Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema:

Biotechnisch erzeugte Itaconsäure als Rohstoff der chemischen Industrie

Zuwendungsempfänger:

Johann Heinrich von Thünen-Institut Bundesforschungsinstitut für Ländliche Räume, Wald und Fischerei - Institut für Agrartechnologie

Förderkennzeichen:

08NR209 bzw. 22020908

Laufzeit:

01.08.2010 bis 31.08.2013

Datum der Veröffentlichung:

Gefördert durch:

Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) als Projektträger des BMELV für das Förderprogramm Nachwachsende Rohstoffe unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Inhaltsverzeichnis

1 Ziele 1
1.1 Aufgabenstellung 1
1.2 Voraussetzungen unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde 1
1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens 2
1.4 Wissenschaftliche-technische Ausgangssituation 3
1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen 5
2 Wissenschaftlich-technische Ergebnisse 6
2.1 Erzielte Ergebnisse 6
AP 1: Bereitstellung, Aufreinigung und Charakterisierung der Rohstoffe 6
AP 2: Stammentwicklung und Fermentation - Entwicklung eines biotechnologischen Prozesses zur Herstellung von Itaconsäure 9
AP 2.1: Stammscreening - Mutation vorhandener und Screening nach neuen IA-Produzenten, Isolierung von Stämmen mit hoher Itaconsäureproduktivität/-toleranz (Mutation/Screening/Adaptation) 9
AP 2.2: Untersuchung der Rohstoffeignung 13
AP 2.3: Untersuchung der Sporulation 14
AP 2.4: Inokulumsherstellung inkl. Maßstabsvergrößerung 17
AP 2.5: Entwicklung und Optimierung des biotechnologischen Prozesses zur Herstellung von Itaconsäure 19
AP 2.6: Extraktivfermentation 37
AP 3: Aufarbeitung der Itaconsäure 37
AP 3.1: Begleitende Analytik, Charakterisierung der Fermentationsbrühe 37
AP 3.2: Abtrennung und Aufreinigung der Itaconsäure aus der Fermentationsbrühe 38
AP 3.3: Strategieentwicklung der Aufarbeitungswege 38
Meilensteine 41
2.2 Verwertbarkeit der Ergebnisse 41
2.3 Relevante Ergebnisse Dritter 42
2.4 Erfolgte/geplante Veröffentlichungen 43
2.5 Literaturverzeichnis 44

1 Ziele

1.1 Aufgabenstellung

Itaconsäure zählt laut US-Department of Energy (DOE) zu den 12 wichtigsten biobasierten Baustein-Chemikalien weltweit. Durch Vorarbeiten am Thünen-Institut für Agrartechnologie (ehem. FAL) liegen vielversprechende Erkenntnisse bezüglich der biotechnischen Itaconsäure Herstellung mit dem filamentös wachsenden Pilz *Aspergillus terreus* vor. Derzeit liegen die berechneten Produktionskosten für einen wirtschaftlichen Prozess allerdings noch zu hoch.
Das Hauptziel des vorliegenden Projektes ist eine deutliche Kostensenkung der biotechnischen Itaconsäure-Produktion durch:

- Einsatz preiswerterer Rohstoffe
- Einsatz intelligenter innovativer Strategien zur Mutation vorhandener Stämme
- Isolierung von Stämmen mit hoher Produktivität und Produkttoleranz, ebenfalls durch Mutation, Selektion und Adaptation
- Gleichzeitig: Screening nach neuen, nicht mit *Aspergillus* verwandten leistungsfähigeren Mikroorganismen
- Optimierung der Fermentationsstrategie
- Online-Analytik und Prozesssteuerung
- Produktaufarbeitung durch Kältekristallisation und/oder Extraktion

Die industriellen Rohstoffe sind beispielsweise auf ihre Eignung als Substrat hin zu untersuchen und die relativ geringen Produktkonzentrationen von zurzeit 90 g/L Itaconsäure sind zu erhöhen.

1.2 Voraussetzungen unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Eine Medienoptimierung der Spurenelemente und mineralischen Bestandteile, sowie eine kontinuierliche Prozessführung mit suspendierter Mycelmasse wurden in dem Projekt von 1995-1998 [P1] am Thünen-Institut für Agrartechnologie durchgeführt. Die mikrobiologischen Arbeiten konzentrierten sich auf den Stamm *Aspergillus terreus* NRRL 1963. Die maximale Itaconsäure-Produktion in Schüttelkolbenexperimenten betrug nach 7 Tagen Kultivierung 46,1 g/L Itaconsäure. Die Produktivität betrug lediglich 0,4 g/L/h bei einer Ausbeute von 80 % (mol/mol).
In dem anschließendem Projekt von 2000-2003 [P2] wurde als Alternative zu Schüttelkolbenansätzen ein geeignetes Vierfach-Fermentersystem aufgebaut, so dass parallele Fermentationen unter vergleichbaren Bedingungen, inkl. online-Analytik und damit einer zeitnahen Prozesskontrolle, durchgeführt werden können. Die im Rahmen des Projektes durchgeführten Arbeiten haben mit dem aus Bodenproben isolierten Stamm *Aspergillus terreus* LU02b einen neuen Produktionsstamm bereitgestellt, mit dem bei der Fermentation nach 25

Tagen eine Produktkonzentration von 78 g/L erreicht wurde, mit einer Ausbeute von 55 % (mol/mol). Es war allerdings zu beobachten, dass die Fermentation mit relativ langsamen Reaktionsgeschwindigkeiten und geringen Ausbeuten verlief.
Während des letzten Projektes von 2004-2007 [P3] konnte durch verbesserte Handhabung und Medienoptimierung Kultivierungsbedingungen geschaffen werden, unter denen die Itaconsäure-Herstellung mit erreichten Konzentrationen von bis zu 90 g/L reproduzierbar durchgeführt werden konnte. Diese Reproduzierbarkeit konnte in den zwei bisherigen Projekten nicht erreicht werden. Sie ist aber essenziell für eine weitere Optimierung, da nur so der Einfluss bestimmter physikalischer oder chemischer Parameter zweifelsfrei zugeordnet werden kann. Ausgehend von einer Prozessoptimierung mit dem Pilz *Aspergillus terreus* LU02b im 1-L-Maßstab fand zusätzlich eine erfolgreiche Maßstabsvergrößerung auf 10 L statt.
Nur durch diese konsequente Weiterentwicklung ist es im Thünen-Institut gelungen, reproduzierbare Kultivierungsverläufe mit einer Endkonzentration von 90 g/L Itaconsäure nach 7 Tagen zu erreichen und dies bei einer Ausbeute von 86 % und maximalen Produktivitäten von bis zu 1,2 g/L/h (Kuenz, et al. 2012).
Allerdings sank nach 4 Tagen Kultivierung und einer bis dahin erreichten Konzentration von ca. 60 g/L Itaconsäure aus bisher ungeklärten Gründen die Produktivität.
In diesem vorliegenden Projekt sollen durch innovative Mutationsansätze und Screeningstrategien leistungsfähigere, hochprodukttolerante Mikroorganismen gefunden werden. Diese Ansätze bergen erfahrungsgemäß ein hohes Risiko aber auch große Chancen, neue leistungsfähigere Produzenten zu finden. Durch die Isolierung von Stämmen mit hoher Produktivität und Produkttoleranz (durch Mutation/Adaptation) soll die derzeitige Endkonzentration von 90 g/L Itaconsäure deutlich erhöht werden.
Bei Vorliegen einer Produkthemmung und/oder sich während der Fermentation anreichernder Hemmstoffe ist der Einsatz eines in-situ Produkt-Trennverfahrens sinnvoll, dessen Strategie und Anwendbarkeit bei der fermentativen Itaconsäure-Herstellung getestet werden muss.

1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Der geplante zeitliche Projektablauf mit den vorgesehenen Meilensteinen ist aus dem Balkendiagramm (Tabelle 1) ersichtlich. Analog zu dieser Übersicht wurden die Arbeitspakete entsprechend bearbeitet. Schwerpunktmäßig wurden während des Vorhabens Arbeiten zur Rohstoffeignung, zur Entwicklung eines geeigneten Systems zur Mutation, zur Entwicklung einer neuen Strategie zur Inokulumherstellung und vor allem Arbeiten im Bereich Mediums –und Prozessoptimierung sowie Fermentation durchgeführt.

Tabelle 1: Gesamtplan über die auszuführenden Arbeiten und deren zeitlicher Ablauf

Arbeiten	1. Jahr	2. Jahr	3. Jahr
Screening, Mutation		**M1**	
Prozessoptimierung		**M2**	
Stammoptimierung			
Mediumsoptimierung			
Fermentation			**M3**
Aufarbeitung			

Meilensteinplanung:

M1: Screening nach neuen Mikroorganismen ist abgeschlossen.

M2: Untersuchungen zur Sporulation sind abgeschlossen.

M3: Prozessoptimierung ist abgeschlossen

1.4 Wissenschaftliche-technische Ausgangssituation

Jährlich werden weltweit über 80.000 Tonnen Itaconsäure produziert zu einem Preis von derzeit rund 2 US$/kg. Auf Basis von Zucker beträgt die dabei erreichte Itaconsäurekonzentrationen ca. 80 g/L. Es gibt nach wie vor aber einen großen Bedarf an Innovationen im Bereich der Prozessführung und bei den Produktionsstämmen, um die Herstellungskosten von Itaconsäure weiter zu reduzieren. Der Markt für Itaconsäure ist groß und das Anwendungspotenzial vielfältig. (Okabe, et al. 2009).

Historisches
Die Arbeiten zur mikrobiellen Itaconsäuresynthese gehen bis ins Jahr 1932 zurück (Kinoshita 1932). In den 60er Jahren wurde am NRRL-Forschungsinstitut in Peoria (Illinois) sehr intensiv gearbeitet und der dort isolierte Pilzstamm *Aspergillus terreus* wird auch heute noch bei einem Großteil der in der Literatur beschriebenen Arbeiten eingesetzt (Röhr, et al. 1992, Willke, et al. 2001).

Stoffwechsel
Bei *Aspergillus terreus* erfolgt die Biosynthese der Itaconsäure auf zuckerhaltigen Substraten wahrscheinlich hauptsächlich - wenn nicht sogar ausschließlich - durch eine Decarboxylierung der cis-Aconitsäure (Winskill 1983, Bonnarme, et al. 1995). Das beteiligte Enzym, die cis-Aconitsäure-Decarboxylase, führt in einem Schritt die Bildung von Itaconsäure aus cis-Aconitsäure durch.

Fermentation
Neben den allgemein bekannten Nachteilen des Einsatzes filamentöser Pilze in Fermentationen (z.B. Anfälligkeit gegenüber hohen Scherkräften, Schwermetall-Salzen und Sauerstoffunterversorgung) scheitert die kostengünstige biotechnische Herstellung von Itaconsäure hauptsächlich an geringen Produktendkonzentrationen, niedrige Produktivitäten (0,7-1,0 g/L·h) und geringen Ausbeuten (0,4 – 0,6 g/g) (Willke and Vorlop 2001).
In Vorarbeiten des Thünen-Institutes konnte die Endkonzentration auf 90 g/L gesteigert und gleichzeitig die Fermentationszeit verkürzt werden. Die Produktivitäten der Citronensäure- und Itaconsäureherstellung sind in der ersten Fermentationsphase zwischen 50 und 90 Stunden

vergleichbar (Abbildung 1). Bei der Itaconsäure Herstellung sinkt allerdings die Produktivität nach etwa 90 Stunden, während bei der Citronensäure Herstellung Endkonzentrationen bis zu 200 g/L erreicht werden (Roehr and Kubicek 1996). Bei der Itaconsäure Herstellung konnte am Thünen-Institut - mit Sporen als Inokulum - der Prozess stabilisiert und reproduzierbar gemacht werden mit erreichten Endkonzentrationen von 90 g/L nach 7 Tagen Kultivierung.

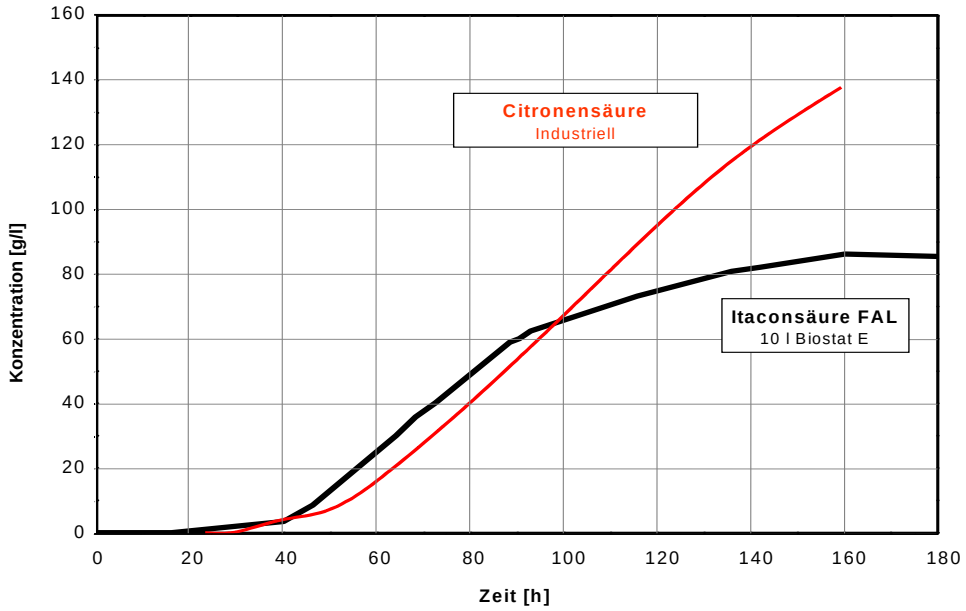

Abbildung 1: Vergleich der industriellen Citronensäure Herstellung (Roehr and Kubicek 1996) und der Itaconsäure-Herstellung im Labormaßstab, 10 L (Thünen-Institut, ehm. FAL)

Andere Mikroorganismen

Einen interessanten Ansatz auf der Suche nach alternativen Itaconsäureproduzenten bieten die Anfang der 80er Jahre von verschiedenen japanischen Arbeitsgruppen durchgeführten Untersuchungen zur Itaconsäureproduktion mit Hefen (Tabuchi, et al. 1981, Nakahara, et al. 1983). Mit Mutanten einer *Candida* Art wurden Konzentrationen von maximal 42 g/L Itaconsäure erreicht (Hashimoto 1989). In einem Screening Projekt wurde ein *Pseudozyma antarctica* Stamm isoliert, der aus Glucose 30 g/L Itaconsäure produzierte (Levinson, et al. 2006). Das UFZ (jetzt: Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung) und die TU Dresden erreichten mit *Pseudozyma tsukubaensis* 74,7 g/L Itaconsäure (Specht, et al. 2009).

Aufarbeitung

Die Itaconsäure Aufarbeitung kann mit verschiedenen Strategien durchgeführt werden: Neben der Kristallisation kommen Ultrafiltration bzw. Umkehrosmoseverfahren und zunehmend auch Elektrodialyse zur Anwendung. In jüngster Zeit ist die Flüssig-Flüssig-Extraktion zur Aufreinigung organischer Säuren in der Literatur beschrieben; detaillierte Veröffentlichungen speziell für die Aufreinigung der Itaconsäure existieren allerdings nicht.

Verwendung

Itaconsäure ist im Vergleich zu den meisten Monomeren ungiftig und weder augen- noch schleimhautreizend. Sie ist eine weiße, kristalline, einfach ungesättigte Dicarbonsäure und besitzt zwei Carboxylgruppen, eine konjugierte Doppelbindung sowie eine, durch eine Carboxylgruppe aktivierte Ethyl-Methylengruppe. Die Vielfalt der funktionellen Gruppierungen im Itaconsäuremolekül machen sie zu einem interessanten Zwischenprodukt bei der Herstellung

von komplexen organischen Verbindungen (Pfizer 1972, Rüdiger 2000, Willke and Vorlop 2001). Die industriell vielseitige Einsetzbarkeit von Itaconsäure und deren Reaktionsverbindungen spiegelt sich im breiten Anwendungsspektrum wieder:

- Ungesättigte Polyester (Gießharze, Beschichtungen z. B. für Metalle), Faserverbundwerkstoffe (Glas- bzw. Kohlefaser), Composite (z. B. mit Glas, Sand, Kies etc.)
- Co-Monomer zur Verbesserung der Eigenschaften von Kunststoffen (Elastomere) und hitzestabilen Harzen („thermosetting“)
- Co-Polymerisate zur Steigerung der Haftungseigenschaften von Tinte
- Latexlackfarben, Bodenbeschichtungen, Auslegware
- Detergenzien und Hilfsstoffe

Patentsituation

Es existieren bisher keine eigenen Patente oder Patenanmeldungen, die den vorgesehenen Projektinhalt betreffen. Die grundlegenden Patentanmeldungen Dritter zur Itaconsäurebildung sind entweder bereits abgelaufen (Kane et al. 1945) bzw. decken jeweils sehr spezielle Teilbereiche wie z.B. den Zusatz von Glycerin zum Kulturmedium (Jarry 1997) oder ausgewählte Kultivierungsbedingungen wie Festphasenfermentation ab (Tsui, et al. 2001). Eine Beeinflussung der Projektergebnisse ist daher nicht zu erwarten. Ein aktuelles Patent zur Itaconsäureproduktion unter oszillierenden Sauerstoff-Regime betrifft lediglich die Verwendung von Hefen (Specht, et al. 2009).

1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Entfällt.

2 Wissenschaftlich-technische Ergebnisse

Das Gesamtprojekt ist in 3 Arbeitspakete (AP) unterteilt, in denen wiederum verschiedene Aufgaben bearbeitet werden, die im Folgenden aufgelistet sind.

2.1 Erzielte Ergebnisse

AP 1: Bereitstellung, Aufreinigung und Charakterisierung der Rohstoffe

Durch die Verwendung preiswerter Substrate könnten die Kosten für die Itaconsäureproduktion deutlich gesenkt werden. Es ist bekannt, dass *A. terreus* eine Vielzahl an Zuckern verwerten kann (Eimhjellen und Larsen 1955). Als alternative Rohstoffquelle wurden Rübenschnitzel ausgewählt. Die Zusammensetzung der verschiedenen Zucker in den Rübenschnitzeln ist in Tabelle 2 angegeben. Um die Verwendbarkeit dieses Zuckergemisches zu überprüfen, wurde die Zusammensetzung mit Reinzuckern und den Salzen des Standardmediums nachgestellt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Zucker in Rübenschnitzeln [P4]

	Konzentration [g/L]
Glucose	32,7
Xylose	2,3
Arabinose	26,1
Galactose	6,5
D-Mannose	2,3
Rhamnose	1,7
D-Galacturonsäure	28,5

Bei der Kultivierung im Schüttelkolben zeigte sich, dass Glucose von den verwendeten Substraten als erstes verbraucht wurde (Abbildung 2). Nach 5,7 Tagen Kultivierung war keine Glucose mehr nachweisbar und andere Substrate wurden bereits abgebaut. Galacturonsäure, Arabinose, Galactose/Mannose/Xylose wurden dabei parallel verstoffwechselt. Rhamnose, das nur in sehr kleinen Mengen im Medium vorhanden war, wurde erst verbraucht nachdem die übrigen Zucker limitiert waren. Die maximale Itaconsäurekonzentration betrug 31 g/L. Die theoretische Ausbeute beträgt 0,72 $g_{IA}/g_{Glucose}$. Die Ausbeute der Substratmischung (Abbildung 2) betrug 0,31 $g_{IA}/g_{Gesamtzucker}$.

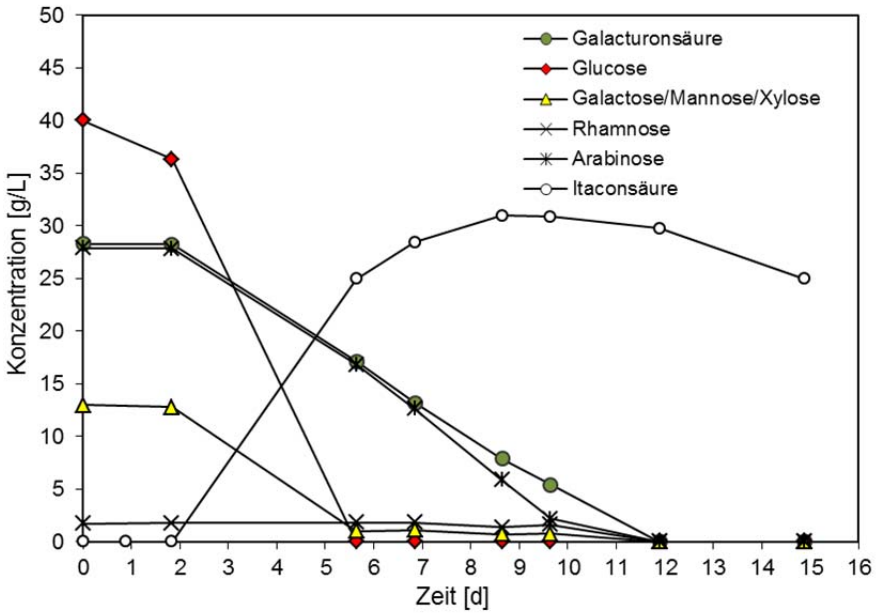

Abbildung 2: Substrat- und Produktverläufe bei der Itaconsäureproduktion mit *A. terreus*. Die Substratmischung entspricht der Zusammensetzung der Zucker in der Zuckerrübe. 250 mL Schüttelkolben, 120 rpm, 33 °C, Start pH 3,1.

Die Färbung der Fermentationsbrühe war rotbraun und wich damit deutlich von der hellgelben Farbe der Standardkultivierung ab. Das Mycel bildete zwar wie bei der Standardkultivierung Pellets aus, die aber lange Hyphen bildeten, so dass ein Mycelgeflecht entstand.

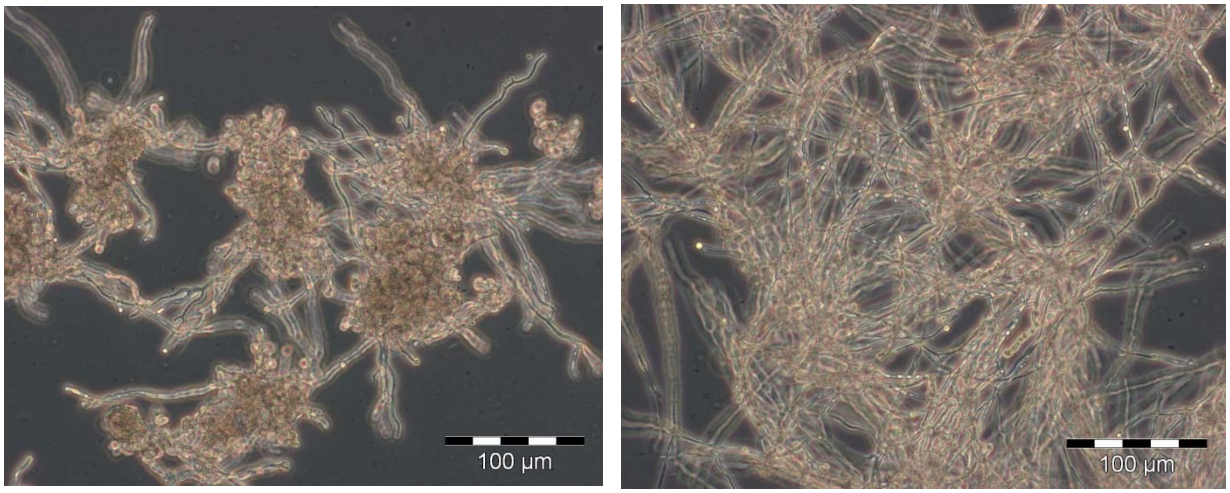

Abbildung 3: Morphologie von *A. terreus* bei der Standardkultivierung (links) und bei der Kultivierung mit dem Substatgemisch, dass der Zuckerzusammensetzung in der Zuckerrübe entspricht (rechts). 250 mL Schüttelkolben, 7 Tage Kultivierung, 120 rpm, 33 °C, Start pH 3,1.

Da *A. terreus* in der Lage ist die einzelnen Zuckerbestandteile einer Zuckerrübe zu verwerten, wurde daraufhin Zuckerrübenschnitzel als Substrat verwendet. Die Rübenschnitzel wurden mit einer Schlagmühle zu einer Partikelgröße kleiner 0,7 mm gemahlen und eine Suspension mit Reinstwasser mit einer Konzentration von 100 g/L hergestellt. In 250 mL Schüttelkolben wurden 90 mL Suspension und die Salzmischung des Standardmediums gegeben. Der pH-Wert wurde mit 0,5 M H_2SO_4 auf ca. 4 eingestellt und anschließend autoklaviert.

Der pH-Wert der Kultivierung war nach 5 Tagen von pH 4,1 auf pH 3,7 gefallen. Der Pilz wuchs gut auf mit Rübenschnitzeln als Substrat und bildete sich eine dichtes Mycel (Abbildung 4). Es wurde jedoch wurde keine Itaconsäure gebildet.

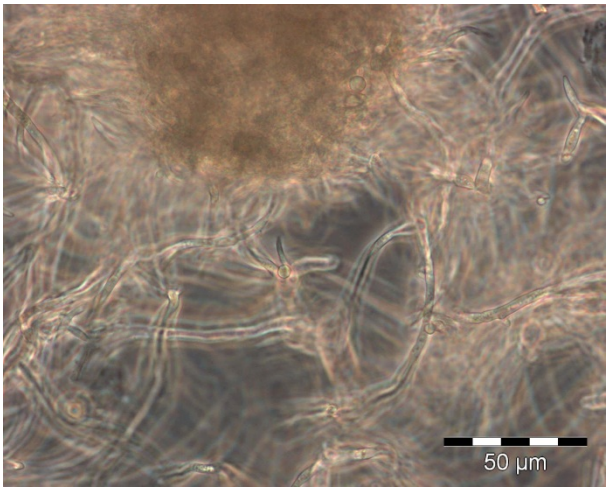

Abbildung 4: Morphologie von *A. terreus* nach 5 Tagen Kultivierung mit Zuckerrübenschnitzeln als Substrat. 250 mL Schüttelkolben, 120 rpm, 33 °C, Start pH 3,1.

Als weiterer alternativer Rohstoff zur Itaconsäurebildung wurde Stärke untersucht. Als Substrat wurde Stärke sowie auch Gemische von Stärke und Glucose verwendet. Die Gesamtkonzentration des Substrates betrug jeweils 100 g/L. *A. terreus* konnte mit Stärke als Substrat wachsen, bildete allerdings keine Itaconsäure (Abbildung 5). Mit einem Anteil an Glucose im Substrat wurde Itaconsäure gebildet. Hierbei stieg die gebildete Produktmenge mit steigendem Glucoseanteil an. Für die Itaconsäurebildung wurde daher wahrscheinlich nur Glucose verwendet.

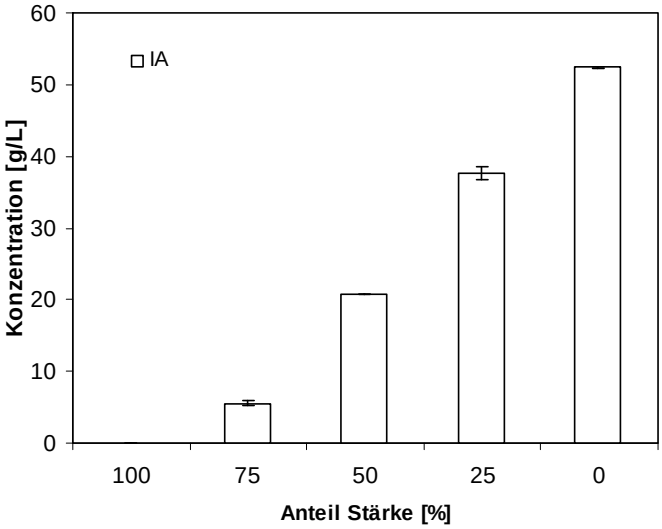

Abbildung 5: Itaconsäureproduktion mit *A. terreus* mit unterschiedlichen Anteilen von Stärke und Glucose als Substrat. 96-Well Mikrotiterplatte, 950 rpm, 7 Tage Kultivierung, 33 °C, Start pH 3,1.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass *A. terreus* in der Lage ist verschiedene Einfachzucker für Wachstum als auch für die Produktbildung zu verwerten. Weiterhin besitzt der Pilz besitzt die Enzymsysteme um Rohsubstrate wir Rübenschnitzel oder Stärke für das Wachstum nutzen zu

können. Die gleichzeitige Hydrolyse der Komplexen Bestandteile und Itaconsäurebildung konnte allerdings nicht beobachtet werden. Eine Hydrolyse dieser Bestandteile vor der Kultivierung ist daher erforderlich. Bei der Verwendung von Hydrolysaten für die Kultivierung mit *A. terreus* wären aufgrund der Nebenprodukte und vorhandenen Spurenelementen Aufreinigungsschritte notwendig.

AP 2: Stammentwicklung und Fermentation - Entwicklung eines biotechnologischen Prozesses zur Herstellung von Itaconsäure

AP 2.1: Stammscreening - Mutation vorhandener und Screening nach neuen IA-Produzenten, Isolierung von Stämmen mit hoher Itaconsäureproduktivität/-toleranz (Mutation/Screening/Adaptation)

Kultivierung in Mikrotiterplatten

Für eine Verbesserung des Produktionsstammes, *Aspergillus terreus* DSM 23081, durch Mutation wird ein geeignetes Screeningverfahren benötigt. Ein Screening in den etablierten Systemen der 1,5 L Fermentern und 250 mL Schüttelkolben ist aufgrund des benötigten hohen Durchsatzes nicht praktikabel. Daher wird eine Verkleinerung des Prozesses in Mikrotiterplatten angestrebt.
Als Kultivierungsgefäß wurden 96-Well-Platten ausgewählt. Es wurde im Thermo Shaker PST 60HL-4 mit je 0,1 mL/Well bei 33 °C inkubiert. Die Platte wurde mit einem Deckel und zusätzlich Parafilm verschlossen, da bei anderen Abdeckungsarten (wie z.B. Acetatfolie 50 % Verdunstung nach 4 Tagen) die Verdunstung zu hoch war. Aufgrund der Verdunstung wurden die 2 äußeren Reihen der Mikrotiterplatte während der Versuche mit Wasser befüllt. Die Verdunstung in den inneren Wells betrug nach 7 Tagen Kultivierung bei 33 °C nicht mehr als 2 % des Füllvolumens von 100 µL.
Für die Bestimmung der Schüttelfrequenz wurde zunächst die Mischzeit in den Wells bestimmt. Ab einer Frequenz von 1050 rpm trat eine instantane Durchmischung auf (Abbildung 6 A). Die Schüttelfrequenz hatte auch einen großen Einfluss auf die Morphologie der Pellets (Abbildung 6 B). Mit zunehmender Schüttelfrequenz verkürzten sich die aus dem Pellet wachsenden Hyphen von langen Fäden (850 rpm) zu kaum vorhandenen Ansätzen (1050 rpm). Bei 950 rpm entsprach die Morphologie der Pellets der Morphologie, die im Schüttelkolben ausgebildet wurde.

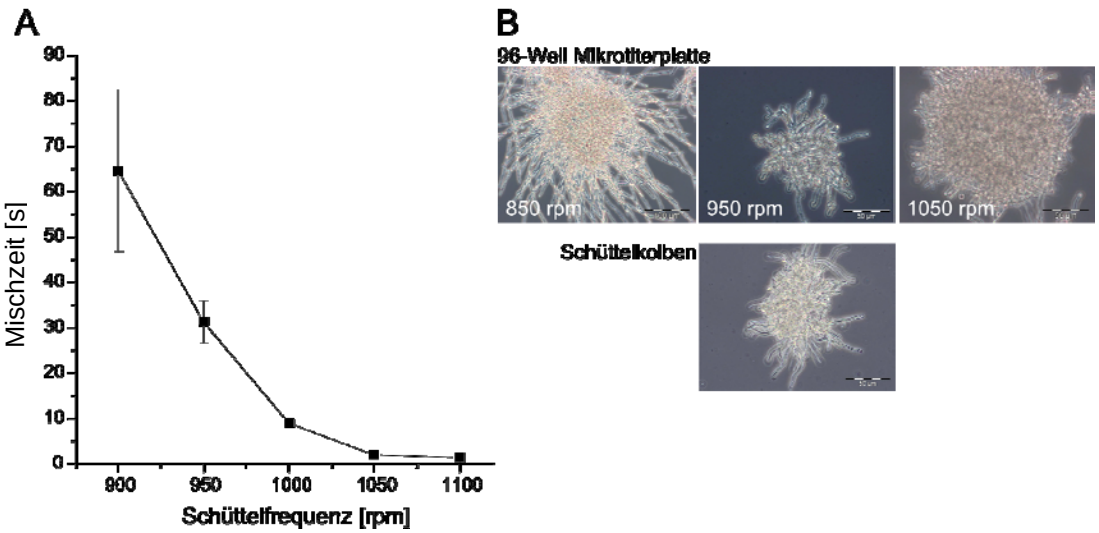

Abbildung 6: Bestimmung der Mischzeiten, durch die Neutralisierungsmethode mit Natronlauge, in runden 96-Well Mikrotiterplatten mit 100 µL Füllvolumen in Abhängigkeit von der Schüttelfrequenz (A). Einfluss der Schüttelfrequenz auf die Morphologie der Pellets von *A. terreus* bei einer Kultivierung in Mikrotiterplatten im Vergleich zum Schüttelkolben (B).

Die Füllhöhe hatte einen starken Einfluss auf die Itaconsäurebildung (Abbildung 7). Die höchste Itaconsäurekonzentration ergab sich bei 100 µL Füllvolumen pro Well. Bei größeren Volumina trat wahrscheinlich eine Sauerstofflimitierung auf.

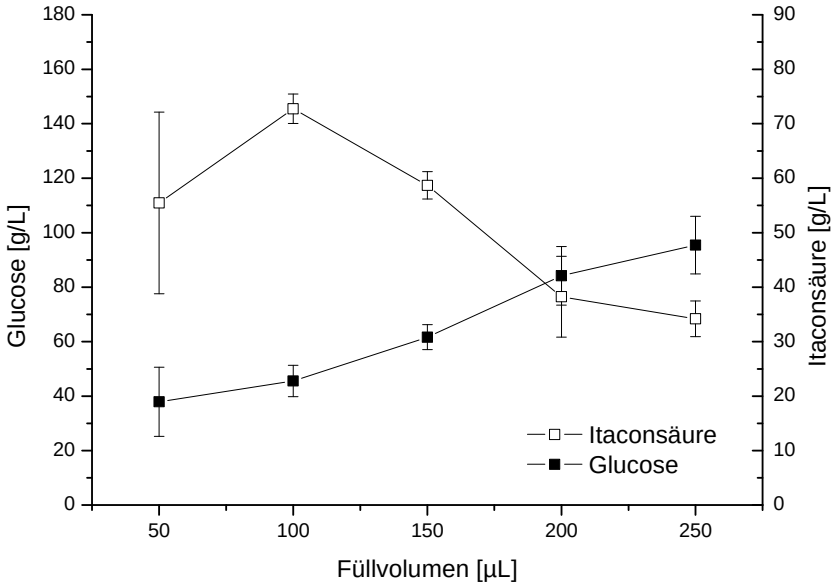

Abbildung 7: Einfluss des Füllvolumens auf die Itaconsäureproduktion nach 7 Tagen Kultivierung von *A. terreus*. 96-Well Mikrotiterplatte, 33 °C, Start pH 3,1.

Um einen Einfluss von der Lage des Wells auf der Mikrotiterplatte durch z.B. unterschiedlichen Sauerstoffeintrag auszuschließen, wurden alle Wells einer Platte parallel kultiviert. Nach 7 Tagen Kultivierung ergaben sich zwischen den einzelnen Wells nur sehr geringe Abweichungen (Abbildung 8). Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Kultivierung in Mikrotiterplatten. Aufgrund der Empfindlichkeit der Itaconsäureproduktion gegenüber Sauerstofflimitierungen (Larsen and Eimhjellen 1955, Gyamerah 1995, Kuenz 2008) sind keine Unterbrechungen in der Kultivierung möglich, wodurch nur ein Probenahmezeitpunkt pro Mikrotiterplatte möglich ist,

so dass bei einer zeitlichen Verschiebung zwischen den einzelnen Wells ein einmaliger Probenahmezeitpunkt nicht möglich wäre. Aufgrund der geringen Standardabweichung wurden die folgenden Versuche in Doppelbestimmung durchgeführt.

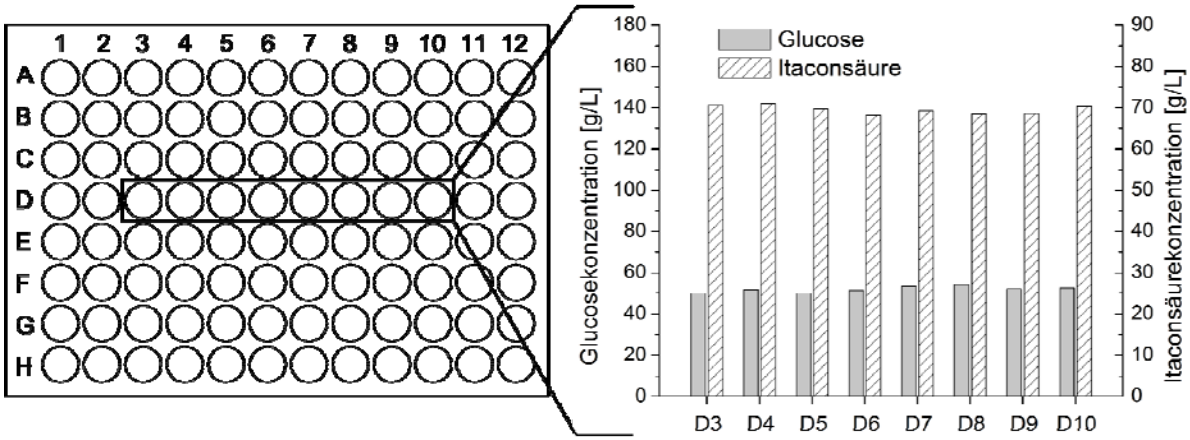

Abbildung 8: Einfluss der Lage des Wells auf der Mikrotiterplatte nach 7 Tagen Kultivierung von *A. terreus*. 33 °C, Start pH 3,1.

Der Verlauf der Itaconsäurebildung bei einer Kultivierung in den Mikrotiterplatten wurde bestimmt, indem für jeden Probenahmezeitpunkt eine einzelne parallele Platte verwendet wurde. Es zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung der Itaconsäureproduktion in den Mikrotiterplatten zu einer Kultivierung im Schüttelkolben (Abbildung 9). Nach 10 Tagen Kultivierung wurden in der Mikrotiterplatte 84,7 g/L Itaconsäure gebildet. Der Probenahmezeitpunkt für künftige Versuche wurde nach 7 Tagen Kultivierung gewählt. Hier ist zwar kein Anstieg in der maximalen Produktendkonzentration sichtbar, aber Steigerungen der maximalen Produktivität sowie eine späterer Abfall der Produktivität sind detektierbar.

Mit der Kultivierung in 96-Well Mikrotiterplatten konnte ein einfaches geschütteltes System mit geringen Standardabweichungen gefunden werden, das sehr gute Vergleichbarkeit zur Kultivierung in den Schüttelkolben hat. Die Kultivierung in Mikrotiterplatten ist für Bakterien weit verbreitet und etabliert. Für filamentöse Pilze ist dies nicht der Fall. Die Kultivierung in Mikrotiterplatten wurde hier für qualitative Aussagen, wie der Test von Antimykotika durchgeführt (Jahn, et al. 1995, Tawara, et al. 2000). Nur selten wurden sie für qualitative Aussagen, wie ein Screening genutzt, wobei die Ergebnisse hier in einer 2. Runde in Schüttelkolben validiert wurden (Futamura, et al. 2001).

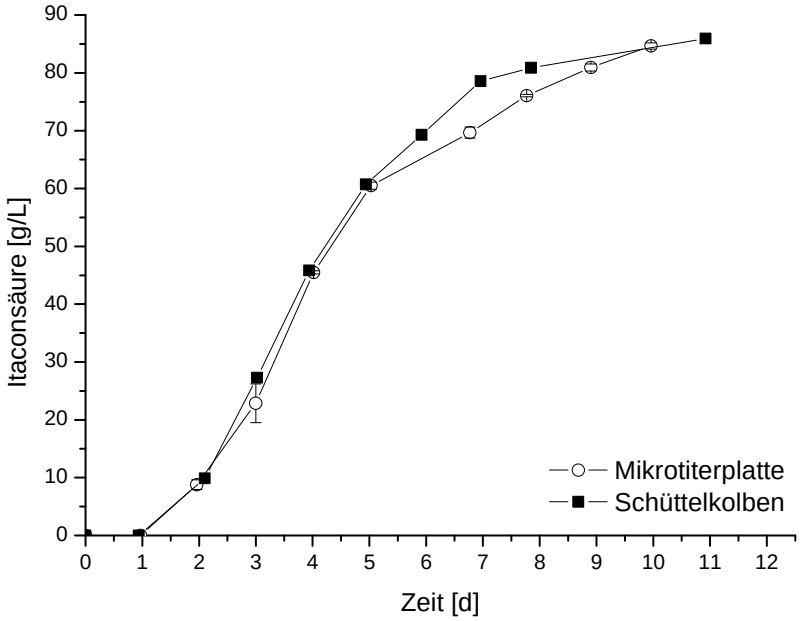

Abbildung 9: Vergleich der Itaconsäureproduktion von *A. terreus* bei der Kultivierung in Mikrotiterplatten und Schüttelkolben. 33 °C, Start pH 3,1.

Mutation

Um eine Mutation auszulösen, wurde die Bestrahlung mit UV-Licht gewählt. 20 mL einer Sporensuspension von *A. terreus* mit $1 \cdot 10^6$ Sporen/mL wurde in einer Petrischale unter der Sterilbank leicht geschwenkt. Durch die Bestrahlung mit einer UV-Lampe wurden die Überlebensraten zu den einzelnen Bestrahlungszeiten ermittelt (Abbildung 10).

Ein Screening von möglichen Mutanten auf Itaconsäureproduktion ist durch die folgende beschriebene Methode möglich:

- Die bestrahlten Sporen werden so verdünnt, dass nach dem Ausstreichen auf einer Agarplatte einzelne Kolonien entstehen.
- In Mikrotiterplatten wird je Well 100 µL Medium vorgelegt.
- Inokuliert wird dieses, indem mit einem sterilen Zahnstocher Sporen von den gebildeten Kolonien abgestreift werden und diese dann in das Medium überführt werden.

Obwohl mit dieser Methode keine definierten Sporenkonzentrationen eingestellt werden konnte, ergaben sich in Vorversuchen keine großen Unterschiede in der Itaconsäurekonzentration bei der Inokulation von verschiedenen Kolonien, auch wenn diese unterschiedlich groß waren (Abbildung 11). Ein Nachweis der gebildeten Itaconsäuremenge ist prinzipiell durch HPLC-Messungen möglich. Da diese allerdings sehr Zeitaufwendig und auch kostenintensiv sind, wurde eine Methode zur Bestimmung des Säuregehaltes angepasst. Hierfür wurde der Kulturüberstand mit Phenolphthalein versetzt und mit 2 M NaOH titriert, bis ein Farbumschlag zu erkennen war. Dies könnte auch durch ein Photometer mit automatischer Zugabefunktion automatisiert werden. Diese Methode beinhaltet zwar ein gewisses Fehlerpotential, da nicht nur Itaconsäure sondern auch andere organische Säuren, wie Citronensäure, Ketoglutarsäure und Äpfelsäure nachgewiesen werden können. Allerdings ist es für einen ersten Überblick ausreichend und potentielle Hochproduzierer könnten per HPLC-Analytik verifiziert werden.

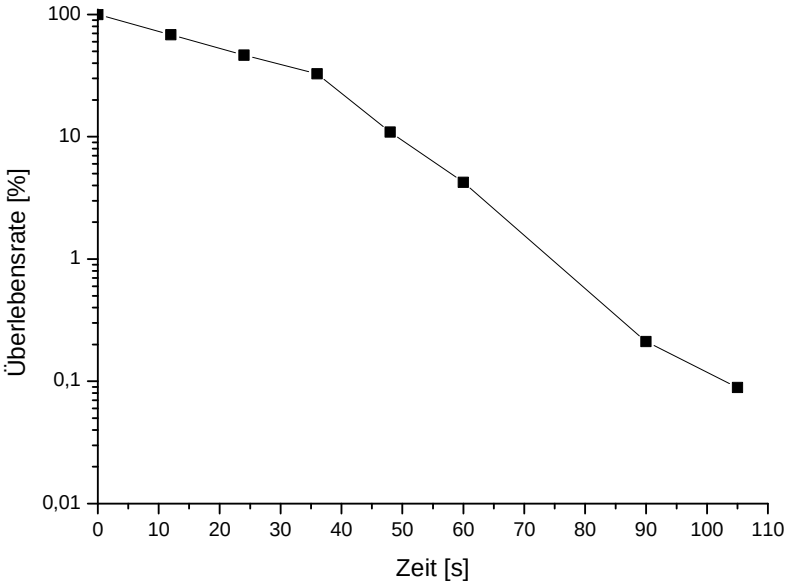

Abbildung 10: Überlebensraten in Abhängigkeit von der Dauer der UV-Bestrahlung einer $1 \cdot 10^6$ Sporen/mL Sporensuspension von *A. terreus*.

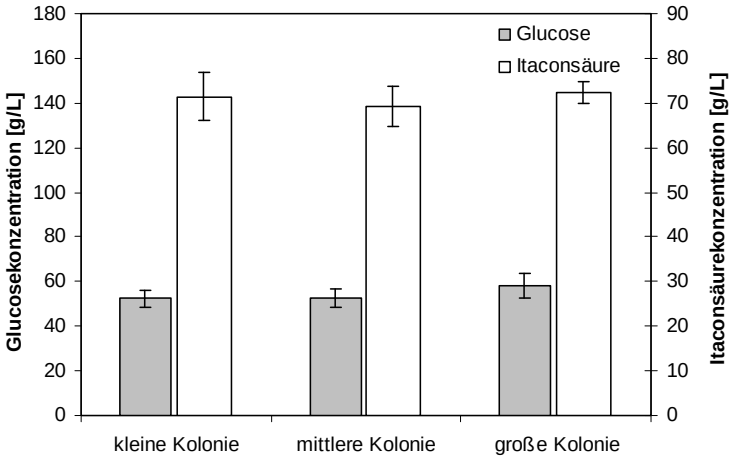

Abbildung 11: Einfluss der Koloniegröße auf die Produktionseigenschaften bei einer Inokulation von Mikrotiterplattenwells durch Abstreifen der Sporen von einzelnen Kolonien mit einem Zahnstocher. 96-Well Mikrotiterplatten, 7 Tage Kultivierung, 100 µL Füllvolumen, 950 rpm.

Bei den durchgeführten Mutationen konnte keine Mutanten gefunden werden, bei denen eine signifikante Erhöhung der Itaconsäurekonzentration auftrat.

AP 2.2: Untersuchung der Rohstoffeignung

Untersuchungen zur Rohstoffeignung wurden wie in AP 1 beschrieben durchgeführt.

AP 2.3: Untersuchung der Sporulation

Sporen aus Oberflächenkulturen

Für die Produktion von Sporen von *A. terreus* zur Stammhaltung oder als Inokulum wurde der Pilz als Oberflächenkultur gehalten. Als Nährmedium wird hierfür in der Literatur vorrangig Czapek-Dox-Agar und Kartoffel-Dextrose-Agar verwendet. Für die hier beschriebenen Arbeiten wurde Czapek-Dox-Agar verwendet, da es sich hierbei um ein definiertes Medium handelt und ein Eintrag von unbestimmten Substanzen über das Inolulum vermieden werden sollte.
A. terreus bildete nach 4 Tagen Inkubation auf dem Czapek-Dox-Agar (Merck) einen dichten hellgelben Pilzteppich mit Riefen (Abbildung 12 A) von dem eine Sporenkonzentration von $5 \cdot 10^7$ Sporen/mL gewonnen werden konnte. Allerdings war dies abhängig von der Charge der Czapek-Dox-Agars von Merck, so dass bei einer zweiten Charge das Wachstum verzögert auftrat und das Pilzmycel dunkler mit weniger Riefen war (Abbildung 12 B). Da der Czapek-Dox-Agar von Merck nicht mehr im Handel erhältlich war, wurden Produkte von anderen Herstellern bezogen. Bei Czapek-Dox-Agar von Fluka und Difco zeigte sich nur geringes bzw. kaum Wachstum (Abbildung 12 C, D). Um mögliche hemmende Stoffe bei den Produkten von Fluka und Difco auszuschließen, wurde der Czapek-Dox-Agar selbst zusammengestellt. Hier wurde nach der Inkubation kaum Mycelbildung festgestellt (Abbildung 12 E). Das verminderte Wachstum wurde demnach nicht durch Verunreinigungen verursacht.

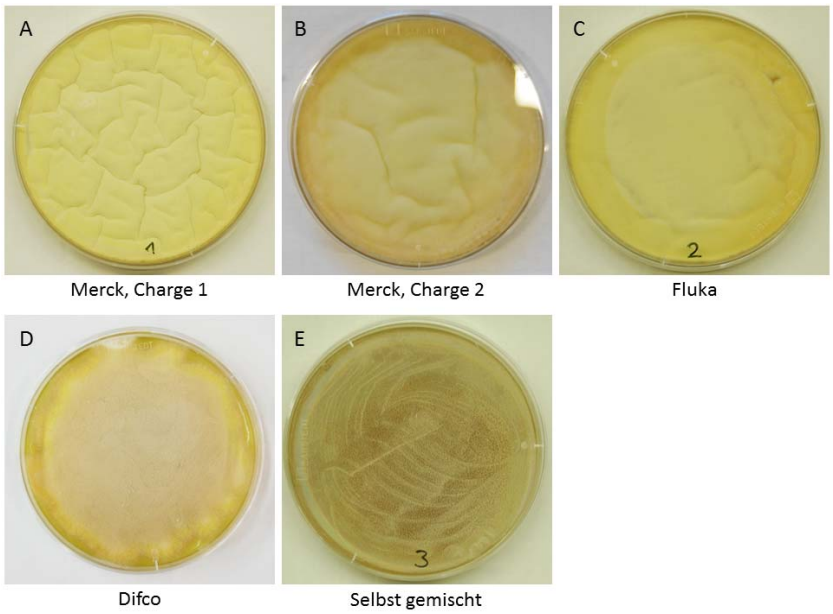

Abbildung 12: Wachstum von *A. terreus* auf Czapek-Dox-Agar verschiedener Hersteller und selbst zusammengestellt.

Um die Ursache für die unterschiedlichen Wachstumseigenschaften zu bestimmen, wurden die Spurenelementkonzentrationen in den verschiedenen Czapek-Dox-Agar bestimmt. In Tabelle 3 sind die Elemente aufgeführt, die sich nicht im der Zusammensetzung des Czapek-Dox-Agars befinden. In allen Produkten zeigte sich eine Vielzahl an zusätzlichen Elementen in dem definierten Medium. Der wachstumsfördernde Czapek-Dox-Agar von Merck beinhaltete, im Gegensatz zu den anderen Produkten, in beiden untersuchten Chargen geringe Mengen an

Kupfer und Zink. Da Zink, Kupfer und Calcium auch im Produktionsmedium vorhanden sind, wo gutes Wachstum auftritt, wurde der Einfluss dieser Elemente weiter untersucht.

Tabelle 3: Konzentrationen zusätzlicher Elemente im Czapek-Dox-Agar verschiedener Hersteller.

Element	Merck Charge 1 [mg/L]	Merck Charge 2 [mg/L]	Fluka [mg/L]	Difco [mg/L]
B	0,39	0,19	0,14	0,14
Ca	0,79	> 1	> 1	> 1
Cu	0,03	0,00	0,00	0,00
Mn	0,00	0,01	0,04	0,01
Se	0,04	0,06	0,05	0,06
Sr	0,00	0,03	0,19	0,09
Zn	0,05	0,004	0,00	0,00

Bei einer Zugabe von 0,5 mg/L $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$ in den selbst zusammengestellten Czapek-Dox-Agar zeigte sich Wachstum von *A. terreus*. Der Pilzrasen war allerdings dünn und es konnten nur eine Sporenlösung mit der Sporenkonzentration von $1{,}2 \cdot 10^7$ Sporen/mL geerntet werden. Durch die Zugabe von je 0,5 mg/L $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$, $CuSO_4 \cdot 7\ H_2O$ und $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ wuchs ein dichter Zellrasen mit wenigen Riefen. Hieraus ergab sich eine Sporenkonzentration von $2{,}9 \cdot 10^8$ Sporen/mL in der geernteten Sporenlösung.

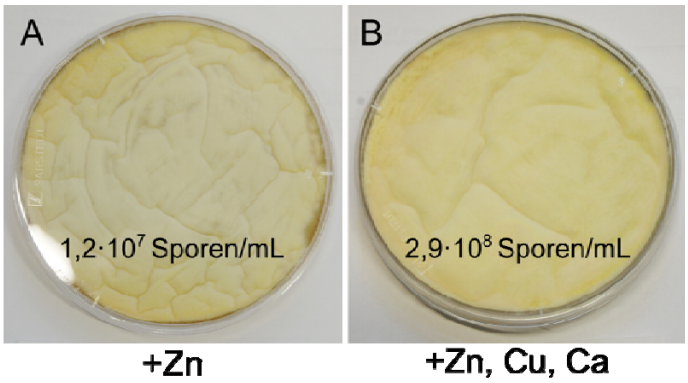

Abbildung 13: Wachstum und erreichte Sporenkonzentrationen auf Czapek-Dox-Agar mit Zusatz von Zink (A) und Zink, Kupfer und Calcium (B).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass reiner Czapek-Dox-Agar nicht für die Kultivierung von *A. terreus* geeignet ist. Es fehlen hier notwendige Spurenelemente wie Zink oder Kupfer. Durch den Zusatz dieser Elemente konnte eine zuverlässige Sporenproduktion gewährleistet werden, von der ca. die fünffache Sporenkonzentration wie vom Czapek-Dox-Agar von Merck gewonnen wurde.

Submerse Sporenbildung

Die Gewinnung von Sporen aus Oberflächenkulturen ist sehr aufwendig und benötigt insbesondere bei einer Maßstabsvergrößerung eine große Fläche. Daher sollten alternative Sporenherstellungsmethoden untersucht werden.

Eine charakteristische Eigenschaft für *A. terreus* ist die Bildung von Chlamydosporen. Dies sind asexuelle Sporen, die meist einzeln an der Seite oder Spitze von submersen Mycelium gebildet werden. Allerdings werden diese Sporen in einer Standardkultivierung nur in sehr geringen Konzentrationen gebildet.

Während einer Kultivierung zur Itaconsäurebildung wurde der pH-Wert mit 5 M NaOH schlagartig von pH 2 auf pH 4 bzw. pH 6 angehoben. Hierdurch wurden vermehrt Chlamydosporen gebildet, aber es kam auch zur Bildung von submersen Konidienträgern. Die submerse Bildung von Konidienträgern ist für andere Pilze bereits bekannt (Vézina, et al. 1965), wurde aber für *A. terreus* noch nicht in der Literatur beschrieben.

Die Sporenbildung trat sowohl nach einem pH-Shift im Schüttelkolben als auch im Bioreaktor auf. Nach dem pH-Shift bildete sich ein Konidiophor mit Vesikel (Abbildung 14). Auf der oberen Hälfte des Vesikels bildeten sich Phialiden, von denen sich runde transparente Konidien abschnürten. Durch die Scherung im Medium bildeten sich keine oder nur sehr kurze Konidienketten aus.

Die submersen Konidienträger unterscheiden sich morphologisch von Konidienträgern aus Oberflächenkultivierungen. In Oberflächenkulturen sind Konidienträger von *A. terreus* zweiphasig: auf dem Vesikel bilden sich Metulae, die je ein Bündel von Phialiden tragen. Wodurch dieser Unterschied in der Morphologie verursacht wird ist nicht bekannt und bedarf weiterer Untersuchungen.

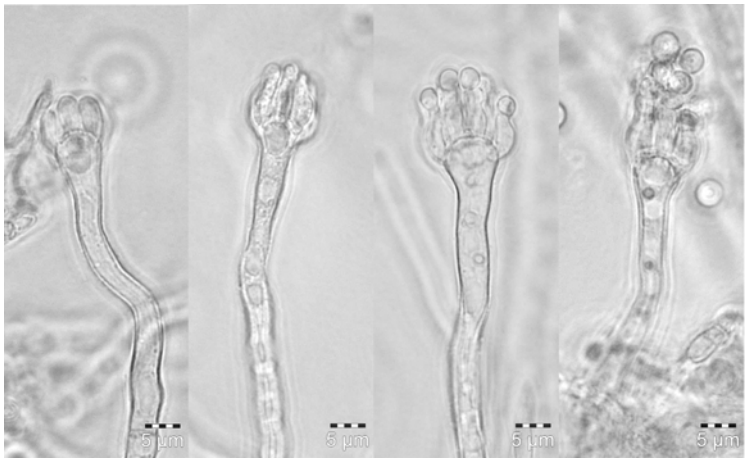

Abbildung 14: Bildung von submersen Konidienträgern nach einem pH-Shift auf pH 5 bei der Kultivierung von *A. terreus* (Aufnahme: Thünen-Institut für Agrartechnologie).

Die nach einem pH-Shift gebildeten Sporen waren ein Gemisch aus Chlamydosporen und Sporen von submersen Konidienträgern. Sie waren mit 3,0-6,4 µm Durchmesser deutlich größer als Sporen aus Oberflächenkultur, die einen Durchmesser von 1,9-2,3 µm hatten (Abbildung 15).

Sporenbildung bei Pilzen tritt in der Regel durch einen Mangel an Nährstoffen oder anderen Stress, wie z.B. Temperatursprüngen auf (Anderson and Smith 1971, Broderick and Greenshields 1981). Durch den schnellen hohen Anstieg des pH-Wertes wurde Stress auf die Zellen ausgeübt, so dass eine Sporenbildung induziert wurde. Die hohe Konzentration an Natriumionen, die durch die Lauge mit eingetragen wurden, konnte als Ursache ausgeschlossen werden. Dafür wurde die äquivalente Konzentration an Natriumionen in Form von NaCl zum Zeitpunkt des pH-Shifts zugegeben. Hier trat keine Sporenbildung auf.

Weitere Untersuchungen zur submersen Sporenbildung und deren Einflüsse sind in AP 2.4 dargestellt.

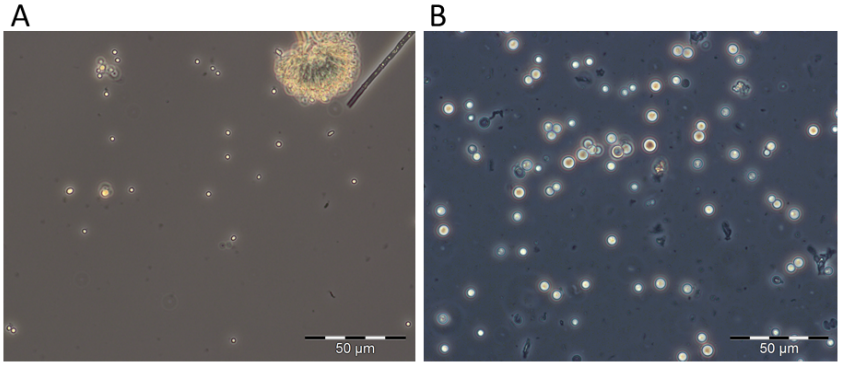

Abbildung 15: Sporen aus Oberflächenkultivierung (A) und Sporen aus submerser Kultivierung (B).

AP 2.4: Inokulumsherstellung inkl. Maßstabsvergrößerung

Für eine Nutzung der submersen Sporen als Inokulum wurden der Verlauf der Sporenbildung und die Einflüsse darauf genauer Untersucht.

Nach einem pH-Shift auf pH 5 im Bioreaktor begann die Bildung freier Sporen bereits nach 0,7 Tagen, so dass sich $8{,}3 \cdot 10^6$ Sporen/mL im Medium befanden (Abbildung 16). Die Sporenkonzentration stieg stetig an und erreichte nach 4,7 Tagen eine Konzentration von $4{,}8 \cdot 10^7$ Sporen/mL.

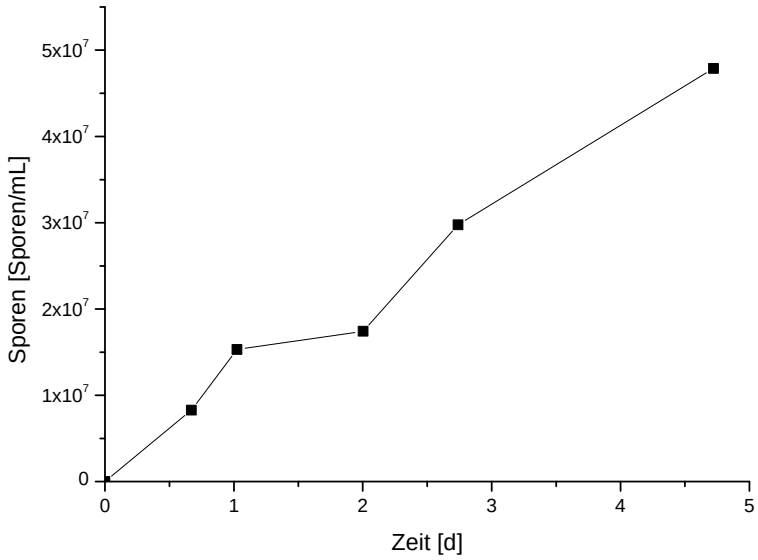

Abbildung 16: Verlauf der Sporenproduktion ab dem Zeitpunkt des pH-Shifts. Der pH-Shift wurde mit 5 M NaOH auf pH 5 nach 2 Tagen Kultivierung durchgeführt. 1,5 L Bioreaktor, 470 rpm, 33 °C, Start pH 3,1.

Die erreichten Sporenkonzentrationen nach einem pH-Shift variierten allerdings stark bei gleicher Versuchsdurchführung. Die Ursache hierfür lag vorrangig in den unterschiedlichen Biotrockenmassekonzentrationen zum Zeitpunkt des pH-Shifts. Es zeigte sich eine Abhängigkeit zwischen den erreichten Sporenkonzentrationen nach 5 Tagen Kultivierung und der Biotrockenmassekonzentration zum Zeitpunkt des pH-Shifts (Abbildung 17). Je höher die Biomassekonzentration war, desto mehr Sporen wurden gebildet. Nur die Zellmasse, die durch

den pH-Shift gestresst wurde, ist demnach in der Lage Sporen zu bilden. Später geformte Biomasse trägt nicht zur Sporenproduktion bei. Für die Optimierung der Sporenproduktion müsste das Medium und der Zeitpunkt des pH-Shifts so gewählt werden, dass sich eine hohe Biomassekonzentration aufbauen kann.

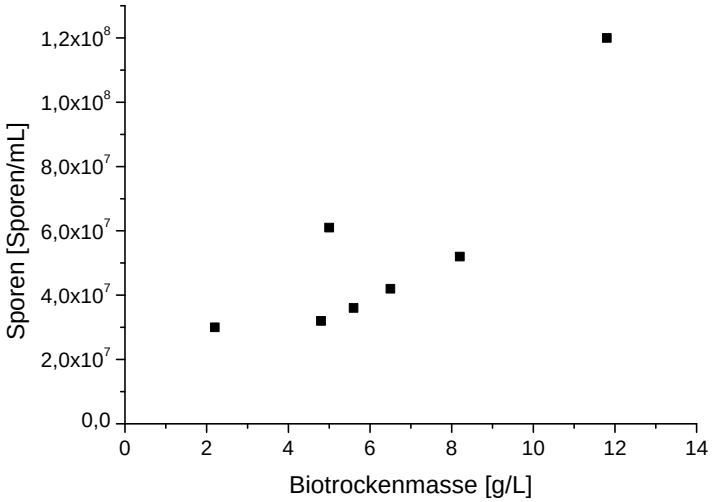

Abbildung 17: Die erreichte Sporenkonzentration nach 5 Tagen Kultivierung in Abhängigkeit von der Biotrockenmasse zum Zeitpunkt des pH-Shifts. Der pH-Shift wurde mit 5 M NaOH nach 2 Tagen Kultivierung durchgeführt.

Einen weiteren Einfluss auf die Sporenbildung hat der Zeitpunkt des pH-Shifts und die verwendete Lauge. Ein pH-Shift in der Produktionsphase nach 2 Tagen Kultivierung führte zu einer vermehrten Bildung von Chlamydosporen, jedoch nicht zur Bildung von Konidienträgern. Bei der Verwendung von KOH als Lauge für den pH-Shift trat wie bei NaOH die Bildung von submersen Konidienträgern auf. Bei der Verwendung von Ammoniaklösung kam es jedoch nur zu der vermehrten Bildung von Chlamydosporen. Dies könnte auf die hohen Ammoniumkonzentrationen im Medium zurückzuführen sein.

Zur Nutzung der submersen Sporen als Inokulum, mussten diese von der übrigen Biomasse getrennt werden. Die Verwendung von Filterpapier war sehr ineffizient: 94 % der Sporen verblieben im Filter oder im sich aufbauenden Filterkuchen. Durch die Verwendung eines Prüfsiebes mit einer maschenweite von 80 µm konnte dieser Verlust auf 18 % reduziert werden. Die submers gewonnenen Sporen keimten bei einer Standardkultivierung deutlich schneller aus, als die Sporen aus Oberflächenkultur (Abbildung 18). Dies war insbesondere am früheren abfallen des pH-Wertes zu erkennen. Die Itaconsäureproduktion setze dadurch ca. einen ¾ Tag früher ein, als bei der Kultivierung mit Oberflächensporen. Die Produktbildung verlief parallel und beide Sporenarten erreichten die gleichen Endkonzentrationen. Die Ausbeute war mit den submersen Sporen mit 0,55 (w/w) besser als mit den Oberflächensporen mit 0,51 (w/w). Während der Kultivierung wurde Glucose als Feststoff nachgegeben werden, um eine Limitation zu vermeiden.

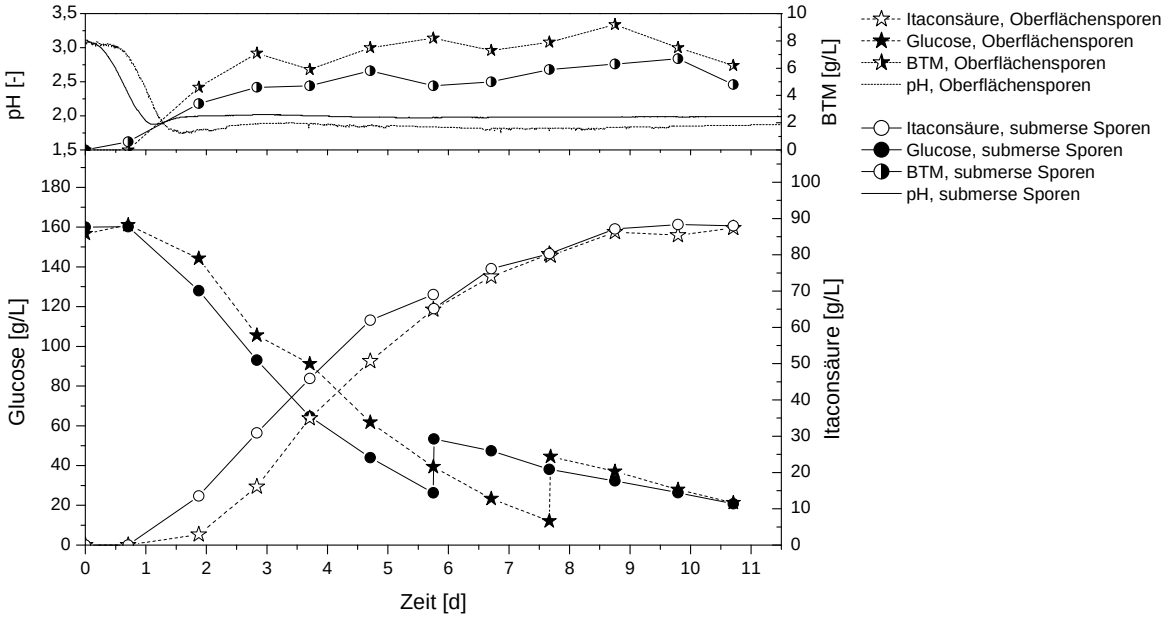

Abbildung 18: Vergleich von submers gewonnenen Sporen und Sporen aus Oberflächenkultur von *A. terreus* für die Itaconsäureproduktion. 400 mL Bioreaktor, 400 rpm, 33 °C, Start pH 3,1.

Durch die Bildung von submersen Sporen durch einen pH-Shift konnte eine Methode gefunden werden, bei der große Mengen an Sporen einfach hergestellt werden können. Dies ist insbesondere bei einen Scale-up des Prozesses wichtig, da für die klassische Sporenherstellung über Oberflächensporen sehr große Flächen benötigt werden. Die submersen Sporen zeigten außerdem eine deutlich verkürzte Keimungsphase, so dass sich mit ihnen eine höhere Produktivität erzielen lässt.

AP 2.5: Entwicklung und Optimierung des biotechnologischen Prozesses zur Herstellung von Itaconsäure

Etablierung der Bioreaktorkultivierung in unterschiedlichen Systemen

Für die Kultivierung von *A. terreus* im Bioreaktor standen 2 verschiedene Systeme zur Verfügung: 1,5 L Bioreaktoren, sowie 400 mL Bioreaktoren.

Die 1,5 L Bioreaktoren wurden mit einem Füllvolumen von 1 L betrieben. Die Itaconsäureproduktion begann nach 1,7 Tagen Kultivierung und erreichte eine Endkonzentration von 87,2 g/L nach 8,8 Tagen. Der pH-Wert sank während des Wachstums auf pH 2 ab und verblieb dort für den Rest der Kultivierung (Abbildung 19).

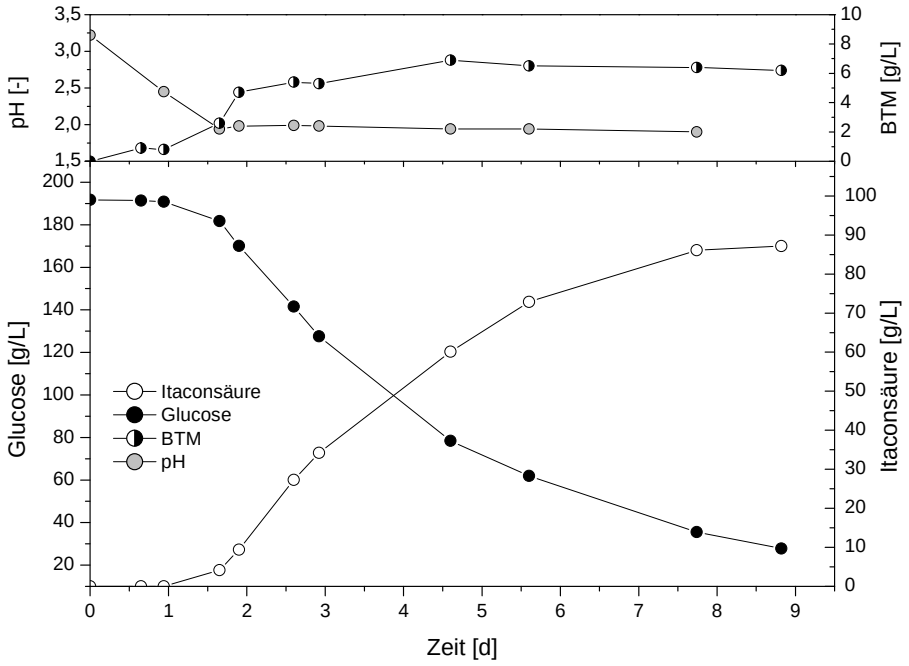

Abbildung 19: Kultivierung von *A. terreus* für die Itaconsäureproduktion. 1,5 L Bioreaktor, 1 L Füllvolumen, 470 rpm, 33 °C, Start pH 3,1.

Für die 400 mL Bioreaktoren wurde ein Füllvolumen von 200 mL festgelegt. Die Durchmischung fand in diesem System mit großen Magnetrührstäbchen statt, die auf dem Reaktorboden auflagen. Zur Ermittlung der optimalen Rührgeschwindigkeit wurden diese von 300 bis 600 rpm variiert (Abbildung 20). Es zeigte sich ein Maximum der erreichten Itaconsäurekonzentration bei 400 rpm. Hier wurden nach 10,7 Tagen Kultivierung 100,2 g/L Itaconsäure gebildet. Aufgrund der höheren Produktbildung, musste hier nach 7 Tagen Kultivierung Glucose nachgegeben werden, um eine Limitation zu vermeiden.

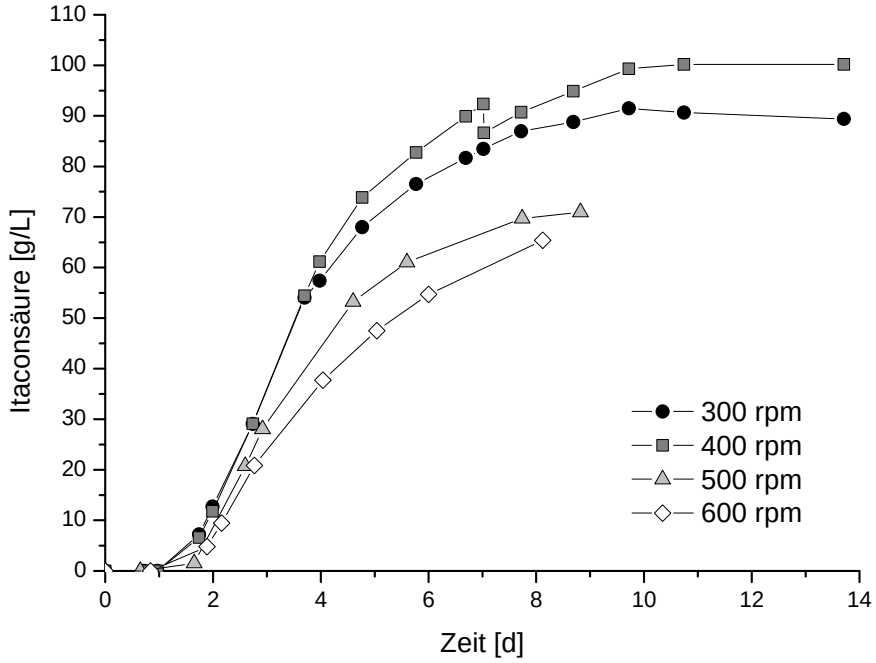

Abbildung 20: Einfluss der Rührgeschwindigkeit auf die Kultivierung von *A. terreus* für die Itaconsäureproduktion. 400 mL Bioreaktor, 33 °C, Start pH 3,1.

Medienoptimierung

Die in AP 2.1 entwickelte Kultivierung in Mikrotiterplatten ermöglicht eine schnelle und parallele Kultivierung. Daher wurde dieses System für die Medienoptimierung genutzt.
In der Standardkultivierung im 400 mL Bioreaktor musste durch die verstärkte Itaconsäurebildung Glucose während der Kultivierung nachgegeben werden. Daher wurde der Einfluss der Glucosestartkonzentration oberhalb der verwendeten 180 g/L untersucht (Abbildung 21). Zwischen den Glucosestartkonzentrationen von 200-430 g/L zeigte sich eine Abnahme in der Itaconsäurekonzentration nach 7 Tagen Kultivierung mit zunehmender Glucosestartkonzentration. Dies wurde vermutlich durch die erhöhten Viskositäten im Medium verursacht, was Auswirkungen auf die Pelletmorphologie haben könnte. Eine Erhöhung der Eduktkonzentration für weitere Versuche ist demnach nicht sinnvoll und weitere benötigte Glucose sollte im Verlauf der Kultivierung hinzugegeben werden.

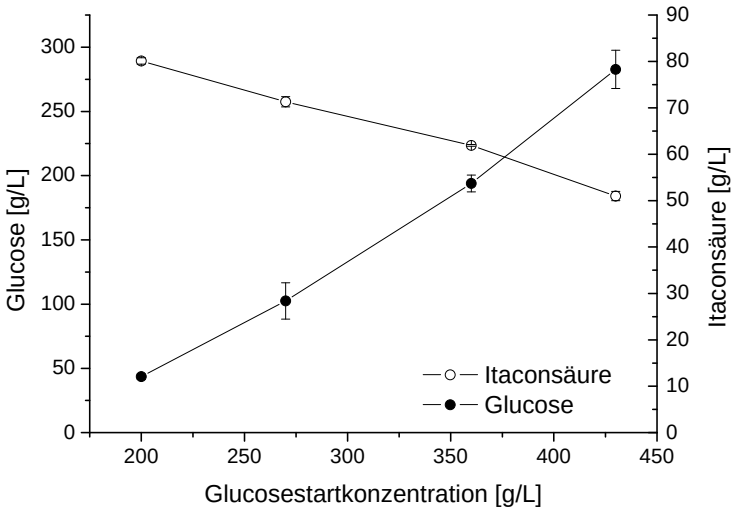

Abbildung 21: Einfluss der Glucosestartkonzentration auf die Kultivierung von *A. terreus* zur Itaconsäureproduktion. 96-Well Mikrotiterplatte, 950 rpm, 7 Tage Kultivierung, 33 °C, Start pH 3,1.

Für die Optimierung des Mediums wurden die einzelnen Medienbestandteile unabhängig voneinander variiert und für 7 Tage in den Mikrotiterplatten kultiviert. Die gemessenen Itaconsäure- und Glucosekonzentrationen sind in Abbildung 22 dargestellt. Bei der Variation von Ammoniumsulfat, Eisenchlorid, Magnesiumsulfat, Calciumchlorid und Zinksulfat konnte keine Steigerung der Itaconsäurekonzentration beobachtet werden.
Die Verringerung der $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ Konzentration von 0,015 g/L auf 0,005 g/L führte zu einer Erhöhung der Itaconsäurekonzentration um 13 % auf 77,8 g/L. Die Steigerung der KH_2PO_4 Konzentration von 0,1 g/L auf 0,8 g/L ergab den höchsten Anstieg der Itaconsäurekonzentration von 31 % auf 88,5 g/L. Bei allen Steigerungen in der Itaconsäurekonzentration konnte visuell erkannt werden, dass die Biomasse im Well gegenüber der Referenz zugenommen hatte. Daher sind die Verbesserungen wahrscheinlich auf den gleichen Effekt der verstärkten Biomassebildung zurückzuführen. Die weiteren Untersuchungen wurden daher auf die KH_2PO_4 Konzentration konzentriert, da hier der größte Anstieg in der Itaconsäurekonzentration im Vergleich zur Referenz zu erkennen war.

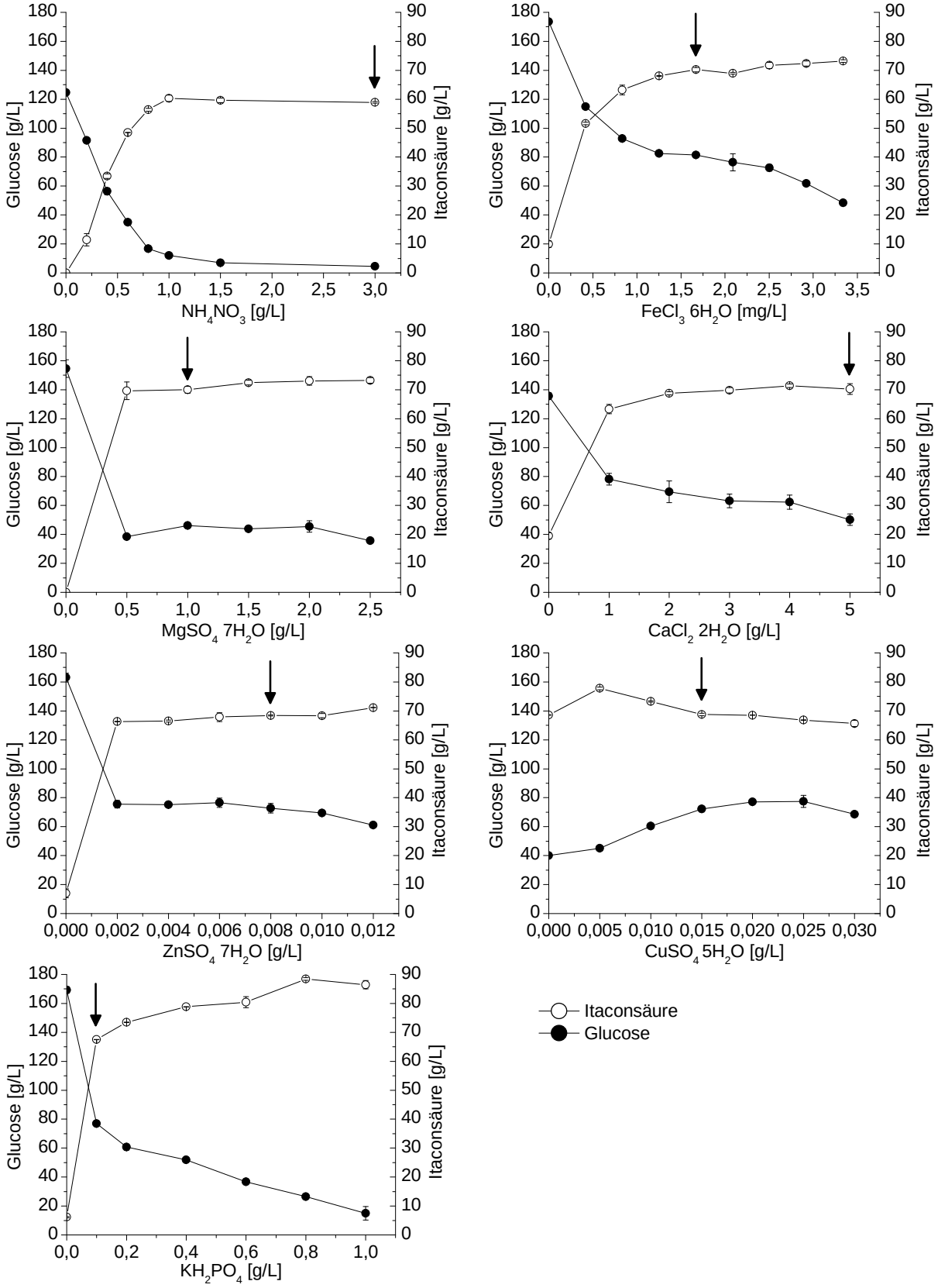

Abbildung 22: Unabhängige Variation der einzelnen Medienbestandteile für die Produktion von Itaconsäure mit *A. terreus*. Die Pfeile markieren die Standardkonzentration. 96-Well Mikrotiterplatte, 33 °C, 950 rpm, 7 Tage Kultivierung, Start pH 3,1.

Zur genaueren Untersuchung der Produktsteigerung infolge der Medienoptimierung wurde eine Kultivierung mit 0,8 g/L KH_2PO_4 im 400 mL Bioreaktor durchgeführt (Abbildung 23). Der Produktionsstart setzte zum gleichen Zeitpunkt wie im Standardmedium ein. Die maximale Produktivität betrug allerdings mit 2,78 g/L/h das 2,6fache des Standardmediums. Nach 2,9 Tagen Kultivierung brach die Produktivität allerdings stark ein. Eine Ursache hierfür könnte die Limitierung der beiden Stickstoffquellen Nitrat und Ammonium sein. In der Standardkultivierung wurde ca. die Hälfte des eingesetzten Ammoniumnitrats verbraucht. Bei der Kultivierung mit erhöhter KH_2PO_4-Konzentration trat jedoch nach 2,9 Tagen Kultivierung eine Stickstofflimitierung ein. Eine spätere Zugabe von Ammoniumnitrat brachte keine weitere Erhöhung der Itaconsäurekonzentration. Dieser starke Stickstoffverbrauch könnte durch die vermehrte Biotrockenmassebildung verursacht worden sein. Es wurden 2/3 der Biotrockenmasse in der Produktionsphase der Kultivierung gebildet, so dass etwa die doppelte Biotrockenmassekonzentration im Vergleich zur Standardkultivierung erreicht wurde. Die Ursache hierfür liegt vermutlich in der höheren Phosphatkonzentration. Diese war im Standardmedium zum Zeitpunkt des Produktionsbeginns limitiert, so dass auch die Biomassebildung limitiert wurde. Mit der erhöhten KH_2PO_4 Konzentration lagen nach dem Start der Itaconsäurebildung 98 mg/L Phosphat im Medium vor. Dies ist höher als die Startphosphatkonzentration des Standardmediums und dennoch startete die Itaconsäureproduktion zum gleichen Zeitpunkt. Dies widerspricht der in der Literatur vertretenen Meinung, dass es eine Phosphatlimitierung für die Itaconsäurebildung in *A. terreus* bedarf (Rychtera and Wase 1981, Riscaldati, et al. 2000).

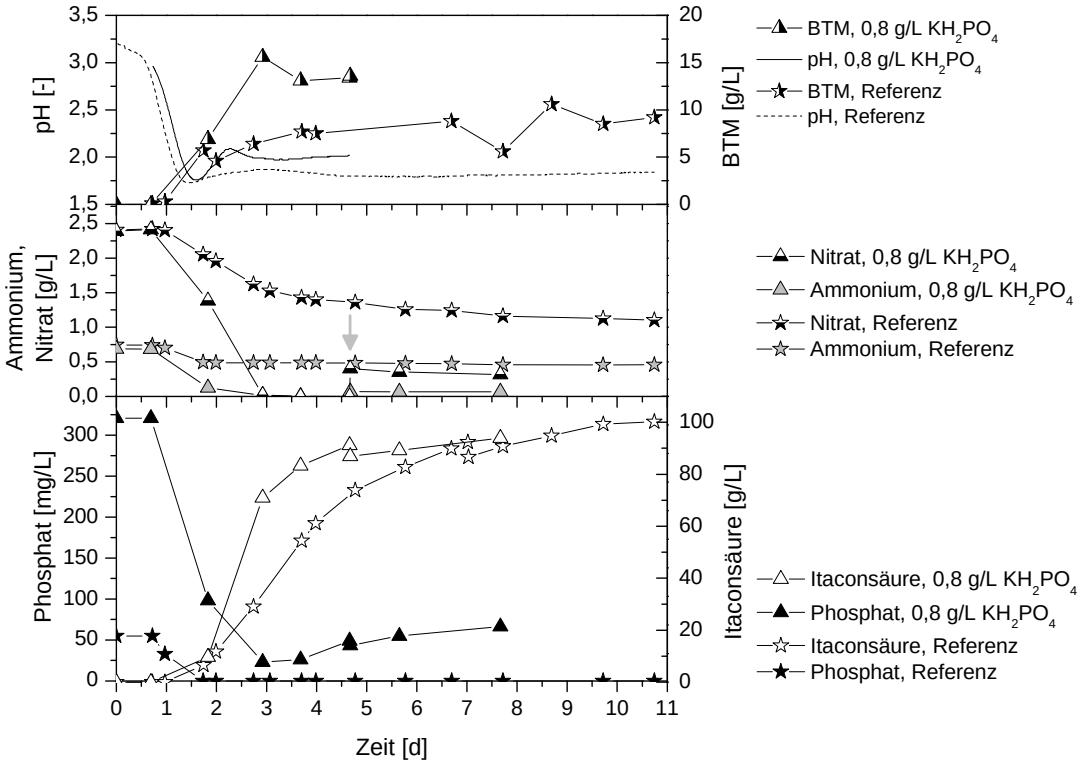

Abbildung 23: Einfluss von erhöhter KH_2PO_4 Konzentration auf die Kultivierung mit *A. terreus* zur Itaconsäureproduktion. Der Pfeil zeigt eine Zugabe von Ammoniumnitrat an. 400 mL Bioreaktor, 400 rpm, 33 °C, Start pH 3,1.

Da die eingetretene Stickstofflimitierung nach 2,9 Tagen Kultivierung wahrscheinlich einen Einfluss auf die Produktbildung hatte, wurde der Versuch im 1,5 L Bioreaktor wiederholt (Abbildung 24). Hierbei wurde darauf geachtet, dass es zu keiner Stickstofflimitierung kam. Auch in diesem Reaktorsystem zeigte sich eine Steigerung der max. Produktivität, auch wenn diese mit 1,63 g/L/h im Vergleich zu 1,20 g/L/h der Referenz nicht so hoch ausfiel. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich in den unterschiedlichen Reaktorsystemen selbst. Mit der Vermeidung der Stickstofflimitierung konnte die max. Itaconsäurekonzentration mit 89,3 g/L nicht signifikant gesteigert werden.
Eine erhöhte KH_2PO_4 Konzentration verhindert demnach eine Phosphatlimitierung, wodurch mehr itaconsäurebildene Biomasse gebildet werden kann. Hierdurch konnte die erreichte Itaconsäurekonzentration nicht erhöht werden, aber die Kultivierungsdauer reduziert werden.

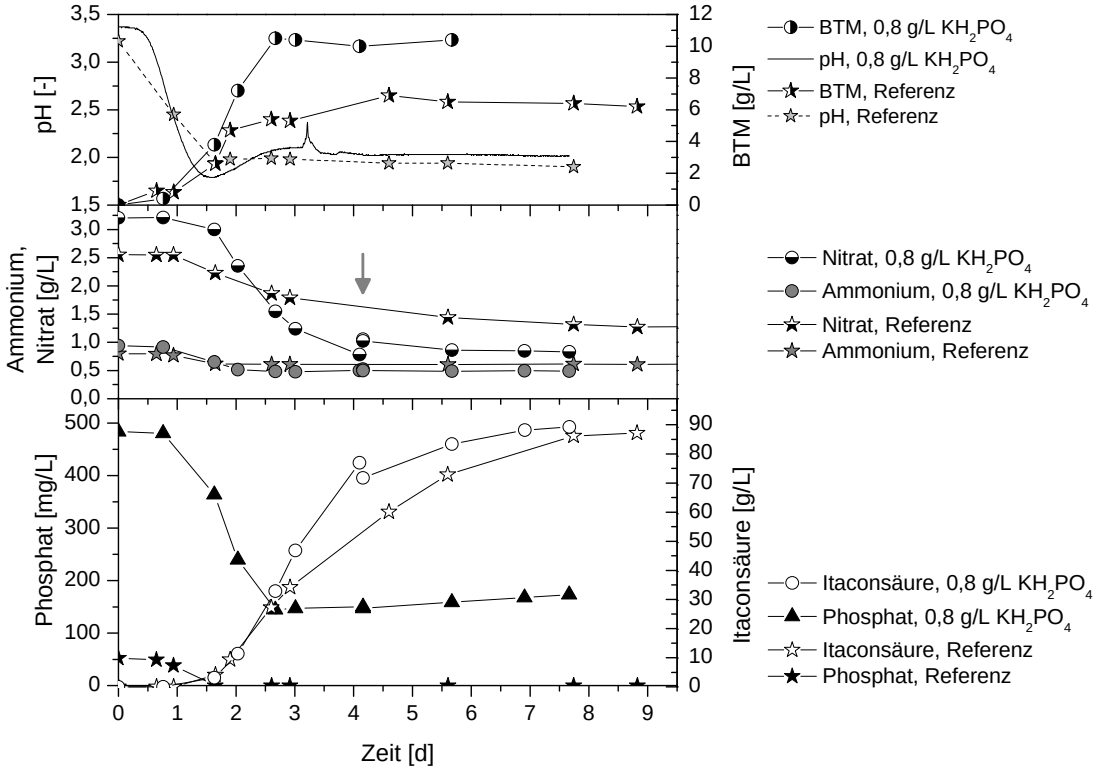

Abbildung 24: Einfluss von erhöhter KH_2PO_4 Konzentration auf die Kultivierung mit *A. terreus* zur Itaconsäureproduktion. Der Pfeil zeigt eine Zugabe von Ammoniumnitrat an. 1,5 L Bioreaktor, 470 rpm, 33 °C, Start pH 3,1.

Start pH

Der verwendete Start pH für eine Kultivierung mit *A. terreus* zur Itaconsäurebildung schwankt in den Literaturangaben sehr von pH 2 (bei der Verwendung von Mycelium als Inokulum) (Park, et al. 1993, Yahiro, et al. 1995) bis pH 5,9 (Gyamerah 1995). Der Einfluss des Start pHs auf das verwendete Standardmedium wurde daher untersucht (Abbildung 25). In einem pH-Bereich von 4,85 bis 2,85 zeigte sich kaum ein Unterschied in der Itaconsäurebildung. Dies liegt vermutlich daran, dass das Medium ungepuffert ist und sich der pH-Wert durch die Aufnahme von Ammoniumionen in der Wachsumsphase schnell auf einen Wert von pH 2 einstellt. Bei tieferen pH-Werten, insbesondere bei pH 1,91, setzte die Itaconsäurebildung verspätet ein. Dies geschah durch eine verzögerte Keimung der Sporen, die bei pH 1,91 erst nach 2 Tagen Inkubierung

stattfand. Nach 7 Tagen Kultivierung wurden hier 60,1 g/L Itaconsäure gebildet, so dass der tiefe Start pH keinen Einfluss auf die Produktbildung hatte.
Die Verzögerung der Sporenkeimung durch den pH-Wert ist auch bei anderen Pilzen bekannt. So liegt bei *A. niger* der optimale pH-Wert für die Keimung der Sporen bei pH 4,5 (Abdel-Rahim and Arbab 1985).

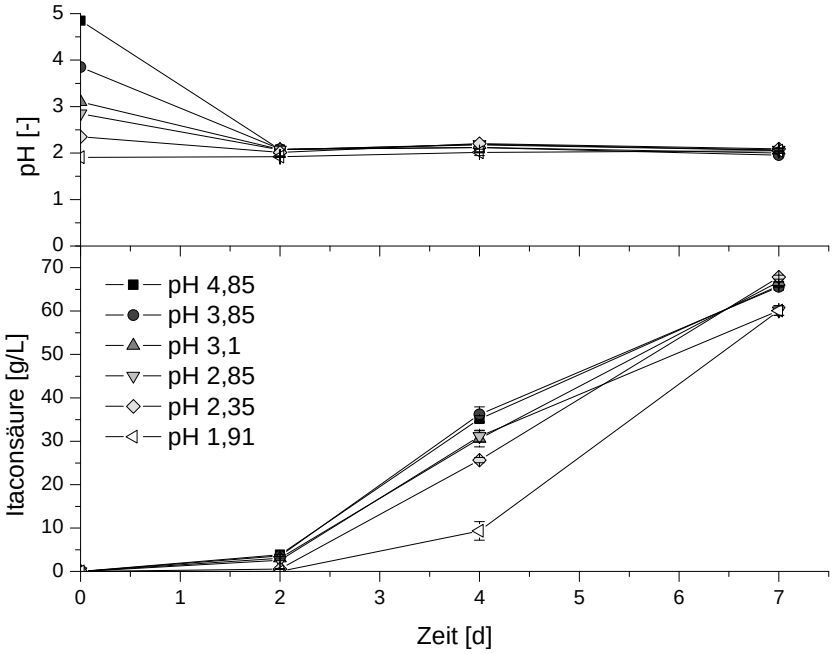

Abbildung 25: Einfluss des Start pH-Wertes auf die Itaconsäurebildung mit *A. terreus*. 96-Well Mikrotiterplatte, 950 rpm, 33 °C.

Prozessoptimierung: pH-Shift

Eine Veränderung des pH-Wertes während der Kultivierung kann einen großen Einfluss auf die Produktzusammensetzung haben. Bei der Kultivierung von *A. niger* führt ein pH-Shift von pH 2 zu pH 6 zur Produktion von Oxalsäure (Kubicek, et al. 1988, Cameselle, et al. 1998).
Um einen solchen Einfluss auf die Itaconsäurebildung zu überprüfen, wurde der pH-Wert in einem Schüttelkolbenversuch nach 4 Tagen Kultivierung auf pH 4 und pH 6 geshiftet (Abbildung 26). Es ergab sich eine vermehrte Bildung von Biotrockenmasse, eine starke Produktion von Sporen und der Ausbildung von Konidienträgern. Weitere Untersuchungen zur Sporenbildung wurden in AP 2.3 näher behandelt. Die Itaconsäurebildung sank nach dem pH-Shift ab, was durch eine mögliche Sauerstofflimitierung infolge des starken Biomassewachstums verursacht sein könnte. Um diese Fehlerquelle auszuschließen wurde der Versuch im Bioreaktor wiederholt.

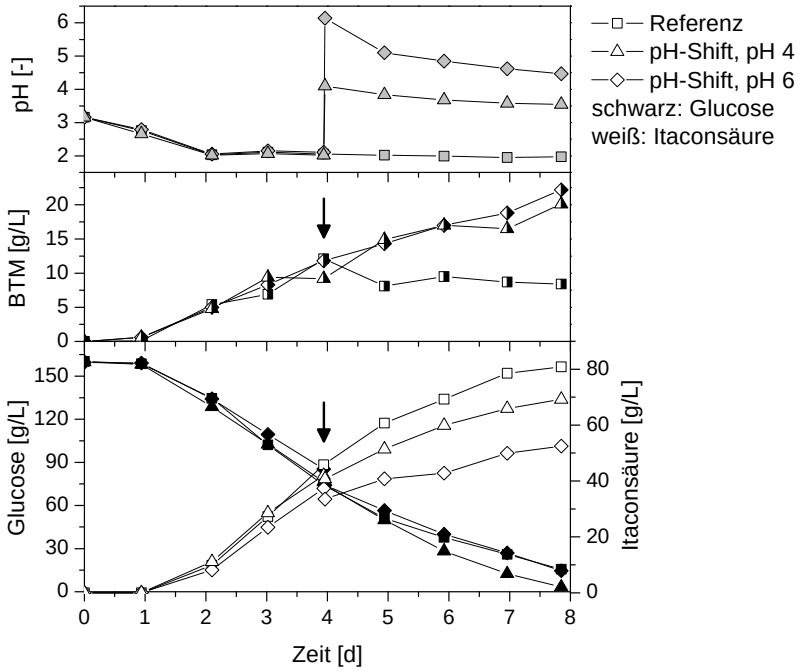

Abbildung 26: Einfluss eines pH-Shiftes mit 5 M NaOH auf pH 4 und pH 6 auf die Itaconsäurebildung und Biotrockenmasse bei der Kultivierung von *A. terreus*. 250 mL Schüttelkolben, 120 rpm, 33°C, Start pH 3,1.

Der pH-Shift im Bioreaktor wurde nach 2 Tagen Kultivierung durchgeführt, da so weniger Lauge für die Neutralisation der schon gebildeten Itaconsäure notwendig war. Die Farbe der Fermentationsbrühe änderte sich nach dem pH-Shift von hellgelb zu rötlich und im späteren Verlauf der Kultivierung rotbraun. Wie im Schüttelkolbenversuch kam es zu einer vermehrten Biomassebildung. Die Produktivität sank nach dem pH-Shift ab, blieb dann aber über 5 Tage konstant bevor sie absank. Dadurch wurde eine Itaconsäureendkonzentration von 131,3 g/L erreicht. Dieser Wert liegt deutlich über den in der Literatur erreichten Itaconsäurekonzentrationen von 90 g/L (Kuenz 2008).

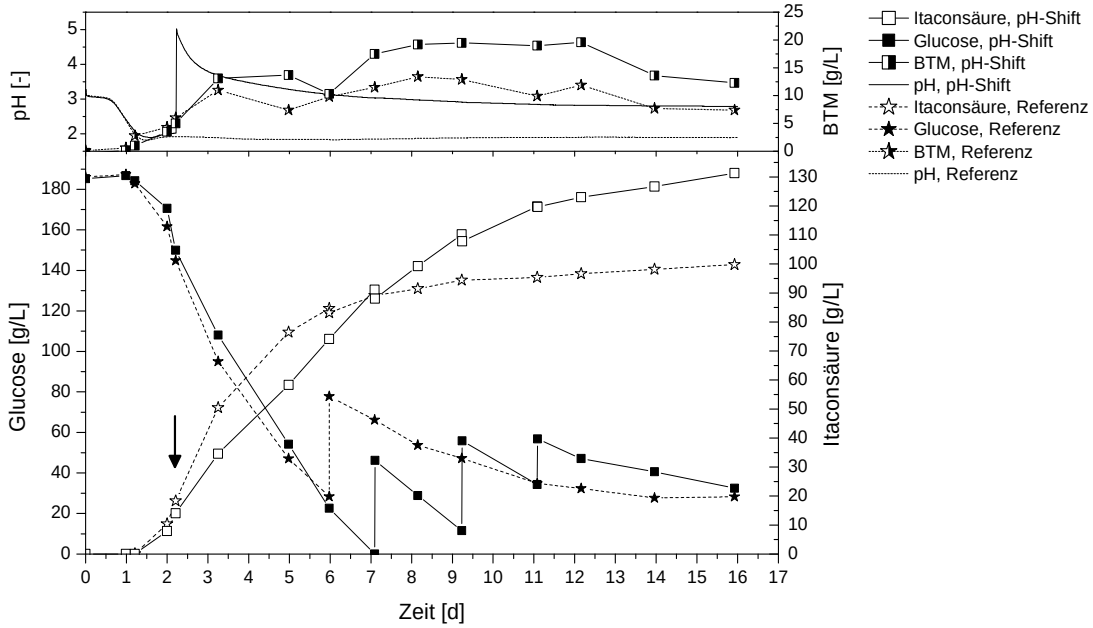

Abbildung 27: Einfluss eines pH-Shiftes mit 5 M NaOH auf die Kultivierung von *A. terreus* zur Itaconsäurebildung. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt des pH-Shiftes. 400 mL Bioreaktor, 400 rpm, 33 °C, Start pH 3,1.

Bei dem pH-Shift wurde neben der Anhebung des pH-Wertes auch Natriumionen in das Medium eingetragen. Um festzustellen, ob die hohen Endkonzentrationen auf die pH-Wertänderung oder den Natriumionen zurückzuführen sind, wurde in einem weiteren Experiment zum Zeitpunkt des pH-Shiftes die äquivalente Menge an Natriumionen durch die Zugabe von NaCl zugeführt. Die Kultivierung verhielt sich ähnlich zur Referenz: Es gab keinen Anstieg in der Biomasse, keine Farbänderung und die Produktivität brach nach der Natriumzugabe nicht ein. Die Endkonzentration lag allerdings mit 79,8 g/L unterhalb der Standardkultivierung.
Durch die Zugabe von Natriumionen zeigten sich demnach keine Veränderungen in der Kultivierung, die durch den pH-Shift auftraten. Die Ursache für die hohen Endkonzentrationen lag daher vermutlich in der pH-Wertänderung.

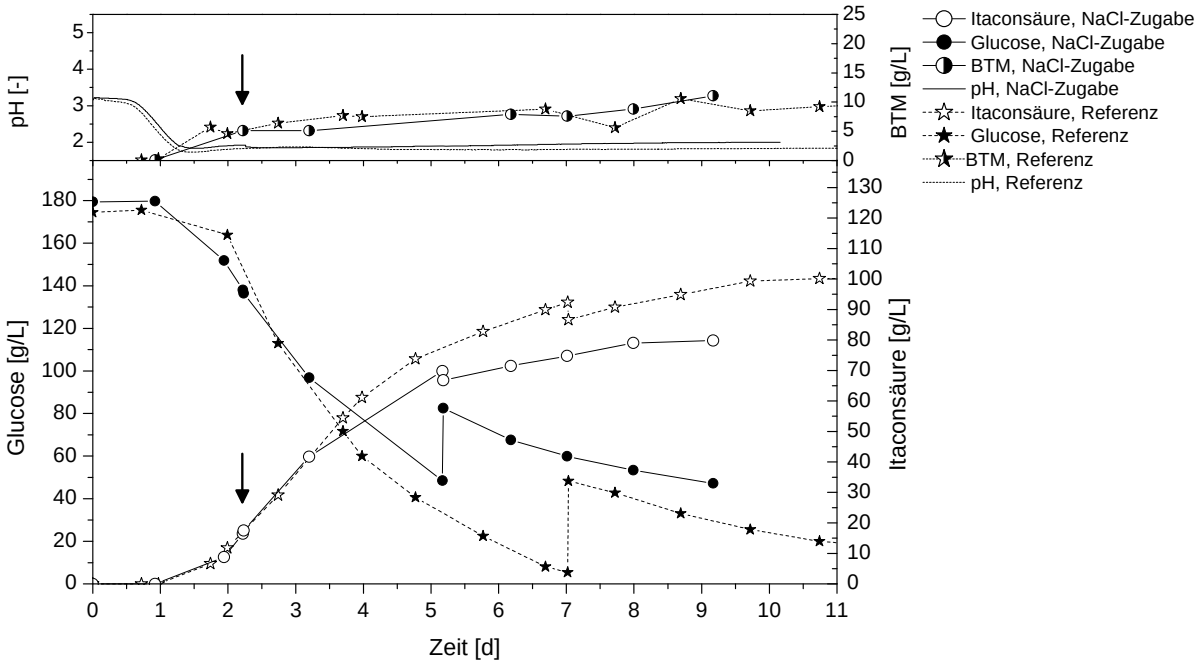

Abbildung 28: Einfluss der Zugabe von NaCl auf die Kultivierung von *A. terreus* zur Itaconsäurebildung. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der NaCl-Zugabe. 400 mL Bioreaktor, 400 rpm, 33 °C, Start pH 3,1.

Um die Menge der zugegebenen Lauge zu minimieren, wurde ein pH-Shift nach 1,2 Tagen Kultivierung durchgeführt (Abbildung 29). Hier befand sich der Pilz in der Wachstumsphase und hatte noch keine Itaconsäure produziert. Der pH-Wert fiel nach dem pH-Shift innerhalb eines Tages wieder auf den vorherigen Wert von pH 2 zurück. Die Itaconsäureproduktion setzte erst nach dem Abfall des pH-Wertes ein und verlief mit einer geringeren maximalen Produktivität als die Standardkultivierung. Die Endkonzentration lag mit 92,5 g/L etwas unterhalb der Standardkultivierung. Durch den Anstieg des pH-Wertes wurde ein Teil der Biomasse bei höheren pH-Werten gebildet. Dadurch war diese nicht in der Lage Itaconsäure zu bilden (Larsen and Eimhjellen 1955) und verursachte so die geringere Produktivität.
Ein pH-Shift muss demnach in der Produktionsphase der Kultivierung stattfinden, um einen positiven Effekt auf die Endkonzentration ausüben zu können.

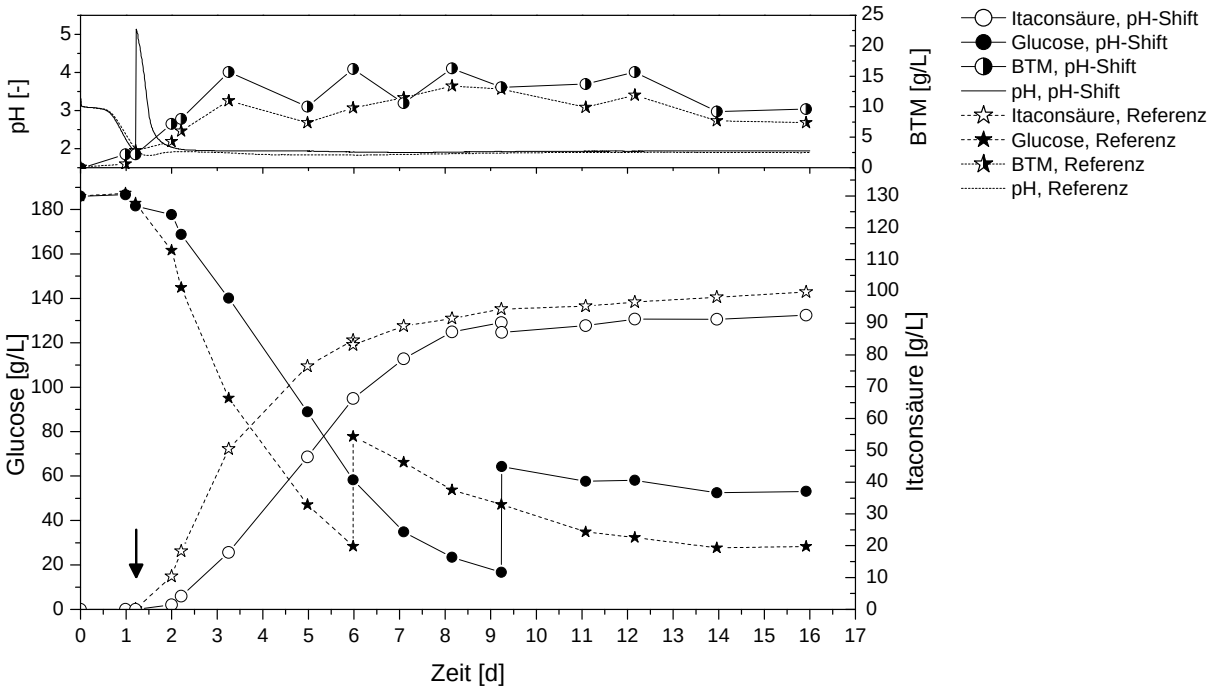

Abbildung 29: Einfluss eines pH-Shiftes mit 5 M NaOH auf die Kultivierung von *A. terreus* zur Itaconsäurebildung. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt des pH-Shiftes. 400 mL Bioreaktor, 400 rpm, 33 °C, Start pH 3,1.

Für einen pH-Shift wurde in den bisherigen Versuche NaOH als Lauge verwendet. Daher wurde untersucht, ob die Verwendung von unterschiedlichen Laugen den gleichen Einfluss auf die Itaconsäurebildung hat (Abbildung 30).

Ein pH-Shift mit KOH führte zu einen ähnlichen Produktionsverhalten wie bei dem pH-Shift mit NaOH: Die Produktivität verringerte sich nach dem pH-Shift auf 0,72 g/L/h blieb hier lange konstant. Es wurde eine Itaconsäureendkonzentration von 132,8 g/L erreicht.

Nach einem pH-Shift mit Ammoniaklösung brach die maximale Produktivität nicht ein, sondern betrug 1,07 g/L/h, was der Produktivität der Referenz mit 1,08 g/L/h entspricht. Es wurde eine Endkonzentration von 122,3 g/L erreicht. Aufgrund der höheren maximalen Produktivität bei der Verwendung von Ammoniaklösung wurde diese für weitere pH-Shifts verwendet.

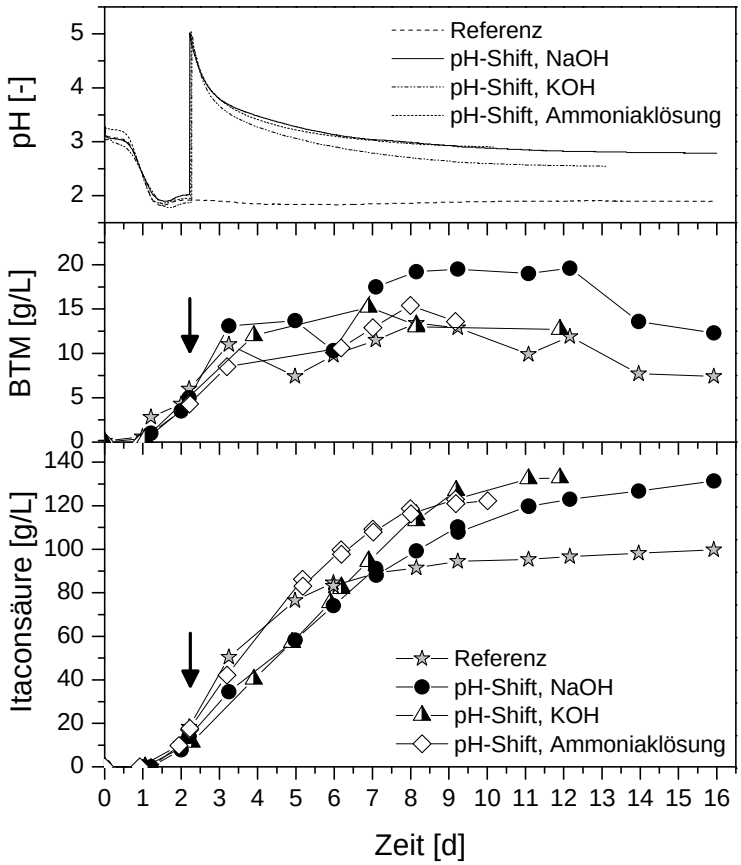

Abbildung 30: Einfluss der Lauge bei einem pH-Shift auf pH 5 auf die Kultivierung von *A. terreus* zur Itaconsäurebildung. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der pH-Shifts. 400 mL Bioreaktor, 400 rpm, 33 °C, Start pH 3,1.

Ein pH-Shift mit den unterschiedlichen Laugen zeigte auch Einfluss auf den Stickstoffverbrauch der Kultivierung. Als Stickstoffquelle waren im Medium Ammonium und Nitrat vorhanden. Bei einer Standardkultivierung ohne pH-Shift wurde in der Wachstumsphase Ammonium als Stickstoffquelle verwendet, während in der Produktionsphase Nitrat durch die Zellen aufgenommen wurde (Abbildung 31). Dabei wurden insgesamt 532 mg/L Stickstoff aufgenommen, das in etwa zu gleichen Teilen aus Ammonium und Nitrat stammten. Nach einem pH-Shift mit NaOH und KOH wurde mit 988 bzw. 881 mg/L deutlich mehr Stickstoff als bei der Referenz aufgenommen. Hierbei wurde Ammonium auch während der Produktionsphase von den Zellen aufgenommen, so dass der Stickstoff etwa zu gleichen Teilen aus Ammonium und Nitrat stammte. Bei dem pH-Shift mit Ammoniaklösung stieg die Ammoniumkonzentration durch den pH-Shift deutlich auf 4,4 g/L an. Nach dem pH-Shift brach die Nitrataufnahme stark ein und Ammonium wurde als Stickstoffquelle verwendet. Dies resultierte in einem Gesamtstickstoffverbrauch von 1322 mg/L, wovon ca. 80 % aus Ammonium stammten. Das Überangebot an Ammonium nach einem pH-Shift mit Ammoniaklösung könnte die Ursache für die anhaltende Produktivität nach dem pH-Shift sein.

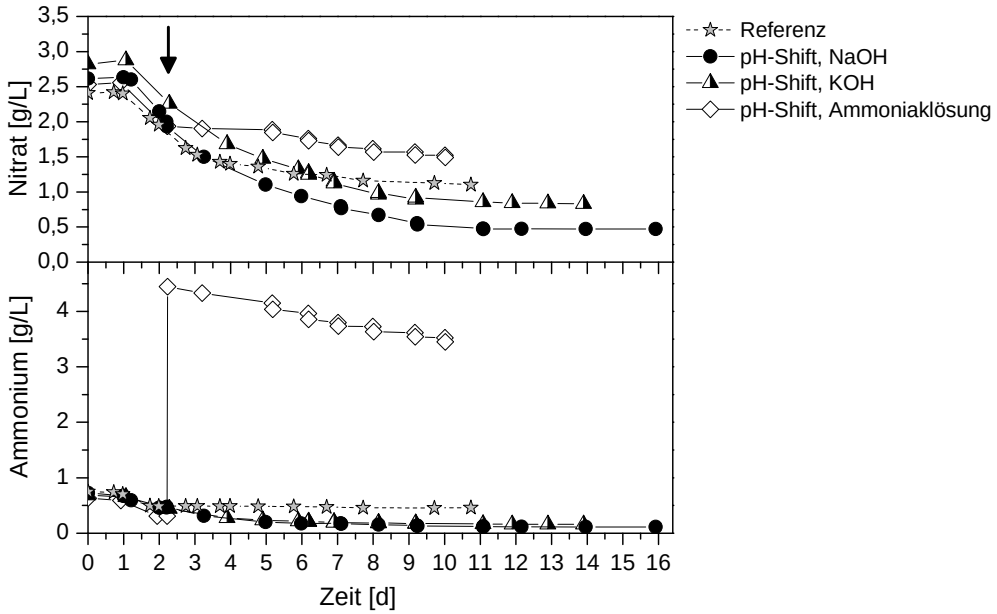

Abbildung 31: Einfluss der Lauge bei einem pH-Shift auf pH 5 auf den Nitrat- und Ammoniumverbrauch bei der Kultivierung von *A. terreus* zur Itaconsäureproduktion. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der pH-Shifts. 400 mL Bioreaktor, 400 rpm, 33 °C, Start pH 3,1.

Ein Einfluss der verwendeten Lauge zeigte sich auch in der Bildung der Hauptnebenprodukte Äpfelsäure und α-Ketoglutarsäure (Abbildung 32).

Die α-Ketoglutarsäurekonzentration stieg bei einer Standardkultivierung stetig an. Nach einem pH-Shift hingegen verringerte sich die Bildung und stagnierte ab ca. 6 Tagen Kultivierung. Dies war unabhängig von der Art der verwendeten Lauge, dem Zeitpunkt des pH-Shifts und trat auch bei der Zugabe von NaCl zum Zeitpunkt des pH-Shifts auf.

Auch die Äpfelsäurekonzentration stieg bei der Standardkultivierung stetig an. Bei einem pH-Shift mit NaOH und KOH kam es zu einer Stagnation der Äpfelsäurekonzentration nach ca. 4 Tagen Kultivierung, während die Zugabe von NaCl keinen Einfluss zeigte. Die Verwendung von Ammoniaklösung als Base führte hingegen zu einer verstärkten Bildung von Äpfelsäure. Die Äpfelsäurekonzentration erreichte hier nach 5 Tagen ein Maximum mit 3,02 g/L und nahm daraufhin wieder ab.

Die Einflüsse auf die α-Ketoglutarsäure und Äpfelsäurebildung scheinen unterschiedliche Ursachen zu haben. Bei der α-Ketoglutarsäure könnte die Erhöhung des osmotischen Druckes bei Zugaben von Lauge oder NaCl Einfluss auf den Citratzyklus oder Transportproteine haben. Äpfelsäure hingegen wird außer im Citratzyklus auch im Cytoplasma aus Pyruvat über Oxalessigsäure gebildet. Wahrscheinlich wurde Äpfelsäure über diesen Stoffwechselweg verstärkt nach der Zugabe von Ammoniaklösung gebildet. Es ist möglich, dass dies durch einen erhöhten Durchsatz in der Glykolyse verursacht worden ist, was auch die konstante Produktivität nach einem pH-Shift mit Ammoniaklösung erklären würde.

Insgesamt betrug bei der Standardkultivierung der Anteil der Nebenprodukte an der Gesamtproduktion 4,1 %. Durch den pH-Shift wurde dieser Wert bei allen verwendeten Laugen verringert: NaOH 1,1 %, KOH 1,5 %, Ammoniaklösung 2,1 %.

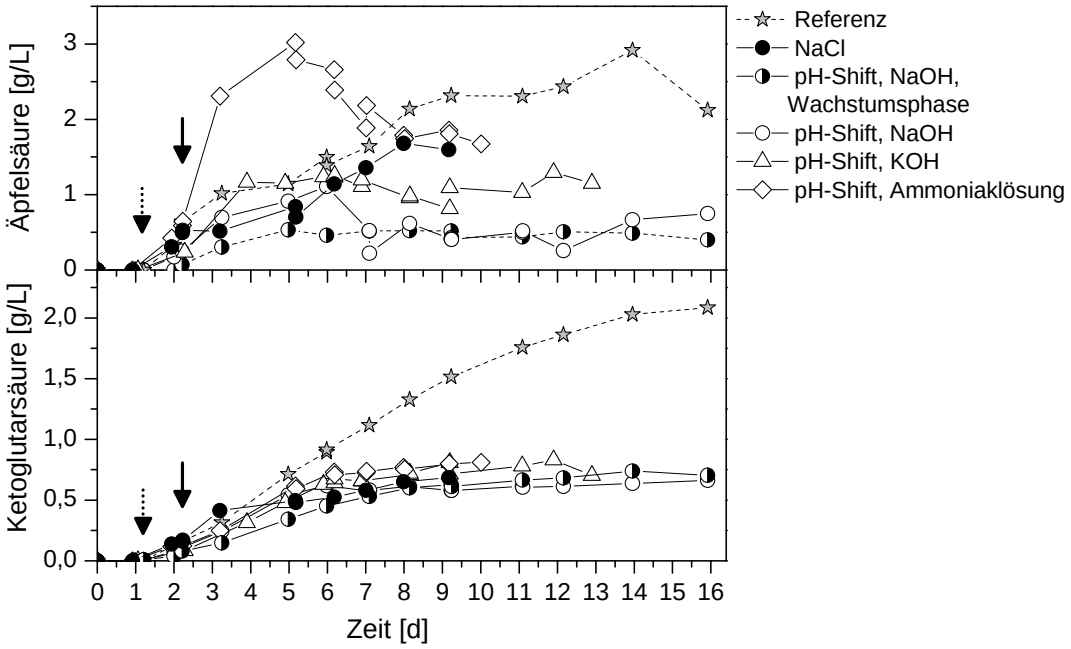

Abbildung 32: Einfluss unterschiedlicher pH-Shifts und NaCl Zugabe auf die Hauptnebenprodukte bei der Kultivierung von *A. terreus* zur Itaconsäurebildung. Der unterbrochene Pfeil markiert den Zeitpunkt des pH-Shifts in der Wachstumsphase und der durchgehende Pfeil den Zeitpunkt des übrigen pH-Shifts und der NaCl-Zugabe. 400 mL Bioreaktor, 400 rpm, 33 °C, Start pH 3,1.

Um herauszufinden welchen Einfluss die Höhe des pH-Shifts auf die Itaconsäurebildung hat, wurde dieser von pH 3 bis pH 6 variiert (Abbildung 33). Der Versuch wurde im 1,5 L Bioreaktor mit Ammoniumlösung als Lauge durchgeführt. Es zeigte sich, dass ein pH-Shift auf pH 3 keinen Einfluss auf die Produktbildung hatte. Die Endkonzentration war mit 84,4 g/L ähnlich der Itaconsäurekonzentration der Referenzkultivierung mit 87,2 g/L. Auch kam es hier nicht zu einer verstärkten Biomassebildung, sowie zu keiner Farbänderung der Fermentationsbrühe. Die pH-Shifts auf pH 4 und pH 5 verhielten sich sehr ähnlich: Nach den pH-Shifts fand eine langsame Farbänderung von hellgelb zu rotbraun statt und es wurden Endkonzentrationen von 101,5 g/L bzw. 103,1 g/L Itaconsäure erreicht. Bei dem pH-Shift auf pH 6 verfärbe sich die Fermenterbrühe sofort von hellgelb in violett. Diese Färbung änderte sich im Verlauf der Kultivierung zu hellbraun und später rotbraun. Die Itaconsäureendkonzentration lag mit 110,0 g/L etwas über den anderen pH-Shifts.

Die Endkonzentrationen nach dem pH-Shift im 1,5 L Bioreaktor lagen unterhalb der Konzentrationen im 400 mL Bioreaktor. Die Ursache hierfür war wahrscheinlich, dass die Endkonzentrationen der Standardkultivierungen beider Systeme unterschiedlich sind. Durch die Optimierung der Kultivierungsbedingungen im 400 mL Bioreaktor, wurden hier mit 100 g/L Itaconsäure 13 g/L Itaconsäure mehr als im 1,5 L Bioreaktor erreicht. Dies entspricht auch dem Unterschied zwischen den pH-Shifts mit Ammoniumlösung in den beiden Systemen.

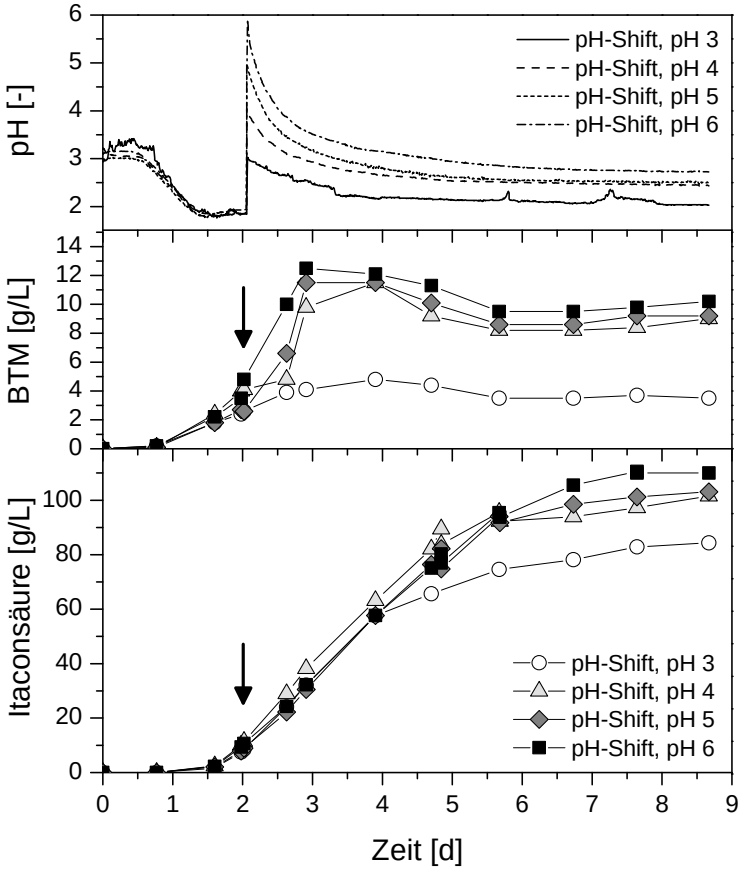

Abbildung 33: Einfluss der Höhe des pH-Shifts mit Ammoniumlösung (6,25 %) auf die Kultivierung von *A. terreus* zur Itaconsäurebildung. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt des pH-Shifts. 1,5 L Bioreaktor, 470 rpm, 33 °C, Start pH 3,1.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass mit einem durchgeführten pH-Shift in der Produktionsphase der Kultivierung die Endkonzentration auf bis zu 132,8 g/L Itaconsäure gesteigert werden kann. Dieser positive Effekt auf die Itaconsäureendkonzentration war unabhängig von der Art der verwendeten Lauge und im Bereich von pH 4 bis pH 6 von der Höhe des pH-Shifts. Die Ursache in der Konzentrationssteigerung könnte in der höheren maximalen Löslichkeit der Itaconsäure nach einem pH-Shift liegen. Die maximale Löslichkeit der Itaconsäure ist stark pH abhängig (Abbildung 34). Nach dem pH-Shift sank der pH-Wert nicht wieder auf den Wert vor dem pH-Shift, sondern erreichte Werte zwischen pH 2,5 und pH 3. In diesem Bereich lag die maximale Löslichkeit der Itaconsäure zwischen 131 g/L und 166 g/L Itaconsäure. Eine Steigerung der Löslichkeit der Itaconsäure könnte auch durch die Verwendung von höheren Temperaturen erreicht werden. Allerdings war diese Abhängigkeit zwischen 28 °C und 40 °C nur linear (Abbildung 34).

In der Standardkultivierung lag die erreichte maximale Itaconsäurekonzentration bei 90 g/L. Ab dieser Konzentration kam es vermutlich zu einer Produkthemmung, die durch die Löslichkeit der Itaconsäure verursacht wurde.

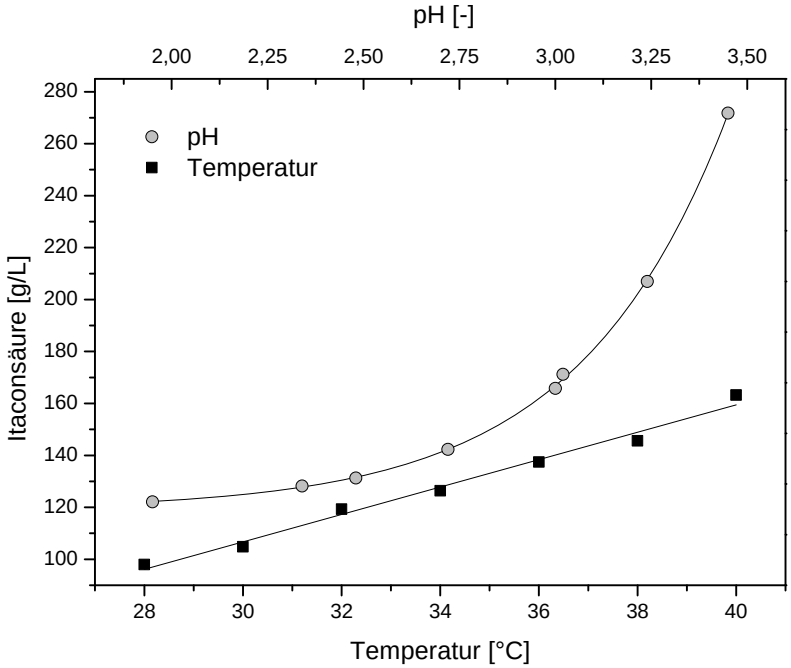

Abbildung 34: Maximale Itaconsäurelöslichkeit in zellfreier Fermentationsbrühe in Abhängigkeit vom pH-Wert (Temperatur 33 °C) und in Abhängigkeit von der Temperatur (pH 2,04).

Prozessoptimierung: pH-Regelung

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass ein einmaliger pH-Shift positive Auswirkungen auf die Itaconsäureendkonzentration hat. Dieser Effekt wird vermutlich durch die erhöhten pH-Wert am Ende der Kultivierung und somit die erhöhte Löslichkeit der Itaconsäure verursacht.
Um dies zu untersuchen, wurde ein pH-Shift auf pH 3 zu Beginn der Produktionsphase durchgeführt und dann auf pH 3 geregelt (Abbildung 35). Nach dem pH-Shift entsprach die maximale Produktivität mit 1,23 g/L/h dem des einmaligen pH-Shifts. Die Produktivität konnte allerdings länger aufrechterhalten werden, so dass nach 12,6 Tagen Kultivierung eine Konzentration von 146,1 g/L Itaconsäure erreicht wurde. Dies ist eine Steigerung in der Enkonzentration von 33 % zum einmaligen pH-Shift und um 68 % zur Referenzkultivierung. Durch den pH-Shift mit Regelung wurde außerdem die Ausbeute auf 0,59 (w/w) im Vergleich zum einmaligen pH-Shift und der Referenz mit 0,53 (w/w) gesteigert. Nach dem pH-Shift kam es auch hier zu einer Verfärbung der Fermenterbrühe. Diese führte von hellgelb über hellbraun zu rot-violett. Die Konzentration der Biotrockenmasse erhöhte sich nach dem pH-Shift mit Regelung nicht, sondern erreichte mit Werten von 8 g/L in etwa die Konzentration der Referenzkultivierung. Durch die hohen pH-Werte beim einmaligen pH-Shift lag der pH-Wert im Medium wahrscheinlich näher am optimalen pH-Wert für das Wachstum von *A. terreus*, wodurch mehr Biomasse gebildet wurde. Durch die pH-Regelung bei pH 3 konnte dies vermieden werden.
Diese hohen Itaconsäurekonzentrationen wurden nur dadurch erreicht, dass zuerst der pH-Wert frei fallen konnte und erst ab der Produktionsphase geregelt wurde. Bei einer pH-Regelung von Beginn der Kultivierung begann die Produktbildung nach 2 Tagen Kultivierung, jedoch mit einer sehr geringen Produktivität. So wurden nach 4,9 Tagen nur 17,1 g/L Itaconsäure gebildet.
Für die Itaconsäurebildung muss das Mycelium bei tiefen pH-Werten (pH 2) wachsen. Nach der Induktion der Produktbildung wird diese dann auch in höheren pH-Werten fortgeführt (pH 6)

(Larsen 1945). Daher war es wichtig die pH-Regelung erst nach Produktionsstart durchzuführen.

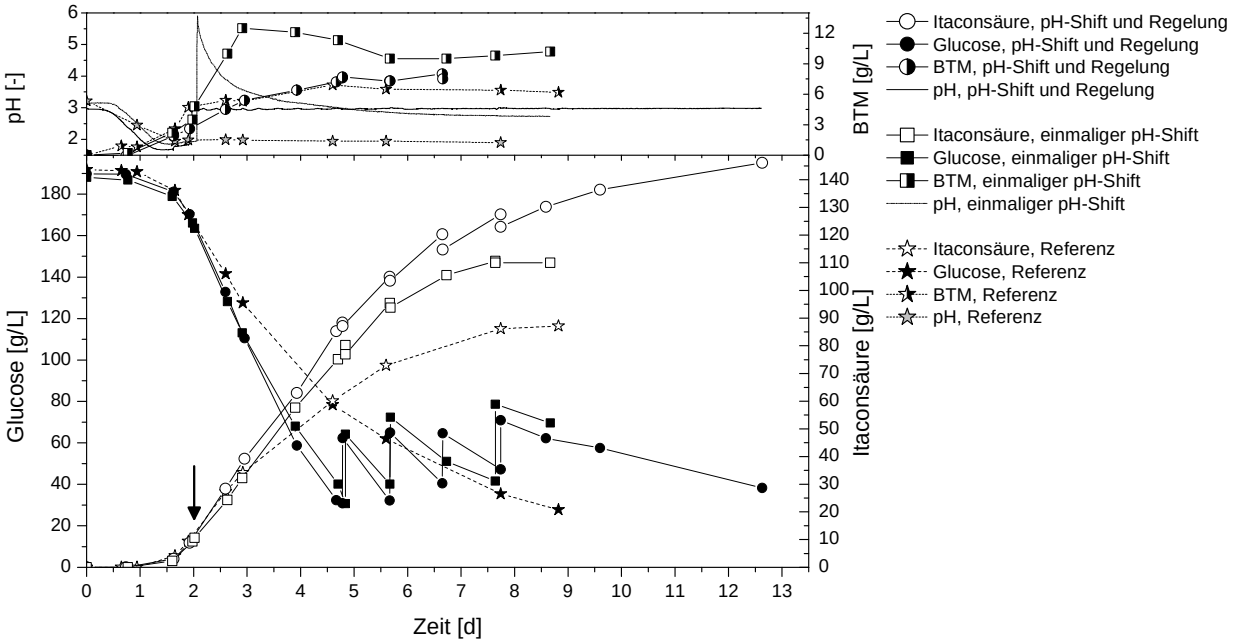

Abbildung 35: Einfluss eines pH-Shiftes auf pH 3 und anschließender Regelung auf pH 3 auf die Itaconsäurebildung mit *A. terreus*. Im Vergleich dazu ein einmaliger pH-Shift auf pH 6, sowie die Referenzkultivierung. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt des pH-Shifts an. Lauge: Ammoniaklösung (6,25 %), 1,5 L Bioreaktor, 470 rpm, 33 °C, Start pH 3,1.

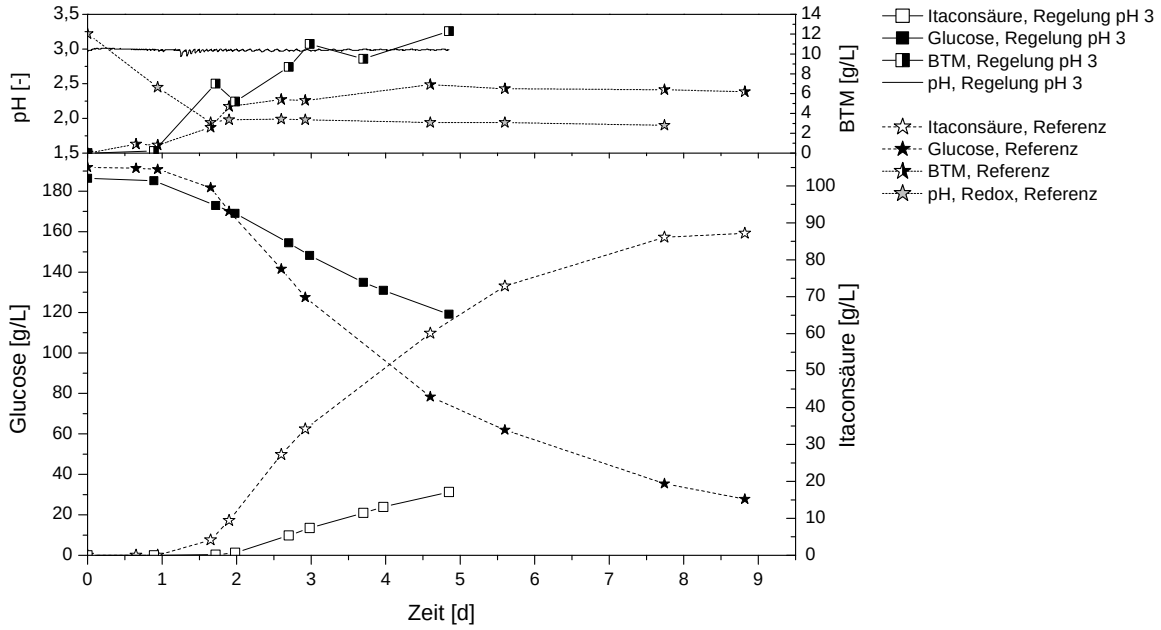

Abbildung 36: Einfluss einer pH-Regelung auf pH 3 auf die Itaconsäureproduktion mit *A. terreus*. 1,5 L Bioreaktor, 470 rpm, 33 °C.

Prozessoptimierung: Inokulumskonzentration

Die Variation der Sporenkonzentration für die Inokulation resultierte in einer Steigerung der erreichten Itaconsäurekonzentration um 11 % auf 85,1 g/L bei $2{,}5 \cdot 10^7$ Sporen/mL (Abbildung 37). Eine weitere Erhöhung der Sporenkonzentration führte jedoch zu einer Glucoselimitierung. Wie zuvor gezeigt, hatte eine Erhöhung der Glucosestartkonzentration einen negativen Einfluss auf die Itaconsäureproduktion, so dass dieses im Batch-Ansatz nicht weiter untersucht werden konnte und Untersuchungen in einem größeren Maßstab notwendig wären. Ein Anstieg der Biomasse in den Wells mit erhöhter Itaconsäurekonzentration, die mit dem Auge sichtbar war, war vermutlich die Ursache für die höheren Produktkonzentrationen. Da es sich wie bei der Erhöhung der KH_2PO_4-Konzentration (siehe AP 2.5) um die gleiche Ursache handelte, wurde dies nicht weiter untersucht.

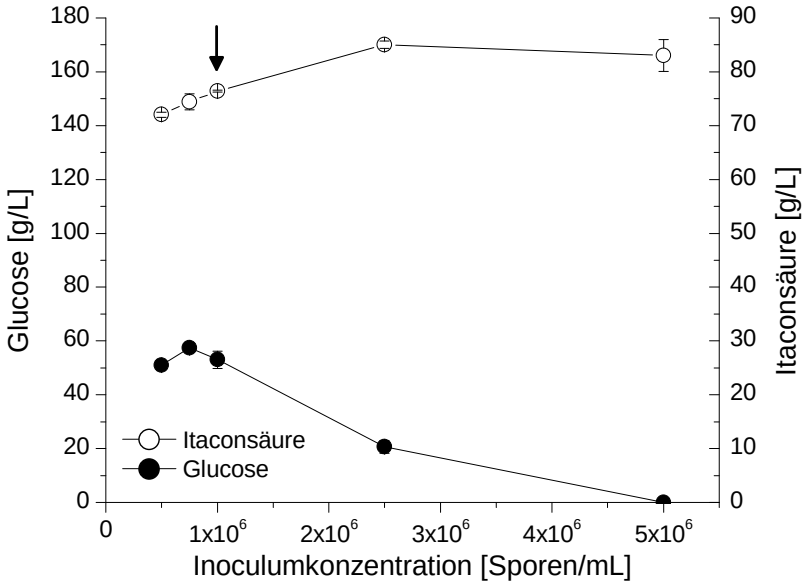

Abbildung 37: Einfluss der Inokulumskonzentration auf die Kultivierung von *A. terreus* für die Itaconsäurebildung. 96-Well Mikrotiterplatte, 7 Tage Kultivierung, Start pH 3,1.

Prozessoptimierung: Temperatur

Die Temperatur für die Kultivierung von *A. terreus* zur Itaconsäurebildung variiert in der Literatur von 30 °C (Yahiro, et al. 1995) über 35 °C (Riscaldati, et al. 2000) bis zu 40 °C (Yahiro, et al. 1997).

Der Einfluss der Temperatur wurde für die hier verwendeten Standardbedingungen durch die Kultivierung in Mikrotiterplatten untersucht (Abbildung 38). Nach 7 Tagen Kultivierung ergab sich ein Maximum in der Itaconsäurekonzentration bei 35 °C mit 75,8 g/L. Bei der bisherigen Standardtemperatur von 33 °C wurde mit 66,3 g/L Itaconsäure ähnlich viel Produkt gebildet wie bei 37 °C mit 65,1 g/L Itaconsäure.

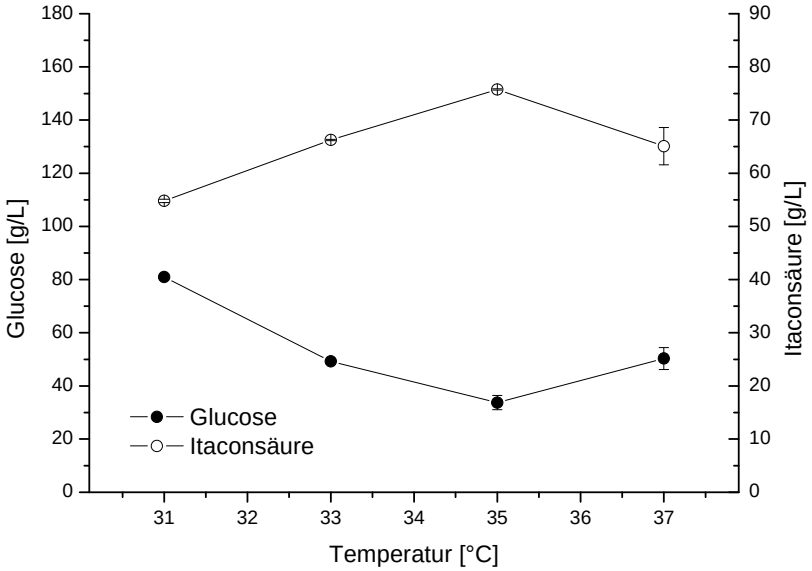

Abbildung 38: Einfluss der Temperatur bei der Kultivierung von *A. terreus* für die Itaconsäurebildung. 96-Well Mikrotiterplatte, 7 Tage Kultivierung, Start pH 3,1.

Kultivierung unter optimierten Bedingungen

Die zuvor optimierten Parameter für die Itaconsäureproduktion wurden in einem Versuch vereint: Submers gewonnene Sporen als Inokulum, 0,8 g/L KH_2PO_4 im Medium, pH-Shift mit Ammoniaklösung nach 2 Tagen Kultivierung auf pH 3 mit anschließender Regelung auf pH 3 und 35 °C Kultivierungstemperatur.

Die Sporen keimten früh aus, was am Abfall des pH-Wertes erkennbar war. Die Itaconsäurebildung begann nach 1 Tag Kultivierung und nach 1,7 Tagen wurde der pH-Shift mit anschließender Regelung auf pH 3 durchgeführt. Es wurden nach 4,7 Tagen Kultivierung eine Endkonzentration von 129,3 g/L Itaconsäure gebildet. Dies entspricht einer Produktivität von 1,15 g/L/h. Die Ausbeute lag mit 0,58 (w/w) über der Ausbeute der Referenzkultivierung mit 0,53 (w/w).

Die Biotrockenmassekonzentration erreichte nach 2,9 Tagen ihr Maximum mit 13,5 g/L und blieb hiernach konstant. Die Zunahme der Biotrockenmasse wurde durch die erhöhte Phosphatkonzentration verursacht. Diese korreliert Biotrockenmassebildung: während des Wachstums nahm sie stetig ab und blieb dann konstant, so dass es zu keiner Phosphatlimitierung kam. Der Stickstoffverbrauch war höher als bei der Referenzkultivierung. Ein absoluter Wert konnte nicht bestimmt werden, da sich durch die Titration mit Ammoniaklösung die Ammoniumkonzentration kontinuierlich erhöht wurde. Durch das verstärkte Biomassewachstum wurden 682 mg/L Nitrat verbraucht, so dass während der Kultivierung Ammoniumnitrat zum Medium hinzugegeben werden musste.

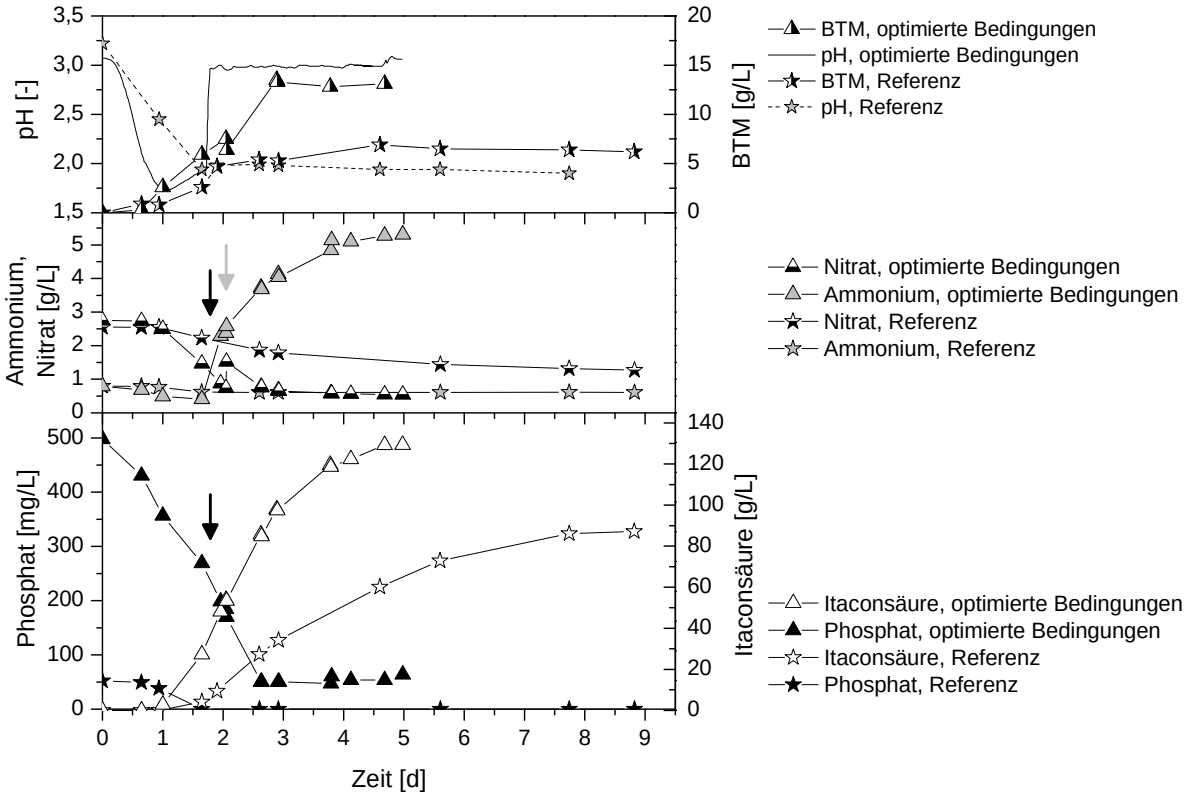

Abbildung 39: Kultivierung von *A. terreus* mit 0,8 g/L KH_2PO_4, pH-Shift und anschließender Regelung auf pH 3 (Ammoniaklösung) und submers gewonnenen Sporen als Inokulum zur Itaconsäureproduktion. Der schwarze Pfeil gibt den Zeitpunkt des pH-Shifts an, der graue Pfeil die Zugabe von Ammoniumnitrat ins Medium. 1,5 L Bioreaktor, 470 rpm, 35 °C, Start-pH 3,1.

AP 2.6: Extraktivfermentation

Bei Vorliegen einer Produkthemmung und/oder sich während der Fermentation ansammelnder Hemmstoffe wäre der Einsatz einer Extraktivfermentation sinnvoll. Laut Literatur und den eigenen Vorarbeiten im Bereich der fermentativen Itaconsäureherstellung waren bisher keine höheren Endkonzentrationen als 90 g/L Itaconsäure beschrieben und es wurde von einer Produkthemmung ausgegangen (Kuenz 2012).

Da innerhalb dieses Projektes, in AP 2.5, eine deutliche Konzentrationssteigerung von 87,2 g/L auf 146,1 g/L Itaconsäure erreicht wurde, ist eine deutliche Endkonzentrationssteigerung erzielt wurden und eine Extraktivfermentation wurde innerhalb dieser Projektlaufzeit nicht weiter verfolgt.

AP 3: Aufarbeitung der Itaconsäure

AP 3.1: Begleitende Analytik, Charakterisierung der Fermentationsbrühe

Die begleitende Analytik von Kultivierungsmedien und Fermentationsbrühen wurde wie folgt durchgeführt:

- Glucose, Itaconsäure und weitere organische Säuren wurden mit einer HPLC-Analytik getrennt und quantitativ bestimmt.

- Phosphat, Nitrat und Ammonium wurden über eine Anionen- und Kationenchromatographie quantitativ bestimmt.
- Spurenelemente: Die Konzentration der Spurenelemente im Czapek-Dox-Agar (AP 2.3) wurde über eine Inductively Coupled Plasma (ICP)-Bestimmung festgestellt.

AP 3.2: Abtrennung und Aufreinigung der Itaconsäure aus der Fermentationsbrühe

Neben den Kosten für die Rohstoffe und der Produktionsprozesse an sich hat auch die Aufarbeitung mit der gewünschten Reinheit des Produktes einen enormen Einfluss auf die Endkosten des Produkts. Innerhalb dieses Projektes wurde die Aufarbeitung der Itaconsäure (IA) mittels Kühlungskristallisation untersucht. Das Kristallisationsverhalten von Itaconsäure wurde hierbei in verschiedenen Modellösungen und realen Fermentationsbrühen bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht, mit Hinblick einer möglichst hohen Ausbeute. Weiterhin wurde in Hinblick auf eine industrielle Umsetzung die Fermentationsbrühe eingedampft um die Kristallisation von Itaconsäure aus einer stark übersättigten Lösung näher zu betrachten.

AP 3.3: Strategieentwicklung der Aufarbeitungswege

Kristallisation von IA-Modellösungen (100 g/L IA) bei -20 °C und 4 °C

Der Anteil an auskristallisierter Itaconsäure als Feststoff ist bei der Lagerung bei 4 °C mit 31,1 % höher als bei -20 °C mit 18,9 %. Der Feststoff lagerte sich bei -20 °C als Pulver an das Filterpapier und bei 4 °C bildeten sich kleine grobe, weiße Kristalle. Der Verlust mit 13,8 % (4 °C) und 14,7 % (-20 °C) entstand vermutlich, weil nicht der gesamte Feststoffanteil vom Reaktionsgefäß auf das Filterpapier gegeben werden konnte und kleinere Rückstände im Gefäß hafteten.

Kristallisation einer nachgebildeten Fermentationsbrühe

Die mengenmäßig meisten vorkommenden Komponenten des Mediums wurden mit 20 g/L Glucose·H_2O, 5 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 2 g/L NH_4NO_3 und 94,9 g/L Itaconsäure als nachgebildete Fermentationsbrühe eingewogen (Tabelle 4).

Tabelle 4: Anteile an IA im Feststoff, in der Flüssigkeit und Verlust bei der Kristallisation einer nachgebildeten Modellösung

Temperatur [°C]	*Anteil an IA im Feststoff [%]*	*Anteil an IA in Flüssigkeit [%]*	*Verlust [%]*
4	47,3	52,7	0
-20	39,2	60,1	0,71

Wie bei der Kristallisation der reinen IA-Modellösung erreichte der Feststoffanteil für die Kristallisation bei 4 °C mit 47,3 % einen höheren Wert als bei -20 °C mit 39,2 %. Die Ursache für

die bessere Ausbeute bei 4 °C im Vergleich zu -20 °C, obwohl eine höhere Löslichkeit des Produktes vorlag, könnte der zusätzliche Prozess des Gefrierens der Lösung bei -20 °C sein. Für die Abtrennung der Kristalle erfolgte für die Versuche bei -20 °C ebenfalls das Auftauen der Lösung. Weiterhin könnten sehr feine Kristalle während der Filtration durch das Filtermedium ins Filtrat gelangt sein. Diese könnten Gründe für die schlechtere Ausbeute bei -20 °C gewesen sein. Die zugegebenen Stoffe könnten für die Bildung von zusätzlichen Kristallisationskeimen verantwortlich gewesen sein und so eine verstärkte Kristallisation, vergleichend mit der reinen IA-Modellösung begünstigen.

Kristallisation von realen Fermentationsbrühen

Autoklavierte und zellfreie Fermentationsbrühe wurde, vergleichend zu den Kristallisationsversuchen der Modellösungen, bezüglich der Kristallisation von Itaconsäure bei 4 °C und -20 °C untersucht (Tabelle 5).

Tabelle 5: Anteile an IA im Feststoff, in der Flüssigkeit und Verlust bei der Kristallisation einer realen Fermentationsbrühe mit 83,4 g/L IA

Temperatur [°C]	*Anteil an IA im Feststoff [%]*	*Anteil an IA in Flüssigkeit [%]*	*Verlust [%]*
4	36,5	63,1	0,41
-20	27,8	71,8	0,37

Wie auch bei den vorigen Modellösungen wurde bei einer Kristallisationstemperatur von 4 °C eine höhere Feststoffausbeute erzielt, als bei -20 °C. Die geringeren erreichten Feststoffanteile, vergleichend zu den Modellösungen, könnten mit den zusätzlichen Komponenten sowie den gebildeten Metaboliten und lysierten Zellen in der realen Fermentationsbrühe und der geringeren IA Konzentration in der jeweiligen Ausgangslösung begründet werden. Das autoklavieren der Fermentationsbrühe könnte Komponenten der Brühe verändern was ebenfalls die anschließende Kristallisation beeinflussen könnte. Bei 4 °C entstanden bräunlich, orange Kristallplättchen. Die Reinheit der Kristalle bei 4 °C betrug 90,6 %. Aufgrund der geringen Menge an Feststoff bei -20 °C konnte keine Reinheitsbestimmung durchgeführt werden. Die Braunfärbung der Fermentationsbrühe erfolgte während des Autoklavierens, so dass hier bestimmte Stoffe in der Lösung entstanden sein könnten, die sich bei der späteren Kristallisation z.T. mit in die Kristalle einlagerten und so zur Verfärbung der Kristalle und der Unreinheit von 9,4 % führten.

Kristallisation von aufkonzentrierten Fermentationsbrühen

Eine reale Fermentationsbrühe wurde am Rotationsverdampfer auf eine Itaconsäurekonzentration von 138,3 g/L eingedampft. Im Gegensatz zu den bisherigen Beobachtungen stieg der Feststoffanteil bei diesem Versuch mit sinkender Kristallisationstemperatur. Die Kristallformen unterschieden sich voneinander:

- 20 °C: kleine hellbraune längliche Nadelkristalle
- 4 °C: dunkelbraune, rundliche größere Kristalle, teilweise zusammengewachsen
- -20 °C: pulverförmiges Kristallisat auf und im bräunlich verfärbten Filterpapier

Tabelle 6: Anteile an IA im Feststoff, in der Flüssigkeit und Verlust bei der Kristallisation einer realen aufkonzentrierten Fermentationsbrühe mit 139 g/L IA

Temperatur [°C]	*Anteil an IA im Feststoff [%]*	*Anteil an IA in Flüssigkeit [%]*	*Verlust [%]*
20	41,9	53,8	4,3
4	55,1	40,1	4,8
-20	60,3	37,5	2,2

Temperaturprofil bei Abkühlung hochkonzentrierter Itaconsäurefermenterbrühe

Dem Eindampfen der Fermentationsbrühe auf 390,8 g/L IA folgte die Kristallisation durch Abkühlung von ca. 65 auf 20 °C. Hierbei wurde der Temperaturverlauf aufgezeichnet und vergleichend mit dem von Wasser dargestellt.

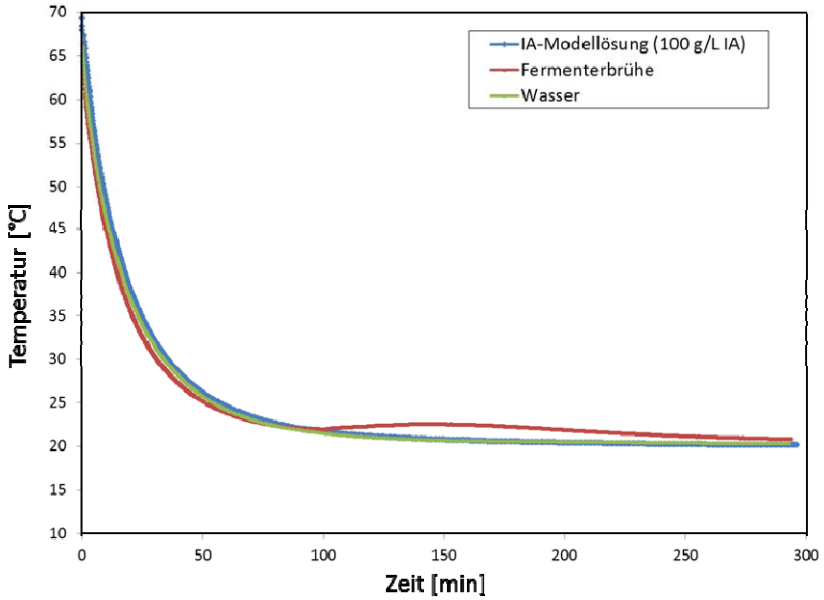

Abbildung 40: Temperaturprofil von Wasser, einer IA-Modellösung mit 100 g/L IA sowie einer realen Fermentationsbrühe von ca. 65 °C auf 20 °C

Zwischen den verschiedenen Lösungen ist bei dem Temperaturprofil bis 90 min und einer erreichten Temperatur von 22 °C kein Unterschied erkennbar (Abbildung 40). Im weiteren Verlauf kühlt Wasser und die IA-Modellösung auf 20 °C ab. Bei der hochkonzentrierten realen Fermentationsbrühe (390,8 g/L IA) beginnt während der Abkühlung die Kristallisation. Hierbei nimmt das System bis zu einer bestimmten Kristallgröße, kritische Keimgröße, Energie aus der Umgebung auf (Mersmann 2005). Wird diese Größe überschritten erfolgt die Abgabe der Energie in Form von Wärme, was im Temperaturprofil nach 100 min ersichtlich ist Wärme. Die Temperatur steigt nach 100 min erneut an, nimmt wieder ab und erreicht nach ungefähr 300 min ebenfalls 20 °C.

Tabelle 7: Anteile an IA im Feststoff, in der Flüssigkeit und Verlust bei der Kristallisation einer realen aufkonzentrierten Fermentationsbrühe mit 390,8 g/L IA

Temperatur [°C]	*Anteil an IA im Feststoff [%]*	*Anteil an IA in Flüssigkeit [%]*	*Verlust [%]*
20	60,4	35,8	3,8

Bei der Kristallisation der auf 390,8 g/L IA aufkonzentrierten Fermentationsbrühe ist der Anteil der IA im Feststoff mit 60 % im Vergleich zu den vorherigen Versuchen am höchsten. Die Reinheit der gewonnenen dunkelbraunen Kristalle betrug 87,2 %.

Meilensteine

In diesem Projekt sollten 3 Meilensteine erreicht werden. Für Meilenstein M1 sollte das Screening nach neuen Mikroorganismen, für Meilenstein M2 die Untersuchungen zur Sporulation abgeschlossen sein und für Meilenstein M3 sollte die Prozessoptimierung abgeschlossen sein (Tabelle 1).
Für M1 ist eine effiziente Methode zum Screening von *A. terreus* Mutanten entwickelt worden. Die Durchführung eines weiteren Screenings zur Steigerung der IA-Endkonzentration hat sich durch die Fortschritte in der Prozessoptimierung auf Konzentrationen von über 120 g/L unter den bisherigen Aspekten, innerhalb dieser Projektlaufzeit, als nicht notwendig erwiesen.
Zur Erfüllung von M2 wurde ein einfacher und effizienter Ansatz zur submersen Herstellung von Sporen gefunden. Dies ist ein sehr vielversprechender Weg, da die Sporen auch gute Produktionseigenschaften aufwiesen.
Zur Erfüllung von M3 wurde unter den neu gewonnen Aspekten der Medienoptimierung sowie der Optimierung physikalischer Parameter wie Temperatur und pH Wert nach 4,7 Tagen Kultivierung eine Endkonzentration von 129,3 g/L Itaconsäure gebildet. Hiermit wurde im Vergleich zur Literatur erstmals deutlich über 90 g/L Produkt gebildet und gleichzeitig die Fermentationsdauer verkürzt.

2.2 Verwertbarkeit der Ergebnisse

Gegenüber der Ausgangssituation vor Beginn des Projektes konnten bedeutende Fortschritte erzielt werden:

Mit der Kultivierung in 96-Well Mikrotiterplatten konnte ein einfaches geschütteltes System mit geringen Standardabweichungen im µl Maßstab, für den filamentös wachsenden Pilz *A. terreus,* etabliert werden, das sehr gute Vergleichbarkeit zur Kultivierung in den Schüttelkolben aufzeigt und sowohl Einsatz findet beim Screening, Mutation sowie bei der Prozessoptimierung. Mit diesem System wurde eine Medienoptimierung durchgeführt. Hierdurch konnte die maximale Produktivtät um das 2,6fache auf 2,78 g/L/h gesteigert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Phosphatlimitierung für die Induktion der Itaconsäurebildung nicht notwendig ist.
In dieser Projektlaufzeit sollten alternative Sporenherstellungsmethoden untersucht werden. Durch die Bildung von submersen Sporen durch einen pH-Shift konnte eine Methode gefunden

werden, bei der große Mengen an Sporen einfach hergestellt werden können. Die submers gewonnenen Sporen keimten bei einer Standardkultivierung deutlich schneller aus, als die Sporen aus Oberflächenkulturen. Die Itaconsäureproduktion setzt ca. einen ¾ Tag früher ein, im Vergleich mit Kultivierungen, die mit Oberflächensporen inokuliert wurden. Die Produktbildung verlief parallel und die Kultivierungen erreichten unabhängig von der Herstellungsmethode der Sporen die gleichen Endkonzentrationen. Somit wurde eine effiziente Methode der Sporenherstellung entwickelt, bei der eine hohe Sporenkonzentration erzielt wurde, während der Kultivierung die lag Phase verkürzt wurde und bei gleichbleibender Produktivität somit die Kultivierungsdauer verkürzt werden konnte.
Neben dem Effekt der submersen Sporenbildung konnte aufgezeigt werden, dass ein einmaliger pH-Shift eine positive Auswirkung auf die Itaconsäureendkonzentration hatte. Mit dieser neuen Strategie der Prozessführung wurde mit einem einmaligen pH-Shift 110 g/L Itaconsäure nach 7,6 Tagen Kultivierung gebildet.
Es hat sich gezeigt, dass mit zwei verschiedenen Prozessvarianten die biotechnische Itaconsäure Herstellung deutlich verbessert wird:

1. Führt man einen pH-Shift mit anschließender Regelung des pH-Wertes durch, wird bei längerer Kultivierungszeit, 12,6 Tagen, die Endkonzentration deutlich auf 146,1 g/L Itaconsäure gesteigert. Dies ist eine Steigerung in der Endkonzentration von 33 % zum einmaligen pH-Shift und um 68 % zur Referenzkultivierung. Durch den pH-Shift mit Regelung wurde außerdem die Ausbeute auf 0,59 (w/w) im Vergleich zum einmaligen pH-Shift und der Referenz mit 0,53 (w/w) gesteigert.
2. In einem Abschlussexperiment wurden die zuvor optimierten Parameter für die Itaconsäureproduktion vereint. Hierbei wurden nach 4,7 Tagen Kultivierung eine Endkonzentration von 129,3 g/L Itaconsäure gebildet. Dies entspricht einer Produktivität von 1,15 g/L/h. Die Ausbeute lag mit 0,58 (w/w) über der Ausbeute der Referenzkultivierung mit 0,53 (w/w).

Im Vergleich zur Ausgangssituation, 90 g/L IA nach 7 Tagen, wurde die Endkonzentration deutlich gesteigert, bei einer gleichzeitigen Verkürzung der Fermentationszeit, so dass die im Projekt gewonnenen Erkenntnisse von hohem wissenschaftlichem Wert sind.
Das Projekt hat gezeigt, dass die Übertragung in den µl Maßstab sehr erfolgreich machbar ist und gegenteilig zur aktuellen Literatur keine Phosphatlimitierung zur IA Produktion nötig ist und höhere Endkonzentration als 90 g/L mit einem natürlichen Pilz machbar sind.
Für eine zeitnahe technische Umsetzung des entwickelten Verfahrens mit den bisherigen sehr erfolgreichen und weiterhin vielversprechenden Ergebnissen ist ein weiterer Forschungsbedarf hinsichtlich der Nutzung von Agrarreststoffen nötig und ein hierfür unumgängliches Screening nach neuen Mikroorganismen mit dem im Projekt entwickelten Verfahren, um die Kosten des Prozesses weiter zu senken.

2.3 Relevante Ergebnisse Dritter

Während dieser Projektlaufzeit wurden folgende Patente erteilt:

- CAD WO2009014437A1 van der Werf, Maria Johanna (NL), beinhaltet die Aufklärung des codierenden Gens für das Enzym cis-Aconitat Decarboxylase (CAD), den Nachweis dass eine Überexpression dieses Enzyms von *Aspergillus* die IA Produktion ankurbelt

sowie die Methode der IA Produktion in einem geeignetes Wirtsstamm, durch die Überexpression des Enzyms CAD.

- EP 2 017 344 A1 van der Werf, Maria Johanna (NL): beinhaltet die Herstellung von Itaconsäure in eine geeignete Wirts-Zelle, die ein Gen für das Enzym (CAD) codiert, vorzugsweise abgeleitet von *A. terreus*. Verstärkung der IA-Produktion durch Einbringen eines Gens für das Enzym Aconitase und / oder Codierung des Enzyme 2-Methylcitrat Dehydratase. Weitere Teil der Erfindung sind Wirtszellen, vorzugsweise *A. niger* mit den oben genannten Genen.
- 2011: US 2011/0124066A1 Johannes Petrus Maria Jore (NL): beinhaltet die Aufklärung der Nukleotid Sequenz eines mitochondrialen tricarboxylic acid transporter, der für die IA Produktion genutzt werden kann. Wobei vorzugsweise das Transporter Protein das Protein ist, welches durch die Nukleinsäure, die auf einem Chromosom Segment von *Aspergillus terreus* ist. Dieses birgt auch andere Gene, die in der Itaconsäure Biosynthese involviert sind. Auch Vektoren, Hosts und transformierte Mikroorganismus sind Teil der Erfindung.

Während dieser Projektlaufzeit wurden folgende Reviews veröffentlicht:

- Klement, T., and J. Büchs. "Itaconic Acid - a Biotechnological Process in Change." [In English]. Bioresource Technology 135 (May 2013): 422-31. (Klement and Büchs2013):
- Steiger, Matthias G., Marzena L. Blumhoff, Diethard Mattanovich, and Michael Sauer. "Biochemistry of Microbial Itaconic Acid Production." Frontiers in microbiology 4 (2013): 23. (Steiger, et al. 2013):

Während dieser Projektlaufzeit wurden folgende Paper veröffentlicht:

- Klement, T., S. Milker, G. Jäger, P. M. Grande, P. D. de Maria, and J. Büchs. "Biomass Pretreatment Affects *Ustilago Maydis* in Producing Itaconic Acid." [In English]. Microbial Cell Factories 11 (Apr 5 2012).(Klement, et al. 2012)
- Li, An, Nina Pfelzer, Robbert Zuijderwijk, and Peter Punt. "Enhanced Itaconic Acid Production in *Aspergillus Niger* Using Genetic Modification and Medium Optimization." BMC biotechnology 12 (2012): 57.(Li, et al. 2012)

2.4 Erfolgte/geplante Veröffentlichungen

Im Rahmen des Projektes wurden folgende Veröffentlichungen getätigt:

Veröffentlichungen

Hevekerl, A., Kuenz A., Willke T., Vorlop K.-D. (2012) Filamentöse Pilze in Mikrotiterplatten – Ein effizienter Weg zur Optimierung der Itaconsäureproduktion mit Aspergillus terreus. Chemie Ingenieur Technik 84(8): 1198-1199.

Kuenz, A., Gallenmüller Y., Willke T., Vorlop K.-D. (2012) Microbial production of itaconic acid: developing a stable platform for high product concentrations. Applied Microbiology and Biotechnology, DOI: 10.1007/s00253-012-4221-y, 96(5): 1209-1216.

Kuenz A., Willke T. (2011) Natürliche Kunststoffe aus Zucker, Zuckerrübe 01/2011 (60. Jg.), 66, ISSN 0044-5398

Kongressbeiträge

Hevekerl, A., Kuenz A., Willke T., Vorlop K.-D. (2013) Biotechnological itaconic acid production – Time saving optimization. 9th ECCE 2nd ECAB. Poster,
The Hague, Netherlands.
http://www.eventure-online.com/eventure/publicSearch.do?action=save&congressId=6293

Kuenz A., Hevekerl A., Willke T., Vorlop K.-D. (2012) High level itaconic acid production with *Aspergillus terreus*. Symposium on Bio-based Production of Organic Acids (bbpoa2012), Book of Abstracts, P.10, p. 24, DECHEMA-House, Poster,
Frankfurt/Main.

Hevekerl, A., Kuenz A., Willke T., Vorlop K.-D. (2012) Filamentöse Pilze in Mikrotiterplatten – Ein effizienter Weg zur Optimierung der Itaconsäureproduktion mit *Aspergillus terreus*. ProcessNet-Jahrestagung und 30. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen. Vortrag,
Karlsruhe.

Kuenz A., Hevekerl A., Willke T., Vorlop K.-D. (2011) Reproducible itaconic acid production with a new isolated strain of *Aspergillus terreus*. 8th ECCE together with ProcessNet-Annual Meeting and 1st ECAB together with 29th DECHEMA Biotechnology Annual Meeting. Poster, Berlin.

2.5 Literaturverzeichnis

Projekte:

[P1] 95NR063-F - Biotechnologische Produktion von Itaconsäure aus nachwachsenden Rohstoffen

[P2] 22003999 - Verbundvorhaben: Entwicklung von Bindemitteln aus nachwachsenden Rohstoffen für Klebstoffe und Dichtmittel im Bau- und Wohnbereich

[P2] 22008203 - Verbundvorhaben: Itaconsäureherstellung aus nachwachsenden Rohstoffen als Ersatz für petrochemisch hergestellte Acrylsäure

[P4] 22028308B - Ganzheitliche Bewertung eines biotechnologischen Prozesses zur Herstellung von Butanol aus agrarischen Rest- oder Rohstoffen - Phase 2

Patente:

Hashimoto, K. Shiray Y. Tanigaki M. Japan, 1989. JP-Patent 01 296 977.

Jarry, Seraudie (1997): Production of itaconic acid by fermentation. US Patent 5.637.485 (Rhone-Poulenc)

Kane, Finlay, Amana (1945): Production of itaconic acid. US Patent 2.385.283 (Pfizer)

Specht, R., A. Aurich, E. Kreys, G. Barth, C. Bodinus (2009): Verfahren zur biotechnischen Herstellung von Produkten. Patent: DE102008011854A1

Tsui, Huang, Lin, Su (2001): Method for the production of itaconic acid using Aspergillus terreus solid state fermentation. US Patent 6.171.831 (National Science Council, Taiwan

Verwendete Literatur:

Abdel-Rahim, Awad M, and Hassan A Arbab. "Factors Affecting Spore Germination in Aspergillus Niger." *Mycopathologia* 89, no. 2 (1985): 75-79.

Anderson, JG, and JE Smith. "The Production of Conidiophores and Conidia by Newly Germinated Conidia of Aspergillus Niger (Microcycle Conidiation)." *Journal of General Microbiology* 69, no. 2 (1971): 185-97.

Bonnarme, P., B. Gillet, A. M. Sepulchre, C. Role, J. C. Beloeil, and C. Ducrocq. "Itaconate Biosynthesis in Aspergillus-Terreus." *Journal of Bacteriology* 177, no. 12 (1995): 3573-78.

Broderick, AJ, and RN Greenshields. "Sporulation of Aspergillus Niger and Aspergillus Ochraceus in Continuous Submerged Liquid Culture." *Journal of General Microbiology* 126, no. 1 (1981): 193-202.

Cameselle, C, JT Bohlmann, MJ Nunez, and JM Lema. "Oxalic Acid Production by Aspergillus Niger." *Bioprocess Engineering* 19, no. 4 (1998): 247-52.

Eimhjellen, K. E., et al. (1955). "Mechanism of Itaconic Acid Formation by Aspergillus-Terreus .2. Effect of Substrates and Inhibitors." Biochemical Journal 60(1-4): 139-147.

Futamura, Takafumi, Mitsuyasu Okabe, Takayoshi Tamura, Kyouko Toda, Toshio Matsunobu, and Yong Soo Park. "Improvement of Production of Kojic Acid by a Mutant Strain Aspergillus Oryzae, Mk107-39." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91, no. 3 (2001): 272-76.

Gyamerah, M. H. "Oxygen Requirement and Energy Relations of Itaconic Acid Fermentation by Aspergillus Terreus Nrrl 1960." *Applied Microbiology and Biotechnology* 44, no. 1-2 (1995): 20-26.

Jahn, Bernhard, Edith Martin, Annette Stueben, and Sucharit Bhakdi. "Susceptibility Testing of Candida Albicans and Aspergillus Species by a Simple Microtiter Menadione-Augmented 3-(4, 5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2, 5-Diphenyl-2h-Tetrazolium Bromide Assay." *Journal of Clinical Microbiology* 33, no. 3 (1995): 661-67.

Kinoshita, K. "Šber Die Produktion Von Itacons„Ure Und Mannit Durch Einen Neuen Schimmelpilz, Aspergillus Itaconicus ". *Acta Phytochimica* 5 (1932): 271-87.

Klement, T., and J. Büchs. "Itaconic Acid - a Biotechnological Process in Change.". *Bioresource Technology* 135 (May 2013): 422-31.

Klement, T., S. Milker, G. Jäger, P. M. Grande, P. D. de Maria, and J. Büchs. "Biomass Pretreatment Affects Ustilago Maydis in Producing Itaconic Acid.". *Microbial Cell Factories* 11 (Apr 5 2012).

Kubicek, CP, G Schreferl-Kunar, W Wöhrer, and M Röhr. "Evidence for a Cytoplasmic Pathway of Oxalate Biosynthesis in Aspergillus Niger." *Applied and Environmental Microbiology* 54, no. 3 (1988): 633-37.

Kuenz, A. "Itaconsäureherstellung Aus Nachwachsenden Rohstoffen Als Ersatz Für Petrochemisch Hergestellte Acrylsäure." Naturwissenschaftliche Fakultät der Technischen Universität Braunschweig, 2008.

Kuenz, Anja, Yvonne Gallenmüller, Thomas Willke, and Klaus-Dieter Vorlop. "Microbial Production of Itaconic Acid: Developing a Stable Platform for High Product Concentrations.". *Applied Microbiology and Biotechnology* 96, no. 5 (2012/12/01 2012): 1209-16.

Larsen, H, and KE Eimhjellen. "The Mechanism of Itaconic Acid Formation by Aspergillus Terreus. 1. The Effect of Acidity." *Biochemical Journal* 60, no. 1 (1955): 135.

Levinson, W. E., C. P. Kurtzman, and T. M. Kuo. "Production of Itaconic Acid by Pseudozyma Antarctica Nrrl Y-7808 under Nitrogen-Limited Growth Conditions." *Enzyme and Microbial Technology* 39, no. 4 (2006): 824-27.

Li, An, Nina Pfelzer, Robbert Zuijderwijk, and Peter Punt. "Enhanced Itaconic Acid Production in Aspergillus Niger Using Genetic Modification and Medium Optimization." *BMC biotechnology* 12 (2012): 57.

Mersmann, Alfons. *Thermische Verfahrenstechnik: Grundlagen Und Methoden*. Springer - Verlag, 2005.

Nakahara, T., H. Kawashima, T. Sugisawa, Y. Takamori, and T. Tabuchi. "Induction and Characterization of Mutants Enhanced in Assimilability of Normal-Alkanes in Shake Cultures from a Strain of Candida Sp." *Journal of Fermentation Technology* 61, no. 1 (1983): 19-23.

Okabe, M., D. Lies, S. Kanamasa, and E. Y. Park. "Biotechnological Production of Itaconic Acid and Its Biosynthesis in Aspergillus Terreus." *Applied Microbiology and Biotechnology* 84, no. 4 (2009): 597-606.

Park, Y. S., N. Ohta, and M. Okabe. "Effect of Dissolved-Oxygen Concentration and Impeller Tip Speed on Itaconic Acid Production by Aspergillus-Terreus." *Biotechnology Letters* 15, no. 6 (1993): 583-86.

Pfizer. *Itaconsäure*. Pfizer GmbH Karlsruhe, 1972.

Riscaldati, E., M. Moresi, F. Federici, and M. Petruccioli. "Effect of Ph and Stirring Rate on Itaconate Production by Aspergillus Terreus." *Journal of Biotechnology* 83, no. 3 (2000): 219-30.

Roehr, M., and C. Kubicek. "Products of Primary Metabolism ". In *Biotechnology*, edited by Rehm, Reed, P hler and Stadler, 307 -45. Weinheim, New York, Cambridge, Tokyo VCH-Verlag, 1996.

Röhr, M., C. P. Kubicek, and J. Kominek. "Industrial Acids and Other Small Molecules." In *Bennet, J.W.; Klich, M.A. (Eds.) Aspergillus : Biology and Industrial Applications* 91-131. Boston, Butterworth-Heinemann, 1992.

Rüdiger, C. "Synthesen Und Untersuchungen Zum Polymerisationsverhalten Von Itacons„Urederivaten." Wuppertal, Bergische Universität Gesamthochschule Wuppertal, Fachbereich Chemie, 2000.

Rychtera, M., and D. A. J. Wase. "The Growth of Aspergillus-Terreus and the Production of Itaconic Acid in Batch and Continuous Cultures - the Influence of Ph." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 31, no. 8 (1981): 509-21.

Steiger, Matthias G., Marzena L. Blumhoff, Diethard Mattanovich, and Michael Sauer. "Biochemistry of Microbial Itaconic Acid Production." *Frontiers in microbiology* 4 (2013): 23.

Tabuchi, T., T. Sugisawa, T. Ishidori, T. Nakahara, and J. Sugiyama. "Itaconic Acid Fermentation by a Yeast Belonging to the Genus Candida." *Agricultural and Biological Chemistry* 45, no. 2 (1981): 475-79.

Tawara, Shuichi, Fumiaki Ikeda, Katsuyuki Maki, Yoshihiko Morishita, Kazumi Otomo, Noriko Teratani, Toshio Goto*, et al.* "In Vitro Activities of a New Lipopeptide Antifungal Agent, Fk463, against a Variety of Clinically Important Fungi." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, no. 1 (2000): 57-62.

Vézina, Claude, Kartar Singh, and SN Sehgal. "Sporulation of Filamentous Fungi in Submerged Culture." *Mycologia* 57, no. 5 (1965): 722-36.

Willke, Thomas, and K. D. Vorlop. "Biotechnological Production of Itaconic Acid." *Applied Microbiology and Biotechnology* 56, no. 3-4 (2001): 289-95.

Willke, Thomas, K. Welter, and K. D. Vorlop. "Biotechnological Production of Itaconic Acid from Sugar." *Zuckerindustrie* 126, no. 6 (2001): 444-47.

Winskill, N. "Tricarboxylic-Acid Cycle Activity in Relation to Itaconic Acid Biosynthesis by Aspergillus-Terreus." *Journal of General Microbiology* 129, no. SEP (1983): 2877-83.

Yahiro, K., T. Takahama, S. R. Jai, Y. S. Park, and M. Okabe. "Comparison of Air-Lift and Stirred Tank Reactors for Itaconic Acid Production by Aspergillus Terreus." *Biotechnology Letters* 19, no. 7 (1997): 619-21.

Yahiro, K., T. Takahama, Y. S. Park, and M. Okabe. "Breeding of Aspergillus-Terreus Mutant Tn-484 for Itaconic Acid Production with High-Yield." *Journal of Fermentation and Bioengineering* 79, no. 5 (1995): 506-08.