



Universität für Bodenkultur Wien
University of Natural Resources
and Life Sciences, Vienna

Produktion von Squalen in *Aurantiochytrium limacinum* SR21

Masterarbeit

Eingereicht von Sonja Hiller Bakk. techn.

Betreuer: ao.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr. Peter Holubar, MBA

Department für Biotechnologie
Institut für Angewandte Mikrobiologie

Wien, Mai 2013

Danksagung

Ich danke meinen Eltern Hannelore und Ewald Hiller für die andauernde Unterstützung während der gesamten Studienzeit. Ihr Glaube an ihre Kinder und sich selbst ist eine Quelle ständiger Inspiration und Kraft.

Besonderer Dank gilt dem Betreuer dieser Arbeit, Herrn Prof. Peter Holubar. Durch die Bereitstellung seines wissenschaftlichen Know-hows und der fachkundigen Expertenmeinung inspirierte er mit neuen Ideen und Denkansätzen. Auch für das stets freundliche Arbeitsklima und die Zurverfügungstellung aller Materialien und Geräte bin ich sehr dankbar.

Nicht unerwähnt bleiben sollen Katarzyna Kowalczyk und Magda Rogala, die während ihres dreimonatigen Erasmuspraktikums tatkräftig in der praktischen Durchführung einiger Versuche mithalfen.

Ferner möchte ich mich bei meinem Freund Sascha bedanken, der immer für mich da ist und eine nicht wegzudenkende Stütze in allen Lebenslagen ist.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	V
Resümee.....	X
Abstract.....	XI
Abkürzungen.....	XII
1 Einleitung.....	1
1.1 Squalen.....	2
1.1.1 Squalen als Antioxidans.....	3
1.1.2 Squalen als Nahrungsergänzungsmittel.....	4
1.1.3 Verwendung von Squalen als Adjuvans.....	5
1.2 Squalenproduzierende Organismen.....	5
1.2.1 Squalen in tierischen und menschlichen Zellen.....	5
1.2.2 Squalen in Pflanzen.....	6
1.2.3 Squalen in Mikroorganismen.....	6
1.3 Thraustochytriden.....	8
1.4 <i>Aurantiochytrium limacinum</i> SR21.....	9
1.4.1 Lebenszyklus von <i>Aurantiochytrium limacinum</i> ssp.....	9
2 Zielsetzung.....	13
3 Material und Methoden.....	15
3.1 Herkunft.....	16
3.2 Konservierung und Erstellen einer Forschungszellbank (RCB).....	16
3.3 Angewendete Kultivierungsmethoden.....	17
3.4 Kulturmedien.....	18
3.4.1 Künstliches Meerwasser (Artificial Seawater; ASW).....	18
3.4.2 Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphorquellen.....	19
3.4.3 Methyljasmonatstammlösung nach Yue und Jiang, (2009).....	21
3.5 Versuche in Schüttelkolben.....	21
3.5.1 Vorbereitung des Inokulums.....	22
3.5.2 Medienvorbereitung.....	23
3.5.3 Bedingungen.....	23
3.5.4 Probenahme.....	24

3.5.5	Ernte der Kulturen.....	25
3.6	Fed-Batch Fermentation	26
3.6.1	Inokulum.....	26
3.6.2	Medium.....	27
3.6.3	Vorbereitungen	28
3.6.4	Probenahme	28
3.6.5	Nach der Fermentation	29
3.7	Analytik.....	30
3.7.1	Squalenbestimmung	30
3.7.1.1	Gefriertrocknung.....	30
3.7.1.2	Squalenextraktion mit Hexan	31
3.7.1.3	GC-MS Messung	32
3.7.1.4	GC-FID Messung.....	33
3.7.2	Berechnung der Produktparameter	34
3.7.2.1	Squalengehalt.....	34
3.7.2.2	Produktbildungsrate Q_p	35
3.7.3	Gravimetrische Bestimmung der Biotrockensubstanz (BTS).....	35
3.7.4	Berechnung der Wachstumsparameter.....	36
3.7.4.1	Biomassekonzentration x	36
3.7.4.2	Berechnung der Gesamtbiomasse X	36
3.7.4.3	Berechnung der spezifischen Wachstumsrate μ	36
3.7.5	Nicht-freisetzbarer organischer Kohlenstoffgehalt (NPOC) und Gesamtstickstoffgehalt (TN).....	37
3.7.6	Kohlenhydratanalyse mittels HPLC.....	40
3.7.7	Bestimmung des pH-Wertes	41
3.7.8	k_La -Wertbestimmung.....	41
3.7.8.1	Berechnung des k_La -Wertes	44
4	Versuche und Ergebnisse.....	47
4.1	Kalibrationsgeraden.....	48
4.1.1	GC-MS.....	48
4.1.2	GC-FID	48
4.2	Versuche in 500 ml Schüttelkolben	49

4.2.1	Wachstum bei verschiedenen Glukosekonzentrationen und Füllvolumina ohne zusätzlicher Stickstoffquelle im Batchversuch (Versuch A-F).....	49
4.2.1.1	Zielsetzung	49
4.2.1.2	Inokulum und Medienzusammensetzung	49
4.2.1.3	Biomassekonzentration	50
4.2.1.4	Restsubstratanalyse.....	52
4.2.1.5	pH-Wert	53
4.2.2	Wachstum bei verschiedenen Glukosekonzentrationen und Füllvolumina mit zusätzlicher Stickstoffquelle im Batchversuch (Versuch G-L).....	53
4.2.2.1	Zielsetzung	53
4.2.2.2	Inokulum und Medienzusammensetzung	54
4.2.2.3	Biomassekonzentration	54
4.2.2.4	Restsubstratanalyse.....	56
4.2.2.5	pH-Wert	57
4.2.3	Bestimmung der Squalenproduktionsdauer im Batchversuch.....	58
4.2.3.1	Zielsetzung	58
4.2.3.2	Inokulum und Medienzusammensetzung	58
4.2.3.3	Biomassekonzentration	59
4.2.3.4	Squalenbestimmung	59
4.2.4	Repeated Batchversuch mit gleichbleibender und steigender Medienkonzentration (Kultur R-T).....	60
4.2.4.1	Zielsetzung	60
4.2.4.2	Inokulum und Medienzusammensetzung	60
4.2.4.3	Biomassekonzentration	62
4.2.4.4	Restsubstratanalyse.....	63
4.2.4.5	pH-Wert	64
4.2.4.6	Squalenbestimmung	64
4.2.5	Repeated Batchversuch mit steigender Medienkonzentration und unterschiedlicher YEP-Konzentration im Ausgangsmedium (Kultur SN, SP).....	66
4.2.5.1	Zielsetzung	66
4.2.5.2	Inokulum und Medienzusammensetzung	66
4.2.5.3	Biomassekonzentration	67
4.2.5.4	Restsubstratanalyse.....	68

4.2.5.5	pH-Wert.....	70
4.2.5.6	Squalenbestimmung.....	70
4.2.6	Batch und Repeated Batchversuch mit Zugabe von Methyljasmonat (Kultur MJ1-MJ4).....	72
4.2.6.1	Zielsetzung.....	72
4.2.6.2	Inokulum und Mediumzusammensetzung.....	72
4.2.6.3	Biomassekonzentration.....	73
4.2.6.4	Restsubstratanalyse.....	74
4.2.6.5	pH-Wert.....	75
4.2.6.6	Squalenbestimmung.....	75
4.2.7	Repeated Batchversuch mit steigender Medienkonzentration und MJA (Kultur MN1-MN2).....	77
4.2.7.1	Zielsetzung.....	77
4.2.7.2	Inokulum und Medienzusammensetzung.....	77
4.2.7.3	Biomassekonzentration.....	78
4.2.7.4	Restsubstratanalyse.....	79
4.2.7.5	pH-Wert.....	80
4.2.7.6	Squalenbestimmung.....	81
4.2.8	Viabilitätskontrolle.....	83
4.2.8.1	Zielsetzung.....	83
4.2.8.2	Inokulum und Medienzusammensetzung.....	83
4.2.8.3	Biomassekonzentration.....	83
4.3	Versuche in 2000 ml Kolben.....	84
4.3.1	Batchversuch mit und ohne Licht (Kultur A, B).....	84
4.3.1.1	Zielsetzung.....	84
4.3.1.2	Inokulum und Medienzusammensetzung.....	84
4.3.1.3	Biomassekonzentration.....	84
4.3.1.4	Restsubstratanalyse.....	85
4.3.1.5	pH-Wert.....	86
4.3.2	Batchkultur und repeated Batch (Kultur M, N, O).....	87
4.3.2.1	Zielsetzung.....	87
4.3.2.2	Inokulum und Medienzusammensetzung.....	87
4.3.2.3	Biomassekonzentration.....	88

4.3.2.4	Restsubstratanalyse.....	88
4.3.2.5	pH-Wert	89
4.3.2.6	Squalenbestimmung	89
4.4	Fermentation.....	91
4.4.1	Prozessparameter.....	91
4.4.2	Start der Zugabe des Feed Mediums	91
4.4.3	Biomassekonzentration	91
4.4.4	Reaktorvolumen.....	92
4.4.5	Restsubstratanalyse.....	93
4.4.6	Squalenbestimmung	95
4.5	k_La -Wert-Bestimmung	97
4.5.1	k_La - Wert.....	97
4.5.2	Relevanz des k_La -Wertes für biotechnologische Prozesse.....	98
4.5.3	Ergebnisse	98
5	Diskussion.....	101
5.1	Wahl der Kohlenstoffquelle	102
5.2	Zusätzliche Stickstoffquelle Ammoniumnitrat	102
5.3	Füllvolumen 500 ml Kolben	105
5.4	Biomassekonzentration	105
5.4.1	Biomassewachstum im repeated Batch Verfahren	109
5.4.2	Biomassewachstum im Fermenter	112
5.5	Squalengehalt	113
5.5.1	Squalenproduktionsdauer	115
5.5.2	Auswirkungen des Enzymverstärkers MJA.....	115
5.5.3	Squalenproduktion im Bioreaktor	117
5.6	Abschließende Bemerkungen	118
6	Zusammenfassung.....	119
7	Literatur.....	123
	Formeln und Berechnungen.....	130
	Abbildungen	130
	Tabellen	131
	Diagramme	133

Resümee

Aurantiochytrium limacinum SR21 gehört zu der Gruppe der Thraustochytriden, einzelligen Meeresprotisten, die sich vorwiegend von abgestorbenem Pflanzenmaterial ernähren. Der Stamm ist ein hervorragender Produzent von DHA (Docosahexaensäure) und anderen Omega-3-Fettsäuren. Des Weiteren ist er in der Lage, ca. 50 % der Lipide in Squalen umzuwandeln, ein Triterpen, das antitumorale Wirkung hat und auch in der Nahrungsmittelindustrie, in Kosmetika und als Impfadjuvans Anwendung findet.

In der vorliegenden Arbeit kamen verschiedene Kultivationsmethoden zur Anwendung. Neben der Batchkultur haben sich die periodische Satzkultur und die Fed-Batch-Fermentation als sehr effiziente Prozesse erwiesen.

In den ersten Versuchen wurden das optimale Füllvolumen von 200 ml für 0,5 l Schüttelkolben und eine Glukosekonzentration von 20 g l⁻¹ im Batchbetrieb festgelegt. Die Nährstoffversorgung mit Stickstoff wurde über Hefeextrakt und Pepton aus Kasein (YEP) sowie Ammoniumnitrat gesichert. Zur Überprüfung der Sauerstoffversorgung im Schüttelkolben wurden die k_La-Werte bestimmt, die zwischen 21,6 und 45,3 h⁻¹ lagen. Im Batchprozess konnte eine Biomassekonzentration von circa 5-6 g l⁻¹ angehäuft werden. Diese Werte konnten auch mit repeated batch Kulturen erzielt werden, die mit Medium mit gleichbleibender Nährstoffkonzentration ergänzt wurden.

Bei periodischen Satzkulturen (= repeated batch) in Schüttelkolben, bei denen eine Ergänzung mit Medium ansteigender Nährstoffkonzentration stattfand, stieg die BTS-konzentration auf circa 14-16 g l⁻¹. Es konnte genug Probenmaterial angehäuft werden um regelmäßige Squalenbestimmungen durchzuführen. Während der Fed-Batch Fermentation im 10 l Bioreaktor wurden nach einer Kultivierungsdauer von 71 Stunden 104 g Biomasse bzw. circa 15 g l⁻¹ akkumuliert.

Die Extraktion von Squalen aus dem getrockneten und verseiften Zellpellet erfolgte mittels n-Hexan. Die Hexanfraktion wurde anschließend mit Hilfe der GC-FID Messung analysiert und der Squalengehalt quantifiziert.

Der höchste Squalengehalt von 4,73 mg Squalen g⁻¹ Biotrockenmasse wurde in Kultur SP festgestellt. Dabei handelte es sich um eine repeated Batchkultur, die einen Gehalt von 0,4 % YEP im Startmedium besaß.

Zu den Zeitpunkten von 45,5 und 60,3 Stunden nach Inokulation der Fed-Batch Fermentation konnte ein maximaler Squalengehalt von 0,38 mg g⁻¹ gemessen werden. Die im Reaktor akkumulierte Squalenmenge betrug zu Ende der Fermentation 19,73 mg, die mit einer Produktbildungsrate von 0,43 mg h⁻¹ produziert wurde.

Die Zugabe des Enzymverstärker Methyljasmonat (MJA) erhöhte den Squalengehalt in repeated Batchkulturen gering. Batchkulturen, die mit MJA versetzt wurden, konnten nicht positiv auf Squalen getestet werden.

Neben der Bestimmung von Biotrockenmasse und Squalengehalt wurde in den Kulturen das Restsubstrat auf NPOC (nichtfreisetzbarer organischer Kohlenstoff) und TN (Gesamtstickstoff) untersucht. Proben der Fed-Batch Fermentation wurden zusätzlich einer Messung der Restglukosekonzentration unterzogen.

Abstract

Aurantiochytrium limacinum SR21, a unicellular marine protist which primarily feeds on dead plant material, is a member of thraustochytrid group. The strain is an excellent producer of DHA (docosahexaenoic acid) and other omega-3 fatty acids. It is capable of converting about 50% of the lipids into squalene, a triterpene which has shown anti-tumor activity, and is also being used in the food industry, in cosmetics and as adjuvant in vaccines.

In this study different cultivation methods were applied. In addition to batch culture cultivation, repeated batch and fed-batch fermentation processes have been proven to be highly efficient.

The initial experiments defined the optimal filling volume of 200 ml for 0.5 l shake flasks and a glucose concentration of 20 g l⁻¹ in batch mode. The nutrient supply of nitrogen was secured by yeast extract and peptone from casein (YEP), and ammonium nitrate. To examine the oxygen supply in the shake flasks, $k_L a$ values were determined, which were found to be between 21.6 and 45.3 h⁻¹.

During the batch process a biomass concentration (CDW) of about 5-6 g l⁻¹ accumulated. Repeated batch cultures that were supplemented in medium with constant nutrient concentration achieved the same biomass concentration.

CDW of repeated batch processes in shake flasks, where medium supplement contained an increasing nutrient concentration, rose to approximately 14-16 g l⁻¹. This way enough sample material could be accumulated to conduct squalene analyses in periodical intervals. After a cultivation period of 71 hours, 104 g of biomass (about 15 g l⁻¹ CDW) were accumulated during the fed-batch fermentation in a 10 l bioreactor.

The extraction of squalene from dried and saponified cell pellets was performed with n-hexane. Analysis and quantification of squalene in the hexane fraction took place via GC-FID measurement.

The highest squalene content of 4.73 mg squalene g⁻¹ dry biomass was detected in culture SP, which was a repeated batch culture that contained a level of 0.4% YEP in the start medium.

After 45.5 and 60.3 hours after inoculation of the fed-batch fermentation a maximum squalene content of 0.38 mg g⁻¹ could be measured. The final amount of squalene accumulated in the reactor was 19.73 mg, which was produced at a product formation rate of 0.43 mg h⁻¹.

The addition of the enzyme enhancer methyl jasmonate (MJA) led to a slight increase of squalene content in repeated batch cultures. Batch cultures that were treated with MJA could not be tested positive for squalene.

Besides the determination of CDW and squalene, residual substrate parameters such as NPOC- (non purgeable organic carbon) and TN content (total nitrogen) were examined. Samples taken from the fed batch fermentation were, in addition, subjected to residual glucose determination.

Abkürzungen

<i>A. limacinum</i>	<i>Aurantiochytrium limacinum</i> SR21	
μ	Spezifische Wachstumsrate [h^{-1}]	
μ_{max}	Maximale spezifische Wachstumsrate [h^{-1}]	
ASW	Künstliches Meerwasser	Artificial sea water
ATCC	Amerikanische Stammsammlung	American Type Culture Collection
BTS, x, CDW	Biotrockensubstanz, Biomassekonzentration [g l^{-1}]	cell dry weight [g l^{-1}]
dH ₂ O	Steriles Wasser	
DHA	Docosahexaensäure	Docosahexaenoic acid
DMSO	Dimethylsulfoxid	
GC-FID	Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor	
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie	
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	High performance liquid chromatography
$k_{\text{L}}a$	Volumenbezogener Stoffübergangskoeffizient	
MJA	Methyljasmonat	
NPOC	Nichtfreisetzbarer organischer Kohlenstoff	Non-purgeable organic carbon
p.A.	Analysenrein	pro analysi
PUFA	Mehrfach ungesättigte Fettsäure	Poly unsaturated fatty acid
RCB	Forschungszellbank	Research cell bank
RO-H ₂ O	Mittels Umkehrosmose gereinigtes Wasser	Water from reverse osmosis
rpm	Umdrehungen pro Minute	Rounds per minute
TN	Gesamtstickstoff	Total nitrogen
X	Gesamtbiomasse [g]	Maximum biomass concentration [g]
YEP	Hefeextrakt und Pepton aus Casein	Yeast extract and peptone from casein

1 Einleitung

1.1 Squalen

Squalen (2,6,10,15,19,23-hexamethyl-6,6,10,14,18,20-tetracosahexan) ist ein mehrfach ungesättigter triterpener, symmetrischer Kohlenwasserstoff aus 30 C-Atomen, der sechs Doppelbindungen und sechs 2-methyl-2-Penten Einheiten enthält (Kohno et al., 1995).

In der Natur kommen viele andere Substanzen vor, die mehrere Prenylgruppen enthalten und Squalen strukturell ähnlich sind. Sie alle haben wichtige biologische Funktionen. Squalen und dessen verwandte chemische Verbindungen, Oxidosqualen und Bis-oxidosqualene sind Vorstufen von bis zu 200 verschiedenen Triterpenen (Xu et al., 2004).

In Tieren werden Prenylgruppen zur Bildung von Ubiquinonseitenketten verwendet. Im menschlichen Körper ist Koenzym Q10 (CoQ10) die häufigste Form von Ubiquinon. Weitere Substanzen, die Prenylgruppen für ihren Aufbau brauchen sind Karotinoide, die Vitamine A, K, D, E und andere Tocopherole, Tocotrienole, ringförmige Terpenoide wie Campher, Pinene und Limonen sowie Dolichol (Kelly, 1999).

Der Name Squalen leitet sich von dem Vorkommen in Haifischleberöl ab (Haifisch = *Squalus spp.*) (Kelly, 1999). Bei Raumtemperatur liegt Squalen in flüssiger Form mit angenehm mildem Geschmack vor. In

Tabelle 1 sind einige Eigenschaften von Squalen zusammengefasst. Diese Daten unterstreichen den stark hydrophoben Charakter. Wie in Abbildung 1 zu erkennen ist, ergeben sich durch die Doppelbindungen verschiedene Konformationen des Moleküls. Am Bemerkenswertesten ist dabei die Fähigkeit von Squalen sich in der Form eines Sterols zu organisieren, was eine Aufnahme in die Membran möglich machen könnte. Aufgrund seiner unpolaren Natur ist der Einbau von Squalen in biologische Membranen aber limitiert und es wird daher eher in Lipidspeichern angesammelt. In Schwannschen Zellen wurde Squalen hauptsächlich in Lipidtröpfchen vorgefunden. Diese Zellen bilden die Myelinscheiden der markhaltigen Nervenfasern im peripheren Nervensystem und hüllen mit ihrem Zytoplasma die marklosen Nervenfasern ein, was zu einer höheren Geschwindigkeit der Reizübertragung führt (Goodrum et al., 1990, Kalvodova, 2010, Spanova und Daum, 2011).

Squalan, ein hydrierter Verwandter von Squalen kann horizontal in die Phospholipid-doppelschicht der Membran eingefügt werden. Es wird vermutet, dass diese räumliche Struktur Schutz vor Protonenverlust bietet und auf den transmembranen Protonenfluss einwirken kann (Hauß et al., 2002).

Aufgrund seiner chemischen Struktur insbesondere dem hohen Grad an Doppelbindungen ist Squalen nicht sehr stabil und wird leicht oxidiert. In komplexen Mischungen wie Olivenöl weist die Substanz durch die Anwesenheit von β -Carotin und

α -Tocopherol (Vitamin E), zweier Antioxidantien, jedoch eine höhere Stabilität auf. Nach sechs Monaten dunkler Lagerung bei Raumtemperatur beobachteten (Manzi et al., 1998) einen Abbau von Squalen im Bereich von 26-47 %.

Tabelle 1: physikalische Eigenschaften von Squalen (Spanova und Daum, 2011)

Eigenschaften	Werte
n -Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient K_{ow}	10,67
Löslichkeit von Squalen in Wasser	0,124 mg l ⁻¹
Viskosität	~11 cP
Oberflächenspannung	~ 32 mN m ⁻¹
Dichte	0,858 g l ⁻¹

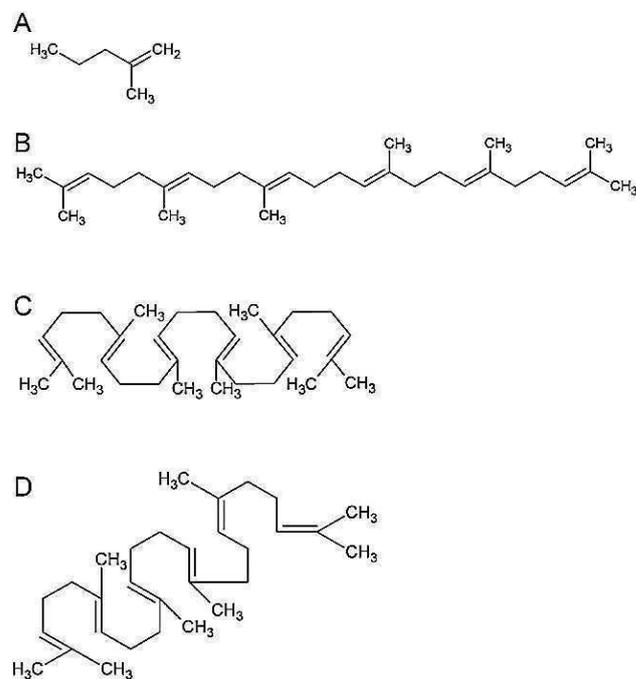


Abbildung 1: Chemische Struktur von Squalen und seiner Vorstufe. A: chemische Struktur von Isopren B-D: verschiedene Squalenstrukturen: B: gestreckte Form, C: gewundene Form, D: „sterol-ähnliche“ Form; aus Spanova und Daum, 2011

1.1.1 Squalen als Antioxidans

Squalen hat antioxidative Eigenschaften als Peroxid-Radikalfänger in der durch milde UV-Strahlung vermittelte Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren (PUFAs) (Dessi et al., 2002). Eine Kombination von PUFAs und Squalen führte zu einer verminderten Lipidperoxidation in Herzgewebe und Leber von Ratten. Des Weiteren wurde herausgefunden, dass Nahrung mit einer Anreicherung von 2 % Squalen altersbedingte Prozesse im mitochondrialen Energiestatus minimiert (Buddhan et al., 2007).

Verschiedene antioxidative Effekte wurden in unterschiedlichen Zelltypen beobachtet. Squalen zeigte antioxidative Wirkung nur in Brustepithel- und Knochenmarkzellen, aber nicht in menschlichen Brustkrebs- und Neuroblastomazellen (Das et al., 2008, Warleta et al., 2010).

Warleta et al. (2010) schlagen drei mögliche Gründe für die antioxidative Selektivität von Squalen vor: (i) das „Glutathion Paradox“, das besagt, dass Squalen die Menge an Glutathion in normalen Zellen erhöht, (ii) Unterschiede in der Squalenaufnahme, Verwendung und Akkumulierung oder (iii) Deregulation von antioxidanten Systemen in Tumorzellen (Das et al., 2003; Klaunig und Kamendulis, 2004; Das et al., 2008).

1.1.2 Squalen als Nahrungsergänzungsmittel

Eine Studie an Patienten mit Hypercholesterinämie ergab, dass eine Menge von 850 mg Squalen pro Tag, 20 Wochen lang den Gesamtcholesterinspiegel um circa 17 %, LDL-Cholesterin um 22 % und TAG (Triacylglycerol) um 5 % senkt (Chan et al., 1996). Somit ist Squalen auch ein Kandidat für die Behandlung von kardiovaskulären Krankheiten. Strandberg et al. (1990) beobachteten, dass eine hohe täglich eingenommene Squalendosis den Cholesterinspiegel nicht erhöht.

In Hunden und Ratten führte eine hochdosierte Squalenbehandlung zu verringertem Körperfett und einem niedrigeren Glukosespiegel im Blut. Außerdem erhöhte sich in den Versuchstieren das Gewicht der Hoden und der Testosteronspiegel (Kamimura et al., 1991, Liu et al., 2009) Auch bei Hähnen für die Fleischproduktion stiegen die Fortpflanzungsleistung, der Testosteronspiegel und das Samenvolumen (Li et al., 2010). Squalen hat einen zytoprotektiven Effekt gegen Cyclophosphamid ausgelöste, oxidative Schäden an Herz, Harn und Hoden in männlichen Ratten (Motawi et al., 2010). Eine hohe Dosis Squalen ($> 13,5 \text{ g Tag}^{-1}$) verkleinert Falten in gealterter Haut, erhöht Typ I Prokollagen und erniedrigt UV-induzierte Schäden in vivo, wird aber auch mit vorübergehenden Nebenwirkungen wie flüssigem Stuhlgang in Verbindung gebracht (Cho et al., 2009).

Squalen zeigt antitumorale Aktivität gegen Dickdarm, Haut, Sarkoma und Lungenkrebs in Nagetieren (Ohkuma et al. 1983, Murakoshi et al., 1992, Rao et al., 1998, Smith, 2000)

In der Mittelmeergegend wurde reduziertes Krebsrisiko mit dem hohen Konsum von in nativem Olivenöl enthaltenem Squalen in Verbindung gebracht (Naziri et al., 2011). Squalen konnte bereits bestehende Brustkrebszellen nicht abtöten, was darauf schließen lässt, dass Squalen besser in der Krebsprävention denn in der Bekämpfung wirkt (Warleta et al., 2010). Olivenöl wird zudem mit niedrigeren Risiken für Brust-, Haut- und Dickdarmkrebs in Verbindung gebracht und soll einen chemo- und cardioprotektiven Effekt haben, blutdrucksenkend und entzündungshemmend wirken sowie der Bildung von atherosklerotischen Plaques vorbeugen. Die Wirkung ist abhängig von der Menge

und der Dauer des Olivenölkonsums. Der jährliche Verbrauch an Olivenöl pro Person kann bis zu 15 kg betragen (Strandberg et al., 1989, Rao et al., 1998, Linos et al., 1999, Newmark, 1999, Owen et al., 2000, Beauchamp et al., 2005, Gilani et al., 2005, Gill et al., 2005 Alonso et al., 2006).

1.1.3 Verwendung von Squalen als Adjuvans

Squalen wird oft als Trägerstoff in Lipidemulsionen für Impfstoffe und pharmazeutische Anwendungen verwendet. Solche Emulsionen können schlecht lösliche Substanzen in ihre disperse Phase aufnehmen, was zu einer erhöhten Aufnahme des Impf- oder Arzneistoffes führt und Nebenwirkungen minimiert. Squalen und Squalan bilden stabile und viskose Emulsionen mit lipophilen Arznei-, Impf- und Hilfsstoffen, mit hoher Transfektionsaktivität und kleiner Tröpfchengröße. Beispiele für die Verwendung von Squalen in Impfstoffen sind: SAF, DETOX[®], PROVAX[®] und MF59[®]. MF59[®] wird in verschiedenen Impfstoffen gegen Hepatitis B und C, Herpes-simplex-Virus, HIV-1 und Grippe (Fluad[®]) verwendet (Kim et al., 2003, Wang et al., 2006, Fox, 2009).

1.2 Squalenproduzierende Organismen

1.2.1 Squalen in tierischen und menschlichen Zellen

Im Organismus von Säugetieren ist Squalen eines der wichtigsten Lipide von Hautzellen. Es wird in Talgdrüsen hergestellt, wo es 13 % der Lipide ausmacht. Im Menschen ist Squalen in der höchsten Konzentration im Sebum (=Talg) der Talgdrüse (~13 %) vorzufinden. Die Gesamtkonzentration in der Haut und das Squalen-Cholesterin Verhältnis hängt von der Lage der Haut ab. Die Sekretion ist von Individuum zu Individuum unterschiedlich und beläuft sich auf 125-475 mg pro Tag (Honda et al., 1998, Spanova and Daum, 2011). Interessanterweise wird sehr wenig des Squalens, das von den Talgdrüsen sekretiert wird in Cholesterin umgewandelt. Dies kann entweder auf eine Überexpression von Squalensynthase (SQS) oder einer Reduzierung der Aktivität von Oxidosqualencyclase (SQE) zurückgeführt werden (Smith und Thiboutot, 2008).

Squalen in Säugetieren kommt teils aus endogener Biosynthese, teils aus der Nahrung. Das intrazelluläre Depot von Squalen scheint im Gleichgewicht mit den Vorkommen im Plasma zu sein (Hidaka et al., 1991, Spanova und Daum, 2011).

Rund 60-85 % des mit der Nahrung aufgenommenen Squalens wird absorbiert und in das Serum transportiert, meist gemeinsam mit VLDL. Anschließend erfolgt die Verteilung an unterschiedliche Gewebe. Nur ein sehr kleiner Teil des aus der Nahrung stammenden Squalens wird zu Cholesterin umgewandelt und auch ein höherer Verzehr von Squalen ändert den Cholesterinspiegel nicht (Strandberg et al., 1990).

Squalen ist in sehr hohen Konzentrationen in den Körpern von Knorpelfischen vorhanden, die keine Schwimmblase haben und daher ihre Körperdichte mit Fetten und Ölen reduzieren müssen. In Haileberöl erreicht die Squalenkonzentration 40-70 Gewichtsprozent (Catchpole und Von Kamp, 1997).

Die Rolle von Lipiden und Kohlenwasserstoffen als Auftriebsregulator in der Leber von Tiefseehaien wurde bereits dokumentiert und es wurde berichtet, dass Haie die Lipidzusammensetzung ihrer Leber verändern um Auftriebskraft zu erhalten. Der Squalenspiegel wird zudem von saisonalen Faktoren und Nahrungsaufnahme maßgeblich beeinflusst (Malins und Barone, 1970, Bakes und Nichols, 1995).

1.2.2 Squalen in Pflanzen

Squalen kommt in einem breiten Spektrum in der Natur vor. Die höchste Anreicherung von Squalen in Pflanzen wurde bis heute in Olivenöl und Amaranthöl gefunden. Die unverseifbare Fraktion von Oliven enthält 0,8-1 g Squalen kg^{-1} , Olivenöl enthält 3,6-4,5 g Squalen kg^{-1} ; abhängig vom jeweiligen Kultivar. 6,1 % der Lipide in Amaranthöl sind Squalen (Manzi et al., 1998, He et al., 2002).

Kleinere Mengen wurden auch in Palmöl, Weizenkeimöl, Erdnussöl und Reisöl nachgewiesen (Spanova und Daum, 2011).

Die Reaktionen von Squalen zu Phytosterolen ergibt verschiedene Produkte wie zum Beispiel: Sitosterol, Stigmasterol, Campesterol und Isofucosterol (Spanova und Daum, 2011).

In Pflanzen wird Squalen zu 2,3-oxidosqualen oxidiert und zu Cycloartenol umgewandelt, anstatt zu Lanosterol, wie es von tierischen Zellen und Pilzen bekannt ist. Cycloartenol wird dann zum Endprodukt Sitosterol verstoffwechselt (Boutte and Grebe, 2009). Die im Endoplasmatischen Retikulum produzierten freien Phytosterole werden größtenteils zur Plasmamembran transportiert wobei nur ein kleiner Teil im Golgi-Apparat verbleibt (Moreau et al., 1998).

1.2.3 Squalen in Mikroorganismen

Auch wenn Mikroorganismen nicht so viel Squalen wie Pflanzen und Haie anhäufen, sind sie durch ihr schnelles und massereiches Wachstum doch eine vielversprechende Squalenquelle (Spanova und Daum, 2011). Es wurde bereits über Squalenextraktionen folgender Organismen berichtet: Hefe, im Speziellen *Saccaromyces*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pseudomonas*, *Candida*, die Alge *Euglena*, verschiedenen *Traustochytrium* Arten, *Schizochytrium mangrovei*, *Aurantiochytrium limacinum* SR21 und *Botryococcus braunii* (Mauricio and Ortega, 1993, Bhattacharjee et al., 2001, Banerjee et al., 2002, Dessì et al., 2002, Jiang et al., 2004, Yue und Jiang, 2009, Chen et al., 2010, Spanova und Daum, 2011).

In Bakterien tritt Squalen als eine Zwischenstufe der Hopanoidsynthese auf. Die Reaktion wird vom Enzym Squalen-Hopan-Zyklase katalysiert. Hopanoide sind pentacyclische Triterpene, die für die bakterielle Membransynthese benötigt werden (Ourisson et al., 1987) und in aeroben Bakterien wie Cyanobakterien, Methanotrophe und Heterotrophen vorkommen. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Erhaltung der Membran und ihrer Permeabilität (Welande et al., 2009). Des Weiteren helfen Hopanoide bei externen Stressreizen wie Ethanoltoleranz, Sauerstoffdiffusion und bewahren Sporen vor eindringendem Wasser (Horbach et al., 1991, Berry et al., 1993, Poralla et al., 2000).

Ghimire et al. (2009) verbesserten die Squalenproduktion in *E. coli* durch Einschleusen von Genen der Hopanoidsynthese; *hopA*, *hopB* (Squalen/Phytoenol-Synthase), und *hopD* (Farnesyl-Diphosphat-Synthase) aus *Streptomyces peucetius*. Die Squalenausbeute erhöhte sich von 4 auf 12 mg l⁻¹, bei gleichzeitiger Expression der Gene für Deoxyxylulose-Phosphat-Synthase und IPP Isomerase.

In Hefe spielt Squalen eine wichtige Rolle in der Synthese von Sterolen, die wichtig für das Fließvermögen und die Durchlässigkeit der Membran sind, die Energiequellenverwertung beeinflussen und membrangebundene ATP-asen kontrollieren (Bard et al., 1978, Cobon und Haslam, 1973, Lees et al., 1979, Lees et al., 1980). Ergosterol, das Hauptsterol in Pilz- und Hefemembranen ist essentiell für das Entwicklungswachstum und das Hauptziel für Fungizide, die zur Zeit für die Bekämpfung von Pilzinfektionen verwendet werden (Alcazar-Fuoli und Mellado, 2012).

Wie in anderen eukaryotischen Zellen kann der Aufbauweg von Sterolen in zwei Abschnitte geteilt werden. Der erste Teil heißt Mevalonat oder Isoprenpfad und beginnt mit Acetyl-CoA, das zu Farnesylpyrophosphat umgewandelt wird und als Substrat für andere biosynthetische Wege zur Verfügung steht (Spanova und Daum, 2011).

Der zweite Teil ist der Ergosterolpfad, in dem Squalen zu Squalenepoxid und dann weiter zu Ergosterol umgebaut wird. In Hefen findet unter normalen Wachstumsbedingungen keine Squalenakkumulierung statt, da es effizient zum Endprodukt verstoffwechselt wird (Jandrositz et al., 1991).

Mit Hilfe eines veränderten Stammes gelang es Mantzouridou und Tsimidou, (2010) den Squalengehalt in *S. cerevisiae* um ein 20-faches zu steigern. Dazu wurde eine zusätzliche Kopie des HMG2-Genes (kodierend für Hmg2p, eine HMG-CoA Reduktase) mit einer K6R stabilisierenden Mutation in Hmg2p eingebaut und unter die Kontrolle des induzierbaren Galaktosepromoters gebracht. Die stabile Integration erfolgte am chromosomalen HO Locus.

Mikroalgen, mikroskopisch kleine Algen, sind eine weitere Quelle für die Produktion von Squalen (Spanova und Daum, 2011).

Sie bieten ein weites Verwendungsspektrum als Produzenten von Polysacchariden, Proteinen und Karotinoiden, oder als erneuerbare Energiequelle durch die Fähigkeit Abwasser und Abfallstoffe in wertvolle Biomasse zu verwandeln. Einige Vertreter dieser Gruppe sind fotosynthetische Algen wie: *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella fusca* und *Botryococcus braunii*. *Botryococcus braunii* akkumuliert Squalen in geringen Mengen, wächst aber schlecht unter heterotrophen Bedingungen und ist somit für eine biotechnologische Verwendung nicht attraktiv (Banerjee et al., 2002). Der Thraustochytrid *Aurantiochytrium* (früher als *Schizochytrium* bekannt) produziert Squalen heterotroph, der Apparat für die Kohlenstofffixierung fehlt (Chen, 1996, Jiang et al., 2004).

1.3 Thraustochytriden

Thraustochytriden sind eukaryotische, heterotrophe, einzellige Meeresorganismen (Porter, 1990). Sie gehören der Gruppe der Stramenopilen an, die auch Chromista oder Heterokonta genannt und zu der auch Braunalgen und Diatome gezählt werden (Cavalier-Smith et al., 1994). Innerhalb der Stramenopilen bilden die Netzschleimpilze oder Schleimnetze (Labyrinthulomycetes) ein Taxon in das die Familie der Thraustochytriden (Thraustochytridae) eingeordnet wird (Adl et al., 2005).

Thraustochytriden werden selten auf lebenden Pflanzen gefunden, sondern oft auf abgestorbenen Pflanzenteilen, wie in das Meer herabhängende Mangrovenblätter oder auf anderen Algen. Durch die Fähigkeit zur Produktion und Sekretion von Abbauenzymen, wird vermutet, dass sie eine wichtige Rolle als Saprophyten im Ökosystem des Meeres spielen (Porter, 1990, Raghukumar, 2002).

50 % der Biomasse von Thraustochytriden wird in Lipidform gespeichert, wobei ein sehr hoher Anteil ω -3 PUFAs (mehrfachungesättigte Fettsäuren) sind (Lewis et al., 1999). In vielen Meeresorganismen wie Algen und Bakterien wurde die Produktion von DHA und anderen langkettigen, mehrfachungesättigten Fettsäuren beobachtet. Es wird angenommen, dass diese die Toleranz für niedrige Temperaturen und hohen Druck erhöhen (Morita et al., 2006).

Yokoyama und Honda, (2007) teilen die Gattung *Schizochytrium* aufgrund von Morphologie, Chemotaxis und 18S ribosomaler RNA Genphylogenie in *Schizochytrium sensu lato*, *Aurantiochytrium* und *Oblongichytrium* gen. nov. ein.

Aurantiochytrium Arten werden dazu verwendet, DHA und andere n-3 PUFAs zu produzieren, die seit über zehn Jahren auch Babynahrung beigemischt werden (Lewis et al., 1999, Aki et al., 2003) Das aus Schizochytrien gewonnene Öl erhielt den GRAS (generally regarded as safe) Status der behördlichen Lebensmittelüberwachung und Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten (FDA) (Bonnette, 2003). Getrocknete *Aurantiochytrium* Zellen werden an Hühner und Fische verfüttert. Verglichen

zu konventionellen Produkten enthalten Thraustochytriden ein breiteres Nährstoffprofil, reich an Proteinen, Sterolen, Vitaminen und Spurenelementen und erhöhen so den Nährwert der Tiere (Lewis et al., 1999, Song et al., 2007, Kalogeropoulos et al., 2010).

1.4 *Aurantiochytrium limacinum* SR21

Aurantiochytrium limacinum sp. früher bekannt als *Schizochytrium limacinum* sp. gehört zu den Thraustochytriden und wird in Mangrovengegenden aus Salzwasser extrahiert. *Aurantiochytrium limacinum* sp. steht in der Gruppe *Aurantiochytrium* spp. (vormals *Schizochytrium* spp.) *S. aggregatum* durch seine zitronenförmigen, amöboiden Zellen, der Größe der Zoosporen und deren Freisetzung ohne amöboide Phase am nächsten (Honda et al., 1998, Yokoyama und Honda, 2007).

Vegetative Zellen sind sphärisch, mit einem Durchmesser von ca. 7-15 µm und in flüssigem Medium häufig in Clustern vorzufinden. Im Zellinneren befinden sich sphärische Vakuolen, die sich bei Betrachtung im Lichtmikroskop stark vom Zytoplasma abheben.

Bei Anzucht auf Nähragarplatten beobachteten Honda et al. (1998) Kolonien aus sphärischen Zellen, an deren Rande sich längliche amorphe Zellen ausbildeten. Des Weiteren berichteten sie von der Entstehung eines ektoplasmischen Netzes an einer Seite der Zelle.

Aurantiochytrium limacinum SR21 ist bekannt für seine hohe Produktionsleistung in Suspensionkultur und einem einfachem PUFA-Profil, das reich an DHA und DPA ist (Nakahara et al., 1996). *A. limacinum* ist fähig, in der nicht verseifbaren Lipidfraktion 15,4 % Squalen zu akkumulieren (Wang und Wang, 2012).

1.4.1 Lebenszyklus von *Aurantiochytrium limacinum* ssp.

Honda et al. (1998) beschreiben im Detail den Lebenszyklus von *Aurantiochytrium limacinum* ssp., der hier wiedergegeben wird.

Abschnitt 1 von Abbildung 2, vegetative Zellen: Nach Inokulation in frisches Medium vergrößerten sich die vegetativen Zellen und es kam zu Kernteilungen ohne Zytokinese. Anschließend an dieses mehrkernige Stadium erfolgte reguläre Zytokinese und die Zellen reiften zu Zoosporangien mit einem Durchmesser von 12-24 µm. Nach 9-10 Stunden wurde die zoosporangiale Wand durchlässig und 16-64 Zoosporen wurden freigesetzt. Die Zoosporen besaßen ein eiförmiges Aussehen, waren 6-8,5 µm lang und 5-7 µm breit. Zwei ungleiche Flagellen entsprangen dem seitlichen Teil der Zoospore.

4-5 Stunden nach der Beimpfung von frischem Medium begann die gleichmäßige Teilung, d.h. Teilung der Kerne mit Zytokinese der vegetativen Zellen. Diese Zellteilungen fanden vier- oder fünfmal statt und so wurde aus einer einzelnen Zelle ein Cluster von 16-32 Zellen.

Abschnitt 2 von Abbildung 2, amöboiden Zellen: 10 Stunden später kam es zur Freisetzung von zitronenförmigen, amöboiden Zellen durch einige Zellen im Cluster, die 12-20 μm lang und 5-8 μm breit waren. Die amöboiden Zellen entwickelten feine Scheinfüßchen und krabbelten mit dehrenden und gekrümmten Bewegungen am Boden des Kulturgefäßes. Es wurde beobachtet, dass jede dieser Zellen zwei sphärische Kerne enthielt.

Abschnitt 3 von Abbildung 2, Niederlassung der amöboiden Zellen: Nach 30 Minuten ließen sich die amöboiden Zellen nieder und entwickelten sich zu einer Kugel von ca. 9,5-10,5 μm im Durchmesser. Darauf folgten drei Zellteilungen ohne Zunahme der Zellgröße und aus jeder amöboiden Zelle entwickelten sich acht Zoosporen. Die Zoosporen wurden nach einer Stunde freigesetzt und waren eiförmig und mit Maßen von 4,5-6 μm Länge und 3,5-5 μm Breite etwas kleiner als Zoosporen, die direkt von vegetativen Zellen freigesetzt wurden.

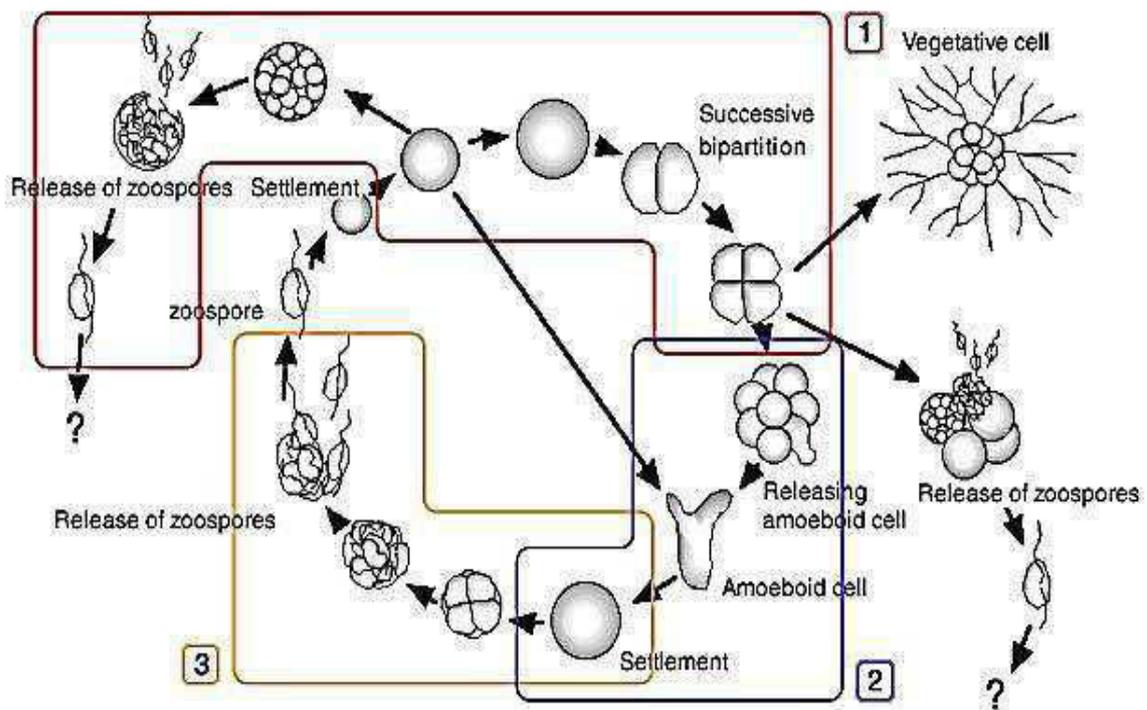


Abbildung 2: Lebenszyklus von *Aurantiochytrium limacinum* ssp. aus: Konan, 2003

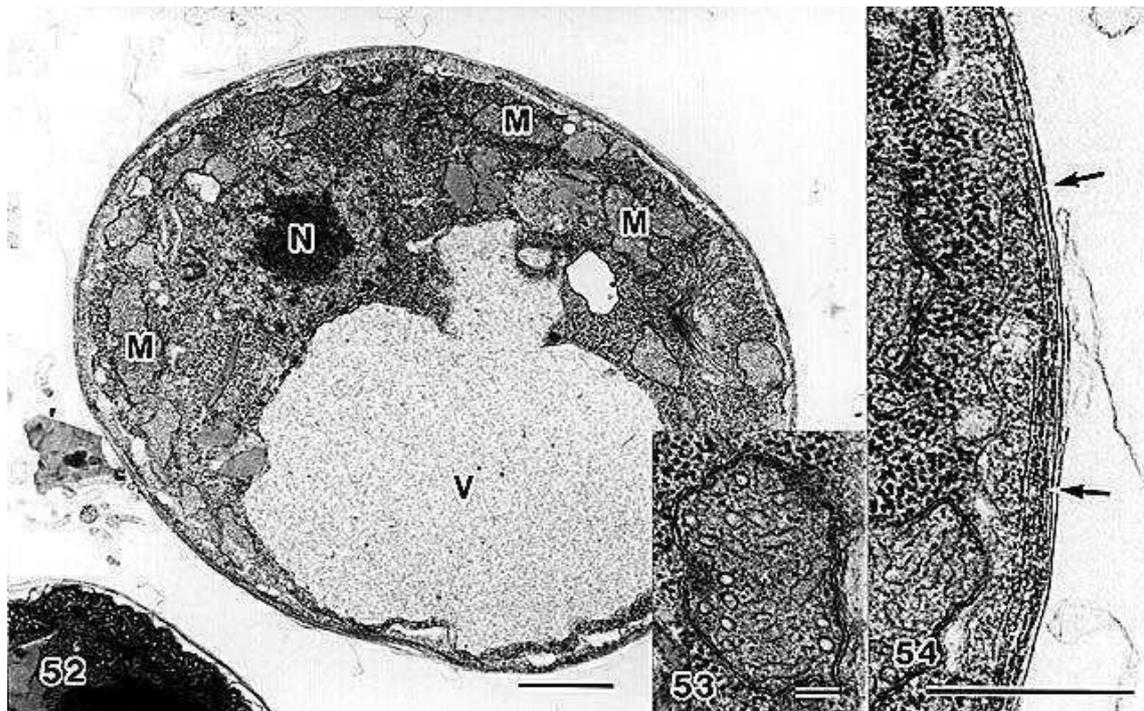


Abbildung 3: elektronenmikroskopische Aufnahme von *Aurantiochytrium limacinum*, Dünnschliff durch vegetative Zellen. 52: Querschnitt durch die Zelle umhüllt von der Zellwand. (N) Kern (M) Mitochondrien (V) Vakuole. 53: Mitochondrium mit röhrenförmigen Cristae. 54: vielschichtiger Aufbau der Zellwand (Pfeile). Balkenlänge: 52: 1 μm , 53: 0,1 μm , 54: 0,5 μm . Aus: Honda et al., 1998

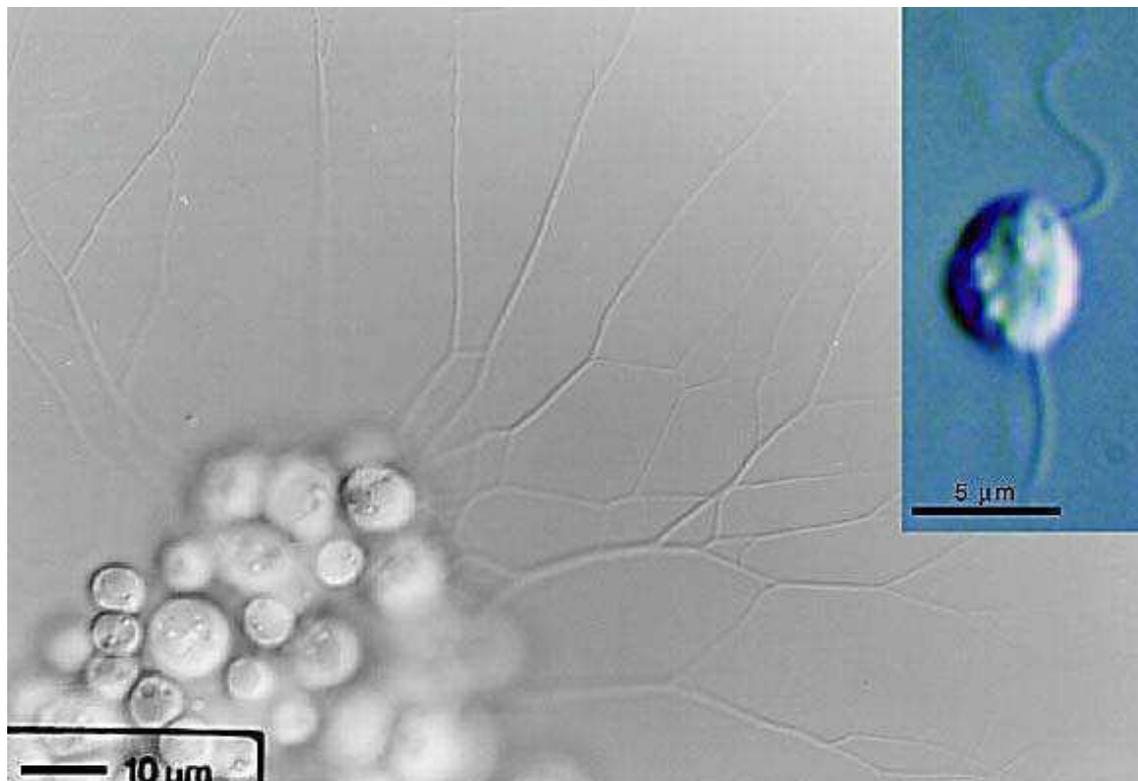


Abbildung 4: Zellcluster mit ektoplasmaschem Netz, rechts oben: Zoospore mit deutlich sichtbaren Flagellen. Aus: Konan, 2003

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Produktionsdauer und den Gehalt von Squalen im Protisten *Aurantiochytrium limacinum* SR21 zu untersuchen.

Des Weiteren sollen optimale Betriebsparameter sowie die passende Medienzusammensetzung, wie Glukose- und Stickstoffkonzentration bestimmt werden. Verschiedene Kultivierungsmethoden angefangen von der Kultivation in Schüttelkolben bis zur Fermentation im 10 l-Reaktor sollen untersucht werden um möglichst viel Biomasse anzuhäufen und damit auch den Squalengehalt zu erhöhen. Eine wichtige Aufgabe dabei ist es, Nährstoff und Sauerstoff Limitierungen zu erkennen und nach Möglichkeit auszuschalten.

Ein weiteres Ziel ist es, die passenden Analysemethoden zu ermitteln um den Squalengehalt mit den vorhandenen Messgeräten akkurat bestimmen zu können.

3 Material und Methoden

3.1 Herkunft

Der verwendete Stamm entstammt der American Type Culture Collection (ATCC) und trägt die Nummer: ATCC MYA-1381; *A. limacinum* SR21. Davon wurde nach Anleitung von Rappel (2013) eine Forschungszellbank hergestellt, die für alle beschriebenen Versuche als Ausgangspunkt diente.

3.2 Konservierung und Erstellen einer Forschungszellbank (RCB)

Materialien:

Glycerin p.A., steril

2 ml Kryovials (maximales Füllvolumen: 1,8 ml)

Kryorack

Sterile 300 ml Schikanenkolben, verschlossen mit Watte, bedeckt mit Aluminiumfolie

70% (w/w) Ethanol

sterile 10 ml Messpipetten

Akkupipettierhilfe

-80 °C Gefrierschrank

Sterile Sicherheitswerkbank (Laminar)

Orbitalschüttler Thermo Scientific MaxQ 3000

Brutraum, 25 °C

Glukosestammlösung, YEP-Stammlösung, ASW, dH₂O

Methode:

1. Drei sterile Schikanenkolben wurden mit je 60 ml sterilem Medium befüllt, (Zusammensetzung siehe Tabelle 2) und mit 1, 2 und 3 beschriftet.
2. Von einer ca. 32-38 Stunden alten *A. limacinum* SR21 Kultur wurden je 6 ml zur Inokulation von Kolben 1 und 2 verwendet, wobei Kolben 1 zur Überprüfung der BTS diente, Kolben 2 zur Konservierung in den Kryovials.
3. Die Kolben wurden am Orbitalschüttler bei 170 rpm und 25 °C bebrütet. Der nicht beimpfte Schikanenkolben 3 diente als Sterilkontrolle.
4. Nach 30-32 Stunden wurden in der sterilen Sicherheitswerkbank von Kultur 1 5 ml Probe zur BTS-Bestimmung entnommen und zu Kultur 2 17 g Glycerin aseptisch hinzugefügt um eine Glycerinkonzentration von ca. 15 % (w/w) zu erhalten. Der Kolben wurde gut geschüttelt.
5. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde der Inhalt von Kultur 2 in 1,5 ml Portionen in Kryovials aufgeteilt.
6. Die Kryovials wurden zur Lagerung bei -80 °C in den 2. Stock des IAM gebracht.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Mediums für das Inokulum, 0,5 % Glukose, 0,1 % Hefeextrakt und Pepton aus Kasein, 50 % ASW

ASW [ml]	YEP-Stammlösung [ml]	dH ₂ O [ml]	Glukosestammlösung [ml]
30	6	24	0,5

3.3 Angewendete Kultivierungsmethoden

A. limacinum wurde für die Erstellung dieser Arbeit mit drei verschiedenen Methoden nach Schügerl und Sittig, (1994) kultiviert:

- a) Batchkultur, auch Satzkultur genannt
- b) repeated batch oder periodische Satzkultur
- c) Fed-batch-Kultur (Zusatzlaufkultur)

Bei der Batchkultur werden die Zellen unter unlimitierten Bedingungen vermehrt (Wachstumsphase). Wird eine höhere Zelldichte erreicht, treten eine Substrat- und somit auch eine Wachstumslimitierung ein. Die Ernte erfolgt meist zum Zeitpunkt der höchsten Produktbildungsrate. Diese Kultivierungsmethode wurde zur Beobachtung des Wachstums der Biomasse und zur Ermittlung der optimalen Glukosekonzentration verwendet.

Die periodische Satzkultur beginnt gleich wie die Batchkultur, allerdings findet nach einem Produktionszyklus zur Zeit $t=t'$ eine teilweise Entleerung des Kultivierungsgefäßes statt. Ohne Reinigung und Sterilisation des Reaktors wird das entnommene Volumen mit neuem, frischem Medium ersetzt. Die Nährstoffkonzentration des zugesetzten Mediums der folgenden Versuche entsprach entweder der Konzentration zu Beginn (gleichbleibend) oder erhöhte sich mit fortschreitender Kultivationsdauer (steigend). Die repeated batch Kultivierung eignete sich hervorragend um die Nährstofflimitierung in Schüttelkolben aufzuheben und in regelmäßigen Abständen genug Probenmaterial für die Squalenbestimmung zu generieren.

Bei der Zusatzlaufkultur wird während der Wachstumsphase zusätzlich Nährmedium zugeführt. Die Fed-Batch Kultur wurde in einem 10-l Bioreaktor durchgeführt. Dieser Prozess ist leicht zu überwachen (teilweise computergesteuert) und liefert zu beliebigen Zeitpunkten genügend Biomasse und Probenmaterial zur anschließenden Analyse.

Einige der Versuche wurden mit dem Enzymverstärker Methyljasmonat durchgeführt. Jasmonat und dessen Methylester Methyljasmonat (MJA) werden als starke Lipidregulatoren angesehen, die verschiedene physiologische Prozesse wie Wachstum, Seneszenz, Reproduktion und Stressantwort auf mechanische Traumata und Pathogenese in Pflanzen abstimmen (Yue und Jiang 2009).

Bisher wurde MJA erfolgreich eingesetzt um die Biosynthese von vielen wichtigen Sekundärmetaboliten in Pflanzenzellen, wie z.B. Ginsenoside und Paclitaxel, die in

Medikamenten und Nahrungsergänzungsmittel für den Menschen zum Einsatz kommen, zu induzieren oder zu steigern (Yue und Jiang, 2009). Die Wirkung von MJA in Mikroalgen ist sehr schlecht untersucht und noch wenig bekannt. Es konnte aber gezeigt werden, dass bei Zugabe von MJA die Aktivität von Squalensynthetase in dem mit *Aurantiochytrium limacinum* SR21 verwandten Organismus, *A. mangrovei*, gesteigert wurde. Squalensynthetase (EC 2.5.1.21) katalysiert die reduktive Dimerisierung von zwei Farnesyl-Diphosphatmolekülen zu Squalen und stellt eine mögliche Verzweigungsstelle in der Isoprenbiosynthese dar. Auch die Ausbeute an Squalen konnte bei Behandlung der Kultur mit 0.1 mM MJA-Lösung 1,6-fach erhöht werden (Yue und Jiang, 2009)

3.4 Kulturmedien

3.4.1 Künstliches Meerwasser (Artificial Seawater; ASW)

Das im Labor hergestellte ASW ist eine dem natürlich vorkommenden Meerwasser ähnliche Salzlösung. Es ist chemisch definiert und hat so den Vorteil in reproduzierbarer und stabiler Qualität hergestellt werden zu können. Die Zusammensetzung wurde der Arbeit von Rappel (2013) entnommen.

Materialien:

Chemikalien (siehe Tabelle 3 und

Tabelle 4)

1 Liter Schottflasche

Messzylinder

Einweg Plastikspritzen

Einweg 0,22 µm Sterilfilter

dH₂O

HEPES Puffer, 50 mM

Analytische Waage, Präzision: 0,0001 g

Autoklav

Sterile Sicherheitswerkbank (Laminar)

Methode:

Alle Stocklösungen wurden laut Tabelle 3 und

1. Tabelle 4 hergestellt und in sterilisiertem Wasser oder 50 mM HEPES Puffer gelöst.
2. Die in Schritt 1 vorbereiteten Stocklösungen wurden nach den Methoden in den oben genannten Tabellen sterilisiert. Die Hitzesterilisation fand bei 121 °C und einem Überdruck von 1 bar für 20 min statt. Die Sterilfiltration wurde mit einem

- Filter der Porengröße 0,22 µm in der sterilen Sicherheitswerkbank durchgeführt.
3. Alle Komponenten außer der K_2HPO_4 -Lösung und den Vitaminstocklösungen wurden der Reihe nach abgewogen, wenn nötig in sterilem Wasser vorgelöst und unter ständigem Rühren zusammengeführt und hitzesterilisiert.
 4. In der sterilen Sicherheitswerkbank wurden nach Abkühlen der Salzlösung die restlichen Substanzen hinzugefügt.
 5. Die drei Vitaminstocklösungen wurden bei -20 °C gelagert, alle anderen Stocklösungen und das komplettierte ASW bei 4 °C im Dunkeln.

3.4.2 Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphorquellen

Als Stickstoffquellen dienten YEP und NH_4NO_3 , variierend von Experiment zu Experiment.

YEP-Stocklösung bestand aus 5,0 g Hefeextrakt und 5,0 g Pepton aus Kasein. Die Substanzen wurden in einem Liter RO- H_2O gelöst und hitzesterilisiert.

NH_4NO_3 -Stocklösung 1,25 M ($80,04 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$): 10 g NH_4NO_3 wurden in 100 ml RO- H_2O gelöst und hitzesterilisiert.

Als Phosphorquelle diente eine 0,329 M K_2HPO_4 -Lösung, die zusätzlich zu dem schon im ASW enthaltenen K_2HPO_4 in einigen Versuchen zur Verwendung kam. Dazu wurden 5,7265 g K_2HPO_4 in 100 ml RO- H_2O gelöst und autoklaviert.

Neben den in YEP enthaltenen Kohlenstoffquellen, diente Glukose als alleiniger Kohlenstoffspender. Für die Glukosestammlösung wurden 400g D-Glukose in 1 kg RO- H_2O gelöst und anschließend hitzesterilisiert.

Alle Stammlösungen wurden bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

Tabelle 3: Zusammensetzung für 1 L ASW

M [g mol ⁻¹]	Komponente	Stocklö- sung [g l ⁻¹]	Menge	Ein- heit	Endkonzentra- tion [mol l ⁻¹]	Sterili- sation
Komponenten, die vor der Hitzesterilisation hinzugefügt wurden						
58,44	NaCl	-	25,00	g	4,28E-01	Hitze
246,47	MgSO ₄ • 7 H ₂ O	-	3,50	g	1,42E-02	
203,3	MgCl ₂ • 6 H ₂ O	-	2,00	g	9,84E-03	
147,01	CaCl ₂ • 2 H ₂ O	-	0,50	g	3,40E-03	
74,55	KCl	-	0,50	g	6,71E-03	
210,14	Zitronensäure- monohydrate	3,28*	1,00	ml	1,56E-05	
-	Ammoniumeisen (III)-citrat	3,00*	1,00	ml		
84,99	NaNO ₃	-	0,75	g	8,82E-03	
105,99	Na ₂ CO ₃	20,0*	1,00	ml	1,89E-04	
372,24	Na ₂ EDTA • 2 H ₂ O Stock	0,5025*	1,30	ml	1,75E-06	
-	Spurenelemente- stocklösung		1,00	ml		
Komponenten, die nach der Hitzesterilisation hinzugefügt wurden						
174,18	K ₂ HPO ₄	57,265*	1,00	ml	3,29E-04	Hitze
1355,37	Vitamin B ₁₂	0,1352 ^{†‡}	1,00	ml	9,98E-08	Filtration
244,31	Biotin	0,0250 ^{†‡}	1,00	ml	1,02E-07	Filtration
337,27	Thiamin-HCl	1,0960 ^{†‡}	1,00	ml	3,25E-06	Filtration

Tabelle 4: Zusammensetzung Spurenelementestocklösung

Spurenelementestocklösung[‡]						
61,83	H ₃ BO ₃	-	2,860	g	4,63E-05	Hitze
197,91	MnCl ₂ • 4H ₂ O	-	1,810	g	9,15E-06	
287,56	ZnSO ₄ • 7H ₂ O	-	0,222	g	7,72E-07	
241,95	Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	-	0,390	g	1,61E-06	
249,69	CuSO ₄ , 5H ₂ O	-	0,079	g	3,16E-07	
237,93	CoCl ₂ • 6 H ₂ O	-	0,040	g	1,68E-07	

* Lagerung bei 4 °C

† In 50 mM HEPES buffer

‡ Lagerung bei -20 °C

3.4.3 Methyljasmonatstammlösung nach Yue und Jiang, (2009)

Materialien:

Kolbenhubpipette 1000 µl

Pipettenspitzen 1000 µl

Messkolben 50 ml

0,45 µm Sterilfilter

Einwegplastikspritze

Sterile 50 ml Schottflasche

Sterile Sicherheitswerkbank (Laminar)

Methyljasmonat (MJA, Sigma, Artikelnummer: 392707-5ML)

Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck, Artikelnummer: 1.02931.2500)

Methode:

1. Zur Herstellung einer 0,1 M Methyljasmonatstammlösung wurde 1,1 ml MJA in 50 ml DMSO gelöst und in der sterilen Sicherheitswerkbank mit einem 0,45 µm Filter aseptisch in die sterile Schottflasche überführt.
2. Sterilisation der Kontrollflüssigkeit: 50 ml DMSO wurden mit einem 0,45 µm Filter aseptisch in eine sterile Schottflasche überführt.
3. Lagerung der Lösungen bei Raumtemperatur, da der Gefrierpunkt von DMSO bei 18 °C liegt (Douglas, 1946).

3.5 Versuche in Schüttelkolben

Bei den Versuchen in den Schüttelkolben kamen drei verschiedene Arten von Schüttelkolben zur Anwendung.

- 300 ml Schikanenkolben (Schott) mit Verschluss aus Watte
- 500 ml Schikanenkolben (Schott, Duran) mit Plastiksraubverschluss mit integriertem Septum mit Filter zum Austausch von Gasen (Schott, GL 45)
- 2000 ml Schüttelkolben (Schott) ohne Schikanen mit Edelstahl-Steckkappe

3.5.1 Vorbereitung des Inokulums

Materialien:

Kryokultur von *A. limacinum* SR21, hergestellt aus RCB RR (26.4.2012)
 Sterile Pipettenspitzen 200 µl
 Kolbenhubpipette 200 µl
 sterile 10 ml Messpipetten
 sterile 25 ml Messpipetten
 Akkupipettierhilfe
 Sterile 300 ml Schikanenkolben (Schott), verschlossen mit Watte, bedeckt mit Aluminiumfolie zur Sterilisierung
 70 % (w/w) Ethanol
 Sterile Sicherheitswerkbank (Laminar)
 Orbitalschüttler Thermo Scientific MaxQ 3000
 Brutraum, 25 °C
 Glukosestammlösung, YEP-Stammlösung, ASW, dH₂O

Methode:

1. drei 300 ml Schikanenkolben wurden mit 70 % Ethanol abgewischt und in die sterile Sicherheitswerkbank gestellt. Das Gleiche passierte mit den Pipetten, Spitzen und der Pipettierhilfe und den Medienkomponenten.
2. Das Medium wurde aus den Stammlösungen und dem sterilisierten Wasser nach Tabelle 5 hergestellt.
3. Die Kulturampulle wurde aufgetaut, leicht geschüttelt, mit Ethanol abgewischt und 60 µl daraus aseptisch in zwei Schikanenkolben transferiert.
4. Die Kolben wurden am Orbitalschüttler bei 170 rpm und 25 °C bebrütet. Der dritte Schikanenkolben mit demselben Medium wurde als Sterilkontrolle verwendet und verblieb ohne Inokulum.
5. Die Wachstumsüberprüfung erfolgte durch visuelle Beobachtung und gravimetrische BTS Bestimmung.
6. Die beimpften Kulturen dienten als Inokulum von frischen Medien.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Mediums für das Inokulum, 0,5 % Glukose, 0,1 % Hefeextrakt und Pepton aus Kasein, 50 % ASW

ASW [ml]	YEP-Stammlösung [ml]	dH ₂ O [ml]	Glukosestammlösung [ml]
30	6	24	0,5

3.5.2 Medienvorbereitung

Die Medienzusammensetzung für die einzelnen Versuche unterschied sich von Experiment zu Experiment.

Im Allgemeinen wurde ein Grundmedium aus 50 % ASW, 0,1 % YEP hergestellt. Die Konzentrationen von Glukose und den zusätzlichen Phosphor- und Stickstoffquellen variierten.

Materialien:

sterile 10 ml Messpipetten

sterile 25 ml Messpipetten

Akkupipettierhilfe

Sterile 500 ml Schikanenkolben bzw. 2000 ml Schüttelkolben

70% (w/w) Ethanol

Waage, Präzision: 0,1 g

Orbitalschüttler Thermo Scientific MaxQ 3000

Brutraum, 25 °C

Sterile Sicherheitswerkbank (Laminar)

Glukosestammlösung, YEP, ASW, dH₂O, K₂HPO₄-Stammlösung, NH₄NO₃-Stocklösung

Methode:

1. die Schikanenkolben wurden mit 70 % Ethanol abgewischt und in die sterile Sicherheitswerkbank gestellt. Das Gleiche passierte mit den Pipetten, der Pipettierhilfe und den Medienkomponenten.
2. Das Medium wurde aus den Stammlösungen und dem sterilisierten Wasser laut den jeweiligen Angaben hergestellt.
3. Das frisch vorbereitete Medium wurde mit 5 % (v/v) 32-38 h altem Inokulum beimpft.
4. Die Kolben wurden am Orbitalschüttler bei 170 rpm und 25 °C bebrütet. Ein zusätzlicher Schikanenkolben mit demselben Medium wurde als Sterilkontrolle verwendet und daher nicht beimpft.
5. Die Wachstumsüberprüfung erfolgte durch visuelle Beobachtung und gravimetrische BTS-Bestimmung.

3.5.3 Bedingungen

alle Versuche wurden im auf 25 °C temperierten Brutraum durchgeführt. Der Orbitalschüttler bewegte die Kulturen mit 170 rpm. Die Versuche erfolgten größtenteils im Dunkeln, neben einer Lichtquelle für photosynthetische Algen, die 18 Stunden pro Tag eingeschaltet war.

3.5.4 Probenahme

In regelmäßigen Abständen wurden aus den Kulturen in den Schüttelkolben Proben entnommen um die BTS-Entwicklung zu beobachten. Die BTS-Konzentration wurde einfach bestimmt, bei der Fermentation im Bioreaktor und der Versuche in 2 l Kolben erfolgten Doppelbestimmungen. Des Weiteren wurden die Konzentrationen an verbleibendem nicht-freisetzbarem organischen Kohlenstoff (NPOC) und Gesamtstickstoff (TN) gemessen und der pH-Wert bestimmt.

Material:

sterile 10 ml Messpipetten
Akkupipettierhilfe
15 ml Zentrifugenröhrchen
Zentrifugenröhrchenhalter
70 % (v/v) Ethanol
20 µl Kolbenhubpipette
Pipettenspitzen
Objektträger
Deckglas
Sterile Sicherheitswerkbank (Laminar)
Lichtmikroskop
Eppendorf Zentrifuge 5804
Rotor: Eppendorf A-4-44
-20 °C Schrank

Methode:

1. Die Kulturen wurden mit 70 % Ethanol abgewischt und in der sterilen Sicherheitswerkbank platziert. Anschließend wurden fünf ml Probe aseptisch entnommen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt.
2. Die Kulturen wurden zurück auf den Schüttler in den Brutraum gestellt.
3. Es erfolgte eine optische Untersuchung mit Hilfe des Lichtmikroskops bei einer Vergrößerung von 100-600. Dazu wurden zehn µl Probe auf einem Objektträger platziert und mit einem Deckglas abgedeckt.
4. Stark glukosehaltige Proben aus Kulturen mit einer Glukosekonzentration von 80 g l⁻¹ wurden nach Bedarf mit sieben ml RO-Wasser verdünnt.
5. Die Zentrifugenröhrchen wurden auf eine Differenz von 0,1 g austariert.
6. Es folgte ein zehn Minuten langer Zentrifugationsschritt bei 4000 rpm.
7. Aus dem Überstand wurde der pH-Wert, NPOC und TN bestimmt, das Pellet diente zur Bestimmung der BTS-Konzentration. Der Überstand wurde bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

3.5.5 Ernte der Kulturen

Nach Ablauf der Kultivierungsdauer wurden die Kulturen geerntet und das Pellet gewaschen, getrocknet und einer Squalenanalyse unterzogen.

Materialien:

50 ml Proberöhrchen (Fa. Greiner, Artikelnummer: 227261)

Zentrifugenbecher für Beckmanzentrifuge

Waage, Präzision: 0,01 g

Beckman Zentrifuge J2-21

Rotor JA-20

Eppendorf Zentrifuge 5804

Rotor: Eppendorf A-4-44

-20 °C Schrank

Methode:

1. Das gesamte verbleibende Volumen in den Kolben wurde in die Zentrifugenbecher überführt und austariert.
2. Die Zentrifugenbecher wurden im gekühlt gelagerten Rotor platziert.
3. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 10-15 Minuten bei 5000 rpm.
4. Der Überstand wurde entsorgt oder für die Restsubstratanalyse weiter verwendet.
5. Das Pellet wurde in ca. 40 ml RO-Wasser gelöst und in ein, bei großen Pellets zwei 50 ml Proberöhrchen überführt.
6. Die Proberöhrchen wurden erneut fünf Minuten lang bei 4000 rpm (Eppendorfszentrifuge) zentrifugiert.
7. Dieser Waschschrift wurde wiederholt.
8. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei -20 °C eingefroren.

3.6 Fed-Batch Fermentation

Die Fed-Batch Fermentation wurde in einem Bioreaktor aus Edelstahl der Firma Bioengineering AG mit einem Gesamtvolumen von 16 l und einem Arbeitsvolumen von 10 l durchgeführt. Die Temperaturregelung im Reaktor erfolgte durch einen Doppelmantel, zudem war im oberen Teil der Front ein Schauglas eingebaut.

Zum Reaktorzubehör gehörten des Weiteren: drei Schlauchquetschpumpen (Bioengineering AG, 23430 Peripex W1, 100 rpm), sterile Filter (Bioengineering AG) für die Luftzu- und -abfuhr, ein Rückflusskühler, eine Lampe im Inneren des Reaktors sowie ein Manometer.

Eine doppelte Rushtonturbine (Scheibenrührer) mit sechs Rührblättern (80 mm Durchmesser) garantierte in Kombination mit vier Schikanen und einem Einblasrohr die Belüftung und Homogenisation der Kulturbrühe. Die Turbine wurde von einem Motor (Unitec Motor 1,1 kW) mit bis zu 1500 rpm Drehgeschwindigkeit angetrieben. Das Probeventil am unteren Ende wurde von der Firma Bioengineering AG hergestellt und mit Hilfe heißen Wasserdampfs sterilisiert. Der Wasserdampf wurde von einem externen Dampfgenerator (Faber Trevil) bereitgestellt.

Die Überprüfung der Prozessparameter und die automatische Prozesskontrolle erfolgten durch ein Thermometer (Pt 100), eine Antischaumsonde (DN 19, Bioengineering AG), einen Sauerstoffsensoren (Mettler Toledo InPro 6820), ausgestattet mit Teflonmembranen (Mettler Toledo O₂ membrane t-96) und einer pH Elektrode (MT405-DPAS-SC-K85/120 combination pH). Die pH-Wert- und Sauerstoffüberwachung fand mittels Bedienfeldern mit der Bezeichnung Mettler Toledo O₂ panel 4100e beziehungsweise Mettler Toledo pH-panel 2100e statt.

Die Prozesskontrolleinheit (PCU, ISE GmbH) kontrollierte die Rührergeschwindigkeit und die Temperatur im Inneren des Reaktors, sowie die Schlauchquetschpumpen. Die Speicherung aller erfassten Daten erfolgte automatisch durch die iFIX Startup Software (Version 3.0, 2002 Build 5179).

3.6.1 Inokulum

Materialien:

Zusätzlich zu Punkt 3.5.1

Sterile 250 Schüttelkolben mit Schlauchverbindung und Injektionsnadel

Methode:

Die Vorbereitung des Inokulums verlief analog zu Punkt 3.5.1. Nach abgelaufener Bebrütungsdauer 30 Stunden wurde das Inokulum aseptisch in den Bioreaktor transferiert.

3.6.2 Medium

Materialien:

Natriumchlorid (NaCl)

Magnesiumsulfat Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)

Magnesiumchlorid Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)

Calciumchlorid Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)

Kaliumchlorid (KCl)

Zitronensäure-Monohydrat

Ammoniumeisen (III)-citrat

Natriumnitrat (NaNO_3)

Natriumcarbonat (Na_2CO_3)

Natriumethylenediamintetraessigsäure Dihydrat ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)

Spurenelementestocklösung

Hefeextrakt

Pepton aus Kasein

D-Glukose

Hitzelabile Komponenten:

Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)

Vitamin B₁₂

Biotin

Thiamin-HCl

Waage

Sterile Sicherheitswerkbank (Laminar)

10 l Flasche

10 l Flasche, steril

Sterilfilter

Methode:

Tabelle 6: Zusammensetzung der Medien für die Fed-Batch Fermentation

	Batch Medium (4 l)	Feed Medium (5 l)
Glukose	20 g l ⁻¹	200 g l ⁻¹
Hefeextrakt	2 g l ⁻¹	12 g l ⁻¹
Pepton (aus Kasein)	2 g l ⁻¹	12 g l ⁻¹
ASW	50 % (v/v)	50 % (v/v)

Alle hitzestabilen Chemikalien für 2 l ASW, 8 g Hefeextrakt und 8 g Pepton wurden einzeln eingewogen und in 3,5 l RO-Wasser gelöst. Diese Lösung wurde in den Reaktor überführt und sterilisiert.

Für die Bereitung des Batch Mediums wurden 80 g Glukose in eine 500 ml Flasche eingewogen, mit RO-Wasser aufgefüllt und hitzesterilisiert. Anschließend wurden zu dieser Glukoselösung aseptisch die für 2 l ASW benötigten Vitaminlösungen hinzugefügt und die Mischung dem sterilisierten Medium im Reaktor beigemischt.

Die Komponenten des Feed Mediums wurden einzeln eingewogen, in RO-Wasser gelöst und mit RO-Wasser auf 5 l ergänzt. Die Sterilisierung erfolgte über Filtration.

3.6.3 Vorbereitungen

Der Deckel des sauberen Bioreaktors wurde abgenommen und das sterile Probenahmeventil, der Sauerstoffsensor und die Antischaumsonde hineingeschraubt. Anschließend wurde das Batchmedium, das noch keine Glukose und NaCl enthielt, eingefüllt, der Reaktor geschlossen und für 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck sterilisiert. Nach der Sterilisation wurde das Fermentationsprogramm gestartet und die verbleibenden Medienkomponenten aseptisch hinzugefügt. Die Ammoniaklösung (12,5 % v/v) zur Regulierung des pH-Wertes und die Flasche mit Antischaum (Glanapagon) wurden angestochen.

Nach Erreichen einer konstanten Medientemperatur von 25 °C im Inneren des Fermenters wurde die Belüftung 5 min lang auf 1 vvm (4 l min^{-1}) und die Rührerdrehzahl auf 800 rpm gestellt. Inzwischen wurde die Nullpunktkalibration mit Hilfe des Simulators (Mettler Toledo O₂ Simulator 82) durchgeführt und am Bedienfeld mit dem Code 1001 bestätigt. Nach Ablauf der 5 min erfolgte die Kalibration für 100 % relative Sauerstoffsättigung durch Eingeben des Codes 1100.

Anschließend wurde der Prozessmodus zurück auf „automatisch“ gestellt und die Belüftung auf circa 2 l min^{-1} angepasst. Die Zugabe des Inokulums erfolgte durch Anstechen eines der sterilen Septen am Reaktordeckel.

3.6.4 Probenahme

Materialien:

Bioreaktor mit Probenahmeventil
50 ml Proberöhrchen (Fa. Greiner, Artikelnummer: 227261)
Einweg Plastikspritze, 20 ml
Dampfgenerator

Methode:

1. Zu Beginn wurde die Plastikspritze an das Probenahmeventil angesetzt und circa 2 ml Kulturbrühe entnommen und verworfen.
2. Anschließend wurden zweimal 10 ml Probe für die gravimetrische BTS-Bestimmung gezogen, bzw. 40 ml zur Analyse des Squalengehalts und in 50 ml Proberöhrchen überführt.
3. Das Probenahmeventil wurde für circa 5 min mit heißem Dampf durchströmt.

3.6.5 Nach der Fermentation

Zum Beenden der Fermentation wurde das Programm über das Bedienfeld gestoppt, verbleibende Medienreste in den Reaktor gepumpt und der Fermenter bei 80 °C 20 min lang dekontaminiert. Die Kulturbrühe wurde entsorgt und der Innenraum des Reaktors mit Wasser ausgespült. Alle Teile wurden gesäubert und mit Wasser gereinigt.

3.7 Analytik

3.7.1 Squalenbestimmung

3.7.1.1 Gefriertrocknung

Materialien:

50 ml Proberöhrchen (Fa. Greiner, Artikelnummer: 227261) mit gewaschenem Pellet, gelagert bei -20 °C

Gefriertrockner (Druck um 1-2 mbar)

Polycarbonatbehälter

-80 °C Gefrierschrank

Methode:

1. Die Proben wurden bei -80 °C auf die Lyophilisierung vorbereitet.
2. Die Polycarbonatbehälter wurden mit den Proberöhrchen befüllt (max. 6 pro Behälter). Die Deckel der Röhrchen wurden leicht geöffnet.
3. Die Behälter wurden an den Gefriertrockner angeschlossen und die Ventile zur Vakuumpumpe wurden geöffnet.
4. Es erfolgte eine Druckbeobachtung wobei galt: unter 1 mbar ist gut, unter 2 mbar akzeptabel.
5. Die Proben wurden mindestens über Nacht gefriergetrocknet.
6. Das Ende des Prozesses konnte durch Überprüfung der Temperatur abgeschätzt werden. Niedrige Temperaturen waren ein Indiz dafür, dass der Prozess noch im Gange war, da noch immer Wasser vorhanden war.
7. Die Entnahme der Behälter erfolgte durch Auflegen des Daumens auf das Ventil. Danach wurde das Ventil geöffnet und die Kammer langsam wieder auf Normaldruck gebracht. Bei zu schnellem Gaseintritt besteht die Gefahr das Probenmaterial zu verlieren.

3.7.1.2 Squalenextraktion mit Hexan

Materialien:

20 ml Pyrexröhrchen

10 ml Pyrexröhrchen

5 ml Glaspipette

Pasteurpipetten

10% (w/v) KOH in 75% (v/v) Ethanol, auf Raumtemperatur temperiert

n-Hexan

Wasserbad (50°C)

Thermometer für Wasserbad

Ultraschallbad

Vortexer

Eppendorf Zentrifuge 5804

Rotor: Eppendorf A-4-44

Ca. 100 mg gefriergetrocknetes Algenpellet

Methode:

1. Von jedem gefriergetrockneten Zellpellet wurden ca. 100 mg in ein 20 ml Pyrexröhrchen abgewogen und der Wert notiert.
2. Zu jeder Probe wurden anschließend 4 ml Raumtemperatur warme 10% KOH-Lösung hinzugefügt und homogenisiert (vortexen).
3. Das Probengemisch wurde fünf Minuten lang im Ultraschallbad behandelt um eine Suspension ohne Klumpen zu erhalten
4. Die Probe wurde für 15 Minuten in das 50° Celsius warme Wasserbad gestellt und in fünf Minutenintervallen gemischt.
5. Mit einer Glaspipette wurden unter dem Abzug zwei ml n-Hexan hinzugefügt
6. Es folgten ein Mischungsschritt (vortexen) und eine weitere Behandlung für fünf Minuten im Ultraschallbad.
7. Nun wurde die obere hexanhältige Schicht mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein 10 ml Pyrexröhrchen überführt.
8. Zur verbleibenden Schicht (Zellpellet) wurden wiederum zwei ml Hexan hinzugefügt, gut gemischt und fünf Minuten in das Ultraschallbad gestellt.
9. Die obere Hexanschicht wurde mit einer Pasteurpipette abgehoben und zur ersten abgehobenen Fraktion transferiert.
10. Es folgte eine dritte Extraktion mit zwei ml Hexan, gefolgt von Mischen und einer fünf Minuten langen Ultraschallbadbehandlung.

11. Erneut wurde die Hexanschicht mit einer Pasteurpipette abgehoben und zu den ersten beiden Fraktionen hinzugefügt. Das Pyrexröhrchen wurde mit geschlossenem, dichtem Deckel bei 2000 rpm zwei Minuten lang zentrifugiert.

3.7.1.3 GC-MS Messung

Materialien:

GC-Vials

100 ml, 10 ml und 5 ml Messkolben

Kolbenhubpipette 1000 μ l

Pipettenspitzen

Pasteurpipetten

n-Hexan

Agilent Technologies 7890A GC-System

Säule J&W 19091N-202 Innowax 260 °C: 25 m x 200 μ m x 0.4 μ m

Agilent Technologies 7693 Autosampler

Agilent Technologies 5975C inert MSD mit Triple-Axis Detector

Software:

Agilent Technologies MSD Chem Station E.02.01.1177

Agilent Technologies Enhanced Chem Station E.02.01.1177

Kalibration:

1. Zur Herstellung der Kalibrationsstammlösung wurden 1,000 g Squalen bei Raumtemperatur in einen 100 ml Messkolben eingewogen und mit Hexan aufgefüllt. Dies entsprach einer Konzentration von 10.000 μ g ml⁻¹.
2. 1000 μ g ml⁻¹ Standardlösung: Von der Stammlösung wurden 1000 μ l entnommen, in einen 10 ml Messkolben überführt und bis zur Markierung mit Hexan aufgefüllt.
3. 600 μ g ml⁻¹ Standardlösung: Von der Stammlösung wurden 600 μ l entnommen, in einen 10 ml Messkolben überführt und bis zur Markierung mit Hexan aufgefüllt.
4. 300 μ g ml⁻¹ Standardlösung: Von der Stammlösung wurden 300 μ l entnommen, in einen 10 ml Messkolben überführt und bis zur Markierung mit Hexan aufgefüllt.
5. Zur Herstellung der 100, 60 und 30 μ g ml⁻¹ Standardlösungen wurden je 500 μ l der 1000, 600 und 300 μ g ml⁻¹ Standardlösungen in 5 ml Messkolben pipettiert und mit Hexan bis zur Markierung aufgefüllt.
6. Die Standardlösungen wurden gut geschüttelt.

Messung:

1. Circa 1,5 ml der Standardlösungen und der Proben wurden mit sauberen Pasteurpipetten in GC-Vials überführt, diese verschlossen und in den Autosampler gestellt.
2. Die Messung der Kalibrationsstandardlösungen erfolgte in dreifacher Bestimmung, Proben wurden zweimal gemessen. Als Blank diente Hexan.

Tabelle 7: Parameter der Methode *Squalen_Method_Isotherm_Sim*

Ofenprogramm	240 °C, 30 min lang
Laufzeit	30 min
Injektionsvolumen	1 µl
Lösungsmittel zum Ausspülen der Spritze	n-Hexan
Waschgänge vor der Injektion, je 8 µl	1
Waschgänge nach der Injektion, je 8 µl	3
Splitmodus	split
Splitverhältnis	10:1
Splitfluss	3 ml min ⁻¹

3.7.1.4 GC-FID Messung**Materialien:**

GC-Vials

100 ml, 10 ml und 5 ml Messkolben

Kolbenhubpipette 1000 µl

Pipettenspitzen

Pasteurpipetten

n-Hexan

Agilent Technologies 7890A GC-System

Flammenionisationsdetektor (FID) Agilent J&W HP-5

GC-Säule: HP-INNOWAX Polyethylene Glyco: Agilent 19091N-202

260 °C: 30 m, 0.32 mm, 0.25 µm)

Autosampler: Combi PAL, CTC Analysis

Software: Agilent Chem Station offline/ online Rev. B.04.02 [96]

PAL Cycle Composer Version 1.5.2.

Kalibration:

Die Herstellung der Standards erfolgte nach Punkt 3.7.1.3, verwendet wurden die Kalibrationspunkte zwischen 6 und 60 µg ml⁻¹.

Messung:

1. Circa 1,5 ml der Standardlösungen und der Proben wurden mit sauberen Pasteurpipetten in GC-Vials überführt, diese verschlossen und in den Autosampler gestellt.
2. Die Messung der Kalibrationsstandardlösungen erfolgte in dreifacher Bestimmung, Proben wurden dreimal gemessen. Als Blank diente Hexan.

Tabelle 8: Methodenbeschreibung GC-FID

Ofenprogramm	150 °C für 2 min; stufenweise Erhöhung der Temperatur um 10 °C min ⁻¹ bis 250 °C, 18 min bei 250 °C halten
Laufzeit	30 min
Injektionsvolumen	2 µl
Lösungsmittel zum Ausspülen der Spritze	n-Hexan
Waschgänge vor der Injektion, je 8 µl	1
Waschgänge nach der Injektion, je 8 µl	3
Splitmodus	ohne

3.7.2 Berechnung der Produktparameter**3.7.2.1 Squalengehalt**

Die Berechnung des Squalengehaltes erfolgte aus der dreifachen GC-FID Messung und der dazugehörigen Kalibrationsgerade im Bereich von 6 µg ml⁻¹ bis 60 µg ml⁻¹. Siehe dazu auch Punkt 4.1.2.

Die Ermittlung des Blank erfolgte durch Einsetzen von 0 als Mittelwert der FID-Messungen in Formel 1. Der Blankwert betrug 3,22 µg*ml⁻¹ und wurde zusätzlich von jeder berechneten Konzentration abgezogen.

$$\text{Squalengehalt [mg g}^{-1}\text{]} = \frac{\text{FID[Area]}}{k \left[\frac{\text{Area}}{\frac{\text{ml}}{\mu\text{g}}} \right]} + d - \text{Blankwert} * V_{\text{Probe}}[\text{ml}] * \frac{1 [\text{mg}]}{1000 [\mu\text{g}]} * \frac{1}{\text{Einwaage [g]}}$$

Formel 1: Squalengehalt

Wobei: V_{Probe}: Volumen des Extraktionsansatzes: 6 ml; Blankwert: 3,22

3.7.2.2 Produktbildungsrate Q_P

Ein weiterer interessanter Parameter zur Beschreibung der Squalenproduktion ist die Produktbildungsrate. Dazu wird zuerst die Squalenmenge P im Bioreaktor ermittelt. Nach Auftragen dieser gegen die Zeit ergibt sich aus der Steigung die Produktbildungsrate.

$$P_t [mg] = \text{Squalengehalt}_t [mg g^{-1}] * X_t [g]$$

Formel 2: Squalenmenge P zum Zeitpunkt t

$$Q_P = \frac{dP}{dt}$$

Formel 3: Produktbildungsrate

3.7.3 Gravimetrische Bestimmung der Biotrockensubstanz (BTS)

Materialien:

Sterile 10 ml Pipetten
 15 ml Zentrifugenröhrchen aus Plastik
 Akkupipettierhilfe
 20 ml Glasfläschchen für BTS und Restsubstratanalyse
 Exsikkator
 Trockenschrank; 105°C
 Analysenwaage, Präzision 0,0001 g
 Eppendorf Zentrifuge 5804
 Rotor: Eppendorf A-4-44
 Sterile Sicherheitswerkbank (Laminar)

Methode:

1. Ein 20 ml Glasfläschchen wurde beschriftet und 24 h vor der Analyse im 105°C Schrank ausgeglüht. Die Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte im Exsikkator.
2. Das Zellpellet aus Punkt 3.5.4, Probenahme, wurde zweimal mit je fünf ml RO-Wasser gewaschen und für je vier Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert.
3. Das gewaschene Zellpellet wurde in ein beschriftetes, ausgeglühtes und abgewogenes Fläschchen (BTS) überführt, das Zentrifugenröhrchen mit RO-Wasser ausgespült und ebenfalls in dasselbe Fläschchen überführt.
4. Das Zellpellet wurde für 24 h bei 105 °C getrocknet.
5. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur im Exsikkator wurde das Bruttogewicht des Fläschchens ermittelt.

3.7.4 Berechnung der Wachstumsparameter

3.7.4.1 Biomassekonzentration x

Zur Berechnung der BTS-Konzentration in g l^{-1} wurde die Differenz des Flaschengewichts vor und nach Hinzufügen der Biomasse herangezogen und durch das verwendete Probevolumen in l dividiert.

$$x = \frac{\Delta m}{V_{\text{Probe}}}$$

Formel 4: BTS-Konzentration x

3.7.4.2 Berechnung der Gesamtbiomasse X

X gibt die gesamte im Reaktor vorhandene Biomasse in g an. Dazu wird die Biomassekonzentration x [g l^{-1}] mit dem Volumen im Reaktor (V_{Reaktor} [l]) multipliziert

$$X = x * V_{\text{Reaktor}}$$

Formel 5: Gesamtbiomasse X

3.7.4.3 Berechnung der spezifischen Wachstumsrate μ

Die spezifische Wachstumsrate beschreibt die Proportionalität der Geschwindigkeit der Veränderung der Zellmasse pro Zeiteinheit zur Zellmasse X bei exponentiellem Wachstum. μ steht für die spezifische Wachstumsrate in h^{-1} , X für die trockene Biomassekonzentration in g l^{-1} , die Indizes 2 und 1 symbolisieren zwei unterschiedliche Probenahmezeitpunkte und Δt [h] steht für die Zeit, die zwischen den Probenahmen verstrichen ist.

$$\mu = \frac{\ln(X_2) - \ln(X_1)}{\Delta t}$$

Formel 6: spezifische Wachstumsrate μ

3.7.5 Nicht-freisetzbarer organischer Kohlenstoffgehalt (NPOC) und Gesamtstickstoffgehalt (TN)

Materialien:

Kaliumhydrogenphthalat p.A. ($C_8H_5KO_4$) im Exsikkator getrocknet

Kaliumnitrat p.A. (KNO_3) im Exsikkator getrocknet

1000 ml, 100 ml, 50 ml Messkolben

5 ml Messpipetten

50 ml, 20 ml, 10 ml, 5 ml Vollpipetten

Akkupipettierhilfe

20 ml TOC-Röhrchen (Shimadzu)

Dispenser

Shimadzu TOC-L_{CPH/CPN} analyzer

Shimadzu ASI-L autosampler

Analysenwaage, Präzision: 0,0001 g

Methode:

Erstellen der Kalibrationsgeraden für TC/NPOC:

1. 2,125 g getrocknetes Kaliumhydrogenphthalat wurden einwogen, in einen 1000 ml Messkolben überführt, der anschließend bis zur Markierung mit RO-Wasser aufgefüllt und geschüttelt wurde. Diese Stammlösung entsprach der 1000 ppm Standardlösung.
2. Herstellung der Verdünnungen: 100 ppm: Entnahme von 10 ml der Stammlösung, Überführen in einen 100 ml Messkolben, Auffüllen mit RO-Wasser bis zur Markierung.
3. 300 ppm Standardlösung: Entnahme von 30 ml der Stammlösung, Überführen in einen 100 ml Messkolben, Auffüllen mit RO-Wasser bis zur Markierung.
4. 600 ppm Standardlösung: Entnahme von 60 ml der Stammlösung, Überführen in einen 100 ml Messkolben, Auffüllen mit RO-Wasser bis zur Markierung.
5. Um 10, 30, 60 ppm Standardlösungen herzustellen wurden je 5 ml der 100, 300 und 600 ppm Standardlösungen entnommen, in frische 50 ml Messkolben pipettiert und mit RO-Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.
6. Alle Standardlösungen wurden gut geschüttelt. Je 20 ml Standardlösung wurde in je ein 20 ml TOC-Röhrchen transferiert. Die Röhrchen wurden mit Verschlussfolie abgedichtet, mit den passenden Deckeln verschlossen und im Autosampler platziert. Die Lagerung der Stamm- und Standardlösungen erfolgte bei 4 °C.
7. Es wurden zwei Kalibrationsgeraden gemessen mit dem vorgegebenen Kalibrierprogramm des Gerätes gemessen. Die erste reichte von 10-100 ppm, die zweite von 100-1000 ppm.

Erstellen der Kalibrationsgeraden für TN:

1. Die TN-Stammlösung wurde durch Einwaage von 7,219 g getrocknetes Kaliumnitrat in einen 1000 ml Messkolben hergestellt, der anschließend bis zur Markierung mit RO-Wasser aufgefüllt und geschüttelt wurde. Diese Stammlösung entsprach der 1000 ppm Standardlösung.
2. Herstellung der Verdünnungen: 100 ppm: Entnahme von 10 ml der Stammlösung, Überführen in einen 100 ml Messkolben, Auffüllen mit RO-Wasser bis zur Markierung.
3. 60 ppm: Entnahme von 3 ml der Stammlösung, Überführen in einen 50 ml Messkolben, Auffüllen mit RO-Wasser bis zur Markierung.
4. 30 ppm Standardlösung: Entnahme von 1,5 ml der Stammlösung, Überführen in einen 50 ml Messkolben, Auffüllen mit RO-Wasser bis zur Markierung.
5. Um Standardlösungen mit Konzentrationen von 10, 6, 3, 1 ppm herzustellen wurden je 5 ml der 100, 60, 30, 10 ppm Standardlösungen entnommen, in frische 50 ml Messkolben pipettiert und mit RO-Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.
6. Alle Standardlösungen wurden gut geschüttelt. Je 20 ml Standardlösung wurde in je ein 20 ml TOC-Röhrchen transferiert. Die Röhrchen wurden mit Verschlussfolie abgedichtet, mit den passenden Deckeln verschlossen und im Autosampler platziert. Die Lagerung der Stamm- und Standardlösungen erfolgte bei 4 °C.
7. Es wurden zwei Kalibrationsgeraden mit dem vorgegebenen Kalibrierprogramm des Gerätes gemessen. Die erste reichte von 1-10 ppm, die zweite von 10-100 ppm.

Vorbereitung der Proben:

Bei den Proben handelte es sich um Fermentationsüberstände und Medienüberstände aus den Versuchen mit den Schüttelkolben, die den Versuchssystemen in regelmäßigen Abständen entnommen wurden. Nach der Probenahme folgte ein Zentrifugationsschritt von fünf Minuten bei 4000 g, der auch in Punkt 3.5.4 beschrieben wird.

1. Vier ml des Probenüberstandes wurden in einem 20 ml TOC-Röhrchen mit 16 ml RO-Wasser verdünnt.
2. Das Röhrchen wurde mit Verschlussfolie abgedichtet, mit dem passenden Deckel versehen und im Autosampler platziert.

Messung:*Tabelle 9: Daten der Messmethode für die NPOC- und TN-Bestimmung*

System	TOC-L mit ASI-L
Analyse	NPOC/TN
Manuelle Verdünnung	1,000000
Anzahl der Wiederholungen	1
Quelle	NPOC_TN_120620_SH.met

Tabelle 10: Parameter der NPOC-Bestimmung

Einheit	mg l ⁻¹
Anzahl der Injektionen	2/3
Anzahl der Waschgänge	3
maximale Standardabweichung	0,100000
maximaler Variationskoeffizient	2,000000%
Säurezugabe	1,500000%
Begasungsfluss	80 ml
Begasungszeit	600 sec
automatische Verdünnung	0
Injektionsvolumen	20 µl
Mehrfachinjektionen	nein
Minimale Integrationszeit	0 sec
maximale Integrationszeit	290 sec
zuletzt verwendete Kalibrationsgerade	KK_MR_TC_100-1000.cal

Tabelle 11: Parameter der TN-Bestimmung

Einheit	mg l ⁻¹
Anzahl der Injektionen	2/3
Anzahl der Waschgänge	3
maximale Standardabweichung	0,100000
maximaler Variationskoeffizient	2,000000%
Säurezugabe	1,500000%
Begasungsfluss	80 ml
Begasungszeit	600 sec
automatische Verdünnung	0
Injektionsvolumen	20 µl
Mehrfachinjektionen	nein
Minimale Integrationszeit	0 sec
maximale Integrationszeit	290 sec
zuletzt verwendete Kalibrationsgerade	KK_MR_TN_10-100.cal

Die erhaltenen Ergebnisse wurden laut Formel 7 mit dem Verdünnungsfaktor 5 multipliziert. So ergab sich die NPOC- bzw. TN-Konzentration in mg l⁻¹.

$$\rho = \frac{m}{V_p} * VF$$

Formel 7: Massenkonzentration ρ

3.7.6 Kohlenhydratanalyse mittels HPLC

Methodenbeschreibung erfolgte nach Jeschek, (2012).

Trennprinzip: Bestimmung von Kohlenhydraten, organischen Säuren und Alkoholen mittels Ionen-Ausschluss-Chromatographie. Die isokratische Auftrennung der Substanzen erfolgte über einen stark sauren Kationentauscher mit 0,01 N Schwefelsäure als mobile Phase. Die Detektion erfolgte aufgrund von Änderungen im Brechungsindex mittels eines RI-Detektors

Ionen - Ausschlusschromatographie: Nicht dissoziierte (Kohlenhydrate, Alkohole) Probenmoleküle diffundieren in das Ionentauscherharz hinein und werden je nach ihrer Größe verschieden lange zurückgehalten. Anionen werden von der negativ geladenen Sulfithülle des Harzes abgestoßen und sofort eluiert, während Kationen durch Wechselwirkungen mit dem Harz verzögert eluiert werden.

Materialien:

GC/HPLC Vials

Einweg 0,22 μm Sterilfilter

Isokratische Pumpe, G1310A von Agilent 1100 Serie

Autosampler: G1329B von Agilent 1200 Serie, temperiert auf 10°C

Thermostatisiereinheit Autosampler: G1330B von Agilent 1200 Serie

Refractive Index Detector, G1362A von Agilent 1200 Serie, temperiert auf 25°C

Säulenofen: Jetstream 2 Serie, TEC

Vorsäulen zum Schutz der Trennsäule, Micro-Guard cartridge, #125-0129, BIO RAD

Säule: Aminex Ion Exclusion HPX 87H, 300 x 7.8 mm, #125-0140, BIO RAD, temperiert auf 25°C mittels Säulenofen

Software: Agilent ChemStation, Revision B.04.01

Parameter:

Tabelle 12: Parameter der Bestimmung mittels HPLC

Fließrate	0,45 ml min ⁻¹
Laufmittel	0,01 N Schwefelsäure (0,005 M)
Injektionsvolumen	20 μl

Kalibration:

Glukose: Kalibration von 100 mg l⁻¹ bis 2000 mg l⁻¹

Vor und nach jeder Analysenserie werden Standards zur Überprüfung der Kalibration bzw. des HPLC-Systems mitanalysiert.

Probenvorbereitung:

Zwei ml des Überstandes nach der Probenahme wurden mit einem 0,22 µm Filter in ein GC/HPLC-Vial sterilfiltriert und verschlossen. Bei einigen Proben erfolgte eine Verdünnung mit gereinigtem Wasser.

3.7.7 Bestimmung des pH-Wertes

Der pH-Wert wurde mittels pH-Papier (pH 1-10 Merck, 9526) und in einigen Versuchen mittels pH-Meter (WTW) bestimmt. Während der Fed-Batch-Fermentation erfolgte die pH-Messung mittels einer Sonde (Mettler Toledo, MT405-DPAS-SC-K85/120 combination pH) direkt im Reaktor.

3.7.8 k_La-Wertbestimmung

Materialien:

Enzymlösung bestehend aus:

0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7,0)

Glukose-Oxidase (10 [U ml⁻¹], Sigma; von *Aspergillus niger*, 17300 U/G Feststoff)

Katalase (120 [U ml⁻¹], Sigma; aus Rinderleber, 3809 U/mg Feststoff)

1,5 M Glukosestammlösung

10 ml Messkolben

Enzym-Testkit zur Glukosebestimmung (Lebensmittelanalytik, Boehringer Mannheim, Saccharose/D-Glucose)

500 ml Schikanenkolben mit blauen Deckeln

300 ml Schikanenkolben mit Wattestopfen

2 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf)

100 °C Wasserbad

Kolbenhuppipette 1000 µl

Pipettenspitzen

Orbitalschüttler

Photometer (Hach, Lange, DR5000)

Methode:

Methodenbeschreibung nach Heinzle, (2012)

1. Herstellung der Enzymlösung:
Für den Kalium-Phosphat-Puffer: 13,6 g KH_2PO_4 bzw. 17,4 g K_2HPO_4 wurden jeweils mit RO-Wasser auf einen Liter aufgefüllt.
60 ml der K_2HPO_4 -Lösung wurden mit 40 ml KH_2PO_4 -Lösung vermischt, was in einer 0,1 M Kalium-Phosphatpufferlösung resultierte. Darin wurden 0,0578 g Glukose-Oxidase und 0,0032 g Katalase gelöst.
2. Herstellung der Glukosestammllösung: Einwaage von 2,7 g D-Glukose in einen 10 ml Messkolben, der mit RO-Wasser bis zur 10 ml-Marke aufgefüllt wurde.
3. Befüllen der Schikanenkolben und Probenahme nach folgendem Schema: siehe Tabelle 13: Zusammensetzung der Ansätze zur k_La -Wertbestimmung Tabelle 13.
4. Nach Zugabe von 0,5 oder 1 ml Glukosestammllösung wurde aus den Ansätzen A, C und E sofort eine Nullprobe gezogen. Dazu wurde aus den genannten Kolben je ein ml Probengemisch entnommen, in ein Glasröhrchen transferiert und sofort in das 100 °C heiße Wasserbad gestellt.
5. Nach einer Inkubationsdauer von fünf Minuten wurde die Probe aus dem Wasserbad genommen und bis zur Messung der Glukosekonzentration auf Eis gestellt.
6. Weitere Probenahmen erfolgten laut Tabelle 14.

Tabelle 13: Zusammensetzung der Ansätze zur k_La -Wertbestimmung

	RO-H ₂ O [ml]	Enzymlösung [ml]	1,5 M Glukoselösung [ml]	Gesamtfüllvolumen [ml]
A	89,5	10	0,5	100
B	89,5	10	0,5	100
C	179	20	1	200
D	179	20	1	200
E	50	10	0,5	60,5

Bei A-D handelte es sich um 500 ml Schüttelkolben, bei E um einen 300 ml Schüttelkolben mit Wattestopfen.

Tabelle 14: Schema der Probenahme für die k_{La} -Wertbestimmung

	Probenahme nach						
	0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
A	x		x		x		x
B		x		x		x	
C	x		x		x		x
D		x		x		x	
E	x		x		x		x

Nach Beendigung der Probenahme erfolgte die Analyse der Glukosekonzentration mittels Enzym-Testkit.

1. Zuerst wurden 500 μ l von Lösung 1 in ein 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Danach erfolgte die Zugabe von RO-Wasser und der Probe- bzw. Standardlösung, siehe Tabelle 15.
2. Der Ansatz wurde gemischt und für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
3. Am Photometer wurde anschließend die Extinktion des Gemisches bei 340 nm detektiert.
4. Nach der Messung wurden 10 μ l Suspension 2 hinzugefügt, erneut gemischt und bei Raumtemperatur inkubiert.
5. Nach Ablauf von 15 Minuten erfolgte eine zweite Messung bei 340 nm.
6. Aus den beiden Messwerten wurde die Differenz gebildet und die Glukosekonzentration berechnet.

Tabelle 15: Pipettierschema für die Messung der Extinktionen

	Leerwert	Probe	Kontrolle
Lösung 1	500 μ l	500 μ l	500 μ l
RO-H₂O	1 ml	950 μ l	950 μ l
Probelösung		50 μ l	
Standardlösung			50 μ l
Mischen, 3 min Inkubation, Messung der Extinktion (E1)			
Suspension 2	10 μ l	10 μ l	10 μ l
Mischen, 15 min Inkubation, Messung der Extinktion (E2)			

3.7.8.1 Berechnung des $k_L a$ -Wertes

$$k_L a = \frac{r_{O_2}}{C_L^* - C_L}$$

Formel 8: $k_L a$ -Wert

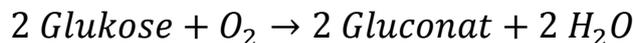
Die Berechnung des $k_L a$ -Wertes erfolgt nach obenstehender Formel, wobei C_L für die Konzentration von gelöstem Gas, C_L^* für die Gleichgewichtskonzentration an der Phasengrenzfläche bzw. die maximale Löslichkeit und r_{O_2} für die Sauerstoffverbrauchsrate steht. Die Gleichgewichtskonzentration kann über das Henry-Gesetz aus dem Partialdruck des jeweiligen Gases ermittelt werden.

Die Sauerstoffverbrauchsrate r_{O_2} kann durch die Bestimmung des Umsatzes der eingesetzten Reaktion indirekt ermittelt werden. Dazu wird die von Glukose-Oxidase katalysierte enzymatische Oxidation von Glukose zu Gluconsäure verwendet. Das dabei entstandene Wasserstoffperoxyd wird im Folgenden durch das Enzym Katalase in Wasser und Sauerstoff umgewandelt:



Formel 9: Katalasereaktion

So entstehen aus 2 mol Glukose 2 mol Gluconat und 2 mol H_2O :



Formel 10: Oxidation von Glukose durch Glukose-Oxidase

Die Glukoseverbrauchsrate kann nun herangezogen werden um die Sauerstoffverbrauchsrate aufgrund der Proportionalität zwischen Glukose- und Sauerstoffverbrauch direkt zu berechnen indem die Glukoseverbrauchsrate in $\text{mol l}^{-1} \text{min}^{-1}$ durch 2 dividiert wird, da je 2 mol eingesetzter Glukose ein mol Sauerstoff verbraucht werden.

Die Glukoseverbrauchsrate ergibt sich aus der Steigung der Geraden, die entsteht, wenn Glukosekonzentration (y) und Zeit (x) aufgetragen werden.

Aus den erhaltenen Extinktionswerten aller Proben werden die Extinktionsdifferenzen ΔE_0 berechnet:

$$\Delta E_0 = E_2 - E_1$$

Formel 11: Extinktionsdifferenz ΔE_0

Um die Extinktionsdifferenz ΔE der Proben zu berechnen ist ΔE_0 des Leerwerts von ΔE_0 der Proben abzuziehen:

$$\Delta E = \Delta E_{0Probe} - \Delta E_{0Leerwert}$$

Formel 12: Extinktionsdifferenz ΔE

Die Berechnung der Glukosekonzentration erfolgt anschließend nach:

$$c_{Glc} [mol \cdot l^{-1}] = \frac{F * V * \Delta E}{\epsilon * d * v * 1000}$$

Formel 13: Glukosekonzentration c_{Glc}

wobei:

F: Verdünnungsfaktor der Probe

V: Gesamtvolumen des Messansatzes (1,51 ml)

v: Probevolumen (0,05 ml)

1000: Umrechnungsfaktor von ml in l

d: Schichtdicke der Küvette (1 cm)

ϵ : Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm

ΔE : Extinktionsdifferenz der Probe

4 Versuche und Ergebnisse

4.1 Kalibrationsgeraden

4.1.1 GC-MS

Tabelle 16: Messwerte der Kalibrationsstandards

Konzentration [µg ml ⁻¹]	Messung [Area]			Standardab- weichung [Area]
	1/3	2/3	3/3	
60,516	1.814.052	829.759	1.734.289	546.712
30,258	587.780	943.035	825.013	180.930
10,086	136.608	161.591	201.490	32.725
6,0516	273.862	129.592	150.477	77.967

Geradengleichung:

$$y = 32731x - 2E+06$$

$$R^2 = 0,9767$$

Formel 14: Kalibrationsgerade der GC-MS-Messung

Die Messwerte der einzelnen Bestimmungen streuen sehr stark. Durch die Ungenauigkeit der Messmethode wurde der Squalengehalt mittels GC-FID ermittelt.

4.1.2 GC-FID

Tabelle 17: Messwerte der Kalibrationsstandards

Konzentration [µg ml ⁻¹]	Messung [Area]			Standardab- weichung [Area]
	1/3	2/3	3/3	
60	463,16989	482,02798	506,91348	21,94089
30	210,38405	208,9929	206,94116	1,73198
10	58,42245	59,65656	60,02536	0,83948
6	29,05715	29,0049	32,21862	1,84054

Geradengleichung:

$$y = 8,4015x - 27,071,$$

$$R^2 = 0,9972$$

Formel 15: Kalibrationsgerade der GC-FID-Messung

Diese Geradengleichung wurde zur Berechnung des Squalengehaltes verwendet.

4.2 Versuche in 500 ml Schüttelkolben

4.2.1 Wachstum bei verschiedenen Glukosekonzentrationen und Füllvolumina ohne zusätzlicher Stickstoffquelle im Batchversuch (Versuch A-F)

4.2.1.1 Zielsetzung

Ziel dieses Versuches war es, unterschiedliche Medienvolumen und Glukosekonzentrationen zu vergleichen und dabei möglichst viel BTS zu produzieren. Die Versuche wurden in 500 ml Schikanenkolben durchgeführt. Die Kolben wurden mit einem Verschluss mit gasdurchlässiger Membran versehen.

Die Kolben A, C, E enthielten 100 ml Medium; die Kolben B, D, F: 200 ml. Die Glukosekonzentration variierte wie folgt: A, B: 0,5 % (w/v) C, D: 2 % E, F: 8 % Glukose.

Als Stickstoffquelle diente YEP. Die Konzentration von YEP in allen Kulturen betrug 0,1 % und war daher nicht an die steigende Glukosekonzentration angepasst.

4.2.1.2 Inokulum und Medienzusammensetzung

Tabelle 18: Medienzusammensetzung, Alter und BTS-Konzentration des Inokulums Versuch A-F

	ASW [g]	YEP-Stamm-lösung [ml]	dH ₂ O [g]	Glukose-stamm-lösung [ml]	Volumen Inokulum [ml]	Alter Inokulum [h]	BTS Inokulum [g l ⁻¹]
A	50	10	39	0,8	5	39	1,9
B	100	20	77,5	1,6	10	39	1,9
C	50	10	35	3,2	5	39	1,9
D	100	20	70	6,4	10	39	1,9
E	50	10	20	12,8	5	39	1,9
F	100	20	40	25,6	10	39	1,9

Die Herstellung, Beimpfung und Bebrütung des Mediums für das Inokulum erfolgte nach Punkt 3.5.1.

Nach der Beimpfung mit 39 Stunden altem Inokulum wurden die Kulturen für 168 Stunden bebrütet. Es erfolgten regelmäßige Probenahmen in Einfachbestimmung. Daraus wurden die BTS-Konzentration, der NPOC- und der TN-Gehalt bestimmt. Des Weiteren fanden optische Kontrollen statt.

4.2.1.3 Biomassekonzentration

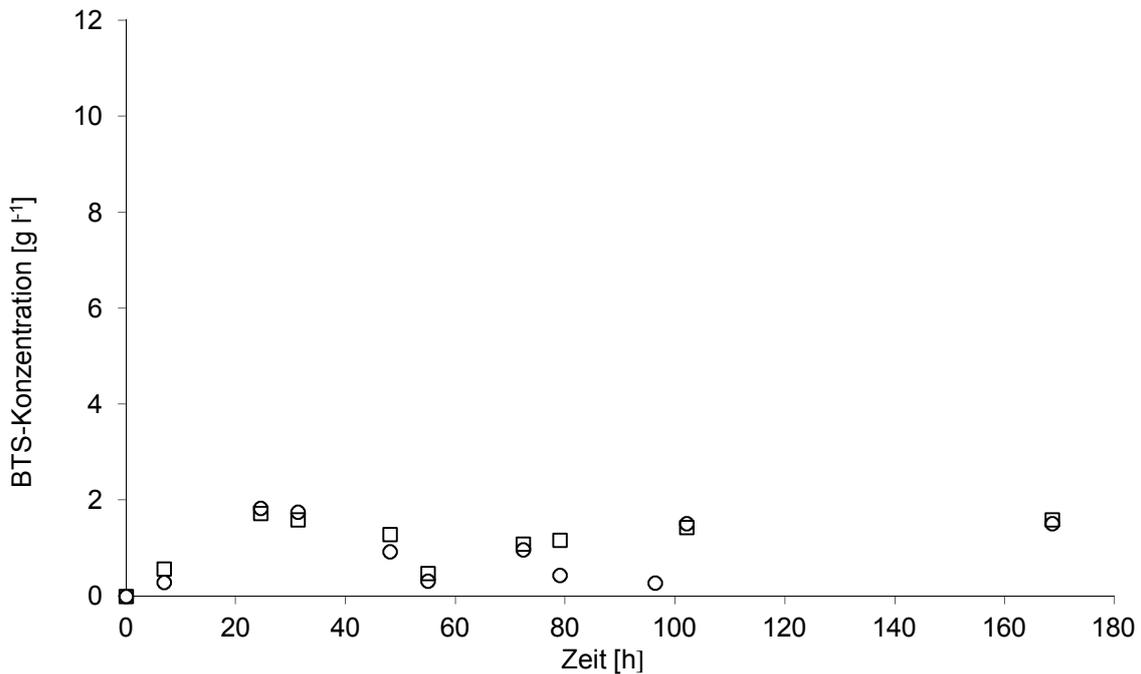


Diagramm 1: 0,5 % Glukose, BTS-Konzentration von Kultur A (100 ml Füllvolumen, □) und Kultur B (200 ml Füllvolumen, ○) im Batchbetrieb

Die Daten der BTS-Konzentrationsbestimmung bei 0,5 % Glukose schwanken stark. Der Datenpunkt für Kultur bei 96,25 Stunden wurde als Ausreißer identifiziert und nicht im Diagramm dargestellt.

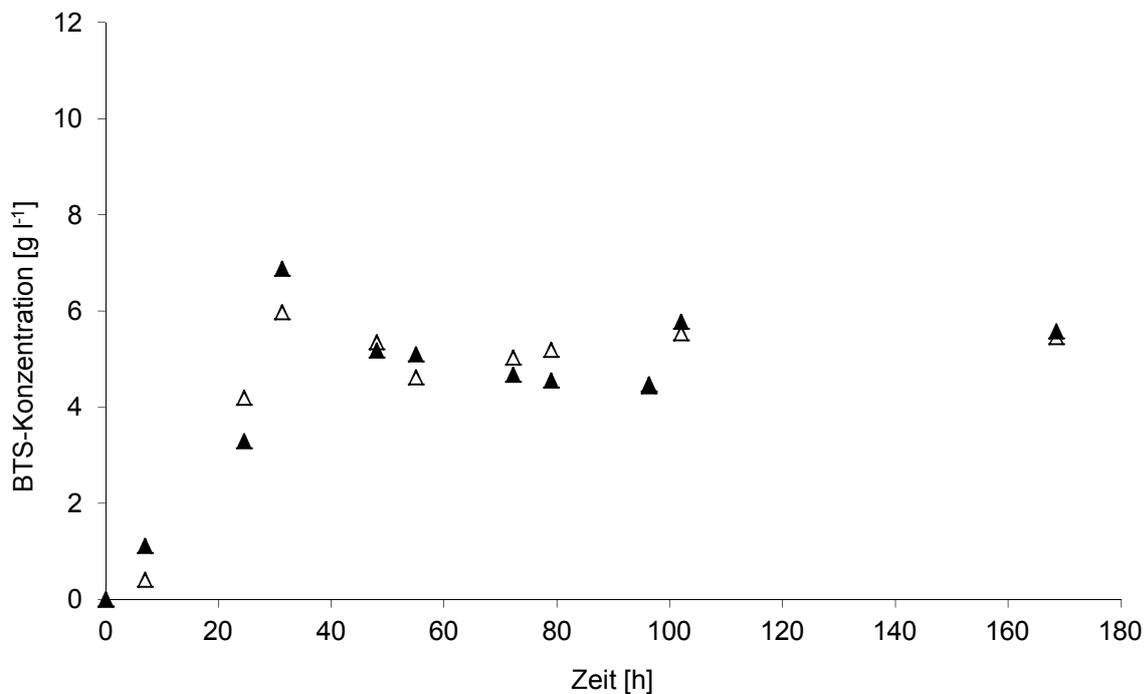


Diagramm 2: 2 % Glukose, BTS-Konzentration von Kultur C (100 ml Füllvolumen, Δ) und Kultur D (200 ml Füllvolumen, ▲) im Batchbetrieb

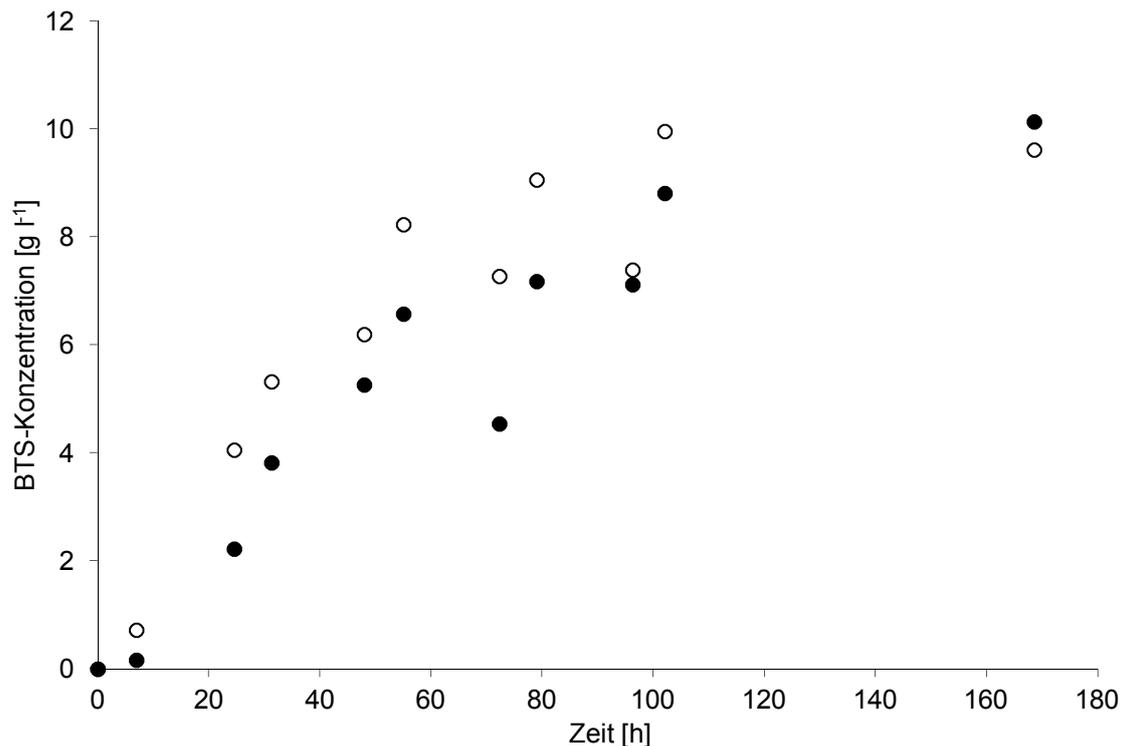


Diagramm 3: 8 % Glukose, BTS-Konzentration von Kultur E (100 ml Füllvolumen, ○) und Kultur F (200 ml Füllvolumen, ●) im Batchbetrieb

Bei keiner der verwendeten Glukosekonzentrationen ist ein offensichtlicher Unterschied zwischen einer Füllmenge von 100 ml und 200 ml zu erkennen. Die maximale BTS-Konzentration übersteigt nicht die Grenze von 2 g l^{-1} bei 0,5 % Glukose. Für 2 % Glukose liegt der höchste erreichte BTS-Wert bei circa 6 g l^{-1} , für 8 % Glukose bei 10 g l^{-1} .

Bei den Kulturen E und F (8 % Glukose) traten nach 55 Stunden bis zum Zeitpunkt der Ernte Probleme bei der Probenaufbereitung für die BTS-Bestimmung auf. Nach der ersten Zentrifugation befand sich ein Teil des Zellpellets im Überstand, der dadurch trüb wirkte. Nach Verdünnen des Überstandes mit 5 ml RO-Wasser und Zentrifugation dieser Fraktion konnte ein Pellet gewonnen werden, das mit dem ersten vereint wurde und den weiteren Wasch- und Trockenschritten unterzogen wurde.

4.2.1.4 Restsubstratanalyse

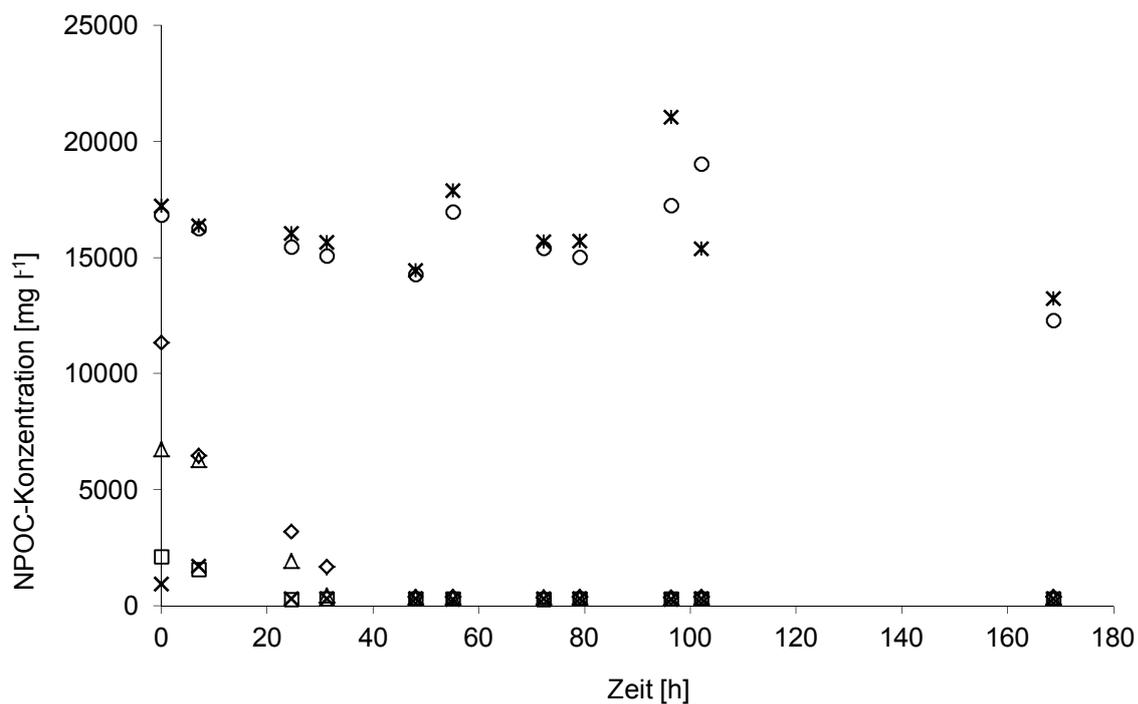


Diagramm 4: NPOC-Konzentration Kulturen A-F, Batchbetrieb mit verschiedenen Glukosekonzentrationen und Füllvolumina. 8 % Glukose: 100 ml Füllvolumen: ○; 200 ml: ✕; 2%: 100 ml: △; 200 ml: ◇; 0,5 %: 100 ml: □; 200 ml: x

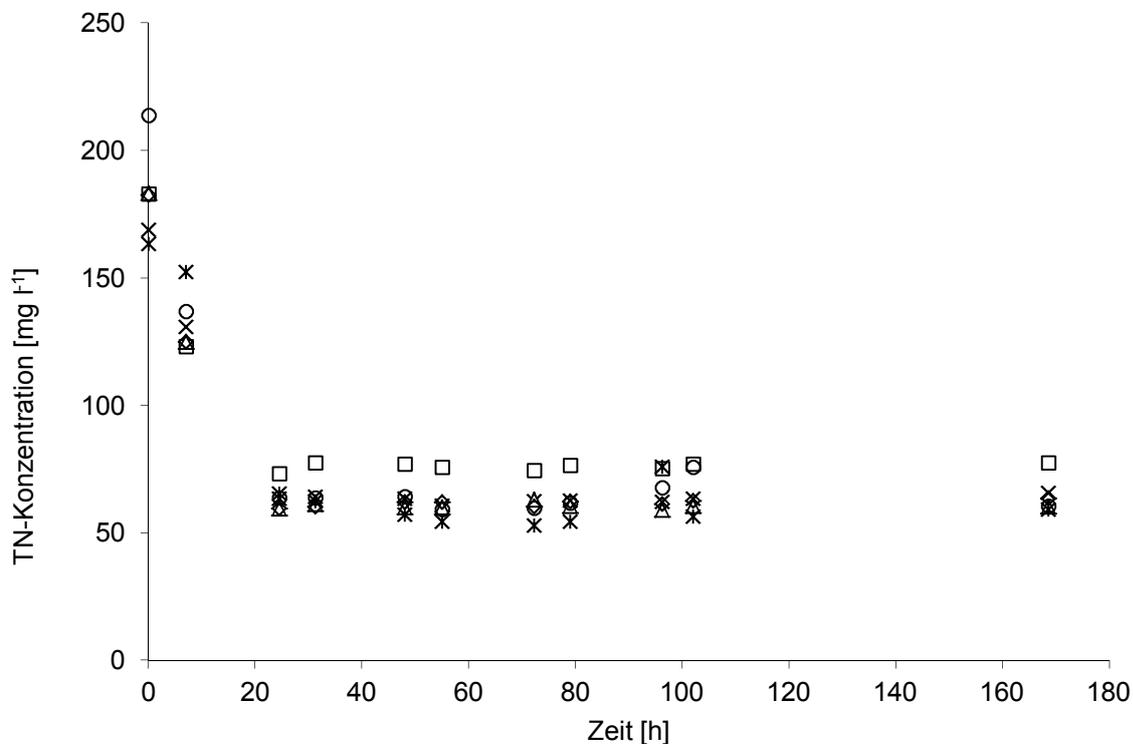


Diagramm 5: TN-Konzentration Kulturen A-F; Batchbetrieb mit verschiedenen Glukosekonzentrationen und Füllvolumina. 8 % Glukose: 100 ml Füllvolumen: ○; 200 ml: ✕; 2%: 100 ml: △; 200 ml: ◇; 0,5 %: 100 ml: □; 200 ml: x

Die Restsubstratanalyse zeigt eine Abnahme der Kohlenstoff- und Stickstoffquelle im Laufe der Zeit. Die Kulturansätze mit 0,5 % und 2 % Glukose erreichen das niedrigste NPOC-Niveau zwischen $340 \pm 40 \text{ mg l}^{-1}$ nach 24 beziehungsweise 48 Stunden. Bei 8 % Glukose bleiben die Werte konstant, es ist kaum eine Abnahme der C-Quelle sichtbar. Der Verlauf des Stickstoffverbrauchs ist bei allen Kulturen derselbe. Nach 24,5 Stunden ist ein Plateau von circa $65 \pm 12 \text{ mg l}^{-1}$ erreicht, das sich bis zum Zeitpunkt der Ernte nicht mehr verändert. Es kann davon ausgegangen werden, dass die minimale Stickstoffkonzentration bei diesem Wert liegt. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Füllvolumina zu sehen.

4.2.1.5 pH-Wert

Bei diesem Versuch erfolgte keine Bestimmung des pH-Wertes der Kultur.

4.2.2 Wachstum bei verschiedenen Glukosekonzentrationen und Füllvolumina mit zusätzlicher Stickstoffquelle im Batchversuch (Versuch G-L)

4.2.2.1 Zielsetzung

Ziel dieses Versuches war es, den Versuch zur Untersuchung des Wachstum bei verschiedenen Glukosekonzentrationen und Füllvolumina ohne zusätzlicher Stickstoffquelle zu wiederholen; zusätzlich wurden NH_4NO_3 - und K_2HPO_4 -Lösungen zugesetzt um eine mögliche Stickstoff- und Phosphorlimitierung auszuschließen.

Die Versuche wurden in 500 ml Schikanenkolben mit einem Verschluss mit gasdurchlässiger Membran durchgeführt.

Die Kolben G, I, K enthielten 100 ml Medium. Die Kulturen H, J, L waren mit 200 ml Medium befüllt. Die Glukosekonzentration variierte wie folgt: G, H: 0,5% (w/v) I, J: 2% K, L: 8% Glukose.

Die Konzentration von YEP in allen Kulturen betrug 0,1 % und war daher nicht an die steigenden Glukosekonzentrationen angepasst. Als weitere Stickstoffquelle diente eine 1,25 M NH_4NO_3 -Lösung, als Phosphorquelle eine 0,329 M K_2HPO_4 -Lösung. Die Zugabe beider Lösungen wurde an die Glukosekonzentration der jeweiligen Kultur angepasst. Bei der Berechnung wurde ein molekulares Verhältnis von C:N:P-Atomen 100:5:1 als Grundlage herangezogen.

4.2.2.2 Inokulum und Medienzusammensetzung

Tabelle 19: Medienzusammensetzung Versuch G-F

	ASW [g]	YEP-Stammlösung [ml]	dH ₂ O [g]	Glukose-stamm-lösung [ml]		1,25 M NH ₄ NO ₃ Lösung [ml]	0,329 M K ₂ HPO ₄ ⁻ Lösung [ml]
G	50	10	39	0,8	Entnahme von 5 ml Probe	0,12	0,197
H	100	20	77,5	1,6		0,234	0,385
I	50	10	35	3,2		0,48	0,788
J	100	20	70	6,4		0,937	1,5
K	50	10	20	12,8		2,1	3,2
L	100	20	40	25,6		4,1	6,3

Die Herstellung, Beimpfung und Bebrütung des Mediums für das Inokulums erfolgte nach Punkt 3.5.1. Das Inokulum war 39,5 h alt, die BTS-Konzentration betrug $1,5 \text{ g l}^{-1}$. Zu Kulturen mit einem Gesamtvollvolumen von 200 ml wurden 10 ml Inokulum hinzugefügt, bei einem Füllvolumen von 100 ml betrug das Inokulumsvolumen 5 ml. Die Bebrütungsdauer betrug 167 Stunden. Neben optischen Kontrollen erfolgten regelmäßige Probenahmen in Einfachbestimmung. Daraus wurden die BTS-Konzentration, der NPOC- und der TN-Gehalt sowie der pH-Wert bestimmt

4.2.2.3 Biomassekonzentration

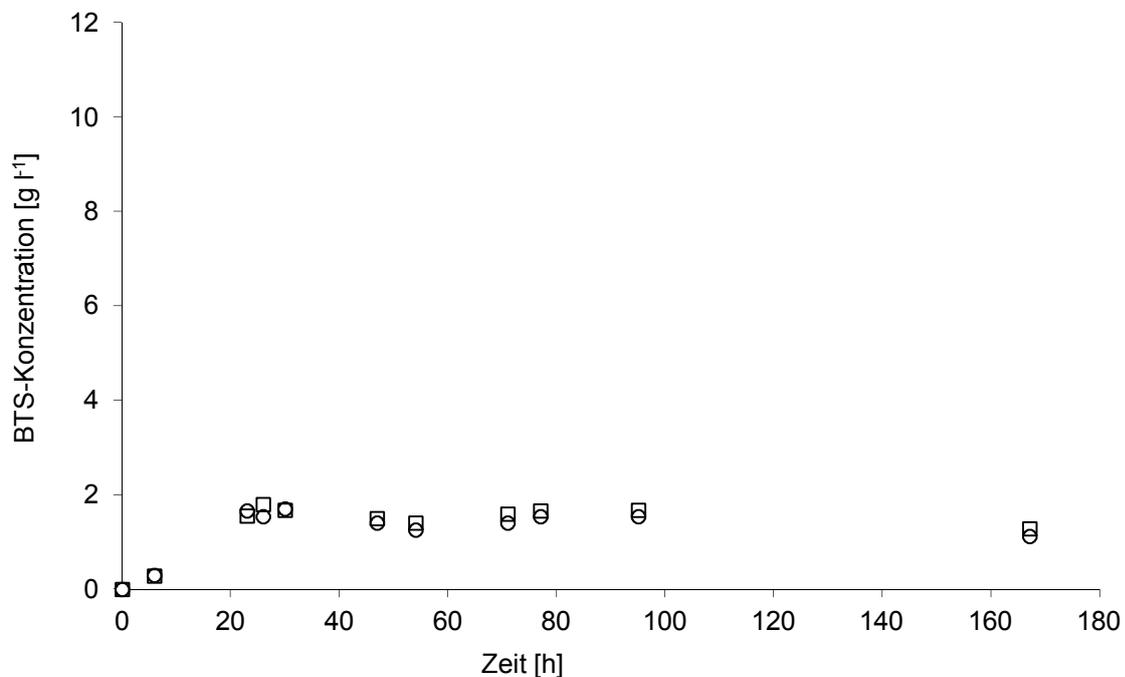


Diagramm 6: 0,5 % Glukose, BTS-Konzentration von Kultur G (100 ml Füllvolumen, □) und Kultur H (200 ml Füllvolumen, ○) im Batchbetrieb

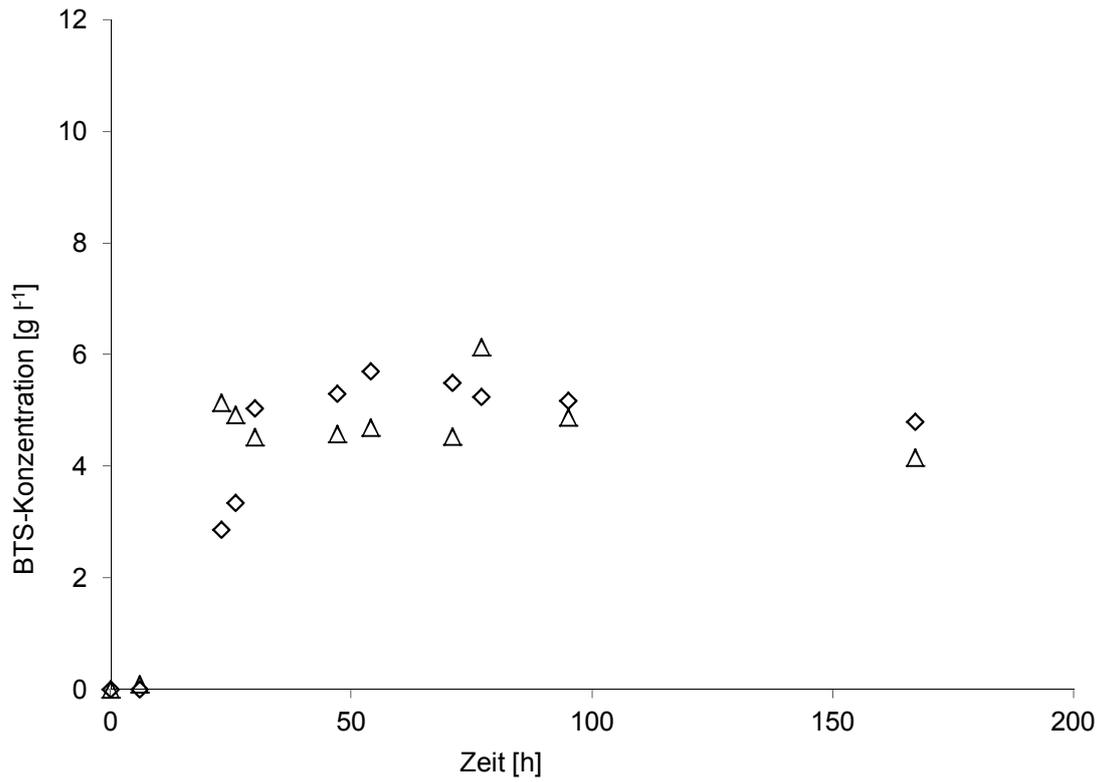


Diagramm 7: 2 % Glukose, BTS-Konzentration von Kultur I (100 ml Füllvolumen, Δ) und Kultur J (200 ml Füllvolumen, \diamond) im Batchbetrieb

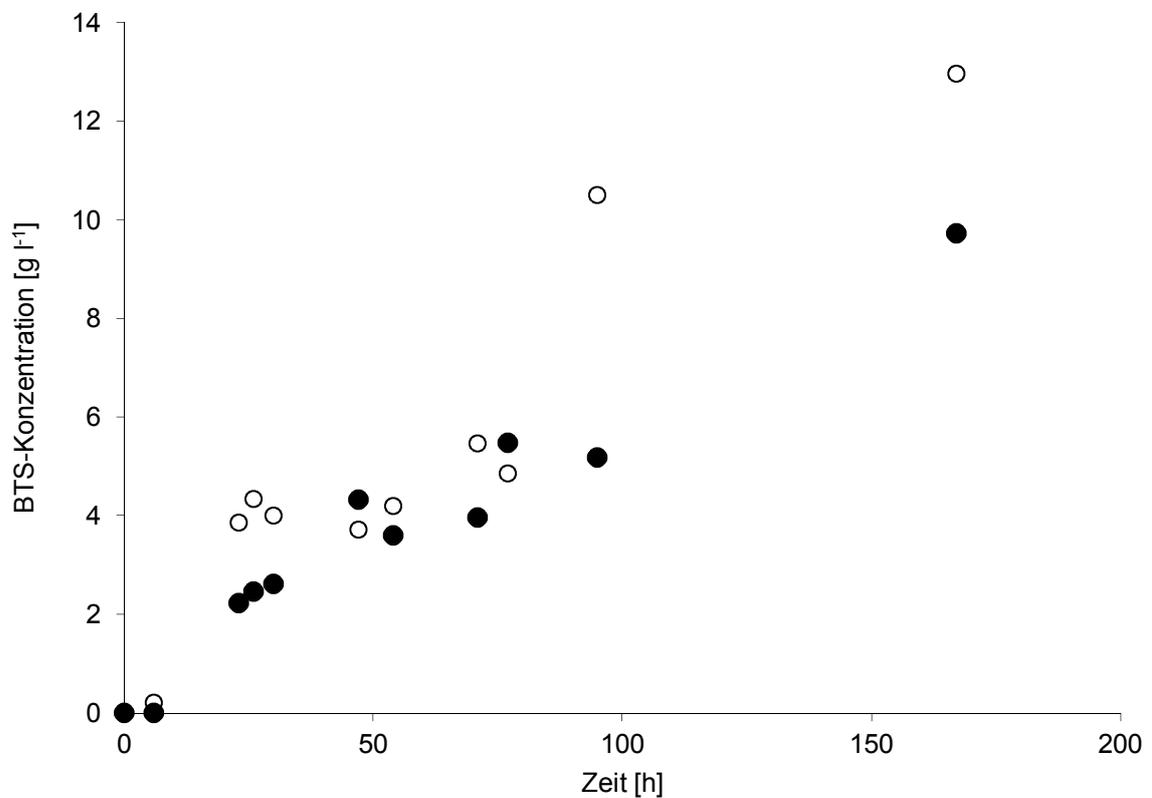


Diagramm 8: 8 % Glukose, BTS-Konzentration von Kultur K (100 ml Füllvolumen, \circ) und Kultur L (200 ml Füllvolumen, \bullet) im Batchbetrieb

Die BTS-Entwicklung bei den Ansätzen mit 0,5 % Glukose pendelte sich zwischen und 1,8 und 1,6 g l⁻¹ ein. Bei 2 % Glukose bewegte sich die BTS-Konzentration bei circa 5 g l⁻¹. Bei beiden Glukosekonzentrationen erreichte die Wachstumskurve die stationäre Phase nach 30 Stunden. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen 100 ml und 200 ml Füllvolumen ersichtlich. Die höchsten BTS-Werte, die bei einer Glukosekonzentration von 8 % erreicht wurden lagen bei 9,7 g l⁻¹ (200 ml Füllvolumen) und 13 g l⁻¹ (100 ml Füllvolumen). 95 Stunden nach Inokulation beginnt die BTS-Kurve in der 100 ml Kultur stärker anzusteigen. Davor ist kein offensichtlicher Unterschied zu beobachten.

4.2.2.4 Restsubstratanalyse

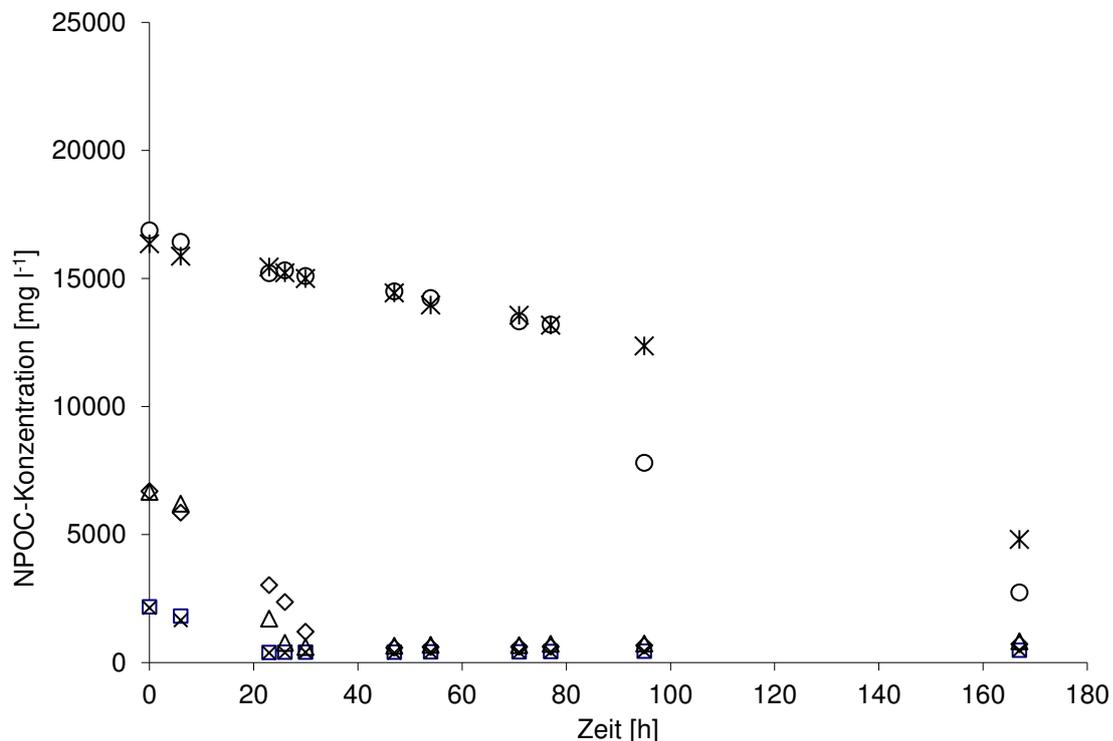


Diagramm 9: NPOC-Konzentration Kulturen G-L Batchbetrieb mit verschiedenen Glukosekonzentrationen und Füllvolumina mit zusätzlicher Stickstoffquelle. 8 % Glukose: 100 ml Füllvolumen: ○; 200 ml: ✕; 2%: 100 ml: △; 200 ml: ◇; 0,5 %: 100 ml: □; 200 ml: x

Die Restsubstratanalyse zeigt eine Abnahme der Kohlenstoff- und Stickstoffquelle im Laufe der Zeit. Kulturen mit 0,5 % Glukose im Medium erreichen das niedrigste NPOC-Niveau von $379 \pm 9 \text{ mg l}^{-1}$ nach 24,5 Stunden, Kulturen mit 2 % Glukose nach circa 30 Stunden, wobei das Plateau bei circa $582 \pm 12 \text{ mg l}^{-1}$ liegt. Bei 8 % Glukose geht der Kohlenstoffverbrauch langsamer vor sich. Nach 77 Stunden können noch etwa 44 % des verfügbaren NPOC gefunden werden und bis zu diesem Zeitpunkt ist kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Füllvolumina zu erkennen. Danach sinkt der Kohlenstoffverbrauch in der 100 ml Kultur schneller als bei einem Füllvolumen von 200 ml.

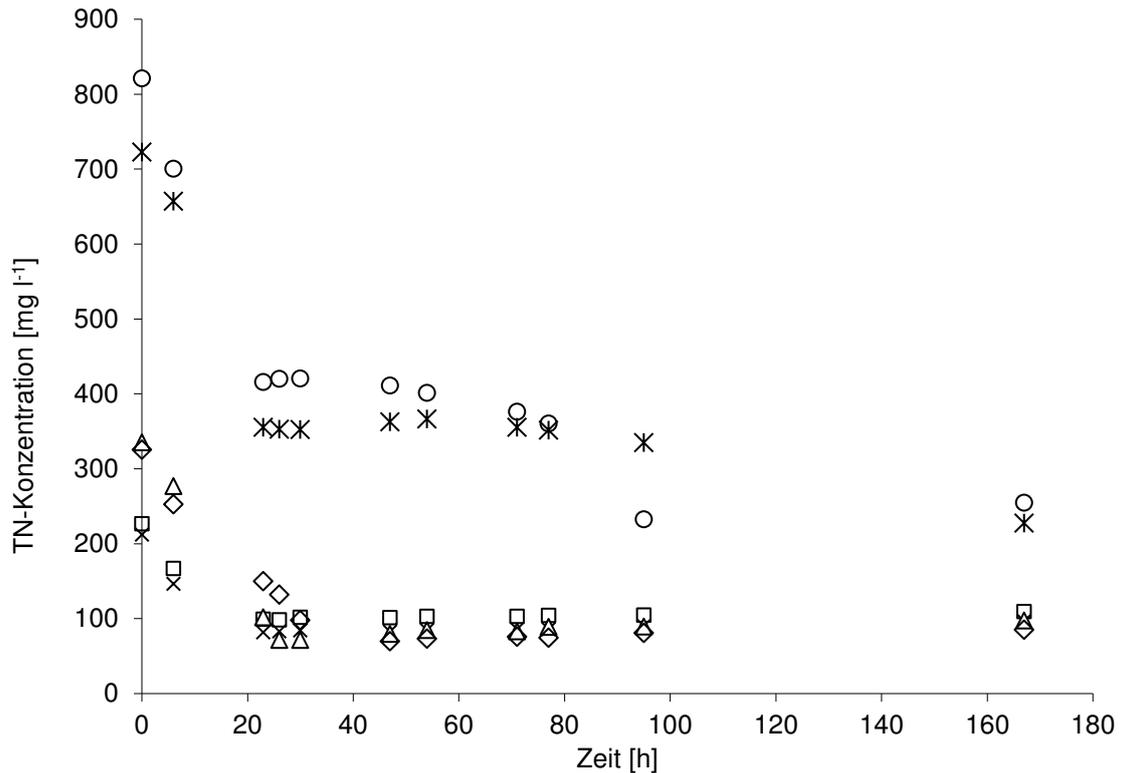


Diagramm 10: TN-Konzentration NPOC-Konzentration Kulturen G-L Batchbetrieb mit verschiedenen Glukosekonzentrationen und Füllvolumina mit zusätzlicher Stickstoffquelle. 8 % Glukose: 100 ml Füllvolumen: ○; 200 ml: X; 2%: 100 ml: Δ; 200 ml: ◇; 0,5 %: 100 ml: □; 200 ml: x

Der Verlauf des Stickstoffverbrauchs ist bei verschiedenen Glukosekonzentrationen ähnlich. Nach 23 Stunden erreichen die Kulturen mit 0,5 % Glukose ein Plateau von circa $65 \pm 12 \text{ mg l}^{-1}$, das von den Ansätzen mit 2 % Glukose nach 30 Stunden erreicht wird und sich bis zum Zeitpunkt der Ernte nicht mehr verändert. Die Kulturen K und L (8 % Glukose) erreichen ein Plateau nach 23 Stunden, das nach einer Kultivationsdauer von 77 Stunden weiter sinkt, den Wert von 227 mg l^{-1} aber nicht unterschreitet. Auch hier ist kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Füllvolumina zu sehen.

4.2.2.5 pH-Wert

Der pH-Wert in den Kulturen mit 0,5 % und 2 % Glukose bewegt sich bei beiden Füllvolumen zwischen 6,5 und 7. Die erste Messung erfolgte nach 23 Stunden. Bei 8 % Glukose befindet sich der pH-Wert nach 23 Stunden zwischen 3 und 4. Während der Kultivierung steigt er bei einem Füllvolumen von 100 ml auf 6-7, bei 200 ml liegt nach abgelaufener Kultivierung pH-Wert 5 vor.

4.2.3 Bestimmung der Squalenproduktionsdauer im Batchversuch

4.2.3.1 Zielsetzung

Ziel dieses Versuches war es die Squalenproduktionsdauer und den -gehalt bei optimalen Bedingungen von 2 % (w/v) Glukose und 200 ml Füllvolumen in 500 ml Schikanenkolben mit Verschlüssen mit eingebauter gasdurchlässiger Membran zu bestimmen.

Die Glukosekonzentration betrug 2 % bei einem Füllvolumen von 200 ml. Als Stickstoffquelle diente YEP. Die Konzentration von YEP in allen Kulturen betrug 0,1 %.

4.2.3.2 Inokulum und Medienzusammensetzung

Tabelle 20: Medienzusammensetzung Versuch D1-D6

	ASW [g]	YEP- Stamm- lösung [ml]	dH ₂ O [g]	Glukose- stamm- lösung [ml]	Volumen Inokulum [ml]	Alter Inoku- lum [h]	BTS-Konz. Inokulum [g l ⁻¹]
D1	100	20	70	6,4	10	39	k.A.
D2	100	20	70	6,4	10	39	k.A.
D3	100	20	70	6,4	10	39	k.A.
D4	100	20	70	6,4	10	39	k.A.
D5	100	20	70	6,4	10	39	k.A.
D6	100	20	70	6,4	10	39	k.A.

Die Herstellung, Beimpfung und Bebrütung des Mediums für das Inokulums erfolgte nach Punkt 3.5.1. Das Alter des Inokulums betrug 39 Stunden, eine Bestimmung der BTS-Konzentration wurde nicht durchgeführt.

Die Kulturen wurden nach 24, 30 und 72 h in Doppelbestimmungen geerntet. Neben optischen Kontrollen erfolgte eine Bestimmung der BTS-Konzentration zum Zeitpunkt der Ernte.

Die Bestimmung des Squalengehaltes erfolgte nach Protokoll. Die Analyse wurde mittels Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor durchgeführt.

4.2.3.3 Biomassekonzentration

Tabelle 21: BTS-Daten für D1-D6

	Leergewicht [g]	Gewicht mit BTS [g]	Differenz [g]	BTS [g l ⁻¹]	Zeit nach Inokulation [h]
D1	19,8804	19,8973	0,0169	3,38	24,00
D2	19,3855	19,4008	0,0153	3,06	24,00
D3	19,5072	19,5299	0,0227	4,54	30,00
D4	18,6059	18,6284	0,0225	4,50	30,00
D5	19,5770	19,6026	0,0256	5,12	72,00
D6	19,5362	19,5646	0,0284	5,68	72,00

Die Werte stimmen mit den Daten aus dem vorher beschriebenen Versuche überein, siehe dazu auch Seite 50, Versuch A-F, Kultur D.

4.2.3.4 Squalenbestimmung

Tabelle 22: Ergebnisse der Squalenbestimmung mittels FID

	Einwaage [g]	FID Messung [Area]			Mittelwert FID [Area]	Konzentration [µg ml ⁻¹]	Squalengehalt [mg g ⁻¹]	Standardabweichung [mg g ⁻¹]
		1/3	2/3	3/3				
D1	x	x	x	x	x	x	x	x
D2	0,1305	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
D3	0,1019	66,97	69,75	72,29	69,67	8,29	0,49	0,02
D4	0,1245	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
D5	0,1063	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
D6	0,1127	13,71	15,82	15,67	15,07	1,80	0,10	0,01

x.. zu wenig Zellpellet für die GC-FID Analyse vorhanden.

D1 und D2 wurden nach 24 h, D3 und D4 nach 30 h, D5 und D6 nach 72 h geerntet. Die Analyse des Squalengehaltes mittels GC-FID wurde an den lyophilisierten Zellpellets von D2-D6 durchgeführt und verlief nach 48 und 72 Stunden positiv. Allerdings wurde nur in jeweils einer der Doppelbestimmungen Squalen gefunden, nämlich in den Proben D3 und D6. Der Squalengehalt nach 30 Stunden lag bei 0,49 mg Squalen g⁻¹ Biotrockenmasse. Nach 72 Stunden erniedrigte sich der Wert um circa 80 % auf 0,1 mg g⁻¹.

Zusätzlich wurde eine Analyse mit GC-MS durchgeführt und das Gerät erkannte Squalenpeaks in den Proben D1, D3 und D4, allerdings schwankten die Messwerte zu stark um weiter quantifiziert zu werden.

Tabelle 23: Ergebnisse der GC-MS Messung, Doppelbestimmung eines Zellextraktes

	Messung 1	Messung 2
D1	75342	66438
D2	0	0
D3	0	75565
D4	0	75166
D5	0	0
D6	0	0

4.2.4 Repeated Batchversuch mit gleichbleibender und steigender Medienkonzentration (Kultur R-T)

4.2.4.1 Zielsetzung

Ziel für Kultur R war es, die BTS-Entwicklung zu beobachten. Nach 24, 48, 72, 96 Stunden wurden 40 ml zur Squalenbestimmung entnommen und 50 ml frisches Medium zugegeben. Die Konzentration des frisch zugegebenen Mediums entsprach der des entnommenen.

Ziel für Kultur S war die Beobachtung der BTS-Entwicklung, Bestimmung des Squalengehalts nach 24, 48, 72 und 96 Stunden durch Entnahme von 40 ml Kultur zu diesen Zeiten und Zugabe von 50 ml Medium mit ansteigenden Glukose-, Stickstoff- und Phosphat-Konzentrationen. Die Kulturen S und R wurden im repeated Batchverfahren betrieben.

Ziel für die Kultur T war die Beobachtung der BTS-Entwicklung im Batchbetrieb.

Die Versuche fanden in 500 ml Schikanenkolben statt (siehe Punkt 3.5) Die Glukosekonzentration zu Beginn betrug 20 g l^{-1} , was 2 % Glukose entspricht. Die Konzentration von YEP betrug 0,1%. Als weitere Stickstoffquelle diente eine 1,25 M NH_4NO_3 -Lösung, als Phosphorquelle eine 0,329 M K_2HPO_4 -Lösung.

4.2.4.2 Inokulum und Medienzusammensetzung

Tabelle 24: Medienzusammensetzung R- repeated batch mit gleichbleibender Konzentration, S- repeated batch mit steigender Konzentration, T- Batchbetrieb

	ASW [g]	YEP-Stammlösung [ml]	dH ₂ O [g]	Glukosestammlösung [ml]	1,25 M NH_4NO_3 Lösung [ml]	0,329 M K_2HPO_4 Lösung [ml]	Alter Inokulum [h]	BTS Inokulum [g l^{-1}]
R	100	20	70	6,4	0,91	1,5	30	k.A.
S	100	20	70	6,4	0,91	1,5	30	k.A.
T	100	20	70	6,4	0,91	1,5	30	k.A.

Die Herstellung, Beimpfung und Bebrütung des Mediums für das Inokulum erfolgte nach Punkt 3.5.1. Das Inokulum war bei der Beimpfung der Kultur 30 h alt. Zu den Kulturen wurden 10 ml Inokulum hinzugefügt (5% v/v). Die Bebrütungsdauer betrug 138 Stunden.

Medienwechsel:

Tabelle 25: Zusammensetzung und Zeitpunkte der Medienwechsel von Kultur R und S

Zeit [h]	Kultur R [ml]	Kultur S [ml]	zugegebene Medienkomponenten
23,5	48	41,6	Basismedium (siehe Tabelle 26)
	1,6	6,4	Glukosestocklösung
	---	0,8	NH ₄ NO ₃ -Stocklösung
	---	1,2	K ₂ HPO ₄ -Stocklösung
48,0	48	33	Basismedium
	1,6	12,8	Glukosestocklösung
	---	1,6	NH ₄ NO ₃ -Stocklösung
	---	2,4	K ₂ HPO ₄ -Stocklösung
71,5	48	16	Basismedium
	1,6	25,6	Glukosestocklösung
	---	3,5	NH ₄ NO ₃ -Stocklösung
	---	5,2	K ₂ HPO ₄ -Stocklösung
98,0	48	16	Basismedium
	1,6	25,6	Glukosestocklösung
	---	3,5	NH ₄ NO ₃ -Stocklösung
	---	5,2	K ₂ HPO ₄ -Stocklösung

Kultur S: Zugabe von 50 ml konzentriertem Medium, um in der Kultur wieder eine Glukosekonzentration und daran angepasste Konzentration von Stickstoff- und Phosphorquelle von 2 % zu erhalten, 4% nach 48 Stunden und 8 % nach 71,5 und 98 Stunden.

Die Zusammensetzung des Basismediums lautete wie folgt:

Tabelle 26: Zusammensetzung von 300 ml Basismedium

ASW [g]	YEP-Stammlösung [g]	dH ₂ O [g]	1,25 M NH ₄ NO ₃ Lösung [ml]	0,329 M K ₂ HPO ₄ -Lösung [ml]
150	30	111	1,4	2

Neben optischen Kontrollen erfolgten regelmäßige Probenahmen in Einfachbestimmung. Daraus wurde die BTS-Konzentration, NPOC- und TN-Gehalt sowie der pH-Wert bestimmt.

4.2.4.3 Biomassekonzentration

Die Ergebnisse der BTS-Bestimmung für die Kultur T (Batch) und R (Zugabe von Medium, einfach konzentriert) können nicht signifikant voneinander unterschieden werden. Die stationäre Wachstumsphase tritt nach circa 42 Stunden auf. Die maximale BTS-Konzentration liegt zwischen 3 und 6 g l⁻¹.

Die mit höher konzentriertem Medium ergänzte Kultur S allerdings erreichte eine maximale Biomassekonzentration von 14,8 g l⁻¹. Die stationäre Phase beginnt nach ungefähr 72 Stunden.

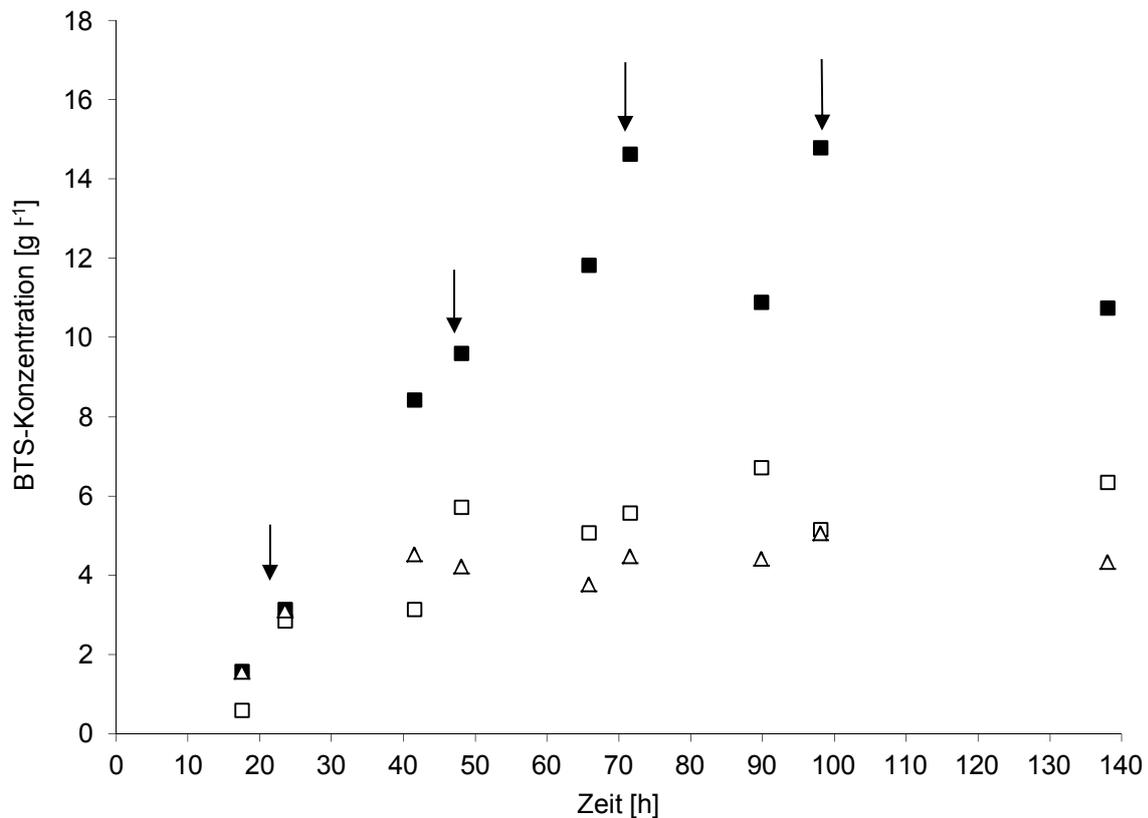


Diagramm 11: BTS-Konzentration der Kulturen R- repeated batch mit gleichbleibender Konzentration (□), S- repeated batch mit steigender Konzentration (■) und T- Batchbetrieb (Δ). Pfeile zeigen Zeitpunkte des Medientausches bei repeated Batchkulturen an

4.2.4.4 Restsubstratanalyse

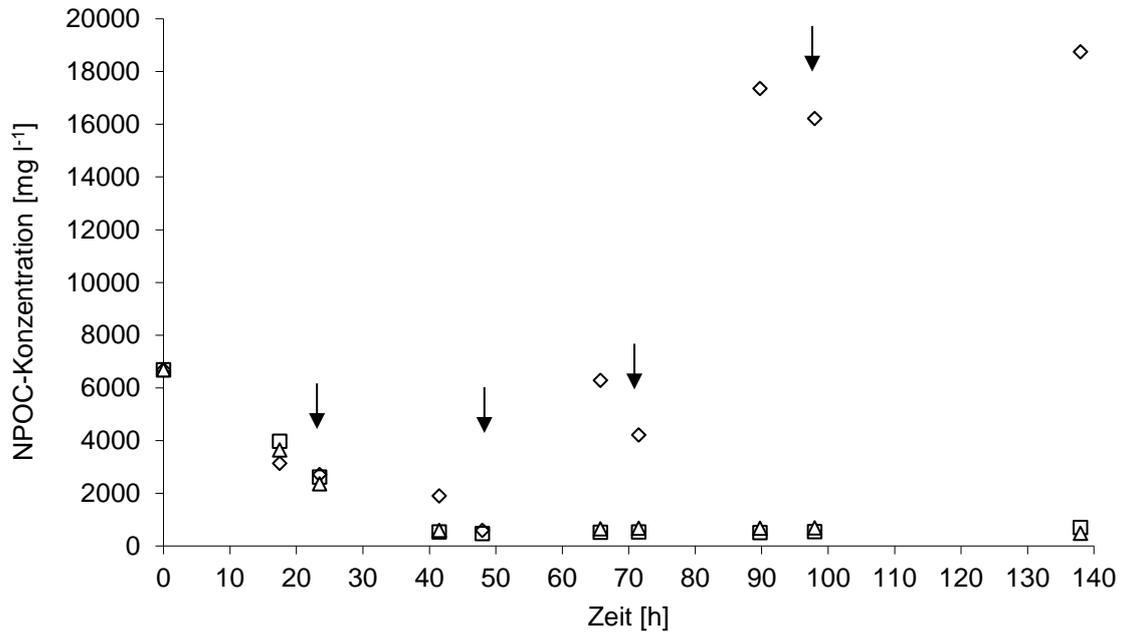


Diagramm 12: NPOC-Konzentrationen der Kulturen R- repeated batch mit gleichbleibender Konzentration (□), S- repeated batch mit steigender Konzentration (◇) und T- Batchbetrieb (Δ), Pfeile zeigen Zeitpunkte des Medientausches bei repeated Batchkulturen an

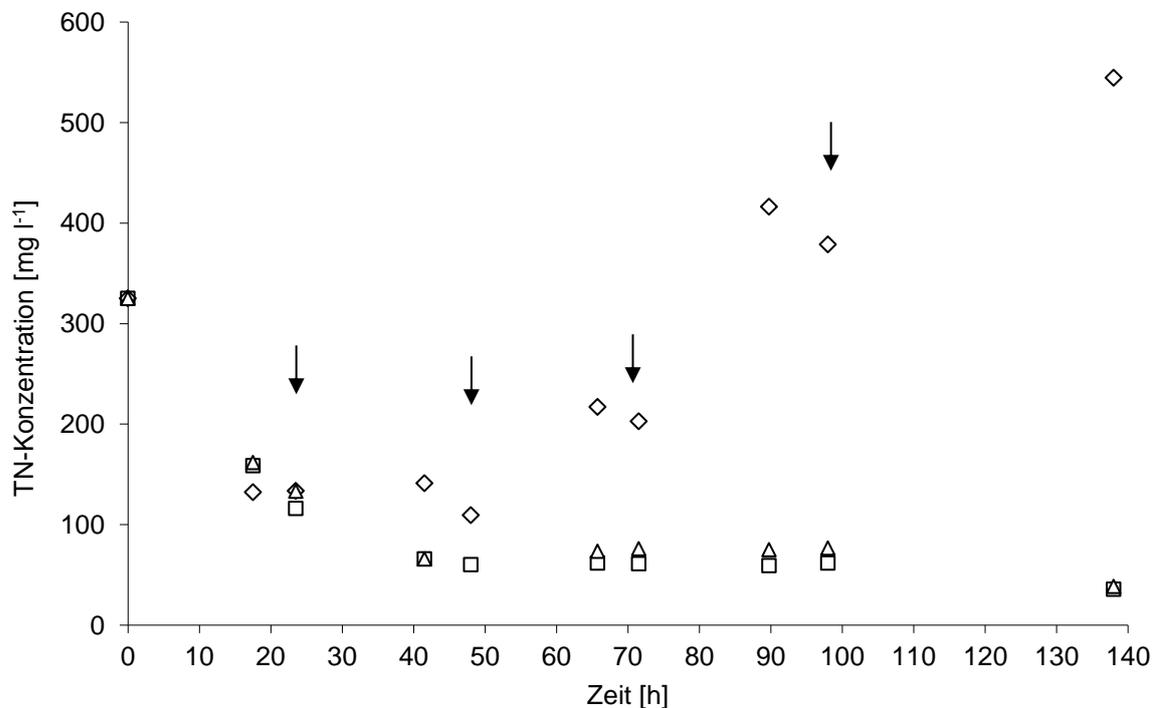


Diagramm 13: TN-Konzentrationen der Kulturen R- repeated batch mit gleichbleibender Konzentration (□), S- repeated batch mit steigender Konzentration (◇) und T- Batchbetrieb (Δ) Pfeile zeigen Zeitpunkte des Medientausches bei repeated Batchkulturen an

Die gemessene NPOC-Konzentration der Kultur im Batchmodus (T) und der Kultur mit gleichbleibender Nährstoffkonzentration im repeated Batch Medium erreichen ein Minimum nach 42 Stunden, dasselbe ist auch bei der TN-Bestimmung zu beobachten. Die beiden Kultivationsmethoden unterscheiden sich in der Restsubstratanalyse nicht bedeutsam voneinander.

Für den Zeitpunkt von 48 Stunden nach Inokulation konnte wegen fehlendem Probematerial keine Restsubstratanalyse für die Kultur T durchgeführt werden.

Bei Kultur S konnte ein Anstieg der NPOC- und TN-Werte beobachtet werden. Nach Erreichen eines Minimums von 596 mg l^{-1} stieg der Gehalt an NPOC in der Kultur mit jedem Medientausch an. Nach 98 Stunden überstieg er den Anfangswert. Dasselbe gilt für die TN-Konzentration. Das Minimum für Kultur S lag hier bei 109 mg l^{-1} .

4.2.4.5 pH-Wert

Der pH-Wert aller drei Kultivationsmethoden startete bei pH 4 und erreichte nach 48 Stunden im Batchbetrieb und bei Zugabe von einfach konzentriertem Medium ein Plateau von pH 8. Nach 48 Stunden wurde auch bei Kultur S (repeated Batch mit Zugabe von höher konzentriertem Medium) der höchste pH-Wert von 7 gemessen, der aber wieder sank und nach insgesamt 90 Stunden bei einem pH-Wert von 2 ankam.

4.2.4.6 Squalenbestimmung

Tabelle 27: Ergebnisse der Squalenbestimmung für Kultur T- Batchbetrieb

Zeit [h]	Einwaage [g]	FID Messung [Area]			Mittelwert FID [Area]	Konzentration [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	Squalengehalt [mg g^{-1}]	Standardabweichung [mg g^{-1}]
		1/3	2/3	3/3				
138	0,1099	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

Tabelle 28: Ergebnisse der Squalenbestimmung für Kultur R- repeated batch mit gleichbleibender Konzentration

Zeit [h]	Einwaage [g]	FID Messung [Area]			Mittelwert FID [Area]	Konzentration [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	Squalengehalt [mg g^{-1}]	Standardabweichung [mg g^{-1}]
		1/3	2/3	3/3				
23,5	0,1068	83,41	92,08	96,03	90,51	10,77	0,61	0,04
48,0	0,1039	53,78	52,60	52,81	53,06	6,32	0,36	0,00
71,5	0,1019	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
98,0	0,1057	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
138,0	0,1000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabelle 29: Ergebnisse der Squalenbestimmung für Kultur S- repeated batch mit steigender Konzentration

Zeit [h]	Einwaage [g]	FID Messung [Area]			Mittelwert FID [Area]	Konzentration [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	Squalengehalt [mg g^{-1}]	Standardabweichung [mg g^{-1}]
		1/3	2/3	3/3				
23,5	0,1022	76,00	81,14	86,61	81,25	9,67	0,57	0,03
48,0	0,1070	112,83	112,53	117,28	114,21	13,60	0,76	0,01
71,5	0,1058	151,86	157,34	138,59	149,26	17,77	1,01	0,05
98,0	0,1041	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
138,0	0,1000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

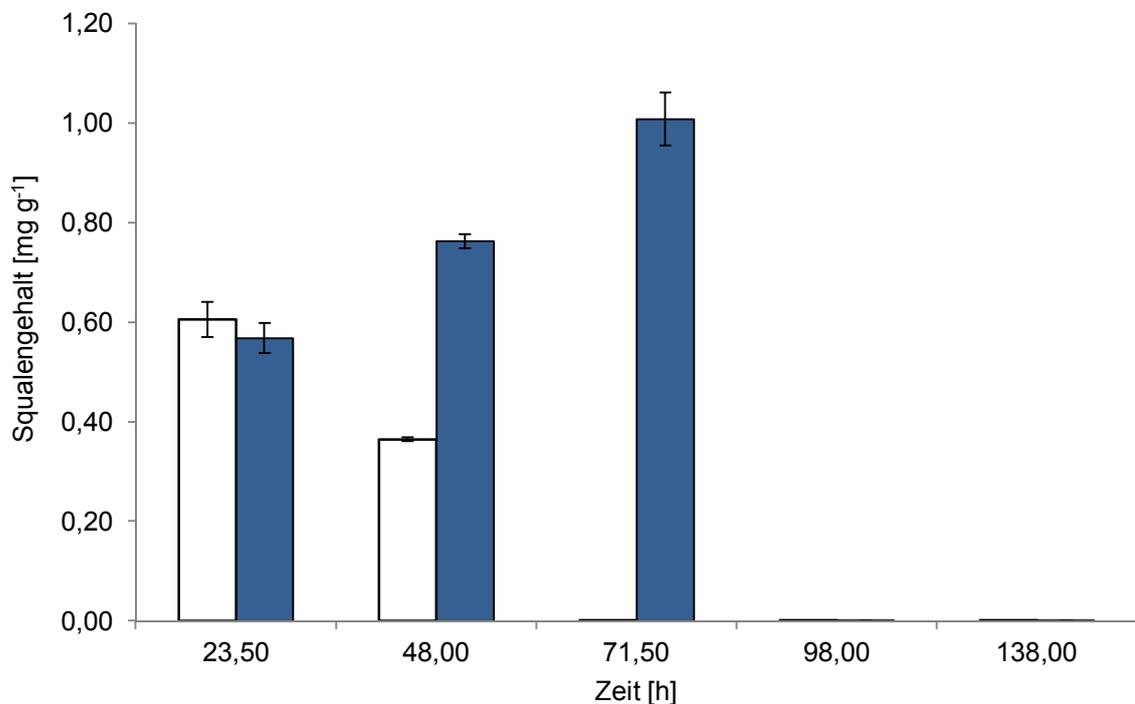


Diagramm 14: Squalengehalt der Kultur R- repeated batch mit gleichbleibender Medienkonzentration (□), S- repeated batch mit steigender Konzentration (■) Mittelwerte der FID-Messung \pm Standardabweichung

Es ist deutlich sichtbar, dass Kultur S, die mit höher konzentriertem Medium ergänzt wurde, länger Squalen produziert und einen etwas höheren Squalengehalt aufweist. Der höchste Squalengehalt wurde nach 71,5 Stunden bei $1,01 \text{ mg g}^{-1}$ detektiert. Kultur R weist den maximalen Squalengehalt nach einem Tag auf: $0,61 \text{ mg g}^{-1}$. Kultur T (Batchmodus) wurde nach 138 Stunden auf Squalen untersucht, es konnte kein Squalen detektiert werden.

4.2.5 Repeated Batchversuch mit steigender Medienkonzentration und unterschiedlicher YEP-Konzentration im Ausgangsmedium (Kultur SN, SP)

4.2.5.1 Zielsetzung

Wiederholung von Versuch S mit gleichen Bedingungen (SN) und angepasster YEP-Konzentration (0,4 %) im Ausgangsmedium von SP.

Die Kultivation erfolgte in 500 ml Schikanenkolben mit gasdurchlässigen Deckeln. Bei beiden Kulturen wurden nach 24, 48, 72 und 96 Stunden 40 ml Kultur für die Squalenbestimmung entnommen und mit 50 ml frischem Medium mit ansteigender Glukose-, Stickstoff- und Phosphor-Konzentration ersetzt.

Zusätzlich wurde ein dritter 500 ml Schikanenkolben mit unbeimpftem Medium vorbereitet. Aus dieser Sterilkontrolle wurden genauso Proben genommen wie aus den anderen Kulturen.

4.2.5.2 Inokulum und Medienzusammensetzung

Tabelle 30: Medienzusammensetzung repeated Batch mit steigender Medienkonzentration. Kultur SP: 0,4 % YEP im Ausgangsmedium, Kultur SN: 0,1 % YEP

	ASW [g]	YEP- Stamm- lösung [ml]	dH ₂ O [g]		Glukose stamm- lösung [ml]	1,25 M NH ₄ NO ₃ Lösung [ml]	0,329 M K ₂ HPO ₄ Lösung [ml]	Alter Inoku- lum [h]	BTS Inoku- lum [g l ⁻¹]
SN	102,5	20,5	75,75	/	6,5	0,94	1,31	39	3,08
SP	102,5	82	13,8	/	6,5	0,94	1,31	39	3,08
Kon- trolle	105	23	76,4	*	6,6	0,90	1,30	39	---

* Entnahme von 5 ml Probe

Die Herstellung, Beimpfung und Bebrütung des Mediums für das Inokulums erfolgte nach Punkt 3.5.1. Das Inokulum war bei der Beimpfung der Kultur 39 h alt. Zu den Kulturen wurden 10 ml Inokulum hinzugefügt (5% v/v). Die Bebrütungsdauer betrug 119,7 Stunden.

Medienwechsel:

Tabelle 31: Zusammensetzung und Zeitpunkte der Medienwechsel repeated Batch mit steigender Medienkonzentration. Kultur SP: 0,4 % YEP im Ausgangsmedium, Kultur SN: 0,1 % YEP

Zeit [h]	Kultur SN, SP und Kontrolle je	zugegebene Medienkomponenten
23,0	25	ASW [g]
	5	YEP [ml]
	6,6	Glukosestocklösung [ml]
	12,14	dH ₂ O [g]
	0,94	NH ₄ NO ₃ -Stocklösung [ml]
	1,3	K ₂ HPO ₄ -Stocklösung [ml]
48,0	25	ASW [g]
	5	YEP [ml]
	17,8	Glukosestocklösung [ml]
	27,2	dH ₂ O [g]
	1,6	NH ₄ NO ₃ -Stocklösung [ml]
	2,9	K ₂ HPO ₄ -Stocklösung [ml]
71,5	20	ASW [g]
	5	YEP [ml]
	19,2	Glukosestocklösung [ml]
	2,72	dH ₂ O [g]
	2,4	NH ₄ NO ₃ -Stocklösung [ml]
	4,32	K ₂ HPO ₄ -Stocklösung [ml]
98,0	10,7	ASW [g]
	5	YEP [ml]
	25,6	Glukosestocklösung [ml]
	0	dH ₂ O [g]
	3,5	NH ₄ NO ₃ -Stocklösung [ml]
	5,2	K ₂ HPO ₄ -Stocklösung [ml]

Neben optischen Kontrollen erfolgten regelmäßige Probenahmen in Einfachbestimmung. Daraus wurden die BTS-Konzentration, der NPOC- und der TN-Gehalt sowie der pH-Wert bestimmt.

4.2.5.3 Biomassekonzentration

Von beiden Kulturen wurden zu jedem mit Pfeil indiziertem Zeitpunkt 40 ml Probe entnommen und 50 ml frisches Medium hinzugefügt, allerdings enthielt Kultur SP viermal mehr YEP im Ausgangsmedium als Kultur SN. Die BTS-Konzentration entwickelt sich bei beiden Kulturen ähnlich. Bis zum Zeitpunkt von circa 72 Stunden nach Inokulation ist ein stetiges Wachstum zu beobachten, das sich bei einer Konzentration von circa 13-17,5 g l⁻¹ einpendelt.

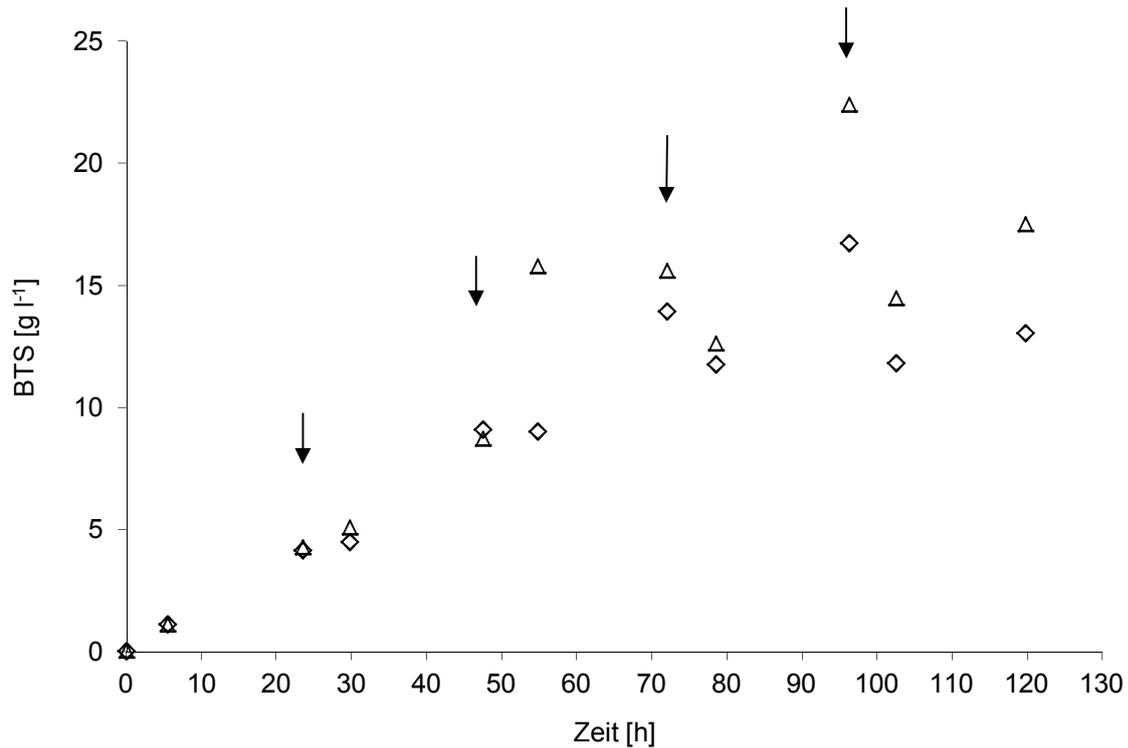


Diagramm 15: BTS-Konzentrationen der repeated batch Kulturen SN- 0,1% YEP (Δ) und SP- 0,4 % YEP im Anfangsmedium (◊), Pfeile zeigen Zeitpunkte der Medienwechsel an

4.2.5.4 Restsubstratanalyse

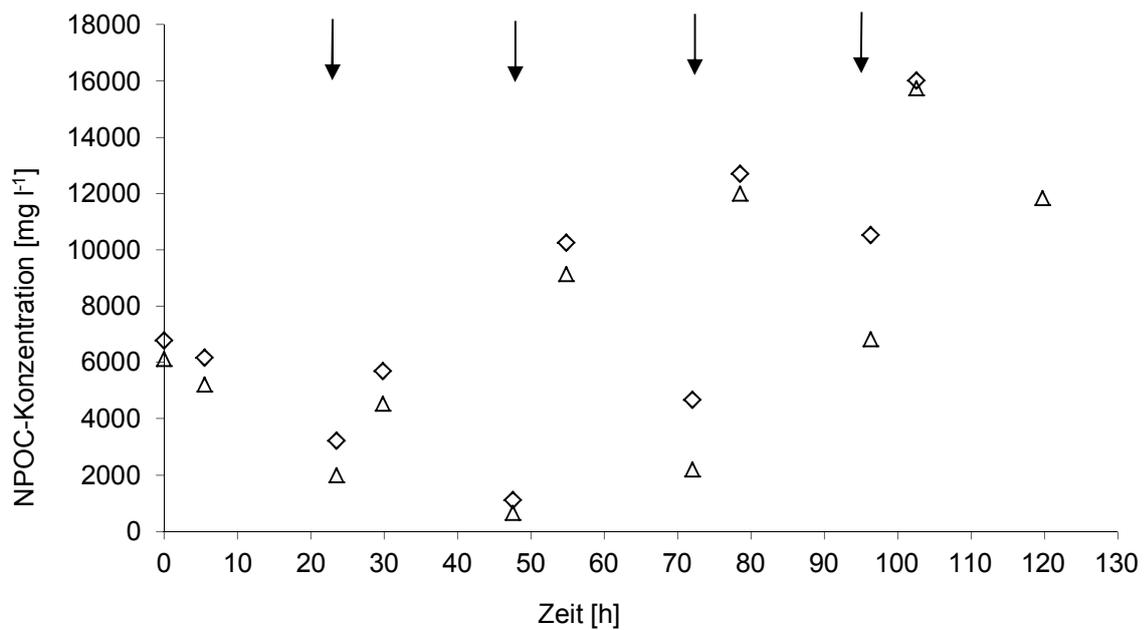


Diagramm 16: NPOC- Konzentrationen der repeated batch Kulturen SN- 0,1% YEP zu Beginn (Δ) und SP- 0,4 % YEP im Anfangsmedium (◊), Pfeile zeigen Zeitpunkte der Medienwechsel an

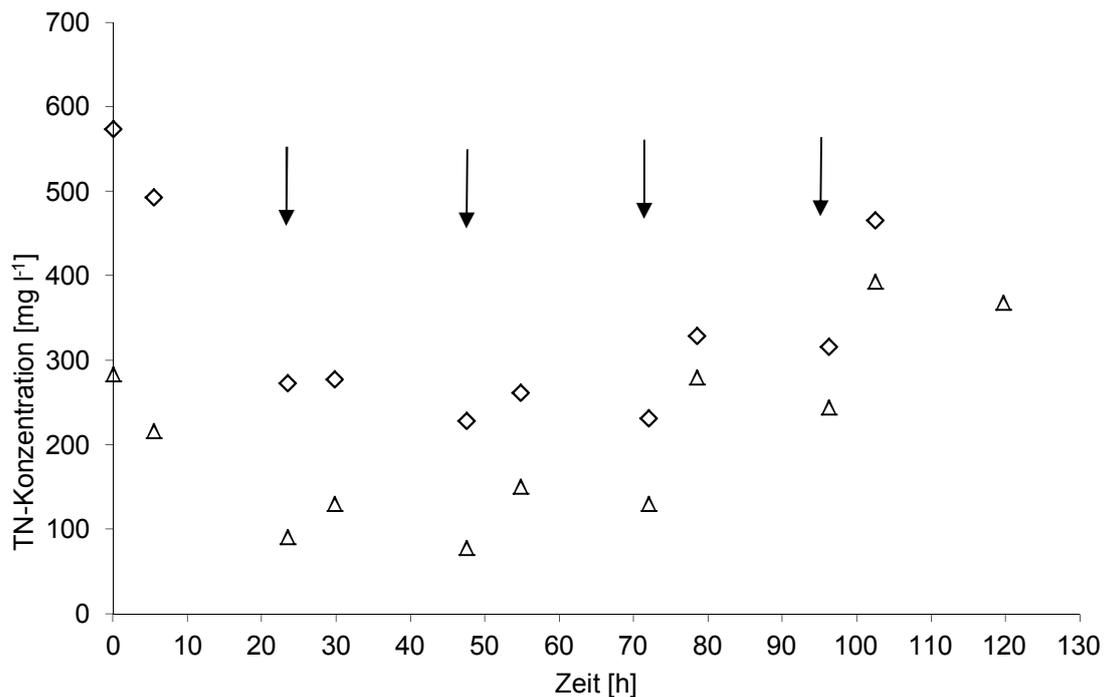


Diagramm 17: TN- Konzentrationen der repeated batch Kulturen SN- 0,1% YEP zu Beginn (Δ) und SP- 0,4 % YEP im Anfangsmedium (◇), Pfeile zeigen Zeitpunkte der Medienwechsel an

Für Kultur SP liegt zum Zeitpunkt der Ernte kein Probenmaterial für die Restsubstratanalyse vor.

Die Ergebnisse der NPOC-Bestimmung zeigen, dass nach jeder Zugabe von frischem Medium die Konzentration an verfügbarer C-Quelle im Medium steigt und anschließend wieder absinkt. Die niedrigste Konzentration ist nach 48 Stunden erreicht, hält sich aber nach der Mediumzugabe nach 72 Stunden konstant über dem Anfangswert von 6780 bzw. 6140 mg l⁻¹.

Die gemessene Konzentration von Stickstoff zu Beginn der Kultivierung liegt bei Kultur SP mit einem Wert von 574 mg l⁻¹ doppelt so hoch wie bei SN. Im Laufe des Experimentes gleichen sich die Werte aneinander an, erreichen jedoch nicht den Anfangswert von Kultur SP.

4.2.5.5 pH-Wert

Tabelle 32: pH- der repeated batch Kulturen SN- 0,1% YEP und SP- 0,4 % YEP im Anfangsmedium

Zeit [h]	pH SN	pH SP
0,00		
5,50	6,54	6,69
23,50	6,29	5,35
29,75	6,11	3,79
47,50	7,46	6,61
54,75	6,28	4,49
72,00	6,50	6,15
78,50	3,92	3,41
96,25	6,56	4,76
102,50	2,96	3,00
119,70	4,53	3,56

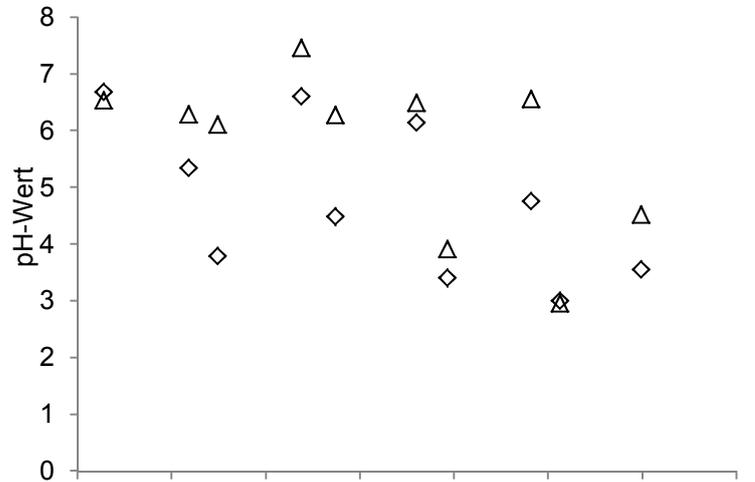


Diagramm 18: pH-Werte für Kultur SN (Δ) und SP(◇)

Die pH-Werte der beiden Kulturen sinken mit zunehmender Kultivationsdauer. Nach der Ergänzung mit frischem Medium steigt der pH-Wert wieder leicht an. Siehe auch Diagramm 18.

4.2.5.6 Squalenbestimmung

Tabelle 33: Ergebnisse der Squalenbestimmung für Kultur SN- repeated batch mit 0,1% YEP im Anfangsmedium

Zeit [h]	Einwaage [g]	FID Messung [Area]			Mittelwert FID [Area]	Konzentration [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	Squalengehalt [mg g^{-1}]	Standardabweichung [mg g^{-1}]
		1/3	2/3	3/3				
23,50	0,0469	50,12	50,41	47,61	49,38	5,88	0,75	0,02
47,50	0,1002	50,64	53,06	x	51,85	6,17	0,37	0,01
72,00	0,1055	92,77	135,47	140,16	122,80	14,62	0,83	0,14
96,25	0,1166	142,74	158,11	159,31	153,39	18,26	0,94	0,05
119,70	0,1030	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabelle 34: Ergebnisse der Squalenbestimmung der repeated batch Kultur SP - 0,4 % YEP zu Beginn

Zeit [h]	Einwaage [g]	FID Messung [Area]			Mittelwert FID [Area]	Konzentration [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	Squalengehalt [mg g^{-1}]	Standardabweichung [mg g^{-1}]
		1/3	2/3	3/3				
23,50	0,1195	784,76	784,20	803,47	790,81	94,13	4,73	0,05
47,50	0,1097	608,87	637,25	627,14	624,42	74,32	4,07	0,08
72,00	0,1053	252,26	263,34	268,76	261,45	31,12	1,77	0,05
96,25	0,1100	108,58	120,61	129,83	119,67	14,25	0,78	0,06
119,70	0,1025	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

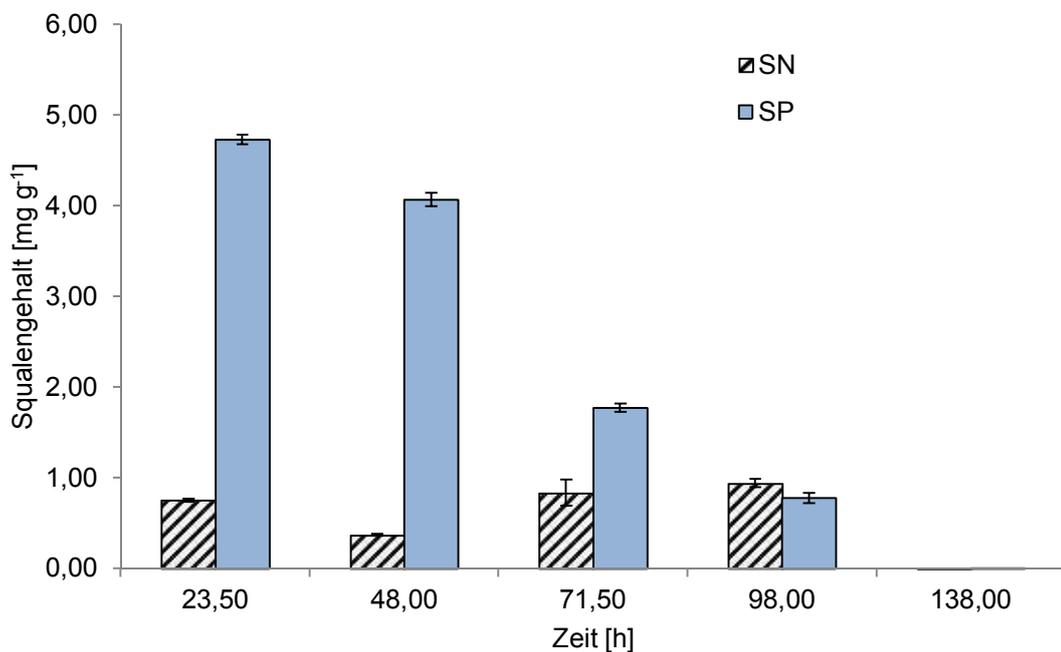


Diagramm 19: Squalengehalte der repeated batch Kulturen SN- 0,1% YEP und SP- 0,4 % YEP im Anfangsmedium, Mittelwerte der FID-Messung \pm Standardabweichung

Die Squalengehalte in der Kultur mit erhöhter Stickstoffkonzentration im Anfangsmedium (SP) erreichten den höchsten Wert von $4,73 \text{ mg g}^{-1}$ nach einem Tag. Danach sinken sie auf $0,78 \text{ mg g}^{-1}$ ab.

Die Squalengehalte in Kultur SN bleiben unter $0,1 \text{ mg g}^{-1}$. Die Squalenproduktionsdauer endet vermutlich nach 98 Stunden – zum Zeitpunkt der Ernte, d.h. 138 Stunden nach Inokulation, kann in keinem der beiden Kultivationsansätze Squalen nachgewiesen werden.

4.2.6 Batch und Repeated Batchversuch mit Zugabe von Methyljasmonat (Kultur MJ1-MJ4)

4.2.6.1 Zielsetzung

Ziel war die Beobachtung der BTS-Entwicklung und der Auswirkung von Enzymverstärker Methyljasmonat auf den Squalengehalt nach 24, 48, 72 und 96 Stunden durch Entnahme von 40 ml Kultur zu diesen Zeiten.

MJ1: Batchkultur, Zugabe von Methyljasmonat nach 24 Stunden

MJ2: repeated Batch mit gleichbleibender Nährstoff- und MJA-Konzentration

MJ3: repeated Batch mit ansteigender Nährstoff- und gleichbleibender MJA-Konzentration

MJ4: Kontrollkultur, hier wurde beobachtet, ob sich die BTS-Entwicklung durch die Zugabe von DMSO verändert, eine Squalenanalyse wurde zum Zeitpunkt der Ernte durchgeführt

4.2.6.2 Inokulum und Mediumzusammensetzung

Tabelle 35: Zusammensetzung und Inokulum von MJ1-Batchkultur mit MJA, MJ2-repeated Batch mit gleichbleibender Konzentration und MJA, MJ3- repeated Batch mit steigender Konzentration und MJA, MJ4- Kontrollkultur mit DMSO

	ASW [g]	YEP-Stamm lösung [ml]	dH ₂ O [g]	1,25 M NH ₄ NO ₃ Lösung [ml]	0,329 M K ₂ HPO ₄ Lösung [ml]		Glukose stamm- lösung [ml]	Alter Inoku- lum [h]	BTS- Inoku- lum [g l ⁻¹]
MJ1	110	22	81,4	1	1,4	*	6,5	40,5	2,21
MJ2	110	22	81,4	1	1,4		6,5	40,5	2,21
MJ3	110	22	81,4	1	1,4		6,5	40,5	2,21
MJ4	110	22	81,4	1	1,4		6,5	40,5	2,21

* Entnahme von 5 ml Probe

Die Herstellung, Beimpfung und Bebrütung des Mediums für das Inokulums erfolgte nach Punkt 3.5.1. Das Inokulum war bei der Beimpfung der Kultur 40,5 h alt und hatte eine BTS-Konzentration von 2,21 g l⁻¹. Zu den Kulturen wurden 10 ml Inokulum hinzugefügt (5 % v/v). Die Bebrütungsdauer betrug 95,5 Stunden.

Tabelle 36: Zusammensetzung und Zeitpunkte der Medienwechsel von MJ1-Batchkultur mit MJA, MJ2- repeated Batch mit gleichbleibender Konzentration und MJA, MJ3- repeated Batch mit steigender Konzentration und MJA, MJ4- Kontrollkultur mit DMSO

Zeit [h]	MJA1	MJA 2	MJA 3	MJA4	zugegebene Medienkomponenten [ml]
24	0,2	0,2	0,2		0,1 M MJA-Lösung
				0,2	DMSO, steril
48		0,05	0,05		0,1 M MJA-Lösung
		48	33		Basismedium (Tabelle 26)
		1,6	12,8		Glukosestocklösung
			1,6		NH ₄ NO ₃ -Stocklösung
			2,4		K ₂ HPO ₄ -Stocklösung
72		0,05	0,05		0,1 M MJA-Lösung
		48	33		Basismedium
		1,6	12,8		Glukosestocklösung
			1,6		NH ₄ NO ₃ -Stocklösung
			2,4		K ₂ HPO ₄ -Stocklösung

Die Zusammensetzung des Basismediums kann Tabelle 26 entnommen werden.

4.2.6.3 Biomassekonzentration

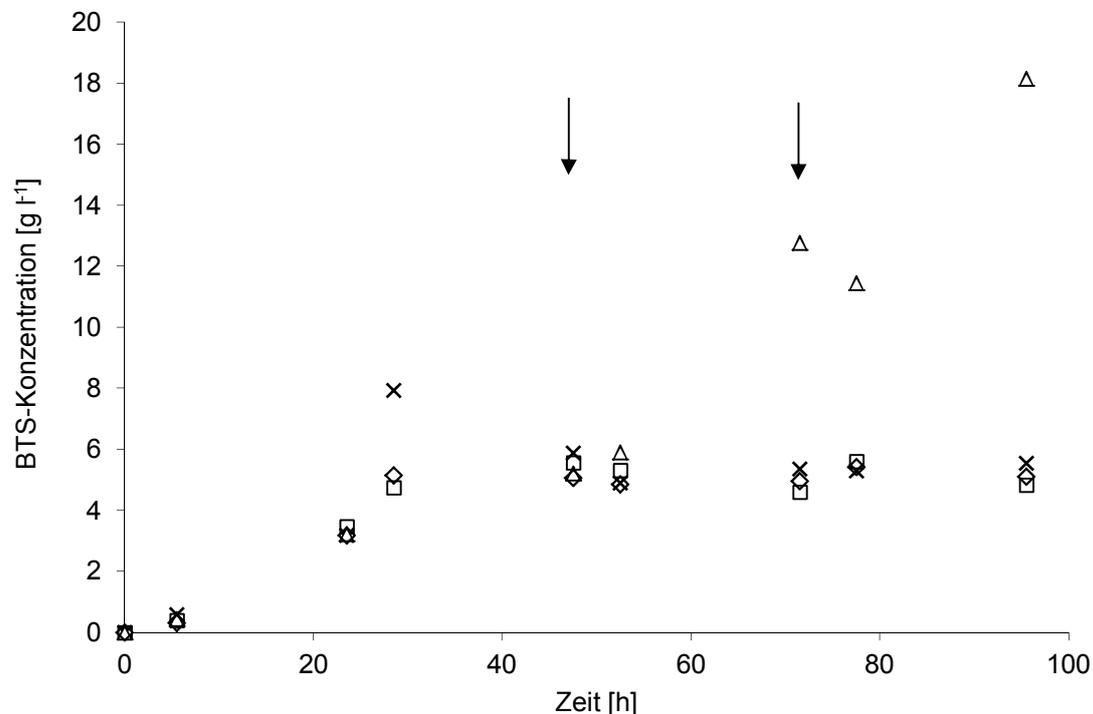


Diagramm 20: BTS-Konzentrationen der Kulturen MJ1- Batchkultur mit MJA (□), MJ2- repeated batch mit gleichbleibender Konz. und MJA (x), MJ3- repeated batch mit steigender Konzentration und MJA (Δ), MJ4- Batchkultur mit DMSO (◇), Pfeile zeigen Zeitpunkte der Medienwechsel an

Der BTS-Wert von Kultur MJ3 überstieg bei 28,5 Stunden $28,8 \text{ g l}^{-1}$, wurde als Ausreißer identifiziert und nicht im Diagramm dargestellt.

Kulturen MJ1, MJ2 und MJ4, die im Batchbetrieb bzw. mit einfachkonzentriertem Medium ergänzt wurden, erreichten die stationäre Phase nach circa 48 Stunden. Die BTS-Konzentration betrug zu diesem Zeitpunkt circa 6 g l^{-1} . Kultur MJ3 wurde nach 48 und 72 Stunden mit höherkonzentriertem Medium supplementiert und erreichte nach 96 Stunden 18 g BTS l^{-1} Kulturmedium.

4.2.6.4 Restsubstratanalyse

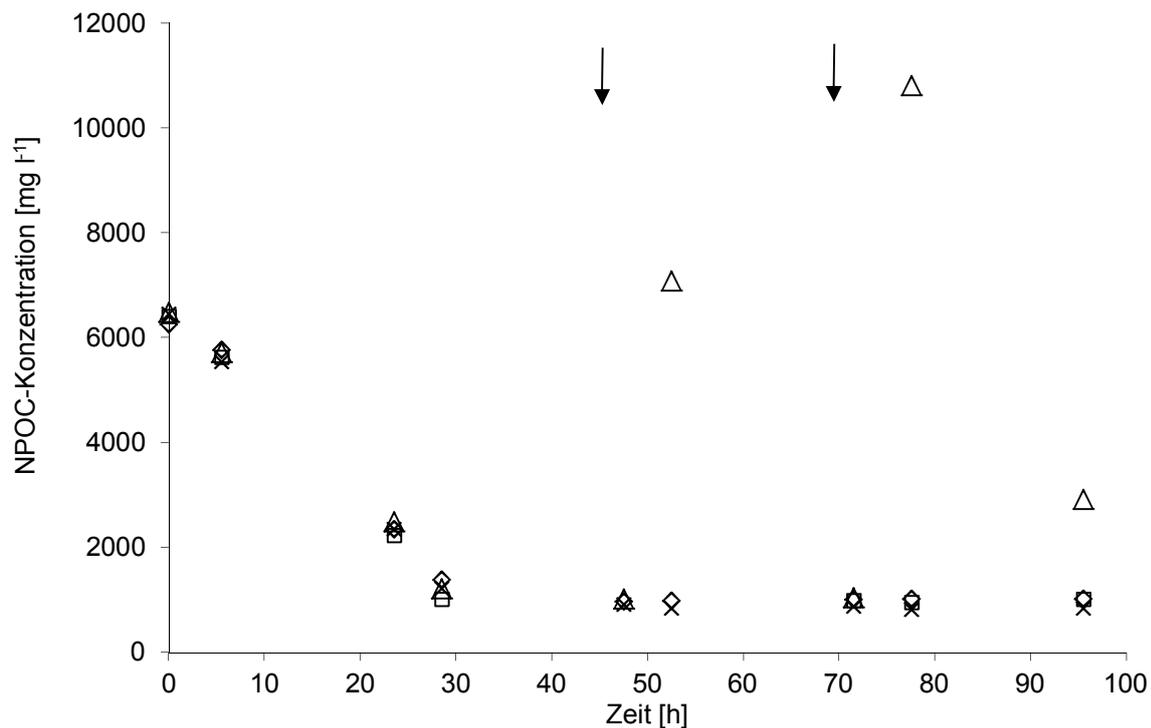


Diagramm 21: NPOC-Konzentrationen der Kulturen MJ1- Batchkultur mit MJA (□), MJ2- repeated batch mit gleichbleibender Konz. und MJA (x), MJ3- repeated batch mit steigender Konzentration und MJA (Δ), MJ4- Batchkultur mit DMSO (◇), Pfeile zeigen Zeitpunkte der Medienwechsel an

NPOC-Konzentrationen in den Kulturen MJ1, MJ2 und MJ4 erreichen nach circa 29 Stunden das niedrigste Plateau bei circa 1000 mg l^{-1} . Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den beschriebenen Kulturen zu erkennen. Kultur MJ3 hingegen wurde zweimal mit höherkonzentriertem Medium ergänzt. Die Werte steigen nach der Supplementation über das Anfangsniveau an und sinken danach wieder ab.

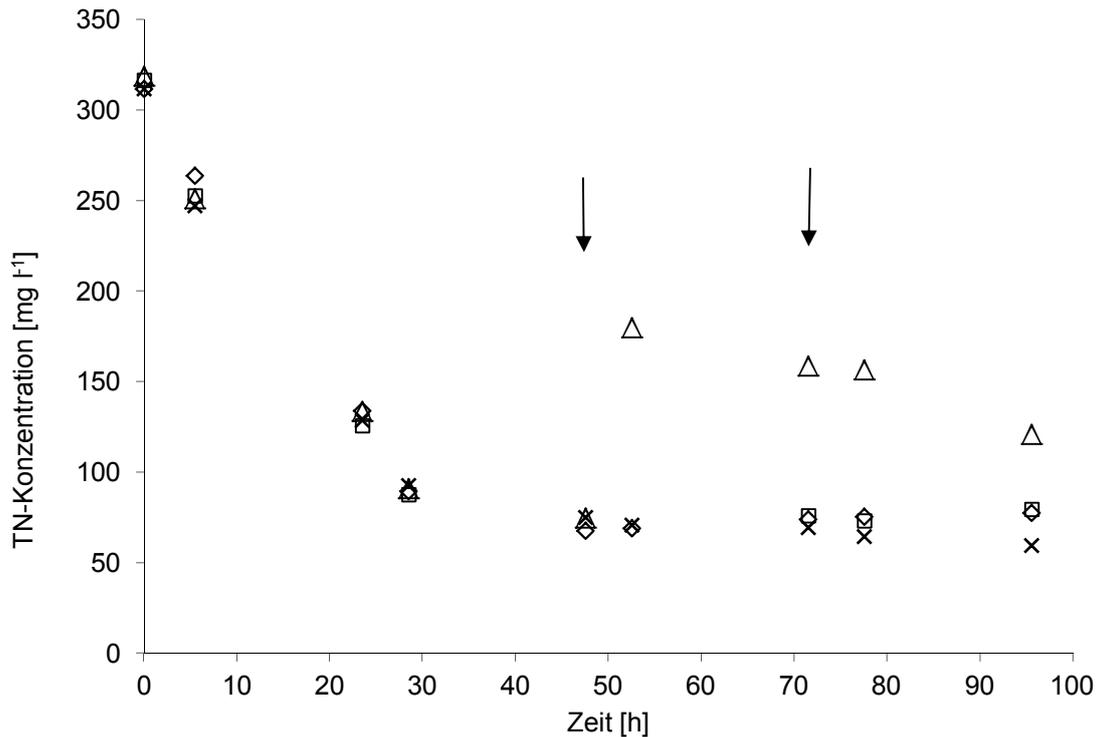


Diagramm 22: TN-Konzentrationen der Kulturen MJ1- Batchkultur mit MJA (□), MJ2- repeated batch mit gleichbleibender Konz. und MJA (x), MJ3- repeated batch mit steigender Konzentration und MJA (Δ), MJ4- Batchkultur mit DMSO (◇), Pfeile zeigen Zeitpunkte der Medienwechsel an

Die TN-Konzentrationen der Kulturen im Batch- und im repeated Batchbetrieb (mit einfach konzentriertem Medium ergänzt) stiegen rasch ab und erreichten nach 48 Stunden Werte von circa 70 mg l⁻¹. Bei Kultur MJ3 erfolgte der Konzentrationsabfall durch Zugabe von neuem Medium langsamer.

4.2.6.5 pH-Wert

Die pH-Wertentwicklung ist in allen Kulturen ähnlich. Zu Beginn wurde ein pH-Wert von 6,8 gemessen, der sich im Laufe der Kultivierung auf 8 erhöhte. Nur in Kultur MJ3 trat keine Veränderung auf – der pH-Wert blieb zwischen 6,3 und 6,8.

4.2.6.6 Squalenbestimmung

Tabelle 37: Ergebnisse der Squalenbestimmung der Kultur MJ1- Batchkultur mit MJA

Zeit [h]	Einwaage [g]	FID Messung [Area]			Mittelwert FID [Area]	Konzentration [µg ml ⁻¹]	Squalengehalt [mg g ⁻¹]	Standardabweichung [mg g ⁻¹]
		1/3	2/3	3/3				
95,5	0,1042	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

Tabelle 38: Ergebnisse der Squalenbestimmung der Kultur MJ2- repeated batch mit gleichbleibender Konzentration und MJA

Zeit [h]	Einwaage [g]	FID Messung [Area]			Mittelwert FID [Area]	Konzentration [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	Squalengehalt [mg g^{-1}]	Standardabweichung [mg g^{-1}]
		1/3	2/3	3/3				
47,5	0,1013	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
71,5	0,1050	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
95,5	0,1025	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

Tabelle 39: Ergebnisse der Squalenbestimmung für Kultur MJ3- repeated batch mit steigender Konzentration und MJA

Zeit [h]	Einwaage [g]	FID Messung [Area]			Mittelwert FID [Area]	Konzentration [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	Squalengehalt [mg g^{-1}]	Standardabweichung [mg g^{-1}]
		1/3	2/3	3/3				
47,5	0,1013	x	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
71,5	0,1050	32,04	36,00	36,87	34,97	4,16	0,24	
95,5	0,1030	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

Tabelle 40: Ergebnisse der Squalenbestimmung für Kultur MJ4- Batchkultur mit DMSO

Zeit [h]	Einwaage [g]	FID Messung [Area]			Mittelwert FID [Area]	Konzentration [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	Squalengehalt [mg g^{-1}]	Standardabweichung [mg g^{-1}]
		1/3	2/3	3/3				
95,5	0,1154	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

Nach 71,5 Stunden wurden in Kultur MJ3 $0,24 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ Squalen gefunden. Alle anderen Squalenbestimmungen verliefen negativ.

4.2.7 Repeated Batchversuch mit steigender Medienkonzentration und MJA (Kultur MN1-MN2)

4.2.7.1 Zielsetzung

Ziel war die Beobachtung der BTS-Entwicklung und der Auswirkung des Enzymverstärkers Methyljasmonat auf den Squalengehalt nach 24, 48, 72 und 96 Stunden durch Entnahme von 40 ml Kultur zu diesen Zeiten. Das entnommene Kulturvolumen wurde im repeated Batchverfahren durch Zugabe von 50 ml Medium mit ansteigenden Glukose-, Stickstoff-, Phosphat- und gleichbleibender MJA-Konzentrationen ergänzt. Der Versuch baut auf Versuch SN Seite 66 auf.

Zusätzlich wurde ein dritter 500 ml Schikanenkolben mit unbeimpftem Medium vorbereitet. Aus dieser Sterilkontrolle wurden genauso Proben genommen wie aus den anderen Kulturen.

4.2.7.2 Inokulum und Medienzusammensetzung

Tabelle 41: Medienzusammensetzung Versuch MN1, MN2, repeated Batch mit steigender Medienkonzentration und MJA

	ASW [g]	YEP- Stamm lösung [ml]	dH ₂ O [g]		Glukose stamm lösung [ml]	1,25 M NH ₄ NO ₃ Lösung [ml]	0,329 M K ₂ HPO ₄ - Lösung [ml]	Alter Inoku lum [h]	BTS Inoku lum [g l ⁻¹]
MN1	102,5	20,5	75,75	---	6,5	0,94	1,31	39	3,08
MN2	102,5	22,5	75,75	---	6,5	0,94	1,31	39	3,78
Kon- trolle	105	23	76,4	*	6,6	0,90	1,30	39	---

*Entnahme von 5 ml Probe

Die Herstellung, Beimpfung und Bebrütung des Mediums für das Inokulum erfolgte nach Punkt 3.5.1. Das Inokulum war bei der Beimpfung der Kultur 39 h alt. Zu den Kulturen wurden 10 ml Inokulum hinzugefügt (5% v/v). Die Bebrütungsdauer betrug 119,7 Stunden.

Tabelle 42: Zusammensetzung und Zeitpunkte der Medienwechsel von Kultur MN1 und MN2, repeated Batch mit steigender Medienkonzentration und MJA

Zeit [h]	Kultur MN1, MN2 und Kontrolle je	zugegebene Medienkomponenten
23	0,2	0,1 M MJA-Lösung [ml]
	25	ASW [g]
	5	YEP [ml]
	6,6	Glukosestocklösung [ml]
	12,14	dH ₂ O [g]
	0,94	NH ₄ NO ₃ -Stocklösung [ml]
	1,3	K ₂ HPO ₄ -Stocklösung [ml]
48	0,05	0,1 M MJA-Lösung [ml]
	25	ASW [g]
	5	YEP [ml]
	17,8	Glukosestocklösung [ml]
	27,2	dH ₂ O [g]
	1,6	NH ₄ NO ₃ -Stocklösung [ml]
	2,9	K ₂ HPO ₄ -Stocklösung [ml]
72	0,05	0,1 M MJA-Lösung [ml]
	20	ASW [g]
	5	YEP [ml]
	19,2	Glukosestocklösung [ml]
	2,72	dH ₂ O [g]
	2,4	NH ₄ NO ₃ -Stocklösung [ml]
	4,32	K ₂ HPO ₄ -Stocklösung [ml]
98	0,05	0,1 M MJA-Lösung [ml]
	10,7	ASW [g]
	5	YEP [ml]
	25,6	Glukosestocklösung [ml]
	0	dH ₂ O [g]
	3,5	NH ₄ NO ₃ -Stocklösung [ml]
	5,2	K ₂ HPO ₄ -Stocklösung [ml]

4.2.7.3 Biomassekonzentration

Die BTS-Werte bei 96 Stunden wurden mit Verdacht auf Ausreißer entfernt, da sie doppelt und vierfach so hoch waren wie die zuvor gemessenen (MN1 bei 96 Stunden: 26,88 g l⁻¹ MN2: 42,48 g l⁻¹).

Die Konzentration der Biotrockensubstanz wächst in beiden Kulturen stetig an und erreicht zum Zeitpunkt der Ernte circa 15 g l⁻¹.

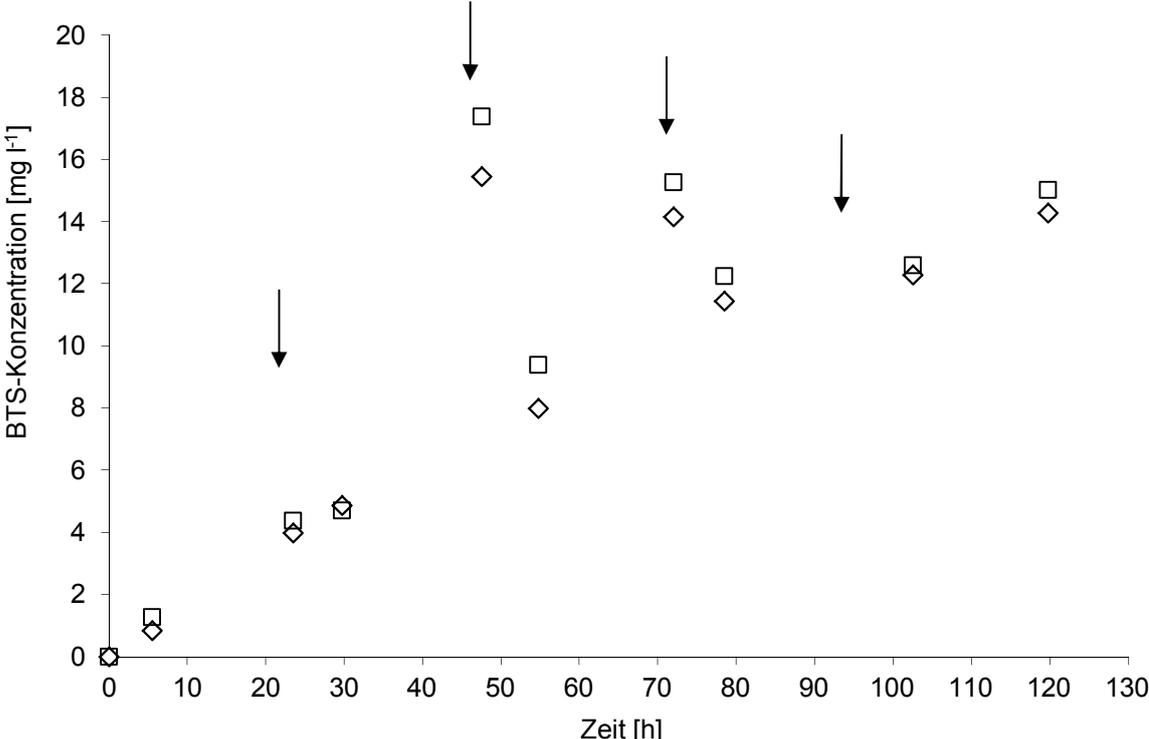


Diagramm 23: BTS-Konzentrationen der repeated batch Kulturen MN1 (□) und MN2 (◇) mit steigender Medienkonzentration und MJA, Pfeile zeigen Zeitpunkte der Medienwechsel an

4.2.7.4 Restsubstratanalyse

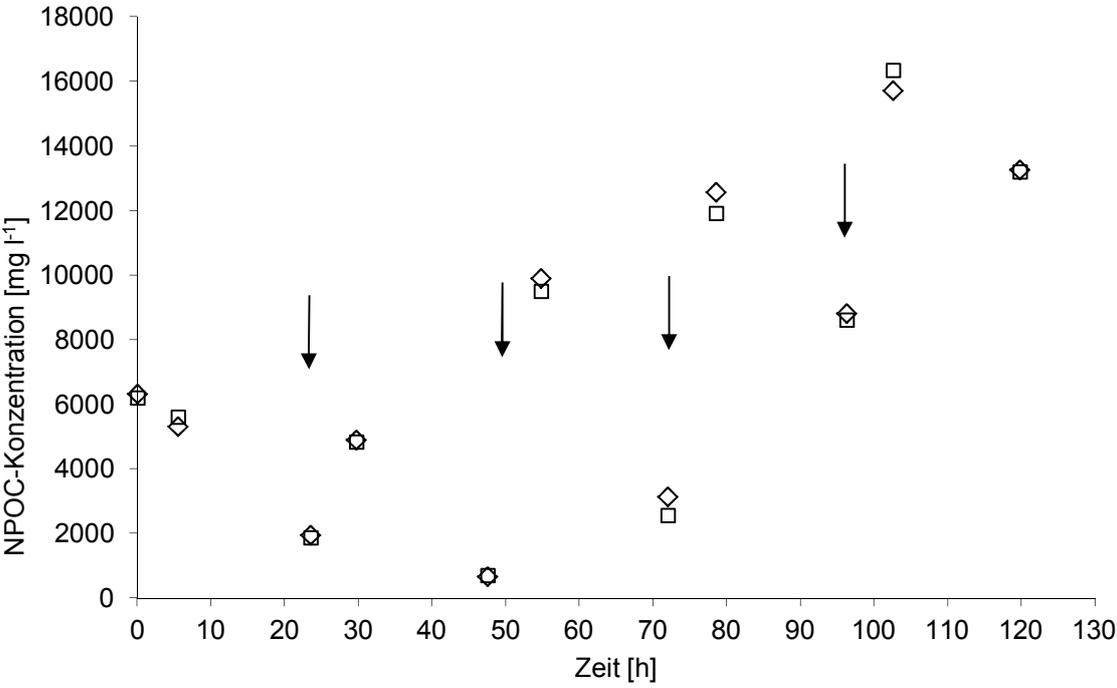


Diagramm 24: NPOC- Konzentrationen der repeated batch Kulturen MN1 (□) und MN2 (◇) mit steigender Medienkonzentration und MJA, Pfeile zeigen Zeitpunkte der Medienwechsel an

Nach der Zugabe von frischem Medium erhöht sich die sinkende NPOC-Konzentration stetig, bis sie nach 78,5 Stunden den Anfangswert von 6335 mg l^{-1} dauerhaft übersteigt. Es kann kein offensichtlicher Unterschied zwischen den Kulturen festgestellt werden.

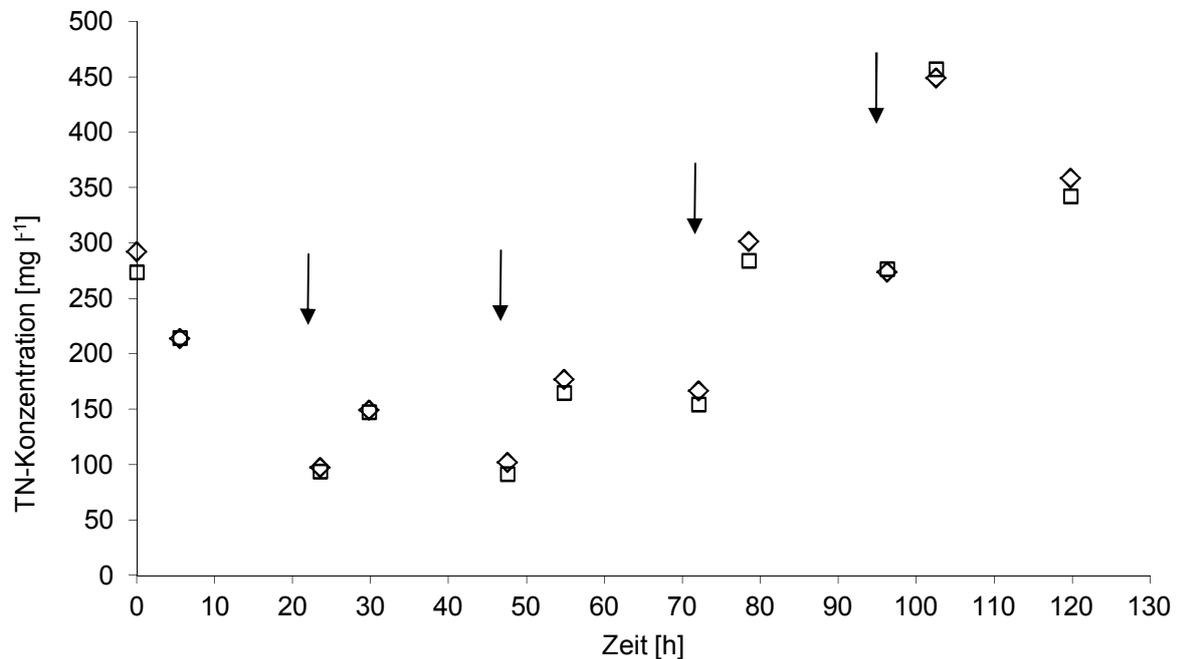


Diagramm 25 TN- Konzentrationen der der repeated batch Kulturen MN1 (□) und MN2 (◇) mit steigender Medienkonzentration und MJA, Pfeile zeigen Zeitpunkte der Medienwechsel an

Die TN-Konzentrationen der Kulturen fielen bis zur ersten Mediumzugabe bis auf 100 mg l^{-1} ab. Nach 78,5 Stunden wurden Werte über der Anfangskonzentration von $280 \pm 10 \text{ mg l}^{-1}$ gemessen. Nach jeder Medienzugabe erhöhte sich die im Medium verbleibende Stickstoffkonzentration.

4.2.7.5 pH-Wert

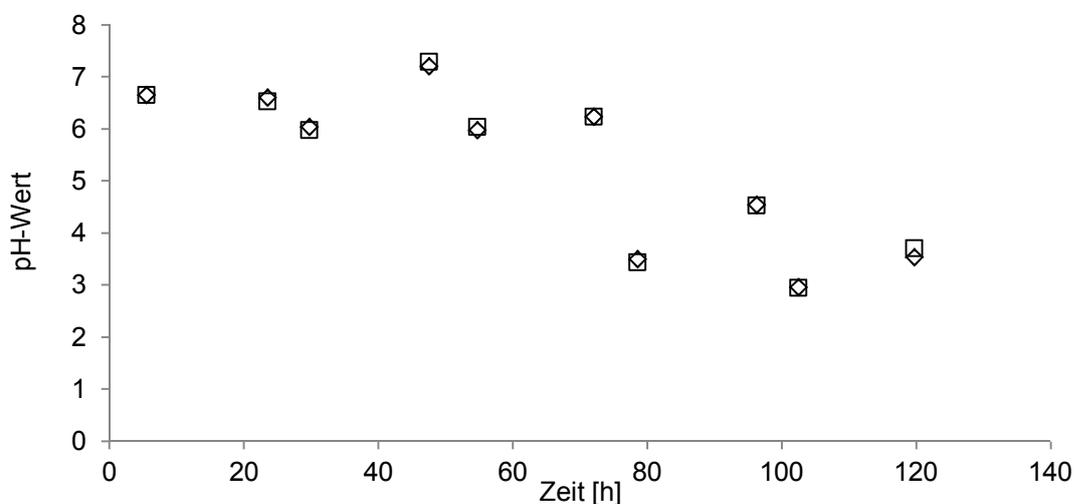


Diagramm 26: pH-Werte der repeated batch Kulturen MN1 (□) und MN2 (◇) mit steigender Medienkonzentration und MJA

Die pH-Werte beider Kulturen können nicht erkennbar voneinander unterschieden werden. Im Laufe der Kultivierung sinkt der pH-Wert von 6,5 auf 3-4 ab.

4.2.7.6 Squalenbestimmung

Tabelle 43 Ergebnisse der Squalengehaltbestimmung der repeated batch Kulturen MN1 mit steigender Medienkonzentration und MJA

Zeit [h]	Einwaage [g]	FID Messung [Area]			Mittelwert FID [Area]	Konzentration [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	Squalengehalt [mg g^{-1}]	Standardabweichung [mg g^{-1}]
		1/3	2/3	3/3				
23,5	0,1056	235,88	249,65	258,46	248,00	29,52	1,68	0,06
47,5	0,1350	47,94	45,95	44,17	46,02	5,48	0,24	0,01
72,0	0,1061	218,04	216,47	209,98	214,83	25,57	1,45	0,02
96,25	0,1045	57,10	71,51	71,85	66,82	7,96	0,46	0,05
119,7	0,1036	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabelle 44: Ergebnisse der Squalengehaltbestimmung der repeated batch Kulturen MN2 mit steigender Medienkonzentration und MJA

Zeit [h]	Einwaage [g]	FID Messung [Area]			Mittelwert FID [Area]	Konzentration [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	Squalengehalt [mg g^{-1}]	Standardabweichung [mg g^{-1}]
		1/3	2/3	3/3				
23,5	0,1197	354,20	366,28	373,53	364,67	43,41	2,18	0,05
47,5	0,1131	190,74	190,45	196,93	192,71	22,94	1,22	0,02
72,0	0,1082	204,15	207,78	208,58	206,84	24,62	1,37	0,01
96,25	0,1011	170,13	174,96	173,49	172,86	20,58	1,22	0,01
119,7	0,1074	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

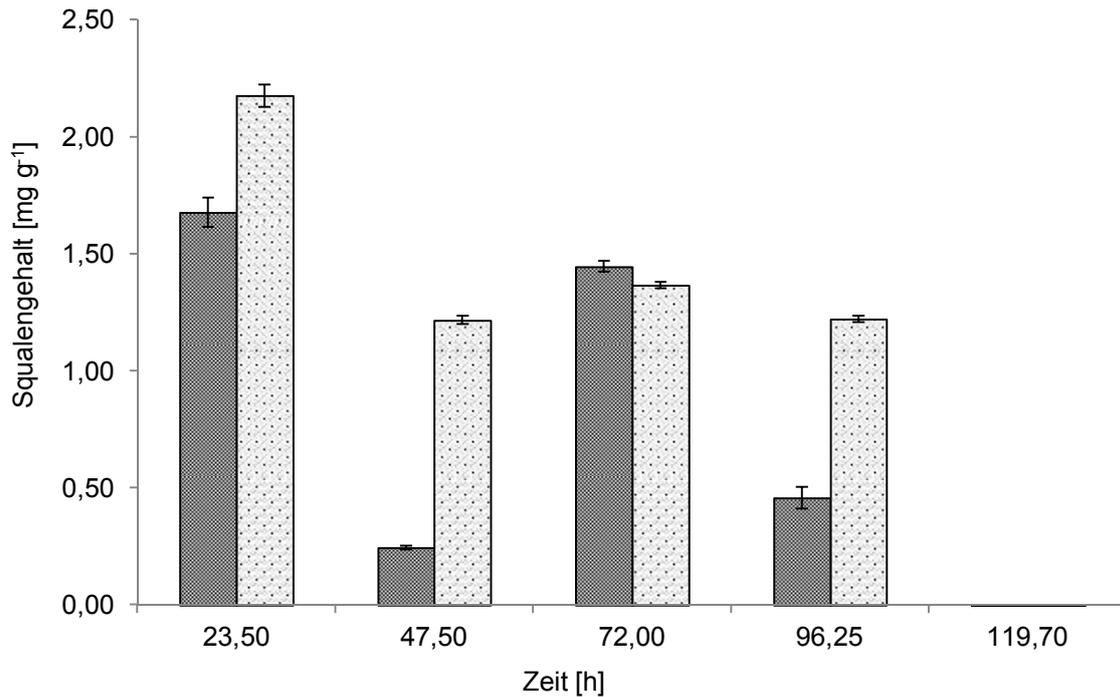


Diagramm 27: Squalengehalt der repeated batch Kulturen MN1 (■) und MN2 (□) mit steigender Medienkonzentration und MJA, Mittelwerte der FID-Messung \pm Standardabweichung

Der Squalengehalt in beiden Kulturen ist nach einem Tag am höchsten. Allerdings wurde dieser Wert vor der ersten MJA-Zugabe gemessen. In der Kultur MN1 sinkt der Squalengehalt nach 48 Stunden, steigt dann wieder leicht an. Zum Zeitpunkt der Ernte, nach 120 Stunden wurde kein Squalen detektiert.

4.2.8 Viabilitätskontrolle

4.2.8.1 Zielsetzung

Ziel dieses Versuches war es, die in Punkt 3.2 beschriebene RCB auf Viabilität zu prüfen und die BTS-Entwicklung 24 und 27 Stunden nach der Beimpfung zu beobachten. Dazu wurden insgesamt vier 300 ml Schüttelkolben mit 0,5 % (w/v) und 2 % glukosehaltigem Medium versehen und mit einer Kultur beimpft, die aus der neu erstellten, eine Woche alten RCB stammte.

4.2.8.2 Inokulum und Medienzusammensetzung

Tabelle 45: Medienzusammensetzung für Versuch Vt1-4

Bezeichnung und Glukosekonzentration	ASW [ml]	YEP-Stammlösung [ml]	dH ₂ O [g]	Glukosestamm-lösung [ml]	Inokulumsvolumen aus Kryokultur [ml]
Vt1 0,5 %	50	10	39	0,8	0,1
Vt2 0,5 %	50	10	39	0,8	0,1
Vt3 2 %	50	10	37	3,2	0,1
Vt4 2 %	50	10	37	3,2	0,1
Kontrolle	50	10	37	3,2	-----

Die Kultivierungsdauer betrug 27 Stunden. Nach 24 und 27 Stunden wurden je fünf ml Probe zur BTS-Analyse entnommen. Die Kultivierungsbedingungen sind Punkt 3.5.3 zu entnehmen.

4.2.8.3 Biomassekonzentration

Tabelle 46: BTS-Daten der Viabilitätskontrolle

Bezeichnung, Glukosekonzentration	Leergewicht [g]	Gewicht mit BTS [g]	Differenz [g]	BTS [g l ⁻¹]	Zeit nach Inokulation [h]
Vt1 0,5 %	19,4845	19,4875	0,0030	0,60	24
Vt1 0,5 %	51,9353	51,9392	0,0039	0,78	27
Vt2 0,5 %	51,7505	51,7598	0,0093	1,86	24
Vt2 0,5 %	50,6387	50,6453	0,0066	1,32	27
Vt3 2 %	50,8386	50,8427	0,0041	0,82	24
Vt3 2 %	51,9362	51,9425	0,0063	1,26	27
Vt4 2 %	52,0604	52,0643	0,0039	0,78	24
Vt4 2 %	52,0176	52,0215	0,0039	0,78	27

Die Kultur wächst wie erwartet und kann als Ausgangsmaterial für weitere Experimente als Kryokultur verwendet werden.

4.3 Versuche in 2000 ml Kolben

4.3.1 Batchversuch mit und ohne Licht (Kultur A, B)

4.3.1.1 Zielsetzung

Vorversuch zum Kennenlernen der Handhabung von 2000 ml Kolben sowie Untersuchung des Wachstumsverhaltens mit (Kultur B) und ohne Licht (Kultur A).

4.3.1.2 Inokulum und Medienzusammensetzung

Tabelle 47: Medienzusammensetzung Batchkultivierung in 2 l Kolben

	ASW [g]	YEP-Stammlösung [ml]	dH ₂ O [g]	Glukose-stamm-lösung [ml]	Volumen Inokulum [ml]
A	262	53,6	179,5	25	0,5
B	253,6	62,9	175	25	0,5

Die Inokulumzugabe erfolgte direkt aus der tiefgefrorenen RCB-Ampulle. Die Glukosekonzentration betrug 2 %, YEP: 0,1 %.

4.3.1.3 Biomassekonzentration

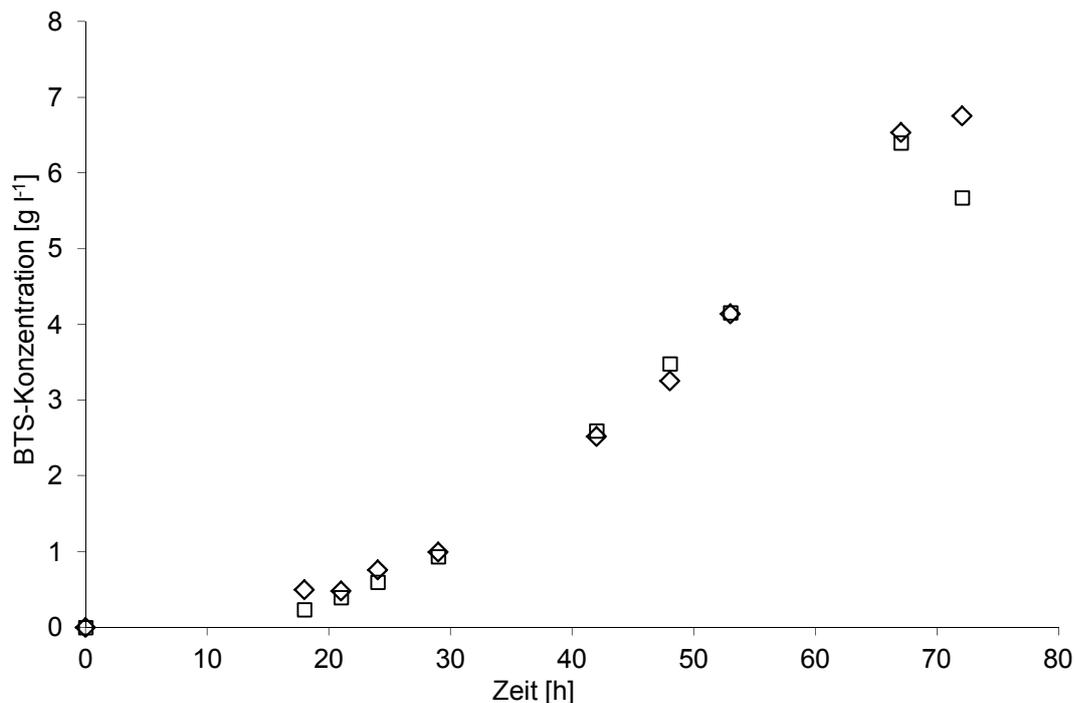


Diagramm 28: BTS-Konzentrationen der Batchkulturen A ohne Licht (□) und B mit Licht (◇) in 2 l-Kolben

Die Kulturen A und B unterscheiden sich in ihrem BTS-Verhalten nicht signifikant voneinander. Das Biomassewachstum steigt stetig an, bis es zu Kulturrende, nach 72 Stunden circa 7 g l^{-1} beträgt. Nach 48 Stunden ist eine leicht gelb-orange Färbung in dem unter Licht kultivierten Ansatz zu beobachten, die bis zur Ernte stärker wird.

4.3.1.4 Restsubstratanalyse

Die beiden Kulturansätze unterscheiden sich in der Substratverwertung von Kohlen- und Stickstoff nicht signifikant. Die NPOC-Konzentration nimmt stetig ab und erreicht den niedrigsten Wert von circa 900 mg l^{-1} zu Ende des Versuches nach 72 Stunden. Die TN Konzentration kommt nach 42 Stunden auf einem Plateau mit Werten von $60\text{-}80 \text{ mg l}^{-1}$ an.

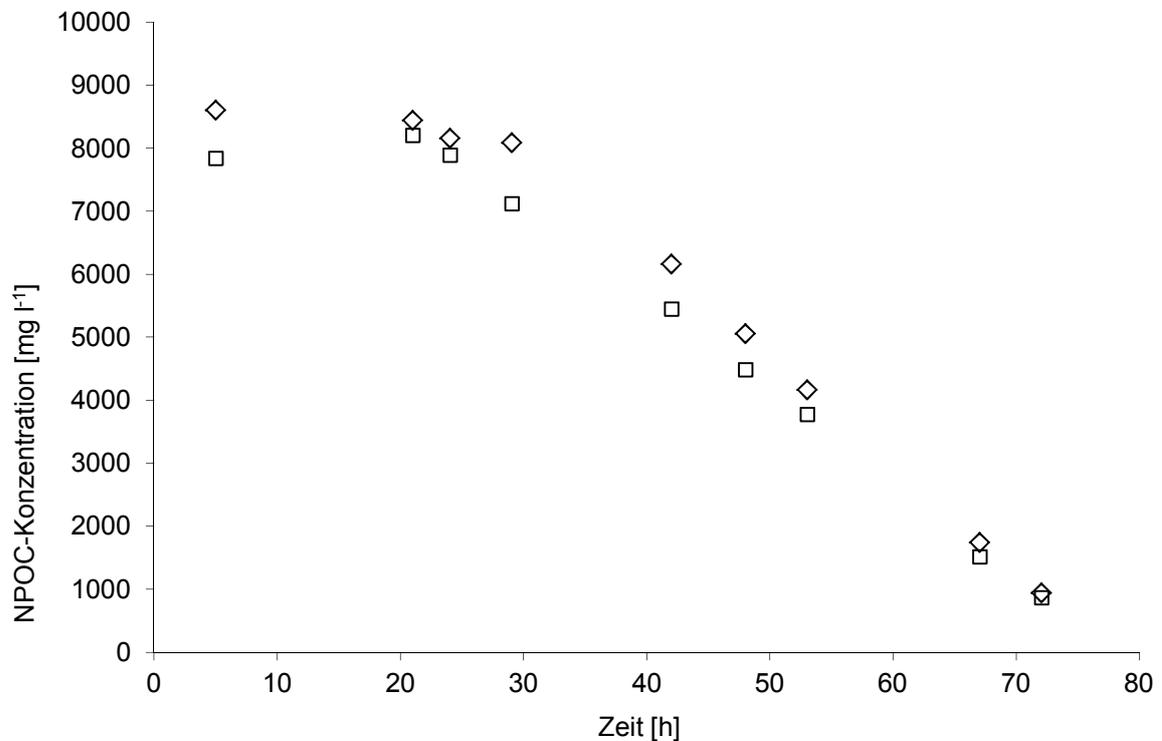


Diagramm 29: NPOC-Konzentrationen der Batchkulturen A ohne Licht (□) und B mit Licht (◇) in 2 l-Kolben

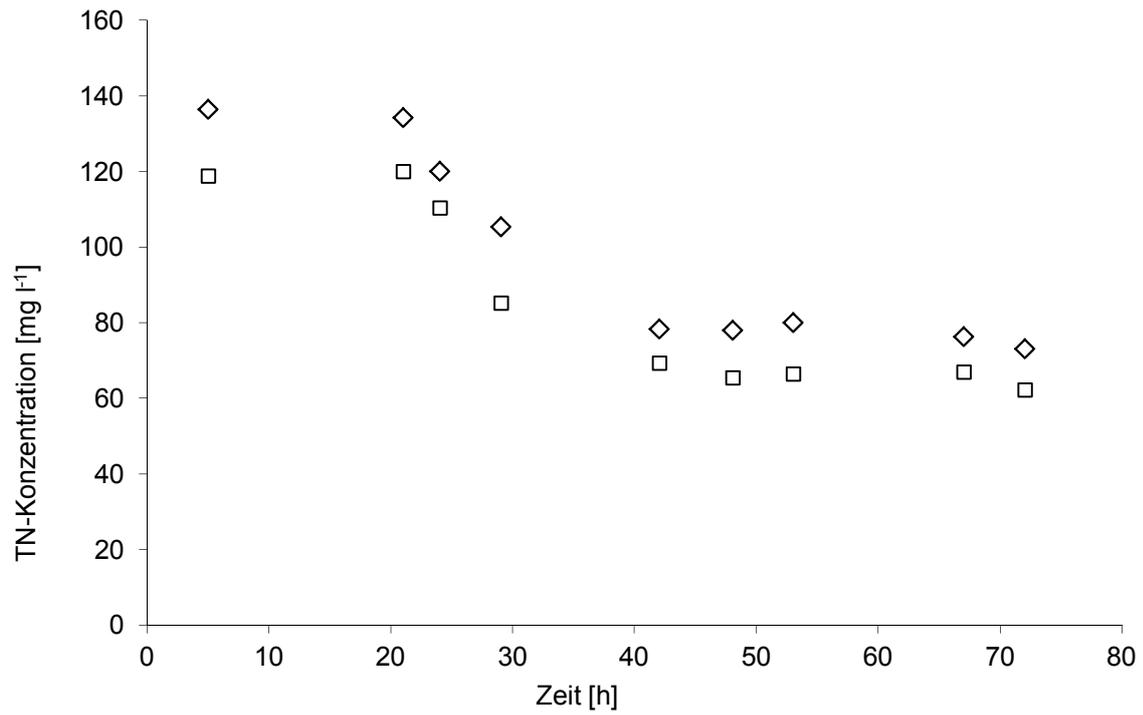


Diagramm 30: TN-Konzentrationen der Batchkulturen A ohne Licht (□) und B mit Licht (◇) in 2 l-Kolben

4.3.1.5 pH-Wert

Es fand keine pH-Wert-Bestimmung statt.

4.3.2 Batchkultur und repeated Batch (Kultur M, N, O)

4.3.2.1 Zielsetzung

Ziel dieses Versuches war es, Kultur O im repeated Batchverfahren durchzuführen. Die anderen Kolben dienten zur Überprüfung und zum Vergleich.

Das Medium enthielt 2% Glukose mit NH_4NO_3 und K_2HPO_4 als zusätzlichen Nährstoffquellen.

Kultur M diente zur BTS-Bestimmung und wurde während des Batchbetriebes nicht verändert.

In Kultur N erfolgte nach je 24 h eine Entnahme von 40 ml für die Squalenbestimmung. Zu Kultur O wurden im Abstand von 24 Stunden, nach Entfernung von 40 ml Kulturmedium für die Squalenbestimmung, 50 ml Basismedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 48) und weitere 1,6 ml Glukosestammlösung hinzugefügt.

Zusätzlich wurde ein dritter Kolben mit unbeimpftem Medium vorbereitet. Aus dieser Sterilkontrolle wurden genauso Proben genommen wie aus den anderen Kulturen.

4.3.2.2 Inokulum und Medienzusammensetzung

Tabelle 48: Zusammensetzung von 300 ml Basismedium

ASW [g]	YEP-Stammlösung [g]	dH ₂ O [g]	1,25 M NH_4NO_3 Lösung [ml]	0,329 M K_2HPO_4 -Lösung [ml]
150	30	111	1,4	2

Tabelle 49: Medienzusammensetzung und Inokulum Versuch M-O

	ASW [g]	YEP-Stamm-lösung [ml]	dH ₂ O [g]	Glukose-stamm-lösung [ml]	1,25 M NH_4NO_3 Lösung [ml]	0,329 M K_2HPO_4 -Lösung [ml]	Alter Inoku-lum [h]	BTS-Inoku-lum [g l ⁻¹]
M	300	60	221	19,2	2,8	4,5	37	0,92
N	300	60	221	19,2	2,8	4,5	37	0,9
O	300	60	221	19,2	2,8	4,5	37	1,32
Kon-trolle	300	60	221	19,2	2,8	4,5	37	---

Die Kultivierung dauerte 432 Stunden. Die Bestimmung der BTS-Konzentration erfolgte in Doppelbestimmungen.

4.3.2.3 Biomassekonzentration

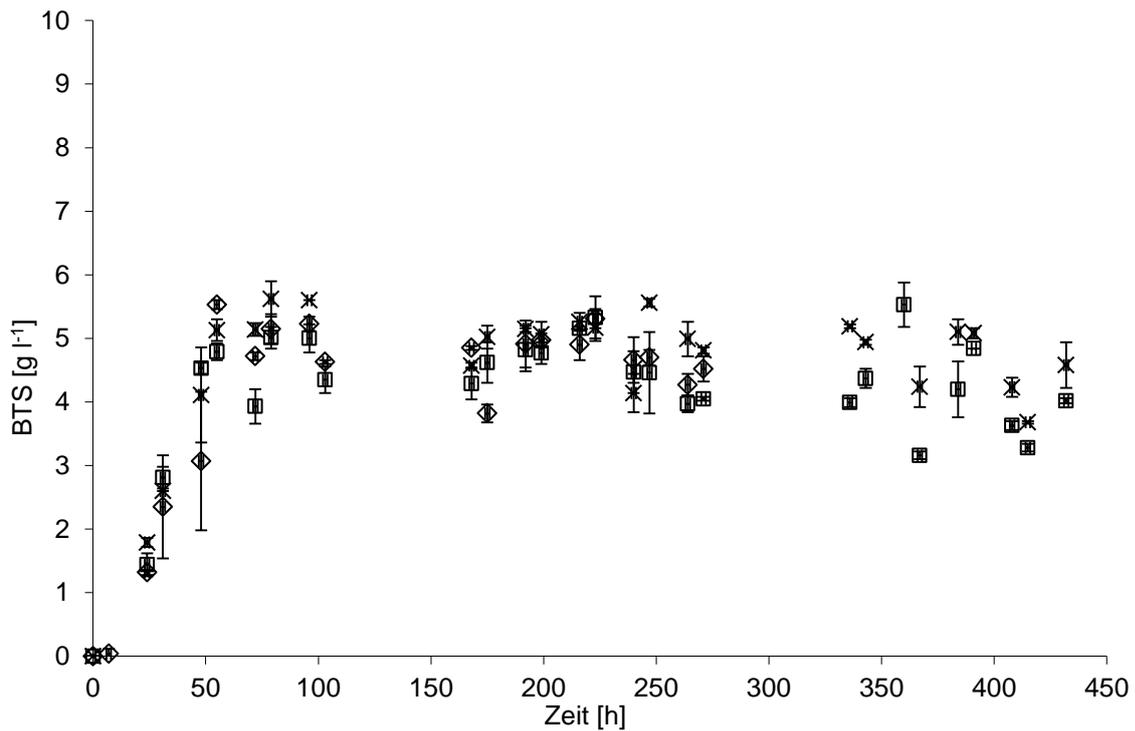


Diagramm 31: BTS-Daten der Kulturen M- Batchbetrieb (□), N- Batchbetrieb mit Entnahme von 40 ml d⁻¹ (◇), O- repeated batch mit gleichbleibender Konzentration (x) in Doppelbestimmungen

Die BTS-Entwicklung in den einzelnen 2 l Kolben unterscheidet sich nicht signifikant. Nach circa 96 Stunden bleibt die BTS-Konzentration stetig im Bereich von 4-6 g l⁻¹.

4.3.2.4 Restsubstratanalyse

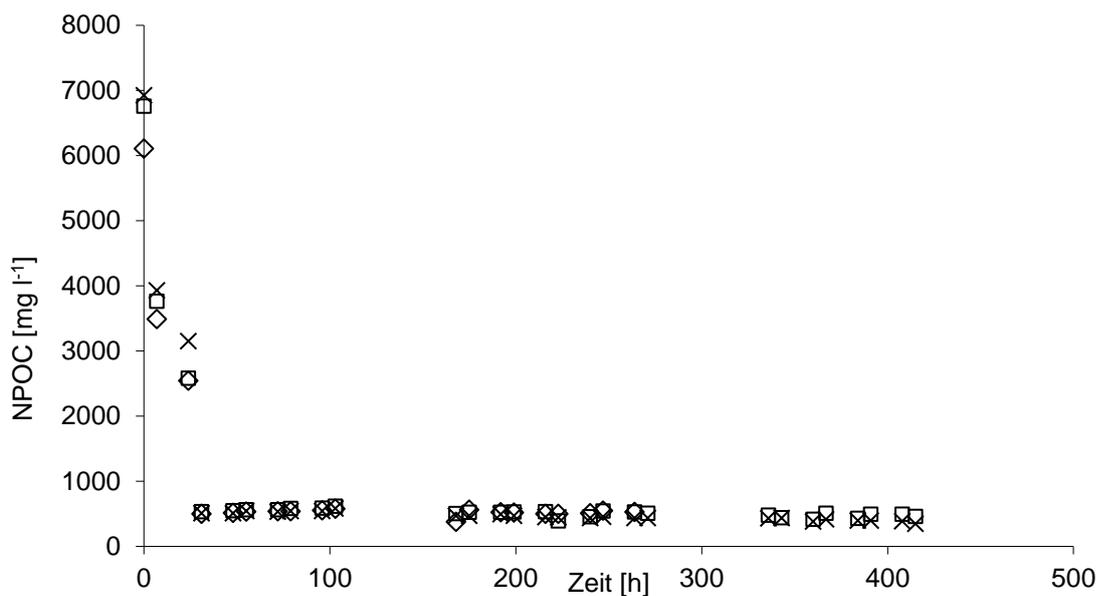


Diagramm 32: NPOC-Konzentration der Kulturen M- Batchbetrieb (□), N- Batchbetrieb mit Entnahme von 40 ml d⁻¹ (◇), O- repeated batch mit gleichbleibender Konzentration (x)

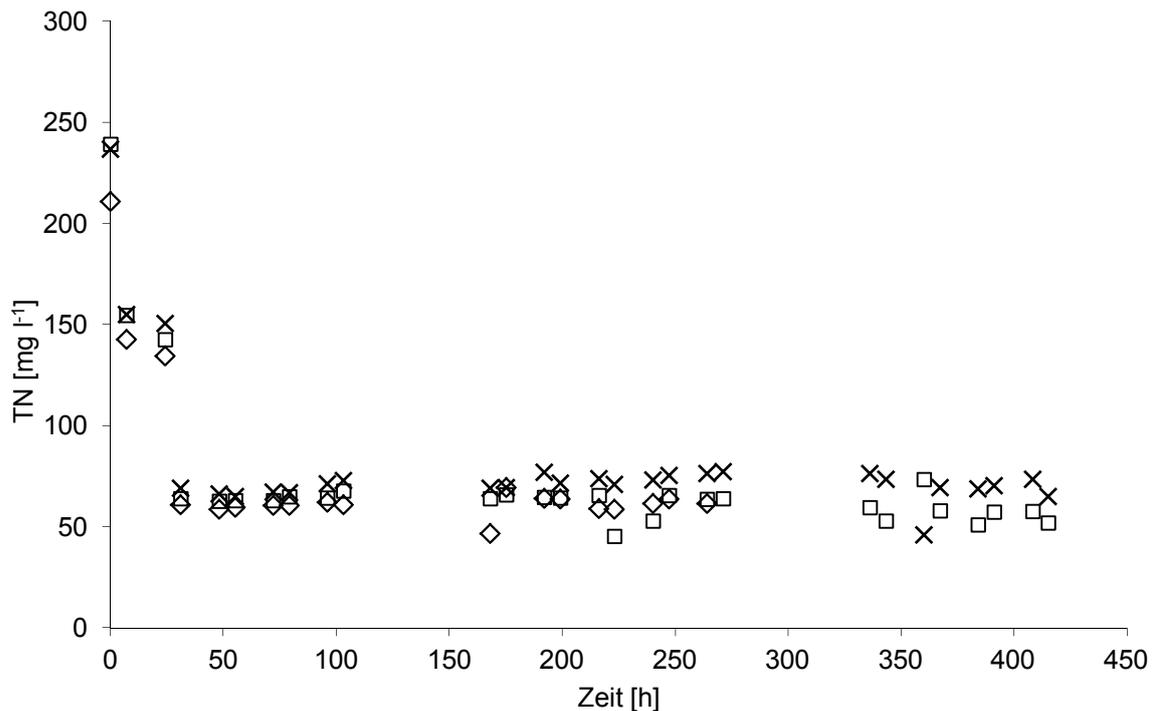


Diagramm 33: TN-Konzentration Konzentration der Kulturen M- Batchbetrieb (□), N- Batchbetrieb mit Entnahme von 40 ml d⁻¹ (◇), O- repeated batch mit gleichbleibender Konzentration (x)

Die NPOC- und TN-Konzentrationen erreichen in allen Kulturen das Minium von circa $500 \pm 40 \text{ mg l}^{-1}$ bzw. $60 \pm 10 \text{ mg l}^{-1}$ nach 31 Stunden und bleiben in diesem Konzentrationsbereich bis zum Ende des Experimentes.

4.3.2.5 pH-Wert

Die pH-Wertentwicklung verlief in allen Kulturen gleich: 7 Stunden nach Inokulation wurde in der Kulturbrühe pH 7 gemessen. Nach 24 Stunden erhöhte sich der Wert auf 7,5 bzw. 8 nach 48 Stunden. Bis zum Zeitpunkt der Ernte nach 432 Stunden bewegte sich der pH Wert zwischen 7,3 und 8,3.

4.3.2.6 Squalenbestimmung

Von den Proben der Kultur O, die im repeated Batchverfahren mit gleichbleibendem Medium kultiviert wurde, wurden nach 48 Stunden sowie nach 14, 15, 16 und 17 Tagen keine Squalenanalyse durchgeführt.

Die Probe der Kultur N (Batchverfahren mit Entnahme von 40 ml d⁻¹), die nach 48 Stunden gezogen wurde, konnte nicht lyophilisiert werden.

Die Squalenbestimmung mittels GC-FID verlief in keiner der gemessenen Proben positiv.

Die Analyse mit GC-MS ergab folgende Werte für Kultur O
nach 24 Stunden: 186579 und 196359 [Area],
nach 48 Stunden: 755212; 444961 [Area],
nach 72 Stunden: 96380; 0 [Area].

Nach 72 Stunden wurde in Kultur N 98705; 0 [Area] gemessen.

Aufgrund der hohen Schwankungen der Kalibrationsgerade für die GC-MS-Methode (siehe auch Punkt 4.1.1), können diese Werte nicht quantitativ ausgewertet werden sondern geben lediglich eine qualitative Aussage darüber, dass in den gemessenen Proben Squalen gefunden wurde, was mittels GC-FID nicht nachgewiesen werden konnte.

4.4 Fermentation

4.4.1 Prozessparameter

Tabelle 50: Fermentationsparameter

Batch Medium	~ 4 l
Feed Medium	~ 5 l, 10-fach konzentriert
Temperatur	25 °C
Rührerdrehzahl	300 bis maximal 700 rpm, abhängig vom Grad der relativen Sauerstoffsättigung
pH Wert	7-7,6
Sauerstoffzufuhr	Sterile Zulufrate händisch auf circa 2 l min ⁻¹ eingestellt, Sauerstoffzufuhr im Reaktor auch über Rührerdrehzahl geregelt; nicht unter 30 % relative Sauerstoffsättigung
Inokulum	100 ml
Antischaum	Durch Antischaumsonde reguliert

4.4.2 Start der Zugabe des Feed Mediums

Die Zugabe des Feed Mediums erfolgte nach 37,5 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt wurde ein stetiger Anstieg des pH-Wertes beobachtet. Die maximale theoretische spezifische Wachstumsrate μ wurde auf 0,07 h⁻¹ eingestellt. Nach 52 Stunden wurde diese auf 0,09 h⁻¹ erhöht.

4.4.3 Biomassekonzentration

Diagramm 34 zeigt die gesamte akkumulierte Biomasse während des Fermentationsprozesses. Die Messungen wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt. Bis zum Fedbatch Start nach 37,5 h befanden sich circa 20 g Biotrockenmasse im Reaktor. Dies entspricht einer Konzentration von circa 6 g l⁻¹. Nach 52 Stunden erfolgte eine Erhöhung von $\mu_{\text{theoretisch}}$ von 0,07 h⁻¹ auf 0,09 h⁻¹. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich 9 g l⁻¹ BTS bzw. 32 g Zellmaterial im Fermentor. Die gesamte maximale Biomasse im Reaktor betrug 104,7 g nach 71 Stunden, was einer Konzentration von circa 15 g l⁻¹ entspricht.

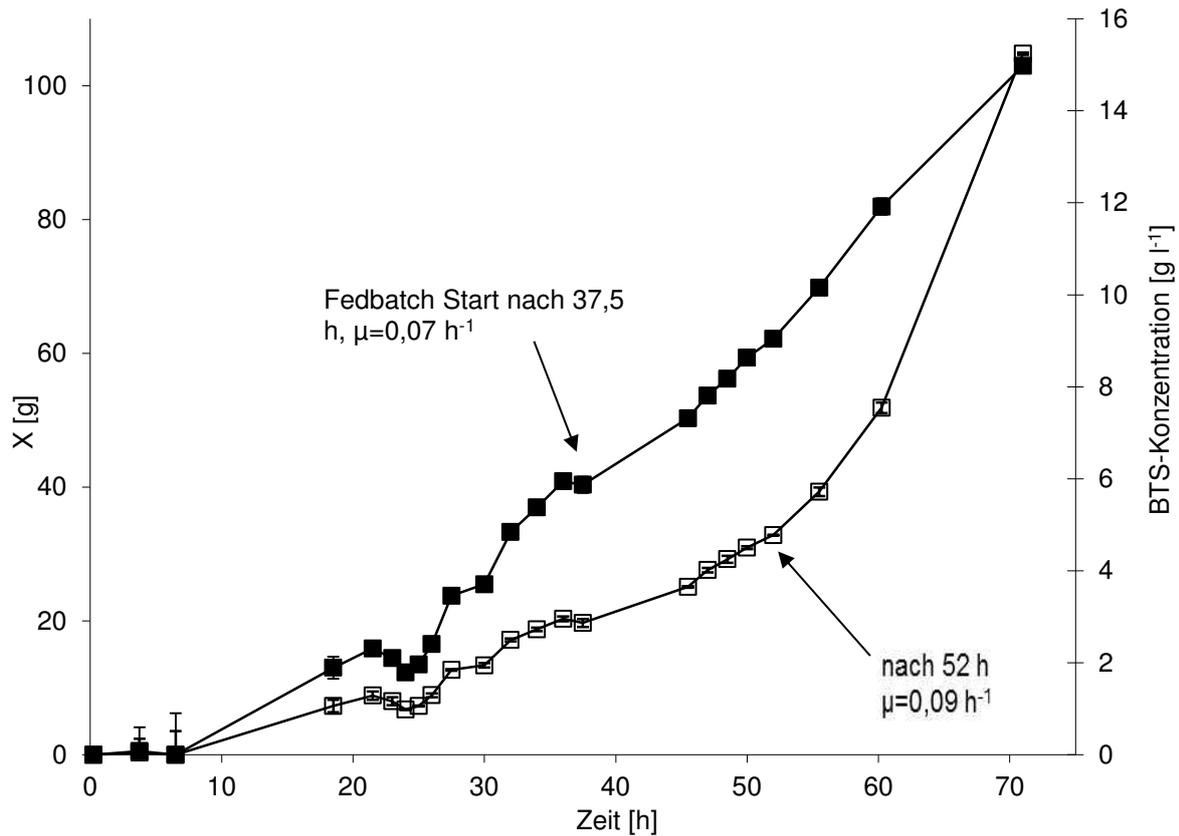


Diagramm 34: Gesamtbiomasse X (□) und BTS-Konzentration (■) der Fed-Batch Fermentation, Doppelbestimmungen

4.4.4 Reaktorvolumen

Das Reaktorvolumen während der Fermentation ist in Diagramm 35 dargestellt. Die Entnahme von Probevolumen zur Bestimmung der Biotrockenmasse sowie zur Analyse des Squalengehaltes ist miteinbezogen.

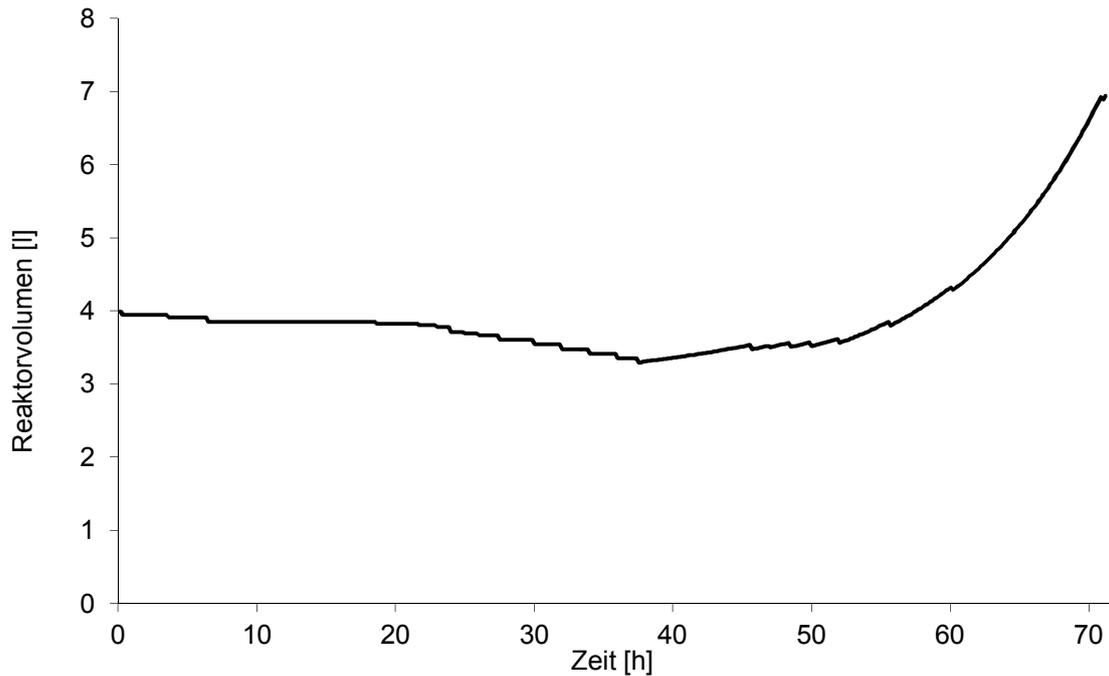


Diagramm 35: Reaktorvolumen während der Fed-Batch Fermentation

4.4.5 Restsubstratanalyse

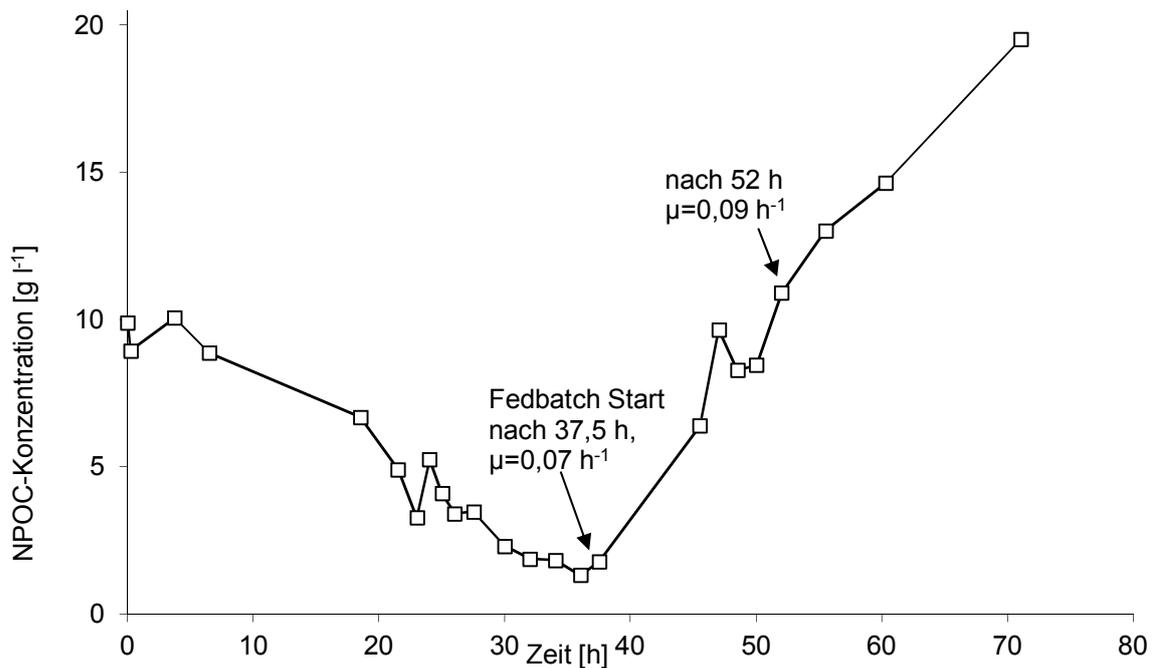


Diagramm 36: NPOC-Konzentration der Fed-Batch Fermentation

Die Bestimmung des im Restsubstrat vorhandenen, organischen Kohlenstoffs ist in Diagramm 36 dargestellt. Die Konzentration nimmt kontinuierlich ab, bis nach Zugabe des Feedmediums nach 37,5 Stunden wieder Glukose zur Verfügung steht. Die Werte ab dem Zeitpunkt von 50 Stunden sind nicht mehr verlässlich, da sie sich bereits außerhalb der Kalibrationskurve befinden. Eine genauere Angabe der im Medium verbleibenden Glukose liefert die Glukoseanalyse mittels HPLC.

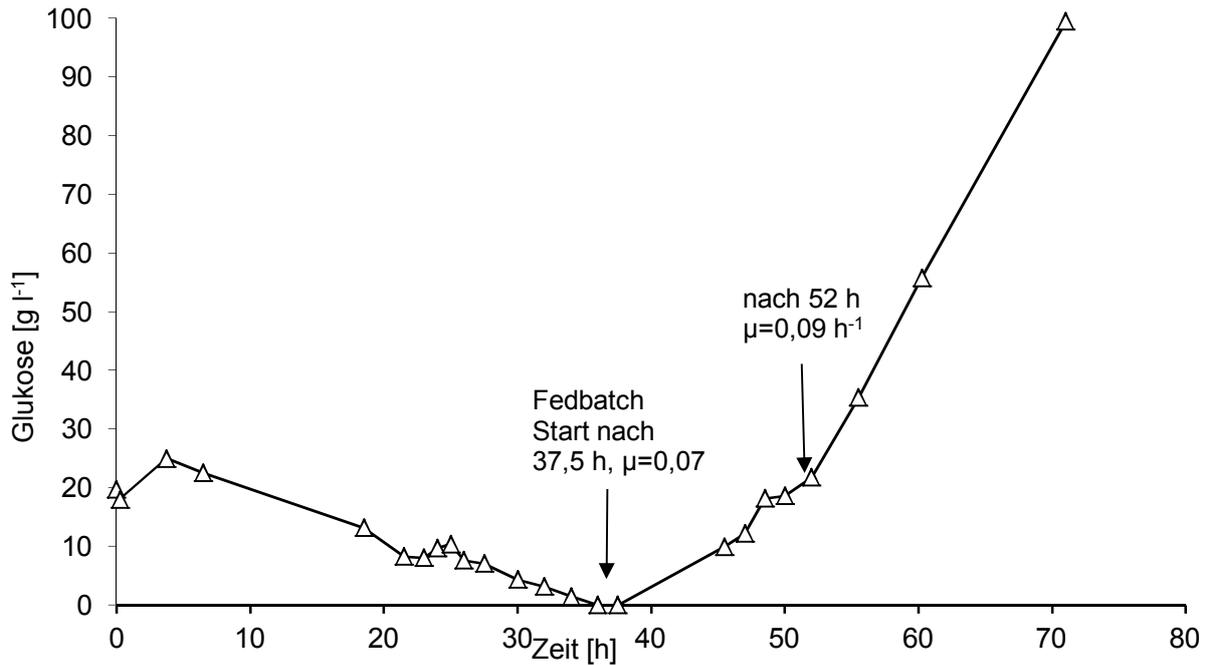


Diagramm 37: Glukosewerte der Fed-Batch Fermentation

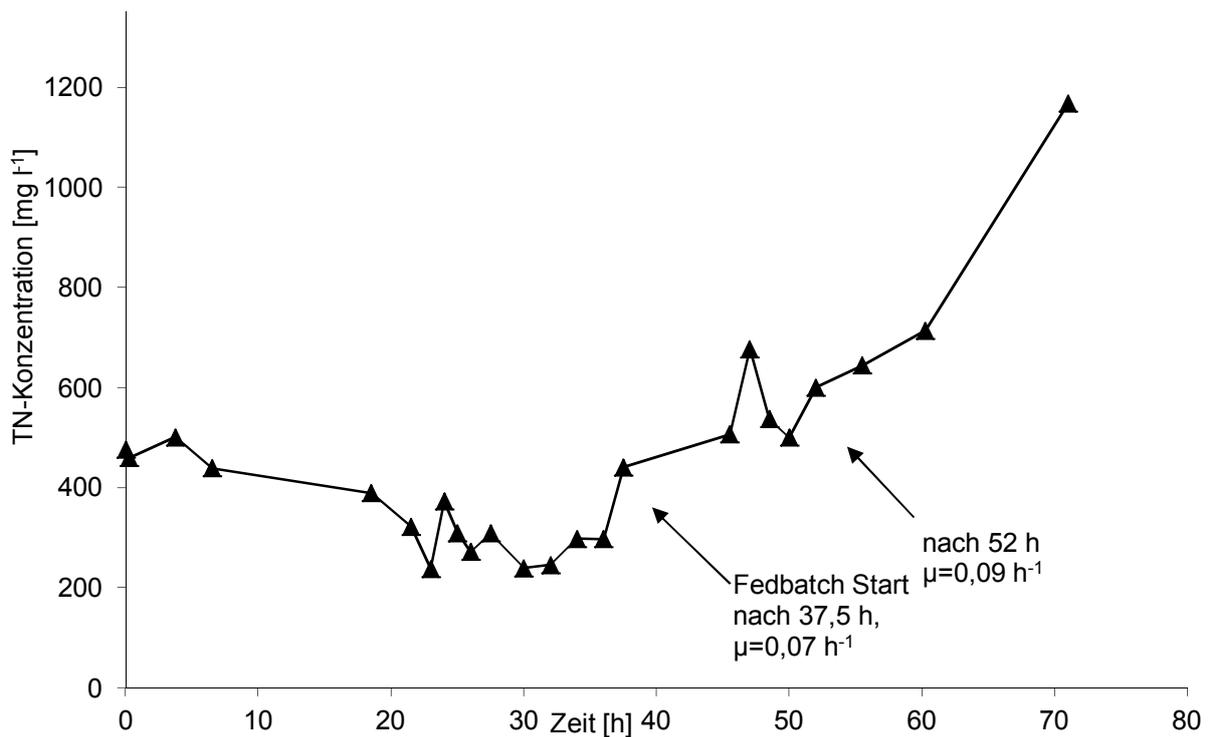


Diagramm 38: TN-Konzentration der Fed-Batch Fermentation

Die TN-Konzentration erreichte den niedrigsten Wert bevor Batchende und stieg schon vor Zugabe des Feedmediums an. Nach circa 47 Stunden überstieg die TN-Konzentration dauerhaft den Anfangswert bis sie zum Kultivierungsende nach 71 Stunden 1,3 g l⁻¹ betrug.

4.4.6 Squalenbestimmung

Tabelle 51: Squalendaten der Fermentation

Zeit [h]	Einwaage [g]	FID Messung [Area]			Mittelwert FID [Area]	Konzentration [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	Squalengehalt [mg g^{-1}]	Standardabweichung [mg g^{-1}]
		1/3	2/3	3/3				
24,0	0,1003	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
27,5	0,1015	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
30,0	0,1040	32,05	44,33	52,68	43,02	5,12	0,30	
32,0	0,1015	41,67	39,31	35,53	38,83	4,62	0,27	
34,0	0,1073	41,31	43,00	41,78	42,03	5,00	0,28	
36,0	0,1000	19,63	18,20	18,33	18,72	2,23	0,13	
38,0	0,1006	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
45,5	0,1000	53,59	51,98	53,71	53,09	6,32	0,38	
48,5	0,1006	51,05	54,00	48,91	51,32	6,11	0,36	
50,0	0,1005	48,60	46,75	44,88	46,74	5,57	0,33	
52,0	0,1028	37,79	38,13	36,92	37,61	4,48	0,26	
55,5	0,1062	49,29	49,69	49,49	49,49	5,89	0,33	
60,3	0,1013	54,09	55,56	52,41	54,02	6,43	0,38	
71,0	0,1000	25,74	26,59	26,73	26,35	3,14	0,19	

Der Squalengehalt in mg pro g Biomasse wurde ab einer Kultivationsdauer von 30 Stunden nachgewiesen. Nach 46 und 60 h nach Inokulation wurde der höchste Squalengehalt von $0,38 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ BTS nachgewiesen.

Diagramm 39 zeigt den Squalengehalt in mg g^{-1} BTS und die gesamte im Reaktor vorhandene Squalenmenge. Die Produktbildungsrate ergibt sich aus der Steigung der Geraden durch die Squalenmenge in mg. Pro Stunde werden $0,43 \text{ mg}$ Squalen gebildet.

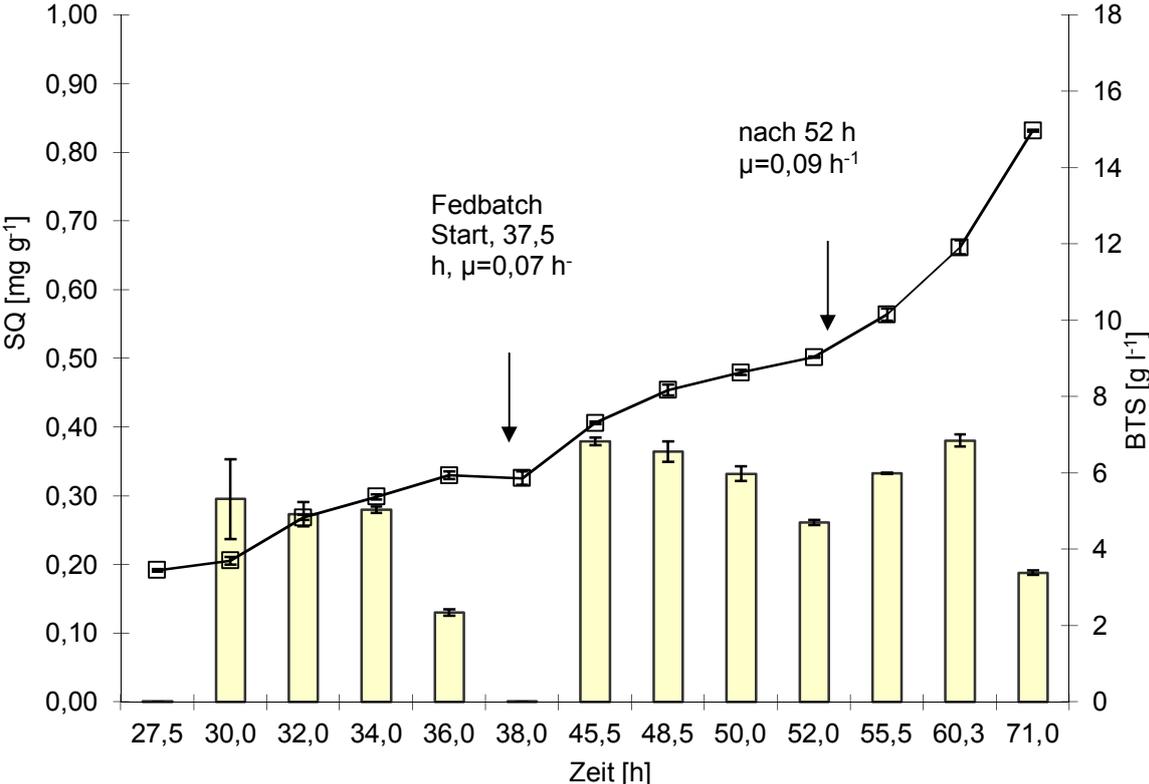


Diagramm 39: Squalengehalt (dreifache GC-FID Messung ± Standardabweichung, Balken) und BTS-Konzentration der Fed-Batch Fermentation (Mittelwerte ± Differenz, Linie)

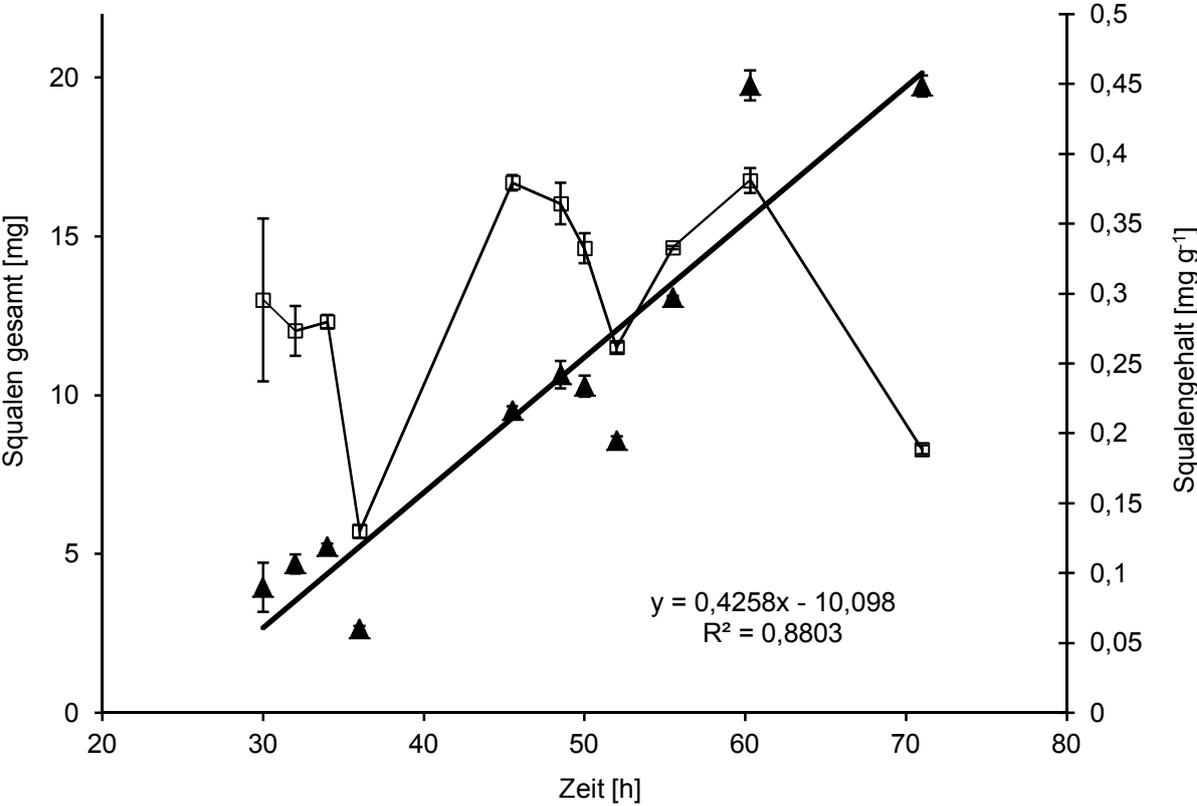


Diagramm 40: Squalengehalt (□) und Akkumulation von Squalen (▲) im Bioreaktor

4.5 $k_L a$ -Wert-Bestimmung

4.5.1 $k_L a$ - Wert

Der $k_L a$ - Wert ist ein volumenbezogener Stoffübergangskoeffizient, der einen wichtigen Parameter in aeroben, biologischen Kultivierungsprozessen wie z.B. in Bioreaktoren und Schüttelkolben, bzw. in chemischen Gas-Flüssigreaktoren darstellt. In der vorliegenden Arbeit wurde der $k_L a$ -Wert in Schüttelkolben bestimmt um einen Vergleich der Sauerstoffeintragsrate in verschiedenen Kolbenbauarten und Füllvolumina zu ziehen.

Der Konzentrationsgradient bewirkt den Transport von Sauerstoff von der Gas- in die Flüssigphase. Konzentrationsgradienten an der Gas-flüssig-Grenzfläche werden von der Geschwindigkeit der Sauerstoff zehrenden Reaktion, vom Sauerstoff-Partialdruck in der Gasphase und vom Transportwiderstand an der Grenzfläche beeinflusst.

Die Film-Theorie beschreibt diese an Grenzschichten stattfindenden Transportphänomene quantitativ. Es wird davon ausgegangen, dass laminare, stationäre Grenzschichten an den Phasengrenzen aller fluiden Phasen entstehen, wo der Stofftransport nur mittels Diffusion erfolgt. Diffusibilität von Sauerstoff und die Dicke der Diffusionsgrenzschicht haben einen Einfluss auf diesen Stofftransport.

Der Diffusionskoeffizienten D charakterisiert die Diffusibilität. D ist in Wasser ca. $0,2 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ und in Luft ca. $0,3 \times 10^{-5} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Der verbleibende Teil der fluiden Phase ist turbulent und auf Grund konvektiver Strömung vollständig durchmischt. Der Widerstand liegt daher praktisch vollständig in der Flüssig-Grenzschicht.

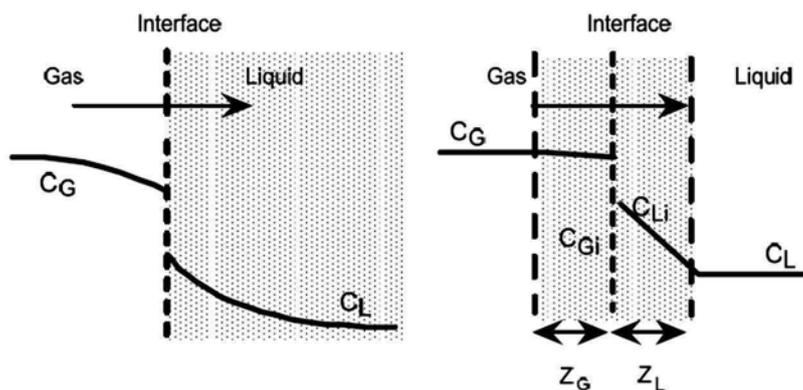


Abbildung 5: Phasengrenze mit Konzentrationsgradienten. Links: reale Gradienten; rechts: Gradienten laut Film-Theorie. Aus: Heinzle, 2012

4.5.2 Relevanz des $k_L a$ -Wertes für biotechnologische Prozesse

Der $k_L a$ -Wert ist in biotechnologischen Prozessen sehr wichtig. Er beschreibt wie gut Mikroorganismen in einer biotechnologischen Anlage mit Gasen versorgt werden können.

Bei aerober Kultivierung ist ein hoher $k_L a$ -Wert für Sauerstoff von großer Bedeutung.

Der $k_L a$ -Wert kann konstruktiv, durch verbesserte Geometrie von Rührkesseln und –organen sowie Stromstörern, und durch die Änderung von Betriebsparametern erhöht werden. Rührerdrehzahl, bzw. die Schüttelrate, die Begasungsrate, die Zusammensetzung des zugeführten Gases und der Gesamtdruck gehören zu den veränderbaren Betriebsparameter (Heinzle, 2012).

4.5.3 Ergebnisse

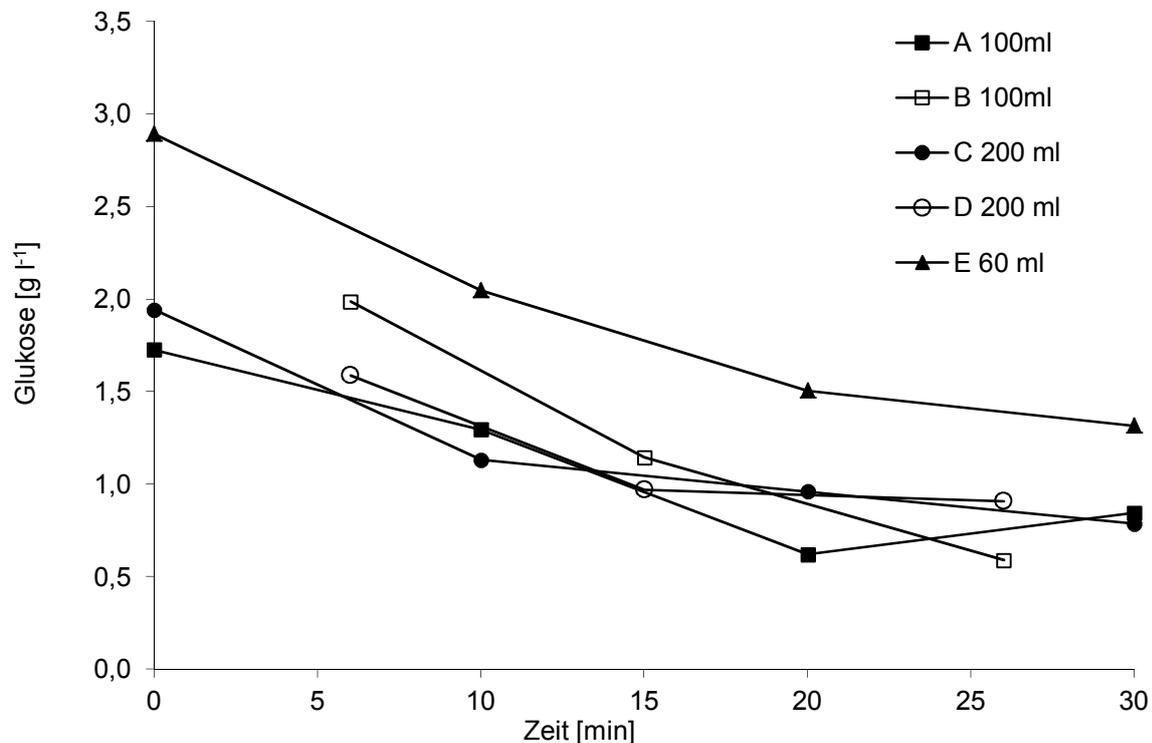


Diagramm 41: enzymatischer Glukoseverbrauch in Schüttelkolben

In Diagramm 41 sind die Glukosekonzentrationen zu den Zeitpunkten der Probenahme aufgetragen.

Es ist zu sehen, dass die Glukose kontinuierlich verbraucht wird und die Kurve zuletzt abflacht. Werden die Ansätze mit 100 ml und 200 ml verglichen, ist kein offensichtlicher Unterschied zwischen den Füllvolumina festzustellen.

Tabelle 52: Ergebnisse der $k_{L,a}$ -Wertbestimmung

	Füll- vo- lumen [ml]	Glukose- verbrauchs rate [g l⁻¹ min⁻¹]	Glukose- verbrauchs rate [mol l⁻¹ min⁻¹]	Sauerstoff- verbrauchs rate rO₂ [mol l⁻¹ min⁻¹]	Sauerstoff- verbrauchs rate rO₂ [g l⁻¹ min⁻¹]	k_{L,a} [min⁻¹]	k_{L,a} [h⁻¹]
A	100	0,0332	0,00018	0,00009	0,0030	0,363	21,78
B	100	0,0691	0,00038	0,00019	0,0061	0,755	45,30
C	200	0,0364	0,00020	0,00010	0,0032	0,398	23,86
D	200	0,0329	0,00018	0,00009	0,0029	0,360	21,59
E	60	0,0527	0,00029	0,00015	0,0047	0,576	34,57

5 Diskussion

5.1 Wahl der Kohlenstoffquelle

Aurantiochytrium limacinum SR21 ist fähig verschiedene Kohlenstoffquellen zu verwerten. In der Literatur wurden unter anderem Glukose, Fruktose, Saccharose, Laktose, Maltose, Stärke, Glyzerin, Propionat, Acetat, Ölsäure und Leinöl beschrieben. Das Wachstum bei Verwendung von Di- und Polysacchariden ist allerdings geringer als bei Monosacchariden (Glukose und Fruktose) und Glyzerin (Yokochi et al., 1998, Rappel, 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurde Glukose verwendet, da sie eine leicht verwertbare Kohlenstoffquelle darstellt, einfach zu gewinnen ist, chemisch definiert, einfach in der Handhabung (Einwaage, Sterilisation), nicht toxisch ist. Zudem ist die Verfügbarkeit an vielen Orten der Welt gewährleistet. Allerdings ist zu bedenken, dass bei einer Großproduktion von *A. limacinum* auch andere, billigere Kohlenstoffquellen in Betracht gezogen werden sollten, die zum Beispiel als Abfallprodukte bei anderen Prozessen anfallen. Aus Zeitgründen, wurde auf die Wirkung anderer Kohlenstoffquellen auf das Biomassewachstum und den Squalengehalt verzichtet.

5.2 Zusätzliche Stickstoffquelle Ammoniumnitrat

In einem weiteren Vorversuch im Batchmodus; Experiment G-L wurde Versuch A-F (Bestimmung der Glukosekonzentration und Füllvolumen) wiederholt und das Medium mit einer zusätzlichen Stickstoffquelle versehen. Da *A. limacinum* SR21 fähig ist sowohl Ammonium als auch Nitrat als Stickstoffquelle zu verwerten wurde dem Medium Ammoniumnitrat zugeführt (Chen et al., 2010).

Eine Gegenüberstellung der Biomassekonzentration des Versuches ohne zusätzlicher Stickstoffquelle (Diagramm 42) mit der Biomasseentwicklung des Versuches mit Ammoniumnitrat (Diagramm 43) zeigt, dass Kulturen mit 8 % Glukose und zusätzlicher N-Quelle später Biomasse akkumulierten als dieselben Kulturen ohne Ammoniumnitrat. Im Gesamten können die Wachstumsentwicklungen aber als vergleichbar betrachtet werden. Diagramm 44 zeigt zudem ein Vergleich von Kulturen mit und ohne Zugabe von Ammoniumnitrat mit 2 % Glukose. Es ist zu sehen, dass in der mit NH_4NO_3 -versetzten Kultur Stickstoff erst nach 48 Stunden nicht mehr verbraucht wird.

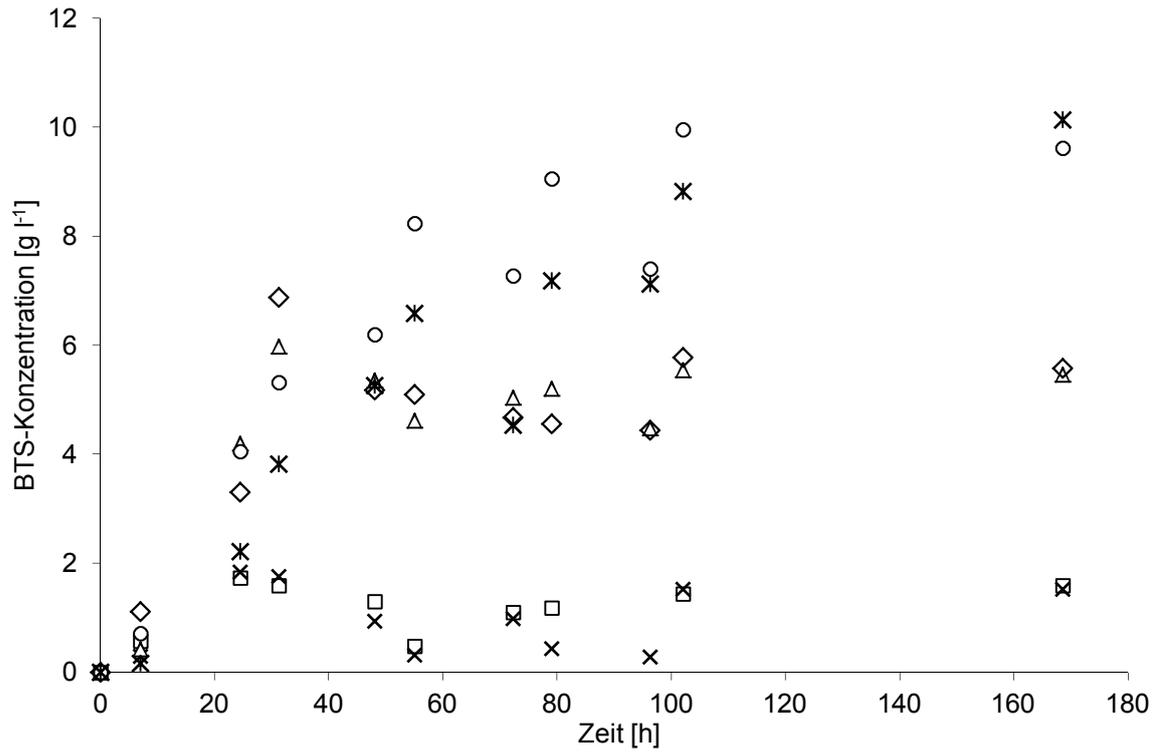


Diagramm 42 BTS-Konzentrationen der Batchkulturen ohne zusätzlicher Stickstoffquelle. 0,5 % Glukose 100 ml Füllvolumen (□) 200 ml (x), 2 % Glukose 100 ml (Δ) 200 ml (◇), 8 % Glukose 100 ml (○) 200 ml (X)

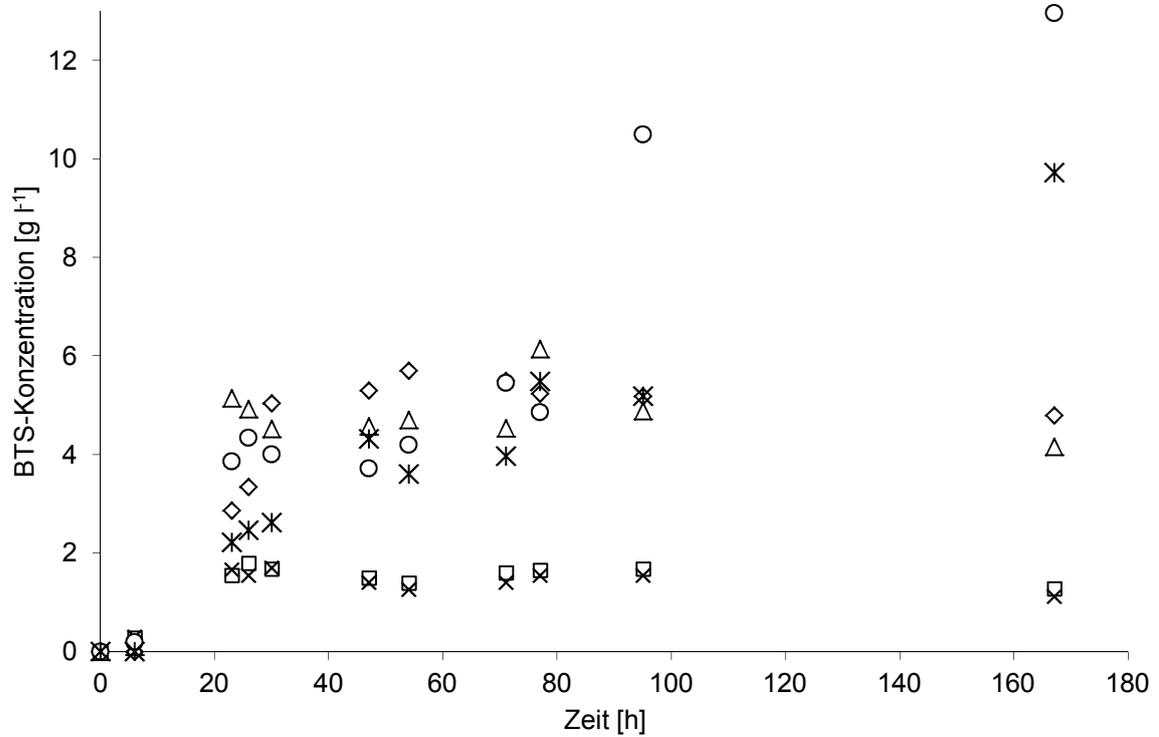


Diagramm 43: BTS-Konzentrationen der Batchkulturen mit zusätzlicher Stickstoffquelle. 0,5 % Glukose 100 ml Füllvolumen (□) 200 ml (x), 2 % Glukose 100 ml (Δ) 200 ml (◇), 8 % Glukose 100 ml (○) 200 ml (X)

Tabelle 53: NPOC- und TN- Werte der Batchkulturen ohne zusätzlicher Stickstoffquelle

Glukosegehalt/ Füllvolumen [ml]	NPOC start [mg l ⁻¹]	NPOC min [mg l ⁻¹]	TN start [mg l ⁻¹]	TN min [mg l ⁻¹]
0,5 %/ 100 ml	2121,5	297,3	183,15	73,45
0,5 %/ 200 ml	1711	286,8	168,75	60,6
2 %/ 100 ml	6740	353,25	183,3	59,1
2 %/ 200 ml	11350	377,9	182,55	59,55
8 %/ 100 ml	16845	12320	214	59,33
8 %/ 200 ml	17230	13233	163,25	52,76

Tabelle 54: NPOC- und TN-Werte der Batchkulturen mit Ammoniumnitrat

Glukosegehalt/ Füllvolumen [ml]	NPOC start [mg l ⁻¹]	NPOC min [mg l ⁻¹]	TN start [mg l ⁻¹]	TN min [mg l ⁻¹]
0,5 %/ 100 ml	2167	388,5	226,4	98,35
0,5 %/ 200 ml	2138,5	370	211,8	81,45
2 %/ 100 ml	6655	594,5	335,3	71,15
2 %/ 200 ml	6685	570,5	325,2	73,05
8 %/ 100 ml	16880	2725,8	821	232,6
8 %/ 200 ml	16355	4798,2	722,5	227,37

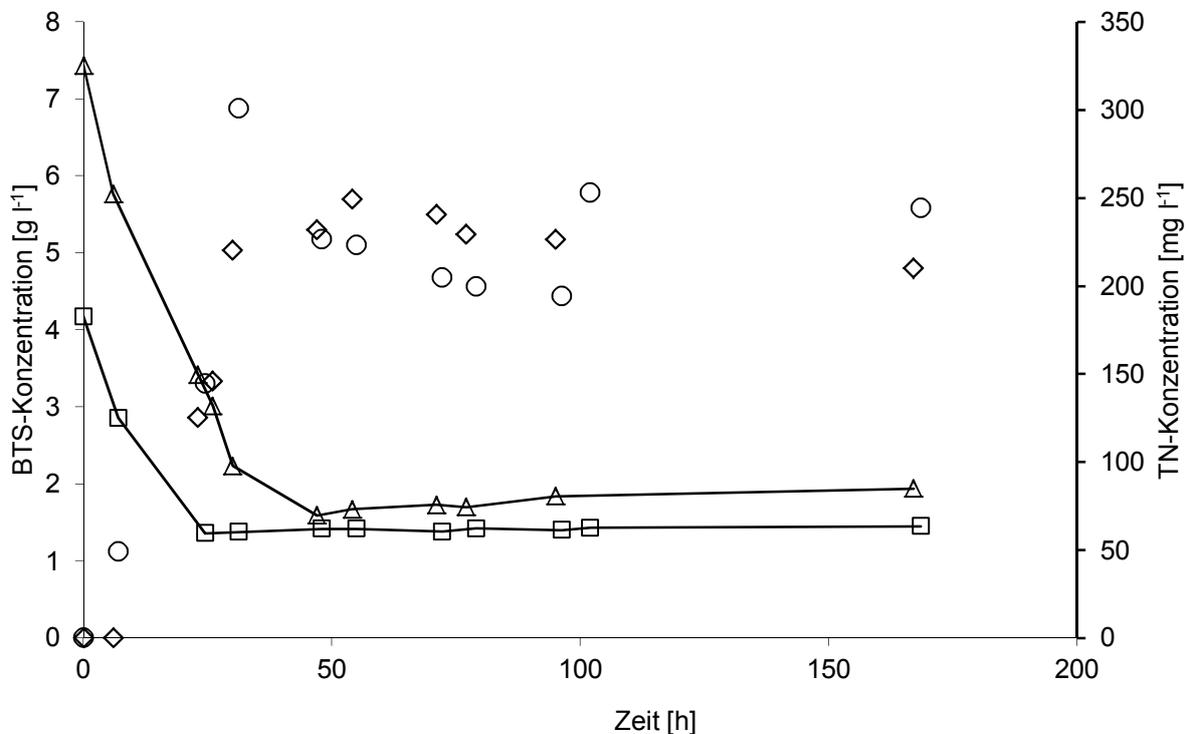


Diagramm 44: Gegenüberstellung der BTS- und TN-Konzentrationen von Batchkulturen mit 2 % Glukose und Zugabe von Ammoniumnitrat bei 200 ml Füllvolumen. ohne Ammoniumnitrat (BTS: ◊, TN: Δ) und mit (BTS: ○, TN: □)

5.3 Füllvolumen 500 ml Kolben

Da bei keinem der Vorversuche ein offensichtlicher Unterschied zwischen Füllvolumina von 100 ml und 200 ml beobachtet werden konnte, wurden alle weiteren Experimente mit 200 ml Medium durchgeführt.

Auch die Ergebnisse der $k_{L,a}$ -Wertanalyse stützen diese Entscheidung: Die $k_{L,a}$ -Werte für 500 ml Schüttelkolben liegen bei 21,78 und 45,30 h^{-1} bei 100 ml und bei 23,86 und 21,59 h^{-1} bei 200 ml Füllvolumen. Im 300 ml Kolben mit einem Füllvolumen von 60 ml wurde ein $k_{L,a}$ -Wert von 34,57 h^{-1} festgestellt.

Diese Werte liegen in dem Bereich von $10 < k_{L,a} < 100 h^{-1}$, der von Zhang et al., (2005) für 250 ml Schüttelkolben und einer Schüttelrate von 100-300 rpm beschrieben wird.

Tabelle 55: $k_{L,a}$ -Werte A-D: 500 ml Schikanenkolben, E: 300 ml Schikanenkolben

	Füllvolumen	$k_{L,a}$ [h^{-1}]
A	100 ml	21,78
B	100 ml	45,30
C	200 ml	23,86
D	200 ml	21,59
E	60 ml	34,57

5.4 Biomassekonzentration

In den ersten Batchversuchen in 500 ml Schüttelkolben (A-F und G-L) wurde die optimale Glukosekonzentration anhand des BTS-Wachstums bestimmt. Dazu wurden drei verschiedene Konzentrationen verwendet: 0,5 %, 2 % und 8 % Glukose.

Die Konzentration von 0,5 % wurde gewählt, um den unteren Konzentrationsbereich abzudecken.

In mehreren Publikationen wird eine Glukosekonzentration von 2 % als optimal für die Squalenproduktion angegeben (Fan et al., 2010, Nakazawa et al., 2012). Dieselbe Glukosekonzentration wurde auch zur Kultivierung von *A. limacinum* in Versuchen zur Docosahexaensäure (DHA)-Produktion, einer Omega-3-Fettsäure, von Rappel (2013) in unserem Labor verwendet.

Eine Konzentration von 80 g Glukose l^{-1} wurde gewählt, um einen etwaigen Anstieg des Biomassewachstums zu beobachten. Allerdings fand die vorher erwähnten Veröffentlichungen von Fan (2010) und Nakazawa (2012) zwar eine Erhöhung der BTS bei einer Glukosekonzentration von bis zu 9 %, beobachteten aber einen Rückgang im Squalengehalt.

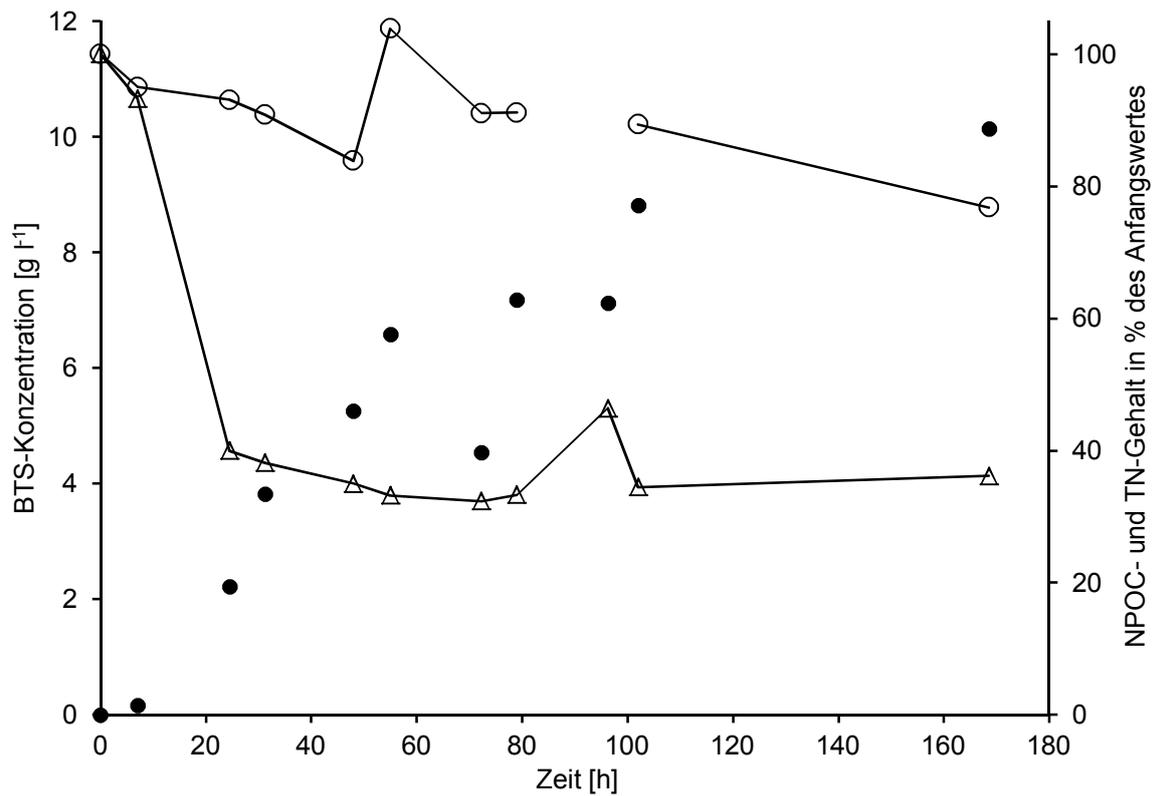


Diagramm 45: Batchversuch, 8 % Glukose. BTS (●), NPOC- (○) und TN-Gehalt (Δ), NPOC-Messwert bei 96 Stunden wurde als Ausreißer identifiziert und nicht dargestellt

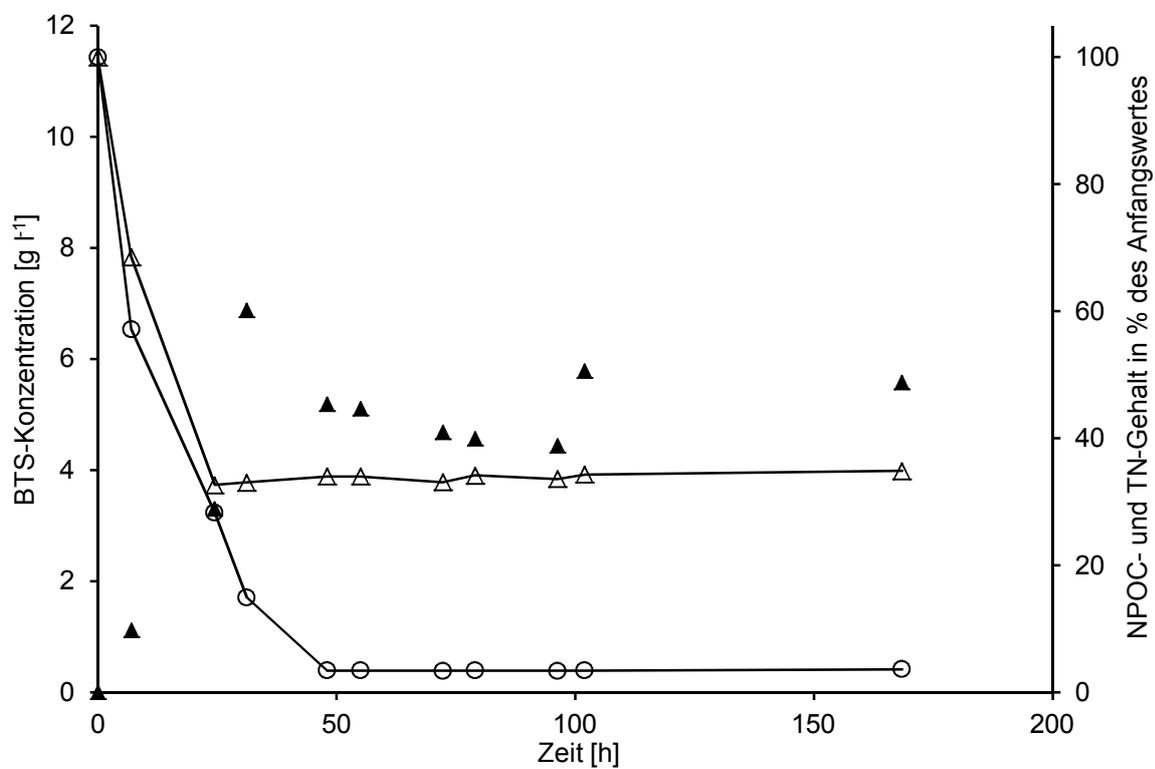


Diagramm 46: Batchversuch, 2 % Glukose. BTS (▲), NPOC- (○) und TN-Gehalt (Δ)

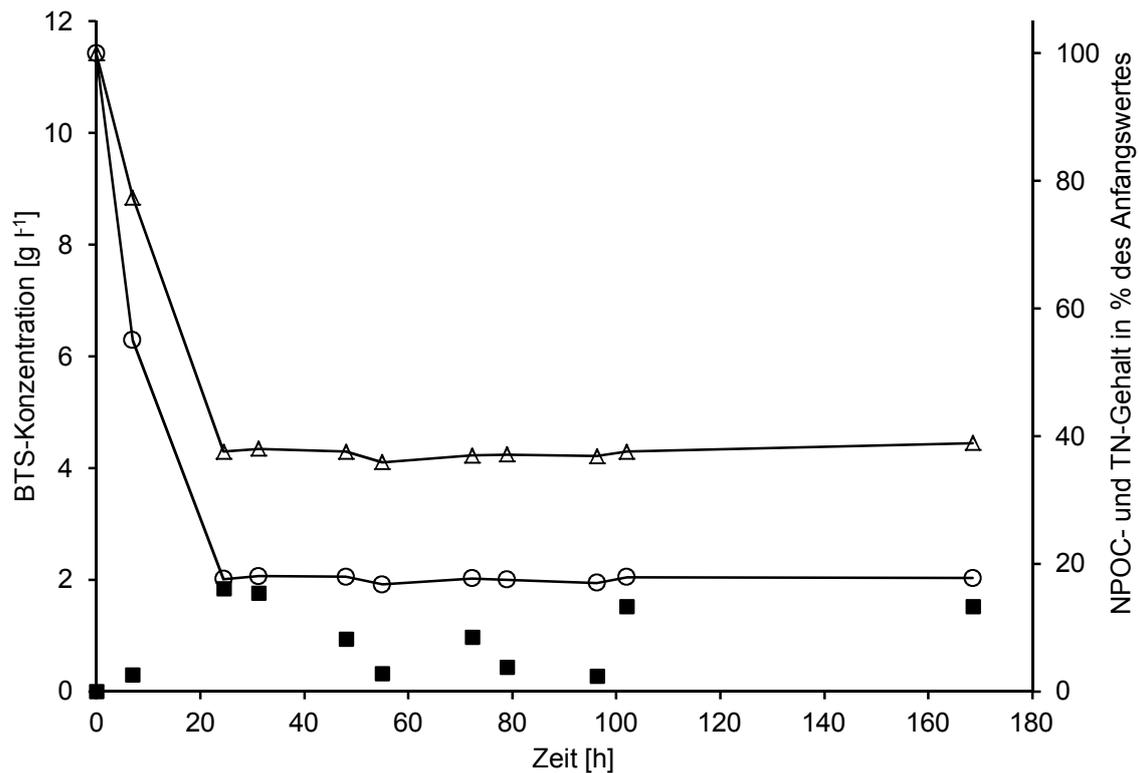


Diagramm 47: Batchversuch, 0,5 % Glukose. BTS (■), NPOC- (○) und TN-Gehalt (Δ)

In den obenstehenden Diagrammen (Diagramm 45, Diagramm 46 und Diagramm 47) werden die BTS-Entwicklungen sowie die NPOC- und TN-Gehalte in den Versuchen zur Ermittlung der optimalen Glukosekonzentration dargestellt, wobei keine Zugabe von Ammoniumnitrat erfolgte. Das Wachstum erreichte bei einer Konzentration von 0,5 % Glukose nur $1,56 \pm 0,04 \text{ g l}^{-1}$ und die Restsubstratanalyse zeigt, dass der im Medium zur Verfügung stehende Kohlenstoff nach circa 24 Stunden verbraucht war. Die Abnahme und starke Schwankungsbreite der BTS-Daten der Kulturen bei 0,5 % Glukose im Zeitraum von 48 h-96 h kann durch einen Messfehler wie z.B. einer schlecht eingestellten Waage oder der durch kleine Probenmengen entstandenen Ungenauigkeit bei niedrigen BTS-Konzentrationen entstanden sein.

Wird dem Medium $20 \text{ g Glukose l}^{-1}$ zugesetzt, tritt das Wachstum erst nach 48 Stunden in die stationäre Phase ein und es wird ein BTS-Höchstwert von circa $5,52 \pm 0,07 \text{ g l}^{-1}$ erreicht. Dieses Ergebnis stimmt auch annähernd mit dem erwarteten Wert von $6,24 \text{ g l}^{-1}$ überein, der durch Multiplikation von $1,56 \text{ g l}^{-1}$ (BTS-Endwert bei 0,5 % Glukose) mit Faktor 4 berechnet wurde.

Die Kultivierung des Organismus bei 8 % hingegen erreichte bei Weitem nicht das angestrebte Ziel von circa 22 g l^{-1} , sondern einen Wert von $9,88 \pm 0,26 \text{ g l}^{-1}$. Bei der BTS-Bestimmung aus Proben der Kulturen mit 8 % Glukose erschwerte sich die Handhabung mit zunehmendem Alter der Kulturen durch Bildung eines gallertartigen Überstandes nach der ersten Zentrifugation. Dieses Phänomen konnte durch Abheben

des Überstandes, Verdünnen und erneutem Zentrifugieren dieses beseitigt werden. So wurde sichergestellt, dass die sich im Überstand befindliche Zellmasse zum Pellet hinzugefügt wurde. Es ist unklar, wie diese Trübung entstand. Es darf vermutet werden, dass sie zu einem Teil aus Zellen bestand. Die gallertartige Konsistenz kann zudem auf eine erhöhte Kohlenhydrat-Konzentration, das ektoplasmische Netz oder Zellausscheidungen hinweisen.

Es wird angenommen, dass zu wenig Sauerstoff in den Schüttelkolben zur Verfügung stand und das Wachstum so gehemmt wurde. Yokochi et al., (1998) berichteten über die höchste Biomassekonzentration von circa 35 g l^{-1} einer *A. limacinum*-Kultur bei 9 % Glukose, was eine Inhibierung des Wachstums durch das Substrat eher unwahrscheinlich macht. Trotzdem ist in der Restsubstratanalyse zu erkennen, dass der NPOC-Gehalt der Kulturen mit 8 % Glukose kaum abnimmt und konstant bei circa 16 g l^{-1} bleibt beziehungsweise langsam weniger wird (siehe Diagramm 48 und Diagramm 49 Diagramm 50). Chen und Johns, (1996) vermuten, dass bei hohen Glukosekonzentrationen der Kohlenstoff für die Aufrechterhaltung der Zellfunktionen und weniger für den normalen Metabolismus verwendet wird und so eine niedrigere Wachstumsrate zustande kommt.

Aufgrund der Ergebnisse aus den Vorversuchen im Batchverfahren sowie den Verweisen in der Fachliteratur wurde eine Glukosekonzentration von 2 % für weitere Experimente verwendet.

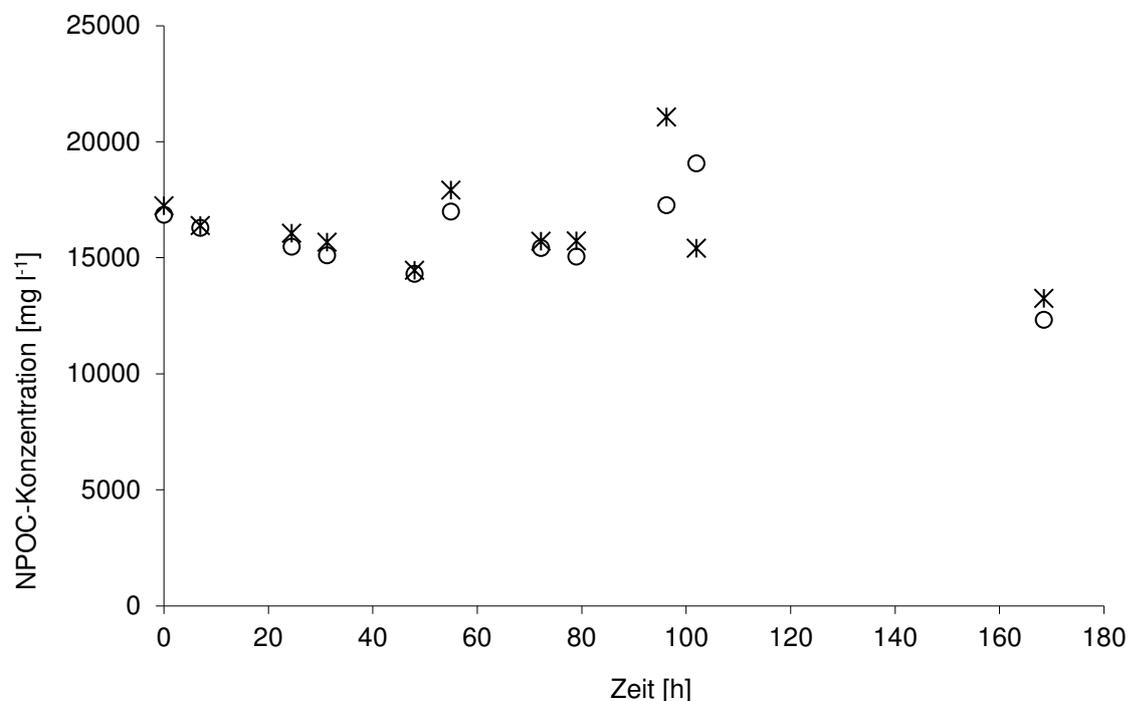


Diagramm 48: NPOC-Konzentration, Batchbetrieb mit 8 % Glukose und verschiedenen Füllvolumina ohne zusätzlicher Stickstoffquelle. 100 ml Füllvolumen: ○; 200 ml Füllvolumen: ✕

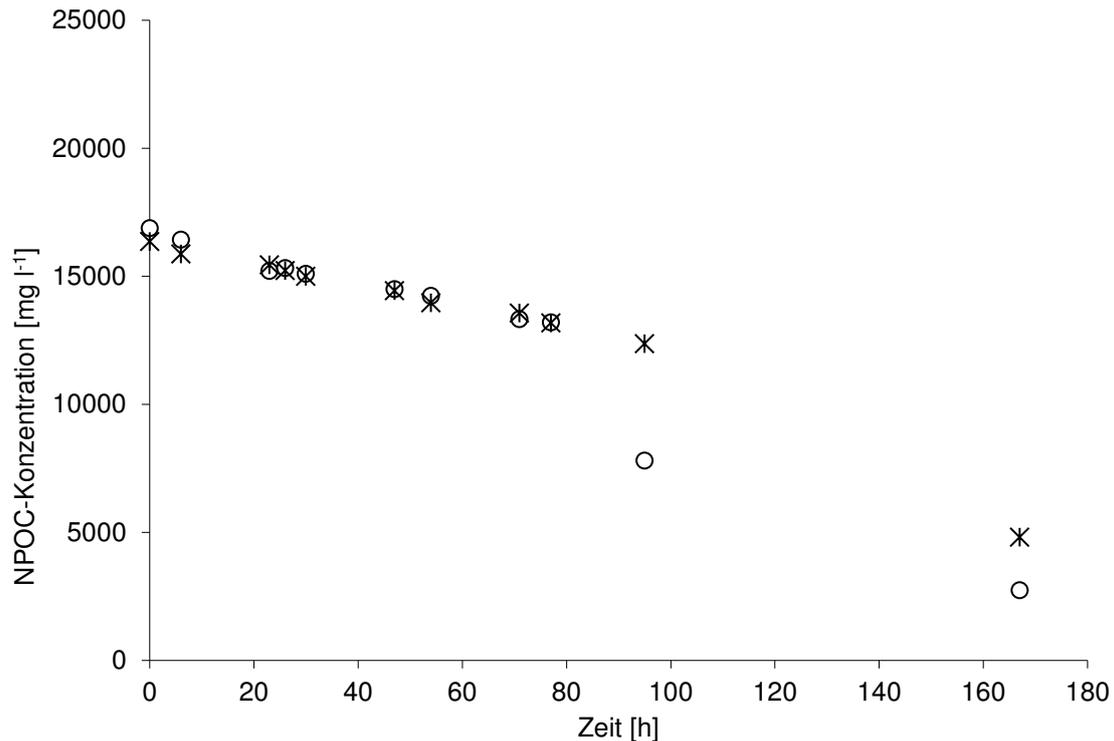


Diagramm 49: NPOC-Konzentration Batchbetrieb mit 8 % Glukose und verschiedenen Füllvolumina mit zusätzlicher Stickstoffquelle. 8 % Glukose: 100 ml Füllvolumen: ○; 200 ml: ✕

5.4.1 Biomassewachstum im repeated Batch Verfahren

Diagramm 50 zeigt eine Gegenüberstellung von Wachstumskurven periodischer Satzkulturen und Batch Kulturen. Die aufgetragenen Werte sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen der Kulturen T und J (Batchmodus) und S und SN (repeated Batch).

Es ist deutlich zu sehen, dass eine Ergänzung mit frischem Medium mit steigender Nährstoffkonzentration einen Anstieg der Biomasse bewirkt und den Eintritt der stationären Phase verzögert. Diese Ergebnisse sind auch mit der Fed-Batch Fermentation vergleichbar. Nach 72 Stunden ist die Biomassekonzentration in repeated batch Kulturen gleich hoch wie während der Fed-batch Fermentation. Die Restsubstratanalyse zeigt, dass die Kulturen im Gegensatz zur Batchkultivierung nicht nährstofflimitiert sind (Diagramm 51) und im Falle von Kultur S (am stärksten ansteigende Strichlinien; Diagramm 51), NPOC und TN-Konzentrationen über dem Startniveau aufweisen. Repeated Batch Kultivierung ist so eine nützliche Methode zur Simulation eines nicht nährstofflimitierten Prozesses. Es können große Mengen an Biotrockenmasse angehäuft und in regelmäßigen Abständen Probenvolumen zur Squalenbestimmung entnommen werden.

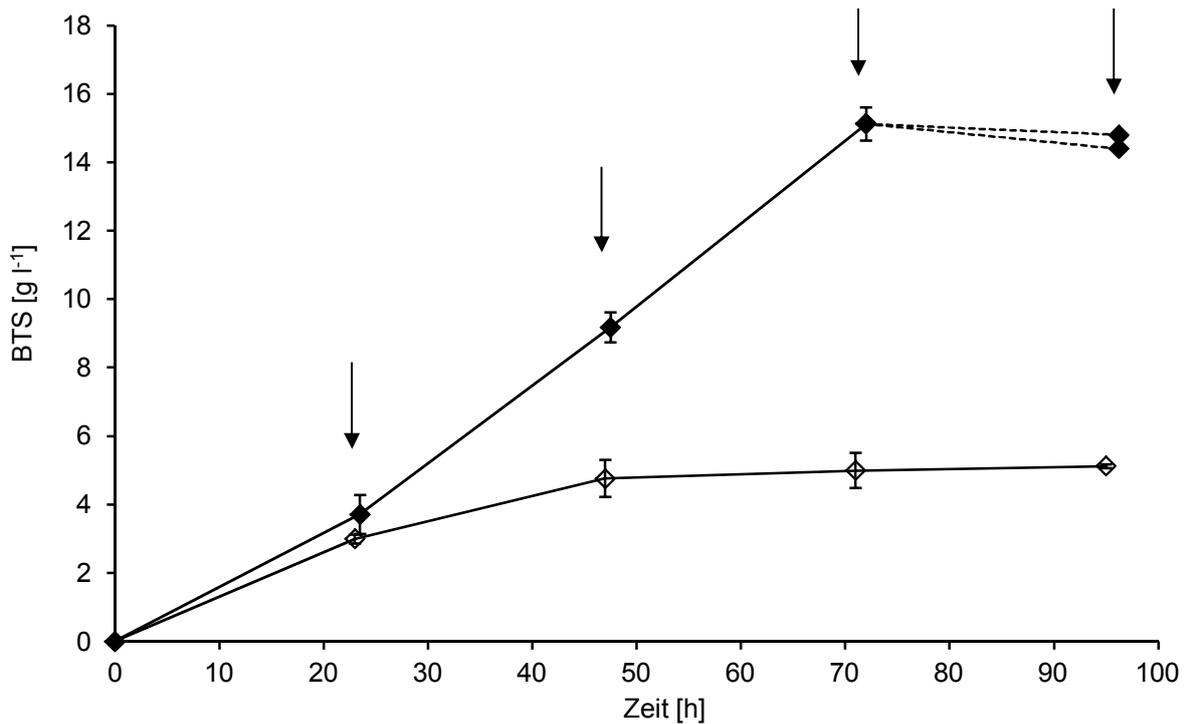


Diagramm 50: Gegenüberstellung Biotrockenmassekonzentration repeated batch (◆) und batch Kultur (◇) in Doppelbestimmung (Mittelwerte ± Differenz). Die Pfeile geben die Zeitpunkte der Medienergänzung an, Strichlinien zeigen zwei parallele Kulturen an, die aber ab 72 h mit unterschiedlich konzentriertem Medium supplementiert wurden

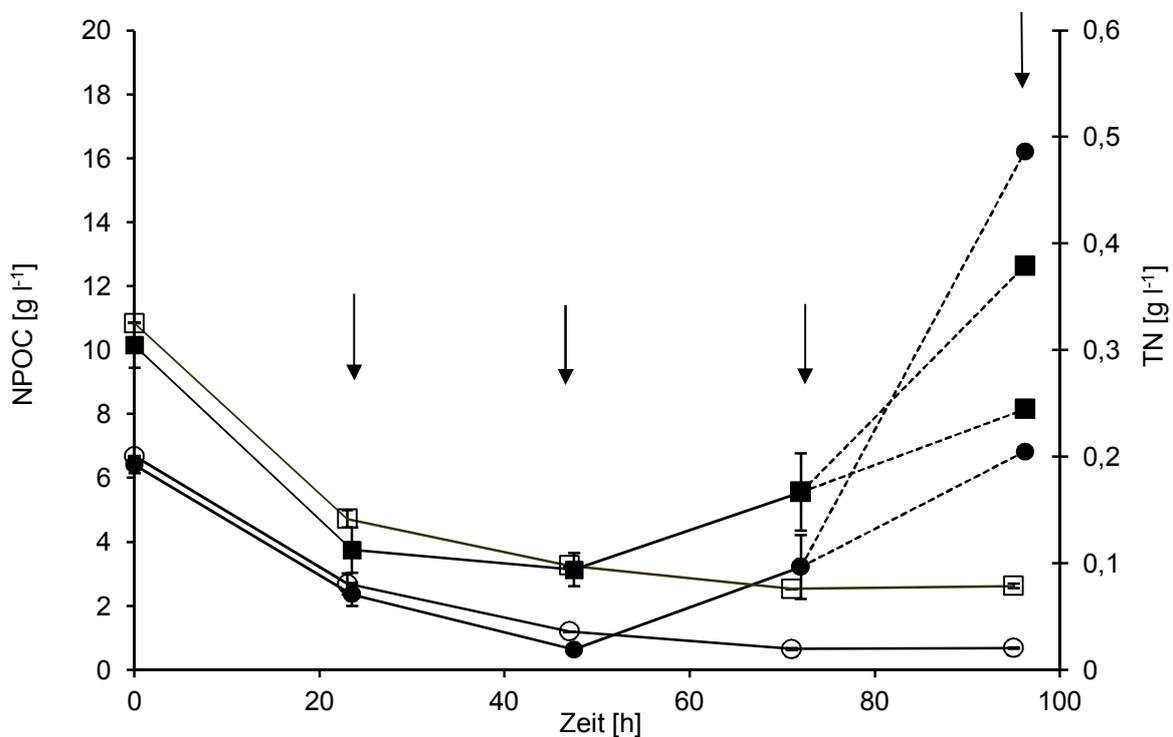


Diagramm 51: Gegenüberstellung Restsubstratanalyse repeated batch (gefüllte Symbole) und batch Kultur (leere Symbole) in Doppelbestimmung (Mittelwerte ± Differenz). NPOC (○●) und TN (■□). Die Pfeile geben die Zeitpunkte der Medienergänzung an, Strichlinien zeigen zwei parallele Kulturen an, die ab 72 h mit unterschiedlich konzentriertem Medium supplementiert wurden

Es hat sich gezeigt, dass sich das Wachstumsverhalten von Kulturen im repeated Batchprozess, deren hinzugefügte Medienkonzentration genauso hoch war wie die entfernte, einer Batchkultur gleichen, da die hinzugefügte Nährstoffkonzentration zu gering ist, um den Ansprüchen der wachsenden Zellpopulation zu entsprechen. Diagramm 52 zeigt zudem, dass es keinen Unterschied zwischen einer Kultivierung in 2000 ml und 500 ml Kolben gibt.

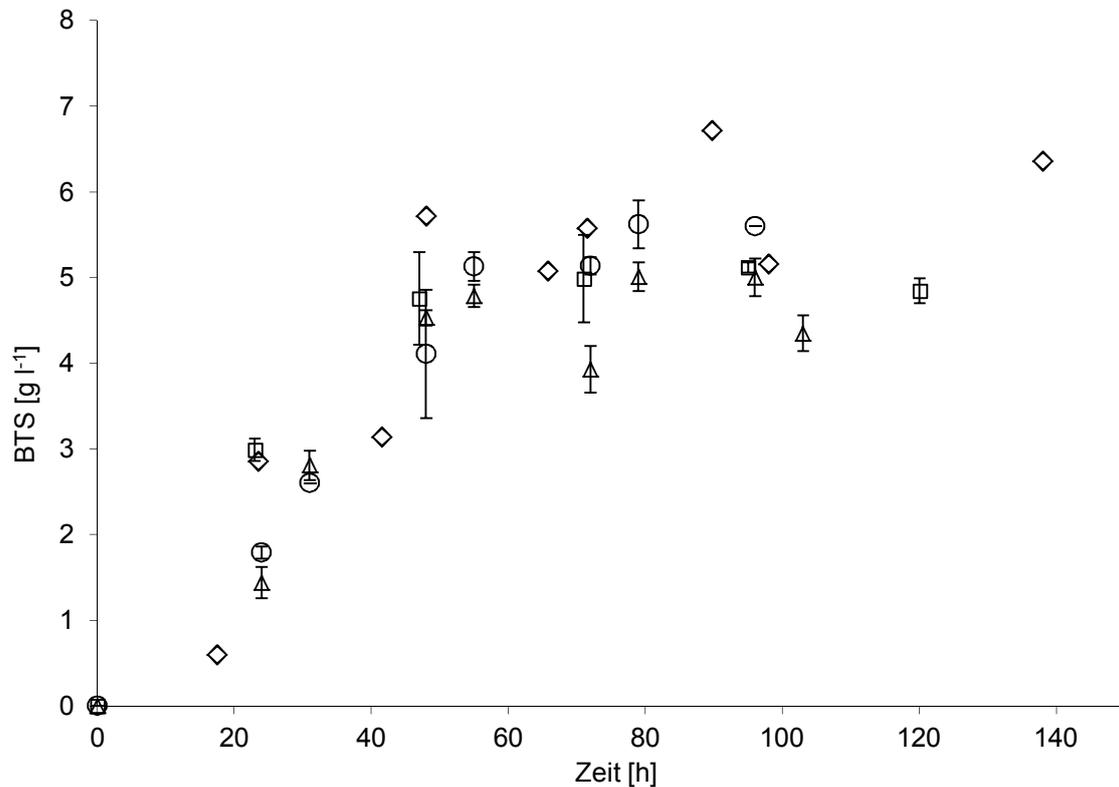


Diagramm 52: Wachstumskurve von *A. limacinum* in Batchkultur (2 l Kolben: Δ, 500 ml: □) und repeated Batchkultur mit unveränderter Medienkonzentration (2 l Kolben: ○, 500 ml: ◇).

Das Wachstumsverhalten in Kulturen, die mit 0,1 mM MJA bzw. DMSO behandelt wurden, unterscheidet sich nicht offensichtlich von Kulturen ohne Enzymverstärker. Dies gilt für Kultivierungsverfahren im Batchbetrieb und repeated Batch-Kulturen gleichermaßen. Allerdings schwanken die BTS-Werte von Kulturen im repeated batch Verfahren, wie auch in Diagramm 53 zu erkennen ist. Dies kann durch Messfehler entstanden sein oder durch die Verdünnung des Kulturmediums bei Zugabe des neuen Mediums.

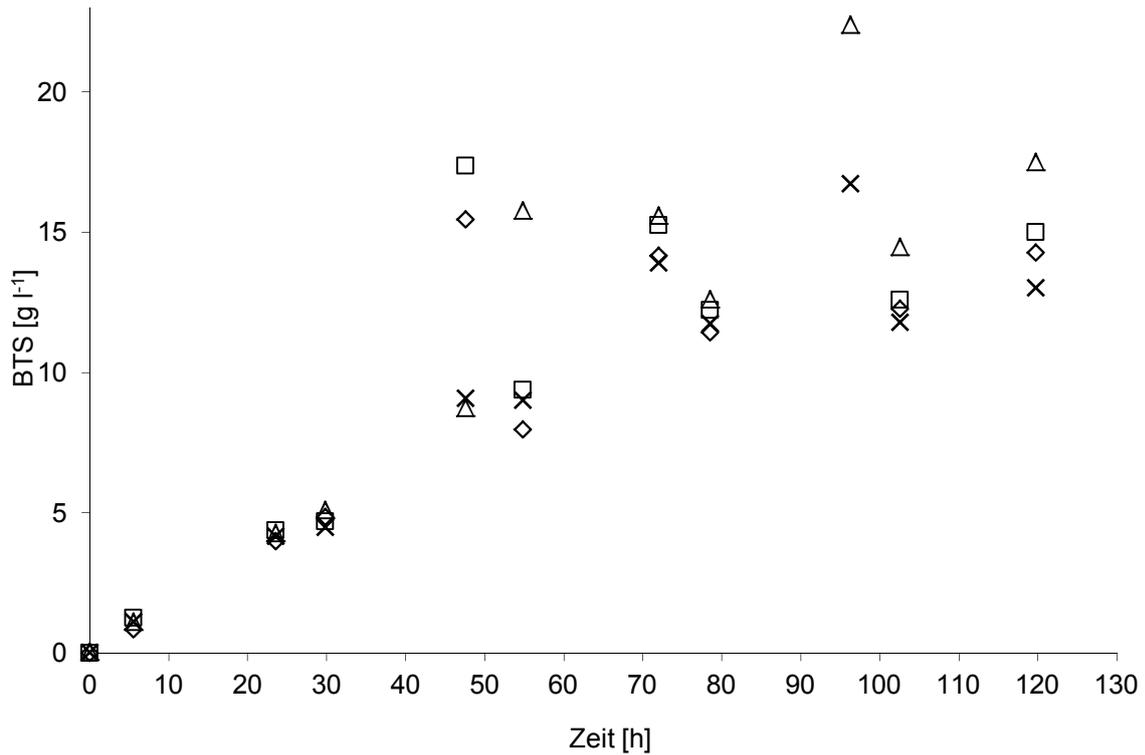


Diagramm 53: repeated batch mit MJA (□;◇; Doppelbestimmung) und ohne MJA (Δ; x mit höherer Stickstoffkonzentration zu Beginn)

5.4.2 Biomassewachstum im Fermenter

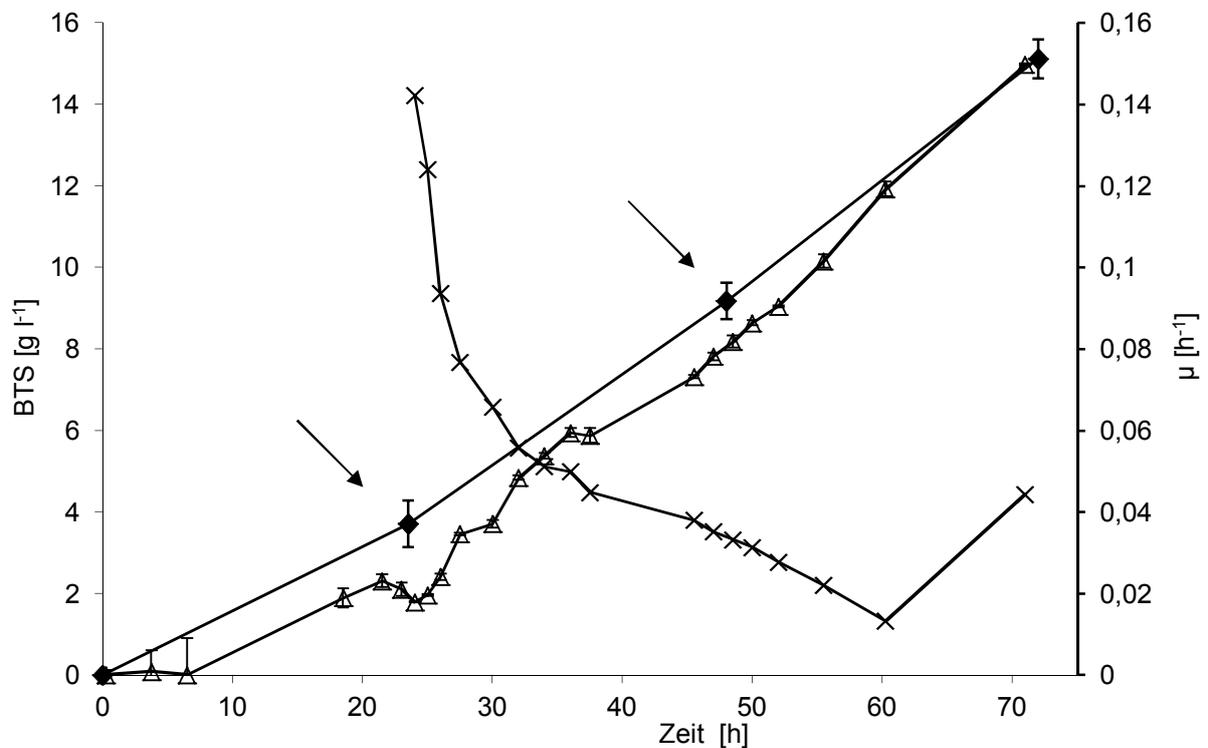


Diagramm 54: BTS-Konzentration repeated batch (◆) und Fed-Batch Fermentation (Δ), sowie μ der Fed-Batch Fermentation (x) Pfeile zeigen Medienwechsel an

Wird die BTS-Entwicklung der repeated batch Kultur der der Fed-Batch Fermentation gegenübergestellt, zeigt sich deutlich, dass sich die zwei Prozesse sehr ähnlich sind. Die gesamte maximale Biomasse (X) im Reaktor beträgt 104,7 g nach 71 Stunden, was einer Konzentration von circa 15 g l⁻¹ entspricht.

Die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{\max} während der Batch Phase der Fed-Batch Fermentation liegt bei 0,14 h⁻¹, μ_{\max} der ersten Feed-Phase von 37 – 52 h, mit einem eingestellten theoretischen μ von 0,07 h⁻¹ betrug 0,045 h⁻¹. μ_{\max} des letzten Fermentationsabschnittes von Stunde 52 – Kultivationsende nach 71 Stunden lag bei 0,044 h⁻¹. Beide Werte für μ_{\max} während der Feed-Phase liegen unterhalb der festgelegten Werte.

Diese Werte stimmen auch mit einer auf 3 % glukosehaltigem Medium wachsenden *A. mangrovei* Kultur überein, die ein μ von 0,077 h⁻¹ erzielte (Fan et al., 2010). In Batchversuchen im Bioreaktor wurden mit 2 % Glukose bis zu 8,29 ± 0,39 g l⁻¹ Biomasse mit einer maximalen spezifischen Wachstumsrate von 0,20 ± 0,02 h⁻¹ erreicht (Rappel, 2013).

5.5 Squalengehalt

Wird der Squalengehalt im repeated Batch Modus mit gleichbleibender und steigender Medienkonzentration verglichen, ist deutlich zu sehen, dass nährstofflimitierte Kulturen durchschnittlich kürzer und weniger Squalen produzieren (Diagramm 55).

Dieses Ergebnis stimmt auch für Kulturen, die in 2 l Kolben gezüchtet wurden. Obwohl die Kultivationsdauer mehr als 14 Tage betrug, konnte ein qualitativer Nachweis von Squalen mittels GC-MS nur in den ersten 72 Stunden in der Batch und repeated Batch Kultur erbracht werden.

Der höchste Squalengehalt ist in Kultur SP nach einer Kultivationsdauer von circa einem Tag zu sehen. Diese Kultur wurde im repeated Batch Modus kultiviert und enthielt mehr YEP im Anfangsmedium als die anderen, beschriebenen Kulturen. Dieses Ergebnis ist allerdings das Resultat einer Einfachbestimmung und somit nicht statistisch abgesichert.

Der Squalengehalt in der vorliegenden Arbeit schwankt von Experiment zu Experiment und bewegt sich im Bereich bis 4,73 mg Squalen g⁻¹ Biotrockenmasse.

Die Werte sind mit Angaben aus anderen Veröffentlichungen vergleichbar, die über einen Squalengehalt in *Aurantiochytrium* zwischen 0,1 und 0,72 mg g⁻¹ berichten (Li et al., 2009, Chen et al., 2010, Fan et al., 2010).

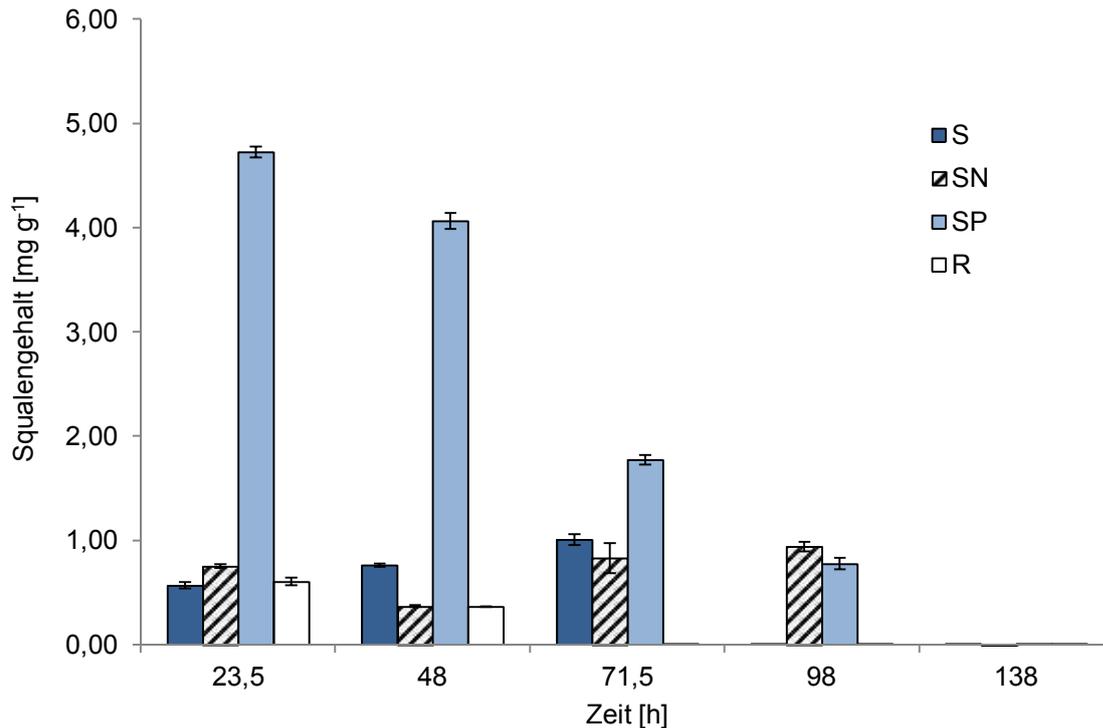


Diagramm 55: Squalengehalt in repeated Batch-Kultivierung. R: Medientausch ohne Veränderung der Nährstoffkonzentration, S/SN: angepasste Medienkonzentration, SP: erhöhte YEP-Konzentration im Anfangsmedium. Mittelwerte der FID-Messungen \pm Standardabweichung

Die höchsten bisher publizierten Resultate von 198 mg Squalen pro g BTS eines marinen Protisten stammen von *Aurantiochytrium* 18W-13a. Dies entspricht einer Konzentration von $1,29 \pm 0,13$ g Squalen l^{-1} am vierten Tag nach Kultivationsbeginn auf 2-prozentigem Glukosemedium. Bei Kultivierung auf Medien mit höherem Glukosegehalt wurde in *A.* 18W-13a- sowie in *A. mangrovei*-Kulturen eine Abnahme des Squalengehaltes beobachtet (Fan et al., 2010, Kaya et al., 2011).

Bei der Untersuchung der Squalenproduktion in Hefen konnte generell ein geringer Gehalt unter $0,43$ mg g^{-1} festgestellt werden. Eine Ausnahme bildet *Pseudozyma* sp. mit einem Squalengehalt von $70,32$ mg g^{-1} (Chang et al., 2008). Ein genetisch veränderter *S. cerevisiae* Stamm, dem ein zusätzliches HMG2-Gen eingeschleust wurde, akkumulierte $18,3$ mg Squalen pro g Biomasse während der exponentiellen Wachstumsphase, 20 mal mehr als der Wildtyp (Mantzouridou and Tsimidou, 2010).

Bei Kultivierung von *A. limacinum* mit Licht wurde eine Orangefärbung der Zellen nach circa 48 Stunden beobachtet. Dies könnte auf eine Produktion von β -Karotin oder anderen Pigmenten hinweisen. Aki et al., (2003) berichteten über die Fähigkeit von Thraustochytriden auch β -Karotin zu produzieren.

5.5.1 Squalenproduktionsdauer

Versuch D (siehe Seite 58) sollte dazu dienen, die Squalenproduktionsdauer in 2 % Glukosemedium zu bestimmen. Die Analyse des Squalengehaltes mittels GC-FID verlief nach 48 und 72 Stunden positiv. Allerdings wurde nur in jeweils einer der Doppelbestimmungen Squalen gefunden. Der Squalengehalt nach 30 Stunden lag bei 0,49 mg Squalen g⁻¹ Biotrockenmasse. Nach 72 Stunden erniedrigte sich der Wert um circa 80 % auf 0,1 mg g⁻¹. Die Squalenproduktionsdauer endete in vielen Kulturen nach 98 Stunden und zum Zeitpunkt der Ernte, d.h. 138 Stunden nach Inokulation, konnte in keinem Kultivationsansatz Squalen nachgewiesen werden. Zudem konnte in vielen Kulturen beobachtet werden, dass der Squalengehalt nach 2-3 Tagen deutlich abnimmt.

Fan et al., (2010) berichten, dass der Squalengehalt einer Kultur weniger von der Glukosekonzentration zu Beginn der Kultivierung sondern mehr vom Alter der Kultur abhängt. Nach einiger Zeit, 24 h -4 Tage nach Inokulation sinkt der Squalengehalt bis zum Zeitpunkt der Ernte, meist nach 5 Tagen, ganz auf null. Diese Ergebnisse konnten auch in anderen Kulturen wie *S. cerevisiae*, *Thraustochytrium* sp. ACEM 6063 und *Torulaspota delbrueckii* nachgewiesen werden (Bhattacharjee et al., 2001, Lewis et al., 2001, Valero et al., 2002).

Es wird angenommen, dass der Squalengehalt mit steigendem Kulturalter durch die schnelle Umwandlung von Squalen zu anderen Verbindungen während der Wachstumsphase sinkt, da Squalen als wichtiges Zwischenprodukt im Sterolaufbauweg in eukaryotischen Mikroorganismen auftritt (Bhattacharjee et al., 2001).

5.5.2 Auswirkungen des Enzymverstärkers MJA

Yue und Jiang, (2009) berichten, dass bei Zugabe des Enzymverstärker MJA zu *A. mangrovei* Batchkulturen in 300 ml Schüttelkolben die Produktion von Squalen um 60 % anstieg und dadurch einen Gehalt von 1,17 mg g⁻¹ erreicht werden konnte.

Ähnliche Werte konnten in der vorliegenden Arbeit mittels repeated batch Kultur erzielt werden, siehe dazu Tabelle 56. Nach 24 Stunden wurden in den mit MJA ergänzten Kulturen 2,28 bzw. 1,68 mg Squalen g⁻¹ BTS erzielt. Dies ist um circa 65 % mehr als die Mittelwerte der beiden Kontrollkulturen zur selben Zeit. Der höchste Squalengehalt in den Ansätzen ohne Squalen betrug 1,01 mg g⁻¹ nach 72 Stunden, bzw. 0.94 mg g⁻¹ nach 96 Stunden.

In Batchkulturen zu denen MJA hinzugefügt wurde, konnte kein Squalen nachgewiesen werden. Nach 71,5 Stunden wurden in der im repeated Batch betriebenen Kultur MJ3 0,24 ± 0,01 mg g⁻¹ Squalen gefunden. Alle anderen Squalenbestimmungen desselben Experimentes, die im Batchbetrieb kultiviert wurden verliefen negativ. Diese Versuche

wurden im repeated Batchmodus wiederholt um auch Nährstofflimitierungen auszuschließen.

Tabelle 56: Squalengehalt in repeated batch Kulturen mit und ohne Enzymverstärker MJA. Jede Spalte steht für eine einzelnen Versuchsansatz (Mittelwert von Squalen in mg g⁻¹ BTS ± Standardabweichung von drei GC-FID-Messungen

Zeit [h]	Repeated batch (ohne MJA)		Repeated batch (mit MJA)	
	Squalen (mg g ⁵¹ BTS)		Squalen (mg g ⁵¹ BTS)	
24	0,57 ± 0,03	0,75 ± 0,02	1,68 ± 0,06	2,18 ± 0,05
48	0,76 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,24 ± 0,01	1,22 ± 0,02
72	1,01 ± 0,05	0,83 ± 0,14	1,45 ± 0,02	1,37 ± 0,01
96	n.n.*	0,94 ± 0,05	0,46 ± 0,05	1,22 ± 0,01

*n.n. nicht nachweisbar

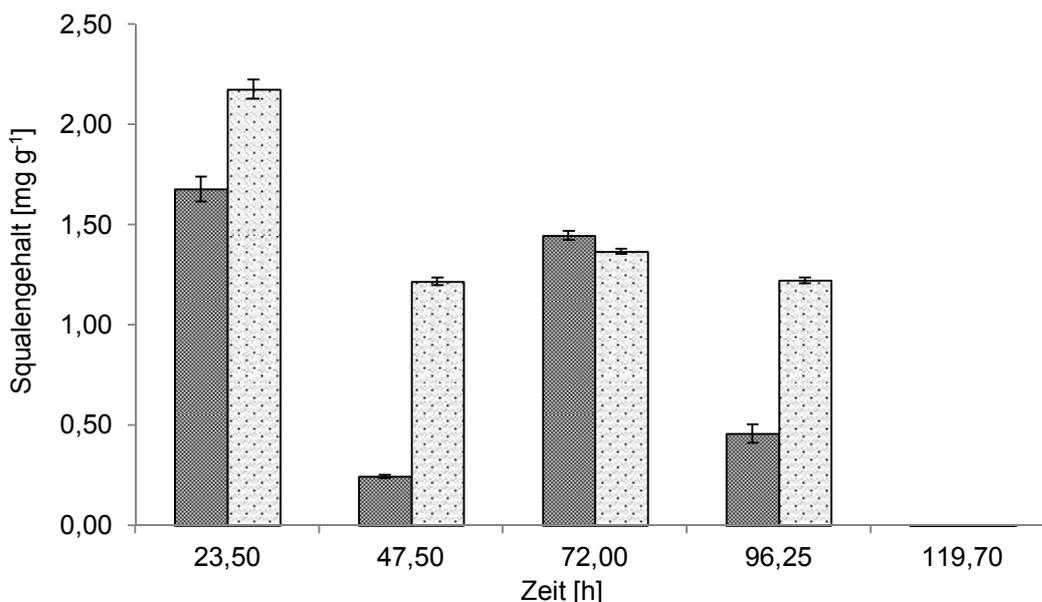


Diagramm 56: Squalengehalt der repeated batch Kulturen MN1 (■) und MN2 (□) mit steigender Medienkonzentration und MJA, Mittelwerte der FID-Messung ± Standardabweichung

Diagramm 56 zeigt die Ergebnisse der Squalenbestimmung der repeated batch Kulturen MN1 und MN2, die nach 24 Stunden mit MJA ergänzt wurden. Obwohl es sich dabei um Parallelkulturen handelt, die die gleiche Behandlung erhielten, ist deutlich zu erkennen, dass der Squalengehalt nicht zu jedem Zeitpunkt derselbe ist. Dies kann auf die kleine Probenmenge (100 mg getrocknetes Zellpellet) zurückzuschließen sein und so die Methodenausführung erschweren oder auf natürliche Schwankungen in der Protistenpopulation zurückgeführt werden. Diese Beobachtung gilt für alle Squalenmessungen dieser Arbeit.

5.5.3 Squalenproduktion im Bioreaktor

Diagramm 57 zeigt den Squalengehalt in mg g^{-1} BTS und die gesamte im Reaktor vorhandene Squalenmenge von 19,7 mg nach 71 Stunden Fed-Batch Fermentation. Pro Stunde werden 0,43 mg Squalen gebildet. Der höchste Squalengehalt von $0,38 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ BTS wurde nach 45,5 und 60,3 h beobachtet.

Im Gegensatz zum Squalengehalt sank die gesamte Menge an akkumuliertem Squalen im Bioreaktor zwischen 60 und 71 Stunden nicht ab. Dieser Effekt ergibt sich möglicherweise durch die Produktion von Squalen in neu generierten, jungen Zellen, die die niedrigere Squalenproduktionsrate älterer Zellen kompensieren und so den Squalenspiegel im Bioreaktor aufrecht halten.

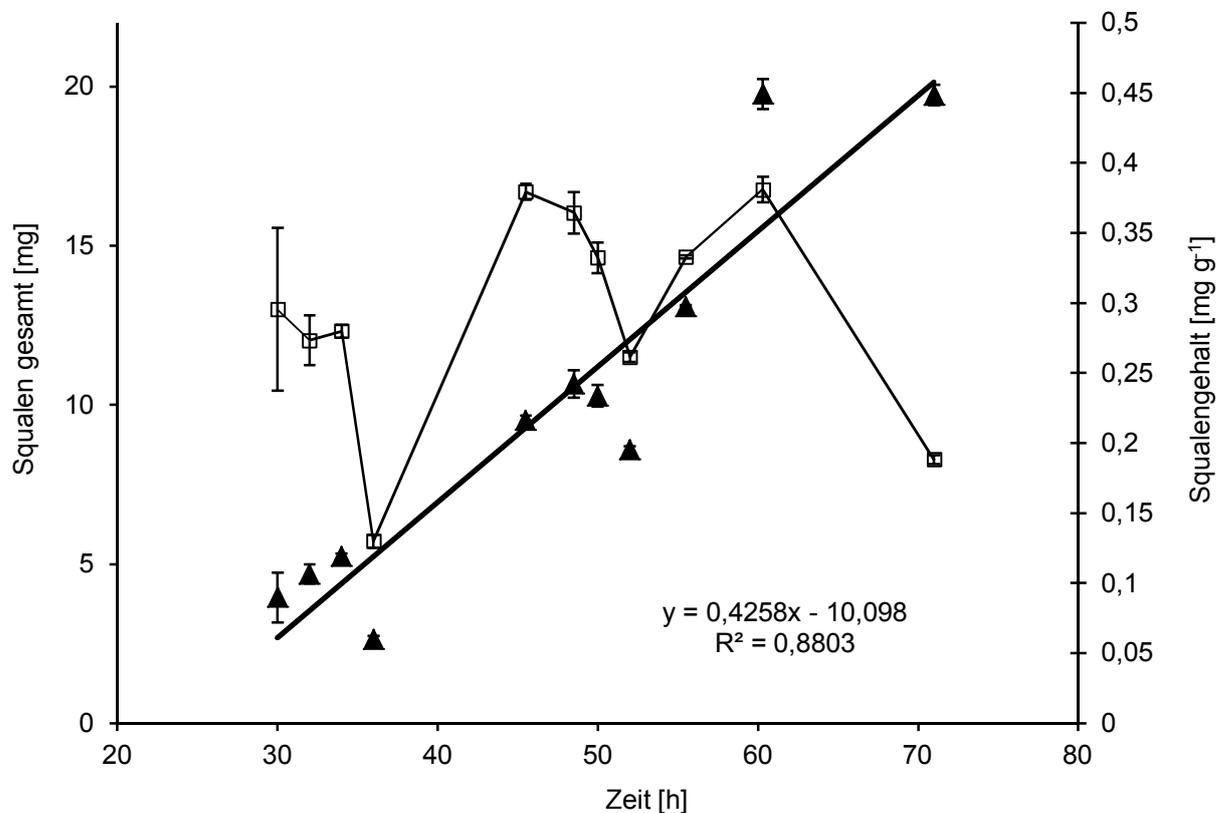


Diagramm 57: Squalengehalt (□) und Akkumulierung von Squalen (▲) im Bioreaktor

5.6 Abschließende Bemerkungen

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass *A. limacinum* Squalen mit bis zu $4,7 \text{ mg g}^{-1}$ anhäuft. Die höchsten Werte treten dabei in repeated batch Kultur in Schüttelkolben auf, wenn im Medium genügend Kohlenstoff und Stickstoff zur Verfügung stehen. Die Squalenwerte überschreiten die einiger vorher publizierten Untersuchungen am selben Organismus, der Stamm kann aber nicht mit *Aurantiochytrium* sp.18W-13a konkurrieren, ein Stamm, der bis zu 189 mg g^{-1} Squalen anhäuft. Eine mögliche Verbesserung der Squalenproduktionsleistung könnte mittels kontinuierlicher Kultivierung gelingen. Dadurch kann die optimale Squalenproduktionsphase ermittelt werden und der Organismus in dieser gehalten werden. Eine andere Möglichkeit, wäre die gentechnische Manipulation und die Steigerung der Squalenausbeute auf molekularem Level durch kontrollierte Einwirkung auf den Stoffwechsel. Dafür müssen aber noch weitere Details über die Funktion bestimmter Gene erforscht werden.

Ein weiterer Ansatzpunkt der Squalenproduktion ist die Aufbereitung des Produktes. Dieses Thema war nicht Gegenstand der Arbeit, es soll trotzdem mit wenigen Worten darauf eingegangen werden. In den beschriebenen Experimenten wurde Squalen mittels Hexan extrahiert. Soll Squalen für den menschlichen oder tierischen Verzehr aufbereitet werden, ist der Einsatz von Hexan teuer und bei eventuellem Vorhandensein von Rückständen gesundheitsgefährlich. Lu et al. (2003) berichten über eine mögliche Extraktionsmethode von Squalen aus Thraustochytriden mittels Gegenstromverteilungschromatographie. Des Weiteren beschreiben Catchpole und Von Kamp, (1997) sowie Owen, (1997) die Extraktion von Squalen aus Haifischleberöl mittels überkritischem Kohlendioxid, wobei hier die Anwendbarkeit und Effizienz an Thraustochytriden noch zu evaluieren wäre.

Offene Fragen ergeben sich aus der Restsubstratanalyse und der pH-Wert-Analyse. Es bleibt zu klären, wieso die im Medium vorhandenen NPOC- und TN-Gehalte nicht auf 0 sanken und aus welchen Substanzen diese nicht verwertbaren Reste bestehen. In Kulturen mit 8 % Glukose fand eine mit der Zeit zunehmende Absenkung des pH-Wertes statt, ein ähnliches Phänomen konnte bei der repeated-batch Kultivierung beobachtet werden. Auch dies ist eine Fragestellung, die den Rahmen der Arbeit sprengt, aber nicht unbeachtet gelassen werden sollte.

6 Zusammenfassung

In den ersten Versuchen wurden das optimale Füllvolumen von 200 ml für 0,5 l Schüttelkolben und eine Glukosekonzentration von 20 g l⁻¹ im Batchbetrieb festgelegt. Die Nährstoffversorgung mit Stickstoff wurde über Hefeextrakt und Pepton aus Kasein (YEP) sowie Ammoniumnitrat gesichert. Dazu wurden Glukosekonzentrationen von 0,5 %, 2 % und 8 % miteinander verglichen und in einem zweiten Versuch Ammoniumnitrat als zusätzliche Stickstoffquelle hinzugegeben.

Im Batchprozess konnte eine Biomassekonzentration von circa 5-6 g l⁻¹ angehäuft werden. Diese Werte konnten auch mit repeated batch Kulturen erzielt werden, die mit Medium mit gleichbleibender Nährstoffkonzentration ergänzt wurden.

Bei periodischen Satzkulturen (= repeated batch) in Schüttelkolben, bei denen eine Ergänzung mit Medium ansteigender Nährstoffkonzentration stattfand, stieg die BTS-Konzentration auf circa 14-16 g l⁻¹. Es konnte genug Probenmaterial angehäuft werden um regelmäßige Squalenbestimmungen durchzuführen.

Die Batch- und repeated Batchversuche in 2 l Kolben unterschieden sich nicht von den Ergebnissen der Kultivierungen in 500 ml Schikanenkolben.

Zur Überprüfung der Sauerstoffversorgung in 500 ml Schüttelkolben wurden die k_La-Werte enzymatisch bestimmt. Sie lagen zwischen 21,6 und 45,3 h⁻¹.

Während der Fed-Batch Fermentation im 10 l Bioreaktor wurden nach einer Kultivierungsdauer von 71 Stunden 104 g Biomasse bzw. circa 15 g l⁻¹ akkumuliert. Dieses Ergebnis kann mit der Kultivierung im repeated Batch-Verfahren verglichen werden.

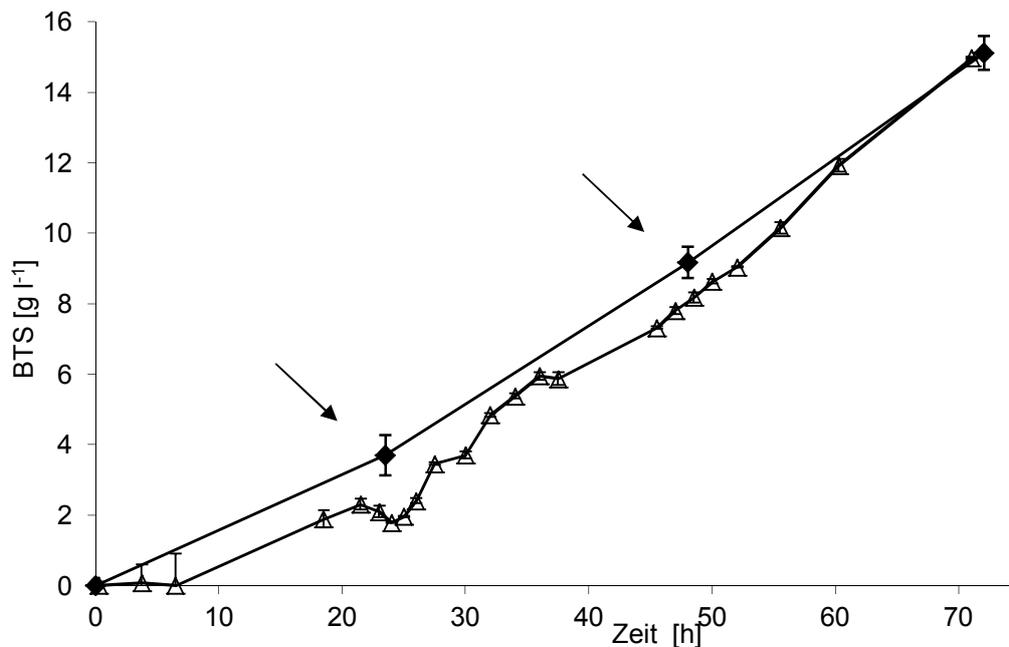


Diagramm 58: BTS-Konzentration repeated batch (◆) und Fed-Batch Fermentation (Δ), (▲)Pfeile zeigen Medienwechsel der repeated batch Kultur an

Die Extraktion von Squalen aus dem getrockneten und verseiften Zellpellet erfolgte mittels n-Hexan. Die Hexanfraktion wurde anschließend mit Hilfe der GC-FID Messung analysiert und der Squalengehalt quantifiziert. Eine vorhergehende Analyse mittels GC-MS musste mit GC-FID ersetzt werden, da die Werte zu sehr streuten.

Der höchste Squalengehalt von 4,73 mg Squalen g⁻¹ Biotrockenmasse wurde in Kultur SP festgestellt. Dabei handelte es sich um eine repeated Batchkultur, die einen Gehalt von 0,4 % YEP im Startmedium besaß.

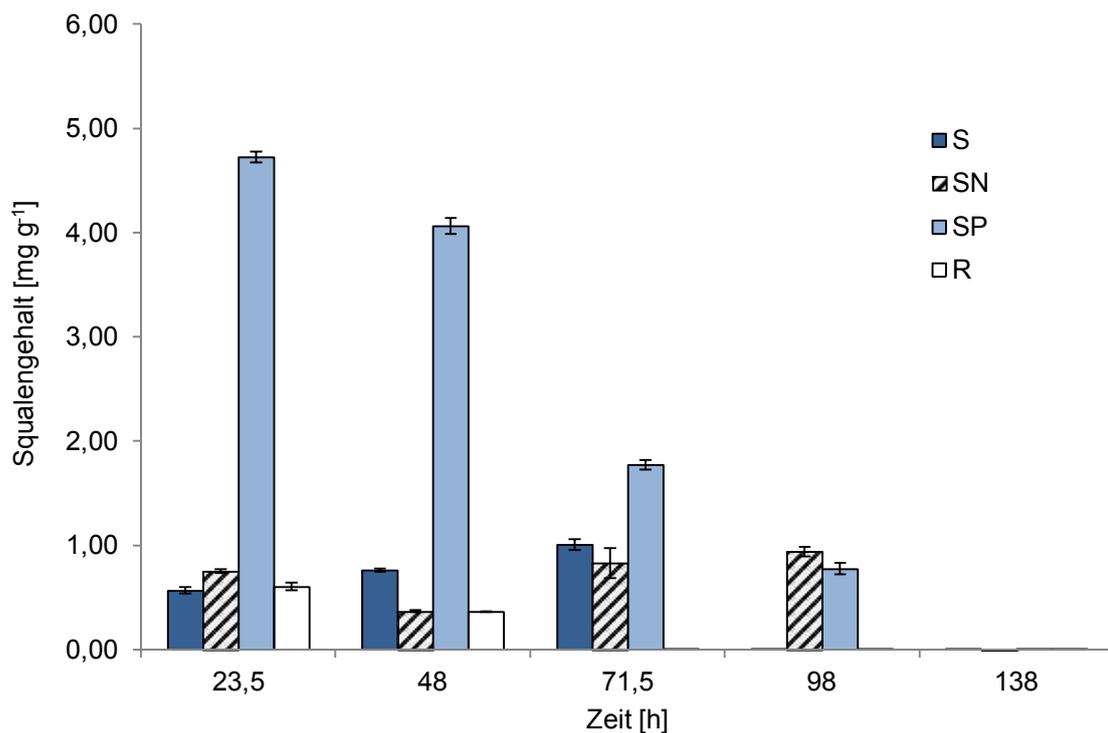


Diagramm 59: Squalengehalt in repeated Batch-Kultivierung. R: Medientausch ohne Veränderung der Nährstoffkonzentration, S/SN: angepasste Medienkonzentration, SP: wie SN aber erhöhte YEP-Konzentration im Startermedium. Mittelwerte der FID-Messungen \pm Standardabweichung

Die Zugabe des Enzymverstärker Methyljasmonat (MJA) erhöhte den Squalengehalt in repeated Batchkulturen gering. Batchkulturen, die mit MJA versetzt wurden, konnten nicht positiv auf Squalen getestet werden.

Tabelle 57: Squalengehalt in repeated batch Kulturen mit und ohne Enzymverstärker MJA. Jede Spalte steht für eine einzelnen Versuchsansatz (Mittelwert von Squalen in mg g^{-1} BTS \pm Standardabweichung von drei GC-FID-Messungen)

Zeit [h]	Repeated batch (ohne MJA)		Repeated batch (mit MJA)	
	Squalen (mg g^{-1} BTS)		Squalen (mg g^{-1} BTS)	
24	$0,57 \pm 0,03$	$0,75 \pm 0,02$	$1,68 \pm 0,06$	$2,18 \pm 0,05$
48	$0,76 \pm 0,01$	$0,37 \pm 0,01$	$0,24 \pm 0,01$	$1,22 \pm 0,02$
72	$1,01 \pm 0,05$	$0,83 \pm 0,14$	$1,45 \pm 0,02$	$1,37 \pm 0,01$
96	n.n.*	$0,94 \pm 0,05$	$0,46 \pm 0,05$	$1,22 \pm 0,01$

*n.n. nicht nachweisbar

Zu den Zeitpunkten von 45,5 und 60,3 Stunden nach Inokulation der Fed-Batch Fermentation konnte ein maximaler Squalengehalt von $0,38 \text{ mg g}^{-1}$ gemessen werden. Die im Reaktor akkumulierte Squalenmenge betrug zu Ende der Fermentation $19,73 \text{ mg}$, die mit einer Produktbildungsrate von $0,43 \text{ mg h}^{-1}$ produziert wurde.

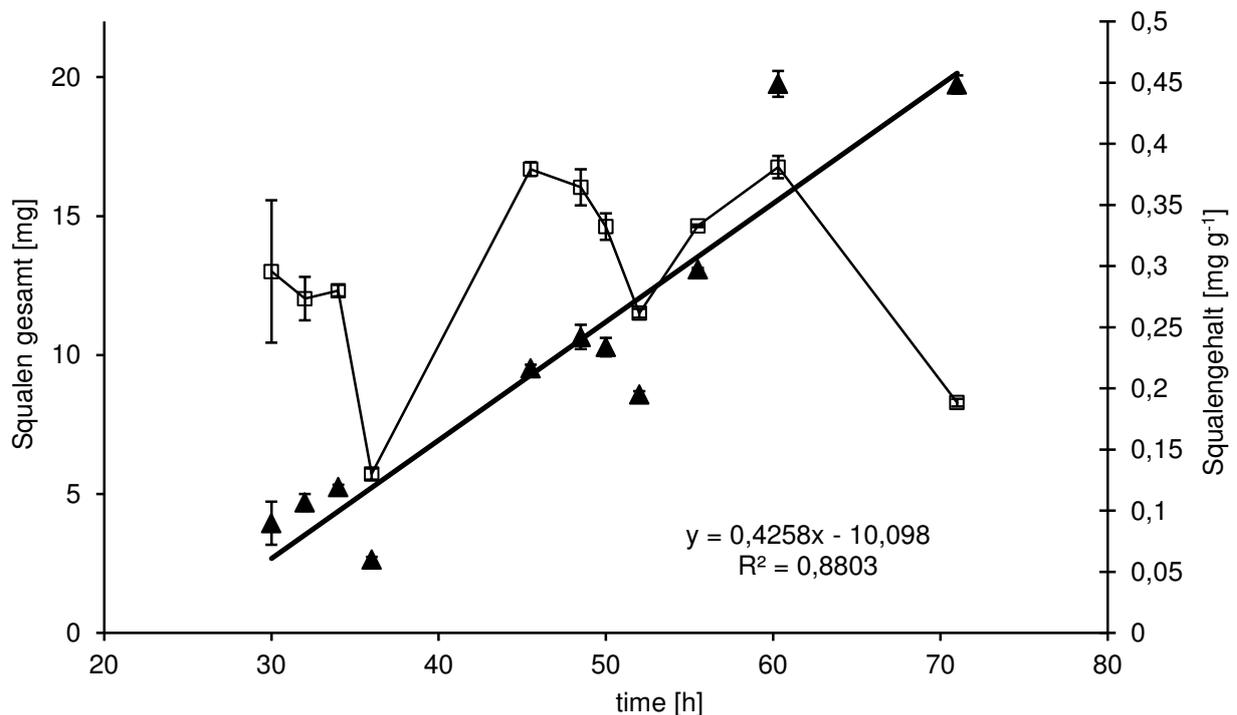


Diagramm 60: Squalengehalt (\square) und Akkumulierung von Squalen (\blacktriangle) im Bioreaktor

Neben der Bestimmung von Biotrockenmasse und Squalengehalt wurde in den Kulturen das Restsubstrat auf NPOC (nichtfreisetzbarer organischer Kohlenstoff) und TN (Gesamtstickstoff) untersucht. Proben der Fed-Batch Fermentation wurden zusätzlich einer Messung der Restglukosekonzentration unterzogen.

7 Literatur

- Adl, Sina M., Alastair G. B. Simpson, Mark A. Farmer, Robert A. Andersen, O. Roger Anderson, John R. Barta, Samuel S. Bowser, G. U. Y. Brugerolle, Robert A. Fensome, Suzanne Fredericq, Timothy Y. James, Sergei Karpov, Paul Kugrens, John Krug, Christopher E. Lane, Louise A. Lewis, Jean Lodge, Denis H. Lynn, David G. Mann, Richard M. McCourt, Leonel Mendoza, ØJvind Moestrup, Sharon E. Mozley-Standridge, Thomas A. Nerad, Carol A. Shearer, Alexey V. Smirnov, Frederick W. Spiegel, and Max F. J. R. Taylor. 'The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists', *Journal of Eukaryotic Microbiology* **Vol. 52, No. 5**, 399-451, 2005.
- Aki, Tsunehiro, Kazutaka Hachida, Megumi Yoshinaga, Yuko Katai, Takashi Yamasaki, Seiji Kawamoto, Toshihide Kakizono, Takashi Maoka, Seiko Shigeta, Osamu Suzuki, and Kazuhisa Ono. 'Thraustochytrid as a Potential Source of Carotenoids', *Journal of the American Oil Chemists' Society* **Vol. 80, No. 8**, 789-794, 2003.
- Alcazar-Fuoli, L., and E. Mellado. 'Ergosterol Biosynthesis in *Aspergillus Fumigatus*: Its Relevance as an Antifungal Target and Role in Antifungal Drug Resistance', *Front Microbiol* **Vol. 3**, 439, 2012.
- Alonso, A., V. Ruiz-Gutierrez, and M. A. Martinez-Gonzalez. 'Monounsaturated Fatty Acids, Olive Oil and Blood Pressure: Epidemiological, Clinical and Experimental Evidence', *Public Health Nutr*, 2006.
- Bakes, Michael J., and Peter D. Nichols. 'Lipid, Fatty Acid and Squalene Composition of Liver Oil from Six Species of Deep-Sea Sharks Collected in Southern Australian Waters', *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **Vol. 110, No. 1**, 267-275, 1995.
- Banerjee, Anirban, Rohit Sharma, Yusuf Chisti, and U. C. Banerjee. '*Botryococcus Braunii*: A Renewable Source of Hydrocarbons and Other Chemicals', *Critical Reviews in Biotechnology* **Vol. 22, No. 3**, 245-279, 2002.
- Bard, M., N. D. Lees, L. S. Burrows, and F. W. Kleinhaus. 'Differences in Crystal Violet Uptake and Cation-Induced Death among Yeast Sterol Mutants', *J Bacteriol* **Vol. 135, No. 3**, 1146-8, 1978.
- Beauchamp, G. K., R. S. Keast, D. Morel, J. Lin, J. Pika, Q. Han, C. H. Lee, A. B. Smith, and P. A. Breslin. 'Phytochemistry: Ibuprofen-Like Activity in Extra-Virgin Olive Oil', *Nature*, 2005.
- Berry, A. M., O. T. Harriott, R. A. Moreau, S. F. Osman, D. R. Benson, and A. D. Jones. 'Hopanoid Lipids Compose the *Frankia* Vesicle Envelope, Presumptive Barrier of Oxygen Diffusion to Nitrogenase', *Proceedings of the National Academy of Sciences* **Vol. 90, No. 13**, 6091-6094, 1993.
- Bhattacharjee, P., V. B. Shukla, R. S. Singhal, and P. R. Kulkarni. 'Studies on Fermentative Production of Squalene', *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **Vol. 17, No. 8**, 811-816, 2001.
- Bonnette, Richard E. 'Gras Exemption Claim for Dha Algal Oil Derived from *Schizochytrium* Sp. As a Source of Dha for Use in Food', In Food and Drug Administration, 2003.
- Boutte, Y., and M. Grebe. 'Cellular Processes Relying on Sterol Function in Plants', *Curr Opin Plant Biol*, 2009.
- Buddhan, S., R. Sivakumar, N. Dhandapani, B. Ganesan, and R. Anandan. 'Protective Effect of Dietary Squalene Supplementation on Mitochondrial Function in Liver of Aged Rats', *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2007.
- Catchpole, O. J., and J. C. Von Kamp. 'Phase Equilibrium for the Extraction of Squalene from Shark Liver Oil Using Supercritical Carbon Dioxide', *Industrial and Engineering Chemistry Research* **Vol. 36, No. 9**, 3762-3768, 1997.
- Cavalier-Smith, T., M. T. E. P. Allsopp, and E. E. Chao. 'Thraustochytrids Are Chromists, Not Fungi: 18s Rna Signatures of Heterokonta', *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **Vol. 346, No. 1318**, 387-397, 1994.

- Chan, P., B. Tomlinson, C. B. Lee, und Y. S. Lee. 'Effectiveness and Safety of Low-Dose Pravastatin and Squalene, Alone and in Combination, in Elderly Patients with Hypercholesterolemia', *J Clin Pharmacol* **Vol. 36, No. 5**, 422-7, 1996.
- Chang, Mi-Hee, Hyeon-Jin Kim, Kwang-Yeop Jahng, und Seong-Chool Hong. 'The Isolation and Characterization of *Pseudozyma* Sp. Jcc 207, a Novel Producer of Squalene', *Applied Microbiology and Biotechnology* **Vol. 78, No. 6**, 963-972, 2008.
- Chen, Feng. 'High Cell Density Culture of Microalgae in Heterotrophic Growth', *Trends in Biotechnology* **Vol. 14, No. 11**, 421-426, 1996.
- Chen, Feng, und Michael R Johns. 'Relationship between Substrate Inhibition and Maintenance Energy of *Chlamydomonas Reinhardtii* in Heterotrophic Culture', *Journal of Applied Phycology* **Vol. 8, No. 1**, 15-19, 1996.
- Chen, Guanqun, King-Wai Fan, Fu-Ping Lu, Qian Li, Tsunehiro Aki, Feng Chen, und Yue Jiang. 'Optimization of Nitrogen Source for Enhanced Production of Squalene from Thraustochytrid *Aurantiochytrium* Sp', *New Biotechnology* **Vol. 27, No. 4**, 382-389, 2010.
- Cho, S., C. W. Choi, D. H. Lee, C. H. Won, S. M. Kim, S. Lee, M. J. Lee, und J. H. Chung. 'High-Dose Squalene Ingestion Increases Type I Procollagen and Decreases Ultraviolet-Induced Dna Damage in Human Skin in Vivo but Is Associated with Transient Adverse Effects', *Clinical and Experimental Dermatology* **Vol. 34, No. 4**, 500-508, 2009.
- Cobon, G. S., und J. M. Haslam. 'The Effect of Altered Membrane Sterol Composition on the Temperature Dependence of Yeast Mitochondrial Atpase', *Biochem Biophys Res Commun*, 1973.
- Das, B., R. Antoon, R. Tsuchida, S. Lotfi, O. Morozova, W. Farhat, D. Malkin, G. Koren, H. Yeger, und S. Baruchel. 'Squalene Selectively Protects Mouse Bone Marrow Progenitors against Cisplatin and Carboplatin-Induced Cytotoxicity in Vivo without Protecting Tumor Growth', *Neoplasia* **Vol. 10, No. 10**, 1105-19, 2008.
- Das, B., H. Yeger, H. Baruchel, M. H. Freedman, G. Koren, und S. Baruchel. 'In Vitro Cytoprotective Activity of Squalene on a Bone Marrow Versus Neuroblastoma Model of Cisplatin-Induced Toxicity. Implications in Cancer Chemotherapy', *Eur J Cancer*, 2003.
- Dessi, M. Assunta, Monica Deiana, Billy W. Day, Antonella Rosa, Sebastiano Banni, und Francesco P. Corongiu. 'Oxidative Stability of Polyunsaturated Fatty Acids: Effect of Squalene', *European Journal of Lipid Science and Technology* **Vol. 104, No. 8**, 506--512, 2002.
- Douglas, Thomas B. 'Heats of Formation of Liquid Methyl Sulfoxide und Crystalline Methyl Sulfone at 18°', *Journal of the American Chemical Society* **Vol. 68, No. 6**, 1072-1076, 1946.
- Fan, King Wai, Tsunehiro Aki, Feng Chen, und Yue Jiang. 'Enhanced Production of Squalene in the Thraustochytrid *Aurantiochytrium Mangrovei* by Medium Optimization and Treatment with Terbinafine', *World J Microbiol Biotechnol*, **No. 26**, 1303-1309, 2010.
- Fox, C. B. 'Squalene Emulsions for Parenteral Vaccine and Drug Delivery', *Molecules*, 2009.
- Ghimire, G. P., H. C. Lee, und J. K. Sohng. 'Improved Squalene Production Via Modulation of the Methylerythritol 4-Phosphate Pathway and Heterologous Expression of Genes from *Streptomyces peucetius* ATCC 27952 in *Escherichia coli*', *Appl Environ Microbiol*, 2009.
- Gilani, A. H., A. U. Khan, A. J. Shah, J. Connor, und Q. Jabeen. 'Blood Pressure Lowering Effect of Olive Is Mediated through Calcium Channel Blockade', *Int J Food Sci Nutr*, 2005.
- Gill, C. I., A. Boyd, E. McDermott, M. McCann, M. Servili, R. Selvaggini, A. Taticchi, S. Esposito, G. Montedoro, H. McGlynn, und I. Rowland. 'Potential Anti-Cancer

- Effects of Virgin Olive Oil Phenols on Colorectal Carcinogenesis Models in Vitro', *Int J Cancer* **Vol. 117, No. 1**, 1-7, 2005.
- Goodrum, J. F., T. S. Earnhardt, N. D. Goines, und T. W. Bouldin. 'Lipid Droplets in Schwann Cells During Tellurium Neuropathy Are Derived from Newly Synthesized Lipid', *J Neurochem* **Vol. 55, No. 6**, 1928-32, 1990.
- Hauß, Thomas, Silvia Dante, Norbert A. Dencher, und Thomas H. Haines. 'Squalene Is in the Midplane of the Lipid Bilayer: Implications for Its Function as a Proton Permeability Barrier', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **Vol. 1556, No. 2-3**, 149-154, 2002.
- He, H. P., Y. Cai, M. Sun, und H. Corke. 'Extraction and Purification of Squalene from Amaranthus Grain', *J Agric Food Chem*, 2002.
- Heinzle, Elmar, 'Gas-Flüssig Stoffübergang in Schüttelkolben - Bestimmung Des $k_L a$ - Wertes', Universität des Saarlandes, http://www.uni-saarland.de/fak8/heinzle/de/teaching/Technische_Chemie_Prakt/H1- kla_shakeflask.pdf Zugriff am 12. Juli 2012.
- Hidaka, Y., H. Hotta, Y. Nagata, Y. Iwasawa, M. Horie, und T. Kamei. 'Effect of a Novel Squalene Epoxidase Inhibitor, Nb-598, on the Regulation of Cholesterol Metabolism in Hep G2 Cells', *J Biol Chem* **Vol. 266, No. 20**, 13171-7, 1991.
- Honda, Daisuke, Toshihiro Yokochi, Toro Nakahara, Mayumi Erata, und Takanori Higashihara. '*Schizochytrium limacinum* Sp. Nov., a New Thraustochytrid from a Mangrove Area in the West Pacific Ocean', *Mycological Research* **Vol. 102, No. 04**, 439-448, 1998.
- Horbach, Silke, Burkard Neuss, und Hermann Sahm. 'Effect of Azasqualene on Hopanoid Biosynthesis and Ethanol Tolerance of *Zymomonas mobilis*', *FEMS Microbiology Letters* **Vol. 79, No. 2-3**, 347-350, 1991.
- Jandrositz, A., F. Turnowsky, und G. Hogenauer. 'The Gene Encoding Squalene Epoxidase from *Saccharomyces cerevisiae*: Cloning and Characterization', *Gene*, 1991.
- Jeschek, Dominik, 'Kohlenhydratanalyse Mittels HPLC', Universität für Bodenkultur, 2012.
- Jiang, Y., K. W. Fan, R. T. Wong, und F. Chen. 'Fatty Acid Composition and Squalene Content of the Marine Microalga *Schizochytrium mangrovei*', *J Agric Food Chem* **Vol. 52, No. 5**, 1196-200, 2004.
- Kalogeropoulos, N., A. Chiou, E. Gavala, M. Christea, und N. K. Andrikopoulos. 'Nutritional Evaluation and Bioactive Microconstituents (Carotenoids, Tocopherols, Sterols and Squalene) of Raw and Roasted Chicken Fed on Dha-Rich Microalgae', *Food Research International* **Vol. 43, No. 8**, 2006-2013, 2010.
- Kalvodova, L. 'Squalene-Based Oil-in-Water Emulsion Adjuvants Perturb Metabolism of Neutral Lipids and Enhance Lipid Droplet Formation', *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. Published by Elsevier Inc., 2010.
- Kamimura, H., K. Fuchigami, H. Inoue, R. Kodama, und H. Yoshimura. 'Studies on Distribution and Excretion of Squalene in Dogs Administered for 2 Weeks', *Fukuoka Igaku Zasshi* **Vol. 82, No. 5**, 300-4, 1991.
- Kaya, K., A. Nakazawa, H. Matsuura, D. Honda, I. Inouye, und M. M. Watanabe. 'Thraustochytrid *Aurantiochytrium* Sp. 18w-13a Accumulates High Amounts of Squalene', *Biosci Biotechnol Biochem* **Vol. 75, No. 11**, 2246-8, 2011.
- Kelly, Gregory. 'Squalene and Its Potential Clinical Uses', *Alternative Medicine Review*, Thorne Research, Inc., 1999.
- Kim, Y. J., T. W. Kim, H. Chung, I. C. Kwon, H. C. Sung, und S. Y. Jeong. 'The Effects of Serum on the Stability and the Transfection Activity of the Cationic Lipid Emulsion with Various Oils', *Int J Pharm*, 2003.
- Klaunig, J. E., und L. M. Kamendulis. 'The Role of Oxidative Stress in Carcinogenesis', *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **Vol. 44**, 239-67, 2004.
- Kohno, Yoshiyuki, Yoshifumi Egawa, Shingo Itoh, Shin-ichi Nagaoka, Motoji Takahashi, und Kazuo Mukai. 'Kinetic Study of Quenching Reaction of Singlet Oxygen and

- Scavenging Reaction of Free Radical by Squalene in N-Butanol', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **Vol. 1256, No. 1**, 52-56, 1995.
- Konan, University. 'Development of Organisms', Konan Universität, 2003.
<http://kccn.konan-u.ac.jp/bio/syst/pages/2527b5.html> Zugriff am 19. Oktober 2012
- Lees, N. D., M. Bard, M. D. Kemple, R. A. Haak, und F. W. Kleinhans. 'Esr Determination of Membrane Order Parameter in Yeast Sterol Mutants', *Biochim Biophys Acta* **Vol. 553, No. 3**, 469-75, 1979.
- Lees, Norman D., Stephanie L. Lofton, Robin A. Woods, und Martin Bard. 'The Effects of Varied Energy Source and Detergent on the Growth of Sterol Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of General Microbiology* **Vol. 118, No. 1**, 209-214, 1980.
- Lewis, T. E., P. D. Nichols, und T. A. McMeekin. 'Sterol and Squalene Content of a Docosahexaenoic-Acid-Producing Thraustochytrid: Influence of Culture Age, Temperature, and Dissolved Oxygen', *Mar Biotechnol (NY)* **Vol. 3, No. 5**, 439-47, 2001.
- Lewis, Tom E., Peter D. Nichols, und Thomas A. McMeekin. 'The Biotechnological Potential of Thraustochytrids', *Marine Biotechnology* **Vol. 1, No. 6**, 580-587, 1999.
- Li, Q., G. Q. Chen, K. W. Fan, F. P. Lu, T. Aki, und Y. Jiang. 'Screening and Characterization of Squalene-Producing Thraustochytrids from Hong Kong Mangroves', *J Agric Food Chem* **Vol. 57, No. 10**, 4267-72, 2009.
- Li, Shijun, Zhenhua Liang, Cui Wang, Yanping Feng, Xiuli Peng, und Yanzhang Gong. 'Improvement of Reproduction Performance in Aa (+) Meat-Type Male Chicken by Feeding with Squalene', *J. Anim. Vet. Adv* **Vol. 9**, 486-490, 2010.
- Linos, A., V. G. Kaklamani, E. Kaklamani, Y. Koumantaki, E. Giziaki, S. Papazoglou, und C. S. Mantzoros. 'Dietary Factors in Relation to Rheumatoid Arthritis: A Role for Olive Oil and Cooked Vegetables?', *Am J Clin Nutr* **Vol. 70, No. 6**, 1077-82, 1999.
- Liu, Y., X. Xu, D. Bi, X. Wang, X. Zhang, H. Dai, S. Chen, und W. Zhang. 'Influence of Squalene Feeding on Plasma Leptin, Testosterone & Blood Pressure in Rats', *Indian J Med Res* **Vol. 129, No. 2**, 150-3, 2009.
- Lu, H. T., Y. Jiang, und F. Chen. 'Preparative Separation and Purification of Squalene from the Microalga *Thraustochytrium* Atcc 26185 by High-Speed Counter-Current Chromatography', *J Chromatogr A* **Vol. 994, No. 1-2**, 37-43, 2003.
- Malins, D. C., und A. Barone. Glyceryl Ether Metabolism: Regulation of Buoyancy in Dogfish *Squalus acanthias*, 1970.
- Mantzouridou, Fani, und Maria Z. Tsimidou. 'Observations on Squalene Accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* Due to the Manipulation of Hmg2 and Erg6', *FEMS Yeast Research* **Vol. 10, No. 6**, 699-707, 2010.
- Manzi, Pamela, Gianfranco Panfili, Marco Esti, und Laura Pizzoferrato. 'Natural Antioxidants in the Unsaponifiable Fraction of Virgin Olive Oils from Different Cultivars', *Journal of The Science of Food and Agriculture* **Vol. 77**, 115--120, 1998.
- Mauricio, J. C., und J. M. Ortega. 'Influence of Fermentation Conditions on Specific Activity of the Enzymes Alcohol and Aldehyde Dehydrogenase from Yeasts', *Microbios* **Vol. 75, No. 303**, 95-106, 1993.
- Moreau, P., M. A. Hartmann, A. M. Perret, B. Sturbois-Balcerzak, und C. Cassagne. 'Transport of Sterols to the Plasma Membrane of Leek Seedlings', *Plant Physiol* **Vol. 117, No. 3**, 931-7, 1998.
- Morita, E., Y. Kumon, T. Nakahara, S. Kagiwada, und T. Noguchi. 'Docosahexaenoic Acid Production and Lipid-Body Formation in *Schizochytrium limacinum* SR21', *Mar Biotechnol (NY)* **Vol. 8, No. 3**, 319-27, 2006.
- Motawi, T. M., N. A. Sadik, und A. Refaat. 'Cytoprotective Effects of DL-Alpha-Lipoic Acid or Squalene on Cyclophosphamide-Induced Oxidative Injury: An Experimental

- Study on Rat Myocardium, Testicles and Urinary Bladder', *Food Chem Toxicol*, 2010 Elsevier Ltd, 2010.
- Murakoshi, M., H. Nishino, H. Tokuda, A. Iwashima, J. Okuzumi, H. Kitano, und R. Iwasaki. 'Inhibition by Squalene of the Tumor-Promoting Activity of 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate in Mouse-Skin Carcinogenesis', *Int J Cancer* **Vol. 52, No. 6**, 950-2, 1992.
- Nakahara, T., T. Yokochi, T. Higashihara, S. Tanaka, T. Yaguchi, und D. Honda. 'Production of Docosahexaenoic and Docosapentaenoic Acids Byschizochytrium Sp. Isolated from Yap Islands', *Journal of the American Oil Chemists' Society* **Vol. 73, No. 11**, 1421-1426, 1996.
- Nakazawa, A., H. Matsuura, R. Kose, S. Kato, D. Honda, I. Inouye, K. Kaya, und M. M. Watanabe. 'Optimization of Culture Conditions of the Thraustochytrid *Aurantiochytrium* Sp. Strain 18w-13a for Squalene Production', *Bioresour Technol* **Vol. 109**, 287-91, 2012.
- Naziri, Eleni, Fani Mantzouridou, und Maria Z. Tsimidou. 'Squalene Resources and Uses Point to the Potential of Biotechnology', *Lipid Technology* **Vol. 23, No. 12**, 270-273, 2011.
- Newmark, H. L. 'Squalene, Olive Oil, and Cancer Risk. Review and Hypothesis', *Ann N Y Acad Sci* **Vol. 889**, 193-203, 1999.
- Ohkuma, T., K. Otagiri, S. Tanaka, und T. Ikekawa. 'Intensification of Host's Immunity by Squalene in Sarcoma 180 Bearing Icr Mice', *J Pharmacobiodyn* **Vol. 6, No. 2**, 148-51, 1983.
- Ourisson, G., M. Rohmer, und K. Poralla. 'Prokaryotic Hopanoids and Other Polyterpenoid Sterol Surrogates', *Annu Rev Microbiol* **Vol. 41**, 301-33, 1987.
- Owen, J. Catchpole und Jan-Christian von Kamp and John B. Grey. 'Extraction of Squalene from Shark Liver Oil in a Packed Column Using Supercritical Carbon Dioxide', *Industrial & Engineering Chemistry Research* **Vol. 36**, 4318--4324, 1997.
- Owen, R. W., A. Giacosa, W. E. Hull, R. Haubner, G. Wurtele, B. Spiegelhalder, und H. Bartsch. 'Olive-Oil Consumption and Health: The Possible Role of Antioxidants', *Lancet Oncol* **Vol. 1**, 107-12, 2000.
- Poralla, K., G. Muth, und T. Hartner. 'Hopanoids Are Formed During Transition from Substrate to Aerial Hyphae in *Streptomyces coelicolor* A3(2)', *Fems Microbiol Lett*, 2000.
- Porter, David. 'Phylum Labyrinthulomycota', In L. Margulis, J. Corliss, M. Melkonian und C.J. Chapman (Eds.), *Handbook of Protoctista*, 1990.
- Raghukumar, Seshagiri. 'Ecology of the Marine Protists, the Labyrinthulomycetes (Thraustochytrids and Labyrinthulids)', *European Journal of Protistology* **Vol. 38, No. 2**, 127-145, 2002.
- Rao, C., H. L. Newmark, und B. S. Reddy. 'Chemopreventive Effect of Squalene on Colon Cancer', *Carcinogenesis* **Vol. 19**, 287--290, 1998.
- Rappel, Ralf. 'Fermentation of Docosahexanoic Acid by the Thraustochytrid *Aurantiochytrium limacinum* SR 21', Universität für Bodenkultur, 2013.
- Schügerl, Karl, und Wolfgang Sittig. 'Bioreaktoren', In P. Präve, U. Faust, W. Sittig und D.A. Sukatsch (Eds.), *Handbuch Der Biotechnologie*, Oldenbourg, 1994.
- Smith, K. R., und D. M. Thiboutot. 'Thematic Review Series: Skin Lipids. Sebaceous Gland Lipids: Friend or Foe?', *J Lipid Res*, 2008.
- Smith, Theresa J. 'Squalene: Potential Chemopreventive Agent', *Expert Opinion on Investigational Drugs* **Vol. 9, No. 8**, 1841-1848, 2000.
- Song, Xiaojin, Xuecheng Zhang, Nan Guo, Luying Zhu, und Chenghong Kuang. 'Assessment of Marine Thraustochytrid *Schizochytrium limacinum* Ouc88 for Mariculture by Enriched Feeds', *Fisheries Science* **Vol. 73, No. 3**, 565-573, 2007.
- Spanova, Miroslava, und Günther Daum. 'Squalene – Biochemistry, Molecular Biology, Process Biotechnology, and Applications', *European Journal of Lipid Science and Technology* **Vol. 113, No. 11**, 1299-1320, 2011.

- Strandberg, T. E., R. S. Tilvis, und T. A. Miettinen. 'Variations of Hepatic Cholesterol Precursors During Altered Flows of Endogenous and Exogenous Squalene in the Rat', *Biochim Biophys Acta*, 1989.
- . 'Metabolic Variables of Cholesterol During Squalene Feeding in Humans: Comparison with Cholestyramine Treatment', *J Lipid Res* **Vol. 31, No. 9**, 1637-43, 1990.
- Valero, E., C. Millán, und J. M. Ortega. 'Changes in the Lipid Composition of *Saccharomyces Cerevisiae* Race Capensis (G-1) During Alcoholic Fermentation and Flor Film Formation', *LWT - Food Science and Technology* **Vol. 35, No. 7**, 593-599, 2002.
- Wang, Guang, und Tong Wang. 'Characterization of Lipid Components in Two Microalgae for Biofuel Application', *Journal of the American Oil Chemists' Society* **Vol. 89, No. 1**, 135-143, 2012.
- Wang, J. J., K. C. Sung, O. Y. Hu, C. H. Yeh, und J. Y. Fang. 'Submicron Lipid Emulsion as a Drug Delivery System for Nalbuphine and Its Prodrugs', *J Control Release*, 2006.
- Warleta, F., M. Campos, Y. Allouche, C. Sanchez-Quesada, J. Ruiz-Mora, G. Beltran, und J. J. Gaforio. 'Squalene Protects against Oxidative Dna Damage in Mcf10a Human Mammary Epithelial Cells but Not in Mcf7 and Mda-Mb-231 Human Breast Cancer Cells', *Food Chem Toxicol*, 2010 Elsevier Ltd, 2010.
- Welander, Paula V., Ryan C. Hunter, Lichun Zhang, Alex L. Sessions, Roger E. Summons, und Dianne K. Newman. 'Hopanoids Play a Role in Membrane Integrity and Ph Homeostasis in *Rhodopseudomonas palustris* Tie-1', *Journal of Bacteriology* **Vol. 191, No. 19**, 6145-6156, 2009.
- Xu, Ran, Gia C. Fazio, und Seiichi P. T. Matsuda. 'On the Origins of Triterpenoid Skeletal Diversity', *Phytochemistry* **Vol. 65, No. 3**, 261-291, 2004.
- Yokochi, T., D. Honda, T. Higashihara, und T. Nakahara. 'Optimization of Docosahexaenoic Acid Production by *Schizochytrium limacinum* SR21', *Applied Microbiology and Biotechnology* **Vol. 49, No. 1**, 72-76, 1998.
- Yokoyama, Rinka, und Daiske Honda. 'Taxonomic Rearrangement of the Genus *Schizochytrium* Sensu Lato Based on Morphology, Chemotaxonomic Characteristics, and 18s Rrna Gene Phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): Emendation for *Schizochytrium* and Erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* Gen. Nov', *Mycoscience* **Vol. 48, No. 4**, 199-211, 2007.
- Yue, Cai-Jun, und Yue Jiang. 'Impact of Methyl Jasmonate on Squalene Biosynthesis in Microalga *Schizochytrium mangrovei*', *Process Biochemistry* **Vol. 44, No. 8**, 923-927, 2009.
- Zhang, H., W. Williams-Dalson, E. Keshavarz-Moore, und P. A. Shamlou. 'Computational-Fluid-Dynamics (Cfd) Analysis of Mixing and Gas-Liquid Mass Transfer in Shake Flasks', *Biotechnol Appl Biochem*, 2005.

Formeln und Berechnungen

Formel 1: Squalengehalt	34
Formel 2: Squalenmenge P zum Zeitpunkt t	35
Formel 3: Produktbildungsrate	35
Formel 4: BTS-Konzentration x	36
Formel 5: Gesamtbiomasse X.....	36
Formel 6: spezifische Wachstumsrate μ	36
Formel 7: Massenkonzentration ρ	40
Formel 8: k_{La} -Wert	44
Formel 9: Katalasereaktion	44
Formel 10: Oxidation von Glukose durch Glukose-Oxidase	44
Formel 11: Extinktionsdifferenz ΔE_0	44
Formel 12: Extinktionsdifferenz ΔE	45
Formel 13: Glukosekonzentration c_{Glc}	45
Formel 14: Kalibrationsgerade der GC-MS-Messung	48
Formel 15: Kalibrationsgerade der GC-FID-Messung.....	48

Abbildungen

Abbildung 1: Chemische Struktur von Squalen und seiner Vorstufe. A: chemische Struktur von Isopren B-D: verschiedene Squalenstrukturen: B: gestreckte Form, C: gewundene Form, D: „sterol-ähnliche“ Form; aus Spanova und Daum, 2011.....	3
Abbildung 2: Lebenszyklus von <i>Aurantiochytrium limacinum</i> ssp. aus: Konan, 2003.....	10
Abbildung 3: elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Aurantiochytrium limacinum</i> , Dünnschliff durch vegetative Zellen. 52: Querschnitt durch die Zelle umhüllt von der Zellwand. (N) Kern (M) Mitochondrien (V) Vakuole. 53: Mitochondrium mit röhrenförmigen Cristae. 54: vielschichtiger Aufbau der Zellwand (Pfeile). Balkenlänge: 52: 1 μm , 53: 0,1 μm , 54: 0,5 μm . Aus: Honda et al., 1998	11
Abbildung 4: Zellcluster mit ektoplasmischem Netz, rechts oben: Zoospore mit deutlich sichtbaren Flagellen. Aus: Konan, 2003.....	11
Abbildung 5: Phasengrenze mit Konzentrationsgradienten. Links: reale Gradienten; rechts: Gradienten laut Film-Theorie. Aus: Heinzle, 2012.....	97

Tabellen

Tabelle 1: physikalische Eigenschaften von Squalen (Spanova und Daum, 2011)	3
Tabelle 2: Zusammensetzung des Mediums für das Inokulum, 0,5 % Glukose, 0,1 % Hefeextrakt und Pepton aus Kasein, 50 % ASW	17
Tabelle 3: Zusammensetzung für 1 L ASW	20
Tabelle 4: Zusammensetzung Spurenelementestocklösung	20
Tabelle 5: Zusammensetzung des Mediums für das Inokulum, 0,5 % Glukose, 0,1 % Hefeextrakt und Pepton aus Kasein, 50 % ASW	22
Tabelle 6: Zusammensetzung der Medien für die Fed-Batch Fermentation	27
Tabelle 7: Parameter der Methode Squalen_Method_Isotherm_Sim	33
Tabelle 8: Methodenbeschreibung GC-FID	34
Tabelle 9: Daten der Messmethode für die NPOC- und TN-Bestimmung	39
Tabelle 10: Parameter der NPOC-Bestimmung	39
Tabelle 11: Parameter der TN-Bestimmung	39
Tabelle 12: Parameter der Bestimmung mittels HPLC	40
Tabelle 13: Zusammensetzung der Ansätze zur k_La -Wertbestimmung	42
Tabelle 14: Schema der Probenahme für die k_La -Wertbestimmung	43
Tabelle 15: Pipettierschema für die Messung der Extinktionen	43
Tabelle 16: Messwerte der Kalibrationsstandards	48
Tabelle 17: Messwerte der Kalibrationsstandards	48
Tabelle 18: Medienzusammensetzung, Alter und BTS-Konzentration des Inokulums Versuch A-F	49
Tabelle 19: Medienzusammensetzung Versuch G-F	54
Tabelle 20: Medienzusammensetzung Versuch D1-D6	58
Tabelle 21: BTS-Daten für D1-D6	59
Tabelle 22: Ergebnisse der Squalenbestimmung mittels FID	59
Tabelle 23: Ergebnisse der GC-MS Messung, Doppelbestimmung eines Zellextraktes	60
Tabelle 24: Medienzusammensetzung R- repeated batch mit gleichbleibender Konzentration, S- repeated batch mit steigender Konzentration, T- Batchbetrieb	60
Tabelle 25: Zusammensetzung und Zeitpunkte der Medienwechsel von Kultur R und S61	
Tabelle 26: Zusammensetzung von 300 ml Basismedium	61
Tabelle 27: Ergebnisse der Squalenbestimmung für Kultur T- Batchbetrieb	64
Tabelle 28: Ergebnisse der Squalenbestimmung für Kultur R- repeated batch mit gleichbleibender Konzentration	64
Tabelle 29: Ergebnisse der Squalenbestimmung für Kultur S- repeated batch mit steigender Konzentration	65
Tabelle 30: Medienzusammensetzung repeated Batch mit steigender Medienkon- zentration. Kultur SP: 0,4 % YEP im Ausgangsmedium, Kultur SN: 0,1 % YEP	66
Tabelle 31: Zusammensetzung und Zeitpunkte der Medienwechsel repeated Batch mit steigender Medienkonzentration. Kultur SP: 0,4 % YEP im Ausgangsmedium, Kultur SN: 0,1 % YEP	67

Tabelle 32: pH- der repeated batch Kulturen SN- 0,1% YEP und SP- 0,4 % YEP im Anfangsmedium	70
Tabelle 33: Ergebnisse der Squalenbestimmung für Kultur SN- repeated batch mit 0,1% YEP im Anfangsmedium	70
Tabelle 34: Ergebnisse der Squalenbestimmung der repeated batch Kultur SP - 0,4 % YEP zu Beginn.....	71
Tabelle 35: Zusammensetzung und Inokulum von MJ1-Batchkultur mit MJA, MJ2- repeated Batch mit gleichbleibender Konzentration und MJA, MJ3- repeated Batch mit steigender Konzentration und MJA, MJ4- Kontrollkultur mit DMSO	72
Tabelle 36: Zusammensetzung und Zeitpunkte der Medienwechsel von MJ1-Batchkultur mit MJA, MJ2- repeated Batch mit gleichbleibender Konzentration und MJA, MJ3- repeated Batch mit steigender Konzentration und MJA, MJ4- Kontrollkultur mit DMSO	73
Tabelle 37: Ergebnisse der Squalenbestimmung der Kultur MJ1- Batchkultur mit MJA.	75
Tabelle 38: Ergebnisse der Squalenbestimmung der Kultur MJ2- repeated batch mit gleichbleibender Konzentration und MJA	76
Tabelle 39: Ergebnisse der Squalenbestimmung für Kultur MJ3- repeated batch mit steigender Konzentration und MJA	76
Tabelle 40: Ergebnisse der Squalenbestimmung für Kultur MJ4- Batchkultur mit DMSO	76
Tabelle 41: Medienzusammensetzung Versuch MN1, MN2, repeated Batch mit steigender Medienkonzentration und MJA	77
Tabelle 42: Zusammensetzung und Zeitpunkte der Medienwechsel von Kultur MN1 und MN2, repeated Batch mit steigender Medienkonzentration und MJA	78
Tabelle 43 Ergebnisse der Squalengehaltbestimmung der repeated batch Kulturen MN1 mit steigender Medienkonzentration und MJA.....	81
Tabelle 44: Ergebnisse der Squalengehaltbestimmung der repeated batch Kulturen MN2 mit steigender Medienkonzentration und MJA.....	81
Tabelle 45: Medienzusammensetzung für Versuch Vt1-4	83
Tabelle 46: BTS-Daten der Viabilitätskontrolle	83
Tabelle 47: Medienzusammensetzung Batchkultivierung in 2 l Kolben.....	84
Tabelle 48: Zusammensetzung von 300 ml Basismedium.....	87
Tabelle 49: Medienzusammensetzung und Inokulum Versuch M-O	87
Tabelle 50: Fermentationsparameter	91
Tabelle 51: Squalendaten der Fermentation	95
Tabelle 52: Ergebnisse der $k_L a$ -Wertbestimmung.....	99
Tabelle 53: NPOC- und TN- Werte der Batchkulturen ohne zusätzlicher Stickstoffquelle	104
Tabelle 54: NPOC- und TN-Werte der Batchkulturen mit Ammoniumnitrat.....	104
Tabelle 55: $k_L a$ -Werte A-D: 500 ml Schikanenkolben, E: 300 ml Schikanenkolben	105
Tabelle 56: Squalengehalt in repeated batch Kulturen mit und ohne Enzymverstärker MJA. Jede Spalte steht für einen einzelnen Versuchsansatz (Mittelwert von Squalen in mg g^{-1} BTS \pm Standardabweichung von drei GC-FID-Messungen	116

Tabelle 57: Squalengehalt in repeated batch Kulturen mit und ohne Enzymverstärker MJA. Jede Spalte steht für einen einzelnen Versuchsansatz (Mittelwert von Squalen in mg g^{-1} BTS \pm Standardabweichung von drei GC-FID-Messungen 122

Diagramme

Diagramm 1: 0,5 % Glukose, BTS-Konzentration von Kultur A (100 ml Füllvolumen, □) und Kultur B (200 ml Füllvolumen, ○) im Batchbetrieb.....	50
Diagramm 2: 2 % Glukose, BTS-Konzentration von Kultur C (100 ml Füllvolumen, Δ) und Kultur D (200 ml Füllvolumen, ▲) im Batchbetrieb	50
Diagramm 3: 8 % Glukose, BTS-Konzentration von Kultur E (100 ml Füllvolumen, ○) und Kultur F (200 ml Füllvolumen, ●) im Batchbetrieb.....	51
Diagramm 4: NPOC-Konzentration Kulturen A-F, Batchbetrieb mit verschiedenen Glukosekonzentrationen und Füllvolumina. 8 % Glukose: 100 m Füllvolumen: ○; 200 ml: ✕; 2%: 100 ml: Δ; 200 ml: ◇; 0,5 %: 100 ml: □; 200 ml: x	52
Diagramm 5: TN-Konzentration Kulturen A-F; Batchbetrieb mit verschiedenen Glukosekonzentrationen und Füllvolumina. 8 % Glukose: 100 m Füllvolumen: ○; 200 ml: ✕; 2%: 100 ml: Δ; 200 ml: ◇; 0,5 %: 100 ml: □; 200 ml: x.....	52
Diagramm 6: 0,5 % Glukose, BTS-Konzentration von Kultur G (100 ml Füllvolumen, □) und Kultur H (200 ml Füllvolumen, ○) im Batchbetrieb.....	54
Diagramm 7: 2 % Glukose, BTS-Konzentration von Kultur I (100 ml Füllvolumen, Δ) und Kultur J (200 ml Füllvolumen, ◇) im Batchbetrieb.....	55
Diagramm 8: 8 % Glukose, BTS-Konzentration von Kultur K (100 ml Füllvolumen, ○) und Kultur L (200 ml Füllvolumen, ●) im Batchbetrieb	55
Diagramm 9: NPOC-Konzentration Kulturen G-L Batchbetrieb mit verschiedenen Glukosekonzentrationen und Füllvolumina mit zusätzlicher Stickstoffquelle. 8 % Glukose: 100 m Füllvolumen: ○; 200 ml: ✕; 2%: 100 ml: Δ; 200 ml: ◇; 0,5 %: 100 ml: □; 200 ml: x56	
Diagramm 10: TN-Konzentration NPOC-Konzentration Kulturen G-L Batchbetrieb mit verschiedenen Glukosekonzentrationen und Füllvolumina mit zusätzlicher Stickstoffquelle. 8 % Glukose: 100 m Füllvolumen: ○; 200 ml: ✕; 2%: 100 ml: Δ; 200 ml: ◇; 0,5 %: 100 ml: □; 200 ml: x	57
Diagramm 11: BTS-Konzentration der Kulturen R- repeated batch mit gleichbleibender Konzentration (□), S- repeated batch mit steigender Konzentration (■) und T- Batchbetrieb (Δ). Pfeile zeigen Zeitpunkte des Medientausches bei repeated Batchkulturen an	62
Diagramm 12: NPOC-Konzentrationen der Kulturen R- repeated batch mit gleichbleibender Konzentration (□), S- repeated batch mit steigender Konzentration (◇) und T- Batchbetrieb (Δ), Pfeile zeigen Zeitpunkte des Medientausches bei repeated Batchkulturen an	63

Diagramm 13: TN-Konzentrationen der Kulturen R- repeated batch mit gleichbleibender Konzentration (□), S- repeated batch mit steigender Konzentration (◇) und T- Batchbetrieb (Δ) Pfeile zeigen Zeitpunkte des Medientausches bei repeated Batch-kulturen an	63
Diagramm 14: Squalengehalt der Kultur R- repeated batch mit gleichbleibender Medienkonzentration (□), S- repeated batch mit steigender Konzentration (■) Mittelwerte der FID-Messung ± Standardabweichung	65
Diagramm 15: BTS-Konzentrationen der repeated batch Kulturen SN- 0,1% YEP (Δ) und SP- 0,4 % YEP im Anfangsmedium (◇), Pfeile zeigen Zeitpunkte der Medienwechsel an	68
Diagramm 16: NPOC- Konzentrationen der repeated batch Kulturen SN- 0,1% YEP zu Beginn (Δ) und SP- 0,4 % YEP im Anfangsmedium (◇), Pfeile zeigen Zeitpunkte der Medienwechsel an	68
Diagramm 17: TN- Konzentrationen der repeated batch Kulturen SN- 0,1% YEP zu Beginn (Δ) und SP- 0,4 % YEP im Anfangsmedium (◇), Pfeile zeigen Zeitpunkte der Medienwechsel an	69
Diagramm 18: pH-Werte für Kultur SN (Δ) und SP(◇).....	70
Diagramm 19: Squalengehalte der repeated batch Kulturen SN- 0,1% YEP und SP- 0,4 % YEP im Anfangsmedium, Mittelwerte der FID-Messung ± Standardabweichung.....	71
Diagramm 20: BTS-Konzentrationen der Kulturen MJ1- Batchkultur mit MJA (□), MJ2- repeated batch mit gleichbleibender Konz. und MJA (x), MJ3- repeated batch mit steigender Konzentration und MJA (Δ), MJ4- Batchkultur mit DMSO (◇), Pfeile zeigen Zeitpunkte der Medienwechsel an.....	73
Diagramm 21: NPOC-Konzentrationen der Kulturen MJ1- Batchkultur mit MJA (□), MJ2- repeated batch mit gleichbleibender Konz. und MJA (x), MJ3- repeated batch mit steigender Konzentration und MJA (Δ), MJ4- Batchkultur mit DMSO (◇), Pfeile zeigen Zeitpunkte der Medienwechsel an.....	74
Diagramm 22: TN-Konzentrationen der Kulturen MJ1- Batchkultur mit MJA (□), MJ2- repeated batch mit gleichbleibender Konz. und MJA (x), MJ3- repeated batch mit steigender Konzentration und MJA (Δ), MJ4- Batchkultur mit DMSO (◇), Pfeile zeigen Zeitpunkte der Medienwechsel an.....	75
Diagramm 23: BTS-Konzentrationen der repeated batch Kulturen MN1 (□) und MN2 (◇) mit steigender Medienkonzentration und MJA, Pfeile zeigen Zeitpunkte der Medienwechsel an	79
Diagramm 24: NPOC- Konzentrationen der repeated batch Kulturen MN1 (□) und MN2 (◇) mit steigender Medienkonzentration und MJA, Pfeile zeigen Zeitpunkte der Medienwechsel an	79
Diagramm 25 TN- Konzentrationen der der repeated batch Kulturen MN1 (□) und MN2 (◇) mit steigender Medienkonzentration und MJA, Pfeile zeigen Zeitpunkte der Medienwechsel an	80
Diagramm 26: pH-Werte der repeated batch Kulturen MN1 (□) und MN2 (◇) mit steigender Medienkonzentration und MJA	80

Diagramm 27: Squalengehalt der repeated batch Kulturen MN1 (■) und MN2 (□) mit steigender Medienkonzentration und MJA, Mittelwerte der FID-Messung \pm Standardabweichung	82
Diagramm 28: BTS-Konzentrationen der Batchkulturen A ohne Licht (□) und B mit Licht (◇) in 2 l-Kolben	84
Diagramm 29: NPOC-Konzentrationen der Batchkulturen A ohne Licht (□) und B mit Licht (◇) in 2 l-Kolben.....	85
Diagramm 30: TN-Konzentrationen der Batchkulturen A ohne Licht (□) und B mit Licht (◇) in 2 l-Kolben	86
Diagramm 31: BTS-Daten der Kulturen M- Batchbetrieb (□), N- Batchbetrieb mit Entnahme von 40 ml d ⁻¹ (◇), O- repeated batch mit gleichbleibender Konzentration (x) in Doppelbestimmungen	88
Diagramm 32: NPOC-Konzentration der Kulturen M- Batchbetrieb (□), N- Batchbetrieb mit Entnahme von 40 ml d ⁻¹ (◇), O- repeated batch mit gleichbleibender Konzentration (x)	88
Diagramm 33: TN-Konzentration Konzentration der Kulturen M- Batchbetrieb (□), N- Batchbetrieb mit Entnahme von 40 ml d ⁻¹ (◇), O- repeated batch mit gleichbleibender Konzentration (x)	89
Diagramm 34: Gesamtbiomasse X (□) und BTS-Konzentration (■) der Fed-Batch Fermentation, Doppelbestimmungen	92
Diagramm 35: Reaktorvolumen während der Fed-Batch Fermentation	93
Diagramm 36: NPOC-Konzentration der Fed-Batch Fermentation	93
Diagramm 37: Glukosewerte der Fed-Batch Fermentation	94
Diagramm 38: TN-Konzentration der Fed-Batch Fermentation.....	94
Diagramm 39: Squalengehalt (dreifache GC-FID Messung \pm Standardabweichung, Balken) und BTS-Konzentration der Fed-Batch Fermentation (Mittelwerte \pm Differenz, Linie)	96
Diagramm 40: Squalengehalt (□) und Akkumulierung von Squalen (▲) im Bioreaktor ..	96
Diagramm 41: enzymatischer Glukoseverbrauch in Schüttelkolben	98
Diagramm 42 BTS-Konzentrationen der Batchkulturen ohne zusätzlicher Stickstoffquelle. 0,5 % Glukose 100 ml Füllvolumen (□) 200 ml (x), 2 % Glukose 100 ml (Δ) 200 ml (◇), 8 % Glukose 100 ml (○) 200 ml (X)	103
Diagramm 43: BTS-Konzentrationen der Batchkulturen mit zusätzlicher Stickstoffquelle. 0,5 % Glukose 100 ml Füllvolumen (□) 200 ml (x), 2 % Glukose 100 ml (Δ) 200 ml (◇), 8 % Glukose 100 ml (○) 200 ml (X)	103
Diagramm 44: Gegenüberstellung der BTS- und TN-Konzentrationen von Batchkulturen mit 2 % Glukose und Zugabe von Ammoniumnitrat bei 200 ml Füllvolumen. ohne Ammoniumnitrat (BTS: ◇, TN: Δ) und mit (BTS:○, TN: □).....	104
Diagramm 45: Batchversuch, 8 % Glukose. BTS (●), NPOC- (○) und TN-Gehalt (Δ), NPOC-Messwert bei 96 Stunden wurde als Ausreißer identifiziert und nicht dargestellt	106
Diagramm 46: Batchversuch, 2 % Glukose. BTS (▲), NPOC- (○) und TN-Gehalt (Δ) .	106

Diagramm 47: Batchversuch, 0,5 % Glukose. BTS (■), NPOC- (○) und TN-Gehalt (Δ)	107
Diagramm 48: NPOC-Konzentration, Batchbetrieb mit 8 % Glukose und verschiedenen Füllvolumina ohne zusätzlicher Stickstoffquelle. 100 ml Füllvolumen: ○; 200 ml Füllvolumen: ✕	108
Diagramm 49: NPOC-Konzentration Batchbetrieb mit 8 % Glukose und verschiedenen Füllvolumina mit zusätzlicher Stickstoffquelle. 8 % Glukose: 100 ml Füllvolumen: ○; 200 ml: ✕	109
Diagramm 50: Gegenüberstellung Biotrockenmassekonzentration repeated batch (◆) und batch Kultur (◇) in Doppelbestimmung (Mittelwerte ± Differenz). Die Pfeile geben die Zeitpunkte der Medienergänzung an, Strichlinien zeigen zwei parallele Kulturen an, die aber ab 72 h mit unterschiedlich konzentriertem Medium supplementiert wurden	110
Diagramm 51: Gegenüberstellung Restsubstratanalyse repeated batch (gefüllte Symbole) und batch Kultur (leere Symbole) in Doppelbestimmung (Mittelwerte ± Differenz). NPOC (○●) und TN (■□). Die Pfeile geben die Zeitpunkte der Medienergänzung an, Strichlinien zeigen zwei parallele Kulturen an, die ab 72 h mit unterschiedlich konzentriertem Medium supplementiert wurden	110
Diagramm 52: Wachstumskurve von <i>A. limacinum</i> in Batchkultur (2 l Kolben: Δ, 500 ml: □) und repeated Batchkultur mit unveränderter Medienkonzentration (2 l Kolben: ○ 500 ml: ◇)	111
Diagramm 53: repeated batch mit MJA (□;◇; Doppelbestimmung) und ohne MJA (Δ; x mit höherer Stickstoffkonzentration zu Beginn)	112
Diagramm 54: BTS-Konzentration repeated batch (◆) und Fed-Batch Fermentation (Δ), sowie μ der Fed-Batch Fermentation (x) Pfeile zeigen Medienwechsel an	112
Diagramm 55: Squalengehalt in repeated Batch-Kultivierung. R: Medientausch ohne Veränderung der Nährstoffkonzentration, S/SN: angepasste Medienkonzentration, SP: erhöhte YEP-Konzentration im Anfangsmedium. Mittelwerte der FID-Messungen ± Standardabweichung	114
Diagramm 56: Squalengehalt der repeated batch Kulturen MN1 (■) und MN2 (□) mit steigender Medienkonzentration und MJA, Mittelwerte der FID-Messung ± Standardabweichung	116
Diagramm 57: Squalengehalt (□) und Akkumulierung von Squalen (▲) im Bioreaktor	117
Diagramm 58: BTS-Konzentration repeated batch (◆) und Fed-Batch Fermentation (Δ), (▲) Pfeile zeigen Medienwechsel der repeated batch Kultur an	120
Diagramm 59: Squalengehalt in repeated Batch-Kultivierung. R: Medientausch ohne Veränderung der Nährstoffkonzentration, S/SN: angepasste Medienkonzentration, SP: wie SN aber erhöhte YEP-Konzentration im Startermedium. Mittelwerte der FID-Messungen ± Standardabweichung	121
Diagramm 60: Squalengehalt (□) und Akkumulierung von Squalen (▲) im Bioreaktor	122