

Optimierung der Produktion von Squalen in *Aurantiochytrium limacinum* SR21 mittels statistischer Versuchsplanung

MASTERARBEIT

Eingereicht von Martin Schott, Bakk. techn.

Betreuer: ao. Univ. Prof. DI Dr. Peter Holubar, MBA

Department für Biotechnologie Institut für Angewandte Mikrobiologie

Wien, März 2014

Inhaltsverzeichnis

Iı	nhaltsverze	ichnis	2
D	anksagung		5
Z	usammenfa	ssung	6
1		ng	
		luktionsorganismus Aurantiochytrium limacinum SR21SR21	
		uktionsorganismus Aurantiocnytrium timacinum 3x21ukt Squalen	
	1.2.1	Verwendung von Squalen	
	1.2.1	Produktion von Squalen	
	1.2.2.1	Mevalonatweg (MVA-Weg)	
	1.2.2.2	Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg)	
	1.2.3	Squalen in Säugetieren	
	1.2.4	Squalen in Pflanzen	
	1.2.5	Squalen in Mikroorganismen	
2	Zielsetz	ung	21
3		und Methoden	
		nm	
		ien und Nährstoffquellen	
	3.2.1	Künstliches Meerwasser (Artificial Sea Water – ASW)	
	3.2.2	Stickstoff- und Kohlenstoffquelle	
		ivierungsmethode	
		stische Versuchsplanung (Design of Experiments)	
		chführung der Versuche im Bioreaktor	
	3.5.1	lnokulum	
	3.5.2	Batch - Medium	28
	3.5.3	Vorbereitung der Fermentation	29
	3.5.4	Probenahme während der Fermentation	30
	3.5.5	Dekontamination und Reinigung	31
	3.6 Anal	ytik	31
	3.6.1	Gravimetrische Bestimmung der Biomassetrockensubstanz	31
	3.6.2	Berechnung der Wachstumsparameter	32
	3.6.2.1	Biomassekonzentration	32
	3.6.2.2	Berechnung der Gesamtbiomasse X	32
	3.6.2.3	Berechnung der spezifischen Wachstumsrate μ	
	3.6.3	Nicht-ausblasbarer organischer Kohlenstoff (NPOC) und Gesamtstickstoffgehalt (TN)	
	3.6.3.1	Erstellen der Kalibrationsgerade für TC/NPOC	
	3.6.3.2	Erstellen der Kalibrationsgerade für TN	
	3.6.3.3	Vorbereitung und Messung der Proben	
	3.6.4	Ergebnisse der Kalibration NPOC & TN	
	3.6.5	Bestimmung der Glukose mittels HPLC	
	3.6.5.1	Kalibration	37

	3.6.5.2	Probenvorbereitung und Messung	37
	3.6.6	Squalenbestimmung	37
	3.6.6.1	Gefriertrocknung (Lyophilisation)	37
	3.6.6.2	Squalenextraktion	38
	3.6.6.3	GC-MS Messung	39
4	Versuch	e und Ergebnisse	42
	4.1 Versi	uchsverläufe bei unterschiedlichen Temperaturstufen	42
	4.1.1	Versuche bei 25 °C	42
	4.1.1.1	Biomassewachstum bei 25 °C	42
	4.1.1.2	Squalengehalt bei 25 °C	43
	4.1.2	Versuche bei 22,5 °C	
	4.1.2.1	Biomassewachstum bei 22,5 °C	44
	4.1.2.2	Squalengehalt bei 22,5 °C	
	4.1.3	Versuche bei 20 °C	
	4.1.3.1	Biomassewachstum bei 20 °C	
	4.1.3.2	Squalengehalt bei 20 °C	
		uchsverlauf bei unterschiedlichen pH-Stufen	
	4.2.1	Versuche bei pH 7	
	4.2.1.1	Biomassewachstum bei pH 7	
	4.2.1.2	Squalengehalt bei pH 7	
	4.2.2	Versuche bei pH 6,25	
	4.2.2.1 4.2.2.2	Biomassewachstum bei pH 6,25	
	4.2.2.2	Squalengehalt bei pH 6,25 Versuche bei pH 5,5	
	4.2.3.1	Biomassewachstum bei pH 5,5	
	4.2.3.1	Squalengehalt bei pH 5,5	
		ıchsverlauf bei unterschiedlichen mindest-pO2 Konzentrationen	
	4.3.1	Versuche bei einer mindest-pO ₂ Konzentration von 50 %	
	4.3.1.1	Biomassewachstum bei einer mindest-pO ₂ Konzentration von 50 %	
	4.3.1.2	Squalengehalt bei einer mindest-pO ₂ Konzentration von 50 %	
	4.3.2	Versuche bei einer mindest-pO ₂ Konzentration von 40 %	
	4.3.2.1	Biomassewachstum bei einer mindest-pO ₂ Konzentration von 40 %	
	4.3.2.2	Squalengehalt bei einer mindest-pO ₂ Konzentration von 40 %	
	4.3.3	Versuche bei einer mindest-pO ₂ Konzentration von 30 %	
	4.3.3.1	Biomassewachstum bei einer mindest-pO ₂ Konzentration von 30 %	58
	4.3.3.2	Squalengehalt bei einer mindest-pO ₂ Konzentration von 30 %	59
	4.4 Ausw	vertung Versuchsplan	60
	4.5 Wirk	ungsflächendiagramme	62
5	Diskussi	on	66
		uss der Medienzusammensetzung	
	5.1.1	Kohlenstoffquelle	66
	5.1.2	Stickstoffquelle	67
	5.1.3	ASW Konzentration	
		uss des pH Wertes auf Wachstum und Squalenproduktion	
	5.3 Einfl	uss der mindest-pO2 Konzentration im Medium auf Wachstum und Squalenproduktion	70

5.4	Einfluss der Temperatur	72
5.5	Vergleich mit Daten aus der Literatur	74
5.6	Optimierte Bedingungen der Fermentation von Aurantiochytrium limacinum SR21	77
5.7	Abschließende Bemerkungen	<i>7</i> 9
6 Lit	eratur	80
7 Ab	bildungsverzeichnis	85
8 Ta	bellenverzeichnis	87

Danksagung

Ich danke meinen Eltern Elisabeth und Helmut für die große Unterstützung während meiner Studienzeit. Ohne Sie hätte ich mein Studium wohl nicht abschließen können. Ich bedanke mich besonders für die Geduld mit meinen Tätigkeiten neben dem Studium.

Ich danke meiner lieben Freundin Irina für die Kraft und die Liebe die sie mir immer wieder gibt. Danke für die vielen schönen Stunden und den so unkomplizierten Umgang miteinander, der jede Lebenssituation einfacher macht.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Peter Holubar. Sein Wissen und der lockere Umgang in der Arbeitsgruppe motivierten und inspirierten mich immer wieder. Ich danke insbesondere für die Zurverfügungstellung aller Materialien und Geräte.

Ich danke Jakob, Klemens, Dave und Luce für die Freundschaft und die vielen lustigen Stunden während meiner Studienzeit. Sie haben für Ablenkung vom Stress gesorgt und die Studienzeit in Wien so wunderbar lebenswert gemacht.

Ich danke allen Menschen die ich während meiner ÖH Tätigkeit kennenlernen durfte - ganz besonders jedoch Kilian, Beate, Julie, Christoph, Alf, Paul und Hanno. Aus ÖH KollegInnen sind sehr gute und wichtige FreundInnen geworden. Was wir geschafft haben ist unglaublich und allein die Erinnerung daran gibt unendlich viel Kraft.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Fermentation von Aurantiochytrium limacinum SR21, ein eukaryotischer, heterotropher Meeresorganismus, optimiert. Der Stamm produziert ca. 80 Prozent der gebildeten Fettsäuren als Docosahexaensäure (DHA), wodurch er sich unter anderem von anderen Gattungen der Thraustochytriden unterscheidet. Außerdem ist er in der Lage einen Großteil der Lipide in Squalen umzuwandeln und bietet sich so als alternative Squalenquelle zu der großindustriellen Gewinnung aus Haifischleberöl an. Squalen ist ein triterpener Kohlenwasserstoff, welcher in der Natur weitverbreitet ist. Squalen wird als Wirkverstärker (Adjuvans) in der Medizin, auf Grund der antitumoralen Wirkung als Nahrungsergänzungsmittel, und auch in Komsetika als feuchtigkeitsspendende Substanz verwendet.

Als Kohlenstoffquelle diente in der vorliegenden Arbeit Glukose mit einer Konzentration von 20 g Γ^1 im Batchmedium. Zur Versorgung mit Stickstoff wurde eine Mischung aus Hefeextrakt (8 g Γ^1 im Batchmedium) und Pepton aus Kasein (8 g Γ^1 im Batchmedium) verwendet. Zur effizienten Optimierung der Fermentationsparameter pH-Wert, Temperatur und Mindestprozentanteil von Sauerstoff im Medium (pO₂ Konzentration) wurde mit der Statistiksoftware *JMP* ein statistischer Versuchsplan (Design of Experiments, DoE)mit 16 Versuchsläufen erstellt und abgearbeitet. Als Qualitätsmerkmale wurden die Biomassekonzentration und der Squalengehalt bestimmt und die spezifische Wachstumsrate in der exponentiellen Wachstumsphase berechnet. Die Temperatur variierte von 20 – 25 °C, der pH Wert von 5,5 – 7 und die pO₂ Konzentration von 30 – 50 %. Zur Bestimmung des Squalengehaltes wurde Squalen mit n-Hexan aus einem gefriergetrockneten und verseiften Zellpellet extrahiert und der Squalengehalt in der Hexanfraktion danach mittels GC-MS und einem internen Standard (Octadecan) quantifiziert.

Es zeigte sich, dass insbesondere die Temperatur und die p O_2 Konzentration einen Einfluss auf das Wachstum der Zellen haben. Bei einer Temperatur von 25 °C erfolgte das Wachstum mit spezifischen Wachstumsraten von 0,128 bis 0,281 h⁻¹ und damit deutlich schneller als bei 20 °C (μ von 0,091 bis 0,197 h⁻¹). Auch bei einer hohen p O_2 Konzentration (mindestens 50 %) wuchsen die Zellen schneller, mit Wachstumsraten von 0,154 bis 0,281 h⁻¹, als bei einer kleineren p O_2 Konzentration von mindestens 30 % (μ von 0,091 bis 0,256 h⁻¹).

Bei der Squalenproduktion zeigte sich ein umgekehrter Einfluss der Parameter Temperatur und p O_2 Konzentration als beim Wachstum der Zellen. Bei einer Temperatur von 20 °C lag der Squalengehalt zwischen 0,048 und 0,090 mg Squalen pro g BTS, wohingegen bei 25 °C nur zwischen 0,012 und 0,026 mg Squalen pro g BTS gemessen werden konnten. In der vorliegenden Arbeit konnte kein vergleichbarer Einfluss des pH Wertes auf das Wachstum der Zellen oder die Squalenproduktion festgestellt werden.

Die gemessenen Werte der Qualitätsmerkmale wurden mittels *JMP* über eine nicht-lineare Regression als Koeffizienten einer Polynomfunktion 2. Grades dargestellt und so eine Vorhersageformel für jedes Qualitätsmerkmal erstellt. Mit diesen Vorhersageformeln können die optimierten Bedingungen für jedes Qualitätsmerkmal mitsamt einem vorhergesagten Wert dargestellt werden.

Bei optimierten Bedingungen für das Wachstum der Zellen (25 °C, pH 6,6, p O_2 Konzentration von mindestens 50 %) wird eine spezifische Wachstumsrate von 0,29 h⁻¹ vorhergesagt. Die optimierten Bedingungen für die Squalenproduktion lassen bei einer Temperatur von 20 °C, einer p O_2 Konzentration von 41,3 % und einem pH Wert von 5,5, einen Squalengehalt von 0,101 mg Squalen pro g BTS erwarten.

Abstract

In this study the fermentation with *Aurantiochytrium limacinum* SR21, a eukaryotic, heterotrophic marine protist, was optimized. This strain produces about 80 % of the total fatty acids as docosahexaenoic acid (DHA) and so differs to other genera in the family of the thraustochytrids. Additionally it is capable to convert a large amount of the produced lipids to squalene and so it is an interesting alternative to the production of squalene out of shark liver oil. Squalene is a triterpenic hydrocarbon and is used as adjuvans in medicine, as dietary supplement and also in cosmetics industry.

The carbon source in this study was glucose, with a concentration of 20 g l⁻¹ in the batch media. For nitrogen supply a mixture out of yeast extract (8 g l⁻¹) and tryptone (8 g l⁻¹) was used. To optimize the parameters temperature (20 – 25 °C), pH value (pH 5.5 – 7) and the minimum concentration of oxygen in the media (pO₂ concentration, 30 – 50 %) a design of experiment with 16 runs was build up with the statistical software JMP. The measured values of the biomass concentration and the squalene content were used, together with the calculated specific growth rate (μ), as responses. The extraction of squalene from dried and lyophilized cell pellets was performed with n-hexane. Analysis and quantification of squalene content in the hexane fraction took place via GC-MS.

It was shown that notably the parameters temperature and pO_2 concentration had a big influence on the growth specifics of the cells. At a temperature of 25 °C the growth occurred with specific growth rates between 0,128 and 0,281 h⁻¹ and was so clearly faster than at a temperature of 20 °C (μ 0,091 to 0,197 h⁻¹). The parameterpO₂ concentration showed similar effects, whereas the specific growth rates were between 0,154 to 0,281 h⁻¹ at a pO₂ concentration of at least 50 % and only between 0,091 and 0,256 h⁻¹ at a pO₂ concentration of at least 30 %. The quantified squalene contents showed contrary effects of temperature and pO₂ concentration. At 20 °C the values of the squalene content were between 0,048 and 0,09 mg squalene per g biomass and so higher than at 25 °C (0,012 – 0,026 mg squalene per biomass). In this study no comparable effect of the pH value of the media could be shown.

The relationship between the responses and an independent variable were expressed in second-polynomial models, whereas the correlation coefficients of the models were obtained by nonlinear regression analysis with use of JMP. The model for every response shows the optimized data and the predicted values. At optimized conditions for the response "growth rate", with 25 °C, pH 6.6 and a pO₂ concentration of at least 50 % a specific growth rate of 0.29 h⁻¹ is predicted. The optimized conditions for squalene production will be at 20 °C, pH 5.5 and a pO₂ concentration of at least 30 % and provide a squalene content of 0,101 mg squalene per g biomass.

1 Einleitung

1.1 Produktionsorganismus Aurantiochytrium limacinum SR21

Thraustochytriden sind eine Gruppe von nicht-photosynthetisierenden, eukaryotischen, heterotrophen, einzelligen Meeresorganismen die, obwohl ursprünglich als Pilze angesehen, mittlerweile zur Gruppe der Stramenopilen (Chromista) gezählt werden(Cavalier-Smith, Allsopp, and Chao 1994; Corliss 1990). Die Thraustochytriden werden innerhalb der Stramenopilen im Taxon der Labyrinthulomycetes (Netzschleimpilze) geführt, in das auch die Labyrinthuliden fallen (Adl et al. 2005). Labyrinthuliden leben als Parasiten hauptsächlich auf oder in Meeresalgen und Seegräsern. Thraustochytriden werden im Gegensatz dazu selten auf lebenden Pflanzen, sondern vielmehr auf abgestorbenen Pflanzenteilen die in das Meer ragen gefunden(Raghukumar 2002).

Innerhalb der Familie der Thraustochytriden werden zahlreiche Gattungen unterschieden. Ursprünglich wurden sechs Gattungen auf Grund der Morphologie der Zellwände bzw. der Unterschiede in den Wachstumsphasen charakterisiert. Eine Gattung, Schizochytrium, wurde jedoch später auf Grund unterschiedlicher Erkenntnisse von Yokoyama & Honda (2006)in drei Gattungen aufgeteilt: Schizochytrium, Aurantiochytrium und Oblongichytrium.

Die Gattung Aurantiochytrium erfasst mehrere, teils noch unerforschte, Organismen. Diese unterscheiden sich zu den anderen Gattungen dadurch, dass die Zellen in der Wachstumsphase keine Kolonien bilden. Außerdem sind die Anteile an Fettsäuren, wie in Abbildung 1 zu sehen ist, spezifisch für diese Gattung. Die Gattung Aurantiochytrium hat einen Anteil von unter 5 % an Arachidonsäure und ungefähr 80 % an Docosahexansäure (DHA) wohingegen andere Gattungen viel größere Anteile an Arachidonsäure besitzen. (Yokoyama and Honda 2006)

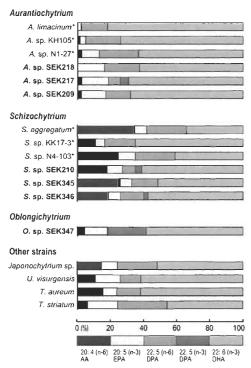


Abbildung 1: Anteil an ungesättigten Fettsäuren in unterschiedlichen Thraustochytriden(Yokoyama and Honda 2006); AA: Arachidonsäure, EPA: Eicosapentaensäure, DPA: Docosapentaensäure, DHA: Docosahexansäure

Der Thraustochytrid Aurantiochytrium limacinum sp. (vormals Schizochytrium limacinum sp.) steht Aurantiochytrium aggregatum nahe. Dieser Organismus wurde 1964 isoliert und als neuer Organismus in den Thraustochytriden identifiziert (S. Goldstein and Belsky 1964). Aurantiochytrium limacinum unterscheidet sich zu anderen Organismen in dieser Familie durch die amöboide Form der Zellen, der Größe der Zoosporen und in der Umsetzung von Kohlenstoffquellen (HONDA 1998).

Wie in Abbildung 2 zu sehen ist bilden vegetative Zellen von *Aurantiochytrium limacinum* Zellcluster. Im Inneren der ca. 7-15 µm großen vegetativen Zellen befinden sich Vakuolen, die sich unter dem Lichtmikroskop deutlich vom Zytoplasma unterscheiden. Auf Agar Platten wurden am Rand von Kolonien aus sphärischen Zellen, längliche amorphe Zellen beobachtet(HONDA 1998).

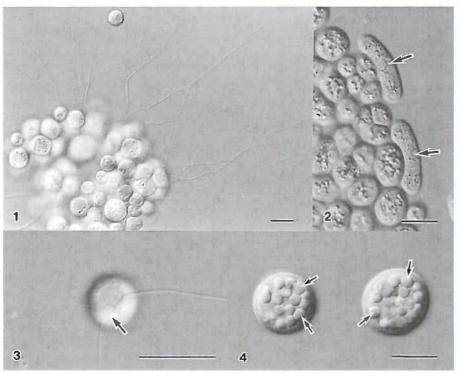


Abbildung 2: Aurantiochytrium limacinum, 1: Zellcluster mit ektoplasmatischem Netz, 2: Längliche, amorphe Zellen (Pfeile) am Rand einer Kolonie, 3: einzelne Zelle mit ektoplasmatischem Netz, 4: 2 Wochen alte vegetative Zellen mit Vakuolen (Pfeile),(HONDA 1998)

Der in Abbildung 3 dargestellte Lebenszyklus von *Aurantiochytrium limacinum sp.* wurde von HONDA (1998) folgendermaßen beschrieben: Vegetative Zellen vergrößern sich nach der Inokulation in frisches Medium und es kommt zur Kernteilung ohne eine Zytokinese. Nach einem mehrkernigen Stadium entwickeln sich durch reguläre Zellteilung Zoosporangien mit einem Durchmesser von ca. 12-24 µm. Nach ungefähr 10 Stunden werden 16-64 Zoosporen freigesetzt die ein eiförmiges Aussehen und zwei ungleiche Flagellen an den seitlichen Teilen besitzen.

Nach der Beimpfung mit frischem Medium beginnt die gleichmäßige Zellteilung nach ca. 5 Stunden und erfolgt bis zu vier oder fünf Mal. Daraus entsteht ein Zellcluster mit 16-32 Zellen. Nach weiteren 10 Stunden werden einige zitronenförmige, amöboide Zellen im Cluster freigesetzt. Diese entwickeln feine Scheinfüßchen und bewegen sich in kriechartigen Bewegungen entlang des Kulturgefäßes. Nach ca. 30 Minuten siedeln sich die amöboiden Zellen an und entwickeln sich zu Kugeln mit einem Durchmesser von ca. 10 µm. Durch drei weitere Zellteilungen ohne merkliches Wachstum der Zellen entwickeln sich aus jeder amöboiden Zelle acht Zoosporen. Diese Zoosporen werden nach ca. einer Stunde freigesetzt und sind etwas kleiner als Zoosporen welche direkt aus vegetativen Zellen entstehen.

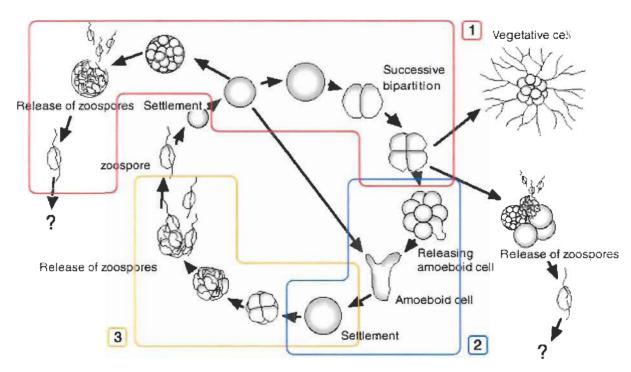


Abbildung 3: Lebenszyklus von Aurantiochytrium limacinum sp.(Konan 2003)

1.2 Produkt Squalen

Squalen (2,6,10,15,19,23-hexamethyl-6,6,10,14,18,20-tetracosahexan) ist ein triterpener Kohlenwasserstoff der in der Natur weitverbreitet ist und u.a. in erheblichen Mengen in Olivenöl oder Palmöl vorkommt. Die größte Quelle für Squalen ist jedoch Haifischleberöl, von dessen lateinischem Namen *Squalus spp.* (=Haifisch) sich auch der Name ableitet (Kelly 1999; Spanova and Daum 2011).

Squalen wird als Zwischenprodukt zur Produktion von eukaryotischen Sterolen und bakteriellen Hopnaoiden in allen Zelltypen synthetisiert. Die verwandten chemischen Verbindungen Oxidosqualen und Bis-Oxidosqualen sind Prekursor für mehr als 200 verschiedenen Triterpene (Xu, Fazio, and Matsuda 2004).

Squalen ist ein mehrfach ungesättigtes Triterpen aus 30 C-Atomen mit sechs isoprenen Untereinheiten (siehe Abbildung 4). Die chemische Struktur zeigt, dass Squalen durch die hohe Anzahl an ungesättigten Verbindungen nicht sehr stabil ist und leicht oxidiert wird. In Tabelle 1sind einige biophysikalische Eigenschaften aufgelistet, die den stark hydrophoben Charakter von Squalen unterstreichen. Der Einbau von Squalen in biologische Membranen ist auf Grund des polaren Charakters limitiert. Daher sammelt sich Squalen eher in Lipidspeichern an, was

auch in Schwannschen Zellen so beobachtet werden konnte. (Goodrum et al., 1990; Spanova & Daum, 2011)

Wie jedoch in Abbildung 4 zu sehen ist kann Squalen durch die Doppelbindungen in unterschiedlichen Konformationen vorliegen. Unter anderem auch in Form eines Sterols, wodurch die Aufnahme in Membranen ermöglicht werden könnte. Es wurde entdeckt, dass Squalan, ein hydrogenisierter Verwandter von Squalen, in eine Phospholipid-Doppelschicht eingefügt wurde. (Hauss et al. 2002; Spanova and Daum 2011)

Abbildung 4: Chemische Struktur von Squalen und seiner Vorstufen. A: chemische Struktur von Isopren B-D: verschiedene Squalenstrukturen: B: gestreckte Form, C: gewundene Form, D: "sterol ähnliche" Form;(Spanova and Daum 2011)

Tabelle 1: biophysikalische Eigenschaften von Squalen, (Spanova and Daum 2011)

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

1.2.1 Verwendung von Squalen

Squalen als Wirkverstärker (Adjuvans)

Ein Adjuvans ist ein Hilfsstoff, welcher die Wirkung eines Reagenz oder einer Arznei verstärken soll. Squalen wird häufig als Adjuvans für verschiedene Impfstoffe und pharmazeutische Anwendungen eingesetzt. Emulsionen die Squalen enthalten, erleichtern die Aufnahme von schlecht löslichen Substanzen in Impfstoffe. Die Eigenschaften von Squalen und Squalan machen die beiden Substanzen ideal zur Herstellung von stabilen und nicht-toxischen Nanoemulsionen. Aus diesem Grund gibt es zahlreiche auf Squalen-Basis hergestellte Emulsionen die als Adjuvans für Impfstoffe dienen (Fox 2009).

Squalen in Nahrungsmitteln

Es wurde gezeigt, dass die tägliche Zufuhr von Squalen Nahrungsmittelergänzunggesundheitsfördernde Effekte erwirken könnte. Der starke Konsum von nativem Olivenöl, welches Squalen enthält, wurde mit geringerem Riskio für Brust- oder Lungenkrebs in mediterranen Gebieten (Mittelmeergegend) in Zusammenhang gebracht. Außerdem wurde gezeigt, dass Squalen entgiftende Eigenschaften hat und so den Abbau von Xenobiotika fördern kann. Weiters wird Squalen positive Eigenschaften beim Braten konstatiert. Es wurde gezeigt, dass natürliche Substanzen, wie Squalen, die Stabilität von Öl beim Braten besser erhalten als synthetische Substanzen(Naziri, Mantzouridou, and Tsimidou 2011; Preedy and Watson 2010).

Squalen in Kosmetika

Die feuchtigkeitsspendende und weichmachende Eigenschaft von Squalen führt in Verbindung mit der gleichzeitigen Komptabilität mit Haut-Oberflächenlipiden zum häufigen Einsatz in der Kosmetikindustrie. Gemeinsam mit Squalan wird Squalen bei einer Vielzahl von Pflegeprodukten, wie Feuchtigkeitscremes oder Haar- bzw. Nagelprodukten, eingesetzt. Auch in Sonnen- und Antifaltencremes findet Squalen Anwendung (Naziri, Mantzouridou, and Tsimidou 2011; Z.-R. Huang, Lin, and Fang 2009).

1.2.2 Produktion von Squalen

Squalen spielt als Zwischenprodukt eine wichtige Rolle in der Biosynthese von Sterolen. Als Vorstufe von Squalen werden zwei Isoprene, Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) und Isopentenylpyrophosphat (IPP), benötigt. In Eukaryoten erfolgt deren Synthese hauptsächlich über den Mevalonatweg (MVA-Weg). Bakterien und Algen erzeugen DMAPP und IPP hingegen auch über den Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg).

1.2.2.1 Mevalonatweg (MVA-Weg)

Beim MVA-Weg (siehe Abbildung 5) wird in ersten Schritten Acetyl-CoA zu Mevalonsäure reduziert. Das Enzym 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA Reduktase (HMGR) das dabei zum Einsatz kommt,spielt im Feedbacksystem eine wichtige Rolle um die Anhäufung von Cholesterol, durch Herabsetzung der Enzymaktivität um bis zu 90 %, zu verhindern (Song, Javitt, and DeBose-Boyd 2005). Nach der Phosphorylierung und Decarboxylierung von Mevalonsäure entsteht IPP als Vorstufe für Farnesyl-Pyroposphat (FPP). FPP wird danach entweder zu Squalen (und weiter zu Cholesterol) oder auch zu Dolichol oder Ubiquinon umgewandelt. Die Synthese von Squalen aus zwei FPP Molekülen erfolgt mittels Squalen-Synthase (SQS). SQS ist in ähnlicher Weise als Feedbackpunkt für den zellulären Sterolgehalt verantwortlich wie HMGR (Tansey and Shechter 2000).

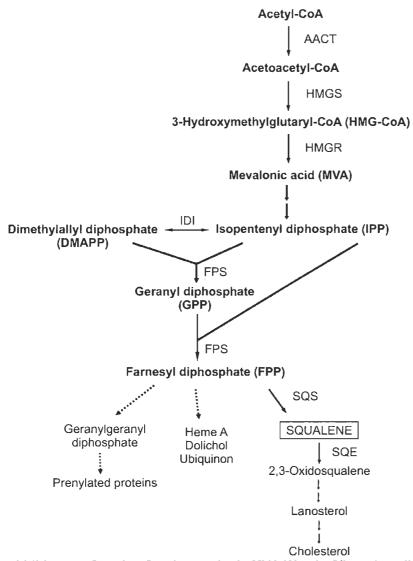


Abbildung 5: Squalen Synthese mittels MVA-Weg in Säugetierzellen(Spanova and Daum 2011)

1.2.2.2 Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg)

Der MEP-Weg, der u.a. in Plastiden von Pflanzen lokalisiert ist, beginnt mit der Verknüpfung von Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat (G3P) zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP) mittels dem Enzym DXP-Synthase (DXS). DXS dient im MEP-Weg als wichtiger Regulationspunkt (Wolfertz et al. 2004). In anschließenden Schritten wird DXP, wie in Abbildung 6 zu sehen ist, über das Zwischenprodukt MEP zu IPP und DMAPP umgewandelt. IPP und DMAPP werden danach, wie auch im MVA-Weg zu FPP und danach weiter zu Squalen umgewandelt.

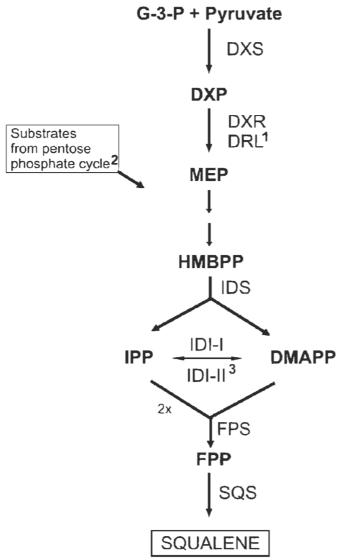


Abbildung 6: Squalen Synthese mittels MEP-Weg in E. coli; G-3-P: Glycerol-3-Phosphat, DXP: Deoxy-Xylose-Phosphat, DXS: DXP-Synthase, MEP: Methyl-Erythritol-Phosphat, DXR: DXP-Reduktoisomerase, HMBPP: Hydroxy-Methyl-Butenyl-Pyrophosphat, IPP: Isopentenylpyrophosphat, DMAPP: Dimethylallylpyrophosphat, FPP: Farnesyl-Pyrophosphat(Spanova and Daum 2011)

1.2.3 Squalen in Säugetieren

Squalen ist in Säugetieren eines der wichtigsten Lipide und wird in den Talgdrüsen produziert (125 – 475 mg pro Tag). Nur wenig Squalen wird jedoch zu Cholesterol weiterverarbeitet, was an der Überexpression bzw. erhöhten Aktivität von SQS oder an der geringen Aktivität von SQE liegt (Smith and Thiboutot 2008). In Säugetieren kommt Squalen teilweise aus der endogenen Biosynthese und teilweise aus der Nahrung. Der Großteil des durch Nahrung aufgenommenen Squalens wird gemeinsam mit VLDL (very little density lipoprotein) in das Serum transportiert

und anschließend in unterschiedliche Gewebe verteilt. Nur ein kleiner Anteil wird zu Cholesterol umgewandelt. Ein hoher Anteil von Squalen kann in Fischen, besonders in Haifischen und Walen, gefunden werden. In der Haifischleber erreicht die Squalenkonzentration einen Anteil von bis zu 70 Gewichtsprozent (Spanova and Daum 2011).

Biosynthese von Squalen in Säugetieren

Sterole sind wichtige strukturelle und regulatorische Komponenten der eukaryotischen Membranen. Die Synthese von Squalen ist in allen Organismen ähnlich, auch wenn Eigenschaften von beteiligten Enzymen unterschiedlich sein können. In menschlichen und tierischen Zellen wird Cholesterol entweder über den Mevalonatweg (siehe Seite 15) oder über die Aufnahme von LDL synthetisiert. Zwischen den beiden Quellen besteht ein reguliertes Gleichgewicht, wobei z.B. die Anzahl an LDL Rezeptoren verringert wird oder die Enzymaktivitäten im MVA-Weg reduziert werden (J. L. Goldstein, DeBose-Boyd, and Brown 2006).

1.2.4 Squalen in Pflanzen

Neben den hohen Squalenmengen in Haifischleberöl wurden auch unterschiedliche Pflanzen als ergiebige Quelle für Squalen entdeckt. Hohe Vorkommen wurden u.a. in Olivenöl (7 mg Squalen pro g Olivenöl) beschrieben(Newmark 1997). Kleinere Mengen wurden auch in Palm-, Erdnuss-, oder Reisöl gefunden (Spanova and Daum 2011).

Biosynthese von Squalen in Pflanzen

Die Biosynthese von Squalen in Pflanzen unterscheidet sich zu der in Säugetieren. Biosynthetische Reaktionen von Squalen zu Phytosterolen ergeben Produkte wie Sitosterol, Stigmasterol oder Campesterol. In Pflanzen wird Squalen nicht wie in Tieren und Pilzen zu Lanesterol, sondern zu Cycloartenol umgewandelt. Dieses Cycloartenol wird danach weiter zum Endprodukt Sitosterol verstoffwechselt(Boutté and Grebe 2009; Spanova and Daum 2011).

Die Isoprenoide IPP und DMAPP werden in Pflanzen einerseits im Cytosol über den MVA-Weg oder auch in den Plastiden über den MEP Weg synthetisiert. Der Austausch von Isoprenoiden zwischen Plastiden und Cytosol ist jedoch sehr ineffizient (Bouvier, Rahier, and Camara 2005).

1.2.5 Squalen in Mikroorganismen

Mikrobielle Squalensynthese ist in den letzten Jahren eine vielversprechende Alternative zur Gewinnung von Squalen geworden. Obwohl die Produktionsraten von Squalen nicht so hoch wie in Wirbeltieren oder Pflanzen sind, ist das schnelle und billige Wachstum von Mikroorganismen ein Vorteil (Spanova and Daum 2011).

Biosynthese von Squalen in Prokaryonten

Die Synthese von Squalen in Bakterien unterscheidet sich von Spezies zu Spezies. Generell werden die Vorstufen IPP und DMAPP über beide, den MVA-Weg und den MEP-Weg, gebildet. Der MEP Weg ist überwiegend bei Eubakterien und Cyanobakterien, der Mevalonatweg dagegen hauptsächlich in Archae und nur in wenigen Eubakterien zu finden(Spanova and Daum 2011).

In Bakterien wird Squalen zu Membranbausteinen, den pentacyclischen Hopanoiden, weiterverarbeitet. Diese kommen reichlich in aeroben Bakterien, wie z.B. Cyanobakterien vor, und spielen eine wichtige Rolle in der Erhaltung und Permeabilität von Membranen (Welander et al. 2009). Um die Squalenproduktion in *E. coli* zu verbessern, schleusten Ghimire, Lee & Sohng(2009) Gene der Hopnaoidsynthese aus *Streptomyces peucetius* ein. Die Ausbeute wurde so auf ca. 12 mg l⁻¹ verdreifacht.

Biosynthese von Squalen in Hefen

Der Einfluss von Sterolen auf die Fluidität und die Durchlässigkeit von Membranen oder die Verwertung von Energiequellen und die Aktivität von membran-gebundenem ATP wurde in Hefen erforscht. Wie auch in anderen eukaryotischen Zellen findet der Aufbau von Sterolen in zwei Teilen statt. Der erste Teil ist der MVA-WEG (siehe Seite 15). Danach folgt die Egosterolsynthese bei der Squalen über Squalenepoxid zum Endprodukt Egosterol umgewandelt wird. In Hefen wird Squalen unter normalen Wachstumsbedingungen nicht in den Zellen angehäuft sondern sehr effizient zu Egosterol weiterverarbeitet(Spanova and Daum 2011).

Die Biosynthese von Egosterol in Hefen ist strikt aerob, da eine der ersten Reaktionen zur Verarbeitung von Squalen Sauerstoff benötigt. Unter anaeroben Bedingungen konnte, unter Zugabe von Egosterol und ungesättigten Fettsäuren als Medienzusatz, eine Anhäufung von Squalen, mit einer maximalen Ausbeute von ca. 41 mgkg⁻¹ BTS erreicht werden (Bhattacharjee et al. 2001). Unter aeroben Bedingungen konnte eine Erhöhung der Squalenausbeute mittels Temperaturunterschied in den Wachstumsbedingungen erreicht werden. Mutante Hefen häuften bei 16 °C bis zu vier mal so viel Squalen an, wie die gleichen Hefen bei 30 °C(Loertscher et al. 2006).

Biosynthese und Regulation von Squalen in Mikroalgen

Mikroalgen, mikroskopisch kleine Algen, werden mittlerweile zur Produktion von u.a. Polysacchariden, Karotionoiden und Proteinen oder auch als Quelle für erneuerbare Energien genutzt. Manche Mikroalgen häufen eine beachtliche Menge an Squalen an. Der Thraustochytrid *Aurantiochyatrium sp.* ist auf Grund des fehlenden Apparates zur Kohlenstofffixierung unter heterotrophen Bedingungen ein effizienter Produzent von Squalen (Li et al. 2009).

Im Gegensatz zu Pilzen und Säugetieren wird in MikroalgenIPP nur über den MEP-Weg oder aus Substraten durch photosynthetische Reaktionen hergestellt. IPP und DMAPP dienen als Substrat zur Erzeugung von FPP wobei interessanterweise auch andere Moleküle, wie zum Beispiel Farnesol, als Substrat zur FPP Erzeugung dienen können (siehe Abbildung 7). Der Anteil von Squalen der nicht für die Weiterverarbeitung genutzt wird bleibt oft methyliert und wird mit anderen Karbonaten gelagert(Z. Huang and Poulter 1989; Spanova and Daum 2011).

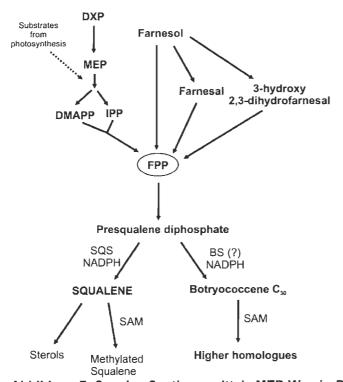


Abbildung 7: Squalen Synthese mittels MEP-Weg in B. braunii; (Spanova and Daum 2011)

2 Zielsetzung

Durch die Optimierung der Fermentationsbedingungen von *Aurantiochytrium limacinum* SR21 ist die Produktausbeute an Squalen zu erhöhen.

Zur effizienten Optimierung der Fermentationsparameter Temperatur des Mediums, pH Wert des Mediums und dem Mindestprozentanteil von Sauerstoff im Medium wurde mit einem Statistikprogramm ein Versuchsplan (Design of Experiments, DoE) erstellt.

3 Material und Methoden

3.1 Stamm

Die in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz gekommenen Mikroorganismen sind aus der Sammlung mit dem Namen 'American Type Culture Collection' (ATCC). Dieser Stamm trägt die Nummer: ATCC MYA-1381; *A. limacinum* SR21. Als Ausgangspunkt für alle Versuche diente eine nachRappel(2013) hergestellte Forschungszellbank (RCB).

3.2 Medien und Nährstoffquellen

3.2.1 Künstliches Meerwasser (Artificial Sea Water – ASW)

Künstliches Meerwasser ist eine dem natürlich vorkommenden Meerwasser ähnliche Salzlösung. Sie ist chemisch definiert und kann so in stabiler Qualität reproduziert werden. Die Zusammensetzung und die Herstellung wurde nachRappel(2013) vollzogen.

Material:

Chemikalien (Zusammensetzung und Konzentrationen siehe Tabelle 2 und Tabelle 3)

1 Liter Glas - Messkolben

Magnetrührstab und Magnetrührer

Spatel und Löffel

Einweg Plastikspritzen

Einweg Sterilfilter (Rotilabo-Spritzenfilter, CME, steril, Porengröße 0,22 µm)

Entmineralisiertes Wasser (RO-H₂O)

HEPES Puffer, 50 mM

Autoklav

Waage (Präzision 0,1 g)

Analytische Waage (Präzision 0,0001 g)

Sterile Sicherheitswerkbank (Laminar)

Methode:

- 1. Die Stammlösungen nach Tabelle 2 und Tabelle 3 herstellen.
- 2. Tabelle 2herstellen und in RO-H₂O lösen. Danach die Lösung, noch ohne Vitaminlösungen bzw. K₂HPO₄, bei 121 °C und 1 bar für 20 Minuten hitzesterilisieren.
- 3. In der sterilen Sicherheitswerkbank werden nach Abkühlen der sterilen Salzlösung die restlichen Komponenten mittels Sterilfiltration hinzugefügt.
- 4. Wird das ASW nicht gleich verwendet kann es bei 4 °C im Kühlraum gelagert werden.

Tabelle 2: Zusammensetzung für 1 Liter ASW nach Rappel (2013)

Komponente	M[g mol ⁻¹]	Stammlösung [g l ⁻¹]	Menge	Einheit	Sterilisation
NaCl	58,44	-	25,00	g	
MgSO ₄ •7 H ₂ O	246,47	-	3,5	g	
MgCl ₂ •6 H ₂ O	203,3	-	2,00	g	
CaCl ₂ • H ₂ O	147,01	-	0,50	g	
KCI	74,55	-	0,50	g	Hitze:
NaNO ₃	84,99	-	0,75	g	20 Minuten bei 121 °C
Zitronensäure- monohydrat ¹	210,14	3,28	1,00	ml	und 1 bar
Ammoniumeisen (III) – citrat ¹		3,00	1,00	ml	
Na₂EDTA • 2 H₂O Stock¹	372,24	0,5025	1,30	ml	
Na ₂ CO ₃ ¹	105,99	20,0	1,00	ml	
Spurenelementelösung*	-	sieheTabelle 3	1,00	ml	_
Komponenten die nach	der Hitzester	rilisation hinzuge	fügt werder	1	
K ₂ HPO ₄ ¹	174,18	57,265	1,00	ml	Hitze
Vitamin B ₁₂ ⁺	1355,37	0,1352	1,00	mi	Filtration (0,22 µm)
Biotin⁺	244,31	0,0250	1,00	mi	Filtration
Thiamin HCl [⁺]	337,27	1,0960	1,00	mi	Filtration

Tabelle 3: Zusammensetzung Spurenelementelösung

Komponente	M [g mol ⁻¹]	Menge	Einheit	Sterilisation
H ₃ BO ₃	61,83	2,860	g	
MnCl ₂ • 4H ₂ O	197,91	1,810	g	
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	287,56	0,222	g	Hitze: 20 Minuten bei
Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	241,95	0,390	g	121 °C und 1 bar
CuSO ₄ • 5 H ₂ O	249,60	0,079	g	
CoCl ₂ • 6 H ₂ O	237,93	0,040	g	

¹ Lagerung bei 4 °C [†] Lagerung bei -20 °C

3.2.2 Stickstoff- und Kohlenstoffquelle

Als Stickstoffquelle diente eine YEP-Stammlösung. Diese besteht aus Hefeextrakt und Pepton aus Kasein. Die beiden Substanzen werden, je nach benötigter Konzentration, in RO-H₂O gelöst und anschließend bei 121 °C hitzesterilisiert.

Als Kohlenstoffquelle diente, neben YEP, das Monosaccharid Glukose. Für die Stammlösung wurde Glukose, je nach gewünschter Konzentration in RO-H₂O gelöst und anschließend hitzesterilisiert.

Die beiden Stammlösungen werden bei 4 °C im Kühlraum gelagert.

3.3 Kultivierungsmethode

Sämtliche Versuche mit *A. limacinum* SR21 wurden als Batchkulturen durchgeführt. Die Batchkultur, oder auch Satzkultur, wird als geschlossenes (oder scheinbar geschlossenes) System bezeichnet. Nachdem das Nährstoffmedium mit lebenden Zellen, dem Inokulum, beimpft wurde, wird dieser wachsenden Kultur, mit Ausnahme von Gasen und kleinen Flüssigkeitsströmen zur pH-Kontrolle und zur Schaumbekämpfung, nichts mehr zugeführt. In der exponentiellen Wachstumsphase vermehren sich die Zellen unter unlimitierten Bedingungen. Am Ende der Wachstumsphase tritt eine Substratlimitierung, und damit auch eine Wachstumslimitierung ein (Chmiel 2011).

3.4 Statistische Versuchsplanung (Design of Experiments)

Um die Auswirkungen und Einflüsse der ausgewählten Faktoren möglichst effizient untersuchen zu können wurde ein statistischer Versuchsplan erstellt. Die statistische Versuchsplanung ist seit den 1920er Jahren ein viel eingesetztes Instrument um Versuchsreihen kostensparend zu konstruieren und korrekt auszuwerten. Zur Erstellung und Auswertung des Versuchsplanes wurde die Statistik-Software JMP (JMP Software V10.0.2, SAS Institute Inc., NC, USA) verwendet.

Als Qualitätsmerkmale, also die messbaren Ergebnisse mit denen ein Versuch bewertet wird, wurden für die Versuche dieser Arbeit die spezifische Wachstumsrate, der Squalengehalt und die Masse an angehäufter Biomassetrockensubstanz (BTS) herangezogen.

Als Faktoren wurden die zu verändernden und daher auch untersuchenden Parameter bezeichnet. Im Fall dieser Arbeit wurden die Faktoren pH Wert, Temperatur und die Konzentration an gelöstem Sauerstoff im Medium untersucht.

Qualitätsmerkmale, in JMP als Zielgrößen benannt, und die Stufen der Faktoren wurden wie in Abbildung 8zu sehen ist eingestellt und so der Versuchsplan (Tabelle 4) erstellt. Dieser Versuchsplan wurde im Zeitraum KW34/2013 – KW03/2014 Versuch für Versuch abgearbeitet.

Eine Polynomfunktion 2. Grades (Formel 1) beschreibt den Zusammenhang zwischen Zielgrößen und Variablen, wobei Y der Vorhersagewert der Zielgröße ist, β der Gleichungskoeffizient und i bzw. j die Variablen sind. Diese Koeffizienten für die Gleichung wurden über eine multiple Regression der Ergebnisse mit der Statistiksoftware JMP berechnet.

Formel 1: Zusammenhang zwischen Zielgröße und Variable im Vorhersagemodell

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i \sum \beta_{ii} x_i^2 \sum \beta_{ij} x_i x_j$$

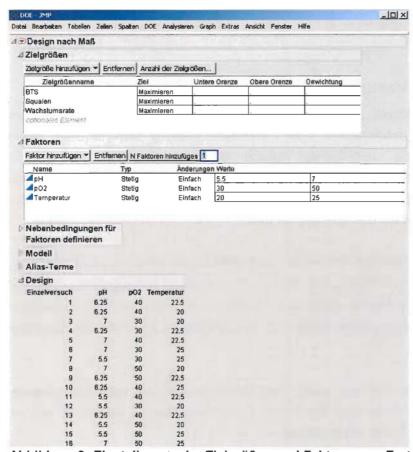


Abbildung 8: Einstellungen der Zielgrößen und Faktoren zur Erstellung des Versuchsplans

Tabelle 4: Versuchsplan zur Optimierung der Squalenproduktion

	pH Wert	pO ₂ [%]	Temperatur [°C]
V1	5,5	30	20
V2	7	30	20
V3	6,25	40	20
V4	5,5	50	20
V5	7	50	20
V6	6,25	30	22,5
V7	5,5	40	22,5
V8	6,25	40	22,5
V9	6,25	40	22,5
V10	7	40	22,5
V11	6,25	50	22,5
V12	5,5	30	25
V13	7	30	25
V14	6,25	40	25
V15	5,5	50	25
V16	7	50	25

3.5 Durchführung der Versuche im Bioreaktor

Alle Versuche wurden in Bioreaktoren aus Edelstahl der Firma Bioengineering AG mit einem Gesamtvolumen von 16 Liter durchgeführt. Die Temperaturregelung erfolgte über einen Doppelmantel. Für die Zugabe von Säure, Lauge oder Anti-Schaummittel wurden Schlauchquetschpumpen (Bioengineering AG, 23430 Peripex W1, 100 rpm) eingesetzt. Zur Zubzw. Abfuhr von Luft bzw. Abluft wurden Systeme der Firma Bioengineering AG mit Keramik-Filterelementen, welche sterilisiert werden können, genutzt.

Zur Homogenisierung und Belüftung der Fermentationsbrühe wurde eine doppelte Rushton-Turbine (Scheibenrührer) mit sechs Rührblättern (80 mm Durchmesser) in Kombination mit vier Schikanen-Einbauten bzw. ein Einblasrohr, welches mit steriler Luft gespeist wurde, eingesetzt. Die Turbine wurde von einem Motor (Unitec Motor 1,1, kW) mit bis zu 700 Umdrehungen pro Minute angetrieben.

Zur Probenahme wurde ein Probenahmeventil der Firma Bioengineering AG verwendet. Dieses wurde mit Hilfe von heißem Wasserdampf 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), eine pH Elektrode (MT405-DPAS-SC-K85/120 combination pH) und eine Sauerstoffsonde. Dabei wurde

nach ca. der Hälfte der Versuche die ursprüngliche Sauerstoffsonde (Mettler Toledo InPro 6820 mit Teflonmembran Mettler Toledo O2 memrane t-96) durch eine neue, optische Sauerstoffsonde (Firma Hamilton) ersetzt.

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).

3.5.1 Inokulum

Material:

Kryokultur von A. limacinum SR21

Sterile Pipettenspitzen 1000 µl

Kolbenhubpipette 1000 µl

Sterile 500 ml Schikanenkolben (Schott), verschlossen mit Schraubverschluss mit Membran

Sterile 300 ml Schikanenkolben mit Schlauchverbindung und Bioreaktor-Anstechnadel

70 % (v/v) Ethanol

Sterile Sicherheitswerkbank (Laminar)

Waage (Präzision 0,1 g)

Brutraum

Sterile Glukosestammlösung (400 g kg⁻¹ Glukose)

Sterile YEP – Stammlösung (100 g kg⁻¹ Hefeextrakt und 100 g kg⁻¹ Pepton aus Kasein)

Steriles ASW

Steriles RO-H2O

Orbitalschüttler (VWR Advanced Digital Shaker)

Methode:

- Pro Bioreaktor wurden zwei sterile 500 ml Schikanenkolben vorbereitet. Dazu wurden diese außen mit 70 % Ethanol abgewischt und in die Laminar gestellt. Das Gleiche passierte mit den Pipetten und den Medienkomponenten.
- Das Medium wurde aus den Stammlösungen, dem ASW und dem sterilen Wasser nach Tabelle 5hergestellt.
- 3. Pro Kolben wurde eine Kulturampulle aufgetaut, leicht geschüttelt, mit Ethanol abgewischt und ca. 1 ml daraus aseptisch in einen Kolben transferiert. Ein zusätzlicher Kolben wurde als Sterilkontrolle ohne Kultur belassen.
- 4. Die Kolben wurden am Orbitalschüttler bei 140 rpm und eingestellter Temperatur für 25 Stunden bebrütet.

5. Nach abgelaufener Bebrütungsdauer von 25 Stunden wurden jeweils zwei Kolben in einen sterilen Kolben mit Schlauchverbindung überführt und danach in den sterilen Bioreaktor transferiert. Zuvor wurden die Kulturen unter dem Mikroskop auf Kontaminationen und vorhandenes Wachstum überprüft.

Tabelle 5 Zusammensetzung des Mediums für einen Kolben mit 100g Medium des Inokulums

ASW	Hefeextrakt	Pepton aus Kasein	Glukose
50 % (w/w)	1 g kg ⁻¹	1 g kg ⁻¹	5 g kg ⁻¹

3.5.2 Batch - Medium

Material:

Natriumchlorid

Magnesiumsulfat Heptahydrat

Magnesiumchlorid Hexahydrat

Calciumchlorid Dihydrat

Kaliumchlorid

Natriumnitrat

Zitronensäure Monohydrat

Ammoniumeisen (III)-citrat

Natriumcarbonat

Natriumethylendiamintetraessigsäure Dihydrat

Spurenelemente-Stammlösung (siehe Tabelle 3)

Hefeextrakt

Pepton aus Kasein

D-Glukose

RO-H2O

Hitzelabile Komponenten:

Dikaliumhydrogenphosphat

Vitamin B12

Biotin

Thiamin HCI

Waage (Präzision 0,1g)

Sterile Sicherheitswerkbank (Laminar)

2 Liter Messkolben

1 Liter Messkolben

1 Liter Schottflasche mit Schlauchverbindung und Bioreaktor-Anstechnadel

Sterilfilter

Spritze 2 ml

Methode:

- Alle hitzestabilen Komponenten für 2 Liter ASW wurden eingewogen und in einem 2 Liter Messkolben in RO-H₂O gelöst.
- 2. 8 g Hefeextrakt und 8 g Pepton aus Kasein wurden eingewogen und in einem 1 Liter Messkolben in RO-H₂O gelöst.
- 3. Beide Lösungen wurden in den Bioreaktor überführt und dort sterilisiert.
- 4. 80 g Glukose wurden eingewogen und in einer 1 Liter Schottflasche in RO-H₂O gelöst und hitzesterilisiert.
- 5. In der Laminar wurde der abgekühlten Glukose-Lösung aseptisch die für 2 Liter ASW benötigten hitzelabilen Komponenten hinzugefügt und anschließend die Mischung dem sterilisierten Bioreaktor beigemengt.

Tabelle 6 Zusammensetzung Batch Medium (4 Liter)

ASW	Hefeextrakt	Pepton aus Kasein	Glukose
50 % (v/v)	8 g l ⁻¹	8 g l ⁻¹	20 g l ⁻¹

3.5.3 Vorbereitung der Fermentation

Material:

Bioreaktor (Bioengineering AG)

Manometer

Antischaum-Sonde (DN 19, Bioengineering AG)

Lichtleiter

Abluft-Vorrichtung mit Keramikmembran (Bioengineering AG)

Probenahmeventil (Bioengineering AG)

Plastik-Septen (Bioengineering AG)

Temperatur Sonde Pt 100

pH Elektrode (MT405-DPAS-SC-K85/120 combination pH)

pO₂ Elektrode (Mettler Toledo InPro 6820 mit Teflonmembran Mettler Toledo O₂ memrane t-96) pH Kalibrierlösungen (pH 4 und pH 7)

Ammoniak (12,5 % (v/v))

Phosphorsäure (10 % (v/v))

Anti-Schaummittel (Glanapaon DG160, Bussetti, Batch Nr. E303723; 1:12 Verdünnung)

Methoden:

- Der saubere Bioreaktor wurde verschlossen und ein Manometer, ein Lichtleiter und die Abluft-Vorrichtung eingebaut.
- 2. Danach wurden die restlichen Anschlüsse mit Plastik-Septen ausgestattet um diese im weiteren Verlauf anstechen zu können ohne eine Kontamination zu verursachen.
- 3. Die pH Elektrode wurde mit den Kalibrierlösungen kalibriert.

- 4. Danach wurden im unteren Bereich Temperatur-Sonde, Probenahmeventil, pO2 Sonde und die pH Elektrode eingebaut.
- 5. Über einen Trichter wurde das Medium, noch ohne Glukose und die hitzelabilen Komponenten des ASW, eingefüllt und anschließend die noch fehlende Anti-Schaumsonde eingebaut und somit der Reaktor verschlossen. Danach wurde das Sterilisationsprogramm gestartet und der Bioreaktor sterilisiert.
- 6. Nach erfolgter Sterilisation wurde das Fermentationsprogramm mit den gewünschten Parametern gestartet und die verbleibenden Medienkomponenten aseptisch in den Reaktor transferiert.
- 7. Zuluft, Lauge, Säure und Antischaum wurden angeschlossen und alle Parameter auf die gewünschte Größe gebracht.
- 8. Nach Erreichen der gewünschten Parameter wurde die pO2 Sonde kalibriert. Dazu wurde mit Stickstoff über das sterile Zuluft-System belüftet um den Nullpunkt zu kalibrieren. Danach wurde bei einer Rührerdrehzahl von 400 rpm und einer Belüftung mit Luft (4 vvm) der 100 % Punkt kalibriert.

3.5.4 Probenahme während der Fermentation

Material:

Bioreaktor (Bioengineering AG)
10 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon Tube)
50 ml Röhrchen (Greiner); für Zentrifuge geeignet
Plastikspritze, 20 ml
Dampfgenerator
Lichtmikroskop (Olympus CH-2)
Objektträger
Deckgläser
Eppendorf Zentrifuge 5804, Rotor Eppendorf A-4-44
Waage, Präzision 0,1 g

Methode:

- 1. Zu Beginn wurde die Plastikspritze an das Probenahmeventil angesetzt und ca. 2 ml Kulturbrühe entnommen und verworfen.
- 2. Anschließend wurden zweimal je 5 ml Probe für die gravimetrische BTS Bestimmung entnommen bzw. einmal 40 ml für Bestimmung des Squalengehalts.
- 3. Das Probenahmeventil wurde danach für ca. 10 Minuten mit heißem Dampf durchströmt.
- 4. Es erfolgte eine optische Untersuchung mit Hilfe des Lichtmikroskops bei Vergrößerungen von 100x – 600x. Dazu wurden ca. 10 μl der Probe auf einen Objektträger platziert und mit einem Deckglas abgedeckt.

- 5. Die Probenahmeröhrchen wurden auf 0,1 g austariert und bei 4000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert.
- 6. Der Überstand wurde für die NPOC, TN bzw. Glukosebestimmung herangezogen das Pellet für die BTS bzw. Squalenbestimmung.

3.5.5 Dekontamination und Reinigung

Zum Beenden der Fermentation wurde das Programm über das Bedienfeld gestoppt und das Dekontaminations-Programm gestartet. Dabei wird der Bioreaktor auf 80 °C aufgeheizt und für 15 Minuten auf dem Temperaturlevel gehalten. Anschließend wurde die Kulturbrühe entsorgt und der Reaktor sowie alle Anschlüsse und Schlauchverbindungen gereinigt.

3.6 Analytik

3.6.1 Gravimetrische Bestimmung der Biomassetrockensubstanz

Material:

Sterile 5 ml Pipetten

10 ml Zentrifugenröhrchen aus Plastik
Pipettierhilfe
Bechergläser
Exsikkator
Trockenschrank, 105 °C
Analysenwaage, Präzision 0,0001 g
Eppendorf Zentrifuge 5804, Rotor Eppendorf A-4-44

Methode:

- Die Bechergläser wurden beschriftet und 24 h vor der Analyse im Trockenschrank bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Abkühlung auf Raumtemperatur vor der Auswaage erfolgte im Exsikkator.
- Das Zellpellet von derProbenahme (siehe Seite 30) wurde zweimal mit je fünf ml RO-H₂O gewaschen und jeweils für vier Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert.
- 3. Das gewaschene Zellpellet wurde danach in ein Becherglas aus Punkt 1 überführt und das Zentrifugenröhrchen noch einmal mit RO-H₂O ausgespült und die Suspension ebenfalls in dasselbe Becherglas überführt.
- 4. Das Zellpellet im Becherglas wurde danach für 24 h im Trockenschrank bei 105 °C getrocknet und nach Abkühlung auf Raumtemperatur (im Exsikkator) ausgewogen, um so das Bruttogewicht zu ermitteln.

3.6.2 Berechnung der Wachstumsparameter

3.6.2.1 Biomassekonzentration

Zur Berechnung der BTS Konzentration in g I^{-1} wurde die Differenz der Becherglasmasse (Δm) vor und nach Hinzufügen des Zellpellets herangezogen und durch das verwendete Probevolumen in Liter (V_{Probe}) geteilt.

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

Formel 2: Berechnung der BTS-Konzentration x

3.6.2.2 Berechnung der Gesamtbiomasse X

X gibt die gesamte im Bioreaktor vorhandene Biomasse in g an. Dazu wird die Biomassekonzentration (x) mit dem im Bioreaktor vorhandenen Volumen (V_{Reaktor}) multipliziert.

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

Formel 3: Berechnung der Gesamtbiomasse X

3.6.2.3 Berechnung der spezifischen Wachstumsrate µ

Die spezifische Wachstumsrate (μ) beschreibt die Proportionalität der Geschwindigkeit der Veränderung der Zellmasse pro Zeiteinheit zur Zellmasse X bei exponentiellem Wachstum einer Kultur.X steht in der Formel fu \Box r die trockene Biomassekonzentration in g, die Indizes 2 und 1 symbolisieren zwei unterschiedliche Probenahmezeitpunkte und Δt [h] steht fu \Box r die Zeit, die zwischen den Probenahmen verstrichen ist.

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

Formel 4: Berechnung der spezifischen Wachstumsrate µ

3.6.3 Nicht-ausblasbarer organischer Kohlenstoff (NPOC) und Gesamtstickstoffgehalt (TN)

Material:

1000 ml, 250 ml, 100 ml, 50 ml Messkolben

5 ml Messpipetten

25 ml, 10 ml, 5 ml Vollipetten

Pipettierhilfe

20 ml TOC Röhrchen (Shimadzu) mit passendem Schraubverschluss

Verschlussfolie (Nescofilm, Firma Roth)

Dispenser (Firma Brand)
Analysenwaage, Präzision 0,0001 g
Shimadzu TOC-L_{CPH/CPN} analyzer
Shimadzu ASI-L autosampler
Kaliumhydrogenphtalat p.A. (im Exsikkator getrocknet)
Kaliumnitrat p.A. (im Exsikkator getrocknet)
RO-H₂O

3.6.3.1 Erstellen der Kalibrationsgerade für TC/NPOC

- 2,125 g im Exsikkator getrocknetes Kaliumhydrogenphtalat wurden in einem 100 ml Messkolben eingewogen und mit RO-H₂O gelöst. Diese Stammlösung entspricht 2000 mg l⁻¹ C Standardlösung.
- 2. Herstellung der Verdünnungen:
 - a. 1000 mg l⁻¹ C: 50 ml der Stammlösung mit 50 ml RO-H₂O mischen
 - b. 500 mg l⁻¹ C: 50 ml der 1000 mg l⁻¹ C mit 50 ml RO-H₂O mischen
 - c. $250 \text{ mg I}^{-1} \text{ C}$: 50 ml der 500 mg I $^{-1} \text{ C}$ mit 50 ml RO-H₂O mischen
- Die Lösungen wurden gut geschüttelt. Je 20 ml der Lösungen wurden in ein TOC-Röhrchen transferiert, mit Verschlussfolie abgedichtet und mit Schraubverschluss verschlossen.
- 4. Danach wurden die Röhrchen in abfallender Konzentration im Autosampler positioniert und die Lösungen gemessen um eine Kalibrationsgerade zu erstellen.

3.6.3.2 Erstellen der Kalibrationsgerade für TN

- 1,103 g im Exsikkator getrocknetes Natriumcarbonat und 0,875 g im Exsikkator getrocknetes Natriumhydrogencarbonatwurden in einem 250 ml Messkolben eingewogen und mit RO-H₂O gelöst. Diese Stammlösung entspricht 1000 mg l⁻¹ N Standardlösung.
- 2. Herstellung der Verdünnungen:
 - a. 500 mg l⁻¹ C: 50 ml der Stammlösung mit 50 ml RO-H₂O mischen
 - b. $250 \text{ mg I}^{-1} \text{ C}$: 50 ml der 500 mg I $^{-1} \text{ C}$ mit 50 ml RO-H₂O mischen
 - c. 100 mg l⁻¹ C: 10 ml der 500 mg l⁻¹ C mit 90 ml RO-H₂O mischen
- Die Lösungen wurden gut geschüttelt. Je 20 ml der Lösungen wurden in ein TOC-Röhrchen transferiert, mit Verschlussfolie abgedichtet und mit Schraubverschluss verschlossen.
- 4. Danach wurden die Röhrchen in abfallender Konzentration im Autosampler positioniert und die Lösungen gemessen um eine Kalibrationsgerade zu erstellen.

3.6.3.3 Vorbereitung und Messung der Proben

- 1. 4 ml aus dem Überstand aus Probenahme wurde in einem 20 ml TOC-Röhrchen mit RO-H₂O verdünnt.
- 2. Die Röhrchen wurden mit Verschlussfolie und dem passenden Schraubverschluss verschlossen und in den Autosampler gestellt.
- 3. Danach wurde das Messprogramm gestartet, welches die Kalibrationsgeraden aus Erstellen der Kalibrationsgerade für TC/NPOC und Erstellen der Kalibrationsgerade für TN für die Berechnung der Konzentration und die Parameter ausTabelle 7verwendete.

Tabelle 7: Parameter der NPOC/TN Bestimmung

System	TOC-L mit ASI			
Einheit	mg l ⁻¹			
Manuelle Verdünnung	5			
Automatische Verdünnung	10			
Anzahl der Injektionen	3/5			
Anzahl der Waschgänge	2			
Maximale Standardabweichung	0,1			
Maximaler Variationskoeffizient	2,0 %			
Säurezugabe	1,5 %			
Begasungszufluss	80 ml			
Begasungszeit	600 Sekunden			
Injektionsvolumen	40 μΙ			

3.6.4 Ergebnisse der Kalibration NPOC & TN

Tabelle 8: Messwerte für die Kalibrationsgerade NPOC

	Messwerte [A	Area]		Standardabweichung	
Konzentration	I	II	III	Mittelwert	[Area]
2000 mg l ⁻¹	2134	2120	2131	2128,3	7,4
1000 mg l ⁻¹	1001	1018	1017	1012,0	9,5
500 mg l ⁻¹	498,9	504,3	500,3	501,2	2,8
250 mg l ⁻¹	238,1	238,8	239,8	238,9	0,9

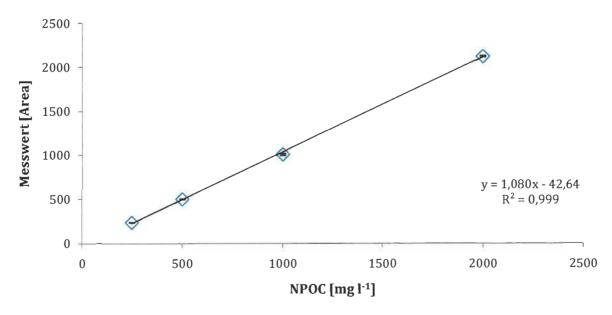


Abbildung 9: Kalibrationsgerade NPOC

Formel 5: Gleichung der Kalibrationsgerade NPOC

$$y = 1,0803 * x - 42,648$$

$$R^2 = 0,99957$$

Tabelle 9: Messwerte für die Kalibrationsgerade TN

	Messwerte [A	Area]	Standardabweichung		
Konzentration	T	П	III	Mittelwert	[Area]
1000 mg l ⁻¹	2094	2095	2094	2094,3	0,6
500 mg l ⁻¹	1059	1058	1055	1057,3	2,1
250 mg l ⁻¹	525,8	525	527,1	526,0	1,1
100 mg l ⁻¹	208,9	205,6	205,3	206,6	2,0

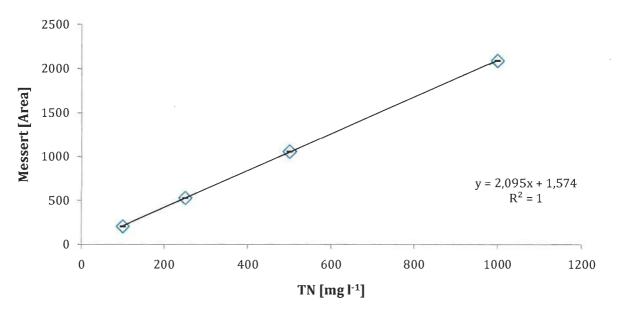


Abbildung 10: Kalibrationsgerade TN

Formel 6: Gleichung der Kalibrationsgerade TN

$$y = 2,0958 * x + 1,5743$$

$R^2 = 0,99996$

3.6.5 Bestimmung der Glukose mittels HPLC

Material:

Einweg Filter 0,22 μm Plastikspritze 2 ml GC/HPLC Vials

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, 25 °C

Software: Agilent ChemStation, Revision B.04.01.

3.6.5.1 Kalibration

Mittels Standardlösungen wurde eine Kalibrationsgerade von 100 mg l⁻¹ und 2000 mg l⁻¹ erstellt. Vor und nach jeder Analysenserie wurden Standards bestimmter Konzentrationen zur Überprüfung der Kalibration bzw. des HPLC Systems mitanaylsiert.

3.6.5.2 Probenvorbereitung und Messung

Aus dem Überstand der Probenahme wurde ca. ein ml mit RO- H_2 O Wasser 1:10 verdünnt und danach mit einem 0,22 μ m Filter in ein GC/HPLC Vial filtriert und verschlossen. Die Proben wurden danach in der HPLC mit den Parametern aus Tabelle 10anaysiert.

Tabelle 10: Parameter Glukosebestimmung mittels HPLC

Fließrate	0,45 ml min ⁻¹
Laufmittel	0,005 M Schwefelsäure
Injektionsvolumen	20 μΙ

3.6.6 Squalenbestimmung

3.6.6.1 Gefriertrocknung (Lyophilisation)

Material:

50 ml Proberöhrchen mit gewaschenem Pellet, gelagert bei -20 °C Gefriertrockner Polycarbonatbehälter

Methode:

- 1. Die Polycarbonatbehälter wurden mit den Proberöhrchen aus dem -20 °C Kühlraum befüllt. Dabei wurden die Deckel der Proberöhrchen leicht aufgeschraubt.
- 2. Die Behälter mit den Proberöhrchen wurden danach an den Gefriertrockner angeschlossen. Die Ventile blieben noch verschlossen.
- 3. Der Gefriertrockner wurde eingeschaltet um eine Temperatur von -75 °C und einen Druck von unter 1 mbar zu erreichen. Danach wurden die Ventile zu den Behältern geöffnet um den Trocknungsvorgang zu starten.
- 4. Die Proben wurden über Nacht, im besten Fall 24 Stunden, getrocknet.
- 5. Nach Abschluss der Trocknung wurden die Ventile langsam geöffnet. Die Proberöhrchen wurden wieder fest verschlossen und, falls nicht gleich weiterverarbeitet, bei -20 °C gelagert.

3.6.6.2 Squalenextraktion

Material:

ca. 100 mg gefriergetrocknetes Pellet (auf 0,1 mg genau eingewogen) 10 ml Pyrexröhrchen mit Schraubverschluss mit Butyl-Teflon Dichtung GC/HPLC Vial ca. 2 ml mit Verschluss mit Butyl-Teflon Dichtung 50 ml Glaspipette

Pipettierhilfe

Pasteurpipetten

Wasserbad (50 °C)

Ultraschallbad

Vortexer

Eppendorf Zentrifuge 5804, Rotor Eppendorf A-4-44 10 % (w/v) KOH in 75 % (v/v) Ethanol, auf Raumtemperatur temperiert n-Hexan mit 200 mg l⁻¹ Octadecan

Methode:

- 1. Von jedem gefriergetrocknetem Pellet wurden ca. 100 mg in ein 10 ml Pyrexröhrchen abgewogen und der Wert, auf 0,1 mg genau, notiert.
- 2. Zu jedem Pellet wurden anschließend 4 ml 10 % KOH-Lösung hinzugefügt und gevortext.
- 3. Danach wurde das Gemisch im Ultraschallbad für fünf Minuten behandelt um eine Lösung ohne Klumpen zu erhalten. Wenn nötig wurde immer wieder kurz gevortext.
- 4. Die Proben wurden danach für 15 Minuten in ein 50 °C warmes Wasserbad gestellt.
- 5. Danach wurde den Proben 4 ml n-Hexan mit Octadecan als internem Standard hinzugefügt.
- 6. Nach weiteren fünf Minuten im Ultraschallbad wurden die Proben 10 Minuten per Hand geschüttelt.
- 7. Abschließend wurden die Röhrchen bei 5000 rpm 5 Minuten zentrifugiert und ca. 1 ml der Hexan-Schicht in ein GC/HPLC Vial überführt und verschlossen.

3.6.6.3 GC-MS Messung

Material:

GC/HPLC Vials

100 ml Messkolben

Kolbenhubpipette 1000 µl mit passenden Pipettenspitzen

n-Hexan (Mallinckrodt, LOT 4159KHTN, CAS 110-54-3)

Octadecan (99%, AlfaAesar, LOT D11Z007, CAS 593-45-3)

Squalen (>98%, Sigma, LOT 120M1635V, CAS 111-02-4)

Agilent Technologies 7890A GC-System

Agilent Techologies 7693 Autosampler

Agilent Technologies 5975C inert MSD mit Triple-Axis Detector

3.6.6.3.1 Kalibration und Messung

- 1. Zur Bestimmung des Squalengehalts wurde die Methode der 'Quantifizierung mittels internem Standard'durchgeführt. Der int. Standard, Octadecan, wurde direkt mit der Prüfsubstanz, Squalen, vermischt und gemeinsam analysiert.
- 2. 23 μl Squalen (Dichte: 0,86 g ml⁻¹) und 20,88 mg Octadecan wurden in 100 ml Hexan gelöst.
- 3. Von der so hergestellten Kalibrierlösung erhält man ein Chromatogramm, das mit den Parametern aus Tabelle 11erstellt wurde. Daraus konnte mit der eingewogenen Masse der Pru□fsubstanz (m_{Kal-STD}) und von der Masse desStandards (m_{ISTD}) bzw. der erhaltenen Peakfläche der Pru□fsubstanz (A_{Kal-STD}) und der Peakfläche desStandards (A_{ISTD}) der Methodenfaktor laut Formel 7berechnetwerden.
- 4. Danach wurden die GC/HPLC Vials derSqualenextraktionunter gleichen Bedingungen wie oben gemessen. Man erhält danach die Peakfläche von der Standardsubstanz A_{ISTD} und die Peakfläche von der Pru⊡fsubstanz A_{Kal-STD}. Die Berechnung des Massenanteils von Squalen erfolgt gemäß Formel 8.

Formel 7: Berechnung GC Methodenfaktor

$$MF = \frac{A_{ISTD} * m_{kal-STD}}{A_{kal-STD}} * m_{ISTD}$$

Formel 8: Berechnung Massenanteil Squalen

$$W_{Pr} = \frac{MF * A_{Pr} * m_{ISTD}}{A_{ISTD} * m_{Pr}} * 100\%$$

Tabelle 11: Parameter der Methode "Squalen_100m"

<u>Ofenprogramm</u>	
Laufzeit	38 min
Injektionsvolumen	2 µl
Lösungsmittel zum Ausspülen der Spritze	n-Hexan
Waschgänge vor der Injektion, je 8 μΙ	1
Waschgänge nach der Injektion, je 8 μΙ	3
Splitmodus	splitless
MSD Einstellungen (MSD 5975C)	
Solvent delay	17 min
Aq. Mode Scan	35 – 550 m Z ⁻¹ ; 2,83 scans sek ⁻¹
MS _{Source}	230 °C
MS _{Quadrupole}	150 °C

3.6.6.3.2 Messung und Berechnung Methodenfaktor GC MS

Tabelle 12: Messwerte zur Bestimmung Methodenfaktor GC MS

Substanz	Messung [Area]			Standardabweichung	
	I	I II III Mittelwert			
Ocatadecan	742033541	724204608	705520242	723919463,7	14907855,46
Squalen	1202326076	1180183163	1213734493	1198747911	13928995,81

 $m_{Kal-STD} = 19,78 \text{ mg}$

 $m_{ISTD} = 20,88 \text{ mg}$

 $A_{Kal-STD} = 1198747911$

 $A_{ISTD} = 723919463,7$

MF = 0,57 (Berechnung nach Formel 7)

Abundance

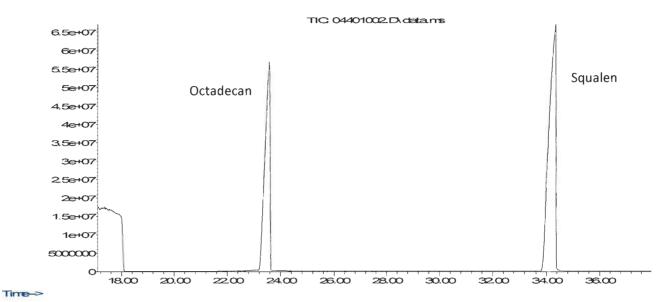


Abbildung 11:Chromatogramm der GC-MS Messung der Kalibrierlösungen zur Bestimmung des Methodenfaktors

4 Versuche und Ergebnisse

Alle Daten zu den einzelnen Grafiken finden sich im Anhang A.

4.1 Versuchsverläufe bei unterschiedlichen Temperaturstufen

4.1.1 Versuche bei 25 °C

	pH Wert	pO ₂ [%]	Temperatur [°C]
V12	5,5	30	25
V13	7	30	25
V14	6,25	40	25
V15	5,5	50	25
V16	7	50	25

4.1.1.1 Biomassewachstum bei 25 °C

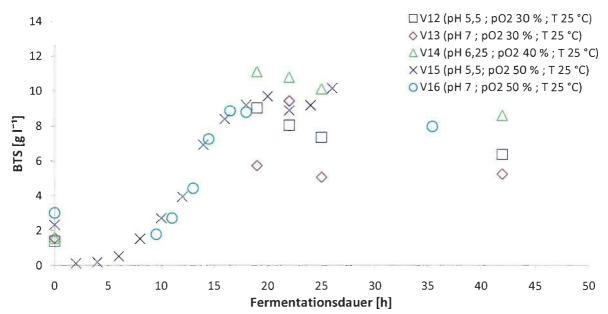


Abbildung 12: Biomassewachstum der Versuche bei 25 °C; V12(□) V13(♦) V14(△) V15(☼) V16(○)

4.1.1.2 Squalengehalt bei 25 °C

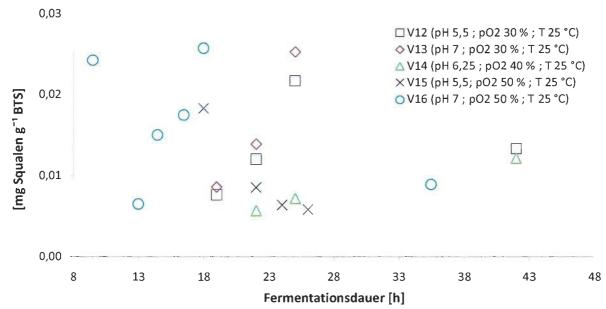


Abbildung 13: Squalengehalt der Versuche bei 25 °C; V12(□) V13(♦) V14(△) V15(☎) V16(○)

4.1.2 Versuche bei 22,5 °C

	pH Wert	pO ₂ [%]	Temperatur [°C]
V6	6,25	30	22,5
V7	5,5	40	22,5
V8	6,25	40	22,5
V 9	6,25	40	22,5
V10	7	40	22,5
V11	6,25	50	22,5

4.1.2.1 Biomassewachstum bei 22,5 °C

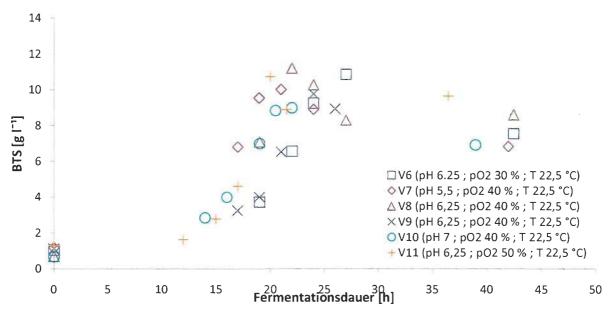


Abbildung 14: Biomassewachstum der Versuche bei 22,5 °C; V6(□) V7(\diamondsuit) V8(\triangle) V9(\varnothing) V10(\bigcirc) V11(\diamondsuit)

4.1.2.2 Squalengehalt bei 22,5 °C

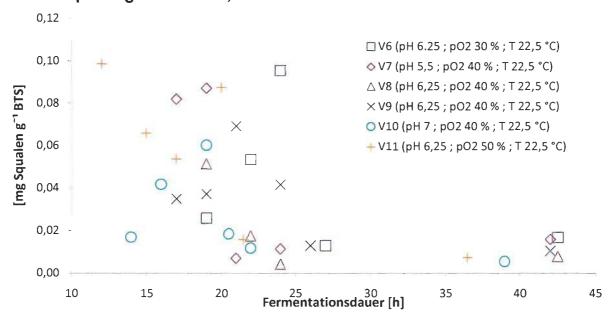


Abbildung 15: Squalengehalt der Versuche bei 22,5 °C; V6(□) V7(♦) V8(△) V9(☼) V10(♦) V11(♣)

4.1.3 Versuche bei 20 °C

	pH Wert	pO ₂ [%]	Temperatur [°C]
V1	5,5	30	20
V2	7	30	20
V3	6,25	40	20
V4	5,5	50	20
V5	7	50	20

4.1.3.1 Biomassewachstum bei 20 °C

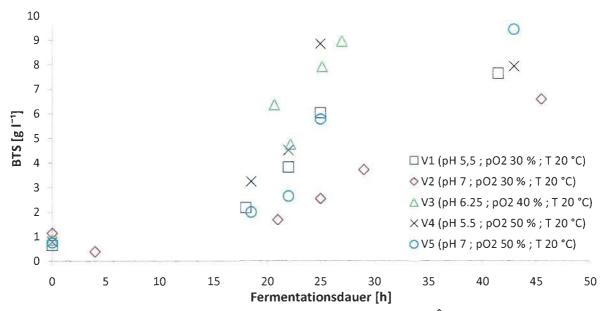


Abbildung 16: Biomassewachstum der Versuche bei 20 °C; V1(□) V2(♦) V3(△) V4(☼) V5(○)

4.1.3.2 Squalengehalt bei 20 °C

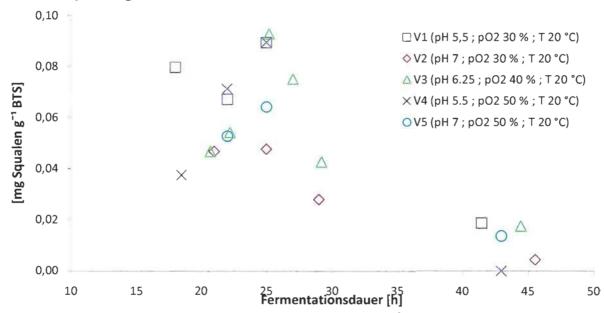


Abbildung 17: Squalengehalt der Versuche bei 20 °C; V1(□) V2(♦) V3(△) V4(੩) V5(੦)

4.2 Versuchsverlauf bei unterschiedlichen pH-Stufen

4.2.1 Versuche bei pH 7

	pH Wert	pO ₂ [%]	Temperatur [°C]
V2	7	30	20
V5	7	50	20
V10	7	40	22,5
V13	7	30	25
V16	7	50	25

4.2.1.1 Biomassewachstum bei pH 7

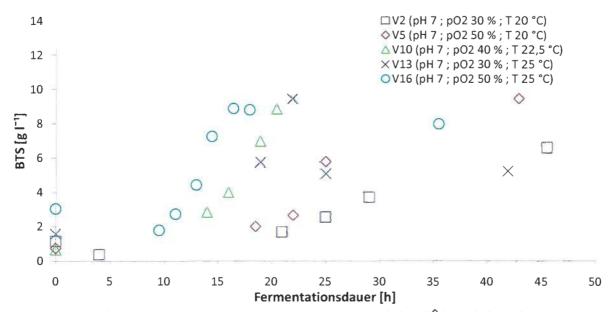


Abbildung 18:Biomassewachstum der Versuche bei pH 7; V2(□) V5(♦) V10(△) V13(ℑ) V16(○)

4.2.1.2 Squalengehalt bei pH 7

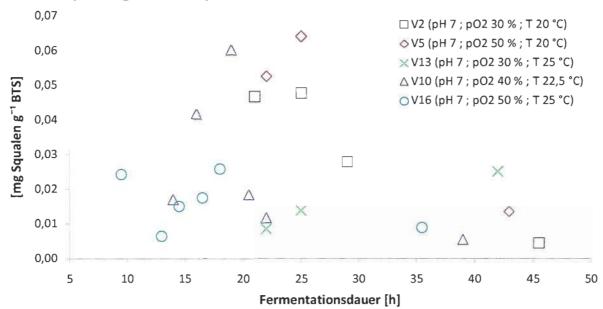


Abbildung 19: Squalengehalt der Versuche bei pH 7; V2(□) V5(♦) V10(△) V13(ℑ) V16(੦)

4.2.2 Versuche bei pH 6,25

	pH Wert	pO ₂ [%]	Temperatur [°C]
V3	6,25	40	20
V6	6,25	30	22,5
V8	6,25	40	22,5
V9	6,25	40	22,5
V11	6,25	50	22,5
V14	6,25	40	25

4.2.2.1 Biomassewachstum bei pH 6,25

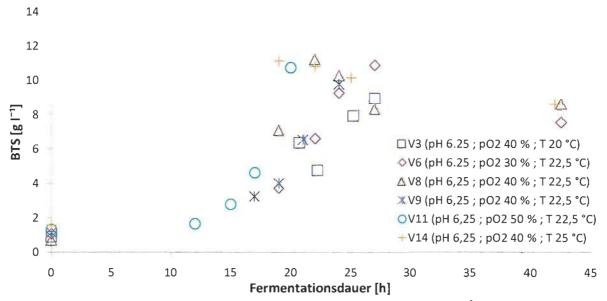


Abbildung 20: Biomassewachstum der Versuche bei pH 6,25; V3(\Box) V6(\diamondsuit) V8(\triangle) V9(\varnothing) V11(\bigcirc) V14(\diamondsuit)

4.2.2.2 Squalengehalt bei pH 6,25

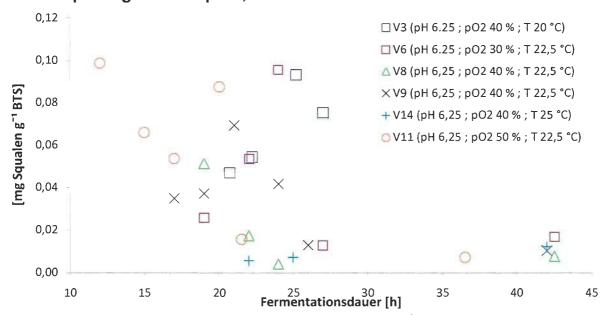


Abbildung 21: Squalengehalt der Versuche bei pH 6,25; V3(□) V6(♦) V8(△) V9(☼) V11(♦)

4.2.3 Versuche bei pH 5,5

	pH Wert	pO ₂ [%]	Temperatur [°C]
V1	5,5	30	20
V4	5,5	50	20
V7	5,5	40	22,5
V12	5,5	30	25
V15	5,5	50	25

4.2.3.1 Biomassewachstum bei pH 5,5

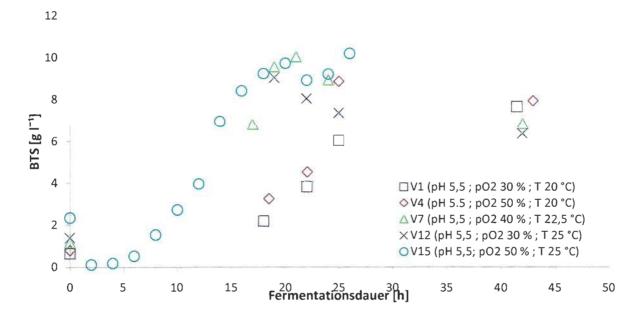


Abbildung 22: Biomassewachstum der Versuche bei pH 5,5; V1(□) V4(♦) V7(△) V12(☎) V15(○)

4.2.3.2 Squalengehalt bei pH 5,5

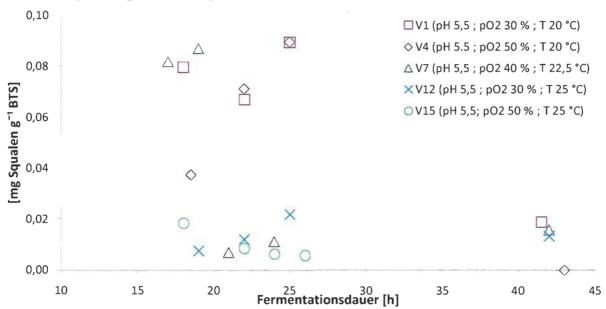


Abbildung 23: Squalengehalt der Versuche bei pH 5,5; V1(□) V4(♦) V7(△) V12(☎) V15(○)

4.3 Versuchsverlauf bei unterschiedlichen mindestpO₂Konzentrationen

4.3.1 Versuche bei einer mindest-pO₂Konzentration von 50 %

	pH Wert	pO ₂ [%]	Temperatur [°C]
V4	5,5	50	20
V5	7	50	20
V11	6,25	50	22,5
V15	5,5	50	25
V16	7	50	25

4.3.1.1 Biomassewachstum bei einer mindest-pO₂ Konzentration von 50 %

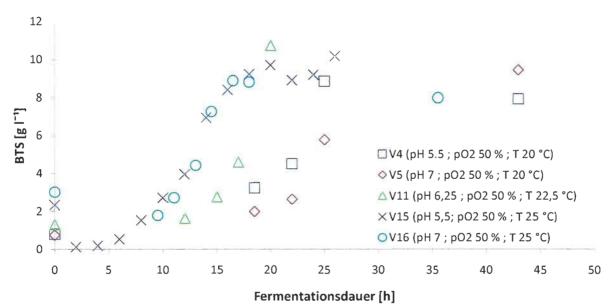


Abbildung 24: Biomassewachstum der Versuche bei einer mindest-pO₂ Konzentration von 50 %; V4(□) V5(♦) V11(△) V15(ℍ) V16(♦)

4.3.1.2 Squalengehalt bei einer mindest-pO₂ Konzentration von 50 %

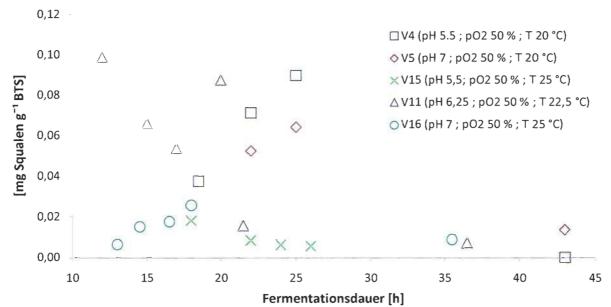


Abbildung 25: Squalengehalt der Versuche bei einer mindest-pO₂ Konzentration von 50 %; V4(□) V5(♦) V11(△) V15(ℂ) V16(੦)

4.3.2 Versuche bei einer mindest-pO₂Konzentration von 40 %

	pH Wert	pO ₂ [%]	Temperatur [°C]
V3	6,25	40	20
V7	5,5	40	22,5
V8	6,25	40	22,5
V9	6,25	40	22,5
V10	7	40	22,5
V14	6,25	40	25

4.3.2.1 Biomassewachstum bei einer mindest-pO₂ Konzentration von 40 %

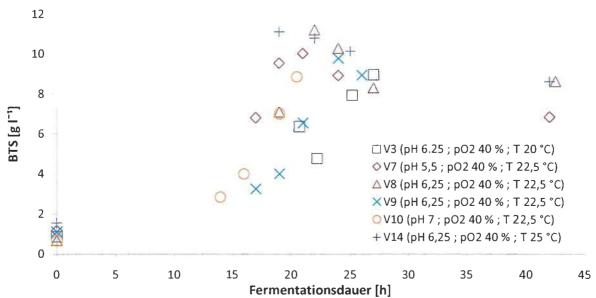


Abbildung 26: Biomassewachstum der Versuche bei einer mindest-pO₂Konzentration von 40 %; V3(□) V7(♦) V8(△) V9(੩) V10(੦) V14(♣)

4.3.2.2 Squalengehalt bei einer mindest-pO₂ Konzentration von 40 %

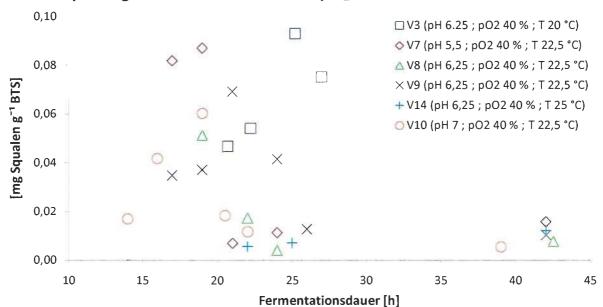


Abbildung 27: Squalengehalt der Versuche bei einer mindest-pO₂Konzentration von 40 %; V3(□) V7(◇) V8(△) V9(窓) V10(○) V14(�)

4.3.3 Versuche bei einer mindest-pO₂Konzentration von 30 %

	pH Wert	pO ₂ [%]	Temperatur [°C]
V1	5,5	30	20
V2	7	30	20
V6	6,25	30	22,5
V12	5,5	30	25
V13	7	30	25

4.3.3.1 Biomassewachstum bei einer mindest-pO₂ Konzentration von 30 %

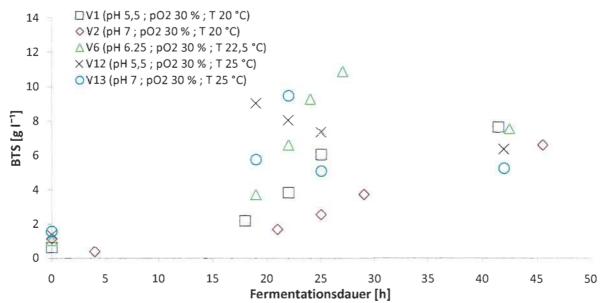


Abbildung 28: Biomassewachstum der Versuche bei einer mindest-pO $_2$ Konzentration von 30 %; V1(\square) V2(\diamondsuit) V6(\triangle) V12(\otimes) V13(\bigcirc)

4.3.3.2 Squalengehalt bei einer mindest-p O_2 Konzentration von 30 %

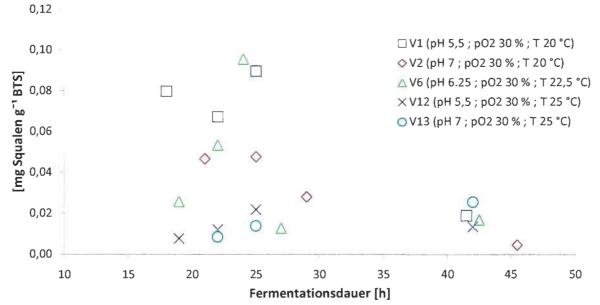


Abbildung 29: Squalengehalt der Versuche bei einer mindest-pO $_2$ Konzentration von 30 %; V1(\square) V2(\diamondsuit) V6(\triangle) V12(\otimes) V13(\bigcirc)

4.4 Auswertung Versuchsplan

Tabelle 13: Versuchsplan mit erhaltenen Ergebnissen der Zielgrößen

_	рН	pO ₂	Temperatur	BTS	Squalen	Wachstumsrate	
		[%]	[°C]	[g l ⁻¹]	[mg Squalen g ⁻¹ BTS]	[h ⁻¹]	
V1	5.5	30	20	24.2	0,089	0.145	
V2	7	30	20	14.92	0,048	0.091	
V3	6.25	40	20	35.88	0,087	0.197	
V4	5.5	50	20	35.44	0,090	0.154	
V5	7	50	20	23.12	0,064	0.163	
V6	6.25	30	22.5	43.48	0,053	0.134	
V7	5.5	40	22.5	40.12	0,087	0.170	
V8	6.25	40	22.5	44.84	0,051	0.153	
V9	6.25	40	22.5	39.16	0,069	0.175	
V10	7	40	22.5	35.44	0,060	0.175	
V11	6.25	50	22.5	42.92	0,066	0.236	
V12	5.5	30	25	36.16	0,022	0.256	
V13	7	30	25	37.84	0,025	0.218	
V14	6.25	40	25	44.44	0,012	0.261	
V15	5.5	50	25	38.84	0,018	0.252	
V16	7	50	25	35.52	0,026	0.281	

Tabelle 14: Regressionskoeffizienten der einzelnen Variablen für BTS, Squalengehalt und Wachstumsrate

β	Variablen	BTS [g l ⁻¹]			Squalen [mg Squalen g ^{-₁} BTS]			Wachstumsrate [h ⁻¹]		
		Schätzung	t - Wert	p - Wert	Schätzung	t - Wert	p - Wert	Schätzung	t - Wert	p - Wert
β_0	Achsenabschnitt	43,761	32,93	0,0001*	0,064	13,67	0,0001	0,182	14,37	<u>0,0001</u>
β1	[pH]	-2,792	-3,15	0,0199	-0,008	-2,65	0,0380	-0,005	-0,58	0,5824
β ₂	[pO ₂]	1,924	2,17	0,0733	0,003	0,86	0,4216	0,024	2,87	0,0285
β3	Temperatur [T]	5,924	6,67	0,0005	-0,028	-8,78	0,0001	0,052	6,14	0,0009
β ₁₂	[pH] x [pH]	-6,862	-3,97	0,0074	0,007	1,21	0,2707	-0,018	-1,08	0,3208
β ₁₃	[pH] x [pO ₂]	-1,01	-1,01	0,3503	0,003	0,71	0,5020	0,016	1,72	0,1356
β ₂₃	[pO ₂] x [pO ₂]	-1,442	-0,83	0,4361	-0,007	-1,08	0,3204	-0,005	-0,32	0,7590
β ₁₁	[pH] x [T]	2,495	2,51	0,0456	0,010	2,79	<u>0,0318</u>	0,005	0,48	0,6501
β22	[pO ₂]x [T]	-2,385	-2,40	0,0531	-0,003	-0,71	0,5020	-0,003	-0,29	0,7804
β_{33}	[T] x [T]	-4,482	-2,59	<u>0,0411</u>	-0,017	-2,72	<u>0,0345</u>	0,039	2,36	0,0565

^{*} Signifikante Koeffizienten (p < 0,05) wurden unterstrichen

Die Messergebnisse wurden mittels nicht-linearer Regressionsanalyse ausgewertet und die erhaltenen Regressionskoeffizienten über eine Polynomfunktion 2. Grades miteinander in Beziehung gebracht.

Tabelle 15: Vorhersageformel und statistische Kontrollverfahren

	Modell (nach Formel 1)	R ²	F - Test
BTS	43,761 – 2,792 [pH] + 1,924 [pO ₂] + 5,924 [T] – 6,862 [pH] x	0,9546	14,0176
[g I ⁻¹]	$[pH] - 1,005 [pH] \times [pO_2] - 1,442 [pO_2] \times [pO_2] + 2,495 [pH]$		
	x [T] - 2,385 [pO ₂] x [T] - 4,482 [T] x [T]		
Squalen	$0.064 - 0.008 \text{ [pH]} + 0.003 \text{ [pO}_2 - 0.028 \text{ [T]} + 0.007 \text{ [pH]} \text{ x}$	0,947	11,753
[mg Squalen g ⁻¹ BTS]	$[pH] + 0,003 [pH] \times [pO_2] - 0,007 [pO_2] \times [pO_2] + 0,010 [pH]$		
	x [T] - 0,003 [pO2] x [T] - 0,017 [T] x [T]		
Wachstumsrate	$0.182 - 0.005 \text{ [pH]} + 0.024 \text{ [pO}_2\text{]} + 0.052 \text{ [T]} - 0.018 \text{ [pH]} \text{ x}$	0,9022	6,1499
[h ⁻¹]	$[pH] +0.016 [pH] \times [pO_2] -0.005 [pO_2] \times [pO_2] +0.005 [pH]$		
	x [T] - 0,003 [pO2] x [T] + 0,039 [T] x [T]		

Die Vorhersageformeln stellen eine optimale Anpassung an die erhaltenen Messwerte dar. Aufgrund der Tatsache, dass jeder Versuch nur einmal durchgeführt wurde sind keine Daten über eine statistische Reproduzierbarkeit vorhanden. Die statistischen Tests der Varianzanalyse beziehen sich nur auf die Vorhersageformeln und deren Anpassung an die Messwerte.

Tabelle 16: Vorhersagewerte für die optimierten Bedingungen

	рН	pO ₂	Temperatur	Vorhersagewerte
BTS	6,2	42,3 %	23,9 °C	45,83 [g l ⁻¹]
Squalen	5,5	41,3 %	20 °C	0,101 [mg Squalen g ⁻¹ BTS]
Wachstumsrate	6,6	50 %	25 °C	0,29 [h ⁻¹]

4.5 Wirkungsflächendiagramme

Die Wirkungsflächendiagramme sind die grafische Darstellung der Vorhersageformeln. Dabei wurden jeweils zwei Faktoren und eine Zielgröße in Verbindung gebracht.

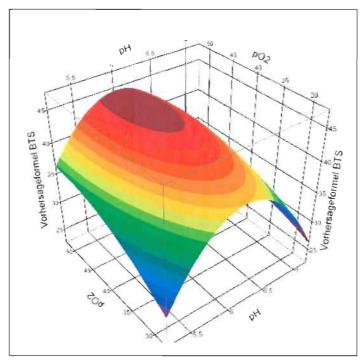


Abbildung 30: Wirkungsflächendiagramm der Vorhersageformel BTS als Funktion der Variablen pO_2 und pH

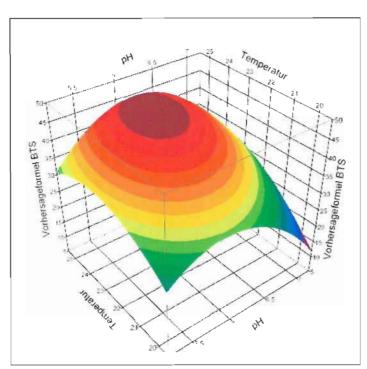


Abbildung 31: Wirkungsflächendiagramm der Vorhersageformel BTS als Funktion der Variablen Temperatur und pH

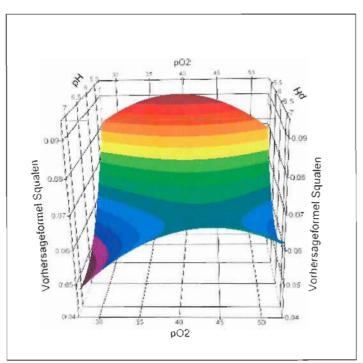


Abbildung 32: Wirkungsflächendiagramm der Vorhersageformel Squalen als Funktion der Variablen pO2 und pH

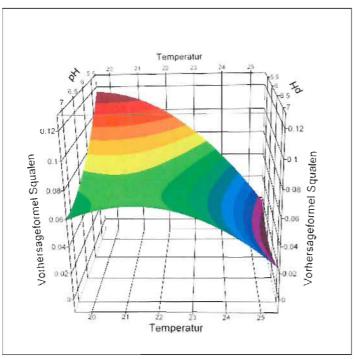


Abbildung 33: Wirkungsflächendiagramm der Vorhersageformel Squalen als Funktion der Variablen Temperatur und pH

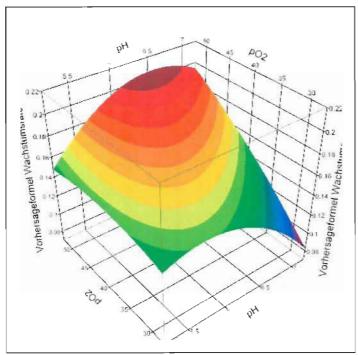


Abbildung 34: Wirkungsflächendiagramm der Vorhersageformel Wachstumsrate als Funktion der Variablen pO2 und pH

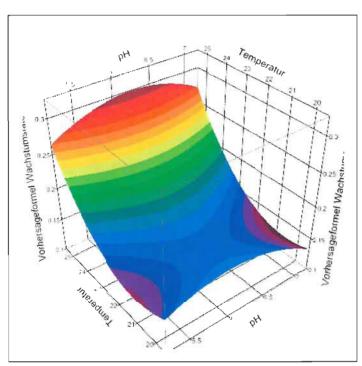


Abbildung 35: Wirkungsflächendiagramm der Vorhersageformel Wachstumsrate als Funktion der Variablen Temperatur und pH

5 Diskussion

5.1 Einfluss der Medienzusammensetzung

5.1.1 Kohlenstoffquelle

In der Literatur wird beschrieben, dass *Aurantiochytrium limacinum* SR 21 zahlreiche Kohlenstoffquellen verwerten kann. Unter anderem werden dabei Glukose, Fructose, Saccharose, Laktose, Glyzerin, Acetat, Ölsäure und Leinöl beschrieben, wobei das Wachstum bei Monosacchariden am höchsten ist. (Rappel 2013; Yokochi et al. 1998)

Für diese Arbeit wurde Glukose als Kohlenstoffquelle und eine Konzentration von 20 g l⁻¹ im Batchmedium gewählt. Diese Auswahl basierte auf der Vorarbeit vonHiller (2013), die ebenfalls mit Glukose durchgeführt wurde. Glukose ist als Arbeitsmittel praktisch zu handhaben, weil das Monosaccharid nicht toxisch, leicht verfügbar und einfach in der Handhabung ist. Dennoch bleiben mögliche Alternativen zu Glukose für die großtechnische Produktion von Squalen mit *A. limacinum* bestehen.

Die Restsubstratanalysen zeigen, dass die Glukose im Laufe der Fermentation vollständig abgebaut wird. Bei Probenahmen, bei denen keine Glukose mehr nachweisbar war, konnte dennoch immer ein NPOC-Wert von ca. 1000 mg l⁻¹ gemessen werden. Diese Auffälligkeit findet sich auch in der Arbeit von Hiller (2013) und kann mit dem Vorhandensein von C-Molekülen in den komplexen Stickstoffquellen Hefeextrakt bzw. Pepton erklärt werden. DieAbbildung 36 zeigt die Restsubstratanalysen eines ausgewählten Versuches und zeigt den vollständigen Abbau der Glukose bei gleichzeitigem Vorhandensein von NPOC.

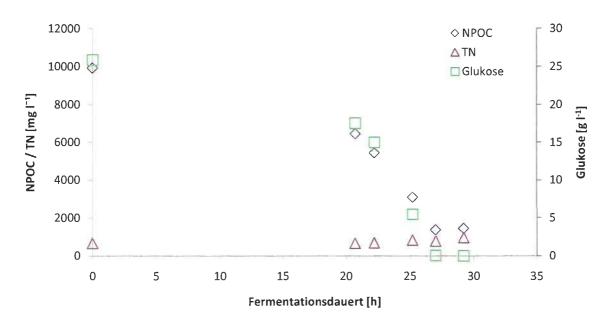


Abbildung 36: Restsubstratanalyse des Versuchslaufs V3 (pH 6,25; pO₂ 40 %, 20 °C); Glukose (□) NPOC (♦) TN (△)

5.1.2 Stickstoffquelle

Aurantiochytriden sind in der Lage unterschiedliche Stickstoffquellen zu verwerten. Generell können diese in definierte und komplexe Stickstoffquellen unterteilt werden. Definierte N-Quellen sind Stoffe auf einzel-molekularer Basis, die chemisch genau definiert sind, wie z.B. Ammonium oder Nitrat. Komplexe Stickstoffquellen hingegen enthalten auch organische Bestandteile und sind daher chemisch nicht genau definiert. Beispiele für komplexe Stickstoffquellen sind Pepton, Hefeextrakt oder auch Maisquellwasser (Chen et al. 2010).

Hefeextrakt und Pepton aus Kasein dienten in dieser Arbeit als Stickstoffquellen mit einer Konzentration von jeweils 8 g l⁻¹ im Batchmedium. Auch diese Wahl beruhte auf den Erfahrungen der Vorarbeit von Hiller (2013).

Die Restsubstratanalysen zeigen, dass Stickstoff nicht in limitierender Menge vorliegt. Im Laufe der Fermentation steigen die Werte der TN-Messungen leicht an. Für dieses Phänomen konnte keine Erklärung gefunden werden.

5.1.3 ASW Konzentration

Künstliches Meerwasser wird bei der Arbeit mit *Thraustochytriden* als Medienkomponente zur Optimierung des osmotischen Drucks verwendet. Für bestmögliche Wachstumsbedingungen testeten Nagano et al. (2009)ASW Konzentrationen von 0 bis 200 %. Wie in Abbildung 37 zu

sehen ist, ist eine ASW Konzentration von 50 % optimal. Auch die Zusammensetzung und die essentiellen Salze im künstlichen Meerwasser als Medienkomponente wurden in der gleichen Arbeitvon Nagano et al. (2009)erforscht.

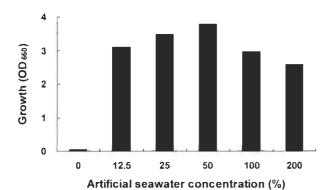


Abbildung 37: Einfluss der ASW Konzentration auf das Wachstum von Aurantiochytrium limacinum mh0186(Nagano et al. 2009)

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zusammensetzung bzw. die Endkonzentration von 50 % des künstlichen Meerwassers in allen Medien auf Grundlage dieser Erkenntnisse und der Vorarbeiten von Hiller (2013) und Rappel (2013) eingesetzt.

5.2 Einfluss des pH Wertes auf Wachstum und Squalenproduktion

In den durchgeführten Versuchsläufen wurden pH Stufen zwischen 5,5 und 7 eingestellt. Die Regulierung des pH Werts erfolgte unter Zugabe von Phosphorsäure (10 % (v/v)) und Ammoniak (12,5 % (v/v)) über die computergesteuerte Prozesseinheit.

Der Einfluss des pH Werts auf das Biomassewachstum und die Squalenproduktion von *Thraustochytriden* wurde bisher nicht optimiert. Viele Arbeiten führen die Optimierungen einer Fermentation in Schüttelkolben ohne entsprechende pH Wert Überwachung durch oder geben den pH Wert in den Publikationen nicht an. Der Einfluss des pH Wertes auf die Produktion von Farnesol in *Saccharomyces cerevisiae* wurde in einer Publikation von Muramatsu et al. (2009) dargelegt. Dabei zeigte sich, dass ein alkalisches Ausgangsmedium zu erhöhter Farnsesolproduktion führt, wohingegen pH Werte im sauren Bereich zur Abnahme führten. Farnseol wird dabei auch als mögliches Substrat zur Squalenproduktion genannt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen einen geringen Einfluss des pH Wertes auf das Biomassewachstum. Die Einflüsse der Faktoren Temperatur und pO₂Konzentration im Medium überlagern den Effekt durch die Änderung des pH Wertes deutlich. Die spezifischen Wachstumsraten liegen bei pH 7 zwischen 0,091 und 0,281 h-1, bei pH 6,25 zwischen 0,134

und 0,261 h-1 und bei pH 5,5 zwischen 0,145 und 0,256 h-1. Dabei zeigt sich, dass die hohen Wachstumsraten bei höheren Temperaturen und hohen pO₂Konzentrationen liegen.

Der Squalengehalt liegt bei den Versuchen bei pH 7 zwischen 0,025 und 0,064 mg Squalen pro g BTS, bei pH 6,25 zwischen 0,051 und 0,087 mg Squalen pro g BTS und bei pH 5,5 zwischen 0,018 und 0,090 mg Squalen pro g BTS.Auch wenn die Versuchsläufe bei niedrigeren pH Werten etwas höhere Squalengehalte zeigen, kann keine Aussage über einen möglichen Effekt getroffen werden, da ein solcher auch nicht in anderen Arbeiten zu finden ist.

Die Abbildung 38 zeigt das Biomassewachstum der Versuchsläufe V7, V8 und V10. Diese Versuchsläufe unterscheiden sich nur in den unterschiedlichen pH Stufen. V7 wurde bei pH 5,5, V8 bei pH 6,25 und V10 bei pH 7 durchgeführt. Sowohl Temperatur (22,5 °C) als auch pO2 Konzentration (40 %) unterscheiden sich nicht. Es ist deutlich zu erkennen, dass weder im Verlauf der Wachstumsphase noch in der höchsten Konzentration der Biomasse ein markanter Unterschied zu erkennen ist.

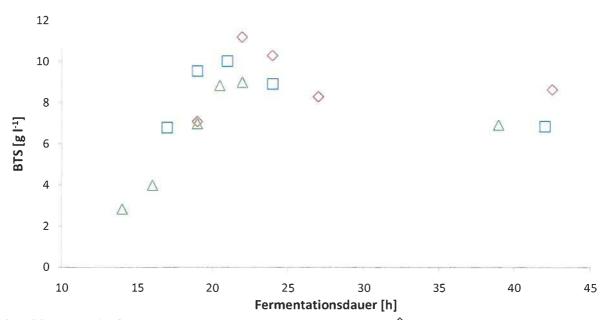


Abbildung 38: BTS Konzentrationen der Versuche V7(\Box), V8(\diamondsuit) und V10(\triangle) die sich nur durch den pH Wert unterscheiden

5.3 Einfluss der mindest-pO₂ Konzentration im Medium auf Wachstum und Squalenproduktion

Der Einfluss der Konzentration von gelöstem Sauerstoff im Medium bei der Produktion von Squalen mit *Thraustochytriden* spielt eine wichtige Rolle in der Optimierung dieses Prozesses. In der vorliegenden Arbeit wurden mindest-Konzentrationen von 30 % bis 50 % eingestellt und mittels Rührerdrehzahl (400 - 700 rpm) reguliert.

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich der Einfluss der pO2 Konzentration im Medium besonders im Wachstumsverlauf bzw. in der Fermentationsdauer und daher auch in der spezifischen Wachstumsrate. Bei 30~% pO $_2$ Konzentration liegen die spezifischen Wachstumsraten zwischen 0,091 und 0,256 h-1, bei 40~% pO $_2$ Konzentration zwischen 0,153 und 0,261 h-1 und bei 50~% pO $_2$ Konzentration zwischen 0,154 und 0,281 h-1.

In Abbildung 39sind die Fermentationsverläufe von Versuchsläufen dargestellt, die sich nur durch unterschiedliche pO₂ Konzentrationen unterscheiden. Die spezifische Wachstumsrate bei V11, der mit einer pO₂ Konzentration von mindestens 50 % betrieben wurde, liegt bei 0,236 h⁻¹ und damit deutlicher höher als bei V8 (mindestens 40 % pO₂ Konzentration) mit 0,153 h⁻¹ und V6 (mindestens 30 % pO₂ Konzentration) mit 0,134 h⁻¹.Die Höhe der Biomassekonzentration unterscheidet sich in diesen Läufen jedoch nicht so stark wie die der spezifischen Wachstumsrate. Auch Abbildung 40 zeigt, dass die spezifischen Wachstumsraten bei einer pO₂ Konzentration von mindestens 50 % höher liegen, wobei zu sehen ist, dass insbesondere auch die Temperatur (Balken mit der jeweils gleichen Farbe) einen starken Einfluss auf das Wachstum hat.

Die mindest-pO₂ Konzentration im Medium hat offenbar insbesondere auf die Vermehrung der Zellen Einfluss. Bei einer pO₂ Konzentration von mindestens 50 % liegt die Wachstumsrate daher hoch. Gleichzeitig steigt die Biomassekonzentration jedoch nicht im gleichen Maße an, weil die Zellen weniger Wachstum bzw. Produktion von Lipiden zeigen.Chi et al. (2009) zeigten, dass es keinen linearen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Zellen und der Biomasse gibt und die Vermehrung über Zoosporen hin zu vegetativen Zellen viel Sauerstoffbenötigt. In einer starken Phase der Vermehrung zeigen die Zellen keine entsprechende Einlagerung von Lipiden oder anderen Zellkörpern und es kommt nicht zu einer gleichgroßen Erhöhung der Biomasse.

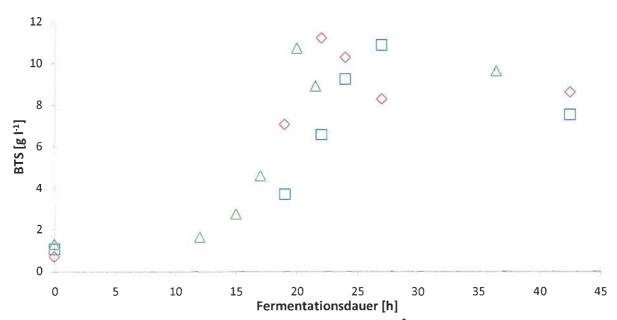


Abbildung 39: BTS Konzentrationen der Versuche V6(\square), V8(\diamondsuit) und V11(\triangle) die sich nur durch diemindest-pO₂ Konzentration im Medium unterscheiden

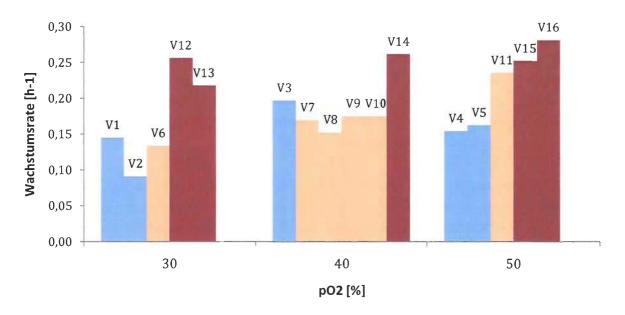


Abbildung 40: Vergleich der spezifischen Wachstumsraten; gruppiert nach mindest-pO₂ Konzentration und nach Temperaturstufen gefärbt (blau: 20 °C, orange: 22,5 °C, rot: 25 °C)

In den Arbeiten von Lewis et al. (1999) und Li et al. (2009)finden sich Aussagen über den Zusammenhang zwischen pO_2 Konzentration und Squalenproduktion. Es wird gezeigt, dass der Squalengehalt im späteren Verlauf der Fermentation rapide abnimmt. Die Biosynthese von

Sterolen, bei der Squalen ein wichtiger Bestandteil ist, benötigt im ersten Schritt Sauerstoff um Squalen weiterzuverarbeiten. Eine durchgehend hohe pO_2 Konzentration führt daher zur schnelleren Weiterverarbeitung von Squalen und verhindert die gewünschte Anhäufung.

Insbesondere die starke Abnahme des Squalengehaltes im frühen Verlauf der Fermentation bei hoher pO_2 Konzentration im Medium decken sich mit dieser Aussage und deuten darauf hin, dass zur Squalenproduktion eine niedrigere pO_2 Konzentration im Medium vorteilhaft ist.

In der vorliegenden Arbeit ist die mindest-pO₂ Konzentration von 30 % offenbar dennoch zu hoch, weil auch bei dieser Stufe die Versuchsläufe eine starke Abnahme des Squalengehaltes zeigen. In den Arbeiten von Lewis et al. (1999) und Li et al. (2009)werden hingegen pO₂ Konzentrationen von bis zu 5 % erwähnt.

5.4 Einfluss der Temperatur

In dieser Arbeit wurden drei Temperaturstufen zur Fermentation von *Aurantiochytrium limacinum* SR21 gewählt. Auf Grund der Erfahrungen aus der Literatur(Nakazawa et al. 2012) wurde als höchste Temperaturstufe 25 °C und darunter die Stufen mit 22,5 °C und 20 °C ausgewählt.

Der Einfluss der Temperatur auf das Biomassewachstum und die spezifische Wachstumsrate zeigt sich in Abbildung 41 bei der ein Versuchslauf bei 20 °C (V2) mit einem Lauf bei 25 °C (V16) verglichen wird. Es zeigt sich deutlich, dass das Wachstum bei der Fermentation bei höheren Temperaturen schneller und stärker erfolgt. Die spezifischen Wachstumsraten liegen bei den Versuchen mit 20 °C zwischen 0,091 und 0,197 h⁻¹, bei 22,5 °C zwischen 0,134 und 0,236 h⁻¹ und bei 25 °C zwischen 0,218 und 0,281 h⁻¹.

Thraustochytriden wachsen in einem breiten Temperatur-Spektrum, wobei die optimalen Wachstumsbedingungen, in Bezug auf die Wachstumsrate, bei Temperaturen von 25 °C bis 30 °C erreicht werden. Die Verdoppelungszeiten des Stammes Aurantiochytrium sp. 18W-13a sind bei 25 °C fast 8-mal so hoch als bei 10 °C(Jiang and Chen 2000; Nakazawa et al. 2012).

Die Abbildung 42 zeigt den Squalengehalt aller Versuchsläufe und lässt im Gegensatz zu den unterschiedlichen Wachstumsraten darauf schließen, dass die Squalenproduktion bei niedrigeren Temperaturen besser erfolgt. Der Squalengehalt liegt bei den Versuchen bei 20 °C zwischen 0,048 und 0,090 mg Squalen pro g BTS, bei 22,5 °C zwischen 0,051 und 0,088 mg Squalen pro g BTS und bei 25 °C zwischen 0,012 und 0,026 mg Squalen pro g BTS.

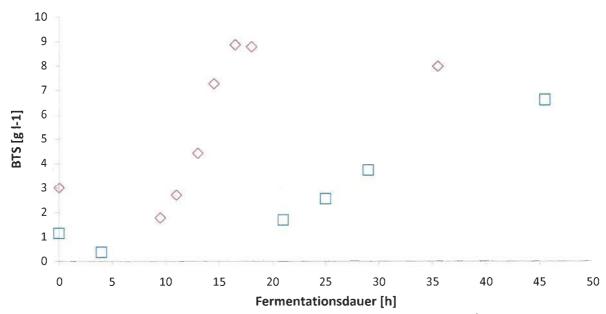


Abbildung 41: BTS Konzentrationen der Versuche V2(□) bei 20 °C, und V16(♦) bei 25 °C

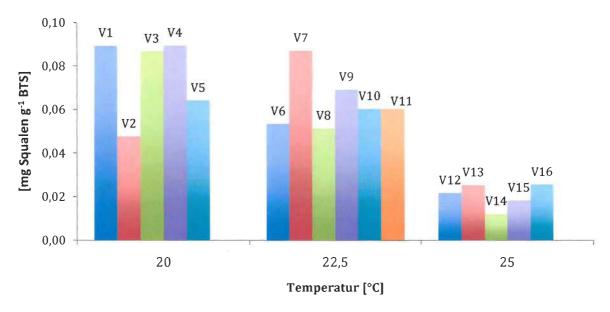


Abbildung 42: Squalengehalt der Versuchsläufe; gruppiert nach Temperatur

Unterschiedliche Temperaturen bei Fermentationen mit Thraustochytriden beeinflussen neben dem Biomassewachstum besonders die Squalenproduktion. Lewis et al (2001) stellten eine umgekehrte Relation zwischen Squalengehalt und Temperatur fest. Außerdem zeigten sie, dass der Squalengehalt bei niedrigeren Temperaturen im Laufe der Fermentation weniger schnell abnimmt als bei höheren Temperaturen.

5.5 Vergleich mit Daten aus der Literatur

In Tabelle 17 (bzw. Tabelle 18) werden Versuchsanordnungen aus der Literatur verglichen, die ebenfalls Aurantiochytrienals Produktionsstamm verwendeten und die Fermentationsbedingungen zur Verbesserung des Wachstums oder der Squalenproduktion optimierten.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse liegen in der gleichen Größenordnung wie in der Arbeit von Nakazawa et al., (2012), bei dem der Stamm *Aurantiochytrium limacinum* SR21 einen Squalengehalt von 0,2 mg Squalen pro g BTS liefert.

In der gleichen Arbeit wird auch das höchste bisher publizierte Resultat gezeigt. Der Stamm *Aurantiochytrium limacinum* 18W-13a produzierte dabei 171,1 ± 6,7 mg Squalen pro g BTS und liegt damit um vieles höher als die Produktausbeuten in dieser Arbeit.

Tabelle 17: Vergleich ausgewählter Publikationen und deren Versuchsanordnungen

Autoren	Stamm	Ziel	Variable Parameter	Fixe Parameter	Ausbeuten
Nakazawa et al., (2012)	Aurantiochytrium limacinum 18-W- 13a (auch Vergleich mit anderen Stämmen)	Optimierung der ASW Konzentration, der Glukosekonzentration und der Temperatur auf Wachstumsbedingungen und zur Produktion von Squalen	10 – 35 °C 2 – 9 % Glukose 25 – 100 % ASW	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt 500 ml Schüttelkolben mit 200 ml Medium 130 rpm am Orbitalschüttler	BTS: 4 – 12 g l ⁻¹ Squalengehalt: bis zu 171 mg g ⁻¹ (18-W-13a)
Nagano et al., (2009)	Aurantiochytrium limacinum mh0186	Messung des Einflusses unterschiedlicher Kohlenstoffquellen auf Wachstum und DHA Produktion; Optimierung der ASW Zusammensetzung bzw. der ASW Konzentration	3 % untersch. C-Quellen (u.a. Glukose, Mannose, Gylcerin,) 0 – 200 % ASW	1 % Hefeextrakt 500 ml Schüttelkolben mit 200 ml Medium 120 rpm am Orbitalschüttler 28 °C	Wachstum nur in OD ₆₀₀ angegeben – keine BTS Zahlen
Nagano et al., (2009)	Aurantiochytrium limacinum mh0186	Optimierung der Rührerdrehzahl im Bioreaktor für Biomassewachstum in 6 Liter Medium; Vorkultur in 500 ml Schüttelkolben mit 100 ml Medium	200 – 500 rpm	3 % Glukose 1 % Hefeextrakt 50 % ASW 1 vvm Luftzufuhr 28 °C	Wachstum nur in OD ₆₀₀ angegeben – keine BTS Zahlen

Tabelle 18 (Fortsetzung Tabelle 17): Vergleich ausgewählter Publikationen und deren Versuchsanordnungen

Chen et al., (2010)	Aurantiochytrium sp. BR-MP4-A1	Messung des Einflusses unterschiedlicher Stickstoffquellen auf Wachstumsbedingungen und zur Produktion von Squalen	Unterschiedliche Konzentrationen (1 – 50 mM) der Stickstoffquellen NaNO ₃ , Ammoniumsulfat, Harnsäure, Natriumglutamat, Hefeextrakt, Pepton	30 g l ⁻¹ Glukose 50 % ASW pH 6 25 °C 120 rpm am Orbitalschüttler	BTS: max. 9,82 g l ⁻¹ Squalengehalt: max. 0,21 mg g ⁻¹
(Fa et al., (2010)	Aurantiochytrium mangrovei FB3	Optimierung der Glukosekonzentration zur Produktion von Squalen; Einsatz von Terbafin zur Steigerung der Squalenproduktion	20 – 80 g l ⁻¹ Glukose 0,1 – 100 mg l ⁻¹ Terbafin	2 g l ⁻¹ Natriumglutamat 2 g l ⁻¹ Hefeextrakt 50 % ASW 25 °C 200 rpm am Orbitalschüttler	BTS: max. 20 g l ⁻¹ Squalengehalt: max. 0,37 mg g ⁻¹
Lewis et al., (2001)	Aurantiochytrium sp. ACEM 6063	Optimierung des Einflusses von Temperatur und pO ₂ Konzentration auf Squalenproduktion	15 – 25 °C ,low pO ₂ ': 0 – 5 % ,high pO ₂ ': 40 – 60 %	Medienkomponenten nicht angeführt	Squalengehalt: max. 1,5 mg g ⁻¹

5.6 Optimierte Bedingungen der Fermentation von Aurantiochytrium limacinum SR21

Die Auswertung des Versuchsplanes erfolgte mit dem Statistikprogramm JMP. Die Tabelle 13 zeigt die Einstellungen der Faktoren und die Ergebnisse für die Zielgrößen Biomassekonzentration [g l⁻¹], Squalengehalt [mg Squalen g⁻¹ BTS] und spezifische Wachstumsrate μ [h⁻¹]. Diese Daten wurden mittels JMP über eine nicht-lineare Regression in Gleichungen der Form einer Polynomfunktion 2. Grades (siehe Formel 1) miteinander in Beziehung gebracht.

Die Tabelle 14 zeigt die Schätzwerte der einzelnen Gleichungskoeffizienten und die entsprechenden t-Werte bzw. die Irrtumswahrscheinlichkeiten (p-Wert). Für den p-Wert gilt eine fünfprozentige Irrtumswahrscheinlichkeit, wobei die Werte unter 0,05 in der Tabelle unterstrichen und damit hervorgehoben sind. Obwohl nicht alle Effekte laut diesem Hypothesentest als echte Effekte dargestellt werden, wurden die Gleichungen zur Beschreibung des Zusammenhangs der Zielgrößen mit den Faktoren Temperatur, pH und pO₂ Konzentration erstellt. Es wurden alle Versuchsläufe nur einmal durchgeführt, was keine Aussage über die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der einzelnen Versuche zulässt und daher auch die Hypothesentests der einzelnen Faktoren beeinflusst.

Die

Tabelle 15 zeigt die Vorhersageformeln für alle drei Zielgrößen und die jeweils relativ hohen Werte der Varianzanalyse (R² bzw. F-Wert). Das zeigt eine gute Anpassung der Vorhersageformeln an die erhaltenen Messwerte.

Um die optimierten Einstellungen der Faktoren für die Zielgrößen zu bestimmen wurden auf Grundlage der Vorhersageformeln dreidimensionale Wirkungsflächendiagramme erstellt. Für jede Zielgröße sind diese Wirkungsflächendiagramme in den Abbildungen 29 – 34 zu sehen.

In den Diagrammen sind die Zusammenhänge zwischen Änderungen bei den Faktoren und den daraus berechneten vorhergesagten Ergebnissen der Zielgrößen dargestellt. Es zeigt sich deutlich, dass sich die optimierten Bedingungen für Wachstum (Biomassekonzentration bzw. Wachstumsrate) von denen für die optimale Squalenproduktion (Squalengehalt) unterscheiden. Für hohe Wachstumsraten zeigen die Wirkungsflächendiagramme Einstellungen bei hohen Temperaturen bzw. hohen pO₂ Konzentrationen und liegen im Bereich von 25 °C bzw. 50 % pO₂ Konzentration. Die Darstellung der Vorhersageformel für den Squalengehalt zeigen

vermeintliche Auswirkungen der Temperatur bzw. des pH Wertes. Wie bereits beschrieben liegen die optimalen Bedingungen bei niedrigeren Temperaturen undniedriger pO₂ Kozentration.

Auf Grundlage der Vorhersageformeln und der Wirkungsflächendiagramme wurden mittels *JMP* die bestmöglichen Bedingungen für das jeweils maximale Ergebnis der einzelnen Zielgrößen errechnet. Diese Werte sind in der Tabelle 19dargestellt und belegen die bisher angeführten Diskussionen, dass sich die Einstellungen der Parameter zur Squalenproduktion von denen zum optimalen Wachstum von *Aurantiochytrium limacinum* SR21 unterscheiden.

Tabelle 19: Vorhersagewerte für die optimierten Bedingungen

	рН	pO ₂	Temperatur	Vorhersagewerte
BTS	6,2	42,3 %	23,9 °C	45,83 [g l ⁻¹]
Squalen	5,5	41,3 %	20 °C	0,101 [mg Squalen g ⁻¹ BTS]
Wachstumsrate	6,6	50 %	25 °C	0,29 [h ⁻¹]

Es wurde keineÜberprüfung der Vorhersagewerte unter den optimalen Bedingungen durchgeführt. Diesist für weitere Arbeiten als Grundlage zu empfehlen!

5.7 Abschließende Bemerkungen

Wie bereits mehrfach angeführt gibt es bereits zahlreiche Arbeiten, welche den Einfluss von Temperatur und pO₂ Konzentration im Medium untersucht haben. Der Einfluss des pH Wertes scheint nicht die entsprechenden Auswirkungen wie Änderungen z.B. der Temperatur auf Wachstum und Squalengehalt zu haben. Ergebnisse von Versuchen mit unterschiedlichen Temperaturstufen im Verlauf einer Fermentation bzw. bei Veränderung der minimalen pO₂ Konzentration sind jedoch spannende Anknüpfungspunkte an die vorliegende Arbeit.

In Bezug auf einer Fermentation mit *Aurantiochytrium limacinum* SR21 zur Produktion von Squalen scheint es laut Chi et al., (2009) zwei unterschiedliche Phasen zu geben: eine erste Phase für das optimierte Zellwachstum und eine zweite Phase zur optimierten Squalenproduktion. In der ersten Phase, bei hoher Temperatur und hoher pO₂ Konzentration im Medium, vermehren sich die Zellen rapide und erreichen einerseits eine hohe Wachstumsrate und andererseits auch eine entsprechende Biomasse (bzw. Zellzahl). In der zweiten Phase ist besonders eine niedrigere pO2 Konzentration günstig, um die Squalenproduktion zu erhöhen.

Bisher wurden Änderungen der pO₂ Konzentration bzw. der Temperatur vor allem bei der Produktion von Lipiden erforscht. So zeigte sich eine zwei-stufige Fermentation mit unterschiedlichen pO₂ Konzentrationen als erfolgreiche Strategie. Dabei wurde *Aurantiochytrium limacinum* SR21 bei 25 °C und 50 % pO₂ Konzentration fermentiert und nach bestimmten Zeitpunkten 50 ml in Schüttelkolben transferiert, um diese bei niedrigeren pO₂ Konzentrationen weiterzuführen. (Chi et al. 2009)

Der Einfluss einer Temperaturänderung wurde ebenfalls bei der Produktion von Lipiden gezeigt. In der Arbeit von Taoka et al. (2011) wurde *Aurantiochytrium limacinum* mh0186 bei 28 °C fermentiert, um nach 72 Stunden einen Teil der Kultur bei 10 °C zu lagern. Anschließend wurde die Entwicklung der Lipidproduktion getestet und es zeigte sich insbesondere eine unterschiedliche Zusammensetzung der Lipide.

Versuchsanordnungen bei denen während der Fermentation die Temperatur bzw. die pO₂ Konzentration im Medium verändert werden, versprechen gute Ausbeuten und stellen spannende Anknüpfungspunkte an diese Arbeit dar.

6 Literatur

- Adl, Sina M, Alastair G B Simpson, Mark a Farmer, Robert a Andersen, O Roger Anderson, John R Barta, Samuel S Bowser, et al. 2005. "The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists." *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 52 (5): 399–451. doi:10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16248873.
- Bhattacharjee, P, V B Shukla, R S Singhal, and P R Kulkarni. 2001. "Studies on Fermentative Production of Squalene" 60: 811–816.
- Boutté, Yohann, and Markus Grebe. 2009. "Cellular Processes Relying on Sterol Function in Plants." Current Opinion in Plant Biology 12 (6) (December): 705–13. doi:10.1016/j.pbi.2009.09.013. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19846334.
- Bouvier, Florence, Alain Rahier, and Bilal Camara. 2005. "Biogenesis, Molecular Regulation and Function of Plant Isoprenoids." *Progress in Lipid Research* 44 (6) (November): 357–429. doi:10.1016/j.plipres.2005.09.003. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16289312.
- Cavalier-Smith, T., M. T. E. P. Allsopp, and E. E. Chao. 1994. "Thraustochytrids Are Chromists, Not Fungi: 18s rRNA Signatures of Heterokonta." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 346 (1318) (December 29): 387–397. doi:10.1098/rstb.1994.0156. http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.1994.0156.
- Chen, Guanqun, King-Wai Fan, Fu-Ping Lu, Qian Li, Tsunehiro Aki, Feng Chen, and Yue Jiang. 2010. "Optimization of Nitrogen Source for Enhanced Production of Squalene from Thraustochytrid Aurantiochytrium Sp." New Biotechnology 27 (4) (September 30): 382–9. doi:10.1016/j.nbt.2010.04.005. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20412873.
- Chi, Zhanyou, Yan Liu, Craig Frear, and Shulin Chen. 2009. "Study of a Two-Stage Growth of DHA-Producing Marine Algae Schizochytrium Limacinum SR21 with Shifting Dissolved Oxygen Level."

 Applied Microbiology and Biotechnology 81 (6) (January): 1141–8. doi:10.1007/s00253-008-1740-7. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18936938.
- Chmiel, Horst. 2011. *Bioprozesstechnik*. *Vasa*. http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf.
- Corliss, John O. 1990. Handbook of Protoctista: The Structure, Cultivation, Habitats and Life Histories of the Eukaryotic, Microorganisms and Their Descendants Exclusive O (The Jones and Bartlett Series in Life Sciences). Jones & Bartlett Pub. http://www.amazon.com/Handbook-Protoctista-Cultivation-Microorganisms-Descendants/dp/0867200529.
- Fan, King Wai, Tsunehiro Aki, Feng Chen, and Yue Jiang. 2010. "Enhanced Production of Squalene in the Thraustochytrid Aurantiochytrium Mangrovei by Medium Optimization and Treatment with

- Terbinafine." World Journal of Microbiology and Biotechnology 26 (7) (January 8): 1303–1309. doi:10.1007/s11274-009-0301-2. http://link.springer.com/10.1007/s11274-009-0301-2.
- Fox, Christopher B. 2009. "Squalene Emulsions for Parenteral Vaccine and Drug Delivery." *Molecules (Basel, Switzerland)* 14 (9) (January): 3286–312. doi:10.3390/molecules14093286. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19783926.
- Ghimire, Gopal Prasad, Hei Chan Lee, and Jae Kyung Sohng. 2009. "Improved Squalene Production via Modulation of the Methylerythritol 4-Phosphate Pathway and Heterologous Expression of Genes from Streptomyces Peucetius ATCC 27952 in Escherichia Coli." *Applied and Environmental Microbiology* 75 (22) (November): 7291–3. doi:10.1128/AEM.01402-09. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2786506&tool=pmcentrez&rendertyp e=abstract.
- Goldstein, Joseph L., Russell A. DeBose-Boyd, and Michael S. Brown. 2006. "Protein Sensors for Membrane Sterols." *Cell* 124 (1): 35–46. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867405014637.
- Goldstein, Solomon, and Melvin Belsky. 1964. "Axenic Culture Studies of a New Marine Phycomycete Possessing an Unusual Type of Asexual Reproduction." *American Journal of Botany* 51 (1) (January): 72. doi:10.2307/2440066. http://www.researchgate.net/publication/250267040_Axenic_Culture_Studies_of_a_New_Marine _Phycomycete_Possessing_an_Unusual_Type_of_Asexual_Reproduction.
- Goodrum, J F, T S Earnhardt, N D Goines, and T W Bouldin. 1990. "Lipid Droplets in Schwann Cells During Tellurium Neuropathy Are Derived from Newly Synthesized Lipid." *Journal of Neurochemistry* 55 (6) (December): 1928–32. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2230802.
- Hauss, Thomas, Silvia Dante, Norbert A Dencher, and Thomas H Haines. 2002. "Squalane Is in the Midplane of the Lipid Bilayer: Implications for Its Function as a Proton Permeability Barrier." *Biochimica et Biophysica Acta* 1556 (2-3) (December 2): 149–54. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12460672.
- Hiller, Sonja. 2013. "Produktion von Squalen in Aurantiochytrium Limacinum SR21 Masterarbeit."
- HONDA, DAISKE. 1998. "Schizochytrium Limacinum Sp. Nov., a New Thraustochytrid from a Mangrove Area in the West Pacific Ocean DAISKEHONDA1, 2*, TOSHIHIROYOKOCHI2, TORONAKAHARA2, MAYUMIERATA3" 102 (4): 439–448.
- Huang, Zheng, and C. Dale Poulter. 1989. "Stereochemical Studies of Botryococcene Biosynthesis: Analogies Between 1'-1 and 1'-3 Condensations in the Isoprenoid Pathway." *Journal of the American Chemical Society* 111 (7) (March): 2713–2715. doi:10.1021/ja00189a056. http://dx.doi.org/10.1021/ja00189a056.
- Huang, Zih-Rou, Yin-Ku Lin, and Jia-You Fang. 2009. "Biological and Pharmacological Activities of Squalene and Related Compounds: Potential Uses in Cosmetic Dermatology." *Molecules (Basel,*

- *Switzerland*) 14 (1) (January 23): 540–54. doi:10.3390/molecules14010540. http://www.mdpi.com/1420-3049/14/1/540.
- Jiang, Yue, and Feng Chen. 2000. "Effects of Temperature and Temperature Shift on Docosahexaenoic Acid Production by the Marine Microalga Crypthecodinium Cohnii": 613–617.
- Kelly, G S. 1999. "Squalene and Its Potential Clinical Uses." *Alternative Medicine Review*2: a Journal of Clinical Therapeutic 4 (1) (February): 29–36. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9988781.
- Konan, University. 2003. "Development of Organisms." http://kccn.konan-u.ac.jp/bio/syst/pages/2527b5.html#movie1.
- Lewis, T E, P D Nichols, and T a McMeekin. 2001. "Sterol and Squalene Content of a Docosahexaenoic-Acid-Producing Thraustochytrid: Influence of Culture Age, Temperature, and Dissolved Oxygen."

 Marine Biotechnology (New York, N.Y.) 3 (5) (September): 439–47. doi:10.1007/s10126-001-0016-3. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14961336.
- Lewis, Tom E., Peter D. Nichols, and Thomas A. McMeekin. 1999. "The Biotechnological Potential of Thraustochytrids." *Marine Biotechnology* 1 (6) (November): 580–587. doi:10.1007/PL00011813. http://link.springer.com/10.1007/PL00011813.
- Li, Qian, Guan-Qun Chen, King-Wai Fan, Fu-Ping Lu, Tsunehiro Aki, and Yue Jiang. 2009. "Screening and Characterization of Squalene-Producing Thraustochytrids from Hong Kong Mangroves." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (10) (May 27): 4267–72. doi:10.1021/jf9003972. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19371138.
- Loertscher, Jennifer, Lynnelle L Larson, Clinton K Matson, Mark L Parrish, Alicia Felthauser, Aaron Sturm, Christine Tachibana, Martin Bard, and Robin Wright. 2006. "Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation Is Required for Cold Adaptation and Regulation of Sterol Biosynthesis in the Yeast Saccharomyces Cerevisiae" 5 (4): 712–722. doi:10.1128/EC.5.4.712.
- Muramatsu, Masayoshi, Chikara Ohto, Shusei Obata, Eiji Sakuradani, and Sakayu Shimizu. 2009. "Alkaline pH Enhances Farnesol Production by Saccharomyces Cerevisiae." *JBIOSC* 108 (1): 52–55. doi:10.1016/j.jbiosc.2009.02.012. http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.02.012.
- Nagano, Naoki, Yousuke Taoka, Daisuke Honda, and Masahiro Hayashi. 2009. "Optimization of Culture Conditions for Growth and Docosahexaenoic Acid Production by a Marine Thraustochytrid, Aurantiochytrium Limacinum Mh0186." *Journal of Oleo Science* 58 (12) (January): 623–8. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19915319.
- Nakazawa, Atsushi, Hiroshi Matsuura, Ryoji Kose, Syou Kato, Daiske Honda, Isao Inouye, Kunimitsu Kaya, and Makoto M Watanabe. 2012. "Optimization of Culture Conditions of the Thraustochytrid Aurantiochytrium Sp. Strain 18W-13a for Squalene Production." *Bioresource Technology* 109 (April): 287–91. doi:10.1016/j.biortech.2011.09.127. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22023965.

- Naziri, Eleni, Fani Mantzouridou, and Maria Z. Tsimidou. 2011. "Squalene Resources and Uses Point to the Potential of Biotechnology." *Lipid Technology* 23 (12) (December 15): 270–273. doi:10.1002/lite.201100157. http://doi.wiley.com/10.1002/lite.201100157.
- Newmark, H. L. 1997. "Squalene, Olive Oil, and Cancer Risk: a Review and Hypothesis." Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : a Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology 6 (12) (December): 1101–3. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9419410.
- Preedy, Victor R., and Ronald Ross Watson. 2010. "Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention 9780123744203 | ScienceDirect.com." http://www.sciencedirect.com/science/book/9780123744203.
- Raghukumar, Seshagiri. 2002. "Ecology of the Marine Protists, the Labyrinthulomycetes (Thraustochytrids and Labyrinthulids)." European Journal of Protistology 38 (2) (January): 127–145. doi:10.1078/0932-4739-00832. http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0932473904700553.
- Rappel, Ralf. 2013. "Docosahexaenoic Acid Production by the Thraustochytrid Aurantiochytrium Limacinum SR21 Using Various Carbon Sources Diploma Thesis."
- Smith, K R, and D M Thiboutot. 2008. "Thematic Review Series: Skin Lipids. Sebaceous Gland Lipids: Friend or Foe?" *Journal of Lipid Research* 49 (2) (February 1): 271–81. doi:10.1194/jlr.R700015-JLR200. http://www.jlr.org/content/49/2/271.full.
- Song, Bao-Liang, Norman B Javitt, and Russell A DeBose-Boyd. 2005. "Insig-Mediated Degradation of HMG CoA Reductase Stimulated by Lanosterol, an Intermediate in the Synthesis of Cholesterol." *Cell Metabolism* 1 (3) (March): 179–89. doi:10.1016/j.cmet.2005.01.001. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16054061.
- Spanova, Miroslava, and Günther Daum. 2011. "Squalene Biochemistry, Molecular Biology, Process Biotechnology, and Applications." European Journal of Lipid Science and Technology 113 (11) (November 15): 1299–1320. doi:10.1002/ejlt.201100203. http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201100203.
- Tansey, T R, and I Shechter. 2000. "Structure and Regulation of Mammalian Squalene Synthase." Biochimica et Biophysica Acta 1529 (1-3) (December 15): 49–62. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11111077.
- Taoka, Yousuke, Naoki Nagano, Yuji Okita, Hitoshi Izumida, Shinichi Sugimoto, and Masahiro Hayashi. 2011. "Effects of Cold Shock Treatment on Total Lipid Content and Fatty Acid Composition of Aurantiochytrium Limacinum Strain Mh0186." *Journal of Oleo Science* 60 (5) (January): 217–20. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21502721.
- Welander, Paula V, Ryan C Hunter, Lichun Zhang, Alex L Sessions, Roger E Summons, and Dianne K Newman. 2009. "Hopanoids Play a Role in Membrane Integrity and pH Homeostasis in

- Rhodopseudomonas Palustris TIE-1." *Journal of Bacteriology* 191 (19) (October 1): 6145–56. doi:10.1128/JB.00460-09. http://jb.asm.org/content/191/19/6145.short.
- Wolfertz, Michael, Thomas D Sharkey, Wilhelm Boland, and Frank Kühnemann. 2004. "Rapid Regulation of the Methylerythritol 4-Phosphate Pathway During Isoprene Synthesis." *Plant Physiology* 135 (4) (August): 1939–45. doi:10.1104/pp.104.043737. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=520765&tool=pmcentrez&rendertype =abstract.
- Xu, Ran, Gia C. Fazio, and Seiichi P.T. Matsuda. 2004. "On the Origins of Triterpenoid Skeletal Diversity." *Phytochemistry* 65 (3): 261–291. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942203006927.
- Yokochi, T., D. Honda, T. Higashihara, and T. Nakahara. 1998. "Optimization of Docosahexaenoic Acid Production by Schizochytrium Limacinum SR21." *Applied Microbiology and Biotechnology* 49 (1) (January 26): 72–76. doi:10.1007/s002530051139. http://link.springer.com/10.1007/s002530051139.
- Yokoyama, Rinka, and Daiske Honda. 2006. "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": 199–211. doi:10.1007/s10267-006-0362-0.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anteil an ungesättigten Fettsäuren in unterschiedlichen Thraustochytriden (Yokoyama &
Honda, 2006); AA: Arachidonsäure, EPA: Eicosapentaensäure, DPA: Docosapentaensäure, DHA:
Docosahexansäure 10
Abbildung 2: Aurantiochytrium limacinum, 1: Zellcluster mit ektoplasmatischem Netz, 2: Längliche,
amorphe Zellen (Pfeile) am Rand einer Kolonie, 3: einzelne Zelle mit ektoplasmatischem Netz, 4:
2 Wochen alte vegetative Zellen mit Vakuolen (Pfeile), (HONDA, 1998)11
Abbildung 3: Lebenszyklus von Aurantiochytrium limacinum sp. (Konan, 2003) 12
Abbildung 4: Chemische Struktur von Squalen und seiner Vorstufen. A: chemische Struktur von
Isopren B-D: verschiedene Squalenstrukturen: B: gestreckte Form, C: gewundene Form, D: "sterol
ähnliche" Form; (Spanova & Daum, 2011)
Abbildung 5: Squalen Synthese mittels MVA-Weg in Säugetierzellen (Spanova & Daum, 2011) 16
Abbildung 6: Squalen Synthese mittels MEP-Weg in E. coli; G-3-P: Glycerol-3-Phosphat, DXP: Deoxy-
Xylose-Phosphat, DXS: DXP-Synthase, MEP: Methyl-Erythritol-Phosphat, DXR: DXP-
Reduktoisomerase, HMBPP: Hydroxy-Methyl-Butenyl-Pyrophosphat, IPP:
Isopentenylpyrophosphat, DMAPP: Dimethylallylpyrophosphat, FPP: Farnesyl-Pyrophosphat
(Spanova & Daum, 2011)
Abbildung 7: Squalen Synthese mittels MEP-Weg in B. braunii; (Spanova & Daum, 2011)20
Abbildung 8: Einstellungen der Zielgrößen und Faktoren zur Erstellung des Versuchsplans25
Abbildung 9: Kalibrationsgerade NPOC
Abbildung 10: Kalibrationsgerade TN
Abbildung 11: Chromatogramm der GC-MS Messung der Kalibrierlösungen zur Bestimmung des
Methodenfaktors
Abbildung 12: Biomassewachstum der Versuche bei 25 °C; V12(□) V13(♦) V14(△) V15(♥) V16(○) 42
Abbildung 13: Squalengehalt der Versuche bei 25 °C; V12(□) V13(♦) V14(△) V15(☎) V16(○) 43
Abbildung 14: Biomassewachstum der Versuche bei 22,5 °C; V6(\Box) V7(\diamondsuit) V8(\triangle) V9(\boxtimes) V10(\bigcirc)
V11(♣)44
Abbildung 15: Squalengehalt der Versuche bei 22,5 °C; V6(□) V7(♦) V8(△) V9(♡) V10(○) V11(♣) 45
Abbildung 16: Biomassewachstum der Versuche bei 20 °C; V1(□) V2(♦) V3(△) V4(♡) V5(♦) 46
Abbildung 17: Squalengehalt der Versuche bei 20 °C; V1(\square) V2(\diamondsuit) V3(\triangle) V4(\boxtimes) V5(\bigcirc)
Abbildung 18: Biomassewachstum der Versuche bei pH 7; V2(□) V5(♦) V10(△) V13(☼) V16(♦) 48
Abbildung 19: Squalengehalt der Versuche bei pH 7; V2(□) V5(♦) V10(△) V13(♥) V16(♦)49
Abbildung 20: Biomassewachstum der Versuche bei pH 6,25; V3(\square) V6(\diamondsuit) V8(\triangle) V9(\bowtie) V11(\bigcirc)
V14(♣)50
Abbildung 21: Squalengehalt der Versuche bei pH 6,25; $V3(\Box) V6(\diamondsuit) V8(\triangle) V9(\beta) V11(\bigcirc) V14(\dip) 51$
Abbildung 22: Biomassewachstum der Versuche bei pH 5,5; V1(□) V4(♦) V7(△) V12(※) V15(○) 52
Abbildung 23: Squalengehalt der Versuche bei pH 5,5; V1(\square) V4(\diamondsuit) V7(\triangle) V12(\boxtimes) V15(\bigcirc)53
Abbildung 24: Biomassewachstum der Versuche bei einer mindest-pO₂ Konzentration von 50 %; V4(□
) V5(♦) V11(△) V15(窓) V16(○)54
Abbildung 25: Squalengehalt der Versuche bei einer mindest-pO₂ Konzentration von 50 %; V4(□)
V5(♦) V11(△) V15(☎) V16(○)
Abbildung 26: Biomassewachstum der Versuche bei einer mindest-pO₂ Konzentration von 40 %; V3(□
) V7(♦) V8(△) V9(ଛ) V10(०) V14(♣)

Abbildung 27: Squalengehalt der Versuche bei einer mindest-pO ₂ Konzentration von 40 %; V3(山)
V7(♦) V8(△) V9(≅) V10(♦) V14(♦)
Abbildung 28: Biomassewachstum der Versuche bei einer mindest-pO2 Konzentration von 30 %; V1(
) V2(♦) V6(△) V12(☼) V13(♦) 58
Abbildung 29: Squalengehalt der Versuche bei einer mindest-pO₂ Konzentration von 30 %; V1(□)
V2(♦) V6(△) V12(☎) V13(♦)
Abbildung 30: Wirkungsflächendiagramm der Vorhersageformel BTS als Funktion der Variablen pO ₂
und pH
Abbildung 31: Wirkungsflächendiagramm der Vorhersageformel BTS als Funktion der Variablen
Temperatur und pH
Abbildung 32: Wirkungsflächendiagramm der Vorhersageformel Squalen als Funktion der Variablen
pO2 und pH63
Abbildung 33: Wirkungsflächendiagramm der Vorhersageformel Squalen als Funktion der Variablen
Temperatur und pH64
Abbildung 34: Wirkungsflächendiagramm der Vorhersageformel Wachstumsrate als Funktion der
Variablen p02 und pH64
Abbildung 35: Wirkungsflächendiagramm der Vorhersageformel Wachstumsrate als Funktion der
Variablen Temperatur und pH65
Abbildung 36: Restsubstratanalyse des Versuchslaufs V3 (pH 6,25; pO₂ 40 %, 20 °C); Glukose (□)
NPOC (♦) TN (△)
Abbildung 37: Einfluss der ASW Konzentration auf das Wachstum von Aurantiochytrium limacinum
mh0186 (Nagano et al., 2009)68
Abbildung 38: BTS Konzentrationen der Versuche V7(\square), V8(\diamondsuit) und V10(\triangle) die sich nur durch den
pH Wert unterscheiden69
Abbildung 39: BTS Konzentrationen der Versuche V6(\square), V8(\diamondsuit) und V11(\triangle) die sich nur durch die
mindest-pO2 Konzentration im Medium unterscheiden71
Abbildung 40: Vergleich der spezifischen Wachstumsraten; gruppiert nach mindest-pO ₂
Konzentration und nach Temperaturstufen gefärbt (blau: 20 °C, orange: 22,5 °C, rot: 25 °C) 71
Abbildung 41: BTS Konzentrationen der Versuche V2(□) bei 20 °C, und V16(♦) bei 25 °C 73
Abbildung 42: Squalengehalt der Versuchsläufe; gruppiert nach Temperatur

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: biophysikalische Eigenschaften von Squalen, (Spanova & Daum, 2011)	13
Tabelle 2: Zusammensetzung für 1 Liter ASW nach Rappel (2013)	23
Tabelle 3: Zusammensetzung Spurenelementelösung	23
Tabelle 4: Versuchsplan zur Optimierung der Squalenproduktion	26
Tabelle 5 Zusammensetzung des Mediums für einen Kolben mit 100g Medium des Inokulums	28
Tabelle 6 Zusammensetzung Batch Medium (4 Liter)	29
Tabelle 7: Parameter der NPOC/TN Bestimmung	34
Tabelle 8: Messwerte für die Kalibrationsgerade NPOC	34
Tabelle 9: Messwerte für die Kalibrationsgerade TN	35
Tabelle 10: Parameter Glukosebestimmung mittels HPLC	
Tabelle 11: Parameter der Methode "Squalen_100m"	40
Tabelle 12: Messwerte zur Bestimmung Methodenfaktor GC MS	40
Tabelle 13: Versuchsplan mit erhaltenen Ergebnissen der Zielgrößen	60
Tabelle 14: Regressionskoeffizienten der einzelnen Variablen für BTS, Squalengehalt und	
Wachstumsrate	
Tabelle 15: Vorhersageformel und statistische Kontrollverfahren	61
Tabelle 16: Vorhersagewerte für die optimierten Bedingungen	61
Tabelle 17: Vergleich ausgewählter Publikationen und deren Versuchsanordnungen	75
Tabelle 18 (Fortsetzung Tabelle 17): Vergleich ausgewählter Publikationen und deren	
Versuchsanordnungen	76
Tabelle 19: Vorhersagewerte für die optimierten Bedingungen	78

ANHANG: Sammlung der Messerergebnisse aller Versuchsläufe

	Fermentationsdauer [h]	BTS [g I ⁻¹]	NPOC [mg l ⁻¹]	TN [mg l ⁻¹]	Glukose [g l ⁻¹]	Squalengehalt [mg Squalen g ⁻¹ BTS]
V1	0	0,64	9463,0	623,3	23,1	_*
	18	2,19	7890,5	761,8	9,3	0,080
	22	3,83	6519,5	1076,0	14,6	0,067
	25	6,05	4560,5	1233,0	10,3	0,089
	41,5	7,66	1213,0	1799,5	0,7	0,019
V2	0	1,15	8569,5	621,0	23,3	_*
	4	0,38	8013,0	616,3	_1	1 -
	21	1,7	7301,0	620,9	19,4	0,047
	25	2,56	6603,5	771,0	16,8	0,048
	29	3,73	5356,5	961,5	10,9	0,028
	45,5	6,61	1329,0	1250,5	0+	0,004
V3	0	0,88	9923,0	669,1	25,9	_*
	20,7	6,37	6460,0	656,4	17,5	0,047
	22,2	4,76	5440,5	683,0	15,0	0,054
	25,2	7,94	3093,5	821,6	5,4	0,093
	27	8,97	1367,0	771,0	0,0	0,075
	29,2	7,08	1441,5	949,6	0*	0,043
	44,45	5	1364,5	1324,0	0+	0,017
V4	0	0,8	10295,5	663,5	27,8	_*
	18,5	3,25	6722,5	877,4	10,6	0,04
	22	4,52	5246,5	971,2	11,7	0,07
	25	8,86	2934,5	1142,0	4,6	0,09
	43	7,94	1352,0	1819,5	0,3	_1
V5	0	0,75	10416,5	681,9	24,8	_*

	18,5	2,01	8863,0	802,1	23,4	
				· ·		
	22	2,66	7531,0	854,6	18,9	0,05
	25	5,78	5906,5	926,3	13,0	0,06
	43	9,45	1636,0	1249,0	0,9	0,01
V6	0	1,05	12059,5	842,1	28,1	_*
	19	3,72	8083,5	826,0	0,	0,026
	22	6,59	5543,5	867,8	0+	0,053
	24	9,27	3401,0	910,0	0 ⁺	0,095
	27	10,87	1639,5	1137,5	0⁺	0,013
	42,5	7,56	1587,0	1669,5	0 ⁺	0,017
V7	0	1,18	9228,5	602,0	20,0	-*
	17	6,8	4159,5	828,6	9,7	0,082
	19	9,55	1896,5	895,0	2,1	0,087
	21	10,03	1187,5	1032,5	0+	0,007
	24	8,93	1165,0	1294,5	0+	0,011
	42	6,85	1163,5	1580,0	0 ⁺	0,016
V8	0	0,7	10328,0	687,8	23,9	_* .
	19	7,09	4863,0	709,3	0+	0,051
	22	11,21	1413,0	730,6	0+	0,017
	24	10,29	1362,0	946,0	0+	0,004
	27	8,32	1302,0	1122,0	0+	_1
	42,5	8,63	1359,5	1307,0	0+	0,008
V9	0	1,12	9167,5	683,7	20,0	_*
	17	3,25	6951,0	657,0	13,5	0,035
	19	4	5531,0	667,3	9,2	0,037
	21	6,55	3994,0	671,0	8,0	0,069
	24	9,79	1286,5	687,2	0*	0,042
	26	8,95	1269,5	849,7	0+	0,013

	42	7,42	1288,5	1108,5	0+	0,010	
V10	0	0,67	9737,0	634,0	_1	_*	
	14	2,84	7450,0	528,0	22,5	0,017	
	16	3,99	5923,5	748,0	13,6	0,042	
	19	6,99	2767,0	787,9	4,4	0,060	
	20,5	8,86	1350,0	839,2	0,1	0,018	
	22	9,01	1364,5	923,6	0,1	0,012	
	39	6,93	1451,0	1131,0	0+	0,005	
V11	0	1,3	11245,0	762,9	_1	_*	
	12	1,63	8692,5	525,4	27,0	0,099	
	15	2,78	7043,5	613,8	18,8	0,066	
	17	4,61	6416,0	772,1	19,3	0,054	
	20	10,73	2533,0	798,5	3,7	0,087	
	21,5	8,92	1363,5	856,7	0+	0,016	_
	36,5	9,65	1354,0	1632,5	0*	0,007	
V12	0	1,39	8490,0	542,0	21,5	_*	
	19	9,04	1176,5	699,9	0,0	0,008	
	22	8,05	1182,0	988,4	0*	0,012	
	25	7,36	1196,0	1132,0	0 ⁺	0,022	
	42	6,39	1199,0	1303,5	O ⁺	0,013	
V13	0	1,57	12480,5	787,2	28,1	-*	
	19	5,74	1784,5	1390,5	O ⁺	_1	
	22	9,46	1684,5	1422,5	0,	0,009	
	25	5,08	1822,0	1572,5	0 ⁺	0,014	
	42	5,26	2020,5	1892,5	0*	0,025	-
V14	0	1,55	12277,5	816,9	27,2	_*	
	19	11,11	2510,5	794,0	2,6	_1	
	22	10,8	1676,5	1105,5	0+	0,006	

	25	10,14	1705,0	1345,0	0+	0,007
	42	8,62	1787,5	1593,5	O ⁺	0,012
V15	0	2,33	11137,5	755,3	21,8	-*
	2	0,12	10629,5	720,9	_1	-1
	4	0,19	9864,0	645,7	18,7	-1
	6	0,53	9733,5	611,8	-1	_1
	8	1,53	9018,5	528,6	_1	-1
	10	2,71	8800,5	635,5	18,1	-1
	12	3,95	7569,5	682,1	_1	_1
	14	6,94	6076,0	708,8	_1	_1
	16	8,4	3200,5	1984,0	_1	-1
	18	9,22	1223,0	2308,5	0+	0,018
	20	9,71	1382,5	2692,5	_1	_1
	22	8,91	1316,0	2621,0	_1	0,009
	24	9,2	1352,0	2807,0	0*	0,006
	26	10,18	1318,0	2816,0	_1	0,006
V16	0	3,01	8670,5	560,6	20,0	_*
	9,5	1,78	6878,0	559,1	18,8	0,024
	11	2,71	6444,5	594,1	14,4	-1
	13	4,42	4842,5	647,4	13,4	0,007
	14,5	7,26	3097,5	680,1	7,9	0,015
	16,5	8,88	1244,5	729,3	0*	0,017
	18	8,8	1240,0	865,0	0+	0,026
	35,5	7,99	1143,0	983,0	0+	0,009

^{*} bei der ersten Probenahme wurde keine Bestimmung des Squalengehalts durchgeführt

^{*}keine Glukose mehr nachweisbar

¹keine Squalenbestimmung möglich

