkonzentration in der Abluft ist ein lokales Maximum erkennbar. Dieser Effekt wurde auch von BEHRENS ET AL. (1987) und THIERSCH (1987) beobachtet und ist typisch für die Übergangsphase zwischen der Auszehrung der extrazellulären Stickstoffquelle und dem Anfang der Citronensäureproduktion bei Nutzung von Kohlenhydraten als Substrat. Im Laufe der Idiophase kommt es zum allmählichen Rückgang des Sauerstoffbedarfs, sodass die Kurve der Sauerstoffkonzentration wieder ansteigt und die Zeitfunktionen von Kohlenstoffdioxidkonzentration und Rührerdrehzahl absinken.

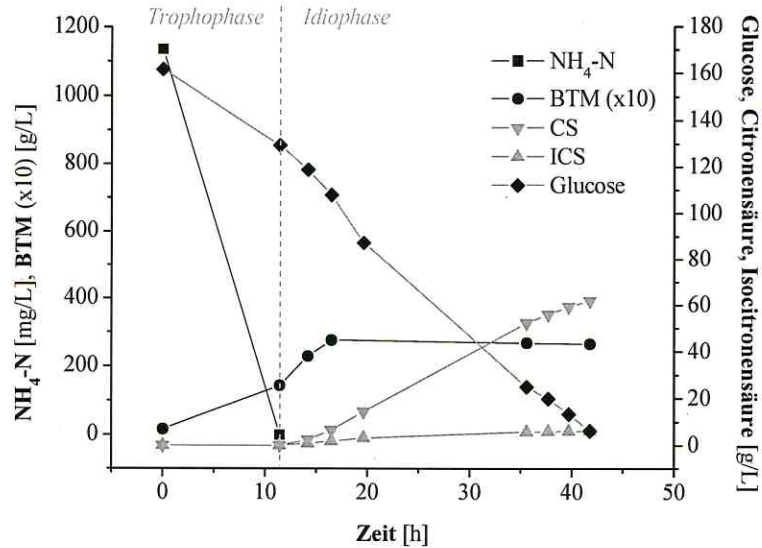


Abbildung 7: Beispiel einer Batch-Kultivierung: Konzentrationen der Substrate (Glucose, Ammonium-Stickstoff), Biomasse und Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure) (MOELLER ET AL. 2010).

Bedingungen: pH = 6,0; T = 30 °C; pO₂ = 50 %; V = 5 L.

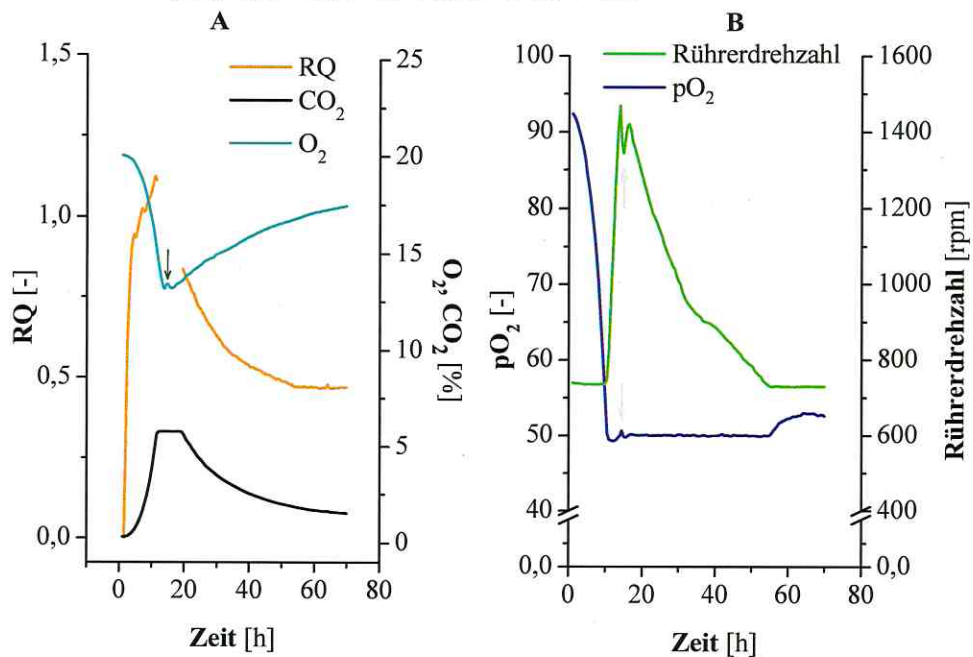


Abbildung 8: Respiratorischer Quotient und Konzentrationen von Sauerstoff und Kohlendioxid in der Abluft (A) (MOELLER ET AL. 2010) sowie Rührerdrehzahl und gelöster Sauerstoff (pO₂) (B) im Laufe des zweiten Zyklus einer Repeated Fed-Batch Kultivierung (s. Kapitel 3.2.2.4). (Der Messbereich des Abluftanalysators ist für CO₂ 0-5 %, womit das Plateau auf der CO₂-Kurve und die Unterbrechung der RQ-Kurve zu erklären sind.)

Bedingungen: pH 6,0; T = 30 °C; pO₂ = 50 %; V₀ = 5 L.

THIERSCH (1987) beschrieb ein Phänomen der Verzögerung der Substratverwertung in dieser Übergangsphase bei den Kultivierungen von *Y. lipolytica* H181 auf Glucose. Er nahm an, dass zu diesem Zeitpunkt die Zellmembran modifiziert werden muss, damit die Ausscheidung der Citronensäure ins Medium ermöglicht wird. Sobald aber Paraffin als Substrat für das Wachstum verwendet wird, tritt keine Zwischenphase auf und die Säureausscheidung beginnt unmittelbar nach der Stickstofflimitation. ANASTASSIADIS ET AL. (2002 und 2005) stellten fest, dass in der Übergangsphase sowohl die intrazelluläre Konzentration der Ammonium-Ionen (wahrscheinlich aufgrund der Proteolyse) als auch die Energieladung innerhalb der Zellen von *Candida oleophila* ansteigen. Die Autoren behaupten, dass unter diesen Bedingungen ein spezifisches aktives Transportsystem für die Citronensäureausscheidung in den Zellen induziert wird. Die Länge der Übergangsphase ist nach ihren Beobachtungen vom gewählten Hefestamm abhängig. KOZLOVA ET AL. (1981), die die strukturellen Änderungen der Zellen von *Y. lipolytica* im Laufe der Citronensäuresynthese untersuchten, beschrieben eine weitgehende Reorganisation der Zelle während der Übergangsphase, die die Inhibierung der Proteinsynthese, Änderungen der Struktur des Zytoplasmas sowie die Anreicherung von Lipiden und Vakuolisierung umfasst. ANASTASSIADIS ET AL. (2002) berichten von der Bildung großer Vakuolen als Ergebnis intrazellulärer Anreicherung von Citronensäure innerhalb dieser Organellen.

Nach der Übergangsphase beginnt die Idiophase, in der organische Säuren (Citronensäure und Isocitronensäure) produziert werden. Während dieser Produktbildungsphase wird Glucose auf verschiedene Weise verstoffwechselt. Die Prozesse der Glucoseverwertung können mit folgenden Gleichungen ausgedrückt werden (BRIFAUD & ENGASSER 1979):



Die Citronensäureproduktion fängt mit einer kurzen Anlaufphase an, für die eine langsame Produktbildung typisch ist. Danach steigt die Citronensäurekonzentration in der Kulturlösung linear an. In der Phase des linearen Anstiegs wird generell die Citronensäure mit höchster Geschwindigkeit produziert (s. Abbildung 9A). Diese Beobachtung haben auch ANASTASSIADIS ET AL. (2002) in Fed-Batch Kultivierungen von *Candida oleophila* gemacht. Nachdem ca. 70 g/L Citronensäure erreicht werden, kommt es zu einer allmählichen Verlangsamung der Produktbildung (s. z. B. Abbildung 21). Dies ist die Folge der Produkthemmung (s. Kapitel 3.2.5) und der Alterung der Zellen auf Grund des fehlenden Wachstums in stickstofflimitierenden Bedingungen (ARZUMANOV ET AL. 2000). Kurz nach

der Auszehrung der Kohlenstoffquelle fängt die Utilisierung von Citronensäure an (s. Kapitel 3.3.1.1).

Die Erhaltung des Stoffwechsels ist während der Produktbildung von großer Bedeutung, wie BRIFFAUD & ENGASSER (1979) feststellten. Nach ihren Berechnungen werden 60 % des Sauerstoffs und 35 % der Glucose allein für die Atmung der Zellen aufgebraucht.

Der respiratorische Quotient (RQ, s. Gleichung 7), dessen Wert in der Trophophase nahe 1 liegt, geht im Laufe der Idiophase bis auf Werte von 0,5 zurück (s. Abbildung 8A).

$$RQ = \frac{V(CO_2 \text{ Produktion})}{V(O_2 \text{ Aufnahme})} \quad \left[\frac{\text{mol}}{\text{mol}} \right] \quad [7]$$

Der respiratorische Quotient hängt von der Art des verstoffwechselten Substrates ab; bei Nutzung von Kohlenhydraten als Kohlenstoffquelle ist aufgrund des stöchiometrischen Verhältnisses von Sauerstoff und Kohlenstoff von 1:1 der $RQ = 1$. Davon ist abzuleiten, dass während der Produktbildungsphase, wenn $RQ < 1$ ist, Kohlendioxid fixiert wird. Dies geschieht in dem Schritt der enzymatischen Carboxylierung von Pyruvat als Endprodukt des Glucoseabbauweges der Glykolyse zu Oxalacetat, die mit dem Enzym Pyruvatcarboxylase (EC 6.4.1.1) katalysiert wird (s. Abbildung 3). Es handelt sich um eine anaplerotische Reaktion für den Citronensäurezyklus, die für die Überproduktion der Citronensäure eine entscheidende Rolle spielt (PAPAGIANNI 2007). Das Kohlendioxid, das für die Reaktion benötigt wird, stammt offenbar sowohl aus dem Metabolismus der Zelle als auch aus dem Medium (sog. heterotrophe CO_2 -Fixierung). Theoretisch sollte die Menge an CO_2 , die mit Hilfe von Pyruvatdehydrogenase entsteht, ausreichend für die Deckung des Bedarfs für die Carboxylierung sein. Es wurde nachgewiesen, dass die Fixierung des extrazellulären Kohlenstoffdioxids abhängig vom pH-Wert ist (MATTEY 1999).

Die zeitliche Änderung der Isocitronensäurekonzentration in der Fermentationslösung ist ähnlich der der Citronensäurekonzentration: nach einer kurzen Anlaufphase steigt die Konzentration der Isocitronensäure linear an; nachdem ca. 6 g/L Isocitronensäure erreicht werden (bei Nutzung von Glucose als Substrat), verlangsamt sich die Produktion. Der Zeitpunkt des Beginns der Abnahme der Produktbildungsrate ist bei beiden Säuren gleich.

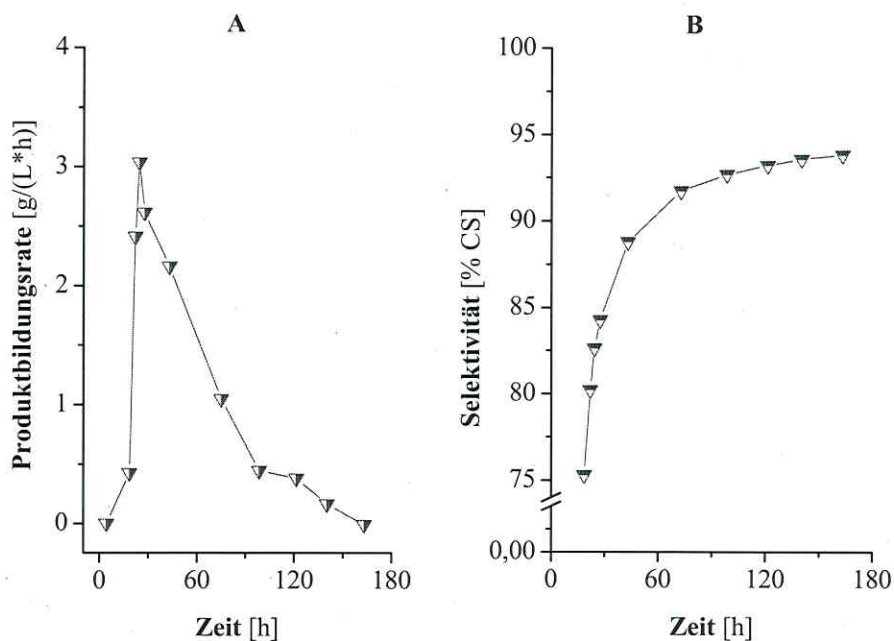


Abbildung 9: Produktbildungsrate (A) und Selektivität des Bioprozesses für Citronensäure (B) im Laufe einer Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222 aus Glucosesirup von Fa. Südzucker AG (s. Kapitel 3.4.2).
Bedingungen: pH 6,0; T = 30 °C; pO₂ = 50 %; V₀ = 5 L.

Die Selektivität des Bioprozesses für die Citronensäure erreicht in Kultivierungen mit dem Wildtypstamm *Y. lipolytica* H222 in der frühen Produktbildungsphase Werte von über 50 %. In den ersten 5 Stunden der Idiophase steigt die Selektivität schnell an, bis es bei 90 % zu einer rapiden Verlangsamung der Zunahme kommt. Bei Anwendung von Glucose als Substrat wird am Ende der Batch-Fermentation eine Selektivität von max. 92 % erreicht (s. Abbildung 9B). Ähnliche Beobachtungen machten auch ANASTASSIADIS ET AL. (2002) bei verschiedenen Stämmen von *Candida lipolytica* und *Candida oleophila*. Das Verhältnis Citronensäure/Isocitronensäure stieg in ihren Versuchen mit der Fermentationszeit an, die Selektivität hing vom verwendeten Hefestamm ab.

Die Selektivität im Laufe der Kultivierung mit dem rekombinanten Stamm *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 zeigt einen anderen Verlauf als bei der Nutzung des Wildtypstammes. Aufgrund der genetischen Modifizierung wird das Verhältnis der Säuren bereits in der frühen Produktbildungsphase stark auf die Seite von Citronensäure verschoben, sodass die Selektivität von Anfang an höher 90 % ist. Am Ende der Fermentation erreicht die Selektivität in der Regel Werte von 94-97 %. Der direkte Vergleich der Selektivitäten bei der

Nutzung des Wildtypstammes und des rekombinanten Stammes wird in Kapitel 3.7.2.2 (Abbildung 52B) veranschaulicht.

Die Kinetik des Bioprozesses und somit auch die erreichte Citronensäurekonzentration hängen mit einer qualitativ hochwertigen Vorkultur zusammen. Dies wird in dieser Arbeit deutlich. Für die ersten Versuche mit Glucose als Substrat wurden eintägige Vorkulturen mit niedrigem Hefeextraktanteil (0,25 g/L Hefeextrakt) verwendet (Versuche in Kapiteln 3.2.1, 3.2.2, 3.2.4, 3.2.5 und 3.3.1); zum Animpfen der übrigen Versuche wurden dreitägige Vorkulturen mit 2,5 g/L Hefeextrakt benutzt. Der direkte Vergleich von zwei Fed-Batch Fermentationen mit unterschiedlich lange gewachsenen Vorkulturen wird im Kapitel 3.3.2.3 dargestellt.

Einen erheblichen Einfluss auf den Verlauf der Zulaufverfahren haben auch die Konzentrationen des zugeführten Substrates und der pH-Korrekturmittel, v. a. Natronlauge. In den ersten Versuchen (Kapitel 3.3.1) wurden 300 g/L Glucoselösung und 10 % NaOH (w/v) genutzt. Die Konzentration der Natronlauge wurde in den späteren Versuchen auf 30 % erhöht. Die Substratkonzentration wurde im Falle der Glucose dann auf 500 g/L geändert. Im Kapitel 3.4, wo die Ergebnisse der Nutzung von Stärkehydrolysaten mit 890 bis 970 g/L Glucose präsentiert werden, wird der Einfluss der Glucosekonzentration auf Fed-Batch Versuche umfangreich diskutiert. Für die Substratnachdosierung im Zulaufverfahren bei Nutzung von rekombinanter *Y. lipolytica* wurde eine 750 g/L-Saccharoselösung genutzt.

Ebenso üben die Kultivierungsbedingungen und die Art der Prozessführung einen großen Einfluss auf die Effektivität der Citronensäureherstellung aus. Die eingehende Optimierung der Bedingungen des Bioprozesses unter Verwendung von Glucose als Substrat wird in Kapitel 3.2 vorgestellt. Weitere Versuche zur Anpassung der ermittelten optimalen Bedingungen auf den Bioprozess mit Saccharose werden in Kapitel 3.6 beschrieben. Die Erprobung verschiedener Prozessführungsstrategien und ihr Einfluss auf die Effektivität des Bioprozesses werden in den Kapiteln 3.3 (für Glucose) und 3.7 (für Saccharose) ausführlich dargestellt. In diesem Teil der Dissertation kommt die Biosensor-online-Regelung der Substratkonzentration zum Einsatz.

Die Nutzung von Saccharose für die Citronensäureproduktion mit der Hefe *Y. lipolytica* stellt eine innovative Methode dar. Bis dato wurden nur drei Versuche in Bioreaktoren durchgeführt (FÖRSTER ET AL. 2006). Im Kapitel 3.5 werden Versuche beschrieben, die zum besseren Verständnis der enzymatischen Spaltung von Saccharose und der Verwertung der Zwischenprodukte Glucose und Fructose durch den genetisch modifizierten Stamm beitragen.

Zur Beschreibung des Bioprozesses der Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* aus Glucose in Batch und Fed-Batch Modus wird im Kapitel 3.8 ein Modell vorgestellt. Abschließend wird im Kapitel 3.9 die Wirtschaftlichkeit des hefebasierten Verfahrens im Vergleich mit der konventionellen Citronensäureherstellung unter Verwendung von *A. niger* beurteilt.

3.2 Optimierung des Bioprozesses mit dem Wildtypstamm *Yarrowia lipolytica* H222 mit Glucose als Substrat

3.2.1 Einfluss der Temperatur auf den Bioprozess

Der Temperatureinfluss auf das Zellwachstum von *Y. lipolytica* wurde zwischen 24 und 34 °C untersucht, es wurden dazugehörige Wachstumskurven aufgenommen. Bei 24 °C wurde die niedrigste maximale spezifische Wachstumsrate $\mu_{\max} = 0,110 \text{ h}^{-1}$ festgestellt. Beim Erhöhen der Temperatur stieg auch die maximale Wachstumsrate, bis sie bei 30 °C ihren höchsten Wert mit $\mu_{\max} = 0,132 \text{ h}^{-1}$ erreichte (s. Abbildung 10). Ein weiterer Anstieg der Temperatur bis auf 34 °C verursachte keine Veränderung. Bei 36 °C und 38 °C wurde kein Wachstum mehr festgestellt.

Die Reproduzierbarkeit der ermittelten maximalen Wachstumsraten wurde bei sechs parallelen Kultivierungen mit gleichen Bedingungen getestet. Die mittlere Abweichung von $\mu_{\max}$ betrug $0,01 \text{ h}^{-1}$.

Das Absinken der Wachstumsrate bei Temperaturen über 34 °C ist in Übereinstimmung mit der Feststellung von BARTH & GAILLARDIN (1997), dass die optimale Temperatur für das Wachstum von *Y. lipolytica* selten 32-34 °C überschreitet.

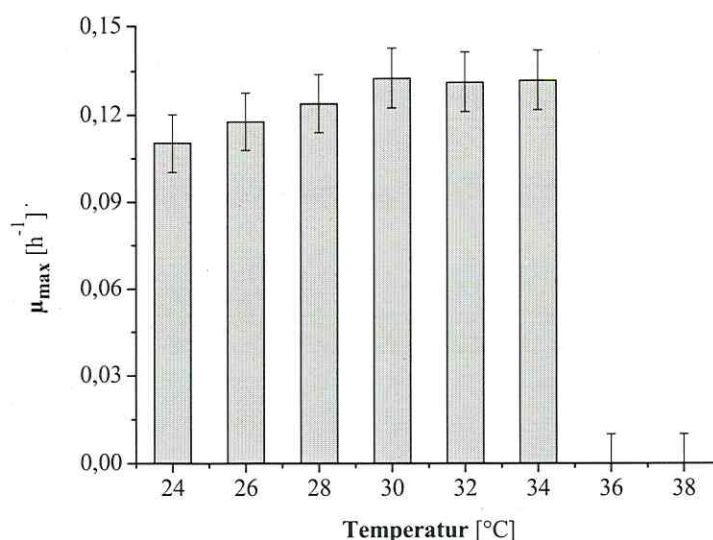


Abbildung 10: Einfluss der Temperatur auf die maximale spezifische Wachstumsrate $\mu_{\max}$ von *Y. lipolytica* H222 beim Wachstum auf Glucose (MOELLER ET AL. 2007).
Bedingungen: pH 7,0; $pO_2 = 50\%$; $V = 300\text{ mL}$; 1000 rpm. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und die Standardabweichungen von sechs Wiederholungen.

Zur Beurteilung des Temperatureinflusses auf die Citronensäureproduktion wurden während der Idiophase Temperaturen von 26 bis 34 °C eingestellt. Die höchste Citronensäureendkonzentration von 41 g/L wurde bei der Temperatur von 30 °C erreicht (s. Tabelle 8). Auch für andere Parameter lagen die höchsten Werte bei 30 °C, wie z. B. für die substratbezogene Ausbeute (0,551 g_{CS}/g_{GL}), die volumetrische Produktivität für Citronensäure (0,45 g/(L*h)), die (maximale) biomassebezogene Produktbildungsrate für Citronensäure ($p_{CS} = 0,12\text{ h}^{-1}$ und $p_{CS,\max} = 0,27\text{ h}^{-1}$) sowie für die Selektivität für Citronensäure (93,1 % CS). Die maximale Produktbildungsrate blieb in einem weiten Temperaturbereich von 26 bis 32 °C auf Werten nahe 1 g/(L*h), bei 34 °C ist sie dann um zwei Drittel gesunken. Die Endkonzentration der Isocitronensäure hatte ihr Maximum von 4,10 g/L bei 28 °C und nahm dann mit steigender Temperatur ab.

Aus den in Abbildung 10 und Tabelle 8 präsentierten Ergebnissen wurde die Temperatur von 30 °C sowohl für das Wachstum von *Y. lipolytica* H222 als auch für die Citronensäureproduktion als Optimum gefunden (MOELLER ET AL. 2007).

Tabelle 8: Ermittelte Parameter aus der Temperaturoptimierung des Bioprozesses zur Produktion von Citronensäure aus Glucose mit *Y. lipolytica* H222 (MOELLER ET AL. 2007).

t [°C]	BTM _{N=0} [g/L]	c _{CS} [g/L]	c _{ICS} [g/L]	S _{CS} [%]	Y _{CS/GL} [g/g]	P _{CS} [g/(L*h)]	P _{CS,max} [g/(L*h)]	p _{CS} [h ⁻¹]	p _{CS,max} [h ⁻¹]
26	4,40	33,4	3,03	91,7	0,50	0,36	1,01	0,07	0,15
28	5,39	36,3	4,10	89,9	0,39	0,39	0,97	0,07	0,18
30	3,71	41,0	3,05	93,1	0,55	0,45	1,00	0,12	0,27
32	3,38	37,7	2,79	93,1	0,46	0,41	0,98	0,10	0,24
34	7,00	13,5	1,78	88,4	0,15	0,15	0,34	0,02	0,05

Bedingungen: pH 6,0; T (Wachstumsphase) = 30 °C; pO₂ = 50 %; V = 300 mL; 1000 rpm.

3.2.2 Einfluss des pH-Wertes auf den Bioprozess

Die Wirkung von unterschiedlichen pH-Werten auf das Zellwachstum wurde im Bereich zwischen pH 3,0 und 9,0 untersucht, indem Wachstumskurven aufgenommen wurden. Die ermittelten maximalen spezifischen Wachstumsraten sind in der Abbildung 11 dargestellt. Ein allmählicher Anstieg der $\mu_{\max}$ vom pH 3,0 bis pH 6,0 wurde beobachtet. Die höchste maximale Wachstumsrate wurde bei pH 6,5 erreicht und betrug 0,192 h⁻¹, wobei $\mu_{\max}$ bei pH 6,0 ($\mu_{\max}=0,191$ h⁻¹) und 7,0 ($\mu_{\max}=0,191$ h⁻¹) nur geringfügig niedriger waren. Bei höheren pH-Werten nahm $\mu_{\max}$ schnell wieder ab. Bei pH 9,0 fand kein Wachstum mehr statt.

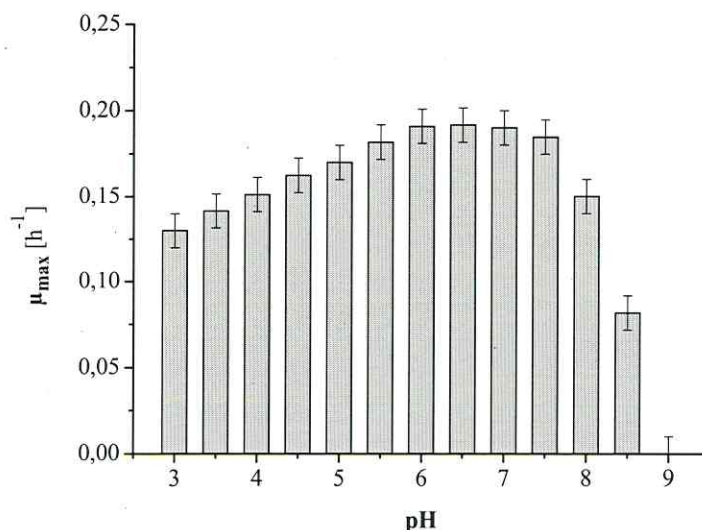


Abbildung 11: Einfluss des pH-Wertes auf die maximale spezifische Wachstumsrate $\mu_{\max}$ von *Y. lipolytica* H222 (MOELLER ET AL. 2007).

Bedingungen: T = 30 °C; pO₂ = 50 %; V = 300 mL; 1000 rpm. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und die Standardabweichungen von sechs Wiederholungen.

Die für das pH-Optimum der Wachstumsphase ermittelte maximale spezifische Wachstumsrate ist in Übereinstimmung mit Werten, die in der Literatur publiziert wurden. WOJTATOWICZ ET AL. (1991) erreichten bei unterschiedlichen Stämmen von *Y. lipolytica* bei pH 5,5 maximale spezifische Wachstumsraten zwischen 0,09 und 0,22 h⁻¹ (mit 6 g/L NH₄Cl als N-Quelle). BRIFFAUD & ENGASSER (1979) publizierten $\mu_{\max}=0,21$ h⁻¹ bei pH 4,7 und 5 g/L NH₄NO₃ als N-Quelle für *Saccharomycopsis lipolytica* D 1805. THIERSCH (1988) berichtete von etwas höheren maximalen spezifischen Wachstumsraten zwischen 0,23-0,25 h⁻¹ für *Y. lipolytica* H181 (bei pH 5,0 und 3 g/L NH₄Cl). Die Form der Kurve der Abhängigkeit der maximalen spezifischen Wachstumsrate vom pH-Wert in Abbildung 11 stimmt mit Angaben von BARTH UND GAILLARDIN (1997) überein. Die Autoren berichteten, dass die meisten *Y. lipolytica*-Stämme niedrige pH-Werte bis zu 3,0 tolerieren und ihr Wachstum bei pH höher 7,0 gehemmt wird, bis sie bei Werten über pH 8,0 gar nicht mehr wachsen.

Das pH-Optimum der Idiophase wurde im Bereich der höchsten maximalen Wachstumsraten ermittelt, d.h. zwischen pH 5,5 und pH 7,5. Die Trophophase lief bei allen Versuchen bei pH 7,0. Die Endkonzentrationen von Citronensäure und Isocitronensäure sowie weitere Produktionsparameter sind in Tabelle 9 zu sehen.

Tabelle 9: Ermittelte Parameter aus der pH-Optimierung des Bioprozesses zur Citronensäureproduktion aus Glucose mit *Y. lipolytica* H222 (MOELLER ET AL. 2007).

pH	BTM _{N=0} [g/L]	c _{CS} [g/L]	c _{ICS} [g/L]	S _{CS} [%]	Y _{CS/GL} [g/g]	P _{CS} [g/(L*h)]	P _{CS,max} [g _{CS} /(L*h)]	p _{CS} [h ⁻¹]	P _{CS,max} [h ⁻¹]
5,5	8,46	22,4	2,56	89,7	0,20	0,24	0,78	0,029	0,092
6,0	8,13	24,9	2,81	89,9	0,22	0,27	1,09	0,033	0,134
6,5	8,46	22,5	3,10	87,9	0,16	0,25	0,80	0,029	0,094
7,0	6,74	22,3	3,13	87,7	0,19	0,24	0,72	0,036	0,107
7,5	7,58	18,8	3,46	84,5	0,16	0,20	0,74	0,027	0,098

Bedingungen: pH (Wachstumsphase) 7,0; T = 30 °C; pO₂ = 50 %; V = 300 mL; 1000 rpm.

Die Biomassekonzentrationen, die zum Zeitpunkt der Stickstoffauszehrung gemessen wurden, wurden als Grundlage für die Berechnung der spezifischen Produktbildungsrate gewählt. In den ersten zwei Stunden nach Beginn der Produktbildungsphase hat sich bei allen Versuchen die Biotrockenmasse noch um 2-4 g/L erhöht. Im weiteren Verlauf blieben dann die Biomassekonzentrationen stabil.

Die Konzentration von Citronensäure erreichte bei allen Versuchen ähnliche Endwerte von 18,8 bis 24,9 g/L, die maximale Citronensäurekonzentration wurde bei pH 6,0 festgestellt. Bei

diesem pH-Wert erreichten auch andere Parameter, wie die Selektivität des Bioprozesses für Citronensäure ($S_{CS} = 89,9 \%$), die substratbezogene Ausbeute ($Y_{CS/GL} = 0,22 \text{ g/g}$) sowie die (maximale spezifische) Produktbildungsrate ($P_{CS} = 0,27 \text{ g/(L*h)}$, $P_{CS,max} = 1,09 \text{ g/(L*h)}$ und $p_{CS,max} = 0,134 \text{ h}^{-1}$) ihre Maxima. Die höchste biomassespezifische Produktivität wurde mit $0,036 \text{ h}^{-1}$ dagegen bei pH 7 erzielt. Die Endkonzentration von Isocitronensäure stieg mit zunehmendem pH-Wert bis zum maximalen Wert von $3,46 \text{ g/L}$ bei pH 7,5. Die Selektivität des Bioprozesses für Citronensäure nahm mit steigendem pH-Wert (ab pH 6,0) in der Idiophase ab (s. Tabelle 9). Diese Tendenz zur Verschiebung des Säureverhältnisses auf die Seite von Citronensäure mit fallenden pH-Werten steht in Übereinstimmung mit Untersuchungen an *Y. lipolytica* von FINOGENOVA ET AL. (1991), die Ethanol als Kohlenstoffquelle nutzten, und AURICH ET AL. (2002), wo Pflanzenöle als Substrate für *Y. lipolytica* H181 dienten. Die in Tabelle 9 angegebenen substratbezogenen Ausbeuten bewegen sich im Bereich der von RANE & SIMS (1993) erreichten $0,12\text{-}0,21 \text{ g}_{CS}/\text{g}_{GL}$.

Anhand der in Tabelle 9 präsentierten Ergebnisse wurde pH 6,0 als Optimum für die Produktbildungsphase ermittelt. Weil die Differenz beim Wachstum von *Y. lipolytica* zwischen pH 6,0 und pH 6,5 nur minimal war, wurde für den gesamten Bioprozess der pH-Wert 6,0 zum pH-Optimum erklärt, da die Prozessführung mit einem während des ganzen Bioprozesses konstant gehaltenen pH-Wert wesentlich vereinfacht wird (MOELLER ET AL. 2007).

Das ermittelte pH-Optimum ist in Übereinstimmung mit der Empfehlung von ROEHR ET AL. (1996), den pH-Wert während der Fermentation mit *Y. lipolytica* über 5,0 zu halten, da bei niedrigerem pH Nebenprodukte wie die Polyole Erythritol und Arabitol entstehen.

3.2.3 Einfluss der Stickstoffkonzentration (Biomassekonzentration) auf den Bioprozess

Ein erhebliches Potenzial zur Steigerung der Produktivität des Bioprozesses der Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* liegt in der Erhöhung der Biomassekonzentration im Kultivierungsmedium. Die Menge der gebildeten Biomasse ist von der gewählten Stickstoffkonzentration im Produktionsmedium abhängig. Deswegen wurde eine Versuchsserie zur Abhängigkeit der Citronensäurebildung von der Anfangskonzentration der Stickstoffquelle durchgeführt.

Aus den Abbildungen Abbildung 12 und Abbildung 13 und der Tabelle 10 wird ersichtlich, dass steigende $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen im Kulturmedium eine lineare Erhöhung der Biomassebildung ($R^2 = 0,994$) im Bereich zwischen $1,85$ und $9,89 \text{ g/L}$ Ammoniumsulfat bewirken. Der extrazelluläre Stickstoff wurde bei den Versuchen 2 bis 6 nach 22 Stunden

Fermentationsdauer fast gleichzeitig ausgezehrt; beim Versuch 1 wurde die Stickstoffquelle schon innerhalb der ersten 20 Stunden von den Zellen aufgebraucht.

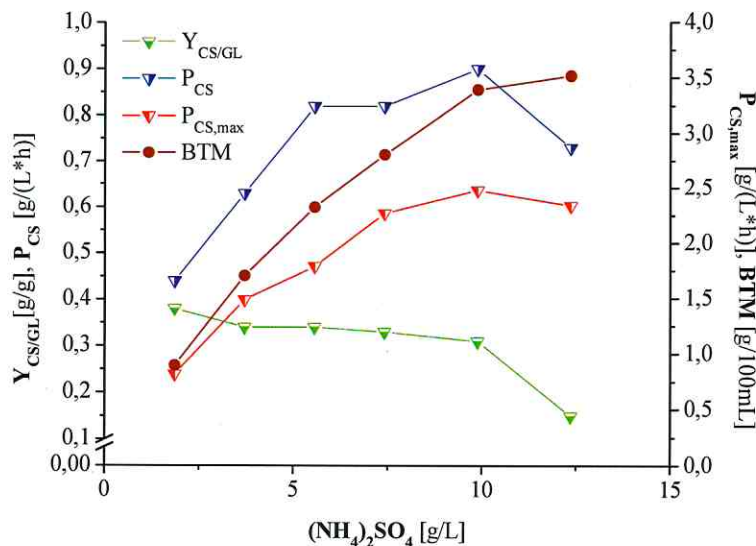


Abbildung 12: Einfluss der Anfangskonzentration von Ammoniumsulfat auf die Biomassebildung und die Produktbildung (Ausbeute, Produktivitäten) im Bioprozess zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222 aus Glucose.
Bedingungen: pH 6,0; T = 30 °C; $p\text{O}_2$ = 50 %; V = 300 mL; 1000 rpm.

Die Produktbildungsrate der Citronensäurebildung stieg im Bereich zwischen den $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen von 1,85 und 5,56 g/L bis zum Wert von 0,82 g/(L*h) linear an ($R^2 = 0,999$) (s. Abbildung 12). Eine weitere Erhöhung der Biomassekonzentration hatte keine weitere Steigerung der Produktivität zur Folge.

Mit der Erhöhung der Biomassekonzentration kam es auch zur Steigerung der maximalen Produktbildungsrate von 0,82 g/(L*h) im Versuch 1 bis zu 2,27 g/(L*h) im Versuch 4, bei weiterer Erhöhung der Anfangskonzentration der Stickstoffquelle veränderte sich die maximale Produktbildungsrate nur noch unwesentlich.

Mit der Erhöhung der Biomassekonzentration sank die substratbezogene Ausbeute von 0,38 g_{CS}/g_{GL} im Versuch 1 bis zu 0,31 g_{CS}/g_{GL} im Versuch 5 (s. Tabelle 10). Die starke Absenkung der Ausbeute auf 0,15 g_{CS}/g_{GL} im Versuch 6 ist auf die hohe Biomassekonzentration zurückzuführen, da ein erheblicher Anteil des Substrates für die Aufrechterhaltung des Stoffwechsels verbraucht wurde. Die spezifische Produktbildungsrate sank allmählich mit steigender Anfangskonzentration von Ammoniumsulfat von 0,05 h⁻¹ im Versuch 1 bis zu 0,02 h⁻¹ im Versuch 6. Eine ähnliche Tendenz wurde auch bei der maximalen spezifischen Produktbildungsrate beobachtet.

Tabelle 10: Parameter der Optimierung der Stickstoffkonzentration während des Bioprozesses zur Produktion von Citronensäure aus Glucose mit *Y. lipolytica* H222.

Versuch Nr.	(NH ₄) ₂ SO ₄ [g/L]	BTM _{N=0} [g/L]	c _{CS} [g/L]	c _{ICS} [g/L]	S _{CS} [%]	Y _{CS/GL} [g/g]	P _{CS} [g/(L*h)]	P _{CS,max} [g/(L*h)]	p _{CS} [h ⁻¹]	p _{CS,max} [h ⁻¹]
1	1,85	8,97	42,5	4,50	90,4	0,38	0,44	0,82	0,05	0,09
2	3,71	17,1	60,2	4,61	92,9	0,34	0,63	1,49	0,04	0,09
3	5,56	23,3	78,5	6,90	91,9	0,34	0,82	1,79	0,04	0,08
4	7,41	28,1	78,2	5,81	92,0	0,33	0,82	2,27	0,03	0,08
5	9,89	34,0	85,1	7,70	91,7	0,31	0,90	2,48	0,03	0,07
6	12,36	35,2	32,0	6,07	84,1	0,15	0,73	2,34	0,02	0,07

Bedingungen: pH 6,0; T = 30 °C; pO₂ = 50 %; V = 300 mL; 1000 rpm.

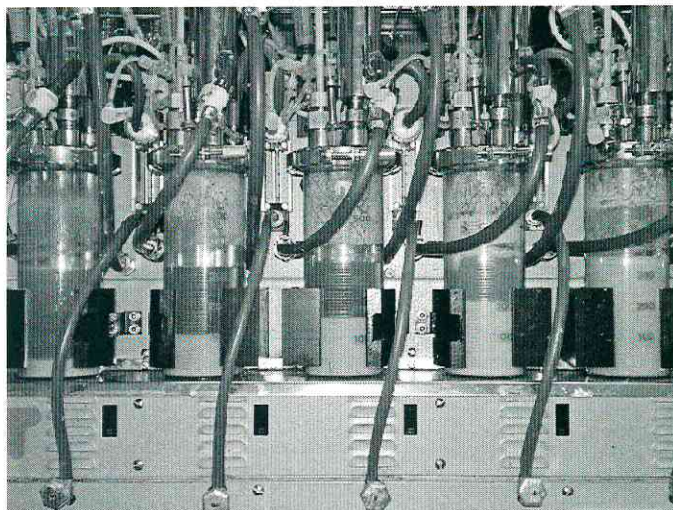


Abbildung 13: Einfluss der Anfangskonzentration von Ammoniumsulfat auf die Biomassebildung von *Y. lipolytica* H222: abgesetzte Biomasse nach Beendigung der Versuche mit 1,85 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ganz links) bis 9,89 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ganz rechts). Bedingungen: pH 6,0; T = 30 °C; pO_2 = 50 %; V = 300 mL; 1000 rpm.

Um die optimale Startkonzentration der Stickstoffquelle festzulegen, muss ein Kompromiss zwischen drei Faktoren gefunden werden. Diese Faktoren sind die Citronensäureendkonzentration, die volumetrische Produktivität und die substratbezogene Ausbeute, die im optimalen Fall ihr Maximum erreichen sollen. Bei der Analyse der in der Tabelle 10 zusammengefassten Ergebnisse stellt sich heraus, dass 5,56 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ die optimale Anfangskonzentration ist. Diese Konzentration stellte einen markanten Punkt in den Verläufen der Abhängigkeiten der Citronensäureendkonzentration und Produktivität bezogen auf die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Startkonzentration dar. Erhöhten sich diese bis zu 5,56 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ linear, wurde ihr Anstieg im weiteren Verlauf gedämpft. Bis zu diesem Wert wurde auch die angestrebte Proportionalität zwischen der Biomassekonzentration und der Produktbildungsrate erfüllt. Dem steht die gegensätzliche Entwicklung der substratbezogenen Ausbeute gegenüber, die mit steigender Stickstoffkonzentration abfiel. Bei 5,56 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ erreichte diese mit 0,34 gCS/gGL einen um 0,04 gCS/gGL niedrigeren Wert als im Maximum, was einen noch akzeptablen Verlust bedeutet.

Die gleiche Tendenz der Abhängigkeit der Produktbildungsrate von der Startkonzentration der Stickstoffquelle wurde von AURICH ET AL. (2003) beobachtet, die Untersuchungen im Bereich zwischen 0,75-6 g/L NH_4Cl mit *Y. lipolytica* H181 unter Verwendung von Pflanzenölen als Substrat durchführten. Diese Autoren fanden 4,5 g/L NH_4Cl als Optimum.

3.2.4 Substrathemmung

Für die Entwicklung der unterschiedlichen Prozessführungsstrategien ist es wichtig zu wissen, wie sich unterschiedliche Startkonzentrationen von Glucose auf das Wachstum der Hefe auswirken.

Die durch das Substrat verursachte Hemmung des Wachstums von *Y. lipolytica* wurde untersucht, indem Wachstumskurven der Hefe bei 40 bis 200 g/L Glucosestartkonzentration aufgenommen und die spezifischen Wachstumsraten berechnet wurden.

Bei den Glukosekonzentrationen von 40 bis 75 g/L wurde keine signifikante Substrathemmung beobachtet (Tabelle 11); die spezifische Wachstumsrate lag bei $\sim 0,16 \text{ h}^{-1}$ (bei 40 g/L Glucose) bis $\sim 0,17 \text{ h}^{-1}$ (bei 50 und 75 g/L Glucose). Eine weitere Zunahme der Glucosestartkonzentration führte zur allmählichen Verlangsamung des Wachstums und damit verbundener Verlängerung der lag-Phasen. Bei 200 g/L Glucose wurde $\mu_{\max}=0,055 \text{ h}^{-1}$ festgestellt, d. h. nur 32,4 % der höchsten maximalen spezifischen Wachstumsrate, die bei 50 g/L Glucose gefunden wurde. Die substratbezogene Ausbeute der Biomasse zeigte hingegen keine solche rapide Abnahme bei 200 g/L Glucose.

Gleiche Beobachtungen machte auch MORESI (1994) bei der Untersuchung des Effektes verschiedener Glukosekonzentrationen zwischen 40 g/L und 108 g/L auf den Bioprozess der Citronensäureherstellung mit der Hefe *Y. lipolytica* ATCC 20346. Moresi präsentierte ein kinetisches Model pseudo-ersten Grades, in dem die Konstante der Wachstumsrate K_1 (d. h. die Steigung der Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Substratkonzentration: $\mu = K_1 \cdot S$) mit steigender Glukosekonzentration sank. Die substratbezogenen Ausbeuten von Biomasse und Stickstoff wurden in seinen Versuchen von der Glukosekonzentration nicht beeinflusst.

Die höchste Biomassekonzentration (14,3 g/L) wurde bei 50 g/L Glucose erreicht (s. Tabelle 11), wobei die Abweichungen zu anderen Biomassekonzentrationen, die in Versuchen bis zu 150 g/L Glucosestartkonzentration erreicht wurden, klein sind. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit PAPANIKOLAOU ET AL. (2006), welche die Kinetik des Wachstums von *Y. lipolytica* ACA-DC 50109 in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration im Bereich zwischen 34 und 149,5 g/L untersuchten.

Die geringste Biomasse wurde im Versuch mit 200 g/L Glucose gebildet. Die substratbezogenen Ausbeuten der Biomasse unterschieden sich in allen Versuchen nur wenig und lagen zwischen $\sim 0,3$ und $\sim 0,4 \text{ g}_{\text{BTM}}/\text{g}_{\text{GL}}$ (MOELLER ET AL. 2007).

Tabelle 11: Substrathemmung - Parameter des Bioprozesses zur Produktion von Citronensäure aus Glucose mit *Y. lipolytica* H222.

Glucose [g/L]	$\mu_{\max}$ [h ⁻¹]	BTM _{N=0} [g/L]	Y _{BTM/GL} [g/g]
40	0,161	13,2	0,33
50	0,175	14,3	0,35
75	0,167	11,3	0,33
100	0,128	11,7	0,40
150	0,096	12,9	0,33
200	0,055	8,50	0,32

Bedingungen: pH 6,0; T = 30 °C; pO₂ = 50 %; V = 300 mL; 1000 rpm.

SHAH ET AL. (1993) untersuchten den substrathemmenden Einfluss von Glucose auf *Y. lipolytica* DS-1 im Bereich von 100 bis 300 g/L Glucose. Sie stellten fest, dass die Hefe Glucosekonzentrationen bis 300 g/L akzeptiert. In diesem Bereich wurde aber eine starke Substrathemmung festgestellt. Auch ANTONUCCI ET AL. (2001) untersuchten den Effekt ansteigender Glucosekonzentration von 70 bis 250 g/L auf die Kinetik des Bioprozesses mit *Y. lipolytica* ATCC 20346. Mit wachsender Substratkonzentration sank zwar die Glucoseaufnahmerate, der Effekt auf die Citronensäureproduktion war allerdings umgekehrt: mit höherer Glucosekonzentration stieg auch die spezifische Produktbildungsrate.

Bei der Ermittlung der optimalen Glucosekonzentrationen müssen unterschiedliche Aspekte in Betracht gezogen werden. Die Substratkonzentration darf nicht zu niedrig sein, weil im Zulaufverfahren eine zu starke Verdünnung des Bioreaktorinhaltes stattfinden würde. Eine zu hohe Glucosekonzentration führt andererseits zur Wachstumsinhibierung. Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen wurde auf der Basis der in Tabelle 11 präsentierten Ergebnisse die Glucoseanfangskonzentration von 150 g/L als Optimum festgelegt, da sich bei dieser Konzentration die Substrathemmung nur auf die Wachstumsrate, nicht aber auf die Endkonzentration der Biomasse auswirkt.

3.2.5 Produkthemmung

Für die Entwicklung der unterschiedlichen Prozessführungsstrategien ist es neben der Untersuchung der Substrathemmung ebenso wichtig festzustellen, ob eine eventuelle Produkthemmung auftritt.

Um den Einfluss der im Medium vorliegenden Citronensäurekonzentration auf die weitere Produktbildung zu untersuchen, wurden in einer Versuchsserie nach dem Ende der

Trophophase unterschiedliche Mengen von Citronensäure zur Kulturbrühe zugegeben. Die Anfangskonzentrationen der Citronensäure lagen dann bei 22,5 g/L, 70 g/L und 120 g/L. Als Kontrolle wurde bei einer Fermentation statt Citronensäure nur Wasser zugegeben. Ermittelt wurde die Citronensäurebildung aus der Differenz der zu Zeitpunkten der Probenahmen bestimmten Citronensäurekonzentration und der zugesetzten Menge an Citronensäure.

In Kultivierungen mit 22,5 g/L zugesetzter Citronensäure wurde keine Produkthemmung beobachtet (s. Tabelle 12). Je mehr Citronensäure hinzugefügt wurde und somit in der Kulturbrühe vorlag, desto weniger Citronensäure wurde im Prozess gebildet. Die Zugabe von 70 g/L Citronensäure verursachte eine Reduktion der Citronensäurebildung auf 25,3 g/L und damit um 33,5 % vom Maximalwert 34,2 g/L bei 22,5 g/L zugesetzter Citronensäure. Bei 120 g/L zugesetzter Citronensäure wurden nur noch 7,2 g/L Citronensäure produziert.

Tabelle 12: Produkthemmung - Parameter des Bioprozesses zur Produktion von Citronensäure aus Glucose mit *Y. lipolytica* H222 (MOELLER ET AL. 2007).

Zugegebene CS [g/L]	BTM _{N=0} [g/L]	c _{CS} [g/L]	c _{ICS} [g/L]	Y _{CS/GL} [g/g]	P _{CS} [g/(L*h)]	P _{CS,max} [g/(L*h)]	p _{CS} [h ⁻¹]	p _{CS,max} [h ⁻¹]
0	6,99	33,4	3,39	0,19	0,16	0,54	0,02	0,08
22,5	6,99	34,2	5,15	0,20	0,16	0,36	0,02	0,05
70	5,83	25,3	3,13	0,13	0,12	0,41	0,02	0,07
120	3,89	7,22	1,70	0,04	0,03	0,17	0,01	0,04

Bedingungen: pH 6,0; T = 30 °C; pO₂ = 50 %; V = 300 mL; 1000 rpm.

Die Zugabe von Citronensäure in die Kulturlösung führte zu Verzögerungen in der Produktbildung. Dieser Verzug dauerte bei 120 g/L zugesetzter Citronensäure ca. 45 Stunden. Die maximale Geschwindigkeit der Citronensäurebildung wurde in dieser Kultivierung erst nach 90 Stunden Fermentationsdauer erreicht.

Die substratbezogenen Ausbeuten und die volumetrischen Produktbildungsrate zeigten mit steigender Menge an zugesetzter Citronensäure die gleiche Tendenz. Beide Parameter erreichten in Versuchen ohne Zugabe von Citronensäure und mit 22,5 g/L zugesetzter Citronensäure ähnlich hohe Werte von 0,2 g_{CS}/g_{GL} bzw. 0,16 g/(L*h). Mit steigender Citronensäureanfangskonzentration nahmen die Werte dieser Parameter schnell ab, bis sie bei 120 g/L zugegebener Citronensäure ca. ein Fünftel ihrer maximalen Werte erreichten.

Aus den Ergebnissen (s. Tabelle 12) geht hervor, dass bei niedrigen Citronensäurekonzentrationen die Produktbildung nicht gehemmt wird. Bei 70 g/L Citronensäure tritt eine schwache Produktinhibierung auf, die dann bei 120 g/L Citronensäure schon stark ausgeprägt

ist. In Versuchen mit *Y. lipolytica* H181 wachsend auf Pflanzenölen in Schüttelkolben beobachteten AURICH ET AL. (2003b) eine relativ geringfügige Hemmung der Citronensäureproduktion bei Citronensäurekonzentrationen von 90 bis 110 g/L und eine stärkere Inhibierung bei 140 bis 160 g/L Citronensäure. Diese Autoren beschrieben auch ein Auftreten von lag-Phasen in der Produktbildung mit steigender Anfangskonzentration von Citronensäure.

ISKE ET AL. (1983) führten mit *Y. lipolytica* EH59 umfangreiche Wachstumsversuche auf *n*-Alkanen bei Zugabe von bis zu 90 g/L Citronensäure am Kultivierungsbeginn durch. Auch ihre Ergebnisse zeigten, dass niedrige Konzentrationen von 30 g/L keinen bedeutsamen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Hefe hatten, bei 90 g/L Citronensäure wurden jedoch nur noch 63 % von $\mu_{\max}$ im Vergleich zum Ansatz ohne Zugabe von Citronensäure beobachtet.

KIM ET AL. (1991) berichteten über Chemostatexperimente mit *Y. lipolytica* ATCC 20390 mit Glucose als Substrat bei Zugabe von 5-50 g/L Citronensäure. Die Autoren beschrieben, dass die extrazelluläre Citronensäure sowohl eine nichtkompetitive Inhibierung der Produktbildungsrate für Citronensäure als auch eine Hemmung der Glucoseabbaurate verursachte.

Aus den hier präsentierten Ergebnissen geht hervor, dass Citronensäure als Produkt im Medium in Konzentrationen von 120 g/L eine starke Inhibierung der weiteren Produktsynthese bei *Y. lipolytica* H222 aus Glucose hervorruft (MOELLER ET AL. 2007). Dieses Erkenntnis ist wichtig für die Entwicklung geeigneter Prozessführungsstrategien, da die Absenkung der Produktivität infolge höherer Citronensäurekonzentrationen für die Effizienz des Bioprozesses ungünstig ist.

3.3 Entwicklung verschiedener Prozessführungsstrategien mit Glucose als Substrat für *Yarrowia lipolytica* H222 unter Verwendung des Biosensor-online-Messsystems

3.3.1 Ermittlung der optimalen Glucosekonzentration im Medium für die biosensorgestützte Substratnachdosierung

3.3.1.1 Batch Kultivierung

Um eine Grundlage für die Beurteilung der einzelnen Nachdosierungsstrategien zu schaffen, wurde eine Batch-Kultivierung im halbtechnischen Maßstab mit 5 L Arbeitsvolumen durchgeführt.

Die lag- und Trophophase nahmen die erste Hälfte der Kultivierungszeit ein (s. Abbildung 14). Die maximale spezifische Wachstumsrate war in dieser Fermentation mit

0,30 h⁻¹ erheblich höher als in Kultivierungen mit kleinerem Volumen, wo sie Werte von maximal 0,18 h⁻¹ erreichte (s. z. B. Kapitel 3.2.4). Der Grund für diese Differenz liegt sowohl in der unterschiedlichen Geometrie der beiden Reaktorsysteme als auch in der fortgeschrittenen technischen Ausführung der Sauerstoffregelung im halbtechnischen Maßstab. Die Biomassekonzentration erreichte während der Produktbildungsphase 13,3 g/L. Die substratbezogene Ausbeute der Biomasse ($Y = 0,33 \text{ g}_{\text{BTM}}/\text{g}_{\text{GL}}$) entsprach den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen (0,39 g_{BTM}/g_{GL} bei THIERSCH (1987) und 0,42 g/L bei BRIFFAUD & ENGASSER (1979)).

Nach einer dreistündigen Anlaufphase stieg die Citronensäurekonzentration bis zu 34,8 g/L linear an (s. Abbildung 14). Die höchste Produktbildungsgeschwindigkeit von 1,74 g/(L*h) wurde nach 45,5 Stunden Fermentationszeit erreicht. Zu diesem Zeitpunkt wurden 2,36 g/L Glucose in der Kulturlösung nachgewiesen. Nach der Auszehrung von Glucose aus dem Medium hielt die Citronensäureproduktion noch 1,5 Stunden an. In dieser Zeit sind 1,38 g/L Citronensäure entstanden. Danach begann die Verwertung beider organischen Säuren; innerhalb von zwei Stunden sank die Citronensäurekonzentration um 0,81 g/L und die Isocitronensäurekonzentration nahm um 0,08 g/L ab. Die Endkonzentration der Citronensäure lag bei 34 g/L (s. Tabelle 13).

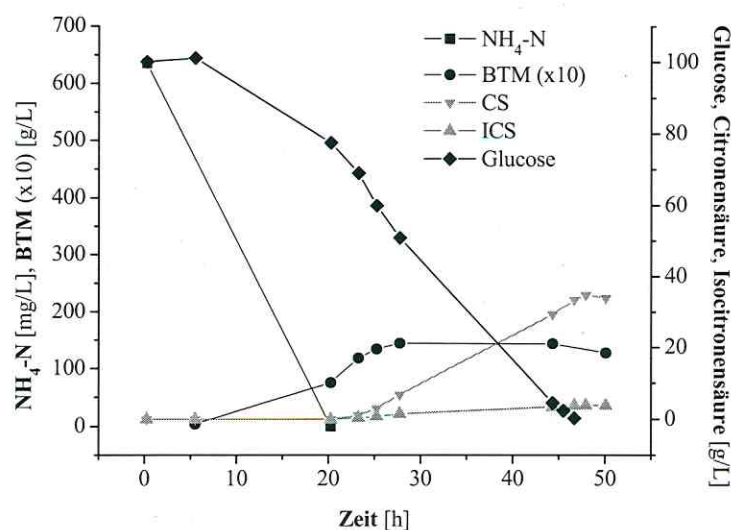


Abbildung 14: Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222 aus Glucose: Konzentrationen der Substrate (Glucose, Ammonium-Stickstoff), Biomasse und Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure).
Bedingungen: pH 6,0; T = 30 °C; pO₂ = 50 %; V = 5 L.

Die Verwertung der Citronensäure als Substrat nach der Auszehrung von Glucose beschrieb auch THIERSCH (1987). In seinen Untersuchungen beobachtete er, dass der sofortige Beginn der Citronensäurewiederaufnahme nach Glucoseauszehrung nur in Ausnahmefällen auftritt. Bevorzugt werden andere Nebenprodukte, wie z. B. Polyole, verwertet. Dabei kann die Citronensäurekonzentration sogar noch geringfügig ansteigen. TRÉTON ET AL. (1978) stellten fest, dass die Citronensäure vor Isocitronensäure bevorzugt wieder aufgenommen wird. Sie vermuteten, dass es unterschiedliche Membrantransporter für die Wiederaufnahme der beiden Säuren gibt.

Die kinetischen Parameter der Batch Kultivierung (s. Tabelle 13) sind in Übereinstimmung mit publizierten Daten. Die volumetrische Produktivität erreichte mit $0,73 \text{ g/(L}\cdot\text{h)}$ den gleichen Wert wie bei FÖRSTER ET AL. (2007) für die rekombinante *Y. lipolytica* mit Saccharose als Substrat. Die substratbezogene Ausbeute lag mit $0,52 \text{ g}_{\text{CS}}/\text{g}_{\text{GL}}$ unter der von THIERSCH (1987) erreichten Ausbeute von $0,67 \text{ g}_{\text{CS}}/\text{g}_{\text{GL}}$ bei Anwendung von *Y. lipolytica* H181.

3.3.1.2 Fed-Batch Betrieb

Das Ziel dieser Fed-Batch Kultivierungen bestand darin, den Einfluss unterschiedlicher Glucosekonzentrationen, die im Laufe der Kultivierung konstant gehalten werden, auf den Bioprozess zur Citronensäureherstellung aus Glucose mit *Y. lipolytica* H222 zu untersuchen. Ziel war auch, die Substrathemmung (s. Kapitel 3.2.4), die in einem Batch-Versuch nicht zu verhindern ist, zu vermeiden. Die Substratnachdosierung erfolgte mit Hilfe des Biosensor-online-Messsystems entsprechend der aktuellen metabolischen Aktivität der Mikroorganismen. Für die Festlegung der optimalen Substratkonzentration wurden fünf verschiedene Glucosekonzentrationen getestet. Die Glucosekonzentration wurde dabei so gewählt, dass sie innerhalb des Messbereiches des jeweiligen Glucosebiosensors lag (1, 10, 20 und 30 g/L). Darüber hinaus wurde eine Kultivierung mit konstanter Glucosefütterungsrate ohne Biosensor-online-Regelung durchgeführt (50 g/L Glucose konst.). Hierfür wurden Erfahrungen aus vorhergehenden Fed-Batch Kultivierungen hinsichtlich der Glucose-zulauftrate genutzt. Nach 15 Stunden lag-Phase wurde die konstante Nachdosierung mit der Geschwindigkeit von 60 g Fütterungslösung pro Stunde gestartet.

Die Verläufe der Konzentrationen von Substraten (Glucose und Ammonium-Stickstoff), Biomasse und Produkten (Citronensäure und Isocitronensäure) sind an den Beispielen der Fed-Batch Kultivierung mit konstanter Fütterungsrate in Abbildung 15 und der Fed-Batch Fermentation mit biosensorgestützter Substratnachdosierung für eine konstante Glucose-

konzentration von 20 g/L in Abbildung 16 dargestellt. Die ermittelten Parameter dieser Kultivierungen sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Die Wachstumsphasen der Fed-Batch Versuche verliefen entsprechend der Batch Kultivierung. Die Dauer der lag- und Wachstumsphasen bewegten sich bei den Versuchen mit Biosensor-online-Regelung zwischen 22 h (bei 20 g/L Glucose) und 26 h (bei 10 g/L Glucose). Im Versuch mit konstanter Zufütterung war der Stickstoff bereits nach 15,5 Stunden ausgezehrt. In allen Versuchen erreichte die Biomassekonzentration zum Zeitpunkt der Stickstoffauszehrung ähnliche Werte zwischen 7,24 g/L (bei 50 g/L) und 8,69 g/L (bei 1 g/L). Wie bereits im Kapitel 3.1 beschrieben wurde, erhöhte sich die gemessene Biotrockenmasse im weiteren Verlauf der Fermentationen.

Die Citronensäureproduktion startete in Versuchen mit 10 bis 50 g/L mit ähnlicher Kinetik, zur 32. Stunde der Produktbildungsphase wurden in o. g. Fermentationen 29 g/L (bei 10 g/L Glucose) bis 32 g/L Citronensäure (bei 50 g/L Glucose) erreicht. In Versuchen mit 20 g/L und 30 g/L Glucose wurden Citronensäureendkonzentrationen von 73 und 70 g/L gemessen, im Versuch mit 10 g/L waren es bei gleicher Kultivierungsdauer lediglich 63 g/L Citronensäure (s. Tabelle 13). Die höchste absolute Menge an Citronensäure von 790 g wurde im Versuch mit 30 g/L Glucose gebildet. Die Selektivität und die substratbezogene Ausbeute erreichten im Versuch mit 20 g/L Glucose mit 95 % und 0,64 g_{CS}/g_{GL} ihre höchsten Werte. Die beste volumetrische Produktivität wurde in der Kultivierung mit 50 g/L erzielt. Dies ist aber auf die Kultivierungsdauer zurückzuführen (s. Tabelle 13); in Versuchen mit 10 g/L bis 30 g/L Glucose wurden zur 95. Stunde volumetrische Produktivitäten von 0,51 g/(L*h) (bei 10 g/L Glucose) und 0,53 g/(L*h) (bei 20 und 30 g/L) festgestellt.

Die schlechtesten Ergebnisse bezüglich Produktbildung wurden in der Kultivierung mit 1 g/L Glucose erreicht (s. Tabelle 13). Die Ursache hierfür lag wahrscheinlich in der höheren Verdünnung der Kulturbrühe aufgrund niedrigerer Glucosekonzentration der Fütterungslösung (100 g/L vs. 300 g/L im Falle der Versuche mit 10 bis 50 g/L Glucose). Ebenso kommt eine Substratlimitation als Erklärung des verhältnismäßig langsamen Verlaufs in Frage.

Eine Erhöhung der Effizienz des Bioprozesses für Citronensäureproduktion zwischen 1 und 20 g/L Glucose wurde auch von KIM & ROBERTS (1991) beobachtet. Die Autoren führten kontinuierliche Kultivierungen mit *S. lipolytica* ATCC 20390 bei unterschiedlichen Glucosekonzentrationen zwischen 1-25 g/L durch. Sie beobachteten, dass zwar die Glucoseaufnahmerate von der Glucosekonzentration in der Kulturlösung nicht abhängig ist, die Ausbeute von Citronensäure wird aber mit steigender Glucosekonzentration höher.

Tabelle 13: Parameter der Citronensäurebildung aus Glucose mit *Y. lipolytica* H222 in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration im Medium in Kultivierungen mit (biosensorgesteuerter) Substratnachdosierung

Glucose	Dauer	BTM	Absolut gebildet*		Endkonzentration		S _{CS}	Y _{CS/GL}	P _{CS}	P _{CS,max}	p _{CS}	p _{CS,max}
[g/L]	[h]	[g/L]	CS	ICS	CS	ICS	[%]	[g/g]	[g/(L*h)]	[g/(L*h)]	[h ⁻¹]	[h ⁻¹]
Batch												
100	50,1	13,3	218	24,1	34,0	3,76	90,0	0,52	0,73	1,74	0,05	0,16
Fed-Batch												
50 **	92,7	10,3	488	31,9	42,5	2,69	94,0	0,35	0,53	1,22	0,05	0,13
30	211,3	8,87	790	53,1	70,2	4,67	93,8	0,52	0,33	0,93	0,04	0,22
20	211,3	7,03	655	39,9	72,7	4,12	94,6	0,64	0,34	1,09	0,05	0,18
10	211,3	9,86	698	54,2	63,1	5,08	92,5	0,59	0,30	1,03	0,03	0,12
1	210,5	6,73	355	34,3	37,3	3,96	90,4	0,18	0,16	0,66	0,02	0,22
Kontinuierliche Kultivierung												
10	237,4	10,1	415	26,4	61,4	3,76	94,2	0,58	0,26	0,80	0,03	0,10
5	234,2	11,2	338	28,9	56,0	4,97	91,8	0,48	0,24	1,02	0,02	0,10

Bedingungen: pH 6,0; T = 30 °C; pO₂ = 50 %; V₀ = 5 L; falls nicht anders angegeben, wurde angegebene Glucosekonzentration mit Hilfe der Biosensor-online-Regelung konstant gehalten;

* ermittelt aus Realvolumen am Ende der Kultivierung und vorliegender Citronensäurekonzentration

** konstante Glucosenachdosierung (nach 15 Stunden Kultivierungszeit wurden 60 g/h einer 300 g/L Glucoselösung nachdosiert).

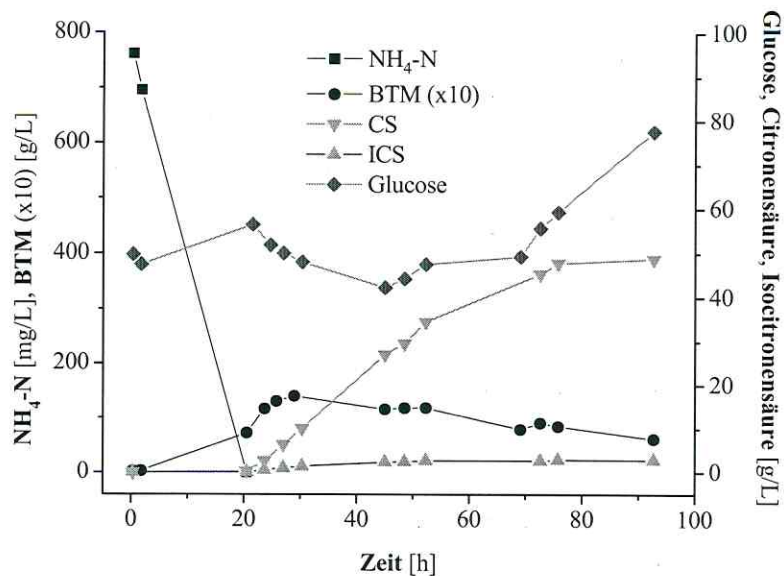


Abbildung 15: Fed-Batch Kultivierung mit konstanter Fütterungsrate mit *Y. lipolytica* H222: Verlauf der Konzentrationen der Substrate (Glucose, Ammonium-Stickstoff), Biomasse und Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure).
Bedingungen: pH 6,0; 30 °C; $\text{pO}_2 = 50 \%$; $V_0 = 5 \text{ L}$; $F = 60 \text{ g/h}$ (nach 15 h).

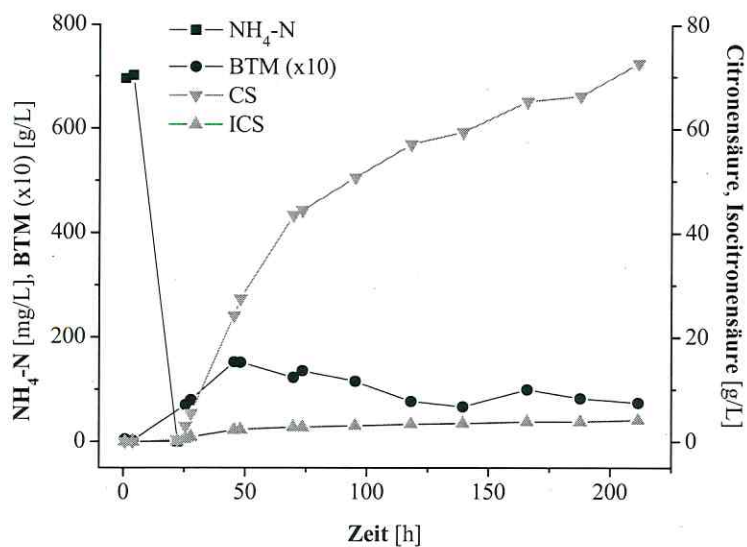


Abbildung 16: Fed-Batch Kultivierung mit biosensorgestützter Substratnachdosierung mit *Y. lipolytica* H222 bei konstanter Glucosekonzentration von 20 g/L: Verlauf der Konzentrationen von Ammonium-Stickstoff, Biomasse und Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure).
Bedingungen: pH 6,0; 30 °C; $\text{pO}_2 = 50 \%$; $V_0 = 5 \text{ L}$.

Die Verläufe der Glucosekonzentrationen in Versuchen mit 1 g/L bis 30 g/L Glucose mit biosensorgestützter online-Regelung sind in den Abbildungen Abbildung 17 bis Abbildung 20 dargestellt. Im Falle der Kultivierungen mit 10 bis 30 g/L wurden Glucosebiosensoren mit einem Messbereich von 0,5 bis 40 g/L Glucose genutzt, im Versuch mit 1 g/L Glucose wurde ein Glucosebiosensor mit dem Messbereich von 0,05 bis 5 g/L Glucose angewendet. Die Glucosebiosensoren wurden am Anfang der Fermentation kalibriert. In regelmäßigen Abständen wurde ein sog. Sondencheck durchgeführt, mit dessen Hilfe die Durchlässigkeit der Dialysemembran kontrolliert und ggf. eine Korrektur der gemessenen Daten mittels einer offline-Messung durchgeführt wurde. Dieser Eingriff verursachte Peaks in den Verläufen der mit dem Glucosebiosensor gemessenen Glucosekonzentrationen (s. z. B. Abbildung 17).

Die mittlere Abweichung zwischen den vom Biosensor gelieferten Glucosekonzentrationen und den mit dem Enzymtest gemessenen Daten sowie die mittleren Abweichungen zwischen dem Sollwert und offline-Daten sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Vergleich der einzelnen Methoden der Glucosemessung (Glucosebiosensor und Enzymtest) untereinander und mit dem Sollwert

Glucose (Sollwert) [g/L]	1	10	20	30
Biosensor vs. Enzymtest [g/L] ([%])	1,1 (110)	1,3 (13)	4,5 (23)	3,4 (11)
Sollwert vs. Enzymtest [g/L] ([%])	1,5 (145)	1,5 (15)	6,0 (30)	3,2 (11)
Sollwert vs. Biosensor [g/L] ([%])	1,7 (171)	0,8 (8)	3,6 (18)	1,5 (5)

Die Ergebnisse, die mit dem Glucosebiosensor mit größerem Messbereich erhalten wurden, sind in Übereinstimmung mit in der Literatur beschriebenen Anwendungen von Glucosebiosensoren ähnlichen Aufbaus zur Kontrolle von Fermentationsprozessen. LINDGREN ET AL. (2005) erhielten im Laufe einer siebenstündigen Fermentation mit Hefe (10 mM Glucose und 20 g/L Hefe) eine Abweichung von 8,5 bis 22,9 % zwischen den Messdaten eines Glucosebiosensors im Vergleich mit denen eines Enzymtests. Im Falle der in dieser Arbeit beschriebenen Kultivierungen von 10 bis 30 g/L bewegte sich diese Abweichung von 11 % bei 30 g/L bis 23 % bei 20 g/L Glucose (s. Tabelle 14), wobei die Laufzeit der Kultivierungen mit 211 Stunden erheblich länger war, als bei LINDGREN ET AL. (2005). MIZUTANI ET AL. (1987) untersuchten den Einfluss unterschiedlicher Glucosekonzentrationen auf den Bioprozess mit *Saccharomyces cerevisiae*, indem die Glucosekonzentration mit Hilfe eines automatischen Glucoseanalyzers (basierend auf einem Glucosebiosensor) auf 0,3; 2,5 bzw. 10 g/L konstant gehalten wurde. Während der 8 bis 10

stündigen Fermentationen zeigte sich der Biosensor als gut stabil. In der Fermentation mit 10 g/L Glucose (konst.) fluktuieren die Werte um den Sollwert mit weniger als 10 % Abweichung. Die Variationsbreite erhöhte sich bei 2,5 g/L Glucose (konst.) auf 20 %. Dieser Trend wurde auch in den hier präsentierten Versuchen festgestellt (s. Tabelle 14). RENNEBERG ET AL. (1991), die ein Biosensor-online-Messsystem für die Glucosemessung in Zellkulturen entwickelten, gaben an, dass die offline gemessenen Werte etwas höher lagen als die online gemessenen Glucosekonzentrationen. Sie vermuteten, dass sich diese Differenz aus der unterschiedlichen Handhabung der Proben ergibt. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen eine ähnliche Neigung (s. z. B. Abbildung 17). Diese Differenz ist aber mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Multiplikation der Fehler der jeweiligen Methoden zurückzuführen. Der Enzymtest hat z. B. bei einer Verdünnung von 1:100 einen vom Hersteller angegebenen Fehler von 0,4 bis 0,8 g/L. Beim Glucosebiosensor liegt der absolute Fehler bei 3 % (d. h. bei einer Messung von 20 g/L ist der Fehler $\pm 0,6$ g/L).

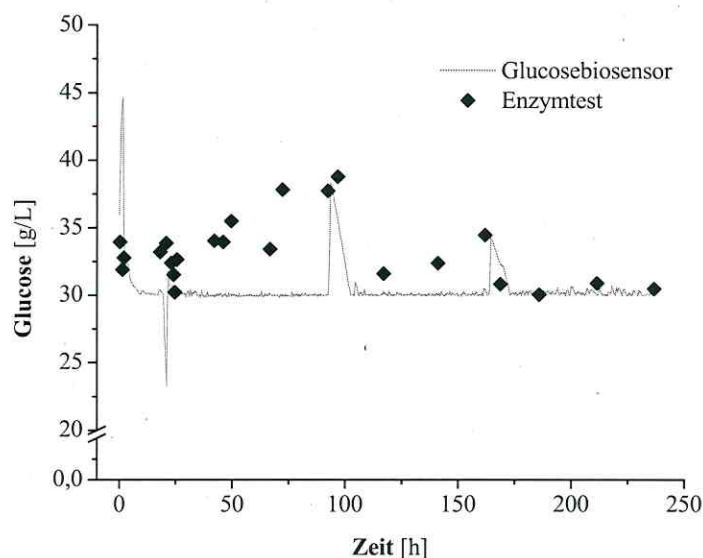


Abbildung 17: Biosensorgestützte Fed-Batch Kultivierung mit konstanter Glucosekonzentration von 30 g/L mit *Y. lipolytica* H222: Verlauf der Konzentration von Glucose, gemessen mit Glucosebiosensor und einem Enzymtest.
Bedingungen: pH 6,0; 30 °C; $pO_2 = 50$ %; $V_0 = 5$ L.

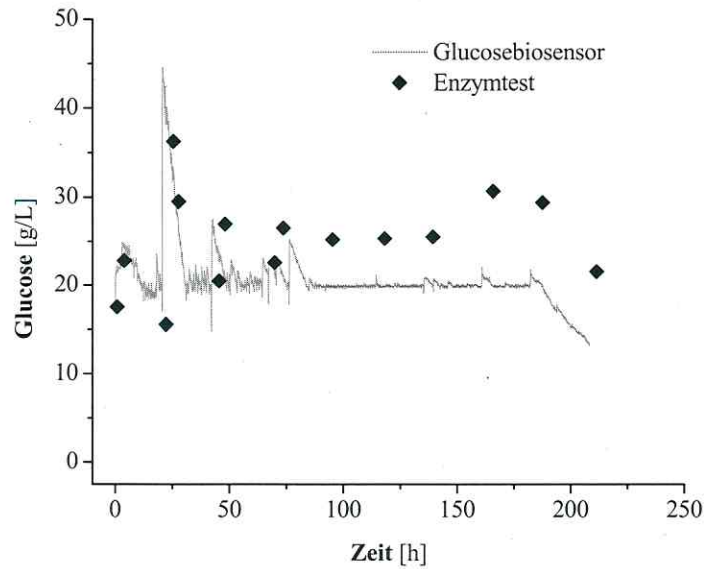


Abbildung 18: Biosensorgestützte Fed-Batch Kultivierung mit konstanter Glukosekonzentration von 20 g/L mit *Y. lipolytica* H222: Verlauf der Konzentration von Glucose, gemessen mit Glucosebiosensor und einem Enzymtest.
Bedingungen: pH 6,0; 30 °C; $pO_2 = 50 \%$; $V_0 = 5$ L.

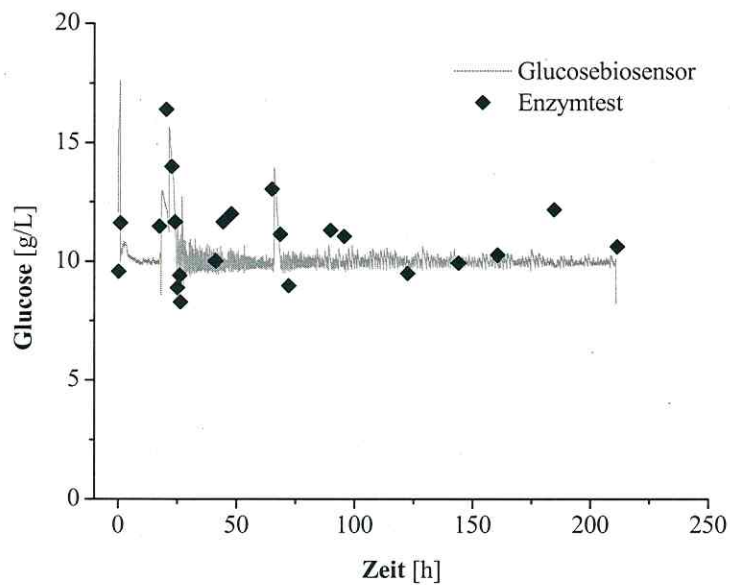


Abbildung 19: Biosensorgestützte Fed-Batch Kultivierung mit konstanter Glukosekonzentration von 10 g/L mit *Y. lipolytica* H222: Verlauf der Konzentration von Glucose, gemessen mit Glucosebiosensor und einem Enzymtest.
Bedingungen: pH 6,0; 30 °C; $pO_2 = 50 \%$; $V_0 = 5$ L.

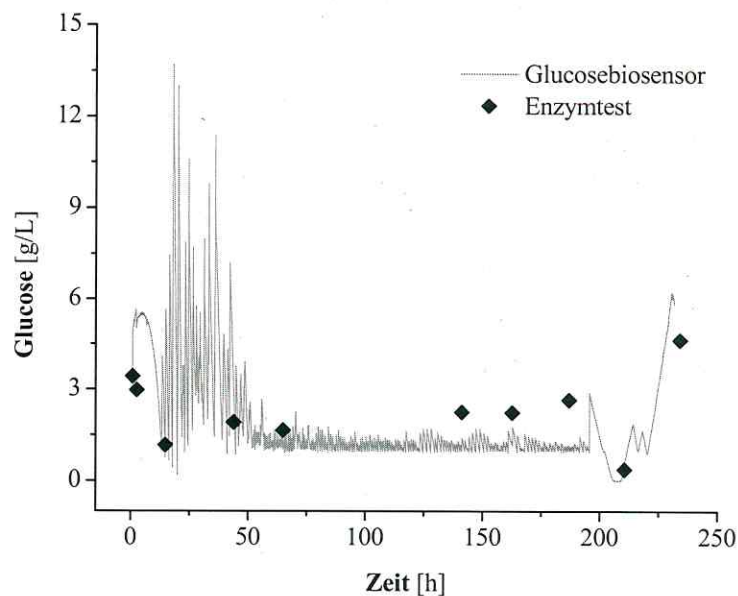


Abbildung 20: Biosensorgestützte Fed-Batch Kultivierung mit konstanter Glucosekonzentration von 1 g/L mit *Y. lipolytica* H222: Verlauf der Konzentration von Glucose, gemessen mit Glucosebiosensor und einem Enzymtest.
Bedingungen: pH 6,0; 30 °C; $pO_2 = 50 \%$; $V_0 = 5$ L.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass Glucosekonzentrationen von 1 g/L und 10 g/L für eine effektive biosensorgestützte Substratnachdosierung nicht geeignet sind. Im Versuch mit 1 g/L Glucose zeigte sich die Biosensor-online-Regelung des Bioprozesses auch von der praktischen Seite der Versuchsführung her als ungünstig. Eingriffe wie Rekalibrierung des Biosensors, Überprüfung der Durchlässigkeit der Membran in der Sonde oder Austausch des Vorlagebehälters mit der Fütterungslösung konnten aufgrund der sofortigen Aufzehrung der vorhandenen Glucose nicht durchgeführt werden.

Im Versuch mit konstanter Nachdosierung ohne Einsatz von Biosensoren wurde gezeigt, dass es möglich ist, mit einer umfassenden Kenntnis des Bioprozesses eine festgelegte Kulturführung zu erreichen, ohne ein Biosensor-online-Messgerät verwenden zu müssen. Dies ist aber nur bis zum Zeitpunkt der Reduktion der Hefeaktivität möglich (s. Abbildung 15).

Als optimale Glucosekonzentration wurde 20 g/L festgelegt, weil bei dieser Konzentration die besten Ergebnisse seitens der Citronensäureproduktion erreicht wurden. Günstig ist auch, dass sich diese Glucosekonzentration in der Mitte des Messbereiches des Glucosebiosensors befindet.

Im Vergleich zur Kultivierung im Batch Modus (s. Kapitel 3.3.1.1 und Tabelle 13) wurden in Fed-Batch Fermentationen höhere Erträge von Citronensäure im Sinne der absoluten Menge

an Citronensäure und Endkonzentration der Citronensäure erzielt. Sowohl die Selektivität des Bioprozesses für Citronensäure als auch die substratbezogene Ausbeute erhöhten sich aufgrund der Verlängerung der Produktbildungsphase in Fed-Batch Versuchen. Die volumetrische Produktivität war hingegen im Falle des Batch Modus erheblich höher als bei Fed-Batch. Das hängt mit dem Verlauf der aktuellen Produktbildungsrate zusammen, der im Kapitel 3.1 beschrieben wurde (s. Abbildung 9A). Die Geschwindigkeit der Citronensäurebildung ist in der frühen Idiophase am höchsten und sinkt dann mit der Kultivierungsdauer. Je länger also eine Fermentation läuft, desto niedriger ist dann die erreichte volumetrische Produktivität.

3.3.1.3 Kontinuierliche Kultivierung

Aufgrund des Zulaufs der Fütterungslösung musste in den Fed-Batch Versuchen in regelmäßigen Abständen ein Teil der Kulturlösung abgelassen werden. Um die Möglichkeit einer kontinuierlichen Abnahme der Kulturflüssigkeit zu überprüfen und deren Einfluss auf den Bioprozess zu erkunden, wurden zwei Versuche mit 5 g/L und 10 g/L Glucosekonzentration durchgeführt. Die Verläufe der wichtigsten Analyte im Laufe einer kontinuierlichen Kultivierung sind am Beispiel einer Fermentation mit 10 g/L Glucose in Abbildung 21 dargestellt.

Die Trophophase dauerte bei beiden Fermentationen unterschiedlich lange. Im Versuch mit 5 g/L war die Dauer der Wachstumsphase mit 29 Stunden doppelt so lang als bei der Kultivierung mit 10 g/L Glucose. Diese Differenz ist in diesem Fall auf die unterschiedliche Qualität der Vorkultur zurückzuführen. Die während der Idiophase gemessenen mittleren Biomassen erreichten allerdings bei beiden Fermentationen ähnliche Werte von 10 – 11 g/L (s. Tabelle 13).

Während der Kultivierung mit 10 g/L Glucose wurden 5,4 g/L mehr Citronensäure gebildet als im Versuch mit 5 g/L Glucose (s. Tabelle 13). Auch andere Parameter, wie die substratbezogene Ausbeute, die volumetrische Produktivität und die Selektivität erreichten bei 10 g/L Glucose höhere Werte als bei 5 g/L Glucose. Dieses Ergebnis ergänzt den im Kapitel 3.3.1.2 angedeuteten Trend der Verschlechterung der Effektivität des Bioprozesses bezüglich Produktbildung mit sinkender konstanter Glucosekonzentration bei Werten unter 20 g/L Glucose.

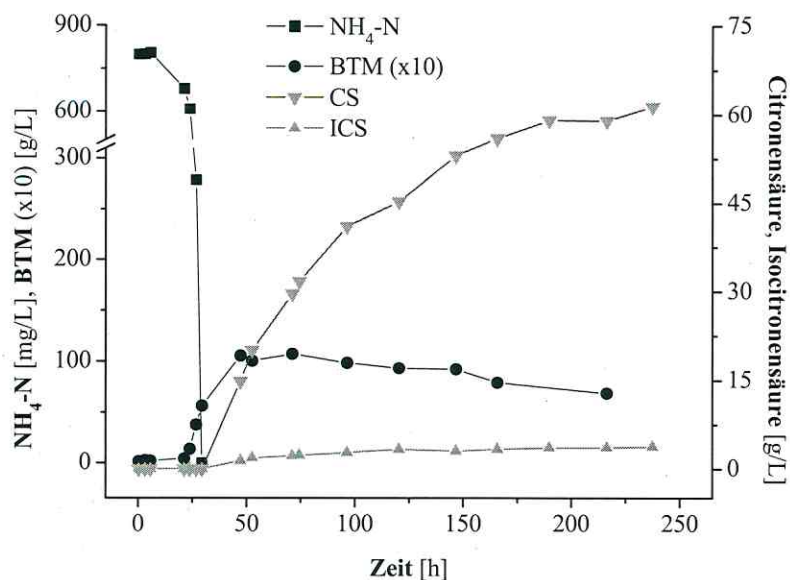


Abbildung 21: Kontinuierliche Kultivierung mit biosensorgestützter Substratnachdosierung mit *Y. lipolytica* H222 bei konstanter Glucosekonzentration von 10 g/L: Verlauf der Konzentrationen von Ammonium-Stickstoff, der Biomasse und Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure).
Bedingungen: pH 6,0; 30 °C; pO₂ = 50 %; V₀ = 5 L.

Eine Erklärung für die verschlechterte Produktbildung bei niedrigen Glucosekonzentrationen bietet die Anwesenheit verschiedener Typen von Glucosetransportern. Glucosetransporter sind transmembranäre Transportproteine, die den Transport der polaren Glucose über die apolare Lipiddoppelschicht der Zellmembran ermöglichen. Der Transport wird durch das Konzentrationsgefälle von Glucose reguliert. Für *Y. lipolytica* wurden zwei unterschiedliche Mechanismen der Glucoseaufnahme mit Hilfe von sog. low-affinity und high-affinity Transportern beschrieben (DOES UND BISSON 1989). Diese zwei Transportergruppen wurden auch in *Saccharomyces cerevisiae* (LEE ET AL. 2002) und *Aspergillus niger* (TORRES ET AL. 1996) entdeckt. Die Funktion der einzelnen Transportertypen hing bei diesen beiden Mikroorganismen mit der Glucosekonzentration der Kulturlösung zusammen. Das konstitutive low-affinity Transportsystem dient für den Glucosetransport bei hohen Glucosekonzentrationen (z. B. 2 %). High-affinity Transporter werden für die Glucoseübertragung in Lösungen mit niedrigen Glucosekonzentrationen (z. B. 0,05 %) genutzt. Ihre Aktivität ist von den Kultivierungsbedingungen abhängig und ist von Glucose und Citronensäure reprimierbar (MISCHAK ET AL. 1984). DOES UND BISSON (1989) stellten fest, dass bei *Y. lipolytica* die high-affinity Transporter nicht von Glucose inhibiert werden, sodass die Glucosetransporter bei dieser Hefe nicht von der Glucosekonzentration beeinflusst werden. Die in Tabelle 13

dargestellten Ergebnisse widersprechen dieser Aussage, denn die Abnahme der Produktbildungsaktivität der Hefe mit sinkender Glucosekonzentration kann nur mit unterschiedlicher Aktivität der Glucosetransportsysteme erklärt werden.

Die Verläufe der Glucosekonzentrationen in beiden Kultivierungen sind in Abbildung 22 (10 g/L Glucose) und Abbildung 23 (5 g/L Glucose) dargestellt. Bei den Verläufen der mit dem Biosensor gemessenen Glucosekonzentrationen ist eine Abnahme der mikrobiellen Aktivität mit der Kultivierungszeit gut erkennbar. Am Anfang der Fermentationen oszillierten die gemessenen Werte um den Sollwert stärker als in der zweiten Hälfte der Kultivierungen.

Die Daten, die vom Glucosebiosensor geliefert wurden, unterschieden sich von den mit dem Enzymkit gemessenen mit einer mittleren Abweichung von 2,9 g/L Glucose im Versuch mit 10 g/L Glucose bzw. 1,7 g/L Glucose bei der Kultivierung mit 5 g/L Glucose. Die Differenz zwischen den on- und offline gemessenen Werten, prozentual ausgedrückt, war im Versuch mit 10 g/L Glucose 27 %, in der Fermentation mit 5 g/L lag sie bei 41 %. Diese Werte liegen erheblich höher als bei den Fed-Batch Versuchen im Kapitel 3.2.1.2 und als in Untersuchungen von LINDGREN ET AL. (2005) (s. Kapitel 3.2.1.2). Die Unterschiede zwischen den spektrophotometrisch gemessenen Glucosekonzentrationen und dem Sollwert, auf den geregelt wurde, lagen im Durchschnitt bei 1,1 g/L Glucose im Versuch mit 5 g/L Glucose und bei 3,2 g/L Glucose in der Kultivierung mit 10 g/L Glucose. Die letztere Kultivierung war hiermit hinsichtlich der Messtechnik schlechter als der Fed-Batch Versuch mit 10 g/L Glucose, wo diese Differenz lediglich 1,5 g/L Glucose ausmachte (s. Kapitel 3.2.1.2).

Der Vergleich zwischen der kontinuierlichen Kultivierung mit 10 g/L und der Fed-Batch Fermentation mit gleicher Glucosekonzentration zeigt, dass Fed-Batch die günstigere Prozessführungsstrategie für diesen Bioprozess darstellt (s. Tabelle 13). Im Laufe der Fed-Batch Kultivierung wurde mehr Citronensäure produziert (698 g Citronensäure bei Fed-Batch vs. 415 g Citronensäure bei kontinuierlicher Kultivierung) und die volumetrische Produktivität war mit 0,30 g/(L*h) in Fed-Batch besser als in der kontinuierlichen Fermentation (0,26 g/(L*h)). Die Citronensäureendkonzentration und die substratbezogene Ausbeute erreichten ähnliche Werte von 61 bis 63 g/L Citronensäure bzw. 0,58-0,59 g_{CS}/g_{GL}.

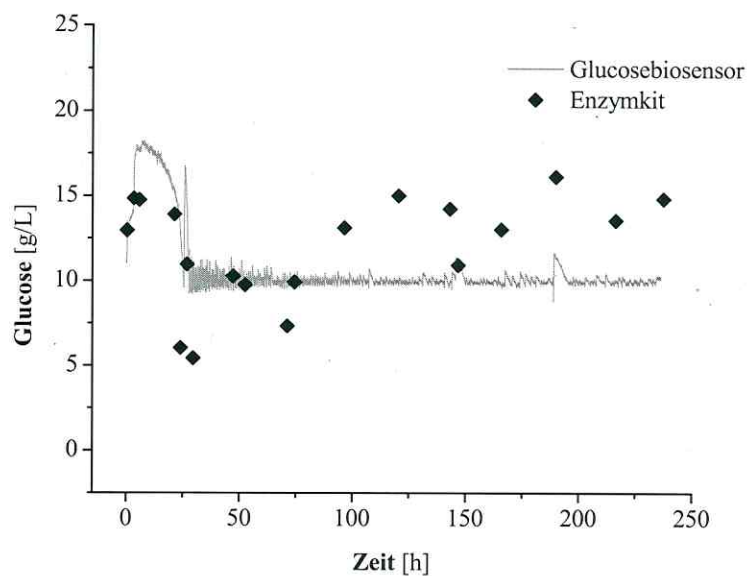


Abbildung 22: Biosensorgestützte kontinuierliche Kultivierung mit konstanter Glucosekonzentration von 10 g/L mit *Y. lipolytica* H222: Verlauf der Konzentration von Glucose, gemessen mit Glucosebiosensor und einem Enzymtest.
Bedingungen: pH 6,0; 30 °C; $pO_2 = 50 \%$; $V_0 = 5$ L.

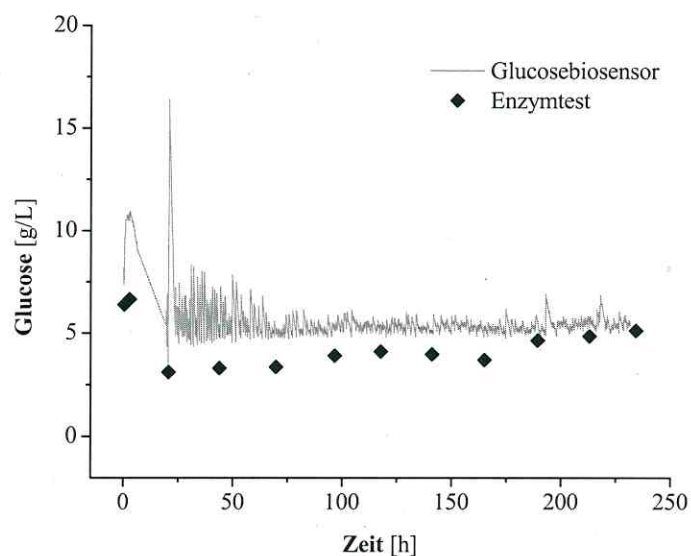


Abbildung 23: Biosensorgestützte kontinuierliche Kultivierung mit konstanter Glucosekonzentration von 5 g/L mit *Y. lipolytica* H222: Verlauf der Konzentration von Glucose, gemessen mit Glucosebiosensor und einem Enzymtest.
Bedingungen: pH 6,0; 30 °C; $pO_2 = 50 \%$; $V_0 = 5$ L.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass die Erhöhung der Glucosekonzentration von 5 auf 10 g/L eine Verbesserung der Effektivität des Bioprozesses für die Citronensäureproduktion mit sich bringt. Im Vergleich der kontinuierlichen Fermentation bei 10 g/L Glucose mit einer Fed-Batch Kultivierung mit der gleichen Glucosekonzentration zeigte sich die Fed-Batch Methode als die günstigere Art der Prozessführung.

3.3.2 Entwicklung semikontinuierlicher Verfahren

3.3.2.1 Batch Kultivierung

Eine Batch Kultivierung wurde als Ausgangspunkt der Untersuchungen durchgeführt, um eine Vergleichsbasis für die Beurteilung der Effektivität der getesteten Methoden zur Citronensäureherstellung aus Glucose mit Hilfe von *Y. lipolytica* H222 zu erhalten. Der Verlauf der Konzentrationen der wichtigsten Analyte im Laufe einer Batch-Fermentation ist in Abbildung 7 zu finden, die Parameter des Bioprozesses sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Die Startkonzentration von Glucose wurde mit 100 g/L so festgelegt, dass eine starke Substrathemmung, wie sie im Bereich von 200 g/L Glucose (s. Kapitel 3.2.4) auftritt, vermieden wird. Die Kultivierung lief 42 Stunden, ein Viertel von dieser Zeit fiel auf die Wachstumsphase. Die Biomassekonzentration erreichte in der Produktbildungsphase einen konstanten Wert von 23 g/L. Am Ende der Fermentation wurden 62 g/L Citronensäure und 6,1 g/L Isocitronensäure in der Kulturlösung detektiert, das entspricht einer Selektivität von 91 % Citronensäure. Die substratbezogene Ausbeute lag bei 0,37 g/g und die Produktivität des Bioprozesses erreichte 1,5 g/(L*h). (MOELLER ET AL. 2010)

3.3.2.2 Repeated Batch

Die ökonomische Effizienz des Bioprozesses wird erhöht, indem die Batch Fermentation in Zyklen durchgeführt wird. Durch die Anwendung des Repeated Batch Modus wird die Rüstzeit des Bioreaktors im Vergleich mit einer Batch Kultivierung erheblich reduziert. Die Vorkultur wird nur für den ersten Zyklus zubereitet und die Kultivierungsdauer verkürzt sich aufgrund des Wegfalls der lag-Phase der Mikroorganismen in den darauffolgenden Zyklen (WENTWORTH & COOPER 1996). Die Zeit, die dadurch eingespart wird, kann für die Citronensäureproduktion genutzt werden. ARZUMANOV ET AL. (2000), die ein Repeated Batch Verfahren für die Citronensäureherstellung aus Ethanol entwickelten, gaben an, dass durch diese Einsparung bis zu 12 % mehr Citronensäure produziert werden kann. Darüber hinaus werden Kosten für die Sterilisierung und Vorbereitung der Vorkultur gespart.

Eine Repeated Batch Fermentation wurde in 5 Zyklen durchgeführt. Die kinetischen Parameter dieser Kultivierung sind Tabelle 16 zu entnehmen. Die Verläufe der Konzentrationen der Biomasse, der Substrate (Glucose und Ammonium-Stickstoff) und der Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure) sind in den Abbildungen Abbildung 24 und Abbildung 25 dargestellt. Die höchste Biomassekonzentration von 29,6 g/L wurde im ersten Zyklus erreicht (s. Tabelle 16). Die geringste Biomasse wurde aufgrund einer starken Schaumbildung im zweiten Zyklus gebildet (BTM = 18,5 g/L). Diese Situation konnte in den nächsten Zyklen durch Vorlage von Antischaummittel im Medium verhindert werden. Im dritten Zyklus war die Biomassekonzentration nur geringfügig höher als im zweiten Zyklus. Dies ist auf eine technische Störung zurückzuführen - aufgrund eines Ausfalls der Kühleinheit des Bioreaktors erhöhte sich zu Beginn des dritten Zyklus die Temperatur der Kulturbrühe kurzzeitig auf 48 °C. Diese Störung verursachte eine erhebliche Verlängerung der lag-Phase der Mikroorganismen und beeinflusste die gesamten Ergebnisse des dritten Zyklus negativ. Im vierten und fünften Zyklus wurden wieder höhere Biomassekonzentrationen erreicht (24,0 g/L im vierten Zyklus und 27,1 g/L im fünften Zyklus). Dies zeigt, dass sich die Kultur wieder völlig erholen konnte. Die maximale spezifische Wachstumsrate konnte nur im ersten und im letzten Zyklus bestimmt werden (1. Zyklus: $\mu_{\max} = 0,20 \text{ h}^{-1}$, 5. Zyklus: $\mu_{\max} = 0,17 \text{ h}^{-1}$), da nur in diesen Zyklen genügend Messwerte ermittelt worden waren. Diese Werte zeigen, dass in den fünf Zyklen ein kleiner Verlust der Vermehrungsfähigkeit der Hefezellen zu verzeichnen ist.

Tabelle 15: Parameter der Batch und Fed-Batch Kultivierungen zur Citronensäureproduktion aus Glucose mit *Y. lipolytica* H222 (MOELLER ET AL. 2010).

	Dauer [h]	$\mu_{\max}$ [h ⁻¹]	BTM [g/L]	Absolut gebildet		Endkonzentration		S _{CS} [%]	Y _{CS,GL} [g/g]	P _{CS} [g/(L*h)]	P _{CS,max} [g/(L*h)]	p _{CS} [h ⁻¹]	p _{CS,max} [h ⁻¹]
				CS [g]	ICS [g]	CS [g/L]	ICS [g/L]						
Batch	41,8	0,30	23,7	286	28,5	62,0	6,14	91,0	0,37	1,48	2,84	0,06	0,12
Fed-batch I	171	0,15	23,1	1.228	153,1	132,6	16,4	89,0	0,67	0,78	1,42	0,04	0,07
Fed-batch II	335	0,21	16,2	2.194	45,04	166,4	2,32	95,6	0,71	0,50	1,88	0,03	0,12

Bedingungen: pH 6,0; T = 30 °C; pO₂ = 50 %; V₀ = 5 L; 150 g/L Glucosestartkonzentration, bei Fed-Batch Kultivierungen biosensorgestützte Nachdosierung einer 500 g/L Glucoselösung nach Absenken der Glucosekonzentration auf 30 g/L (Fed-Batch I) bzw. 20 g/L (Fed-Batch II).

Tabelle 16: Parameter einzelner Zyklen einer Repeated Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung aus Glucose mit *Y. lipolytica* H222 (MOELLER ET AL. 2010).

Zyklus Nr.	Zyklus- dauer [h]	$\mu_{\max}$ [h ⁻¹]	BTM [g/L]	Absolut gebildet		Endkonzentration		S _{CS} [%]	Y _{CS,GL} [g/g]	P _{CS} [g/(L*h)]	P _{CS,max} [g/(L*h)]	p _{CS} [h ⁻¹]	p _{CS,max} [h ⁻¹]
				CS [g]	ICS [g]	CS [g/L]	ICS [g/L]						
1	29,4	0,20	29,6	224	35,7	33,8	5,37	86,3	0,26	1,15	2,54	0,04	0,09
2	37,7	n.d.	18,5	397	44,2	59,0	7,24	89,9	0,40	1,49	3,87	0,08	0,21
3	33,8	n.d.	19,4	80,8	11,0	19,1	2,37	89,0	0,19	0,36	3,64	0,02	0,19
4	36,4	n.d.	24,0	355	37,1	58,2	6,08	90,6	0,38	1,51	2,38	0,06	0,10
5	34,0	0,17	27,1	428	36,4	66,5	5,76	92,0	0,48	1,70	2,39	0,07	0,10

Bedingungen: pH 6,0; T = 30 °C; pO₂ = 50 %; V = 5 L; 150 g/L Glucoseanfangskonzentration.

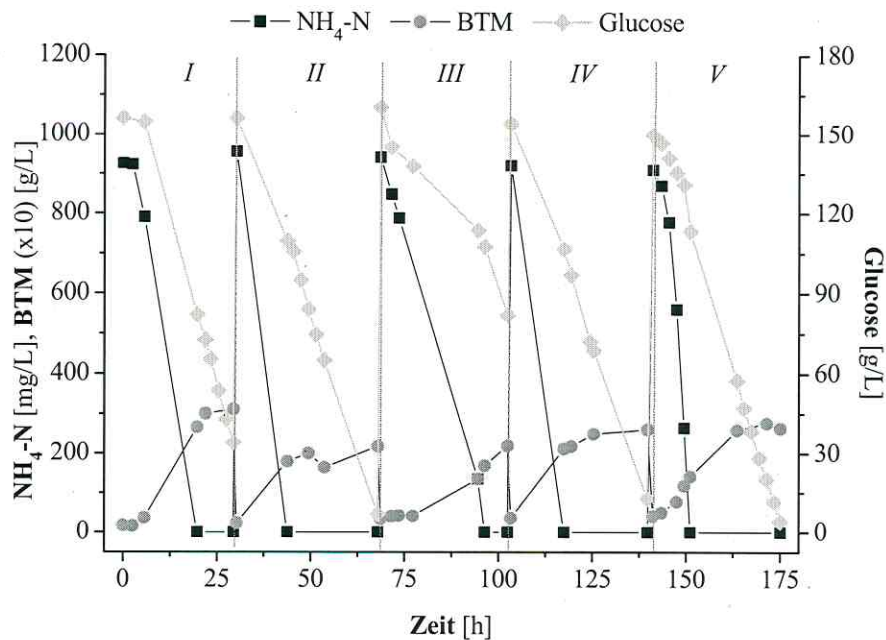


Abbildung 24: Repeated Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222:
Verlauf der Konzentrationen der Substrate (Glucose, Ammonium-Stickstoff) und Biomasse.
Bedingungen: pH 6,0; 30 °C; $pO_2 = 50 \%$; $V = 5 \text{ L}$.

Im ersten Zyklus wurde die niedrigste Endkonzentration der Citronensäure von 33,8 g/L erreicht (s. Abbildung 25, dritter Zyklus nicht berücksichtigt). Der Grund dafür ist die kürzeste Zyklusdauer (29,4 Stunden) und die längste lag-Phase, sodass die Produktbildungsphase nur 14 Stunden dauerte. Auch andere Parameter, wie die Selektivität des Bioprozesses für Citronensäure, die Produktivität und die substratbezogene Ausbeute sind in diesem Zyklus am niedrigsten ($S_{CS} = 86,3 \%$, $P_{CS} = 1,15 \text{ g/(L*h)}$ und $Y_{CS/GL} = 0,26 \text{ g/g}$).

Im zweiten und vierten Zyklus wurden ähnliche Citronensäureendkonzentrationen festgestellt (58-59 g/L Citronensäure). Auch die Produktivität und die Ausbeute unterschieden sich in diesen beiden Zyklen nur minimal ($P_{CS} = 1,5 \text{ g/(L*h)}$, $Y_{CS/GL} = 0,4 \text{ g/g}$ und $S_{CS} = 90-91 \%$). Die besten Ergebnisse wurden im vierten Zyklus erreicht: die höchste Endkonzentration der Citronensäure (66,5 g/L), sowie die größte absolute Menge an Citronensäure (428 g) mit der höchsten Selektivität (92 %), der besten Ausbeute ($0,48 \text{ g}_{CS}/\text{g}_{GL}$) und der maximalen Produktivität ($1,7 \text{ g/(L*h)}$) (s. Tabelle 16).

Die spezifische Produktbildungsrate erreichte im zweiten, vierten und fünften Zyklus ähnliche Werte zwischen $0,06$ und $0,08 \text{ h}^{-1}$, der niedrigste Wert von $0,04 \text{ h}^{-1}$ wurde auch hier im ersten Zyklus festgestellt (dritter Zyklus nicht berücksichtigt).

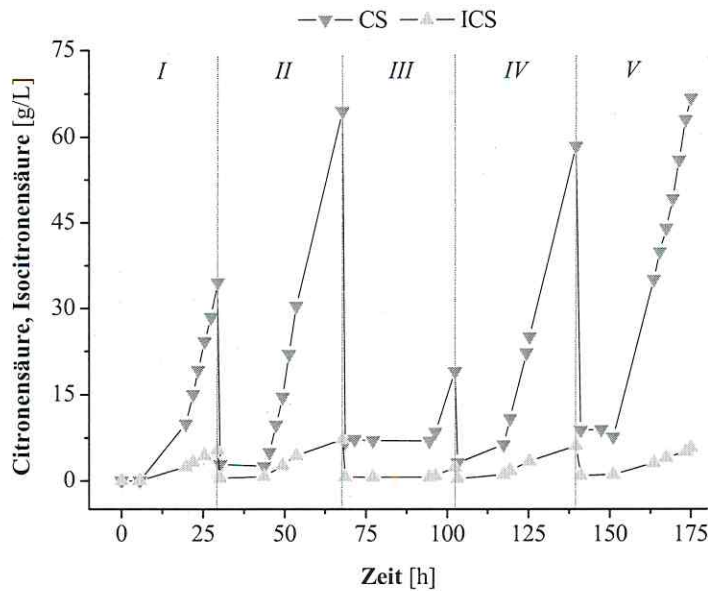


Abbildung 25: Repeated Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222: Verlauf der Konzentrationen der Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure) (MOELLER ET AL. 2010).
Bedingungen: pH 6,0; 30 °C; $pO_2 = 50 \%$; $V = 5 \text{ L}$.

Die Ergebnisse in Tabelle 16 zeigen, dass die Hefezellen innerhalb der fünf Zyklen ihre Aktivität zur Citronensäureproduktion nicht verlieren, diese wird sogar im fünften Zyklus noch intensiviert.

Vergleicht man die Parameter der Repeated Batch Kultivierung mit der Batch Fermentation (s. Kapitel 3.3.2.1), findet man eine bemerkenswerte Ähnlichkeit des einzelnen Batch Bioprozesses mit dem zweiten und vierten Zyklus in den erreichten Citronensäurekonzentrationen, substratbezogenen Ausbeuten sowie den volumetrischen Produktivitäten (s. Tabellen 15 und 16).

RYWINSKA ET AL. (2008) führten Repeated Batch Kultivierungen mit sechs Zyklen durch, in denen sie den rekombinanten Stamm *Y. lipolytica* A-101-1.31 und Glucose als Substrat nutzten. In den ersten vier Zyklen ihres Versuchs erreichten sie etwas niedrigere Citronensäureendkonzentrationen von 40,1-54,5 g/L (vgl. Tabelle 16). Auch die Produktivitäten lagen in der Fermentation von RYWINSKA ET AL. (2008) mit 0,36-0,74 g/(L*h) niedriger (vgl. Tabelle 16). Andererseits waren Ausbeuten und Selektivitäten einzelner Zyklen bei diesen Autoren mit 0,33-0,58 g_{CS}/g_{GL} und 95-97 % etwas höher (vgl. Tabelle 16). Im Ergebnis wurde festgestellt, dass die Kopplung mehrerer Zyklen in einer Repeated Batch Kultivierung für die Citronensäureproduktion mit der Hefe *Y. lipolytica* eine Verbesserung

der Effektivität der Produktion gegenüber einem einfachen Batch Verfahren bietet. Die Wiederholung der Wachstums- und Produktbildungsphasen bereitete dem Mikroorganismus keine Probleme, die Citronensäureproduktion blieb bis zum Ende des fünften Zyklus stabil (MOELLER ET AL. 2010).

3.3.2.3 Fed-Batch

Die weitere Erhöhung der Effektivität des Bioprozesses der Citronensäureproduktion ist durch die Verlängerung der Idiophase möglich. Dabei ist es jedoch nicht günstig, die Glucoseanfangskonzentration zu erhöhen, weil im Bereich von 200 g/L Glucose eine starke Substratinhibierung auftritt (s. Kapitel 3.2.4). Demzufolge bietet sich an, das Substrat mit Hilfe einer Nachdosierung in dem Maße zu liefern, wie es gebraucht wird (CROLLA & KENNEDY 2004). Dazu wird z. B. ein Biosensor-online-Messsystem eingesetzt, das die Substratkonzentration misst und die Nachdosierung regelt.

Zwei Fed-Batch Kultivierungen mit Biosensor-online-Regelung der Glucosekonzentration wurden durchgeführt. Die Fermentationen wurden im Batch Modus gestartet. Nachdem eine Glucosekonzentration von 30 bzw. 20 g/L erreicht wurde, startete die Nachdosierung einer 500 g/L Glucoselösung, wodurch dieses Konzentrationsniveau gehalten wurde. Der Unterschied zwischen den beiden Fermentationen liegt in unterschiedlichen Vorkulturen. Während im Versuch I eine eintägige Vorkultur zum Animpfen des Mediums genutzt wurde, war die im Versuch II verwendete drei Tage alt.

Die kinetischen Parameter beider Fed-Batch Fermentationen sind in Tabelle 15 angegeben. Die Verläufe der Konzentrationen von Biomasse, Substraten (Glucose und N-Quelle) und Produkten (Citronensäure und Isocitronensäure) im Laufe der Fed-Batch Kultivierung I und II sind in Abbildung 26 resp. Abbildung 27 dargestellt. Die Wachstumsphase dauerte im Versuch I 19 Stunden. Der Mittelwert der über die gesamte Produktbildungsphase gemessenen Biomassekonzentration erreichte 23,1 g/L (s. Tabelle 15). Die Trophophase des Versuchs II dauerte lediglich 13 Stunden. Die niedrige mittlere Biotrockenmasse (16,2 g/L) ist auf die Länge des Versuches zurückzuführen. Zum Zeitpunkt der Auszehrung des extrazellulären Stickstoffs aus der Kulturbrühe lag die Biomassekonzentration im Fed-Batch I bei 20,7 g/L, im Fed-Batch II bei 29,5 g/L.

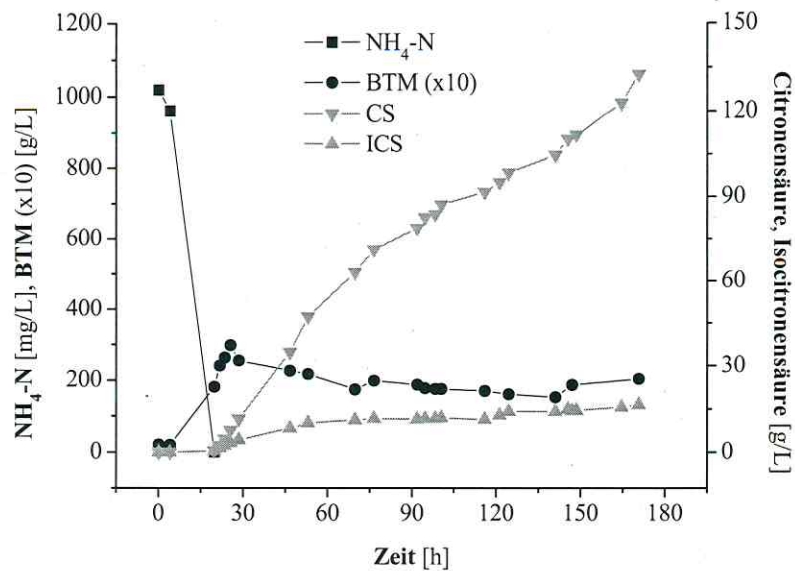


Abbildung 26: Fed-Batch Kultivierung I zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222: Verlauf der Konzentrationen der Biomasse, $\text{NH}_4\text{-N}$ und Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure).
Bedingungen: pH 6,0; $T = 30\text{ }^\circ\text{C}$; $p\text{O}_2 = 50\text{ } \%$; $V_0 = 5\text{ L}$.

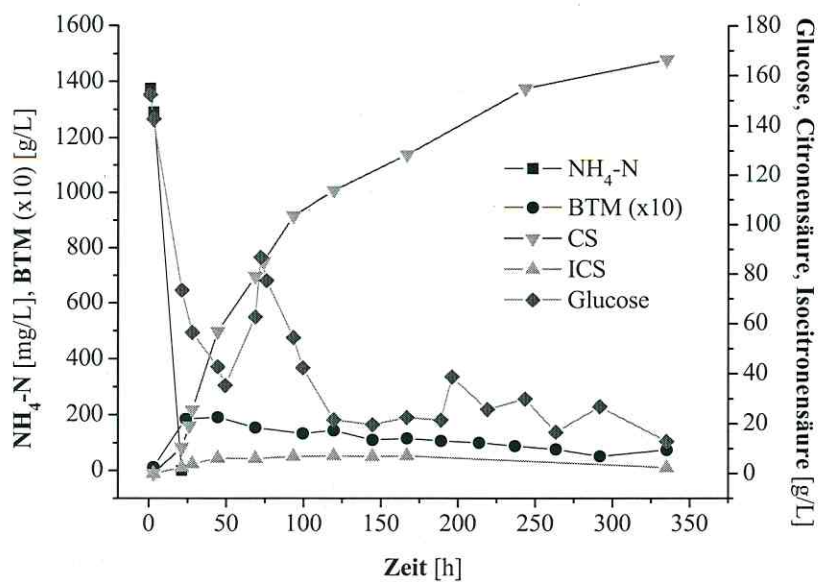


Abbildung 27: Fed-Batch Kultivierung II zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222: Verlauf der Konzentrationen der Biomasse, Substrate (Glucose und $\text{NH}_4\text{-N}$) und Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure).
Bedingungen: pH 6,0; $T = 30\text{ }^\circ\text{C}$; $p\text{O}_2 = 50\text{ } \%$; $V_0 = 5\text{ L}$.

Die Citronensäureproduktion startete im Versuch I nach 19,8 Stunden Fermentationszeit. Nach zweistündiger Anlaufphase, in der die Citronensäure mit der Geschwindigkeit von 0,89 g/(L*h) gebildet wurde, war ein linearer Anstieg ($R^2 = 0,996$) der Citronensäurekonzentration bis zur 77. Stunde mit der Produktbildungsrate von 1,27 g/(L*h) zu verzeichnen. Nachdem 71 g/L Citronensäure erreicht wurden, verlangsamte sich die Citronensäurebildung und Citronensäure wurde bis zum Ende mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 0,60 g/(L*h) produziert. Die Citronensäurekonzentration lag am Ende der Kultivierung bei 132,6 g/L (MOELLER ET AL. 2010). Im Versuch II wurde Citronensäure im Bereich der linearen Produktionsphase bis zur 45. Stunde mit der Geschwindigkeit von 1,80 g/(L*h) produziert ($R^2 = 0,980$). Danach kam es zu einer deutlichen Verlangsamung der Produktbildung auf 0,47 g/(L*h) im Intervall von der 45. bis zur 166. Stunde. Dann hat sich die mittlere Produktbildungsrate nochmal halbiert (0,22 g/(L*h)). Die Citronensäurekonzentration erreichte nach 335 Stunden am Ende der Fermentation 166,4 g/L. Der Verlauf der Glucosekonzentration im Laufe der Fed-Batch Fermentation I ist in Abbildung 28 dargestellt. Die Fermentation startete bei 150 g/L Glucose im Batch Modus. Bereits von Anfang an wurde der Glucosebiosensor für die Glucosemessung genutzt, obwohl für den Biosensor der Messbereich nur zwischen 0,5 und 40 g/L Glucose angegeben ist. Nachdem 30 g/L Glucose erreicht wurden, setzte die Substratnachdosierung ein. Die gemessenen Werte oszillierten um den Sollwert mit einer mittleren Abweichung von 0,82 g/L Glucose. Die biosensorgestützte Substratfütterung dauerte 112 Stunden. Nach 148,5 Stunden wurde die Fütterungspumpe ausgeschaltet, damit die restliche Glucose, die sich in der Kulturlösung befand, verwertet werden konnte. Die vom Glucosebiosensor gelieferten Daten unterschieden sich von den offline gemessenen Glucosekonzentrationen durchschnittlich um 29 % (d. h. $\pm 8,7$ g/L) (MOELLER ET AL. 2010).

Im Versuch II kam es am Anfang der biosensorgestützten Nachdosierung zu Störungen des Biosensor-online-Messsystems, die eine Erhöhung der Glucosekonzentration bis zu 87 g/L verursachten. Der Fehler konnte im Laufe der Kultivierung beseitigt werden, sodass ab der 120. Stunde eine biosensorgestützte Substratnachdosierung möglich war. Leider stehen keine Messdaten des Glucosebiosensors zur Verfügung.

Durch die Verlängerung der Produktbildungsphase durch die Substratnachdosierung während einer Fed-Batch Kultivierung wurde im Vergleich zu der Batch Fermentation die Citratendkonzentration mehr als verdoppelt. Auch die substratbezogene Ausbeute wurde erheblich gesteigert.

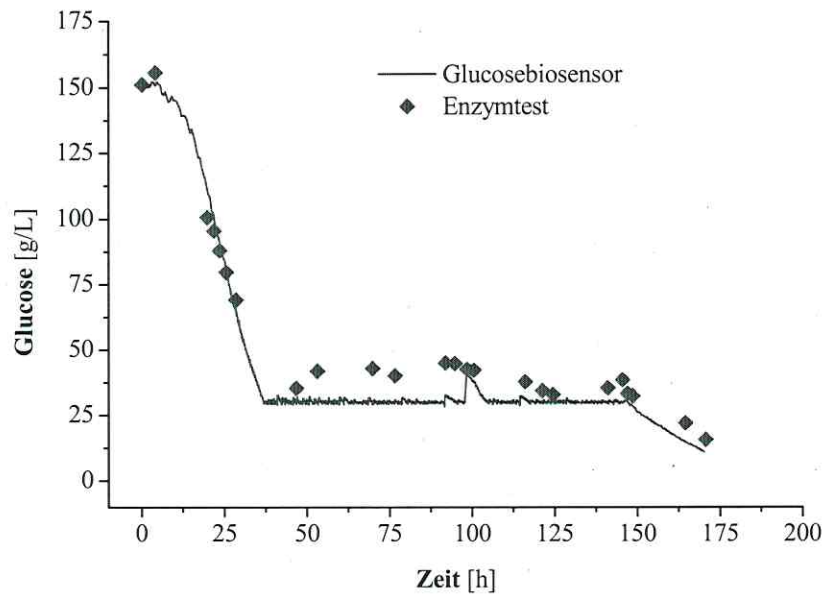


Abbildung 28: Fed-Batch Kultivierung I zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222: Verlauf der Konzentration von Glucose, gemessen mit dem Glucosebiosensor und einem Enzymtest (MOELLER ET AL. 2010).
Bedingungen: pH 6,0; T = 30 °C; pO₂ = 50 %; V₀ = 5 L.

3.3.2.4 Repeated Fed-Batch

Im Rahmen der Entwicklung geeigneter Prozessführungsstrategien wurden die ermittelten Vorteile von Fed-Batch und Repeated Batch in einer Fermentationsmethode verbunden. Repeated Fed-Batch zeichnet sich sowohl durch die Verlängerung der Produktbildungsphase mit Hilfe der Substratfütterung als auch durch die Verkürzung der Rüstzeiten des Bioreaktors und den Wegfall der Inokulumzubereitung ab dem zweiten Zyklus aus.

Die Ergebnisse der Repeated Fed-Batch Kultivierung mit drei Zyklen sind in Tabelle 17 zusammengefasst, die Verläufe der Konzentrationen der Substrate, Biomasse und Produkte sind in Abbildung 29 dargestellt.

Die Wachstumsphasen aller drei Zyklen dauerten 11 bis 12 Stunden, auch die mittleren Biomassekonzentrationen erreichten während der Produktbildungsphasen ähnliche Werte zwischen 20,7 und 23,7 g/L.

Der erste Zyklus brachte die besten Ergebnisse, wenn man die Citronensäureendkonzentration, die Selektivität und die volumetrische und biomassespezifische Produktivität betrachtet ($c_{CS} = 102,3$ g/L, $S_{CS} = 94,4$ %, $P_{CS} = 1,42$ g/(L*h) und $p_{CS} = 0,06$ h⁻¹). In diesem Zyklus wurde die Citronensäure auch am schnellsten gebildet, wie

die höchste maximale Produktbildungsrate zeigt ($P_{CS,max} = 2,99 \text{ g/(L*h)}$). Im zweiten Zyklus wurde die niedrigste Citronensäureendkonzentration von $90,9 \text{ g/L}$ festgestellt, im dritten Zyklus wurden ähnlich wie im ersten Zyklus 100 g/L Citronensäure gebildet. Die Endkonzentrationen von Isocitronensäure erreichten mit fortschreitender Zykluszahl höhere Werte (von $6,0 \text{ g/L}$ im ersten Zyklus bis $8,7 \text{ g/L}$ im letzten Zyklus). Dies führte auch zu einer Verschlechterung der Selektivität des Bioprozesses für Citronensäure von $94,4 \%$ im ersten Zyklus bis zu $92,0 \%$ im dritten Zyklus. Die höchste substratbezogene Ausbeute wurde mit $0,65 \text{ g}_{CS}/\text{g}_{GL}$ im dritten Zyklus erreicht (MOELLER ET AL. 2010).

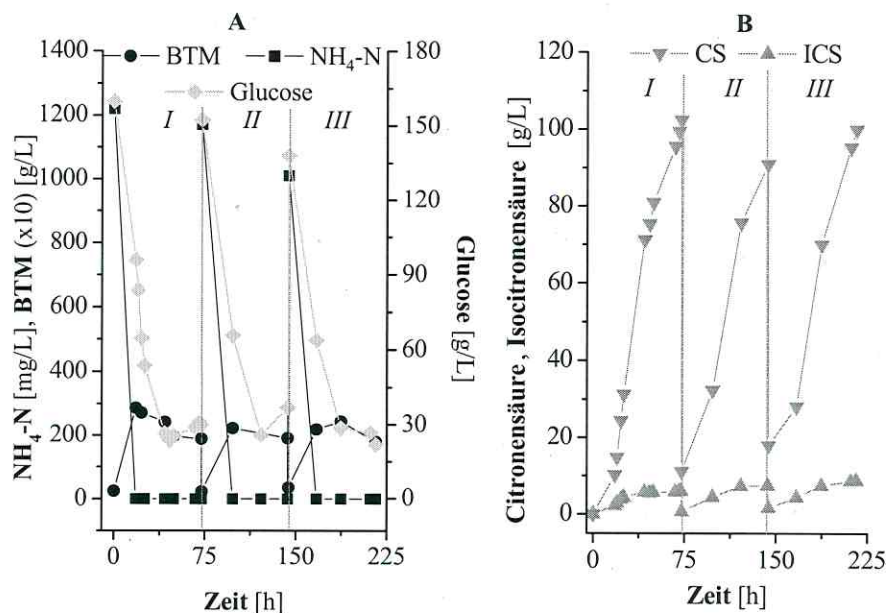


Abbildung 29: Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222: Verlauf der Konzentrationen der Biomasse und Substrate (Glucose und $\text{NH}_4\text{-N}$) (A) und der Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure) (B) (MOELLER ET AL. 2010).
Bedingungen: pH 6,0; 30°C ; $\text{pO}_2 = 50 \%$; $V_0 = 5 \text{ L}$.

Nachdem die Eignung der Repeated Fed-Batch Methode für die Citronensäureherstellung in einer Fermentation mit drei Zyklen bestätigt wurde, wurde ein Langzeitversuch durchgeführt, um sowohl die Stabilität von *Y. lipolytica* für die Citronensäureproduktion als auch die Robustheit des Glucosebiosensors zu ermitteln.

Der Langzeitversuch bestand aus zehn Zyklen und dauerte insgesamt 23 Tage. Die ersten drei Zyklen liefen jeweils drei Tage, die Laufzeit der restlichen sieben Zyklen wurde auf zwei Tage verkürzt. Die Parameter der jeweiligen Zyklen der Kultivierung sind in Tabelle 18 zusammengefasst. Im Laufe des sechsten Zyklus kam es zu einem Ausfall der Elektrizitätsversorgung für einige Minuten, welches einen negativen Einfluss auf die

Produktbildung ausübte. Aus diesem Grund wird der sechste Zyklus bei der Untersuchung der Langzeitstabilität nicht in Betracht gezogen.

Die Biomassekonzentration erreichte in den ersten fünf Zyklen in der Idiophase ähnliche Werte von 26-28 g/L. In den nächsten vier Zyklen kam es zur Erhöhung der in der Produktbildungsphase erreichten Biomasse. In den letzten beiden Zyklen stabilisierte sich die Biomassekonzentration auf 34-35 g/L. Die maximale spezifische Wachstumsrate $\mu_{\max}$ sank mit fortschreitender Zykluszahl: im ersten Zyklus erreichte sie $0,20 \text{ h}^{-1}$, im letzten Zyklus lag sie bei $0,12 \text{ h}^{-1}$. Somit ist der Trend des Abfalls von $\mu_{\max}$ ähnlich, wie bei der Repeated Batch Kultivierung.

Die höchsten Citronensäureendkonzentrationen wurden in den ersten drei Zyklen erreicht ($c_{\text{CS}} = 96-98 \text{ g/L}$) (s. Abbildung 30). Im Verlauf der Citronensäurekonzentration der ersten drei Zyklen ist jeweils in den letzten 24 Stunden der Zykluszeit eine gewisse Verlangsamung der Citronensäurebildung zu beobachten (s. auch Abbildung 29B), die auf die Produkthemmung zurückzuführen ist (s. Kapitel 3.2.5). Aus diesem Grund wurde die Zykluszeit der weiteren Zyklen um 24 Stunden gekürzt. Im Laufe der ersten sieben Zyklen schwankte die nach 48 Stunden Zykluszeit erreichte Citronensäurekonzentration zwischen 65 und 78 g/L (im ersten Zyklus wurden nach 48 Stunden 72,1 g/L Citronensäure gebildet, im zweiten Zyklus waren es 64,5 g/L und im dritten Zyklus entstanden 67,6 g/L Citronensäure in dieser Zeit). Im achten und neunten Zyklus erreichten die Citronensäureendkonzentrationen weniger als 60 g/L. Im zehnten Zyklus wurden zur 48. Stunde 62,2 g/L Citronensäure in der Kulturlösung festgestellt. Diese Entwicklung deutet nicht eindeutig auf eine Abnahme der mikrobiellen Aktivität für die Citronensäureproduktion hin. Auf der anderen Seite ist für die Selektivität des Bioprozesses für Citronensäure eine klare Abnahme zu beobachten (s. Abbildung 32). Die höchste Selektivität von 92 % Citronensäure wurde am Ende der ersten drei Zyklen erhalten. Dies ist, wie bereits im Kapitel 3.1 (s. Abbildung 9B) erklärt wurde, mit der längeren Zykluszeit verbunden. Betrachtet man aber die Selektivität nach jeweils 48 Stunden Zykluszeit (s. Abbildung 32), wird deutlich, dass sich die Selektivität in den ersten fünf Zyklen zwischen min. 90,3 % (im ersten Zyklus) und max. 91,1 % (im dritten Zyklus) bewegte und danach mit fortschreitender Zykluszahl bis auf 87,9 % im zehnten Zyklus abnahm.

Die hohe Stabilität der citratbildenden Hefe im Laufe von Kultivierungen in unterschiedlichen Modi wurde in der Literatur bereits beschrieben. ANASTASSIADIS ET AL. (2006) führten eine Repeated Batch Kultivierung von *C. oleophila* ATCC 20177 in 20 Zyklen ohne jeglichen Verlust an Aktivität des Mikroorganismus durch. RANE & SIMS (1995) berichteten, dass

Y. lipolytica Y 1095 im Zellrückführungsbioreaktor beinahe 700 Stunden aktiv geblieben ist, in den letzten 200 Stunden gingen allerdings sowohl die Lebensfähigkeit der Zellen als auch die Citronensäureproduktion deutlich zurück. KIM ET AL. (1987) beschrieben eine kontinuierliche Fermentation mit *S. lipolytica* D 1805 im Membranrührreaktor, deren Lebenstüchtigkeit über 600 Stunden Kultivierungszeit aufrechterhalten blieb. ENZMINGER & ASENJO (1986) wiesen nach, dass *S. lipolytica* Y7576 ihre Fähigkeit, Citronensäure zu bilden und auszuscheiden, über ca. 700 Stunden beibehält. Zum gleichen Ergebnis kamen auch ARZUMANOV ET AL. (2000), die die Citronensäuresynthese aus Ethanol mit *Y. lipolytica* VKM Y-2373 in einer Repeated Batch Kultivierung untersuchten.

Die Glucosestartkonzentration lag in jedem Zyklus bei 150 g/L (s. Abbildung 31). Nachdem die Glucosekonzentration auf 20 g/L gesunken war, wurde sie auf diesem Wert mit der mittleren Abweichung von $\pm 0,38$ g/L mit Hilfe der Biosensor-online-Regelung konstant gehalten. Der Glucosebiosensor wurde am Zyklusanfang rekaliert. Am zweiten Zyklustag (noch vor dem eigentlichen Beginn der biosensorgesteuerten Substratnachdosierung) wurde die Durchlässigkeit der Dialysemembran getestet. Der Glucosebiosensor lieferte 6227 Messdaten, obwohl er nach Herstellerangaben nur für 5000 Messungen ausgelegt war. Im Laufe des ganzen Langzeitversuchs wurde keine Abnahme seiner Aktivität registriert. Bei einem Vergleich der Messdaten beider Methoden der Glucosebestimmung zeigte sich eine mittlere Abweichung von 5,6 g/L, wobei nur die Daten innerhalb des vom Hersteller definierten Messbereiches des Glucosebiosensors zwischen 0,5 und 40 g/L Glucose berücksichtigt wurden. Auch außerhalb dieses Messbereiches wurde bis zu 150 g/L Glucose eine gute Übereinstimmung mit den Messdaten aus dem Enzymtest gefunden. Über die gesamte Fermentationszeit betrachtet wurde eine Abweichung von 6,9 g/L ermittelt. Das zeigt, dass der Glucosebiosensor sowohl in einem größeren Messbereich als auch für eine größere Anzahl an Messungen einsetzbar ist, als vom Hersteller vorgegeben. Somit kann er für lange Kultivierungszeiten angewendet werden und zur Glucosemessung von Beginn an verwendet werden, selbst wenn die vorgelegte Startkonzentration höher ist, als die obere Messbereichsgrenze.

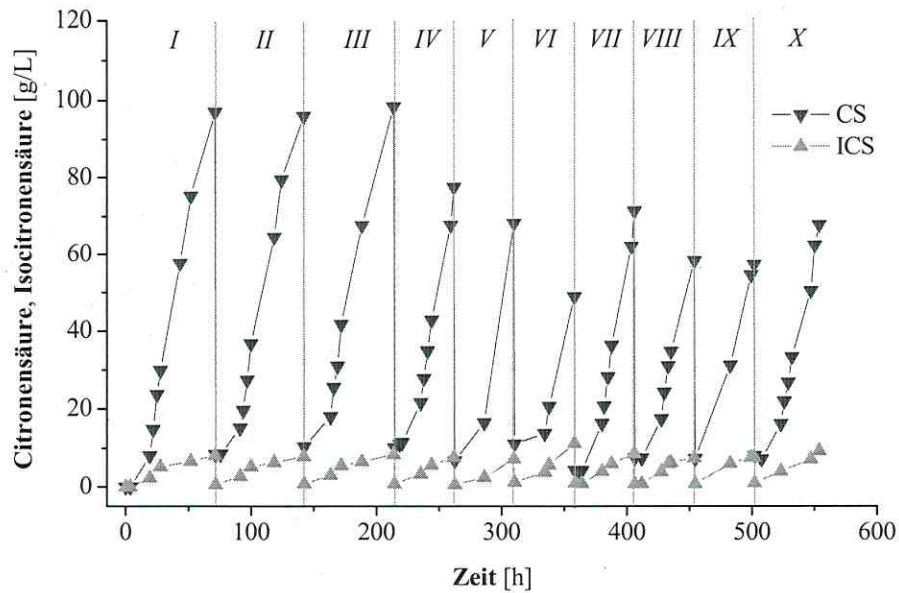


Abbildung 30: Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222 - Langzeitversuch: Verlauf der Konzentrationen der Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure).

Bedingungen: pH 6,0; 30 °C; $pO_2 = 50 \%$; $V_0 = 5$ L.

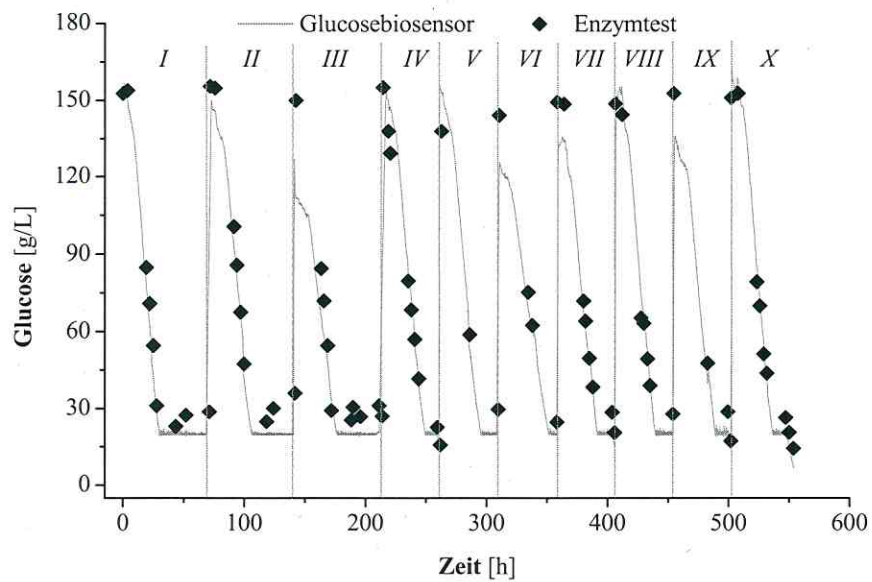


Abbildung 31: Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222 - Langzeitversuch: Verlauf der Konzentrationen von Glucose, gemessen mit Glucosebiosensor und einem Enzymtest.

Bedingungen: pH 6,0; 30 °C; $pO_2 = 50 \%$; $V_0 = 5$ L.

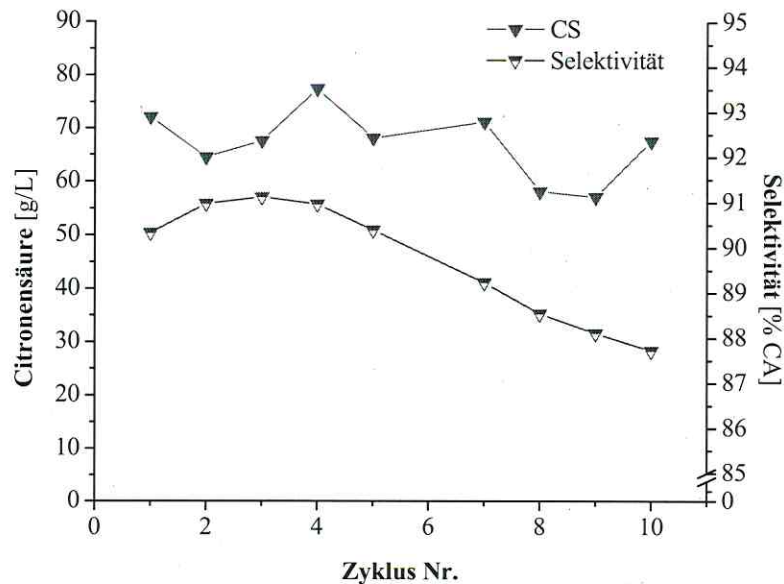


Abbildung 32: Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222 - Langzeitversuch: Konzentrationen von Citronensäure in den einzelnen Zyklen nach 48 Stunden Zykluszeit und Selektivität des Bioprozesses für Citronensäure in den einzelnen Zyklen nach 48 Stunden Zykluszeit.
Bedingungen: pH 6,0; 30 °C; $pO_2 = 50 \%$; $V_0 = 5 \text{ L}$.

Die Repeated Fed-Batch Kultivierung zeigte sich als die beste Methode der untersuchten Prozessführungsstrategien. In Abbildung 33 ist der Vergleich der Effektivität von Batch, Fed-Batch und zwei Zyklen von Repeated Fed-Batch (mit gleicher Kultivierungsdauer wie die Fed-Batch Kultivierung) dargestellt. Aufgrund der Verlängerung der Idiophase mit Hilfe der Substratnachdosierung wurde eine geringfügige Erhöhung der Citronensäureproduktion von 6,8 g/h auf 7,1 g/h erzielt. Dies entspricht einer dreiprozentigen Steigerung. Ein deutlicher Anstieg der Effektivität des Bioprozesses von 30 % wurde durch eine Aneinanderreihung von zwei Zyklen in einer Repeated Fed-Batch Fermentation erreicht.

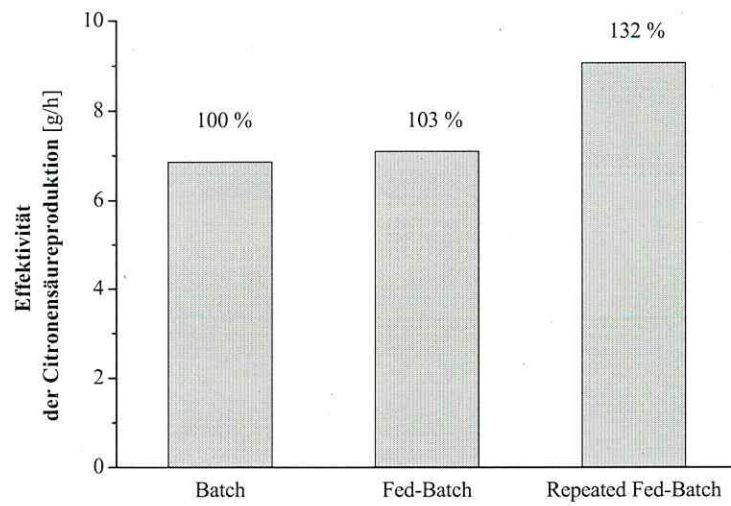


Abbildung 33: Vergleich der Effektivität des Bioprozesses bezüglich Citronensäureproduktion in Batch, Fed-Batch und Repeated Fed-Batch Modi (MOELLER ET AL. 2010).
Bedingungen: pH 6,0; 30 °C; $pO_2 = 50 \%$; $V_0 = 5 \text{ L}$.

Tabelle 17: Parameter einzelner Zyklen der Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung aus Glucose mit *Y. lipolytica* H222 (MOELLER ET AL. 2010).

Zyklus Nr.	Zyklus- dauer [h]	$\mu_{\max}$ [h ⁻¹]	BTM [g/L]	Absolut gebildet		Endkonzentration		S _{CS} [%]	Y _{CS/GL} [g/g]	P _{CS} [g/(L*h)]	P _{CS,max} [g/(L*h)]	p _{CS} [h ⁻¹]	p _{CS,max} [h ⁻¹]
				CS [g]	ICS [g]	CS [g/L]	ICS [g/L]						
1	72,16	0,26	23,71	617	36,3	102,3	5,99	94,4	0,51	1,42	2,99	0,06	0,13
2	70,66	-	20,70	540	45,4	90,9	7,42	92,5	0,52	1,13	1,95	0,06	0,09
3	71,99	-	21,43	605	52,8	100,0	8,72	92,0	0,65	1,14	2,52	0,05	0,12

Bedingungen: pH = 6,0; T = 30 °C; pO₂ = 50 %; V₀ = 5 L; 150 g/L Glucoseanfangskonzentration, nach Absenken der Glucosekonzentration auf 20 g/L biosensorgestützte Nachdosierung einer 500 g/L Glucoselösung. Zyklusdauer: 71-72 h.

Tabelle 18: Parameter einzelner Zyklen der Repeated Fed-Batch Langzeitkultivierung zur Citronensäureherstellung aus Glucose mit *Y. lipolytica* H222.

Zyklus Nr.	Zyklus- dauer [h]	$\mu_{\max}$ [h ⁻¹]	BTM [g/L]	Absolut gebildet		Endkonzentration		S _{CS} [%]	Y _{CS/GL} [g/g]	P _{CS} [g/(L*h)]	P _{CS,max} [g/(L*h)]	P _{CS} [h ⁻¹]	P _{CS,max} [h ⁻¹]
				CS [g]	ICS [g]	CS [g/L]	ICS [g/L]						
1	71,2	0,20	27,0	654	55,4	97,0	8,2	92,2	0,54	1,36	2,81	0,05	0,13
2	70,3	0,19	26,3	589	48,5	95,9	7,9	92,4	0,59	1,25	3,74	0,05	0,18
3	71,3	0,13	26,2	679	58,8	98,3	8,4	92,1	0,69	1,23	3,22	0,05	0,16
4	47,6	0,16	28,2	391	39,8	77,5	7,7	91,0	0,52	1,41	2,53	0,05	0,11
5	47,2	n.d.	28,1	377	40,4	68,1	7,2	90,4	0,56	1,30	n.d.	0,05	n.d.
6	47,8	n.d.	28,9	237	56,1	52,8	11,2	81,3	0,47	0,79	n.d.	0,03	n.d.
7	47,5	0,16	32,5	392	45,4	71,2	8,6	89,2	0,49	1,41	2,61	0,04	0,09
8	47,6	0,14	33,3	292	38,5	58,2	7,5	88,5	0,39	1,06	2,71	0,03	0,11
9	47,4	n.d.	35,2	298	40,9	57,2	7,7	88,1	0,39	1,05	n.d.	0,03	n.d.
10	51,7	0,12	34,2	341	42,8	67,6	9,3	87,9	0,41	1,15	2,49	0,03	0,09

Bedingungen: pH 6,0; T = 30 °C; pO₂ = 50 %; V₀ = 5 L; 150 g/L Glucoseanfangskonzentration, nach Absenken der Glucosekonzentration auf 20 g/L biosensorgestützte Nachdosierung einer 500 g/L Glucoselösung. Zyklusdauer: 71 h (3 Zyklen) und 48 h (7 Zyklen).

3.4 Versuche zur Anwendung von Stärkehydrolysaten zur Citronensäuregewinnung mit *Yarrowia lipolytica* H222

3.4.1 Auswahl des geeigneten Stärkehydrolysates

Für eine Erweiterung des Substratspektrums bietet sich die Anwendung von Stärkehydrolysaten an. Ein Stärkehydrolysat (oder verflüssigte Stärke) ist ein Zuckergemisch, das durch so genannte Stärkeverflüssigung mit hitzetoleranter α -Amylase gewonnen wird. Diese verflüssigte Stärke wird weiter mit α -Glucoamylase und Debranching Enzyme verarbeitet. Diese sog. Stärkeverzuckerung ergibt Glucosesirup, dessen Glucosegehalt hoch ist und von den Verzuckerungsbedingungen abhängt. Durch eine weitere Bearbeitung dieses Sirups entsteht Glucose (PETERS 2006).

Die Anwendung von Glucosesirup für die Citronensäureherstellung bringt einige Vorteile. Wie bereits im Kapitel 3.1 erwähnt wurde, beeinflusst die Konzentration der Fütterungslösung den Verlauf der Zulaufverfahren. Dank der geringeren Verdünnung der Kulturbrühe durch den höher konzentrierten Glucosesirup im Vergleich zu Glucoselösungen während einer Fed-Batch Kultivierung wird das maximale Arbeitsvolumen des Bioreaktors später erreicht und dadurch wird die Fermentationsdauer verlängert (maximale Wasserlöslichkeit von Glucose bei 20 °C: 470 g/L Glucose).

Drei Glucosesirupe mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen von 883 g/L (RL 95), 950 g/L (Südzucker) und 966 g/L (C* Sweet) wurden im Multibioreaktorsystem Sixfors auf ihre Eignung für die Citronensäureherstellung überprüft. Darüber hinaus wurde zum Vergleich eine Fermentation mit Glucosemonohydrat durchgeführt. Alle Versuche starteten mit 150 g/L Glucose im Batch Modus, der Glucosegehalt wurde mit zweifacher Nachdosierung des jeweiligen Glucosesirups bzw. einer 500 g/L Glucoselösung aufgefüllt. Die kinetischen Parameter der Kultivierungen sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Die Wachstumsphasen der einzelnen Versuche hatten den gleichen Verlauf. Innerhalb der ersten 20 Stunden wurde der extrazelluläre Stickstoff ausgezehrt und die Biomassekonzentrationen erreichten ähnliche Endwerte von 25-25,5 g/L (s. Tabelle 19).

Die Citronensäureproduktion startete im Versuch mit Glucosemonohydrat am schnellsten. Nach 20,5 Stunden der Fermentation wurden bereits 8,6 g/L Citronensäure gebildet, währenddessen sich in den Versuchen mit den Glucosesirupen die Citronensäurekonzentration zu diesem Zeitpunkt zwischen 2 g/L (RL95) und 4,6 g/L (Südzucker) bewegte. Diese Situation änderte sich nach der ersten Substratnachdosierung, die nach 27,5 h Fermentationsdauer durchgeführt wurde. Infolge der stärkeren Verdünnung der Kulturbrühe

aufgrund der Nachdosierung der höher verdünnten Glucoselösung als in den übrigen Fermentationen wurde zum Zeitpunkt der zweiten Fütterung in der 51. Stunde im Versuch mit Glucosemonohydrat die niedrigste Citronensäurekonzentration von 54,4 g/L gemessen. In den Versuchen mit Glucosesirupen wurden bis zu diesem Zeitpunkt 56,7 g/L (C* Sweet) bis 60 g/L (Südzucker) Citronensäure gebildet.

Dieser Trend hielt bis zum Ende der Fermentation an. Die höchste Endkonzentration der Citronensäure von 73,3 g/L wurde unter Verwendung des Glucosesirups der Südzucker AG erzielt. Auch andere Parameter, wie substratbezogene Ausbeute, Selektivität und Produktivität des Bioprozesses haben in dieser Fermentation ihren höchsten Wert erreicht (s. Tabelle 19).

RYMOWICZ & LENART (2004) nutzten für Ihre Untersuchungen des Einflusses von Gelöstsauerstoff auf die Citronensäurebildung mit *Y. lipolytica* GW-7 den Glucosesirup „Syroprim G 95“ (Cargill Inc.) mit 95,35 % Glucose. Unter optimalen Bedingungen (50-60 % pO₂) erreichten sie nach 55 Stunden Fermentationszeit 52 g/L Citronensäure, eine Produktivität von 1-1,1 g/(L*h) und Ausbeuten von 0,43-0,44 g/g. Unter Nutzung von Glucosesirup von Südzucker wurde in der hier präsentierten Kultivierung zur 53. Stunde eine etwas höhere Citronensäurekonzentration von 58,2 g/L erreicht, die Produktivität war mit 1,1 g/(L*h) zu diesem Zeitpunkt im Bereich des von RYMOWICZ & LENART (2004) ermittelten Wertes.

Tabelle 19: Kinetische Parameter der Citronensäureproduktion bei der Auswahl des geeigneten Glucosesirups für die Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222.

C-Quelle	c _{GL} [g/L]	BTM [g/L]	Absolut gebildet		Endkonzentration		S _{CS} [%]	Y _{CS/GL} [g/g]	P _{CS} [g/(L*h)]	P _{CS,max} [g/(L*h)]	p _{CS} [h ⁻¹]	p _{CS,max} [h ⁻¹]
			CS [g]	ICS [g]	CS [g/L]	ICS [g/L]						
Glucosemonohydrat	500	25,0	29,9	1,89	66,2	4,03	94,3	0,37	0,96	2,28	0,039	0,091
Südzucker	950	25,5	36,2	2,12	73,3	4,46	94,3	0,49	1,07	2,39	0,042	0,094
C* Sweet	966	24,9	31,3	2,02	71,6	4,48	94,1	0,49	1,05	2,24	0,042	0,098
RL95	883	25,0	29,4	1,99	65,0	4,39	93,7	0,41	0,96	2,21	0,038	0,089

Bedingungen: pH = 6,0; T = 30 °C; pO₂ = 50 %; V₀ = 300 mL; 1000 rpm.

3.4.2 Anwendung des Stärkehydrolysates unter biosensorgesteuerter Substratnachdosierung

Auf der Basis der in Kapitel 3.4.1 beschriebenen Ergebnisse der Versuchsreihe zur Ermittlung eines geeigneten Stärkehydrolysates wurde für die Überprüfung der biosensorgesteuerten Substratnachdosierung im halbertechnischen Maßstab der Glucosesirup der Firma Südzucker AG gewählt.

Die Fermentation fing mit 150 g/L Glucose im Batch Modus an. Nachdem die Glucosekonzentration auf 20 g/L gesunken war, startete die biosensorgestützte Nachdosierung des Glucosesirups. Der Fed-Batch Modus wurde nach Erreichen von 7 L Arbeitsvolumen in der 75. Fermentationsstunde durch die kontinuierliche Verfahrensweise ersetzt (s. Abbildung 34).

Die Wachstumsphase dauerte ungefähr 12 Stunden, am Ende der Trophophase waren 21 g/L Biomasse gebildet worden. Die gemessene Biomasse erhöhte sich auf 29 g/L in der frühen Idiophase. Mit fortschreitender Fermentationszeit sank sie bis 16 g/L, sowohl aufgrund der Verdünnung der Kulturbrühe infolge der pH-Regelung und Substratnachdosierung als auch der Auswaschung der Biomasse in der kontinuierlichen Phase.

Die Produktion von Citronensäure startete mit einer Geschwindigkeit von bis zu 3 g/(L*h). Nachdem die Citronensäurekonzentration von 80 g/L erreicht wurde, verlangsamte sich die Produktbildung infolge Produkthemmung, sodass die Rate der Citronensäurebildung von 2,2 g/(L*h) (18,5 bis 52 h) auf 0,88 g/(L*h) (52 bis 91 h) absank (s. Abbildung 9A). Nach 91 Stunden Fermentationszeit hörte die Bildung von Citronensäure allmählich auf. Zwischen der 121. und 140. Fermentationsstunde wurden lediglich 3,1 g/L Citronensäure produziert.

Bis zur 72. Stunde wurden 104 g/L Citronensäure gebildet. Diese Konzentration ist etwas höher als die Endkonzentrationen der Citronensäure im ersten Zyklus der Repeated Fed-Batch Kultivierungen im Kapitel 3.3.2.4 (102 g/L bei Repeated Fed-Batch mit 3 Zyklen und 97 g/L im Falle der Langzeitkultivierung). Die Selektivität des Bioprozesses für Citronensäure war mit 91,7 % wiederum schlechter als in o.g. Versuchen.

Die Endkonzentration der Citronensäure lag bei 133 g/L (entspricht 994 g Citronensäure). Die gleiche Citronensäurekonzentration wurde auch im Fed-Batch Versuch II mit etwas längerer Kultivierungsdauer (s. Kapitel 3.3.2.3) erreicht. Die Selektivität war mit 93,8 % etwas niedriger als die nach der gleichen Fermentationsdauer festgestellten 94,7 % Citronensäure in der Fed-Batch Kultivierung.

Die volumetrische Produktivität der gesamten Fermentation lag bei $0,84 \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ und war damit um $0,5 \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ höher als bei dem Fed-Batch Versuch II. Auch die Produktivität, die zur 72. Stunde festgestellt wurde ($P_{\text{CS}} = 1,431 \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{h})$), war höher als im Falle der ersten Zyklen der Repeated Fed-Batch Kultivierungen. Die biomassespezifische Produktbildungsrate erreichte mit $0,059 \text{ h}^{-1}$ zur 72. Stunde und $0,037 \text{ h}^{-1}$ am Ende der Fermentation gleiche Werte, wie bei allen (Repeated) Fed-Batch Kultivierungen. Die substratbezogene Ausbeute zur 72. Stunde übertraf mit $0,58 \text{ g}_{\text{CS}}/\text{g}_{\text{GL}}$ die Repeated Fed-Batch Versuche um $0,03$ (Kultivierung mit drei Zyklen) bzw. $0,07 \text{ g}_{\text{CS}}/\text{g}_{\text{GL}}$ (Langzeitversuch). Die Ausbeute am Fermentationsende von $0,56 \text{ g}_{\text{CS}}/\text{g}_{\text{GL}}$ lag wiederum um $0,15 \text{ g}_{\text{CS}}/\text{g}_{\text{GL}}$ niedriger als im Fed-Batch Versuch II.

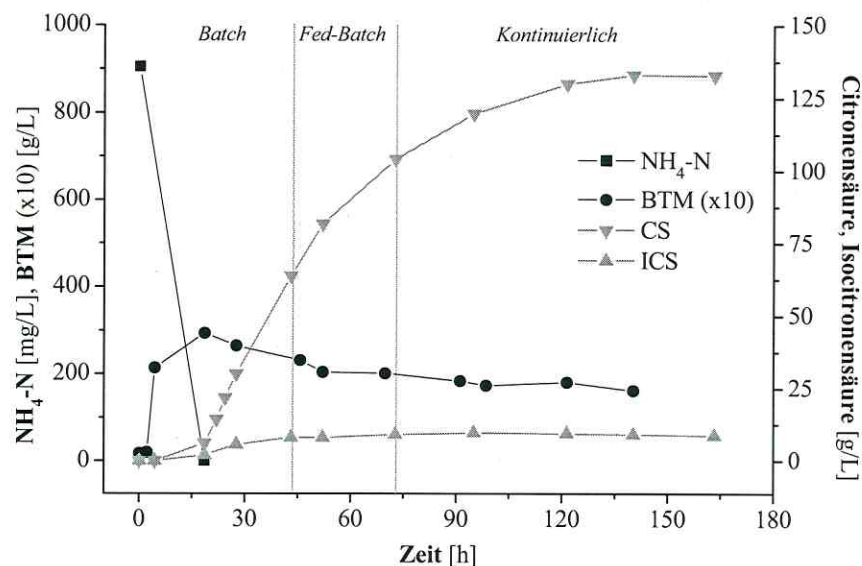


Abbildung 34: Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222 aus Glucosesirup von Südzucker AG: Verlauf der Konzentrationen der Biomasse, Substrate (Glucose und $\text{NH}_4\text{-N}$) und Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure). Bedingungen: pH 6,0; T = 30 °C; $\text{pO}_2 = 50 \%$; $V_0 = 5 \text{ L}$.

Der Glucosebiosensor lieferte Messdaten, die von den offline gemessenen Glucosekonzentrationen eine mittlere Abweichung von $5,8 \text{ g/L}$ Glucose aufwiesen (s. Abbildung 35). Die mit der spektrophotometrischen Methode ermittelten Messwerte unterschieden sich vom Sollwert mit einer mittleren Abweichung von $6,5 \text{ g/L}$ Glucose. Diese Ergebnisse waren schlechter als die in Kapitel 3.3.1. Die prozentuelle Abweichung lag dagegen mit 22% im Bereich der im o.g. Kapitel erreichten Ergebnisse.

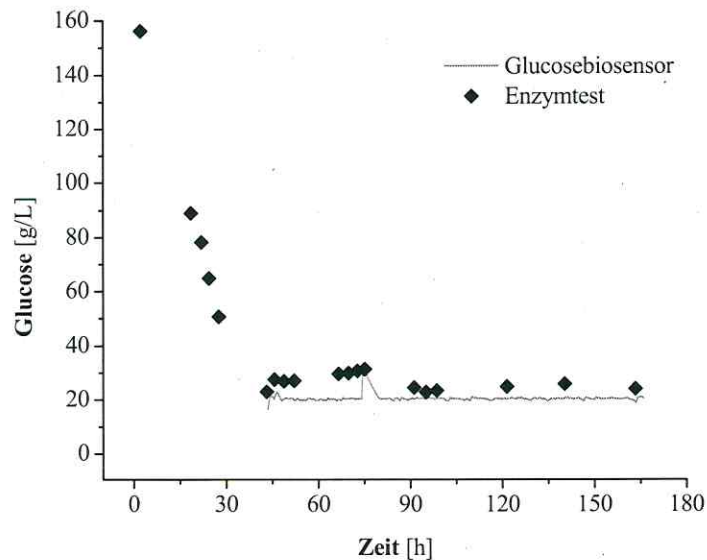


Abbildung 35: Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222 aus Glucosesirup von Südzucker AG: Verlauf der Konzentration von Glucose, gemessen mit Glucosebiosensor und einem Enzymtest.
Bedingungen: pH 6,0; T = 30 °C; pO₂ = 50 %; V₀ = 5 L.

Die Nutzung des Stärkehydrolysates zeigte keinen herausragenden Vorteil gegenüber der Nutzung von Glucosemonohydrat bei der biosensorgestützten Prozessführung. Eine geringfügige Verbesserung der Effektivität des Bioprozesses für die Citronensäureproduktion wurde erreicht.

SHAH ET AL. (1993) untersuchten die Citronensäureproduktion mit *Y. lipolytica* DS-1 aus verschiedenen Kohlenstoffquellen, wie Glucose, Fructose, Hydrol, (invertierte) Saccharose, (invertierte) Zuckerrohrmelassen, Kerosin und Tapiokastärkehydrolysat. Ihren Beobachtungen nach stellte sich das gereinigte Tapiokastärkehydrolysat mit 96 DE (w/w) als das beste Substrat dar, um eine vergleichbare Effizienz der Konversion und einen wirtschaftlichen Vorteil durch Ersatz der teuren Glucose zu erhalten. Unreines Tapiokastärke-Hydrolysat (96 DE w/w) wurde dagegen zusammen mit Fructose, Hydrol und Invertzucker nur als relativ gute Kohlenstoffquelle betrachtet.

3.5 Untersuchung der Substratverwertung beim rekombinanten Stamm *Yarrowia lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5

3.5.1 Untersuchung des Abbaus von Saccharose, Glucose und Fructose in Fermentationen mit Mischsubstratansatz

Die Verwertung von Saccharose, Glucose und Fructose durch die gentechnisch modifizierte Hefe *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 wurde untersucht. Die Monosaccharide Glucose und Fructose entstehen durch die enzymatische Hydrolyse des Disaccharids Saccharose mit Hilfe des von der rekombinanten Hefe produzierten extrazellulären Enzyms Invertase. Zu untersuchen war sowohl die Aufnahme und Verwertung von Glucose und Fructose von den Hefezellen, als auch die Rate der Spaltung der Saccharose, die wiederum die Höhe der Intensität der Invertaseaktivität kennzeichnet. Um den Prozess besser verstehen zu können, wurde eine Versuchsserie konzipiert, in der verschiedene Kombinationen der Substrate vorgelegt wurden. Zur Absicherung der Ergebnisse wurde diese Versuchsreihe wiederholt, allerdings mit anderen Startkonzentrationen der einzelnen Kohlenhydrate. Die Übersicht der Versuche ist in der Tabelle 5 zu finden.

Wenn die beiden Monosaccharide als alleinige Kohlenstoffquelle den Hefezellen vorlagen, wurden sie mit nahezu gleicher Geschwindigkeit abgebaut (Glucose: $S_{GL} = (0,86 \pm 0,17) \text{ g/(L*h)}$; Fructose: $S_{FR} = (1,04 \pm 0,32) \text{ g/(L*h)}$) (s. Abbildung 36A).

Wenn nur Saccharose am Anfang der Fermentation in der Kulturbrühe vorhanden war, wurde diese gleich von Anfang an gespalten (s. Abbildung 36B); die Geschwindigkeit des Abbaus von Saccharose war mit $(1,02 \pm 0,05) \text{ g/(L*h)}$ (Versuch A) bzw. $(0,92 \pm 0,23) \text{ g/(L*h)}$ (Versuch B) im Bereich der Abbauraten der einzelnen Monosaccharide. In den ersten zwanzig Stunden der Fermentationszeit wurden Glucose und Fructose aus der Saccharose-Spaltung von den Hefezellen gleichzeitig aufgenommen und verwertet. Im weiteren Verlauf kam es zur Anreicherung der Fructose in der Kulturlösung, währenddessen nahezu keine Glucose in der Kulturbrühe nachgewiesen wurde; in beiden Versuchen wurde die höchste Glucosekonzentration mit 2,7 g/L (Versuch A) bzw. 2,0 g/L (Versuch B) nach 50 Stunden Fermentationszeit erreicht. Die Fructoseanreicherung in der Kulturlösung erfolgte solange, bis die Saccharosekonzentration einen gewissen Wert unterschritten hat (17 g/L im Versuch A und 10 g/L im Versuch B). Zu diesem Zeitpunkt erreichte die Fructosekonzentration ihr Maximum, das von der Saccharoseanfangskonzentration abhing: im Versuch A (100 g/L Saccharose) wurden 31,6 g/L Fructose angereichert, im Versuch B (70 g/L Saccharose) wurden 18,4 g/L Fructose in der Lösung nachgewiesen. Die Geschwindigkeit der

Fructoseanreicherung war in beiden Versuchen ungefähr gleich (Versuch A: 0,72 g/(L*h) und Versuch B: 0,66 g/(L*h)). Bis zum vollständigen Abbau von Saccharose wurden beide Monosaccharide gleichzeitig verwertet. Danach kam es zur Beschleunigung der Fructoseabbaurate, da keine Glucose mehr geliefert werden konnte. So stieg z. B. im Versuch B die Geschwindigkeit der Fructoseaufnahme von 0,37 g/(L*h) (zum Zeitpunkt als noch 1 g/L Saccharose in Lösung war) auf 0,70 g/(L*h) am Ende der Fermentation an.

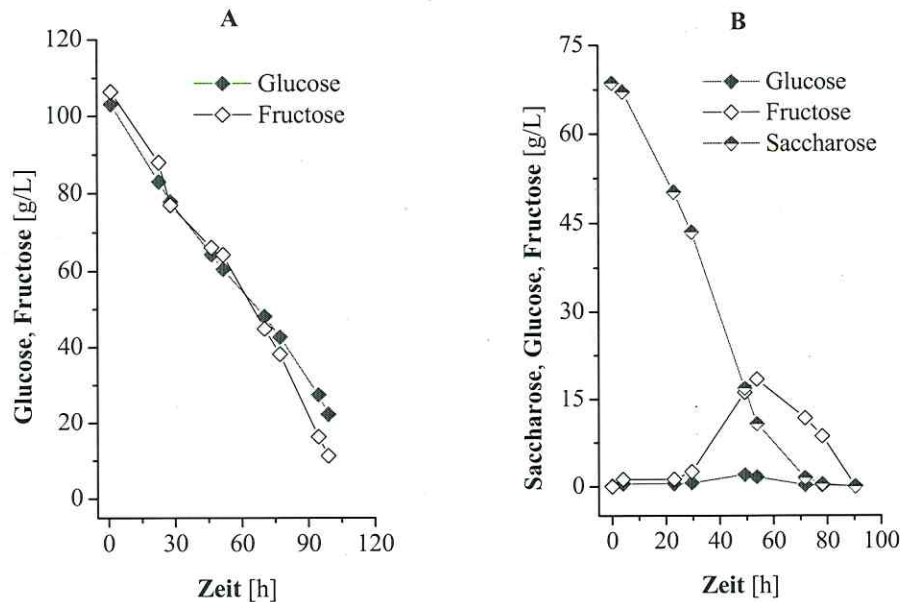


Abbildung 36: Verlauf der Konzentrationen von Glucose, Fructose und Saccharose in Batch Kultivierungen mit Glucose (Versuch A) bzw. Fructose (Versuch B) (A) bzw. Saccharose (Versuch D) (B) als alleiniger Kohlenstoffquelle.
Bedingungen: pH 6,0; T = 30 °C; 130 rpm; V₀ = 100 mL.

BIZUKOJC & LEDAKOWICZ (2004) untersuchten die Spaltung von Saccharose und die Verwertung von Glucose und Fructose bei *A. niger* BIO4F. Auch dieser Mikroorganismus nimmt die beiden Monosaccharide nicht mit gleicher Geschwindigkeit auf – Glucose wird ähnlich wie bei *Y. lipolytica* vor Fructose bevorzugt aufgenommen. Der Unterschied in der Aufnahme der beiden Zucker ist in diesem Fall aber nicht so ausgeprägt wie bei der Hefe. Die Fructoseverwertung wurde allerdings bei *A. niger* durch erhöhte Citronensäurekonzentrationen im Medium von 30-45 g/L gehemmt. Die Autoren gehen davon aus, dass dieses Phänomen mit der Interferenz der Citronensäure mit dem Fructosetransportsystem zusammenhängt. Dieser Effekt wurde bei *Y. lipolytica* nicht beobachtet.

Die Erklärung für die unterschiedliche Geschwindigkeit der Verwertung von Glucose und Fructose kann auch auf der Ebene der Glykolyse gesucht werden. STEINBÖCK ET AL. (1994)

isolierten das glucosephosphorylierende Enzym Hexokinase aus *A. niger* ATCC 11414 und untersuchten seine Eigenschaften. Dieses konstitutive Enzym zeigte eine tausendfach höhere Affinität zu Glucose als zu Fructose. Ihre höchste Aktivität erreichte diese Hexokinase beim Wachstum von *A. niger* im Medium mit hohen Konzentrationen von Glucose oder Saccharose.

Anders sieht die Situation aus, wenn in der Kulturlösung außer Saccharose noch ein anderes Kohlenhydrat vorhanden ist. Wenn Glucose in gleicher Menge wie Saccharose vorgelegt wurde, fiel die Phase der gemeinsamen Verwertung von Glucose und Fructose aus und Fructose wurde von Anfang an in der Lösung angereichert (s. Abbildung 37A). Die Utilisierung von Fructose begann erst dann, wenn die Saccharosekonzentration auf 6 g/L abgesunken war. Im Maximum wurden 25 g/L Fructose (Versuch E mit 50 g/L Saccharose und 55 g/L Glucose) bzw. 16,9 g/L Fructose (Versuch F mit 35 g/L Saccharose und 35 g/L Glucose) in der Lösung nachgewiesen. Dies zeigt, dass bis zu diesem Zeitpunkt keine Fructose utlisiert wurde, denn aus 50 g/L Saccharose (Versuch E) entstehen stöchiometrisch berechnet 25 g/L Fructose, die in der Kulturbrühe wiedergefunden wurden. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich noch 10 g/L Glucose im Versuch E bzw. 5 g/L Glucose im Versuch F in der Kulturlösung. Der Abbau von Glucose und Saccharose lief im Versuch mit höheren Substratkonzentrationen schneller, als im Versuch mit weniger Substrat ($S_{GL} = (0,61 \pm 0,28) \text{ g/(L*h)}$ (Versuch E) bzw. $(0,51 \pm 0,11) \text{ g/(L*h)}$ (Versuch F) und $S_{SA} = (0,53 \pm 0,23) \text{ g/(L*h)}$ (Versuch E) bzw. $(0,34 \pm 0,18) \text{ g/(L*h)}$ (Versuch F)). Auch die Anreicherung von Fructose erfolgte im Versuch E mit höherer Geschwindigkeit als im Versuch F ($P_{FR} = (0,42 \pm 0,19) \text{ g/(L*h)}$ vs. $(0,28 \pm 0,08) \text{ g/(L*h)}$).

Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Saccharose und Fructose im Kulturanatz wurde Fructose von Anfang an verwertet (s. Abbildung 37B). Im Laufe des Versuchs mit niedrigeren Anfangskonzentrationen der Substrate (Versuch H mit 35 g/L Saccharose und 35 g/L Fructose) wurde Fructose mit nahezu gleicher Geschwindigkeit abgebaut ($S_{FR} = (0,45 \pm 0,18) \text{ g/(L*h)}$). Im Versuch G (50 g/L Saccharose und 70 g/L Fructose) wurde Fructose vorerst langsam verwertet ($S_{FR} = (0,20 \pm 0,11) \text{ g/(L*h)}$), bis die Saccharosekonzentration 7 g/L erreicht hatte und danach stieg die Abbaurate bis auf 2,2 g/(L*h) stark an. Saccharose wurde in beiden Versuchen gleich schnell gespalten ($S_{SA} = (0,44 \pm 0,19) \text{ g/(L*h)}$ im Versuch G und $(0,45 \pm 0,13) \text{ g/(L*h)}$ im Versuch H). Die Glucose wurde im Laufe beider Versuche G und H immer vollständig verwertet, sodass keine Glucose in den Kulturlösungen nachgewiesen wurde.

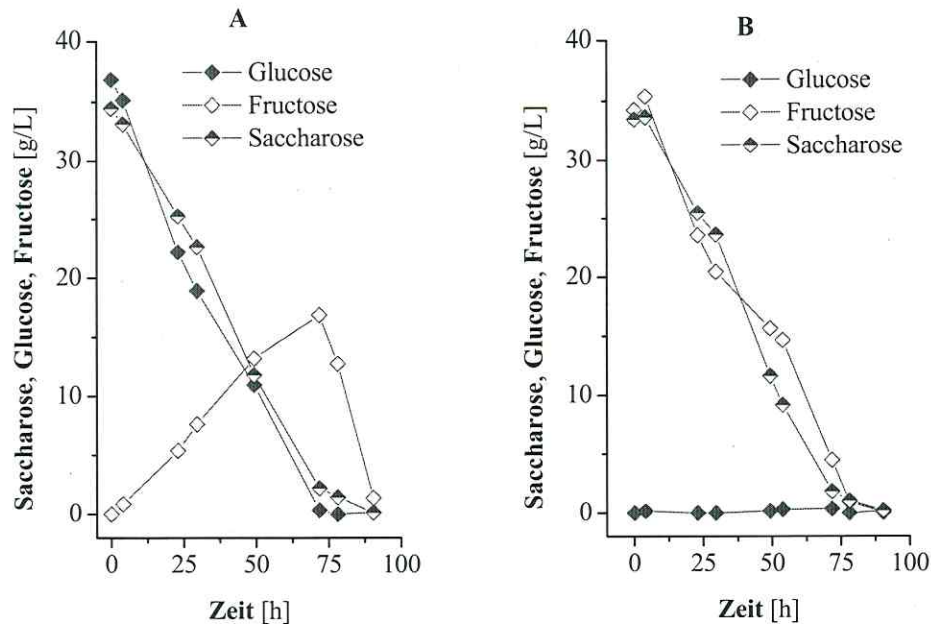


Abbildung 37: Verlauf der Konzentrationen von Glucose, Fructose und Saccharose in Batch Kultivierungen unter Verwendung von Saccharose und Glucose (Versuch F) (A) bzw. Saccharose und Fructose (Versuch H) (B) als Mischsubstratansätze.
Bedingungen: pH 6,0; T = 30 °C; 130 rpm; V₀ = 100 mL.

Befinden sich im Medium alle drei Kohlenhydrate in gleicher Menge am Anfang der Fermentation, verhält sich das System ähnlich, wie im Falle der Anwesenheit von nur Saccharose und Glucose als Mischsubstrat. Während Glucose von Anfang an genutzt wurde, wurde Fructose zunächst in der Kulturlösung angereichert (s. Abbildung 38). Erst nachdem die Glucosekonzentration unter 3 g/L sank, begann der Fructoseabbau. Die maximale Fructosekonzentration im Versuch J (jeweils 23 g/L von Saccharose, Glucose und Fructose) lag bei 29,3 g/L. Aus der Differenz zur Fructose im Ansatz (22,9 g/L) geht hervor, dass 6,4 g/L Fructose angereichert wurden. Aus 23 g/L Saccharose entstehen stöchiometrisch 11,5 g/L Fructose. Dies zeigt, dass ca. 5,1 g/L Fructose bereits am Anfang genutzt wurden. Anders ist die Situation im Versuch mit höheren Anfangskonzentrationen der Kohlenstoffe (Versuch I – jeweils 33 g/L von Saccharose, Glucose und Fructose), wo die gesamte Menge an Fructose, die durch die Spaltung der Saccharose entstanden ist, in der Lösung vorerst ungenutzt blieb.

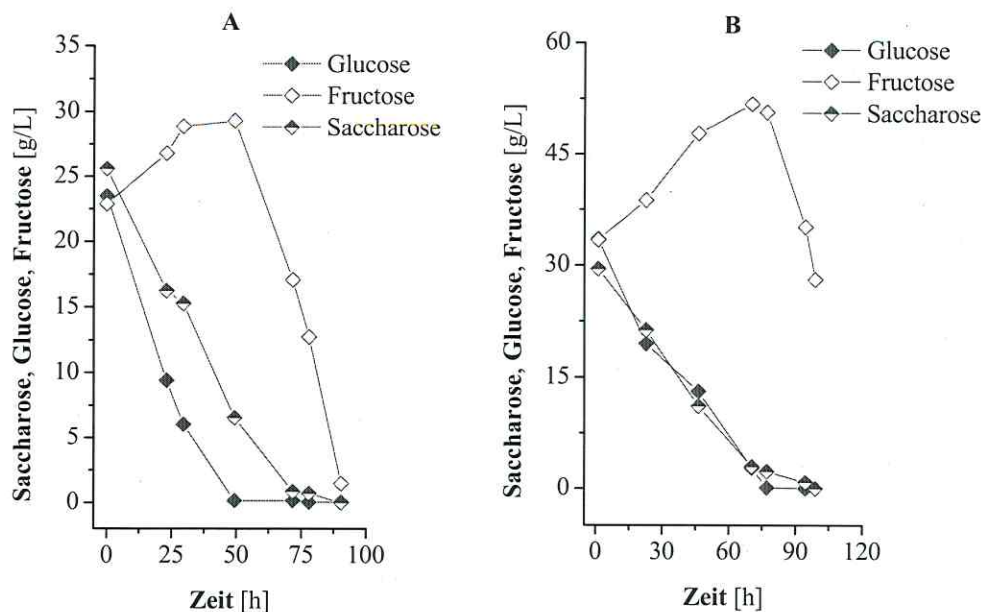


Abbildung 38: Verlauf der Konzentrationen von Glucose, Fructose und Saccharose in Batch Kultivierungen unter Verwendung von Saccharose, Glucose und Fructose mit der Konzentration von je 23 g/L (Versuch J) (A) bzw. je 33 g/L (Versuch I) (B) als Mischsubstratansätze.
Bedingungen: pH 6,0; T = 30 °C; 130 rpm; V₀ = 100 mL.

Aus den Ergebnissen ist zu schlussfolgern, dass es sich hier um keine echte Diauxie handelt, da es teilweise zur gleichzeitigen Verwertung von Glucose und Fructose kommt. Die Limitation des Fructoseabbaus durch höhere Glucosekonzentration scheint auf dem Niveau der Substrataufnahme durch die Zellmembran zu wirken.

Erste Untersuchungen zur gleichzeitigen Verwertung von Glucose und Fructose von *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 führten FÖRSTER ET AL. (2007) durch. Im Versuch mit 40 g/L Glucose und 40 g/L Fructose als Mischsubstrat stellten sie fest, dass die Fructoseverwertung erst nach dem Absinken der Glucosekonzentration auf 5-10 g/L anfang. Die Autoren vermuten, dass bei hoher Invertaseexpression die Verwertung der akkumulierten Fructose für den Prozess der Citronensäureproduktion aus Saccharose geschwindigkeitslimitierend werden kann.

3.5.2 Einfluss der Fructoseanfangskonzentration auf die Glucoseverwertung

Aus den Versuchen G und H im Kapitel 3.5.1, in denen Saccharose und Fructose als Mischsubstrat verwendet wurden, ging hervor, dass die Anwesenheit von Fructose die Anreicherung von Glucose bremst. Dies ist eine wichtige Erkenntnis für die Nutzung des Saccharosebiosensors, da angereicherte Glucose eine Verfälschung der Messdaten verursacht.

Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Fructose in verschiedenen Konzentrationen im Kulturansatz auf die Anreicherung von Glucose in der Kulturbrühe im Laufe der Fermentation näher untersucht. Hierfür wurde eine Versuchsserie in Schüttelkolben mit 50 g/L Saccharose- und unterschiedlichen Fructoseanfangskonzentrationen durchgeführt.

Wie bereits in Kapitel 3.5.1 beschrieben (s. Abbildung 37B), wurde auch in diesen Versuchen Fructose von Anfang an vollkommen verwertet. Im Versuch mit 5 g/L Fructoseanfangskonzentration wurde Fructose innerhalb der ersten 25 Stunden Kultivierungszeit ausgezehrt, im weiteren Verlauf konnte jedoch wieder ein Anstieg der Fructosekonzentration bis zu 2,8 g/L festgestellt werden (s. Abbildung 39A). Nachdem die Saccharosekonzentration unter 7 g/L gesunken war, wurde auch Fructose wieder aufgenommen. Auch in Versuchen mit höheren Fructoseanfangskonzentrationen als 5 g/L wurde eine ähnliche Tendenz beobachtet (als Beispiel s. Abbildung 39B). In den ersten 31 Stunden wurde Fructose relativ schnell abgebaut ($S_{FR} = 0,32 \text{ g/(L*h)}$ bei 25 g/L Fructose, $0,41 \text{ g/(L*h)}$ bei 50 g/L Fructose und $0,53 \text{ g/(L*h)}$ bei 85 g/L Fructose). Danach verlangsamte sich die Fructoseaufnahme für einige Zeit. Nachdem die Saccharosekonzentration 13 g/L (bei 85 g/L Fructose) bis 17,6 g/L (bei 50 g/L Fructose) erreichte, beschleunigte sich die Fructoseverwertung und die Fructoseabbaurate erreichte in dieser Phase ihre höchsten Werte ($S_{FR,max} = 0,44 \text{ g/(L*h)}$ bei 25 g/L Fructose, $0,70 \text{ g/(L*h)}$ bei 50 g/L Fructose und $0,82 \text{ g/(L*h)}$ bei 85 g/L Fructose).

Die Saccharose wurde am schnellsten im Versuch mit 5 g/L abgebaut ($S_{SA} = (0,60 \pm 0,14) \text{ g/(L*h)}$). In den übrigen Versuchen erreichte die Saccharoseabbaurate ähnliche Werte zwischen $(0,38 \pm 0,13) \text{ g/(L*h)}$ (bei 85 g/L Fructose) und $(0,44 \pm 0,16) \text{ g/(L*h)}$ (bei 50 g/L Fructose).

Die Glucose wurde in allen Fermentationen nach der Spaltung von Saccharose gleich verwertet und nicht angereichert.

In dieser Versuchsserie wurde die vorherige Erkenntnis bestätigt, dass das Vorhandensein von Fructose am Anfang der Fermentation einer Glucoseanreicherung vorbeugt. Die Höhe der Fructoseanfangskonzentration hatte dabei keinen Einfluss, bereits die niedrige Fructosekonzentration von 5 g/L bremste die Anreicherung von Glucose in der Kulturflüssigkeit.

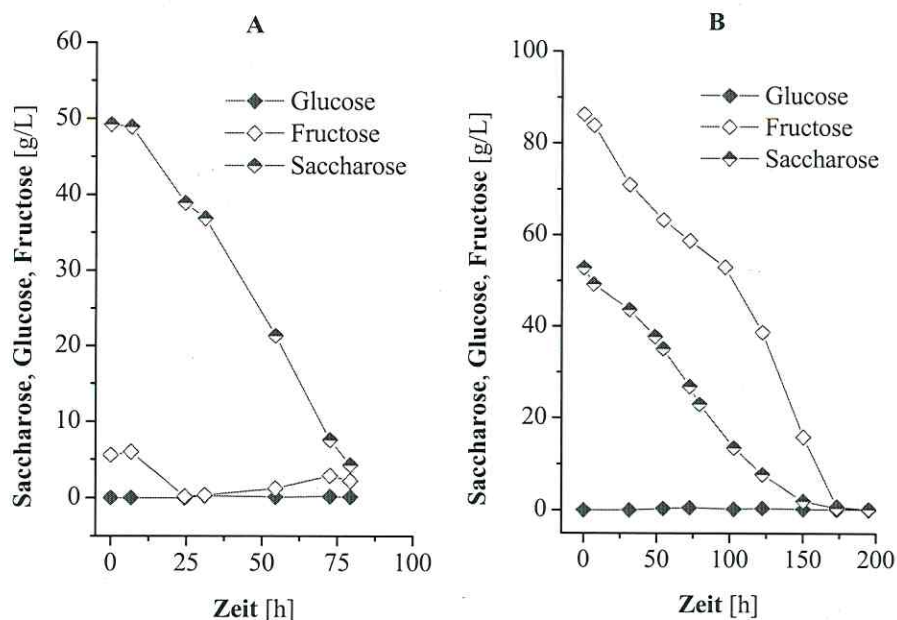


Abbildung 39: Verlauf der Konzentrationen von Glucose, Fructose und Saccharose in Batch Kultivierungen unter Verwendung von 50 g/L Saccharose und 5 g/L (A) bzw. 85 g/L (B) Fructose als Mischsubstratansätze. Bedingungen: pH 6,0; T = 30 °C; 130 rpm; V₀ = 100 mL.

3.6 Optimierung des Bioprozesses mit dem rekombinanten Stamm *Yarrowia lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 und Saccharose als Substrat

3.6.1 Einfluss des pH-Wertes auf den Bioprozess

Die höchste Induktion des XPR2-Promotors im gentechnisch modifizierten Hefestamm findet bei Anwesenheit von Proteosepepton im Medium statt; seine Derepression beginnt bei pH-Werten von höher als 5,5 – 6,0 (OGRYDZIAK ET AL. 1977 und MADZAK ET AL. 1999 in FÖRSTER ET AL. 2007). FÖRSTER ET AL. (2007) untersuchten den Bioprozess der Citronensäureherstellung bei *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 aus Saccharose bei unterschiedlichen pH-Werten der Idiophase (pH (Wachstumsphase) = 6,8; pH (Produktbildungsphase) = 5,0; 6,0 oder 6,8). Die Autoren stellten fest, dass bei diesem Stamm die Derepression des XPR2-Promotors bei pH 6,0 - 6,8 für die Unterstützung des Wachstums auf Saccharose ausreichend ist. Sowohl die Invertaseaktivität als auch die Citronensäureproduktion erreichten bei pH 6,8 die höchsten Werte. In den o. g. Versuchen wurde allerdings 0,4 g/L Proteosepepton zugegeben. In Hinsicht auf den hohen Beschaffungspreis von Proteosepepton (420 €/kg bei Merck KGaA Darmstadt) wurde eine Serie von drei Fermentationen im Multibioreaktorsystem Multifors durchgeführt, um die

Notwendigkeit der Anwendung dieses Stoffes zu überprüfen. Die ersten zwei Kultivierungen liefen bei pH 6,0; sie unterschieden sich in der Anwesenheit von Proteosepepton. Das Medium für die dritte Fermentation beinhaltete kein Proteosepepton und der pH-Wert wurde bei 7,0 konstant gehalten. Die kinetischen Parameter dieser drei Versuche sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 20: Parameter der Produktbildung in Versuchen zur Ermittlung des Einflusses des pH-Wertes sowie der Anwesenheit von Proteosepepton für den Bioprozess zur Citronensäureproduktion aus Saccharose mit *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5.

pH	$\mu_{\max}$ [h ⁻¹]	c_{CS} [g/L]	c_{ICS} [g/L]	S_{CS} [%]	$Y_{CS/GL}$ [g/g]	P_{CS} [g/(L h)]	$P_{CS,max}$ [g/(L*h)]	p_{CS} [h ⁻¹]	$p_{CS,max}$ [h ⁻¹]
6,0 (mit Pepton)	0,13	59,1	1,70	96,7	0,47	0,80	1,53	0,05	0,10
6,0 (ohne Pepton)	0,13	55,5	1,71	97,0	0,43	0,75	1,63	0,04	0,09
7,0 (ohne Pepton)	0,14	70,4	3,76	94,9	0,55	0,96	2,09	0,06	0,12

Bedingungen: T = 30 °C; pO₂ = 50 %; V₀ = 700 mL; 1000 rpm.

Die Biomasse erreichte in allen Versuchen zum Zeitpunkt der Stickstoffauszehrung 12 g/L; am Ende der Produktbildungsphase lagen die Biomassekonzentrationen zwischen 16,4 g/L im Versuch bei pH 6,0 mit Proteosepepton und 18 g/L im Versuch mit pH 6,0 ohne Peptonzugabe. Allerdings war im zeitlichen Verlauf des gelösten Sauerstoffs pO₂ im Versuch bei pH 7,0 eine deutlich längere lag-Phase zu verzeichnen als in beiden Versuchen bei pH 6,0.

Sowohl die Citronensäureendkonzentration als auch alle kinetischen Parameter der Produktbildung erreichten beim pH 7,0 ohne Zugabe von Proteosepepton ihr Maximum ($c_{CS} = 70$ g/L, $Y_{CS/GL} = 0,55$ g/g, $P_{CS} = 0,96$ g/(L*h)) (s. Tabelle 20). Die schlechtesten Ergebnisse hinsichtlich der Citronensäurebildung wurden bei der Kultivierung bei pH 6,0 ohne Zugabe von Proteosepepton festgestellt ($c_{CS} = 56$ g/L, $Y_{CS/GL} = 0,43$ g/g, $P_{CS} = 0,75$ g/(L*h)).

Die Saccharose wurde in allen Versuchen ähnlich schnell gespalten, die Saccharoseabbaurate erreichte Werte zwischen $(3,49 \pm 0,92)$ g/(L*h) bei pH 6,0 ohne Zugabe von Proteosepepton und $(4,31 \pm 0,85)$ g/(L*h) bei pH 6,0 mit Peptonzugabe. Die Saccharose wurde in allen Versuchen innerhalb von 50 Stunden vollständig abgebaut. Es kam zur Anreicherung sowohl von Glucose als auch Fructose bei allen pH-Werten. Die Glucosekonzentration erreichte maximal 6 g/L in beiden Versuchen mit pH 6,0 und maximal 3 g/L im Versuch mit pH 7,0. Die höchste Fructosekonzentration wurde im Versuch mit pH 6,0 mit Peptonzugabe erreicht

($c_{FR} = 46 \text{ g/L}$), am wenigsten wurde Fructose im Versuch mit pH 6,0 ohne Zugabe von Proteosepepton angereichert ($c_{FR} = 26,5 \text{ g/L}$).

Anhand der in Tabelle 20 präsentierten Ergebnisse wurde pH 7,0 als Optimum für die Citronensäureherstellung aus Saccharose mit rekombinanter *Y. lipolytica* ermittelt. Es wurde nachgewiesen, dass bei pH 7,0 keine Zugabe von Proteosepepton für die Invertaseexpression notwendig ist.

3.6.2 Substrathemmung

Um den substrathemmenden Einfluss von Saccharose auf den Bioprozess der Citronensäureherstellung aus Saccharose mit der rekombinanten *Y. lipolytica* zu untersuchen, wurde eine Versuchsserie mit Startkonzentrationen von Saccharose zwischen 100 und 300 g/L in Schüttelkolben konzipiert.

Sowohl die maximale spezifische Wachstumsrate als auch die zum Zeitpunkt der Stickstoffauszehrung gemessene Biomasse waren bei 150 g/L Saccharose am höchsten ($\mu_{max} = 0,09 \text{ h}^{-1}$, BTM = 8,7 g/L) (s. Tabelle 21), während bei 100 g/L diese Parameter nur geringfügig niedriger lagen ($\mu_{max} = 0,08 \text{ h}^{-1}$, BTM = 8,0 g/L). Beim Erhöhen der Saccharosekonzentration sanken die Werte dieser Größen linear (μ_{max} : $R^2 = 0,999$; BTM: $R^2 = 0,965$) bis zu $\mu_{max} = 0,07 \text{ h}^{-1}$ und BTM = 5,1 g/L bei 300 g/L Saccharose.

Tabelle 21: Substrathemmung - Parameter des Bioprozesses zur Produktion von Citronensäure aus Saccharose mit *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5.

Saccharose [g/L]	μ_{max} [h ⁻¹]	BTM _{N=0} [g/L]	CS nach 93,5 h [g/L]	CS Endkonzentration [g/L]	P _{CS,max} [g/(L*h)]
100	0,084	7,98	31,0	30,2	0,66
150	0,089	8,72	18,4	65,2	0,63
200	0,081	7,54	18,3	102,7	0,60
250	0,072	6,19	8,74	129,9	0,49
300	0,069	5,09	7,86	224,2	0,50

Bedingungen: pH 6,0; T = 30 °C; 140 rpm; V₀ = 100 mL.

Der Einfluss verschiedener Startkonzentrationen von Saccharose auf die Produktbildung ist in Abbildung 40 verdeutlicht. Die Citronensäure wurde bei 100 g/L Saccharose am schnellsten produziert (P_{CS,max} = 0,7 g/(L*h)) und nach 93,5 Stunden Fermentationsdauer (Zeitpunkt der Auszehrung der Saccharose in diesem Versuch) waren 31 g/L Citronensäure entstanden (s. Tabelle 21). Bei 150 g/L und 200 g/L Saccharose war die Kinetik der Citronensäurebildung nahezu gleich (P_{CS,max} = 0,6 g/(L*h)) und nach 93,5 Stunden wurden in

diesen beiden Fermentationen je 18 g/L Citronensäure produziert. Auffallende Parallelen zeigten jeweils die Verläufe der Citronensäurebildung bei 150 g/L und 200 g/L Saccharose sowie die bei 250 g/L und 300 g/L Saccharoseanfangskonzentration. Auch hier wurde Citronensäure mit gleicher Geschwindigkeit produziert ($P_{CS,max} = 0,5 \text{ g/(L*h)}$) und nach 93,5 Stunden wurde in beiden Ansätzen 8-9 g/L Citronensäure in der Kulturlösung nachgewiesen.

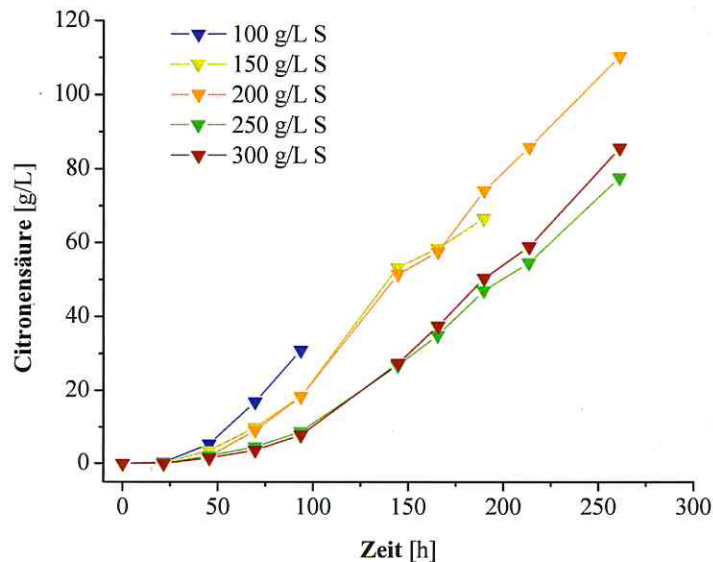


Abbildung 40: Substrathemmung: Verlauf der Konzentration von Citronensäure in Batch Kultivierungen unter Verwendung von verschiedenen Saccharosestartkonzentrationen.
Bedingungen: pH 6,0; T = 30 °C; 140 rpm; $V_0 = 100 \text{ mL}$.

Wie es bei Glucose der Fall war (s. Kapitel 3.2.4), wurde auch im Falle von Saccharose eine Substrathemmung festgestellt, allerdings erst bei höheren Konzentrationen als bei Glucose. Eine deutliche Substratinhibierung des Wachstums wurde erst bei 250 g/L Saccharose nachgewiesen (s. Tabelle 21). Mit steigender Saccharosekonzentration wurde stufenweise auch die Citronensäureproduktion beeinträchtigt. Zunächst verursachte der Schritt von 100 g/L auf 150 g/L Saccharose eine Verlangsamung der Produktbildung, die weitere deutliche Abnahme der Produktivität fand zwischen 200 und 250 g/L Saccharose statt (s. Abbildung 40).

3.6.3 Langzeitstabilität des rekombinanten Stammes

Für die technologische Nutzung des gentechnisch modifizierten Hefestammes *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 ist es notwendig, seine Stabilität in Langzeitkultivierungen zu überprüfen. Hierfür wurde eine Versuchsserie in Schüttelkolben im Repeated Batch Modus durchgeführt (Übersicht s. Tabelle 6). Die Stabilität des

rekombinanten Stammes wurde bei unterschiedlichen Bedingungen untersucht. Zwei Kultivierungen wurden mit Saccharose als Substrat angesetzt - einmal mit Zugabe von Proteosepepton bei pH 6,0 (Versuch I) und einmal ohne Zugabe von Proteosepepton bei pH 7,0 (Versuch II). Außerdem wurde eine Kultivierung mit Glucose als Substrat mit dem rekombinanten Hefestamm durchgeführt (Versuch III). Weiterhin wurde eine Repeated Batch Fermentation mit dem Wildtypstamm *Y. lipolytica* H222 auf Glucose angesetzt (Versuch IV), um die Eigenschaften der beiden Stämme zu vergleichen. Die Kultivierungen I, II und III hatten eine gemeinsame Vorkultur. Um die Ergebnisse zu sichern, wurden alle Kultivierungen in den ersten vier Zyklen in doppelten Ausführungen durchgeführt. Aufgrund des hohen Maßes an Ähnlichkeit der jeweiligen Doppelansätze wurde die Anzahl der Versuchsansätze in den letzten sechs Zyklen auf eine Kultivierung pro Versuch reduziert. Im zweiten, vierten und sechsten Zyklus wurden bei allen Ansätzen schmalere Schüttelkolben genutzt als in den restlichen Zyklen. Dies hatte aufgrund des schlechteren Sauerstoffeintrages einen negativen Einfluss sowohl auf das Zellwachstum als auch auf die Produktbildung. Aus diesem Grund werden für die Stabilitätsbewertung nur Zyklen in Betracht gezogen, in denen breite Schüttelkolben genutzt worden waren. Die Parameter der einzelnen Kultivierungen sind in Tabellen 22 bis 25 zusammengefasst.

Die Biomassebildung erfolgte in allen Fermentationen gleich, die erreichten Biotrockenmassekonzentrationen unterschieden sich zwischen den einzelnen Ansätzen minimal. Die erzielten Biomassen in den einzelnen Zyklen einer jeden Kultivierung fluktuieren um einen Wert (z. B. beim Wildtypstamm auf Glucose erreichte die Biomassekonzentration einen Mittelwert von $14,3 \pm 2,1$ g/L). Lediglich im Versuch II wurde eine Absenkung der erreichten Biomasse im letzten Zyklus auf 5,8 g/L beobachtet (s. Tabelle 23).

Die Endkonzentrationen der Citronensäure in ausgewählten Zyklen der einzelnen Versuche sind in Abbildung 41 dargestellt. Die Tendenz der erreichten Citronensäurekonzentrationen war in den meisten Versuchen ähnlich. Abweichend verhielt sich lediglich die Entwicklung der Citronensäureendkonzentration im Versuch II. In dieser Fermentation kam es ab dem sechsten Zyklus zur starken Abnahme der Citronensäureproduktion, im zehnten Zyklus wurde dann keine Citronensäure mehr in der Kulturflüssigkeit nachgewiesen (s. Tabelle 23). Die höchsten Citronensäurekonzentrationen wurden in fast allen Versuchen im fünften Zyklus erreicht. Im Versuch III wurde die meiste Citronensäure im 3. Zyklus gebildet (s. Tabelle 24), wobei der Unterschied in den erreichten Citronensäurekonzentrationen zwischen dem dritten und fünften Zyklus weniger als 1 g/L Citronensäure war. Die wenigste Citronensäure wurde

in den Versuchen I, III und IV im ersten Zyklus gebildet. Dies war durch die lag-Phase in diesem Zyklus verursacht.

Bemerkenswert ist die außerordentliche Empfindlichkeit des rekombinanten Stammes, wachsend auf Saccharose ohne Zugabe von Proteosepepton, auf eine Sauerstoffunterversorgung. In dieser Kultivierung wurden die größten Unterschiede zwischen den Citronensäureendkonzentrationen in den Zyklen, die in schmalen Schüttelkolben durchgeführt wurden, und Zyklen, in welchen breite Schüttelkolben eingesetzt wurden, festgestellt (bis zu 46,6 g/L weniger Citronensäure wurde im sechsten Zyklus im Vergleich zum fünften Zyklus gebildet).

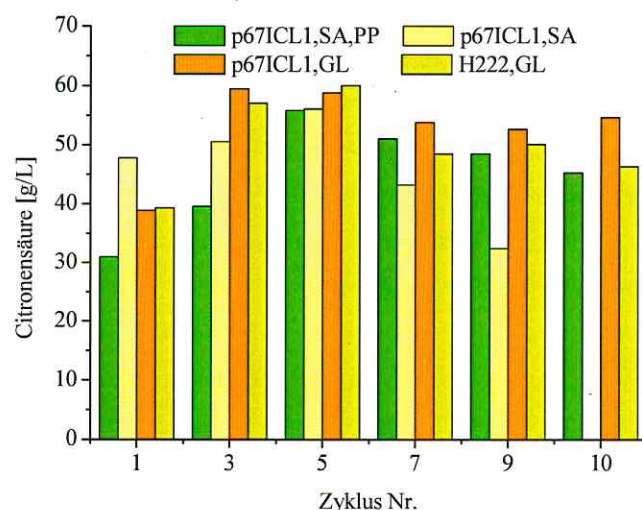


Abbildung 41: Langzeitstabilität der Hefe *Y. lipolytica* für die Citronensäureproduktion. Citronensäureendkonzentrationen in ausgewählten Zyklen der Repeated Batch Kultivierungen von *Y. lipolytica* H222 bzw. *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 aus Glucose (GL) bzw. Saccharose (SA) mit (PP) oder ohne Zugabe von Proteosepepton. Bedingungen: pH 6,0 (bei GVO, SA, PP; GVO, GL und WTS, GL) bzw. 7,0 (bei GVO, SA); T = 30 °C; 140 rpm; V₀ = 100 mL.

Mit dieser Versuchsserie wurde nachgewiesen, dass sowohl der Wildtypstamm *Y. lipolytica* H222 als auch seine rekombinante Form *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 unter optimalen Bedingungen (d. h. auch mit Zugabe von Proteosepepton für das Wachstum auf Saccharose) in der Lage sind Citronensäure in langen Kultivierungszeiten von 957 Stunden in Schüttelkolben zu produzieren. Im Versuch IV mit *Y. lipolytica* H222 wurden aus Glucose durchschnittlich $(49,3 \pm 7,29)$ g/L Citronensäure gebildet. Die rekombinante *Y. lipolytica* produzierte aus Glucose $(53,4 \pm 6,88)$ g/L Citronensäure und aus Saccharose mit Zugabe von Proteosepepton $(43,6 \pm 9,20)$ g/L Citronensäure, bzw. ohne Peptonzugabe

($38,1 \pm 18,6$) g/L Citronensäure. Die Streuung der Werte, auf die die Standardabweichung hinweist, ist in den Versuchen I, III und IV zufriedenstellend. Die besten Ergebnisse im Hinblick auf die Produktbildung wurden im Versuch III (rekombinante *Y. lipolytica* mit Glucose als Substrat) erreicht. In dieser Kultivierung wurde nicht nur der höchste Mittelwert der Citronensäurekonzentration erreicht (s. o.), sondern auch die beste Selektivität des Bioprozesses für Citronensäure ($S_{CS} = (97,6 \pm 0,35) \%$) sowie die höchste mittlere volumetrische Produktivität ($P_{CS} = (0,52 \pm 0,06) \text{ g/(L}\cdot\text{h)}$) und die höchste substratbezogene Ausbeute ($Y_{CS/GL} = (0,56 \pm 0,05) \text{ g/g}$). Dieses Ergebnis zeigt, dass in diesem Versuchsansatz alle vorteilhaften Faktoren zusammengefasst sind. Zum einen ermöglicht die genetische Modifizierung höhere Selektivitäten und zum anderen werden höhere Erträge an Citronensäure durch die Nutzung von Glucose als natürliches Substrat der Hefe erzielt, da die Hefe in diesem Fall keine Energie für die Invertasebildung investieren muss.

Der deutliche Unterschied in der Selektivität im Versuch IV unter Nutzung des Wildtypstamms und Glucose als Substrat ($S_{CS} = (90,7 \pm 1,69) \%$) im Vergleich zu den Kultivierungen mit rekombinanter Hefe, in welchen die Selektivitäten nie 95 % Citronensäure unterschritten haben, zeigt, dass die genetische Modifizierung für die Selektivität der Citronensäurebildung von großer Bedeutung ist.

Vergleicht man die Verläufe des Versuchs IV mit der Langzeitkultivierung im halbertechnischen Maßstab (s. Kapitel 3.3.2.4), findet man viele Merkmale wieder. Die Citronensäureendkonzentration hatte in beiden Versuchen einen ähnlichen Trend; die Werte der Endkonzentrationen von Citronensäure bewegten sich in beiden Kultivierungen um den Mittelwert mit der Standardabweichung von 7,3 g/L (im Versuch IV) bzw. 7,6 g/L. In den letzten Zyklen der beiden Kultivierungen konnte anhand der Citronensäureendkonzentrationen keine Abnahme der Aktivität der Hefezellen zur Citronensäurebildung beobachtet werden. Auch die substratbezogenen Ausbeuten und die volumetrischen Produktivitäten zeigten einen gleichen Trend in beiden Langzeitversuchen (Tabelle 18 vs. Tabelle 25). Lediglich die Absenkung der Selektivität und die Erhöhung der Biotrockenmasse mit steigender Zykluszahl während der Kultivierung im Bioreaktor (s. Abbildung 32) wurden in den Schüttelkolben nicht bestätigt.

Repeated Batch Kultivierung in Schüttelkolben mit immobilisierter *Y. lipolytica* A-101 führten auch RYMOWICZ ET AL. (1993) durch. Die höchste erreichte Citronensäurekonzentration lag in ihrem Versuch bei 39 g/L, also um 21 g/L Citronensäure niedriger als es im Versuch IV der Fall war.

Tabelle 22: Parameter einzelner Zyklen der Repeated Batch Langzeitkultivierung zur Citronensäureherstellung aus Saccharose mit *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 mit Zugabe von 0,4 g/L Proteosepepton (Versuch I).

Zyklus Nr.	BTM [g/L]	c _{CS} [g/L]	c _{ICS} [g/L]	S _{CS} [%]	Y _{CS/SA} [g/g]	P _{CS} [g/(L*h)]	p _{CS} [h ⁻¹]
1	11,5	31,0	1,21	96,2	0,42	0,33	0,03
2	13,7	27,4	0,75	97,3	0,56	0,29	0,02
3	14,4	39,6	0,95	97,7	0,54	0,42	0,03
4	13,2	21,7	0,84	96,3	0,46	0,18	0,01
5	17,2	55,9	1,56	97,3	0,56	0,55	0,03
6	14,9	23,0	1,09	95,5	0,42	0,25	0,02
7	15,1	51,1	1,40	97,3	0,63	0,51	0,03
8	13,5	33,7	0,99	97,1	0,55	0,30	0,02
9	17,8	48,5	1,32	97,4	0,67	0,48	0,03
10	13,7	45,4	1,23	97,4	0,54	0,42	0,03

Bedingungen: pH 6,0; T = 30 °C; 140 rpm; V₀ = 100 mL.

Tabelle 23: Parameter einzelner Zyklen der Repeated Batch Langzeitkultivierung zur Citronensäureherstellung aus Saccharose mit *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 ohne Zugabe von Proteosepepton (Versuch II).

Zyklus Nr.	BTM [g/L]	c _{CS} [g/L]	c _{ICS} [g/L]	S _{CS} [%]	Y _{CS/SA} [g/g]	P _{CS} [g/(L*h)]	p _{CS} [h ⁻¹]
1	15,1	47,8	1,52	96,9	0,53	0,51	0,03
2	8,91	13,9	0,64	95,6	0,44	0,15	0,02
3	14,9	50,5	1,36	97,4	0,66	0,54	0,04
4	12,3	17,1	0,57	96,8	0,38	0,13	0,01
5	17,5	56,1	1,20	97,9	0,69	0,55	0,03
6	11,1	9,47	0,54	94,6	0,28	0,10	0,01
7	11,9	43,3	1,18	97,3	0,58	0,44	0,04
8	12,8	36,3	1,04	97,2	0,59	0,33	0,03
9	16,9	32,5	0,96	97,1	0,56	0,31	0,02
10	5,82	0,14	0	-	-	-	-

Bedingungen: pH 6,0; T = 30 °C; 140 rpm; V₀ = 100 mL.

Tabelle 24: Parameter einzelner Zyklen der Repeated Batch Langzeitkultivierung zur Citronensäureherstellung aus Glucose mit *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 (Versuch II).

Zyklus Nr.	BTM [g/L]	c _{CS} [g/L]	S _{CS} [%]	Y _{CS/GL} [g/g]	P _{CS} [g/(L*h)]	p _{CS} [h ⁻¹]
1	13,6	38,9	97,1	0,46	0,42	0,03
2	16,0	30,7	97,0	0,44	0,32	0,02
3	12,2	59,5	98,1	0,59	0,63	0,05
4	13,4	33,9	96,2	0,51	0,29	0,02
5	14,9	58,8	97,6	0,55	0,56	0,04
6	15,5	41,4	96,8	0,54	0,44	0,03
7	12,5	53,8	97,6	0,57	0,53	0,04
8	14,5	55,7	97,6	0,59	0,52	0,04
9	15,3	52,7	97,2	0,58	0,49	0,03
10	14,3	54,7	97,9	0,58	0,51	0,04

Bedingungen: pH 6,0; T = 30 °C; 140 rpm; V₀ = 100 mL.

Tabelle 25: Parameter einzelner Zyklen der Repeated Batch Langzeitkultivierung zur Citronensäureherstellung aus Glucose mit *Y. lipolytica* H222 (Versuch IV).

Zyklus Nr.	BTM [g/L]	c _{CS} [g/L]	S _{CS} [%]	Y _{CS/GL} [g/g]	P _{CS} [g/(L*h)]	p _{CS} [h ⁻¹]
1	12,3	39,4	86,9	0,47	0,42	0,03
2	14,0	29,2	87,0	0,44	0,31	0,02
3	11,8	57,1	91,7	0,61	0,60	0,05
4	13,2	42,7	88,3	0,52	0,38	0,03
5	16,2	60,0	91,2	0,58	0,57	0,04
6	14,8	44,9	90,7	0,53	0,48	0,03
7	13,3	48,5	91,1	0,51	0,46	0,03
8	14,4	43,3	91,1	0,47	0,41	0,03
9	17,5	50,1	91,3	0,56	0,48	0,03
10	14,6	46,4	91,6	0,47	0,56	0,04

Bedingungen: pH 6,0; T = 30 °C; 140 rpm; V₀ = 100 mL.

3.7 Entwicklung verschiedener Prozessführungsstrategien mit dem rekombinanten Stamm *Yarrowia lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 und Saccharose als Substrat

3.7.1 Fed-Batch

3.7.1.1 Fed-Batch Kultivierung unter Verwendung einer Biosensor-online-Regelung

Die Anwendung des Glucose- bzw. Saccharosebiosensors in der biosensorgesteuerten Nachdosierung von Saccharose wurde getestet, indem zwei Fed-Batch Kultivierungen unter Verwendung des jeweiligen Biosensors durchgeführt wurden.

Während der Fed-Batch Fermentation unter Verwendung des Saccharosebiosensors wurde die Saccharosekonzentration über die ganze Fermentationszeit auf 20 g/L konstant gehalten. Das Produktionsmedium beinhaltete kein Proteosepepton. Das Zellwachstum erfolgte sehr langsam, wie es am Verlauf der Ammonium-Stickstoffkonzentration in Abbildung 42B deutlich wird. Die Biomassekonzentration erreichte in der stationären Phase im Durchschnitt lediglich 11 g/L (s. Tabelle 26). Die Saccharose wurde auch ohne Anwesenheit von Proteosepepton gespalten, die entstandenen Glucose und Fructose wurden gleich verwertet (s. Abbildung 42A). Der Saccharosebiosensor war im Vergleich zum Glucosebiosensor erheblich instabiler. Trotz täglicher Rekalibrierung, die im Falle des Glucosebiosensors nicht nötig war, unterschieden sich die Werte, die vom Saccharosebiosensor geliefert wurden, von den offline gemessenen Messdaten um $(5,33 \pm 3,13)$ g/L. Trotz der Schwierigkeiten war eine Substratnachdosierung mit dem Saccharosebiosensor möglich (s. Abbildung 43).

Die Produktbildung fing nach der Auszehrung des extrazellulären Stickstoffs nicht sofort an. Erst nach 65 Stunden Fermentationszeit (d. h. nach mehr als 20 Stunden nach der Stickstoffauszehrung) wurden in der Kulturbrühe 3,3 g/L Citronensäure nachgewiesen (s. Abbildung 42B). Diese Konzentration wurde auch im weiteren Verlauf nicht überschritten. Am Ende der Fermentation wurden lediglich 1,41 g/L Citronensäure detektiert. Daraus kann abgeleitet werden, dass neben Glucose und Fructose auch die Citronensäure als Substrat verwertet wurde. Die schwache Produktbildung könnte ihre Ursache im energetischen Aufwand der gleichzeitigen Utilisierung der beiden Monosaccharide haben. Das Auslassen der Peptonzugabe kann nicht der Grund für die gescheiterte Produktbildung sein, da das Proteosepepton nur für die Invertaseexpression essenziell sein sollte.

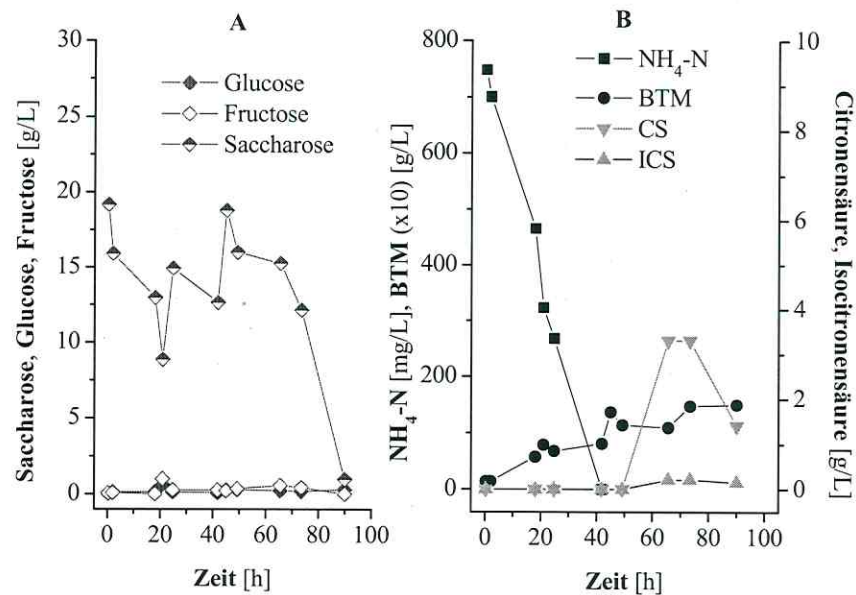


Abbildung 42: Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 aus Saccharose mit online-Regelung mit Hilfe eines Saccharosebiosensors: Verlauf der Konzentrationen der Saccharose, Glucose und Fructose (A) und der Biomasse, des Ammonium-Stickstoffs sowie der Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure) (B).
Bedingungen: pH 7,0; 30 °C; pO₂ = 50 %; V₀ = 6 L.

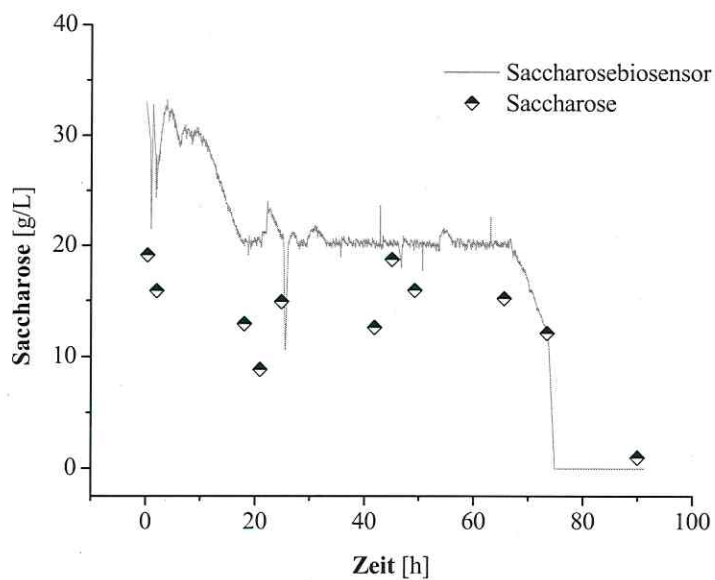


Abbildung 43: Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 aus Saccharose mit einer online-Regelung auf Basis eines Saccharosebiosensors: Verlauf der Konzentration von Saccharose, gemessen mit Saccharosebiosensor und einem Enzymtest.
Bedingungen: pH 7,0; 30 °C; pO₂ = 50 %; V₀ = 6 L.

Die Fed-Batch Kultivierung zur Untersuchung der Anwendung des Glucosebiosensors für die online-Regelung der Saccharosenachdosierung wurde mit invertierter Saccharose durchgeführt. Die Nutzung des Glucosebiosensors setzt voraus, dass von Anfang an Glucose in der Lösung vorhanden ist, sonst ist die erste Kalibrierung des Biosensors nicht möglich. Aus diesem Grund wurde die 500 g/L Saccharoselösung vor der Fermentation mit Hitze teilweise invertiert. Der Verlauf der Konzentrationen der einzelnen Analyte ist in Abbildung 44 dargestellt.

Nachdem die Glucosekonzentration von anfänglichen 65 g/L auf 1 g/L gesunken war, wurde eine Fütterungslösung mit 67 g/L Saccharose, 217 g/L Glucose und 217 g/L Fructose nachdosiert. Der Verlauf der Glucosekonzentration ist in Abbildung 45 dargestellt. Dank der Nachdosierung wurde die Saccharosekonzentration zwischen 17 und 23 g/L gehalten (s. Abbildung 44A). Die Fructosekonzentration sank in den ersten 20 Stunden von 65 g/L auf 47 g/L. Mit Beginn der Substratnachdosierung stieg diese wieder auf 63 g/L und im weiteren Verlauf bewegte sie sich zwischen 53 und 49 g/L (s. Abbildung 44A). Nach 51 Stunden Fermentationsdauer wurde neues Substrat mit 500 g/L Saccharose vorgelegt. Dies führte zur Erhöhung der Saccharosekonzentration bis zu 108 g/L in der 70. Fermentationsstunde. Gleichzeitig sank die Fructosekonzentration auf 38 g/L. Auf Basis der im Abschnitt 3.5.1 erworbenen Erkenntnisse kann man schlussfolgern, dass die Fructose, die sonst im Medium angereichert wird, deswegen genutzt wird, weil nicht ausreichend Glucose aus Saccharose entstehen konnte. Dies führte erstens zur ständigen Nachdosierung der Saccharoselösung und zweitens zum gleichzeitigen Abbau von Glucose und Fructose.

Die Bildung von Citronensäure lief am schnellsten in den ersten Stunden der Produktbildungsphase (s. Abbildung 44B), nach einer geringen Verlangsamung erreichte die Citronensäurekonzentration nach 53 Stunden 61,7 g/L. Am letzten Fermentationstag verlangsamte sich die Produktion, am Ende der Fermentation wurden 66,5 g/L Citronensäure in der Kulturlösung festgestellt (s. Tabelle 26). Die Selektivität des Bioprozesses für Citronensäure blieb über die gesamte Fermentationszeit niedrig und erreichte am Ende lediglich 90 %.

Die Nutzung des Glucosebiosensors für die Saccharosenachdosierung erwies sich als ungünstig, da aufgrund der sofortigen Utilisierung von Glucose ständig frisches Substrat angefordert wird. Demzufolge erhöhen sich sowohl die Saccharose- als auch die Fructosekonzentration ohne dass so viel Glucose in der Lösung vorhanden ist, dass eine Nachdosierung auf der Basis der Glucosekonzentration möglich wäre.

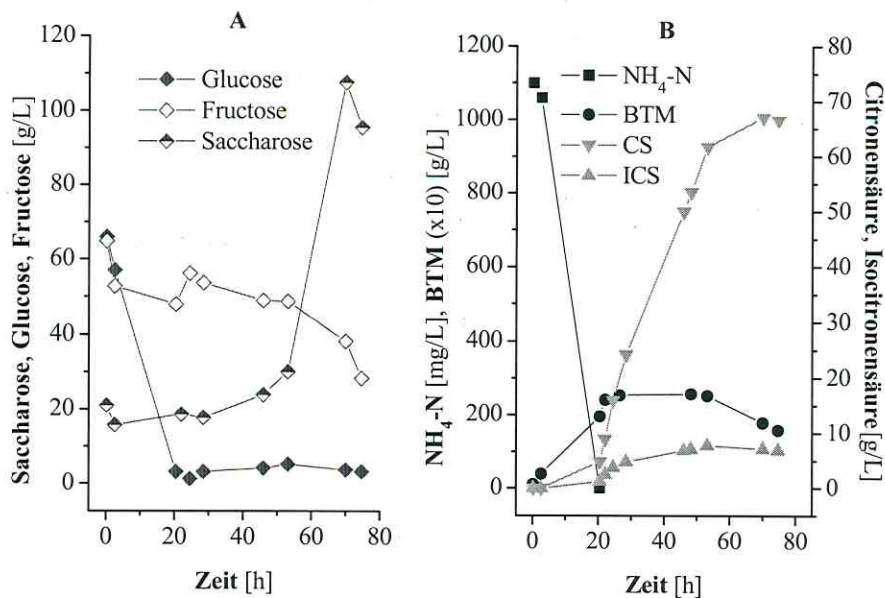


Abbildung 44: Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 aus invertierter Saccharose mit online-Regelung mit Hilfe eines Glucosebiosensors: Verlauf der Konzentrationen der Saccharose, Glucose und Fructose (A) und der Biomasse, des Ammonium-Stickstoffs sowie der Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure) (B). Bedingungen: pH 6,0; 30 °C; $\text{pO}_2 = 50 \%$; $V_0 = 5 \text{ L}$.

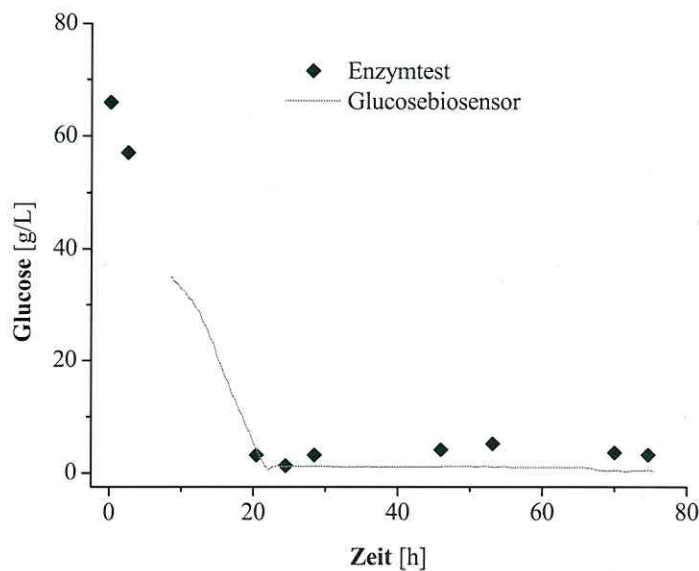


Abbildung 45: Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 aus Saccharose mit online-Regelung mit Hilfe eines Glucosebiosensors: Verlauf der Konzentration von Glucose, gemessen mit Glucosebiosensor (Aufzeichnung der Bioreaktorsoftware alle 30 Minuten) und einem Enzymtest. Bedingungen: pH 6,0; 30 °C; $\text{pO}_2 = 50 \%$; $V_0 = 5 \text{ L}$.

3.7.1.2 Fed-Batch Kultivierung mit ungesteuerter Substratnachdosierung

Eine Fed-Batch Fermentation ohne Nutzung von Biosensoren mit manueller Substratzufuhr wurde durchgeführt, um eine Vergleichsbasis für die Beurteilung der Effektivität des biosensorgestützten Prozesses zu schaffen.

Die Startkonzentration von Saccharose lag bei 135 g/L. Innerhalb von 72 Stunden Fermentationsdauer wurden zweimal 40 g Saccharose in Form einer 750 g/L-Saccharose-lösung nachdosiert. In den ersten 24 Stunden der Fermentation sank die Saccharosekonzentration um 50 g/L (d. h. es wurden jeweils 25 g/L Glucose und Fructose produziert), es kam jedoch zu keiner Anreicherung der Monosacharide (s. Abbildung 46A). Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Versuche in Schüttelkolben zur Untersuchung der Substratverwertung, die im Kapitel 3.5.1 präsentiert werden. Im weiteren Verlauf wurde jedoch sowohl Fructose als auch Glucose angereichert. Die Glucosekonzentration erreichte maximal 27 g/L, die Fructosekonzentration lag in ihrem Maximum bei 98 g/L. Ab dem Zeitpunkt der Auszehrung der Saccharose in der 66. Stunde der Fermentationszeit kam es zur gleichzeitigen Verwertung von Glucose und Fructose, obwohl die Glucosekonzentration bei 26 g/L lag. Das entspricht wiederum nicht den früheren Beobachtungen, bei denen die Glucosekonzentration unter 10 g/L sinken musste um den Fructoseabbau anzuregen.

Die Bildung von Citronensäure startete 2 Stunden nach der Auszehrung der Stickstoffquelle in der Kulturbrühe. Die zur 72. Stunde der Fermentation erreichte Citronensäurekonzentration lag bei 63,5 g/L (s. Abbildung 46B und Tabelle 26). Die Selektivität des Bioprozesses für Citronensäure startete bei 93 % und erreichte am Ende der Fermentation 97 %.

FÖRSTER ET AL. (2007) haben Fed-Batch Versuche zur Citronensäureherstellung aus Saccharose mit dem gleichen rekombinanten Stamm (*Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)) durchgeführt. Die Substratnachdosierung erfolgte ebenso manuell. Zur 73. Stunde haben sie die gleiche Citronensäurekonzentration von 60-65 g/L erhalten. Ihr Versuch dauerte 215 Stunden und die Citronensäureendkonzentration lag bei 140 g/L. Die substratbezogene Ausbeute war mit 0,82 g_{CS}/g_{SA} deutlich höher als die des hier beschriebenen Versuches (0,52 g_{CS}/g_{SA}, s. Tabelle 26); die Produktivität war aber bei FÖRSTER ET AL. (2007) mit 0,73 g/(L*h) niedriger als die hier erreichte 0,88 g/(L*h) (s. Tabelle 26).

WOJTATOWICZ ET AL. (1997) untersuchten zwei Invertase-positive (Suc⁺) Transformanten von *Y. lipolytica* (*Y. lipolytica* W29ura3-302 und JM23/pINA169) auf ihre Fähigkeit, aus Saccharose und Melasse Citronensäure zu bilden. Sie stellten fest, dass ähnlich wie z. B. im Versuch in Abbildung 46 dargestellt, die Glucose vor Fructose bevorzugt aufgenommen wird. Sie behaupteten allerdings, dass während Glucose sowohl für das Wachstum als auch für die

Bildung beider Säuren (Citronensäure und Isocitronensäure) verwertet wird, die Fructose lediglich für die Citronensäureproduktion genutzt wird. Diese Feststellung gilt für *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 nicht, da im Laufe des ersten Fermentationstages, d. h. während der Wachstumsphase, beide o. g. Monosaccharide utilized werden (s. Abbildung 46A).

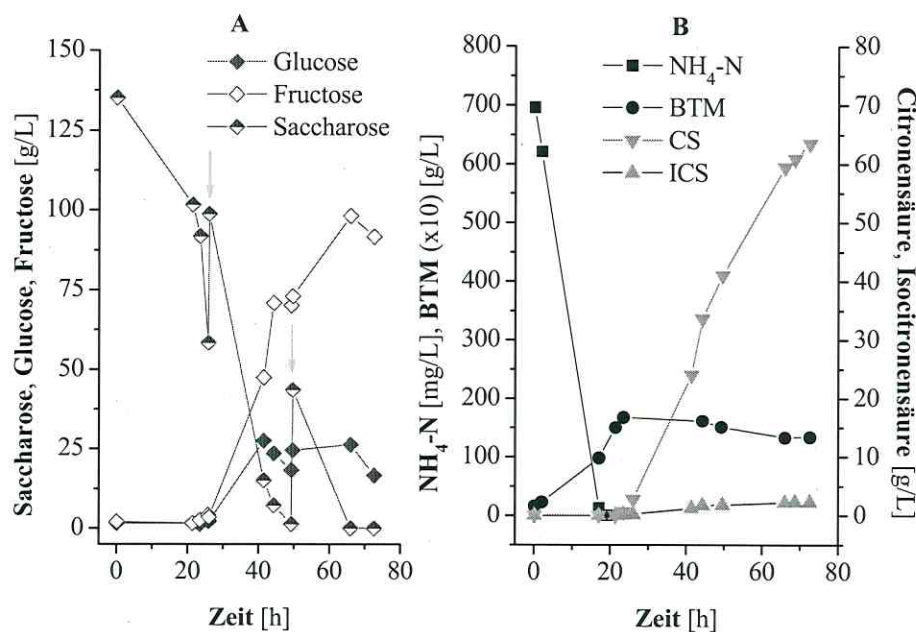


Abbildung 46: Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 aus Saccharose mit manueller Substratzufuhr: Verlauf der Konzentrationen der Saccharose, Glucose und Fructose (A) und der Biomasse, des Ammonium-Stickstoffs sowie der Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure) (B). Bedingungen: pH 6,0; 30 °C; pO₂ = 50 %; V₀ = 5 L.

ŽAROWSKA ET AL. (2001) führten Versuche mit Wildtypstämmen und rekombinanten saccharoseverwertenden Stämmen in Mischkulturen durch. Sie stellten fest, dass diese Mischkulturen mit nichtinvertierten Melassen als Substrat bessere Ergebnisse bringen, als nur rekombinante Stämme. Auffällig war die Steigerung der Selektivität des Bioprozesses für Citronensäure bis auf 98,4 %. Die Kultivierungen der Wildtypstämmen auf invertierten Melassen zeigten eine etwas bessere Kinetik des Bioprozesses als die Mischkulturen, die Selektivität war aber mit 89,5 % deutlich niedriger. Im Vergleich zum hier präsentierten Versuch haben ŽAROWSKA ET AL. (2001) mit dem rekombinanten Stamm *Y. lipolytica* W29ura3-302 in längeren Kultivierungszeiten eine geringere Citronensäureendkonzentration erreicht (50,2 g/L vs. 63,5 g/L (s. Tabelle 26)), die substratbezogene Ausbeute war mit 0,42 g_{CS}/g_{SA} schlechter als in dem hier beschriebenen Versuch ($Y_{CS/SA}=0,52$ g/g).

Tabelle 26: Parameter der Fed-Batch Kultivierungen zur Citronensäureproduktion aus Saccharose mit *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5.

Fed-Batch mit Regelung von	Dauer [h]	$\mu_{\max}$ [h ⁻¹]	BTM [g/L]	Absolut gebildet		Endkonzentration		S _{CS} [%]	Y _{CS/SA} [g/g]	P _{CS} [g/(L*h)]	P _{CS,max} [g/(L*h)]	p _{CS} [h ⁻¹]	p _{CS,max} [h ⁻¹]
				CS [g]	ICS [g]	CS [g/L]	ICS [g/L]						
Saccharose	90	0,11	11,0	1,41	0	1,41	0	-	-	-	-	-	-
Glucose	75	0,19	21,4	516	53,7	66,5	6,90	90,6	0,68	0,90	2,89	0,04	0,14
ohne Steuerung	73	0,15	13,6	378	13,6	63,5	2,31	96,5	0,52	0,88	3,56	0,06	0,25

Bedingungen: pH 6,0 bzw. 7,0 (im Versuch mit der Steuerung von Saccharose); T = 30 °C; pO₂ = 50 %; V₀ = 5 L.

Tabelle 27: Parameter einzelner Zyklen einer biosensorgesteuerten Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung aus Saccharose mit *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1).

Zyklus Nr.	Zyklus- dauer [h]	$\mu_{\max}$ [h ⁻¹]	BTM [g/L]	Absolut gebildet		Endkonzentration		S _{CS} [%]	Y _{CS/SA} [g/g]	P _{CS} [g/(L*h)]	P _{CS,max} [g/(L*h)]	p _{CS} [h ⁻¹]	p _{CS,max} [h ⁻¹]
				CS [g]	ICS [g]	CS [g/L]	ICS [g/L]						
1	72	0,18	18,4	560	31,3	68,9	3,84	94,7	0,56	0,96	2,03	0,05	0,11
2	72	0,19	15,1	442	20,2	57,7	2,67	95,6	0,49	0,66	2,90	0,04	0,19
3	71	0,16	17,0	484	22,5	65,8	3,03	95,6	0,57	0,78	2,20	0,05	0,13
4	42	0,13	12,9	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-

Bedingungen: pH = 7,0; T = 30 °C; pO₂ = 50 %; V₀ = 6 L; 3,71 g/L (NH₄)₂SO₄; 0,4 g/L Proteosepton- und 150 g/L Saccharoseanfängskonzentration; nach Absenken der Saccharosekonzentration auf 20 g/L biosensorgestützte Nachdosierung einer 750 g/L Saccharoselösung.

Tabelle 28: Parameter einzelner Zyklen einer programmgesteuerten Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung aus Saccharose mit *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1).

Zyklus Nr.	Zyklus- dauer [h]	$\mu_{\max}$ [h ⁻¹]	BTM [g/L]	Absolut gebildet		Endkonzentration		S _{CS} [%]	Y _{CS/SA} [g/g]	P _{CS} [g/(L*h)]	P _{CS,max} [g/(L*h)]	p _{CS} [h ⁻¹]	p _{CS,max} [h ⁻¹]
				CS [g]	ICS [g]	CS [g/L]	ICS [g/L]						
1	71	0,16	16,2	535	36,3	78,0	5,26	93,7	0,57	1,10	1,99	0,07	0,12
2	118	0,12	16,5	885	31,4	114,5	4,27	96,4	0,64	0,89	1,41	0,05	0,09

Bedingungen: pH = 7,0; T = 30 °C; pO₂ = 50 %; V₀ = 5 L; 5,56 g/L (NH₄)₂SO₄, 0,4 g/L Proteosepton- und 150 g/L Saccharoseanfängskonzentration im ersten Zyklus und 5,56 g/L (NH₄)₂SO₄ und 120 g/L Saccharoseanfängskonzentration im zweiten Zyklus (ohne Proteosepton). Programmgesteuerte Nachdosierung einer 750 g/L Saccharose-lösung.

3.7.2 Repeated Fed-Batch

3.7.2.1 Repeated Fed-Batch Kultivierung unter Verwendung einer Saccharosebiosensor-online-Regelung der Substratkonzentration

Eine Repeated Fed-Batch Fermentation unter Verwendung einer biosensorgestützten Nachdosierung wurde in vier Zyklen durchgeführt. Für die Regelung der Substratkonzentration wurde ein Saccharosebiosensor genutzt.

Im ersten Zyklus dauerten die lag- und Wachstumsphase insgesamt 16 Stunden und die höchste Biomassekonzentration von allen Zyklen wurde in diesem Zyklus erreicht (BTM = 18,4 g/L) (s. Tabelle 27). Im zweiten und dritten Zyklus währten die Wachstumsphasen ca. 12 Stunden und damit kürzer als im ersten Zyklus. Im vierten Zyklus kam es zum verzögerten Wachstum und nachdem in der 42. Stunde Zykluszeit keine Citronensäurebildung mehr stattfand, wurde die Fermentation abgebrochen.

Als Anfangskonzentration für Saccharose wurden 100 g/L gewählt, um die Anreicherung von Glucose in der Kulturbrühe zu unterbinden, da diese die Messung mit dem Saccharosebiosensor negativ beeinflusst, weil sie im Messwert mit erfasst wird. Nachdem die Saccharosekonzentration auf 20 g/L sank, startete die biosensorgeregelte Substratnachdosierung mit einer 750 g/L-Saccharoselösung. In Abbildung 48 ist der Verlauf der Saccharosekonzentration, gemessen mit einem Saccharosebiosensor und einem Enzymtest, im Laufe der ersten drei Zyklen dargestellt. Die biosensorgestützte Regelung der Saccharosekonzentration war nur im ersten Zyklus erfolgreich. Im zweiten und dritten Zyklus kam es zu Störungen im Biosensor-online-Messsystem, die auf Undichtigkeiten zurückzuführen waren. Aufgrund dessen wurden viel zu niedrige Saccharosekonzentrationen gemessen. Dies führte zu einer übermäßigen Zufuhr der Fütterungslösung, was wiederum zu einer Erhöhung der Saccharosekonzentration bis zu 86 g/L führte. Im vierten Zyklus wurde Saccharose nur langsam verwertet. Zur 22. Stunde der Zykluszeit wurden nur 14 g/L Saccharose utilized. Im ersten und zweiten Zyklus waren es zu dieser Zeit 50 bzw. 58 g/L, im dritten Zyklus 32 g/L. Dieser Trend zeigt, dass wahrscheinlich bereits im dritten Zyklus die Saccharose langsamer gespalten wurde. Trotzdem standen im dritten Zyklus immer noch genug Glucose und Fructose für die Hefe zur Verfügung. Auch der Verlauf der Fructosekonzentration zeigt die Tendenz der Abnahme der mikrobiellen Aktivität. Während in den ersten beiden Zyklen am Zyklusende 64 g/L Fructose in der Kulturbrühe nachgewiesen wurden, waren es im dritten Zyklus nur 28 g/L Fructose (s. Abbildung 47). Im letzten Zyklus wurde keine Fructose angereichert. Der Verlauf der Konzentrationen von Glucose und

Fructose im Laufe der ersten drei Zyklen war ähnlich dem Verlauf der Konzentration dieser Monosaccharide während der Fed-Batch Kultivierung mit manueller Substratnachdosierung (s. Kapitel 3.7.1.2). Im Laufe des ersten Tages der Zykluszeit wurden sowohl Glucose als auch Fructose verwertet. Am zweiten Tag kam es zur Anreicherung beider Monosaccharide in unterschiedlichem Maße. Die höchste Glucosekonzentration von 19 g/L wurde am Ende des zweiten Zyklus nachgewiesen (s. Abbildung 47). Diese Beobachtung stimmt mit den im Kapitel 3.5.2 beschriebenen Ergebnissen nicht überein, wo auch eine geringe Anfangskonzentration an Fructose die Glucoseanreicherung hemmte. Der Grund der Diskrepanz dieser Ergebnisse liegt wahrscheinlich in der unterschiedlichen Dynamik des Bioprozesses im Schüttelkolben und im Bioreaktor. Die bessere Sauerstoffversorgung im Bioreaktor hat erheblichen Einfluss auf die Rate der biochemischen Reaktionen. Während im Schüttelkolben die Glucose, die durch die Spaltung von Saccharose entsteht, sofort verbraucht wird, ist im Bioreaktor die Spaltung von Saccharose so schnell, dass die Mikroorganismen nicht in der Lage sind, die bereitgestellte Glucose sofort zu verarbeiten.

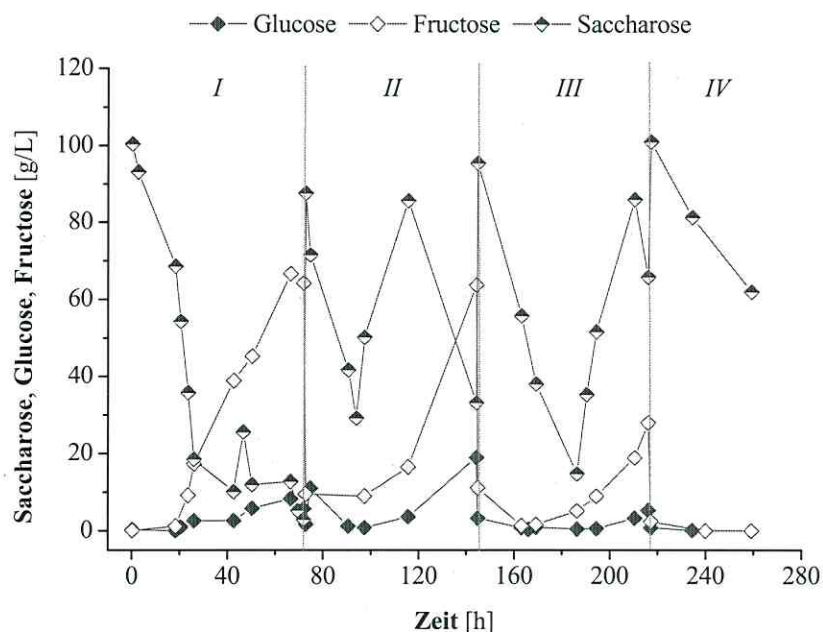


Abbildung 47: Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 aus Saccharose mit online-Regelung mit Hilfe eines Saccharosebiosensors: Verlauf der Konzentrationen der Saccharose, Glucose und Fructose. Bedingungen: pH 7,0; 30 °C; $pO_2 = 50 \%$; $V_0 = 6$ L.

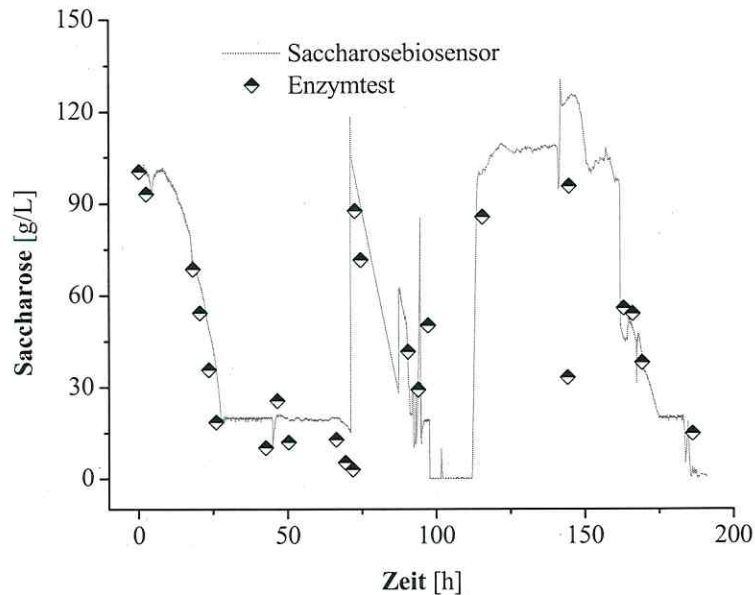


Abbildung 48: Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 aus Saccharose: Verlauf der Konzentration von Saccharose, gemessen mit Saccharosebiosensor und einem Enzymtest im Laufe der ersten drei Zyklen.
Bedingungen: pH 7,0; T = 30 °C; pO₂ = 50 %; V₀ = 6 L.

Die meiste Citronensäure (560 g) sowie die höchste Produktivität ($P_{CS} = 0,96 \text{ g/(L}\cdot\text{h)}$) wurden im ersten Zyklus erreicht (s. Tabelle 27). In den weiteren Zyklen ist die Citronensäurebildung ein wenig zurückgegangen, die Endkonzentrationen von Citronensäure waren niedriger als im ersten Zyklus (58 g/L im 2. Zyklus bzw. 66 g/L im 3. Zyklus vs. 69 g/L im 1. Zyklus) (s. Abbildung 49). Die Selektivität des Bioprozesses für Citronensäure erhöhte sich um 1 % zwischen dem ersten und zweiten Zyklus, danach blieb sie konstant. Die substratbezogene Ausbeute erreichte im ersten und dritten Zyklus ähnliche Werte ($Y_{CS/SA} = 0,56\text{-}0,57 \text{ g/g}$), im zweiten Zyklus lag diese mit $0,46 \text{ g}_{CS}/\text{g}_{SA}$ etwas niedriger. Im vierten Zyklus wurde keine Citronensäure gebildet.

Mit dieser Repeated Fed-Batch Kultivierung wurde gezeigt, dass der rekombinante Stamm in einer Langzeitkultivierung im halbertechnischen Maßstab instabil ist. Diese Feststellung stimmt mit den im Kapitel 3.6.3 dargestellten Ergebnissen der Repeated Batch Kultivierungen zur Langzeitstabilität des genetisch modifizierten Stammes nicht überein. Dieser Umstand bietet einen Anlass für weiterführende Untersuchungen zu dieser Problematik. Auch die Stabilität des Saccharosebiosensors war für diese Prozessführung nicht ausreichend.

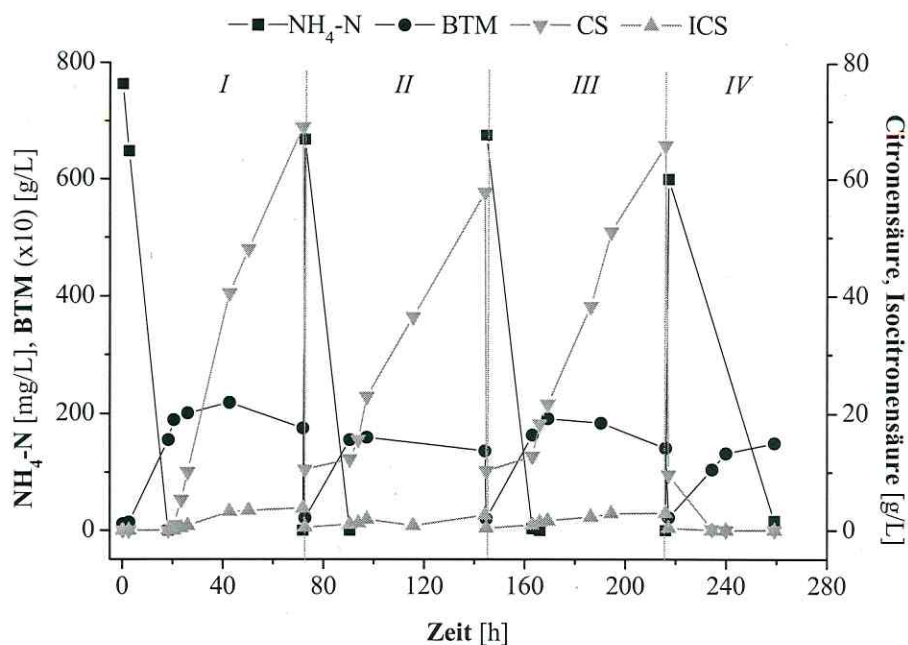


Abbildung 49: Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 aus Saccharose mit online-Regelung mit Hilfe eines Saccharosebiosensors: Verlauf der Konzentrationen des Ammonium-Stickstoffs, der Biomasse und der Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure).
Bedingungen: pH 7,0; 30 °C; pO₂ = 50 %; V₀ = 6 L.

3.7.2.2 Repeated Fed-Batch Kultivierung unter Verwendung einer programmgesteuerten Substratnachdosierung

Nachdem sich die Steuerung des Bioprozesses mit dem Saccharosebiosensor für zyklische Verfahren als nicht geeignet erwies (s. Kapitel 3.7.2.1), wurde eine Repeated Fed-Batch Fermentation mit einer programmgesteuerten Pumpe für die Substratnachdosierung durchgeführt. Die Pumpensteuerung wurde auf der Basis von Erfahrungswerten mit der biosensorgeregelten Nachdosierung programmiert.

Die lag- und Idiophase dauerten im ersten Zyklus insgesamt 24 Stunden, im zweiten Zyklus nahm die Wachstumsphase 10 Stunden der Zykluszeit ein. Die Biomassekonzentration erreichte in beiden Zyklen beinahe gleiche Werte von 16 g/L. Die Anfangskonzentration von Saccharose lag im ersten Zyklus bei 150 g/L (s. Abbildung 50). Nachdem die ganze Saccharose in der Kulturlösung in ihre Monomere gespalten war, wurde die Nachdosierung gestartet. Die gelieferte Saccharose wurde dann immer sofort gespalten, sodass die Saccharosekonzentration bis Ende des ersten Zyklus 6 g/L nicht überschritt. Am Ende des Zyklus lagen 0,5 g/L Saccharose in der Kulturbrühe vor. Die Anfangskonzentration der Saccharose im zweiten Zyklus war 120 g/L. Obwohl dem Medium in diesem Zyklus kein

Proteosepepton zugegeben wurde, wurde Saccharose im Laufe des gesamten Zyklus gespalten. Nachdem die Saccharose auf 3,6 g/L gesunken war, startete die Substratnachdosierung. Im weiteren Verlauf kam es zur Erhöhung der Saccharosekonzentration auf 11 g/L und dann allmählich auf 17 g/L in der 74. Fermentationsstunde. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Substratpumpe ausgeschaltet und die Saccharosekonzentration sank in den nächsten 18 Stunden auf 0,5 g/L. Bis zum Ende der Fermentation wurde dann kein frisches Substrat zugeführt, sodass in den letzten 23 Stunden der Zykluszeit keine Saccharose in der Kulturlösung vorhanden war.

Eine gleichzeitige Verwertung von Glucose und Fructose fand in beiden Zyklen im Laufe der ersten 22 Stunden statt (s. Abbildung 50). Danach kam es zuerst zur Anreicherung von Fructose, die Glucose wurde im ersten Zyklus erst ab der 48. Stunde der Zykluszeit akkumuliert. Im zweiten Zyklus fing die Glucoseanreicherung früher an, zur 45. Stunde Zykluszeit wurden bereits 12 g/L Glucose in der Kulturlösung nachgewiesen. Mit der Auszehrung von Saccharose in der 43. Stunde des ersten Zyklus startete die Fructoseverwertung. Nachdem die Substratnachdosierung eine Stunde später anging, kam der Fructoseabbau zum Stillstand und Fructose wurde in der Kulturlösung weiter angereichert. Am Ende des ersten Zyklus lagen in der Kulturbrühe 24 g/L Glucose und 82 g/L Fructose vor. Im zweiten Zyklus wurde aufgrund der Abschaltung der Substratpumpe ein Teil der freigegebenen Monosaccharide wiederverwertet. Die höchste Konzentration an Glucose von 25 g/L wurde zum Zeitpunkt der Pumpenausschaltung festgestellt. Danach wurde Glucose mit der Geschwindigkeit von 0,86 g/(L*h) genutzt. Erst nachdem die Glucosekonzentration auf 6 g/L gesunken war, wurde auch Fructose, die inzwischen die Konzentration von 122 g/L erreicht hatte, verwertet. Die Abbaurate von Fructose war mit 1,4 g/(L*h) um 36 % höher als die Geschwindigkeit des Abbaus von Glucose. Davon ist abzuleiten, dass während der Glucoseverwertung auch gleichzeitig Fructose abgebaut wurde, obwohl deren Konzentration im Medium weiter anstieg. Dies geht auch aus der Massenbilanz hervor: durch die Nachdosierung wurden umgerechnet ca. 113 g/L Fructose in Form von Saccharose zugeführt; zu Beginn der Substratfütterung waren bereits 60 g/L Fructose in der Kulturlösung vorhanden und die maximale erreichte Fructosekonzentration lag bei 122 g/L. Im Laufe der Nachdosierung wurden also 51 g/L Fructose genutzt.

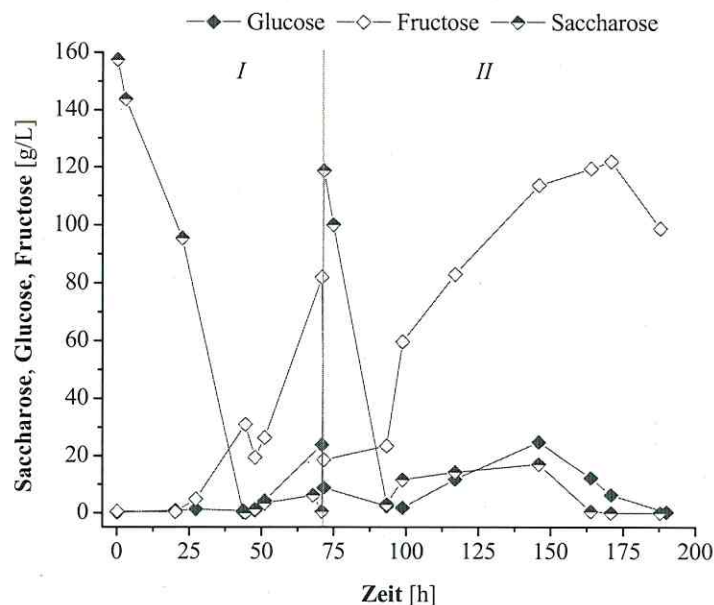


Abbildung 50: Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 aus Saccharose unter Verwendung von programmgesteuerter Nachdosierung: Verlauf der Konzentrationen der Saccharose, Glucose und Fructose.
Bedingungen: pH 7,0; 30 °C; $pO_2 = 50 \%$; $V_0 = 5 \text{ L}$.

Im ersten Zyklus wurden 78 g/L Citronensäure gebildet, im zweiten Zyklus lagen zur gleichen Zykluszeit 82 g/L Citronensäure (s. Abbildung 51) in der Kulturlösung vor, am Ende des zweiten Zyklus erreichte die Citronensäurekonzentration 114 g/L (s. Tabelle 28). Auch andere Parameter, wie die Selektivität des Bioprozesses für Citronensäure ($S_{CS} = 94 \%$) und die substratbezogene Ausbeute ($Y_{CS/GL} = 0,57 \text{ g/g}$) waren im ersten Zyklus niedriger als im zweiten Zyklus ($S_{CS} = 96 \%$, $Y_{CS/GL} = 0,64 \text{ g/g}$) (s. Tabelle 28). Die volumetrischen und spezifischen Produktivitäten erreichten hingegen im ersten Zyklus höhere Werte als im zweiten Zyklus - z. B. $P_{CS} = 1,10 \text{ g/(L*h)}$ im ersten Zyklus vs. $0,89 \text{ g/(L*h)}$ im zweiten Zyklus. Diese Tatsache ist auf die Länge der einzelnen Zyklen zurückzuführen, da im zweiten Zyklus aufgrund der längeren Zykluszeit die Produkthemmung auftritt und das Volumen der Kulturbrühe am Ende des Zyklus größer ist (8 L im zweiten Zyklus vs. 6,7 L im ersten Zyklus).

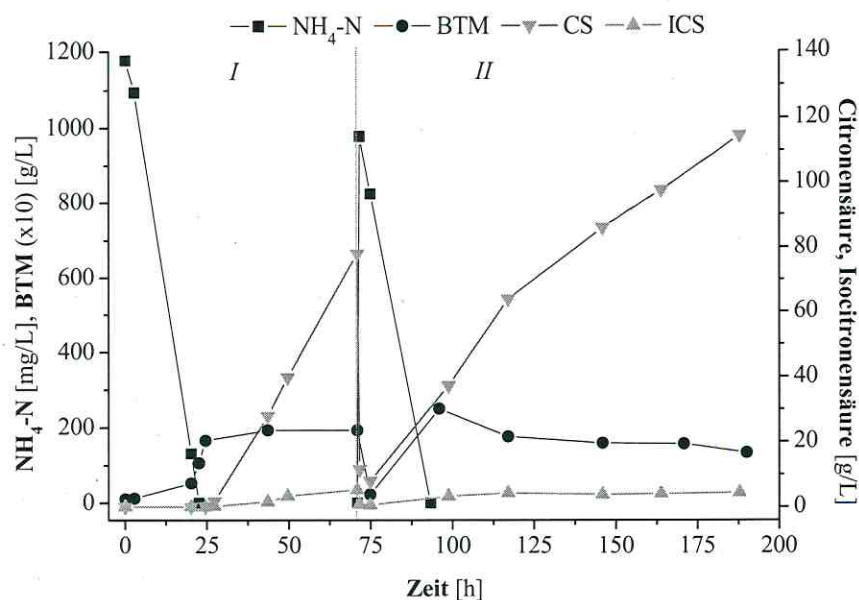


Abbildung 51: Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 aus Saccharose unter Verwendung von programmgesteuerter Nachdosierung: Verlauf der Konzentrationen des Ammonium-Stickstoffs, der Biomasse und der Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure). Bedingungen: pH 7,0; 30 °C; $\text{pO}_2 = 50 \%$; $V_0 = 5 \text{ L}$.

Der Unterschied zwischen den beiden Repeated Fed-Batch Kultivierungen zur Citronensäureproduktion mit *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 aus Saccharose, die im Kapitel 3.7.2 beschrieben wurden, besteht in der Anfangskonzentration der Stickstoffquelle (3,71 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ im Kapitel 3.7.2.1 vs. 5,56 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ im Kapitel 3.7.2.2) und dem Anfangsvolumen der Fermentation (6 L im Kapitel 3.7.2.1 vs. 5 L im Kapitel 3.7.2.2). Die Steigerung der Anfangskonzentration der Stickstoffquelle beeinflusste die Biomassekonzentration nicht maßgeblich, hatte aber wiederum einen positiven Einfluss auf die Citronensäurebildung. Im ersten Zyklus der Kultivierung mit höherer Anfangskonzentration von Stickstoff fing die Produktbildung etwas später an als im Versuch mit weniger Ammoniumsulfat im Medium. In der biosensorgeregelten Repeated Fed-Batch Kultivierung wurden im ersten Zyklus 9 g/L weniger Citronensäure gebildet als im Repeated Fed-Batch Versuch mit programmgesteuerter Substratnachdosierung, wo mehr Stickstoff zur Verfügung stand. Im zweiten Zyklus lag die Differenz zwischen den Citronensäurekonzentrationen zur 71. Stunde Zykluszeit bei 24 g/L Citronensäure. Die volumetrische Produktbildungsrate verzeichnete einen Unterschied von 0,14 g/(L*h) zwischen den ersten Zyklen bzw. 0,33 g/(L*h) zwischen den zweiten Zyklen zugunsten der Repeated Fed-Batch Kultivierung mit höherer Ammoniumsulfatkonzentration im Medium. Die substratbezogene Ausbeute wies

in beiden Kultivierungen im ersten Zyklus keine große Abweichung aus. Die Selektivität des Bioprozesses für Citronensäure lag im ersten Zyklus im Versuch mit der Biosensor-online-Regelung um 1 % höher als im Versuch mit höherer Stickstoffkonzentration. Im zweiten Zyklus erreichte die Selektivität zur 71. Stunde in beiden Fermentationen den gleichen Wert von 95,6 % Citronensäure. Von diesem Vergleich ist abzuleiten, dass wie beim Wildtypstamm auch hier die optimale Konzentration des Ammoniumsulfats bei 5,56 g/L liegt. Vergleicht man die programmgesteuerte Repeated Fed-Batch Kultivierung mit Saccharose als Substrat (Kapitel 3.7.2.2) mit der Repeated Fed-Batch Fermentation mit Glucose als Substrat (Kapitel 3.3.2.4), wird deutlich, dass die Nutzung von Glucose und dem Wildtypstamm bessere Ergebnisse im Sinne der Effektivität des Bioprozesses für die Citronensäureproduktion bringt. Der Vergleich der Verläufe der Citronensäurekonzentrationen in den ersten beiden Zyklen der o. g. Versuche ist in Abbildung 52A dargestellt. Die lag- und Wachstumsphasen dauerten im Falle der Anwendung des rekombinanten Stammes wachsend auf Saccharose mit 24 Stunden doppelt so lange als bei der Nutzung des Wildtypstammes mit Glucose als Substrat. Aufgrund dessen kam es auch zum verzögerten Anfang der Produktbildung unter Anwendung des rekombinanten Stammes und demzufolge wurde in diesem Fall auch um 24 g/L weniger Citronensäure gebildet als bei der Kultivierung des Wildtypstammes. Der Verlauf der Selektivitäten im ersten Zyklus beider Versuche ist in Abbildung 52B veranschaulicht. Die Selektivität des Bioprozesses für Citronensäure fing bei der Nutzung des Wildtypstammes bei 82 % Citronensäure an, während sie in den folgenden 24 Stunden steil auf 92 % anstieg. Danach verlangsamte sich ihre Zunahme, sodass am Ende des Zyklus die Selektivität 94 % Citronensäure erreichte. Der Anstieg der Selektivität während der Fermentation unter Anwendung des rekombinanten Stammes ist viel flacher. Die Selektivität begann bereits bei 91 % und erreichte am Zyklusende 94 % Citronensäure. Die Citronensäurebildung im zweiten Zyklus fing in beiden Fermentationen gleich an, trotzdem wurde im Versuch mit dem Wildtypstamm und Glucose am Ende der Fermentation mehr Citronensäure nachgewiesen als beim rekombinanten Stamm. Die Differenz zwischen den Citronensäurekonzentrationen war allerdings mit 9 g/L kleiner als im ersten Zyklus.

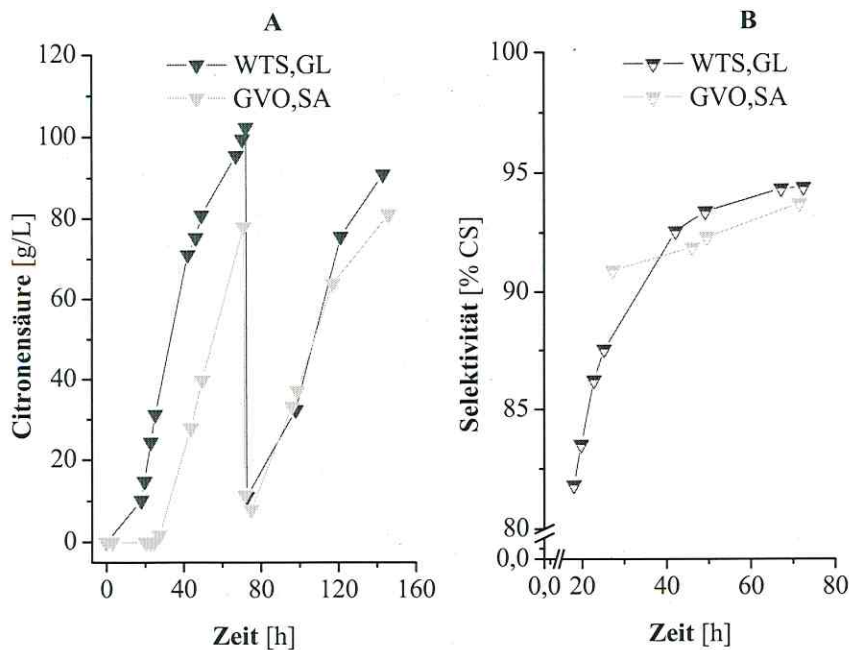


Abbildung 52: Vergleich der Citronensäurebildung des rekombinanten Stammes *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 (GVO) zum Wildtypstamm *Y. lipolytica* H222 (WTS) auf Saccharose (SA) bzw. Glucose (GL): die Citronensäureproduktion in jeweils zwei Zyklen der Repeated-Fed-Batch Kultivierungen (Kap. 3.3.2.4 und 3.7.2.2) (A) und Selektivität des Bioprozesses für Citronensäure in ersten Zyklen der gleichen Fermentationen (B)
Bedingungen: pH 6,0 (bei WTS) bzw. 7,0 (bei GVO); 30 °C; $pO_2 = 50 \%$; $V_0 = 5 \text{ L}$.

Im Ergebnis wurde festgestellt, dass die programmgesteuerte Substratnachdosierung eine gute Alternative zu biosensorgesteuerten Prozessführungsstrategien darstellt. Weiterhin wurde gezeigt, dass auch bei der Citronensäureherstellung aus Saccharose die optimale Konzentration von Ammoniumsulfat bei 5,56 g/L liegt. Die übermäßige Anreicherung von Fructose könnte zu Limitierungen des Bioprozesses führen. Deswegen bedarf es weiterführender Untersuchungen zur Minimierung der Fructosekonzentration während der Fermentation. Leider kann man Fructose zurzeit nur offline messen, was die direkte Steuerung ihrer Konzentration erschwert. Es ist auch schwierig, den Prozess anderweitig zu steuern. Die Regelung über den pO_2 -Wert ist nur möglich, wenn eine Limitation der Kohlenstoffquelle entsteht. In diesem Fall greift eine solche Limitation erst nachdem auch Citronensäure als Substrat aufgebraucht wurde. An dieser Stelle könnten pulsierende Nachdosierungstechniken von Vorteil sein, wenn man die Fütterungspumpe so programmieren würde, dass nur in gewissen Abständen Saccharose nachdosiert werden würde. Die Abstände müssten allerdings so kurz gewählt werden, dass es zu keiner

vollkommenen Auszehrung der Kohlenhydrate kommt, und so lang eingestellt werden, dass es zu keiner übermäßigen Fructoseanreicherung kommt.

3.8 Modellierung des Bioprozesses der Citronensäureherstellung mit *Yarrowia lipolytica* H222 und Glucose als Substrat

Bei allen Verfahrensentwicklungen sind Versuche in Modellmaßstäben im Labor- und Technikumsmaßstab erforderlich. Da die Kosten für diese Experimente zum Teil beträchtlich hoch sind, werden in der Praxis zunehmend einzelne Prozessstufen bis hin zu kompletten Verfahren im Rechenmodell simuliert. Ein mathematisches Modell zur Beschreibung biologischer Prozesse bietet die Möglichkeit, auf der Basis ausgewählter Daten Vorhersagen zum Prozessverlauf zu treffen. Im Modell werden Zusammenhänge zwischen den Geschwindigkeiten und Konzentrationen der Reaktanten und Produkte mathematisch ausgedrückt (STORHAS 2003).

In diesem Kapitel wird ein unstrukturiertes und unsegregiertes Modell des Bioprozesses zur Citronensäureherstellung mit dem Wildtypstamm *Y. lipolytica* H222 aus Glucose vorgestellt. Dieses Modell dient zur Beurteilung der Kinetiken der Konzentrationen von Substraten, Biomasse und Produkten, sowie zum Vergleich dieser Parameter innerhalb der Versuchsreihen zur Ermittlung von optimalen Bedingungen und zur Untersuchung der Eigenschaften des Bioprozesses.

Auf der Basis der Literaturrecherche wurden verschiedene Differenzialgleichungen für die Beschreibung der Tropho- und Idiophase getestet. Eine Übersicht über die getesteten Modelle zeigt die Tabelle 29. Die Eignung der einzelnen Modelle für die Beschreibung des Batch-Prozesses für die Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222 aus Glucose (s. Kapitel 3.3.1.1) wurde mit der Fehlerquadratsumme bewertet, die die Differenz zwischen den Messdaten und der mit Hilfe des Modelles generierten Werte ausdrückt (s. Tabelle 30).

An Hand des Vergleiches der einzelnen Modelle wurde ein neues Modell generiert (bezeichnet als [Moeller], s. Abbildung 53). Für die Beschreibung des mikrobiellen Wachstums etablierte sich die Differenzialgleichung, die von der linearen Blackman-Williams Gleichung abgeleitet und in PAPANIKOLAOU ET AL. (2006) publiziert wurde (entwickelt von GALIOTOU-PANAYOTOU ET AL. 1998). In dieser Modellgleichung wurde der Stickstoff als limitierender Faktor des Zellwachstums betrachtet.

Die Verwertung von Glucose wurde mit einer Differenzialgleichung beschrieben, in der der Substratabbau durch das Zellwachstum und die Produktbildung berücksichtigt werden. Der

Koeffizient für die Aufrechterhaltung der Biomasse m (maintenance coefficient), der von KLASSON ET AL. (1991) in der Gleichung verwendet wird, wurde vernachlässigt.

Als „Produkt“ wird in diesem Modell die Summe von Citronensäure und Isocitronensäure bezeichnet. Die Produktbildung wurde mit Hilfe einer Luedeking-Piret Gleichung (LUEDEKING & PIRET 1959) ausgedrückt, wobei die (Iso-)Citronensäure als wachstums-entkoppelter Metabolit betrachtet wird. Die Konstante k in diesem Modell stellt einen Ertragskoeffizient dar. Vorausgesetzt, dass der Wert von k negativ ist, wird die (Iso-)Citronensäure, falls μ einen gewissen Wert erreichen würde, als Substrat verwertet und nicht als Produkt ausgeschieden.

Das entwickelte Modell bewies seine Eignung durch die besten Fehlerquadratsummen bei den Schlüsselanalyten (s. Tabelle 30). Die Parameter des Bioprozesses, die durch das Fitting der Konzentrationskurven berechnet wurden, stimmen mit den experimentellen Werten überein (z. B. $Y_{X/G} = 0,34$ g/g (Modell) vs. 0,33 g/g) oder sind etwas höher (z. B. $Y_{P/G} = 0,67$ g/g (Modell) vs. 0,57 g/g).

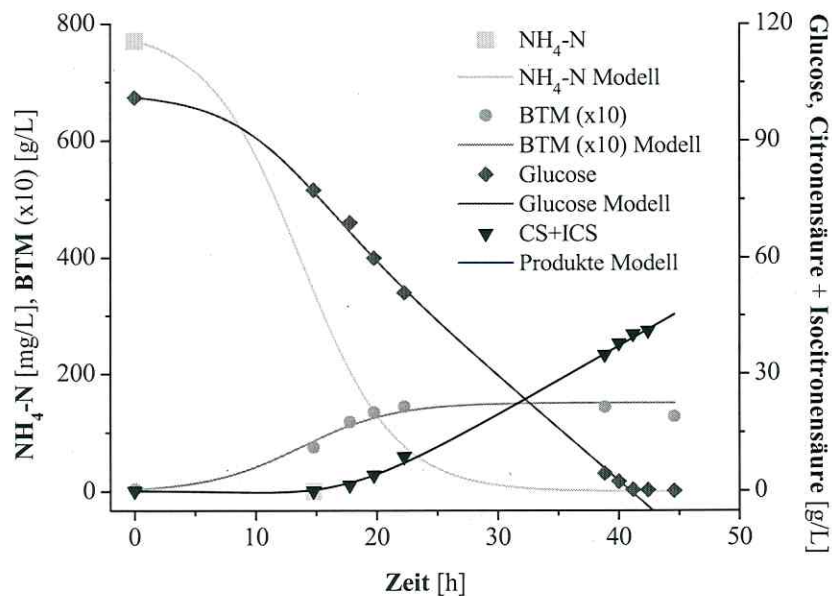


Abbildung 53: Modell einer Batch-Kultivierung (s. Kap. 3.3.1.1) zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222 aus Glucose: experimentelle Daten vs. simulierte Kurven.

Tabelle 29: Vergleich verschiedener Modelle zur Beschreibung einer ausgewählten Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* aus Glucose.

Gleichungen	Modell nach			
	DUNN & MOOR 1975	KLASSON ET AL. 1991	MORESI 1994	PAPANIKOLAOU ET AL. 2006
Biomasse: $\frac{dX}{dt}$	$\mu^* X$ $\mu = \mu_{\max}^* \frac{G}{G + K_G}$	$\mu_{\max}^* \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right)$ $X_{\max} = X_{t=0} + Y_{X/N}^* N_{t=0}$	$\mu^* X$ $\mu = k_4^* G$	$\mu^* X$ $\mu = \mu_{\max}^* \frac{N}{N_{t=0}}$
Glucose: $\frac{dG}{dt}$	$-\frac{1}{Y_{X/G}} \frac{dX}{dt}$	$-\frac{1}{Y_{X/G}} \frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{P/G}} \frac{dP}{dt} - m_1 X$	$-\frac{1}{Y_{X/G}} \frac{dX}{dt}$	$-\frac{1}{Y_{X/G}} \frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{P/G}} \frac{dP}{dt}$
Stickstoff: $\frac{dN}{dt}$	-	$-\frac{1}{Y_{X/N}} \frac{dX}{dt}$	$-\frac{1}{Y_{N/X}} \frac{dX}{dt}$	$-\frac{1}{Y_{X/N}} \frac{dX}{dt}$
Produkt: $\frac{dP}{dt}$	$(k_1 + k_2^* \mu^*) X$	$k_3^* \frac{dX}{dt} + q_m^* X$	$m_2^* X$	$k_5^* \frac{dX}{dt} + q_m^* X$
$\mu_{\max}$ [h ⁻¹]	0,316	0,317	-	0,252
$Y_{X/G}$ [g/g]	0,157	0,170	0,172	0,344
$Y_{X/N}$ (bzw. $Y_{N/X}$) [g/g]	-	62,8	$Y_{N/X} = 4,62$	19,0
$Y_{P/G}$ [g/g]	-	1,23	-	0,665
m [h ⁻¹]	-	$m_1 \equiv 0$	$m_2 = 0,119$	-
q_m [g/(g*h)]	-	0,219	-	0,118
K_G [g/L]	100	-	-	-
k_1 bis k_5	$k_1 = 0,105 \text{ h}^{-1};$ $k_2 = 0,232$	$k_3 = -0,159$	$k_4 = 0,002 \text{ L/(g*h)}$	$k_5 = -0,646$

Tabelle 30: Fehlerquadratsumme einzelner Modelle zur Begutachtung ihrer Eignung zur Beschreibung einer ausgewählten Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* aus Glucose (Kap. 3.3.1.1).

	Modell nach				[Moeller]
	DUNN UND MOOR 1975	KLASSON ET AL. 1991	MORESI 1994	PAPANIKOLAOU ET AL. 2006	
Biomasse	118,9	165,0	129,2	43,84	9,104
Glucose	133,4	104,8	29,94	43,22	8,720
NH ₄ -N	-	3,611	43,79	0,5167	0,1838
Produkt	43,10	13,72	131,1	60,68	31,62

Tabelle 31: Modell einer ausgewählten Fed-Batch Fermentation zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* aus Glucose (Kap. 3.3.2.3).

	Massenbilanz	Konzentration	Parameter	Fehlerquadratsumme
Biomasse	$\frac{d(v_X)}{dt} = \mu \cdot X \cdot v$ $\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{N}{N_{I=0}}$	$X = \frac{v_X}{v}$	$\mu_{\max} = 0,18 \text{ h}^{-1}$	102,8
Glucose	$\frac{d(v_G)}{dt} = \left(-\frac{1}{Y_{X/G}} \cdot \frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{P/G}} \cdot \frac{dP}{dt} \right) \cdot v + F_G \cdot S_F$	$G = \frac{v_G}{v}$	$Y_{X/G} = 0,42 \text{ g/g}$	443,5
NH ₄ -N	$\frac{d(v_N)}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/N}} \cdot \frac{dX}{dt} \cdot v$	$N = \frac{v_N}{v}$	$Y_{P/G} = 0,61 \text{ g/g}$	0,11
Produkt	$\frac{d(v_P)}{dt} = \left(k \cdot \frac{dX}{dt} + q \cdot X \right) \cdot v$	$P = \frac{v_P}{v}$	$Y_{X/N} = 24,2 \text{ g/g}$ $k = -0,53$ $q = 0,068 \text{ g/(g*h)}$	306,5

Das entwickelte Modell für die Batch Kultivierung wurde auf die Fed-Batch Verfahrensführung adaptiert. Die Fed-Batch Kultivierung (s. Kap. 3.3.2.3) startete im Batch Modus und nachdem eine gewisse Konzentration von Glucose durch den mikrobiellen Abbau erreicht wurde, startete die Substratnachdosierung. Weil sich das Kultivierungsvolumen im Laufe der Fermentation verändert, wurde für die Beschreibung der Stoffflüsse eine Massenbilanz durchgeführt. Die Durchflussraten wurden anhand der Gewichtsänderungen des Vorlagebehälters mit Substrat für die Nachdosierung und der Kulturbrühe im Bioreaktor berechnet (Näheres s. Kapitel 2.12). Die Modellgleichungen sind in Tabelle 31 zusammengefasst. Die erhöhten Werte der Fehlerquadratsummen resultieren aus der größeren Anzahl an Messdaten, bedingt durch die verlängerte Kultivierungsdauer (s. Tabelle 31). Trotzdem ist die Übereinstimmung des Modells mit den gemessenen Daten sehr gut, wie in Abbildung 54 ersichtlich wird.

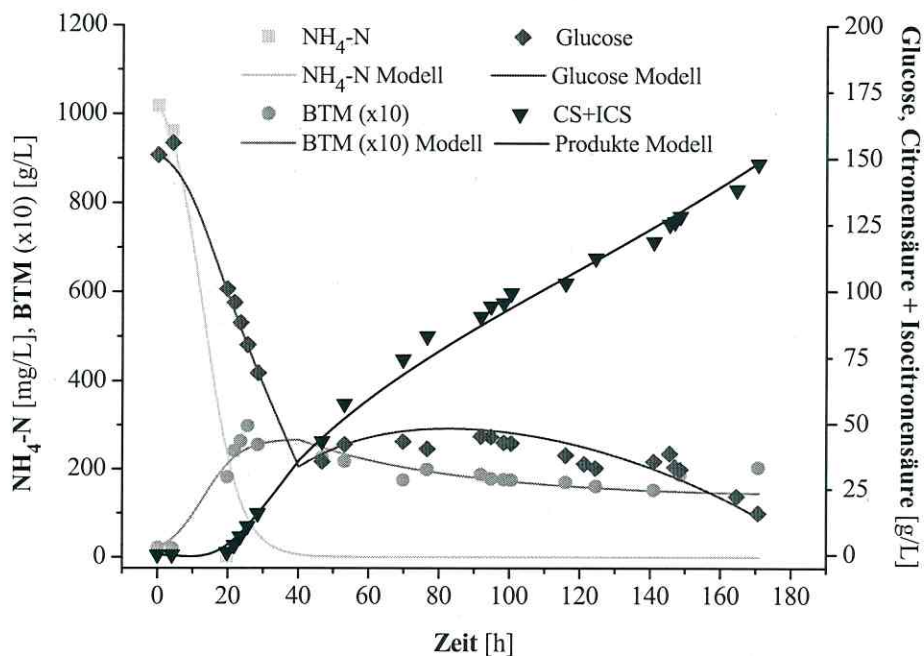


Abbildung 54: Modell einer Fed-Batch Kultivierung (s. Kap. 3.3.2.3) zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222 aus Glucose: experimentelle Daten vs. simulierte Kurven.

In diesem Kapitel wurde ein Modell für die Beschreibung des Batch-Bioprozesses der Citronensäureproduktion mit *Y. lipolytica* H222 aus Glucose vorgestellt. Das Modell wurde weiterhin auf die Fed-Batch Prozessführungsstrategie adaptiert. Die Eignung des Modells für die Beschreibung des o. g. Bioprozesses wurde anhand der Berechnung der Fehlerquadratsumme für die jeweiligen Analyte demonstriert.

3.9 Wirtschaftlichkeitsbetrachtung des Verfahrens mit *Yarrowia lipolytica*

Die industrielle Anwendung des Bioprozesses der Citronensäureherstellung mit der Hefe *Y. lipolytica* anstelle der konventionellen Produktionsmethode mit *A. niger* ist nur dann denkbar, wenn diese für den Produzenten auch wirtschaftlich ist. Aus diesem Grund wurde die Firma „Unternehmensberatung Umwelt- und Industrieanalytik Dr. rer. nat. E. Tschirner“ mit der Durchführung einer Wirtschaftlichkeitsbetrachtung beauftragt. Durch die externe Erstellung der ökonomischen Analyse wird die Unabhängigkeit dieser Bewertung gewährleistet. Die erarbeitete Wirtschaftlichkeitsanalyse befindet sich im Anhang.

Inhalt der Wirtschaftlichkeitsanalyse ist der Vergleich der Citronensäureherstellung mit der Hefe *Y. lipolytica* bzw. mit dem Schimmelpilz *A. niger* aus ökonomischer Sicht. Darüber hinaus werden verschiedene Substrate, die mit *Y. lipolytica* für die Citronensäuregewinnung in Frage kommen, von der wirtschaftlichen Seite her beurteilt und verglichen. Als Grundlage diente eine Studie, die im Rahmen des Projektes „Prozessintegrierter Umweltschutz bei der biotechnologischen Gewinnung von Citronensäure unter Verwendung genetisch modifizierter Hefen“ erarbeitet wurde (AURICH ET AL. 2003b), in der für die Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* allerdings nur Pflanzenöle als Substrat betrachtet wurden.

In dem von der Firma „Unternehmensberatung Umwelt- und Industrieanalytik Dr. rer. nat. E. Tschirner“ durchgeführten Verfahrensvergleich wurde gezeigt, dass das traditionelle Verfahren mit *A. niger* auf der Basis von Melassen das aufwendigste Verfahren hinsichtlich des Einsatzes von Investitionen und der erforderlichen Aufwendungen für die Behandlung von Abprodukten und deren Entsorgung (Abwasser, Gips) ist (die Ergebnisse der Kostenanalyse sind in Tabelle 32 dargestellt). Wesentlich besser schneidet der hefebasierte Produktionsprozess ab, bei dem Investmenteinsparungen von ca. 35 %, eine Senkung der Betriebskosten aufgrund von Energieeinsparung und Verfahrensoptimierung von 25-30 %, sowie um 30 % höhere Produktivitäten im Vergleich zum klassischen *Aspergillus*-Verfahren erreicht werden. Die Nutzung von Kohlenhydraten für die Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* zeigte sich als ökonomisch interessanter als die Anwendung von Pflanzenölen als Substrat.

Tabelle 32: Invest-/Produktionskostenschätzung - Vergleich *Aspergillus*- vs. *Yarrowia*-Verfahren zur Herstellung von Citronensäure (aus „Vergleichende Wirtschaftlichkeitsanalyse für die Herstellung von Citronensäure auf fermentativer Basis unter Verwendung von Hefen und kohlenhydrathaltigen Substraten unter Berücksichtigung der Marktverhältnisse“ erstellt von Unternehmensberatung Umwelt- und Industrieanalytik Dr. rer. nat. E. Tschirner)

Anlagenkapazität 20.000 t/a Citronensäure	Klassisches Verfahren EURO	<i>Yarrowia</i> -Verfahren	
		Öle EURO	Kohlenhydrate EURO
Investkosten (nur Anlageninvest)	42.900.000	30.060.000	28.000.000
Produktionskosten/a			
Rohstoffe	10.665.600	12.229.400	11.000.000
Energie	10.650.000	4.442.200	4.000.000
Personal	8.000.000	7.000.000	6.500.000
Abschreibung	3.750.000	2.505.000	2.000.000
Summen:	33.065.600	26.176.600	23.500.000

4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es, ein alternatives Verfahren für die Herstellung von Citronensäure mit der Hefe *Yarrowia lipolytica* unter Verwendung von zwei Substratgruppen (Glucose/Glucosesirupe und Saccharose) zu optimieren. Dabei sollten effiziente Nachdosierungsstrategien mit direkter Feedback-Kontrolle für den Substratverbrauch durch Biosensor-online-Messung und -Regelung entwickelt werden.

Im ersten Teil wurde der Bioprozess mit Glucose und dem Wildtypstamm *Y. lipolytica* H222 untersucht. Das Zellwachstum und die Citronensäurebildung wurden umfassend hinsichtlich des pH-Wertes, der Temperatur und der Anfangskonzentration der Stickstoff-Quelle optimiert. Sowohl Substrat- als auch Produkthemmung für den Bioprozess wurden ermittelt. Im Rahmen der Entwicklung effizienter Nachdosierungsstrategien wurden folgende Möglichkeiten getestet: Batch, Repeated Batch, Fed-Batch, Repeated Fed-Batch und kontinuierliche Kultivierung. Als die günstigste Variante hinsichtlich der Effektivität der Citronensäureproduktion hat sich das Repeated Fed-Batch Verfahren erwiesen. Durch die Verlängerung der Produktbildungsphase mit Hilfe einer biosensorgestützten Substratnachdosierung sowie durch die Aneinanderreihung mehrerer Zyklen wurde eine 32%ige Steigerung der Effektivität der Citronensäureproduktion gegenüber dem einfachen Batch-Verfahren erreicht. In einem Repeated Fed-Batch-Langzeitversuch mit zehn Zyklen konnte nachgewiesen werden, dass die mikrobielle Aktivität des Hefestammes *Y. lipolytica* H222 für die Citronensäureproduktion unter den gewählten Bedingungen sehr stabil ist. Auch die Regelung des Prozesses mittels Glucosebiosensor und online-Messsystem funktionierte aufgrund der guten Langzeitstabilität des Sensors sehr gut. Darüber hinaus wurde der Einsatz von Stärkehydrolysaten (Glucosesirupen) im biosensorgesteuerten Prozess erfolgreich getestet.

Im zweiten Teil der Arbeiten wurde der Bioprozess mit dem rekombinanten Stamm *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 und Saccharose als Substrat untersucht. Die im ersten Teil der Arbeit ermittelten Bedingungen für den Wildtypstamm bei der Nutzung von Glucose als Substrat wurden an den rekombinanten Hefestamm und sein Substrat Saccharose angepasst. Umfangreiche Untersuchungen zur Substratverwertung des rekombinanten Stammes wurden durchgeführt. Verschiedene Nachdosierungsstrategien mit und ohne Biosensor-online-Regelung wurden getestet. Auch in diesem Fall konnte nachgewiesen werden, dass die Repeated Fed-Batch Kultivierungsmethode die günstigste Prozessführungsstrategie darstellt. Allerdings ist dieses Verfahren unter Nutzung des rekombinanten Stammes und Saccharose hinsichtlich der Kinetik des Bioprozesses für die Citronensäureproduktion deutlich schlechter

als es bei der Nutzung des Wildtypstammes und Glucose der Fall ist. Andererseits konnte eine Erhöhung der Selektivität des Bioprozesses für Citronensäure um 3-5 % durch die genetische Modifizierung im Bioprozess mit rekombinanter *Y. lipolytica* im Vergleich mit dem Wildtypstamm unter Nutzung von Glucose beobachtet werden.

Ein unsegregiertes und unstrukturiertes Modell für die Beschreibung des Bioprozesses der Citronensäureproduktion aus Glucose mit dem Wildtypstamm *Y. lipolytica* wurde entwickelt. Das Modell zeigt eine sehr gute Übereinstimmung mit gemessenen Daten.

Die Wirtschaftlichkeitsanalyse des alternativen Verfahrens der Citronensäureherstellung im Vergleich zum etablierten Herstellungsverfahren wurde in Auftrag gegeben. Es konnte gezeigt werden, dass das *Yarrowia*-Verfahren im Vergleich mit dem etablierten Verfahren mit *A. niger* auf der Basis von Melassen ökonomisch vorteilhafter ist und für die Zukunft die Methode der Wahl sein wird.

Die im Rahmen dieser Dissertation erreichten Ergebnisse füllen eine Lücke der bisherigen Untersuchungen zur Citronensäureherstellung mit der Hefe *Y. lipolytica*, indem

1. eine komplette Optimierung der Fermentationsbedingungen für das jeweilige Substrat und den jeweiligen Hefestamm durchgeführt wurde,
2. verschiedene Prozessführungsstrategien im halbtechnischen Maßstab getestet wurden,
3. das innovative Verfahren mit dem rekombinanten Stamm unter Verwendung von Saccharose als Substrat weiterentwickelt wurde.

Ein Beitrag wurde auch hinsichtlich der Entwicklung der Bioverfahrenstechnik per se geleistet, indem Biosensoren in der online-Regelung der Substratkonzentration angewendet wurden. Die hier erworbenen Ergebnisse können so auch auf andere Prozesse übertragen werden und für die Optimierung von biotechnologischen Verfahren im Sinne von „Process Analytical Technology“ (PAT) genutzt werden.

Es sollte allerdings noch untersucht werden, wie sich der Bioprozess der Citronensäureherstellung im technischen Maßstab verhält und ob auch dort eine Nutzung einer Biosensor-online-Regelung der Substratkonzentration möglich ist. Weiterhin wäre zu überprüfen, wie sich die Nutzung von Mischsubstraten bzw. Mischkulturen (Wildtypstamm und rekombinanter Stamm) unter Anwendung von Saccharose als Substrat auf die Kinetik des Bioprozesses auswirkt. Nicht zuletzt sollten weitere Untersuchungen zur Nutzung des rekombinanten Hefestammes und Saccharose als Substrat durchgeführt werden. Von besonderem Interesse wäre es, die Fructoseanreicherung zu minimieren.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- Abou-Zeid A-ZA, Ashy MA (1984) Production of Citric Acid: A Review. *Agricultural Wastes* 9, 51-76.
- Al-Abid MMR (2006) Dates Derived Industries. *J Agric Investment* 4, 67-73.
- Anastasiadis S, Aivasidis A, Wandrey C (2002) Citric acid production by *Candida* strains under intracellular nitrogen limitation. *Appl Microbiol Biotechnol* 60, 81-87.
- Anastasiadis S, Rehm H-J (2005) Continuous citric acid secretion by a high specific pH dependent active transport system in yeast *Candida oleophila* ATCC 20177. *El J Biotechnol* 8(2), 146-161.
- Anastasiadis S, Wandrey C, Rehm H-J (2005) Continuous citric acid fermentation by *Candida oleophila* under nitrogen limitation at constant C/N ratio. *World J Microbiol Biotechnol* 21, 695-705.
- Anastasiadis S, Rehm H-J (2006) Citric acid production from glucose by yeast *Candida oleophila* ATCC 20177 under batch, continuous and repeated batch cultivation. *El J Biotechnol* 9 (1) 26-39.
- Anastasiadis S, Morgunov IG, Kamzolova SV, Finogenova TV (2008) Citric Acid Production Patent Review, *Recent Patents on Biotechnology* 2, 107-123.
- Antonucci S, Bravi M, Bubbico R, Di Michele A, Verdone N (2001) Selectivity in citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Enzyme and Microbial Technology* 28, 189-195.
- Arts E, Kubicek CP, Röhr M (1987) Regulation of Phosphofructokinase from *Aspergillus niger*: Effect of Fructose 2,6-Bisphosphate on the Action of Citrate, Ammonium Ions and AMP. *Journal of General Microbiology* 133, 1195-1199.
- Arzumanov TE, Shishkanova NV, Finogenova TV (2000) Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeat-batch culture on ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 53, 525-529.
- Aurich A, Stottmeister U (2002) Gewinnung von Citronensäure aus nachwachsenden Rohstoffen mit *Yarrowia lipolytica*. *Chemie Ingenieur Technik* 74, 664.
- Aurich A, Stottmeister U, Mauersberger S, Förster A, Barth G (2002). Prozessintegrierter Umweltschutz bei der biotechnologischen Gewinnung von Citronensäure unter Verwendung genetisch modifizierter Hefen. 2. Zwischenbericht; Projekt des Sächsischen Staatsministeriums für Umwelt und Landwirtschaft (SMUL), AZ: 13-8811.61/89.
- Aurich A, Förster A, Mauersberger S, Barth G, Stottmeister U (2003a) Citric acid production from renewable resources by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Adv* 21, 454-455.
- Aurich A, Stottmeister U, Mauersberger S, Förster A, Barth G (2003b). Prozessintegrierter Umweltschutz bei der biotechnologischen Gewinnung von Citronensäure unter Verwendung genetisch modifizierter Hefen. 4. Zwischenbericht; Projekt des Sächsischen Staatsministeriums für Umwelt und Landwirtschaft (SMUL), AZ: 13-8811.61/89.
- Barth G, Gaillardin C (1997) Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Rev* 19, 219-237.
- Barth G, Beckerich JM, Dominguez A, Kerscher S, Ogrydziak D, Titorenko V, Gaillardin C (2003) Functional genetics of *Yarrowia lipolytica*. In: *Functional Genetics of Industrial Yeasts* (Hrsg. J. H. de Winde, S. Hohmann), Berlin, Heidelberg, New York. Springer-Verlag pp. 236-239.
- Behrens U, Schulze E, Weissbrodt E, Scheffel B (1981) Zur Kinetik der Nebenproduktbildung bei der Überproduktion von Citronensäure durch *Saccharomycopsis lipolytica*. *Acta Biotechnol* 2 (2), 171-177.

- Behrens U, Thiersch A, Weissbrodt E, Stottmeister U (1987) Particularities in the Kinetics of Growth and Citric-Acid Accumulation by *Saccharomycopsis lipolytica*. *Acta Biotechnol* 7 (2), 179-183.
- Berovic M, Legisa M (2007) Citric acid production. *Biotechnology Annual Review* 13, 303-343.
- Bizukoje M, Ledakowicz S (2004) The kinetics of simultaneous glucose and fructose uptake and product formation by *Aspergillus niger* in citric acid fermentation. *Process Biochemistry* 39, 2261-2268.
- Briffaud J, Engasser M (1979) Citric Acid Production from Glucose. I. Growth and Excretion Kinetics in a Stirred Fermentor. *Biotechnol Bioeng* XXI, 2083-2092.
- Briffaud J, Engasser M (1979) Citric Acid Production from Glucose. II. Growth and Excretion Kinetics in a Trickle Flow Fermentor. *Biotechnol Bioeng* XXI, 2093-2111.
- Brooks SL, Ashby RE, Turner APF, Calder MR, Clarke DJ (1987/88) Development of an On-line Glucose Sensor for Fermentation Monitoring. *Biosensors* 3, 45-56.
- Burgstaller W (2006) Thermodynamic boundary conditions suggest that a passive transport step suffices for citrate excretion in *Aspergillus* and *Penicillium*. *Microbiology* 152, 887-893.
- Chang CC, Ryu DDY, Park CS, Kim J-Y, Ogrydziak DM (1998) Recombinant bioprocess optimization for heterologous protein production using two-stage, cyclic fed-batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 49, 531-537.
- Crolla A, Kennedy KJ (2001) Optimization of citric acid production from *Candida lipolytica* Y-1095 using *n*-paraffin. *J Biotechnol* 89, 27-40.
- Crolla A, Kennedy KJ (2004) Fed-batch production of citric acid by *Candida lipolytica* grown on *n*-paraffins. *J Biotechnol* 110, 73-84.
- Diano A, Bekker-Jensen S, Dynesen J, Nielsen J (2006) Polyol Synthesis in *Aspergillus niger*: Influence of Oxygen Availability, Carbon and Nitrogen Sources on the Metabolism. *Biotechnol Bioeng* 94(5), 899-908.
- Does AL, Bisson LF (1989) Comparison of Glucose Uptake Kinetics in Different Yeasts. *J Bacteriol* 171/3, 1303-1308.
- Dunn IJ, Moor J-R (1975) Variable-Volume Continuous Cultivation. *Biotechnol Bioeng* XVII, 1805-1822.
- Enzminger JD, Asenjo JA (1986) Use of cell recycle in the aerobic fermentative production of citric acid by yeast. *Biotechnol Lett* 8 (1), 7-12.
- Finogenova TV, Shishkanova NV, Fausek EA, Eremina SS (1991) Biosynthesis of isocitric acid from ethanol by yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 36, 231-235.
- Finogenova TV, Kamzolova SV, Dedyukhina EG, Shishkanova NV, Il'chenko AP, Morgunov IG, Chernyavskaya OG, Sokolov AP (2002) Biosynthesis of citric and isocitric acid from ethanol by mutant *Yarrowia lipolytica* N1 under continuous cultivation. *Appl Microbiol Biotechnol* 59, 493-500.
- Förster A (2006) Die Nutzung der Hefe *Yarrowia lipolytica* zur Produktion von Citronensäure aus nachwachsenden Rohstoffen. Dissertation. TU Dresden.
- Förster A, Aurich A, Mauersberger S, Barth G (2007) Citric acid production from sucrose using a recombinant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 75/6, 1409-1417.
- Galitou-Panayotou M, Kalatzi O, Aggelis G (1998) Modelling of simultaneous production of polygalacturonase and exopolysaccharide by *Aureobasidium pullulans* ATHUM 2915. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73: 527-543. Zitiert nach Papanikolaou et al. (2006).

- Glazunova LM, Finogenova TV (1976) Enzyme activity of citrate, glyoxylate and pentose phosphate cycles during synthesis of citric acids by *Candida lipolytica*, Mikrobiologiya 45, 444-449.
- Goldberg I, Rokem JS, Pines O (2006) Organic acids: old metabolites, new themes. J Chem Technol Biotechnol 81, 1601-1611.
- Grewal HS, Kalra KL (1995) Fungal Production of Citric Acid. Biotechnol Adv 13 (2) 209-234.
- Gründig B, Strehlitz B, Kotte H, Ethner K (1993) Development of a process-FIA system using mediator-modified enzyme electrodes. J Biotechnol 31, 277-287.
- Heslot, H (1990) Genetics and genetic engineering of the industrial yeast *Yarrowia lipolytica*. Adv Biochem Eng/Biotechnol 43, 43-73.
- Hill HAO, Walton N-J, Higgins IJ (1981) Febs Lett. 126, 282. In Scheller F., Schubert F.: Biosensoren. Beiträge zur Forschung - Schriftenreihe für Experimentalmethodik, Systemanalyse und Instrumentierung in der naturwissenschaftlichen, medizinischen und technischen Forschung, Band 18 (1989) (Hrsg. D. Döring, G. Etzold, T. Köster, D. Schulze) Akademie-Verlag Berlin.
- Hirsch C.F. (1981) Microbiology. In: American Society for Microbiology (Hrsg. D. Schlessinger), Washington DC, 360-362.
- Iske U, Gwenner C, Bullmann M, Uhlenhut G-J, Schindler G (1983) Zur Kinetik der Mischsubstrat-utilisation bei der Citronensäureakkumulation durch *Saccharomycopsis lipolytica* EH 59. Acta Biotechnol 3, 143-153.
- Kamzolova SV, Shishkanova NV, Morgunov IG, Finogenova TV (2003) Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Yarrowia lipolytica*. FEMS Yeast Research 3, 217-222.
- Karaffa L, Kubicek CP (2003) *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box? Appl Microbiol Biotechnol 61, 189-196.
- Kautola H, Rymowicz W, Linko Y-Y, Linko P (1991) Production of citric acid with immobilized *Yarrowia lipolytica*. Appl Microbiol Biotechnol 35, 447-449.
- Kim BS, Lee SC, Lee SY, Chang HN, Chang YK, Woo SI (1994) Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with substrate control using on-line glucose analyzer. Enzyme Microb Technol 16, 556-561.
- Kim EK, Ambriano JR, Roberts RS (1987) Vigorous stationary phase fermentation. Biotechnol Bioeng 30, 805-808.
- Kim EK, Roberts RS (1991) Stable Fermentation of Citric Acid Using Immobilized *Saccharomycopsis lipolytica*. J Microbiol Biotechnol 1(2), 130-135.
- Kim EK, Roberts RS (1991) Rate Equations for the Vigorous Stationary Phase Fermentation of Citric Acid by *Saccharomycopsis lipolytica*. Biotech Bioeng 37, 985-988.
- Klasson KT, Ackerson MD, Clausen EC, Gaddy JL (1991) Modeling lysine and citric acid production in terms of initial limiting nutrient concentrations. J Biotechnol 21, 271-282.
- Kozlova TM, Medvedeva GA, Glazunova LM, Finogenova TV (1981) Structural changes in *Candida lipolytica* cells during citric acid biosynthesis. Mikrobiologiya 50 (3) 508-514.
- Kulakovskaya TV, Matyashova RN, Petrov RN, Kuranova EV (1994) ATPase of the plasma membrane of the yeast *Yarrowia lipolytica* is not involved in citrate excretion. Microbiology 63, 12-15. Zitiert nach Matthey (1999).
- Lee J, Lee SY, Park S, Middelberg APJ (1999) Control of fed-batch fermentations. Biotechnol Adv 17, 29-48.

- Lee W-J, Kim M-D, Ryu Y-W, Bisson LF, Seo J-H (2002) Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 60, 186-191.
- Legiša M, Matthey M (2007) Changes in primary metabolism leading to citric acid overflow in *Aspergillus niger*. *Biotechnol Lett* 29, 181-190.
- Lesniak W (1999) Fermentation Substrates. In : Citric Acid Biotechnology (Hrsg. B. Kristiansen, M. Matthey, J. Linden), Taylor & Francis: pp. 149-160.
- Lidgren L, Lilja O, Krook M, Kriz D (2006) Automatic fermentation control based on a real-time in situ SIRE[®] biosensor regulated glucose feed. *Biosens Bioelectron* 21, 2010-2013.
- Luedeking R, Piret EL (1959) A kinetic study of the lactic acid fermentation. *J Biochem Microbiol Technol Eng* 1, 393-412. Zitiert nach Klasson et al. 1991.
- Maddox IS, Kingston PJ (1983) Use of immobilized cells of the yeast, *Saccharomycopsis lipolytica*, for the production of citric acid. *Biotechnol Lett* 5(12), 795-798.
- Mathias J (2007) Abhängigkeit der Nebenproduktbildung bei der Kultivierung von *Yarrowia lipolytica* H222 von verschiedenen pH-Werten. Bachelorarbeit. Hochschule Anhalt (FH).
- Matthey M, Kristiansen B (1999) A Brief Introduction to Citric Acid Biotechnology. In : Citric Acid Biotechnology (Hrsg. B. Kristiansen, M. Matthey, J. Linden), Taylor & Francis: pp. 1-9.
- Matthey M (1999) Biochemistry of Citric Acid Production by Yeasts. In : Citric Acid Biotechnology (Hrsg. B. Kristiansen, M. Matthey, J. Linden), Taylor & Francis: pp. 33-54.
- McKay IA, Maddox IS, Brooks JD (1994) High specific rates of glucose utilisation under conditions of restricted growth are required for citric acid accumulation by *Yarrowia lipolytica* IMK 2. *Appl Microbiol Biotechnol* 41, 73-78.
- Mischak H, Kubicek CP, Röhr M (1984) Citrate Inhibition of Glucose Uptake by *Aspergillus niger*. *Biotechnol Lett* 6(7), 425-430.
- Moeller L, Strehlitz B, Aurich A, Zehnsdorf A, Bley T (2007) Optimization of Citric Acid Production from Glucose by *Yarrowia lipolytica*. *Eng Life Sci* 7(5), 504-511.
- Moeller L, Grünberg M, Zehnsdorf A, Strehlitz B, Bley T (2010) Semicontinuous Fermentation Methods for Citric Acid Production from Glucose by *Yarrowia lipolytica* Using Biosensor online Control, *Eng Life Sci*, in press.
- Moresi M (1994): Effect of Glucose concentration on Citric Acid Production by *Yarrowia lipolytica*. *J Chem Tech Biotechnol* 60, 387-395.
- Moresi M, Sappino F (2000) Electrodialytic recovery of some fermentation products from model solutions: techno-economic feasibility study. *J Membr Sci* 164, 129-140.
- Murphy RA, Horgan KA (2005) Antibiotics, Enzymes and Chemical Commodities from Fungi. In: Fungi. Biology and Applications (Hrsg. K. Kavanagh), John Wiley and Sons, Ltd., pp. 113-143.
- Mutzall K (1993) Einführung in die Fermentationstechnik, Behr's Verlag, Hamburg.
- Papagianni M (2007) Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger* : Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnol Adv* 25, 244-263.
- Papagianni M, Matthey M, Kristiansen B (1999) The influence of glucose concentration on citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* in batch and culture. *Enzyme Microb Technol* 25, 710-717.

- Papanikolaou S, Muniglia L, Chevalot I, Aggelis G, Marc I (2002) *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *J Appl Microbiol* 92, 737-744.
- Papanikolaou S, Aggelis G (2003) Modelling aspects of the biotechnological valorization of raw glycerol: production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* and 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *J Chem Technol Biotechnol* 78, 542-547.
- Papanikolaou S, Galiotou-Panayotou M, Chevalot I, Komaitis M, Marc I, Aggelis G (2006). Influence of glucose and saturated free-fatty acid mixtures on citric acid and lipid production by *Yarrowia lipolytica*. *Curr Microbiol* 52, 134-142.
- Papanikolaou S, Galiotou-Panayotou M, Fakas S, Komaitis M, Aggelis G (2007) Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. *Bioresource Technology* 99 (7), 2419-2428.
- Peksel A, Thores NV, Liu J, Kubicek CP (2002) ¹³C-NMR analysis of glucose metabolism during citric acid production by *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* 58, 157-163.
- Peters D (2006) Kohlenhydrate als Fermentationsrohstoff, *Chemie Ingenieur Technik* 78 (3) 229-238.
- Rane KD, Sims KA (1993) Production of citric acid by *Candida lipolytica* Y1095 : Effect of glucose concentration on yield and productivity. *Enzyme Microb Technol* 15, 646-651.
- Rane KD, Sims KA (1994) Oxygen uptake and citric acid production by *Candida lipolytica* Y1095. *Biotechnol Bioeng* 43, 131-137.
- Rane KD, Sims KA (1995) Citric Acid Production by *Candida lipolytica* Y 1095 in Cell Recycle and Fed-Batch Fermentors. *Biotechnol Bioeng* 46, 325-332.
- Renneberg R, Trott-Kriegeskorte G, Lietz M, Jiiger V, Pawlowa M, Kaiser G, Wollenberger U, Schubert F, Wagner R, Schmid RD, Scheller FW (1991) Enzyme sensor-FIA-system for on-line monitoring of glucose, lactate and glutamine in animal cell cultures. *J Biotechnol* 21, 173-186.
- Roehr M, Kubicek CP, Komínek J (1996) Citric Acid. In *Biotechnology, Volume 6 (Products of secondary metabolism)* (Hrsg. H.-J. Rehm, G. Reed), VCH, pp. 307-345.
- Rymowicz W, Kautola H, Wojtatowicz M, Linko Y-Y, Linko P (1993) Studies on citric acid production with immobilized *Yarrowia lipolytica* in repeated batch and continuous air-lift bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol* 39, 1-4.
- Rymowicz W, Lenart D (2004) Wpływ natlenienia na wzrost i biosyntezę kwasu cytrynowego z syropu glukozowego przez mutant octanowego *Yarrowia lipolytica* (The effect of aeration on the growth and the production of citric acid by acetate mutant of *Yarrowia lipolytica* from glucose syrup). *Biotechnologia* 3 (1-2), 67-74.
- Rymowicz W, Cibis E (2006) Optimization of citric acid production from glucose syrup by *Yarrowia lipolytica* using response surface methodology. *EJPAU* 9/1, 1-11.
- Rymowicz W, Rywinska A, Żarowska B (2007) Biosynthesis of citric acid from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* in repeated-batch cultivations. *J Biotechnol* 131S, S133-S187.
- Rywinska A, Wojtatowicz M, Żarowska B, Rymowicz W (2008) Biosynthesis of citric acid by yeast *Yarrowia lipolytica* A-101-1.31 under repeated batch cultivation. *EJPAU* 11(1) Nr. 07.
- Sauer M, Porro D, Mattanovich D, Branduardi P (2007) Microbial production of organic acids : expanding the markets. *Trends in Biotechnology* 26 (2), 100-108.
- Scheller F, Schubert F (1989) Biosensoren. Beiträge zur Forschung - Schriftenreihe für Experimentalmethodik, Systemanalyse und Instrumentierung in der naturwissenschaftlichen,

medizinischen und technischen Forschung, Band 18 (Hrsg. D. Döring, G. Etzold, T. Köster, D. Schulze), Akademie-Verlag Berlin, pp. 6-81.

Schmid R.D. (2003) Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik, WILEY-VCH, Weinheim.

Shah DN, Chattoo BB, Kothari RM, Hegde MV (1993) Starch Hydrolysate, an Optimal and Economical Source of Carbon for the Secretion of Citric Acid by *Yarrowia lipolytica* (DS-1). *Starch/Stärke* 45/3, 104-109.

Soccol CR, Vandenberghe LPS, Rodrigues C, Pandey A (2006) New Perspectives for Citric Acid Production and Application. *Food Technol Biotechnol* 44 (2), 141-149.

Sokolov DM, Solodovnikova NY, Sharyshev AA, Finogenova TV (1996) The role of phosphofructokinase in regulation of citric acid biosynthesis by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied Biochemistry and Microbiology* 32, 286-290. Zitiert nach Matthey (1999).

Steinböck F, Choojun S, Held I, Roehr M, Kubicek CP (1994) Characterization and regulatory properties of a single hexokinase from the citric acid accumulating fungus *Aspergillus niger*. *Biochim Biophys Acta* 1200, 215-223.

Storhas W (2003) Stoffumwandlung. In: Bioverfahrensentwicklung (Hrsg. W. Storhas), Wiley-VCH Verlag, pp. 351-388.

Stottmeister U (1979) Kontinuierliche Citronensäuresynthese mit in Polyacrylamidgel immobilisierten *Candida lipolytica*-Zellen. *Z Allg Microbiol* 19, 763-765.

Stottmeister U, Hoppe K (1991) Organische Genusssäuren. In: Lebensmitteltechnologie (Hrsg. Ruttloff), Akademie-Verlag, Berlin.

Stottmeister U, Aurich A, Förster A, Mauersberger S, Barth G (2001) Prozessintegrierter Umweltschutz bei der biotechnologischen Gewinnung von Citronensäure unter Verwendung genetisch modifizierter Hefen. Projektantrag; Projekt des Sächsischen Staatsministeriums für Umwelt und Landwirtschaft (SMUL), AZ: 13-8811.61/89.

Stottmeister U (2003) Fallbeispiel 2: Möglichkeiten der Prävention bei der biotechnologischen Zitronensäuresynthese. In: Biotechnologie zur Umweltentlastung (Ed. U Stottmeister), B. G. Teubner Verlag / GWV Fachverlage GmbH, Wiesbaden: pp. 300-305.

Šilhánková L (1995) Kvasinky. In: Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology (Hrsg. L. Šilhánková), Victoria Publishing, 294-305.

Thiersch A (1987) Untersuchungen zur Zwei-Substrat-Citronensäureüberproduktion mit der Hefe *Yarrowia lipolytica*. Dissertation. Universität Leipzig.

Torres NV, Riol-Cimas JM, Wolschek M, Kubicek CP (1996) Glucose transport by *Aspergillus niger*: the low-affinity carrier is only formed during growth on high glucose concentrations. *Appl Microbiol Biotechnol* 44, 790-794.

Tréton B, Le Dall M-T, Heslot H (1978) Excretion of Citric and Isocitric Acid by the Yeast *Saccharomycopsis lipolytica*. *European J Appl Microbiol Biotechnol* 6, 67-77.

Tsao GT, Cao NJ, Du J, Gong CS. 1999. Production of multifunctional organic acids from renewable resources. In: *Adv Biochem Eng/Biotechnol* Vol. 65, GT Tsao (Hrsg.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York: pp. 243-280.

Velíšek J (1999) Chemie potravin, Teil 3. OSSIS, pp. 65 und 181.

Vodrážka Z (1992) Sacharidy a jejich metabolismus. In: *Biochemie* [2] (Hrsg. Z. Vodrážka), ADADEMIA Praha, pp. 39-62.

Vrbová T. (2001) E330 Kyselina citronová. In Víme co jíme? aneb: Průvodce "Éčky" v potravinách (Hrsg: T. Vrbová), Eco House, 129-130.

Wayman F, Meng Amy HA, Kristiansen B: Modelling the Fermentation Process. In Citric Acid Biotechnology. Taylor & Francis 1999.

Wentworth SD, Cooper DG (1996) Self-Cycling Fermentation of a Citric Acid Producing Strain of *Candida lipolytica*. J Ferm Bioeng 81(5), 400-405.

Wojtatowicz M, Rymowicz W, Kautola H (1991) Comparison of Different Strains of the Yeast *Yarrowia lipolytica* for Citric Acid Production from Glucose Hydrol. Appl Biochem Biotechnol 31, 165-174.

Wojtatowicz M, Rymowicz W, Robak M, Żarowska B, Nicaud J-M (1997) Kinetics of cell growth and citric acid production by *Yarrowia lipolytica* SUC⁺ transformants in sucrose media. Pol J Food Nutri Sci 6/47 (4) 49-54.

Wolschek MF, Kubicek CP (1999) Biochemistry of Citric Acid Accumulation by *Aspergillus niger*. In : Citric Acid Biotechnology (Hrsg. B. Kristiansen, M. Matthey, J. Linden), Taylor & Francis: pp. 11-32.

Żarowska B, Wojtatowicz M, Rymowicz W, Robak M (2001) Production of citric acid on sugar beet molasses by single and mixed cultures of *Yarrowia lipolytica*. EJPAU 4 (2) available online <http://www.ejpau.media.pl>

<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/yarro.htm>

6 ANLAGEN

A.	Verzeichnis der Abbildungen.....	153
B.	Verzeichnis der Tabellen.....	157
C.	Thesen	159
D.	Lebenslauf.....	161
E.	Liste der Publikationen zum Thema	163
F.	Danksagung.....	165
G.	Erklärung.....	167
H.	Datenblätter zu den Abbildungen.....	168
I.	Wirtschaftlichkeitsbetrachtung für die Citronensäureherstellung aus Kohlenhydraten mit <i>Yarrowia lipolytica</i>	180

A. VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abbildung 1:	Strukturformeln von Citronensäure und Isocitronensäure	2
Abbildung 2:	Mikroskopische Aufnahme von <i>Yarrowia lipolytica</i> H222 im Medium nach THIERSCH (1987) mit Glucose als Kohlenstoffquelle. 100x vergrößert.....	12
Abbildung 3:	Vereinfachtes Modell zur Darstellung des Metabolismus bei der Überproduktion von Citronensäure in Pilzen	17
Abbildung 4:	Schema eines der Bioreaktoren der Versuchsanlagen Sixfors und Multifors	29
Abbildung 5:	Schema der Versuchsanlage für die Fed-Batch-Fermentation mit einer Glucose-online-Messung und -Regelung mit Hilfe eines FIA-Biosensor-Messsystems	30
Abbildung 6:	Kalibriergerade für Biotrockenmassebestimmung von <i>Y. lipolytica</i> H222..	34
Abbildung 7:	Beispiel einer Batch-Kultivierung: Konzentrationen der Substrate (Glucose, Ammonium-Stickstoff), Biomasse und Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure)	51
Abbildung 8:	Respiratorischer Quotient und Konzentrationen von Sauerstoff und Kohlendioxid in der Abluft (A) sowie Rührerdrehzahl und Gelöstsauerstoff (pO ₂) (B) im Laufe des zweiten Zyklus einer Repeated Fed-Batch Kultivierung.....	51
Abbildung 9:	Produktbildungsrate (A) und Selektivität des Bioprozesses für Citronensäure (B) im Laufe einer Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> H222 aus Glucosesirup von Fa. Südzucker AG	54
Abbildung 10:	Einfluss der Temperatur auf die maximale spezifische Wachstumsrate $\mu_{\max}$ von <i>Y. lipolytica</i> H222 beim Wachstum auf Glucose.	57
Abbildung 11:	Einfluss des pH-Wertes auf die maximale spezifische Wachstumsrate $\mu_{\max}$ von <i>Y. lipolytica</i> H222	58
Abbildung 12:	Einfluss der Anfangskonzentration von Ammoniumsulfat auf die Biomassebildung und die Produktbildung (Ausbeute, Produktivitäten) im Bioprozess zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> H222 aus Glucose.....	61
Abbildung 13:	Einfluss der Anfangskonzentration von Ammoniumsulfat auf die Biomassebildung von <i>Y. lipolytica</i> H222	63
Abbildung 14:	Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> H222 aus Glucose: Konzentrationen der Substrate (Glucose, Ammonium-Stickstoff), Biomasse und Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure).....	68
Abbildung 15:	Fed-Batch Kultivierung mit konstanter Fütterungsrate mit <i>Y. lipolytica</i> H222: Verlauf der Konzentrationen der Substrate (Glucose, Ammonium-Stickstoff), Biomasse und Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure)	72
Abbildung 16:	Fed-Batch Kultivierung mit biosensorgestützter Substratnachdosierung mit <i>Y. lipolytica</i> H222 bei konstanter Glucosekonzentration von 20 g/L: Verlauf der Konzentrationen von Ammonium-Stickstoff, Biomasse und Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure).....	72
Abbildung 17:	Biosensorgestützte Fed-Batch Kultivierung mit konstanter Glucosekonzentration von 30 g/L mit <i>Y. lipolytica</i> H222: Verlauf der Konzentration von Glucose, gemessen mit Glucosebiosensor und einem Enzymtest	74

Abbildung 18:	Biosensorgestützte Fed-Batch Kultivierung mit konstanter Glucosekonzentration von 20 g/L mit <i>Y. lipolytica</i> H222: Verlauf der Konzentration von Glucose, gemessen mit Glucosebiosensor und einem Enzymtest.....	75
Abbildung 19:	Biosensorgestützte Fed-Batch Kultivierung mit konstanter Glucosekonzentration von 10 g/L mit <i>Y. lipolytica</i> H222: Verlauf der Konzentration von Glucose, gemessen mit Glucosebiosensor und einem Enzymtest.....	75
Abbildung 20:	Biosensorgestützte Fed-Batch Kultivierung mit konstanter Glucosekonzentration von 1 g/L mit <i>Y. lipolytica</i> H222: Verlauf der Konzentration von Glucose, gemessen mit Glucosebiosensor und einem Enzymtest.....	76
Abbildung 21:	Kontinuierliche Kultivierung mit biosensorgestützter Substratnachdosierung mit <i>Y. lipolytica</i> H222 bei konstanter Glucosekonzentration von 10 g/L: Verlauf der Konzentrationen von Ammonium-Stickstoff, der Biomasse und Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure).....	78
Abbildung 22:	Biosensorgestützte kontinuierliche Kultivierung mit konstanter Glucosekonzentration von 10 g/L mit <i>Y. lipolytica</i> H222: Verlauf der Konzentration von Glucose, gemessen mit Glucosebiosensor und einem Enzymtest.....	80
Abbildung 23:	Biosensorgestützte kontinuierliche Kultivierung mit konstanter Glucosekonzentration von 5 g/L mit <i>Y. lipolytica</i> H222: Verlauf der Konzentration von Glucose, gemessen mit Glucosebiosensor und einem Enzymtest.....	80
Abbildung 24:	Repeated Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> H222: Verlauf der Konzentrationen der Substrate (Glucose, Ammonium-Stickstoff) und Biomasse.....	84
Abbildung 25:	Repeated Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> H222: Verlauf der Konzentrationen der Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure)	85
Abbildung 26:	Fed-Batch Kultivierung I zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> H222: Verlauf der Konzentrationen der Biomasse, NH ₄ -N und Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure).....	87
Abbildung 27:	Fed-Batch Kultivierung II zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> H222: Verlauf der Konzentrationen der Biomasse, Substrate (Glucose und NH ₄ -N) und Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure).....	87
Abbildung 28:	Fed-Batch Kultivierung I zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> H222: Verlauf der Konzentration von Glucose, gemessen mit dem Glucosebiosensor und einem Enzymtest.....	89
Abbildung 29:	Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> H222: Verlauf der Konzentrationen der Biomasse und Substrate (Glucose und NH ₄ -N) (A) und der Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure) (B).....	90
Abbildung 30:	Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> H222 - Langzeitversuch: Verlauf der Konzentrationen der Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure).....	93
Abbildung 31:	Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> H222 - Langzeitversuch: Verlauf der Konzentrationen von Glucose, gemessen mit Glucosebiosensor und einem Enzymtest.....	93

Abbildung 32:	Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> H222 - Langzeitversuch: Konzentrationen von Citronensäure in den einzelnen Zyklen nach 48 Stunden Zykluszeit und Selektivität des Bioprozesses für Citronensäure in den einzelnen Zyklen nach 48 Stunden Zykluszeit	94
Abbildung 33:	Vergleich der Effektivität des Bioprozesses bezüglich Citronensäureproduktion in Batch, Fed-Batch und Repeated Fed-Batch Modi	95
Abbildung 34:	Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> H222 aus Glucosesirup von Südzucker AG: Verlauf der Konzentrationen der Biomasse, Substrate (Glucose und $\text{NH}_4\text{-N}$) und Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure).	102
Abbildung 35:	Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> H222 aus Glucosesirup von Südzucker AG: Verlauf der Konzentration von Glucose, gemessen mit Glucosebiosensor und einem Enzymtest.	103
Abbildung 36:	Verlauf der Konzentrationen von Glucose, Fructose und Saccharose in Batch Kultivierungen mit Glucose (Versuch A) bzw. Fructose (Versuch B) (A) bzw. Saccharose (Versuch D) (B) als alleiniger Kohlenstoffquelle.	105
Abbildung 37:	Verlauf der Konzentrationen von Glucose, Fructose und Saccharose in Batch Kultivierungen unter Verwendung von Saccharose und Glucose (Versuch F) (A) bzw. Saccharose und Fructose (Versuch H) (B) als Mischsubstratansätze.	107
Abbildung 38:	Verlauf der Konzentrationen von Glucose, Fructose und Saccharose in Batch Kultivierungen unter Verwendung von Saccharose, Glucose und Fructose mit der Konzentration von je 23 g/L (Versuch J) (A) bzw. je 33 g/L (Versuch I) (B) als Mischsubstratansätze.	108
Abbildung 39:	Verlauf der Konzentrationen von Glucose, Fructose und Saccharose in Batch Kultivierungen unter Verwendung von 50 g/L Saccharose und 5 g/L (A) bzw. 85 g/L (B) Fructose als Mischsubstratansätze.	110
Abbildung 40:	Substrathemmung: Verlauf der Konzentration von Citronensäure in Batch Kultivierungen unter Verwendung von verschiedenen Saccharosestartkonzentrationen.	113
Abbildung 41:	Langzeitstabilität der Hefe <i>Y. lipolytica</i> für die Citronensäureproduktion. Citronensäureendkonzentrationen in ausgewählten Zyklen der Repeated Batch Kultivierungen von <i>Y. lipolytica</i> H222 bzw. <i>Y. lipolytica</i> H222-S4(p67ICL1)T5 aus Glucose (GL) bzw. Saccharose (SA) mit (PP) oder ohne Zugabe von Proteosepepton.	115
Abbildung 42:	Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> H222-S4(p67ICL1)T5 aus Saccharose mit online-Regelung mit Hilfe eines Saccharosebiosensors: Verlauf der Konzentrationen der Saccharose, Glucose und Fructose (A) und der Biomasse, des Ammonium-Stickstoffs sowie der Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure) (B).	120
Abbildung 43:	Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> H222-S4(p67ICL1)T5 aus Saccharose mit einer online-Regelung auf Basis eines Saccharosebiosensors: Verlauf der Konzentration von Saccharose, gemessen mit Saccharosebiosensor und einem Enzymtest.	120

Abbildung 44:	Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> H222-S4(p67ICL1)T5 aus invertierter Saccharose mit online-Regelung mit Hilfe eines Glucosebiosensors: Verlauf der Konzentrationen der Saccharose, Glucose und Fructose (A) und der Biomasse, des Ammonium-Stickstoffs sowie der Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure) (B).....	122
Abbildung 45:	Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> H222-S4(p67ICL1)T5 aus Saccharose mit online-Regelung mit Hilfe eines Glucosebiosensors: Verlauf der Konzentration von Glucose, gemessen mit Glucosebiosensor und einem Enzymtest.....	122
Abbildung 46:	Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> H222-S4(p67ICL1)T5 aus Saccharose mit manueller Substratzufuhr: Verlauf der Konzentrationen der Saccharose, Glucose und Fructose (A) und der Biomasse, des Ammonium-Stickstoffs sowie der Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure) (B).	124
Abbildung 47:	Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> H222-S4(p67ICL1)T5 aus Saccharose mit online-Regelung mit Hilfe eines Saccharosebiosensors: Verlauf der Konzentrationen der Saccharose, Glucose und Fructose.....	128
Abbildung 48:	Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> H222-S4(p67ICL1)T5 aus Saccharose: Verlauf der Konzentration von Saccharose, gemessen mit Saccharosebiosensor und einem Enzymtest im Laufe der ersten drei Zyklen.	129
Abbildung 49:	Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> H222-S4(p67ICL1)T5 aus Saccharose mit online-Regelung mit Hilfe eines Saccharosebiosensors: Verlauf der Konzentrationen des Ammonium-Stickstoffs, der Biomasse und der Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure).	130
Abbildung 50:	Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> H222-S4(p67ICL1)T5 aus Saccharose unter Verwendung von programmgesteuerter Nachdosierung: Verlauf der Konzentrationen der Saccharose, Glucose und Fructose.....	132
Abbildung 51:	Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> H222-S4(p67ICL1)T5 aus Saccharose unter Verwendung von programmgesteuerter Nachdosierung: Verlauf der Konzentrationen des Ammonium-Stickstoffs, der Biomasse und der Produkte (Citronensäure und Isocitronensäure).	133
Abbildung 52:	Vergleich der Citronensäurebildung des rekombinanten Stammes <i>Y. lipolytica</i> H222-S4(p67ICL1)T5 zum Wildtypstamm <i>Y. lipolytica</i> H222 auf Saccharose bzw. Glucose: die Citronensäureproduktion in jeweils zwei Zyklen der Repeated-Fed-Batch Kultivierungen (A) und Selektivität des Bioprozesses für Citronensäure in ersten Zyklen der gleichen Fermentationen (B)	135
Abbildung 53:	Modell einer Batch-Kultivierung (s. Kap. 3.3.1.1) zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> H222 aus Glucose: experimentelle Daten vs. simulierte Kurven.....	137
Abbildung 54:	Modell einer Fed-Batch Kultivierung (s. Kap. 3.3.2.3) zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> H222 aus Glucose: experimentelle Daten vs. simulierte Kurven.....	140

B. VERZEICHNIS DER TABELLEN

Tabelle 1:	Beispiele citronensäurebildender Mikroorganismen.....	5
Tabelle 2:	Readermedium für Hefen (Medium für Stammhaltung von <i>Y. lipolytica</i>).....	26
Tabelle 3:	Vorkultur- und Produktionsmedium.....	27
Tabelle 4:	Trennparameter in der Ionenchromatographie	32
Tabelle 5:	Startkonzentrationen von Saccharose, Glucose und Fructose in Versuchen zur Untersuchung der Substratverwertung durch genetisch modifizierter <i>Yarrowia lipolytica</i> H222-S4(p67ICL1)T5.....	42
Tabelle 6:	Übersicht der Versuchsanordnung zur Untersuchung der Langzeitstabilität des rekombinanten Stammes und des Wildtypstammes von <i>Y. lipolytica</i>	44
Tabelle 7:	Differenzialgleichungen des Modells zur Beschreibung der Batch und Fed-Batch Kultivierungen der Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> aus Glucose.....	47
Tabelle 8:	Ermittelte Parameter aus der Temperaturoptimierung des Bioprozesses zur Produktion von Citronensäure aus Glucose mit <i>Y. lipolytica</i> H222.....	58
Tabelle 9:	Ermittelte Parameter aus der pH-Optimierung des Bioprozesses zur Citronensäureproduktion aus Glucose mit <i>Y. lipolytica</i> H222.....	59
Tabelle 10:	Parameter der Optimierung der Stickstoffkonzentration während des Bioprozesses zur Produktion von Citronensäure aus Glucose mit <i>Y. lipolytica</i> H222.....	62
Tabelle 11:	Substrathemmung - Parameter des Bioprozesses zur Produktion von Citronensäure aus Glucose mit <i>Y. lipolytica</i> H222.....	65
Tabelle 12:	Produkthemmung - Parameter des Bioprozesses zur Produktion von Citronensäure aus Glucose mit <i>Y. lipolytica</i> H222.....	66
Tabelle 13:	Parameter der Citronensäurebildung aus Glucose mit <i>Y. lipolytica</i> H222 in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration im Medium in Kultivierungen mit (biosensorgesteuerter) Substratnachdosierung.....	71
Tabelle 14:	Vergleich der einzelnen Methoden der Glucosemessung (Glucosebiosensor und Enzymtest) untereinander und mit dem Sollwert	73
Tabelle 15:	Parameter der Batch und Fed-Batch Kultivierungen zur Citronensäureproduktion aus Glucose mit <i>Y. lipolytica</i> H222	83
Tabelle 16:	Parameter einzelner Zyklen einer Repeated Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung aus Glucose mit <i>Y. lipolytica</i> H222.....	83
Tabelle 17:	Parameter einzelner Zyklen der Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung aus Glucose mit <i>Y. lipolytica</i> H222.....	96
Tabelle 18:	Parameter einzelner Zyklen der Repeated Fed-Batch Langzeitkultivierung zur Citronensäureherstellung aus Glucose mit <i>Y. lipolytica</i> H222.....	97
Tabelle 19:	Kinetische Parameter der Citronensäureproduktion bei der Auswahl des geeigneten Glucosesirups für die Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> H222.....	100
Tabelle 20:	Parameter der Produktbildung in Versuchen zur Ermittlung des Einflusses des pH-Wertes sowie der Anwesenheit von Proteosepepton für den Bioprozess zur Citronensäureproduktion aus Saccharose mit <i>Y. lipolytica</i> H222-S4(p67ICL1)T5.....	111
Tabelle 21:	Substrathemmung - Parameter des Bioprozesses zur Produktion von Citronensäure aus Saccharose mit <i>Y. lipolytica</i> H222-S4(p67ICL1)T5.....	112
Tabelle 22:	Parameter einzelner Zyklen der Repeated Batch Langzeitkultivierung zur Citronensäureherstellung aus Saccharose mit <i>Y. lipolytica</i> H222-S4(p67ICL1)T5 mit Zugabe von 0,4 g/L Proteosepepton.....	117

Tabelle 23:	Parameter einzelner Zyklen der Repeated Batch Langzeitkultivierung zur Citronensäureherstellung aus Saccharose mit <i>Y. lipolytica</i> H222-S4(p67ICL1)T5 ohne Zugabe von Proteosepepton.	117
Tabelle 24:	Parameter einzelner Zyklen der Repeated Batch Langzeitkultivierung zur Citronensäureherstellung aus Glucose mit <i>Y. lipolytica</i> H222-S4(p67ICL1)T5.	118
Tabelle 25:	Parameter einzelner Zyklen der Repeated Batch Langzeitkultivierung zur Citronensäureherstellung aus Glucose mit <i>Y. lipolytica</i> H222.	118
Tabelle 26:	Parameter der Fed-Batch Kultivierungen zur Citronensäureproduktion aus Saccharose mit <i>Y. lipolytica</i> H222-S4(p67ICL1)T5.	125
Tabelle 27:	Parameter einzelner Zyklen einer biosensorgesteuerten Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung aus Saccharose mit <i>Y. lipolytica</i> H222-S4(p67ICL1).	125
Tabelle 28:	Parameter einzelner Zyklen einer programmgesteuerten Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung aus Saccharose mit <i>Y. lipolytica</i> H222-S4(p67ICL1).	126
Tabelle 29:	Vergleich verschiedener Modelle zur Beschreibung einer ausgewählten Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> aus Glucose.	138
Tabelle 30:	Fehlerquadratsumme einzelner Modelle zur Begutachtung ihrer Eignung zur Beschreibung einer ausgewählten Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> aus Glucose.	139
Tabelle 31:	Modell einer ausgewählten Fed-Batch Fermentation zur Citronensäureherstellung mit <i>Y. lipolytica</i> aus Glucose.	139
Tabelle 32:	Invest-/Produktionskostenschätzung - Vergleich <i>Aspergillus</i> - vs. <i>Yarrowia</i> -Verfahren zur Herstellung von Citronensäure	142

C. THESEN

1. Die Citronensäure ist eine bedeutende Chemikalie, die rein biotechnologisch hergestellt wird. Der Verbrauch von Citronensäure steigt stetig an, womit die Probleme der bestehenden Herstellungstechnologie mit dem Schimmelpilz *Aspergillus niger* aus Zuckermelassen besonders im Hinblick auf die Umweltverschmutzung immer dringender nach Lösungen rufen.
2. Eine alternative, umweltfreundlichere, Methode der Citronensäureherstellung stellt das Verfahren mit der Hefe *Yarrowia lipolytica* aus nachwachsenden Rohstoffen dar. Ziel der Arbeit war es, dieses Verfahren unter Einsatz von Biosensoren zu optimieren.
3. Das pH-Optimum für die Wachstums- und Produktionsbedingungen der Citronensäureherstellung liegt bei 6,0 beim Wildtypstamm *Yarrowia lipolytica* H222 und Glucose als Substrat und bei 7,0 beim rekombinanten Stamm *Yarrowia lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 und Saccharose als Substrat. Die optimale Temperatur ist in beiden Fällen 30 °C. Die optimale Startkonzentration der Stickstoffquelle liegt für beide Bioprozesse bei 5,56 g/L (NH₄)₂SO₄.
4. Beide Substrate, Glucose und Saccharose, verursachen eine Substrathemmung. Bei Glucose wird die Wachstumsrate bei Konzentrationen von 200 g/L Glucose stark gehemmt, bei Saccharose erfolgt die Inhibierung der Citronensäureproduktion erst bei Konzentrationen von 250 g/L Saccharose.
5. Bei 120 g/L Citronensäure tritt eine starke hemmende Wirkung von Citronensäure auf die Produktbildung im Bioprozess mit Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle auf.
6. Die Glucosekonzentration kann in Zulaufverfahren sehr gut mittels Glucosebiosensoren und online-Messgerät geregelt werden, die optimale Soll-Konzentration liegt bei 20 g/L Glucose.
7. Das Repeated Fed-Batch Verfahren ist die am besten geeignete Prozessführungsstrategie für die Citronensäureherstellung aus Glucose mit *Yarrowia lipolytica* H222, verglichen mit Batch, Repeated Batch, Fed-Batch und kontinuierlicher Prozessführung.
8. Der Mikroorganismus *Yarrowia lipolytica* H222 ist stabil in der Langzeitkultivierung einer Repeated Fed-Batch Kultivierung mit einer Versuchsdauer von 23 Tagen und 10 Zyklen.
9. Das Biosensor-online-Messsystem mit Glucosebiosensor ist robust und gut geeignet für Langzeitkultivierungen mit einer Laufzeit von 23 Tagen.

10. Für die Citronensäureherstellung mit *Yarrowia lipolytica* H222 eignen sich gut auch Glucosesirupe als Substrat. Für die automatische Nachdosierung des Glucosesirups kann das Biosensor-online-Messsystem mit Glucosebiosensor genutzt werden.
11. Die Saccharose wird von dem extrazellulären Enzym Invertase, das von der rekombinanten Hefe *Yarrowia lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 produziert wird, in ihre Monomere Glucose und Fructose gespalten. Die Aufnahme dieser Monosaccharide erfolgt nicht parallel, Glucose wird vor Fructose bevorzugt aufgenommen und verwertet.
12. Die biosensorgestützte Substratnachdosierung unter Verwendung von Glucose- und Saccharosebiosensoren ist für die Citronensäureherstellung aus Saccharose mit dem rekombinanten Hefestamm *Yarrowia lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 nicht geeignet.
13. Die optimale Prozessführung für die Citronensäureherstellung aus Saccharose mit *Yarrowia lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 ist das Repeated Fed-Batch Verfahren mit programmgesteuerter Substratnachdosierung. Die Langzeitstabilität des rekombinanten Stammes sollte allerdings näher untersucht werden.
14. Ein neues Modell beschreibt die Prozesse der Batch- und Fed-Batch Kultivierungen zur Citronensäureherstellung aus Glucose mit *Yarrowia lipolytica* H222. Es entstand nach dem Test verschiedener Modelle aus der Literatur und ihrer Eignungsprüfung mittels Fehlerquadratsumme.
15. Die Citronensäureherstellung mit der Hefe *Yarrowia lipolytica* unter Nutzung kohlenhydrathaltiger Substrate zeigt große Potenziale im Vergleich zum derzeit genutzten Herstellungsverfahren mit dem Schimmelpilz *Aspergillus niger*. Laut der Wirtschaftlichkeitsbetrachtung, die von einem externen unabhängigen Gutachter erstellt wurde, sind große Einsparungen im Bereich der Investitions- und Betriebskosten aufgrund der Senkung des Energiebedarfs und der Erhöhung der Produktivität des Herstellungsprozesses zu erzielen.

D. LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Lucie Moeller (geb. Pechová)
Geburtsdatum: 24. 07. 1980
Familienstand: verheiratet (2 Kinder)
Staatsangehörigkeit: tschechisch

Ausbildung

1986-1991 Grundschule in Dušejov, CZ
1991-1998 Gymnasium in Jihlava, CZ
05/1998 **Abitur**
1998-2002 **Grundstudium Chemie**
 Universität für Chemie und Technologie in Prag (Technická 5, CZ-
 166 28 Praha 6 - Dejvice), Fakultät für Lebensmittel- und
 biochemische Technologie
2002-2004 **Fachstudium Chemie**
 Fachrichtung: Naturstoffchemie
06/2004 **Abschluß** – Diplom-Ingenieurin, Prädikat: ausgezeichnet
01/2005-09/2009 **Doktorandin**
 TU-Dresden, Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik
 (Bergstraße 120, D-01069 Dresden)

Praktische Erfahrungen

10/2001 - 07/2002 **Praktikum** (Stipendium: Socrates-Erasmus Programm)
 Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH (D-04318 Leipzig,
 Permoserstr. 15), Department: Sanierungsforschung
 Thema: Einfluß des pH-Wertes auf Mobilisierung des Arsens in einem
 Tailingmaterial unter aeroben und anaeroben Bedingungen
10/2002 - 06/2004 **Studentin (Diplomarbeit)**
 Tschechische Akademie der Wissenschaften (CZ – 166 10 Praha 6 –
 Dejvice, Flemingovo náměstí 2), Institut für Organische Chemie und
 Biochemie, Abteilung Naturstoffe
 Thema der Diplomarbeit: Die Synthese der Glukuronate und Glukoside
 der 2-substituierten Cyklohexanole

- 06/2004 - 07/2004 **Praktikum** (Stipendium: IAESTE)
 Universität in Maribor (SI – 2000 Maribor, Smetanova 17), Fakultät für
 Chemie und Chemische Technologie, Laboratorium für Organische und
 Polymerische Chemie und Technologie
 Thema: Mechanismus des Bildungsprozesses von polymeren
 asymmetrischen Porösmembranen
- 01/2005-09/2009 **Doktorandin** (Stipendium: Deutsche Bundesstiftung Umwelt)
 Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (D-04318 Leipzig, Permoserstr.
 15), Department: Umwelt- und Biotechnologisches Zentrum
 Thema: Biosensorgestützte Optimierung der Citronensäureherstellung
 mit der Hefe *Yarrowia lipolytica*
- seit 10/2009 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**
 Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (D-04318 Leipzig, Permoserstr.
 15), Department: Umwelt- und Biotechnologisches Zentrum
 Thema: Vergleichende Untersuchungen an großtechnischen
 Biogasreaktoren – Verfahrenstechnische, mikrobiologische, ökologische
 und ökonomische Bewertung und Optimierung; Teilprojekt „Schaum“

Fähigkeiten

Sprachen	Tschechisch	Muttersprache
	Deutsch	sehr gut
	Englisch	gut

Umgang mit dem PC (Anwendung von Word, Excel, Access, PowerPoint, ISIS Draw, Internet Explorer, ORIGIN, Madonna Berkeley™)

E. LISTE DER PUBLIKATIONEN ZUM THEMA

Wissenschaftliche Artikel

Moeller, L., Strehlitz, B., Aurich, A., Zehnsdorf, A., Bley, T.: Optimization of Citric Acid Production from Glucose by *Yarrowia lipolytica*. *Eng. Life Sci.* 2007, 7, 504-511.

Moeller, L., Strehlitz, B.: Aus süß wird sauer: Optimierung der Citronensäureherstellung aus Glucose mit der Hefe *Yarrowia lipolytica*. *Bioforum* 2008, 2, 24-26.

Moeller, L., Grünberg, M., Zehnsdorf, A., Strehlitz, B., Bley, T.: Biosensor Online Control of Citric Acid Production from Glucose by *Yarrowia lipolytica* Using Semicontinuous Fermentation. *Eng Life Sci* 2010, in press.

Poster

ACHEMA 2006, 28th International Exhibition-Congress on Chemical Engineering, Environmental Protection and Biotechnology, Mai 2006 in Frankfurt am Main:

Lucie Moeller, Beate Strehlitz, Andreas Aurich, Andreas Zehnsdorf, Thomas Bley: Optimization of Production of Citric Acid by Yeast *Yarrowia lipolytica*.

24. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, 26.-28. September 2006 in Wiesbaden:

Lucie Moeller, Hans-Jürgen Rost, Beate Strehlitz, Andreas Zehnsdorf, Andreas Aurich, Thomas Bley: Biosensorgestützte Optimierung der Citronensäureherstellung mit der Hefe *Yarrowia lipolytica*.

Chemie Ingenieur Technik 2006, 78/9, 1393.

Modellierung: "Von der Zelle zum Prozess" (Vortrags- und Diskussionstagung von DECHEMA), April 2008 in Bremen:

L. Moeller, B. Strehlitz, A. Aurich, A. Zehnsdorf, T. Bley: Modellierung der Citronensäuresynthese mit der Hefe *Yarrowia lipolytica*.

Vorträge

BIT's 2nd Annual World Congress of Industrial Biotechnology ibio-2009, 6. April 2009 in Seoul, Südkorea:

L. Moeller, B. Strehlitz, A. Aurich, A. Zehnsdorf, T. Bley: Optimization of Citric Acid Production by Yeast *Yarrowia lipolytica* based on Biosensor online Monitoring.

Tagungsband Seite 180.

5th UFZ-PhD conference, 28. April 2009 in Leipzig:

L. Moeller: Optimization of Citric Acid Production by Yeast *Yarrowia lipolytica* based on Biosensor online Control or From Sweet To Sour.

ACHEMA 2009, 29th International Exhibition-Congress on Chemical Engineering, Environmental Protection and Biotechnology, 14. Mai 2009 in Frankfurt am Main:

L. Moeller, B. Strehlitz, A. Aurich, A. Zehnsdorf, T. Bley: Optimisation of citric acid production by yeast *Yarrowia lipolytica* based on biosensor on-line monitoring.

27. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, 10. September 2009 in Mannheim:

L. Moeller, B. Strehlitz, A. Aurich, A. Zehnsdorf, T. Bley: Biosensorgestützte Optimierung der Citronensäureherstellung mit *Yarrowia lipolytica*.

Chemie Ingenieur Technik 2009, 81/8, 1267.

F. DANKSAGUNG

Für Ihre Unterstützung meiner Dissertation möchte ich hiermit meinen Dank bei folgenden Personen und Institutionen aussprechen:

- Frau Dr.-Ing. Beate Strehlitz, meiner Betreuerin am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ).

Frau Strehlitz hat mit Ihrem außerordentlich hohen Engagement meine Arbeit sehr beeinflusst. Sie hat meine Aktivitäten stets in die richtige Richtung gelenkt und war jederzeit für mich da. Ihre Menschlichkeit und Herzlichkeit hat mir sehr geholfen - nicht nur bei Anfertigung der Doktorarbeit, sondern auch in schwierigen Situationen, die das Leben mit sich bringt. Ihr gehört mein besonderer Dank.

- Herrn Dr.-Ing. Andreas Zehnsdorf und Herrn Dr.-Ing. Andreas Aurich, meinen weiteren Betreuern am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ).

Herr Zehnsdorf hat mich geduldig in die Geheimnisse der Bioverfahrenstechnik eingeweiht und Herr Aurich hat mir die Schönheit der Mikrobiologie von *Yarrowia lipolytica* gezeigt. Beide haben mich während der gesamten Zeit der Doktorarbeit mit Rat und Tat begleitet.

- Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Bley, meinem Doktorvater an der TU Dresden.

Herr Prof. Bley hat mir beigebracht, wie man das Leben der Mikroben in Differenzialgleichungen ausdrücken kann. Ich bin ihm für sein Interesse an meiner Arbeit und seine beispielhafte Betreuung während der gesamten Zeit dankbar.

- meinen Studenten, Herrn Dipl.-Ing. Mario Grünberg, Herrn Jose Manuel Bravo Muñoz, Frau Elsa Cordula Gründer, Herrn Torsten Reinelt und Herrn Karsten Helbig.

Meine Studenten haben mir nicht nur mit praktischen Arbeiten sehr geholfen, sondern und vor allem mit ihren kritischen Fragen, die mich immer wieder dazu gebracht haben, die Sachen auch aus einer anderen Perspektive zu sehen.

- Frau Dipl.-Ing. Steffi Hunger, Herrn Dipl.-Ing. Hans-Jürgen Rost und Frau Ines Richter, den Technikum- und Laborangestellten.

Frau Hunger und Herr Rost haben die Bioreaktoren stets im Lauf gehalten und für mich bereit gestellt. Frau Hunger zeigte ein großes Engagement, was auch die theoretische Bearbeitung meiner Dissertation angeht. Ihre Hinweise zu meinen Publikationen und der Doktorarbeit waren sehr hilfreich. Frau Richter, die gute Seele des Labors, hat sich nicht nur um die organisatorischen Dinge und die Sauberkeit des Labors sondern auch um eine fröhliche Atmosphäre gekümmert.

- der Arbeitsgruppe Biosensorik, vor allem Frau Dr. Nadia Nikolaus, Frau Dr. Christine Reinemann und Frau Dr. Regina Stoltenburg.

Sie haben mich von Anfang an sehr nett in ihren Kreis aufgenommen und die ganze Zeit seelisch betreut. Ich habe mich in dieser Arbeitsgruppe ausgesprochen gut gefühlt und die Trennung fällt mir schwer. Frau Nikolaus gehört mein besonderer Dank für Ihre Korrekturen meiner englisch geschriebenen Artikel.

- Herrn Dr. Roland Arno Müller, dem Leiter vom Umwelt- und Biotechnologischen Zentrum (UBZ).

Herr Müller hat mir in seinem Department die organisatorischen und exzellenten technischen Voraussetzungen für die Durchführung der Experimente am UBZ bereitgestellt.

- Herrn Prof. Dr. Gerold Barth, dem Schöpfer der rekombinanten Hefe.

Herr Prof. Barth hat für mich den rekombinanten Stamm *Yarrowia lipolytica* H222(p67ICL1)T5 bereitgestellt.

- Herrn Dr. rer. nat. Erhard Tschirner aus der Fa. „Unternehmensberatung Umwelt- und Industrieanalytik Dr. rer. nat. E. Tschirner“.

Herr Tschirner hat die Wirtschaftlichkeitsanalyse des *Yarrowia*-Verfahrens durchgeführt.

- meiner Familie.

Mein Ehemann Stefan und später auch unser Sohn Lukas haben mir stets die innere Kraft gegeben. Meinem Ehemann gehört ein großer Dank für seine beispielhafte Unterstützung, ohne die diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre. Mein Sohn hat mir mit seiner immer guten Laune die Sonne ins Leben gebracht, wenn auf Arbeit gerade nicht alles glatt lief. Meiner Schwiegermutter Brigitte Moeller, die sich um meinen Sohn während meiner arbeitsbedingten Abwesenheit gekümmert hat und die bei seiner Krankheit oft kurzfristig eingesprungen ist, bin ich für Ihre Hilfe sehr dankbar. Ich danke auch meiner Mutter Jitka Pechová für Ihre psychische Unterstützung.

- der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU).

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt in Form eines Stipendiums finanziert. Ich war von dem unkomplizierten und menschlichen Umgang der zuständigen Personen mit uns, Stipendiaten, sehr beeindruckt.

- Graduate School HIGRADE.

HIGRADE hat sämtliche Reisekosten zu Konferenzen, Tagungen und Kongressen sowie zum Forschungsaufenthalt übernommen.

G. ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

- Frau Dr.-Ing. Beate Strehlitz,
- Herr Dr.-Ing. Andreas Zehnsdorf,
- Herr Dr.-Ing. Andreas Aurich,
- Herr Prof. Dr. Thomas Bley,
- Herr Dr. rer. nat. Erhard Tschirner (Unternehmensberatung Umwelt- und Industrieanalytik Dr. rer. nat. E. Tschirner).

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir keine geldwerten Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht worden.

Die Promotionsordnung der Fakultät Maschinenwesen der Technischen Universität Dresden vom 01. Juli 2001 erkenne ich hiermit an.

Leipzig, 11. November 2009

Lucie Moeller

H. DATENBLÄTTER ZU DEN ABBILDUNGEN

Tabelle A 1: Kalibriergerade für Biotrockenmassebestimmung von *Y. lipolytica* H222 (Datenblatt zur Abbildung 6)

OD600	1,05	0,861	0,790	0,769	0,676	0,613	0,584	0,516	0,477	0,433	0,369
BTM [g/L]	0,552	0,417	0,372	0,342	0,285	0,259	0,244	0,214	0,190	0,171	0,143

Tabelle A 2: Beispiel einer Batch-Kultivierung: Konzentrationen der Substrate, Biomasse und Produkte (Datenblatt zur Abbildung 7).

Zeit [h]	BTM [g/L]	NH4-N [mg/L]	Glucose [g/L]	CS [g/L]	ICS [g/L]
0	1,57	1135	161,8	0	0
11,4	14,36	0	129,5	0,02	0
14,2	22,94		118,8	2,4	0,9
16,5	27,68		108,0	6,5	1,8
19,7	26,81		87,2	14,4	3,2
35,6	26,52		24,9	52,4	5,8
37,7	1,57		19,9	56,1	6,0
39,7	14,36		13,3	59,4	6,1
41,8	22,94		6,21	62,0	6,1

Tabelle A 3: Produktbildungsrate und Selektivität des Bioprozesses für Citronensäure im Laufe einer Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222 aus Glucosesirup (Datenblatt zur Abbildung 9).

Zeit [h]	Produktbildungsrate [g/(L*h)]	Selektivität [% CS]
4,39	0	75,3
18,5	0,43	80,2
22,0	2,41	82,7
24,4	3,04	84,3
27,6	2,61	88,8
43,1	2,16	91,7
75,0	1,05	92,7
98,5	0,45	93,2
121,4	0,38	93,6
140,2	0,17	93,8
163,2	-0,01	75,3

Tabelle A 4: Einfluss von Temperatur auf die maximale spezifische Wachstumsrate $\mu_{\max}$ von *Y. lipolytica* H222 beim Wachstum auf Glucose (Datenblatt zur Abbildung 10).

Temperatur [°C]	24	26	28	30	32	34	36	38
$\mu_{\max}$ [h ⁻¹]	0,110	0,118	0,124	0,133	0,131	0,132	0	0

Tabelle A 5: Einfluss des pH-Wertes auf die maximale spezifische Wachstumsrate $\mu_{\max}$ von *Y. lipolytica* H222 (Datenblatt zur Abbildung 11).

pH [-]	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
$\mu_{\max}$ [h ⁻¹]	0,130	0,142	0,151	0,163	0,170	0,182	0,191	0,192	0,190	0,185	0,150	0,082	0

Tabelle A 6: Einfluss der Anfangskonzentration von Ammoniumsulfat auf die Biomassebildung und die Produktbildung (Ausbeute, Produktivitäten) im Bioprozess zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222 aus Glucose (Datenblatt zur Abbildung 12).

(NH ₄) ₂ SO ₄ [g/L]	Y _{CS/GL} [g/g]	P _{CS} [g/(L*h)]	P _{CS,max} [g/(L*h)]	BTM [g/L]
1,85	0,38	0,44	0,82	8,97
3,71	0,34	0,63	1,49	17,05
5,56	0,34	0,82	1,79	23,27
7,41	0,33	0,82	2,27	28,06
9,89	0,31	0,9	2,48	33,95
12,36	0,15	0,73	2,34	35,19

Tabelle A 7: Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222 aus Glucose (Datenblatt zur Abbildung 14).

Zeit [h]	BTM [g/L]	NH ₄ -N [mg/L]	Glucose [g/L]	CS [g/L]	ICS [g/L]
0,25	--	635	100	0	0
5,50	0,44	--	101	0	0
20,3	7,54	0	77,3	0,02	0
23,3	11,84		68,9	1,09	0,35
25,3	13,48		59,9	2,99	0,82
27,8	14,46		50,9	6,75	1,49
44,3	14,4		4,46	29,36	3,39
45,5	--		2,36	--	--
46,7	--		0,27	33,40	3,79
47,9	--		--	34,78	3,84
50,1	12,78		--	33,97	3,76

Tabelle A 8: Fed-Batch Kultivierung mit konstanter Fütterungsrate mit *Y. lipolytica* H222 (Datenblatt zur Abbildung 15).

Zeit [h]	BTM [g/L]	NH ₄ -N [mg/L]	Glucose [g/L]	CS [g/L]	ICS [g/L]
0,33	0,22	762	49,7	0	0
1,75	0,29	696	47,5	0	0
20,5	7,24	0	55,7	0,29	0,07
21,5	7,22		56,4	0,83	0,19
23,7	11,68		53,5	2,65	0,56
24,7	13,1		51,9	3,70	0,73
25,8	13,1		--	4,73	0,85
27,0	--		50,0	6,38	1,0
28,9	14,02		51,7	9,01	1,4
30,3	--		48,0	10,0	1,4
45,0	11,6		42,2	27,1	2,4
48,5	11,8		44,2	29,6	2,4
52,3	11,86		47,5	34,5	2,7
69,1	7,9		49,2	--	2,4
72,6	9,08		55,6	45,3	2,7
75,8	8,44		59,2	47,8	2,9
92,7	6,16		77,6	48,8	2,8

Tabelle A 9: Fed-Batch Kultivierung mit biosensorgestützten Substratnachdosierung mit *Y. lipolytica* H222 bei konstanter Glucosekonzentration von 20 g/L (Datenblatt zur Abbildung 16).

Zeit [h]	BTM [g/L]	NH4-N [mg/L]	CS [g/L]	ICS [g/L]
0,75	0,45	696	0	0
3,83	0,18	702	0	0
22,2	--	0	0,33	0,07
25,4	7,03		2,92	0,53
27,8	7,98		5,38	0,86
45,4	15,26		24,1	2,25
48,0	15,15		27,4	2,31
69,8	12,26		43,4	2,75
73,5	13,54		44,4	2,77
95,2	11,53		50,6	3,02
118,1	7,73		57,0	3,35
139,3	6,70		59,3	3,47
165,8	10,0		65,2	3,79
187,6	8,31		66,3	3,80
211,3	7,43		72,7	4,12

Tabelle A 10: Kontinuierliche Kultivierung mit biosensorgestützten Substratnachdosierung mit *Y. lipolytica* H222 bei konstanter Glucosekonzentration von 10 g/L (Datenblatt zur Abbildung 21).

Zeit [h]	BTM [g/L]	NH4-N [mg/L]	CS [g/L]	ICS [g/L]
0,33	0,18	799	0	0
3,25	0,26	800	0	0
5,57	0,22	806	0	0
21,3	0,42	679	0	0
23,8	1,37	609	0	0
26,8	3,77	279	0	0
29,5	5,62	0	0	0
47,3	10,56		14,8	1,40
52,6	10,06		20,0	1,89
71,8	10,74		29,6	2,20
74,4	--		31,6	2,28
96,4	9,85		41,0	2,77
120,3	9,33		45,3	3,31
143,1	--		--	--
146,7	9,24		53,0	3,01
165,8	7,9		56,0	3,31
189,8	16,22		59,0	3,60
216,3	6,86		58,9	3,60
237,4	14,6		61,4	3,76

Tabelle A 11: Repeated Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222
(Datenblatt zu den Abbildungen 24 und 25).

Zeit [h]	BTM [g/L]	NH4-N [mg/L]	Glucose [g/L]	CS [g/L]	ICS [g/L]
0	1,74	9267	156	0	0
2,42	1,54	924	157	0	0
5,62	3,64	791	155	0	0
19,7	26,6	0	81,9	10,0	2,48
21,9	30,0	0	72,5	15,1	3,25
23,4	32,7	0	65,3	19,3	3,59
25,4	28,05	0	53,5	24,2	4,44
27,4	29,4	0	42,8	28,5	4,83
29,4	31,1	0	34,0	34,5	5,37
30,2	2,31	957	156	2,90	0,45
43,8	17,96	0	110	2,50	0,69
45,4	18,16	0	106	4,99	1,31
47,4	17,04	0	94,8	9,74	1,99
49,4	20,04	0	83,9	14,6	2,68
51,4	18,44	0	74,4	22,0	3,68
53,6	16,44	0	64,9	30,4	4,41
67,9	21,76	0	6,90	64,4	7,24
68,6	3,4	942	160	6,72	0,64
71,5	4,08	848	145	7,22	0,68
73,5	4,19	788	143	7,09	0,66
77,2	4,12	772	138	7,01	0,64
94,6	13,6	136	114	7,00	0,64
96,4	16,92	0	107	8,52	0,85
102,5	21,88	0	81,7	19,0	2,37
103,3	3,6	921	154	3,14	0,35
117,4	21,16	0	107	6,32	1,09
119,4	21,8	0	96,7	10,9	1,80
124,4	25,88	0	71,9	22,2	3,13
125,4	24,89	0	68,7	25,0	3,45
139,7	26,04	0	12,8	58,2	6,08
141,1	4,02	911	150	8,82	0,90
143,4	4,96	870	147	8,98	0,91
145,4	5,82	778	141	9,21	0,94
147,4	7,81	561	135	8,95	0,95
149,4	11,8	265	131	8,22	0,93
151,1	14,16	0	113	7,68	1,12
163,6	25,84	0	57,5	35,0	3,13
165,4	27,2	0	47,1	39,9	3,91
167,4	26,72	0	38,3	43,9	4,01
169,4	27,4	0	28,3	49,1	4,22
171,4	27,64	0	20,2	55,8	4,49
173,4	28,41	0	11,6	62,8	5,08
175,1	26,32	0	4,07	66,5	5,76

Tabelle A 12: Fed-Batch Kultivierung I zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222
(Datenblatt zur Abbildung 26).

Zeit [h]	BTM [g/L]	NH4-N [mg/L]	CS [g/L]	ICS [g/L]
0,1	2,1	1019	0	0
4,12	2,01	963	0	0
19,8	18,16	0	0,52	0,51
21,8	24,12		2,29	1,45
23,5	26,32		4,61	2,33
25,5	29,81		7,59	3,29
28,5	25,51		11,4	4,29
46,7	22,63		34,8	8,29
53,1	21,74		47,3	10,1
69,7	17,44		63,2	11,1
76,6	19,84		71,2	11,7
91,9	18,76		78,8	11,4
94,7	17,76		82,6	11,6
98,4	17,58		83,8	11,7
100,5	17,52		87,3	11,8
116,0	16,96		91,6	11,3
121,2	--		95,0	12,8
124,5	16,08		98,4	14,0
141,0	15,24		105	14,0
145,5	--		110	14,9
147,0	18,65		--	14,3
148,5	--		112	14,5
164,5	--		123	15,5
170,7	20,37		133	16,4

Tabelle A 13: Fed-Batch Kultivierung II zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222
(Datenblatt zur Abbildung 27).

Zeit [h]	BTM [g/L]	NH4-N [mg/L]	Glucose [g/L]	CS [g/L]	ICS [g/L]
0,76	1,11	1376	152	0	0
2,94	1,25	1292	143	0	0
21,2	29,5	0	73,4	10,3	2,46
23,9	18,5		59,5	15,7	3,08
26,3	20,0		60,7	19,0	3,14
28,1	18,0		56,3	25,5	3,82
44,5	19,1		42,7	56,8	6,10
49,3	16,5		35,2	--	5,48
68,9	15,4		62,6	78,9	6,00
72,2	13,4		86,7	--	5,81
74,2	--		84,1	84,9	6,20
76,0	13,5		77,2	--	5,67
93,4	10,3		54,3	103	6,80
99,4	13,2		42,3	--	6,37
119,5	14,3		21,5	114	7,15
144,5	11,0		19,5	116	6,78
166,8	11,5		22,5	128	7,14
172,6	10,3		21,9	--	9,68
189,0	10,6		21,4	--	7,32
196,1	--		38,7	--	6,44
213,5	10,0		30,3	--	6,90

Zeit [h]	BTM [g/L]	NH4-N [mg/L]	Glucose [g/L]	CS [g/L]	ICS [g/L]
219,0	--		25,7	147	7,25
236,9	8,83		28,4	--	8,74
243,5	--		29,9	155	--
263,3	7,63		16,5	--	6,31
291,8	5,1		26,8	--	2,31
335,0	7,41		12,8	166	2,32

Tabelle A 14: Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222 (Datenblatt zur Abbildung 29).

Zeit [h]	BTM [g/L]	NH4-N [mg/L]	Glucose [g/L]	CS [g/L]	ICS [g/L]
0	2,45	1220	160	0	0
18,0	28,6	0	95,7	10,2	2,26
19,7	--	--	83,8	14,8	2,92
22,8	27,1	--	64,6	24,4	3,89
25,2	--	--	53,7	31,3	4,45
42,1	24,2	--	26,3	71,1	5,71
46,2	--	--	23,6	75,3	5,45
49,2	19,7	--	25,4	80,9	5,73
67,2	--	--	28,8	95,6	5,74
70,3	--	--	30,8	99,5	5,79
72,2	18,9	--	29,9	102	5,99
72,5	2,25	1171	152	11,1	0,66
98,0	22,2	0	65,7	32,4	4,45
121,2	--	--	25,7	75,6	7,27
143,2	19,2	--	36,8	90,9	7,42
143,9	3,52	1011	138	17,9	1,58
167,0	21,9	0	63,7	28,1	4,32
187,2	24,4	--	28,6	70,0	7,43
211,4	--	--	26,7	95,4	8,60
215,8	18	--	21,9	100	8,72

Tabelle A 15: Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222 – Langzeitversuch (Datenblatt zur Abbildung 30).

Zeit [h]	CS [g/L]	ICS [g/L]
0	0	0
3,7	0	0
19,2	8,13	2,38
21,8	14,9	3,58
24,9	23,7	4,72
27,7	29,9	5,28
43,4	57,6	6,66
51,8	75,2	6,64
71,2	97,0	8,18
71,6	8,38	0,65
75,7	8,52	0,61
91,3	15,2	2,80
93,7	19,7	3,48
96,8	27,4	4,20
99,8	36,7	5,28

Zeit [h]	CS [g/L]	ICS [g/L]
142,4	10,4	0,83
163,3	18,0	3,08
165,7	25,5	4,07
168,8	30,9	4,62
171,8	41,7	5,57
188,2	67,7	6,59
213,7	98,3	8,43
214,2	10,2	0,85
218,6	11,1	0,86
220,4	11,5	0,87
235,3	21,7	3,41
237,7	27,8	4,19
240,6	34,8	4,97
243,9	42,7	5,75
259,3	67,6	6,92

Zeit [h]	CS [g/L]	ICS [g/L]
118,4	64,5	6,40
124,1	79,4	7,79
141,9	95,9	7,85
309,7	68,1	7,24
310,2	11,1	1,21
334,3	13,8	3,87
337,8	20,6	5,72
358,0	48,8	11,2
358,3	4,34	0,95
361,3	4,35	0,94
364,0	4,23	0,93
380,0	16,3	4,05
381,6	20,8	4,51
384,7	28,2	5,43
387,7	36,2	5,98
403,6	62,0	7,60
405,7	71,2	8,59
406,2	7,54	0,86
411,7	7,47	0,80
427,4	17,4	3,90

Zeit [h]	CS [g/L]	ICS [g/L]
261,8	77,4	7,70
262,5	6,78	0,65
285,9	16,5	2,45
429,8	24,2	5,20
432,8	30,9	5,99
435,0	34,6	6,36
453,7	58,2	7,53
454,4	7,32	0,85
482,5	31,1	6,07
499,2	54,4	7,67
501,8	57,1	7,71
502,0	8,11	1,02
507,6	7,18	0,94
523,1	16,2	4,03
525,7	21,9	4,97
528,9	26,7	5,56
531,7	33,2	6,45
547,1	50,2	7,10
550,1	62,2	8,64
553,6	67,6	9,28

Tabelle A 16: Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222 – Langzeitversuch (Datenblatt zur Abbildung 32).

Zyklus Nr.	CS [g/L]	Selektivität [% CS]
1	72,1	90,3
2	64,5	91,0
3	67,6	91,1
4	77,4	91,0
5	68,1	90,4
7	71,2	89,2
8	58,2	88,5
9	57,1	88,1
10	67,6	87,7

Tabelle A 17: Vergleich der Effektivität des Bioprozesses bezüglich Citronensäureproduktion in Batch, Fed-Batch und Repeated Fed-Batch Modi (Datenblatt zur Abbildung 33).

	Effektivität der Citronensäureproduktion [g/h]
Batch	6,86
Fed-Batch	7,09
Kontinuierliche Kultivierung	9,05

Tabelle A 18: Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222 aus Glucosesirup von Südzucker AG (Datenblatt zur Abbildung 34).

Zeit [h]	BTM [g/L]	NH4-N [mg/L]	CS [g/L]	ICS [g/L]
0,08	--	905	0	0
2,17	1,71	904	0	0
4,39	1,96	913	0	0
18,5	21,4	0	6,0	1,98

Zeit [h]	BTM [g/L]	NH4-N [mg/L]	CS [g/L]	ICS [g/L]
22,0	29,3		14,3	3,53
24,4	27,7		21,7	4,55
27,6	26,8		30,0	5,59
43,1	26,4		63,7	8,0
45,7	--		--	--
48,8	23,1		--	--
52,1	--		81,7	8,08
66,5	20,4		--	--
69,8	--		--	--
72,7	20,1		104	--
75,0	--		106	9,78
91,2	--		--	--
95,0	18,4		120	9,68
98,5	--		121	9,56
121,4	17,4		130	9,45
140,2	18,1		133	9,11
163,2	16,2		133	8,72

Tabelle A 19: Verlauf der Konzentrationen von Glucose, Fructose und Saccharose in Batch Kultivierungen mit Glucose bzw. Fructose (A) bzw. Saccharose (B) als alleiniger Kohlenstoffquelle (Datenblatt zur Abbildung 36).

A			B			
Zeit [h]	Glucose [g/L]	Fructose [g/L]	Zeit [h]	Glucose [g/L]	Fructose [g/L]	Saccharose [g/L]
1,17	103	106	0	0,086	0	68,6
22,8	83,1	88,0	4,0	0,432	1,22	67,1
27,9	77,9	77,0	23,0	0,432	1,22	50,2
46,3	64,3	66,1	29,6	0,605	2,52	43,5
51,7	60,5	64,2	49,3	1,986	16,2	16,9
70,3	48,1	44,8	53,8	1,598	18,4	10,7
77,1	42,7	38,2	71,8	0,216	11,7	1,48
94,4	27,5	16,3	78,1	0,173	8,59	0,39
98,9	22,3	11,3	90,4	0,035	0,02	0

Tabelle A 20: Verlauf der Konzentrationen von Glucose, Fructose und Saccharose in Batch Kultivierungen unter Verwendung von Saccharose und Glucose (A) bzw. Saccharose und Fructose (B) als Mischsubstratansätze (Datenblatt zur Abbildung 37).

A				B			
Zeit [h]	Glucose [g/L]	Fructose [g/L]	Saccharose [g/L]	Zeit [h]	Glucose [g/L]	Fructose [g/L]	Saccharose [g/L]
0	36,9	0	34,5	0	0	34,3	33,5
4,0	35,2	0,87	33,1	4,0	0,17	35,4	33,6
23,0	22,2	5,39	25,2	23,0	0	23,6	25,4
29,6	18,9	7,64	22,6	29,6	0	20,4	23,6
49,3	11,0	13,2	11,8	49,3	0,17	15,6	11,7
71,8	0,34	16,9	2,21	53,8	0,30	14,6	9,19
78,1	0	12,8	1,44	71,8	0,35	4,49	1,84
90,4	0,17	1,37	0,13	78,1	0	0,94	1,05
				90,4	0,17	0,05	0,20

Tabelle A 21: Verlauf der Konzentrationen von Glucose, Fructose und Saccharose in Batch Kultivierungen unter Verwendung von Saccharose, Glucose und Fructose mit der Konzentration von je 23 g/L (A) bzw. je 33 g/L (B) als Mischsubstratansätze (Datenblatt zur Abbildung 38).

A				B			
Zeit [h]	Glucose [g/L]	Fructose [g/L]	Saccharose [g/L]	Zeit [h]	Glucose [g/L]	Fructose [g/L]	Saccharose [g/L]
0	23,5	22,9	25,6	1,17	33,51	33,4	29,5
23,0	9,41	26,8	16,2	22,8	19,52	38,8	21,3
29,6	6,05	28,9	15,3	46,3	13,13	47,8	11,2
49,3	0,17	29,3	6,56	70,3	2,76	51,8	2,95
71,8	0,17	17,1	0,85	77,1	0,09	50,7	2,30
78,1	0,04	12,7	0,72	94,4	0	35,1	0,82
90,4	0,05	1,48	0	98,9	0	28,1	0

Tabelle A 22: Verlauf der Konzentrationen von Glucose, Fructose und Saccharose in Batch Kultivierungen unter Verwendung von 50 g/L Saccharose und 5 g/L (A) bzw. 85 g/L (B) Fructose als Mischsubstratansätze (Datenblatt zur Abbildung 39).

A				B			
Zeit [h]	Glucose [g/L]	Fructose [g/L]	Saccharose [g/L]	Zeit [h]	Glucose [g/L]	Fructose [g/L]	Saccharose [g/L]
0	0	5,56	49,2	0	0	86,2	52,8
6,75	0	6,00	48,9	6,75	0,35	83,8	49,2
24,5	0	0,17	38,9	24,5	0	70,2	45,0
31,2	0,26	0,35	36,9	31,2	0	70,9	43,6
54,5	0,09	1,22	21,3	48,8	0,17	62,4	37,7
72,5	0,17	2,87	7,54	54,4	0,35	63,3	35,1
79,3	0,09	2,17	4,27	72,5	0,52	58,8	26,9
				79,3	0,69	57,2	23,0
				96,5	0,69	53,0	15,8
				102,8	0,26	50,2	13,5
				122,3	0,43	38,7	7,71
				150,3	0,26	15,8	1,97
				173,3	0,13	0,78	0,49
				195,0	0,13	0,09	0,25

Tabelle A 23: Substrathemmung (Datenblatt zur Abbildung 40).

Zeit [h]	100 g/L Saccharose	150 g/L Saccharose	200 g/L Saccharose	250 g/L Saccharose	300 g/L Saccharose
0	0	0	0	0	0
21,5	0,39	0,16	0,04	0	0
45,5	5,41	3,61	2,02	2,10	1,56
69,5	16,9	9,90	9,17	4,58	3,74
93,5	31,0	18,4	18,3	8,74	7,86
144,5		53,3	51,5	26,9	27,4
165,5		58,5	57,5	35,0	37,5
189,8		66,6	74,2	47,0	50,4
213,5			85,9	54,5	58,9
261,0			110	77,6	85,7

Tabelle A 24: Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 aus Saccharose mit online-Regelung mit Hilfe eines Saccharosebiosensors (Datenblatt zur Abbildung 42).

Zeit [h]	Glucose [g/L]	Fructose [g/L]	Saccharose [g/L]	BTM [g/L]	NH4-N [mg/L]	Citronensäure [g/L]	Isocitronensäure [g/L]
0,31	0,04	0,07	19,2	1,44	748	0	0
1,98	0,13	0,09	15,9	1,47	701	0	0
18,0	0,13	0,00	13,0	5,8	465	0	0
20,9	0,61	1,0	8,86	7,9	323	0	0
24,8	0,13	0,26	14,9	6,83	268	0	0
41,8	0,09	0,26	12,6	8,13	0	0	0
45,0	0,26	0,22	18,8	13,7		0	0
49,2	0,30	0,35	16,0	11,4		0	0
65,5	0,22	0,57	15,3	10,98		3,3	0,21
73,4	0,17	0,44	12,1	14,8		3,3	0,21
90,0	0,30	0,00	0,99	15		1,41	0,15

Tabelle A 25: Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 aus invertierter Saccharose mit online-Regelung mit Hilfe eines Glucosebiosensors (Datenblatt zur Abbildung 44).

Zeit [h]	Glucose [g/L]	Fructose [g/L]	Saccharose [g/L]	BTM [g/L]	NH4-N [mg/L]	Citronensäure [g/L]	Isocitronensäure [g/L]
0,15	66,0	64,8	21,0	1,04	1100	0	0
2,56	57,1	52,8	15,8	3,90	1060	0	0
20,4	3,15	47,9	--	19,6	0	4,84	1,27
22,1	0,73	54,8	18,6	24,1		8,97	2,50
24,5	1,25	56,2	22,7	22,1		16,0	3,74
26,5	2,00	--	17,2	25,3		--	3,13
28,5	3,15	53,7	17,7	--		24,2	4,82
46,0	4,15	48,9	23,9	18,9		50,0	6,84
48,2	5,10	49,3	21,7	25,7		53,5	7,10
51,5	5,83	43,0	21,4	18,9		--	6,53
53,2	5,18	48,7	30,0	25,2		61,7	7,78
70,0	3,63	38,2	108	17,8		67,2	7,13
74,7	3,20	28,3	95,5	15,8		66,6	6,90

Tabelle A 26: Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 aus Saccharose mit manueller Substratzufuhr (Datenblatt zur Abbildung 46).

Zeit [h]	Glucose [g/L]	Fructose [g/L]	Saccharose [g/L]	BTM [g/L]	NH4-N [mg/L]	Citronensäure [g/L]	Isocitronensäure [g/L]
0,09	1,6	2,1	135	1,62	696	0	0
1,97	7,6	8,2	118	2,29	621	0	0
17,0	6,9	2,4	91,9	9,84	12,9	0	0
19,2	1	0,9	90,2	9,42	0	0	0
21,4	1,6	1,6	102	15,0		0,01	0
23,5	1,2	2,6	91,9	16,8		0,66	0,04
25,9	2,2	4,2	58,4	12,3		2,72	0,21
26,1	2,2	3,5	98,8	11,8		2,74	0,21
41,5	27,5	47,5	15,1	12,4		24	1,24
44,3	23,5	70,8	7,2	16,2		33,6	1,75
49,3	18,3	70,1	1,3	15,1		42,6	1,88

Zeit [h]	Glucose [g/L]	Fructose [g/L]	Saccharose [g/L]	BTM [g/L]	NH4-N [mg/L]	Citronensäure [g/L]	Isocitronensäure [g/L]
49,6	24,5	73	43,6	13,7		41,0	1,80
66,0	26,3	98,2	0	13,3		59,5	2,20
68,7	19,5	88,3	0	12,3		60,9	2,31
72,6	16,6	91,7	0	13,4		63,5	2,27

Tabelle A 27: Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 aus Saccharose mit online-Regelung mit Hilfe eines Saccharosebiosensors (Datenblatt zu den Abbildungen 47 und 49).

Zeit [h]	Glucose [g/L]	Fructose [g/L]	Saccharose [g/L]	BTM [g/L]	NH4-N [mg/L]	Citronensäure [g/L]	Isocitronensäure [g/L]
0,16	0,345	0,174	100	1,15	764	0	0
2,67	0	0	93,2	1,41	648	0	0
18,3	0	1,22	68,6	15,5	0	0,035	0
20,5	1,04	2,87	54,3	19,0		1,00	0,074
23,5	1,56	9,22	35,8	22,5		5,28	0,441
26,0	2,68	17,3	18,5	20,1		10,1	0,829
42,6	2,68	38,9	10,2	21,9		40,5	3,25
46,5	3,45	40,6	25,6	18,3		41,3	3,12
50,3	5,87	45,2	12,0	17,2		48,0	3,49
66,4	8,38	66,6	12,8	17,0		69,4	4,11
69,4	7,25	65,6	5,25	15,5		69,1	3,95
71,9	5,70	64,2	2,95	17,5	0	68,9	3,84
72,7	1,73	9,56	87,6	2,16	668	10,4	0,559
74,6	11,1	17,6	71,5	1,65	665	7,92	0,396
90,5	1,21	9,56	41,7	15,5	0	12,2	1,06
93,9	0,35	8,00	29,2	15,3		15,6	1,31
97,3	0,86	9,04	50,2	16,0		22,9	1,95
115,6	3,63	16,5	85,7	7,30		36,5	0,833
144,2	19,0	63,6	33,1	13,6		57,7	2,67
144,7	3,28	11,1	95,5	2,01	676	10,2	0,447
163,0	0,864	1,39	55,8	16,4	3,20	12,8	0,983
166,0	0,432	1,57	54,0	21,4	0	18,2	1,41
169,2	0,950	1,65	38,1	19,2		21,6	1,68
186,2	0,518	5,22	14,8	14,1		38,3	2,35
190,2	0,691	7,82	35,3	18,4		49,1	2,92
192,2	0,518	3,04	18,4	8,46		--	0,989
194,3	0,602	9,04	51,7	17,3		51,0	2,94
210,4	3,28	19,0	86,0	15,4		65,3	--
216,0	5,35	28,0	66,0	14,1	0	65,8	3,03
217,1	0,864	2,43	101	2,24	600	9,60	0,430
234,4	0,173	0,695	81,4	10,4	--	0,176	0
239,9	0	0	86,6	13,3	--	0	0
259,1	0	0	62,0	15,0	16,0	0,060	0

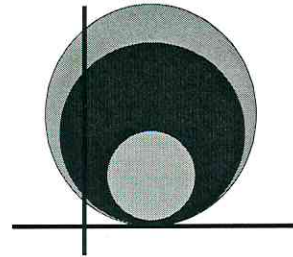
Tabelle A 28: Repeated Fed-Batch Kultivierung zur Citronensäureherstellung mit *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 aus Saccharose unter Verwendung von programmgesteuerter Nachdosierung (Datenblatt zu den Abbildungen 50 und 51).

Zeit [h]	Glucose [g/L]	Fructose [g/L]	Saccharose [g/L]	BTM [g/L]	NH4-N [mg/L]	Citronensäure [g/L]	Isocitronensäure [g/L]
0,13	0,173	0,522	158	1,1	1178	0	0
2,89	0	0	144	1,21	1094	0	0
20,2	0,864	0,348	--	5,27	131	0	0
22,5	0	0,348	95,5	10,67	0	0	0
24,6	0,173	1,57	91,2	16,57		0,060	0
27,3	1,30	4,87	--	--		1,69	0,169
43,6	0,734	26,6	0,328	19,3		27,8	1,53
44,5	0,605	31,0	0	--		38,9	3,47
46,1	0,864	24,7	0	19,17		36,2	3,19
47,7	0,864	19,5	1,31	--		32,7	2,81
49,6	2,51	24,6	3,28	15,07		39,8	3,31
51,1	4,23	26,3	3,45	16,43		39,7	3,32
67,8	15,2	48,3	6,24	12,8		44,8	3,37
70,9	23,8	82,1	0,492	19,33	0	78,0	5,26
71,6	8,81	18,6	119	11,84	978	11,5	0,773
74,8	10,9	17,0	100	2,29	824	7,93	0,495
93,3	2,42	23,5	2,95	8,2	0	9,16	0,749
95,9	0,605	65,7	3,61	25		33,2	2,93
98,8	1,81	59,7	11,7	22,67		37,2	3,22
117,0	11,7	83,0	14,3	17,67		63,9	4,26
145,9	24,8	114	17,1	15,9		77,3	3,78
163,8	12,3	120	0,492	16,27		97,6	4,01
167,2	8,90	118	0,164	--		96,6	3,87
170,8	6,30	122	0,049	15,7		108	4,34
187,8	0,432	98,8	0	14		114	4,27
190,0	0,259	91,0	1,48	13,4		106	3,93

Tabelle A 29: Vergleich der Citronensäurebildung des rekombinanten Stammes *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1)T5 zum Wildtypstamm *Y. lipolytica* H222 auf Saccharose bzw. Glucose (Datenblatt zur Abbildung 52).

Zeit [h]	Citronensäure H222, GL [g/L]	Zeit [h]	Citronensäure p67ICL1, SA [g/L]	Zeit [h]	Selektivität H222, GL [%]	Zeit [h]	Selektivität p67ICL1, SA [%]
0	0	0,13	0	18,0	81,8	27,3	90,9
18,0	10,2	2,89	0	19,7	83,5	46,1	91,9
19,7	14,8	20,2	0	22,8	86,3	49,6	92,3
22,8	24,4	22,5	0	25,2	87,5	71,6	93,7
25,2	31,3	24,6	0,06	42,1	92,6		
42,1	71,1	27,3	1,689	49,2	93,4		
46,2	75,3	43,6	27,8	67,2	94,3		
49,2	80,9	49,6	39,8	72,5	94,4		
67,2	95,6	70,9	78,0				
70,3	99,5	71,6	11,5				
72,2	102	74,8	7,93				
72,5	11,1	95,9	33,2				
97,9	32,4	98,8	37,2				
121,2	75,6	117,0	63,9				
143,2	90,9	145,9	81,0				

**I. WIRTSCHAFTLICHKEITSBETRACHTUNG FÜR DIE CITRONENSÄURE-
HERSTELLUNG AUS KOHLENHYDRATEN MIT *YARROWIA LIPOLYTICA***



**Vergleichende Wirtschaftlichkeitsanalyse für die
Herstellung von Citronensäure auf fermentativer
Basis unter Verwendung von Hefen
und kohlenhydrathaltigen Substraten unter
Berücksichtigung der Marktverhältnisse**

September 2009

Autor: Dr. E. Tschirner

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Allgemeine fachliche und zeitnahe wirtschaftliche Betrachtungen zur Problematik Citronensäure und Citronensäureproduktion	3
2. Der Markt und der Marktführer	4
3. Prozessbeschreibungen der mikrobiellen Citronensäureproduktions-technologien	6
3.1 Etabliertes Produktionsverfahren mit <i>Aspergillus niger</i> unter Verwendung von Zuckermelassen und Produktisolierung mittels Citratfällung	6
3.2 Citronensäureproduktion nach dem LURGI – Verfahren	8
3.3 Biotechnologische Verfahren Citronensäureherstellung mit Hefestämmen von <i>Yarrowia lipolytica</i>	9
3.3.1 Vorbemerkungen	9
3.3.2 Citronensäurebildung auf Grundlage lipophiler Substrate	10
3.3.3 Citronensäurebildung auf Grundlage kohlenhydrathaltiger Substrate	11
4. Spezifische Verbräuche / t Endprodukt Citronensäure in Pharmaqualität	14
4.1 Klassisches Verfahren	14
4.2 Citronensäureproduktion auf Grundlage lipophiler Substrate durch <i>Yarrowia lipolytica</i>	14
4.3 Citronensäureproduktion auf Grundlage kohlenhydrathaltiger Substrate durch <i>Yarrowia lipolytica</i>	15
5. Vergleich des biotechnologischen Verfahren des HEFE/KOHLLENHYDRAT – Einsatzes gegenüber dem klassischen Verfahren hinsichtlich der Kosten für das Investment und die Produktion von Citronensäure	15
6. Ausblick zur weiteren Verfahrensentwicklung	20
7. Zusammenfassung	20
Anhang	21

1. Allgemeine fachliche und zeitnahe wirtschaftliche Betrachtungen zur Problematik Citronensäure und Citronensäureproduktion

Im Rahmen von Forschungs- und Entwicklungsarbeiten zur Gewinnung von Citronensäure unter Verwendung von natürlich vorkommenden Hefestämmen und genetisch modifizierten Hefen sind in einem Verfahrensvergleich die Sachbilanzen für die materiellen und energetischen In- / Outputs bei der Produktion von Citronensäure aufzustellen und Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen durchzuführen.

In die Analyse werden einbezogen:

- das klassische, am Markt etablierte, Produktionsverfahren mit *Aspergillus niger* unter Verwendung von Zuckermelassen und Produktisolierung mittels Citratfällung

(Zugabe von $\text{Ca}(\text{OH})_2 \Rightarrow$ Calciumcitrat

Calciumcitrat + Schwefelsäure $\Rightarrow$ Citronensäure und CaSO_4)

- das LURGI – Verfahren (industriell nicht angewandt): Verfahrensverbesserung mit *Aspergillus niger* unter Verwendung reiner Substrate (Weißzucker) und damit Anwendung innovativer Produktaufarbeitungstechnologien (gipsfreier Prozess)
- Fermentatives Verfahren mit der Hefe *Yarrowia lipolytica* mit breitem Substratverwertungsspektrum für lipophile nachwachsende Rohstoffe landwirtschaftlicher Produktion (industriell nicht überführt) mit integrierter innovativer Produktaufbereitung
- Fermentatives Verfahren mit der Hefe *Yarrowia lipolytica* (in der Entwicklungsphase) mit breitem Substratverwertungsspektrum für kohlenhydrathaltige nachwachsende Rohstoffe landwirtschaftlicher Produktion mit integrierter innovativer Produktaufbereitung

Der Schwerpunkt der Betrachtungen und Bewertungen soll im Bereich der Substratverfügbarkeit, der Substratpreisentwicklungen und des Vergleichs des kohlenhydratverwertenden Herstellungsverfahrens von Citronensäure unter Verwendung von *Yarrowia lipolytica* gegenüber dem klassischen Herstellungsverfahren unter Verwendung von Stämmen von *Aspergillus niger* liegen.

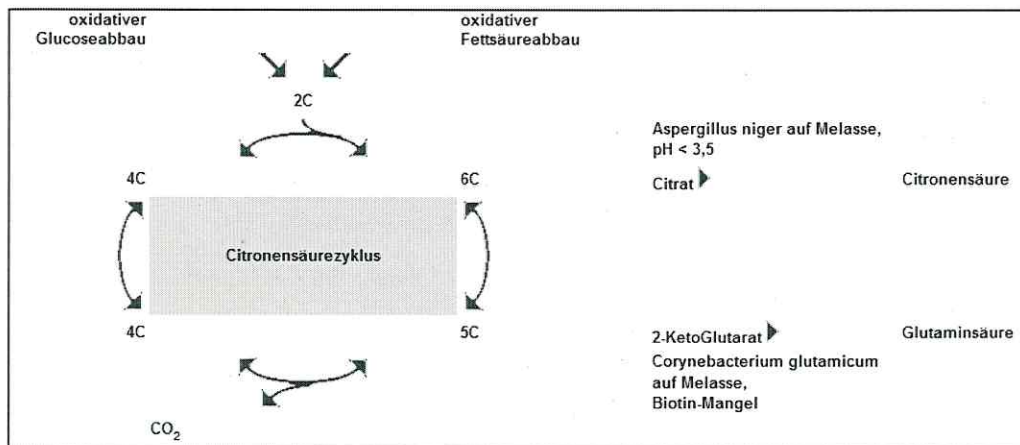


Abb. 1. Überblick zu den mikrobiellen Synthesewegen

2. Der Markt und der Marktführer

Derzeit liegt der Anteil biotechnischer Methoden an allen Produktionsverfahren in der europäischen Chemie erst bei etwa 5 Prozent. Marktforscher gehen aber davon aus, dass der Anteil bis 2015 auf 15 Prozent ansteigen wird. Speziell für Feinchemikalien erwarten Branchenkenner langfristig überdurchschnittlich hohe Wachstumsraten. Hier nehmen schon heute biotechnische Verfahren einen Anteil von rund 20 Prozent ein. Es spricht viel dafür, dass dieser Anteil in der Sparte Feinchemie bis 2015 voraussichtlich auf 50 Prozent zulegen wird. Insgesamt könnte dann im Jahr 2015 der weltweite Umsatz mit weißer Biotechnologie rund 300 Milliarden US-Dollar erreichen, so schätzen Experten. Im Vergleich zu 2004 würde sich damit der Umsatz versiebenfachen.

Der weltweite Markt für Isoascorbinsäure, Ascorbinsäure und Citronensäure wird auf 1.700 Millionen US \$ veranschlagt und wächst jährlich zwischen 3-5 %. Chinesische Hersteller haben derzeit einen Marktanteil von 37 % für Isoascorbinsäure, 65 % bei Ascorbinsäure und 34 % bei Citronensäure.

Spot-Preise für Citronensäure variieren zwischen den Regionen und sind zwischen \$ 2135 - \$ 2565 in Lateinamerika, geschätzte \$ 1540 - \$ 1710 in Asien und \$ 1895 - \$ 2145 in Europa.

Die Doc's International Trade Administration (ITA) schrieb am 13. November 2008, dass die chinesischen Hersteller / Exporteure Citronensäure und Citratsalze in den USA zwischen 19,41 und 56,87 Prozent unter dem regulären Marktwert verkauft hatten. China und Kanada wurden in den USA für schuldig befunden Citronensäure Dumping im großen Stil zu betreiben. Kanadische Hersteller / Exporteure verkauften Citronensäure 20,88 Prozent unter den marktüblichen Preisen.

Europäische Hersteller von Citronensäure und Glutamat erhielten im Dezember 2008 die langfristige Sicherheit, dass ihre Preise gegen billigere Einfuhren aus China unterstützt werden. Von China wird weiterhin erwartet, dass es ein wichtiger Akteur im Geschäftsfeld bleibt.

Die Verordnung zur Einführung endgültiger Zölle auf chinesische Citronensäure wurde im Amtsblatt der Europäischen Union veröffentlicht. Wissenschaftliche Untersuchungen hatten die ursprüngliche Ansicht bestätigt, dass die Industrie innerhalb der EU durch die chinesischen Dumpingexporte gelitten hat.

Daraus folgten vorläufige Zölle von 50 Prozent im Juni für einen Zeitraum von sechs Monaten, nachdem Analysten herausfanden, dass die chinesische Citronensäure mit einem durchschnittlichen Preis von 15 bis 21 Prozent des Europa-Preises verkauft wurde. Die endgültigen Zölle waren dann niedriger, um 42,7 Prozent für die meisten Unternehmen.

Das Anti-Dumping-Problem war der Europäischen Kommission von Jungbunzlauer, eines der beiden Großunternehmen, die Citronensäure in der EU produzieren herangetragen. Der andere Hersteller ist der belgischen SA Citrique Belge, im Besitz von DSM.

Der Europäische Rat hatte aber auch Bedenken, dass durch die Einführung von Anti-Dumping-Maßnahmen durch die betroffenen Parteien in der EU ein duopolistischer Markt geschaffen wird.

In Anbetracht der starken Marktstellung, die die chinesischen exportierenden Hersteller in den letzten Jahren gewonnen haben, zielt die Einführung von Maßnahmen nicht darauf, sie aus dem gemeinschaftlichen Markt zu werfen, sondern nur wieder gleiche Wettbewerbsbedingungen für den Wirtschaftszweig der Gemeinschaft und den chinesischen exportierenden Herstellern zu gleichen Bedingungen herzustellen.

In den 12 Monaten nach dem Untersuchungszeitraum waren die chinesischen Einfuhren gesehen um 17 Prozent gestiegen. Nach den vorläufigen Maßnahmen, blieben sie weiterhin auf einem "hohen Niveau".

Nach Leatherhead International, betrug im Jahr 2007 die globale produzierte Menge an Citronensäure 920.000 Tonnen. Dabei entstanden folgende prozentuale Nachfragen: Europa führt mit einem Anteil von 38 Prozent des gesamten Marktes, die USA mit 27 Prozent, Asien / Pazifik-Region mit 20 Prozent und auf Lateinamerika entfallen 10 Prozent.

Auf dem europäischen Markt für Citronensäure entfielen (2008) insgesamt 37 % des Umsatzes und 28 % des Umsatzes auf den US-Markt.

Wirtschaftsforscher sahen auch eine gewisse Überkapazität bei ausführenden chinesischen Herstellern, die es unwahrscheinlich machten, dass sie sich aus Europa zurückziehen würden - vor allem da Anti-Dumping-Maßnahmen gegen die chinesische Citronensäure auch in den Vereinigten Staaten etabliert wurden.

Weitere mögliche Auswirkungen der Zölle durch den Europäischen Rat sind, dass die Zölle gegen China andere Länder ermutigen, Citronensäure nach Europa zu exportieren, wie z.B. Israel und Südamerika.

Exportierende Citronensäurehersteller in diesen Ländern waren in der Vergangenheit wegen der niedrigen Preise wahrscheinlich weniger daran interessiert nach Europa zu liefern.

Ronny Hacham von Gadot Biochemical sagte 2008 zu Industries FoodNavigator.com, dass seiner Ansicht nach "auch weiterhin die EU aus China importieren wird, da die lokalen Kapazitäten weniger als 50 Prozent des jährlichen Verbrauchs decken."

Auch im US-Markt, wo Anti-Dumping-Maßnahmen gegen chinesische Citronensäure greifen, erwartet Hacham, dass sich Einfuhren aus China etwas verringern. Aber die chinesischen Hersteller sehen in den nächsten Jahren keine Verringerung ihres Marktanteils oder der gesamtwirtschaftlichen Produktion. Im Mittelpunkt ihrer zu verlagernden Exporttätigkeit stehen dabei weniger geschützten Regionen, wie Brasilien.

Ein Sales Manager bei einem der chinesischen Unternehmen, der nicht genannt werden wollte, sagte im Sommer 2008: „Die Zölle haben keine erheblichen Auswirkungen auf die Geschäftstätigkeit des Unternehmens, da insgesamt die Nachfrage in der Welt steigt. So werden wir unseren internationalen Vertrieb mehr auf andere Regionen konzentrieren.“ Das Unternehmen exportierte 2007 20 Prozent seiner Produkte nach Europa, ca. 20.000 Tonnen, aber es zählt auch Asien und die USA zu seinen wichtigen Schlüsselmärkten.

Citronensäureproduktion und EU-Gentech-Verbot: „Gut fürs Marktführergeschäft und schädlich für Innovationen.“

Die österreichische Firma Jungbunzlauer ist lange und erfolgreich in der Biotech-Szene verankert. Der Weltmarktführer in Sachen Citronensäure und deren Derivate profitiert dabei von den strengen Gentech-Gesetzen in der EU.

Jungbunzlauer hat sich darauf spezialisiert, Citronensäure und andere organische Verbindungen fermentativ herzustellen und spielt dabei international in vorderster Reihe mit. Das weltweit größte Citronensäurewerk steht im Stammwerk in Niederösterreich. Die Geschichte des Unternehmens reicht bis 1867 zurück, als man im böhmischen Jung Bunzlau mit einer Alkoholestillationsanlage begann. 1962 stieg man ins heutige Hauptgeschäft Citronensäure ein, 1986 begann das Unternehmen das Verdickungsmittel Xanthan herzustellen. In den letzten zehn Jahren wurde die Produktpalette um Gluconate und organische Salze beständig erweitert. Neben Pernhofen unterhält Jungbunzlauer Werke in Frankreich, Deutschland und Kanada.

Citronensäure wie auch die gesamte Produktpalette findet vor allem in der Lebensmittelindustrie Verwendung:

Zwei Drittel der Gesamtproduktion werden für die Herstellung von Getränken und Nahrungsmitteln benötigt. Weiterhin werden die Produkte in der Pharmaindustrie, in Hygieneprodukten und in Reinigungsmitteln eingesetzt. Die Herstellung basiert durchgehend auf der fermentativen Gewinnung der Verbindungen aus Mikroorganismen.

Die Unternehmensphilosophie heißt:

Ähnliche Verfahren – gleiche Absatzmärkte: So bleibt alles gut überschaubar.

Ausbeute und Qualität der Produkte hängen dabei von den eingesetzten mikrobiellen Stämmen ab. Durch die strenge österreichische und EU-Gesetzgebung ist man bei Jungbunzlauer angewiesen, Stammoptimierungen mit klassischen Selektionsmethoden und ohne den Einsatz effizienterer gentechnischer Verfahren durchzuführen. Auf den ersten Blick ein Wettbewerbsnachteil. Jedoch: Für Jungbunzlauer ist die „natürliche“ Produktionsweise „ein besserer Schutz als der Zoll“, wie es aus dem Unternehmen heißt. Denn: Citronensäure-Hersteller, die sich der modernen Gentechnologien längst bedienen, können auf den europäischen Märkten nichts verkaufen. Und so bleibt die entscheidende Konkurrenz de jure außen vor. Die Grundprinzipien der Produktion blieben im Laufe der Jahre stets gleich, sehr viel hat sich aber an der gesamten Technologie des Werkes geändert. Vor allem, was den Umgang mit Ressourcen und Abfällen betrifft. Das Citronensäure-Werk in Pernhofen betreibt eine eigene Abwasserreinigungsanlage für betriebliche Abwässer. Das entstandene Biogas wird entschwefelt, der gewonnene Schwefel weiterverwendet. Die anfallende Biomasse wird als Futtermittelzusatzstoff weiterverkauft. Bei Jungbunzlauer hat man den Stand der Wissenschaft auf diesem Gebieten in die Praxis umgesetzt und ist dafür auch von der EU durch die Aufnahme in die „best available technology“ Dokumente ausgezeichnet worden.

3. Prozessbeschreibungen der mikrobiellen Citronensäureproduktions-technologien

3.1 Etabliertes Produktionsverfahren mit *Aspergillus niger* unter Verwendung von Zuckermelassen und Produktisolierung mittels Citratfällung

Nach dem klassischen Verfahren wurden verschiedene Quellen - beginnend 1982 bis 2009 – ausgewertet.

Dem Vergleich wird das Verfahren von MESSO (Stand der Technik) das insbesondere hinsichtlich der Aufarbeitungstechnologie und Energieausnutzung effektiv ist und in verschiedenen industriellen Varianten durchgeführt wird, zugrunde gelegt.

Der Prozessablauf ist im Blockschema im Anhang dargestellt.

Substratbereitung

Die Rohmelasse wird in Tanks angeliefert. Die Rohmelasse ist entsprechend den Erfordernissen der Fermentation hinsichtlich TS und erforderlicher Zusätze laborseitig zu kontrollieren.

Nach einer Homogenisierung in einem Zwischenbehälter wird die Rohmelasse diskontinuierlich in den Aufbereitungskessel gefördert. Als Vorlage dient heißes Prozesswasser.

Dieses Primärsubstrat wird auf ca. 100 °C erhitzt, der pH-Wert eingestellt und ein chemisches Klärungsmittel zugegeben. Nach der Sedimentation und ggf. einer Separation des Melasseschlammes wird die geklärte Lösung entweder in die Fermentationseinheit oder in einen Vorratstank gepumpt.

Fermentation

Die Fermentation erfolgt in Spezialfermentern – Air-Lift-Reaktoren nach Mammutpumpenprinzip. Der Lufteintrag dient somit der Sauerstoffbereitstellung als auch der kostengünstigen Mischung im Fermenter.

Vor Beginn der Fermentation wird die Lösung angeimpft, entweder mit einer flüssigen Sporensuspension oder mit vorgezüchteten Sporen geeigneter *Aspergillus niger* Kulturen. Die Pilze entwickeln sich in Form von einzelnen "Pellets" in der Lösung.

Nach der Kühlung im Plattenwärmetauscher wird die Melasselösung in einem der Fermenter gefüllt. Nach Beimpfung startet die Fermentation, wobei kontinuierlich die Temperatur, der pH-Wert, die Luftmenge und der Eintrag gemessen und partiell automatisch prozesstechnisch geregelt werden.

Die Luft, die für die biochemische Umsetzung des Zuckers in Citronensäure erforderlich ist, wird durch Kompressoren erzeugt und in der erforderlichen reinen Qualität bereitgestellt.

Die heiße Kompressorluft wird in einem Kühler abgekühlt, wobei das heiße Wasser der Heißwasseraufbereitung energiesparend zugeführt wird. Der Lufteintritt in den Fermenter erfolgt abschließend über einen Sterilfilter. Die Zudosierung des Antischaummittels erfolgt aus einem Tank über eine prozessgesteuerte Dosierpumpe. Eine technische Option zur Dosierung von Schwefelsäure ist integriert.

In einem Mischtank werden die erforderlichen Nährsalze in einem Löse- und Mischtank in Wasser gelöst und in den Fermenter zugegeben.

Nach Beimpfung der Fermentation wird der Fermenterinhalt in einen Zwischentank gepumpt. Bei diesem Biofermentationsprozess können relativ hohe Citronensäurekonzentration im Fermentationsmedium erreicht werden. Die Fermentation wird mehrere Tage prozesstechnisch geführt.

Separation der Citronensäure

Das Fermentationsmedium mit dem Mycel wird vor dem Lagertank über den Plattenwärmetauscher in den Mischtank gepumpt. Hier wird das Fermentationsmedium mit dem Filterhilfsmittel gemischt und über eine Pumpe zu einem Vakuumfilter gefördert und filtriert. Das abgeschiedene Filterhilfsmittel und das Pilzmycel werden mit einem Schraubenförderer ausgetragen. Das filtrierte Fermentationsmedium wird in einen Zwischentank gepumpt. Anschließend wird es nochmals über einen automatischen Feinfilter geführt. Die klare Lösung wird in einem Zwischentank gelagert, bevor sie in die Ausfällungsstation gepumpt wird.

Durch Zudosierung von heißer Kalkmilch fällt die Citronensäure als festes lösliches Calciumcitrat in diesen Tanks aus. Bei diesem Prozessschritt werden Temperatur und pH-Wert gemessen und überwacht. Die benötigte Kalkmilch, die aus Calciumhydroxid und Wasser in einem klassischen Rührbehälter erzeugt wird, zirkuliert kontinuierlich über einen Zwischentank und eine Ringleitung mit Hilfe einer Pumpe, um unerwünschte Ablagerungen von Feststoffen in der Suspension und Verstopfungen in den Ringleitungen zu vermeiden.

Eine Pumpe transportiert die heiße Calciumcitrat suspension zu einem Vakuumfilter, wo das Calciumcitrat vom Wasser getrennt wird. Das entstehende Abwasser wird zur betrieblichen Abwasseraufbereitung gepumpt. Das Calciumcitrat, gewaschen mit heißem Wasser, wird mit einem Schraubenförderer in die Zersetzungstanks transportiert, wo Schwefelsäure vorgelegt ist und eine Zerlegung zu Gips und Citronensäurelösung erfolgt. Dieser isotherm geführte Prozess wird über eine Leitfähigkeitsmessung kontrolliert.

Nach Beendigung der Zersetzungsreaktion wird die Suspension kontinuierlich über einen Vakuumfilter filtriert. In diesem Filter erfolgt die Trennung des Gipses von der Citronensäurelösung.

Der gewaschene Gips wird als Abfall verwertet/entsorgt. Die vorgereinigte Citronensäurelösung wird in einen Zwischentank gepumpt und anschließend der Reinigung unterzogen.

Reinigung der Citronensäure

Vor der Auskristallisation der Citronensäure wird eine chemisch reine Citronensäurelösung hergestellt. Der erste Schritt ist die Erhitzung der Citronensäurelösung und eine anschließende Filtration.

Nach dem Erhitzen der Lösung in einem Plattenwärmetauscher wird diese durch eine Kaskade von drei Aktivkohlefiltern gedrückt, in denen die Lösung entfärbt wird. Anschließend durchläuft sie die Kationen- und Anionenaustauscherapparaturen.

Nach einer Lagerung in einem Zwischentank wird die Lösung nach Erhitzung in einem Platten-Wärmetauscher einer zweiten Aktivkohlefilterstufe zugeführt. Danach wird sie abschließend über einen Kerzenfilter zum Vakuumverdampfereingang geleitet.

Ätznatron beziehungsweise Salzsäure werden zur Regeneration der Aktivkohlefilter und Ionenaustauscherharze eingesetzt. Dosierpumpen dosieren das Ätznatron bzw. die Salzsäure in das Regenerationswasser.

Eindampfung / Kristallisation / Trocknung

Im Vakuumverdampfer wird die Citronensäurekonzentration in der Lösung kontinuierlich erhöht, in dem das Wasser verdampft wird. Die Löslichkeitsgrenze der Citronensäure wird nicht überschritten. Die erzeugten Kondensate bzw. Dämpfe werden in Tanks gesammelt und von hier aus zur Dampferzeugerstation bzw. zur Abwasseraufbereitung geleitet. Die hochkonzentrierte Flüssigkeit aus dem Verdampfer gelangt nun zur Vakuum-Kristallisation, wo die Citronensäure kontinuierlich aus der Lösung auskristallisiert.

Eine Kristallsuspension mit der gewünschten Korngröße wird kontinuierlich vom Kristallisator abgezogen und in einem Rührbehälter zwischengelagert. Die Kristallsuspension wird zentrifugiert, dadurch die Kristalle von der Mutterflüssigkeit abgetrennt, abschließend mit dem enthärteten Wasser gewaschen. Die Mutterflüssigkeit wird in einem Tank gesammelt und in verschiedenen Stationen der Citronensäure-Erzeugung recycelt.

Die feuchten Citronensäurekristalle werden über einen Zwischentank in einen Fließ-Bett-Trockner mit heißer Luft getrocknet, danach mit gereinigter Luft gekühlt. Über einen Schraubenförderer wird das Endprodukt zu einem Schaufelelevator und von dort zu der Siebmaschine transportiert, wo die Trennung in drei Fraktionen erfolgt. Die Teilchenuntergrößen und Übergrößen werden in einem Rührbehälter gesammelt und mit enthärtetem Wasser gelöst und in den Mutterflüssigkeitstank recycelt.

Die gewünschten Fraktionen des Endproduktes (grob, mittel, fein) werden nach dem fraktionierten Sieben in entsprechenden Silos gestapelt bzw. abgesackt.

Eine Entsorgungsbelastung stellt der anfallende Gips dar. Aufgrund des Überangebotes an Gips, kann dieser nicht aufbereitet und als Nebenprodukt vermarktet werden, sondern stellt einen zu entsorgenden Abfall mit erheblichem Masseanteil dar.

3.2 Citronensäureproduktion nach dem LURGI – Verfahren

Der Lurgi-Prozess zur Produktion von Citronensäure basiert auf der Fermentation von relativ reinen Zuckerlösungen durch hochaktive *Aspergillus niger* Kulturen in Blasenreaktoren und unterscheidet sich wesentlich in der anschließenden Aufbereitung und Reinigung vom

marktkonventionellen Verfahren. Durch eine Kombination von modernen Verfahrensschritten der Proteinfällung, Membranfiltration und Ionenaustausch wird eine Citronensäure in Pharmaqualität ohne Gips-Abfallerzeugung, dem Hauptabfallprodukt des konventionellen Verfahrens, erreicht. Da keine wesentliche industrielle Umsetzung vorliegt, wird auf tiefer gehende Ausführungen verzichtet. Die kurze Zusammenfassung der Verfahrensvorteile ist damit ausreichend.

Vorteile dieses Verfahrens sind:

- kein Einsatz von Calciumoxid für die Citratfällung des klassischen Verfahrens
- kein Schwefelsäureeinsatz
- kein Gipsabfall
- geringe Verbrauchszahlen (Stoffen und Energie)
- geringere Emissionen
- beste Citronensäurequalität: Pharmaqualität
- Produktvariabilität technisch machbar
- erprobte Ausrüstungen nach dem Stand der Technik

3.3 Biotechnologische Verfahren Citronensäureherstellung mit Hefestämmen von *Yarrowia lipolytica*

3.3.1 Vorbemerkungen

Die Hefe *Yarrowia lipolytica* zeichnet sich gegenüber *Aspergillus niger* durch eine hohe Anzahl der für die Citronensäurebildung geeigneten Rohstoffe aus. Sie kann als genetisch veränderter oder natürlich selektierter Stamm eingesetzt, die gewünschten Stoffwechselleistungen zur Bildung von Citronensäure mit gezielter Stoffwechselregulierung erzeugen.

Einsetzbare Stoffe:

n-Alkanen, Fette, Öle, Glucose, Invertzucker (*Y. lipolytica* verfügt im natürlichen Vorkommen über keine Invertasesynthese), Essigsäure, Glycerin, Ethanol

Gegenüber dem *Aspergillus*-Verfahren ist eine größere Substratunabhängigkeit gewährleistet und Preisschwankungen von Rohstoffen könnten besser ausgeglichen werden. *Y. lipolytica* ist auch in der Lage unterschiedliche Substrate im Gemisch gemeinsam zu verwerten bzw. es können in der Wachstums- und Produktbildungsphase verschiedene Substrate eingesetzt werden.

Die Voraussetzung für die Überproduktion und Ausscheidung von Citronensäure in das Fermentationsmedium durch *Yarrowia lipolytica* ist der Eintritt in die Phase des stickstofflimitierten Wachstums. Im Gegensatz zu dem klassischen Citrat-Schwefelsäure-Verfahren mit *Aspergillus niger* ist bei der Fermentation mit Hefen (pH 3,5-5,0) keine vollständige Neutralisation des Fermentationsmediums erforderlich und eine umweltschonende qualitätsgerechte Produktaufbereitung mit innovativen Techniken möglich.

3.3.2 Citronensäurebildung auf Grundlage lipophiler Substrate

Vor 5 Jahren orientierten sich Forschungs- und Entwicklungsaktivitäten am UFZ vor allem auf den Einsatz von pflanzlichen Ölen als Substrat nachwachsender Rohstoffe - als neue Perspektive. Dies lässt sich damit begründen, dass Überschüsse an Ölsaaten auftraten. Für den Einsatz von Pflanzenölen zur Citronensäureherstellung spricht zusätzlich auch die Tatsache, dass es keine physiologischen Bedenken gibt, wie bei der Verwendung von *n*-Alkanen aus Erdölprodukten.

Es wurde das einheimischen Raps- und Sonnenblumenöl am UFZ untersucht. Untersuchungen mit dem preiswerteren tropischen (aber nicht nachhaltig erzeugten) Palmöl folgten.

Der grundsätzliche Prozessablauf der Citronensäureherstellung nach dem Lipophil-Substrat-Verfahren mit der Hefe *Yarrowia lipolytica* ist in Anhang dargestellt. Es wurden im Rahmen von Entwicklungsarbeiten am UFZ bereits batch und fed-batch Fermentationen untersucht. Eine technische Umsetzung wurde nicht weiter untersucht bzw. verfolgt.

Substratbereitung und Fermentationsmedium

Das Pflanzenöl wird in Tanks angeliefert und gelagert. Eine vorbereitende Pasteurisation des einzusetzenden Öls bei 80°C ist der erste Verfahrensschritt. Eine Sterilisation würde zu einer unerwünschten Veränderung im Fettsäuremuster führen.

Das Prozesswasser und die erforderlichen Nährsalzen werden sterilisiert und nach Abkühlung auf Fermentationstemperatur in den Fermenter vorgelegt.

Fermentation

Die Erfahrungswerte zur Fermentation basieren auf Versuchen im Labormaßstab im klassischen Rührfermenter und wurden noch nicht im Scale-up verifiziert.

Nach Bereitstellung der sterilisierten Lösung in der Fermentation erfolgt eine Animpfung mit der in der Vorfermentation erzeugten Hefekultur *Yarrowia lipolytica* im Verhältnis 1:10 bis 1:20.

Großtechnisch sollten später ebenfalls Rührfermenter zum Produktionseinsatz genutzt werden.

Der pH-Wert wurde mit Natronlauge auf 5,0 eingestellt und geregelt. Die Fermentationstemperatur betrug 30°C. Die Belüftungsrate war zwischen 0,1 -1,0 vvm zu regeln. Die Fermentationszeit im Prüfumfang war für die batch Fermentation 125 h und für das fed-batch auf 360 h bemessen.

Bei einer anfänglichen Ölkonzentration von 70 g/l (mit BTS 5 g/l) wurde im batch Betrieb eine Citronensäuremenge von 102 g/l erreicht sowie 6 g/l Isocitronensäure.

Im fed-batch Betrieb betrug die anfängliche Ölkonzentration 150 g/l (mit BTS 10 g/l) und es wurde eine Citronensäuremenge von 198 g/l und 8,7 g/l Isocitronensäure nachgewiesen.

Die Substratendkonzentration im Medium betrug im batch Betrieb < 1,0 g/l und im fed-batch Betrieb 15 -20 g/l.

Die erzielten Fermentationsausbeuten betrugen damit:

Batch Fermentation: 1,45 g/g (g Citronensäure/g Pflanzenöl)

Fed-batch - Fermentation: 1,3 g/g

Biomasseabscheidung

Für die Biomasseabscheidung wird Zentrifugation und Cross-Flow-Rückführung der Biomasse vorgesehen.

Vorreinigungstrennsysteme

Zur Abtrennung der kationischen und anionischen Verunreinigungen wird auf elektrochemische Abscheidung mit bipolaren Membranen orientiert.

Bei der Elektrodialyse handelt es sich um ein Trennverfahren, bei dem wässrige Lösungen nach Anlegen eines elektrischen Spannungsfeldes durch Ionenwanderung - durch permselektive Membranen mit Ionenaustauschereigenschaften - entsalzt werden. Die Elektrodialyse gewährleistet eine bessere Selektivität bei höheren Konzentrationen als die Entsalzung durch einfachen Ionenaustausch.

Eindampfung / Kristallisation / Trocknung

Für die gereinigte Citronensäurelösung ist die Aufkonzentrierung in der bekannten Weise nach dem Stand der Technik über Vakuumverdampfer und Vakuumkristallisator vorzusehen. Die Citronensäurekristalle werden abzentrifugiert, gewaschen und im Fließbettrockner nach dem Stand der Technik getrocknet.

Vorteile des Verfahrens der Metabolisierung von biologischen Ölen zu Citronensäure sind:

- kein Einsatz von Calciumoxid für die Citratfällung (klassisches Verfahren)
- kein Schwefelsäureeinsatz
- kein Gipsabfall
- geringe Verbrauchszahlen
- geringe Emissionen
- beste Citronensäurequalität: Pharmaqualität
- erprobte Fermentations- und Aufarbeitungsanlagen nach dem Stand der Technik

3.3.3 Citronensäurebildung auf Grundlage kohlenhydrathaltiger Substrate

Die neueren Forschungs- und Entwicklungsaktivitäten am UFZ orientieren vor allem auf den Einsatz von Glucose, Glucosesirup (Stärkehydrolysat) und Saccharose als Substrat nachwachsender Rohstoffe und dem perspektivischen Einsatz genetisch modifizierter Hefen, *Yarrowia lipolytica* H222. Dies lässt sich damit begründen, dass diese Rohstoffe nachhaltig erzeugt werden können und ein großes Verfügbarkeitspotential besitzen. Für den Einsatz kohlenhydrathaltigen Substraten zur Citronensäureherstellung spricht auch die Tatsache, dass es keine physiologischen Bedenken gibt, da die Substrate bereits im und außerhalb des Lebensmittelsektors erfolgreich praktisch eingesetzt werden.

Die Untersuchungen wurden bei Anwendung von Stärkehydrolysaten mit biosensor-gesteuerter Substratnachdosierung durchgeführt.

Der grundsätzliche Prozessablauf der Citronensäureherstellung nach diesem „Hydrophil-Substrat“-Verfahren mit der Hefe *Yarrowia lipolytica* ist im Anhang dargestellt.

Es wurden im Rahmen von Entwicklungsarbeiten fed-batch und repeated fed-batch Fermentationen untersucht, die der Bewertung dienen.

Substratbereitung und Fermentationsmedium

Der jeweilige Flüssigzucker wird gereinigt und konzentriert in Tanks angeliefert und gelagert und von Vorlagen in den Fermenter dosiert. Das Prozesswasser und die erforderlichen Nährsalzen werden sterilisiert und nach Abkühlung auf Fermentationstemperatur in den Fermenter vorgelegt bzw. dosiert.

Zur labortechnischen Untersuchung wurden folgende kohlenhydrathaltige Substrate eingesetzt:

- Glucosemonohydrat, Glucosesirupe Südzucker, C* SWEET und RL95
- Saccharose für genetisch modifizierte Hefen mit implementierter Invertaseaktivität

Fermentation

Die Erfahrungswerte zur repeated fed-batch Fermentation basieren auf Versuchen im Labormaßstab im klassischen 10 l Rührfermenter ($V_0=5$ l; 675-1500 rpm) und wurden noch nicht im industriellen Scale-up verifiziert.

Nach Bereitstellung der sterilisierten Lösung in der Fermentation erfolgt die Animpfung mit der in der Vorfermentation erzeugten Hefekultur *Yarrowia lipolytica* H222 im Verhältnis 1:10.

Großtechnisch sollen Hochleistungsrührfermenter mit optimalem Sauerstoffeintragsvermögen zum Produktionseinsatz kommen.

Der pH-Wert wurde auf 6,0 bzw. 7,0 (Saccharosefermentation) eingestellt und geregelt. Die Fermentationstemperatur betrug einheitlich 30°C. Der pO_2 wurde auf 50 % bemessen. Die Fermentationszeit im Prüfumfang war für das repeated fed-batch auf 72 h (3 Zyklen) und 48 h (7 Zyklen) bemessen.

Bei einer anfänglichen Substratstartkonzentration von 150 g/l wurde nach Erreichen von 20 g/l Glucose (bzw. Saccharose) im Fermentationsmedium eine biosensorgesteuerte Nachdosierung einer 500 g/l Glucoselösung (bzw. 750 g/l Saccharose, programmgesteuert) durchgeführt und nach 72 h Fermentationsbetrieb eine Citronensäuremenge von 104 g/l (114 g/l) bei einer BTS von durchschnittlich 26,5 g/l (16 g/l) erreicht.

Die Substratendkonzentration im Medium betrug im batch Betrieb < 1,0 g/l und im fed-batch Betrieb 15 – 20 g/l.

Die erzielten Fermentationsausbeuten betrugen damit:

Fed-batch Fermentation: 0,40 – 0,69 g/g (g Citronensäure/g Glucose)
 0,57 – 0,64 g/g (g Citronensäure/g Saccharose)

Die Citronensäureleistung P_{CS} lag bei allen Fermentationen zwischen 0,03 – 0,05 h⁻¹.

Bei den technischen Substraten konnte wie bei Einsatz von Glucosemonohydrat eine durchschnittliche fermenterspezifische Citronensäureleistung von 1 bis 1,4 g/(l*h) und dem Einsatz von durchschnittlich 25 g/l Hefe berechnet als Biotrockenmasse erzielt werden.

Biomasseabscheidung

Für die Biomasseabscheidung wird Zentrifugation und Cross-Flow-Rückführung der Biomasse vorgesehen.

Vorreinigungstrenneinheit

Zur Abtrennung der kationischen und anionischen Verunreinigungen wird auf elektrochemische Abscheidung mit bipolaren Membranen orientiert.

Bei der Elektrodialyse handelt es sich um ein Trennverfahren, bei dem wässrige Lösungen nach Anlegen eines elektrischen Spannungsfeldes durch Ionenwanderung - durch permselektive Membranen mit Ionenaustauschereigenschaften - entsalzt werden. Die Elektrodialyse gewährleistet eine bessere Selektivität bei höheren Konzentrationen als die Entsalzung durch Ionenaustausch.

Es ist eine Rückgewinnung der Natronlauge und ihre Rückführung in den Prozess aus betriebswirtschaftlicher Sicht vorgesehen.

Eindampfung / Kristallisation / Trocknung

Für die gereinigte Citronensäurelösung ist die Aufkonzentrierung in der bekannten Weise nach dem Stand der Technik über Vakuumverdampfer und Vakuumkristallisator vorzusehen.

Die Citronensäurekristalle werden abzentrifugiert, gewaschen und im Fließbettrockner nach dem Stand der Technik getrocknet.

Vorteile des Verfahrens der Metabolisierung von Zucker und Stärkehydrolysaten zu Citronensäure:

- Ökologisch und ökonomisch nachhaltig erzeugte breite Kohlenhydrat-Substratbasis der agra-industriellen Wirtschaft
- kein Einsatz von Calciumoxid für die Citratfällung (klassisches Verfahren)
- kein Schwefelsäureeinsatz
- kein Gipsabfall
- geringe Verbrauchszahlen auch gegenüber Bioölsbstraten (insbesondere Belüftung, Energie)
- geringe Emissionen
- beste Citronensäurequalität: Pharmaqualität
- erprobte Fermentations- und Aufarbeitungsausrüstungen nach dem Stand der Technik

Wesentliche Vorteile gegenüber dem Substrateinsatz von Bioölen ist die Möglichkeit des Arbeitens mit höheren Substratkonzentrationen und Biomassen. Hieraus lässt sich eine verbesserte Raumzeitausbeute generieren.

Die echte Lösung der Substrate gegenüber dem limitierten Zweiphasen-System (Öl/Wasser) und des damit verbundenen geringeren Reinigungsaufwandes für die Technik führt zu weiteren Einsparungen.

4. Spezifische Verbräuche / t Endprodukt Citronensäure in Pharmaqualität

Hier werden aus Veröffentlichungen die o. g. Verbrauchswerte für das klassische *Aspergillus*-Verfahren dargestellt. Für die Verfahren unter Einsatz von Stämmen der Hefe *Yarrowia lipolytica* erfolgt eine Abschätzung anhand der erzielten Ergebnisse im Labormaßstab.

4.1 Klassisches Verfahren

Spezifische Verbrauchszahlen / t Citronensäuremonohydrat

Melasse (50 % fermentierbarer Zucker)	2,8	t
Chemikalien für die Vorbereitung	50 – 200	kg
Entschäumer	5,0	kg
Calciumoxid (96,6 % CaO)	0,4	t
Schwefelsäure (96 %)	0,72	t
Salzsäure (32 %)	200	kg
Ätznatron (50 %)	130	kg
Dampf	10	t
Prozeßwasser	34	m ³
Trinkwasser	50	m ³
Kaltwasser (10 °C)	50	m ³
Reinwasser	10	m ³
Kühlwasser (30 °C)	200	m ³

4.2 Citronensäureproduktion auf Grundlage lipophiler Substrate durch *Yarrowia lipolytica*

Spezifische Verbrauchszahlen / t Citronensäure in Pharmaqualität (nach Bio-Ingenieurtechnik-GmbH) / Schätzwerte

Pflanzenöl	0,7-0,77 t
Trinkwasser	9 m ³
Make up Wasser für Kühlturm	6 m ³
Dampf 3,5 bar abs.	3 t
Elektroenergie	1900 kWh
Nährstoffe	10 kg
Spurensalze	
Entschäumer	2 l
Filterhilfsmittel	3,5 kg

Abwasseranfall:

Der Abwasseranfall wird analog dem LURGI-Verfahren eingeschätzt.

Abwasser (organisch verschmutzt)	6-8m ³
Mycelschlamm; TS: 10% (inkl. UF Retentat)	1,2 t
Salzwasser (ca. 3 % Natriumchlorid)	3 m ³

Anmerkung: Der spezifische geringe Substratverbrauch ist zu optimistisch geschätzt, da er nicht aus substrat-energetischer Betrachtung bei einer optimalen Emulsionsbildung herleitbar ist.

4.3 Citronensäureproduktion auf Grundlage kohlenhydrathaltiger Substrate durch *Yarrowia lipolytica*

Spezifische Verbrauchszahlen /t Citronensäure in Pharmaqualität

	Schätzwerte
Zucker (Hydrolysate)	1,2 -1,8 t in Abhängigkeit der Glucosesirupqualität
Trinkwasser	7 m ³
Make up Wasser für Kühlturm	6 m ³
Dampf 3,5 bar abs.	2,5 t
Elektroenergie	1600 kWh
Nährstoffe/Salze	10 kg
Entschäumer	2 l
Membranfilterhilfsmittel	3 kg

Abwasseranfall:

Der Abwasseranfall reduziert sich für die Fermentation und die Aufarbeitung gegenüber dem klassischen Verfahren und dem Hefeeinsatz für Bioölkonzentrierung. Es sind keine Ölphasen zu entfernen. Der Einsatz von Hochleistungsreinigungsmittel (biologisch abbaubar) mit internen technischen Reinigungssystemen gewährleistet weitere Einsparungen.

Abwasser (organisch verschmutzt)	5 -6m ³
Hefeschlamm; TS: 10 %	1,2 t *
Salzwasser (ca. 3 % Natriumchlorid)	3 m ³

* Diese hochwertige Hefebiomasse ist aufbereitungsfähig und als Tierfutter zu vermarkten.

5. Vergleich des biotechnologischen Verfahren des HEFE/KOHLNHYDRAT-Einsatzes gegenüber dem klassischen Verfahren hinsichtlich der Kosten für das Investment und die Produktion von Citronensäure

Ausgehend von einer Anlagenkapazität 20.000 t/a Citronensäure in Pharmaqualität wurden für die vier Verfahren die Investitionskosten und die jährlichen Produktionskosten hochgerechnet bzw. abgeschätzt.

Zur Charakterisierung der Verfahren und des dazu erforderlichen Equipment wurden Angebote potentieller Anlagenlieferanten herangezogen und neben der Auswertung einschlägiger Fachliteratur auch eigene Erfahrungen bei der Prozess- und Anlagengestaltung zugrunde gelegt. Nicht in die Bewertung einbezogen wurden Aufwendungen, die sehr stark von Standortbedingungen abhängen wie z. B. Bau sowie Hilfs- und Nebenanlagen (Dampferzeugung, Stromversorgung, Aufwendungen für Infrastruktur und Logistik).

Die Rohstoff- und Energiekosten wurden anhand von spezifischen Verbräuchen ermittelt. Als Bioölpreis für das Verfahren mit *Yarrowia lipolytica* war ein Mittelwert von 435 €/t von BIO-Ingenieurtechnik 2004/2005 festgelegt worden.

Bei Einsatz von preiswerteren tropischen Ölen, wie Palmöl, sollten damals die Rohstoffkosten zu senken sein, was entgegen der geforderten Nachhaltigkeit für das Verfahren steht. Rapsöl kostete in Rotterdam jedoch ab August 2009 595 €/t, Sojaöl 611 €/t und Palmöl lag noch bei 423€/t.

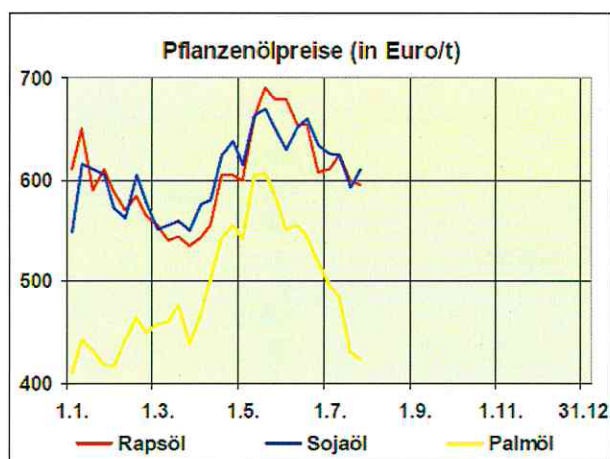


Abb. 2: Pflanzenölpreisentwicklung 2009

Die Rohstoff- und Energiekosten für die Metabolisierung von Zucker zu Citronensäure wurden anhand der spezifischen Verbräuche ermittelt. Als durchschnittlicher Zuckerpreis für das Hefe-Alternativverfahren wurde ein Mittelwert von 404 €/t (Saccharose) zugrunde gelegt. Es ist jedoch darauf zu achten, dass die Marktregelungen und Marktentwicklungen dabei wie folgt zu beachten sind:

Im europäischen Wirtschaftsraum ist die Änderung der Zuckermarktordnung zu beachten. Hauptpunkte der revidierten Marktordnung mit einer Laufzeit der Marktordnung von 9 Jahren: vom 1. Juli 2006 bis zum 30. September 2015 sind kurz zusammengefasst.

Preise und Einkommensausgleich

- Senkung des Zuckerpreises in 4 Jahren um 36 %. Nach 4 Jahren bleibt der Zuckerpreis bis zum 30. 9. 2015 auf einem Niveau von Euro 404,40 pro Tonne.
- Senkung des Mindestrübenpreises in 4 Jahren um 39,7 %. Der Mindestrübenpreis war bis zum 30.6.2006 Euro 43,63 pro Tonne. Rüben und wird dann schrittweise zu einem Niveau von Euro 26,30 pro Tonne gesenkt werden ab 1. 10. 2009.
- Die Rübenzüchter bekommen 64,2 % Einkommensausgleich über den Preisunterschied zwischen dem derzeitigen Mindestrübenpreis und dem neuen Mindestrübenpreis. In den ersten 2 Jahren wird dieser Ausgleich 60 % der Preisdifferenz sein.
- Der Einkommensausgleich für die Rübenzüchter besteht in einem Einkommenszuschlag, der von der Produktion entkoppelt ist.
- Der Festmindestzuckerpreis oder Interventionspreis wird ersetzt durch einen Bezugspreis. Die Europäische Kommission in Brüssel wird den europäischen Zuckermarktpreisen folgen. Wenn diese Marktpreise strukturell unter dem Bezugspreisniveau liegen, wird die Kommission Maßnahmen ergreifen um das Preisniveau im Markt zu fördern bzw. zu erhöhen. Um den EU-Marktpreis zu fördern, kann Brüssel zum Beispiel beschließen eine finanzielle Unterstützung zur Verfügung zu stellen für Privatlagerung oder wird man Quotenzucker dem Markt entziehen. In letzterem Fall wird allen Mitgliedstaaten ein Prozentsatz auferlegt, womit die Zuckerquoten gekürzt werden.

Produktion außerhalb der Quote

Der Zucker (Saccharose), Iso-Glucose oder Inulinsirup, die in einer Verkaufssaison über der Quote produziert werden, dürfen:

verwendet werden für die Fertigung bestimmter Produkte wie:

- Bioethanol, Alkohol, Rum, Hefe und Mengen Schmierrisip u. a.
- bestimmte Industrieprodukte, die keinen Zucker enthalten, sondern für deren Fertigung Zucker, Iso-Glucose oder Inulinsirup verwendet werden;
- bestimmte Produkte der chemischen oder pharmazeutischen Industrie, die Zucker, Iso-Glucose oder Inulinsirup enthalten.

Damit steht Zucker als Substrat auch im europäischen Raum über die Quoten hinaus für biotechnologische Prozesse zur Verfügung.

Internationaler Rohstoffmarkt der Kohlenhydrate und -produkte:

Während sich das Agrargut Mais zur Herstellung von Glucosesirup im vergangenen Jahr trotz eines Minus von 22 Prozent noch vergleichsweise gut hielt, liegt es im laufenden Jahr mit einem Minus von weiteren zehn Prozent weit hinten im Rohstoff-Ranking. Das US-Landwirtschaftsministerium USDA rechnet bei Mais als einzigem Agrarrohstoff für das Jahr 2009/10 mit einem Angebotsdefizit. Grund ist eine prognostizierte Rekordnachfrage von 795 Mio. Tonnen, auf die die Produzenten nach Einschätzung der Rohstoff-Experten von Credit Suisse nicht vorbereitet sein dürften. In der Konsequenz rechnen sie damit, dass die wichtige Kennzahl der Lagerbestände im Verhältnis zum Verbrauch auf einen historischen Tiefstand fallen wird, was einen Preisanstieg ab dem vierten Quartal wahrscheinlich erscheinen lasse. Die Analysten der Unicredit rechnen für Agrarrohstoffe mit einem "heißen Herbst". Ob dieser auch die Preise für Weizen mit nach oben zieht, ist allerdings fraglich. Zwar erwartet das US-Landwirtschaftsministerium für dieses Jahr eine Rekordnachfrage von 637 Mio. Tonnen. Allerdings sind auch die Lagerbestände so hoch wie noch nie seit Beginn des Nachfragebooms. Da das Angebot in diesem Jahr zudem nicht spürbar zurückgehen dürfte – vorausgesetzt, unkalkulierbare Wetterbeeinträchtigungen bleiben aus -, sind die Aussichten für den Weizenmarkt allenfalls durchwachsen. Gleiches gilt für die Preisentwicklung im laufenden Jahr: Seit Anfang 2009 ist der Weizenpreis um 14 Prozent gefallen. (Quelle Handelsblatt 13.09.09).

Auf den bewegten internationalen Zuckermarkt der letzten Jahre soll im Folgenden nochmals eingegangen werden, da der Rohstoffpreis wesentlich die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens mitbestimmt. Die geschilderten Zusammenhänge zeigen, dass mit dem Einsatz von *Yarrowia lypolytica* mit ihrem breiten Substratverwertungsspektrum gut Voraussetzungen gegeben sind, Hochpreissituationen bei Einzelprodukten des Weltmarktes durch Substratwechsel abzufedern und das Verfahren wirtschaftlich weiter zu betreiben:

Die Preise für Rohrzucker (Kontrakt Nr. 11 an der New York Board of Trade) bewegten sich seit Jahresbeginn 2007 bei knapp über 10 Cent je Pfund. Im März 2007 hatte der Preis noch bei rund 18 Cent gelegen, nachdem die Notiz im Vorjahr insgesamt rund 20 % verloren hatte. Der Hauptgrund für den eingetretenen Preisrückgang ist der zunehmende Produktionsüberschuss der wichtigsten Erzeugerländer. Unter diesen liegt Brasilien eindeutig an der Spitze. Das Land exportiert rund 50 % des global verfügbaren Zuckerangebotes. Thailand und Australien, die nächst größeren Anbieter, stellen dagegen nur gerade 18 %.

Vertreter von Cargill International gehen gar so weit, eine zunehmende Abhängigkeit der Konsumentenländer von Brasilien zu prognostizieren; jegliche Angebotsunterbrechung - sei sie wetterbedingt oder von der brasilianischen Politik diktiert - hätte sofort spürbare Folgen für den Zuckerpreis. Die Internationale Zuckerorganisation erwartete für das Erntejahr 2006/07 eine brasilianische Ernte von 32,4 Mio. t; das entsprach rund einem Fünftel des erwarteten weltweiten Ausstoßes. Angesichts dieser Zahlen und der allmählich steigenden Nachfrage

Maßgebliche Beobachter rechnen damit, dass der politische Druck zur vermehrten Verwendung von Ethanol in den Industriestaaten eher zunimmt. Gleichzeitig ist daran zu erinnern, dass die Europäische Union, die früher zu den größten Produzenten und Exporteuren von Zucker gehört hat, bald zum Importeur werden dürfte. Nicht zuletzt deshalb wurden im Nahen Osten und in Nordafrika eine Reihe von Zuckerraffinerien gebaut; so hat etwa die saudiarabische Savola Group eine zweite Raffinerie in Ägypten sowie eine Expansion im eigenen Land angekündigt, derweil Cargill schon im Vorjahr den Bau einer Anlage in Syrien in die Wege geleitet hatte. Trotz allem gilt es im Auge zu behalten, dass der Zuckerexport für Brasilien keine lebensnotwendige Aktivität ist; er bleibt, wie ein brasilianischer Ökonom unlängst festhielt, eine Option. (Quelle NZZ 23.03.07)

In der dritten Jahresauswertung der ISO wird eine Weltzuckerproduktion mit 161,527 Mio Tonnen festgestellt. Ein bedeutender Produktionsfehlbetrag in Indien und eine weitere Verkleinerung der Produktion in der EU einerseits, und einer ständigen Vergrößerung der Zuckerproduktion in Brasilien andererseits sind die drei Hauptveränderungen von 2008/09. Wie man erwartet, entfernt die gemeinsame Wirkung der Produktionsverminderungen der EU und Indiens massiv 7,084 Mio Tonnen von der Weltzuckerversorgung, trotz des hohen Rekordwachstums in der Zuckerproduktion in Brasilien. Bis jetzt ist ein Sinken in der vorausgesagten Produktion in Indien (von 23,9 Mio Tonnen geplant im August zum gegenwärtigen Zeitpunkt von 19,55 Mio Tonnen) durch eine praktisch identische Zunahme in Brasilien (von 33,22 Mio Tonnen auf 37,54 Mio Tonnen) ausgeglichen worden. Inzwischen, wie man voraussagt, wächst der globale Verbrauch um 2,19 % auf 165,801 Mio Tonnen. Wie man jetzt erwartet, ist die Weltproduktion 4,274 Mio Tonnen geringer als der Weltverbrauch im Vergleich zu geplanten 3,626 Mio Tonnen, geplant für November. Folglich bleibt die statistische Meinung für den Markt bis zum Ende der Jahreszeit im September 2009 konstruktiv und unterstützend zu Weltmarkt-Werten. Die ISO stellt eine Weltexportverfügbarkeit für 2008/09 an 49,608 Mio Tonnen im Vergleich zu 46,25 Mio Tonnen im vorherigen Getreide-Zyklus heraus.

Abb.3: Weltmarktpreisentwicklung für Zucker (Quelle: Indischer Zuckerverband)

Bei der Abschätzung der Personalkosten wurde von vergleichbaren industriellen Anlagen unter mitteleuropäischem Lohnkostenniveau mit Instrumentierung nach dem Stand der Technik ausgegangen.

Die Schätzungen für die Investments und der Energie- und Rohstoffkosten sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst:

	Anlagenkapazität 20.000t/a Citronensäure	Klassisches Verfahren EURO	F-Yarrowia - Verfahren Öle EURO	F-Yarrowia - Verfahren KH EURO
1.	Investkosten (nur Anlageninvest)	42.900.000	30.060.000	28.000.000
2.	Produktionskosten/a			
	Rohstoffe	10.665.600	12.229.400	11.000.000
	Energie	10.650.000	4.442.200	4.000.000
	Personal	8.000.000	7.000.000	6.500.000
	Abschreibung	3.750.000	2.505.000	2.000.000
	Summen:	33.065.600	26.176.600	23.500.000

Tabelle 1: Invest-/Produktionskostenschätzung

Erläuterungen zur Tabelle:

Die geringeren Investmentkosten beim Einsatz von Kohlenhydraten sind darin begründet, dass die Rohstoffe in sauberer Form ohne Vorbehandlung eingesetzt werden könnten bzw. durch ein Mikrofiltrationsverfahren erhebliche Anlagenkosten für thermische Verfahren entfallen.

Gegenüber dem klassischen Verfahren mit *Aspergillus niger* verringert sich der Investmentaufwand um ca. 35 %. Er liegt auch noch deutlich unter dem, des Einsatzes von lipophilen Substraten und Hefen zur Citronensäureproduktion (siehe auch Anhang: Schema 3).

Die Verkürzung der Fermentationsproduktionszykluszeiten konnten von 5-6 Tagen beim Einsatz von *Aspergillus niger* auf 2-3 Tage reduziert werden. Bei erreichbaren Citronensäureendkonzentrationen von ca. 100 g/l. Das Klassische Verfahren erreicht in diesem Zeitraum ca. 70 g/l Citronensäure (Endkonzentration 140 g/l nach 6 Tagen).

Es wird weiterhin abgeschätzt, dass das UFZ-Verfahren bei Einsatz von lipophilen Substraten gegenüber Verfahren mit Kohlenhydrat-Substraten einen etwa um 15 – 20 % höheren Elektroenergiebedarf infolge des erforderlichen höheren Sauerstoffbedarfes während der Wachstumsphase im Fermentationsprozess hat. Die Einsparung von 15 - 20 % Kostenersparnis für die geringere Belüftung bei Kohlenhydratsubstraten bringt das Verfahren bezüglich der genannten bewerteten energetischen Parameter an die Spitze der Wirtschaftlichkeit.

Die Einsparung von kompletten Verfahrensstufen verbunden mit Energieeinsparungen und der Vermeidung von Abfällen in flüssiger und fester Form spricht für das wirtschaftliche Anwendungspotenzial des Verfahrens (vergleiche Schemata 1 und 2 im Anhang). Damit verbunden ergeben sich abgeleitet die Einsparungen im Personalaufwand.

Von besonderer Bedeutung für weitere Einsparungspotenziale, auch unter ökologisch-ökonomischen Gesichtspunkten, ist beim Verfahren mit Hefen ein hohes Prozesswasserrückführungspotenzial im Fermentationsprozess.

6. Ausblick zur weiteren Verfahrensentwicklung

Bei der weiteren industriellen Verfahrensentwicklung des kohlenhydratbasierten Herstellungsverfahrens für Citronensäure unter Verwendung von *Yarrowia lipolytica* sollten daher den folgenden biotechnischen Problemstellungen besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden:

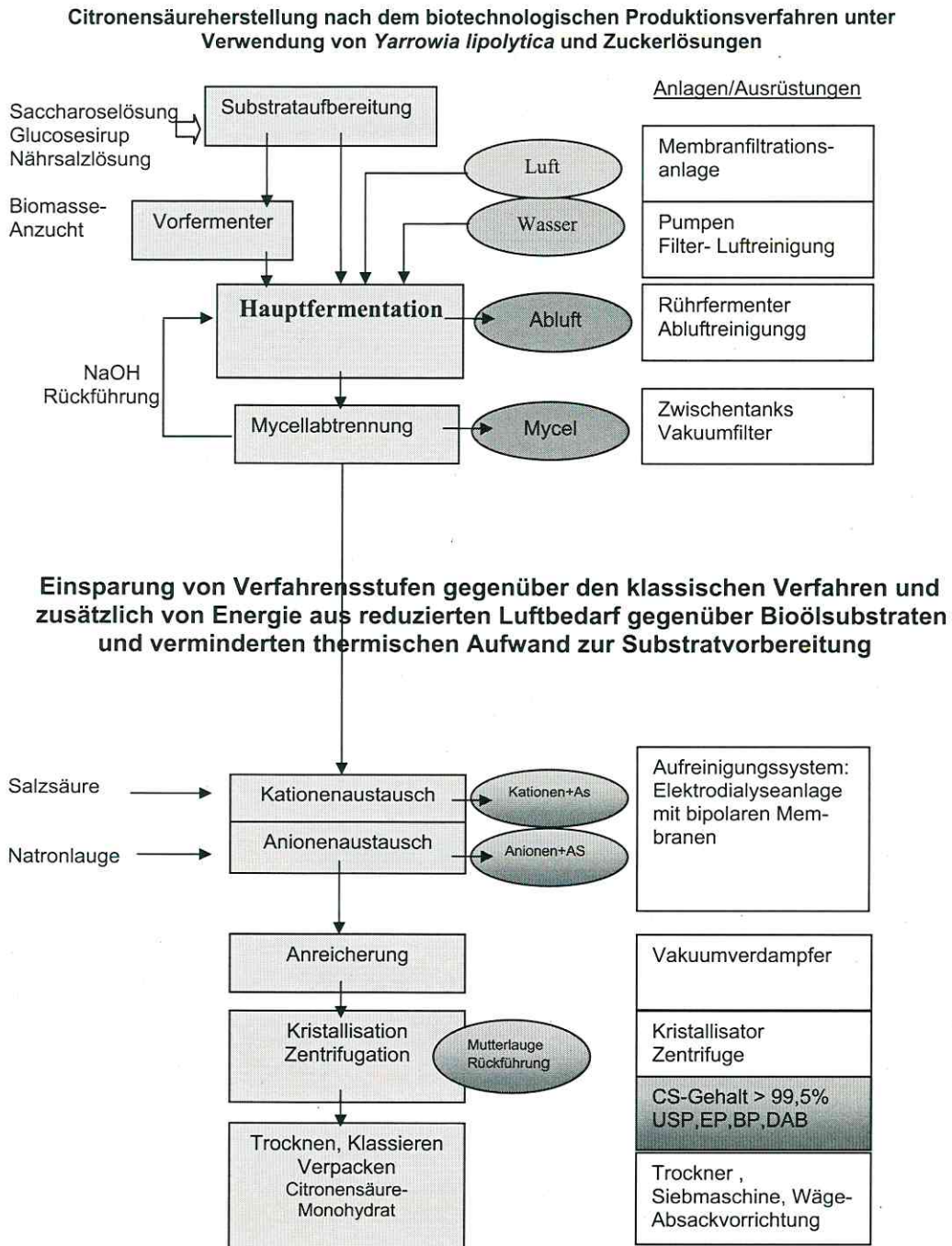
- Genauere Ermittlung des Sauerstoffbedarfes im Fermentationsprozess zwecks Optimierung des Energieeinsatzes und der Hefenversorgung, z.B. durch Anwendung einer fed-batch Technologie mit optimalen Rührwerken und Lufteintragsorganen
- Verifizierung des Verfahrens mit erhöhter Biomassekonzentration in der Maßstabsübertragung auf industrielle Fermentervolumina zum Erreichen des Optimums zwischen hoher Raumzeitausbeute und der substratbezogenen Citronensäureausbeute – Adaptationsverhalten/ Hefestammvorkultur-Management
- Simulation der Rückführung von Prozesswässern mit betriebswirtschaftlicher Prüfung
- Überprüfung des Potenzials des preiswerten Mischsubstrateinsatz - Abfangen von Marktpreisschwankungen der Substrate
- Bearbeitung und Verkauf der Hefebiomasse als wertvollen Futtermittelzusatz

7. Zusammenfassung

Wenn auch der europäische Markt durch Gesetzesrestriktionen und Duopolismus gegenwärtig kaum zugänglich ist, gehört dem Verfahren der Produktion von Citronensäure auf der Basis von kohlenhydrathaltigen Substraten (Zucker) unter Verwendung von *Yarrowia lipolytica* die Zukunft. Die Investmenteinsparungen von ca. 35 % und die energie- und verfahrensoptimierte Betriebskostensenkung (25-30 %) auf höchstem Niveau nach dem Stand der Technik verbunden mit mindestens 30 % besseren Raum-Zeit-Ausbeuten (100 g/l Citronensäure in 72 h bei hohen Biomassekonzentrationen von ca. 25 g/l BTS) sind gegenüber dem klassischen Herstellungsverfahren ein Argument für die Verfahrensetablierung im internationalen Markt. Bei steigenden Marktnachfragen von jährlich 2-3 % Citronensäure und den nach der Bankenkrise wieder steigenden Energie- und Rohstoffpreisen bietet das Verfahren mit seiner breiten Kohlenhydratverwertungsbasis eine sichere Alternative zum etablierten klassischen Verfahren. Der Vorteil des Abfangens von Rohstoffpreisschwankungen beim verfahrensvariablen Substrateinsatz ist zukünftig nicht unterzubewerten, um am Markt aktiv mit kostendeckenden Erzeugerpreisen ohne administrative Regularien teilnehmen zu können.

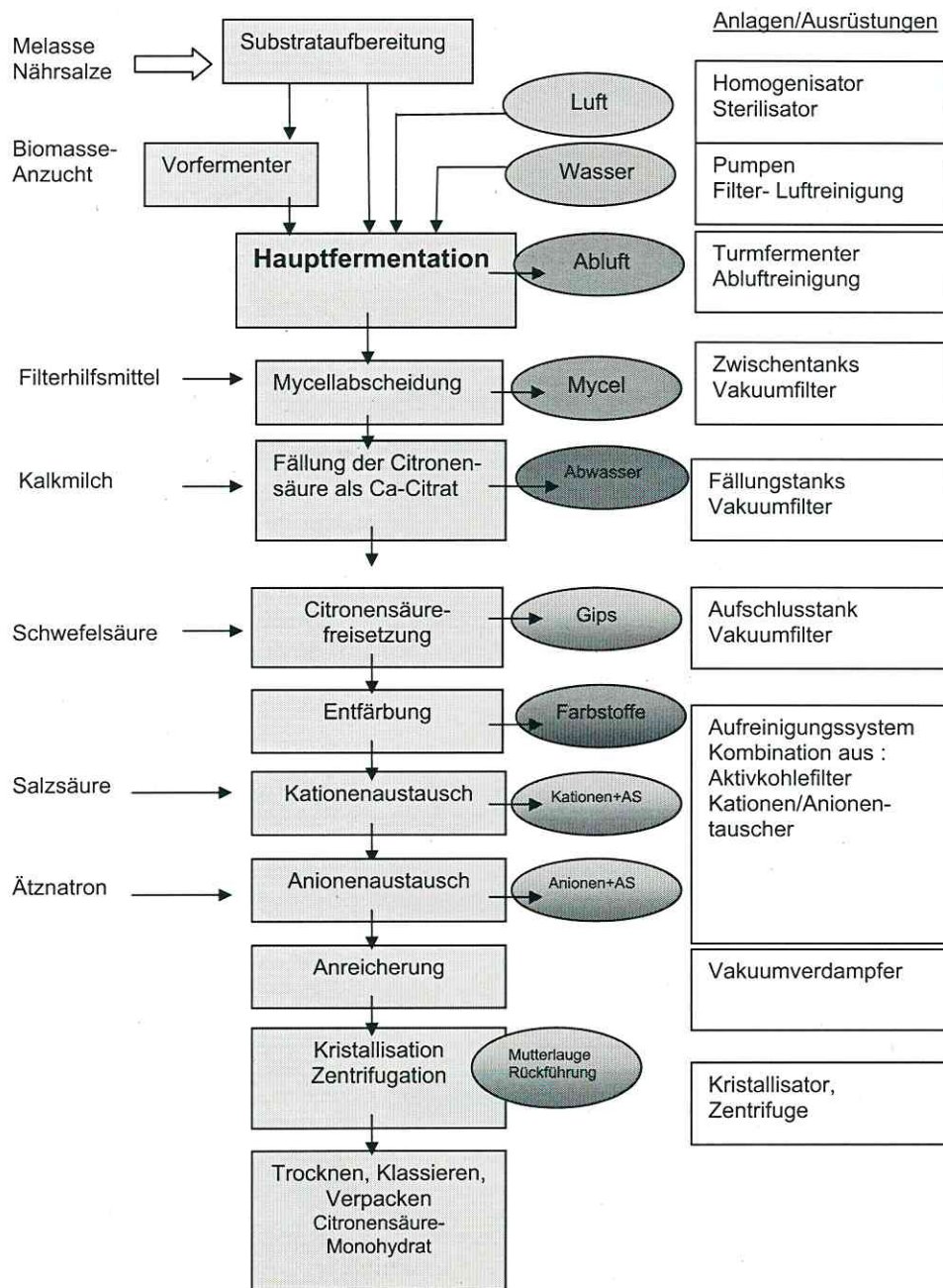
Anhang

Schema 1



Schema 2

Citronensäureherstellung nach dem kommerziell klassischen Produktionsverfahren unter Verwendung des Schimmelpilzes *Aspergillus niger*



Schema 3

