Bundesforschungsanstalt
für Landwirtschaft
Institut für Technologie

Abschlussbericht

zum Verbundvorhaben

Mikrobielle Produktion von Itaconsäure

Teilverbund 1:

FAL

„Itaconsäureherstellung aus nachwachsenden Rohstoffen als Ersatz für petrochemisch hergestellte Acrylsäure“

Förderkennzeichen: **22008203**

Laufzeit des Vorhabens: 01.10.2004 - 30.11.2007
Berichtszeitraum: 01.10.2004 - 30.11.2007

Dr. Thomas Willke (Projektleiter)

Dipl.-Biotechnol. Anja Kuenz

INHALTSVERZEICHNISS

1 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG 1

2 WISSENSCHAFTLICH-TECHNISCHE ERGEBNISSE 1

2.1 Zell-Screening 1

2.2 Arbeiten zur Effizienzsteigerung 2
2.2.1 Schüttelkolbenversuche 2
Handhabung 2
Substratlimitierung/- hemmung 3
Optimierung der Phosphatkonzentration 4
Einfluss der Sporenlagerung bei 4 °C auf die Aktivität des Pilzes 5
Diskussion: Kultivierung in Schüttelkolben 6
2.2.2 Multifermenteranlage 8
Sauerstoffversorgung 8
Einfluss diverser Medienkomponenten 11
Diskussion Kultivierung in der Multifermenteranlage 19
2.2.3 Produktbildung 20
Nebenproduktbildung 20
Produkthemmung 25

2.3 Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b in verschiedenen Reaktorformen 27
2.3.1 Rührreaktor-Umwurfreaktor 27
2.3.2 15 l Rührreaktor 30

2.4 Vergleich der IA produzierenden Stämme 31

2.5 Verdunstungseffekt bei der Kultivierung von *Aspergillus terreus* 33

2.6 Substrat-Screening 34
2.6.1 Mikrobielle Verwertbarkeit 34
Verwertbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen 34
Verwertbarkeit von Neben- bzw. Abfallprodukten 37

2.7 Aufarbeitung 38
2.7.1 Elektrodialyse 38
Versuche mit Modelllösungen 38
Kulturüberstände 39
2.7.2 Flüssig/Flüssig Extraktion 41
Optimierung des molaren Amin/Säure Verhältnisses sowie der Amin/ Alkohol Massenverhältnisse 42
Optimierung der Temperatur und der Extraktionsdauer 43

Einsatz des Extraktionssytemes bei realen Fermentationsbrühen 44
Untersuchung der Reextraktion 46
Untersuchung der Verträglichkeit des Extraktionsmittels 47
Onlineabtrennung der Itaconsäure 48

2.8 Verwertung der Produktionsrückstände und Nebenprodukte 49

3 SCHLUSSBETRACHTUNG 49

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Mit filamentös wachsenden Pilzen, *Aspergillus terreus* kann aus nachwachsenden Rohstoffen die chemische Verbindung Itaconsäure (IA) hergestellt werden. Nach einer Wachstumsphase startet die nahezu wachstumsentkoppelte Itaconsäureproduktion. Die gebildete Itaconsäure wird von den Zellen in das umgebende Medium abgegeben.
In diesem Verbundprojekt sollen von dem Projektpartner FAL schwerpunktmäßig folgende Arbeiten durchgeführt werden:

- **Zell-Screening**
- **Medienoptimierung / Arbeiten zur Effizienzsteigerung bzw. Kostenreduktion des gesamten Biokonversionsschrittes**
- **Substrat-Sreening:**
  Überprüfung der Rohsubstrate auf Eignung für die Itaconsäure Produktion
- **Aufarbeitung:**
  - Elektrodialyse
  - Flüssig-flüssig Extraktion
- **Verwertung der Produktionsrückstände**

2 Wissenschaftlich-technische Ergebnisse

2.1 Zell-Screening

In den bisherigen Projekten der FAL zum Thema „Itaconsäure“ wurde mit Stammsammlungsorganismen sowie mit einem selbst gescreenten Stamm, *A. terreus* LU02b, gearbeitet. Zu Beginn dieser Arbeit wurden die Stämme *A. terreus* NRRL 1963, NRRL 1960 sowie der gescreente Stamm *A. terreus* LU02b parallel unter den gleichen Bedingungen kultiviert (Abbildung 2.1-1). Dazu wurden 250 ml Erlenmeyerkolben mit je 100 ml Standardproduktionsmedium (Vorlop K.D., 2003), mit einem Start pH-Wert von 3,1, mit $1*10^6$ Sporen/ml angeimpft und bei 33 °C und 120 Upm (50 mm Rund- Schüttelbewegung) inkubiert.
Nach 17 Tagen wurde eine Endkonzentration von ungefähr 35 g/L Itaconsäure gemessen.
Die verschiedenen Stämme zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf der IA Produktion. Die Biotrockenmassen sowie der Glucoseverbrauch war über 17 Tage hinweg ebenfalls bei den drei Stämmen sehr ähnlich.
Somit sind unter diesen Bedingungen nicht der Stamm, sondern andere Faktoren für die schlechte IA Produktion entscheidend. Aus diesem Grund wurde nicht nach neuen Stämmen gescreent, da die Optimierung der Bedingungen von größerer Bedeutungen waren. Zur Effizienzsteigerung der IA Produktion wurden folgende Faktoren näher untersucht:

- Handhabung
- Sauerstoffversorgung
- Einfluss diverser Medienbestandteile
- Produkt- und Nebenproduktbildung

Da zwischen den Stämmen kein signifikanter Unterschied beobachtet wurde, wurden alle weiteren Kultivierungen mit dem selbst gescreenten Stamm *A. terreus* LU02b durchgeführt, der bereits nach 14 Tagen 35 g/l IA produziert hat.

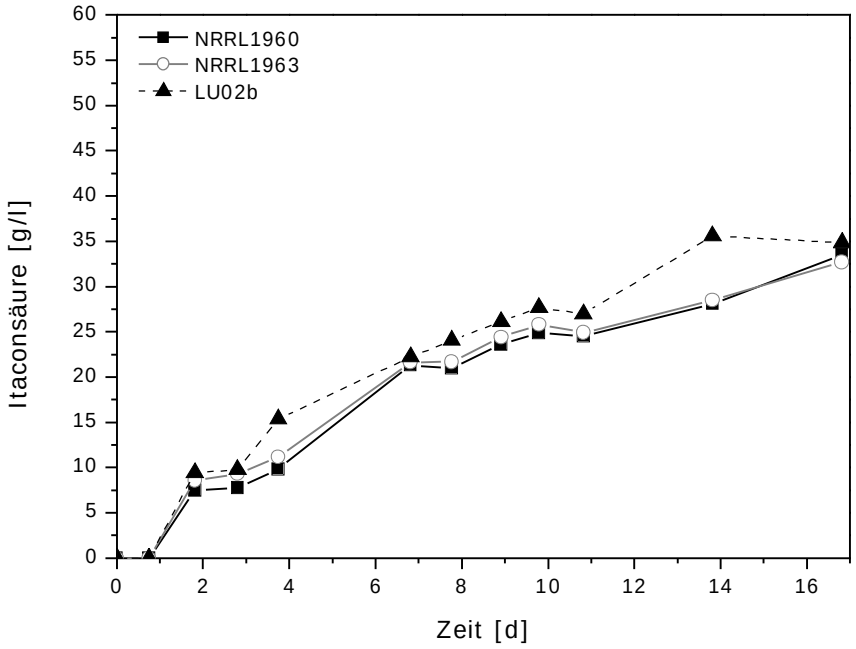

Abbildung 2.1-1: Itaconsäure gebildet von A. terreus 1960, 1963 und LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben; 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt, 120 Upm

2.2 Arbeiten zur Effizienzsteigerung

Alle Kultivierungen wurden mit dem an der FAL gescreenten und hinterlegten Stamm *Aspergillus terreus* LU02b durchgeführt.

2.2.1 Schüttelkolbenversuche

Handhabung

Während der Kultivierung war die Morphologie des Pilzes nicht einheitlich. Es war ein Gemisch aus freiem Myzel und kleinen Pellets. Dies deutet darauf hin, dass der Pilz nicht unter optimalen Bedingungen kultiviert wurde.
Bei den Probenahmen wurden bisher alle Kolben zusammen dem Schüttler entnommen und nacheinander bearbeitet. Vielleicht wurde der Pilz durch zu häufige Probenahme oder aufgrund langer Ruhephasen während der Probenahme unzureichend mit Sauerstoff versorgt.
Der Sauerstoffeintrag spielt eine wesentliche Rolle bei der IA Produktion mit *A. terreus.* Um während der Probenahme die Kultivierung nicht unnötig zu beeinflussen wurde ab dieser Kultivierung immer nur ein Kolben zur Probenahme aus dem Schüttler entnommen. Bei der Handhabung während der Probenahme wurde darauf geachtet, dass der Kolben immer per Hand geschüttelt wurde (neue Handhabung).
Bei der Kultivierung mit der neuen Handhabung wurden nach 7 Tagen Kultivierung 63 g/L IA gebildet. Die Morphologie des Pilzes war einheitlich. Er wuchs als feines freies Myzel.
Mit der neuen Handhabung konnten diese Ergebnisse mehrfach reproduziert werden. Um diese Auswirkung in der Probenahme begründen zu können, wurden zwei Kulturen vor jeder Probenahme 10 Minuten nicht geschüttelt (Abbildung 2.2-1).

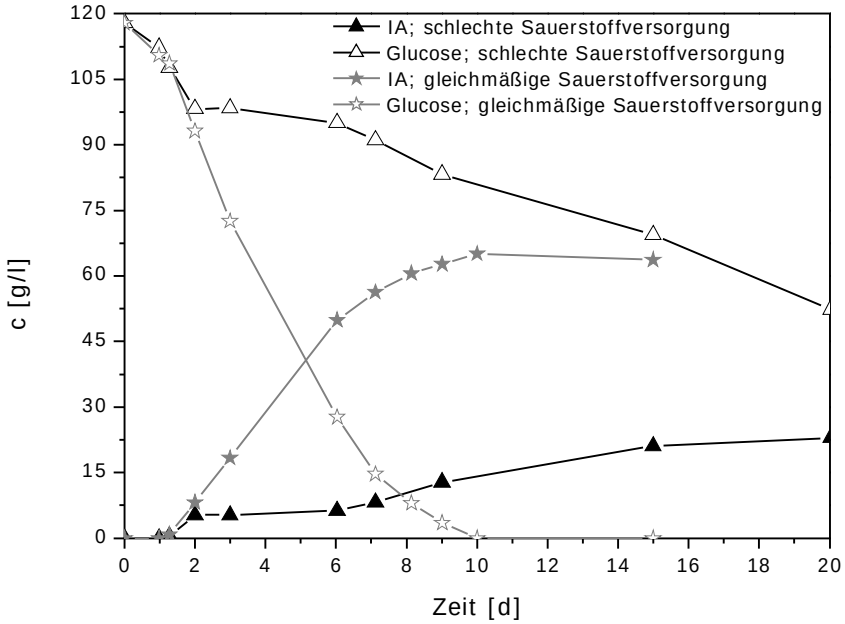

Abbildung 2.2-1: Neue Handhabung (gleichmäßige Sauerstoffversorgung) im Vergleich zu 10 Minuten nicht schütteln vor jeder Probenahme (schlechte Sauerstoffversorgung); Kultivierung von A. terreus LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben; 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt, 120 Upm

In den ersten zwei Tagen sind keine Abweichungen zu den anderen Kultivierungen (immer geschüttelt, gleichmäßige Sauerstoffversorgung) vorhanden. In dieser Zeit befindet sich der Pilz in der Wachstumsphase. Nach zwei Tagen wird kaum noch IA gebildet und Glucose verbraucht. Nach 7 Tagen Kultivierung wurden nur 8 g/L IA gebildet. Die Morphologie des Pilzes war während der Kultivierung nicht einheitlich. Er wuchs sowohl in Pellet- als auch in freier Myzelform. Wohingegen er mit der neuen Handhabung (gleichmäßige Sauerstoffversorgung) in einheitlicher Wuchsform als feines freies Myzel wuchs.
Folglich scheint es für die IA Produktion wesentlich zu sein, dass der Pilz während der Produktionsphase ausreichend und ständig mit Sauerstoff versorgt wird.
Die Ergebnisse der neuen Handhabung konnten mehrfach reproduziert werden. Somit wurden Kultivierungsbedingungen geschaffen, unter denen die IA Herstellung reproduzierbar ist und für weitere Optimierungen als Referenz dient. Diese Reproduzierbar konnte in den zwei bisherigen Projekten nicht erreicht werden, so dass positive oder negative Effekte während der Kultivierung nicht eindeutig auf veränderte Parameter zurück geführt werden konnten.
Bei Kultivierungen mit der neuen Handhabung nimmt die Produktivität nach ungefähr 7 Tagen ab. Für diese Hemmung könnte eine Substratlimitierung, die Bildung von Nebenprodukten oder eine Produkthemmung verantwortlich sein.

Substratlimitierung/- hemmung

Bisher wurden 120 g/l Substrat eingesetzt. Bei einer guten Sauerstoffversorgung wird dieses aber nach 10 Tagen vollständig verbraucht (Abbildung 2.2-1). Somit kann angenommen werden, dass nach 8 Tagen Kultivierung eine Substratlimitierung einsetzt, die Produktivität verringert wird und somit Konzentrationen von mehr als 65 g/l IA nicht erreicht werden können. Daher wurde eine Kultivierung mit 180 g/l Glucose durchgeführt, um zu überprüfen ob zum einem nach 8 Tagen

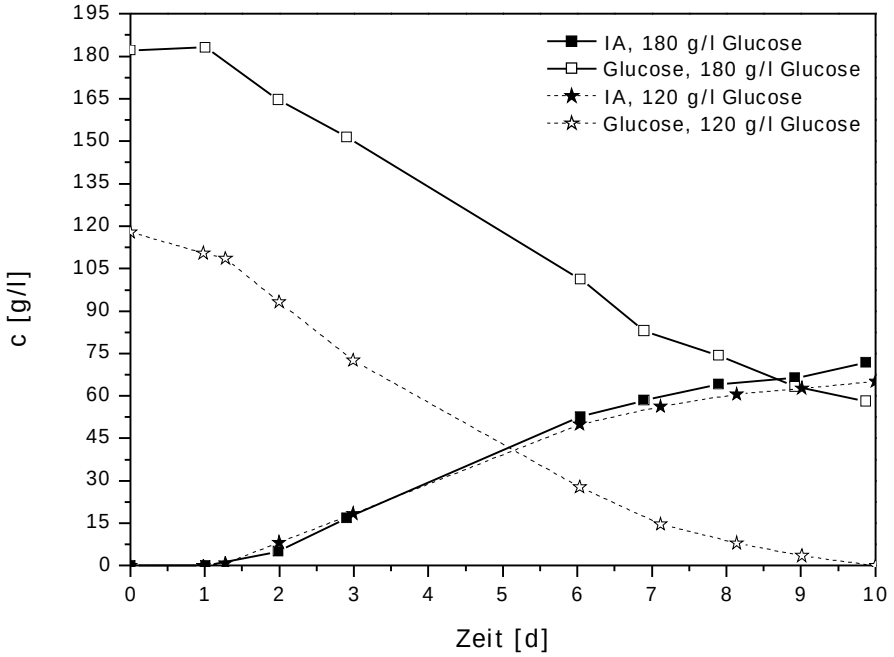

Abbildung 2.2-2: Höhere Substratanfangskonzentration von 180 g/L im Vergleich zu 120 g/L; Kultivierung von A. terreus LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben; 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt, 120 Upm

aufgrund der Substratlimitierung der Pilz keine weitere IA produziert und zum anderen in wie weit der Pilz durch diese Anfangskonzentration gehemmt wird (Abbildung 2.2-2). Der Substratverbrauch und die IA Produktion entsprachen den bei einer Anfangskonzentration von 120 g/l Glucose. Auch bei einer noch ausreichenden Substratkonzentration sinkt die Produktivität unabhängig von der Substratanfangskonzentration nach 6 Tagen Kultivierung. Die Abnahme der Produktivität hängt somit vermutlich nicht mit der Glucosekonzentration zusammen.
Weiterhin wird gezeigt, dass bei 180 g/l Glucose keine Substrathemmung zu Beginn der Fermentation vorliegt.
Wird die Glucose vollständig verbraucht, nutzt der Pilz die Itaconsäure als Kohlenstoffquelle, daher werden die weiteren Forschungsarbeiten mit einem Glucoseüberschuss von 180 g/l durchgeführt. Aus diesen 180 g/l Glucose kann der Pilz bei einer theoretischen Ausbeute von 100 mol% 130 g/l Itaconsäure herstellen.

Optimierung der Phosphatkonzentration

Bei den bisherigen Versuchen wurde das Standardproduktionsmedium (Vorlop K.D., 2003) mit 0,04 g/L KH_2PO_4 verwendet. Die IA Produktion ist phosphatlimitiert und tritt ein, wenn der Phosphatgehalt eine bestimmte Konzentration unterschreitet. In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, in wie weit sich eine erhöhte Phosphatkonzentration auf die Produktion, das Biomassenwachstum sowie auf die Morphologie des Pilzes auswirkt. Die IA Produktion beginnt unabhängig von der Phosphatkonzentration (siehe Abbildung 2.2-3) zwischen 24 und 48 h nach der Inkubation mit Sporen. Zu diesem Zeitpunkt sind ca. 2/3 der exponentiellen Wachstumsphase abgeschlossen. Nach sechs Tagen Kultivierungsdauer wurden mit höheren (> 0,04 g/l KH_2PO_4) Phosphatkonzentrationen mehr IA produziert.
In der stationären Wachstumsphase wurde bei der Kultivierung mit 0,16 g/l KH_2PO_4 9,8 ± 1,8 g/l BTM erreicht. Die Morphologie des Pilzes war helles, aber sehr dichtes Myzel. Die Viskosität der Kultur war deutlich höher als bei

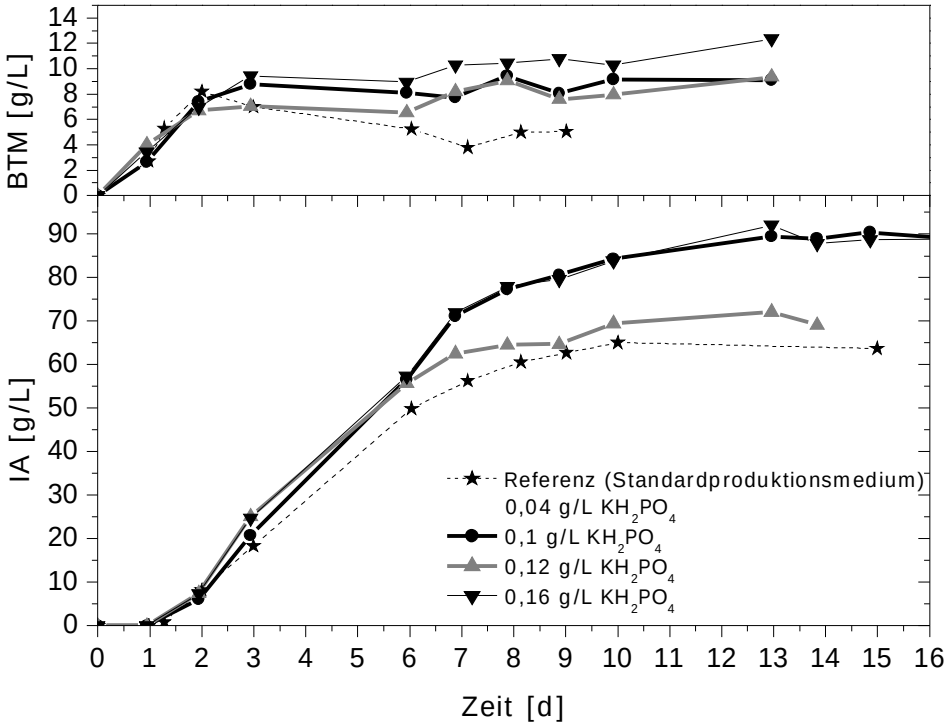

Abbildung 2.2-3 IA Produktion und Biomassenwachstum bei Verwendung verschiedener Phosphatkonzentrationen; Kultivierung von *A. terreus* LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben; 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt, 120 Upm

geringeren Phosphatkonzentrationen. Mit 0,1 g/l KH_2PO_4 wurde die gleiche IA Produktion mit durchschnittlich 8,4 ± 1,4 g/l BTM erreicht. Der Pilz wuchs als feines, freies und helles Myzel. Da aufgrund der Ausbeute und spezifischen Produktivität möglichst wenig Biomasse viel Produkt herstellen soll, wurden alle weiteren Versuche mit 0,1 g/l KH_2PO_4 durchgeführt. Die erzielte IA Konzentration (75 g/l nach 7 Tagen) mit 0,1 g/l KH_2PO_4 konnte reproduziert werden und dient bei den folgenden Variationen als Referenz.

Einfluss der Sporenlagerung bei 4 °C auf die Aktivität des Pilzes

Die Sporen werden auf Czapek-Dox Agar vermehrt (30 °C, 5 Tage), mit einer NaCl Lösung (0,9 % w,v) geerntet und anschließend bis zum Animpfen bei 4 °C gelagert. Um zu untersuchen ob die Zeit der Lagerung bei 4 °C einen Einfluss auf das Wachstum und die Produktivität des Pilzes hat, wurden Sporen, die 2 Wochen, 0,5, 1 und 1,5 Jahre bei 4 °C gelagert wurden parallel unter den gleichen Bedingungen kultiviert (siehe Abbildung 2.2-4). Das Wachstum sowie die IA Produktion zwei Wochen alter Sporen entsprach denen mit frischen Sporen (siehe Referenz Abbildung 2.2-3). Bei den Kultivierungen mit 0,5, 1 und 1,5 Jahren gelagerten Sporen war nach einem Tag Inkubation kein Wachstum erkennbar. Nach zwei Tagen war zwischen den verschiedenen Ansätzen kein Unterschied im Wachstum vorhanden.
Die IA Produktion ist bei 0,5, 1 und 1,5 Jahren gelagerten Sporen ca. einen halben Tag verzögert. Jedoch ist die Biomassenbildung, die IA Produktivität sowie die IA Endkonzentration unabhängig von der Zeit der Lagerung der Sporen bei 4 °C.

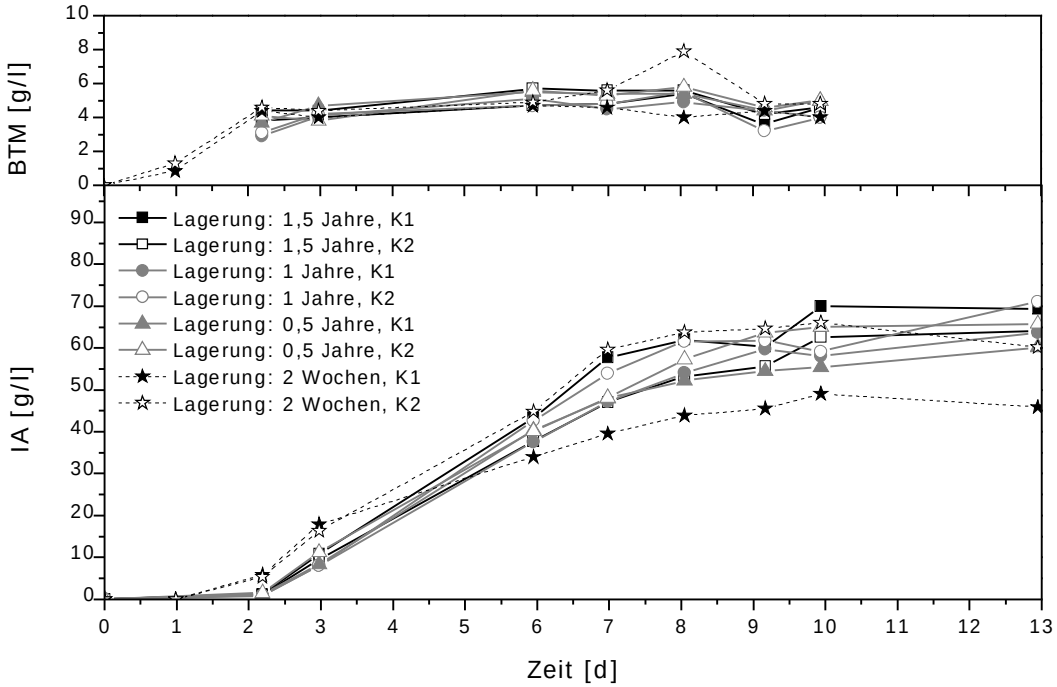

Abbildung 2.2-4: Unterschiedliche Lagerungszeit der Sporen; Kultivierung von *A. terreus* LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben; 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt, 120 Upm

Das bedeutet, dass eine größere Menge an Sporen als Vorrat hergestellt werden kann. Dieser kann über einen längeren Zeitraum (Lagerung bei 4°C bis 1,5 Jahre) als Inokulum für Kultivierungen eingesetzt werden. Somit entfällt die Sporenherstellung und Ernte für jede einzelne Kultivierung, was die Kultivierungsvorbereitungszeit deutlich verkürzt.

Diskussion: Kultivierung in Schüttelkolben

Nach einer Medien Optimierung war die maximal erreichte IA Konzentration von K. Welter 49 g/l nach 8 Tagen Kultivierung (Abbildung 2.2-5) (K.Welter, 2000). In dem nachfolgenden Projekt konnte mit einem Eigenisolat *A. terreus* LU02b im 1,5 l Glasrührreaktor unter Glucosezudosage 78 g/l IA aber nach einer Kultivierungszeit von 25 Tagen hergestellt werden (FNR, 2003). Eigene Versuche zeigten, dass bei einer Sauerstoffunterbrechung von 10 Minuten (schlechte Sauerstoffversorgung) die IA Produktivität sowie die erreichte Konzentration deutlich schlechter sind im Vergleich zu parallel Versuchen mit einer nahezu kontinuierlichen Sauerstoffversorgung (gleichmäßige Sauerstoffversorgung).
Laut Literatur wird bei Sauerstoffmangel weniger NADH verbraucht und dessen Konzentration steigt an, wodurch die Isocitrat-Dehydrogenase und die Citrat-Synthase gehemmt werden und der Citratzyklus zum Erliegen kommt (Karlson, 1994). Die Citrat-Synthase stellt aber die Citronensäure, aus der die Vorstufe der IA synthetisiert wird, bereit. Weiterhin muss der pH-Wert innerhalb der Zellen, gegen einen äußeren pH-Wert von 2,0, auf pH 6,0-7,0 gehalten werden, da die cytoplasmatischen Enzyme dort ihr Optimum besitzen. Außerdem muss die IA, die im Cytoplasma hergestellt wird, gegen einen Konzentrationsgradienten nach außen ins Medium abgegeben werden. Diese beiden energieabhängigen Prozesse forcieren eine kontinuierliche ATP Versorgung. Eine kontinuierliche Sauerstoffversorgung zur ausreichenden Versorgung mit ATP ist somit für die IA Produktion durch den filamentösen Pilz *Aspergillus terreus* notwendig.

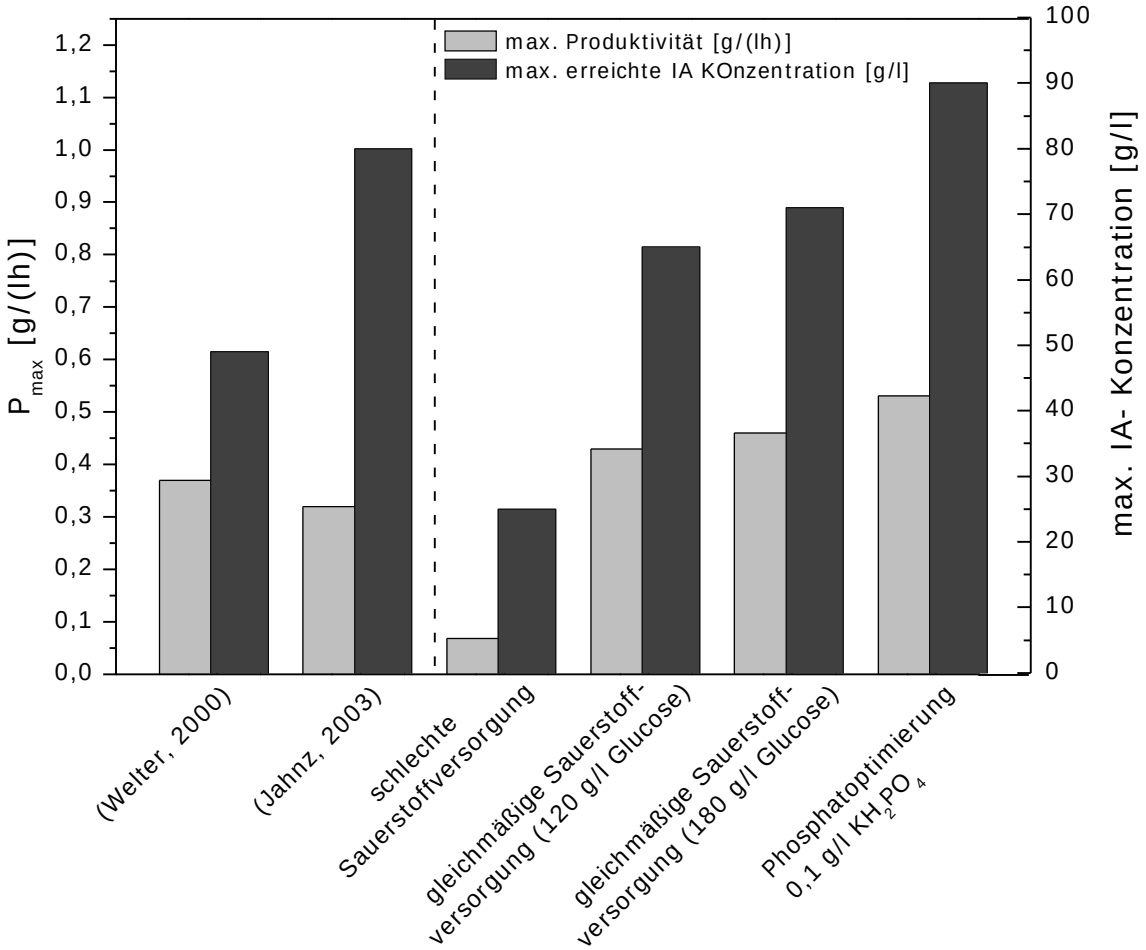

Abbildung 2.2-5: Übersicht der max. Produktivitäten und der max. produzierten IA Konzentrationen in 250 ml Erlenmeyerkolben und 1,5 l Glasfermenter

Unter diesen Bedingungen konnte mit einer maximalen Produktivität von 0,43 g/(lh) nach 10 Tagen Kultivierung im Schüttelkolben eine IA Endkonzentration von 65 g/l erreicht werden. Da, zu diesem Zeitpunkt, die Glucose vollständig verbraucht war, wurde mit einer höheren Glucoseanfangskonzentration (180 g/l) unter gleichen Bedingungen die Kultivierung durchgeführt. Die maximale Produktivität weicht mit 0,46 g/(lh) nicht deutlich von der Referenz Kultivierung mit 120 g/l Glucose ab. Da die Kurvenverläufe des Glucoseverbrauches und der IA Produktion unabhängig von der Höhe der eingesetzten Glucosekonzentration verlaufen, kann sowohl eine Substratlimitierung wie auch eine Substrathemmung durch diese hohe Startkonzentration ausgeschlossen werden.
Bei der Phosphatoptimierung hingegen konnte mit 0,1 g/l KH_2PO_4 eine maximale Produktivität von 0,53 g/(lh) und 90 g/l IA nach lediglich 13 Tagen Kultivierung erreicht werden. Die Biomasse ist mit durchschnittlich 8,4 g/l ungefähr um 2 g/l gegenüber der Referenz erhöht. Mit dem gleichen Medium (Mit Ausnahme der Phosphatkonzentration, 0,1 g/l KH_2PO_4, sowie einer erhöhten Substratanfangskonzentration.) und dem gleichen Stamm konnte somit im Vergleich zu dem bisherigen Stand an der FAL die maximale Produktivität um 0,21 g/(lh) und die Endkonzentration um 12 g/l bei einer gleichzeitigen Halbierung der Fermentationsdauer erreicht werden (FNR, 2003). Weiterhin wurde die molare Ausbeute von 50 % auf 80 % gesteigert.
Diese Ergebnisse konnten mehrfach reproduziert werden. Dennoch ist bei den Kultivierungen im Schüttelkolben zwischen den Doppelansätzen vereinzelt eine Abweichung in der Produktion vorhanden. Die Versuche zur Handhabung zeigen,

dass die Sauerstoffversorgung im Schüttelkolben die IA Produktion stark beeinflusst. Dadurch, dass während der Probenahme die Erlenmeyerkolben per Hand weiter geschüttelt werden, wird versucht die Unterbrechung der Sauerstoffversorgung zu minimieren. Hinzu kommt, dass die verwendeten Erlenmeyerkolben 3 Schikanen besitzen, die für den Sauerstoffeintrag während der Kultivierung. Diese Schikanen werden aber manuell gefertigt, so dass diese Kolben nicht identisch sind. Da diese Einflüsse bei der Kultivierung in Schüttelkolben nicht ausgeschlossen werden können, werden weitere Untersuchungen im Fermentersystem (Vorlop K.D., 2003) durchgeführt.

2.2.2 Multifermenteranlage

Bei den Kultivierungen im Bioreaktor (Abbildung 2.2-6) kann erstmals der gelöst Sauerstoff, der pH Verlauf und das Redoxpotenzial online gemessen werden.

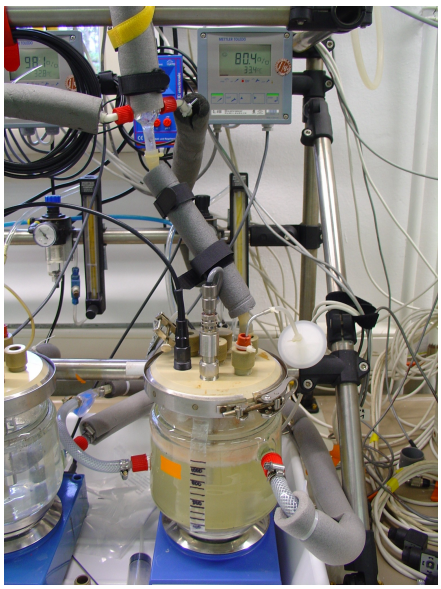

Abbildung 2.2-6 Eine Fermentationseinheit der Multifermenteranlage

Die Kultivierungen im 1,5 L Glasfermenter werden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- 1L Standardproduktionsmedium mit 180 g/L Glucose und 0,1 g/L KH_2PO_4
- Animpfmenge: $1*10^6$ Sporen/mL
- T = 33 °C
- Rührsystem: Magnetrührer mit Fish-Clip (Magnetrührstäbchen "schwebend "über dem Magnetrührgerät)
- Start pH 3,1 ungeregelt

Sauerstoffversorgung

Die Schüttelkolbenversuche zeigen, dass eine kontinuierliche Sauerstoffversorgung notwendig ist. Dieser Parameter soll daher näher untersucht werden.
Die Begasung erfolgt über eine Edelstahlfritte. Diese ist im Fermenter so angeordnet, dass die feinen, austretenden Gasblasen direkt von dem Rührsystem (ca. 2 cm über dem Reaktorboden) verteilt werden. Dies ist für eine gleichmäßige Verteilung und hohe Verweilzeit der Gasblasen im Reaktorinnenraum notwendig. Außerdem entstehen aufgrund der hohen Glucoseanfangskonzentration sehr kleine Gasblasen, was den Sauerstoffübergang von der Gasphase in die Flüssigphase begünstigt. Zu Fermentationsbeginn wird das Medium mit Sauerstoff gesättigt und anschließend wird die Zuluft gestoppt. Der Reaktor wird mit Sporen beimpft. Diesen Sporen steht während der Keimung der gelöst Sauerstoff zur Verfügung.
Sinkt der Gelöstsauerstoffpartialdruck unter 10 % wird die Zuluft manuell stufenweise geöffnet um eine Sauerstofflimitierung zu vermeiden. Während der Wachstums- und Produktionsphase wird der Reaktor kontinuierlich mit Sauerstoff versorgt. Die Begasung beträgt in der Regel 0,5 bis 1 v/vm.

Aufgrund der hohen, aber während der Wachstumsphase notwendigen, Begasungsrate kommt es sehr schnell zu Flotation (Myzel haftet an den feinen Luftblasen und schwimmt mit den Luftblasen nach oben.). Dadurch kommt es zum Biomassenaustrag und Überschäumen des Reaktors. Die Biomasse wird aus der Flüssigphase ausgetragen und lagert sich oberhalb der Phasengrenze an der Reaktorinnenwand an. Setzt im weiteren Verlauf eine starke Schaumbildung ein, tritt dieser Schaum samt Biomasse über die Abluftstrecke aus und die IA Produktion sinkt erheblich. Um dies zu verhindern wird nach einem Tag Kultivierung, während der Wachstumsphase und vor der ersten Schaumbildung, 0,3 ml/l Antischaummittel (Ucolup N-115, Brenntag Mineralöl GmbH, Mülheim a. d. Ruhr) zugegeben.
Die Keimung der Sporen findet innerhalb der ersten 15 Stunden der Kultivierung statt. Bei einer manuellen Sauerstoffregelung wird nicht immer zum gleichen Zeitpunkt die Sauerstoffzufuhr geöffnet. Um zu vermeiden, dass eine Sauerstofflimitierung eintritt und um einen konstanten Partialdruck während der gesamten Fermentation einzustellen wird bei dem Fermenter 1 der 4fach Multifermenteranlage eine Sauerstoffregelung integriert. Der Sollwert des zu konstant haltenden Sauerstoffpartialdrucks wurde auf 25 % eingestellt. Der online Sauerstoffpartialdruck des Fermenters dient dem Regler als Eingangssignal (Istwert). Fällt der Sauerstoffpartialdruck infolge der Sporenkeimung unter 25 %, setzt die Regelung ein und die Zuluft wird entsprechend der Abweichung zwischen Soll- und Istwert geöffnet. Bei den Fermentern 2-4 wird die Zuluft weiterhin manuell eingestellt.

Infolge der Sporenkeimung beginnt die Sauerstoffzehrung (Abbildung 2.2-7). Nach 10 Stunden wurde die Zuluft im Fermenter 1 automatisch, abhängig vom Istwert des Sauerstoffpartialdruckes, geregelt. Nach 1,5 Tagen war die Zuluft mit 0,8 v/vm vollständig geöffnet, reichte aber nicht aus um den Sauerstoffpartialdruck auf 25 % zu halten. Während dieser Phase befand sich der Pilz in der Wachstumsphase, welche nach ungefähr 2 Tagen beendet ist und die Regelung hält den Gelöstsauerstoffpartialdruck auf ungefähr 25 %.
Bei der Fermentation ohne Sauerstoffregelung war der Verlauf des Gelöstsauerstoffpartialdruckes innerhalb der ersten 10 Stunden vergleichbar der Fermentation mit Regelung. Die Zuluft wurde aber erst nach 15,5 Stunden manuell auf 0,2 v/vm geöffnet, worauf der pO_2 sofort auf 100 % anstieg. Zwischenzeitlich war der pO_2 allerdings für 2 Stunden unter 5, aber über 1,5 %. Nach 24 Stunden und bis zum Ende der Fermentation wurde die Zuluft auf 0,5 v/vm eingestellt. Die IA Produktion setzt unabhängig von der Regelung zwischen 1 und 1,5 Tagen ein. Zu diesem Zeitpunkt war der pH-Wert von 3,1 auf 1,8-2,0 abgesunken und blieb bis zum Fermentationsende auf diesem Niveau. Ohne Sauerstoffregelung setzte die IA Produktion ungefähr 8 Stunden verzögert ein. Diese Verzögerung beim Produktionsstart könnte daran liegen, dass der Fermenter während der Sporenkeimung für 2 Stunden zwischen 1,5 und 5 % lag.
In der größten Produktionsphase, zwischen dem 2. und 3. Tag, ist kein nennenswerter Unterschied zwischen diesen beiden Fermentationsverläufen erkennbar. Nach 2,5 Tagen ist eine geringe und nach 4 Tagen eine deutliche Produktionsabnahme unabhängig von der Sauerstoffversorgung und von dem Gelöstsauerstoffpartialdruck (25 % zu 80 %) vorhanden. In beiden Fermentationen wird eine Endkonzentration von 83 g/l IA erreicht.
In beiden Fermentationen war während der Produktionsphase eine kontinuierliche Sauerstoffversorgung gegeben. Der Unterschied im Gelöstsauerstoffpartialdruck, 25 % zu 80 %, wirkte sich anscheinend nicht auf die Fermentation aus.

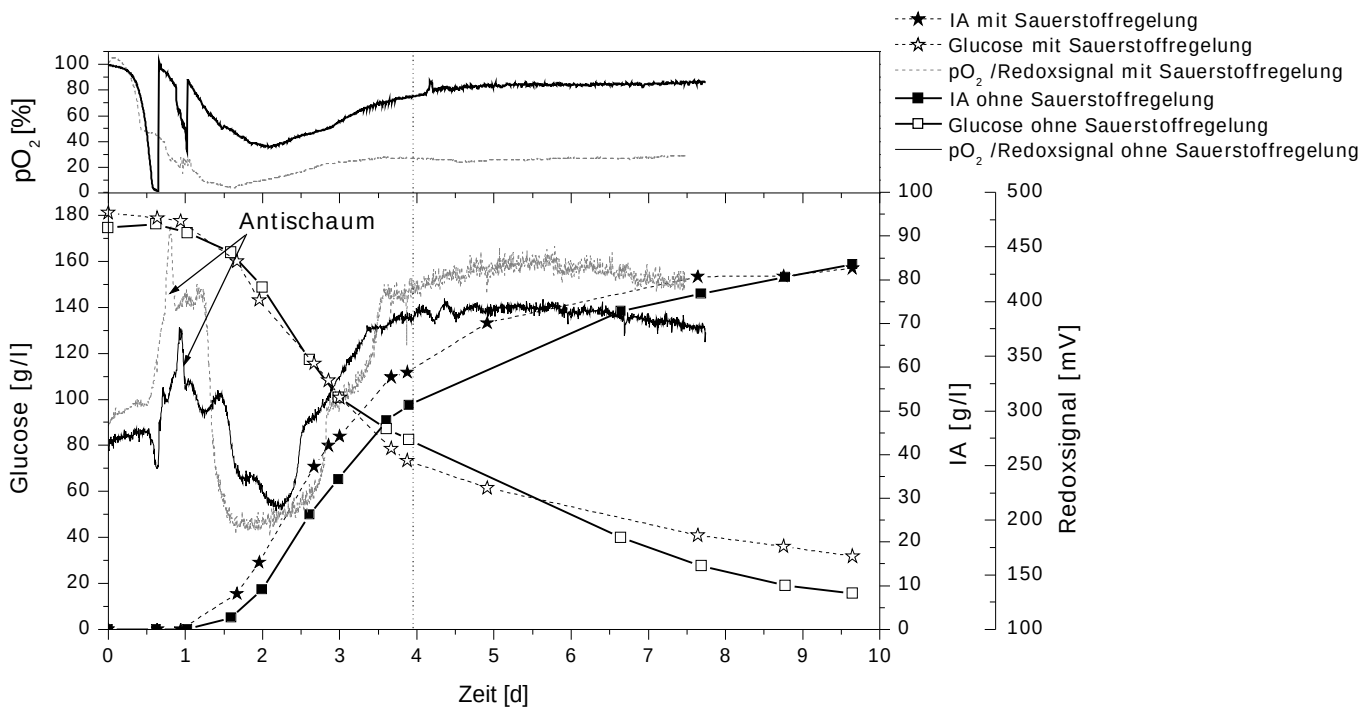

Abbildung 2.2-7: Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter mit Sauerstoffregelung - ohne Sauerstoffregelung, von *Aspergillus terreus* LU02b, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

Durch die Zugabe des Antischaummittels sinkt der Gelöstsauerstoffpartialdruck und das Redoxpotenzial zeigt einen positiven Ausschlag. Das Signal der Redoxelektrode hat am Ende der Wachstumskurve, nach 2 Tagen, ein Minimum erreicht. Bis zum ersten einknicken der Produktivität nach 2,5 bzw. 3 Tagen steigt das Signal stark an. In diesem Bereich kommt es zu einer Hysterese. Im weiterem Verlauf, bis zur deutlichen Produktionsabnahme nach 4 Tagen, steigt das Signal weiter und bleibt anschließend konstant. Die Ursache für die Hysterese im Redoxsignal bzw. für das Umschalten der Produktionsgeschwindigkeiten der IA konnte bisher nicht geklärt werden. Zu den Zeitpunkten, zu denen das Redoxsignal Veränderungen anzeigt, ist in den Verläufen des pH-Wertes und des pO_2 keine Auffälligkeit vorhanden. Anhand dessen lässt sich ausschließen, dass diese beiden Parameter den Verlauf des Redoxsignals in der Produktionsphase verursachen.

Eine Unterbrechung der Zuluft zeigt auch im Fermenter deutliche Auswirkungen auf die Fermentation (Abbildung 2.2-8). Nach dem Ausfall konnte 36 Stunden keine weitere IA-Produktion gemessen werden. Es bildeten sich wie in dem Schüttelkolbenversuch (Abbildung 2.2-1) kleine dunkle Pellets. Im weiteren Fermentationsverlauf wurde nach dem Zuluftausfall trotz kontinuierlicher Begasung die IA-Produktivität der Kultivierung mit Sauerstoffregelung nicht erreicht. Zur fermentativen IA Herstellung mit dem Pilz *A. terreus* scheint eine kontinuierliche Sauerstoffversorgung für eine reproduzierbare IA Produktion notwendig zu sein. In weitern Versuchen wurde der Einfluss einer oszillierenden Begasungsrate auf die Fermentation untersucht. Eine oszillierende Begasungsrate (100 s) zeigt weder Vor- noch Nachteile. Ein einstündige Wechsel des Gelöstsauerstoffpartialdruckes, zwischen 5 und 45 % pO_2 wirkt sich hingegen negativ aus und sollte daher vermieden werden.

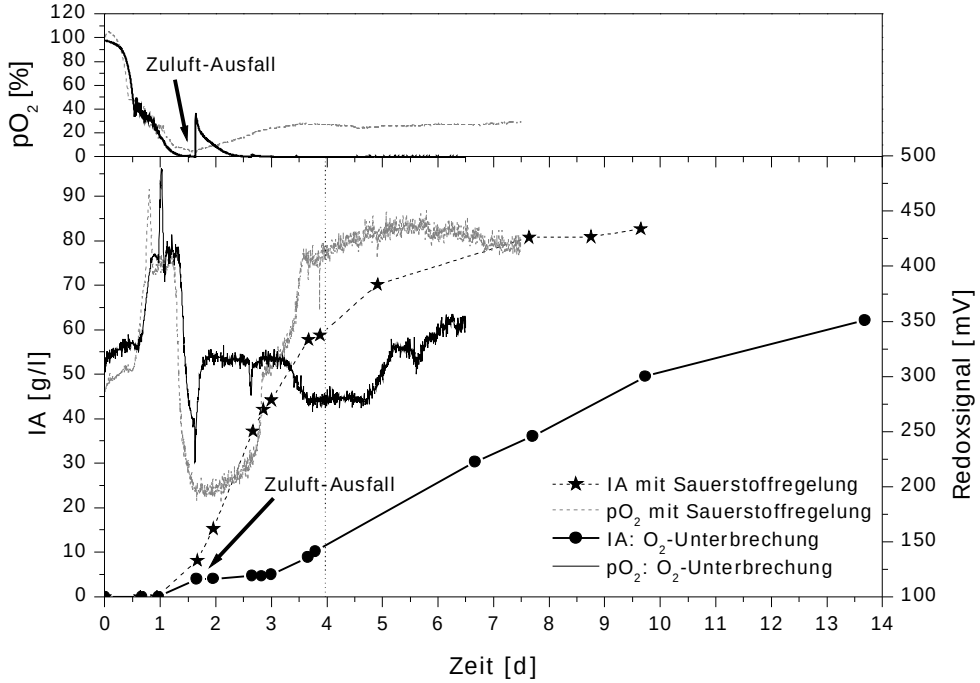

Abbildung 2.2-8: Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter mit Sauerstoffregelung - Zuluft-Ausfall (1 h), Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

Durch die verschiedenen Ansätze der Sauerstoffversorgung kann in keinem Versuchsansatz das Einbrechen der Produktivität verhindert werden. Die Ursache für die Erniedrigung der IA Produktion nach 2,5 und nach 4 Tagen muss aufgeklärt werden. Eine mögliche Ursache könnte eine Limitierung von Medienbestandteilen, eine Produkthemmung oder eine Ansammlung hemmender Stoffe im Medium sein.
Daher wird der Einfluss der Medienkomponenten sowie die Fermentationsbrühe mittels HPLC genauer untersucht. Weiterhin werden Untersuchungen auf eine Produkthemmung durchgeführt.

Einfluss diverser Medienkomponenten

- **Optimierung der Calciumkonzentration**

Laut Literatur beeinflusst die Morphologie des Pilzes nicht unerheblichen die Itaconsäureproduktion hat (Gyamerah, 1995). Speziell die Präsenz der Ionen Ca^{2+}, Zn^{2+} und Fe^{2+} beeinflusst die Art der Sporenkeimung und die daraus folgende Erscheinungsform.
Mit diesem Versuch soll festgestellt werden, wie sich eine Variation der $CaCl_2$ Konzentration (0,2; 1; 5; 10 und 20 g/l) auf die Morphologie und die Produktbildung von *A. terreus* LU02b auswirkt (Abbildung 2.2-9). Besonders bei der niedrigen und der hohen Konzentration von Calcium ist die Wirkung auf die Produktbildung und die Morphologie ausgeprägt. Im Bereich von 1 bis 10 g/l $CaCl_2$ sind die Unterschiede bezüglich der Itaconsäureproduktion weniger stark ausgebildet.
Die Ergebnisse sprechen dafür, dass eine eingesetzte $CaCl_2$-Konzentration in diesem Bereich für die Kultivierung im Fermenter vorteilhaft ist. Die Kultivierung mit 5 g/l $CaCl_2$ zeigt die beste Kombination von Produktivität und Endkonzentration und wird daher für alle weiteren Fermentationen verwendet.

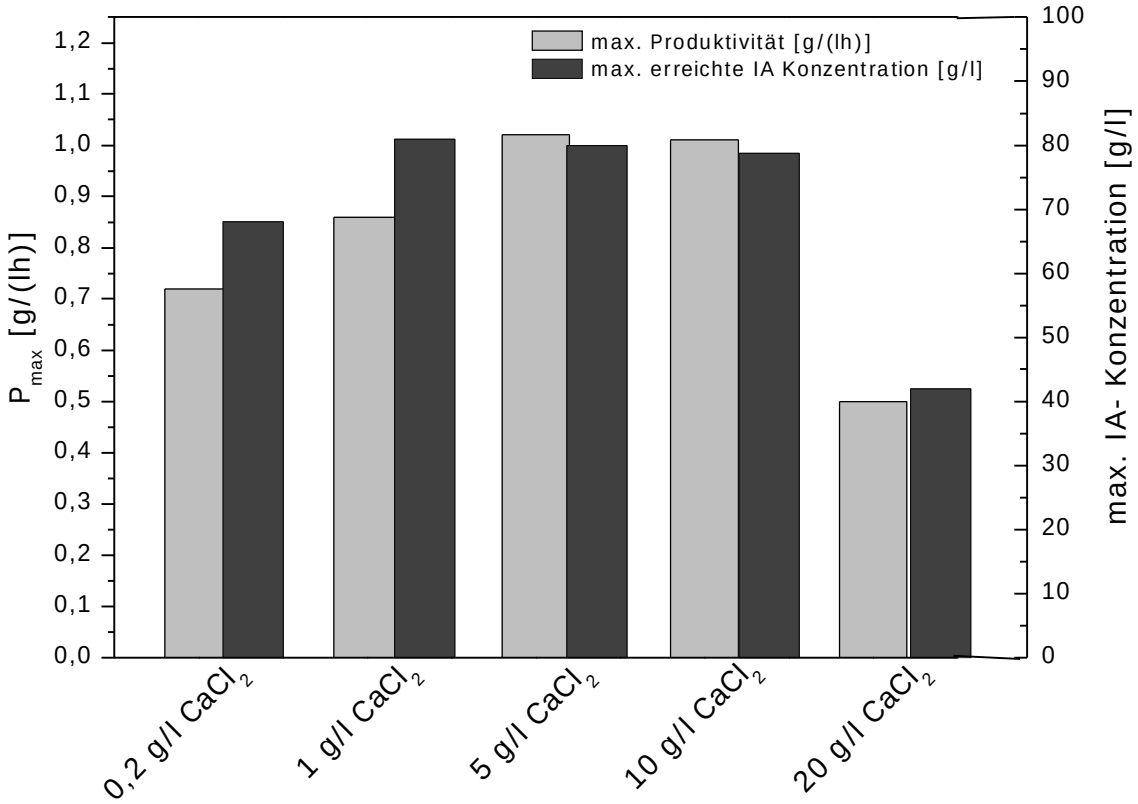

Abbildung 2.2-9: Übersicht der maximalen Produktivitäten und der maximal produzierten IA Konzentrationen im 1,5 l Glasfermenter bei verschiedenen $CaCl_2$ Konzentrationen, Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

Dass sich der Gehalt an $CaCl_2$-Ionen neben der Produktbildung auch auf die Morphologie auswirkt ist in der Abbildung 2.2-10 zu erkennen. Die Kultivierung mit 5 g/l $CaCl_2$ zeigt ein Wachstum in lockerer Pelletform. Der Rand der Pilzagglomerate ist lose und ausgefranst mit einzelnen, langen Myzelfäden. Mit sinkender $CaCl_2$-Konzentration wird das Pellet kompakter. Das Myzel wächst dichter, mit kürzeren Hyphen, der Rand ist deutlich abgegrenzt. Bei Anhebung der Konzentration lockert die Pelletstruktur auf, das Myzel wächst weniger dicht und die einzelnen Hyphen zeigen verkürzte, knollenartige Formen.
Bei Einsatz von 20 g/l $CaCl_2$ bildet der Pilz ein nahezu pseudo-, hefenartiges Wachstum.
Laut Literatur scheint für eine optimale IA Produktion kleine Myzelpellets mit einem Durchmesser von 0,1 bis 0,5 mm und einem lockeren, ausgefransten Rand am besten geeignet zu sein. Sie erzielen scheinbar die besten Produktionsraten und Produktausbeuten (Gyamerah, 1995). Die Pilzmorphologie bei 5 g/l $CaCl_2$ stimmt mit der von Gyamerah beschriebene Morphologie überein und zeigt im Vergleich zu festeren Pellets die beste IA Produktion.

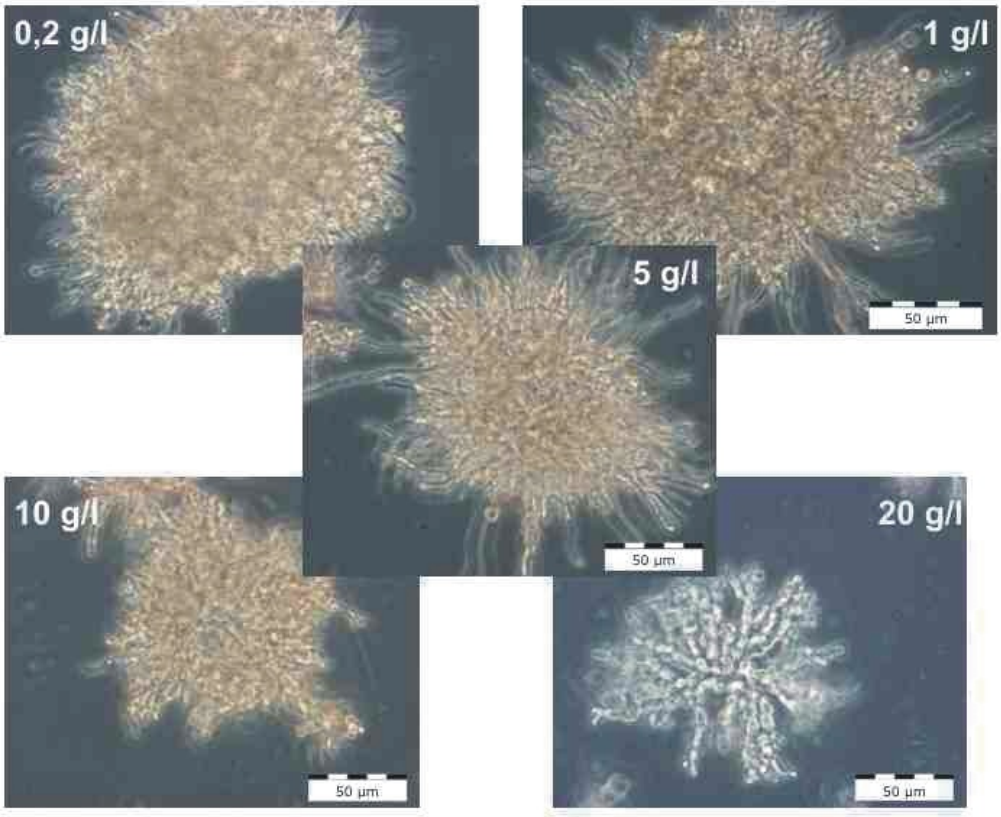

Abbildung 2.2-10: Übersicht der Pilzmorphologie von *Aspergillus terreus* LU02b mit verschiedenen $CaCl_2$ Konzentrationen im 1,5 l Glasfermenter, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

- **Einfluss verschiedener Natriumkonzentrationen**

NaCl ist bisher kein Bestandteil des Standardproduktionsmedium. Trotzdem wird durch das Inokulum eine geringe Menge NaCl in die Kultivierung eingetragen, da die Sporen in einer 0,9 %igen NaCl-Lösung suspendiert sind. Je nach Höhe der Sporenkonzentration werden ca. 5-10 ml Inokulum benötigt. Die Menge von NaCl, die auf diese Weise ins Medium gelangt beläuft sich auf unter 0,1 g/l.
Es besteht die Möglichkeit, dass die Zugabe von NaCl das Fermentationsergebnis beeinflusst. Untersucht werden die Konzentrationen 0,2; 0,5; 1 und 2 g/l NaCl (Abbildung 2.2-11). Die Zugabe von 0,2 und 0,5 g/l NaCl zeigt keinen Einfluss auf den Fermentationsverlauf. Der Einsatz von 2 g/l NaCl bewirkt eine deutliche Abnahme der Produktivität.
Bei der Zugabe von 1 g/l NaCl ist eine Abweichung in der Produktion sowie dem Redoxsignal vorhanden (Abbildung 2.2-12). Die Produktivität zwischen 1,5 und 2,5 Tagen ist geringer als bei der Referenz. Nach 2,5 Tagen verringert sich aber die Produktivität bei der Referenz, wohingegen sie bei dem Einsatz von 1 g/l NaCl zwischen 2,5 und 4 Tagen steigt. Nach 4 Tagen knickt aber unabhängig von der NaCl Zugabe die Produktivität. Das Redoxsignal verbleibt einen längeren Zeitraum im Minimum.
Ein Vergleich der maximalen Produktivitäten zeigt, dass NaCl diese und die erreichte Endkonzentration nicht beeinflusst. Eine Menge von 2 g/l wirkt sich negativ auf die Produktivität aus. Die NaCl Zugabe hatte somit keinen Einfluss auf die Produktivitätsabnahme nach 4 Tagen, aber der Verlauf bei Zugabe von 1 g/l NaCl ist dennoch sehr interessant und bedarf weiteren Untersuchungen.

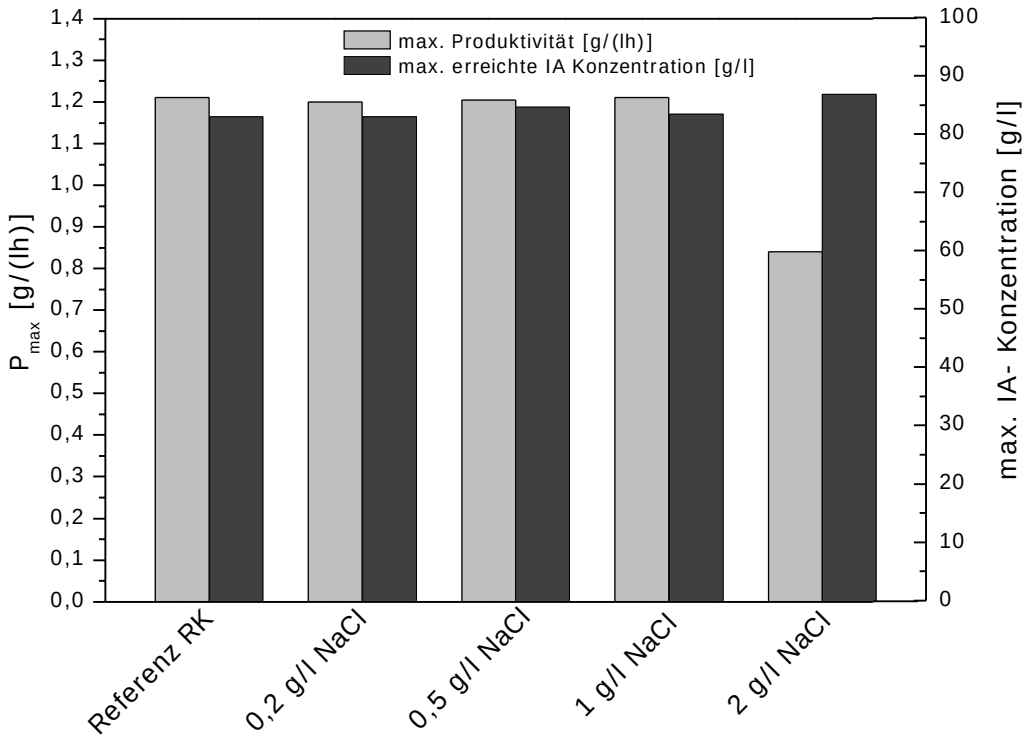

Abbildung 2.2-11: Übersicht der max. Produktivitäten und der max. produzierten IA Konzentrationen bei verschiedenen NaCl Konzentrationen, Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

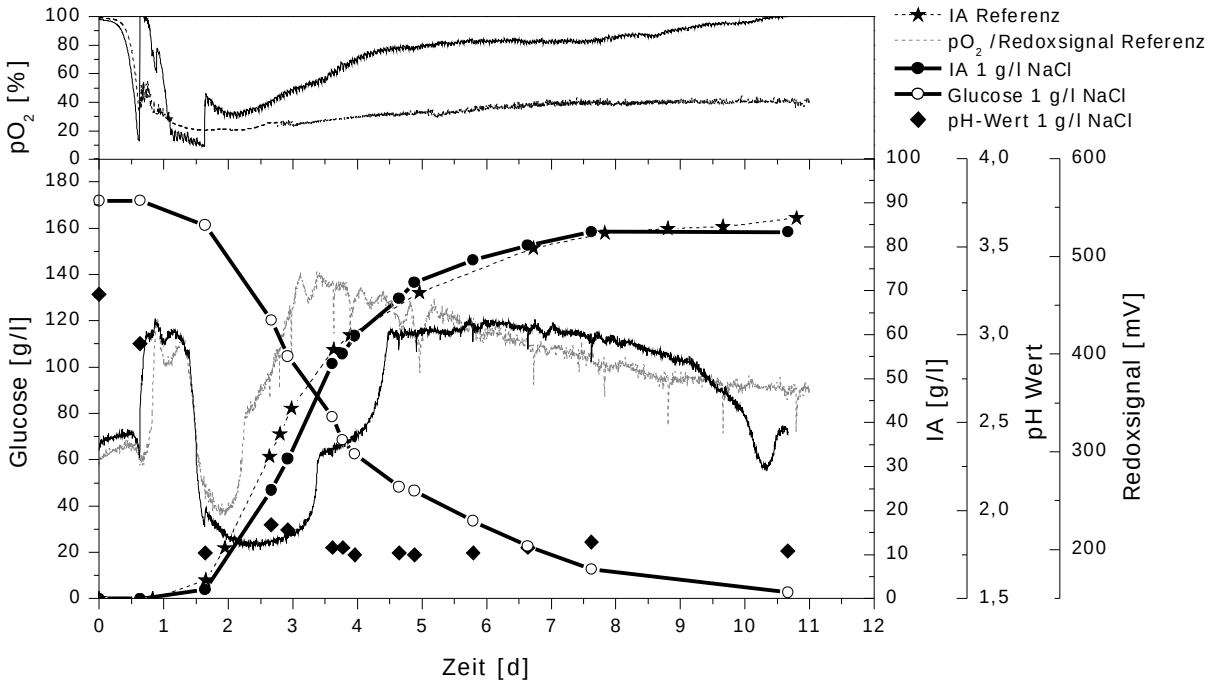

Abbildung 2.2-12: Zugabe von 1 g/l NaCl, Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

- **Phosphateinfluss**

Bei der Fermentation (Abbildung 2.2-7, mit Sauerstoffregelung 25 %, Referenz) wurde mittels HPLC (Anionenanalytik) die Phosphatkonzentration während der Kultivierung gemessen (Abbildung 2.2-13). Bei der Kultivierung von *A. terreus* wird das Wachstum durch die Phosphatkonzentration im Medium limitiert (K.Welter, 2000). Die IA Produktion beginnt am Ende der Wachstumsphase, ungefähr 35,6 % des Wachstums findet während der IA Produktionsphase statt (Gyamerah, 1995). Dies konnte anhand dieser Messung bestätigt werden. Die Phosphatkonzentration sinkt während der Wachstumsphase von ca. 62 auf 3,36 mg/l. Nach 2,6 Tagen nimmt die Phosphatkonzentration wieder auf 5,6 mg/l zu. 4,5 h später und während der gesamten weiteren Fermentation war kein Phosphat im Kulturüberstand messbar.
Es ist auffällig, dass diese Änderung genau zu dem Zeitpunkt der Hysterese des Redoxsignals und der IA Produktivitätsabnahme auftritt.
Um zu überprüfen, ob eine mindest Phosphatkonzentration im Medium für die Produktion, trotz Wachstumslimitierung, vorliegen muss, wurden im Parallelansatz, ab 40 h (Redoxsignal durchläuft das Minimum), täglich 3,35 mg/l Phosphat zugegeben (Abbildung 2.2-14). Die tägliche Phosphat Zugabe zeigte keine Auswirkung auf das Wachstum, die IA Produktivität und auf das Redoxpotenzial. Die Kurven entsprachen denen der Referenz. Die Morphologie des Myzels gleicht der einer Referenz und durch die Zugabe von 3,35 mg Phosphat setzte kein erneutes Biomassenwachstum ein.
Eine erhöhte Phosphatkonzentration zu Beginn der Kultivierung (Kapitel 2.2.1, Optimierung der Phosphatkonzentration) bewirkt eine bessere IA Produktion. Eine tägliche Phosphatzugabe von 3,35 mg/l zeigt hingegen weder einen positiven noch negativen Einfluss auf die IA Produktion.

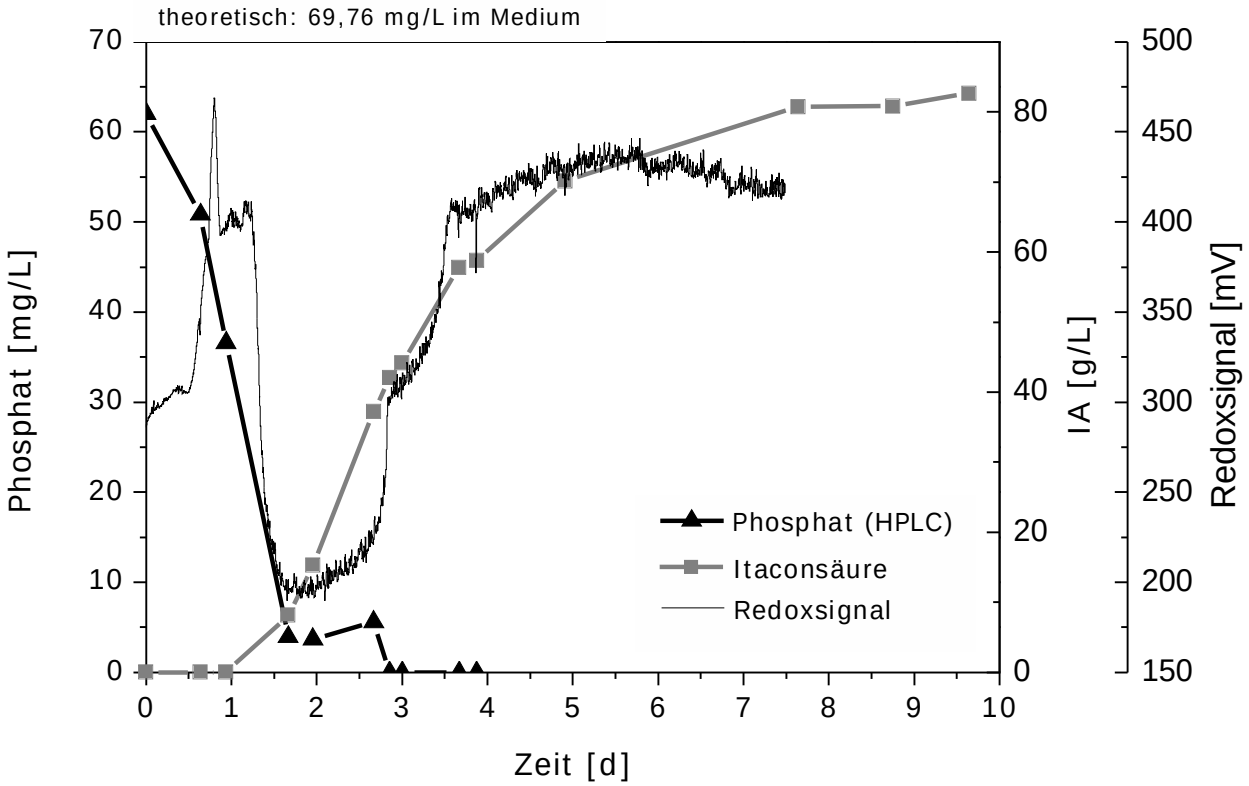

Abbildung 2.2-13: Phosphatverlauf, IA Produktion und Redoxsignal der Referenz Kultivierung von *A. terreus* LU02b im 1,5 L Glasreaktor; 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

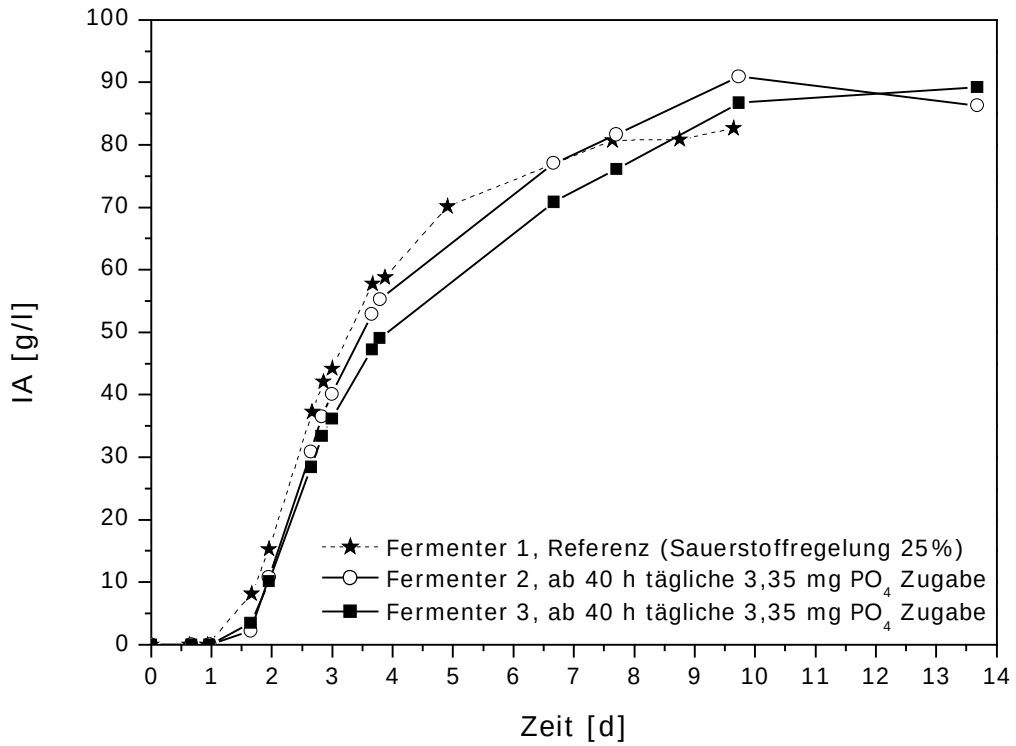

Abbildung 2.2-14: IA Produktion von *A. terreus* LU02b im 1,5 l Glasreaktor, Fermenter 1 mit Standardproduktionsmedium (Sauerstoffregelung auf 25 %, Referenz), Fermenter 2 und 3 mit Standardproduktionsmedium und täglicher Zugabe von 3,35 mg/l PO_4, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

- **Einfluss von Eisen und Cystein**

Das Enzym Aconitase, das die Vorstufe cis-Aconitsäure synthetisiert, besitzt im aktiven Zentrum ein Eisen-Schwefel Cluster. Es benötigt für seine Aktivität Eisen als Co-Faktor und bindet zusammen mit Seitenketten (polaren Aminosäuren, hauptsächlich Arginin Resten) das Substrat Citrat. Außerdem wird das Enzym durch Bestandteile die Eisen komplexieren inhibiert. Wenn der Eisengehalt in der Zell sinkt verliert die Aconitase das Eisen-Schwefel Cluster und somit seine Aktivität. Es übernimmt als „iron response protein" bindendes Enzym eine neue Aufgabe. Es bindet an der mRNA von Transferrin, dessen Genprodukt Eisen aus der Umgebung aufnimmt, und wenn ausreichend Eisen in der Zelle vorhanden ist, bildet sich erneut das Eisen-Schwefel Cluster aus (Brown, 2002;Glusker J.P., 1971;Regev-Rudzki, 2005). In der Literatur ist weiterhin zu finden, dass verschiedene Konzentrationen an Eisen die IA Produktion bei *Aspergillus terreus* NRRL 1960 stark beeinflussen (Batti, 1963). Daher soll zum einen der Einfluss von dreiwertigen und zweiwertigen Eisen untersucht werden und zum anderen die Zugabe von Cystein als „reducing agent" um das Enzym zu stabilisieren (Bruchmann E.E., 1963).

- **Eisenquelle**

Es wurden drei Fermentationen, Fermenter 1 und 2 mit $Fe(II)SO_4$ und Fermenter 3 mit $Fe(III)Cl_3$, parallel durchgeführt und vergleichend zur Referenz (Sauerstoff-

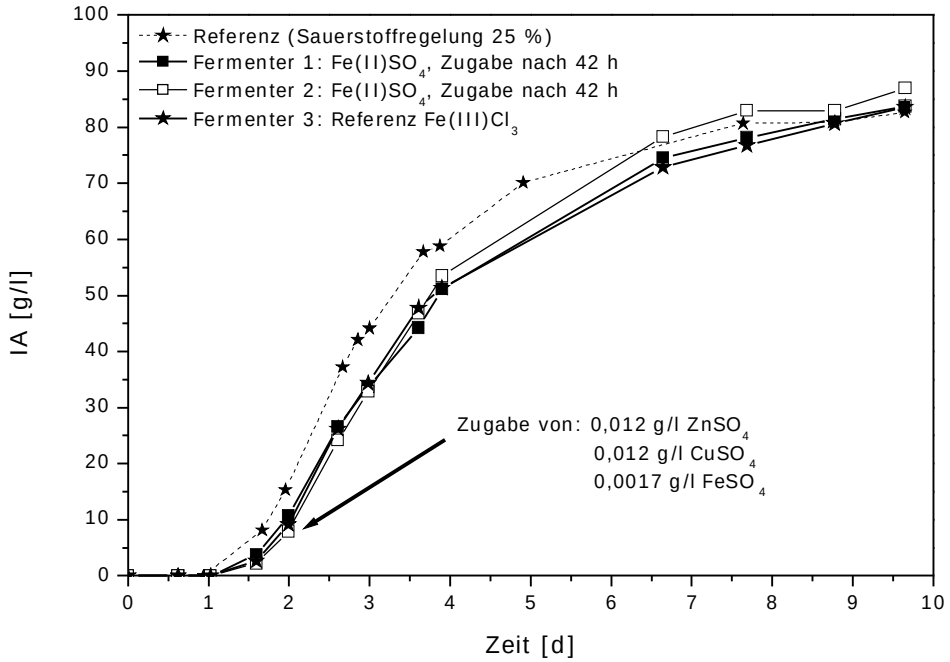

Abbildung 2.2-15: Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter von *Aspergillus terreus* LU02b, Vergleich zwischen $FeCl_3$ und $FeSO_4$, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

regelung 25 %, Fe(III)Cl_3) dargestellt (Abbildung 2.2-15). Die eingesetzte Eisenkonzentration beträgt jeweils 0,34 mg/l. Bei den Fermentern 1 und 2 werden nach 40 Stunden Kultivierung erneut Spurenelemente ($ZnSO_4$, $CuSO_4$ und $FeSO_4$) zugegeben. Bei den drei parallel durchgeführten Fermentationen ist kein Unterschied in dem Kultivierungsverlauf vorhanden. Die unterschiedlichen Eisenquellen sowie die Spurenelementzugabe nach 40 Stunden wirken sich weder positiv noch negativ auf die IA Produktion, das Wachstum sowie auf den Glucoseverbrauch aus.
Im Vergleich zur Referenz, die unter vergleichbaren Bedingungen wie Fermenter 3 durchgeführt wurde, ist die lag-Phase bis zu Beginn der Produktionsphase etwas verzögert. Dies könnte darin begründet sein, dass die Sporenkeimung etwas verzögert war. In der Produktivität ist kein signifikanter Unterschied vorhanden. Unabhängig von den Fermentationsbedingungen knickt nach 2,5 und 4 Tagen die Produktivität ein und Tagen werden bis um Fermentationsende vergleichbare IA-Konzentrationen erreicht.

➢ Zugabe von Eisen in Verbindung mit Cystein

Die Hypothese, dass die IA Produktivität nach 2,5 und 4 Tagen sinkt, da die Aconitase an Aktivität verliert, soll untersucht werden indem durch die Zugabe von Cystein und Eisen das Enzym stabilisiert werden soll.
Es wurden drei Fermentationen mit Fe(II)SO_4 und Zugabe verschiedener Cystein-Konzentrationen (0,02, 0,2 und 2 g/l) durchgeführt und vergleichend zur Referenz (Sauerstoffregelung 25 %) ausgewertet. Eine geringe Cystein-Konzentration von 0,02 g/l scheint, trotz erneuter Zugabe nach 2,5 Tagen, keinen Einfluss auf die IA Herstellung zu besitzen. Bei der Zugabe von 2 g/l Cystein ist die lag-Phase bis zur IA Produktion einen Tag verzögert. Die Produktivität unterscheidet sich bis zum 4. Tag der Fermentation nicht von der Referenz, sinkt dann aber stärker und nach 13,5 Tagen Kultivierung wird eine Endkonzentration von 75 g/l IA er-

reicht. Diese Konzentrationszugabe (2 g/l) zu Beginn der Fermentation scheint sich somit negativ auf die fermentative IA Herstellung auszuwirken.
Bei der Zugabe von 0,2 g/l Cystein hingegen ist ein abweichender Kultivierungsverlauf erkennbar (Abbildung 2.2-16). Die IA Produktion beginnt einen Tag später, als bei der Referenz, da die Cystein Zugabe zu Beginn der Fermentation vermutlich die Sporenkeimung beeinflusst. Dies ist an der Gelöstsauerstoffpartialdruck Kurve ersichtlich. Eine erneute Zugabe von Cystein und Eisen erfolgt nach 2,5 Tagen. Zu diesem Zeitpunkt durchläuft das Redoxsignal das Minimum und wird durch die Zugabe kurzfristig um ungefähr 100 mV gesenkt. Bei der Referenz durchläuft das Redoxsignal die Hysterese und knickt nach 4 Tagen auf einen konstanten Wert. Bei der Cystein Zugabe hingegen bleibt das Redoxsignal bis zum 5. Tag auf dem niedrigen Niveau, steigt dann langsam und erreicht nach ungefähr 6 Tagen einen konstanten Wert. In der IA Produktionskurve ist kein auffälliges einknicken der Produktivität erkennbar. Nach 13,5 Tagen wird eine Endkonzentration von 86 g/l erreicht. Zu diesem Zeitpunkt sind lediglich 6 g/l Glucose vorhanden. Jedoch ist die Ausbeute mit 70 Mol% schlechter als bei der Referenz, mit 80 Mol%.

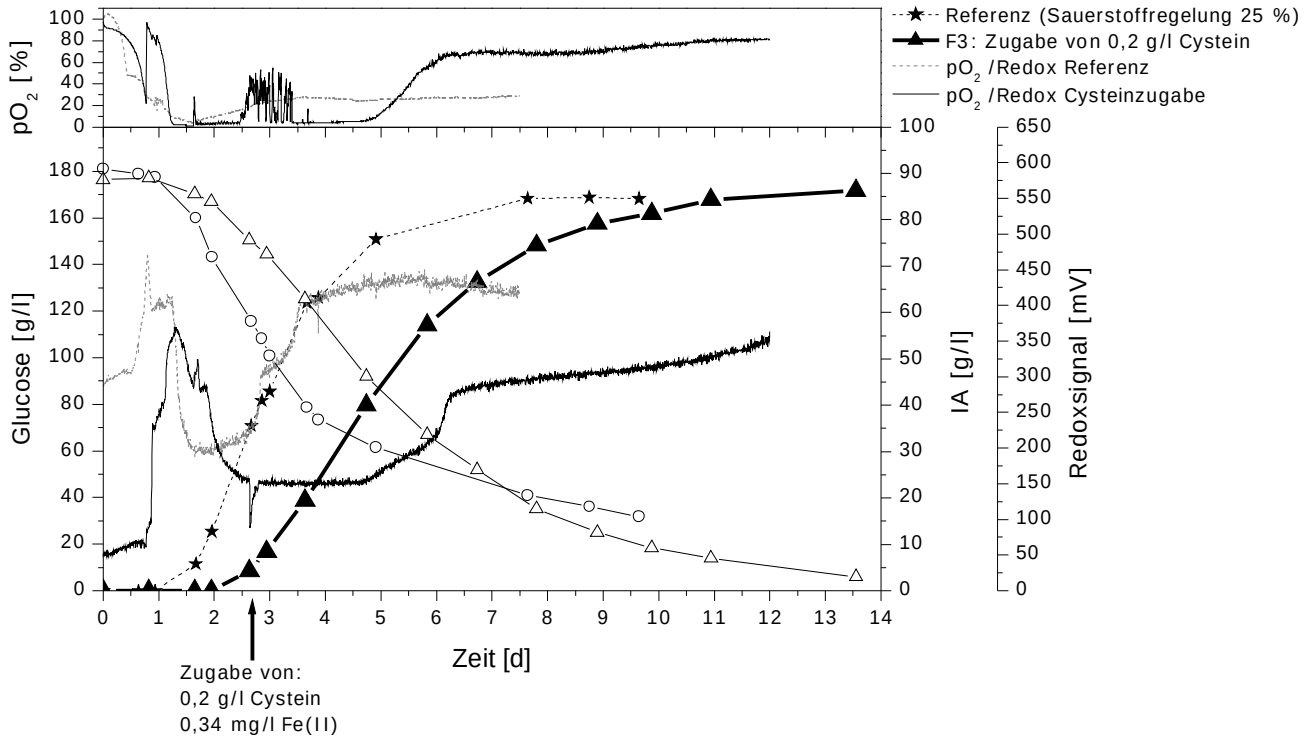

Abbildung 2.2-16: Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter von *Aspergillus terreus* LU02b, Zusatz von 0,2 g/l Cystein, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

Die Cystein Zugabe wirkte sich auch auf die Morphologie des Pilzes aus (Abbildung 2.2-17). Die Kultivierung mit 0,02 g/l Cystein zeigt ein Wachstum in lockerer Pelletform, vergleichend der Referenz. Der Rand der Pilzagglomeration ist lose und ausgefranst mit einzelnen Myzelfäden. Bei der Zugabe von 0,2 g/l Cystein ist hingegen keine Zusammenlagerung zu lockeren, ausgefransten Pellets mit Durchmessern von ungefähr 0,1 mm vorhanden. Die Biomasse zeigt sich vielmehr als lockeres, freies Myzel, mit langen, dünnen, verzweigten Hyphen. Bei der Zugabe von 2 g/l Cystein, was sich negativ auf die IA Produktion auswirkt, ist eine Zusammenlagerung der Hyphen zu Agglomeraten vorhanden. Im Gegensatz zur Referenz waren die einzelnen Hyphen dicker und besaßen viele Wucherungen.

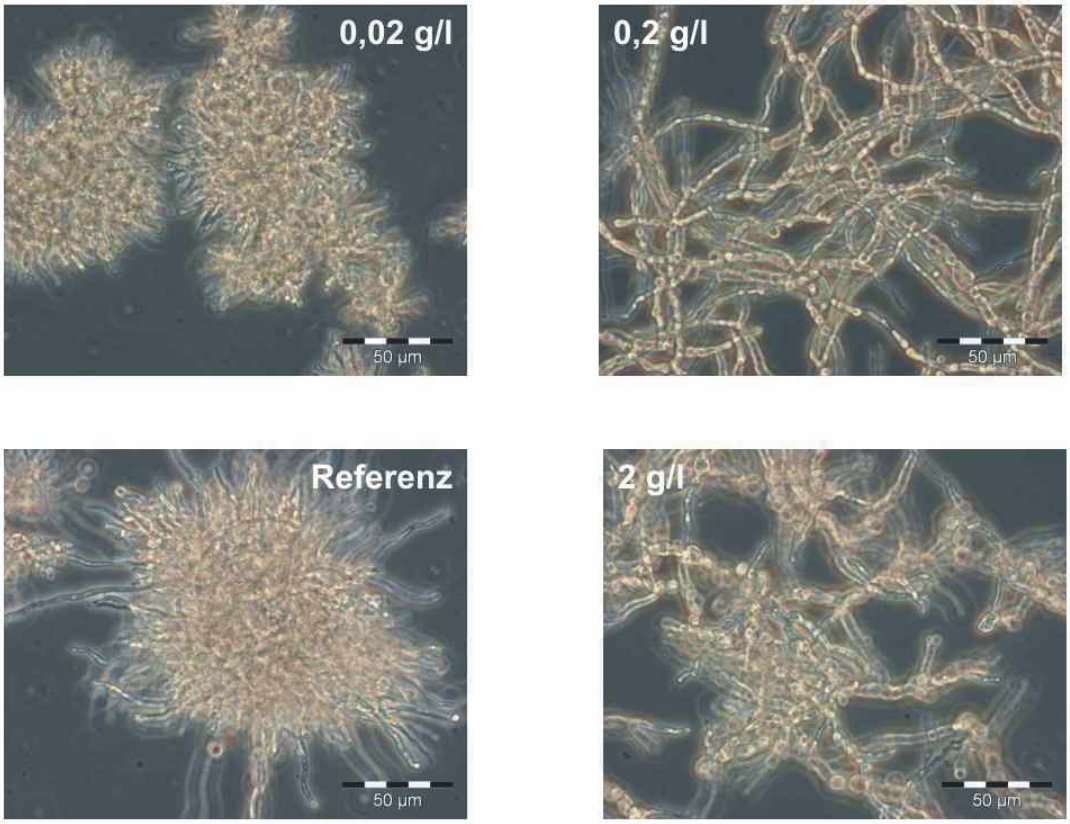

Abbildung 2.2-17: Übersicht der Pilzmorphologie von *Aspergillus terreus* LU02b mit verschiedenen Cystein Konzentrationen im 1,5 l Glasfermenter, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

Diskussion Kultivierung in der Multifermenteranlage

Bei einer kontinuierlichen und gleichmäßigen Sauerstoffversorgung ist eine stabile und reproduzierbare fermentative IA Herstellung im 1 l Maßstab etabliert. Auswirkungen von verschiedenen Kultivierungsvariationen können somit erkannt und analysiert werden.
Der Zusatz von 1 g/l NaCl weist einen abweichenden IA Produktionsverlauf zwischen 2 und 4 Tagen auf. Das Redoxsignal verläuft im Vergleich zur Referenz doppelt so lang das Minimum. Nach 2,5 Tagen wird die Produktivität nicht langsamer, wie die der Referenz, sondern wird erhöht. In wie weit NaCl diesen Effekt beeinflusst kann noch nicht geklärt werden. Aufnahme und Abgabe von Ionen (z.B. Na^+, K^+), Substraten und Metaboliten in die Zelle und aus der Zelle heraus, sind unter anderem an spezielle Transportsysteme in der Cytoplasmamembran gebunden. Es handelt sich dabei um Membranproteine, deren Mechanismus in der Regel vom vorherrschenden biochemischen Potenzial abhängig ist bzw. dieses durch die Verlagerung von Ionen verändert (Schlegel, 1985). Die Aufnahme von Glucose und Salzen aus dem Medium führt zu einer Absenkung und die Freisetzung von IA zu einem Wiederanstieg des Redoxpotenzials. Es ist unbekannt, wie sich die Konzentrationsgradienten dieser Substanzen vom Zellinneren ins umgebende Medium entwickeln und auf welche Weise diese zum Verlauf des Redoxpotenzial beitragen. Anscheinend ist nach dreitägiger Kultivierung eine Art Ungleichgewicht erreicht, welches sich vermutlich destabilisierend auf potenzialabhängige Transportvorgänge auswirkt und so die Durchlässigkeit der Cytoplas-

mamembran verändert. Infolge gestörter Ionengradienten könnten enzymatische Prozesse gehemmt werden, die schließlich zu einer Reduktion der Itaconsäureproduktion führen bzw. allgemein den Zellstoffwechsel beeinträchtigen.
Im folgenden Abschnitt werden die Nebenprodukte genauer untersucht, was eventuell einen Hinweis liefern könnte.
Laut Literatur spielt die Eisenversorgung bei der IA Herstellung eine wesentliche Rolle (Glusker J.P., 1971; Batti, 1963). Bei dem Einsatz von Konzentration ab 1 mg/l Eisen wird die IA Produktion von *A. terreus* NRRL 1960 negativ beeinflusst. Bei *A. terreus* NRRL 1963 zeigte eine Konzentration von 0,34 mg/l Eisen die beste IA Produktion, wohingegen sich 0,68 mg/l Eisen negativ auswirken (K.Welter, 2000). Ausgehend von dieser Konzentration (0,34 mg/l) wird bei *A. terreus* LU02b gezeigt, dass die IA Produktion unabhängig von der Eisenquelle $Fe(II)SO_4$ und $Fe(III)Cl_3$ ist. Auch eine Zugabe von 0,34 mg/l Eisen nach 40 Stunden Kultivierungsdauer beeinflusst den Fermentationsverlauf weder positiv noch negativ. Bei der Fermentation ist eine ausreichende, kontinuierliche Sauerstoffversorgung essenziell. Durch die Begasung, bis zu 1 v/vm, wird das Eisen oxidiert, so dass vermutlich während der aktiven Begasungsphase das Eisen als dreiwertiges Eisen vorliegt. Da laut Literatur das Eisen reduziert vorliegen muss, um enzymatisch wirksam zu sein (Eisen-Schwefel-Cluster der Aconitase) wird Cystein als „reducing agent“ eingesetzt. Die primäre Aufgabe des Cysteins ist, das Eisen reduziert zu halten (Bruchmann E.E., 1963). Geringe Konzentrationen (0,02 g/l) zeigen keinen Einfluss und eine Konzentration von 2 g/l Cystein zu Fermentationsbeginn beeinflusst die IA Herstellung negativ. Bei der Zugabe von 0,2 g/l Cystein ist keine Zusammenlagerung zu lockeren, ausgefransten Pellets vorhanden wie bei der Referenz. Es zeigt sich vielmehr als lockeres, freies Myzel, mit langen, dünnen, verzweigten Hyphen. Auffällig im Vergleich zur Referenz ist, dass das Redoxsignal während der Produktionsphase konstant auf einen niedrigen Level verbleibt und die Produktivität nicht nach 2,5 und 4 Tagen einknickt. Die Zugabe von Cystein wirkt sich auf die Produktion aus. Jedoch ist die maximale Produktivität geringer als bei der Referenz und die erreichte Endkonzentration ist nicht höher. Da die Produktivität nicht knickt, ist zu vermuten, dass durch das Cystein die Enzymaktivität beeinflusst wird. Bei den Verläufen der Nebenprodukte (HPLC Messung) können deutliche Unterschiede zu den Verläufen einer Referenz Kultivierung festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde die Nebenproduktbildung im folgenden Abschnitt genauer untersucht.

2.2.3 Produktbildung

In diesem Kapitel wird zum einen das Nebenproduktspektrum qualitativ und quantitativ untersucht und zum zweiten werden Untersuchungen durchgeführt, die Aufschluss über eine möglicherweise vorliegende Produkthemmung geben sollen.

Nebenproduktbildung

Bei der Kultivierung von *A. terreus* LU02b werden während der Kultivierung Nebenprodukte hergestellt. Eine Untersuchung des Kulturüberstandes (Schüttelkolbenversuch Abbildung 2.1-1) wurde von dem Projektpartner der UFZ Leipzig-Halle GmbH durchgeführt. Mittels Ionenaustauschchromatographie wurden folgende Substanzen identifiziert: Pyruvat (0,2 g/l), Äpfelsäure (0,3 g/l), Itaconsäure (30 g/l), Ketoglutarsäure und Citronensäure (0,4 g/l). Untersuchungen mittels Ionenchromatographie-Massenspektroskopie (IC-MS) ergaben die Molekulargewichte und die zugeordneten Substanzen. Es wurden zusätzlich größere Mengen

an Gluconsäure, im Bereich von 5 g/l, sowie deutlich unter 1 g/l Fumarsäure detektiert. Bei der Ionenaustauschchromatographie und bei der IC-MS wurden Peaks gefunden, die keiner Substanz eindeutig zugeordnet werden können.
Ausgehend von der Analyse des UFZ wurden die Kulturüberstände erneut mittels HPLC (Säule: BioRad HPX87H, 23 °C, 0,6 mL/min, 5 mM H_2SO_4) ausgewertet (Abbildung 2.2-18).

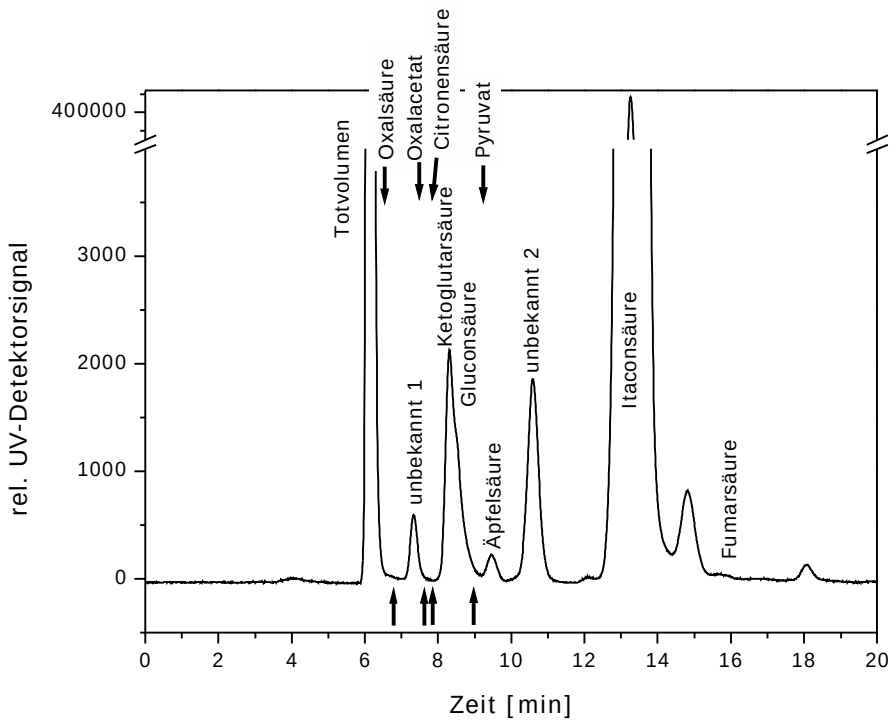

Abbildung 2.2-18: UV-Chromatogramm einer Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b im 1,5 l Glasfermenter, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

Fumarsäure und Äpfelsäure werden unter diesen Bedingungen Basislinien getrennt und können quantitativ ausgewertet werden. Der Peak der Citronensäure kommt kurz vor dem Peak der Ketoglutarsäure. Gluconsäure und Pyruvat kommen kurz nach der Ketoglutarsäure. Überschreitet die Konzentration der Ketoglutarsäure eine bestimmte Konzentration, werden die Peaks der Citronensäure, Gluconsäure und des Pyruvates nicht mehr vom Ketoglutarsäure Peak getrennt und können weder qualitativ noch quantitativ ausgewertet werden. Die Identität zweier Peaks (unbekannt 1 und 2) konnte bisher nicht aufgeklärt werden.
Bei den Kultivierungen mit täglicher Phosphat Zugabe (Abbildung 2.2-14) wurden die Nebenprodukte so weit wie möglich qualitativ ausgewertet (Abbildung 2.2-19). Es werden 3,5 g/l Ketoglutarsäure, 3 g/l Äpfelsäure und 0,02 g/l Fumarsäure produziert. Pyruvat und Gluconsäure konnten nicht quantitativ ausgewertet werden, da die Peaks nicht von dem Ketoglutarsäure Peak getrennt werden und somit vermutlich in geringen Konzentrationen vorliegen. Die Höhe des unbekannten Peaks 2 verläuft ähnlich wie Ketoglutarsäure, mit dem Unterschied, dass die Produktion dieser Substanz nach 4 Tagen deutlich ansteigt.
Interessant verhält sich die Substanz des unbekannten Peaks 1. Die Produktion dieser Substanz beginnt nach einem Tag und steigt bis zum zweiten Tag der Kultivierung an. Ab diesem Zeitpunkt befindet sich der Pilz in der maximalen Produktionsphase und die Höhe des unbekannten Peaks 1 sinkt. Zwischen drei und

vier Tagen ist die IA Produktion geringer, aber die Höhe des unbekannten Peaks 1 steigt. Nach vier Tagen Kultivierung nimmt die IA Produktivität erneut ab und die Höhe der unbekannten Substanz sinkt und bleibt anschließend nahezu konstant.
Die Konzentration dieser unbekannten Substanz (unbekannter Peak 1) verhält sich in den Phasen der unterschiedlichen IA Produktion sehr verschieden. Der Verlauf ist bei einem Produktionsverlauf, der dem einer Referenz entspricht, charakteristisch. Daher liegt die Vermutung nah, dass es sich bei dieser Substanz um eine Substanz handelt, die direkt mit der IA Produktion zusammenhängt.

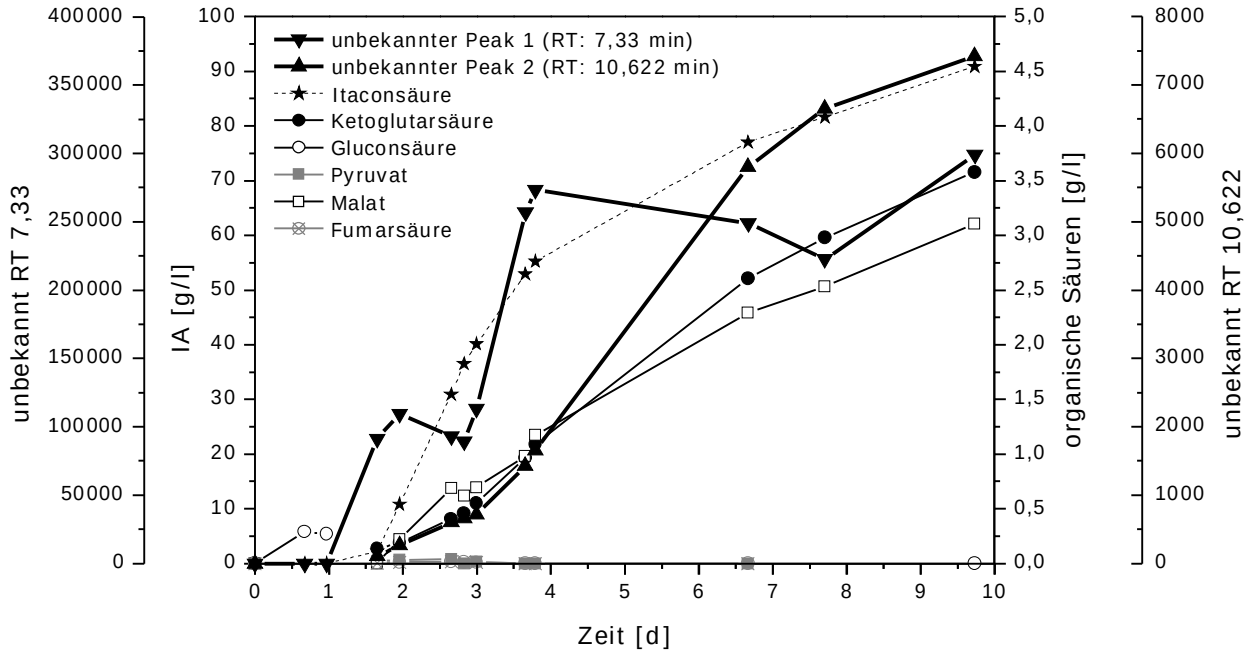

Abbildung 2.2-19: Kulturüberstände des Fermenter 2, ab 40 h tägliche 3,35 mg PO_4 Zugabe (siehe Abbildung 2.2-14) analysiert mittels HPLC (Säule: BioRad HPX87H, 23 °C, 0,6 mL/min, 5 mM H_2SO_4)

Aus diesem Grund wird das Verhalten der IA-Vorstufe, cis-Aconitsäure, genauer untersucht. Cis-Aconitsäure- und trans-Aconitsäurestandards werden mittels HPLC qualitativ analysiert und mit diesen bekannten Konzentrationen quantifiziert. Dadurch und zusätzlich durch Standardadditionen wird gezeigt, dass es sich bei dem unbekannten Peak 1 (RT: 7,33 min) um die Vorstufe der IA, cis-Aconitsäure, handelt. Der unbekannte Peak 2 (RT: 10,6 min) stellt die trans Form der Aconitsäure dar.
Mit dieser Kenntnis der Nebenprodukte und die Möglichkeit der qualitativen Bestimmung werden Versuche, bei denen sich die Produktbildung sowie das Redoxsignal von der Referenz unterscheiden, erneut ausgewertet (Abbildung 2.2-20). Der Verlauf der cis-Aconitsäure bei der Referenz und bei der Zugabe von 0,02 g/l Cystein entspricht dem Verlauf des unbekannten Peak 1 bei dem Versuch der täglichen Phosphatzugabe (Abbildung 2.2-19). Dies bedeutet, dass in der Phase der maximalen Produktivität die cis-Aconitsäure Konzentration konstant bleibt bzw. sogar sinkt. Die im Citratzyklus gebildete cis-Aconitsäure wird somit sofort weiter zu IA umgesetzt, deren Konzentration in dieser Phase am schnellsten zunimmt. Nach 3 Tagen steigt jedoch die cis-Aconitsäure Konzentration stark an. Dies deutet darauf hin, dass entweder mehr cis-Aconitsäure produziert wird, als durch die cis Aconitat-Decarboxylase zu IA umgesetzt werden kann, oder das der

Transport der cis Form durch die mitochondriale Membran der zeitlich begrenzende Faktor darstellt und sich somit ansammelt.
Genau zu diesem Zeitpunkt, nach 3 Tagen, steigt die Konzentration der trans-Aconitsäure. Trans-Aconitsäure ist im Unterschied zu den anderen beschriebenen Nebenprodukten kein direktes Zwischenprodukt des Stoffwechsels. Es handelt

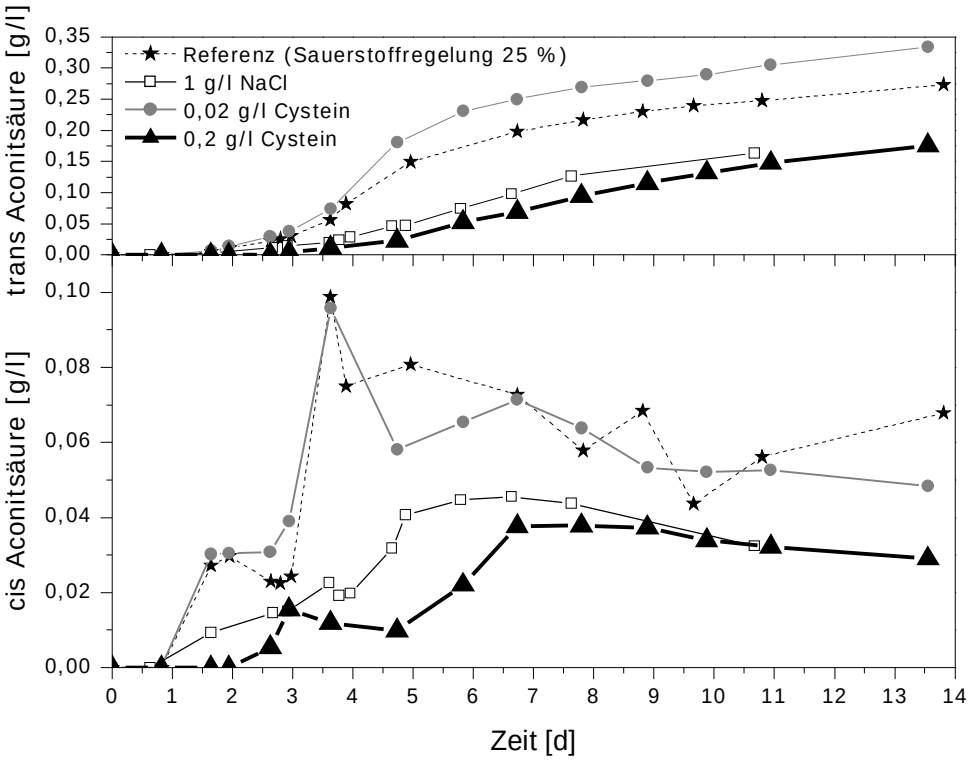

Abbildung 2.2-20: Cis- und trans-Aconitsäure bei verschiedenen Kultivierungen von *Aspergillus terreus* LU02b im 1,5 l Glasfermenter, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

sich um das Isomer der cis-Aconitsäure und entsteht durch physikalische/chemische Umlagerung einer Carbonsäuregruppe. An die Phase des stärksten Verbrauchs von cis-Aconitsäure schließt sich ein deutlicher Anstieg der trans-Aconitsäure im Medium an.
Der Vergleich der Verläufe von Itaconsäure, cis- und trans-Aconitsäure lässt darauf schließen, dass ab dem Zeitpunkt sinkender IA-Produktion auch der Verbrauch von cis-Aconitsäure nachlässt. Diese wird dann vermutlich größtenteils in trans-Aconitsäure umgelagert, was mit dem kontinuierlichen Anstieg dieses Nebenprodukts erklärt werden kann.
Bei der Zugabe von 0,2 g/l Cystein und dem Zusatz von 1 g/l NaCl konnte eine Abweichung von dem Standardproduktionsverlauf beobachtet werden. In beiden Fällen tritt nach 2,5 und 4 Tagen keine Erniedrigung der Produktivität auf. Bei diesen zwei Versuchen kann bei dem Verlauf der cis-Aconitsäure keine enorme Zunahme wie bei der Referenz beobachtet werden. Auch die Konzentration der trans Form ist bei diesen Ansätzen am geringsten und zeigt keine deutliche Steigerung nach drei Tagen.
Dies zeigt, dass durch die Zugabe von 0,2 g/l Cystein und 1 g/l NaCl noch unbekannte Veränderungen in der Zelle bewirkt werden, die gerade bei dem Einsatz von 1 g/l NaCl dazu geführt haben, dass nach 2,5 Tagen eine Steigerung der Produktivität auftritt. Durch diese Versuche kann keine Steigerung der maximalen Produktivität oder der Endkonzentration erzielt werden, aber sie geben Hinweise darauf, dass die Produktivitätseinbußen vermutlich mit den Aktivitäten der

Aconitase (Eisen bedürftig), der cis-Aconitat-Decarboxylase und der transmembranen Transportvorgänge zusammenhängen.

Die trans-Aconitsäure wird nicht im Stoffwechsel synthetisiert. Daher wird im folgenden Abschnitt die cis/trans Umlagerung in Abhängigkeit von der Temperatur (20, 24, 33 und 40 ° C) untersucht.
Wird ein frisch angesetzter cis-Aconitsäure Standard mittels HPLC vermessen, so liegen bereits 8 % der trans Form vor (Abbildung 2.2-21). Um so höher die vorliegende Temperatur ist, desto schneller vollzieht sich die Umlagerung in die trans Form. Es stellt sich unabhängig von der Temperatur ein Verhältnis von 83 % trans : 17 % cis-Aconitsäure ein. Die Fermentationen werden bei 33 °C durchgeführt. Bei dieser Temperatur lagern sich nach 1,5 Tagen 50 % der cis in die trans Form um.

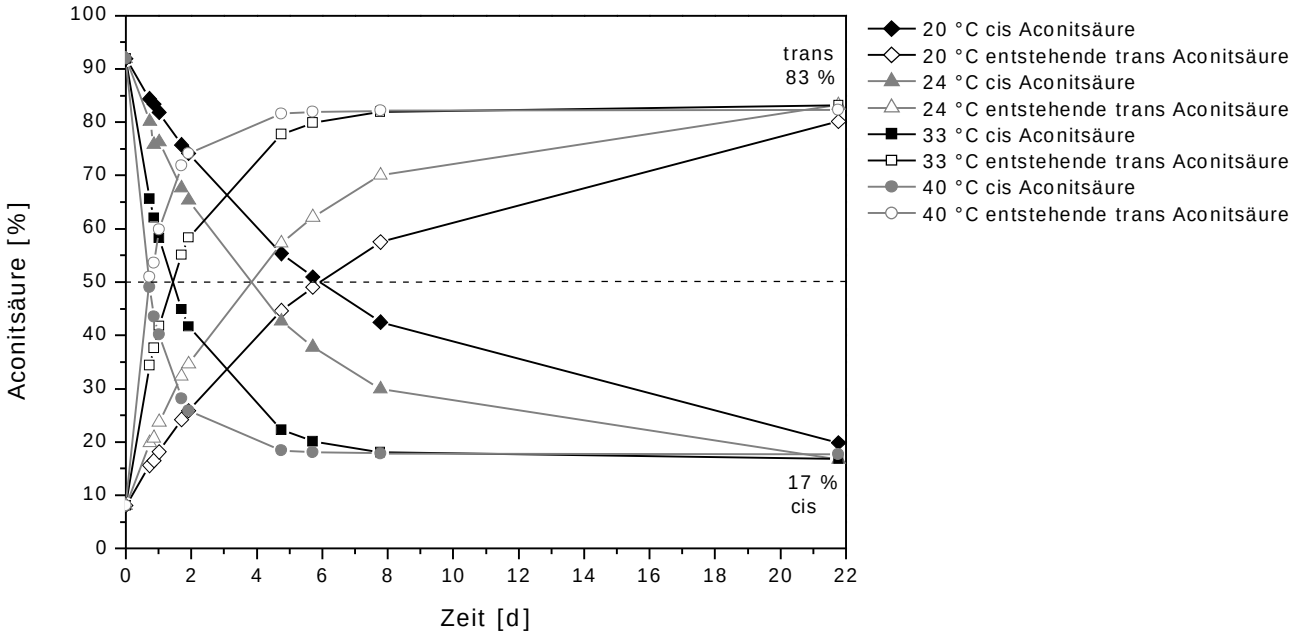

Abbildung 2.2-21: Cis-Aconitsäure Standard, zeitlicher Verlauf der cis/trans Umlagerung bei verschiedenen Temperaturen

Wird ein frisch angesetzter trans-Aconitsäure Standard angesetzt und der zeitliche Verlauf bei 33 °C untersucht, stellt sich heraus, dass sich nach ungefähr 4 Tagen ein Gleichgewicht mit 88 % trans : 12 % cis-Aconitsäure einstellt.
Wird bei der Fermentation die cis-Aconitsäure schneller synthetisiert, als sie durch die mitochondriale Membran transportiert und im Cytosol durch die Decarboxylase zur IA umgesetzt werden kann, sammelt sich die cis-Aconitsäure an und lagert sich in die trans-Aconitsäure um. Es bildet sich ein Gleichgewicht zwischen der cis und trans Form, das deutlich auf der Seite der trans Form liegt. Dies hat zwei negative Folgen:

1. Das Enzym Aconitase katalysiert im Citratzyklus die Gleichgewichtseinstellung zwischen Citronensäure, cis-Aconitsäure und Isocitronensäure. Die trans-Aconitsäure konkurriert um die Bindung an dem Enzym und blockiert somit dessen Aktivität (kompetitive Hemmung (Glusker J.P., 1971)). Diese Enzymaktivität fehlt um aus der Citronensäure cis-Aconitsäure herzustellen.
2. Durch die entstandene trans-Aconitsäure geht der IA Biosynthese Kohlenstoff verloren, da die cis Aconitat-Decarboxylase cis-Aconitsäure als Substrat verwendet, aber mit der trans-Aconitsäure keine Aktivität zeigt (Schomburg, 2002).

Produkthemmung

Im Verlauf einer Standardkultivierung, sinkt die Produktivität von *A. terreus* nach 4 Tagen und ungefähr 60 g/l IA. Die Ursache für diesen Effekt ist bisher nicht aufgeklärt. Eine Limitierung durch das Substrat kann ausgeschlossen werden, da zu diesem Zeitpunkt mit ca. 80 g/l noch ausreichend Glucose im Reaktor vorhanden ist. Ein möglicher Zusammenhang mit dem Pilzwachstum kann ebenfalls vernachlässigt werden, da die Bildung von Itaconsäure ein wachstumsentkoppelter Prozess ist (K.Welter, 2000).
Die im Folgenden dargestellten Versuche sollen aufklären, ob es sich beim eingangs umschriebenen Effekt um die hemmende Wirkung des Produkts handeln könnte.

- **IA Vorlage im Kultivierungsmedium**

Infolge der IA Zugabe zu Beginn der Fermentation liegt der Start pH-Wert dieser Kultivierung bei 1,97 (Abbildung 2.2-22). Der Eintritt des Wachstums erfolgt deutlich verzögert. Erst nach ca. sechs Tagen kann eine Sporenkeimung und Myzelbildung beobachtet werden, was mit dem beginnenden Absinken des pO_2-Gehaltes korreliert.

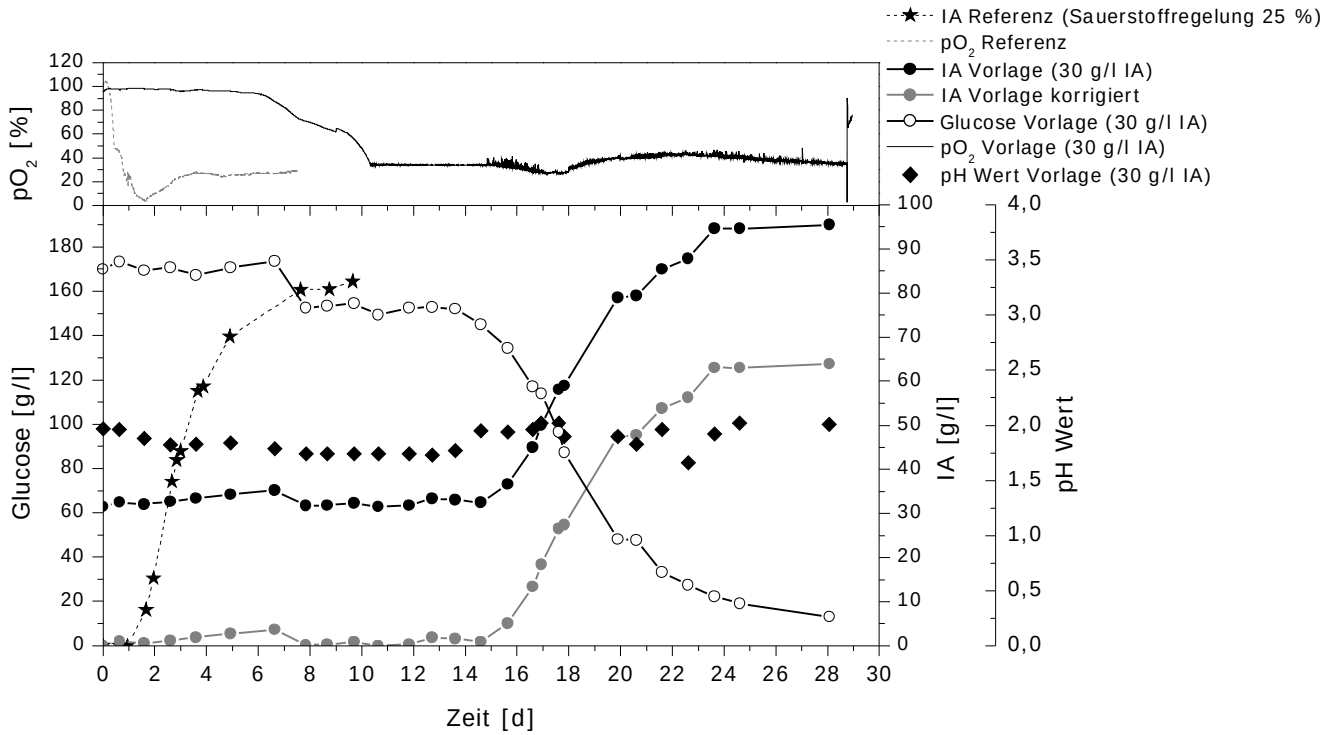

Abbildung 2.2-22: Kultivierungsverlauf von *Aspergillus terreus* LU02B im 1,5 l Glasfermenter mit Vorlage von 30 g/l Itaconsäure, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

Es ist nicht klar, ob dieses verzögerte Wachstum direkt mit dem Vorhandensein von Itaconsäure im Medium zusammenhängt oder ob der niedrige pH-Wert ausschlaggebend ist. Von Lockwood wurde festgestellt, dass nach 12 Tagen in Oberflächenkultivierungen mit pH-Werten unter 1,9 kaum Wachstum und Itaconsäurebildung auftreten, während in Kultivierungen mit pH-Werten über 2,3 das Biomassewachstum ausgeprägt war (Lockwood, 1945). Bei Folgeversuchen mit unterschiedlichen Start pH-Werten (zwischen 1,2 und 3) in Submerskulturen wird von stärkerer Myzelentwicklung bei steigendem pH-Wert berichtet, jedoch nicht von verzögertem Wachstum (Lockwood, 1946)

Die Bildung der Itaconsäure beginnt nach ca. 15 Tagen. Bis zum Abbruch der Kultivierung nach 28 Tagen wurden zusätzlich zu den vorgelegten 30 g/l ungefähr 65 g/l IA produziert. Die Gesamtkonzentration der IA im Reaktor beträgt 95 g/l und liegt ca. 8 g/l über der Endkonzentration der Referenzkultivierung. Nach dieser langen Kultivierungsdauer trat aber eine zusätzliche Verdunstung von etwa 5 % auf. Unter Berücksichtigung dieser Verdunstung läge die Endkonzentration bei ungefähr 90 g/l, was der Endkonzentration der Referenz nahezu entspricht.

- **IA Zugabe verschiedener Konzentrationen während der stabilen Produktionsphase**

In zwei weiteren Versuchen wurde das Phänomen der Produkthemmung genauer untersucht. Dazu wurde während der Phase maximaler Produktivität die Itaconsäurekonzentration im Reaktor durch eine manuelle IA-Zugabe erhöht (Abbildung 2.2-23).

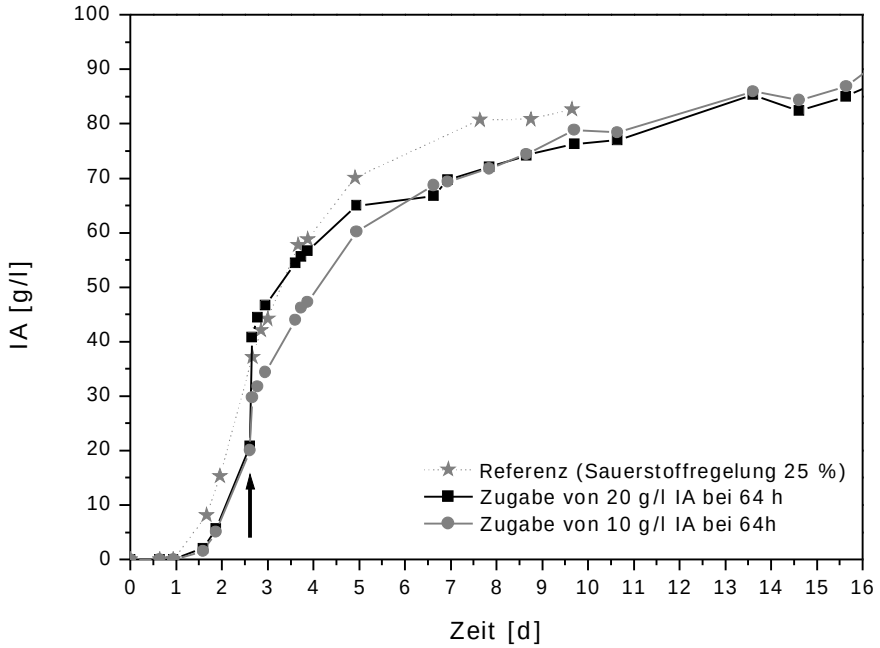

Abbildung 2.2-23: Kultivierungsverlauf von *Aspergillus terreus* LU02b im 1,5 l Glasfermenter mit Zugabe von 10 bzw. 20 g/l IA nach 64 Stunden, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

Direkt nach der Zugabe sinkt die Produktbildungsrate auf 0,6 g/(lh) ab und bleibt in diesem Bereich bis zum fünften Tag der Kultivierung. Zu diesem Zeitpunkt werden 60 g/l, bzw. 65 g/l Itaconsäure im Reaktor erreicht, eine deutliche Abnahme der Produktivität ist sichtbar. Nach 16 Tagen beträgt die Endkonzentration im Reaktor 86,9 g/l, bzw. 85 g/l IA.
Die Biomasseentwicklung der Fermentationen mit Itaconsäurezugabe waren analog zur Referenzkultivierung. Zum Zeitpunkt der Zugabe war in beiden Fällen die stationäre Wachstumsphase mit durchschnittlich 6 bis 7 g/l BTM erreicht.
In den beiden Reaktoren mit Itaconsäurezugabe sind vergleichbare Antworten auf die Zugabe, unabhängig von der extern zugesetzten Menge, zu beobachten:

1. Die Produktivität sinkt unmittelbar nach der Zugabe.

2. Die Endkonzentrationen liegen vergleichbar bei ca. 86 g/l.

Trotz externer Zugabe, bzw. Vorlage von Itaconsäure wird die Höhe der Endkonzentration im Vergleich zu einer Referenzkultivierung nicht verändert. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe deuten auf eine Produkthemmung hin. Es ist aber nicht auszuschließen, dass dies eine Reaktion auf sich verschlechternde Bedingungen im Stoffwechsel darstellen.
Die Untersuchungen der Nebenprodukt zeigen, dass sich bei einer Standardfermentation cis-Aconitsäure genau zu dem Zeitpunkt ansammelt, zu dem auch die Produktivität sinkt. Zum einem würde sich bei einer Produkthemmung zu diesem Zeitpunkt die Vorstufe, cis-Aconitsäure, ansammeln. Zum anderen würde aber auch die Produktivität sinken, wenn z.B. die Aktivität der cis Aconitat-Decarboxylase sinkt, bzw. der Membrantransport negativ beeinflusst wird.

2.3 Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b in verschiedenen Reaktorformen

Für die fermentative Itaconsäureherstellung mittels *Aspergillus terreus* wurden in der Literatur unterschiedliche Untersuchungen durchgeführt. Betrachtet wurden Kultivierungen im Batch-, Fed-Batch und kontinuierlichen Betrieb mit freien und immobilisierten Pilzmyzel (K.Welter, 2000; Kautola, 1989; Kobayashi T, 1972; Park, 1994).
In dieser Arbeit werden zunächst die beiden Reaktortypen Rührreaktor und Umwurfreaktor miteinander verglichen, die sich im Wesentlichen durch ihre Strömungsführung unterscheiden. Weiterhin wird eine Maßstabsvergrößerung um den Faktor 10 (10 l) im Rührreaktor durchgeführt.

2.3.1 Rührreaktor-Umwurfreaktor

Bei störungsfreiem Betrieb und unter Standardbedingungen ergibt sich im 1,5 l Rührreaktor der in Abbildung 2.3-1 dargestellte Kultivierungsverlauf. Mit dem Auskeimen der Sporen sinkt der Sauerstoffgehalt im Reaktor. Durch die Sauerstoffregelung wird die Luftzufuhr geöffnet und soweit möglich auf 25 % gehalten. Nach ca. 48 Stunden geht die exponentielle Wachstumsphase des Pilzes in die stationäre Phase mit ca. 7 g/l BTM über. Während der Wachstumsphase sinkt der pH-Wert der Kultivierung von 3,1 auf pH 1,9 und bleibt bis zum Fermentationsende nahezu konstant auf diesem niedrigen Niveau. Der Pilz wächst in Form von lockeren, kleinen Pellets, mit einem Durchmesser von ungefähr 0,1 mm. Der Rand dieser Pilzagglomeration ist lose und ausgefranst mit einzelnen langen Myzelfäden
Nach ca. 20 Stunden beginnt der Pilz, bei gleichzeitiger Glucoseabnahme, mit der IA Produktion. Zwischen 2 und 3 Tagen besitzt die IA-Produktionskurve die größte Steigung. Ab dem vierten Tag flacht der Kurvenverlauf ab, es wird immer weniger Itaconsäure neu gebildet. Nach acht Tagen Kultivierungsdauer ist eine Itaconsäurekonzentration von 83,1 g/l im Reaktor erreicht, zu diesem Zeitpunkt sind noch weitere 32,6 g/l Glucose vorhanden.
Die Verlängerung der Kultivierung um weitere sechs Tage führt zu einem geringen Anstieg der IA auf 87,6 g/l, während 18 g/l Glucose verbraucht werden.
In einem deutschen Patent konnten mit dem Stamm *A. terreus* NRRL 1960 nach sieben Tagen ca. 90 g/l IA erzeugt werden (Batti, 1963). Kultivierungen des Stammes *A. terreus* NRRL 1963 mit ähnlichem, angepasstem Medium im Schüttelkolben erbrachten lediglich 50 g/l nach acht Tagen Fermentationsdauer (K.Welter, 2000). In einer Fedbatch-Kultivierung von *A. terreus* LU02b wurden nach acht Tagen ca. 40 g/l und nach 25 Tagen 80 g/l Itaconsäure erreicht (FNR, 2003).

Zeitgleich mit dem Begasungsstart werden 0,3 ml Antischaummittel zugegeben, infolge dessen steigt das Redoxpotenzial auf 450 mV. Bis zum Beginn der stärksten Produktionsphase ist es auf ein Minimum von 250 mV gesunken steigt im weiteren Verlauf stufenweise auf knapp 500 mV. Bis zum Kultivierungsende sinkt das Redoxpotenzial langsam aber kontinuierlich auf einen Endwert von 350 mV ab. Die Produktivität ist im Zeitraum zwischen 2 und 3 Tagen mit 1,29 g/(lh) maximal. Nach einem Kultivierungszeitraum von knapp 3 Tagen nimmt die

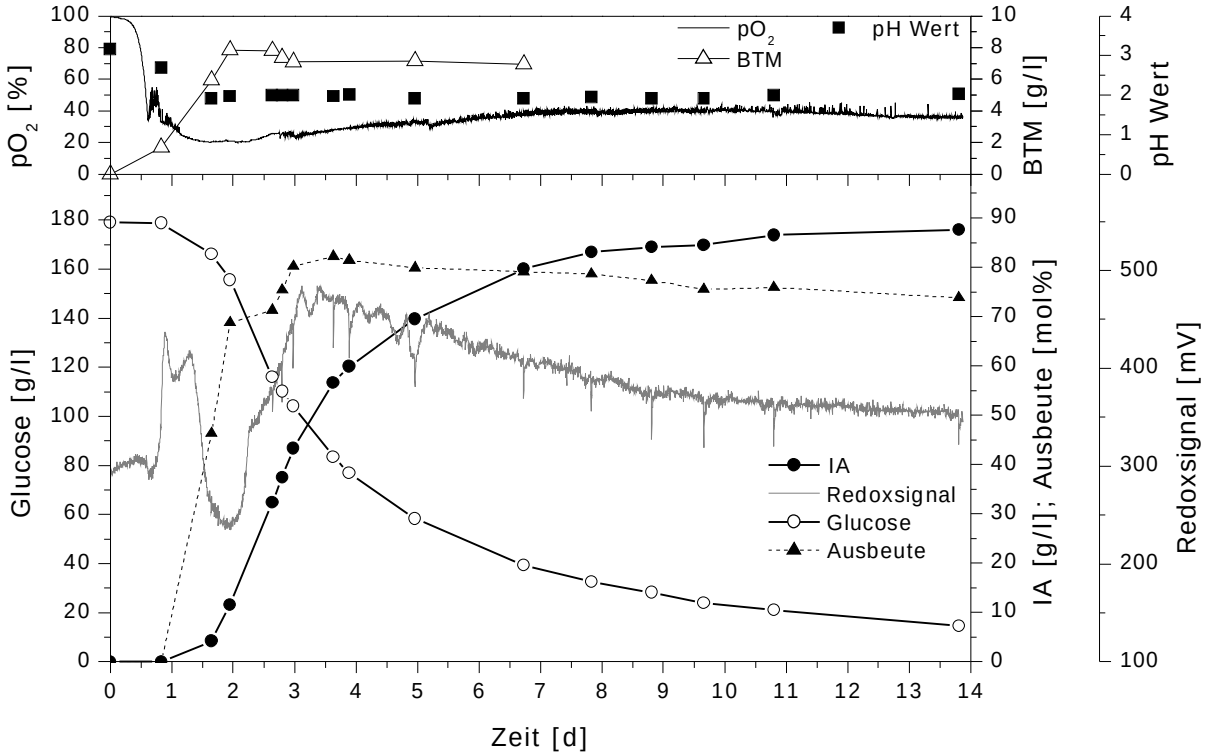

Abbildung 2.3-1: Kultivierung von Aspergillus terreus LU02b im 1,5 l Glasfermenter, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

Produktivität ab und das Redoxpotenzial steigt nicht weiter.
Nach vier Tagen wird eine Ausbeute von 82 % erreicht. Bis zum Kultivierungsende sinkt sie langsam auf 73 % ab. Ausbeuten über 80 % können erreicht werden, da die Bildung der IA nicht an das Wachstum der Biomasse gebunden ist. Der Großteil des Substrates wird in das Produkt umgesetzt. Ein geringerer Anteil dient vermutlich der Biomassebildung, der Bereitstellung von Energie sowie dem Erhaltungsstoffwechsel, durch den Kohlenstoff in Form von CO_2 freigesetzt wird.
Weiterhin werden aus ca. 3 % der verbrauchten Glucose Nebenprodukte gebildet (Abbildung 2.3-2). Nach zwei Tagen und im weiteren Verlauf ist Gluconsäure bedingt durch die HPLC-Analytik nicht mehr nachweisbar, da Konzentrationen kleiner als ca. 4 g/l vom Peak der Ketoglutarsäure verdeckt werden und somit quantitativ nicht auswertbar sind. Bei den Nebenprodukten Ketoglutarsäure, Äpfelsäure und cis-Aconitsäure handelt es sich um Zwischenprodukte des Citronensäurezyklus. Nach sechs bis sieben Tagen wird Äpfelsäure nicht weiter angereichert, die Konzentration nimmt sogar wieder leicht ab. Dies deutet darauf hin, dass der Pilz die Äpfelsäure im Medium wieder in den Stoffwechsel zurückführt. Dies entspricht Ergebnissen von Eimhjellen, demnach kann *A. terreus* eine Vielzahl metabolischer Zwischenprodukte als Substrate nutzen (Eimhjellen, 1955).
Bis zum Einsetzen der stärksten Produktbildungsphase werden zwischen 30 und 40 mg/l cis-Aconitsäure freigesetzt. Zwischen dem zweiten und dem dritten Tag sinkt die Konzentration wieder leicht ab, was darauf hindeutet, das die cis Aconi-

tat-Decarboxylase besonders aktiv ist. Die produzierte cis-Aconitsäure wird vollständig weiter umgesetzt. Nach ca. drei Tagen ist die maximale Produktivität überschritten, es reichern sich bis zu 100 mg/l im Medium an.
Nach vier Tagen, zeitgleich mit der Abnahme der Itaconsäure-Produktionsrate, wird keine cis-Aconitsäure mehr ins Medium freigesetzt. Die Konzentration beträgt 75 mg/l und scheint sich bis zum Ende der Kultivierung noch leicht zu reduzieren.

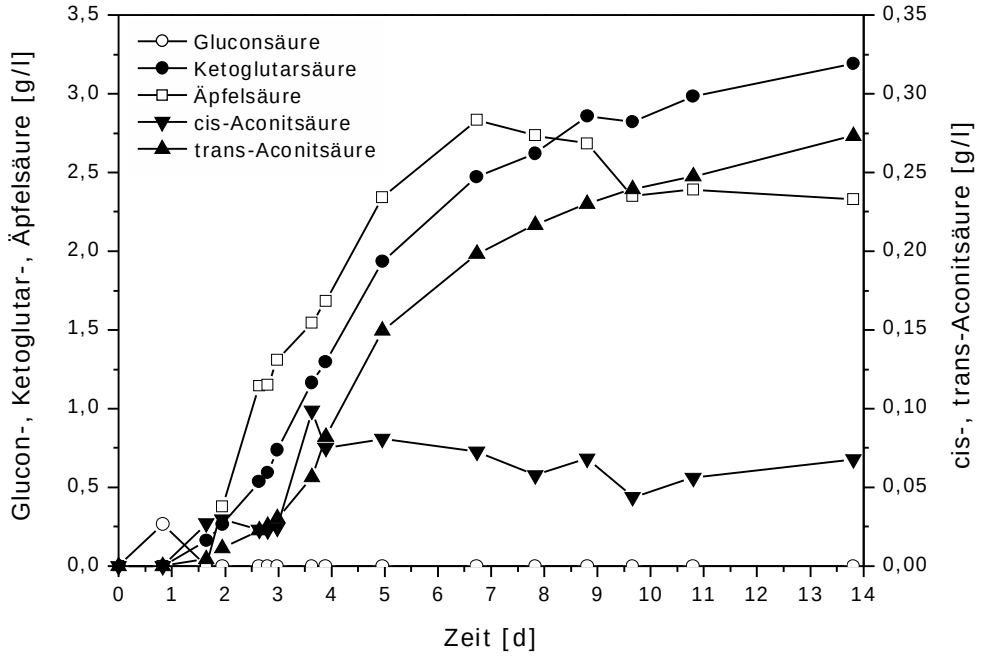

Abbildung 2.3-2: Nebenprodukte der Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b im 1,5 l Glasfermenter, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

An die Phase des stärksten Verbrauchs von cis-Aconitsäure schließt sich ein deutlicher Anstieg der trans-Aconitsäure im Medium an.
In dieser Fermenteranlage wurde eine stabile, reproduzierbare fermentative IA Herstellung mit dem Pilz *A. terreus* LU02b erreicht und die Ergebnisse dienen als Referenz für die Kultivierung im Umwurfreaktor und den 10 l Rührkessel.

Bei der Fermentation mit *A. terreus* im 1,5 l Rührreaktor kommt es zu starker Schaumbildung. Um dies zu verhindern wird der Einsatz eines Umwurffermentersystems zur IA Herstellung getestet. Dies hat den Vorteil, dass durch die besondere Strömungsführung der Schaum zerstört wird und sich keine geschlossene Schaumdecke ausbildet.
Abweichend vom Rührreaktor startet der Pilz mit der IA-Produktion, mit vergleichbarer Produktivität, erst nach drei Tagen (Abbildung 2.3-3). Nach fünf Tagen Kultivierungsdauer und einer IA Konzentration von ca. 50 g/l sinkt die Produktivität deutlich. Nach knapp 11 Tagen wird eine Endkonzentration von 75,9 g/l IA erzielt.
Am Verlauf des gelöst Sauerstoffprtialdruckes ist deutlich zu erkennen, dass die Regelung der Belüftung nicht trivial ist. Nach ca. 24 Stunden fällt der pO_2-Wert im Umwurfreaktor infolge des Sauerstoffverbrauchs durch das Biomassewachstums auf ca. 20 %. Zu diesem Zeitpunkt wird mit der manuellen Belüftung begonnen. Bis zum Beginn der Itaconsäureproduktion kann die Sauerstoffkonzentration relativ konstant gehalten werden. Mit einsetzender Produktion steigt der Verbrauch deutlich an, die Belüftungsrate wird angepasst. Im Bereich zwischen fünf und sieben Tagen ist die Phase maximaler Produktivität überschritten und

der pO_2-Gehalt steigt. Während des siebten Kultivierungstages kam es infolge eines Stromausfalls zu einer einminütigen Unterbrechung der Belüftung, was sich auf die IA Produktion auswirkt. Dies zeigt erneut, wie empfindlich der Pilz auf eine kurzzeitige Unterbrechung der Sauerstoffversorgung reagiert.

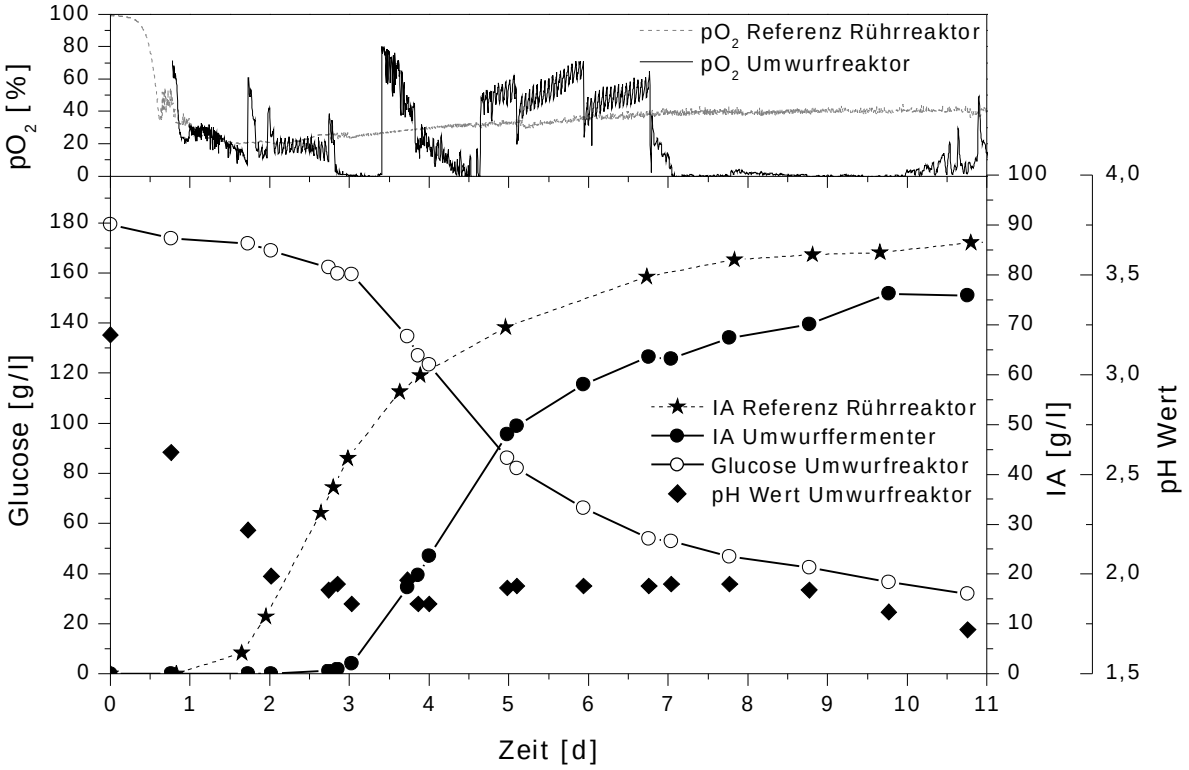

Abbildung 2.3-3: Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b im 3 l Umwurfreaktor, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

Im Umwurfreaktor wächst der Pilz als lockeres, netzartig ausgebildetes Myzel.
Im Störungsfreien Betrieb wird infolge der Strömungsführung keine Schaumdecke ausgebildet, auch ein nennenswerter Bewuchs der Einbauten ist trotz der freien Wachstumsform nicht zu erkennen. Das Überfallen der Kulturflüssigkeit in das Leitrohr scheint sich unterstützend auf den Eintrag des Sauerstoffs auszuwirken, da bereits sehr niedrige Belüftungsraten von unter 0,03 v/vm für die Begasung der Kultivierung ausreicht.
Es konnte nicht geklärt werden, warum die IA-Produktion einen Tag später einsetzte obwohl der Wachstumsverlauf dem im Rührreaktor entsprach. Weiterhin ist unklar, warum die IA-Endkonzentration 10 g/l niedriger ist als im Rührreaktor.
Die Kultivierung von *A. terreus* LU02b im Umwurfreaktor benötigt aufgrund seiner Strömungsführung eine geringer Begasungsrate, aber es erfordert eine zusätzliche Kontrolle um trotz sich erhöhender Medienviskosität einen ausreichenden Umwurf durch Drehzahlerhöhung zu gewährleisten.
Im Vergleich zum Rührreaktor verlief die IA Produktion im Umwurfreaktor schlechter, die Ausbeute betrug nur ca. 74 %. Es ist fraglich ob durch eine Fermentationsoptimierung im Umwurfreaktor eine wesentliche Verbesserung der Produktivität des Pilzes erzielt werden kann.

2.3.2 15 l Rührreaktor

Für eine Umsetzung des Prozesses in den industriellen Maßstab ist es für eine Maßstabsvergrößerung von Vorteil, wenn bereits im Labor mit einem Rührkesselreaktor normierter Bauart gearbeitet wird. In diesem Kapitel sind die Ergebnisse der Kultivierung im Rührkesselreaktor (Braun-Diessel, Melsungen) mit einem Ge-

samtvolumen von 15 l dargestellt. Kultiviert wurde mit insgesamt 10 l Medium unter vergleichbaren Bedingungen wie im 1 l Rührreaktor.
Der Verlauf der Itaconsäurebildung ist im 15 l-Rührkesselreaktor vergleichbar mit der Referenzkultivierung im 1 l Rührreaktor (Abbildung 2.3-4).

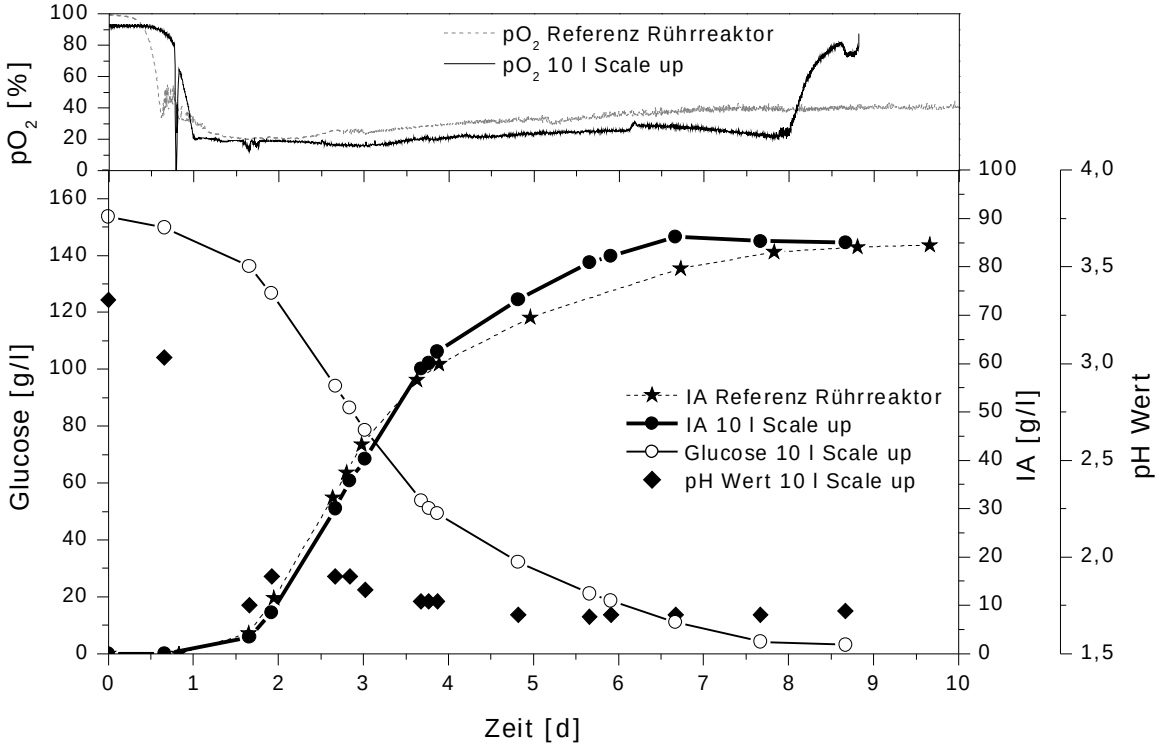

Abbildung 2.3-4: Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b im 10 l Rührreaktor, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

Nach 16 Stunden Kultivierungsdauer beginnt der Pilz mit der IA-Produktion. Die Produktivität zwischen dem zweiten und vierten Kultivierungstag stimmt mit der im 1 l Rührreaktor überein. Nach vier Tagen und einer bis dahin erreichten Konzentration von ca. 60 g/l IA sinkt die Produktivität deutlich ab. Innerhalb von sieben Tagen werden 86,2 g/l Itaconsäure gebildet. Zu diesem Zeitpunkt wird eine Ausbeute von 86 Mol% erzielt, während im 1 l Rührreaktor die Ausbeute 80 Mol% beträgt.
Die Entwicklung der Pilzbiomasse im 15 l-Rührkesselreaktor ist ähnlich der im 1 l Rührreaktor, nach 2 Tagen ist in beiden Reaktoren stationäres Wachstum bei 7 bis 8 g/l BTM erreicht. Die Morphologie des Pilzes unterscheidet sich von der im1 l Rührreaktor durch das Wachstum in Form von losen, lockeren Myzel, wobei die Hyphen relativ kurz und schwächer verwoben sind. Da sich diese Kultivierungen nicht im Medium, der Temperatur, dem pH- oder pO_2-Verläufen unterscheiden muss die leichte Änderung der Morphologie auf die Unterschiede in dem veränderten Strömungsprofil bzw. dem Energieeintrag rückzuführen zu sein.

Die Übertragung der Kultivierung von speziell angefertigten 1 l Rührreaktoren kann in den 15 l-Rührkesselreaktor, normgerechter Bauart, ohne Schwierigkeiten durchgeführt werden.

2.4 Vergleich der IA produzierenden Stämme

Die Stammsammlungsstämme *A. terreus* NRRL 1960 und 1963 werden unter den optimierten Standardbedingungen mit dem Eigenisolat LU02b im 1,5 l Rührreaktor unter vergleichbaren Bedingungen kultiviert (Abbildung 2.4-1).

Die Stammsammlungsstämme schließen wie das Eigenisolat die Wachstumsphase nach ungefähr 2 Tagen ab und erreichen ca. 8 g/l BTM.
Nach ungefähr 1,5 Tagen setzt die IA Produktion ein. Das Eigenisolat hat zu Beginn der Produktionsphase bis 2,5 Tagen Kultivierung eine etwas höhere Produktivität als die Stammsammlungsstämme. Nach 2,5 Tagen sinkt die Produktivität des Stammes LU02b aber, was bei dem 1960er und 63er Stamm nicht eintritt. Nach 4 Tagen sinkt unabhängig vom Stamm die Produktivität. Der 1963 Stamm zeigt nach diesem Knick die höchste Produktivität, so dass dieser Stamm nach 10 Tagen 91 g/l IA produziert.
Zwischen diesen drei Stämmen treten keine größeren Unterschiede im Fermentationsverhalten auf. Die Morphologie der Pilze zeigt ein einheitliches Erscheinungsbild unter diesen Standardbedingungen. Die Endkonzentrationen liegen zwischen 87 und 91 g/l IA. In den Produktivitäten (Abbildung 2.4-2) unterscheiden sich die Stämme. Aufgetragen sind die maximalen Produktivitäten im Vergleich zu den Produktivitäten nach vier Tagen. Die Produktivität des *A. terreus* LU02b sinkt nach 2,5 und 4 Tagen. Bisher ist die Ursache hierfür nicht bekannt.
Die Stämme NRRL 1960 und 1963 zeigen keine Abnahme nach 2,5 Tagen, sondern lediglich nach 4 Tagen Kultivierungsdauer. Da die maximale Produktivität zu Beginn der Produktionsphase von dem Eigenisolat höher ist, als bei den Stammsammlungsstämmen, kann man keinen der Stämme als den geeignetesten Stamm hervorheben.

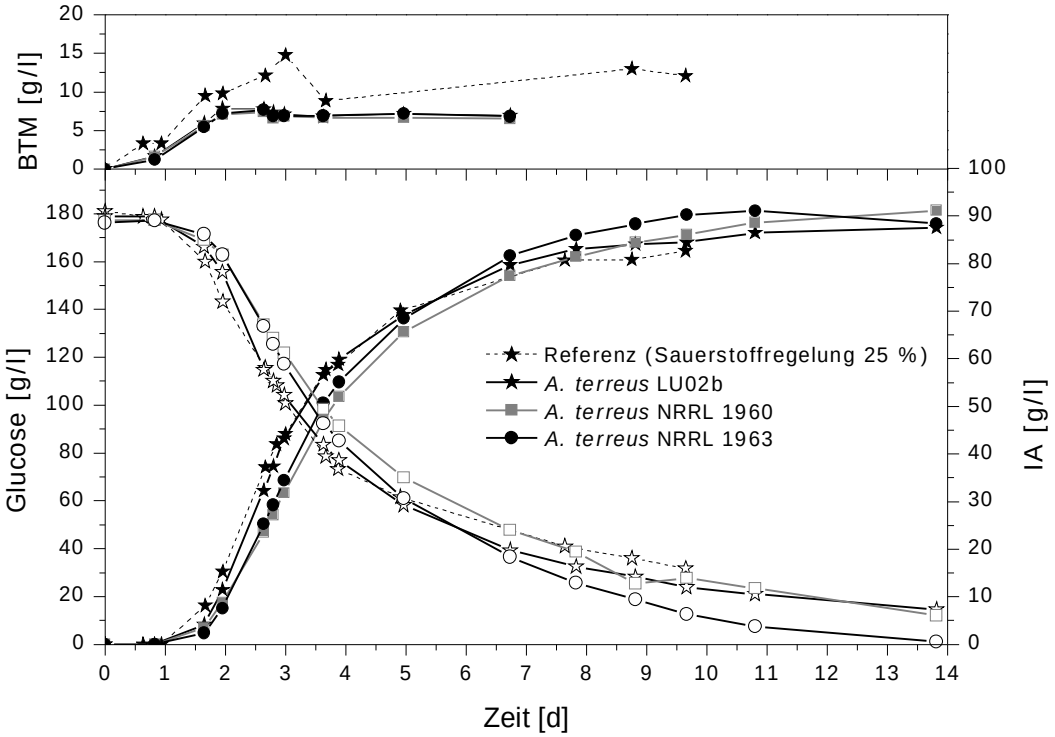

Abbildung 2.4-1: Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter von Aspergillus terreus LU02b, NRRL 1960, NRRL 1963 unter Standardbedingungen, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

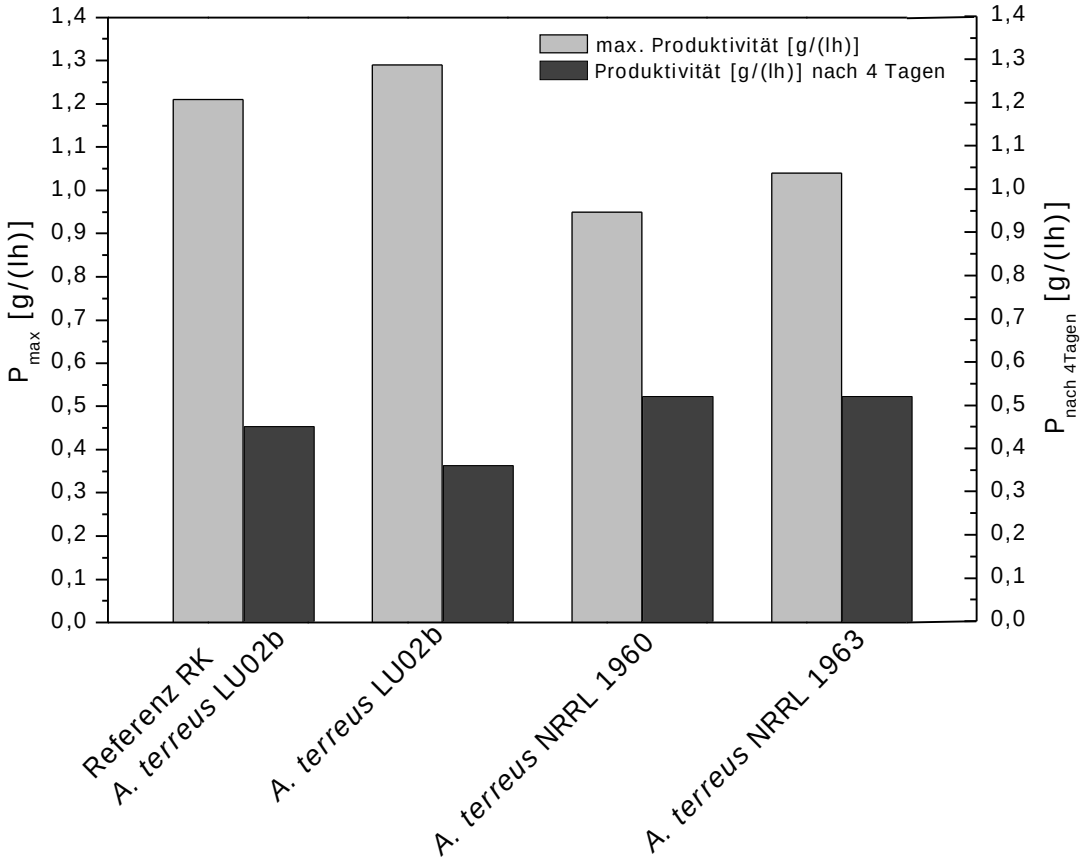

Abbildung 2.4-2: Übersicht der maximalen Produktivitäten und der Produktivitäten nach dem Einbruch nach 4 Tagen von Aspergillus terreus LU02b, NRRL 1960, NRRL 1963 im 1,5 l Glasfermenter, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

2.5 Verdunstungseffekt bei der Kultivierung von *Aspergillus terreus*

Bei der fermentativen Itaconsäureherstellung treten während der vergleichbar langen Kultivierungszeit von 10 Tagen Verdunstungseffekte auf. Diese Effekte sind abhängig von der Kultivierungstemperatur und weiteren Parametern wie z.B. der Begasungsrate, der Feuchtigkeit der Zuluft, der Kühlleistung der Abluftstrecke und der Umgebungstemperatur. Tritt eine hohe Verdunstung auf, ist dies unmittelbar an den Konzentrationsverläufen des Eduktes und Produktes erkennbar. So würde die IA Konzentration nach dem Erreichen der stationären Phase erneut zunehmen (es wird aufkonzentriert), wohingegen der Glucosegehalt nahezu konstant bleibt bzw. sogar leicht ansteigt. Bei einer industriellen Anwendung würde somit das Produkt am Ende der Fermentation aufkonzentriert, was sich positiv auf die sich anschließende Aufarbeitung auswirken würde. Bei Forschungsarbeiten hingegen ist das Vermeiden größerer Verdunstung bzw. die Kenntnis der Verdunstungshöhe bei den jeweiligen Versuchsansätzen notwendig, da sich sie Verdunstung direkt auf die Berechnung von Bilanzen und der Ausbeute auswirken und um die Vergleichbarkeit der eigenen Ergebnisse mit Dritten zu gewähren.
In diesem Bericht sind alle dargestellten Konzentrationen die tatsächlichen, unkorrigierten, gemessenen Werte. Die Verdunstung wurde, wie im folgenden beschrieben, bei den verschiedenen Kultivierungen bestimmt.

Im **Schüttelkolben** wurde vor Beginn der Inkubation das Gewicht des Erlenmeyerkolbens bestimmt. Vor jeder Probenahme wurde der Kolben erneut gewogen und die Gewichtsdifferenz durch Zugabe von sterilem Reinstwasser (Millipore, Milli Qplus 185) ausgeglichen. Nach jeder Probenahme wurde das Gewicht erneut notiert und dieses diente für den Gewichtsvergleich der nächsten Probenahme. Auf diesem Weg konnte der Fehler durch Verdunstung minimiert werden.
In der 1,5 l **Multifermenteranlage** wurde die Kühlung der Abluftstrecke (mittels Kryostat) auf 2 °C eingestellt. Ein volumetrischer Vergleich, unter Berücksichtigung der Probenahmen, zu Beginn und Ende der Fermentation (nach 10 Tagen) ergab maximal einen Verlust von 5 %. Alle Fermentationen im 1 l Maßstab müssen mit diesen 5 % korrigiert werden, um die tatsächlich durch den Pilz produzierten IA Konzentrationen zu erhalten.
Im **Umwurfreaktor** ist die Begasungsrate um den Faktor 20-30 geringer, als im Rührreaktor. Der Reaktor stand auf einer Waage, so dass das Gewicht zu Beginn, nach jeder Probenahme und nach Abbruch der Kultivierung notiert wurde. Die Abluftstrecke wurde ebenfalls auf 2 °C gekühlt. In diesem Reaktor trat eine maximale Verdunstung von 1,6 % auf.
Im **15 l Biostat E Rührkessel** wurde die Abluftstrecke mit Leitungswasser gekühlt. Die Fermentation wurde bei einer Umgebungstemperatur von ungefähr 30 °C durchgeführt, so dass die Temperatur des Leitungswassers vermutlich nicht ausreichte, um eine vergleichbare Kühlung wie in der 1,5 l Multifermenteranlage zu erreichen. Infolge dessen wurde mittels volumetrischem Vergleich, unter Berücksichtigung der Probevolumina, ein Verdunstungseffekt von 7,5 % ermittelt.

2.6 Substrat-Screening

Preisgünstige Substrate auf Basis nachwachsender Rohstoffe sollen auf Verwertbarkeit untersucht werden. In diesem Kapitel wird untersucht, in wie weit die Verwendung von Neben,- bzw. Abfallprodukten der Stärkeproduktion (Kartoffel-Restfruchtwasser), der Herstellung von Maisstärke (Maisquellwasser) sowie der Käseherstellung (Molke) das Wachstum und die IA Produktion des Pilzes beeinflussen. Weiterhin wird der Einsatz alternativer Kohlenstoffquellen (Saccharose, Glycerin, Lactose und Xylose) getestet.

2.6.1 Mikrobielle Verwertbarkeit

Verwertbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen

Es wurden Kultivierungen unter den gleichen Bedingungen mit den verschiedenen C-Quellen Glucose, Saccharose, Pharmaglycerin und Lactose durchgeführt (Abbildung 2.6-1). Mit Glucose konnte die beste IA Produktion erzielt werden. Aus 110 g/l Glucose produziert der Pilz nach 13 Tagen 68 g/l IA. Der Pilz ist in der Lage Saccharose zu verwerten und bildet aus 120 g/l Saccharose 69 g/l IA. Er verbraucht Glucose und Fructose parallel, verwertet aber einen höheren Anteil an Glucose, so dass diese nach 13 Tagen vollständig verbraucht ist bei einer gleichzeitigen Fructose Konzentration von 17,8 g/l.
Mit Pharmaglycerin als alleinige Kohlenstoffquelle ist das Wachstum und die Produktion der Itaconsäure langsamer als mit Glucose. Nach 13 Tagen verbraucht der Pilz die vorgelegte Glucose vollständig mit einer molaren Ausbeute von 86 mol% (68 g/l IA). Mit Pharmaglycerin als alleinige Kohlenstoffquelle wurden aber nach gleicher Inkubationsdauer lediglich 60,5 % des eingesetzten Glycerins (114 g/l) verbraucht und zu 42,5 g/l IA umgesetzt (42,7 mol%).

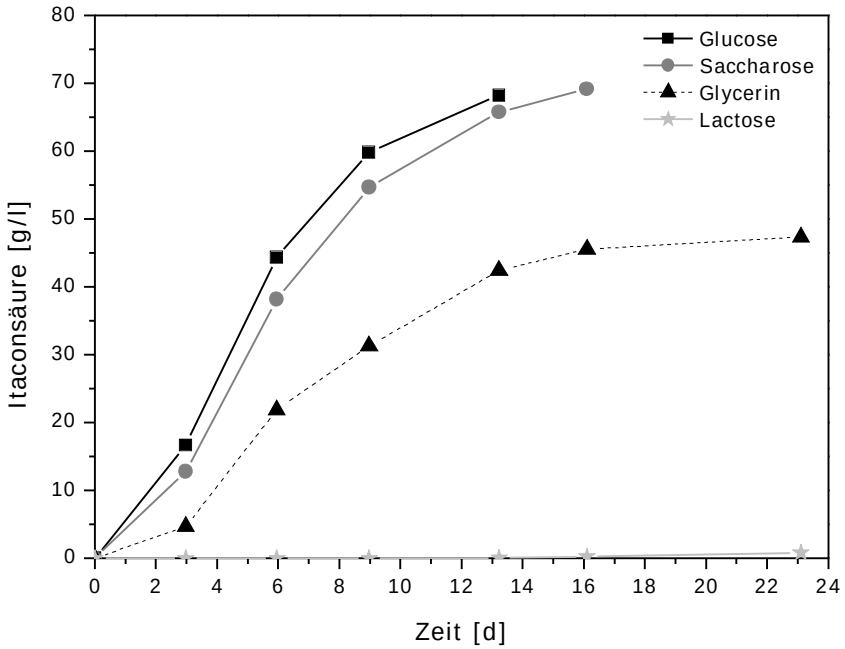

Abbildung 2.6-1: Vergleich verschiedener C-Quellen; Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben; 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

Aspergillus terreus LU02b bildete mit Lactose die dreifache Biotrockenmasse aber lediglich 0,8 g/l IA nach 23 Tagen Kultivierung. Dieser Pilz ist somit in der Lage Lactose als alleinige Kohlenstoffquelle zum Wachstum, aber nicht zu einer hohen IA Produktion nutzen. Folglich ist Molke als alleinige Kohlenstoffquelle nicht einsetzbar.

Im 1,5 l Glasreaktor wurde der Versuch mit Pharmaglycerin als Kohlenstoffquelle wiederholt. Weiterhin wurde die Verwertbarkeit von Xylose als Substrat getestet (Abbildung 2.6-2). Mit reinem Pharmaglycerin erfolgt das Wachstum im Fermenter ähnlich wie mit Glucose. Die IA Produktion setzt hingegen nach ca. zwei Tagen etwas verzögert ein. Die Kurvensteigung während der stärksten Produktbildungsphase ist geringer als bei der Referenz (Standardkultivierung mit Glucose). Nach ca. fünf Tagen nimmt die Produktivität ab und nach 15 Tagen Kultivierungsdauer wird eine Konzentration von 69,7 g/l Itaconsäure erreicht. Die Ausbeute beträgt nach sieben Tagen 69 Mol %, infolge des weiteren Substratverbrauchs sinkt sie aber auf 33 Mol % nach 15 Tagen ab. Bei dieser Kultivierung im Rührreaktor konnte innerhalb vergleichbarer Kultivierungszeit, vermutlich aufgrund der kontrollierbaren Bedingungen und aktiver Sauerstoffzufuhr, vergleichend zum Schüttelkolben 27 g/l IA mehr produziert werden. Dieses macht den Einsatz von Rohglycerin als Kohlenstoffquelle interessant, mit der Einschränkung, dass dieses meist Salze und andere Verunreinigungen in Konzentrationen enthält, die der Produktivität von *Aspergillus terreus* nicht zuträglich sind.

Das Substrat Xylose (Holzzucker) kann aus Holz oder anderen, aus Cellulosefasern bestehenden Pflanzen wie z.B. Stroh gewonnen werden. Im Reaktor sind zwei Tage nach dem Beimpfen die Sporen nicht ausgekeimt. Da die Keimung bei einer Standardfermentation innerhalb der ersten 15 Stunden stattfindet, sollte die Keimung durch Zugabe von 2 g/l Glucose initiiert werden. Nach drei Tagen wurden weitere 3 g/l Glucose zudosiert. Nach vier Tagen Kultivierungsdauer sinkt die gelöst Sauerstoffkonzentration und die Keimung der Sporen beginnt. Nach ca. sieben Tagen ist die zugegebene Glucose aufgezehrt, es hat sich ein pH-Wert

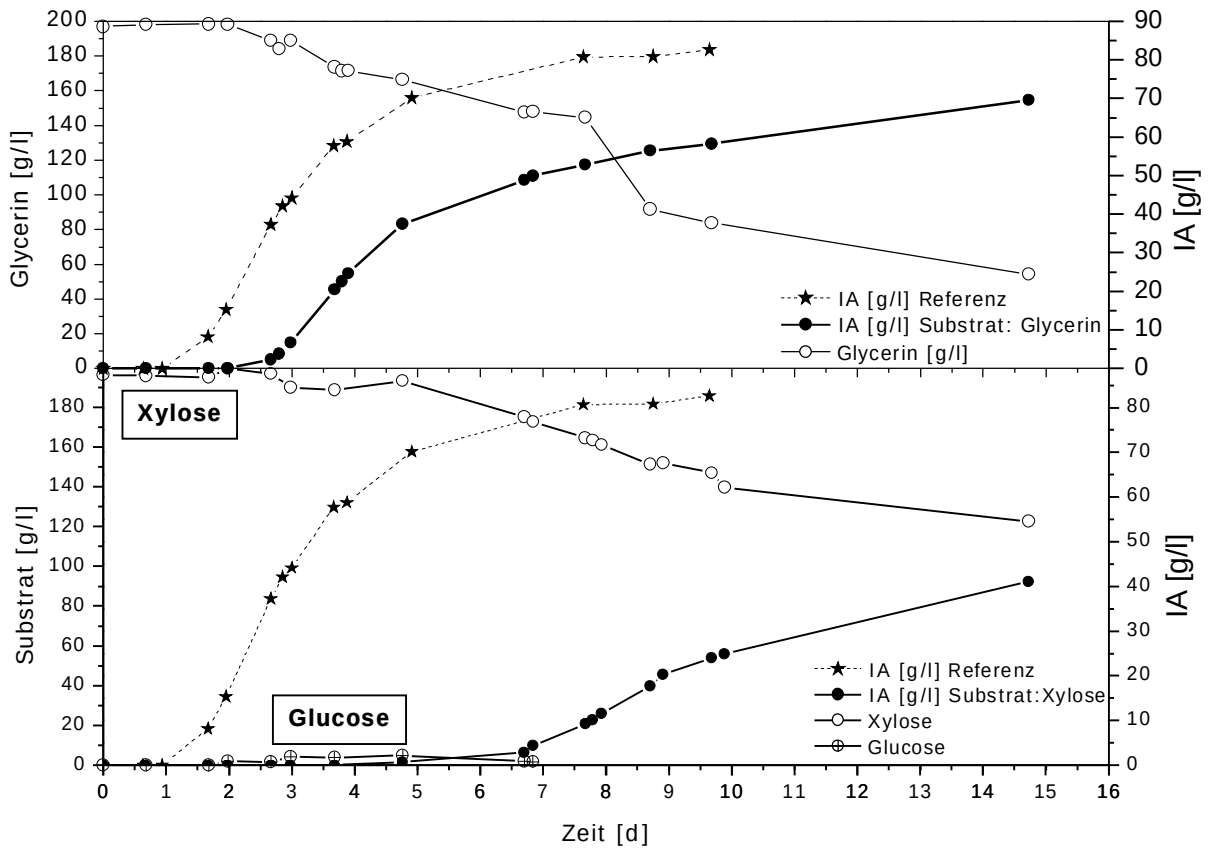

Abbildung 2.6-2: Vergleich verschiedener C-Quellen; Kultivierung von Aspergillus terreus LU02b im 1,5 l Glasfermenter; 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

von 1,9-2,0 eingestellt und der Pilz ist wie bei einer Standardkultivierung in Form von kleinen locker ausgefransten Pellets gewachsen. Die Phase der stärksten Itaconsäureproduktion beginnt und sinkt nach neun bis 10 Tagen. Nach insgesamt 12 Tagen Produktionsdauer beträgt die Konzentration der Itaconsäure im Medium ca. 45 g/l. Am Verlauf der Xylosekonzentration ist zu erkennen, dass der Pilz den Zucker von Beginn des Wachstums an stetig abbaut. Da trotz der Glucosezugabe am zweiten und dritten Tag der Pilz erst nach über vier Tagen mit dem Wachstum beginnt, kann darauf geschlossen werden, dass nicht zwingend Glucose als Substrat benötigt wird. Vermutlich benötigt der Organismus diese Zeit um den Stoffwechsel auf das Substrat Xylose umzustellen. Im Vergleich sind die Produktivität und die erreichte Endkonzentration deutlich geringer als in einer Kultivierung mit dem Substrat Glucose, dennoch wurde eine Ausbeute von ca. 60 Mol% erzielt. Untersuchungen von Kautola haben ebenfalls ergeben, dass *Aspergillus terreus* in der Lage ist organische Säuren aus Xylose herzustellen, jedoch deutlich langsamer als mit Glucose oder Saccharose als Substrat (Kautola, 1989). Dies deckt sich auch mit Ergebnissen von Eimhjellen, der mehrere unterschiedliche Zucker und Alkohole auf ihre Eignung als Substrat zur Itaconsäureproduktion untersucht hat. Das beste Wachstum und die stärkste IA Produktion wurde mit Glucose und Saccharose erzielt, aber auch die Zucker Cellbiose, D-Mannose, D-Fructose, D-Xylose sowie Glycerin stellten sich als taugliche Kohlenstoffquellen heraus (Eimhjellen, 1955).

Verwertbarkeit von Neben- bzw. Abfallprodukten

Der Zusatz von 10 g/l Kartoffelrestfruchtwasser (PNC, als alleinige Stickstoffquelle), 1 bzw. 10 g/l Maisquellwasser sowie Rohglycerin, als alleinige Kohlenstoffquelle, (Abbildung 2.6-3) wurden auf ihre Verwertbarkeit durch den Pilz untersucht.
Das Kartoffelrestfruchtwasser (PNC) ist besonders eiweiß- (bzw. stickstoff-) und mineralreich. Es wurde mehr Biomasse als in der Referenz produziert, aber keine Itaconsäure. Das erhöhte Biomassewachstum ist vermutlich auf das im PNC enthaltene Phosphor zurückzuführen. Da keine IA Produktion vorhanden war ist das Kartoffelrestfruchtwasserkonzentrat, als alleinige Stickstoffquelle, nicht geeignet.
Mit Rohglycerin produzierte der Pilz ab drei Tagen Kultivierung IA. Im Vergleich zur Kultivierung mit Glucose war die lag-Phase bis zum Start der IA Produktion zwei Tage und vergleichend zum Pharmaglycerin einen Tag länger. Nach neun Tagen Kultivierungsdauer produzierte der Pilz 16,7 g/l IA. Zu diesem Zeitpunkt lagen weitere 27 g/l Glycerin im Medium vor. Am Kultivierungsende waren die vorgelegten 117 g/l Glycerin vollständig verbraucht und der Pilz verstoffwechselt die gebildete IA, was an der Konzentrationsabnahme der IA zum Ende der Kultivierung hin erkennbar ist.
Im Vergleich zum reinen Pharmaglycerin beträgt die erreichte IA Konzentration mit 16,7 g/l (13 Mol%) lediglich 39 % der im Schüttelkolben produzierten 42,5 g/l IA. Dieser Versuch zeigt, dass der Einsatz von Rohglycerin prinzipiell möglich ist. Da der Pilz aber sehr stark auf Verunreinigungen (K.Welter, 2000) und Verschiebungen bestimmter Nährstoffverhältnisse (Batti, 1963) reagiert, ist eine Analyse des Rohglycerins mit eventuell anschließender Aufreinigung notwendig um geringe Ausbeuten zu vermeiden.
Maisquellwasser entsteht bei der Herstellung von Maisstärke. Der Einsatz von Maisquellwasser (CSL) ist in der Literatur zahlreich vorhanden (Dwiarti, 2002;Lockwood, 1945;Okabe, 1993). So konnte Dwiarti mit einer Mutante von *Aspergillus terreus* NRRL 1960 (nach einer nitrosoguanidine (NTG) Behandlung) unter Verwendung von 2,1 g/l CSL nach 144 h 80 g/l IA herstellen.
A. terreus LU02b produziert mit 10 g/l Maisquellwasser nur 9,7 g/l IA (Abbildung 2.6-3). Der Zusatz von 1 g/l Maisquellwasser wirkt sich im Bezug der IA Produktion nicht negativ aus. Der Verlauf der IA Produktion ähnelt dem Verlauf der Referenz. Der Pilz produziert in den ersten 10 Tagen der Kultivierung 78 g/l IA. Ab diesem Zeitpunkt war keine Glucose mehr messbar und die gebildete IA wurde als Substrat verbraucht und sank während der weiteren Kultivierung.

Da sich der Zusatz von 10 g/l und 1 g/l Maisquellwasser so unterschiedlich in der Produktion auswirkte wurden Versuche mit unterschiedlichen geringen Zusätzen an Maisquellwasser durchgeführt. Diese Versuchsreihe zeigt, dass die IA Produktion mit dem verwendeten Stamm und dem Standardproduktionsmedium am besten verläuft, um so geringer die zugesetzten Maisquellwassermengen waren. Mit keinem der Ansätze konnte eine bessere IA Produktion erreicht werden, als mit dem Standardproduktionsmedium (Referenz; 0,1 g/l KH_2PO_4).

Unter Verwendung dieser Rohsubstrate verliefen die IA Produktionen schlechter als mit dem reinen Standardproduktionsmedium. Die Rohsubstrate müssten vermutlich vor dem Einsatz aufgereinigt werden um Verunreinigungen und Schwermetallen wie z.B. Eisen und Mangan abzutrennen. Da dies aber kostenintensiv ist und die Produktion an IA bisher ohne weitere Zusätze und Glucose als Substrat am besten verläuft wurden keine weiteren Versuche mit Rohsubstraten durchgeführt.

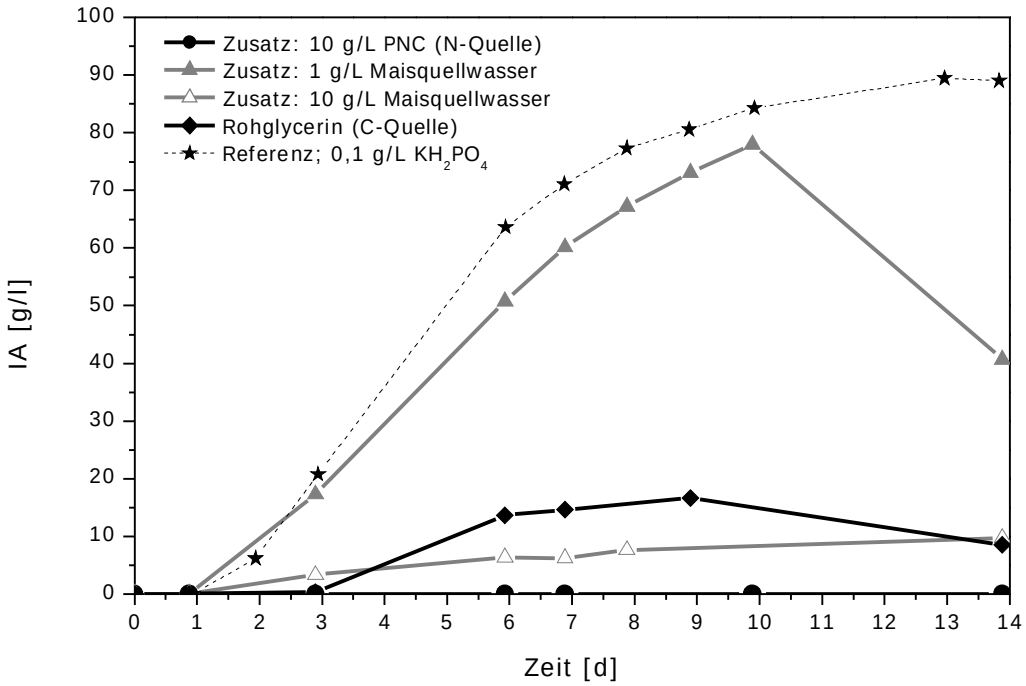

Abbildung 2.6-3: Einsatz verschiedener Rohsubstrate bei einer Kultivierung von *A. terreus* LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben; 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt, 120 Upm

2.7 Aufarbeitung

Ziel ist es, die IA direkt aus dem Fermentationsmedium mit einem Gemisch aus tertiären Aminen und langkettigen Alkoholen zu extrahieren.
Vergleichend zu der Flüssig-flüssig Extraktion wurden Versuche mit der Elektrodialyse durchgeführt.

2.7.1 Elektrodialyse

Versuche mit Modelllösungen

Zunächst ist mit Modelllösungen (Abbildung 2.7-1) gearbeitet wurden um die Handhabung der Elektrodialyse kennen zu lernen und die Methode bei nahezu idealen Verhältnissen (nur Glucose und Itaconsäure) zu erproben. Dabei wurden batch Elektrolysen (Diluat und Konzentrat je 1 l; U=15 V, konstant) mit folgenden Modelllösungen durchgeführt: Verhältnisse (Itaconsäure/Glucose) 3:1, 5:1, 7:1, 9:1. Mit zunehmender IA Konzentration in der Diluatlösung als Vorlage nahm die Zeitdauer zu, die zur Trennung benötigt wurde. Die im Diluat vorgelegte Glucose (10 g/l) trat nicht in den Konzentratkreislauf über. Eine Trennung der IA von der Glucose war unabhängig von der IA Konzentration erfolgreich.

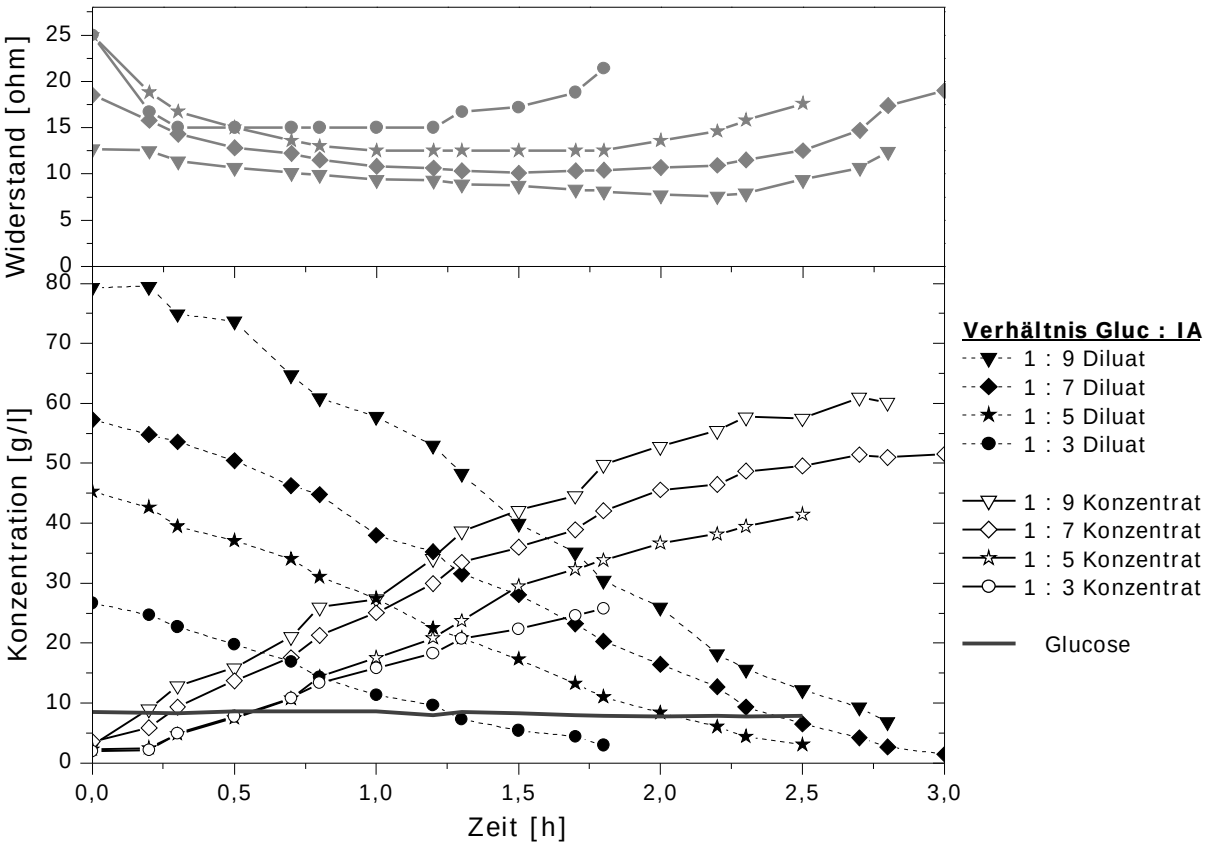

Abbildung 2.7-1: Elektrodialyse von Modelllösungen, bestehend aus Glucose und IA; 1 L Diluat, 1 L Konzentrat, 15 V

Kulturüberstände

Es wurden 1 l biomassefreier Kulturüberstand als Diluat und 1 l (5 µS) Wasser als Konzentrat vorgelegt. Die Kulturüberstandskurven (Abbildung 2.7-2) verliefen leicht unter denen der Modellösung. Dennoch konnte mit dem Kulturüberstand nahezu der gleiche IA Übergang erzielt werden. Am Ende der Elektrodialyse sind 80 % der IA in den Konzentratkreislauf übergegangen.
Der Widerstandsabfall bei dem Kulturüberstand war nicht so abrupt wie bei der Modelllösung. Vermutlich liegen in der Lösung mehr Teilchen und Komponenten vor, die ebenfalls wandern, sich gegenseitig behindern und der Widerstand dennoch hoch ist.
In der Abbildung 2.7-3 sind die Analysen mittels HPLC des Diluates vor Beginn der Elektrodialyse sowie des Diluates und des Konzentrates am Ende der Elektrodialyse dargestellt. Zwischen 2,5 min und 5 min sind die Nebenprodukte erkennbar. Die Endprobe des Konzentrates zeigt, dass alle Nebenprodukte mit der IA in den Konzentratkreislauf übergehen. In der Endprobe des Diluates ist ein Peak bei 3,2 min vorhanden, der vor der Elektrodialyse einen deutlich höheren Peak zeigte. Bei dieser Substanz handelt es sich vermutlich um Gluconsäure, die während der Elektrodialyse anscheinend langsamer in den Konzentratkreislauf übergeht. Mit der Elektrodialyse kann die IA von der Glucose, aber nicht von den gebildeten Nebenprodukten getrennt werden. Die Fermentationsparameter sollen so gewählt werden, dass am Ende einer Kultivierung keine Glucose im Kulturüberstand vorhanden ist.

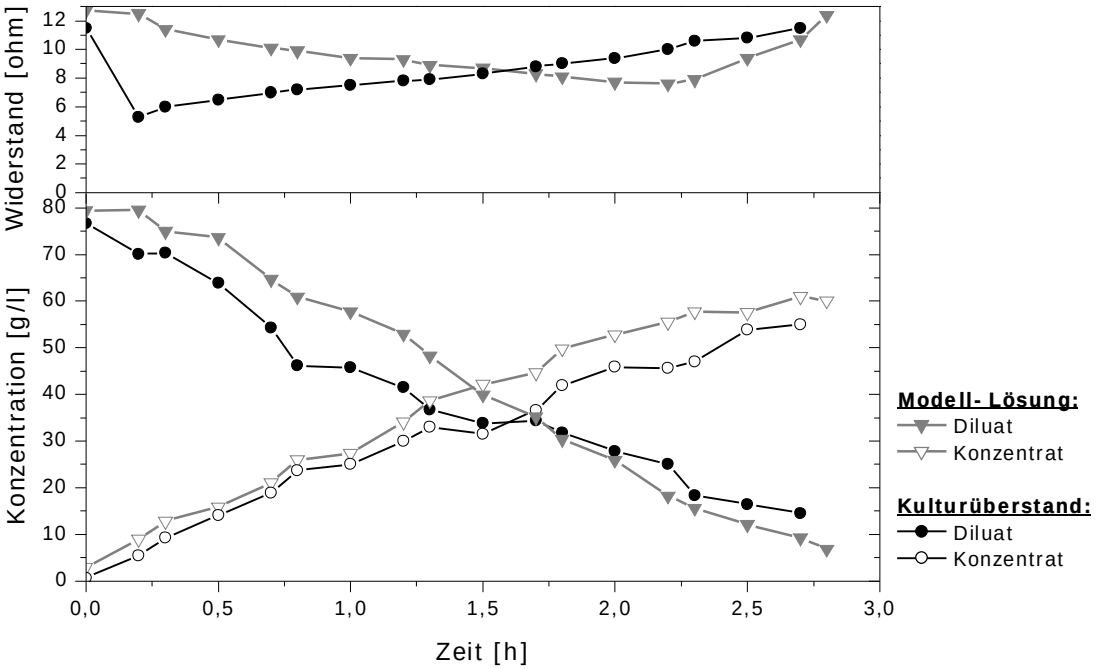

Abbildung 2.7-2: Elektrodialyse eines biomassefreien Kulturüberstandes im Vergleich zu einer Modelllösungen, bestehend aus Glucose und IA; 1 L Diluat, 1 L Konzentrat, 15 V

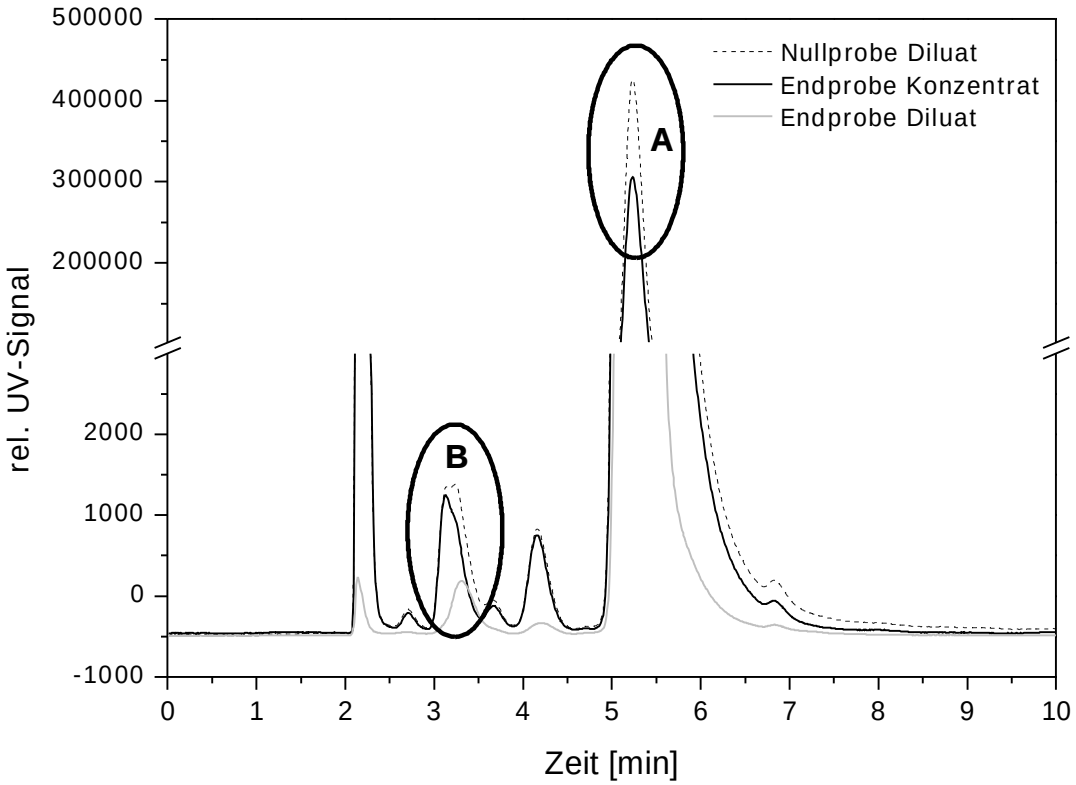

Abbildung 2.7-3: Chromatogramme einer Elektrodialyse; Null- und die Endprobe des Diluates und die Endprobe des Konzentrates; UV-Detektor, Säule: FermentationMonitoring BioRad, 0,8 mL/min, 23 °C, 5 mMol H_2SO_4

2.7.2 Flüssig / Flüssig Extraktion

Der Erfolg der Reaktivextraktion von Itaconsäure setzt sich aus drei Schritten zusammen und der Ablauf ist schematisch in der Abbildung 2.7-4 dargestellt:

- Bildung eines Zwischenproduktes (Komplexes)
- Solvatation des Komplexes in die organische Phase
- Reextraktion der IA aus der organischen Phase

Über verschiedene Versuchsansätze wird das kombinierte Extraktionsmittelsystem bestehend aus den Lösungsmitteln 1-Butanol und 1-Octanol sowie der Reaktivkomponente Trioctylamin (TOA) durch Variation der Verhältnisse zueinander optimiert. Weiterhin wird die Extraktionsdauer, die Temperatur, die Reextraktion sowie der Einsatz realer Kulturbrühen mit und ohne Pilzmyzel untersucht. In wie fern der Pilz auf Spuren der unterschiedlichen Lösungsmittel reagiert ist weiterhin Gegenstand dieser Arbeit.

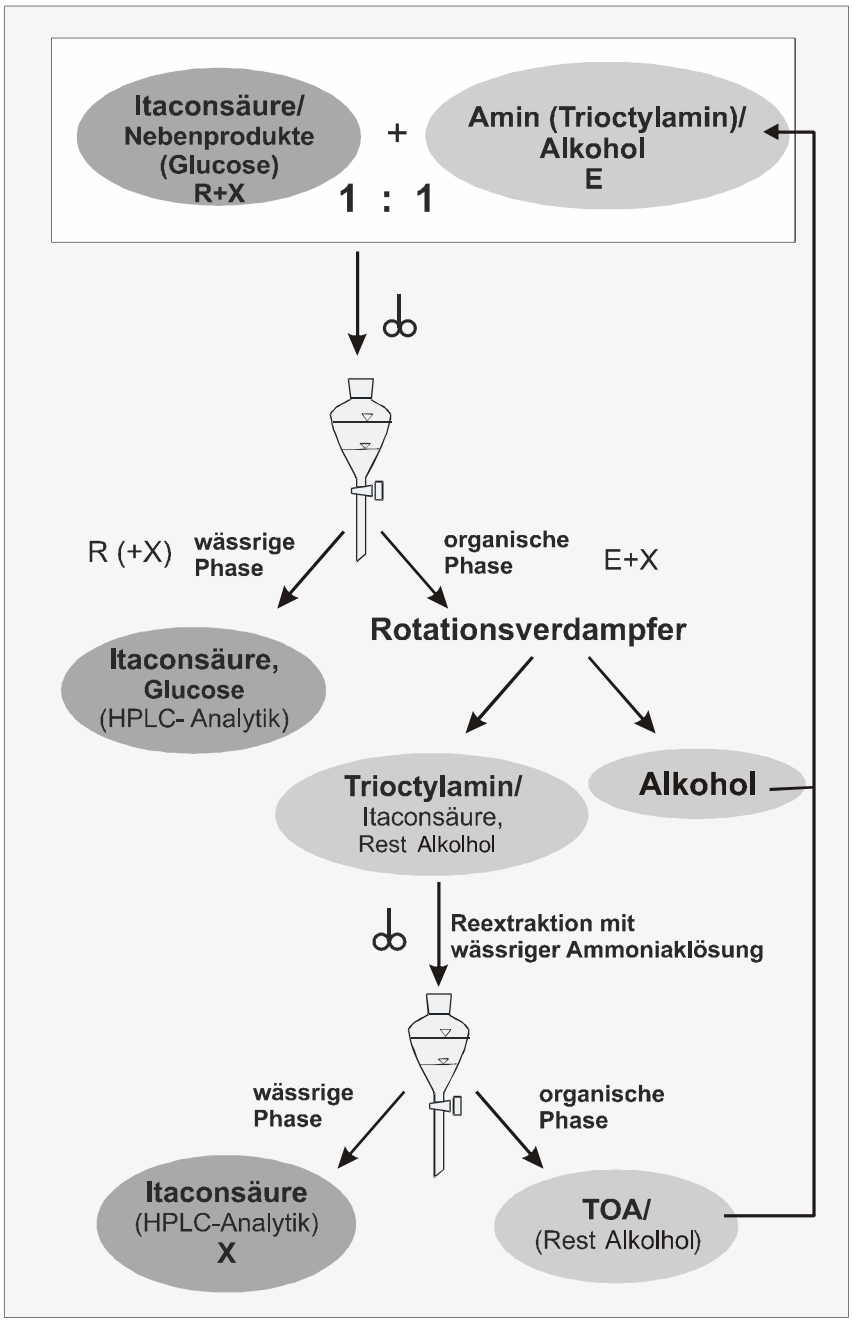

Abbildung 2.7-4: Fließbild der Flüssig-flüssig Extraktion

Optimierung des molaren Amin/Säure Verhältnisses sowie der Amin/ Alkohol Massenverhältnisse

1. Optimierung des Molaren Amin/Säure Verhältnisses

Die Optimierung der Wechselwirkungen zwischen Itaconsäure und der Reaktivkomponente (Trioctylamin) wurde unter konstanten TOA/Butanol Massenverhältnisses (0,2 g/g) durchgeführt (Abbildung 2.7-5). Der Gesamterfolg der Extraktion nimmt mit steigendem Anteil der Reaktivkomponente unter dem gegebenen Amin/Alkohol-Verhältnis sehr stark zu. Ist die molare Beladung von Trioctylamin zur Itaconsäure gleich oder größer als eins, liegt der Extraktionserfolg (Konversionsgrad der Extraktion) bei über 98 %. Eine weitere Erhöhung des Aminanteils bewirkt lediglich eine geringe Steigerung des Extraktionserfolges. Das nach diesem Versuch ermittelte minimale Amin/Säure-Verhältnis beträgt 1,0. Unter diesen Bedingungen werden 98,39 % der eingesetzten Menge an Itaconsäure erfolgreich in die organische Phase extrahiert. Anhand der Ergebnisse von Tamada zur Komplexbildung wird festgestellt, dass die Reaktivkomponente (TOA) mit Itaconsäure-Molekülen (1,1)-Komplexe bildet (Tamada, 1990). Ein IA-Molekül geht somit mit einem TOA-Molekül Wechselwirkungen ein und wird gebunden. In Hinsicht auf die Umweltverträglichkeit und Toxizität der Substanzen, insbesondere von Trioctylamin, ist der Anteil der Reaktivkomponente so gering wie möglich anzustreben.

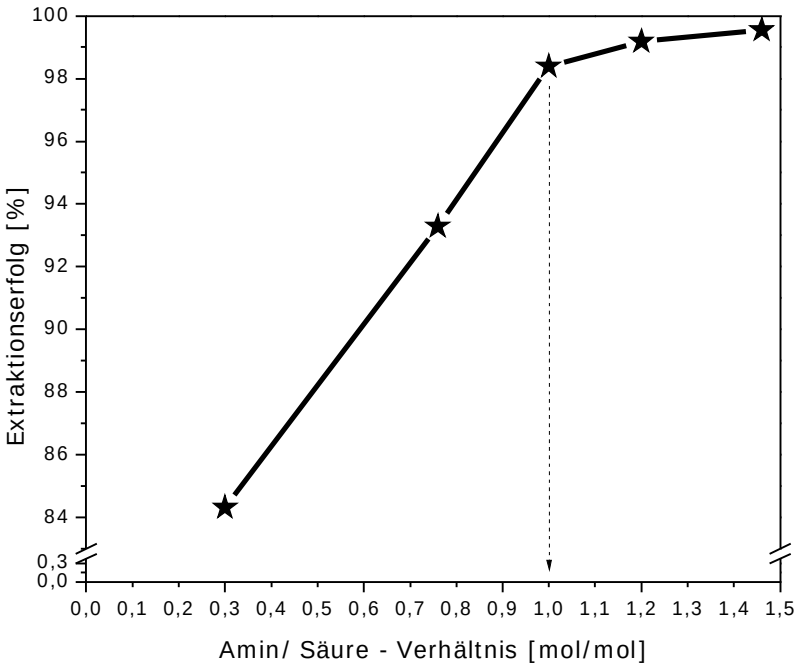

Abbildung 2.7-5: Optimierung des Amin/Säure Verhältnisses bei konstanten Amin/1-Butanol-Massenverhältnis

2. Optimierung des Amin/Alkohol-Massenverhältnisses

Diese Versuchsreihe soll die maximal erreichbare Synergie zwischen dem Komplex und den Lösungsmitteln 1-Butanol und 1-Octanol bei konstanter Aminmenge ermitteln. Der gebildete Amin-Säure-Komplex wird durch das Lösungsmittel sol-

vatisiert. Das Verhältnis zwischen den vorhandenen Komplexen und den Lösungsmitteln bestimmt als zweiten Einflussfaktor den Gesamterfolg und damit den Konversionsgrad der Extraktion (Abbildung 2.7-6). Die Extraktion mit reinen Alkoholen zeigt, dass mit zunehmender Kettenlänge der Alkohole die Extraktion schlechter verläuft. Somit ist eine Reaktivkomponente nötig um eine ausreichende Verteilung der Itaconsäure in der Lösungsmittelphase und schließlich einen hohen Extraktionserfolg zu erreichen. Unabhängig von der Kettenlänge des Alkohols reicht ein Amin/Alkohol-Massenverhältnis von 0,1 aus um über 92 % der Itaconsäure von der wässrigen in die organische Phase zu überführen. Bei höheren Verhältnissen liegt der Extraktionserfolg relativ konstant bei ca. 95 % und bei 1-Butanol bei 98 %. Der Verteilungskoeffizient der IA steigt mit zunehmendem Amin/Alkohol-Massenverhältnis an. Im Hinblick auf die Umweltverträglichkeit der Reaktivkomponente und des gleichbleibenden Extraktionserfolgs wird für die Folgeversuche ein konstantes Amin/Alkohol-Massenverhältnis von 0,2 gewählt.

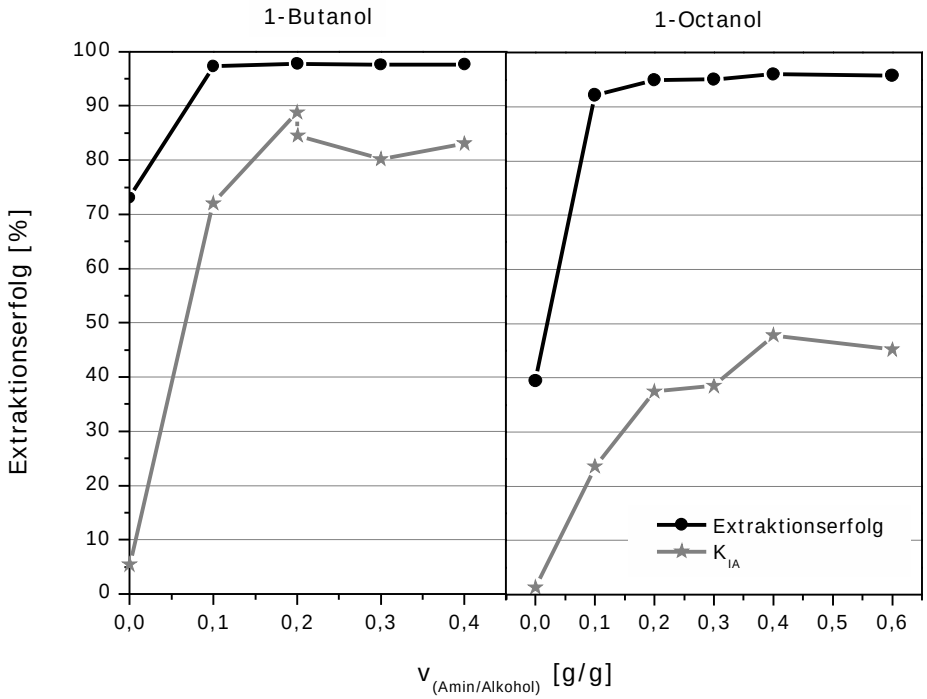

Abbildung 2.7-6: Optimierung des Amin/Alkohol-Verhältnisses bei konstanten Amin/Säure-Molverhältnis

Optimierung der Temperatur und der Extraktionsdauer

Die Dauer der Phasendurchmischung / Extraktionsdauer liefert einen Beitrag zur Effizienz der Extraktion. Eine sehr kurze Mischzeit von ca. fünf Sekunden reicht scheinbar nicht für einen ausreichenden Kontakt der Phasen um einen Übergang der Itaconsäure herzustellen (Abbildung 2.7-7). Eine Verlängerung der Durchmischung auf zwei Minuten zeigt hingegen einen hinreichend hohen Extraktionserfolg, der durch längere Mischzeiten (20 Minuten) nicht weiter erhöht wird. Der Extraktionserfolg ist im Bereich von 25 bis 40 °C weitestgehend Temperatur unabhängig. Die Extraktionstemperatur kann daher in diesem Bereich niedrig gewählt werden.

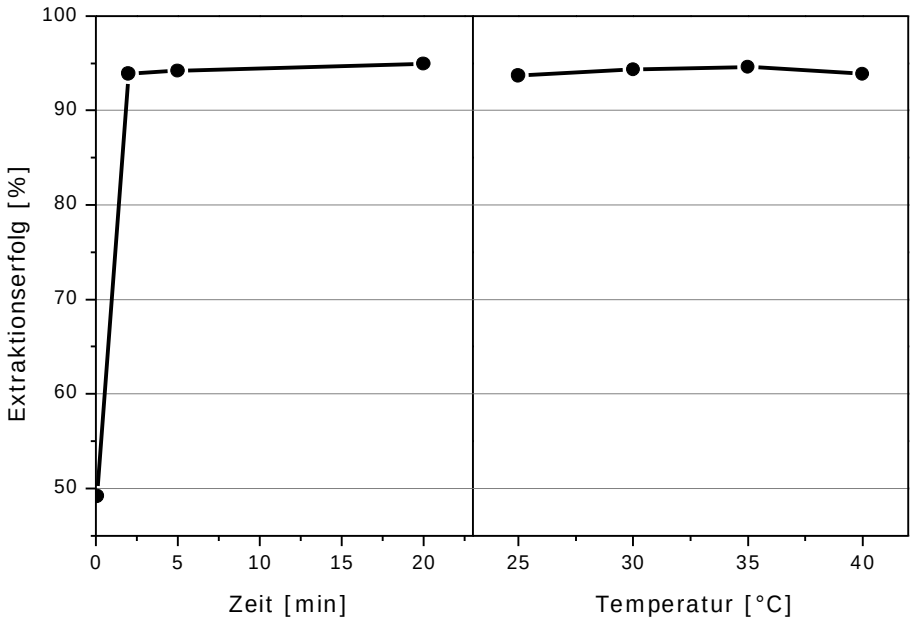

Abbildung 2.7-7: Reaktivextraktion mit TOA/1-Octanol (0,2 g/g), Variation der Parameter: Extraktionsdauer bei 40 °C; Temperatur bei 2 Minuten, $\upsilon_{M(Amin/Säure)}=1$, $V_{wässrig}=V_{organisch}$, Modelllösung mit 61,25 g/l IA und 19 g/l Glucose

Einsatz des Extraktionssytemes bei realen Fermentationsbrühen

Die Extraktionsparameter wurden anhand von Modelllösungen optimiert, die lediglich Itaconsäure und Glucose enthielten. Die Einsetzbarkeit dieser Aufarbeitungsmethode wurde anschließend mittels realer Kulturbrühen getestet. Zum Einen wurde das Extraktionssystem TOA/1-Butanol an realen Kulturüberständen mit und ohne Biomasse untersucht und zum Anderen das optimierte TOA/1-Octanol System (Tabelle 1).

Tabelle 1: Extraktion (TOA/1-Butanol und TOA/1-Octanol) von IA aus biomassefreiem Kulturüberstand (KÜB) sowie aus Kulturbrühe mit Biomasse im Vergleich zu Modelllösungen; $\upsilon_{M(Amin/Säure)}=1$, $V_{wässrig}=V_{organisch}$

	Zeit [min]	T[°C]	$\upsilon_{M(Amin/Alkohol)}$	Extraktionserfolg [%]
KÜB	20	40	TOA/Butanol 0,2	88,21
Kulturbrühe mit Biomasse	20	40	TOA/Butanol 0,2	94,14
Modelllösung	20	40	TOA/Butanol 0,2	98,31
KÜB	2	25	TOA/Octanol 0,2	85,25
Modelllösung	2	25	TOA/Octanol 0,2	93,69

Bei Einsatz realer Kulturüberstände wird die IA mit dem TOA/1-Butanol Extraktionssystem zu 88,21 % in die organische Phase extrahiert. Bei Vorlage von Kulturbrühe mit Biomasse direkt aus dem Fermenter beträgt der Extraktionserfolg ca. 94 %. Somit wird ca. 6 % mehr Itaconsäure extrahiert, wenn die Biomasse vor der Extraktion nicht von der Kulturbrühe abgetrennt wird. Im Vergleich zu den erreichten Extraktionserfolgen bei den Modellversuchen ergibt sich insgesamt betrachtet folgende Reihenfolge: Der geringste Extraktionserfolg ergibt sich beim Einsatz von Kulturüberstand mit 88 %, bei der Kulturbrühe mit Biomasse

konnten ca. 94 % erreicht werden und 98 % Itaconsäure wurden aus den Modelllösungen extrahiert.
Die Übertragung der optimierten Reaktivextraktion mit TOA/1-Octanol auf eine zellfreie Fermentationsbrühe erbrachte mit ca. 85 % ebenfalls einen deutlich herabgesetzten Extraktionserfolg.
Bei der Extraktion wird keine vollständige Abtrennung der Itaconsäure erreicht (Abbildung 2.7-8). In der Kulturbrühe sind neben Itaconsäure die Metabolite vorhanden, die auf den von *A. terreus* durchgeführten Stoffwechselwegen entstehen. Darunter sind die im Tricarbonsäurezyklus gebildeten organischen Säuren. Bei dem Extraktionsprozess treten Wechselwirkungen von Trioctylamin zu allen Verbindungen auf, die Carboxylgruppen tragen und es kann zur Bildung von verschiedensten Komplexen kommen (Hirth, 2002). Offensichtlich bindet Trioctylamin unter diesen Bedingungen bevorzugt Itaconsäure-Moleküle. Allerdings wird der Konversionsgrad bezogen auf Itaconsäure gemindert durch die konkurrierenden organischen Säuren, die ebenfalls extrahiert werden können.
In weiteren Versuchen muss geklärt werden, ob die Abtrennung der Biomasse vor der Extraktion überhaupt erforderlich ist. Der Konversionsgrad bei Verwendung von Kulturbrühe ist höher als bei biomassefreiem Kulturüberstand. Ursache kann sein, dass die Biomasse durch die aufgebrachten Scherkräfte des Rührers zerrissen und in der Lösung als feste Teilchen suspendiert wird. Es vergrößert sich die Stoffaustauschfläche zwischen der organischen und wässrigen Phase. Beim Zerbersten der Hyphen-Zellen wird wahrscheinlich auch intrazellulär im Cytoplasma lokalisierte Itaconsäure frei, die somit bei der Extraktion zur Verfügung steht.

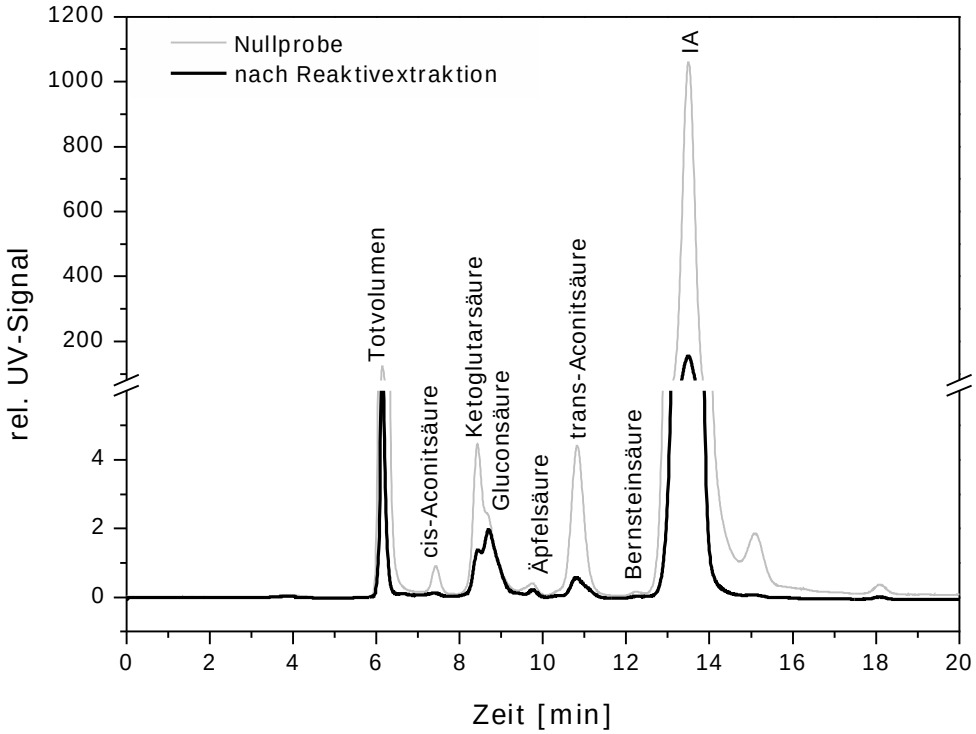

Abbildung 2.7-8: HPLC-Chromatogramm (UV-Detektor) einer Fermentationsbrühe vor und nach der Reaktivextraktion, TOA/1-Octanol 0,2 g/g, $\upsilon_{M(Amin/Säure)}=1$, $V_{wässrig}=V_{organisch}$, 2 Minuten Durchmischungsdauer, 25 °C

Untersuchung der Reextraktion

Nach der Extraktion befindet sich die Itaconsäure in der organischen Phase. Eine Abtrennung der organischen Säure auf destillativem Weg wäre aufgrund des hohen Siedepunkts von TOA (366 ° C) nur durch kostenintensive Hochvakuumrektivikation möglich (Hirth, 2003). Daher wird untersucht, in wie fern die Säure durch Rückextraktion in eine konzentrierte wässrige Phase möglich ist.
Der Siedepunkt des Lösungsmittels 1-Octanol liegt bei 194 ° C. In dieser Versuchsreihe wird der von Jung empfohlene Eindampfungsschritt nicht durchgeführt (Jung, 2000). Die gesamte organische Phase der Reaktivextraktion wird mit dem gleichen Volumen einer wässrigen, stark basischen Ammoniaklösung (~ pH 10) in Kontakt gebracht. Das Reextraktionsverhalten der Itaconsäure in diese wässrige Phase wird bei unterschiedlichen Ammoniakkonzentrationen und Temperaturen untersucht (Abbildung 2.7-9).

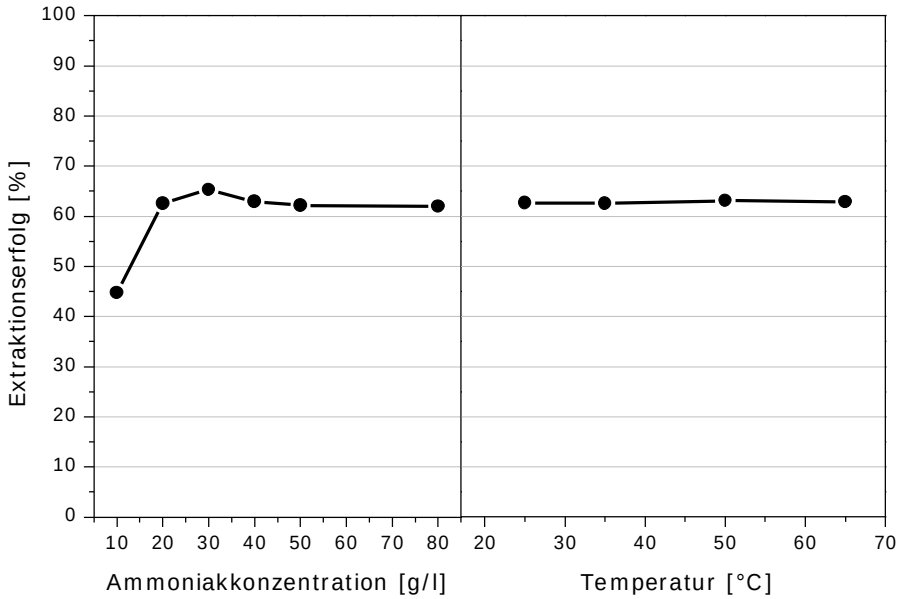

Abbildung 2.7-9:Rückextraktion mit wässriger Ammoniaklösung, Variation der Parameter Ammoniakkonzentration und Temperatur; 20 Minuten, $\upsilon_{M(Amin/Säure)}=1$, $V_{wässrig}=V_{organisch}$, Extraktphasen aus Reaktivextraktionen der Modelllösung mit 61,25 g/l Itaconsäure und 19 g/l Glucose

Die Rückextraktion der Itaconsäure mit wässriger Ammoniaklösung aus dem Extraktionsmittel TOA/1-Octanol erzielte im Bereich von 25-65 °C bei 30 g/l Ammoniak in der wässrigen Phase einen maximalen Reextraktionserfolg von 65,3 %. Die Ammoniakkonzentration sollte mindestens 20 g/l betragen, um über 60 % der Itaconsäure aus der organischen Phase zurück zu gewinnen. Konzentrationen über 30 g/l bringen keine Verbesserung des Extraktionserfolges. Die Mischungsdauer der Reextraktion betrug 20 Minuten. Eine Verlängerung auf 60 Minuten zeigte keine Veränderung im Extraktionsergebnis.
In der Literatur werden weitere Möglichkeiten der Rückgewinnung ohne vorherige Abtrennung des Lösungsmittels vorgeschlagen. Puttemanns untersuchte die Rückextraktion organischer Säuren aus TOA-Komplexen mittels Austauschreaktion durch Perchlorat-Ionen (Puttemans, 1984). Die Verwendung eines niedermolekularen, flüchtigen tertiären Amins (Trimethylamin (TMA)) anstelle von Ammoniak erzielte hervorragende Ergebnisse bei der Rückextraktion von Milch-, Succinat- und Fumarsäure aus einer organischen Extraktphase (Poole, 1991). Eine

Reextraktion der Itaconsäure mittels TMA müsste vergleichend zum Ammoniak untersucht werden.
In einem weiteren Versuch wurde das Lösungsmittel vor der Reextraktion mittels Destillation eingeengt. Das 1-Butanol wurde nicht vollständig mit dem Rotationsverdampfer abgezogen, um ein vorzeitiges Ausfallen der IA zu verhindern. Anschließend wurde eine Reextraktion mit Wasser durchgeführt ($V_{organische\ Phase} = V_{wässrige\ Phase}$). Es konnten aber lediglich 0,8 g/l IA in der wässrigen Phase nachgewiesen werden. Durch eine weitere Reextraktion mit Zusatz einer wässrigen Ammoniaklösung (50 g/l Ammoniak) konnten 96 % der eingesetzten Itaconsäure in der wässrigen Phase nachgewiesen werden.

Untersuchung der Verträglichkeit des Extraktionsmittels

Für eine Onlineabtrennung der Itaconsäure und einer Rückführung der extrahierten Fermentationsbrühe in den Reaktor wird die Verträglichkeit der verschiedenen Lösungsmittel auf das Wachstum und die Itaconsäure Produktion untersucht. Untersucht werden 1-Butanol (Löslichkeit in Wasser 77 g/kg bei 20 °C) und 1-Octanol (Löslichkeit in Wasser 0,3 g/kg bei 20 °C) (Abbildung 2.7-10).

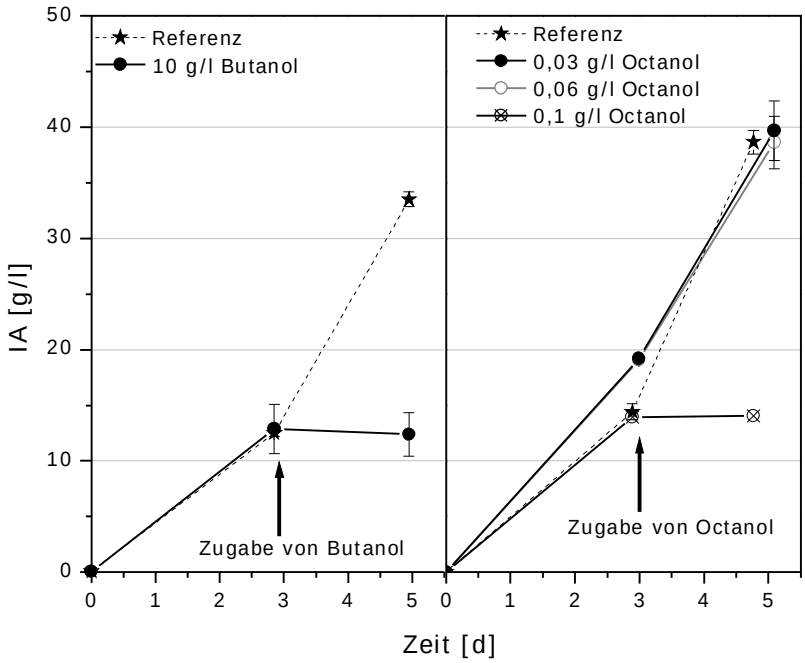

Abbildung 2.7-10: IA-Produktionsverläufe der Fermentation von *A. terreus* LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben (SK), Standardproduktionsmedium mit Zugabe verschiedener Konzentrationen von 1-Butanol und 1-Octanol; 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt, 120 Upm

Die Zugabe der Lösungsmittel erfolgte nach der Wachstumsphase und während der Produktionsphase. Nach der Zugabe von 1-Butanol, so dass die Endkonzentration in der Kultur 10 g/l betrug, stoppt der Pilz sofort mit der IA Produktion. Zu einem wirtschaftlich nicht vertretbaren Verlust an Lösungsmittel würde somit hinzukommen, dass der Pilz mit einer sofortigen Einstellung der Itaconsäureproduktion auf die Präsenz von lediglich 1 % (w/w) Butanol im Medium reagiert, bei einer Wasserlöslichkeit von 7,7 % .
Bei der Zugabe von Octanol werden im Medium Konzentrationen von 0,03; 0,06 und 0,1 g/l erreicht. Die Referenzkultivierung hat nach ca. 3 Tagen 15 g/l und

nach 5 Tagen 38 g/l IA produziert. Bis zum Zeitpunkt der Octanolzugabe, nach 3 Tagen, sind die Entwicklung der Biomasse und die Itaconsäurebildung in diesen Versuchskolben vergleichbar mit der Referenz. Octanolkonzentrationen bis 0,06 g/l scheinen keinen negativen Einfluss auf die Produktivität des Pilzes zu besitzen. Nach ca. 5 Tagen werden in den Kolben ebenfalls zwischen 37 und 40 g/l IA gebildet. 0,1 g/l Octanol hingegen scheint deutlich toxische Wirkung zu haben. Der Pilz stellt die Produktion der Itaconsäure nach dieser Octanolzugabe komplett ein. Dies bedeutet, dass die Rückführung extrahierten Mediums in den Reaktor begrenzt wird durch die Menge eingetragenen Octanols. Erreicht die Octanolkonzentration in der Fermentationsbrühe 0,1 g/l wird die IA Produktion eingestellt, daher ist Octanol für eine online-Produktabtrennung nicht geeignet.

Onlineabtrennung der Itaconsäure

Während der Fermentation wird möglichst zellfrei Kulturbrühe entnommen und durch eine äquivalente Menge an neuen Standardproduktionsmedium ersetzt. Dies soll zeigen inwieweit durch die Entnahme des Produktes eine eventuell vorliegende Produkthemmung unterbunden werden kann und somit eine Effizienzsteigerung der Fermentation erreicht wird. Die Onlineabtrennung erfolgt nach abgeschlossener Wachstumsphase vierfach während der Produktionsphase. Über ein Tauchrohr mit Gazefilter (100 µm Maschenweite) werden 200 ml Fermentationsbrühe (20 % des Reaktorinhaltes) entnommen und durch 200 ml steriles, phosphatfreies Standardmedium ersetzt (siehe Pfeile, Abbildung 2.7-11).

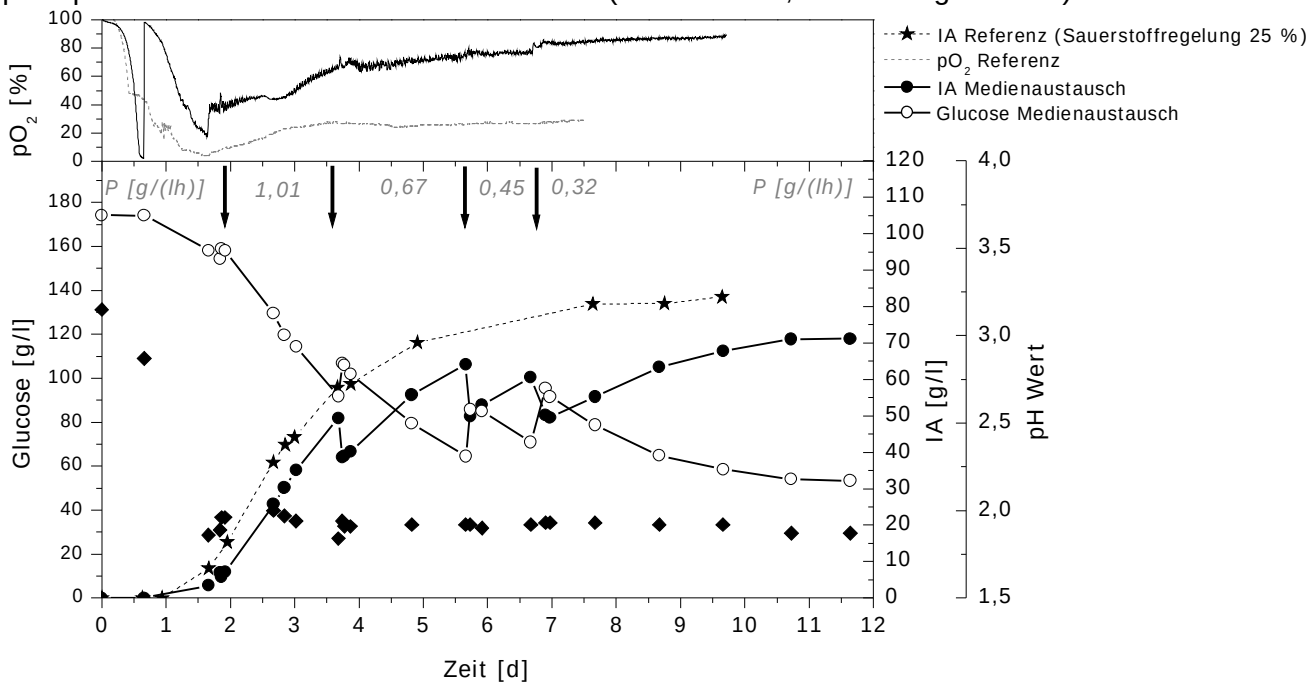

Abbildung 2.7-11: Kultivierungsverlauf von *Aspergillus terreus* LU02b im 1,5 l Glasfermenter mit 4maligem Medienaustausch, 33 ° C, Start pH 3,1 ungeregelt

Der Verlauf der Itaconsäurekonzentration zeigt, dass nach der zweiten Entnahme, im Unterschied zur Referenzkultivierung eine hohe Produktivität aufrechterhalten wird. Bei der Referenzkultivierung beträgt die Produktivität zwischen 4 und 5 Tagen Kultivierung lediglich 0,46 g/(lh) und bei der Kultivierung mit Medienaustausch 0,67 g/(lh). Nach den weiteren Entnahmen haben sich die Produktionsraten zwar reduziert, scheinen aber immer noch geringfügig höher zu sein als in der Kultivierung ohne Medienaustausch. Dies macht deutlich, dass durch

die Entnahme von Itaconsäure die Phase hoher Produktivität über den sonst üblichen Zeitraum hinaus aufrecht erhalten werden kann. Allerdings wird trotz erneuter Medienzugabe, einschließlich der Kohlenstoffquelle, keine höhere IA-Endkonzentration erreicht.

2.8 Verwertung der Produktionsrückstände und Nebenprodukte

Die Optimierung der Kultivierungsbedingungen für eine reproduzierbare und effizientere Itaconsäureproduktion war während dieser Projektlaufzeit von größerer Bedeutung als die Untersuchungen zur Verwertung der Produktionsrückstände. Daher wurden noch keine Fütterungsversuche durchgeführt.

3 Schlussbetrachtung

Die Projektarbeiten FAL hatten als Hauptziel, neue leistungsfähige Itaconsäureproduzenten zu finden und preiswerte Substratquellen zu nutzen. Zusätzliche Arbeiten sollten sich mit einer weiteren Effizienzsteigerung bzw. Kostenreduktion des gesamten Biokonversionsschrittes inklusive Aufarbeitung beschäftigen.
Im Falle eines erfolgreichen Abschlusses der Produkt-Extraktionsexperimente der FAL sollen diese Ergebnisse ebenfalls im Fermenter angewendet werden (Online-Produktabtrennung, Reduktion von Produktinhibierung).

Im ersten Projektjahr wurde festgestellt, dass unter den damals vorliegenden Bedingungen nicht der Stamm, sondern andere Faktoren für die schlechte IA Produktion entscheidend waren. Aus diesem Grund wurden vorrangig Arbeiten durchgeführt, die zum Verständnis, zur Reproduzierbarkeit und zur Effizienzsteigerung der IA Produktion führten. Während dieser Projektlaufzeit wurde daher kein neuer leistungsfähiger Itaconsäureproduzent isoliert.
Allerdings konnten diverse Arbeiten, wie die Handhabung des Pilzes während der Kultivierung, die Optimierung des Phosphatgehaltes, Untersuchungen zur Sauerstoffversorgung, der Einfluss verschiedener Medienkomponenten sowie die detaillierte Betrachtungen der Nebenproduktbildung erheblich zum Verständnis und vor allem zur Effizienzsteigerung der fermentativen Itaconsäureherstellung mittels *Aspergillus terreus* beitragen. Es wurden Kultivierungsbedingungen geschaffen, unter denen die Itaconsäureherstellung reproduzierbar ist. Diese Reproduzierbarkeit konnte in den zwei bisherigen Projekten nicht erreicht werden. Ausgehend von einer Prozessoptimierung mit dem Pilz *Aspergillus terreus* LU02b im 1 l Maßstab (83 g/l nach 8 Tagen, P_{max} = 1,29 g/(lh), 80 Mol%), fand eine erfolgreiche Maßstabsvergrößerung zu 10 l statt. Nach 4 Tagen Kultivierung und einer bis dahin erreichten Konzentration von ca. 60 g/l Itaconsäure sinkt aus bisher ungeklärten Gründen die Produktivität. Innerhalb von 7 Tagen werden insgesamt 86,2 g/l Itaconsäure gebildet, mit einer Ausbeute von 86 Mol%. Im Vergleich zu den bisher geförderten Itaconsäureprojekten (nach 7 Tagen 46,1 g/l bzw. 78 g/l nach 25 Tagen) konnte zum einen die Itaconsäureendkonzentration auf ca. 90 g/l IA gesteigert werden, bei einer gleichzeitigen Verkürzung der Kultivierungsdauer auf 7 Tagen.
Verschiedene Sachverhalte, wie z.B. die Produktivitätsabnahme nach 2,5 und 4 Tagen, das Anhäufen der cis- und trans Aconitsäure, keine höheren Itaconsäurekonzentrationen als 90 g/l konnten innerhalb dieser Projektlaufzeit nicht geklärt werden.

Unter Verwendung von Neben-bzw. Abfallprodukten konnte keine bessere Itaconsäureproduktion erreicht werden als mit Glucose und Saccharose. Xylose und Glycerin sind als Kohlenstoffquelle nutzbar. Der Pilz reagiert stark auf Verunreinigungen und Verschiebungen bestimmter Nährstoffverhältnisse, daher ist eine Analyse der Neben-bzw. Abfallprodukte, z.B. von Rohglycerinen, mit eventuell anschließender Aufreinigung notwendig um geringe Ausbeuten zu vermeiden.
Die ersten Produkt-Extraktionsexperimente liefern vielversprechende Ergebnisse. Über verschiedene Versuchsansätze wurde das kombinierte Extraktionsmittelsystem (1-Butanol und 1-Octanol als Lösungsmittel und der Reaktivkomponente Trioctylamin) durch Variation der Verhältnisse zueinander optimiert. Weiterhin wurde die Extraktionsdauer, die Temperatur, die Reextraktion sowie der Einsatz realer Kulturbrühen mit und ohne Pilzmyzel untersucht.
Bei einer online Extraktion sammeln sich Spuren des Extraktionsmittels in der Kulturbrühe an, daher wurde untersucht in wie fern der Pilz auf verschiedene Konzentrationen der Lösungsmittel reagiert. Eine online-Extraktion mit Butanol scheidet aufgrund der hohen Wasserlöslichkeit und der Unverträglichkeit im Bezug auf die Itaconsäureproduktion der gelösten Butanolmengen in der wässrigen Phase aus. Unter Verwendung von Octanol wird die Rückführung extrahierten Mediums in den Reaktor begrenzt durch die Menge eingetragenen Octanols. Erreicht die Octanolkonzentration in der Fermentationsbrühe 0,1 g/l wird die Itaconsäure Produktion eingestellt. Die Wasserlöslichkeit von Octanol beträgt bei 20 °C 0,3 g/l. Daher ist Octanol für eine online-Produktabtrennung nicht geeignet.
Ausgehend von diesen ersten Untersuchungen muss nach neuen geeigneten Lösungsmitteln zur IA Extraktion gesucht werden, die eine geringe Wasserlöslichkeit zeigen und nicht toxisch auf die Zelle wirken.

Literaturverzeichniss

Batti M.u.S.L.B. Process for the Production of Itaconic Acid. [3 078 217]. 1963. United States.

Brown N.M., Kennedy M.C., Antholine W.E., Eisenstein R.S., & Walden W.E. (2002) Detection of a [3Fe-4S] cluster intermediate of cytosolic aconitase in yeast expressing iron regulatory protein 1 - Insights into the mechanism of Fe-S cluster cycling. *Journal of Biological Chemistry* **277,** 7246-7254.

Bruchmann E.E. Über Aconitat- Hydratase ihre chromatographische Reinigung und einige Hemmstoffe des Enzyms. 1963. Habilitationsschrift, Technische Biochemie, Technische Universität Berlin.

Dwiarti L., Yamane K., Yamatani H., Kahar P., & Okabe M. (2002) Purification and characterization of cis-aconitic acid decarboxylase from Aspergillus terreus TN484-M1. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **94,** 29-33.

Eimhjellen K.E. & Larsen H. (1955) Mechanism of Itaconic Acid Formation by Aspergillus-Terreus .2. Effect of Substrates and Inhibitors. *Biochemical Journal* **60,** 139-147.

FNR (2003) Nachwachsende Rohstoffe für die Chemie 8. Symposium 2003. In *Schriftenreihe "Nachwachsende Rohstoffe"* (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., ed) Landwirtschaftsverlag GmbH, Gülzow.

Glusker J.P. (1971) Aconitase. In *The Enzymes* (Academic Press, ed), 5, 3. Auflage edn. in Boyer, P.D., New York, pp 413-439.

Gyamerah M. (1995a) Factors affecting the growth form of Aspergillus terreus NRRL 1960 in relation to itaconic acid fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **44,** 356-361.

Gyamerah M.H. (1995b) Oxygen requirement and energy relations of itaconic acid fermentation by Aspergillus terreus NRRL 1960. *Applied Microbiology and Biotechnology* **44,** 20-26.

Hirth J. Verfahrensentwicklung zur Synthese von 5- Hydroxymethylfurfural und Kohlenhydratcarbonsäuren auf Basis nachwachsener Rohstoffe. 2003. Fachbereich Chemie; Universität Darmstadt.

Hirth J., Bicker M., & Vogel H. (2002) Isolation of carbohydrate carboxylic acids from aqueous solution by reactive extraction. *Chemie Ingenieur Technik* **74,** 345-350.

Jaklitsch W.M., Kubicek C.P., & Scrutton M.C. (1991) The Subcellular Organization of Itaconate Biosynthesis in Aspergillus-Terreus. *Journal of General Microbiology* **137,** 533-539.

Jung M., Schierbaum B., & Vogel H. (2000) Extraction of carboxylic acids from aqueous solutions with the extractant system alcohol/tri-n-alkylamines. *Chemical Engineering & Technology* **23,** 70-74.

K.Welter. Biotechnische Produktion von Itaconsäure aus nachwachsenden Rohstoffen mit immobilisierten Zellen. 2000. Naturwissenschaftliche Fakultät der Technischen Universität Braunschweig.

Karlson P., Doenecke D., & Koolman J. (1994) *Biochemie*, 14 edn. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.

Kautola H., Vassilev N., & Linko Y.Y. (1989) Itaconic Acid Production by Immobilized Aspergillus-Terreus on Sucrose Medium. *Biotechnology Letters* **11,** 313-318.

Kobayashi T, Nakamura I, & Nakagawa M (1972) Process design for itaconic acid fermentation. *Proc IV IFS: Ferm Technol today* 215-221.

Lockwood L.B. & Nelson G.E.N. (1946) Some Factors Affecting the Production of Itaconic Acid by Aspergillus-Terreus in Agitated Cultures. *Archives of Biochemistry* **10,** 365-374.

Lockwood L.B. & Reeves M.D. (1945) Some Factors Affecting the Production of Itaconic Acid by Aspergillus Terreus. *Archives of Biochemistry* **6,** 455-469.

Okabe M., Ohta N., & Park Y.S. (1993) Itaconic Acid Production in An Airlift Bioreactor Using A Modified Draft Tube. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **76,** 117-122.

Park Y.S., Itida M., Ohta N., & Okabe M. (1994) Itaconic Acid Production Using An Airlift Bioreactor in Repeated Batch Culture of Aspergillus-Terreus. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **77,** 329-331.

Poole L.J. & King C.J. (1991) Regeneration of Carboxylic-Acid Amine Extracts by Back-Extraction with An Aqueous-Solution of A Volatile Amine. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **30,** 923-929.

Puttemans M., Dryon L., & Massart D.L. (1984) Extraction of Organic-Acids by Ion-Pair Formation with Tri-N-Octylamine .2. Back-Extraction. *Analytica Chimica Acta* **161,** 381-386.

Regev-Rudzki N., Karniely S., Ben Haim N.N., & Pines O. (2005) Yeast aconitase in two locations and two metabolic pathways: Seeing small amounts is believing. *Molecular Biology of the Cell* **16,** 4163-4171.

Schlegel H.G. (1985) Die Pilze (Fungi=Mycota). In *Allgemeine Mikrobiologie* Georg Thieme Verlag, pp 162-167.

Schomburg D. & Schomburg I. (2002) *Springer handbook of enzymes*, 2 edn. Springer, Berlin.

Tamada J.A. & King C.J. (1990) Extraction of Carboxylic-Acids with Amine Extractants .2. Chemical Interactions and Interpretation of Data. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **29,** 1327-1333.

Vorlop K.D. Entwicklung von Bindemitteln aus nachwachsenden Rohstoffen für Klebstoffe und Dichtmittel im Bau- und Wohnbereich. 2003. Förderkennzeichen: 99NR039