

Mikrobielle Produktion von Plattformchemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen für die biobasierte Wirtschaft

Habilitationsschrift zur Erlangung der Lehrbefugnis (*venia legendi*) im Fachgebiet
Technische Biologie gemäß Habilitationsordnung der Universität Karlsruhe vom
23. November 1999

von Dr.-Ing. Katrin Ochsenreither, geb. Brzonkalik

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Forschungsuniversität in der Helmholtz-
Gemeinschaft

Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik

Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik 2: Technische Biologie

Telefon: +49 721 608-4-6478

Fax: +49 721 608-4-4881

E-Mail: katrin.ochsenreither@kit.edu

Danksagung

Die Habilitation ist kein Sprint, sondern ein Marathon (frei nach Anke Neumann), insbesondere wenn man das Ziel familiär bedingt in Teilzeit erreichen will. Daher wäre die Anfertigung dieser Arbeit nicht ohne die Unterstützung meiner Familie, Freunde, Kolleg*innen und Mitarbeiter*innen möglich gewesen.

Ich möchte mich an dieser Stelle ausdrücklich als allererstes bei meinem Mann Oliver und meinem Sohn Nico bedanken, die mich zu Hause immer entlastet und die vielen Dienstreisen ermöglichen haben und sehr verständnisvoll waren, wenn ich mal wieder länger und am Wochenende arbeiten musste. Ohne euch wäre das Alles nicht möglich gewesen!

Ebenfalls ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner zweiten Familie am TeBi. Herr Sylatk hat mich immer in jeder erdenklichen Weise in meiner Karriere gefördert und unterstützt, mir aber gleichzeitig die volle wissenschaftliche Freiheit eingeräumt. Ohne seine umsichtige Führung wäre die Technische Biologie nicht ein so angenehmer Arbeitsort! Vielen Dank für das Vertrauen, das sie in mich gesetzt haben. Zusammen mit Anke Neumann, Jens Rudat und Ulrike Engel konnten wir bei unseren täglichen (Arbeits-) Mittagessen viele wissenschaftliche und administrative Probleme unkompliziert, in angenehmer und kollegialer Atmosphäre lösen. Ihr seid die besten Kollegen, die ich mir wünschen kann.

Ein ganz besonderer Dank geht an unsere Sekretärinnen Beate Skolik und Susanne Warth, die uns alle durch ihre tolle Arbeit immens entlasten. Egal ob bei der Verwaltung von Mitarbeitern, der Organisation der Lehre oder der finanziellen Abwicklung von Projekten, auf euch ist immer Verlass!

Absolut unverzichtbar für den reibungslosen Laborablauf und die Organisation der Laborpraktika sind unsere Techniker*innen Michaela Kugel, Sandra Baumann, Laura Krämer, Delphine Muller, Daniela Rambow, Elke Stegmaier und Pascal Baumann. Ich kann euch daher nicht genug für euer Engagement und eure Unterstützung danken.

Ebenso hervorzuheben sind meine ehemaligen und derzeitigen Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen Stefan Dörsam, Vanessa Schmitt, Olga Gorte, Marcus Stabel, Xiujuan Qian, Aline Kövilein, Christin Kubisch und Xinhai Zhou, die zusammen mit ihren Studenten meine Ideen im Labor umgesetzt und weiterentwickelt haben. Die Projektarbeit mit euch ist der Teil meiner Arbeit, der mir am meisten Spaß macht. Vielen Dank für eure tolle Arbeit!

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei allen übrigen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Technischen Biologie. Hervorheben möchte ich die gute Zusammenarbeit mit Sascha Siebenhaller, Oliver Buß, Jens Grüninger, André Delavault, Habibu Aliyu und Rebecca Hollenbach. Danke, dass ihr mein

Wissen über Bioinformatik und Biotenside erweitert habt und für die vielen fachlichen Diskussionen.

Ohne die Unterstützung meiner nationalen und internationalen Kooperationspartner wären viele Projekte nicht möglich gewesen und gefördert worden. Besonders hervorheben möchte ich daher die jahrelange gute und erfolgreiche Zusammenarbeit mit Min Jiang und Fengxue Xin von der Nanjing Tech University in Nanjing, China.

Vorwort

In der vorliegenden Habilitationsschrift möchte ich einen Einblick in das Thema „Mikrobielle Produktion von Plattformchemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen für die biobasierte Wirtschaft“ mit Fokus auf die Produktion von organischen Säuren und Fettsäuren geben. Die hierin beschriebenen Experimente wurden im Rahmen mehrerer Drittmittelprojekte durch meine Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter im Zeitraum von 2014 bis 2019 durchgeführt und sind somit auch Teil ihrer Dissertationen. Ausgangspunkt dazu waren meine eigenen Vorarbeiten im Rahmen meines Postdoc-Aufenthaltes in Nanjing sowie Vorarbeiten durch Ines Schulze im Rahmen ihrer Doktorarbeit in der Technischen Biologie.

Der Begriff „biobasierte Wirtschaft“ oder auch „Bioökonomie“ wurde bereits Anfang der 2000er Jahre in Europa durch die Europäische Kommission geprägt, damals noch unter der Prämisse, dass wegen der baldigen Verknappung fossiler Rohstoffe („Peak Oil“) Alternativen für die Produktion von Chemikalien und Energieträgern gefunden werden müssen und, dass das Potential der Biotechnologie, damals ein noch sehr junges Forschungsfeld, wirtschaftlich ausgeschöpft werden sollte. Diese Idee wurde schnell weiterentwickelt und mündete weltweit, wie auch innerhalb der Europäischen Union in die Aufstellung von Bioökonomie-Konzepten und -Strategien. Auch wenn die damals angenommene baldige Verknappung fossiler Rohstoffe nicht eingetreten ist und auch so bald nicht eintreten wird, so ist es dennoch dringender denn je, nachhaltige Alternativen für fossile Rohstoffe zu finden, wenn man die Treibhausgasemissionen senken und so die Folgen des Klimawandels so gering wie möglich halten will.

Analog zu den Ö raffinerien, in denen Erdöl zu Energieträgern und Chemikalien prozessiert wird, werden in der biobasierten Wirtschaft Biomasse oder Restströme in Bioraffinerien zu (Plattform-)Chemikalien verarbeitet. Dabei muss bedacht werden, dass biobasierte Plattformchemikalien nicht unbedingt deckungsgleich mit denen sind, die man aus fossilen Rohstoffen gewinnen kann. In verschiedenen Roadmaps wurden bereits geeignete Plattformchemikalien identifiziert, die sich durch ihre vielfältigen Einsatzmöglichkeiten auszeichnen. Darunter fallen u.a. C₄-Dicarbonsäuren, wie L-Äpfelsäure und Fumarsäure, aber auch Öle und Fettsäuren.

Für die biotechnologische Nutzung von lignocellulose-haltigen Substraten ist eine Vorbehandlung notwendig, um diese für Mikroorganismen zugänglich zu machen. Es gibt eine Reihe von möglichen Methoden, Biomasse aufzuschließen und diese dann vollständig oder fraktioniert für biotechnologische oder auch chemische Prozesse zu verwenden. In dieser Arbeit werden die thermischen Aufschlussmethoden Pyrolyse und Vergasung und das physikalisch-chemische Organosolv-Verfahren betrachtet und auf ihre Eignung, Substrate für die biotechnologische Herstellung von organischen Säuren und Fettsäuren und deren Derivate bereitzustellen, hin untersucht. Im Zuge dessen wurde auch der Prozess für die L-Äpfelsäure-Herstellung weiter erforscht und optimiert, um neben Bernsteinsäure, eine weitere biotechnologisch produzierte C₄-Dicarbonsäure näher an die Marktreife zu bringen.

Wie in der vorliegenden Arbeit dargestellt, erfordert die Etablierung einer biobasierten Wirtschaft die interdisziplinäre Verknüpfung von verfahrenstechnischen, chemischen, molekular- und mikrobiologischen Methoden. Zukünftig sollte daher die Zusammenarbeit der unterschiedlichen Disziplinen stärker in den Fokus rücken, um weitere Prozesse für die biobasierte Wirtschaft entwickeln zu können.

Dr.-Ing. Katrin Ochsenreither, Karlsruhe, im September 2019

Inhaltsverzeichnis

I. Einführung	7
1.1 Die lignocellulose-basierte Bioraffinerie.....	9
1.2 Aufbau von Biomasse und Vorbehandlungsmethoden.....	13
1.2.1 Thermochemische Methoden.....	17
1.2.2 Physikalisch-chemische Methoden	20
1.2.3 Biologische Methoden.....	22
1.2.4 Nicht-fraktionierende Verfahren / bioliq®-Prozess	24
1.3 Plattformchemikalien für die biobasierte Wirtschaft.....	28
II. Mikrobielle Produktion von L-Äpfelsäure (Malat)	36
2.1 Derzeitige und zukünftige Anwendungsfelder	36
2.2 Mikrobielle Produktion	38
2.2.1 Biosynthesewege.....	40
2.2.2 Natürliche Malat- und Poly-Malat-Produzenten.....	43
2.2.3 Nicht-natürliche Produzenten-Stämme	57
2.2.4 Anmerkungen und Vergleich der Produzentenstämme	66
2.3 Einflussfaktoren und Prozessoptimierung	68
2.3.1 Kohlenstoffquellen	69
2.3.2 Stickstoffquellen und C:N-Verhältnis.....	76
2.3.3 pH-Kontrolle	78
2.3.4 Prozessmodus	80
2.4 Aufarbeitung organischer Säuren.....	82
2.5 Fazit und eigener Forschungsbeitrag	85
2.5.1 Substratspektrum.....	87
2.5.2 Prozessentwicklung und -optimierung	96
2.5.3 Stammentwicklung.....	102
III. Mikrobielle Produktion von Einzellerölen (Single Cell Oils)	106

3.1 Oleogene Mikroorganismen	107
3.1.1 Screening nach neuen oleogenen Hefen.....	110
3.2 SCO-Biosynthese	112
3.2.1 Stammentwicklung durch Metabolic Engineering.....	116
3.3 SCO-Produktion	118
3.3.1 Einflussfaktoren auf die SCO-Bildung und deren Wirtschaftlichkeit.....	119
3.3.2 Prozessmodi	127
3.4 Aufarbeitung der SCOs	129
3.4.1 Mechanische Aufschlussmethoden.....	131
3.4.2 Nicht-Mechanische Aufschlussmethoden	137
3.4.3 Extraktionsmethoden	140
3.5 SCO-Anwendung	144
3.6 Fazit und eigener Forschungsbeitrag	147
3.6.1 Sequenzierung und Charakterisierung neuer oleogener Hefestämme	148
3.6.2 Prozessoptimierung hinsichtlich SCO- und Co-Produkt-Bildung.....	154
3.6.3 Aufarbeitung der SCOs.....	157
3.6.4 Produktion von Biotensiden (Glykolipiden).....	160
IV. Zusammenfassung und Ausblick	163
V. Literatur.....	169
VI. Liste der eigenen Publikationen	216

I. Einführung

Die Herstellung von Chemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen hat eine lange Tradition. Im 19. Und 20. Jahrhundert wurden viele chemische und später auch biotechnologische Prozesse entwickelt, darunter die Furfural-Synthese aus Kleie, erstmals beschrieben 1831 durch den deutschen Chemiker Döbereiner, und ab 1922 kommerziell produziert durch die Quaker Oats Company, die Holzverzuckerung (1819 durch den französischen Chemiker Braconnot) mit anschließender Fermentation zu Ethanol und die industrielle Milchsäureproduktion, 1895 entwickelt durch den deutschen Pharmaunternehmer Böhringer (Kamm et al., 2016). 1925 wurde in den USA der Begriff „Chemurgy“ (sehr frei übersetzt: Holzchemie) geprägt. Die damit verbundenen industriepolitischen Strategien ähnelten stark den heutigen Bioökonomie- und Bioraffinerie-Konzepten. Forschung und Entwicklung auf diesem Gebiet wurden stark vorangetrieben, sodass 1960 schließlich fast alle chemischen Produkte aus Holz herstellbar gewesen wären. Jedoch wurde keiner dieser Prozesse kommerzialisiert, da nach dem Ende des zweiten Weltkrieges der Weltmarkt mit günstigem Erdöl überschwemmt wurde, und die entwickelten Prozesse der Holzchemie mit den erdöl-basierten Prozessen preislich nicht konkurrieren konnten (Kamm et al., 2016). Seit mehr als 150 Jahren ist die Menschheit nun fast vollständig abhängig von fossilen Ressourcen. 2018 betrug die durchschnittliche globale Gesamtfördermenge 100,5 Millionen Barrel Erdöl täglich, oder umgerechnet ca. 5,13 Mrd. Tonnen pro Jahr (U.S Energy Information and Administration, 2019). Erdöl wird zu ca. 90 % als Energieträger und Treibstoff verwendet und zu ca. 10 % für die Herstellung von chemischen Produkten (International Energy Agency, 2017). Diese Petrochemikalien sind wichtige Grundbausteine für fast alle Produkte des täglichen Lebens (Abbildung 1, Sillanpää und Ncibi, 2017). Daraus wird ersichtlich, wie weitreichend die Umstellung auf eine biobasierte Wirtschaft sein wird, um ebenso vielseitige und effiziente Produktionssysteme zu schaffen. Wie oben erwähnt, kann aber glücklicherweise auf bereits vorhandenes Wissen und entwickelte Prozesse zurückgegriffen werden, um diese weiterzuentwickeln und an heutige Bedürfnisse anzupassen.

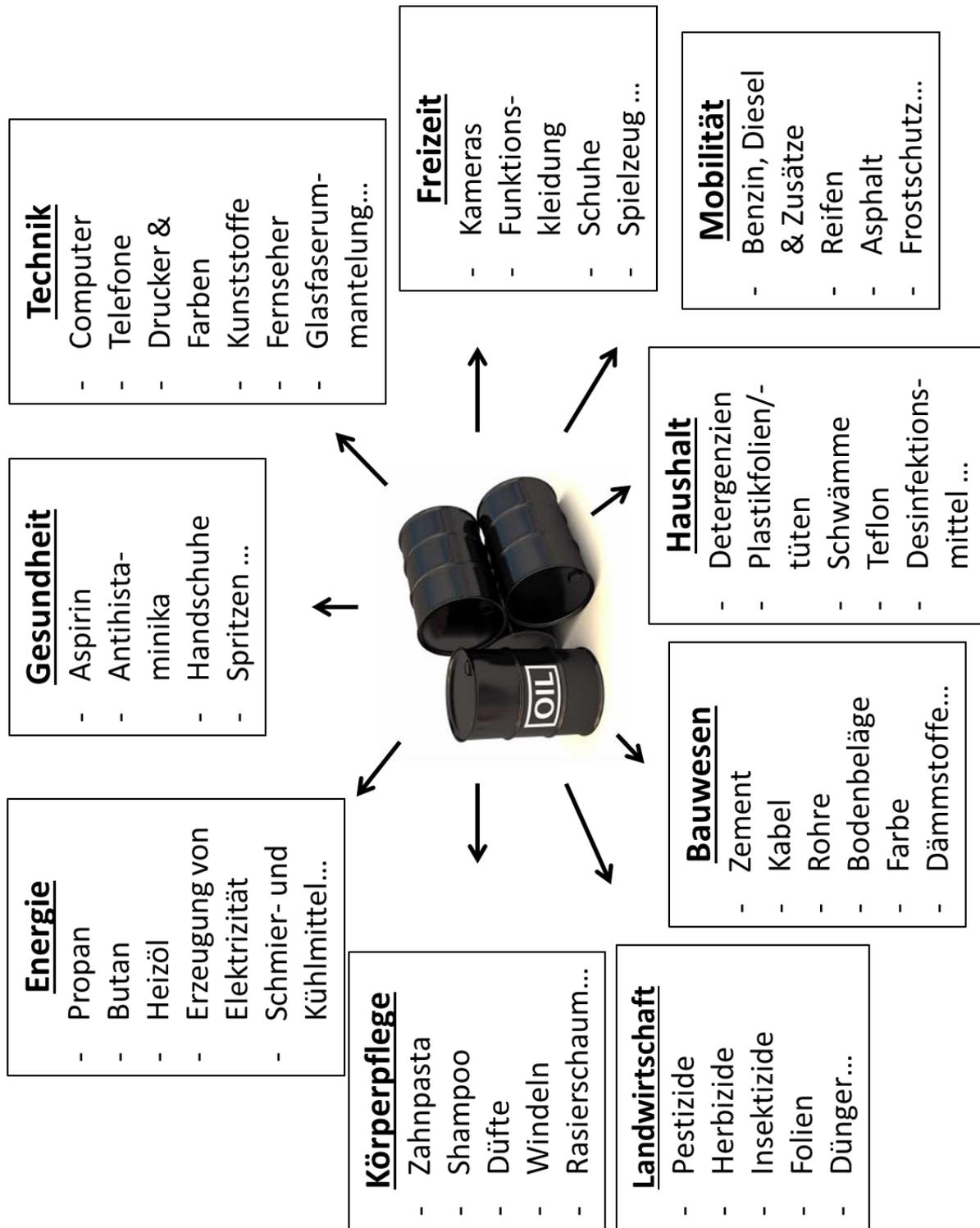


Abbildung 1: Auswahl an erdöl-basierten Endprodukten und Märkten des täglichen Lebens (verändert nach Sillanpää und Ncibi, 2017)

1.1 Die lignocellulose-basierte Bioraffinerie

Ganz allgemein hat eine Raffinerie das Ziel, einen Rohstoff möglichst vollständig in Zwischen- und Endprodukte umzuwandeln und somit zu veredeln. In der Erdöl-Raffinerie werden die unterschiedlichen Kohlenwasserstoffe zu Energieträgern, Treibstoffen und Plattformchemikalien transformiert. Dies geschieht durch fraktionierte Destillation, um die Kohlenwasserstoffe gemäß ihrer Länge in unterschiedlich schwere Fraktionen zu separieren, Cracken, um den Anteil an leichteren Kohlenwasserstoffen zu erhöhen und damit mehr Treibstoff zu produzieren, und durch Reformieren, um Aromaten und zyklische Kohlenwasserstoffe zu erhalten, um höherwertige Produkte herstellen zu können. Leichtere Kohlenwasserstoffe mit einer Kettenlänge von C1 bis C8 werden für die Herstellung von Petrochemikalien verwendet (Fahim et al., 2010) (Abbildung 2).

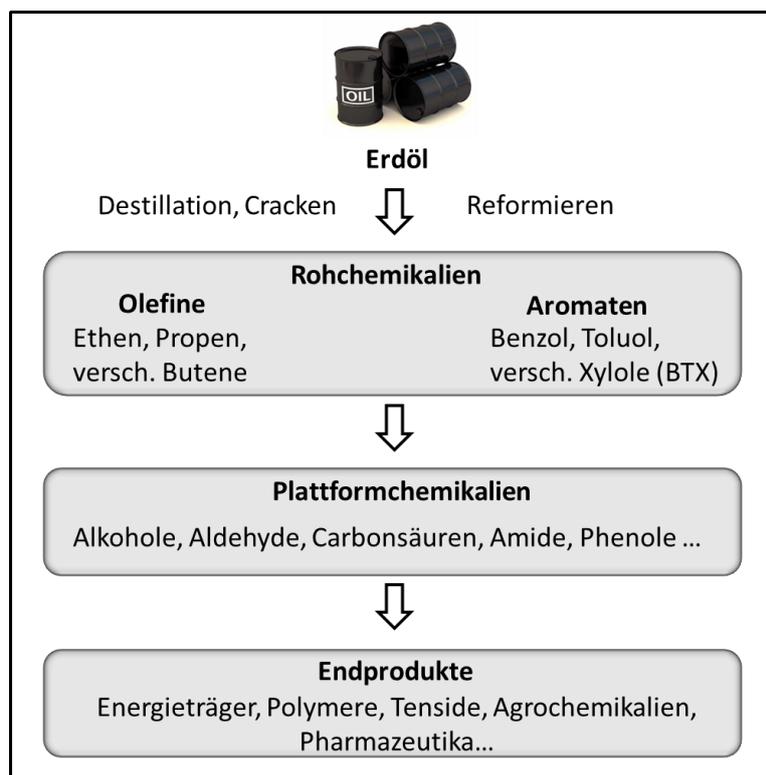


Abbildung 2: Produktion von Petrochemikalien mit Hilfe der Erdölraffinerie

Alle in Abbildung 1 gezeigten Produkte leiten sich letztendlich von den Olefinen Ethen, Propen und verschiedenen Buten-Isomeren, sowie den Aromaten Benzol, Toluol und verschiedenen Xylol-Isomeren ab (Werpy und Petersen, 2004). Sollen fossile Rohstoffe ersetzt werden, müssen dafür zunächst geeignete Prozesse

entwickelt werden, um z.B. in einer Bioraffinerie ähnlich vielseitige Plattformchemikalien zu erhalten.

Analog zur erdöl-basierten Raffinerie werden in einer Bioraffinerie Zwischen- und Endprodukte aus Biomasse gewonnen. 2012 veröffentlichte das deutsche Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) in seiner Roadmap Bioraffinerie folgende Definition:

„Eine Bioraffinerie zeichnet sich durch ein explizit integratives, multifunktionelles Gesamtkonzept aus, das Biomasse als vielfältige Rohstoffquelle für die nachhaltige Erzeugung eines Spektrums unterschiedlicher Zwischenprodukte und Produkte (Chemikalien, Werkstoffe, Bioenergie inkl. Biokraftstoffe) unter möglichst vollständiger Verwendung aller Rohstoffkomponenten nutzt; als Koppelprodukte können ggf. zusätzlich auch Nahrungs- und/oder Futtermittel anfallen. Hierfür erfolgt die Integration unterschiedlicher Verfahren und Technologien.“ (BMBF, 2012)

Der alleinige Wechsel von fossilen Rohstoffen zu Biomasse macht eine Bioraffinerie nicht automatisch nachhaltig und umweltfreundlich. Deshalb sollten zusätzlich die Prinzipien der grünen Chemie angewendet werden (Clark et al., 2009). Auf eine Bioraffinerie bezogen, sollten bei der Vorbehandlung und Weiterverarbeitung der Biomasse Abfälle nach Möglichkeit vermieden, sowie die Verwendung und/oder Erzeugung von umweltgefährdenden Chemikalien unterbunden werden. (Anastas und Warner, 1998; Capolupo und Faraco, 2016; ACS Green Chemistry Institute, 2017).

Bioraffinerien können auf Grund der eingesetzten Biomasse (z.B. Holz, Getreide) oder ihres Zwischenproduktes (z.B. Zucker, Stärke, Synthesegas) klassifiziert werden. Besonderes Augenmerk in der Forschung wird jedoch auf die Verwendung von lignocellulose-haltiger Restbiomasse gelegt, die nicht in Konkurrenz zur Lebensmittelproduktion steht, und in der Regel keine zusätzliche Ackerfläche für deren Anbau benötigt (Wagemann und Tippkötter, 2019). Dies ist auch dringend notwendig, da 2017 von den 234 in Europa verteilten, kommerziellen Bioraffinerien 181 sogenannte „First Generation“ Bioraffinerien waren, die Zucker, Stärke oder Pflanzenöle als Ausgangsmaterial für die Herstellung hauptsächlich von Biotreibstoffen und Oleochemikalien nutzen. Nur die restlichen 43 nutzten als sogenannte „Second Generation“ Bioraffinerien nicht in Nahrungsmittelkonkurrenz stehende Energie- und Nichtfutter-Pflanzen, sowie Bioabfälle für die Produktion von

Biokraftstoffen, Elektrizität, Wärme, Chemikalien und Biomaterialien (Hassan et al., 2019).

Da Biomasse zwar ähnlich komplex aufgebaut ist wie Erdöl, aber sich von der Zusammensetzung her diametral davon unterscheidet, können nicht dieselben Methoden für Fraktionierung und Weiterverarbeitung verwendet werden wie in der Erdölraffinerie. Tatsächlich werden je nach Art der Biomasse und den angestrebten Zielprodukten eine Vielzahl an unterschiedlichen Verfahren verwendet, um das schwer abbaubare Lignocellulosegerüst der Biomasse zunächst in leichter zu verarbeitende Produktklassen zu fraktionieren (Kamm et al., 2016) (Abbildung 3).

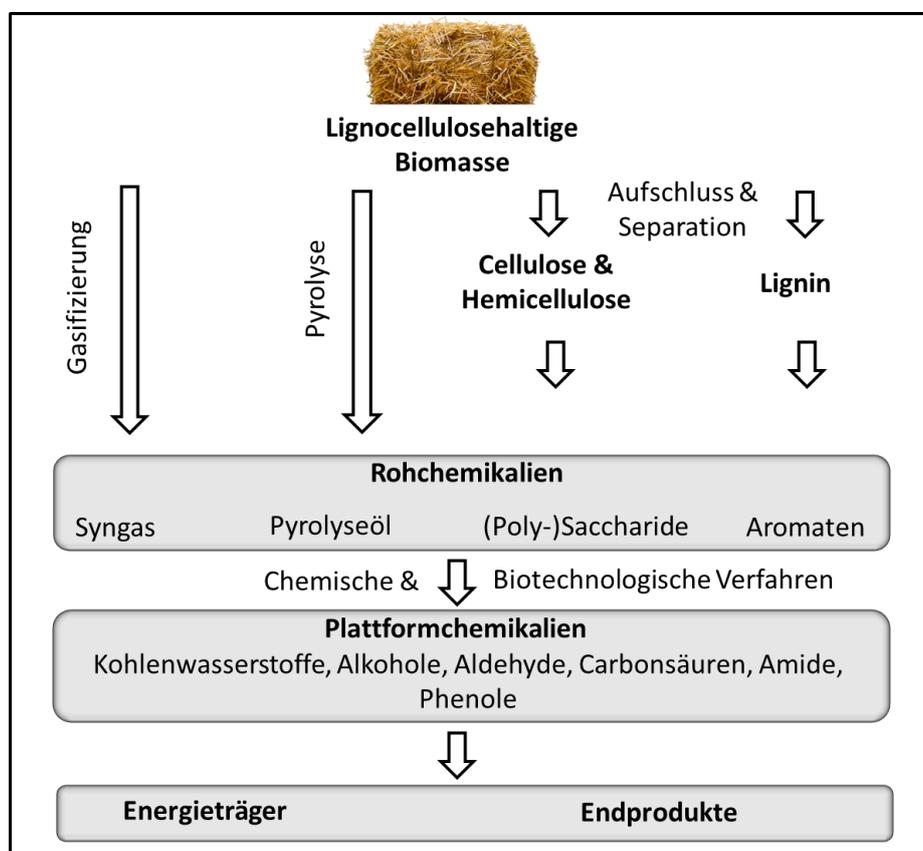


Abbildung 3: Schematischer Aufbau einer Bioraffinerie

Dabei unterscheidet man zum einen die Fraktionierung der Biomasse in ihre drei prinzipiellen Bestandteile, Cellulose, Hemicellulose und Lignin, mit anschließender Spaltung in deren Monomere, die dann zu Biochemikalien oder Biomaterialien weiterverarbeitet werden können. Gerade die aus der Hemicellulose und Cellulose erhaltenden Zuckerbestandteile sind wertvolle Ausgangsmoleküle für Chemie und

Biotechnologie. Zudem stellt Lignin die einzige nachwachsende und nachhaltige Quelle für die Bereitstellung von Aromaten dar, die in riesigen Mengen und somit nahezu unbegrenzt verfügbar ist (Tuck et al., 2012). Zum anderen kann Lignocellulose ohne vorherige Fraktionierung durch thermische Prozesse vollständig in ihre Monomere depolymerisiert (Pyrolyse) oder in Synthesegas umgewandelt werden (Gasifizierung). Im letzteren Fall spricht man auch von der Syngas-Bioraffinerie. Fraktionierung und thermische Verfahren ergänzen sich in Hinblick auf die angestrebten Zielprodukte, da Syngas direkt durch die für Erdgas etablierte C₁ Chemie u.a. in synthetische Kohlenwasserstoffe umgewandelt werden kann (Dahmen et al., 2018) (mehr dazu im folgenden Kapitel).

Die Herausforderungen für die vollständige Etablierung einer biobasierten Wirtschaft sind noch vielfältig. Zumindest aber wird es nicht an der Verfügbarkeit an geeigneter Biomasse scheitern. Nach der Berechnung des S2Biom-Projektes, welches das Ziel hat, die nachhaltige Bereitstellung von nicht-essbarer Biomasse auf lokaler, regionaler und paneuropäischer Ebene durch die Entwicklung von Strategien und Roadmaps zu unterstützen, zu charakterisieren und zu quantifizieren, werden 2030 EU-weit für den Betrieb der gesamten biobasierten Industrie voraussichtlich 476 Millionen Tonnen lignocellulose-haltiger Biomasse benötigt. Dem gegenüber steht die jährliche Produktion von wenigstens etwa 1 Milliarde Tonne Biomasse (S2Biom, 2016). Anders als bei den fossilen Rohstoffen existiert jedoch bisher noch keine effiziente Logistikstrategie, um die über ganz Europa verteilten Biomassen einzusammeln, zu trocknen und zu transportieren. Weiterhin sind etablierte Biomasseaufschlussmethoden, die in typischen Bioraffinerien eingesetzt werden, stark abhängig von einer spezifischen Biomasse und dem jeweiligen Produkt. Die wichtigsten Herausforderungen liegen daher in Skalierbarkeit und Flexibilität, um den Produktionsprozess vor dem Hintergrund unterschiedlicher Rohstoffangebote, variabler Marktnachfrage und schwankender Konjunktur nachhaltig zu optimieren (Hassan et al., 2019).

1.2 Aufbau von Biomasse und Vorbehandlungsmethoden

Lignocellulose-haltige Biomasse ist die am häufigsten vorkommende, nachwachsende Bioressource der Erde und spielt eine entscheidende Rolle für die Etablierung einer biobasierten Wirtschaft, da sie weltweit verfügbar ist und nicht in Konkurrenz zur Nahrungsmittelproduktion steht. Sie ist zudem deutlich günstiger als Rohöl und kann schneller und kostengünstiger produziert werden als andere landwirtschaftlich wichtigen Rohstoffe. So gilt lignocellulose-haltige Biomasse als idealer nachwachsender Rohstoff für die nachhaltige Herstellung von Biokraftstoffen, Grundchemikalien und Polymeren mit hoher wirtschaftlicher Bedeutung (Isikgor und Becer, 2015).

Zu den möglichen, einsetzbaren lignocellulose-haltigen Rohstoffen in einer Bioraffinerie zählen u.a. krautige Pflanzen oder Pflanzenreste, wie z.B. Stroh und Switchgrass (Rutenhirse), Nadelhölzer, wie z.B. Fichte, Harthölzer, wie z.B. Espe oder Eiche, und andere Rest- und Abfallstoffe, wie z.B. Brennerkörner und Altpapier (Qin et al., 2017). Lignocellulose-haltige Biomasse besteht hauptsächlich aus Cellulose (35-50 %), Hemicellulose (20-35 %) und Lignin (10-25 %) und enthält in geringen Anteilen auch Pektin, Proteine, Lipide, Wachse und Asche (Abbildung 4). Dabei gilt zu beachten, dass die Zusammensetzung und Struktur dieser Zellwandbestandteile stark innerhalb einer Pflanze variieren kann, und von der eingesetzten Biomasse, Alter der Pflanze, Erntezeitpunkt und auch vom Ort abhängig ist. Die Zusammensetzung hat wiederum einen Einfluss auf die Effizienz der jeweiligen Vorbehandlungsmethoden (Ding et al., 2012; Barakat et al., 2013).

Cellulose ist mit 35-50 % Massenanteil der Hauptbestandteil von lignocellulose-haltiger Biomasse und etwa die Hälfte des organischen Kohlenstoffes in der Biosphäre ist in Form von Cellulose gebunden. Es ist ein unverzweigtes Homopolymer bestehend aus vielen hunderten bis tausenden $\beta(1-4)$ verknüpften D-Glucose Einheiten. Die fibrilliäre und kristalline Form nativer Cellulose entsteht durch inter- und intramolekulare Wasserstoffbrücken und van der Waals-Kräfte zwischen den einzelnen Celluloseketten (Klemm et al., 2005).

Das zweithäufigste Polymer, Hemicellulose, hat im Gegensatz zu Cellulose eine amorphe Struktur und besteht aus mehreren unterschiedlichen Heteropolymeren,

darunter Xylan, Galactomannan, Glucuronoxylan, Arabinoxylan, Glucomannan und Xyloglucan, die wiederum aus verschiedenen Pentosen (β -D-Xylose und α -L-Arabinose), Hexosen (β -D-Glucose, β -D-Mannose und α -D-Galactose) und acetylierten Zuckern bestehen. Zusätzlich können Uronsäuren (α -D-Glucuronsäuren, α -D-4-O-Methylgalacturonsäure und α -D-Galacturonsäure) sowie andere Zucker (α -L-Rhamnose und α -L-Fucose) enthalten sein. Die genaue Zusammensetzung ist abhängig von der Pflanzenart. Hemicellulose bildet über Quernetzungen zu Lignin und durch Verknüpfung von Cellulosefasern zu Mikrofibrillen ein komplexes Netzwerk, das maßgeblich die Stabilität der pflanzlichen Zellwand erhöht (Scheller und Ulvskov, 2010).

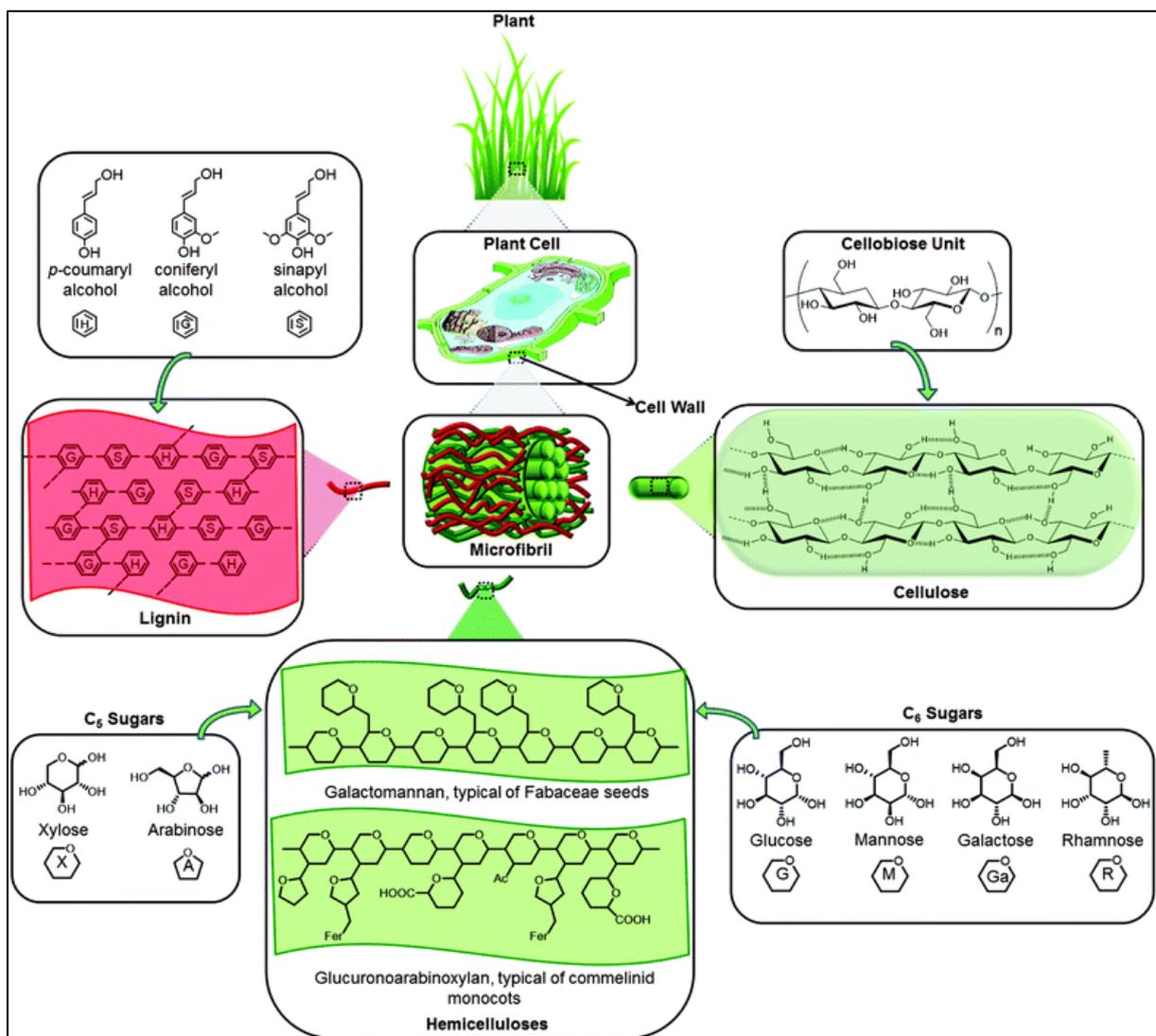


Abbildung 4: Aufbau und Struktur lignocellulosehaltiger Biomasse. (Aus: Isikgor und Becer, 2015. Published by The Royal Society of Chemistry.)

Lignin ist ein komplexes, dreidimensionales und heterogenes Polymer, das durch die oxidative kombinatorische Kopplung von 4-Hydroxyphenylpropanoiden gebildet wird. Die strukturellen Untereinheiten des Ligninpolymers sind p-Hydroxyphenol (H), Guaiacol (G) bzw. Syringol (S), die aus den unterschiedlich stark methoxylierten Monolignolen Coniferylalkohol, Sinapylalkohol und p-Coumarylalkohol entstehen und durch eine Reihe unterschiedlicher Bindungen, u.a. β -O-Arylether und β - β' , untereinander quervernetzt sind (Halpin 2004; Ralph et al., 2004; Vanholme et al., 2010). Lignin ist kovalent mit der Hemicellulose verbunden und sorgt damit für eine Quervernetzung zwischen den unterschiedlichen Polysacchariden. Dadurch verleiht es den Cellulosefasern und dem Pflanzengewebe insgesamt Druckfestigkeit und erhöht die Steifigkeit der Zellwände (Terrett und Dupree, 2018). Im Gegensatz zu anderen Biopolymeren ist Lignin weitgehend resistent gegenüber Säure- oder Base-katalysierter Hydrolyse und findet bei niedrigen Ausbeuten an Monomeren erst ab Temperaturen von über 300°C und erhöhtem Druck statt (Wang H. et al., 2013). Aufgrund der Vielzahl an unterschiedlichen Bindungen innerhalb des Lignin-Polymers ist es auch mikrobiell nur schwer abbaubar (Ruiz-Dueñas und Martínez, 2009). Durch die Quervernetzung mit den anderen Zellwandkomponenten minimiert Lignin die Zugänglichkeit von Cellulose und Hemicellulose gegenüber mikrobiellen Enzymen, was zu einem effektiven Schutz gegen mikrobiellen bzw. enzymatischen Abbau führt (Dos Santos et al., 2018). Die natürliche Widerstandsfähigkeit pflanzlicher Zellwände gegenüber mikrobiellem Abbau wird zusammengefasst auch als „Biomasse-Recalcitranz“ bezeichnet und ist, neben dem Schutz durch Lignin und der Kompaktheit der Zellwand, zudem durch die Kristallinität der Cellulose bedingt (Park et al., 2010; McCann und Carpita, 2015; Zeng et al., 2017). Eine Vorbehandlung der Biomasse ist daher unumgänglich, um diese chemisch oder biotechnologisch weiterverarbeiten zu können. Sollen aus der Biomasse fermentierbare Zucker gewonnen werden, ist eine Fraktionierung der drei Hauptbestandteile vor der enzymatischen Hydrolyse von Hemicellulose und Cellulose sinnvoll, um die enzymatische Abbaubarkeit insbesondere von Cellulose zu erhöhen. Die Vorbehandlung sollte außerdem dazu dienen, die Porosität der Biomassefasern zu erhöhen und die Kristallinität der Cellulose zu verringern, was die enzymatische Hydrolyse signifikant erhöht (Ju et al., 2013).

Biomassevorbehandlung ist unvermeidbar, stellt aber auch den größten Kostenpunkt in einer Bioraffinerie dar (Yang und Wyman, 2008). Daher haben etliche Autoren eine Liste mit Kriterien für effiziente Vorbehandlungsmethoden verfasst, die eine möglichst hohe Ausbeute an fermentierbaren Zuckern zu möglichst geringen Kosten garantieren soll (Mosier et al., 2005a; Yang und Wyman, 2008; Qin et al., 2017):

- Minimaler Bedarf an Energie: Abwärme sollte für andere Prozesse nutzbar sein.
- Vorbehandlungsmethoden, die für größere Biomassepartikel geeignet sind, sind besonders wünschenswert, da eine Verringerung der Partikelgröße z.B. durch Mahlen energie- und kostenintensiv ist.
- Minimale Kosten für Chemikalien: Der Bedarf an Chemikalien für die Vorbehandlung und eine eventuelle anschließende Neutralisation sollte minimal und kostengünstig sein. Eingesetzte Chemikalien sollten nach Möglichkeit wiederverwendbar sein.
- Geringer Wasserverbrauch: Der Einsatz möglichst hoher Rohbiomasse-Massenkonzentrationen kann den Wasser- und Energiebedarf bei der Vorbehandlung reduzieren.
- Minimierung von Abbauprodukten durch sanfte Reaktionsbedingungen: Abbauprodukte aus der Vorbehandlung von Lignocellulose, wie z.B. organische Säuren, Furanderivate und phenolische Verbindungen, verringern die Ausbeute und können die enzymatische Hydrolyse oder die anschließende Fermentation negativ beeinflussen.
- Vermeidung von Abfällen und Nebenprodukten, um Entsorgungs- und Aufarbeitungskosten zu verringern.
- Verwertung von Lignin, um weitere Wertprodukte in Folgeprozessen zu erzeugen.
- Hohe enzymatische Verdaubarkeit der vorbehandelten Biomasse, um hohe Zucker-Ausbeuten (nahe 100 %) bei minimalem Enzymbedarf zu gewährleisten.

Diese Kriterien decken sich im Wesentlichen auch mit den Prinzipien der grünen Chemie.

Mittlerweile gibt es eine Vielzahl an möglichen Vorbehandlungsmethoden, die sich, je nach Autor, grob als thermochemisch, physikalisch-chemisch, biologisch oder als eine Mischung daraus kategorisieren lassen. Jede Methode wirkt sich unterschiedlich auf die Cellulose-, Hemicellulose- und Lignin-Fraktion aus. Daher sollte die Methode und deren Prozessbedingungen abhängig vom anschließenden Prozess gewählt werden (Alvira et al., 2010). Nachfolgend werden die wichtigsten Prinzipien dieser Methoden kurz zusammengefasst. Zuckerhydrolysate, die durch das Organosolv-Verfahren gewonnen wurden, wurden in eigenen Forschungsprojekten verwendet und entstehen durch eine an die Vorbehandlungsmethode angeschlossene Hydrolyse mit einem Enzymmix aus Cellulasen und Hemicellulasen.

1.2.1 *Thermochemische Methoden*

Um hohe Zuckerausbeuten nach der enzymatischen Hydrolyse zu garantieren, sind meist harsche Vorbehandlungsmethoden notwendig. Thermochemische Vorbehandlungsmethoden garantieren aufgrund hoher Temperaturen mit oder ohne zusätzlichen Katalysator einen guten Biomasseaufschluss und verringern die Biomasse-Recalcitranz deutlich. Aufgrund der Art des Katalysators, werden thermochemische Verfahren weiter in saure, neutrale, alkalische und organische Methoden unterteilt. Die saure Vorbehandlung, z.B. mit verdünnter Schwefelsäure („Dilute Acid Pretreatment“, DAP), führt in der Regel zur Hydrolyse der Hemicellulose zu monomeren Zuckern und anderen Nebenprodukten. Neutrale Vorbehandlung, z.B. mit heißem Wasser („Liquid Hot Water Treatment“, LHW, wird von manchen Autoren den physikalisch-chemischen Methoden zugerechnet) hydrolysiert Hemicellulose durch Autohydrolyse. Durch alkalische Vorbehandlung, z.B. mit NaOH, Ammonium oder CaOH („Lime“), werden Lignin und teilweise Hemicellulose in Lösung gebracht. Organische Vorbehandlung, z.B. durch das Organosolv-Verfahren, löst hingegen selektiv Kohlenhydrate und/oder das Lignin (Qin et al., 2017).

DAP mit verdünnter Schwefelsäure ist günstig und äußerst effektiv (Kim et al. 2005; Shahbazi und Zhang, 2010). Durch Behandlung der Biomasse mit Säurekonzentrationen von 0,2 – 2 % und bei 120 - 210°C für wenige Minuten bis zu einer Stunde (González et al. 1986; Chaturvedi und Verma, 2013), werden kovalente

Bindungen, Wasserstoffbrücken und van der Waals-Kräfte innerhalb des Lignocellulosegerüsts zerstört. Als Konsequenz wird der Zusammenhalt der einzelnen Komponenten des Lignocelluloseverbundes geschwächt und Hemicellulose herausgelöst und teilweise hydrolysiert. Weiterhin führt die Behandlung mit Säure zum Aufquellen der Cellulosefibrillen, zu einer Verringerung des Molekulargewichts der Cellulose und einer Erhöhung des Kristallinitätsindex der vorbehandelten Biomasse (Zhu et al., 2009; Foston und Ragauskas, 2010; Cao S. et al., 2012). Während der Vorbehandlung kommt es zudem zu einer strukturellen Umverteilung des Lignins innerhalb des Pflanzengewebes und einem Abbau der Vernetzung zwischen den aromatischen Untereinheiten, was zu einem Matrixverlust zwischen benachbarten Zellwänden und einer zunehmenden Porosität führt, sodass die Cellulosefasern insgesamt stärker exponiert vorliegen und somit besser enzymatisch zugänglich sind (Ji et al., 2015). Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, dass giftige und unerwünschte Nebenprodukte, wie z.B. Furfural und HMF entstehen (Larsson et al., 1999; 2000), und, dass eine nachträgliche Neutralisation notwendig ist (Shahbazi und Zhang, 2010).

Dieser Nachteil wird bei der LHW-Methode umgangen, da hier lediglich Wasser verwendet wird. Bei Temperaturen von 160-240°C und hohem Druck wirkt Wasser als schwache Säure, so dass ebenfalls Hemicellulose aus dem Lignocelluloseverbund herausgelöst und teilweise hydrolysiert wird (Mok und Antal, 1992; Perez et al., 2008). Die Cellulosefasern werden dadurch besser zugänglich für die anschließende enzymatische Hydrolyse, sodass Hydrolyseeffizienz und Zuckerausbeute steigen (Zeng et al., 2012). Aufgrund der sehr viel milderen Prozessbedingungen im Vergleich zu DAP, verbleibt ein Großteil der Cellulose in ungelöster Form und es entstehen insgesamt weniger Monosaccharide und damit auch Nebenprodukte (Mosier et al., 2005b). Darüber hinaus führen die aus der Biomasse freigesetzten organischen Säuren auch zur Verringerung an β -O-4 Bindungen innerhalb des Lignins und zu anderen strukturellen Veränderungen (Leschinsky et al., 2008; Wang W. et al., 2016), was zu einer weiteren Erhöhung der Zugänglichkeit von Cellulose führt (Wang W. et al., 2016; Lü et al., 2017). Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings der hohe Bedarf an Energie und Wasser (Liu und Wyman, 2005).

Im Allgemeinen sind saure und neutrale Vorbehandlungsmethoden besser für krautige Biomasse und landwirtschaftliche Rückstände (z.B. Maisstroh, Weizenstroh und Miscanthus) sowie Hartholz (z.B. Pappel und Olivenholz) geeignet, während sie für Weichholz (z.B. Kiefer und Douglasie) weniger effektiv sind (Xu und Huang, 2014). In beiden Prozessen verbleibt allerdings das Lignin in der Restbiomasse, eine Delignifizierung findet im Gegensatz zu den alkalischen Methoden daher nicht statt. Alkalische Vorbehandlung der Biomasse, insbesondere mit NaOH (Vankov and McIntosh, 2011) und CaOH (Kim und Holtzapfle 2005; 2006) kann bei wesentlich niedrigeren Temperaturen und Drücken stattfinden als DAP und funktioniert auch unter Umgebungstemperaturen (Vankov and McIntosh, 2011; Wu et al., 2011; Kim et al., 2016). Allerdings verlängert sich die Vorbehandlungszeit auf mehrere Stunden oder Tage. Die Delignifizierung findet wahrscheinlich durch eine Verseifung der intermolekularen Esterbindungen zwischen der Hemicellulose und dem Lignin, sowie durch die Spaltung der Bindungen innerhalb des Lignin-Kohlenhydrat-Komplexes statt (Chen et al., 2013). Durch die Behandlung mit Alkali werden zudem Acetylgruppen und Uronsäure-Substituenten entfernt, so dass sich die Zugänglichkeit von Cellulose und Hemicellulose gegenüber hydrolytischen Enzymen stark erhöht (Zhang und Lynd, 2004). Ein bedeutender Nachteil ist allerdings die hohe Salzbelastung, die bei der Verseifung entsteht. Ausgefallene Alkalisalze können u. U. nur schwer oder gar nicht zurückgewonnen werden (Wan et al., 2011; Chen et al., 2013).

Durch das Organosolv-Verfahren kann über 70 % des Lignins aus der Biomasse entfernt werden, ohne dass es zu nennenswerten Verlusten an Cellulose kommt (< 2%) (Zhang C et al., 2016a). Lignin kann als Feststoff und die Kohlenhydratfraktionen in Form von Sirup gewonnen werden. Beim Organosolv-Verfahren wird die Biomasse mit organischen Lösungsmitteln, wie z.B. Ethanol in Konzentrationen von 35-70% (w/v), für 30-90 min bei 180–195°C inkubiert (Zhang C et al., 2016a). Dabei wird Cellulose in kleinere, aber dennoch unlösliche, Fragmente gespalten. Die Hemicellulose wird zu löslichen Monosacchariden, Polysacchariden und Essigsäure hydrolysiert, während Lignin durch die Spaltung der β -O-4 Bindungen in kleinere Bruchstücke depolymerisiert wird, die sich in der wässrigen Ethanol-Lauge lösen und selektiv ausgefällt werden können (Zhao et al., 2009; Nitsos et al., 2018) (Abbildung 5). Somit ist eine Nutzung aller drei Polymere möglich. Verglichen mit den

anderen Methoden, resultiert das Organosolv-Verfahren auch in der höchsten prozentualen Umwandlungsrate (>80 %) der Cellulose zu Monosacchariden. Die verwendeten organischen Lösungsmittel müssen entfernt werden, um Inhibition von Enzymen und Mikroorganismen zu vermeiden, und um Lösungsmittel-Kosten zu sparen. Dies ist zwar im Falle von Ethanol relativ einfach durch Destillation möglich, verteuert aber den Prozess (Capolupo und Faraco, 2016).

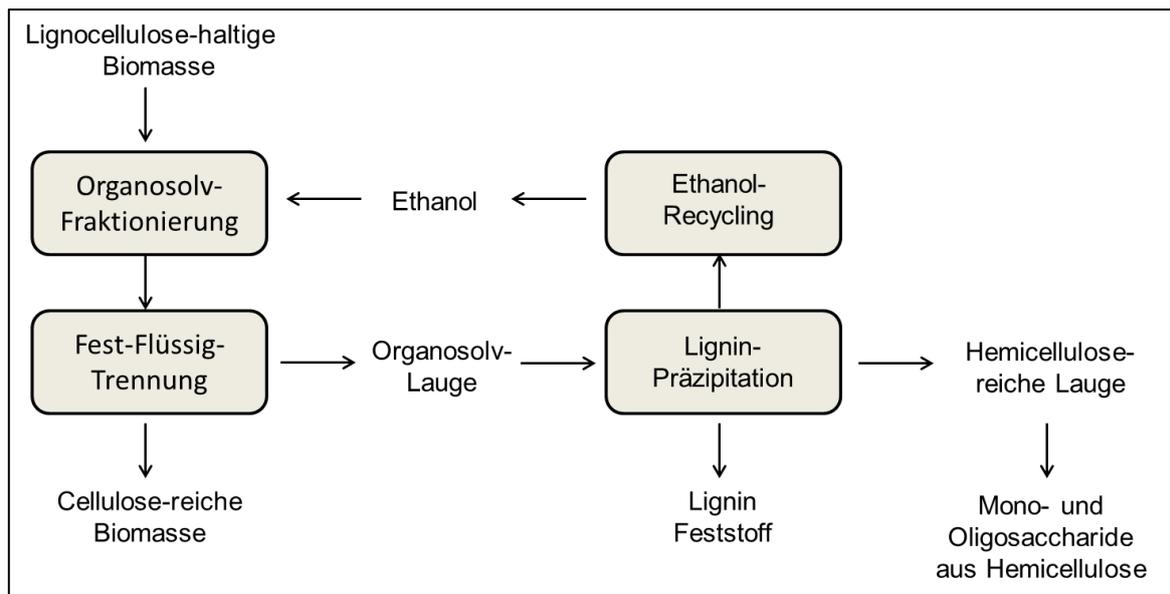


Abbildung 5: Prozessschema des Ethanol-Organosolv-Verfahrens (nach Nitsos et al., 2018).

1.2.2 Physikalisch-chemische Methoden

Physikalisch-chemische Methoden, wie z.B. Dampfexplosion („Steam Explosion“, SE) und Extrusion, verwenden zwar ähnlich harsche Reaktionsbedingungen wie thermochemische Methoden, um hohe Verzuckerungsraten zu erzielen, jedoch werden entweder gar keine oder nur ungiftige Chemikalien eingesetzt (Capolupo, und Faraco, 2016).

Unter den physikalisch-chemischen Methoden wird SE am häufigsten für die Vorbehandlung lignocellulose-haltiger Biomasse angewendet und gilt als eine der effizientesten Methoden für Biomasse aller Art, einschließlich Laubholz (Schultz et al., 1983; Estevez et al. 2012), Nadelholz (Pielhop et al., 2016), landwirtschaftliche (Ballesteros et al. 2002; Duangwang et al., 2016; Wood et al., 2016) und kommunale Abfälle (Dereix et al., 2006; Zhang et al., 2018) sowie forstwirtschaftliche Rückstände

(Hooper und Li, 1996; Kurabi et al., 2005). SE wurde im Pilotmaßstab entwickelt (Sharma et al., 2015) und wird in kommerziellen Bioraffinerien angewendet (Brethauer und Studer, 2015). Für den Aufschluss wird die Biomasse wenige Sekunden bis einige Minuten lang bei 160–260°C und unter Druck (20–50 bar) mit Wasserdampf behandelt, bevor plötzlich entspannt wird, sodass eine Explosion entsteht, was zu einer Trennung von Fasern und Faserbündeln führt (Auxenfans et al., 2017). Während der Inkubation mit dem heißen Dampf, wird die Biomasse erhitzt und deren Mikroporen mit heißem Wasser abgesättigt. Das Wasser wirkt als schwache Säure, was die Autohydrolyse von Hemicellulose zu Oligosacchariden und Monosacchariden initiiert. Auf diese Weise werden Hemicellulose-Bestandteile im heißen Wasser gelöst und können abgetrennt werden. Ähnlich wie bei LHW und DAP, werden auch hier die β -o-4 Bindungen innerhalb des Lignins gespalten. Als Folge der explosiven Dekompression werden Partikelgröße der Biomasse, Faserlänge und die Kristallinität der Cellulose reduziert, was zu einer Vergrößerung der Oberfläche und Erhöhung der Porosität führt (Auxenfans et al., 2017). Am Ende des Prozesses wird eine Schlämme erhalten, aus der eine cellulose-reiche Fraktion abgetrennt werden kann. Das Filtrat wiederum ist angereichert mit der Ligninfraktion. Vorteile sind die große Wirtschaftlichkeit dieser Methode und der niedrige Energiebedarf. Ähnlich wie bei DAP können aber auch hier wegen der hohen Temperaturen Inhibitoren entstehen (Capolupo, und Faraco, 2016).

Bei der Extrusion wird die Biomasse kontinuierlich und unter Druck durch eine Düse gepresst. Bei ihrem Weg durch den Extruder wird die Biomasse gemischt, geschert, gemahlen, erhitzt und wird zusätzlich, ähnlich wie bei SE, schlagartig beim Verlassen durch die Düse ausgedehnt. Dies führt zu einer physikalischen und chemischen Veränderung der Cellulose, der Hemicellulose und des Lignins, was eine Vergrößerung der Oberfläche (Karunanithy and Muthukumarappan 2011a, b) und der Porengröße bewirkt (Jurisic et al. 2009), sodass Cellulose für die enzymatische Hydrolyse besser zugänglich wird. Extrusion wurde bereits erfolgreich an verschiedenen Biomassen getestet, wie z.B. Reisstroh (Chen et al. 2011), Rutenhirse (Karunanithy and Muthukumarappan 2010), Weizenkleie (Lamsal et al., 2010), Maisstroh (Zhang et al., 2012), und Weizenstroh (Vandenbossche et al., 2014). Die Vorbehandlung durch Extrusion hat einige Vorteile gegenüber anderen Methoden, da sie kostengünstig ist, kommerziell für andere Prozesse erhältliche Extruder

verwendet werden können, eine gute Prozessüberwachung und -steuerung aller Variablen erlaubt, und keine Zuckerabbauprodukte erzeugt (Duque et al., 2013; Zheng und Rehmann, 2014).

1.2.3 *Biologische Methoden*

Lignocellulose-haltige Biomasse wird in der Natur unter Umgebungsbedingungen durch Mikroorganismen abgebaut. Dabei sind insbesondere die Weißfäulepilze hervorzuheben, die alle Komponenten der Biomasse, inklusive Lignin, abbauen können (Dashtban et al., 2010; Janusz et al., 2017). Durch den Abbau des Lignins durch Laccasen und verschiedene Peroxidasen können Weißfäulepilze sich schließlich ihre eigentliche Energie- und Kohlenstoffquelle, die Cellulose, erschließen. Laccasen, Lignin-Peroxidasen und Mangan-abhängige Peroxidasen oxidieren phenolische Komponenten des Lignins, um Phenoxy-Radikale zu erzeugen. Diese Radikale dienen wiederum als Substrat für Lignin-abbauende Peroxidasen. Lignin-Peroxidase bewirkt die Oxidation der nicht-phenolischen Phenylpropanoid-Einheiten, was zur Spaltung von C-C und C-O Bindungen und zum Abbau des Lignins führt (Singh und Chen, 2008; Sindhu et al., 2016). Im Gegensatz zu den anderen Vorbehandlungsmethoden ist der biologische Ansatz sehr viel langsamer, könnte aber eine gute Ergänzung darstellen, da durch Zugabe von Laccase die Konzentration inhibierender phenolischer Substanzen verringert wird (Jurado et al., 2009; Moreno et al., 2012). Die Verwendung von Mikroorganismen für die Fermentation von Wertprodukten, die in der Lage sind, Cellulose- und Hemicellulose-Fractionen ohne vorherige enzymatische Verzuckerung zu nutzen, ist ein weiterer Ansatz, um Kosten zu sparen. Weiterhin sind anaerobe Pilze in der Lage, sehr viel schneller als Weißfäulepilze direkt auf unbehandeltem Weizenstroh zu wachsen und dabei Wasserstoff und verschiedene organische Säuren zu bilden (Bauchop and Mountfort, 1981; Cheng et al., 2009). Dazu produzieren sie Enzyme, die selektiv Hemicellulose und Cellulose, jedoch nicht das Lignin abbauen (Wood and Wilson, 1995; Youssef et al., 2013; Berg und McClaugherty, 2014).

Für die vollständige Hydrolyse von Cellulose zu Glucose sind eine Vielzahl an unterschiedlichen Enzymaktivitäten erforderlich, nämlich Cellobiohydrolasen (CBHs,

unterteilt in CBH1 und CBH2), Endoglucanasen (EGs) und β -Glucosidasen (BGLs) (Gusakov et al., 2007; Jørgensen et al., 2007). CBH1 und CBH2 bewegen sich prozessiv entlang der Celluloseketten und spalten Cellobioseeinheiten vom reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Ende her ab. EGs hydrolysieren glykosidische Bindungen innerhalb der Celluloseketten, während BGLs die Oligosaccharide weiter in Glucose umwandeln (Banerjee et al., 2010; Gao et al., 2010) (Abbildung 6).

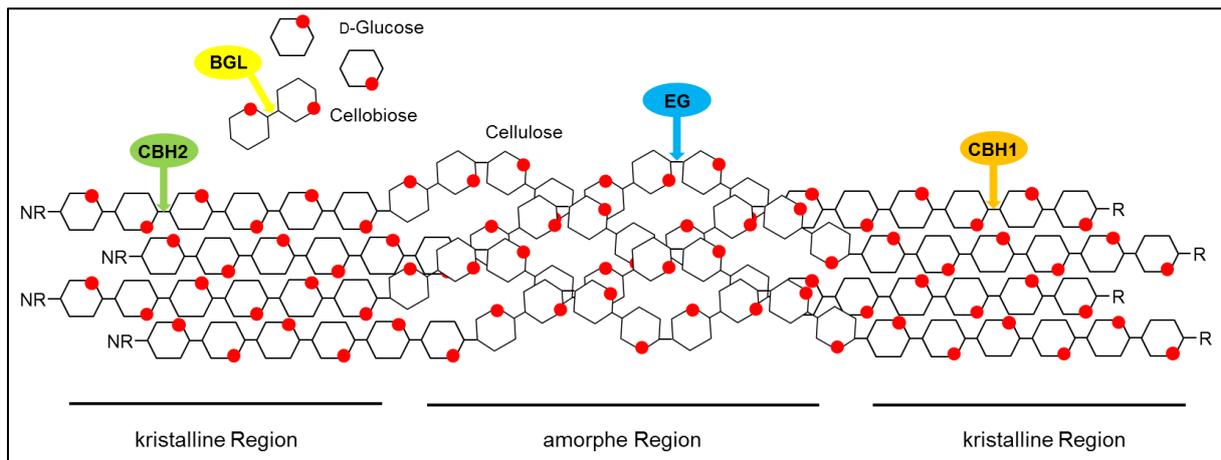


Abbildung 6: Enzymatischer Abbau von Cellulose. Für die vollständige Hydrolyse von Cellulose werden Cellobiohydrolasen (CBH), Endoglucanasen (EG) und β -Glucosidasen (BGL) benötigt. CBHs spalten Cellulose prozessiv und setzen Cellobiose vom reduzierenden (R) (CBH1) oder nicht-reduzierenden (NR) Ende (CBH2) der Cellulosekette her frei. EG hydrolysieren glykosidische Bindungen innerhalb der Celluloseketten, während BGL die freigesetzten Cellobiose-Einheiten zu Glucose spalten (nach Berlin, 2013).

Die komplementären Aktivitäten der einzelnen Enzyme wirken synergistisch, sodass die Aktivität der Mischung höher ist, als die der Summe der Einzelenzyme (Cavaco-Paulo et al., 1997; Ma et al., 2011). Die für die Verzuckerung der vorbehandelten Lignocellulosefraktionen kommerziell eingesetzten Cellulase-Mischungen stammen hauptsächlich vom filamentösen Pilz *Trichoderma reesei*, der alle wesentlichen Enzyme für die vollständige Hydrolyse von Cellulose produziert (Bischof et al., 2016; Paloheimo et al., 2016). Die sekretierten Cellulasen enthalten zwei CBHs (CBH1 und CBH2) und mindestens vier EGs (EG1, EG2, EG3 und EG5), die synergistisch mit BGL1 und verwandten Hemicellulasen zusammen wirken, um Cellulose vollständig abzubauen (Kubicek et al., 2009; Bischof et al., 2016). CBH1 und CBH2 sind die wichtigsten Cellulasekomponenten, die 50-60 bzw. 10-15% der sekretierten Proteine

von *T. reesei* ausmachen (Rosgaard et al., 2007). Die Effizienz des cellulolytischen Enzymsystems hängt zudem nicht nur von den Eigenschaften der einzelnen Enzyme ab, sondern auch von deren Verhältnis im Enzymcocktail (Gusakov et al., 2007). Obwohl die Aktivität kommerzieller Cellulasen über die letzten Jahre signifikant gestiegen ist, stellen Enzymkosten weiterhin einen erheblichen Kostenfaktor für die Gewinnung von Zuckern aus Biomasse dar (Klein-Marcuschamer et al., 2012; Liu et al., 2013; Ellilä et al., 2017). Zu den wichtigsten Strategien zur Verbesserung der Aktivität des Enzymcocktails (und damit zur weiteren Senkung der Enzymkosten) zählen neben dem Screening nach und der Charakterisierung von neuen Cellulasen auch die Optimierung der Enzymzusammensetzung und das Verhältnis der einzelnen Enzyme (Zhou et al., 2009; Qian et al., 2017; Seppälä et al., 2017). Trotz der Bedeutung als industrieller Enzymproduzent ist in den letzten Jahren deutlich geworden, dass das Genom von *T. reesei* unter allen Pilzen, die zum Abbau der Pflanzenzellwand fähig sind, für die kleinste Vielfalt an Cellulasen und Hemicellulasen kodiert (Martinez et al., 2008). Im Gegensatz dazu verfügen anaerobe Pilze über den größten und vielfältigsten Bestand an biomasseabbauenden Enzymen unter allen bisher sequenzierten Pilzen (Seppälä et al., 2017). Zudem scheint die sekretierte Enzymmischung durch die Zusammensetzung des Substrates reguliert zu werden, so dass immer die optimale Zusammensetzung produziert wird (Solomon et al., 2016). Erste Studien zur Charakterisierung einer Cellulobiohydrolase aus dem anaeroben Pilz *Neocallimastix patriciarum* zeigten, dass diese eine bis zu 1000-fach höhere spezifische Aktivität aufwies als die aus *T. reesei* (Denman et al., 1996). Dies verdeutlicht das enorme Potential zur Einsparung von Enzymkosten.

1.2.4 Nicht-fraktionierende Verfahren / bioliq®-Prozess

Wie bereits weiter oben erwähnt, ist nicht die Menge an lignocellulose-haltiger Biomasse das Problem, sondern deren Logistik. Stroh- und Waldreste fallen in der Regel großflächig verteilt an und müssen daher gesammelt und zu einer Konversionsanlage transportiert werden. Da aber vor allem Stroh eine geringe Energiedichte hat, sind die Transportkosten und der Transportaufwand pro Tonne recht hoch, so dass sich die Herstellung des Endproduktes entsprechend verteuert

und damit eventuell unrentabel macht. Um dieses Problem zu lösen, verwendet der bioliq®-Prozess am KIT eine dezentrale (lokale) Vorbehandlung in Kombination mit einer zentralen Vergasung (Dinjus und Dahmen, 2012). Der bioliq®-Prozess ist ein sogenannter "Biomass to Liquid in Two Steps" (BTL2)-Prozess aufgrund der Kombination von lokaler Schnell-Pyrolyse und zentraler Gasifizierung und Kraftstoffherstellung (Raffelt et al., 2006; Leible et al., 2008). Mit diesem BTL2-Konzept ist es möglich, die Kosten pro Gallone Benzinäquivalent synthetischer Kraftstoffe zu senken, wie Wright et al. (2008) für Fischer-Tropsch-Kraftstoffe zeigen konnten. Das bei der Schnell-Pyrolyse erzeugte Pyrolyseöl hat eine 15-fach höhere Energiedichte als Weizenstroh und ein hohes Potenzial als gut transportierbares, lagerstabiles Zwischenprodukt für eine weitere energetische Nutzung oder als Plattform für die Gewinnung von chemischen Grundprodukten (Venderbosch und Prins, 2010). Während des Pyrolyseprozesses werden thermisch und unter Sauerstoffausschluss die Bindungen zwischen den Polymeren der einzelnen Biomassebestandteile aufgebrochen, was in einer Vielzahl von Verbindungen resultiert, darunter organische Säuren, phenolische Verbindungen und Aldehyde, Ketone und Anhydrozucker (Neumann et al., 2015; Venderbosch, 2015). Innerhalb des bioliq®-Prozesses stellt Pyrolyseöl nur ein Zwischenprodukt für die weitere Gasifizierung zur Herstellung von Synthesegas dar (Abbildung 7). Da Pyrolyse aber eine schnelle und zumindest im bioliq®-Prozess auch eine energieneutrale Biomassevorbehandlung ist, wäre es prinzipiell denkbar, Pyrolyseöl auch als biotechnologisches Substrat einzusetzen. Zusätzlich dazu entsteht ein weiteres wässriges Kondensat (= Schwelwasser) bei der Pyrolyse von nicht-holzigen Biomassen und stellt ein wesentliches Nebenprodukt dar. Es ist ähnlich komplex aufgebaut wie Pyrolyseöl, enthält aber einen weitaus höheren Wasseranteil, so dass für Mikroorganismen kritische Komponenten in weit niedrigerer Konzentration enthalten sein könnten (Oasmaa et al., 2003). Aufgrund der niedrigeren Konzentrationen und des hohen Wasseranteils wird Schwelwasser derzeit weder stofflich, chemisch noch energetisch genutzt und stellt somit einen kontinuierlich anfallenden, bisher nicht genutzten Nebenstrom des bioliq®-Prozesses am KIT dar (Nicoleit, 2016). Eine biotechnologische Nutzung mit Schwelwasser als Kohlenstoffquelle wäre prinzipiell möglich (Lian et al., 2012) und würde nicht mit

anderen Verwertungsarten konkurrieren, was in zwei weiteren Projekten derzeit untersucht wird.

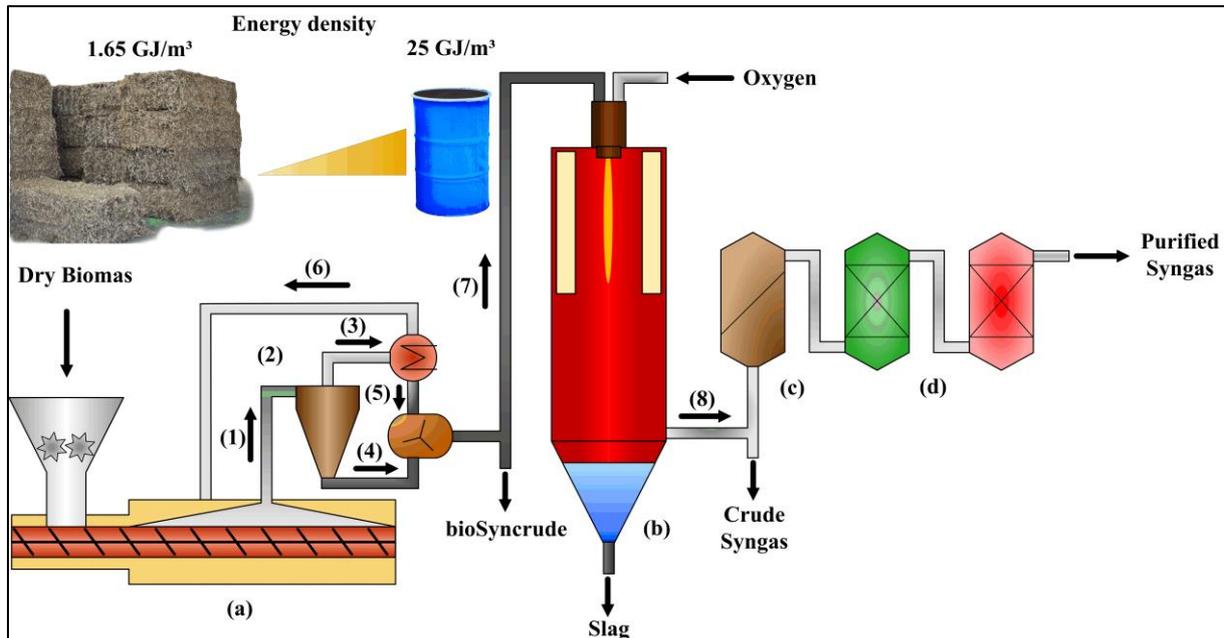


Abbildung 7: Schema des bioliq®-Prozesses am KIT mit Schnellpyrolyse und Gasifizierung. Die Schnell-Pyrolyse dient der Erhöhung der volumetrischen Energiedichte der eingesetzten Biomasse, z.B. Weizenstroh. Das Pyrolyseabgas (1) wird durch einen Zyklon in Koks (3) und Pyrolysegase (2) getrennt, die dann zu organischen und wässrigen Kondensaten (4) kondensiert werden, die die nicht kondensierbare Phase (5) zur Wiederaufheizung des Wärmeträgers verlassen. Koks und Kondensate werden zu einem dicken und energiereichen „Slurry“ (6) vermischt, der dann in einem Flugstromvergaser mit Sauerstoff vergast wird. Das gebildete Synthesegas wird anschließend für die chemische Synthese gereinigt. Slurry, rohes oder gereinigtes Synthesegas können auch als Ausgangsstoff für biologische Umwandlungsprozesse mit Mikroorganismen eingesetzt werden. (a) Schnell-Pyrolyse-Stufe, (b) Vergasungsstufe, (c) Partikelfilter, (d) Gasreinigung (aus Neumann et al., 2015)

Im bioliq®-Prozess wird im nächsten Schritt das Pyrolyseöl bei mehr als 1200°C in einem Flugstromvergaser mit Sauerstoff und Dampf als Vergasungsmedien zu Synthesegas umgewandelt (Dahmen et al., 2012). Die Reaktionstemperatur wird durch Teilverbrennung des Einsatzstoffes erreicht, wodurch die Vergasung unabhängig von zusätzlicher Hilfsenergie ist (Raffelt, 2006). Das resultierende Synthesegas ist teer-frei und arm an Methan (weniger als 0,1 Vol%). Die allgemeine Zusammensetzung von Synthesegas aus der Vergasung von Pyrolyseöl aus der Schnell-Pyrolyse von Stroh liegt im Bereich von 46,5 Vol% CO, 25 Vol% H₂ und 16,5 Vol% CO₂ (Dahmen et al., 2008). Aus Synthesegas wiederum können eine Vielzahl an unterschiedlichen Verbindungen hergestellt werden, so dass man auch von einer

Syngas-Bioraffinerie sprechen kann (Wagemann und Tippkötter, 2019). Die beiden Hauptsyntheserouten sind das Fischer-Tropsch-Verfahren zur Herstellung von Kohlenwasserstoffen und die Methanolproduktion. Methanol wiederum ist der Ausgangspunkt für die Synthese von vielen weiteren chemischen Verbindungsklassen, wie Kohlenwasserstoffe, Ethylen, Propylen, Ether und Aromaten, um nur einige zu nennen. Die meisten Reaktionen sind jedoch nicht vollständig selektiv; die Integration zusätzlicher Prozessschritte ist daher notwendig, um verschiedene Nebenproduktströme zu nutzen oder zu recyceln (Dahmen et al., 2019). Auch Kombinationen einer chemischen Synthese und einer anschließenden mikrobiellen Umwandlung können vielversprechend sein, wie z.B. die Fermentation von Synthesegas (Daniell et al., 2012; Bengelsdorf et al., 2013) oder die Co-Fermentation von (nicht umgesetzten) Synthesegas und Methanol.

Der Vorteil von Pyrolyse und Gasifizierung liegt in der großen Flexibilität der einsetzbaren Lignocellulosematerialien. Anders als bei den fraktionierenden Verfahren, deren Anlagen in der Regel nur für eine Biomasse optimiert sind und diese deshalb nicht so einfach auf andere Biomassenrohstoffe umsteigen können, können mit der BtL –Technologie so ziemlich jede trockene Biomasse, organischer Rest oder Abfall verarbeitet werden. Somit wird man unabhängig von Saison und Klimazone und kann die Rohstoffe nutzen, die gerade günstig und in großen Mengen verfügbar sind (Neumann et al., 2015). Kommerzielle Syngas-Bioraffinerien zur Herstellung von synthetischen Kraftstoffen und Chemikalien sind noch nicht auf dem Markt. Deren Etablierung erfordert komplexe und kostenintensive Technologien, so dass sie erst ab einer gewissen Größe wirtschaftlich werden (Dahmen et al., 2019). Die Synthesegas-Fermentation zur Herstellung von hauptsächlich Acetat und Ethanol mit acetogenen Bakterien ist wiederum bereits kommerzialisiert. Im Gegensatz zur chemischen Umwandlung kann Rohsynthesegas direkt als Ausgangsstoff für Mikroorganismen verwendet werden, da diese in der Regel mehr als 2 % H_2S oder COS (Vega et al., 1990; Grethlein et al., 1992) und bis zu 1 mM Cyanid (Oswald et al., 2018) tolerieren, wodurch eine Vorreinigung entfällt. Da Ethanol sogar durch Fermentation von CO -reichem Abgas z.B. aus der Stahlerzeugung produziert werden kann, kann es auch als Biokraftstoff der vierten Generation bezeichnet werden. Acetogene Bakterien, die auf Syngas als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen, leben am thermodynamischen Limit. Lediglich durch die Erzeugung von

Acetat können kleinste Mengen an Energie gewonnen werden, nämlich zwischen $n = 0,3$ und $n = 0,63$ mol ATP pro produziertem Mol Acetat. Daher beschränkt sich das Produktportfolio auch hauptsächlich auf Acetat und Ethanol. Stammabhängig werden in geringen Mengen auch Butyrat, Butanol, Aceton und 2,3-Butandiol gebildet. Jedoch verringert die Erzeugung dieser Produkte bereits die niedrige Energieausbeute weiter (Schuchmann und Müller, 2014; Neumann et al., 2015). Eine Möglichkeit, das Produktspektrum zu erweitern, wäre, das gebildete Acetat als Kohlenstoffquelle für eine zweite Fermentation zu nutzen (Oswald et al., 2016).

Wie in diesem Kapitel beschrieben, kann lignocellulose-haltige Biomasse in höchst unterschiedlicher Weise vorbehandelt werden. Die daraus resultierenden zuckerreichen Hydrolysate bzw. Syngas können chemisch und biotechnologisch in vielfältiger Weise zu den unterschiedlichsten Produkten weiterverarbeitet werden. Damit entspricht in einer Bioraffinerie die vorbehandelte Biomasse in etwa der Naphtha-Fraktion des Erdöls in einer Erdölraffinerie. Der nächste Schritt wäre demnach, aus der Biomasse hochreine, vielseitig verwendbare Plattformchemikalien zu gewinnen, ähnlich den sechs Olefinen und Aromaten aus der Erdölraffinerie, die dann wiederum der Ausgangspunkt für ganze Familien von nützlichen Molekülen und Polymeren sind. Welche Plattformchemikalien dafür besonders geeignet sind, beleuchtet das nächste Kapitel.

1.3 Plattformchemikalien für die biobasierte Wirtschaft

Die Verwendung vorbehandelter Biomasse, sei es in Form von Zuckerhydrolysaten oder Syngas, als Ausgangsmaterial für chemische Synthesen oder biotechnologische Verfahren ist Gegenstand vieler Forschungsarbeiten. Dementsprechend vielfältig sind die daraus gewonnenen Zielprodukte. Bei einer Zusammenstellung möglicher Plattformchemikalien, die aus Biomasse gewonnen werden können, kam das U.S. Department of Energy 2004 nach ausführlicher Literatur- und Datenbankrecherche auf über 300 mögliche Verbindungen (Werpy und Petersen, 2004). Diese Zahl wird innerhalb der letzten 15 Jahre wahrscheinlich noch gestiegen sein. Bozell und Petersen (2010) bewerten diese Fülle an Möglichkeiten eher als Überforderung für die chemische Industrie und befürworten es daher, sich, ähnlich wie in einer Erdölraffinerie, auf einige wenige, ausgewählte Rohchemikalien und sekundäre

Intermediate zu fokussieren, die dann chemisch weiter veredelt werden. Schwartz et al. (2016) gaben zusätzlich zu bedenken, dass das Produktspektrum einer Bioraffinerie eine gewisse Flexibilität aufweisen sollte, um sich an die wandelnden Bedürfnisse der chemischen Industrie anzupassen zu können. Dies kann ihrer Meinung nach am besten durch die Kopplung von chemischer Katalyse und Biotechnologie erreicht werden. Ähnlich wie Bozell und Petersen (2010) sind auch sie der Meinung, dass insbesondere aus Kohlenhydraten mit vielen funktionalen Gruppen selektive „Defunktionalisierungen“ zu Plattformchemikalien am besten biotechnologisch erfolgen können, da dies chemisch herausfordernd ist. Bezüglich der Frage, wie weit „defunktionalisiert“ werden soll, gibt es im Wesentlichen zwei Sichtweisen (Sheldon, 2014) (Abbildung 8):

1. Vollständige Defunktionalisierung, d.h. Entfernung aller Sauerstoffmoleküle, zu Kohlenwasserstoffen, die dann als „Drop-In“-Moleküle in den für Petrochemikalien existierenden Prozessen weiterverarbeitet werden. Hierzu könnten biotechnologisch zunächst kurzkettige Alkohole, wie Ethanol, Propanol oder Butanol, hergestellt werden, die dann anschließend zu den entsprechenden Alkanen dehydriert werden. Die Bioethanolproduktion ist mittlerweile ein etablierter und kommerzialisierter Prozess (Zabed et al., 2017), daher könnte dieser Weg relativ einfach umgesetzt werden. Tatsächlich wurde bereits vor etlichen Jahren vorgeschlagen, Bioethanol nicht mehr hauptsächlich energetisch, sondern stofflich als Plattformchemikalie zu nutzen (Rass-Hansen et al., 2007; Posada et al., 2013), z.B. für die Produktion von Bioethylen (Mohsenzadeh et al., 2017), Propylen, 1,3-Butadien, Isobuten, Acetaldehyd, Ethylenoxid, n-Butanol, Essigsäure, Ethylacetat, Aceton und Diethylether (Posada et al., 2013). Alternativ könnten mikrobiell direkt Kohlenwasserstoffe über den Isoprenoid-Stoffwechselweg (Li und Wang, 2016) oder die Fettsäurebiosynthese (Wang und Zhu, 2018) produziert werden. Da es aufgrund der geringen Reaktivität von Alkanen schwierig ist, diese selektiv chemisch wieder zu funktionalisieren, sind Alkene, insbesondere α -Olefine, äußerst nützliche Plattformchemikalien in petrochemischen Raffinerien. Obwohl es möglich ist, α -Olefine durch Kombination von chemischer und Bio-Katalyse herzustellen, werden keine hohen Ausbeuten erzielt (Wang H. et al., 2013; Lopez-Ruiz und Davis, 2014). Aromatische Kohlenwasserstoffe könnten aus katalytisch veredeltem Pyrolyseöl gewonnen werden (Karnjanakom et al., 2016).

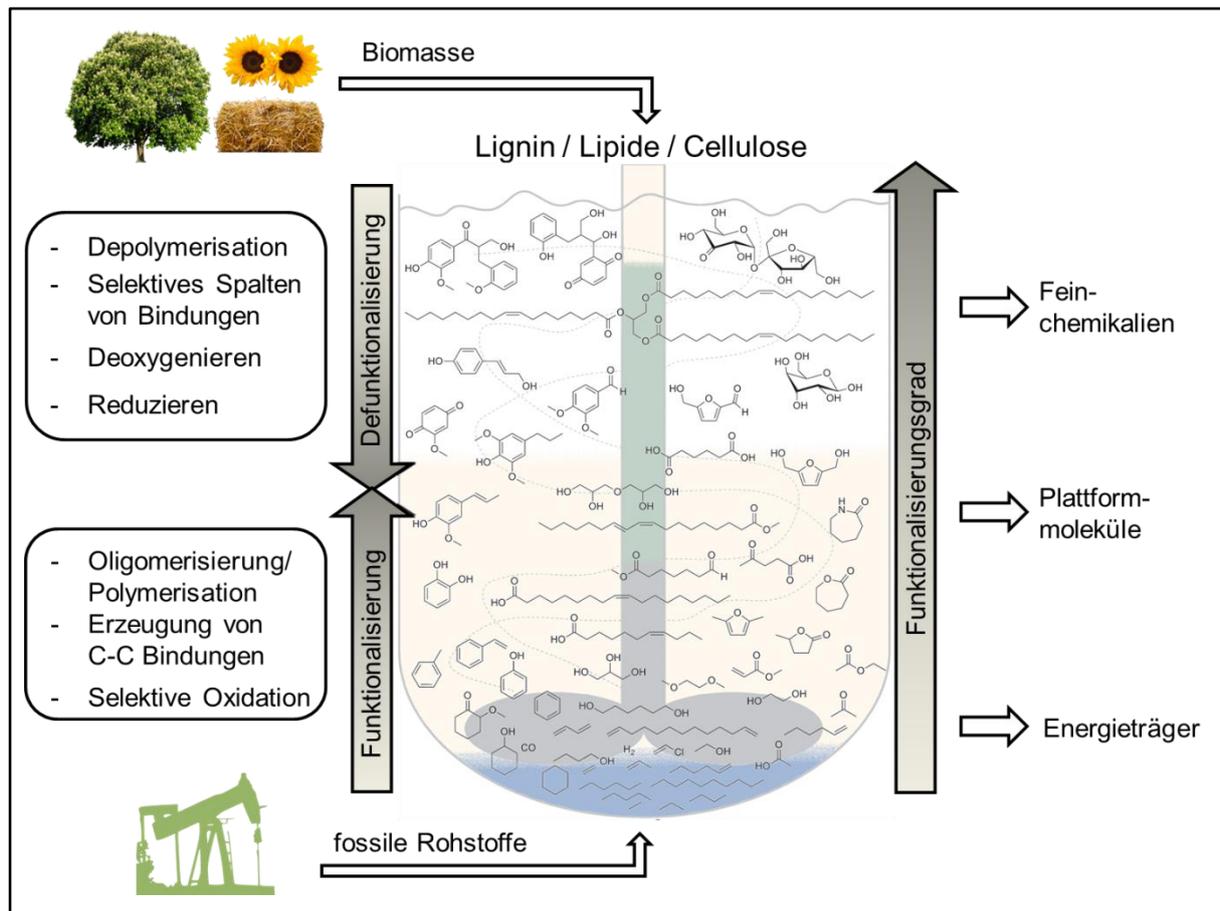


Abbildung 8: Defunktionalisierung von Biomasse vs. Funktionalisierung von fossilen Rohstoffen zur Herstellung von Energieträgern, Plattformchemikalien und Feinchemikalien (modifiziert aus: Deuss et al., 2014. Published by The Royal Society of Chemistry).

Jedoch sind viele gängige Intermediate und Folgeprodukte, die letztlich aus einer traditionellen Erdölraffinerie stammen, sauerstoffhaltig. Es scheint daher etwas unlogisch, aus Kohlenhydraten über mehrere Schritte erst die sauerstoffhaltigen Funktionalisierungen zu entfernen, um diese dann hinterher katalytisch wieder einzubringen. Dies widerspricht auch den Konzepten der Atom-, „Step“- und Redox-Ökonomie innerhalb der organischen Chemie, wonach durch eine gut geplante Synthesestrategie unnötige Schritte grundsätzlich vermieden und unnötige nicht-strategische Redox-Manipulationen minimiert werden sollten. Oxidationszahlen von Zwischenprodukten sollten kontinuierlich im Laufe der Synthese erhöht oder erniedrigt werden, sodass zusätzliche Redoxschritte entfallen (Burns et al., 2009). Dies wird bei der zweiten Möglichkeit berücksichtigt:

2. Direkte Umwandlung zu (sauerstoffhaltigen) Plattformchemikalien. Eine große Vielzahl an unterschiedlichen Verbindungsklassen, z.B. niedere Alkohole, Diole, Mono- und Dicarbonsäuren, können durch mikrobielle Fermentation direkt aus Kohlenhydraten redox-effizient hergestellt und chemisch einfach weiterveredelt werden. Meist enthalten diese Moleküle mehr als eine funktionelle Gruppe. Schwartz et al. (2016) gaben zu bedenken, dass es chemisch sehr schwierig sein kann, bei bifunktionalen Molekülen mit zwei gleichen funktionalen Gruppen selektiv nur eine der beiden Funktionalitäten umzusetzen. Daher sind Moleküle mit zwei unterschiedlichen funktionellen Gruppen, wie z.B. Milchsäure, zu bevorzugen. Das gleiche gilt natürlich auch für tri- oder noch höher funktionalisierte Moleküle. Besonders vorteilhaft halten Schwartz et al. (2016) daher ein Molekül mit drei unterschiedlichen funktionellen Gruppen, beispielsweise ein Polyketid, so dass es möglich ist, selektiv jeweils eine dieser Gruppen umzusetzen. Ein solches Molekül würde es ermöglichen, flexibel mehrere Endprodukte zu synthetisieren, die entweder direkt als „Drop-In“ Moleküle eingesetzt werden können oder neuartige Chemikalien mit einzigartigen Eigenschaften darstellen, die durch die Petrochemie nicht erzeugt werden können.

Neben diesen praktischen Erwägungen hat das U.S. Department of Energy weitere, eher ökonomische und strategische Kriterien angelegt, um aus den über 300 identifizierten Verbindungen die aus ihrer Sicht zwölf vielversprechendsten auszuwählen (Werpy und Petersen, 2004). Dazu kategorisierten sie alle Verbindungen anhand folgender Kriterien in drei Gruppen:

1. Die Verbindung selbst oder das direkte Folgeprodukt ist ein identisches „Drop-In“-Äquivalent und ersetzt eine petrochemische Chemikalie oder Produkt, z.B. Acrylsäure aus Milchsäure ersetzt Acrylsäure aus Propylen. Ökonomisch betrachtet, liegen die Vorteile darin, dass ein entsprechender Marktbedarf vorhanden ist, Wachstumspotenziale und Kostenstrukturen bekannt sind und damit wenig Marktrisiko besteht. Es kommt zu keiner Produktveränderung, da biobasierte und petrochemisch hergestellte Produkte absolut identisch sind. Allerdings kann dies zu mangelnder Marktdifferenzierung für den Verbraucher führen, weil nicht direkt ersichtlich ist, welches Produkt „grün“ ist. Weiterhin

konkurrieren die „grünen“ Produktionssysteme gegen bereits abgeschriebenes Kapital, sodass der Preisdruck enorm ist.

- 2 Neuartige Produkte, die neue und bessere Eigenschaften als bereits bestehende Produkte besitzen und somit andere Anwendungen ermöglichen, z.B. Polymilchsäure (PLA) aus mikrobiell hergestellter Milchsäure. Diese Produkte haben einen viel niedrigeren Preisdruck, weil sie nicht direkt gegen etablierte Produkte konkurrieren und bisher freie Nischen besetzen können, so dass eine hohe Marktdifferenzierung gegeben ist. Bei der Herstellung von mehrfach funktionalisierten Säuren, wie z.B. Milchsäure, werden die vorhandenen Funktionalisierungen der Biomasse/Kohlenhydrate gemäß den obengenannten Konzepten der organischen Chemie optimal genutzt. Die benötigte Zeit bis zur Kommerzialisierung kann jedoch lang sein und ist nicht genau abschätzbar. Zudem besteht bei neuen Produkten noch kein etablierter Markt, und das Risiko ist dementsprechend hoch.
- 3 Plattformmoleküle für die Herstellung eines breiten Portfolios an Folgemolekülen und –produkten, wie z.B. Bernsteinsäure, Syngas, Glutamat und Glycerin. Dieser Ansatz ermöglicht die bereits weiter oben geforderte Flexibilität bezüglich der Folgeprodukte und die Möglichkeit, das Produktportfolio gemäß der sich wandelnden Marktbedürfnisse anzupassen. Es können sowohl „Drop-In“-Äquivalente als auch Bausteine für neuartige Produkte hergestellt werden. Somit können Marktpotentiale voll ausgeschöpft und Risiken verringert werden. Da sehr viele Moleküle in diese Kategorie fallen, müssen hier Forschungsschwerpunkte identifiziert werden, um sich auf weniger Verbindungen konzentrieren so können.

Weiterhin wurden nur aliphatische Monomere mit einer Kettenlänge von C₁ bis C₆ betrachtet, die mehrere funktionelle Gruppen beinhalten, sowohl aus lignocellulose- als auch aus stärke-haltiger Biomasse hergestellt werden können und nicht bereits massiv als Grundchemikalien eingesetzt werden. Daraus resultierte letztendlich eine Liste mit 12 identifizierten Verbindungen:

- C₄-Dicarbonsäuren (Bernsteinsäure, Fumarsäure und Äpfelsäure)
- 2,5-Furandicarboxylsäure
- 3-Hydroxypropionsäure
- Asparaginsäure

- Glutaminsäure
- Glucarsäure
- Itaconsäure
- Levulinsäure
- 3-Hydroxybutyrolacton
- Sorbitol
- Glycerin
- Xylitol/Arabitol

Die C₄-Dicarbonsäuren und Xylitol/Arabitol wurden zusammengruppiert, weil sie ineinander überführt werden können oder aus demselben Biosyntheseweg stammen. Da ein Forschungsschwerpunkt auf der mikrobiellen Herstellung von Äpfelsäure liegt, werden im Folgenden am Beispiel der C₄-Dicarbonsäure Bernsteinsäure kurz ausgewählte Folgereaktionen beschrieben, die aber auch auf Fumarsäure und Äpfelsäure übertragen werden können (Abbildung 9). Produktion und Anwendungsmöglichkeiten der Äpfelsäure werden ausführlich in Kapitel II beschrieben.

Durch selektive Reduzierungen bzw. Hydrierungen können Diole, Furane und Lactone gewonnen werden; im Falle von Bernsteinsäure wären das 1,4-Butandiol (1,4-BDO; Minh et al., 2010; Kang et al., 2015), γ -Butyrolacton (GBL; Zhang K et al., 2016) und Tetrahydrofuran (THF; Luque und Clark, 2010; Hong et al., 2012). Diese Moleküle werden petrochemisch aus Maleinsäureanhydrid hergestellt und könnten somit als „Drop-In“-Äquivalente direkt weiter zu Lösungsmitteln, Fasern und Polymeren verarbeitet werden (Delhomme et al., 2009). 1,4-BDO kann redoxneutral zu 1,4-Butandiamin aminiert werden (Sattler et al., 2012). Durch reduktive Aminierung von Bernsteinsäure mit Amiden oder Ammonium können 2-Pyrrolidon und N-Methyl-2-Pyrrolidon erzeugt werden, die wiederum zu Nylon-4-Polymeren, Pharmazeutika, Medikamenten, Agrochemikalien und Lösungsmittel weiterverarbeitet werden können (Delhomme et al., 2009). Somit ist es möglich, neuartige Polyester und Polyamide basierend auf Bernsteinsäure zu synthetisieren (Isikgor und Becer, 2015). Ester der Bernsteinsäure finden breite Anwendung in der chemischen, pharmazeutischen und Kosmetikindustrie und können chemisch und enzymatisch leicht hergestellt werden (Delhomme et al., 2012).

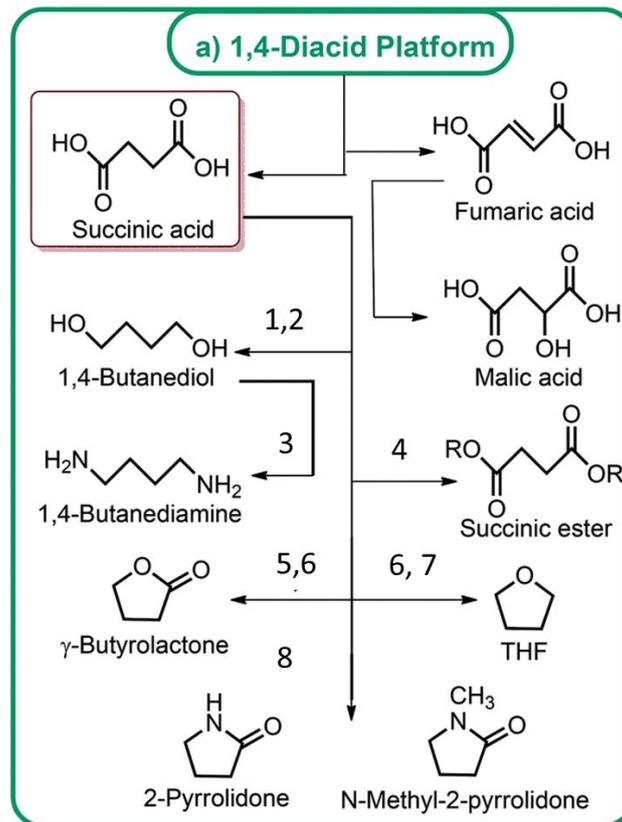


Abbildung 9: C₄-Dicarbonsäuren als Plattformchemikalien am Beispiel von Bernsteinsäure (Succinat). Referenzen: 1 (Minh et al., 2010), 2 (Kang et al., 2015), 3 (Sattler et al., 2010), 4 (Delhomme et al., 2012), 5 (Zhang K et al., 2016), 6 (Luque und Clark, 2010), 7 (Hong et al., 2012), 8 (Delhomme et al., 2009). (Leicht modifiziert aus: Isikgor und Becer, 2015. Published by The Royal Society of Chemistry.)

2010 wurde die Liste der 12 vielversprechendsten Plattformmoleküle aus Biomasse überprüft und aktualisiert (Bozell und Petersen, 2010). Hauptkriterien waren dabei, wie weit Forschung und Entwicklung innerhalb der sechs Jahre sowohl im akademischen Umfeld wie auch in der Industrie bei den einzelnen Verbindungen fortgeschritten sind. Daraus ergaben sich einige Veränderungen innerhalb der Top 10: Ethanol, biobasierte Kohlenwasserstoffe wie Isoprene, und Milchsäure wurden neu aufgenommen, während Glucarsäure, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Itaconsäure und Hydroxybutyrolacton nicht mehr dabei sind. Bei den C₄-Dicarbonsäuren wird nur noch Bernsteinsäure aufgeführt. In Anbetracht der aufgeführten Kriterien ist dies wenig verwunderlich, denn die mikrobielle Succinatproduktion wurde in den letzten Jahren massiv beforscht und mittlerweile z.B. von Myriant und DSM/Roquette kommerzialisiert. Dies zeigt deutlich, dass bei Äpfelsäure weiterhin großer Forschungsbedarf besteht (Kapitel II).

Lipide und Fettsäuren wurden aufgrund ihrer Kettenlänge nicht im DoE Report aufgeführt, stellen aber dennoch wichtige Plattformchemikalien und die Basis für die Biodieselindustrie und Oleochemie dar. Die Hauptrohstoffquelle hierfür sind Pflanzenöle. Die oleochemische Industrie verwendet etwa 12 Mio. Tonnen Pflanzenöle pro Jahr. Welches Öl verwendet wird, hängt von seiner Verfügbarkeit und der potenziellen Anwendung ab, was wiederum vom Fettsäureprofil des Öls beeinflusst wird. Rizinusöl zum Beispiel, wird zur Herstellung spezieller Schmierstoffe und Beschichtungen verwendet (Patel et al. 2016), während tierische Fette, Raps- und Sojaöl in der Biodieselproduktion (Bousba et al. 2013; Amoah et al., 2019) eingesetzt werden (Favaro et al., 2018). Die wichtigsten Basischemikalien, Fettsäuren, Fettsäureester und Fettalkohole, können durch Hydrolyse, Transesterifizierungen und Hydrierungen gewonnen werden. Fettalkohole können durch Ethoxylierung zu Fettalkoholethoxylaten (FAE), durch Sulfatierung zu Fettalkoholsulfaten (FAS), durch Sulfatierung der FAE zu Fettalkoholethersulfaten (FAES), durch Fischer-Reaktion mit Glucose zu Alkylpolyglucosiden (APG) und durch Kondensation zu den Guerbet-Alkoholen veredelt werden (Anneken et al., 2006; Behr und Seidensticker, 2018). Viele weitere Reaktionen innerhalb der Fettsäurekette führen zu Spezialchemikalien, die Anwendung als Tenside, Schmiermittel und Polymere finden. Produkte der Oleochemie können grüne Alternativen zu Petrochemikalien darstellen. Die massive Verwendung von Palmöl in der oleochemischen Industrie und die damit verbundene Abholzung des Regenwaldes stehen jedoch in der Kritik, ebenso wie die generelle Nutzung von Ackerfläche für die Herstellung von Chemikalien und Treibstoff statt für die Nahrungsmittelproduktion. Eine Alternative zur Verwendung von Pflanzenölen könnten daher mikrobielle Einzelleröle darstellen. Sie bestehen ebenfalls aus Triacylglyceriden und sind somit chemisch äquivalent zu Pflanzenölen. Ihre Produktion wird in Kapitel III betrachtet.

II. Mikrobielle Produktion von L-Äpfelsäure (Malat)

Die C₄-Dicarbonsäuren L-Äpfelsäure, Fumarsäure und Bernsteinsäure kommen als Intermediate des Citratzyklus in allen aerob lebenden Organismen vor. Aber nur wenige Arten sind in der Lage, L-Äpfelsäure natürlicherweise in großen Mengen zu akkumulieren. L-Äpfelsäure wurde erstmals 1785 aus Äpfeln isoliert und ist zusammen mit Citronensäure die am häufigsten vorkommende organische Säure in Obst (Jensen, 2007). 1924 wurde L-Äpfelsäure erstmals auch als mikrobielles Gärungsprodukt der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben (Dakin, 1924). Bis heute wurden weitere Pilzstämme identifiziert, die L-Äpfelsäure natürlicherweise akkumulieren, darunter filamentöse Pilze wie *Aspergillus*- und *Rhizopus*-Arten und Hefen der Gattungen *Ustilago* und *Aureobasidium*. Die kommerziell erhältliche Äpfelsäure wird jedoch bis heute hauptsächlich als Racemat durch chemische Synthese aus dem fossilen Rohstoff n-Butan über Maleinsäureanhydrid hergestellt (Miltenberger, 2000). Je nach Quelle beträgt die derzeitige Weltjahresproduktion zwischen 60.000 t und 200.000 t (Alonso et al., 2015; Sauer et al., 2008; Ortiz et al. 2017). Auf Grundlage von Pressemitteilungen und Selbstauskünften auf den Firmen-Webseiten der führenden Produzenten (Bartak, Sealong, Changmao Biochemical Engineering, Thirumalai Chemicals, Polynt) erscheint eine Produktion von ca. 100.000 t/a realistisch.

2.1. Derzeitige und zukünftige Anwendungsfelder

Etwa 90 % der momentan produzierten (racemischen) Äpfelsäure wird, oft in Kombination mit Citronensäure, in der Lebensmittel- und Getränkeindustrie als Säuerungsmittel und Geschmacksverstärker in verschiedenen Produkten wie Süßigkeiten, Erfrischungsgetränken, Backwaren und Gelees verwendet. Im Vergleich zur Citronensäure entwickelt sich der Geschmack langsamer und hält länger an, sodass Äpfelsäure geeignet ist, den Nachgeschmack von künstlichen Süßstoffen zu überdecken (Beidler, 1966; Aldrich et al., 1979). Äpfelsäure wird außerdem als Puffer- und Chelatbildner in Körperpflegeprodukten und Reinigungsmitteln wie Shampoos und Cremes, aber auch in Waschmitteln und in der Metallreinigung eingesetzt (Sakurai und Sugimoto, 2005). Im Pharmabereich ist Äpfelsäure Bestandteil des Migränemedikamentes Almotriptanmalat (Gore et al., 2010).

Weiterhin findet Äpfelsäure in der Halbleiterherstellung als Bestandteil von Polier- oder Reinigungsformulierungen (Zhang Z et al., 2016; Nishiwaki et al., 2010) und als Futtermittelzusatz Anwendung (Stallcup, 1979; Stookey, 2000).

Potentielle zukünftige Anwendungsbereiche der Äpfelsäure umfassen die Verwendung in Niedertemperaturgemischen (Radošević et al., 2016; Yiin et al., 2016) und als Monomer für die Herstellung von Polymeren. Aufgrund der beiden Carboxylgruppen und der Hydroxylgruppe kann Äpfelsäure für die Synthese von Homo- und Heteropolymeren eingesetzt werden. Durch weitere Funktionalisierungen kann eine große Vielfalt an Polymeren mit unterschiedlichen hydrophoben/hydrophilen Eigenschaften erzeugt werden (Bizzarri et al., 2002). So hat sich beispielsweise Poly(DL-Milchsäure-Co- α,β -Malat) als guter Verbundstoff in Nanopartikeln zur Markierung von Stammzellen erwiesen (Wang et al., 2010), während der Äpfelsäurebutan-1,4-Diol-Glycerin-Copolyester als magensaftresistentes Beschichtungsmaterial eingesetzt werden könnte (Shahrzaman et al., 2015). Homopolymere der Äpfelsäure wie Poly(α,β -Malat) können durch direkte Polykondensation gewonnen werden (Kajiyama et al. 2004) und zeichnen sich durch hohe Wasserlöslichkeit, Biokompatibilität und biologische Abbaubarkeit aus (Ljubimova et al., 2007). Das lineare Homopolymer Poly(β -L-Malat) ist ein vielversprechender Wirkstoffträger (Ding et al., 2010; Ljubimova et al., 2007). Es wird mikrobiell direkt durch Polymerisation von L-Äpfelsäuremonomeren hergestellt. Daneben kann die Synthese aber auch chemisch ausgehend von L-Asparaginsäure über Benzol- β -Malolactonat erfolgen (Guerin et al., 1985; Vert, 1998; Bizzarri et al., 2002; Coulembier et al., 2006).

L-Äpfelsäure könnte zudem Maleinsäureanhydrid ersetzen. Maleinsäureanhydrid, das derzeit aus fossilen Rohstoffen mit einem Weltmarktvolumen zwischen 1,5 und 2,0 Millionen Tonnen pro Jahr hergestellt wird, wird vielfältig industriell angewendet (Roa Engel et al., 2008; Zhang und Cue Jr., 2012). Maleinsäureanhydrid dient neben seiner direkten Verwendung zur Herstellung von ungesättigten Polyesterharzen auch zur Herstellung von weit verbreiteten Industriechemikalien. Wichtige Produkte aus Maleinsäureanhydrid sind γ -Butyrolacton, 1,4-Butandiol, Tetrahydrofuran und Bernsteinsäureanhydrid (siehe Abbildung 9). L-Äpfelsäure qualifiziert sich damit als vielfältig anwendbare Plattformchemikalie.

2.2 Mikrobielle Produktion

Durch chemische Synthese entsteht ausschließlich das Racemat DL-Äpfelsäure, welches in Lebensmitteln, Getränken, Körperpflege- und Reinigungsmitteln eingesetzt wird. Für pharmazeutische Anwendungen wird allerdings die physiologische L-Form benötigt. Die Auflösung des Racemats ist teuer und scheint daher für großtechnische Anwendungen nicht geeignet zu sein. Alternativ kann enantiomerenreine L-Äpfelsäure enzymatisch unter milden Reaktionsbedingungen hergestellt werden. Dies geschieht auch industriell, aber in wesentlich geringerem Maße als die chemische Produktion des Racemats (Ortiz et al., 2017). Die enzymatische Herstellung von L-Äpfelsäure erfolgt mit dem Enzym Fumarase, welches das Substrat Fumarsäure durch Hydratation in L-Äpfelsäure umwandelt (Abbildung 10). Dies kann entweder durch das (aufgereinigte) Enzym Fumarase (Giorno et al., 2001; Presečki et al., 2007), permeabilisierten oder lyophilisierten Zellen (Kitahara et al., 1960; Wang et al., 1998; Presecki und Vasić-Racki, 2005; Presečki et al., 2007; Stojkovič und Žnidaršič-Plazl, 2012; Pandurić et al., 2017) oder ganzen Zellen erfolgen. Die Ganzzellkatalyse mit *S. cerevisiae*, *Brevibacterium flavus*, *B. ammoniagenes* oder *Rhizopus oryzae* scheint die am weitesten verbreitete Methode zu sein und erreicht Konversionsraten zwischen etwa 80 % und fast 100 % (Chibata et al., 1975; Terasawa et al., 1990; Oliveira et al., 1994; Bressler et al., 2002; Naude und Nicol, 2018). Die Zellen werden vorzugsweise in geeigneten Materialien wie Polyacrylamid, Alginat oder Carrageen immobilisiert, um den Prozess durch die Wiederverwendung des Katalysators wirtschaftlicher zu gestalten. Jedoch wird auch das bei dem enzymatischen Verfahren und den Biotransformationen verwendete Substrat Fumarsäure heute ausschließlich durch die Isomerisierung von Maleinsäure aus Erdöl hergestellt (Lohbeck et al., 2003; Roa Engel et al., 2008). Fermentationsprozesse zur mikrobiellen Fumarsäureproduktion mit *Rhizopus*-Arten wurden bereits in den 1940er Jahren etabliert, wurden aber im Laufe der Zeit durch das wirtschaftlichere chemische Verfahren ersetzt (Kane et al., 1943; Lubowitz und La Roe, 1958). Der Forschungsschwerpunkt in der mikrobiellen Fumarsäureproduktion liegt daher momentan auf der Verwendung alternativer Non-Food-Substrate wie Rohglycerin oder Lignocellulosehydrolysate, um die Produktionskosten zu senken und somit die mikrobielle Fumarsäureproduktion wirtschaftlich wieder attraktiv zu machen (Xu et al., 2010; Zhou et al., 2014; Das et al.,

2016; Liu H. et al., 2017). Anstatt jedoch L-Äpfelsäure aus mikrobiell gewonnener Fumarsäure herzustellen, kann L-Äpfelsäure auch direkt biotechnologisch produziert werden. Das erste Patent zur Herstellung von mikrobiell hergestellter L-Äpfelsäure wurde bereits 1962 erteilt, und basiert auf der Verwendung verschiedener *Aspergillus*-Stämme (Abe et al., 1962). Mittlerweile sind weitere natürliche (pilzliche) Produzenten bekannt. Zusätzlich wurden einige rekombinante Produzentenstämme erzeugt. Der Vorteil mikrobieller Fermentationen liegt darin, dass eine große Bandbreite an nachwachsenden Rohstoffen eingesetzt werden kann. Dadurch wird der Prozess wesentlich vielseitiger und unabhängiger von fossilen Rohstoffen.

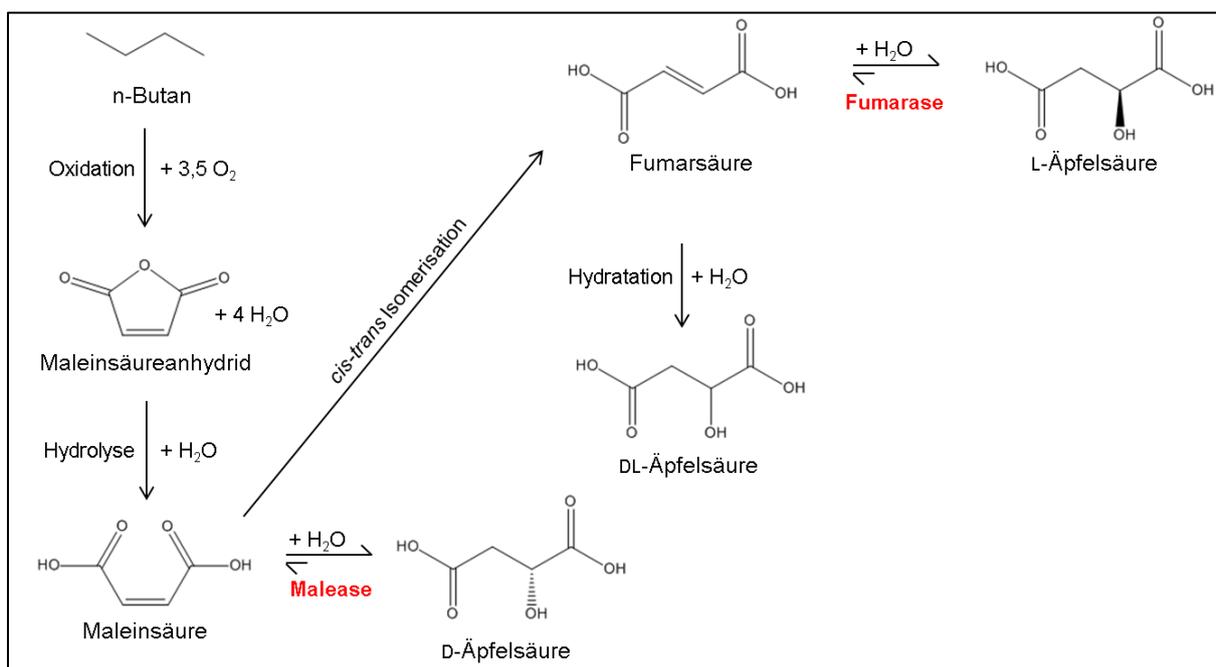


Abbildung 10: Chemisch-enzymatische Synthese von Äpfelsäure-Enantiomeren. Enzymatische Schritte sind rot hervorgehoben. Die rein chemische Syntheseroute von n-Butan über Maleinsäureanhydrid, Maleinsäure und Fumarsäure führt zu **DL-Äpfelsäure** (Miltenberger, 2000). Industriell wird **L-Äpfelsäure** aus Fumarsäure durch das Enzym Fumarase (Giorno et al., 2001; Presečki et al., 2007) oder in Ganzzellkatalyse mit *Saccharomyces cerevisiae*, *Brevibacterium flavus*, *B. ammoniagenes* oder *Rhizopus oryzae* hergestellt (Chibata et al., 1975; Terasawa et al., 1990; Oliveira et al., 1994; Bressler et al., 2002; Naude und Nicol, 2018). **D-Äpfelsäure** kann ebenfalls enzymatisch mit Malease, z.B. aus *Pseudomonas pseudoalcaligenes* oder *P. alcaligenes*, synthetisiert werden (van der Werf et al., 1993; Liu et al., 2015). Dies findet derzeit allerdings keine industrielle Anwendung.

2.2.1 Biosynthesewege

Wie eingangs erwähnt, ist Malat ein Intermediat des TCA-Zyklus. Während der oxidative TCA-Zyklus in Eukaryoten in den Mitochondrien lokalisiert ist und zum Abbau organischer Kohlenstoffquellen zur Energiegewinnung und der Bereitstellung von Intermediaten zur Synthese weiterer Metabolite dient, ist der reduktive oder reverse TCA-Zweig im Cytoplasma lokalisiert und verläuft in umgekehrter Reihenfolge wie der oxidative TCA-Zyklus. Er dient u.a. zur Wiederauffüllung des oxidativen TCA-Zyklus, wenn dort Intermediate entnommen werden. Neben dem oxidativen TCA-Zyklus und reduktiven TCA-Zweig kann Malat zudem über den Glyoxylat-Bypass produziert werden. Je nach Syntheseweg ergeben sich unterschiedliche maximale Ausbeuten für Malat (Zelle et al., 2008) (Abbildung 11).

Im oxidativen TCA-Zyklus kondensiert Acetyl-CoA mit Oxalacetat zu Citrat. Citrat wird dann in mehreren enzymatischen Reaktionsschritten weiter zu Malat oxidiert, begleitet von der Freisetzung von 2 Molekülen CO₂. Aufgrund der Verluste von Kohlenstoff-Molekülen durch die CO₂-Freisetzung ist die maximale molare Ausbeute dieses Weges auf 1 mol/mol Glucose begrenzt. Es konnte gezeigt werden, dass es bei einigen *Aspergillus*-Arten mehrere Isoformen von TCA-Enzymen gibt, die sich entweder im Cytosol oder in den Mitochondrien befinden (Ma et al., 1981; Osmani und Scrutton, 1983; Bercovitz et al., 1990), sodass geschlossen wurde, dass die L-Äpfelsäure-Produktion in diesen Organismen wahrscheinlich über den cytosolischen TCA-Zweig erfolgt. Dieser beginnt mit der Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat, die durch die Pyruvat-Carboxylase (Pyc) katalysiert wird, und der anschließenden Umwandlung von Oxalacetat zu Malat durch die Malat-Dehydrogenase (Mdh).

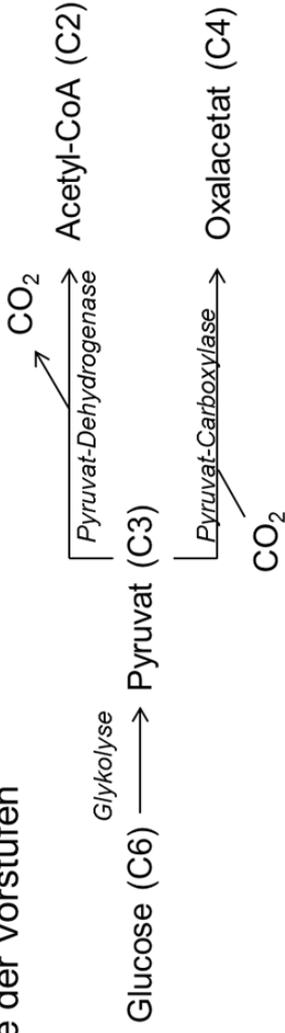
Wird Pyruvat über die Glykolyse bereit gestellt, ist dieser Syntheseweg ATP-neutral, benötigt keine zusätzlichen Reduktionsäquivalente und beinhaltet die Netto-Fixierung von CO₂, was zu einer maximalen theoretischen Malatausbeute von 2 mol/mol Glucose führt (Zelle et al. 2008). Die natürlichen Produzenten der Gattung *Aspergillus* synthetisieren L-Malat hauptsächlich über diesen Weg (Peleg et al., 1989; Dai et al., 2018).

Das im oxidativen TCA-Zyklus produzierte Citrat kann auch als Zwischenprodukt für den dritten Weg der Apfelsäureproduktion, den Glyoxylatweg, dienen. In diesem

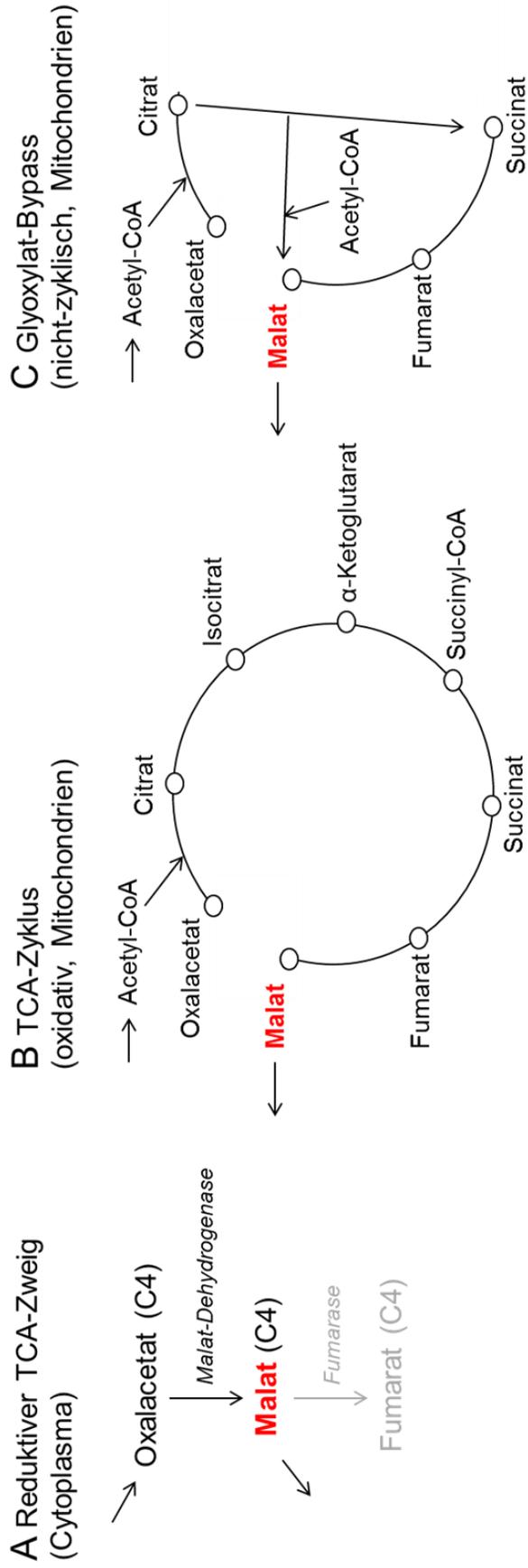
Stoffwechselweg wird Citrat in Succinat und Glyoxylat umgewandelt, gefolgt von einer Kondensation des letzteren mit Acetyl-CoA zur Bildung von Malat. Da die Acetyl-CoA-Bildung aus Pyruvat mit CO₂-Freisetzung einhergeht, ist die maximale molare Malatausbeute für den Glyoxalatzyklus auf 1 mol/mol begrenzt. Wenn jedoch Oxalacetat, das im oxidativen TCA-Zyklus verbraucht wird, durch die Carboxylierung von Pyruvat aufgefüllt wird, kann die maximale Ausbeute für diese nicht-zyklische Version des Glyoxylat-Zyklus (= Glyoxylat-Bypass) auf 1 1/3 mol/mol erhöht werden. Allgemein ermöglicht es der Glyoxylatweg, auf Acetat oder ähnlichen Verbindungen zu wachsen, die über Acetyl-CoA metabolisiert werden. Wenn mit natürlichen Produzenten L-Malat aus Glucose hergestellt wird, spielt dieser Weg jedoch wohl keine Rolle, da er durch die typischen hohen Glucose-Konzentrationen während der Fermentation inhibiert wird (Dai et al. 2018). Wird L-Malat ausgehend von anderen Kohlenstoffquellen produziert, können sich die maximalen Ausbeuten verringern. Im Falle von Glycerin liegt die maximale Ausbeute nur bei 1 mol/mol, mit Xylose bei 1,67 mol/mol (Ochsenreither et al., 2014).

Eine weitere Möglichkeit für die biotechnologische Produktion von L-Malat ist die enzymatische oder chemische Hydrolyse des Biopolymers Poly(β-L-Malat), das in großen Mengen vermutlich als extrazellulärer Speicherstoff von *Aureobasidium* spp. gebildet wird (Liu und Steinbüchel, 1996; Chi et al., 2016). Die Synthese des L-Malat-Monomers erfolgt ebenfalls über den reduktiven TCA-Zweig (Yu H. et al., 2018), aber mit signifikanter Beteiligung des Glyoxylat-Zyklus (Zeng et al., 2019a).

Synthese der Vorstufen



Stoffwechselwege zu Malat



$Y_{S/P}$ (max.): 2 mol/mol

$Y_{S/P}$ (max.): 1 mol/mol

$Y_{S/P}$ (max.): 1,3 mol/mol

Abbildung 11: Mögliche Synthesewege für die mikrobielle Malat-Produktion ausgehend von Oxalacetat und/oder Acetyl-CoA. A. Durch direkte Reduktion von Oxalacetat zu Malat. B. Durch Oxidation von Citrat. C. Durch Kondensation von Oxalacetat und Acetyl-CoA. Modifiziert nach Zelle et al. (2008).

2.2.2 Natürliche Malat- und Poly-Malat-Produzenten

Bisher wurden verschiedene Arten der Gattung *Aspergillus*, *Penicillium* und *Ustilago* als natürliche L-Malatproduzenten und verschiedene *Aureobasidium* Spezies als natürliche Poly-Malat-Bildner näher untersucht. Publiizierte Titer, Produktivitäten und Ausbeuten wurden in den Tabellen 1 und 2 zusammengefasst.

- *L-Malatproduzenten*

Die mikrobielle Produktion von L-Äpfelsäure wurde erstmals 1962 patentiert. Unter den getesteten *Aspergillus*-Arten erwies sich zunächst *Aspergillus flavus* ATCC 13697 als vielversprechendster Produzentenstamm (Abe et al., 1962). Peleg et al. (1988) führten fast 30 Jahre später die Forschung mit diesem *Aspergillus flavus*-Stamm fort und führten erste empirische Medienoptimierungsversuche im Schüttelkolben und im 10 L-Bioreaktor durch. Dabei erwiesen sich eine Stickstofflimitierung und hohe Konzentrationen von CaCO_3 als vorteilhaft für die L-Malatbildung. Als wesentliche Nebenprodukte wurden Succinat und Fumarat identifiziert (Peleg et al., 1988). Battat et al. (1991) untersuchten den Einfluss verschiedener Medienbestandteile und Prozessparameter auf die Äpfelsäureakkumulation mit *Aspergillus flavus* in einem 16-L-Fermenter und Glucose als C-Quelle. Durch die Optimierung von Rührerdrehgeschwindigkeit, initialer Stickstoff- und Eisenkonzentration konnte eine molare Ausbeute von 1,28 mol/mol erzielt werden (Battat et al., 1991).

Da *Aspergillus flavus* in den 1960er Jahren als Aflatoxin-Produzent identifiziert wurde (Allcroft und Carnaghan, 1962; Nesbitt et al., 1962) und daher nicht für die L-Äpfelsäureproduktion im Lebensmittelbereich anwendbar ist, mussten alternative Produktionsstämme in Betracht gezogen werden. Unter diesen schien *A. oryzae* der vielversprechendste Kandidat zu sein, da dieser zwar mit *A. flavus* eng verwandt ist und dementsprechend eine hohe genetische Ähnlichkeit aufweist, aber keine Aflatoxine bilden kann (Kurtzman et al., 1986; Barbesgaard et al., 1992). *A. oryzae* wurde bereits von Abe et al. (1962) als Malatbildner identifiziert und wird seit Jahrhunderten in Asien für die Fermentation von Soja eingesetzt, wie z.B. für die Produktion von Sojasauce (Liang et al., 2009) und hat den GRAS-Status inne (Knuf et al., 2013). Es wird vermutet, dass es sich bei *A. flavus* und *A. oryzae* um Ökotypen derselben Art handeln und *A. oryzae* aus einer Domestikation von *A.*

flavus entstanden sein könnte (Payne et al. 2006). Knuf et al. (2013) und Ochsenreither et al. (2014) untersuchten systematisch die Äpfelsäurebildung mit *A. oryzae* NRRL 3488 und *A. oryzae* DSM1863. Es konnte gezeigt werden, dass sich neben Glucose auch Xylose und Glycerin als alternative Kohlenstoffquellen für die Malatproduktion eignen, und dass das C:N-Verhältnis einen Einfluss auf die L-Äpfelsäureproduktion hat (Ochsenreither et al. 2014).

Neben der Prozessoptimierung kann die Malatproduktion auch durch genetische Modifikation gesteigert werden. Die Überexpression des nativen C₄-Dicarbonsäure-Transporters C4T318 führte zu einer Verdopplung des Malattiters im Schüttelkolben. Durch zusätzliche Überexpression der beiden Schlüsselenzyme des reduktiven TCA-Zweiges, Malat-Dehydrogenase und Pyruvat-Carboxylase, konnte der Malattiter schließlich weiter erhöht werden. Im 2 L-Bioreaktor konnten anschließend in einer 164-stündigen Batch-Fermentation 164 g/L L-Malat produziert werden, was einer Produktivität von 0,94 g/(l*h) und einer Ausbeute von 1,38 mol/mol entspricht (Brown et al. 2013).

Liu J. et al. (2017) verfolgten den Ansatz von Brown et al. (2013) weiter und führten zusätzlich das *mae1* Malat-Transporter-Gen aus *Schizosaccharomyces pombe* sowie die beiden Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase- und Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Gene aus *E. coli* ein, um mehr Oxalacetat aus Phosphoenolpyruvat zu erzeugen. Zusätzlich dazu wurde die 6-Phosphofruktokinase als potenziell limitierender Faktor für die Malatsynthese identifiziert. In einer anschließenden 3-L-Fed-Batch-Fermentation, bei der die Glucosekonzentration über 10 g/L und der pH auf 6 durch Titration mit NaCO₃ gehalten wurde, konnten mit diesem Stamm 165 g/L L-Malat mit einer Produktivität von 1,38 g/(l*h) produziert werden (Liu J. et al., 2017). In einer weiterführenden Arbeit wurde die Bildung des Hauptnebenproduktes Succinat verringert (Liu et al., 2018).

Ding et al. (2018) führten eine ungerichtete Mutagenese des *A. oryzae*-Stammes CCTCC M 2016401 in Kombination mit Prozessoptimierung durch. Sie konnten dadurch Malattiter, Ausbeute und Produktivität deutlich steigern; diese lagen dennoch unter denen der gentechnisch modifizierten Stämme (Ding et al. 2018).

Neben *A. flavus*- und *A. oryzae*-Stämmen wurden auch einige *A. niger*-Stämme als L-Äpfelsäureproduzenten identifiziert (Bercovitz et al., 1990; West, 2011; 2015; 2017; Iyyappan et al., 2018). Der Forschungsschwerpunkt lag in den Arbeiten von West auf der Verwendung von Rohglycerin oder Glycerin-haltigen Nebenprodukten für die Malatproduktion. Die Ergebnisse sind daher schlecht mit den anderen Studien vergleichbar.

Neben *Aspergillus*-Arten wurden auch einige marine *Penicillium*-Arten als natürliche Äpfelsäure-Hochleistungsproduzenten beschrieben. Wang Z.P. et al. (2013b) untersuchten neun marine *Penicillium*-Isolate, von denen sechs L-Malat produzieren konnten. Khan et al. (2014) untersuchten acht weitere marine *Penicillium*-Arten und identifizierten *P. viticola* Stamm 152 als L-Malat-Produzenten. Die bislang höchste Malat-Produktivität von 2 g/(l*h) wurde bisher allerdings von Li X. et al. (2014) für eine *Rhizopus delemar*-Mutante, HF-121, publiziert. Dieser konnte aus 125 g/L Weizenstroh-Hydrolysat (bestehend aus ca. 100 g/L Glucose und 25 g/L Xylose) innerhalb von 60 h ca. 122 g/L L-Malat produzieren.

Geiser et al. (2014) untersuchten in einem breit angelegtem Screening das biotechnologische Potential von 68 Brandpilzen aus der Familie der *Ustilaginaceae*. Spezies dieser Familie sind häufig Pflanzenpathogene, sind aber auch dafür bekannt, eine breite Palette an industriell relevanten Plattformchemikalien, wie z.B. Itaconsäure, L-Äpfelsäure, Bernsteinsäure und Itaweinsäure, bilden zu können (Guevarra und Tabuchi, 1990; Geiser et al., 2014). Zudem vereinen sie die Vorteile von filamentösen Pilzen, d.h. Wachstum auf vielen unterschiedlichen Kohlenstoffquellen, u.a. auch lignocellulose-haltigen Substraten, mit der einzelligen, hefe-artigen Morphologie, was die Prozessführung im Vergleich zu den filamentösen Pilzen erleichtert und die Kontrolle der Morphologie, von der die Produktion von Metaboliten oft abhängt, unnötig macht (Kubicek et al., 2011; Feldbrügge et al., 2013; Geiser et al., 2014). Bezüglich der L-Malat-Produktion konnte *Ustilago maydis* ATCC 22892 als bester Produzent identifiziert werden. In einer weiterführenden Studie wurden 74 Stämme innerhalb der Familie *Ustilaginaceae* gezielt nach L-Äpfelsäureproduzenten gesucht, die effizient Glycerin verwerten können. Die adaptive Evolution des besten Stammes, *U. trichophora* CBS 131473, führte schließlich zu *U. trichophora* TZ1, der aus 250 g/L Glycerin innerhalb von 504 h in

Schüttelkolben-Batch-Kultivierungen fast 200 g/L L-Malat bildete (Zambanini et al., 2016a). Nach weiterer Medien- und Prozessoptimierung konnten schließlich 195 g/L L-Malat in einer Fed-Batch-Kultivierung im Bioreaktor produziert werden. Allerdings sank dadurch die Ausbeute und die Fermentation musste auf Grund der hohen Viskosität und den damit einhergehenden Durchmischungsproblemen abgebrochen werden (Zambanini et al., 2016b). Durch Überexpression zweier Malat-Transporter-Gene sowie der cytosolischen und mitochondrialen Malat-Dehydrogenase-Gene konnte zwar der Malat-Titer nicht gegenüber dem unmodifizierten Ausgangsstamm gesteigert werden, jedoch reduzierten sich Glycerinverbrauch und Biomassekonzentration, sodass Ausbeute und die spezifische Produktionsrate gesteigert werden konnten (Zambanini et al., 2017).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der genetisch modifizierte *Aspergillus oryzae* NRRL3488-Stamm von Brown et al. (2013) die derzeit höchste Ausbeute (1,38 mol/mol Glucose = 69 % des theoretischen Maximums), der adaptierte *Ustilago trichophora* TZ1-Stamm den höchsten Malat-Titer (195 g/L) (Zambanini et al., 2016b) und die *Rhizopus delemar*-Mutante HF-121 die höchste Produktivität mit 2,03 g/(l*h) (Li X. et al., 2014) erreicht. Jedoch lassen sich einzelne Studien nur bedingt untereinander vergleichen, da Fermentationszeit, Fermentationsvolumen, die Konzentration der eingesetzten Kohlenstoffquelle und insbesondere die Art und die Konzentration der eingesetzten Stickstoffquelle (siehe auch Kapitel 2.3) stark variieren. Wie durch die genetischen Arbeiten gezeigt, scheinen Transportprozesse einen entscheidenden Einfluss auf die Malat-Produktion zu haben, da durch Überexpression von cytoplasmatischen und mitochondrialen Transportern die größten Produktionssteigerungen erreicht werden konnten.

II. Mikrobielle Produktion von L-Äpfelsäure (Malat)

Tabelle 1: Übersicht über Titer, Ausbeute und Produktivität verschiedener L-Malat-Produzenten-Stämme

Stamm	Beschreibung	Substrat	Titer	Ausbeute*	Produktivität	Referenz
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 13697	Wildtyp 16 L-Bioreaktor, Batch (190 h)	100 g/L Glucose + 1,28 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄	113 g/L	1,26 mol/mol	0,59 g/(l*h)	Battat et al., 1991
<i>Aspergillus oryzae</i> DSM1863	Wildtyp 2 L-Bioreaktor, Batch (168 h)	120 g/L Glucose + 1,2 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄	43,5 g/L	0,85 mol/mol	0,26 g/(l*h)	Ochsenreither et al., 2014
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL3488	Wildtyp 2L-Bioreaktor, Batch (48 h)	50 g/L Glucose + 1,4 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄	22,3 g/L	1 mol/mol	0,59 g/(l*h)	Knuf et al., 2013
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL3488	ÜE C4T318 2L-Bioreaktor, Batch (164 h)	160 g/L Glucose + 9 g/L Pepton	122 g/L	1,17 mol/mol	0,74 g/(l*h)	Brown et al., 2013
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL3488	ÜE C4T318 + <i>pyc</i> + <i>mdh</i> 2L-Bioreaktor, Batch (164 h)	160 g/L Glucose + 9 g/L Pepton	154 g/L	1,38 mol/mol	0,94 g/(l*h)	Brown et al., 2013
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL3488	ÜE C4T318 + <i>pyc</i> + <i>mdh</i> + <i>pfk</i> + <i>pcK</i> (<i>E.</i> <i>coli</i>) + <i>ppc</i> (<i>E. coli</i>) + <i>mae1</i> (<i>S. pombe</i>) 3 L-Bioreaktor, Fed- Batch (120 h)	110 g/L Glucose + 12 g/L Pepton	165 g/L	n.b.	1,38 g/(l*h)	Liu J. et al., 2017
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL3488 CMPIMISN-3	ÜE <i>cis</i> + <i>isd</i> + <i>oxd</i> + <i>ach</i> + <i>icl</i> + <i>mas</i> + <i>pyc</i> (<i>R. oryzae</i>) + <i>fum</i> (<i>S.</i>	130 g/L Maisstärke + 12 g/L Pepton	117,2 g/L	1,09 mol/mol	1,17 g/(l*h)	Liu et al., 2018

II. Mikrobielle Produktion von L-Äpfelsäure (Malat)

	<i>cerevisiae</i>) + <i>sfc1</i> (<i>S. cerevisiae</i>) + LINOX						
	250 ml SK, Batch (100 h)						
<i>Aspergillus oryzae</i> FMME218-37	Mutante von Stamm CCTCC M 2016401	176 g/L Glucose + 5,5 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄	95,2 g/L	0,73 mol/mol	0,57 g/(l*h)		Ding et al., 2018
	7,5 L-Bioreaktor, Fed-Batch, mehrstufiger Prozess (168 h)						
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 10577	Wildtyp 125 ml SK, Batch (192 h)	Dünnschlempen = 3,4 g/L Glucose + 17,1 g/L Glycerol (+ 15,8 g/L Lactat)	16,4 g/L	0,61 mol/mol	0,09 g/(l*h)		West, 2011
		10 % Rohglycerin = 79 % Glycerin + 16 % FAMES	20,3 g/L	n.b.	0,11 g/(l*h)		West, 2017
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9142	Wildtyp 125 ml SK, Batch (192 h)	Dünnschlempen = 3,4 g/L Glucose + 17,1 g/L Glycerol (+ 15,8 g/L Lactat)	16,9 g/L	0,62 mol/mol	0,09 g/(l*h)		West, 2011
		10 % Rohglycerin = 79 % Glycerin + 16 % FAMES	16,5 g/L	n.b.	0,09 g/(l*h)		West, 2017
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 12846	Wildtyp 125 ml SK, Batch (192 h)	10 % Rohglycerin = 79 % Glycerin + 16 % FAMES	23,5 g/L	n.b.	0,12 g/(l*h)		West, 2017
<i>Aspergillus niger</i> PJR1	Mutante von MTCC 281 250 ml SK (100 ml),	160 g/L Rohglycerin (= 107 g/L Glycerin) + 1,5 g/L Hefeextrakt	83,23 g/L	0,59 mol/mol 0,86 g/g	0,43 g/(l*h)		Iyyappan et al., 2018

II. Mikrobielle Produktion von L-Äpfelsäure (Malat)

	Batch (192 h)					
<i>Penicillium sclerotiorum</i> K302	Wildtyp 10 L-Bioreaktor, Batch (72 h)	140.0 g/L Glucose + 2,0 g/L NH ₄ NO ₃	71 g/L ^a	0,91 mol/mol ^a	0,99 g/(l*h) ^a	Wang Z.P. et al., 2013b
<i>Penicillium viticola</i> 152	Wildtyp 10 L-Bioreaktor, Batch (96 h)	140.0 g/l Glucose + 0.5 % (v/v) Maisquellwasser	129 g/L ^a	1,32 mol/mol ^a	1,35 g/(l*h) ^a	Khan et al., 2014
<i>Rhizopus delemar</i> HF-121	Mutante von Stamm HF-119 (Kontaminante) 3 L-Bioreaktor, Batch (60 h)	Weizenstroh-Hydrolysat = 100 g/L Glucose + 25 g/L Xylose + 2 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄	121,8 g/L	1,26 mol/mol	2,03 g/(l*h)	Li X. et al., 2014
<i>Ustilago maydis</i> ATCC 22892	Wildtyp 1,3 L-Bioreaktor, Batch (72 h)	200 g/L Glucose + 4 g/L NH ₄ Cl	29,9 g/L	0,22 mol/mol	0,42 g/(l*h)	Geiser et al., 2014
<i>Ustilago trichophora</i> TZ1	adaptive Evolution von <i>U. trichophora</i> CBS 131473 2,5 L-Bioreaktor, Fed-Batch (264 h)	200 g/L Glycerin + 3,2 g/L NH ₄ Cl Insgesamt 453 g/L Glycerin	195 g/L	0,31 mol/mol	0,74 g/(l*h)	Zambanini et al., 2016b
<i>Ustilago trichophora</i> TZ1 P _{etef} mdh2 / P _{etef} ssu2	ÜE <i>mdh2</i> bzw. <i>ssu2</i> 2,5 L-Bioreaktor, Fed-Batch (240 h)	200 g/L Glycerin + 3,2 g/L NH ₄ Cl	134 g/L	0,3 mol/mol	0,69/ 0,63 g/(l*h)	Zambanini et al., 2017

* molare Ausbeuten wurden aus den publizierten Daten berechnet, wenn nicht in der Publikation bereits angegeben

^a Daten für Ca-Malat wurden umgerechnet für L-Malat

- Poly-Malat-Produzenten

Das natürliche Biopolymer Poly(β -L-Malat) (PMA) besteht aus L-Malat-Einheiten, die über Esterbindungen zwischen einer Carboxylgruppe und der Hydroxylgruppe verbunden sind und erstmals 1969 für *Penicillium cyclopium* als Protease-Inhibitor beschrieben wurde (Shimada und Matsushima 1969; Shimada et al., 1969). Die mikrobielle PMA-Produktion basiert heute jedoch hauptsächlich auf der Verwendung der schwarzen Hefe *Aureobasidium pullulans* (Manitchotpisit et al., 2012; Li et al., 2015; Chi et al., 2016), die von Nagata et al. als PMA-Produzent identifiziert wurde (Nagata et al. 1993). Seit 2011 wird die PMA-Forschung von einigen wenigen chinesischen Arbeitsgruppen dominiert, die zahlreiche *Aureobasidium*-Eigenisolate als PMA-Produzenten identifiziert und charakterisiert haben. Das Genom mehrerer *A. pullulans*-Stämme wurde sequenziert (Chan et al., 2012; Gostinčar et al., 2014; Zhao S.F. et al., 2019). Obwohl sich die Genomzusammensetzung und -annotation dieser *A. pullulans*-Stämme signifikant unterscheidet, enthalten sie alle eine große Anzahl an Genen, die für sekretierte Proteine kodieren, die am Kohlenhydratabbau beteiligt sind. Die hohe Anzahl an Zuckertransportern und Glykosidhydrolasen lässt vermuten, dass viele verschiedene Kohlenstoffquellen für Wachstum und PMA-Produktion verwendet werden können (Gostinčar et al., 2014; Zou S.F. et al., 2019). Dementsprechend wurden auch erneuerbare Substrate wie Soja- und Zuckerrohrmelasse (Cheng et al., 2017; Feng et al., 2018; Xia et al., 2016), Süßkartoffelhydrolysat (Zan und Zou, 2013), Topinambur (Xia et al., 2017a; Cao et al., 2019) sowie verschiedene Abfallstoffe (Leathers und Manitchotpisit, 2013; Zou et al., 2015; Cheng et al., 2017) auf ihre Eignung für die PMA-Produktion untersucht, ebenso wie unterschiedliche Prozessmodi, die von der Batchfermentation über Repeated-Batch-Kultivierung in Schüttelkolben oder Bioreaktoren mit oder ohne Zellrückhaltung bis hin zu Fed-Batch-, Faserbett- oder Festbettfermentationen reichen (Zou et al., 2019, Tabelle 2). Aufgrund der Vielfalt der Substrate und Prozessmodi ist es schwierig, die einzelnen Ergebnisse der Forschungsgruppen zu vergleichen, aber es lässt sich dennoch zusammenfassen, dass der bisher höchste PMA-Titer 123,7 g/L betrug (Zou et al., 2013), während 0,87 g/g (=1,17 mol/mol; Wang et al., 2015) und 1,3 g/(l*h) (Cao et al., 2016) die maximale Ausbeute und Produktivität waren.

II. Mikrobielle Produktion von L-Äpfelsäure (Malat)

Tabelle 2: Übersicht über Titer, Ausbeute und Produktivität verschiedener Poly-(β -L-Malat)-Produzenten-Stämme (adaptiert von Zou et al., 2019)

Stamm	Beschreibung	Substrat	Titer [#]	Ausbeute	Produktivität	Referenz
<i>Physarum polycephalum</i> ATCC 204388	Wildtyp 2 L-SK (300 ml), Batch (72 h)	15 g/L Glucose + g/L Trypton	10 1,7 g/L	0,11 g/g	0,02 g/(l*h)	Lee und Holler, 1999
<i>Aureobasidium</i> sp. A-91	Wildtyp, Eigenisolat 500 ml-SK (100 ml), Batch (168 h)	120 g/L Glucose + g/L NH ₄ -Succinat + 0,5 g/L Maisquellwasser	3 47 g/L 6 – 11 kDa	0,39 g/g	0,28 g/(l*h)	Nagata et al., 1993
<i>Aureobasidium</i> sp. A-91	Wildtyp Ruhende Zellen, 300 ml-SK (50 ml), Batch (120 h)	160 g/L Glucose	80 g/L	0,5 g/g	0,67 g/(l*h)	Nakajima-Kambe et al., 1996
<i>Aureobasidium pullulans</i> CBS 591.75	Wildtyp 1 L-Bioreaktor, Batch (216 h)	100 g/L Glucose + Succinat + 0,5 g/L Maisquellwasser	13,9 g/L 3-5 kDa	0,21 g/g ^a	0,06 g/(l*h)	Liu und Steinbüchel, 1997
<i>Aureobasidium pullulans</i> ZD-3d	Wildtyp, Pflanzenisolat aus Hangzhou, China 10 L-Bioreaktor (5 L), Batch (160 h)	120 g/L Glucose + g/L NH ₄ NO ₃	2 57,2 g/L 4,25 kDa (M _n)	0,48 g/g	0,36 g/(l*h)	Zhang H. et al., 2011
<i>Aureobasidium pullulans</i> ipe-1 (CGMCC no. 3337)	Wildtyp, 7,5 L-Bioreaktor (4 L), Repeated-Batch (jeweils 48 h)	190 g/L Glucose + g/L Trypton + NaNO ₃ + 5 g/L Hefeextrakt	15 63,2 g/L 6 g/L 4 – 200 kDa	0,33 g/g	1,15 g/(l*h)	Cao W. et al., 2012
<i>Aureobasidium pullulans</i> ipe-1	Wildtyp 2,7 L-Bioreaktor					Cao et al., 2019

II. Mikrobielle Produktion von L-Äpfelsäure (Malat)

(CGMCC no. 3337)	Batch (96 h)	150 g/L Glucose + 15 g/L Pepton + 2 g/L NaNO ₃	25,2 g/L	0,17 g/g	0,26 g/(l*h)	
	Batch (48 h)	Topinambur-Hydrolysat (130 g/L Glucose + Fructose)	24,9 g/L	0,19 g/g	0,52 g/(l*h)	
	Fed-Batch (72 h)	Topinambur-Hydrolysat (130 g/L Glucose + Fructose initial) + 80 g/L	38,1 g/L	0,18 g/g	0,53 g/(l*h)	
	Reapeated-Batch mit Zellrückhaltung (30-40 h)	Topinambur-Hydrolysat (130 g/L Glucose + Fructose initial)	Je 24,9 g/L	0,19 g/g	0,78 g/(l*h)	
<i>Aureobasidium pullulans</i> ZX-10 (ATCC 62921)	Wildtyp					Zou et al., 2013
	5 L-Bioreaktor (3 L)					
	Batch (96 h)	100 g/L Glucose	41,2 g/L	0,41 g/g	0,43 g/(l*h)	
	Fed-Batch (140 h)		76,2 g/L	0,43 g/g	0,55 g/(l*h)	
	FB mit immobilisierten Zellen = FBB (192 h)		123,7 g/L	0,48 g/g	0,64 g/(l*h)	
<i>Aureobasidium pullulans</i> ZX-10 (ATCC 62921)	Wildtyp					Wei et al., 2017
	5 L-Bioreaktor (2 L)					
	Batch (150,5 h)	120 g/L Glucose	51,3 g/L	0,56 g/g	0,34 g/(l*h)	
	Batch (207 h)	120 g/L Saccharose	48,5 g/L	0,68 g/g	0,23 g/(l*h)	
	Batch (187,5 h)	Zuckerrohrmelasse	52,6 g/L	0,54 g/g	0,28 g/(l*h)	
	Fed-Batch (340 h)	Zuckerrohrmelasse	116,3 g/L	0,41 g/g	0,34 g/(l*h)	
	Repeated-Batch (75 –				0,41-0,66	

II. Mikrobielle Produktion von L-Äpfelsäure (Malat)

	90 h)	Zuckerrohrmelasse	40 g/L	0,34 g/g	g/(l*h)	
<i>Aureobasidium pullulans</i> ZX-10 (ATCC 62921)	Wildtyp					Cheng et al., 2017
	5 L-Bioreaktor (2 L)					
	Repeated-Batch mit Zellrückh. (200 h)	100 g/L Sojähüsen-hydroly. + 10 g/L CSL	79,6 g/L	0,39 g/g	0,4 g/(l*h)	
	Fed-Batch (260 h)	Soja-Melasse (270 g/L Zucker)	62,6 g/L	0,6 g/g	0,24 g/(l*h)	
<i>Aureobasidium pullulans</i> NRRL 50383	Wildtyp	50 g/L Weizenstroh-Hydrolysat + hydrolytische Enzyme +0,6 g/L Pepton + 0,4 g/L Hefeextrakt	23,5 g/L	n.b.	0,14 g/(l*h)	Leathers und Manitchotpsit, 2013
	50 ml SK (10 ml) Batch (168 h)					
<i>Aureobasidium sp.</i> P6 (MCCC 2E01288)	Wildtyp (Isolat von Mangroven)	140 g/L Glucose + 2 g/L NH ₄ NO ₃	91,1 g/L	0,68 g/g	0,54 g/(l*h)	Ma et al., 2013
	10 L-Bioreaktor (6 L), Batch (168 h)		81,37 kDa			
<i>Aureobasidium pullulans</i> CCTCC M2012223	Wildtyp					Zan und Zou, 2013
	5 L-Bioreaktor (3 L) Batch (120 h)	Süßkartoffelhydrolysat (120 g/L Zucker) + 3 g/L Hefeextrakt	29,6 g/L	0,28 g/g	0,25 g/(l*h)	
	Fed-Batch (156 h)	Süßkartoffelhydrolysat (60 g/L Zucker initial) + 3 g/L Hefeextrakt	44 g/L	0,19 g/g	0,28 g/(l*h)	
	Immobilisiert, Batch (156 h)	Süßkartoffelhydrolysat (60 g/L Zucker initial) + 3 g/L Hefeextrakt	57,5 g/L	0,2 g/g	0,37 g/(l*h)	

II. Mikrobielle Produktion von L-Äpfelsäure (Malat)

<i>Aureobasidium pullulans</i> CCTCC M2012223	Wildtyp 50 L-Bioreaktor (30 L) Batch (84 h)	90 g/L Glucose, 2 g/L NH ₄ NO ₃ + 70 mg/L Biotin + 30 g/L Na ₂ CO ₃	34,3 g/L	0,45 g/g	0,41 g/(l*h)	Zou et al., 2014
<i>Aureobasidium pullulans</i> CCTCC M2012223	0,5 L aerober Faserbett-Bioreaktor (AFBB) verbunden mit 5 L Fermenter, Repeated Batch mit immobilisierten Zellen (9 Zyklen, 864 h ges.)	Maiskolbenhydrolysat (110 g/L Glucose und Xylose) + 2 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ (initial) Aufgefüllt bis auf 150 g/L	27,6 – 38,6 g/L	0,28 – 0,3 g/g	0,29 – 0,4 g/(l*h)	Zou et al., 2015
<i>Aureobasidium pullulans</i> CCTCC M2012223	Wildtyp 5 L-Bioreaktor (3 L) Batch (60 h)	90 g/L Glucose + 2 g/L NH ₄ NO ₃	26,53 g/L	0,35 g/g ^b	0,44 g/(l*h)	Tu et al., 2015
	Batch (60 h)	+ 0,05 % Tween 80	46,45 g/L	0,52 g/g	0,77 g/(l*h)	
<i>Aureobasidium pullulans</i> CCTCC M2012223 FJ-PYC	ÜE <i>pyc</i> 5 L-Bioreaktor (3,5 L) Batch (68 h)	90 g/L Zucker Glucose + 2 g/L NH ₄ NO ₃	36,2 g/L	0,45 g/g ^b	0,53 g/(l*h)	Feng et al., 2018
	Batch (60 h)	Zuckerrohrmelasse	31,5 g/L	0,38 g/g	0,53 g/(l*h)	
	Fed-Batch (140 h)	Zuckerrohrmelasse (152 g Zucker ges.)	81,5 g/L	0,54 g/g	0,58 g/(l*h)	
<i>Aureobasidium pullulans</i> CCTCC M2012223 YJ-MLS	ÜE <i>mls</i> 5 L-Bioreaktor (3,5 L), Batch (72 h)	90 g/L Glucose + 2 g/L NH ₄ NO ₃	35,8 g/L	0,41 g/g	0,5 g/(l*h)	Yang et al., 2018a
	Batch (72 h)	+ 1% Ethanol	40 g/L	0,48 g/g	0,56 g/(l*h)	

II. Mikrobielle Produktion von L-Äpfelsäure (Malat)

<i>Aureobasidium pullulans</i> YJ6-11	Wildtyp, Eigenisolat von Pflanzen, Jinyun Mountain bei Beibei, Chongqing, China					Zou et al., 2016
	5 L-Bioreaktor (3 L)					
	Batch (74 h)	90 g/L Xylose+ 2 g/L NH ₄ NO ₃	32,1 g/L	0,39 g/g	0,43 g/(l*h)	
	Fed-Batch (156 h)	600 g/L Xylose Feed	80,4 g/L	0,41 g/g	0,51 g/(l*h)	
<i>Aureobasidium pullulans</i> HA-4D (CGMCC No.7.208)	Wildtyp					Xia et al., 2016
	5 L-Bioreaktor (2,7 L)					
	Batch (88 h)	200 g/L Zuckerrohrmelasse (35,8% Saccharose, 5,2% Glucose, 8,7% Fructose) → 100 g/L Zucker + 2 g/L NH ₄ NO ₃	40 g/L ^b	0,4 g/g ^b	0,45 g/(l*h) ^b	
	Fed-Batch (168 h), kontinuierlicher Feed	Feed mit 500 g/L Zucker	95,4 g/L	0,24 g/g	0,57 g/(l*h)	
<i>Aureobasidium pullulans</i> HA-4D (CGMCC No.7.208)	Wildtyp					Xia et al., 2017a
	5 L-Bioreaktor (3 L), Fed-Batch (168 h)					
	Fed-Batch (5 L, 168h)	100 g/L Glucose + 2 g/L NaNO ₃	96,2 g/L	0,62 g/g	0,57 g/(l*h)	
	Fed-Batch (1 t, 168 h)	Topinambur-Hydrolysat (100 g/L Zucker, 75 % Fructose, 25 % Glucose) + 1 g/L	114,2 g/L	0,74 g/g	0,68 g/(l*h)	
			117,5 g/L	n.b.	0,7 g/(l*h)	

II. Mikrobielle Produktion von L-Äpfelsäure (Malat)

		NaNO ₃					
<i>Aureobasidium pullulans</i> HA-4D (CGMCC No.7.208)	Wildtyp	Süßkartoffelreste + Weizenkleie (1:1 w/w) + 0,8 (w/w) NaNO ₃ , 70 % Feuchtigkeit					Xia et al., 2017b
	300 g Feststoff im 5 L-Saugtank, Festbett						
	Batch (192 h)		73,8 mg/g		0,38 mg/(g*h)		
	Repeated-Batch (5 Zyklen) (192 h+ 4x 168 h)		~60 ^b - 75,4 mg/g		0,36 – 0,39 mg/(g*h)		
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>pullulans</i> MCW (MCCC 2E01289)	Wildtyp	140 g/L Glucose + 7,5 g/L Maisquellwasser	117,4 g/L	0,87 g/g	1,22 g/(l*h)	Wang et al., 2015	
	10 L-Bioreaktor (6 L), Batch (96 h)		205,4 kDa				
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i> GXZ-6	Wildtyp	160 g/L Saccharose + 2 g/L NaNO ₃					Zeng et al., 2019b
	10 L-Bioreaktor (6,5 L), Batch (192 h)		44,77 g/L	0,32 g/g	0,23 g/(l*h)		
	Batch (180 h)	160 g/L Saccharose + 2 g/L NaNO ₃ + 5 g/L Citrat + 5 g/L Malat + 2x 7 g/L Na-Malonat	62,56 g/L 2,797 kDa	0,46 g/g	0,35 g/(l*h)		

Angaben für Ca-PMA wurden in PMA durch Multiplikation mit dem Faktor 0,77 (= M_w L-Malat / M_w Ca-Malat) umgerechnet

^a Daten abgeschätzt aus den Diagrammen, Berechnung erfolgte unter der Annahme, dass von den eingesetzten 100 g/L Glucose 65 g/L am Ende der Fermentation verbraucht waren

^b Daten abgeschätzt aus den Diagrammen

Titer, Ausbeute und Produktivität der L-Malat-Produzenten sind derzeit noch höher als die der PMA-Produzenten. Es gibt allerdings momentan erst zwei publizierte Studien, in denen ein PMA-Produzent genetisch verändert wurde. Die meisten Studien konzentrieren sich auf Medien- und Prozessoptimierung, was deutlich macht, dass signifikante Verbesserungen auch mit L-Malat-Wildtyp-Produzenten erreicht werden könnten. Cheng et al. (2017) und Wei et al. (2017) berechneten, dass die L-Malat-Herstellung über PMA mit Soja- oder Zuckerrohr-Melasse wirtschaftlich erfolgen kann. Daher werden diese Substrate auch in eigenen Arbeiten für die L-Malat-Herstellung mit *A. oryzae* evaluiert.

2.2.3 Nicht-natürliche Produzenten-Stämme

Obwohl bereits hohe (Poly-)Malat-Titer mit natürlichen Produzentenstämmen erreicht werden, die zusätzlich durch genetische Modifikationen gesteigert werden konnten, gibt es zahlreiche Studien, die die vollständige rekombinante L-Malat-Produktion mit den bekannten und in der Industrie etablierten Modellorganismen, u.a. *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* und *Escherichia coli* untersuchen. Die Vorteile liegen hier in der einzelligen Morphologie, die die Prozessführung und Skalierbarkeit im Vergleich zu den filamentösen Pilzen deutlich vereinfacht, und der guten genetischen Zugänglichkeit. Dies wird genutzt um Titer, Ausbeuten und Produktivitäten weiter zu steigern und Nebenprodukte zu eliminieren. Jedoch sind meist weitreichende genetische Veränderungen notwendig bis konkurrenzfähige L-Malat-Konzentrationen gebildet werden. Tabelle 3 fasst die derzeit publizierten Studien der nicht-natürlichen L-Malat-Produzenten zusammen.

II. Mikrobielle Produktion von L-Äpfelsäure (Malat)

Tabelle 3: Übersicht über Titer, Ausbeute und Produktivität rekombinanter, nicht-natürlicher L-Malat-Produzenten (modifiziert nach Dai et al., 2018)

Stamm	Beschreibung	Substrat	Titer	Ausbeute	Produktivität	Referenz
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> DMM1-15A	ÜE <i>mdh2</i> Batch (32 h)	20 g/L Galactose + 1,5 g/L NH ₄ Cl	11,8 g/L + 40,7 g/L Citrat	n.b.	0,37 g/(l*h)	Pines et al., 1997
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> RWB525	CEN.PK 113-7D Derivat, ÜE <i>pyc2</i> + <i>mdh3</i> cytoplasma- tisch exprimiert + <i>mae1</i> (<i>S. pombe</i>) SK, 100 ml, Batch (192 h)	189 g/L Glucose + 1 g/L Harnstoff	59 g/L	0,31 g/g 0,42 mol/mol	0,29 g/(l*h)	Zelle et al., 2008
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> W4209	Derivat von RWB837 ÜE <i>pyc</i> (<i>A. flavus</i>) + <i>mdh</i> (<i>R. oryzae</i>) + <i>mae1</i> (<i>S. pombe</i>) 0,5 L SK (100 ml), Batch (96 h)	100 g/L Glucose + 1 g/L Harnstoff	30,25 g/L + 30,75 g/L Pyruvat	0,3 g/g 0,41 mol/mol	0,32 g/(l*h)	Chen et al., 2017
<i>Pichia pastoris</i> GS115	ÜE <i>pyc</i> + <i>mdh1</i> multi- copy 3-stufige Vorkultur, 0,6 L Bioreaktor (0,2 L) Batch (96 h)	100 g/L Glucose + 1,24 g/L KNO ₃	42,28 g/L	0,42 g/g ⁺	0,44 g/(l*h)	Zhang T. et al., 2015
<i>Escherichia coli</i> WGS-10	Derivat von E. coli W3110, ÜE <i>pckA</i> (<i>M.</i> <i>succiniciproducens</i>) + Deletion von <i>ldhA</i> , <i>pta</i> + <i>adhE</i> ^a 5 L-Bioreaktor (3 L),	20 g/L Glucose + 2g/L (NH ₄) ₂ HPO ₄	9,25 g/L	0,46 g/g 0,62 mol/mol	0,74 g/(l*h)	Moon et al., 2008

II. Mikrobielle Produktion von L-Äpfelsäure (Malat)

Batch (12,5 h)						
<i>Escherichia coli</i> KJ071	Derivat von <i>E. coli</i> C ATCC 8739, Deletion <i>adhA</i> , <i>adhE</i> , <i>ackA</i> , <i>focA</i> , <i>pfkB</i> , <i>mgsA</i> + adaptive Evolution	100 g/L Glucose + 1 mM Betain-HCl	69 g/L	1,07 g/g 1,44 mol/mol	0,72 g/(l*h)	Jantama et al., 2008
<i>Escherichia coli</i> XZ658	<i>E. coli</i> ATCC 8739 (Δ ldhA Δ ackA Δ adhE Δ pfkB Δ mgsA Δ poxB Δ frdBC Δ sfca Δ maeB Δ fumB Δ fumAC)	50 g/L Glucose	34 g/L	1 g/g 1,42 mol/mol	0,47 g/(l*h)	Zhang X. et al., 2011
	3 L-Bioreaktor (1,2 L) Zweistufiger Prozess (aerob + anaerob) 72 h					
9 x <i>Escherichia coli</i> Rosseta2 (DE3)	ÜE Malatenzym-Gen (<i>Thermococcus</i> <i>kodakarensis</i>), Glucokinase , Glucose-6-Phosphat Isomerase, 6-Phos- phofructokinase, Fructose-Bisphos- phataldolase, Triosephosphat Isomerase, Enolase, Pyruvat Kinase (PK) aus <i>T. thermophilus</i> , iPGM aus <i>P.</i> <i>horikoshii</i> , und GAPN	1,8 mM Glucose	2,6 mM Malat (0,35 g/L) + 0,6 mM Lactat	1,08 g/g 1,44 mol/mol	0,12 g/(l*h)	Ye et al., 2013

II. Mikrobielle Produktion von L-Äpfelsäure (Malat)

	aus <i>T. kodakarensis</i>					
	Biotransformation mit Rohextraktmischung der 9 Stämme (3 h)					
<i>Escherichia coli</i> F0931	W3110-Derivat Δ ldhA Δ poxB Δ pflB Δ pta - ackA Δ frdBC Δ fumB Δ fumAC + pTrcHisA - ME2(C490S) - pos5	50 g/L Glucose, 20 g/L Trypton, 10 g/L Hefe Extrakt, 2,63 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0,87 g/L $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + 15 g/L Glucose	21,65 g/L+ 16,54 g/L Pyruvat	0,36 g/g 0,48 mol/mol	0,3 g/(l*h)	Dong et al., 2017
	Mehrphasiger Prozess, 5 L-Bioreaktor					
<i>Escherichia coli</i> B0013 - 47	<i>E. coli</i> B0013 – Derivat, PETM7 - PGNAB (<i>pyc A. flavus</i> , <i>gltA</i> , <i>acnB</i> , <i>aceA</i> , <i>aceB Streptomyces coelicolor</i>), sgRNA set 2, dCas9)	25 g/L Glucose, Feed: 20 g/L Nicht-zyklischer Glyoxylat-Weg	36 g/L (269 mM)	0,55 g/g 0,74 mol/mol	0,6 g/(l*h)	Gao et al., 2018
	3,6 L-Bioreaktor (2 L), Fed-Batch (60 h)					
<i>Escherichia coli</i> XB	<i>E. coli</i> XL1-Blue-Derivat, ÜE <i>E. coli</i> <i>pykF</i> -SH3L und <i>E. coli</i> <i>sfcA</i> -SH3D	30 g/L Trypton, 20 g/L Hefeextrakt, 2,5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 8 g/L Glycerin	12,08 g/L	n.b.	0,14 g/(l*h)	Somasundaram et al., 2018
	5 L-Bioreaktor (1,5 L), Fed-Batch (84 h), Endvolumen: 2,5 L					
		Feed: 500 g/L Glycerin, 50 g/L Hefeextrakt, 50 g/L				

II. Mikrobielle Produktion von L-Äpfelsäure (Malat)

		Trypton + 50 g Glucose Pyruvat-Kinase und Malic-Enzym wurden co-lokalisiert				
<i>Escherichia coli</i> Sy731	<i>E. coli</i> K-12 MG1655- Derivat (ATCC47076) $\Delta mdh \Delta mqp \Delta maeA$ $\Delta maeB \Delta icR \Delta arcA$, ÜE ppc_{K620S} - $gltA_{R164L}$ 0,5 L-Bioreaktor, aerob, Batch	50 mM Glucose TCA-Zyklus abhängige Malat- Produktion	5,5 g/L 41 mM	0,61 g/g 0,82 mol/mol	n.b.	Trichez et al., 2018
<i>Escherichia coli</i> FH389	<i>E. coli</i> MG1655- Derivat, $\Delta ptsG$ $\Delta frdBC \Delta fumABC$ $\Delta maeAB \Delta aspC$ $\Delta ldhA \Delta adhE$, ÜE <i>ca</i> und <i>RuBisCo</i> (<i>Synechocystis</i> PCC 6803), <i>pck</i> and <i>mdh</i> aus <i>A. succinogenes</i> 1L-Bioreaktor (0,8 L), Fed-Batch, anaerob	50 g/L Glucose CO ₂ -Fixierung über RuBisCo	51,86 g/L 387 mM	1,1 g/g 1,46 mol/mol	n.b.	Hu et al., 2018
<i>Escherichia coli</i> SBS550MG-Cms243 pHL413-Km	<i>E. coli</i> MG1655- Derivat (ATCC47076), Deletion von <i>ldhA</i> <i>adhE icR ackpta</i> , ÜE Pyruvate carboxylase aus <i>Lactococcus</i>	LB mit 100 mM Glucose (18 g/L) Zunächst Produktion von Succinat, im zweiten Schritt Konversion von Succinat zu Malat	17,83 g/L (133 mM)	0,99 g/g 1,33 mol/mol	0,38 g/(l*h)	Martinez et al., 2018

II. Mikrobielle Produktion von L-Äpfelsäure (Malat)

	<i>lactis</i>					
	250 ml SK (48 h), Batch					
	Zweistufiger Prozess (anaerob/aerob)					
<i>Escherichia coli</i> GL2306	<i>E. coli</i> ATCC8739- Derivat, Δ adhE Δ ackA Δ ldhA Δ ptsI Δ pflB Δ focA Δ mgsA, ÜE pck + mdh (<i>Actinobacillus</i> <i>succinogenes</i>)	20 g/L Glucose Relokation des rTCA- Zyklus ins Periplasma	25,9 g/L 193 mM	0,4 g/g 0,53 mol/mol	0,36 g/(l*h)	Guo et al., 2018
	5 L-Bioreaktor (3 L), zweistufig, fed-batch mikroaerob (72 h)					

* Daten abgeschätzt aus den Diagrammen

+ Keine gesicherten Angaben dazu in der Publikation, Daten beruhen auf eigenen Schätzungen

^a Lactat-Dehydrogenase, Phosphotransacetylase, Alkohol-Dehydrogenase

Einige *S. cerevisiae*-Stämme produzieren zwar natürlicherweise geringe Mengen an Malat (0,1-2,6 g/L) (Faticenti et al., 1984; Schwartz und Radler, 1988; Pines et al., 1996), jedoch in so geringen Mengen, dass *S. cerevisiae* an dieser Stelle aufgeführt wird. Für *S. cerevisiae* sind relativ wenige genetische Modifikationen notwendig, um größere Mengen an Malat produzieren zu können. Weitere Vorteile liegen in der hohen Toleranz gegenüber niedrigen pH-Werten, hohen osmotischen Drücken und Ethanolkonzentrationen, geringer Empfindlichkeit gegenüber Metallionen, sowie einer großen Flexibilität bezüglich des Substratspektrums (Goldberg et al., 2006; Dai et al., 2018). Der Ascomycet *S. cerevisiae* ist zudem nah mit den natürlichen *Aspergillus*-Produzenten verwandt, sodass dieselbe Kompartimentierung der Stoffwechselwege genutzt werden kann und Erkenntnisse bezüglich Kultivierung und Regulation durchaus übertragen werden können. Trotz unterschiedlicher Strategien liegen die Ausbeuten aller drei derzeit publizierten Studien zur L-Malat-Produktion mit *S. cerevisiae* im Bereich von 0,3 g/g bzw. 0,4 mol/mol, was im Vergleich zu den natürlichen Produzenten sehr niedrig ist. Weitere Anstrengungen zur Steigerung der L-Malat-Synthese in *S. cerevisiae* wurden bisher nicht publiziert.

Die methylo trope Hefe *Pichia pastoris* wird oft als Alternative zu *S. cerevisiae* gehandelt, da sie viel höhere Zelldichten erreichen und das kostengünstige Substrat Methanol verstoffwechseln kann, sowie eine effiziente heterologe Genexpression aufweist (Darby et al., 2012). Über die Methanolverwertung werden zudem zwei Moleküle von NADH produziert, sodass ausreichend Redox-Äquivalente für die L-Äpfelsäureproduktion zur Verfügung stehen. In der derzeit einzigen publizierten Studie liegen Ausbeute und Produktivität in der Produktionsphase mit 0,42 g/g bzw. 0,57 mol/mol und 0,44 g/(l*h) zwar leicht höher als bei *S. cerevisiae*, aber immer noch deutlich niedriger als die der natürlichen Produzenten (Zhang T. et al., 2015). Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass es sich hier um einen dreistufigen Prozess handelt, bei dem der Produktionsphase zunächst zwei Vorkulturen vorausgehen, eine für Biomasseproduktion und die zweite für die Enzymproduktion nach der Induktion mit Methanol.

Unter den Bakterienarten wurde *E. coli* am häufigsten für die L-Äpfelsäureproduktion eingesetzt, obwohl sich dieser Organismus im Gegensatz zu Hefen und Pilzen nicht durch ein nennenswertes natürliches Produktionspotenzial auszeichnet. Daher sind

II. Mikrobielle Produktion von L-Äpfelsäure (Malat)

komplexe und aufwändige gentechnische Ansätze zur Umleitung des intrazellulären Kohlenstoffflusses in Richtung der L-Äpfelsäure-Synthese erforderlich. Im Zuge dessen wurden konkurrierende Stoffwechselwege deletiert oder herunterreguliert und Schlüsselenzyme exprimiert oder überexprimiert (siehe Tabelle 3 und Abbildung 12). Für die Konstruktion der entsprechenden Stämme wurde zudem eine Vielzahl an genetischen Ansätzen verwendet. Je nachdem, über welchen Stoffwechselweg die L-Malatbildung abläuft, sind unterschiedliche Prozessmodi für eine optimale Produktion notwendig: komplett aerob, komplett anaerob oder zweistufig mit einer anaeroben and aeroben Phase.

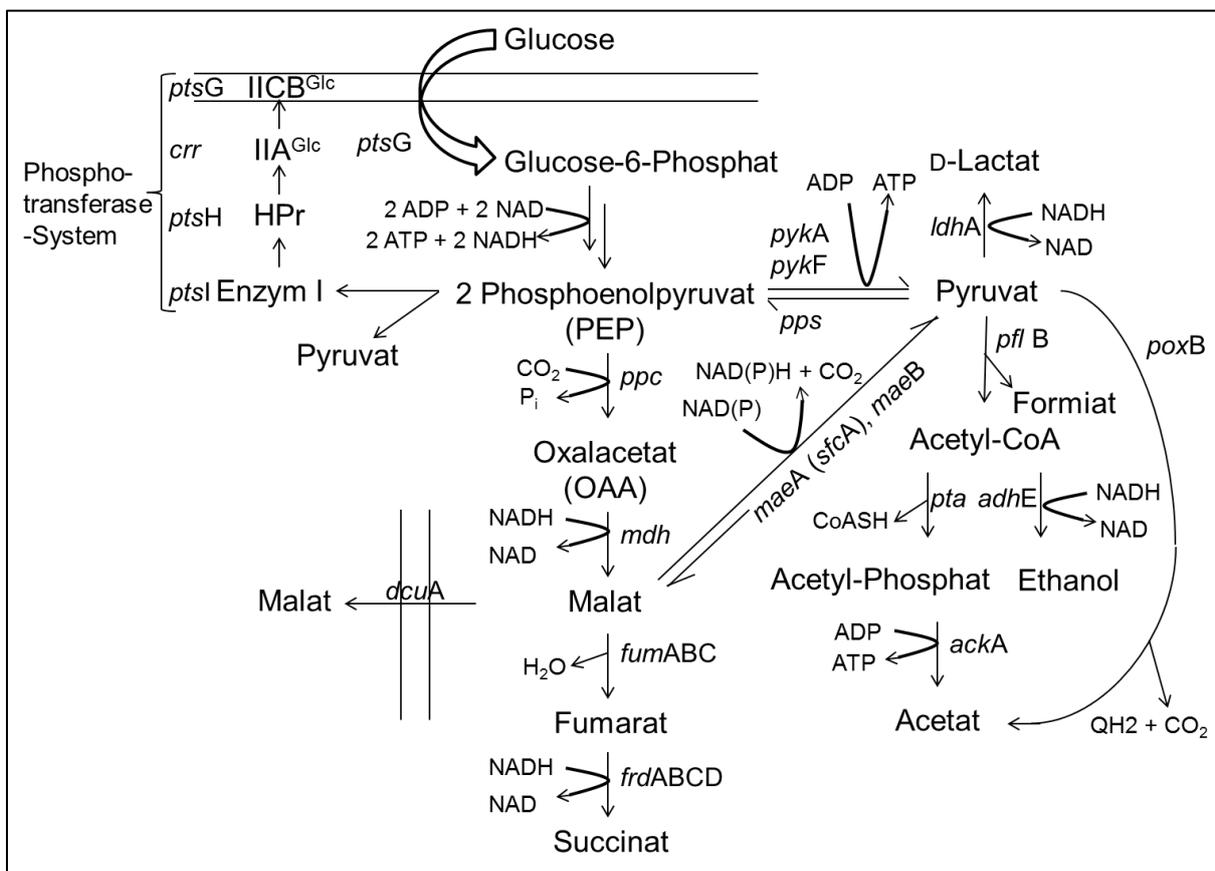


Abbildung 12: Gemischte Säuregärung mit Glucose als Substrat in *E. coli* Wildtyp-Stämmen zur besseren Verortung der deletierten Gene in den rekombinanten *E. coli* Malat-Produzenten in Tabelle 3 und im nachfolgenden Text (modifiziert nach Zhang et al., 2009a; Trichez et al., 2018).

Die L-Malatproduktion durch den reduktiven TCA-Zweig, der über die Carboxylierung von Pyruvat (Pyruvat-Carboxylase *pyc*) oder Phosphoenolpyruvat (PEP) (PEP-Carboxykinase *pck* / PEP-Carboxylase *ppc*) zu Oxalacetat (OAA) und weiter über die

Malatdehydrogenase (*mdh*) zu L-Malat führt, stellt den effizientesten Stoffwechselweg dar, der eine theoretische Ausbeute von 2 Mol L-Malat pro Mol Glucose ermöglicht. Daher konzentrierten sich die meisten Metabolic Engineering-Studien auf die Optimierung dieses Weges. Wichtig ist hierbei, dass eine Pck/Ppc verwendet wird, die nicht durch hohe L-Malat-Konzentrationen gehemmt wird, wie es beim nativen *E. coli*-Enzym der Fall ist, bei dem zudem die Rückreaktion begünstigt ist. Die Reduktion von OAA zu L-Malat erfordert ein hohes NADH/NAD-Verhältnis, das üblicherweise nur unter sauerstoffbegrenzten oder anaeroben Bedingungen in *E. coli* erreicht werden kann. Zudem erfordert die Pck-abhängige Synthese von OAA aus PEP hohe Kohlendioxid- und PEP-Konzentrationen (Zelle et al., 2010b), die entweder nur unter anaeroben Bedingungen oder durch Begasung mit CO₂ (Zelle et al., 2010b; Zhang et al., 2009a) sowie durch Deletion des PEP-verbrauchenden Phosphotransferase-Systems oder durch Inaktivierung der Pyruvatkinase (Zelle et al., 2010b; Zhang et al., 2009a; 2009b) erzielt werden können. Daher wird in Studien, die den rTCA-Zweig nutzen, eine vollständig anaerobe/mikroaerobe Kultivierung durchgeführt oder ein zweistufiger Prozess verwendet, bei der eine anaerobe Produktionsphase an eine aerobe Wachstumphase angeschlossen ist. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Deletion beider nativer Malat-Enzym-Gene (*sfcA* und *maeB*) erforderlich ist (Zhang X et al., 2011; Trichez et al., 2018). Das Malat-Enzym kann zwar L-Malat direkt aus Pyruvat bilden, hat aber eine höhere Affinität zu L-Malat. Bei höheren L-Malatkonzentrationen wird daher die reversible Reaktion von L-Malat zu Pyruvat bevorzugt (Bologna et al., 2007; Somasundaram et al., 2018). Abhilfe konnte hier zum einen die Einführung eines mutierten Malat-Enzym-Gens aus *Arabidopsis thaliana*, das die direkte Umwandlung von Pyruvat zu L-Malat ermöglicht (Dong et al., 2017), und zum anderen die physikalische Verbindung der nativen *E. coli* Proteine Pyruvat-Kinase (*pykF*) und Malat-Enzym (*sfcA*) über Protein-Protein-Interaktionsdomänen zu einem synthetischen Scaffold-Komplex (Somasundaram et al., 2018), schaffen. Ähnlich erfolgsversprechend war die periplasmatische Überexpression der Enzyme für den reduktiven TCA-Zweig, PEP-Carboxykinase und Malat-Dehydrogenase aus *Actinobacillus succinogenes*, in einem Multideletionsstamm, um die natürliche Kompartimentierung von (eukaryotischen) Stoffwechselwegen in Organellen nachzuahmen (Guo et al., 2018). Wie essentiell die Carboxylierungsreaktion für die L-Malat-Bildung ist, wurde durch Hu et al. (2018)

demonstriert. Mit Hilfe eines CO₂-fixierenden *E. coli*-Stammes wurde die derzeit höchste publizierte Malat-Ausbeute von 1,46 mol/mol erreicht. Alternativ zur direkten L-Malat-Produktion kann diese auch zweistufig über Succinat erfolgen. Dazu werden zunächst anaerob große Mengen an Succinat akkumuliert, um diese dann in der zweiten Produktionsphase aerob zu L-Malat umzusetzen (Jantama et al., 2008; Zhang X. et al., 2013; Martinez et al., 2018).

Wird hingegen L-Malat über den oxidativen TCA-Zyklus oder den Glyoxylat-Weg produziert, sind aerobe Kultivierungsbedingungen erforderlich. Dies erhöht die Verfügbarkeit von ATP und NADH innerhalb der Stämme erheblich, was vorteilhaft oder gar notwendig sein könnte, falls Folgeprodukte erzeugt werden sollen, führt aber zu einer Reduktion der maximalen L-Malat-Ausbeute auf 1 bzw. 1,33 mol/mol (Zelle et al., 2008). Daher wurden bisher nur zwei Studien publiziert, die L-Malat über diese beiden Optionen produzieren (Gao et al., 2018; Trichez et al. 2018).

Diese Arbeiten machen deutlich, dass in vielen Fällen mehr als eine Strategie notwendig ist, um eine effiziente L-Malatproduktion zu erreichen und geben einen kleinen Einblick in die Komplexität der gentechnischen Ansätze.

2.2.4 Anmerkungen und Vergleich der Produzentenstämme

Während bei den nicht-natürlichen Produzentenstämmen die effiziente Konstruktion der Stoffwechselwege im Vordergrund steht, hat sich bei der genetischen Modifikation der natürlichen Produzenten gezeigt, dass eine signifikante Steigerung der L-Malatsynthese durch Überexpression des nativen oder eines heterologen C₄-Transporters erzielt werden kann. Tatsächlich zeigte die Studie von Brown et al. (2013), dass sich die L-Malatproduktion weitaus weniger durch Überexpression von *pyc* und *mdh*-Genen in *A. oryzae* erhöhte als durch die alleinige Überexpression des nativen Transporters. Dies konnte in der Studie von Liu J. et al. (2017) bestätigt werden, in der durch die zusätzliche Expression des Transporters aus *S. pombe* der Titer nochmals erhöht werden konnte.

Die mikrobielle Produktion organischer Säuren umfasst verschiedene Transportprozesse wie die Aufnahme von Substraten, den Produktexport und

eventuell den Transport zwischen Organellen und sind für die mikrobielle Produktion organischer Säuren von grundlegender Bedeutung. Die Mechanismen und der Energiebedarf der meisten Transportprozesse ist jedoch noch Gegenstand der Forschung.

Besonders umstritten ist die Frage, wie mikrobiell hergestellte Säuren exportiert werden (Papagianni, 2007; Vrabl et al., 2012). In Anbetracht des Gradienten, der überwunden werden muss, um beispielsweise bis zu 200 g/L Citronensäure bei niedrigem pH-Wert in die Kulturbrühe zu sekretieren, muss ein effizientes Transportsystem vorhanden sein. Eine Möglichkeit besteht darin, dass Citronensäure ATP-abhängig exportiert werden (Wolschek und Kubicek, 1998) oder, dass Citronensäure über einen Protonen-Symport passiv ausgeschieden werden könnte, bei der der niedrige pH-Wert der Kulturbrühe die treibende Kraft ist (Burgstaller et al., 2006; García und Torres, 2011). Bei niedrigem pH-Wert ist die Konzentration des deprotonierten Citronensäureanions außerhalb der Zelle niedrig, aber aufgrund des höheren intrazellulären pH-Wertes im Inneren hoch. Daher könnte dieses Ion die Zelle durch passive Diffusion verlassen. Wie die Protonen jedoch gegen den Gradienten exportiert werden, bleibt unklar (Sauer et al., 2008). Dieser Aspekt wird aber bei den rekombinanten *E. coli*-Stämmen überhaupt nicht betrachtet. Einzig Trichez et al. (2018) gaben an, dass die Inaktivierung des Dicarbonsäure-Transporters DcuA die L-Malatproduktion stark reduzierte. Der Einfluss einer Überexpression von DcuA oder anderer Transporter/Permeasen auf die L-Malatproduktion wurde noch nicht untersucht. Obwohl die Steigerung der Produktionskapazität durch genetische Modifikationen überaus vielversprechend ist und als relativ einfacher Weg erscheint, muss bedacht werden, dass dies dennoch in Deutschland/der EU kein praktikabler Weg ist, wenn L-Äpfelsäure im Lebensmittelbereich eingesetzt werden soll. Die Verwendung von Lebensmittelzusatzstoffen, die mit gentechnisch modifizierten Organismen hergestellt werden, muss zwar momentan nicht deklariert werden, dennoch verzichtet nach eigener Aussage die Firma BRAIN vorsorglich auf die Produktion von L-Malat mit gentechnisch modifizierten Organismen und setzt auf adaptierte Stämme.

Im Vergleich aller Produzentenstämmen wurde der bisher höchste L-Malat-Titer (195 g/L) mit dem adaptierten *Ustilago trichophora*-Stamm TZ1 auf Glycerin (Zambanini et

al., 2016b), die höchste Ausbeute von 1,46 mol/mol mit dem rekombinanten, CO₂-fixierenden *E. coli*-Stamm FH389 (Hu et al., 2018), und die höchste Produktivität von 2,03 g/(l*h) mit dem mutierten *Rhizopus delemar*-Stamm HF121 (Li X. et al., 2014) erzielt. Die Vergleichbarkeit ist allerdings stark eingeschränkt; für eine generellere Aussage über den tatsächlich besten Produktionsstamm müsste eine Vergleichsfermentation von allen publizierten Stämmen unter denselben Bedingungen durchgeführt werden. Für eine mögliche Industrialisierung sind Titer, Ausbeute und Produktivität zudem nicht die einzigen Faktoren, die berücksichtigt werden müssen. Die Kosten für das Substrat und die Produkt-Aufarbeitung sind entscheidende Faktoren für die Wirtschaftlichkeit eines Prozesses. Dies gilt insbesondere für Plattform-Chemikalien, bei denen der Preis nur geringfügig über dem Preis von raffinierten Zuckern liegen könnte. Hohe Substratkosten können den Vorteil hoher Produktkonzentrationen negieren, während hohe Aufarbeitungskosten mögliche Kostenvorteile einer günstigen Kohlenstoffquelle auffangen können (Sauer et al., 2008). Derartige Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen wurden für L-Malat bisher nur indirekt für die Poly-Malat-Produktion publiziert (Wei et al., 2017; Xia et al., 2017a) und werden in den Abschnitten 2.3. und 2.4 näher beleuchtet.

2.3 Einflussfaktoren und Prozessoptimierung

Organische Säuren werden von filamentösen Pilzen und Hefen aerob in der stationären Wachstumsphase unter einer Nährstofflimitierung, i.d.R. von Stickstoff, und bei gleichzeitigem Überschuss der Kohlenstoffquelle gebildet (Peleg et al., 1988). Dabei hat sich herausgestellt, dass das Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff (C:N), aber auch die Art der Stickstoff- und Kohlenstoffquelle eine besondere Rolle spielen. Durch Zugabe eines Neutralisationsmittels bzw. Puffers akkumulieren große Mengen an Säuren in der Kulturbrühe, aber auch die Art des Neutralisationsmittels beeinflusst die Säureproduktion ebenso wie die spätere Aufarbeitung des Produktes (Magnuson und Lasure 2004; Goldberg et al., 2006; Roa Engel et al., 2008; Sauer et al., 2008; Zou et al., 2019). Die Produktion von Citronensäure und Fumarsäure wird zudem durch die Morphologie der filamentösen Produzentenstämmen beeinflusst (Morrin und Ward, 1997; Papadaki et al., 2017; Sun et al., 2018; Cairns et al., 2019). Diese hängt wiederum von sehr vielen anderen Faktoren, wie z.B. die Konzentration der

Kohlenstoffquelle, Spurenelemente, Gelöstsauerstoffkonzentration, pH-Wert, Temperatur, Rheologie und Scherkräfte, ab (Carlsen et al., 1996; Cui et al., 1997; Cox et al., 1998; Papagianni et al., 1999; Papagianni 2004; Berovic und Legisa 2007; Iyyappan et al. 2018). In den nachfolgenden Unterkapiteln werden daher einige Aspekte näher betrachtet, die einen Einfluss auf die (wirtschaftliche) Produktion von L-Malat haben. Die L-Malatproduktion ist bisher weit weniger systematisch untersucht worden als die von Citrat oder Fumarat. Da sich einige Erkenntnisse insbesondere von der Fumarat- auf die L-Malatproduktion übertragen lassen könnten, werden diese an gegebener Stelle ergänzt.

2.3.1 Kohlenstoffquellen

Mikroorganismen im Allgemeinen und filamentöse Pilze im Besonderen sind in der Lage, eine große Vielfalt an Kohlenstoffquellen als Substrat für Wachstum und die Produktion organischer Säuren zu nutzen. Für die L-Malat/Poly-Malat-Produktion sind für die verschiedenen Produzentenstämme diverse Zucker oder auch komplexe Abfallsubstrate oder Lignocellulose-Hydrolysate bereits getestet worden (Ochsenreither et al., 2014; Dörsam et al., 2016; 2017; Zou et al., 2019). Dabei gilt zu beachten, dass die Syntheseroute zu L-Malat nicht unbedingt mehr redox- und energieneutral sein muss, wenn die Substrate über andere Wege als Glucose in die Glykolyse eingespeist werden. Dies könnte die maximale theoretische Malatausbeute von ~1,5 g/g verringern.

Trotz der großen Vielfalt der möglichen Substrate ist ein wirtschaftlicher biotechnologischer Prozess nur möglich, wenn die mikrobielle L-Äpfelsäure auf einem ähnlichen Preisniveau wie chemisch synthetisierte DL-Äpfelsäure hergestellt werden kann, deren Preis derzeit bei 1,75 \$/kg liegt (Cheng et al., 2017). In so gut wie allen Studien wird Glucose zumindest als Vergleichsubstrat verwendet, und schneidet oft besser ab als jede andere getestete Kohlenstoffquelle (Chi et al., 2016; Dörsam et al., 2017). Mit einem Preis von 0,39 \$/kg (Lamers, 2016) ist raffinierte Glucose jedoch viel zu teuer, um dem großtechnischen chemischen Prozess Konkurrenz zu machen. Eine Möglichkeit zur kostengünstigen mikrobiellen L-Äpfelsäureproduktion ist daher die Verwendung von billigen Industrieabfällen, Nebenströmen oder von

lignocellulose-basierten Substraten. Zu den alternativen Rohstoffen, die für die mikrobielle L-Äpfelsäure- und PMA-Produktion untersucht wurden (Tabelle 4), gehören Abfälle und Nicht-Abfall-Biomassen. Miscanthus, Buchenholz, Süßkartoffeln oder Topinamburknollen sind zwar keine Abfallstoffe, stellen aber wenig Ansprüche an ihre Anbaubedingungen: Miscanthus, das als vielversprechende Energiepflanze mit hoher Biomasseproduktionskapazität gilt, sowie Topinambur und Süßkartoffel sind robuste Arten, die auf kargen, minderwertigen Böden angebaut werden können, die sich nicht für die Produktion vieler Nutzpflanzen eignen (Zan und Zou, 2013; Xia, et al. 2017a; 2017b). Mit Topinamburknollenhydrolysat konnte einer der höchsten L-Malat-Titer (nach Hydrolyse von PMA) von 131,5 g/L mit einer Ausbeute von 0,74 g/g erhalten werden (Xia et al., 2017a).

Im Vergleich der Non-Food-Lignocellulosesubstrate wurden die höchsten L-Malatausbeuten mit Buchenholzhydrolysat (0,97 g/g) und Maisstrohhydrolysat (0,96 g/g) erzielt, während für Maisstrohhydrolysat einer der höchsten Titer von 120,5 g/l L-Äpfelsäure aus alternativen Substraten berichtet wurde (Li X. et al., 2014; Dörsam et al., 2017). Im Vergleich dazu liegen die bisher besten Titer mit Glucose zwischen 66,3 - 154 g/L, mit Ausbeuten von 0,68 - 1,11 g/g und Produktivitäten von 0,86 - 1,38 g/(L*h), die alle mit gentechnisch veränderten *Aspergillus oryzae*-Stämmen erzielt wurden (Brown et al. 2013; Knuf et al. 2014; Liu J. et al. 2017).

Der Nachteil der Verwendung von Lignocellulose-Hydrolysaten für die Fermentation ist jedoch die Notwendigkeit einer Vorbehandlung. Die komplexe Struktur von Lignocellulose erfordert es, mechanische Verfahren zur Zerkleinerung der Biomasse einzusetzen, gefolgt von physikalischen oder chemischen Verfahren wie Dampfexplosion, Säurehydrolyse oder dem Organosolv-Verfahren (siehe Abschnitt 1.2). Schließlich ist eine enzymatische Behandlung erforderlich, um die Pentosen und Hexosen für die Fermentation zugänglich zu machen. Oftmals ist diese enzymatische Vorbehandlung der Hauptkostenfaktor der Vorbehandlung. Die Preise für Maisstroh liegen zwischen 30 - 75 \$/t (Waldron 2009, S. 498; Humbird et al. 2011) und sind zwar damit deutlich günstiger als raffinierte Glucose, die etwa 390 \$/t kostet, aber die Vorbehandlungspreise müssen noch draufgerechnet werden. Für eine Ethanolproduktionsanlage wurden beispielsweise die Cellulase-Kosten berechnet,

II. Mikrobielle Produktion von L-Äpfelsäure (Malat)

die je nach Ansatz bereits zwischen etwa 25 - 100 % der trockenen Biomassekosten liegen können (Johnson, 2016).

Tabelle 4: Alternative Substrate für die Malat- und PMA-Produktion. Fett hervorgehoben wurden eigene Arbeiten.

Substrat	Stamm	PMA (g/L)	Malat (g/L)	Ausbeute (g/g)	Referenz
Rohglycerin	<i>U. trichophora</i> TZ1	-	118	0,26	Zambanini et al., 2016b
	<i>A. niger</i> ATCC 9142	-	16,5	0,17	West, 2015
	<i>A. niger</i> ATCC 10577	-	20,3	0,20	West, 2017
	<i>A. niger</i> ATCC 12846	-	23,5	0,24	West, 2017
	<i>A. niger</i> PJR1	-	83,2	0,86*	Iyyappan et al., 2018
Glycerin	<i>U. trichophora</i> TZ1	-	195	0,43	Zambanini et al., 2016b
	<i>A. oryzae</i> DSM 1863	-	45,4	0,54	Ochsenreither et al., 2014
Buchenholz-Cellulose-Hydrolysat	<i>A. oryzae</i> DSM 1863	-	37,9	0,97	Dörsam et al., 2017
Buchenholz-Hemicellulose-Fraktion	<i>A. oryzae</i> DSM 1863	-	5,8	-	Dörsam et al., 2017
Miscanthus-Cellulose-Hydrolysat	<i>A. oryzae</i> DSM 1863	-	30,8	0,32	Dörsam et al., 2017
Maisstroh-Hydrolysat	<i>R. delemar</i> HF-121	-	120,5	0,96	Li X. et al., 2014
Syngas	<i>A. oryzae</i> DSM 1863	-	1,1	0,17	Oswald et al., 2016
Dünnschlempe	<i>A. niger</i> ATCC 9142	-	16,9	0,79	West, 2011/2017
	<i>A. niger</i> ATCC 10577	-	16,4	0,79	West, 2011/2017
Maiskolben-Hydrolysat	<i>A. pullulans</i> YJ 6-11	28,6	32,4	0,41	Zou et al., 2016
Maisfaser-Hydrolysat	<i>A. pullulans</i> NRRL 50383	10,1	10,6	-	Leathers und Manitchotpisit,

II. Mikrobielle Produktion von L-Äpfelsäure (Malat)

					2013
Weizenstroh-Hydrolysat	<i>A.pullulans</i> NRRL 50383	23,5	27,0	-	Leathers und Manitchotpisit, 2013
Topinambur-Hydrolysat	<i>A. pullulans</i> HA-4D	114,4	131,5	0,74	Xia et al., 2017a
Soja-Melasse	<i>A.pullulans</i> ZX-10	62,6	71,9	0,69	Cheng et al., 2017
Sojähülsen-Hydrolysat	<i>A.pullulans</i> ZX-10	27,2	31,3	0,42	Cheng et al., 2017
Zuckerrohr-Melasse	<i>A. pullulans</i> HA-4D	95,4	109,7	0,65	Xia et al., 2016
	<i>A. pullulans</i> FJ-PYC	81,5	94,2	0,67	Feng et al., 2018
Süßkartoffel-Hydrolysat	<i>A. pullulans</i> CCTCCM2012223	57,5	66,1	0,23	Zan und Zou, 2013
Xylose-Mutterlauge (WXML)	<i>A. pullulans</i> FJ-D2	57,3	65,9	0,77	Feng et al., 2019

* angegebene Ausbeute im Paper: 0,18 g/g, Berechnung konnte mit den publizierten Angaben nicht nachvollzogen werden und wurde daher selbst berechnet

Neben- oder Abfallströme wie Melasse oder Dünnschlempe hingegen wurden bereits aufbereitet und können in der Regel entweder direkt oder nach minimaler Vorbehandlung eingesetzt werden. Dünnschlempe, die hauptsächlich Glycerin und sonstige (Poly-)Saccharide enthält, ist ein Hauptnebenprodukt des Trockenmahlprozesses zur Ethanolherstellung und kann das 15-fache des produzierten Ethanolvolumens betragen, was sie zu einem kostengünstigen Abfallsubstrat macht (Kim et al., 2010; Reis et al., 2017). Bei Verwendung von Dünnschlempe betrug die höchste erhaltene L-Äpfelsäurekonzentration 16,9 g/L mit einer Ausbeute von 0,79 g/g (West, 2011; West, 2017). Diese Ergebnisse wurden mit einem Batch-Prozess in 125 mL-Schüttelkolben erzielt. Möglicherweise könnten noch höhere L-Äpfelsäurekonzentrationen in der kontrollierten Umgebung eines Bioreaktors zu erzielt werden. Höhere L-Äpfelsäure-Titer wurden mit Melasse gewonnen, einem Nebenprodukt der Zuckerindustrie, das hauptsächlich Zucker, Proteine, Spurenelemente und Vitamine enthält. Die weltweite Produktion beträgt rund 50 Millionen Tonnen und macht es zu einem leicht verfügbaren Substrat (Nikodinovic-Runic et al., 2013). Aufgrund des Vorhandenseins von Proteinen in der

Melasse ist es möglich, Fermentationen ohne Zusatz von zusätzlichen Stickstoffquellen durchzuführen, was die Kosten für die Fermentation senkt (Cheng et al. 2017). Unter Verwendung von Melasse wurden L-Äpfelsäurekonzentrationen (nach Hydrolyse von PMA) zwischen 71,9 g/L und 109,7 g/L und Ausbeuten zwischen 0,28 g/g und 0,69 g/g in 5 L-Bioreaktor-Fermentationen berichtet (Xia et al., 2016; Cheng et al., 2017; Feng et al., 2018). Die Kosten für Melasse belaufen sich auf ca. 36 \$/t, was sie wegen nicht benötigter Vorbehandlung zu einer kostengünstigeren Ressource als Maisstroh macht (Gnansounou et al. 2015).

Xylose-Mutterlauge (WXML) wurde ebenfalls ohne Vorbehandlung erfolgreich für die L-Äpfelsäureproduktion eingesetzt. WXML ist ein Abfallstrom aus der Xylit-Herstellung basierend auf Lignocellulose. Mit WXML als Substrat konnte eine L-Äpfelsäurekonzentration von ca. 66 g/L mit einer korrespondierenden Ausbeute von 0,77 g/g erzielt werden, was durchaus mit Glucose vergleichbar ist (Feng et al., 2019). Rohglycerin bildet einen weiteren Abfallstrom, der direkt ohne Vorbehandlung als Substrat zur Herstellung von L-Äpfelsäure getestet wurde. In der Biodieselproduktion fällt Rohglycerin zu etwa 10 % (w/w) der produzierten Menge an Biodiesel an (Yang et al., 2012). Aufgrund der enthaltenen Verunreinigungen wie Methanol, Detergenzien, Fettsäuren, Fettsäuremethylester und anorganische Salze ist Rohglycerin nicht für Prozesse geeignet, die hochreine Rohstoffe erfordern, wie beispielsweise pharmazeutische Produkte (Samul et al., 2014). Mit einer weltweit steigenden Biodiesel-Produktion ist der Markt für Rohglycerin übersättigt und liefert damit einen kostengünstigen Rohstoff (Yang et al., 2012). Der Preis für Rohglycerin aus der Biodieselproduktion wurde mit rund 44 US \$/t angegeben (Quispe et al., 2013). Wie in Tabelle 4 zu sehen ist, konnten mit Rohglycerin L-Malat-Titer zwischen 16,5 und 118 g/L und Ausbeuten zwischen 0,17 und 0,86 g/g erzielt werden. Vergleicht man diese Ergebnisse mit Experimenten mit reinem Glycerin, so zeigt sich, dass noch höhere Titer möglich sind. Die höchste jemals publizierte L-Malatkonzentration von 195 g/L stammt aus einem Prozess mit reinem Glycerin als Substrat und erzielte eine Produktivität von 0,74 g/(l*h) (Zambanini et al., 2016b).

Trotz vieler Vorteile sind lignocellulose-basierte Substrate und industrielle Abfallströme oft schwierig in der Anwendung. Zu den Herausforderungen zählen Verunreinigungen, die Heterogenität des Ausgangsmaterials und die Verfügbarkeit

der Rohstoffe. Verunreinigungen wie 5-Hydroxymethylfurfural (HMF), das häufig in Lignocellulose-Hydrolysaten (Dörsam et al., 2017) vorkommt, oder hohe Salzkonzentrationen und Methanol, die häufige Verunreinigungen von Rohglycerin darstellen (Samul et al., 2014). Diese können für Mikroorganismen giftig sein und Wachstum und Produktbildung hemmen. Um dieses Problem zu lösen, könnte entweder nach besonders robusten Produzentenstämmen gescreent werden, oder bereits vorhandene Produzentenstämmen könnten durch gezieltes Metabolic Engineering, Mutagenese oder adaptive Evolution angepasst werden. Im Falle von Rohglycerin zum Beispiel wurde dies für *Aspergillus niger* erfolgreich durchgeführt, was zu einem Stamm mit einer höheren Produktivität auf Rohglycerin als auf Reinglycerin führte (Iyyappan et al., 2018). Manche Verunreinigungen können sich aber auch positiv auf die Malatproduktion auswirken (Dörsam et al., 2016). Eine weitere mögliche Herausforderung ist die Heterogenität des Ausgangsmaterials. Beim Rohglycerin kann der Glyceringehalt zwischen etwa 20 % und fast 100 % liegen, ebenso kann auch die Konzentration der Verunreinigungen variieren (Hansen et al., 2009; Hu et al., 2012). Dies ist auf die unterschiedliche Art der Rohstoffe, aus denen der Biodiesel gewonnen wird und den Kultur- und Umweltbedingungen während des Rohstoffwachstums zurückzuführen. Die lokale Verfügbarkeit des Rohmaterials beeinflusst zudem stark die Produktkosten, da insbesondere bei kostengünstigen Substraten der Transport über lange Strecken die Rohstoffpreise stark erhöhen kann. Für den Transport von Hackschnitzeln im Mittleren Westen der USA beispielsweise betragen die Transportkosten für eine Entfernung von 400 km etwa 30 \$/t, wohingegen für eine Entfernung von 100 km nur etwa 7 \$/t anfallen (Gonzales et al., 2013). Somit kann sich der Preis des oben genannten Maisstrohs leicht verdoppeln. Daher muss bei der mikrobiellen L-Malat-Produktion auf Basis kostengünstiger Substrate der Abstand zwischen dem Produktionsstandort des Ausgangsmaterials und der Produktionsanlage möglichst gering gehalten werden. Ebenso sollten Stämme eingesetzt werden, die mit unterschiedlichen Substraten ähnliche Produkttiter produzieren können, so dass der Prozess flexibel an das lokale Substratangebot angepasst werden kann. Es lohnt sich auf jeden Fall, den Produktionsstamm hinsichtlich seines Substratspektrums zu charakterisieren, um geeignete Abfallströme identifizieren zu können.

Unter diesen Gesichtspunkten wäre das ideale Substrat für die mikrobielle L-Äpfelsäureproduktion ein kostengünstiger Abfallstrom auf Basis nachwachsender Rohstoffe, der (I) so vorliegt, dass eine Vorbehandlung einfach oder sogar überflüssig wird und (II) an verschiedenen Standorten in hohen Mengen erzeugt wird, wodurch Produktionsstätten für L-Äpfelsäure in der Nähe der Rohstoffherzeugung möglich werden. Von den hier genannten Substraten stellen Melasse und Rohglycerin solche Abfallströme dar, da sie leicht verfügbar sind und ohne Vorbehandlung direkt verwendet werden können. Mit etwa 36 \$/t für Melasse und 44 \$/t für Rohglycerin betragen die Kosten beider Abfallströme nur etwa 10 % einer Tonne Glucose. Mit den höchsten Ausbeuten für das jeweilige Substrat sind die für die Herstellung von einer Tonne L-Äpfelsäure erforderlichen Substratkosten in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Theoretische Substratkosten, die für die biotechnologische Herstellung von einer Tonne L-Äpfelsäure benötigt werden. Zugrunde gelegt wurde die für dieses Substrat am höchsten publizierte Ausbeute.

Substrat	Preis (\$/t)	Ausbeute (g/g)	Berechnete Substratkosten für eine Tonne Malat (\$)
Glucose	390 (Lamers 2016)	1,11 Knuf et al., 2014	351
Rohglycerin	44 (Quispe et al. 2013)	0,26 (Zambanini et al., 2016a)	169
Melasse	36 (Gnansounou et al. 2015)	0,69 (Cheng et al., 2017)	52

Selbst bei niedrigeren Titern und Ausbeuten als bei der Verwendung von Glucose sind sowohl Rohglycerin als auch Melasse billigere Substrate, wobei der berechnete Preis für die L-Malatproduktion mit Rohglycerin etwa die Hälfte und mit Melasse etwa ein Siebtel in Relation zur Produktion mit Glucose beträgt. Im Rahmen einer integrierten Bioökonomie könnten diese Abfallströme direkt am Produktionsstandort genutzt werden und sind damit nahezu kostenneutral.

Die Vielfalt der natürlichen L-Malat- und PMA-Produzenten und die Verfügbarkeit gentechnischer Methoden ermöglicht die Entwicklung vielseitiger Prozesse, die an verschiedene alternative Substrate angepasst werden können.

2.3.2 Stickstoffquellen und C:N-Verhältnis

Die natürlichen L-Malat-Produzenten bilden L-Malat in der stationären Wachstumsphase bei einem hohen C:N-Verhältnis als Reaktion auf einen Stickstoffmangel (Peleg et al., 1988; Battat et al., 1990). Dabei beeinflusst das C:N-Verhältnis nicht nur die L-Malatproduktion, sondern auch die Bildung von Nebenprodukten (Ding et al., 2011; Ochsenreither et al., 2014; Wang Y. et al., 2016). Auf transkriptioneller Ebene wird in *A. oryzae* in Reaktion auf den Stickstoffmangel die Expression der am oxidativen TCA-Zyklus beteiligten Gene herunterreguliert, während die Expression der meisten glykolytischen Gene und aller Gene, die am cytosolischen reduktiven TCA-Zweig von Pyruvat über Oxalacetat zu L-Malat beteiligt sind, stark hochreguliert wird. Die Analyse der Promotoren und 5'-UTRs der hochregulierten Gene, einschließlich des Pyruvatcarboxylase-Gens, identifizierte ein konserviertes Sequenzmotiv (CCCCTC), das als Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Msn2/4 aus *S. cerevisiae* bekannt ist. Msn2/4 ist in *S. cerevisiae* an der Multistress-Antwort, einschließlich Stickstoffmangel, beteiligt und gilt als Schlüsselfaktor der allgemeinen Stressreaktion (Knuf et al., 2013).

Für die L-Malat- und PMA-Produktion werden verschiedene organische und anorganische Stickstoffquellen eingesetzt (siehe auch Tabelle 1 und 2). Es fällt auf, dass in Studien mit den höchsten L-Malat-Titern komplexe organische Stickstoffquellen wie Pepton oder Trypton eingesetzt wurden (Brown et al., 2013; Knuf et al., 2014; Liu et al., 2017; Ding et al. 2018). Im Vergleich zu anorganischen Stickstoffquellen, wie $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, scheinen Trypton und Pepton besser assimilierbar zu sein. Durch ungerichtete Mutagenese konnten Ding et al. (2018) die Aufnahme von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ deutlich erhöhen. Infolgedessen konnte auch die Glucoseaufnahme und die L-Malatproduktion gesteigert werden und war nun höher als mit Trypton im Wildtyp (Ding et al., 2018). Wirtschaftlich betrachtet sind anorganische Stickstoffquellen klar zu bevorzugen, da sie kostengünstig und definiert in ihrer Zusammensetzung sind, während Trypton und Pepton in ihrer Zusammensetzung variieren und vergleichsweise teurer sind.

Wie bereits erwähnt, beeinflusst nicht nur die Stickstoffquelle, sondern auch das C:N-Verhältnis die Produktion organischer Säuren. Trotzdem kann aus den Studien, die sich mit dem Thema befassen, keine allgemeine Aussage über das optimale C:N-Verhältnis getroffen werden, da in manchen Fällen die Aussagen widersprüchlich

sind. Dies kann mehrere Gründe haben: (I) Das optimale C:N-Verhältnis ist stamm-spezifisch und muss für jeden Stamm individuell bestimmt werden und/oder hängt von der Kohlenstoffquelle ab. In diesem Zusammenhang muss nochmals betont werden, dass die Vergleichbarkeit der einzelnen Studien eher schlecht ist, weil sich z.B. die Medienzusammensetzung unterscheidet. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass je nach Stickstoffquelle ein anderes C:N-Verhältnis optimal ist. (II) Das C:N-Verhältnis kann variiert werden, indem entweder die Konzentration der Kohlenstoffquelle oder die Stickstoffkonzentration konstant gehalten wird. Hohe Kohlenstoffkonzentrationen können zu osmotischem Stress führen, während höhere Stickstoffkonzentrationen zwar prinzipiell zu mehr Biomasse führen, die wiederum mehr Produkt bilden könnte. Wird jedoch zu viel Stickstoff zugegeben, tritt eine Stickstofflimitierung erst später oder möglicherweise auch gar nicht ein und die Bildung von L-Äpfelsäure könnte reduziert oder verhindert werden. Deshalb sollte nicht nur das reine C:N-Verhältnis betrachtet werden, sondern auch die Kohlenstoff- und Stickstoffkonzentrationen. In der Literatur wurden für Wildtypen C:N-Verhältnisse zwischen 50:1 und 300:1 untersucht. In den Arbeiten von Ding et al. (2011) für Fumarsäure und Ochsenreither et al. (2014) für L-Äpfelsäure wurden die höchsten Produktkonzentrationen mit den niedrigsten Stickstoffkonzentrationen erzielt. Diese Ergebnisse können vermutlich nicht auf genetisch modifizierte Stämme übertragen werden, da dort die natürliche Regulation der am reduktiven TCA-Zweig beteiligten Gene ausgehebelt ist. Eine richtige systematische Studie zu dem Thema, die die oben genannten Punkte aufgreift, fehlt allerdings noch für die natürlichen L-Malatproduzenten. In Studien, die sich mit der Produktion von PMA beschäftigen, werden für eine gegebene Kohlenstoffquelle oft deren optimale Konzentration, die optimale Stickstoffquelle und oft auch das beste C:N-Verhältnis ermittelt (z.B. Wang et al., 2015; Zou et al., 2016; Wang Y. et al., 2016; Xia et al., 2017b). Aber auch hier können die Ergebnisse unter den einzelnen Studien schlecht verglichen werden, da unterschiedliche Prozessmodi verwendet werden. Zudem ist an der L-Malat-Bildung für die PMA-Produktion der oxidative TCA-Zyklus signifikant beteiligt. In *A. pullulans* CCTCC M2012223 werden deshalb im Gegensatz zu *A. oryzae* die Gene des oxidativen TCA-Zyklus unter Stickstofflimitierung hochreguliert. Infolgedessen wird unter Stickstofflimitierung mehr ATP produziert, wahrscheinlich um den erhöhten

ATP-Bedarf für die Polymerisation der L-Malat-Untereinheiten zu PMA zu decken (Wang Y. et al., 2016).

2.3.3 pH-Kontrolle

Die Kontrolle des pHs bei der biotechnologischen Produktion organischer Säuren ist zwingend notwendig, da der anfängliche pH von 6-7 nach Einsetzen der Produktion schnell auf einen pH unter 2 sinken kann, was eine Inhibition von Wachstum und Säureproduktion zur Folge hat (Roa Engel, 2010; Xu Q. et al., 2012). Für die Kontrolle des pHs wird häufig CaCO_3 (Kalk) eingesetzt, da es einige Vorteile bietet: (I) CaCO_3 ist unlöslich in Wasser und wird daher als Feststoff vorgelegt. Mit steigender Säurekonzentration löst es sich in Abhängigkeit der Säurekonzentration und puffert in einem pH-Bereich von 6-6,5. Dies ist insbesondere für Schüttelkolbenexperimente vorteilhaft und ermöglicht einen hohen Durchsatz. Zusätzlich ist CaCO_3 sehr kostengünstig (Salek et al., 2015). (II) Die organischen Säuren liegen in der Kulturbrühe als Ca-Salze vor. Die Löslichkeit von Ca-L-Malat liegt bei nur 12,2 g/L und ist damit weit weniger löslich als die freie Säure (>500 g/L) (López-Garzón und Straathof, 2014). Ein Großteil des produzierten L-Malats präzipitiert somit als Ca-L-Malat und könnte die Aufarbeitung erleichtern. Zusätzlich könnte eine mögliche Produktinhibierung, wie sie für Fumarsäure beschrieben ist (Rhodes et al., 1962; Yang et al., 2011), umgangen werden und höhere Titer wären möglich. (III) CaCO_3 dient als CO_2 -Lieferant für die Carboxylierungsreaktion von Pyruvat zu Oxalacetat. Zelle et al. (2010) konnten zeigen, dass die Begasung mit CO_2 -angereicherter Luft die L-Malat-Produktion positiv beeinflusst. Es ist daher nicht verwunderlich, dass CaCO_3 als das effektivste Neutralisationsagens für die Fumarat- und Milchsäureproduktion mit *R. oryzae/delemar* (Zhou et al., 2002; Yen et al., 2010; Zhou et al., 2011) und die PMA-Produktion mit *A. pullulans*-Stämmen (Chi et al., 2016) beschrieben ist und deshalb bevorzugt eingesetzt wird. Für die L-Malat-Produktion mit *A. oryzae* wurde bisher noch keine systematische Studie zum Einfluss verschiedener Neutralisationsagenzien durchgeführt, dennoch ist es auch hier das meist verwendete Neutralisationsagens. Geyer et al. (2018) konnten zeigen, dass hohe CaCO_3 -Konzentrationen (80 und 120 g/L) die L-Malatproduktion signifikant bis zu 400 % gegenüber dem Einsatz von 20 g/L CaCO_3 erhöht und infolgedessen auch

der Glucoseverbrauch gesteigert wurde. Sie stellten die Hypothese auf, dass eine effiziente L-Malat-Produktion durch eine ausreichende pH-Kontrolle sowie die Verfügbarkeit von CO₂ ermöglicht wird. In dem Experiment konnte nur durch den Einsatz von 120 g/L CaCO₃ der pH-Wert auf über 6 gehalten werden, der als optimal für die L-Malat-Bildung mit *A. oryzae* gilt (Knuf et al., 2013). Dies illustriert auch den ersten von weiteren Nachteilen des Einsatzes von CaCO₃: (I) Die pH-Kontrolle mit dem Feststoff CaCO₃ ist nicht steuerbar und nicht sehr effektiv, da es im Überschuss zugegeben werden muss und nicht nach Bedarf zugepumpt werden kann. Das Lösen von CaCO₃ ist eine kinetisch kontrollierte Gleichgewichtsreaktion und der pH-Wert variiert daher während der Fermentation (Salek et al., 2015; Geyer et al., 2018). (II) Der Einsatz von CaCO₃ erhöht die Viskosität der Kulturbrühe, was zu Durchmischungsproblemen und Massentransferlimitierungen führen könnte (Xu Q. et al., 2012). (III) Filamentöse Pilze könnten mit den Feststoffen, CaCO₃ und Ca-Salzen der organischen Säuren, interagieren, sodass die Morphologie beeinflusst werden könnte (Xu Q. et al., 2012). Für *R. oryzae/deleamar* konnte ein klarer Zusammenhang zwischen Morphologie und Fumarsäureproduktion gezeigt werden (Zhou et al., 2011; Das und Brar, 2014; Zhang K. et al., 2015). Mittlerweile gibt es ebenfalls erste Belege dafür, dass dies auch für die L-Malatproduktion mit *A. oryzae* zutreffen könnte (Chen et al., 2019). In jedem Fall wird die Abtrennung des Myzels erschwert und verhindert eine Wiederverwendung. (IV) Die Rücklösung des Ca-Salzes bei der Aufarbeitung der organischen Säuren erfordert große Mengen an mineralischen Säuren, wie z. B. Schwefelsäure oder Salzsäure, und erzeugt umweltbelastende Abfälle, wie CaSO₄ (Gips) oder CaCl₂, die entsorgt werden müssen und so den Prozess verteuern. All diese Gründe sprechen dafür, andere Neutralisationsagenczien für den Prozess einzusetzen. Trotz schlechterer Titer wurden Natriumsalze, wie NaHCO₃ oder Ammoniumsalze (wenn eine Phosphatlimitation für die Induktion der Säureproduktion genutzt wird), als Ersatz für CaCO₃ für die Fumarsäureproduktion mit *R. oryzae/deleamar* vorgeschlagen, da die entstehenden Fumarat-Salze, Ammoniumfumarat bzw. Natriumfumarat, sogar löslicher sind als freie Fumarsäure. Nach einer Aufkonzentrierung könnte die Fermentationsbrühe direkt zu Aspartat oder L-Malat weiterverarbeitet werden. Darüber hinaus könnten das Myzel in einen erneuten Prozess wiederverwendet oder als Tierfutter bzw. zur Chitosan/Chitin-Extraktion verkauft werden, so wie es bei der Citratproduktion mit *A. niger* üblich ist.

Diese zusätzlichen Einnahmequellen könnten einen niedrigeren Produkttiter ausgleichen (Gangl et al., 1990; Xu Q. et al., 2012). Dies könnte auch auf die L-Malatproduktion übertragen werden, da Na- L-Malat in großen Mengen löslich ist.

Um den Verbrauch an Base und nachgeschaltet den Verbrauch mineralischer Säuren für die Rücklösung der Fumaratsalze bei der Aufarbeitung zu verringern, wurde versucht, die Fermentation bei niedrigeren pH-Werten durchzuführen, aber der Fumarat-Titer sank stark, während die Nebenproduktbildung zunahm (Roa Engel, 2010; Roa Engel et al., 2011). Die vielleicht eleganteste Lösung, um diese Probleme zu umgehen, besteht in der *in situ*-Produktabtrennung. Für die Fumarat-Produktion wurden zwei Studien dazu veröffentlicht. Cao et al. (1996) konstruierten einen rotierenden Biofilm-Reaktor, bei dem das Pilzmyzel auf Scheiben immobilisiert vorlag. Durch Rotation der Scheiben wurde das Myzel abwechselnd in das Kulturmedium getaucht oder in der Gasphase exponiert. Die gebildete Fumarsäure wurde gleichzeitig und kontinuierlich über eine gekoppelte Adsorptionssäule aus dem Medium entfernt. Dieses System verringerte die Produkthemmung, und die Produktivität wurde signifikant auf 4,25 g/(l*h) bei einer Gesamtfermentationszeit von 24 h erhöht. Die Fumarsäure wurde aus der PVP-gepackten Adsorptionskolonne mit NaOH als Elutionsmittel gewonnen. Zhang und Yang (2015) nutzten denselben Ionenaustauscher, simplifizierten aber den Prozess, indem die Adsorptionssäule an einen einfachen Rührkessel-Bioreaktor gekoppelt wurde. Als Ergebnis konnten Ausbeute und Produktivität um 25 % bzw. 59 % gegenüber dem Prozess ohne Produktabtrennung gesteigert werden. Für die L-Malat-Produktion ist der Einfluss des pH-Wertes auf die Produkt- und Nebenproduktbildung bisher nicht untersucht worden. Ebenfalls wurden noch keine Studien veröffentlicht, die sich mit einer *in situ*-Produktabtrennung beschäftigt haben.

2.3.4 Prozessmodus

Biotechnologische Prozesse im Allgemeinen können submers als Batch-, Fed-Batch, repeated Batch oder kontinuierlich oder zusätzlich mit festen Substraten im Festbett betrieben werden. Batch-Prozesse sind am einfachsten realisierbar und können im Schüttelkolben leicht durchgeführt werden. Fed-Batch-Prozesse eignen sich, wenn die Kohlenstoffquelle nicht in hohen Konzentrationen vorgelegt werden kann oder

sollte, weil z.B. das Substrat wie im Falle von Glycerin sehr viskos ist und deshalb die Prozessführung erschwert, bei komplexen (Abfall-)Substraten Inhibitoren vorliegen, die nur bis zu einer bestimmten Konzentration toleriert und abgebaut werden können, oder eine Substratinhibition vorliegt bzw. die Produktbildungsrate ab einer gewissen Substratkonzentration sinkt. Weiterhin kann durch einen Fed-Batch eine Kohlenstofflimitierung verhindert bzw. die Kohlenstoffkonzentration oberhalb eines kritischen Wertes gehalten werden, ab der die Produktion verringert würde oder abbricht. Liegt hingegen eine Produktinhibition vor, könnte ein Repeated-Batch-Prozess vorteilhaft sein, da die Produktkonzentration durch den Austausch des Mediums niedrig gehalten wird und das Myzel aktiv bleibt. Auf diese Weise könnte die Produktionsphase stark verlängert werden.

In Bezug auf Tabelle 1 fällt auf, dass für die L-Malatproduktion mit den natürlichen Produzenten zum Großteil Batch-Prozesse und nur vereinzelt Fed-Batch-Prozesse verwendet wurden. Wie bereits erwähnt, gibt es noch keine Studien, die systematisch den Zusammenhang zwischen Kohlenstoffkonzentration und Produktivität bzw. die optimale/maximale Kohlenstoffkonzentration und das beste C:N-Verhältnis untersucht haben. Somit fehlen die Grundlagen für die Auslegung anderer Prozessmodi in Alternative zum Batch-Prozess. Ein Fed-Batch-Prozess wurde für die Malatproduktion mit *U. trichophora* unter Verwendung von großen Mengen Glycerin durchgeführt (Zambanini et al., 2016b). Der Grund hierfür wird die hohe Viskosität des Substrates sein. Liu J. et al. (2017) verwendeten einen automatisierten Fed-Batch-Prozess für den genetisch modifizierten *A. oryzae* Hochleistungsstamm, um die Glucosekonzentration oberhalb von 10 g/L zu halten. Eine rationale Begründung für diese Konzentration wird allerdings nicht genannt. Es ist durchaus wahrscheinlich, dass für L-Malat ebenfalls, wie für Fumarat beschrieben, eine Produktinhibition vorliegen könnte. Die Entwicklung eines Repeated-Batch-Prozess wäre daher interessant, um mehr über die natürliche Produktbildung zu lernen. Allerdings sind Repeated-Batch-Prozesse mit filamentösen Pilzen ohne Zellrückhaltung, z.B. durch Immobilisierung schwierig, insbesondere wenn CaCO_3 als Neutralisationsagens verwendet wird.

Im Gegensatz dazu wurden für die PMA-Produktion mit *Aureobasidium*-Spezies alle Prozessarten getestet und evaluiert (siehe Tabelle 2). Die Batch-Fermentation wird in

den Studien meist nur anfänglich für eine erste Charakterisierung der Stämme und für die Ermittlung optimaler Parameter in Schüttelkolbenexperimenten verwendet. Fast durchgängig erwiesen sich Fed-Batch- und insbesondere Repeated-Batch-Prozesse als vorteilhafter bezüglich Titer, Ausbeute und Produktivität. Daher sollten auch für die L-Malat-Produktion andere Prozessmodi in Erwägung gezogen werden.

2.4 Aufarbeitung organischer Säuren

Der Hauptteil der Prozesskosten entsteht bei der biotechnologischen Produktion von organischen Säuren zwar durch das Substrat und die Fermentation, dennoch macht auch die Aufarbeitung ca. 30-40% der Kosten aus (Straathof, 2011). Daher ist die Entwicklung eines effizienten und wettbewerbsfähigen Aufarbeitungsprozesses entscheidend, um eine biobasierte Produktion von L-Malat zu ermöglichen. Dies beinhaltet eine ausreichend hohe Reinheit gemäß den Anforderungen nachgeschalteter Prozesse, hohe Gesamt-Ausbeuten des Aufarbeitungsprozesses (90-100%), sowie minimaler Einsatz von Chemikalien und Energie (López-Garzón und Straathof, 2014).

Das allgemeine Arbeitsschema (Abbildung 13) umfasst im ersten Schritt die Abtrennung der Biomasse, Gewinnung des Produktes aus der Kulturbrühe bei gleichzeitiger Abtrennung der meisten Verunreinigungen, falls notwendig die Rücküberführung des Salzes in die freie Säure und schließlich die Aufkonzentrierung des Produktes und Entfernung verbliebener Verunreinigungen (López-Garzón und Straathof, 2014).

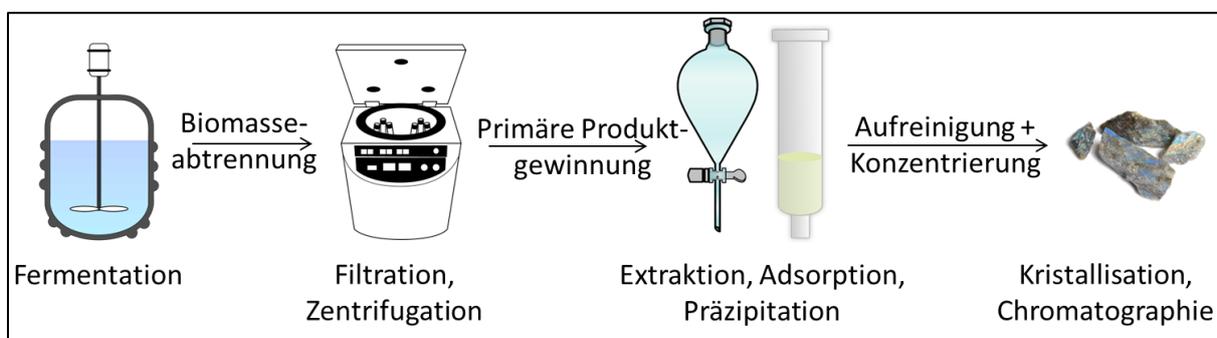


Abbildung 13: Allgemeines Arbeitsschema zur Aufreinigung von organischen Säuren

Organische Säuren können prinzipiell z.B. als Ca-Salze ausgefällt werden. Dies wird standardmäßig bei der primären Aufreinigung von Citronensäure genutzt. Durch den niedrigen pH-Wert am Ende der Fermentation liegt Citronensäure als freie Säure vor. Durch Zugabe von Ca(OH)_2 oder CaCO_3 fällt ein Großteil als Ca-Citrat aus, da die Löslichkeit von Ca-Citrat nur 0,96 g/L beträgt (López-Garzón und Straathof, 2014). Wie oben beschrieben wird CaCO_3 für die L-Äpfelsäureproduktion im kleinen Maßstab am Anfang der Kultivierung vorgelegt, daher fällt Ca- L-Malat direkt während der Produktionsphase aus. Jedoch liegt die Löslichkeit von Ca-Malat bei etwa 12,2 g/L, was zu einem erheblichen Produktverlust führt (López-Garzón und Straathof, 2014). Dazu kommt die Bildung von Gips als Abfallstoff bei der Überführung des Salzes in die freie Säure. Im Zuge der Citronensäureherstellung werden große Mengen an Gips produziert, von dem nur ein Teil industriell weiterverwertet wird, was zu zusätzlichen Kosten durch die Abfallentsorgung führt. In Anbetracht der mit der Calciummalatfällung verbundenen Abfallproduktion und des Produktverlustes ist diese Methode somit keine Option für groß angelegte Downstream-Prozesse.

Alternativ könnte L-Äpfelsäure bzw. das L-Malat-Salz aus der Kulturbrühe extrahiert werden. Extraktion ist die am besten untersuchte Methode für die primäre Gewinnung von Carbonsäuren. Je nach Mechanismus können Carbonsäuren durch Solvatisierung mit aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen, kohlenstoffgebundenen sauerstoffhaltigen Extraktionsmitteln, phosphorgebundenen sauerstoffhaltigen Extraktionsmitteln und über mehrere Wechselwirkungen mit aminbasierten Verbindungen extrahiert werden (Kertes und King, 1986; Eyal und Canari, 1995; López-Garzón und Straathof, 2014). Der Begriff "reaktive Extraktion" beschreibt Extraktionsvorgänge, bei denen entweder ein Assoziationskomplex oder eine chemische Bindung zwischen der gelösten Substanz und dem Extraktionsmittel intermolekular bzw. durch chemische Wechselwirkungen gebildet wird (López-Garzón und Straathof 2014). Im Falle von L-Äpfelsäure gibt es einige Beispiele für „reaktive Extraktionen“ mit langkettigen tertiären Aminen (z.B. Triisooctylamin in Kombination mit Heptanol/Hexanol, Malmay et al., 1998) und quartärnären Ammoniumsalzen (z.B. Trioctyl-methyl-ammoniumchlorid in Kombination mit Isoamylalkohol, Uslu und Kirbaşlar, 2009). Hier wird die Fähigkeit von Aminen oder Ammoniumsalzen genutzt, mit der undissoziierten Dicarbonsäure Wasserstoffbrücken-Bindungen zu bilden, wenn der pH-Wert unter dem pK_a -Wert der

Säure liegt, sodass die hydrophile Säure in das hydrophobe Lösungsmittel übergeht (Canari und Eyal 2003; Gorden et al. 2015). Isoamylalkohol ist zudem ein grünes Lösungsmittel, das aus nachwachsenden Rohstoffen in mikrobiellen oder enzymatischen Prozessen hergestellt werden kann (Picataggio et al. 2009; Anissimova und Allard 2016). Optimalerweise sollte das Lösungsmittelsystem wiederverwendet werden können, um Abfallentstehung zu minimieren und Kosten zu reduzieren. Eine „Reaktive Extraktion“ kann auch während der Fermentation eingesetzt werden, um die produzierten organischen Säuren *in situ* zu entfernen (Yang et al., 2007). Wie bereits oben erwähnt, hätte das den Vorteil, Produktinhibition zu vermeiden und den Einsatz von Base für die pH-Kontrolle zu minimieren. Das Entfernen der freien organischen Säure aus der Kulturbrühe erhöht den pH und kann deshalb für die pH-Kontrolle eingesetzt werden, wenn das System entsprechend gut ausgelegt wird (López-Garzón und Straathof, 2014).

Nach der primären Aufreinigung zur groben Entfernung von Unreinheiten muss das Produkt aufkonzentriert und weiter gereinigt werden. Für organische Säuren wird für diesen Schritt oft Kristallisation verwendet. Dafür kann allerdings eine weitere Voraufreinigung notwendig sein. Insbesondere bei der Produktion organischer Säuren mit Wildtyp-Stämmen werden häufig viele Nebenprodukte, i.d.R. andere organische Säuren, in relativ geringen Konzentrationen gebildet, die aus eng verwandeten Stoffwechselwegen stammen, sodass deren Bildung auch durch Prozessoptimierung meistens nicht vermieden werden kann. Im Falle der L-Malatbildung mit *A. oryzae* sind das z.B. Succinat, Fumarat, α -Ketoglutarat und Citrat, die aus dem reduktiven und oxidativen Citratzyklus stammen (Geyer et al., 2018, eigene Arbeiten). In solchen Fällen eignen sich adsorptive Chromatographieverfahren als Polierschritt am besten. Bei Prozessen im sehr großen Maßstab kann dies kontinuierlich im Gegenstrom z.B. als „Simulated Moving Bed“ (SMB)-Prozess erfolgen (López-Garzón und Straathof, 2014).

L-Malat lässt sich nur schwer aus wässrigen Lösungen auskristallisieren, da es eine sehr hohe Wasserlöslichkeit aufweist. Aufkonzentrierung durch Wasserentzug, z.B. durch Evaporation, kühlen und/oder das Anlegen eines Vakuums führen zu Übersaturierung, so dass sich Kristalle ausbilden können (Sumikawa et al., 1976; Yang et al., 2018b). Im Zuge des Aufkonzentrierungsprozesses können bedingt auch

verbliebene Verunreinigungen wie z.B. Fumarsäure entfernt werden, da diese eine geringere Löslichkeit aufweisen und daher früher auskristallisieren (Sumikawa et al., 1976).

Im Gegensatz zum aufwendigen Downstream-Processing zur Gewinnung von L-Äpfelsäure gestaltet sich die Aufreinigung von PMA zumindest im kleinen Maßstab einfacher. PMA wird als Ca-Salz durch fraktionierte Fällung mit Ethanol, Aceton oder Methanol von den übrigen Exopolysacchariden, wie z.B. Pullulan, die typischerweise ebenfalls von *Aureobasidium sp.* gebildet werden, getrennt. Pullulan präzipitiert bei niedrigeren Lösungsmittelkonzentrationen und kann durch Filtration abgetrennt werden. Durch Erhöhung der Lösungsmittelkonzentration kann PMA bei 4°C ebenfalls ausgefällt werden. Nach Filtration werden Lösungsmittelrückstände durch Evaporation entfernt (Liu und Steinbüchel, 1996; Zhang H. et al., 2011; Manitchotpisit et al., 2012). PMA kann als Polymer erhalten bleiben oder durch saure Hydrolyse in L-Äpfelsäure überführt werden.

2.5 Fazit und eigener Forschungsbeitrag

L-Äpfelsäure ist eine interessante Plattformchemikalie mit bereits etablierten und vielen weiteren möglichen Anwendungsfeldern. Biobasierte L-Äpfelsäure kann daher direkt in bestehende Wertschöpfungsketten integriert werden und hat das Potential kommerziell genauso erfolgreich zu werden wie Citronensäure. Bezüglich der möglichen zukünftigen Anwendungen erweitert PMA das Portfolio an neuartigen biologisch abbaubaren Polymeren. In den letzten Jahren wurde die Forschung an Universitäten und von Biotech-Firmen, wie z.B. BRAIN und Novozymes, intensiviert, um eine wettbewerbsfähige biobasierte Produktion zu ermöglichen. Bei der Stammentwicklung und Medienoptimierung wurden viele Fortschritte erzielt. Veröffentlichte Daten über Titer, Ausbeute und Produktivität rücken immer näher an industriell relevante Produktionsstämme anderer organischer Säuren heran. Die Erforschung und Bewertung von erneuerbaren Substraten aus Biomasse oder industriellen Nebenströmen ist meiner Meinung nach ein Schlüsselaspekt für die Entwicklung wettbewerbsfähiger Prozesse, da die Substratkosten den Großteil der Prozesskosten ausmachen. Rohglycerin und Melasse scheinen in dieser Hinsicht sehr vielversprechend zu sein. Allerdings ist Literatur über Scale-up und

Downstream-Prozess nach wie vor knapp. Besonders nachgeschaltete Prozesse könnten aufgrund der hohen Löslichkeit von L-Äpfelsäure eine Herausforderung darstellen und Aufarbeitungs-Strategien müssen bei der Verwendung von ungereinigten industriellen Nebenströmen eventuell neu bewertet werden.

Die eigene Forschung beschäftigt sich im Rahmen von zwei BMBF- und einem DFG-Projekt mit der L-Äpfelsäure-Produktion mit *A. oryzae*. Wie im Abschnitt 2.2 gezeigt, kann L-Äpfelsäure natürlicherweise und/oder rekombinant mit vielen unterschiedlichen Mikroorganismen produziert werden. *A. oryzae* bietet aber mehrere Vorteile: (I) In der asiatischen Lebensmittelindustrie wird dieser Pilz bereits seit Jahrhunderten für die Erzeugung von Miso, Sojasauce und Sake eingesetzt. *A. oryzae* hält daher den GRAS-Status, was eine Zulassung für L-Äpfelsäure im Lebensmittelbereich, die mit *A. oryzae* produziert wird, unkomplizierter machen dürfte. (II) Die natürliche L-Malat-Produktionsleistung von *A. oryzae* ist bereits hoch und bietet daher die ideale Grundlage für Prozessoptimierung, ohne das vorher Stoffwechselwege implementiert werden müssten. Gerade für die Anwendung der L-Äpfelsäure im Lebensmittelbereich ist die Produktion mit Wildtypen erwünscht, da die Akzeptanz der Bevölkerung für gentechnisch modifizierte Organismen gering ist. (III) *A. oryzae* zeichnet sich durch eine hohe Flexibilität bezüglich verwertbarer Kohlenstoffquellen (zahlreiche Mono- und Disaccharide sowie Gemische daraus, Glycerin, Acetat etc., Dörsam et al., 2017), als auch durch erhöhte Toleranz gegenüber inhibierenden Stoffen aus, sodass er hinsichtlich der Nutzung von komplexen Substraten deutliche Vorteile gegenüber anderen möglichen Produzentenstämmen aufweist. Durch Sekretion von Xylanasen, Cellulasen oder α -Amylasen können selbst komplexere Bestandteile wie Xylane, Cellulose oder Stärke verwertet werden, was für verschiedene *A. oryzae*- und andere *Aspergillus*-Stämme beschrieben wurde (Kimura et al., 1998; Lin et al., 2010; Carroll et al., 2017). Diese Gründe machen *A. oryzae* zum idealen Organismus, um die oben genannten Herausforderung anzugehen. Die eigene Forschung konzentriert sich daher momentan auf die Nutzbarmachung von erneuerbaren Substraten, insbesondere von industriellen Rest- und Abfallströmen (Abschnitt 2.5.1), sowie die in diesem Zusammenhang benötigte Stammentwicklung, um robustere *A. oryzae* Stämme zu generieren (Abschnitt 2.5.3). Durch Medienoptimierung und die Entwicklung verschiedener Prozessmodi in unterschiedlichen Skalierungen sollen die Grundlagen

der Malat-Produktion in *A. oryzae* untersucht und eine Produktion im großen Maßstab ermöglicht werden (Abschnitt 2.5.2).

2.5.1 Substratspektrum (MWK Projekt Pyrolyseöl / DFG-Projekt SchweWa / BMBF-Projekt ValProWa)

Substratkosten machen den Großteil der Produktionskosten aus. Daher ist es wichtig, kostengünstige Substrate für die Äpfelsäureproduktion zu evaluieren. Im Sinne der Bioökonomie sollten diese erneuerbar und nicht in Konkurrenz zu Lebensmitteln stehen. Im Rahmen mehrerer Projekte wurden und werden Weizenstroh, Miscanthus, Buchenholzreste, volatile Fettsäuren, insbesondere Acetat, Rohglycerin und Melasse diesbezüglich untersucht. Acetat, Rohglycerin und Melasse können prinzipiell direkt eingesetzt werden, während unterschiedliche Vorbehandlungsmethoden für die Pflanzenreste getestet wurden.

In Zusammenarbeit mit der Bioliq-Anlage am KIT wurde durch Pyrolyse vorbehandeltes Weizenstroh als potentiell Substrat für die Malat-Produktion untersucht. Die Pyrolyse bietet den Vorteil, dass prinzipiell jede trockene Biomasse eingesetzt werden kann und, dass eine vorherige Fraktionierung in Cellulose, Hemicellulose und Lignin entfällt. Tatsächlich ist die Pyrolyse eine der wenigen Vorbehandlungsmethoden, bei der auch das Lignin mit umgewandelt wird. Bei der verwendeten Schnell-Pyrolyse, bei der kleine Strohpartikel für wenige Sekunden auf 500°C unter Sauerstoffausschluss aufgeheizt werden, entstehen zwei wässrige Kondensate, Pyrolyseöl und Schwelwasser. Pyrolyseöl ist eine stark viskose Flüssigkeit (Abbildung 14) mit einem Organikanteil von etwa 80 % (w/w).

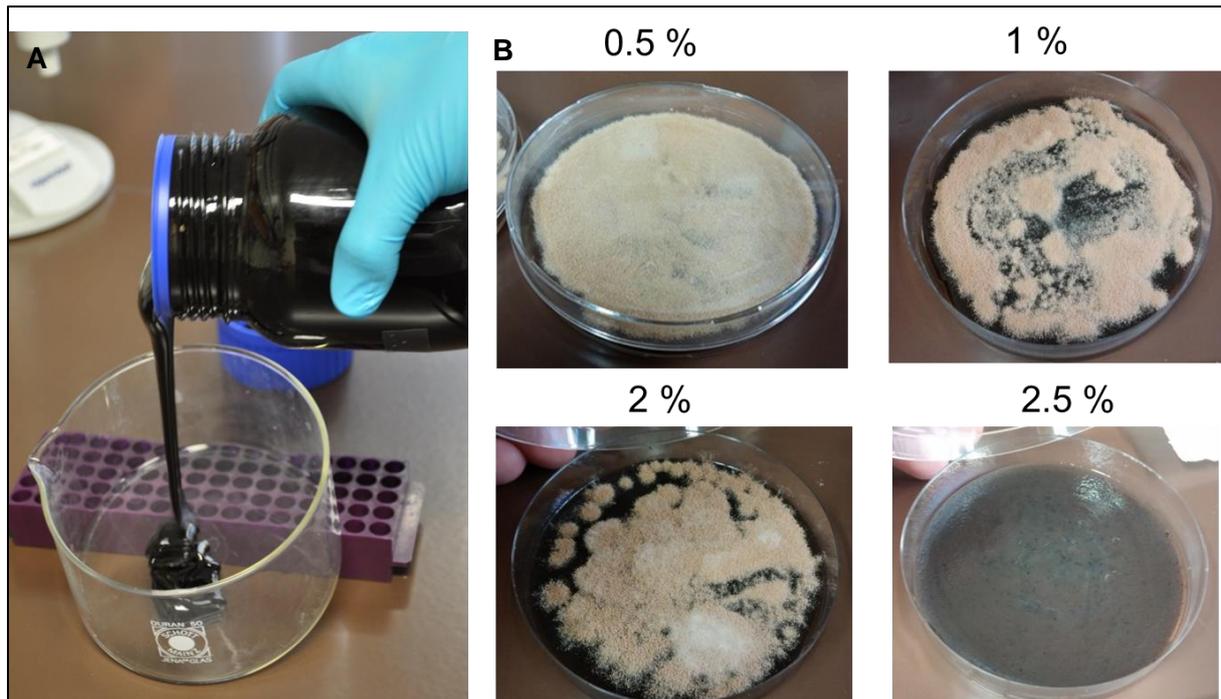


Abbildung 14: Toleranz von *Aspergillus oryzae* DSM 1863 gegenüber Pyrolyseöl aus Weizenstroh. A. Aussehen und Fließverhalten von Pyrolyseöl. B. Wachstum von *A. oryzae* auf Nährmedium, das neben Glucose als Kohlenstoffquelle noch zusätzlich die angegebenen Mengen an Pyrolyseöl enthält. Ab einer Konzentration von 2,5 % (w/w) wird das Wachstum vollständig inhibiert.

Der organische Anteil des Pyrolyseöls setzt sich aus Säuren, Alkoholen, Aldehyden, Ketonen, Estern, Zuckern, Phenolen, Guajakolen, Syringolen, Furanen, aus Lignin abgeleiteten Phenolen und extrahierbaren Terpenen mit multifunktionalen Gruppen zusammen, die aus der thermischen Zersetzung der Makromoleküle Cellulose, Hemicellulose und Lignin der Biomasse hervorgehen. Die genaue Zusammensetzung variiert je nach eingesetzter Biomasse und gewählten Prozessbedingungen der Schnell-Pyrolyse. Unter den genannten Substanzklassen befinden sich Stoffe, die sich gut als mikrobielle Substrate eignen, jedoch auch solche, die als mikrobielle Inhibitoren bekannt sind. Daher können Pyrolyseprodukte auch als mikrobielle Inhibitoren eingesetzt werden, um z.B. Holz gegen mikrobielle Degradierungsprozessen zu schützen.

In einem ersten Schritt wurden 22 Pilze aus den drei großen Abteilungen Ascomycota, Basidiomycota und „Zygomycota“ der lehrstuhleigenen Stammsammlung auf ihre Toleranz gegenüber Pyrolyseöl hin untersucht (Tabelle 6). Die meisten der untersuchten Pilze vertrugen einen Pyrolyseölgehalt von 0,5 %. Nur

Penicillium chrysogenum, *Trigonopsis variabilis*, *Cryptococcus curvatus*, *Pleurotus ostreatus*, *Mortierella elongata*, *Rhizopus microsporus* und *Umbelopsis ramanniana* konnten unter diesen Bedingungen bereits nicht mehr wachsen. Ein Pyrolysegehalt von 1% wirkte inhibierend auf das Wachstum von *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *A. nidulans*, *Yarrowia lipolytica*, *Backusella circina* und *Phycomyces blakesleeanus*. Höhere Konzentrationen wurden nur von *A. oryzae*, der auch noch auf Platten mit einem Pyrolyseölgehalt von 2% und *Trametes versicolor*, der bei allen getesteten Konzentrationen wuchs, toleriert. Zusätzlich bildete sich ein dunkeler, schwarzer Hof um das Myzel von *T. versicolor* (Dörsam et al., 2016).

Tabelle 6: Wachstum ausgewählter Pilzspezies auf Minimalmedium mit unterschiedlichem Pyrolyseölgehalt (Dörsam et al., 2016)

Abteilung	Spezies	Pyrolyseölgehalt im Medium ⁺ (w/v)				
		0 %	0,5 %	1 %	2 %	3 %
Ascomycota	<i>Alternaria alternata</i> DSM 12633	+	+	-	-	-
	<i>Aspergillus niger</i> NRRL 3	+	+	-	-	-
	<i>Aspergillus terreus</i> DSM 5770	+	+	+	-	-
	<i>Aspergillus nidulans</i> DSM 820	+	+	-	-	-
	<i>Aspergillus oryzae</i> DSM 1863	+	+	+	+	-
	<i>Aureobasidium pullulans</i> DSM 2404	+	+	+	-	-
	<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	+	+	+	-	-
	<i>Penicillium chrysogenum</i> ATCC 48271	+	-	-	-	-
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DSM 11285	+	+	+	-	-
	<i>Yarrowia lipolytica</i> DSM 1345	+	+	-	-	-
<i>Trigonopsis variabilis</i> DSM 70714	+	-	-	-	-	
Basidiomycota	<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20508	+	-	-	-	-
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> DSM 1547	+	+	+	-	-
	<i>Pleurotus ostreatus</i> DSM 11191	+	-	-	-	-
	<i>Trametes versicolor</i> DSM 3086	+	+	+	+	+
Zygomycota*	<i>Backusella circina</i> SF 000941	+	+	-	-	-
	<i>Mortierella elongata</i> SF 009721	+	-	-	-	-
	<i>Mucor circinelloides</i> SF 006299	+	+	+	-	-
	<i>Phycomyces blakesleeanus</i> SF 018907	+	+	-	-	-
	<i>Rhizopus microsporus</i> STH 00427	+	-	-	-	-
	<i>Rhizopus delemar</i> DSM 905	+	+	+	-	-
	<i>Umbelopsis ramanniana</i> SF 011341	+	-	-	-	-

⁺ Medium enthält als Kohlenstoffquelle 10 g/L Glucose

* frühere Abteilung, enthält *Entomophthoromycotina*, *Kickxellomycotina*, *Mucoromycotina*, *Zoopagomycotina*

Diese Ergebnisse illustrieren den großen Toleranzbereich gegenüber Pyrolyseöl innerhalb der Pilze. Neben der Toleranz ist aber die Verstoffwechslung von Pyrolyseöl entscheidend, damit es als Kohlenstoffquelle für die biotechnologische Stoffproduktion genutzt werden kann. Daher wurden weitere Tests mit *A. oryzae* bezüglich der Verwertung von Pyrolyseöl für Biomassegenerierung und L-Malat-Produktion durchgeführt. *A. oryzae* konnte auf Medium wachsen, das bis zu 1% Pyrolyseöl als einzige Kohlenstoffquelle enthält. Daher ist *A. oryzae* in der Lage, Substanzen im Pyrolyseöl für die Biomasseproduktion zu metabolisieren. Auf Platten, die mehr als 1% Pyrolyseöl als einzige Kohlenstoffquelle enthalten, wurde jedoch kein Wachstum beobachtet. Da die organische Säureproduktion während der stationären Wachstumsphase stattfindet, unterscheidet sich der Fermentationsprozess wesentlich vom aktiven Wachstum. Daher muss der Einfluss von Pyrolyseöl auf die L-Äpfelsäureproduktion separat untersucht werden. Bei Verwendung von Pyrolyseöl als einziger Kohlenstoffquelle wurde jedoch keine L-Äpfelsäureproduktion beobachtet (Dörsam et al., 2016).

Der Vergleich zwischen Toleranztests (Medium enthält Glucose und Pyrolyseöl) und Anwendungstests (Medium enthält nur Pyrolyseöl) zeigt, dass Pyrolyseöl in höheren Konzentrationen von Pilzen toleriert werden kann, wenn zusätzlich Glucose vorhanden ist. Mit zunehmendem Pyrolyseölgehalt wird das Pilzwachstum jedoch immer stärker gehemmt und die Produktion von L-Äpfelsäure durch *A. oryzae* wird auch in Gegenwart von Glucose stark reduziert. Während eine Beimischung von 0,5 % Pyrolyseöl zum Produktionsmedium noch keine Veränderung der L-Malat-Produktion bewirkte, verringerte die Beimischung von 1 % und 1,5 % sukzessive die gemessenen Titer, bis die Produktion schließlich bei 2 % vollständig unterbunden wurde (Dörsam et al., 2016).

Um aufzuklären, welche Substanzen toxisch oder inhibierend wirken, wurden 11 repräsentative und kommerziell verfügbare Substanzen, die in höheren Konzentrationen im Pyrolyseöl vorhanden sind, ausgewählt und auf ihre Wirkung hinsichtlich Wachstum und L-Malat-Produktion getestet (Tabelle 7). Als Obergrenze wurde die Konzentration gewählt, die im verwendeten Pyrolyseöl vorhanden ist (Dörsam et al., 2016).

II. Mikrobielle Produktion von L-Äpfelsäure (Malat)

Tabelle 7: Inhibierende Wirkung ausgewählter Substanzen in Pyrolyseöl auf das Wachstum und die Malat-Produktion von *A. oryzae* (Dörsam et al., 2016)

Substanz	Konzentration im Pyrolyseöl [% w/w]	Wachstumsgrenze [% w/w] ^a	Malat-Produktionsgrenze [% w/w] ^a
Propionsäure	1,302	0,07	> 1,3
Ethylenglycol	1,258	> 1,25	> 1,25
γ-Butyrolacton	0,335	> 0,335	> 0,335
Hydroxyaceton	4,4631	1,5	2,5
Syringol*	0,556	0,27	0,3
Guaiacol	0,469	0,1	0,1
Furfural	0,281	0,03	0,07
Phenol	0,384	0,07	0,07
Isoeugenol*	0,524	0,03	0,06
o-,m-,p-Cresol	0,17	0,05	0,03
2-Cyclopenten-1-on	0,308	0,00625	0,0125

^a höchste getestete Konzentration, bei noch Wachstum bzw. Produktion nachgewiesen werden konnte. Bei der nächsthöheren getesteten Konzentration konnte kein Wachstum oder keine Produktion mehr beobachtet werden.

* Hinweise auf Abbau der Substanz durch *A. oryzae*

Innerhalb dieser Tests konnte 2-Cyclopenten-1-on identifiziert werden, welches vermutlich zur geringen Toleranz gegenüber Pyrolyseöl beiträgt. In Wachstumstoleranztests wurde die Wachstumsgrenze dieser Substanz bei einer Konzentration von 0,00625% beobachtet, was etwa 2% des Gehalts im Pyrolyseöl entspricht, und somit deckungsgleich mit der Wachstumsgrenze von Pyrolyseöl (2%) ist. Für die L-Äpfelsäureproduktion lag der Grenzwert jedoch bei einer Konzentration von 0,0125%, was etwa 4% des Gehalts an Pyrolyseöl entspricht. Daher kann dieser Stoff nicht allein für die Produktionsgrenze von Pyrolyseöl (1%) verantwortlich sein. Mögliche synergistische Effekte der analysierten und auch nicht-analysierten Substanzen konnten aufgrund der Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten und der geringen Verfügbarkeit von Chemikalien jedoch nicht getestet werden. Starke

synergistische Effekte z.B. von Furfural in Kombination mit anderen Aldehyden wurden in früheren Studien beschrieben (Zaldivar et al., 1999). Darüber hinaus sind auch chemische Reaktionen zwischen den Komponenten möglich, die zu neuen unbekannt Substanzen führen könnten (Dörsam et al., 2016).

Als besonders gut verstoffwechselbare Verbindungen für Wachstum und L-Malat-Bildung innerhalb des Pyrolyseöls konnten der Anhydrozucker Levoglucosan (Dörsam et al., 2017) und Acetat (Oswald et al., 2016) identifiziert werden. Daher konzentrierten und konzentrieren sich weitere Projekte momentan auf diese Kohlenstoffquellen.

Acetat entsteht in vielen mikrobiellen Prozessen und ist eine vielfältig einsetzbare, aber sehr niedrigpreisige Plattformchemikalie. Das momentan stofflich verwertete Acetat wird vollständig aus fossilen Rohstoffen gewonnen, da sich mikrobielle Prozesse wirtschaftlich nicht tragen. In der Bioliq-Anlage wird standardmäßig das erzeugte Pyrolyseöl weiter zu Syngas (CO, CO₂, H₂) gasifiziert, das dann für die chemische Synthese von Kraftstoffen verwendet wird (Stoll et al., 2019). Syngas kann allerdings auch mikrobiell von acetogenen Bakterien als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden. Über den Wood-Ljungdahl-Weg können natürlicherweise Acetat, Ethanol, Butyrat und 2,3-Butandiol entstehen, wobei Acetat und Ethanol die Hauptprodukte bilden. Da die Produktion großer Mengen an höherpreisigen Produkten direkt aus Syngas aufgrund thermodynamischer Limitationen nicht möglich ist, wurde untersucht, ob eine L-Malat-Produktion mit *A. oryzae* ausgehend von Acetat-haltiger Kulturbrühe im Anschluss an die Syngas-Fermentation möglich ist (Abbildung 15). Es zeigte sich, dass nach minimaler Anpassung des Stickstoffgehaltes im Acetogenen-Medium, um sicherzustellen, dass nach Abschluss der ersten, anaeroben Fermentation eine Stickstofflimitation vorherrscht, und Austreiben des COs im Kulturmedium durch Begasung mit Druckluft, *A. oryzae* in der Lage war, in der Kulturbrühe L-Malat zu bilden. Von den dort enthaltenen ca. 15 g/L Acetat wurden ca. 6 g/L Acetat zur Bildung von 1,4 g/L Malat genutzt, was einer Ausbeute von 0,18 g/g Acetat bzw. 0,12 g/g CO entsprach. Dies ist die bisher höchste publizierte Ausbeute für die Produktion von C₄-Verbindungen aus Syngas (Oswald et al., 2016).

II. Mikrobielle Produktion von L-Äpfelsäure (Malat)

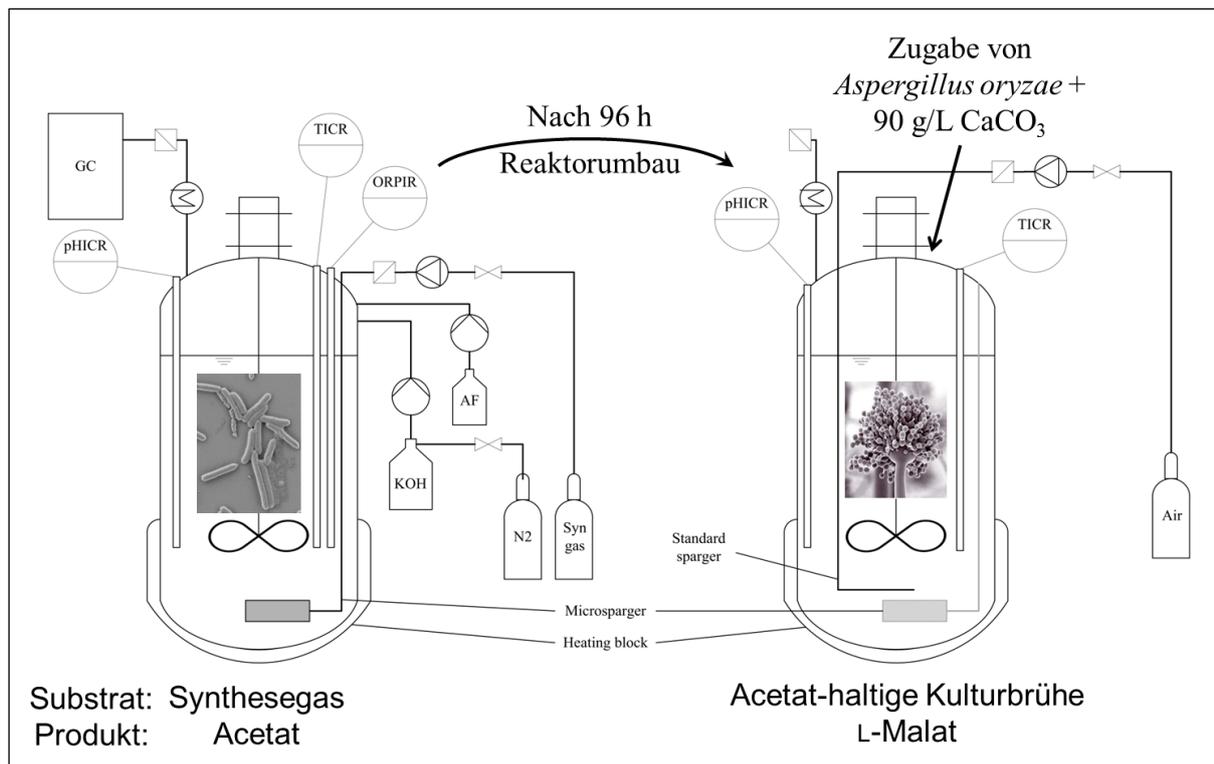


Abbildung 15: Sequentielle Mischkultur zur Produktion von L-Malat aus Synthesegas in zwei Stufen. In einer ersten, 96 stündigen anaeroben Fermentation mit *Clostridium ljungdahlii* entsteht zunächst aus Synthesegas Acetat. Nach 96 h wird durch Begasung mit Druckluft gelöstes Synthesegas ausgetrieben, ein Standardsparger für die Begasung mit Druckluft eingebaut, CaCO₃ als Feststoff für die pH-Kontrolle in den Reaktor vorgelegt und der Reaktor mit einer *Aspergillus oryzae*-Vorkultur beimpft. Die nicht-weiter vorbehandelte Acetat-haltige Kulturbrühe dient nun als Substrat für die anschließende *A. oryzae*-Fermentation zur Herstellung von L-Malat. Für weitere Details siehe Oswald et al. (2016).

Im Rahmen des BMBF-Projektes ValProWa und des DFG-Projektes SchweWa wird die biotechnologische Produktion von L-Malat mit Schwelwasser als Kohlenstoffquelle untersucht. Die Hauptkohlenstoffquelle wäre auch hier Acetat. Da bisher nicht mehr bekannt ist, als dass *A. oryzae* aus Acetat L-Malat bilden kann, werden zunächst nähere Untersuchungen zur Acetat-Verwertung durchgeführt. Diese umfassen die Bestimmung der minimal nötigen Acetat-Konzentration für die L-Malat-Bildung, bzw. das optimale C:N-Verhältnis, sowie die optimale Stickstoffquelle. Bisher bekannt ist, dass *A. oryzae* bis zu 50 g/L Acetat toleriert und für die Produktbildung nutzen kann (Oswald et al., 2016). Somit können nur viel niedrigere Substratkonzentrationen im Batch eingesetzt werden, als für Zucker üblich (100-150 g/L). Es soll daher untersucht werden, ob durch einen Fed-Batch-Prozess die Produktionsphase verlängert und der Produktiter gesteigert werden kann, oder ob, analog zur Hefe-

Fermentation mit Acetat zur Produktion von Einzellerölen (siehe Abschnitt 3.6.2), auch ein automatischer Feed von Acetat über die pH-Regelung möglich wäre. Letzteres wäre zudem elegant, da dadurch CaCO_3 für die pH-Kontrolle obsolet wäre.

In dem breit angelegten Toleranzscreening zeigte neben *A. oryzae* nur *Trametes versicolor* eine höhere Toleranz gegenüber Pyrolyseprodukten (Dörsam et al., 2016). Es soll daher geprüft werden, ob sich *T. versicolor* als biologische Vorbehandlungsmethode zur Nutzbarmachung für Schwelwasser eignet, und ob sich eine zweistufige Fermentation ähnlich wie für die Syngasnutzung nach Oswald et al. (2016) auch für die Schwelwassernutzung eignet. Weitere Strategien zur Schwelwassernutzung bestehen in der Stammentwicklung durch gezielte genetische Modifikation und ungerichtete Mutagenese, um robustere Stämme zu erzeugen, und in der Entwicklung von Repeated-Batch- und kontinuierlichen Prozessen inklusive Immobilisierung zur Zellrückhaltung.

In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass *A. oryzae* neben Glucose auch den C₅-Zucker Xylose für die Malat-Produktion verwenden kann (Ochsenreither et al., 2014), daher sollte es möglich sein, Lignocellulosehydrolysate, wie z. B. durch das Organosolv-Verfahren vorbehandeltes Buchenholz oder Miscanthus, einzusetzen. In einem Vorexperiment wurden zunächst zahlreiche Mono- und Disaccharide getestet, die entweder in Lignocelluloseaufschlüssen (Galactose, Mannose, Arabinose, Xylose, Ribose, and Cellobiose) oder in anderen günstigen komplexen Substraten (Fructose, Maltose) vorkommen (Tabelle 8) (Dörsam et al., 2017).

Es zeigte sich, dass *A. oryzae* in der Lage ist, jeden getesteten Zucker in L-Malat umzuwandeln, wenn auch mit unterschiedlichen Ausbeuten und Produktivitäten. Nur drei der getesteten Kohlenstoffquellen, Cellobiose, Arabinose und Galactose, resultierten in L-Malat-Titern unter 10 g/L. Ähnlich erfolgreich wie die Vorversuche liefen auch die Fermentationen mit den Cellulose- und Hemicellulosefraktionen von Buchenholz und Miscanthus ab. Beide Cellulosefraktionen waren teilweise aufgereinigt (enthielten kein HMF oder Furfural), aufkonzentriert und verzuckert, während dies aus die Hemicellulosefraktionen nicht zutraf. Dennoch konnte L-Malatbildung mit allen vier Fraktionen nachgewiesen werden (Dörsam et al., 2017; siehe auch Tabelle 4).

Tabelle 8: Malat-Produktion mit *A. oryzae* in Schüttelkolbenkultivierungen für 168 h unter Verwendung verschiedener Mono- und Disaccharide als Kohlenstoffquelle

	C-Quelle*	Titer [g/L]	Y_{P/S} [g/g]	Max. Produktivität [g/(l*h)]	Gesamt-Produktivität [g/(l*h)]
Hexosen	Glucose	40.5 ± 3.7	0.65	0.41	0.24
	Fructose	24.8 ± 1.9	0.63	0.22	0.15
	Galactose	1.8 ± 0.5	0.06	0.015	0.01
	Mannose	32.8 ± 0.5	0.69	0.29	0.19
Pentosen	Arabinose	7.2 ± 2.9	0.22	0.06	0.04
	Ribose	20.7 ± 5.7	0.45	0.18	0.12
	Xylose	24.3 ± 3.3	0.49	0.20	0.14
Disaccharide	Maltose	34.1 ± 10.8	0.34	0.30	0.2
	Cellobiose	8.8 ± 1	0.14	0.10	0.05
Mischungen	75% Glucose, 25% Xylose	29.4 ± 1.9	0.38	0.29	0.2
	25% Glucose, 75% Xylose	31.9 ± 0.3	0.59	0.31	0.22

* Alle Medien enthielten dieselbe Menge an Kohlenstoff, äquivalent zu 109 g/L Glucose

Die Verwendung von verschiedenen Melassen und Rohglycerin wurde im Rahmen einer Masterarbeit (Cai, 2019) untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Einsatz von reiner Saccharose den L-Malat-Titer im Vergleich zu Glucose verdoppelte. Auch eine der Zuckerrüben-Melassen führte zu höheren L-Malat-Titern als in der Kontrollkultivierung mit Glucose. Weitere Untersuchungen zur Melasseverwertung erfolgen derzeit. L-Malat kann sowohl mit Glycerin (Ochsenreither et al., 2014) als auch mit Rohglycerin (Cai, 2019 [Masterarbeit]) als Kohlenstoffquelle gebildet werden. Mit Rohglycerin konnten höhere L-Malat-Titer, aber auch höhere Nebenprodukt-Titer erzielt werden.

Die hier dargestellten Arbeiten demonstrieren, wie groß die Auswahl an verschiedenen Substraten für die L-Malatproduktion mit *A. oryzae* ist. Diese umfasst Neben- und Abfallströme wie Rohglycerin und Melasse, aber auch lignocellulosebasierte Substrate, was die Voraussetzung dazu schafft, eine biotechnologische L-Malat-Produktion wirtschaftlich gestalten zu können.

2.5.2 Prozessentwicklung und –optimierung (BMBF-Projekt EvaOrg / DFG-Projekt SchweWa)

Für die erfolgreiche Industrialisierung biotechnologischer Produkte ist die Entwicklung eines robusten und skalierbaren Bioprozesses unabdingbar. Während der Entwicklung und Optimierung wird sich zeigen, ob Erkenntnisse und Konzepte aus Schüttelkolbenexperimenten applikabel und übertragbar sind. Zusätzlich bietet die kontrollierte Umgebung des Bioreaktors die Möglichkeit, Parameter gezielt zu verändern, um die Produktion zu verstehen und zu optimieren. Aus wissenschaftlicher Sicht sind noch viele Fragen zur L-Malat-Produktion offen, insbesondere mit *A. oryzae*. Es wird sich zudem zeigen, ob Erkenntnisse zwischen den unterschiedlichen Produktionsorganismen universell und damit übertragbar sind, oder ob es artspezifische Besonderheiten gibt.

Im ersten Schritt wurde ein Standard-Batch-Prozess für *A. oryzae* DSM1863 in Schüttelkolben entwickelt und in den 2 L-Bioreaktor übertragen (Ochsenreither et al., 2014). Dabei wurden die Medien, der zweistufige Prozess aus Vorkultur zur Biomassegenerierung und Hauptkultur zur L-Malatproduktion, sowie die Prozessbedingungen des *A. flavus*-Prozesses von Battat et al. (1991) übernommen und auf *A. oryzae* übertragen. Dieser Prozess stellte den Ausgangspunkt für alle weiteren Experimente dar. Es zeigte sich, dass Erkenntnisse aus dem Schüttelkolben in den Bioreaktor übertragbar waren. Während einer ersten Prozessoptimierung, wurde die Temperatur während der Produktionsphase auf 35°C erhöht und verschiedenen C:N-Verhältnisse untersucht. Es zeigte sich, dass die Verringerung des C:N-Verhältnisses durch Erhöhung des Stickstoffgehaltes in der Hauptkultur keinen Einfluss auf die L-Malat-Endkonzentration hatte, wohl aber die Fumarsäurekonzentration senkte (Ochsenreither et al., 2014).

Weitere Experimente zur Prozessoptimierung bekräftigten die Vermutung, dass eine Produktinhibierung vorliegen könnte. Die finale L-Malatkonzentration bewegte sich immer zwischen 40 g/L und 50 g/L L-Malat, unabhängig davon, ob dem Produktionsmedium definierte L-Malatsmengen hinzugefügt wurden oder nicht. Bei Zugabe von L-Malat wurde dieses Maximum allerdings eher erreicht. Die Zugabe von L-Malat schien keinen Einfluss auf den Glucoseverbrauch zu haben (Rominger, 2017 [Bachelorarbeit]). Daher stellt sich die Frage, welches Produkt stattdessen

synthetisiert wird. In mehreren studentischen Abschlussarbeiten wurde zudem die optimale Substratkonzentration und das beste C:N-Verhältnis für die L-Malatproduktion ermittelt. L-Malatbildung kann auch bei hohen Glucosekonzentrationen von bis zu 200 g/L beobachtet werden, allerdings liegt das Optimum bei 140-150 g/L Startkonzentration. Als bestes C:N-Verhältnis wurde 200:1 ermittelt, was dem des Standardprozesses entspricht (Klopper, 2017 [Bachelorarbeit]; Cai, 2019 [Masterarbeit]). Die Veränderung des C:N-Verhältnis beeinflusste auch die Nebenproduktbildung. Neben Fumarat wurden Citrat, α -Ketoglutarat und Succinat als Hauptnebenprodukte identifiziert, die ebenfalls beim für die L-Malat-Produktion besten C:N-Verhältnis am stärksten akkumulieren. Eine Varianz der initialen Glucosekonzentration bei festgelegtem C:N-Verhältnis hatte allerdings keinen Einfluss auf die Nebenproduktbildung (Cai, 2019 [Masterarbeit]).

In Anbetracht der wahrscheinlichen Produktinhibition wurden alternative Prozessmodi zum Batch-Prozess untersucht. Dabei erschien der Repeated-Batch als vielversprechendster Prozessmodus. Zusätzlich wurden unterschiedliche Fed-Batch-Varianten betrachtet, um auszuschließen, dass einzelne Medienkomponenten limitierend auf die L-Malatbildung wirken. Während ein Fed-Batch nicht zu einer nennenswerten Steigerung der L-Malatproduktion führte, wies der Repeated-Batch deutliche Vorteile auf. Durch den Austausch der Kulturbrühe mit frischem Medium wurde die Produktivität mit jedem Zyklus gesteigert. Dadurch verkürzen sich die Zyklen von anfänglich vier auf 2-3 Tage. Da das frische Medium auch Stickstoff enthielt, wurde zu Beginn eines neuen Zyklus frische Biomasse gebildet, was am Wachstum der Pellets zu sehen war. Dadurch verringerte sich auch die L-Malatausbeute, da Glucose für die Bildung von Biomasse verwendet wurde (Abbildung 16) (Klopper, 2017 [Bachelorarbeit]). Die Fermentationszeit konnte deutlich gesteigert werden, bis zu 10 Zyklen waren möglich. In den letzten Zyklen desintegrierten die Pellets deutlich und ein Abdekantieren des Mediums war nicht mehr möglich. Es musste darauf geachtet werden, dass die Glucosekonzentration nicht unter 10-20 g/L sank, da dies eine Verringerung der Produktbildung und der Produktivität nach sich zog, die sich auch in nachfolgenden Zyklen nicht mehr erholte. Die regelmäßige Zugabe von CaCO_3 erwies sich als wichtig, jedoch war eine Supplementierung in jedem dritten Zyklus ausreichend. Insgesamt konnten die Ergebnisse in mehreren unabhängigen Experimenten reproduziert werden.

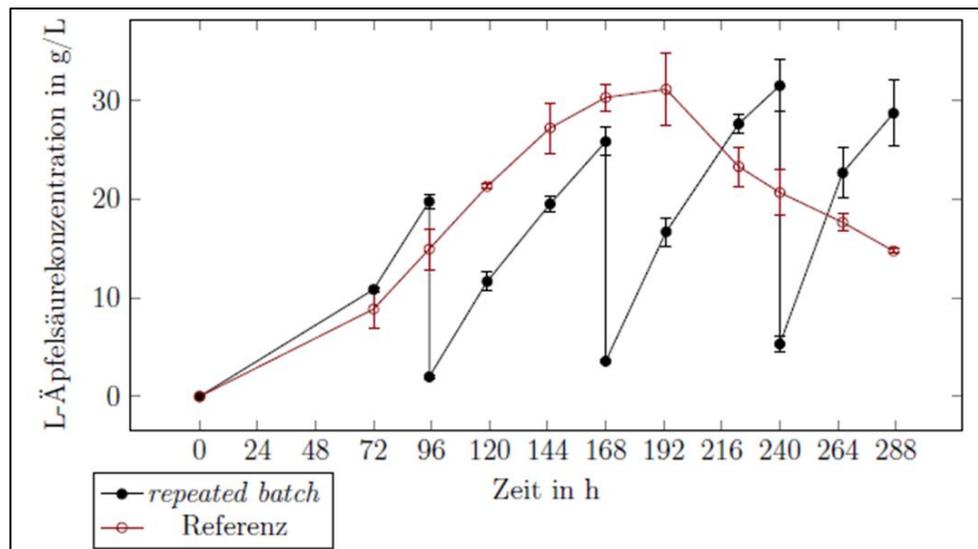


Abbildung 16: Verlauf der L-Äpfelsäurekonzentration mit *Aspergillus oryzae* DSM1863 in einer Repeated-Batch-Fermentation im Vergleich zur Batch-Fermentation (Referenz) im Schüttelkolben mit Glucose als Substrat. Im Repeated-Batch wurde das Medium alle drei Tage ersetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung einer Dreifach-Bestimmung (aus Klopfer, 2017 [Bachelorarbeit]).

Es stellt sich allerdings die Frage, ob ein Repeated-Batch nicht nur in Schüttelkolben, sondern auch im Bioreaktor durchführbar wäre. Entscheidend ist hier, wie gut sich das Medium abpumpen und gegen neues ersetzen lässt, ohne dass Biomasse ausgetragen wird. Auch muss die pH-Kontrolle vorher geklärt werden, da die Zugabe von CaCO_3 in den Bioreaktor im laufenden Betrieb nicht so einfach steril erfolgen kann. Daher wurden parallel Versuche zur pH-Kontrolle und Morphologie-Kontrolle/Immobilisierung durchgeführt (siehe weiter unten).

Die Immobilisierung von *A. oryzae* könnte zusätzliche Vorteile aufweisen. Die Entwicklung eines (halb-)kontinuierlichen Prozesses würde stark vereinfacht bzw. erst möglich, da die Biomasse im Reaktor zurückgehalten werden könnte. Die Immobilisierung von filamentösen Pilzen bietet zudem weitere prozesstechnische Vorteile gegenüber der Fermentation mit freiem Myzel oder Myzelpellets. Insbesondere freies Myzel erhöht bei hohen Zelldichten die Viskosität des Mediums und erschwert dadurch die effektive Durchmischung, was wiederum zu Nährstoffgradienten und Sauerstofflimitierung führen kann. Dieses Problem verstärkt sich mit steigendem Fermentationsvolumen (Gibbs et al., 2000). Der Bewuchs von Reaktoreinbauten und Messelektroden durch Pilzmyzel verstärkt dieses Problem

zusätzlich und kann zudem zum Ausfall von pH- und pO_2 -Elektroden und dem Verstopfen der Luftzufuhr führen. In Fermentationen mit Pilzpellets wird zwar die Viskosität des Mediums auch bei hohen Zelldichten nicht beeinflusst, dennoch ergeben sich trotzdem Diffusionslimitierungen von Nährstoffen und Sauerstoff insbesondere zu den Zellen im Pelletinneren. Als Konsequenz sterben die inneren Zellen meist ab und aktive Zellen befinden sich nur auf der Außenseite (Papagianni, 2004). Der Einfluss der Immobilisierung auf die L-Malat-Bildung ist bisher nicht untersucht worden, weder in *A. oryzae*, noch in anderen L-Malat-Bildnern. Es gibt allerdings zahlreiche Arbeiten, in denen verschiedene Immobilisierungsarten und Aufwuchsmaterialien für die (semi-)kontinuierliche Produktion von Citronensäure mit *A. niger* bzw. Fumarsäure mit *Rhizopus oryzae/arrhizus/delemar* verglichen und diskutiert werden. In diesen Studien zeigte sich generell, dass eine Vielzahl an Materialien für die Immobilisierung geeignet ist und die Immobilisierung selbst sich häufig positiv auf Fermentationsdauer, Ausbeute, Nebenproduktbildung, Produktivität und auch Produktendkonzentration auswirkt. Zudem wurden weitere Prozessvarianten ermöglicht, wie z.B. *in situ*-Produktabtrennung (Cao et al., 1996). Für die Produktion von Fumarsäure wurde *Rhizopus oryzae* unter anderem auf Polyurethan-Schaumblöcken, Perlit, Nylon-oder Drahtnetz, Musselin, in Alginat oder auch auf Kunststoffplatten immobilisiert (Kautola und Linko, 1990; Cao et al., 1996; Petruccioli et al., 1996; Gu et al., 2013; Das et al., 2015). Eine ähnliche Bandbreite an Materialien ist auch für die Citronensäureproduktion mit *A. niger* beschrieben (Papagianni und Matthey, 2004 und darin enthaltene Zitate). Neben prozesstechnischen Vorteilen gibt es Hinweise, dass immobilisierte Mikroorganismen gegenüber Zellgiften wie phenolischen Verbindungen oder Alkoholen eine größere Toleranz aufweisen als nicht-immobilisierte Zellen. Keweloh et al. (1989) berichteten beispielsweise, dass die Immobilisierung der Bakterienarten *E. coli*, *Pseudomonas putida* und *Staphylococcus aureus* in Alginat die Wachstumsinhibierung durch ansonsten bakteriostatische Konzentrationen an Phenol deutlich reduzierte und die allgemeine Toleranz gegenüber Phenol erhöhte. Weitergehende Studien von Heipieper et al. (1991) legten nahe, dass in Alginat immobilisierte *E. coli* Zellen geringere Membranschäden durch Phenol und 4-Chlorphenol davontragen als freie Zellen und somit eine höhere Toleranz gegenüber diesen Substanzen aufweisen. Hanaki et al. (1994) berichteten ebenfalls, dass immobilisierte methanogene

Archaeen eine höhere Toleranz gegenüber Phenolen, Propionsäure, Ölsäure, Sulfide und Nickel aufweisen. Die Immobilisierung von *S. cerevisiae* und *Kluyveromyces marxianus* Zellen führten zu einer erhöhten Ethanoltoleranz (Norton und D`Amore, 1994; Dale et al., 1994). Ob durch Immobilisierung von filamentösen Pilzen eine erhöhte Toleranz gegenüber phenolischen Verbindungen oder anderen inhibierenden Substanzen ist bisher nicht bekannt. In Hinblick auf die Schwelwassernutzung könnte Immobilisierung aber eventuell Vorteile bringen.

Um CaCO_3 als Neutralisationsmittel zu ersetzen, wurden verschiedene Basen getestet. Ähnlich wie für die Fumarsäureproduktion mit *R. delemar* wurde festgestellt, dass CaCO_3 von allen getesteten Neutralisationsmitteln mit Abstand am besten abschnitt. Dennoch wurde NaHCO_3 in Kombination mit Talk-Partikeln als pH-Korrekturmittel für alle weiteren Versuche gewählt, weil es die Prozessführung erleichtert, weitere Versuche zum optimalen pH ermöglicht und die eine Kontrolle der Morphologie erlaubt. Da die Talk-Partikel erst in die Hauptkultur hinzugegeben werden, kann von einer Immobilisierung nicht gesprochen werden. Weitere Versuche zu diesem Themenkomplex sind Teil der aktuellen Forschung.

Momentan gibt es noch keine Untersuchungen, ob bzw. inwieweit die Vorkultur die L-Malat-Produktion beeinflusst. Auch in Hinblick auf einen späteren Scale-Up sind einige Optimierungen durchzuführen. Derzeit wird das Vorkulturmedium mit Konidien beimpft und ca. 24 h kultiviert. Der genaue Zeitpunkt wird durch optische Beurteilung der Pellets bestimmt, da eine OD-Messung hier nicht anwendbar ist. Ein rationalerer Anhaltspunkt, wie z.B. Verbrauch von Kohlenstoff- und/oder Stickstoffquelle wäre allerdings wünschenswerter. Vor der Innokulierung der Hauptkultur wird die Biomasse mit Wasser gewaschen, um restliches Vorkulturmedium und insbesondere den darin enthaltenen Stickstoff zu entfernen. Diese Arbeitsschritte werden bei größeren Maßstäben nicht mehr durchführbar sein, daher sollte das Vorkulturmedium so optimiert werden, dass ausreichend Biomasse in einem definiertem Zeitraum gebildet wird, aber alle Medienkomponenten, insbesondere Stickstoff aufgebraucht sind. Um diese Aspekte zu adressieren, wurde das Wachstum über den üblichen Kultivierungszeitraum und darüber hinaus beobachtet, der Verbrauch von Kohlenstoff- und Stickstoff gemessen und Medienanpassungen vorgenommen.

Zunächst wurden das Wachstum und die Pelletbildung in der Vorkultur mikroskopisch beobachtet, um unterschiedliche Wachstumsphasen zu identifizieren (Abbildung 17). Nach 24 h Kultivierung, bei der üblicherweise die Biomasse in die Hauptkultur überführt wird, befand sich *A. oryzae* sowohl bei der Kultivierung mit dem Standardmedium als auch bei der späteren Kultivierung im reduzierten Medium in der exponentiellen Wachstumsphase. Die maximale spezifische Wachstumsrate von *A. oryzae* in der Vorkultur betrug $0,2 \text{ h}^{-1}$. In den reduzierten Medien wurden sowohl die Glucose- als auch Ammoniumkonzentration sukzessive gesenkt. Es zeigte sich, dass das Wachstum innerhalb der Standardkultivierungszeit (24 Stunden) nicht beeinflusst wurde und keine Limitierungen vorlagen. Bei der höheren Reduzierung (50 % Reduzierung der Glucose- und Ammoniumkonzentration) wurde erst nach 33 h Kultivierungszeit eine Stagnation des Biomassezuwachses beobachtet. Ein Einfluss der reduzierten Stickstoffkonzentration auf die Morphologie wurde nicht beobachtet. Eine weitere Reduzierung der Kohlenstoff- und Stickstoffquelle wäre also prinzipiell möglich, wenn die Kultivierungszeit der Vorkultur weiterhin 24 h betragen soll (Lübbert, 2018 [Bachelorarbeit]). Es bleibt allerdings noch zu klären, ob die L-Malatbildung in der Hauptkultur durch die veränderte Vorkultur beeinflusst wird.

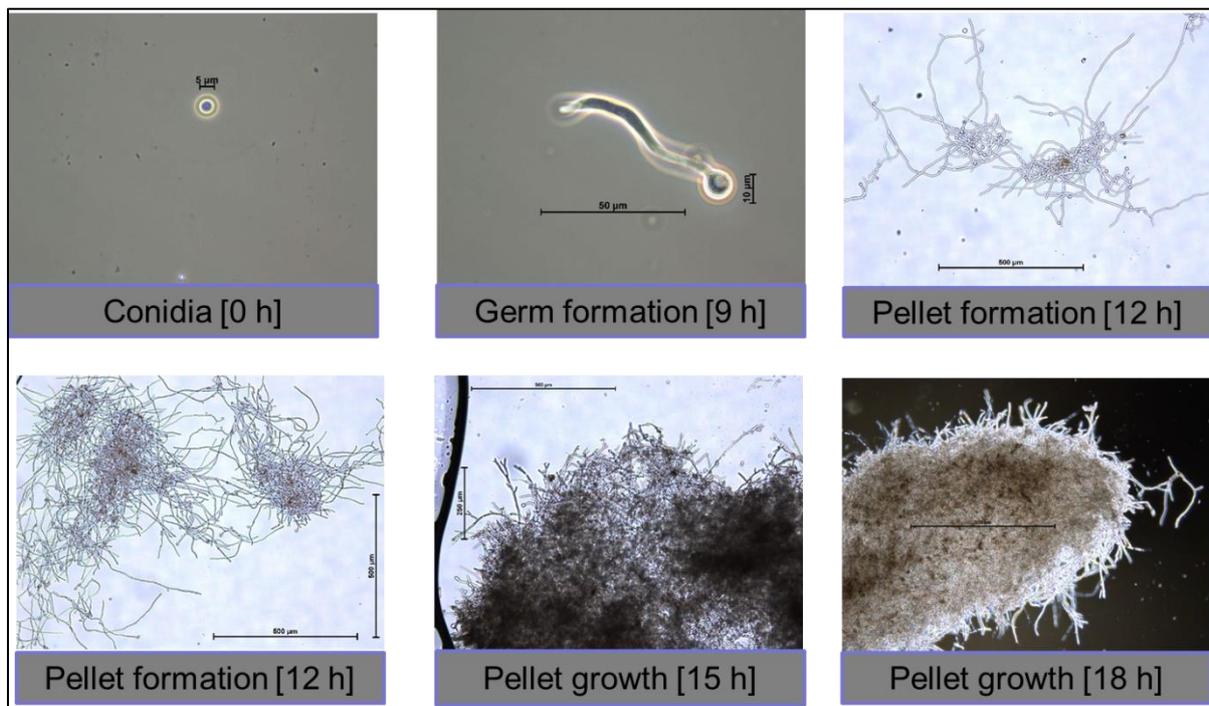


Abbildung 17: Wachstum und Pelletbildung von *A. oryzae* DSM 1863 in der Vorkultur (Lübbert, 2018 [Bachelorarbeit])

2.5.3 Stammentwicklung (BMBF-Projekte EvaOrg + ValProWa)

Die Stammentwicklung von *A. oryzae* innerhalb der eigenen Projekte fokussiert sich auf zwei Aspekte. Zum einen soll innerhalb des BMBF-Projektes EvaOrg die Rolle und der Einfluss verschiedener C₄-Dicarbonsäure-Transporter auf die Malat-Produktion untersucht werden, und zum anderen soll im Rahmen des BMBF-Projektes ValProWa durch gezielte genetische Modifikationen und durch ungerichtete Mutagenese der *A. oryzae* Wildtyp-Stamm robuster gegenüber Schwelwasser gemacht werden, um die L-Malat-Produktion mit Schwelwasser als Substrat zu ermöglichen.

Bezüglich des Einflusses von C₄-Carbonsäure-Transportern auf die L-Malat-Synthese in *A. oryzae* konnte durch die Arbeiten von Brown et al. (2013) und Liu J. (2017) gezeigt werden, dass durch Überexpression des eigenen Transporters sowie des *mae1*-Transporters aus *S. pombe* die L-Malat-Titer deutlich gesteigert werden konnten im Vergleich zum Wildtyp. Es ist daher möglich, dass der Transportprozess durch das Produkt L-Malat gehemmt werden könnte und damit zumindest zum Teil an der Produktinhibition beteiligt ist. Wenn produziertes L-Malat nicht mehr sekretiert werden kann und folglich in der Zelle akkumuliert, könnte dies zu einer Ansäuerung des Cytoplasmas und zu Zellschäden führen. Produktinhibition ist bei der Produktion von Carbonsäuren nicht ungewöhnlich (Lidén, 2017) und wurde auch für die Fumarsäureproduktion mit *R. delemar* beschrieben (Xu Q. et al., 2012). Jedoch sind die genauen Mechanismen nicht bekannt. Transportprozesse spielen bei der Produktion verschiedener organischer Säuren eine große Rolle. Für die Synthese von Itaconat beispielsweise sind zwei Transporter wesentlich beteiligt: zum einen der mitochondriale Transporter MttA, der die Vorstufe cis-Aconitat aus dem Mitochondrium ins Cytoplasma transferiert und MfsA, der für den Transport von Itaconat aus dem Cytoplasma in die Außenumgebung der Zelle verantwortlich ist. Die Überexpression dieser Transporter führte zu einer deutlichen Steigerung des Itaconat-Titers (Hossain et al., 2016; Hosseinpour Tehrani et al., 2019). Weiterhin ist es möglich, durch Expression des mitochondrialen Transporters in Kombination mit der cis-Aconitat-Decarboxylase einen Citrat-Produzenten in einen Itaconat-Produzenten umzuwandeln (van der Straat et al. 2014; van der Straat and de Graaff 2014; Karaffa und Kubicek, 2019). Hinsichtlich der C₄-Dicarbonsäure-Transporter

bleibt die Frage, ob diese spezifisch L-Malat oder Fumarat bzw. Succinat akzeptieren, ob eine dieser Säuren preferenziell ausgeschleust wird, oder ob dies unspezifisch für alle drei Säuren gleich geschieht. Wie bereits oben erwähnt, sind die Hauptnebenprodukte bei der L-Malatproduktion mit *A. oryzae* Succinat und Fumarat. Daher wäre es interessant zu sehen, ob mit der Überexpression eines C₄-Transporters die Bildung beispielsweise von Fumarat gesteuert werden kann. Sollte der Transporter spezifisch für Fumarat sein, würde mehr L-Malat in der Zelle zurückgehalten und Fumarase könnte daraus Fumarat bilden, welches dann sekretiert wird. Generell sind nur wenige C₄-Transporter überhaupt beschrieben. Daher wurden zunächst durch Blast-Analysen Homologe aus Pilzen und auch ein Transporter-Gen aus *E. coli* identifiziert, codon-optimiert und in eines Expressionskassette für *A. oryzae* kloniert. Derzeit werden die Transformanten selektioniert und deren Produktbildungsspektrum ermittelt.

Im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes ValProWa soll die biotechnologische Nutzbarmachung von Schwelwasser untersucht werden (Abbildung 18). Schwelwasser enthält, wie Pyrolyseöl auch, viele Substanzen, die das Wachstum und die L-Malatproduktion von *A. oryzae* verringern oder inhibieren können. Um die Robustheit eines Stammes gegenüber inhibierenden oder toxischen Substanzen oder Substanzgemischen zu erhöhen, können mehrere Ansätze verfolgt werden. (I) Die Toleranz gegenüber bestimmten Substanzen oder Substanzklassen könnte durch gezielte heterologe (Über-)expression geeigneter Gene gesteigert werden. Einige Gene aus unterschiedlichen Organismen wurden bereits identifiziert, die eine erhöhte Toleranz z.B. gegenüber besonders toxischen, häufig in Lignocellulose-Aufschlüssen vorkommenden Substanzen vermitteln. Die Expression dieser Gene in Modellorganismen wie *E. coli*, *Pseudomonas putida* oder *S. cerevisiae* resultierte in einer erhöhten Toleranz, z.B. gegenüber Furfural und 5-Hydroxymethylfurfural (Koopman et al., 2010; Zheng et al., 2012) oder phenolischen Inhibitoren (Ferulasäure, Vanillin, 4-Hydroxybenzaldehyd etc.), die auch in Pyrolyseprodukten vorkommen (Larsson et al., 2001; Forsberg et al., 2015) (einen Überblick geben Mills et al., 2009 für *E. coli* und Almeida et al. 2007 für *S. cerevisiae*). Momentan gibt es keine diesbezüglichen Studien zur genetischen Modifikation von filamentösen Pilzen. Dies könnte daran liegen, dass viele Pilze eine erhöhte Grundtoleranz gegenüber den relevanten Verbindungen aufweisen und somit selbst als Spender für Gene in

Frage kommen (Larsson et al., 2001; Martins et al., 2006; Zhang, et al., 2010; Dörsam et al., 2016), oder die Forschung sich derzeit auf einige wenige Modellorganismen beschränkt. Jedoch zeigen eigene Toxizitätsstudien zu Hauptbestandteilen in Pyrolyseprodukten, dass eine Erhöhung der Toleranz gegenüber z.B. Acetol und 2-Cyclopenten-1-on, die Nutzung von Pyrolyseöl in größeren Mengen ermöglichen könnte (Dörsam et al., 2016). Sofern die Erhöhung der Toleranz gegenüber einer Substanz die Gesamttoleranz gegenüber dem Substrat erhöht, wäre die gezielte genetische Modifikation ein lohnenswerter Ansatz. Basierend auf den Ergebnissen vorheriger und aktueller Toleranzversuche (Dörsam et al., 2016) soll gezielt die Toleranz gegenüber einzelnen Substanzen durch genetische Modifikation des Produktionsstammes erhöht werden. Dazu werden eigene Ergebnisse genutzt sowie eine Literatursuche nach beschriebenen Enzymen durchgeführt, die eine Toleranz gegenüber einer bestimmten Substanz ermöglichen. Diese Enzyme werden kloniert und in *A. oryzae* eingebracht. Alle Transformanten müssen wiederum auf Schwelwassertoleranz und L-Malat-Produktion getestet werden. Sollte die Toleranz gegenüber Schwelwasser jedoch nicht durch das Einbringen einzelner Gene erhöht werden können, weil unterschiedliche Mechanismen synergistisch zusammenwirken, wäre (II) ein Evolutionsexperiment / eine Adaption direkt auf Schwelwasser oder (III) eine Mutagenese mit mutagenen Substanzen wie Ethylmethylsulfonat (EMS) zielführender. Durch das häufige Überimpfen auf frisches Medium, in das sukzessive immer höhere Schwelwasser-Konzentrationen hinzugegeben werden, können gezielt Varianten selektioniert werden, die toleranter gegenüber Schwelwasser sind. Die einzelnen Isolate müssen zudem auf ihre Fähigkeit, L-Malat zu produzieren, hin untersucht werden. Die chemische Mutagenese mit EMS und anschließender Selektion auf geeigneten Medien (in diesem Projekt erhöhte Schwelwasserkonzentrationen) ist eine etablierte Methode zur Stammentwicklung für *A. oryzae* (Leonard et al., 2013; Abdullah und Ikram-ul-Haq, 2015; Ali und Nawaz, 2017).

II. Mikrobielle Produktion von L-Äpfelsäure (Malat)

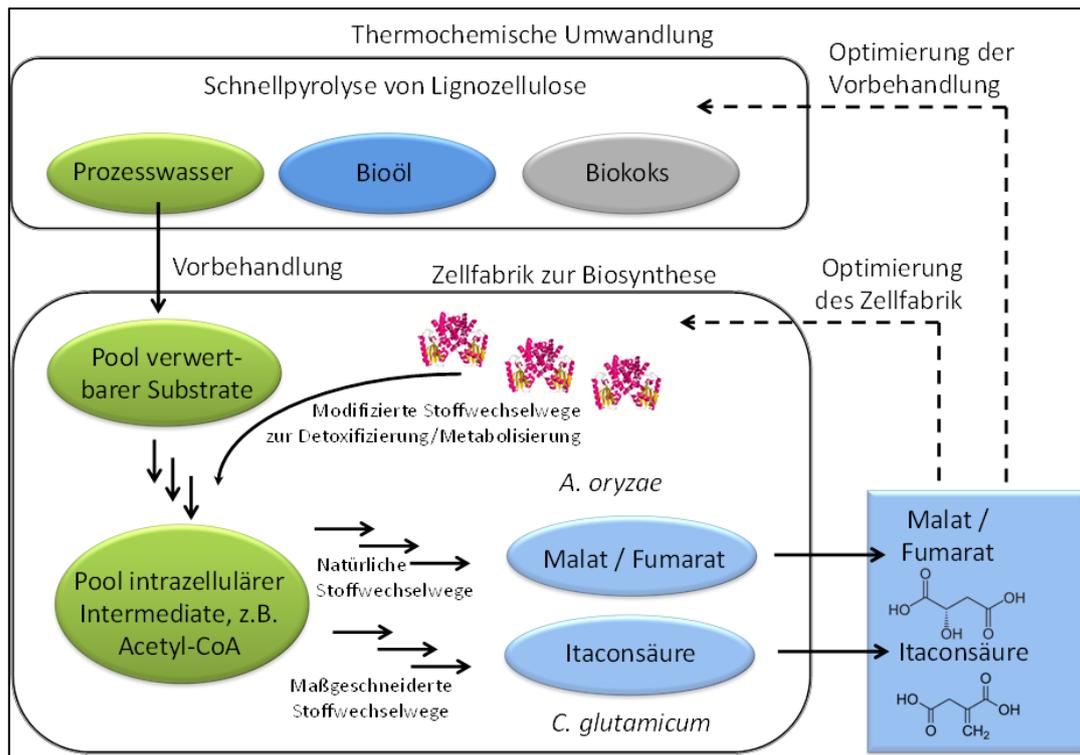


Abbildung 18: Verbundstruktur des Projektes ValProWa mit Verfahrensschritten und Produktbildungspfaden. Das IKFT am KIT (Prof. Dahmen) stellt maßgeschneiderte Prozesswässer/Schmelzwässer aus der Schnell-Pyrolyse von Weizenstroh bereit. Dafür führen das KIT-Tebi und TUMCS-MB (Prof. Blombach) Toxizitätstest mit Schmelzwasser und Schmelzwasserkomponenten durch. Durch gezielte genetische Modifikation sollen die Produktionsstämme höhere Schmelzwasserkonzentrationen tolerieren und als Substrat für die Malatproduktion (*A. oryzae*, KIT-Tebi) und die Itaconatproduktion (*C. glutamicum*, TUMCS-MB) verwenden können.

III. Mikrobielle Produktion von Einzellerölen (Single Cell Oils)

Teile dieses Kapitels beruhen auf dem Review Ochsenreither et al. (2016) „Production Strategies and Applications of Microbial Single Cell Oils“.

Einzelleröle (SCOs) sind intrazelluläre Speicherlipide, die aus Triacylglyceriden bestehen. SCOs werden von sogenannten oleogenen Mikroorganismen (Bakterien, Algen, Hefen oder Pilze) produziert, die in der stationären Wachstumsphase bei einer Nährstofflimitierung, z.B. von Stickstoff oder Phosphat, und bei gleichzeitigem Überschuss an Kohlenstoffquelle zwischen 20 wt.% und bis zu 80 wt.% Lipid pro Biotrockenmasse anreichern können. Abhängig vom oleogenem Mikroorganismus kann das Fettsäureprofil der SCOs variieren, so dass sie sich für verschiedenste industrielle Anwendungen eignen. Die mikrobielle Lipidproduktion kann in Bioreaktoren erfolgen und ist somit unabhängig von Jahreszeit, Klima und Standort. Sie kann mit einer Vielzahl von Kohlenstoffquellen z.B. Abfallströme aus der Lebensmittelindustrie oder erneuerbaren Kohlenstoffquellen, im Falle von Mikroalgen auch aus CO₂, realisiert werden, benötigt keine Ackerflächen, führt zu hohen Erträgen und kann mit gentechnisch veränderten Organismen durchgeführt werden, bei denen die Fettsäurezusammensetzung individuell verändert und die Ausbeuten bestimmter Fettsäuren und auch insgesamt verbessert wurde. Während die Herstellung von sehr langen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren, z.B. Docosahexaensäure (DHA; 22:6, ω-3) und Arachidonsäure (ARA; 20:4, ω-6), mit dem oleogenen Pilz *Mortierella alpina* und verschiedenen oleogenen Mikroalgenspezies kommerzialisiert wurde (für einen Überblick siehe Ratledge, 2004), trifft dies derzeit nicht auf die Herstellung von Biodiesel oder Oleochemikalien aus SCO zu. Wichtige Forschungsfelder sind daher:

- Upstream: Screening nach neuen Stämmen und Stammentwicklung, Medien- und Prozessoptimierung
- Co-Produktion weiterer, höherpreisiger Chemikalien zusätzlich zu den Einzellerölen
- Downstream: Extraktion der SCOs

In diesem Kapitel werden zunächst die Grundlagen der SCO Produktion erläutert und an gegebener Stelle auf die derzeitigen Herausforderungen hingewiesen.

3.1 Oleogene Mikroorganismen

Fettsäuren und Lipide sind in allen lebenden Makro- und Mikroorganismen für die Aufrechterhaltung wesentlicher Zellfunktionen verantwortlich und bilden die Grundlage der Zellmembranen, die aus semipermeablen Lipiddoppelschichten bestehen (Dowhan und Bogdanov, 2013). Allerdings sind nur relativ wenige Mikroorganismen in der Lage, überschüssigen Kohlenstoff in großen Mengen in Form von Speicherlipiden anzureichern. Oleogene Mikroorganismen finden sich unter den Bakterien, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen. Oleogenität ist jedoch kein phylogenetisches Merkmal, d.h. oleogene Mikroorganismen bilden innerhalb ihrer Phyla keine distinkten Gruppen und können daher durch Stammbaumanalysen nicht identifiziert werden. Bisher unbekannte oleogene Organismen müssen somit auch weiterhin klassisch gescreent und experimentell verifiziert werden. Ebenso wenig ist über die Divergenz und Evolution der „Oleogenität“ bekannt, d.h. durch welche molekularen und evolutionären Mechanismen ein Organismus oleogen wird, ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

In der Literatur sind nicht viele Studien zu oleogenen Bakterien zu finden. Bis vor ein paar Jahren waren keine lipidbildenden Bakterien bekannt. Die jetzt beschriebenen gehören meist zu den Actinobacteria, z.B. *Streptomyces jeddahensis* (Röttig et al., 2017). Die meisten Studien beschränken sich daher auf oleogene Algen oder Pilze/Hefen. Algen haben den Vorteil, dass sie nur mit CO₂ und Licht als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen können. Jedoch wachsen sie dann nur sehr langsam und benötigen spezielle Photobioreaktoren, um ihr Potential optimal ausschöpfen zu können. Nur die Produktion sehr hochwertiger Öle ist unter diesen Umständen wirtschaftlich (Dourou et al., 2018). Ausschließlich filamentöse Pilze und Algen sind in der Lage, die besonders hochpreisigen PUFAs zu bilden, daher bilden Pilze die einzige Alternative für die PUFA-Produktion. Sollen weniger hochwertige Öle hergestellt werden, werden einzellige Hefen häufig den mehrzelligen, filamentösen Pilzen mit ihrer komplexen Morphologie vorgezogen, da sie schneller wachsen, hohe Zelldichten im Bioreaktor erreichen und eine relativ unkomplizierte Prozessführung ermöglichen. Viele Hefen haben ein ähnlich breites Substratspektrum wie filamentöse Pilze und können daher auf allen möglichen Kohlenstoffquellen, Rest- und Nebenströmen wachsen. Tabelle 9 gibt einen Überblick über bekannte oleogene Arten innerhalb der Pilze.

Tabelle 9: Ausgewählte pilzliche oleogene Organismen

Abteilung	Ordnung	Gattung	SCO [% (w/w _{B_{TM}})]	Referenzen
Ascomycota	Saccharomycetales	<i>Yarrowia</i>	7 - 54	Papanikolaou et al., 2002; Papanikolaou und Agelis, 2002; Xue et al., 2018
		<i>Lipomyces</i>	2-64	Calvey et al. 2016; McNeil und Stuart, 2018
	Eurotiales	<i>Aspergillus</i>	18-23	Lin et al., 2010; Subhash und Mohan, 2011
	Dothideales	<i>Aureobasidium</i>	32-65	Wang et al., 2014; Wang et al., 2018; Xue et al., 2018
				Xu und Liu, 2017
Basidiomycota	Sporidiobolales	<i>Rhodospiridium/ Rhodotorula</i>	35-70	Yu et al., 2018; Spagnuolo et al., 2019; Zhang et al., 2019
	Trichosporonales	<i>Trichosporon/ Cutaneotrichosporon</i>	22-70	Schulze et al., 2014
		<i>Apiotrichum</i>	34	Schulze et al., 2014
	Tremellales	<i>Saitozyma/ Cryptococcus</i>	32	Gema et al., 2002; Fakas et al., 2009; Chatzifragkou et al., 2010; 2011
				Roux et al., 1994; Szczesna-Antczak et al., 2018; Rodrigues Reis et al., 2019
„Zygomycota“	Mucorales	<i>Cunninghamella</i>	21-78	Bellou et al., 2014
		<i>Mucor</i>	14-68	Bellou et al., 2014
		<i>Thamnidium</i>	50-82	Papanikolaou und Aggelis, 2019
		<i>Zygorhynchus</i>	48-55	
	Mortieralles	<i>Mortierella/ Umbelopsis</i>	20-72	

Ein Vergleich der gebildeten Lipidmengen zwischen den einzelnen Spezies ist nicht einfach, da die Mengen je nach Stamm und Kultivierungsbedingung sehr unterschiedlich sein können. Umbenennungen der Spezies finden häufig statt, da mit zunehmender Anzahl an genom-sequenzierten Arten phylogenetische Analysen immer genauer werden und Verwandtschaftsverhältnisse besser aufgelöst werden können.

Hohe Mengen an zellulären Speicherlipiden werden von Pilzen und Hefen insbesondere der Gattungen *Cutaneotrichum* / *Trichosporon* (ehemals *Cryptococcus*), *Rhodospodium*, *Cunninghamella* und *Mortierella* produziert. Die Gattung *Mortierella* ist in der Lage, SCO mit einer einzigartigen Zusammensetzung zu produzieren, die hohe Anteile an PUFAs enthält (Asadi et al., 2015). *M. alpina* wird in einem industriellen Prozess der Firma DSM zur Herstellung von Arachidonsäure (ARA, 20:4, ω -6) als Nahrungsergänzungsmittel eingesetzt (Bélignon et al., 2016).

Von allen derzeit beschriebenen oleogenen Hefen ist *Yarrowia lipolytica* am besten zugänglich für genetische Modifikationen. Das Genom mehrerer Stämme ist sequenziert (Devillers et al., 2016; Magnan et al., 2016; Liu und Alper, 2014) und alle modernen Werkzeuge der Molekularbiologie, u.a. Transformationssysteme, Vektoren, Promotoren, CRISPR/Cas9 und Selektionsmarker, sind für *Y. lipolytica* etabliert und verfügbar (Madzak, 2015; Schwartz et al., 2015; 2017; Wagner und Alper, 2016). Für die Steigerung der Einzellerölproduktion sowie die Herstellung unterschiedlichster Produkte auf Fettsäurebasis, wie z.B. Fettalkohole, Fettsäureester, freie Fettsäuren und Alkane, aber auch anderer Feinchemikalien, wie z.B. Carotinoide durch Metabolic Engineering wurden daher zahlreiche Studien und Patente veröffentlicht (z.B. Zhu und Jackson, 2015; Friedlander et al., 2016; Xu et al., 2016; Qiao et al., 2017; Liu H-H et al., 2017; Sun et al., 2017).

3.1.1 Screening nach neuen oleogenen Hefen

Trotz aller Fortschritte bei der Lipidproduktion durch Prozessoptimierung und Metabolic Engineering, ist die Produktion von SCOs mit Ausnahme der PUFA-Herstellung derzeit nicht kommerzialisiert. Daher wird weiterhin gescreent, um insbesondere neue oleogene Hefespezies bzw. -stämme zu isolieren. Dabei wird nach robusten Stämmen gesucht, die in der Lage sind, günstige Substrate, wie z.B. Rest- und Nebenströme, zu verwerten, unter extremen Bedingungen, z.B. hohe Konzentrationen an Zucker und Salz, niedrigen pH-Werten oder niedrigen Temperaturen, zu wachsen oder, die in der Lage sind, zusätzliche Wertprodukte zu bilden, sowie besondere Fettsäureprofile aufweisen. Wachstum unter extremen Bedingungen kann helfen, neue Substratquellen zu erschließen oder z.B. Lignocelluloseaufschlüsse ohne vorherige Detoxifizierung zu nutzen, so dass Kosten gespart werden können. Ebenfalls können Kosten bei der Prozessführung gespart werden, wenn die Fermentation bei niedrigem pH und niedrigeren Temperaturen durchgeführt werden kann und deshalb weniger gegentitriert oder geheizt werden muss. Kalt-adaptierte Stämme können u.U. einen höheren Anteil an mehrfach ungesättigten und damit wertvolleren Fettsäuren bilden. Die Möglichkeit mit einem Stamm nicht nur ein Produkt produzieren zu können, trägt zu der anfänglich in der Einführung geforderten Flexibilität einer Bioraffinerie bei. Zudem könnte ein zusätzliches, höherpreisigeres Produkt die Produktion von SCO insgesamt wirtschaftlicher machen.

Um tiefere Einblicke in die Diversität oleogener Mikroorganismen zu bekommen, lohnt es sich, bereits bekannte, aber wenig untersuchte Stämme näher zu charakterisieren. Während sich die Forschung auf einige wenige Spezies konzentriert, wurden in der Literatur bereits mehr als 70 oleogene Hefearten beschrieben (Sitepu et al., 2014). Auch werden bei näherer Charakterisierung von wenig untersuchten, aber in Stammsammlung hinterlegten Stämmen, immer wieder neue oleogene Stämme identifiziert (Gujjari et al., 2011). Obwohl ein Screening nach oleogenen Spezies in Umweltproben ohne besondere Strategie durchaus Erfolg haben kann, schlagen Sitepu et al. (2014) mehrere Möglichkeiten für ein gezielteres Vorgehen vor, die auf den typischen, physiologischen Eigenschaften oleogener Mikroorganismen beruhen, oder sich aus phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnissen ergeben:

1. Selektive Kultivierung über mehrere Generationen in Medium ohne Kohlenstoffquelle, so dass nur Mikroorganismen überleben, die über intrazelluläre Speicherstoffe, wie z.B. Speicherlipide, verfügen (Li et al., 2012).
2. Anreicherung von oleogenen Hefen aus Bodenproben durch Kultivierung mit Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle (Pan et al., 2009).
3. Selektion von Hefestämmen aus Bodenproben, die in der Lage sind, auf stickstoffarmen Medien zu wachsen (Schulze et al., 2014).
4. Vergleich der Lipidbildung von Arten, die phylogenetisch ähnlich zu bekannten oleogenen Arten sind (Oguri et al., 2012, Sitepu et al., 2012; 2013).

Um das Screening zu beschleunigen, können Indikatoren eingesetzt werden, die spezifisch neutrale Lipide färben, wie z.B. Sudan Schwarz B (Schulze et al., 2014) oder Nil Rot (Zhao C. et al., 2019). Ein weiterer Indikator für hohe Lipidakkumulation kann das „Aufschwimmen“ von Zellen sein, d.h. die Zellen lassen sich schlecht durch Zentrifugation vom wässrigen Medium abtrennen (Siebenhaller et al., 2018) oder treiben in 20 % Glycerin für die Cryo-Konservierung auf (Sitepu et al., 2012). Um oleogene filamentöse Pilze, die einen hohen Anteil an PUFAs bilden, zu isolieren, eignet sich eine selektive Kultivierung mit dem Redox-Indikator Triphenyltetrazoliumchlorid und Cerulinin (Yao et al., 2019). Das farblose Triphenyltetrazoliumchlorid wird bei erhöhter Desaturase-Aktivität, und damit indirekt bei Vorhandensein von ungesättigten Fettsäuren, zum roten Farbstoff Triphenylformazan reduziert. Die Intensität des roten Farbstoffes korreliert mit dem Gehalt an PUFAs und dem Lipidgehalt (Zhu et al., 2004; Yadav et al., 2015), so dass Stämme mit hohem Lipidgehalt leicht anhand der roten Färbung erkannt werden können. Die Kultivierung zusätzlich mit Cerulinin eliminiert Falschpositive, d.h. Stämme mit einem Lipidgehalt von unter 20 % (Yao et al., 2019).

Die hohe Anzahl an neuen oleogenen Stämmen oder sogar bisher unbekannter Spezies, die regelmäßig in der Literatur beschrieben werden, zeigt, dass es noch viele Stämme in allen Phyla der Pilze zu entdecken gibt (z.B. Garay et al., 2016; Filippucci et al., 2016; Pessôa et al., 2019). Mit dem Hintergrund dieser taxonomischen Vielfalt ist es riskant, phänotypische oder genotypische Eigenschaften bestimmter Hefearten oder Kladen zu verallgemeinern. Es könnte

durchaus sein, dass das Merkmal „Oleogenität“ sich mehrfach unabhängig voneinander entwickelt hat, und es somit mehrere unterschiedliche molekulare Mechanismen gibt. Genom- und Transkriptom-Vergleiche zwischen eng verwandten Arten oder Stämmen innerhalb einer Art, die unterschiedliche Mengen an Lipiden unter identischen Wachstumsbedingungen akkumulieren können, könnten einen Hinweis auf diese Mechanismen geben (Sitepu et al., 2014).

3.2 SCO-Biosynthese

Die Fähigkeit von eukaryotischen oleogenen Mikroorganismen, große Mengen an Lipiden zu akkumulieren, beruht im Vergleich zu nicht-oleogenen Arten nicht auf einen Unterschied in der Fettsäurebiosynthese. Allerdings muss eine kontinuierliche Zufuhr von Acetyl-CoA und NADPH für die Fettsäureproduktion durch die umgekehrte β -Oxidation unter nährstofflimitierten Bedingungen bei einem gleichzeitigen Überschuss an Kohlenstoffquelle gewährleistet sein. Die kontinuierliche Produktion von Acetyl-CoA in oleogenen Mikroorganismen wird durch eine Kaskade von Enzymreaktionen erreicht, die durch eine Nährstofflimitierung (in der Regel eine Stickstofflimitierung, aber Sulfat- oder Phosphatlimitierung sind ebenso möglich) ausgelöst wird, und die im Wesentlichen zu einer Akkumulation von Citrat in den Mitochondrien führt. Ein einzigartiges Merkmal oleogener Organismen ist die Adenosinmonophosphat (AMP) - Abhängigkeit der Isocitratdehydrogenase, einem Enzym des TCA-Zyklus, das die oxidative Decarboxylierung von Isocitrat katalysiert. Im Falle einer Stickstofflimitierung sinkt die AMP-Konzentration in den Mitochondrien, was wiederum die Aktivität der AMP-Desaminase, die die Spaltung von AMP zu Inosinmonophosphat und Ammoniak katalysiert, erheblich erhöht. Infolgedessen wird Isocitrat durch das Enzym Aconitase nicht weiter metabolisiert und Isocitrat wird in Citrat umgewandelt. Citrat wird in das Cytosol transportiert und durch das Enzym ATP:Citratlyase zu Acetyl-CoA und Oxalacetat gespalten, was schließlich zur kontinuierlichen Zufuhr von Acetyl-CoA für die Fettsäuresynthese führt. ATP:Citratlyase wurde bisher in allen beschriebenen oleogenen Mikroorganismen gefunden, ist aber auch in einigen nicht-oleogenen Organismen vorhanden (Botham und Ratledge, 1979; Boulton und Ratledge, 1981a,b; Evans und Ratledge, 1984, 1985; Wynn et al., 2001; Ratledge, 2002).

Neben Acetyl-CoA sind eine Menge Reduktionsäquivalente in Form von NADPH für die Herstellung von Fettsäuren notwendig, da 16 Mol NADPH für die Synthese von 1 Mol Stearinsäure (C18:0) benötigt wird. Woher das NADPH für die SCO-Biosynthese stammt, ist noch nicht endgültig geklärt, aber eine Möglichkeit ist das Malat-Enzym (ME). ME katalysiert die Decarboxylierung von Malat (resultierend aus Oxalacetat) zu Pyruvat, das in die Mitochondrien transportiert wird. Da jedoch berichtet wurde, dass ME bei einigen oleogenen Organismen, z.B. *Y. lipolytica* (Zhang et al., 2013), nicht an der Regeneration von NADPH beteiligt ist, könnten auch alternative Routen verantwortlich sein, wie z.B. der Pentosephosphatweg (Tang et al., 2015; Zhao et al., 2015), oder eine Mischung aus beiden Routen. Diese Möglichkeit wurde u.a. für *R. toruloides* beschrieben (Bommareddy et al., 2015). Ein Überblick über die SCO-Biosynthese ist in Abbildung 19 gegeben.

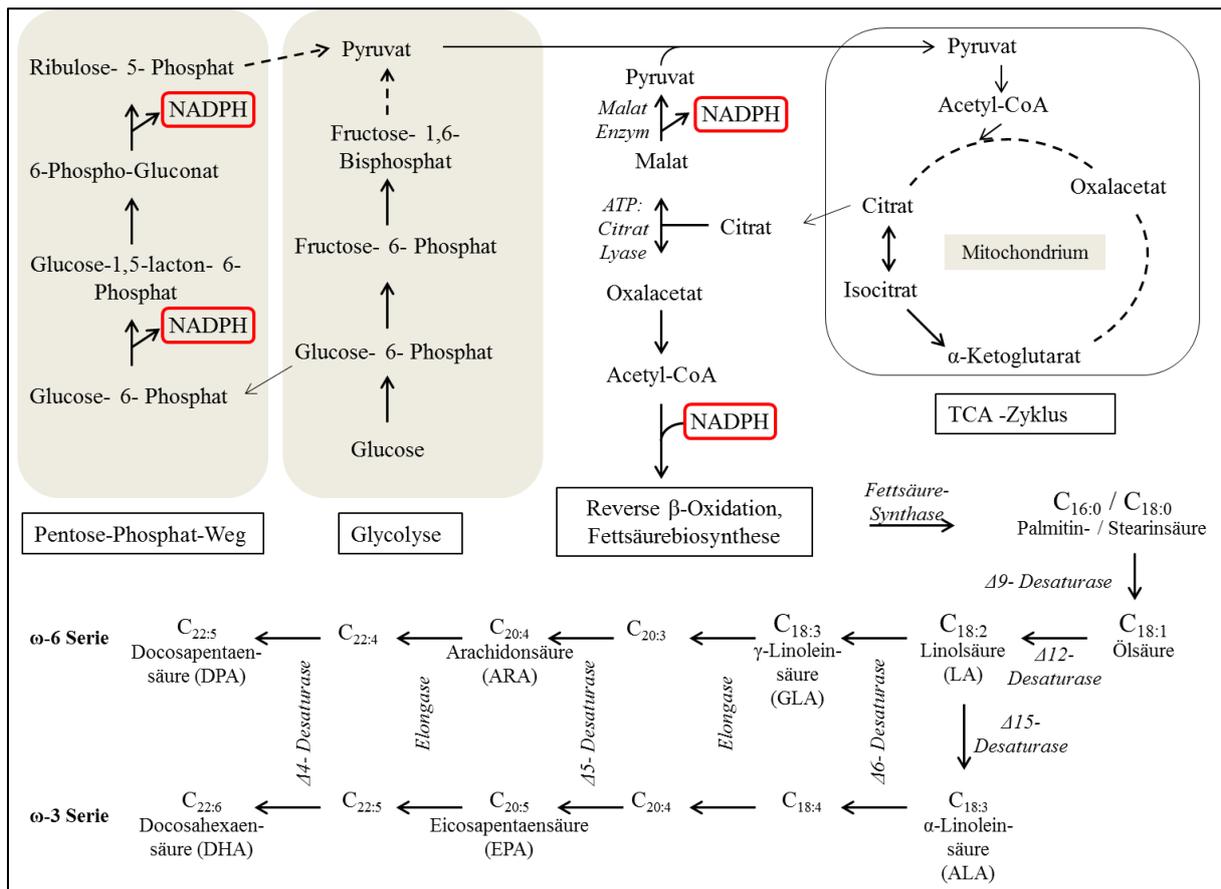


Abbildung 19: Biosynthese von Fettsäuren unter SCO-Produktionsbedingungen in oleogenen eukaryotischen Mikroorganismen (angepasst und modifiziert nach Chemler et al., 2006; Tang et al., 2015) aus Ochsenreither et al., 2016.

Die beschriebene Fettsäurebiosynthese endet in fast jedem Organismus mit der Bildung von Palmitin- (16:0) oder Stearinsäure (18:0). Für die Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist eine anschließende Elongation und Desaturierung durch Elongasen bzw. Desaturasen notwendig. Daher ist die Anzahl an Elongase- und Desaturase-Genen im Genom ein guter Indikator für das Potenzial der produzierbaren PUFAs des jeweiligen oleogenen Organismus.

Die Produkte des Fettsäuresynthese-Komplexes, Palmitoyl-CoA und Stearoyl-CoA, werden in das endoplasmatische Retikulum geleitet, wo sie entweder direkt zur Herstellung von Triacylglyceriden (TAG) verwendet werden, oder zunächst der NADPH-abhängigen Desaturierung oder/und Elongation unterzogen werden, bevor die TAG-Synthese stattfindet. Die Veresterung der Fettsäuren mit dem Glycerin-Grundgerüst findet durch den Kennedy-Biosyntheseweg statt, in dem mehrere Acyl-Transferasen involviert sind (Abbildung 20).

Der erste Schritt besteht aus der Acylierung von Glycerin-3-Phosphat zu 1-Acyl-Glycerin-3-Phosphat (= Lysophosphatidsäure (LPA)). LPA wird weiter durch die LPA-Acyltransferase zu Phosphatidsäure (PA) acyliert, dem wichtigsten Zwischenprodukt aller Glycerophospholipide und TAGs. Nach anschließender Dephosphorylierung durch die PA-Phosphatase wird Diacylglycerin (DAG) freigesetzt (Carman und Han 2009). Nach Meinung mehrerer Autoren ist dies als der wesentliche Schritt in der TAG-Synthese anzusehen, der maßgeblich die Menge an gebildetem TAG bestimmt (Pascual und Carman 2013; Park et al. 2015; Fakas 2017; Hardman et al. 2017). Im letzten Schritt wird DAG entweder durch die Diacylglycerin-Acyltransferase (DGAT) oder die Phospholipid-Diacylglycerin-Acyltransferase zu TAG acyliert. Im Anschluss an ihre Synthese, werden TAGs zusammen mit Sterolestern, Phospholipiden und vielen weiteren Proteinen ins Cytoplasma transferiert, um die Lipidkörperchen (lipid bodies, LB) zu bilden (Adrio, 2017; Dourou et al., 2018).

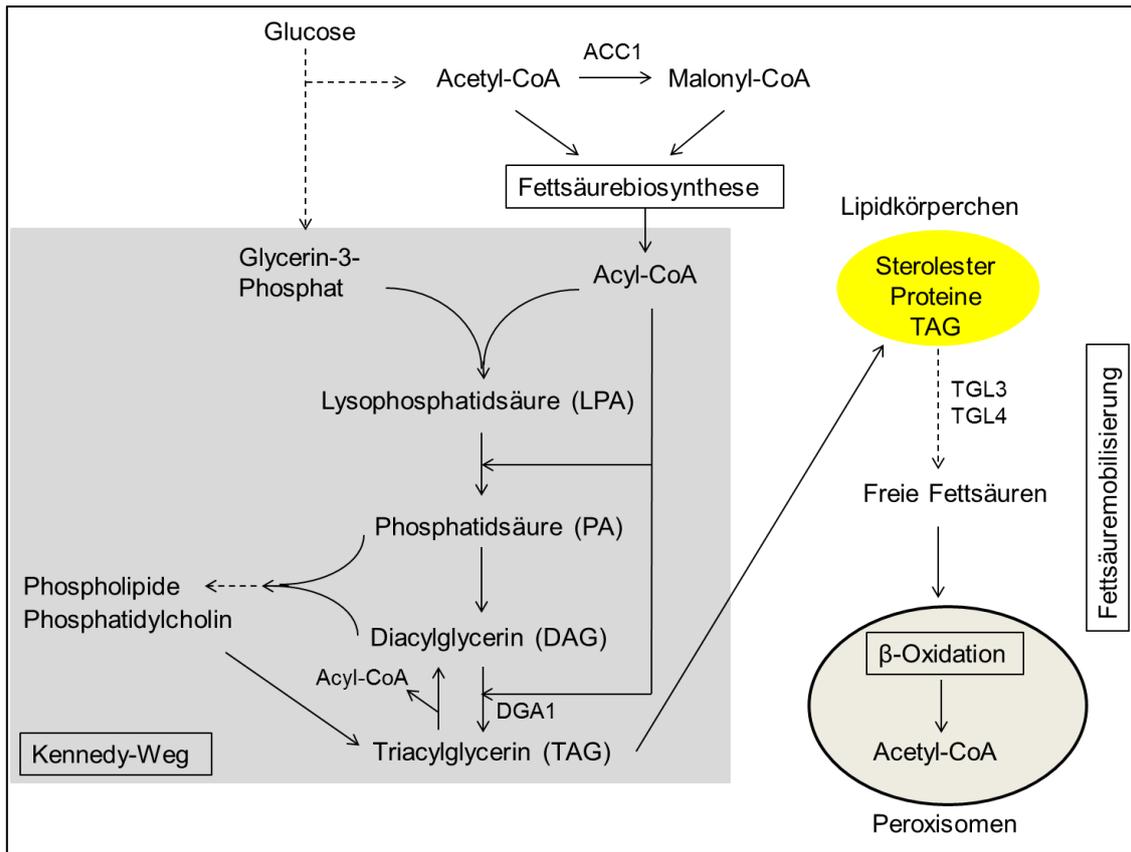


Abbildung 20: Synthese von Triacylglyceriden über den Kennedy-Weg. Der zentrale Metabolit Phosphatidsäure (PA) wird zur Synthese von Diacylglycerin (DAG) und anschließend Triacylglycerin (TAG) verwendet, die in Lipidtröpfchen zusammen mit Sterolestern gespeichert werden können. PA dient auch als Vorläufer für die Bildung von Phospholipiden was u.a. zur Bildung von Phosphatidylcholin führt. Alternativ kann der Kennedy-Pfad DAG für die Phospholipidsynthese bereitstellen. Zur besseren Übersicht wurden Cofaktoren wie ATP und NADH weggelassen. Ausgewählte Enzyme, die im weiteren Text Erwähnung finden, wurden genannt. Nach: Eisenberg und Büttner, 2014; Ledesma-Amaro et al., 2016.

Nach Verbrauch der extrazellulären Kohlenstoffquelle oder aufgrund niedrigerer Aufnahmeraten von weniger bevorzugten Kohlenstoffquellen nutzen oleogene Mikroorganismen ihre eigenen Speicherlipide als Energiequelle für den Erhaltungsstoffwechsel oder als intrazelluläre Kohlenstoffquelle für die Herstellung neuer lipidfreier Verbindungen, sofern essentielle Nährstoffe im Wachstumsmedium vorhanden sind (Alvarez et al. 2000; Makri et al. 2010; Papanikolaou und Aggelis 2011; Dourou et al. 2017). Daher kann die erneute Zugabe einer bevorzugten Kohlenstoffquelle die Verstoffwechslung der SCOs zumindest teilweise unterbinden (Bellou et al. 2016a) (Dourou et al., 2018).

3.2.1 Stammentwicklung durch Metabolic Engineering

Aus dem oben beschriebenen Biosyntheseweg ergeben sich im Wesentlichen vier Angriffspunkte für die Erhöhung der SCO-Produktion durch Metabolic Engineering: (I) Verhinderung des TAG-Abbaus und der Mobilisierung der darin gebundenen Fettsäuren, (II) Ausschalten konkurrierender Biosynthesewege, (III) Optimierung der Acylierung von Glycerin-3-Phosphat zur Bildung von Triacylglyceriden, (IV) Kanalisierung von möglichst viel Acetyl-CoA in und Bereitstellung von möglichst viel NADPH für die Fettsäurebiosynthese.

Native *Y. lipolytica*-Stämme produzieren zwischen 9 und 40 % Lipid pro Biotrockenmasse und gehören damit nicht zu den Top-SCO-Produzenten. Dennoch konnten durch eine Reihe von Knockouts und durch Überexpression sowohl von nativen als auch von heterologen Genen der Lipidanteil der Zellen bis auf 90 % (w/w_{BTM}) gesteigert werden (Lazar et al., 2018). Die Schritte, die zur Steigerung der SCO-Produktion beigetragen haben, haben wichtige Einblicke in die Regulation der SCO-Bildung ermöglicht und das Verständnis für diesen Prozess wesentlich verbessert. Viele Mechanismen konnten zudem bereits auf andere oleogene Hefen, wie z.B. *R. toruloides* übertragen werden.

- Verhinderung des TAG-Abbaus und der Mobilisierung der darin gebundenen Fettsäuren, Ausschalten konkurrierender Biosynthesewege:

Durch Deletion zweier Lipasen (TGL3 und TGL4), die in die Mobilisierung der Fettsäuren aus den TAG involviert sind, resultierte in eine Verdopplung der Lipidakkumulation (Dulermo et al., 2013). Die effektive Blockade der β -Oxidation in den Peroxisomen, verantwortlich für den Abbau der freigesetzten Fettsäuren, kann entweder direkt durch Deletion der fettsäureabbauenden Enzyme oder indirekt durch Ausschaltung von Genen, die die Peroxisomen-Biogenese ermöglichen, erreicht werden, was in einer Steigerung des SCO-Anteils resultiert (Dulermo und Nicaud, 2011; Dulermo et al., 2015). Ebenso ermöglicht die Überexpression von bestimmten Acyl-CoA-Oxidasen, die den ersten Schritt in der β -Oxidation katalysieren, die Bildung besonders großer Lipidkörperchen und die damit einhergehende Ausbildung eines „fetten“ Phänotyps (Mlickova et al., 2004). Die Lipidakkumulation konnte durch die Deletion von Teilen des SNF1-Komplexes, einer der globalen Regulatoren des Lipidmetabolismus in Eukaryoten, um den Faktor 2,6 gesteigert werden und führte zu

einer konstitutiven Lipidakkumulation sogar in Anwesenheit von Stickstoff (Seip et al., 2013). Ebenso führte die Deletion von MIG1, einem Transkriptionsfaktor innerhalb der globalen Katabolitrepression, der die Expression zahlreicher Gene in Anwesenheit von Glucose unterbindet, zu einer 35 %igen Steigerung des Lipidanteils in der Biomasse (Wang Z.P. et al., 2013a). Neben der Einlagerung von Speicherlipiden, ist *Y. lipolytica* auch in der Lage, Glykogen als weiteren bedeutenden Speicherstoff zu bilden. Der Glykogenanteil kann bis zu 16 % der Biotrockenmasse betragen und dessen Bildung wird unter den gleichen Bedingungen wie die SCO-Bildung induziert. Glykogen und TAG-Bildung konkurrieren miteinander um die Einlagerung von Kohlenstoff, weshalb die Elimination des Glykogensyntheseweges einen positiven Effekt auf die SCO-Bildung hat und in einer Steigerung um bis zu 60 % im Vergleich zum Wildtyp resultierte (Bhutada et al., 2017).

- Optimierung der Acylierung von Glycerin-3- Phosphat zur Bildung von Triacylglyceriden

Die erhöhte Bereitstellung von TAG-Vorläufermolekülen steigert ebenfalls den SCO-Anteil der Biomasse. Für die Bildung von TAG wird Glycerin-3-Phosphat (G3P) innerhalb des Kennedy-Weges schrittweise acyliert. Die Menge an G3P kann durch Überexpression von GPD1, einer Dehydrogenase, die G3P aus Dihydroxyaceton-Phosphat synthetisiert, und/oder durch Deletion von GUT2, einer Dehydrogenase, die die Rückreaktion katalysiert, deutlich gesteigert werden. In Kombination mit der Blockade der β -Oxidation konnte ein SCO-Anteil von bis zu 75 % der BTM erzielt werden (Dulermo und Nicaud, 2011).

- Bereitstellung von Acetyl-CoA und NADPH

Durch eine einfach „Push und Pull“-Strategie (Tai und Stephanopoulos, 2013), konnte effektiv mehr Acetyl-CoA in Richtung Fettsäurebiosynthese „gedrückt“ und die gebildeten Fettsäuren in Richtung TAG-Synthese „gezogen“ werden. Dies wurde durch Überexpression von ACC1, das den ersten Schritt in der Fettsäurebiosynthese katalysiert, und DGA1, jener Acyltransferase, die den letzten Schritt in der TAG-Synthese katalysiert, erreicht, und führte zu einer 4-fachen Steigerung des SCO-Anteils.

Die Synthese von Fettsäuren benötigt große Mengen an NADPH. Somit wird die Bildung von SCO durch die verfügbare Menge an NADPH limitiert (Wasylenko et al., 2015). Qiao et al. (2017) implementierten mehrere artifizielle Biosynthesewege in den „Push und Pull“- *Y. lipolytica* Stamm, um überschüssiges cytosolisches NADH in NADPH umzuwandeln. In Bioreaktorexperimenten konnte mit diesem Stamm eine Ausbeute von 0,27 g SCO/g Glucose und die momentan höchste Produktivität von 1,2 g/(l*h) erreicht werden.

Einen umfassenden Überblick über alle bisher konstruierten Stämme geben Lazar et al. (2018). Beim Vergleich der einzelnen Stämme muss allerdings beachtet werden, dass nicht immer der gleiche Ausgangsstamm verwendet wurde und sich daher auch die Ausgangssituation bezüglich der maximalen SCO-Bildung im Wildtyp unterscheidet. Die Menge an akkumulierten SCO eines Stammes wird zudem durch die verwendete Kohlenstoffquelle und den Prozessmodus beeinflusst (z.B. Tai und Stephanopoulos, 2013 vs. Xu et al. 2017). Daher lohnt sich in jedem Fall eine Betrachtung der Produktionsbedingungen und deren Optimierung.

3.3 SCO-Produktion

Die SCO-Produktion ist ein zweistufiger Prozess, in dem sich die SCO-Bildung der Wachstumsphase anschließt. In der Wachstumsphase, bei Vorhandensein aller wichtigen Nährstoffe, wird die Kohlenstoffquelle für die Produktion von Biomasse, reich an Proteinen und Polysacchariden, und Zellproliferation genutzt. Es werden hauptsächlich polare Lipide, wie Phospho- und Glykolipide gebildet, die für die Bildung von Membranen notwendig sind. Der Übergang zur SCO Produktionsphase wird durch die Limitierung eines Nährstoffes bei gleichzeitigem Überschuss an Kohlenstoffquelle induziert. Unter diesen Bedingungen wird Kohlenstoff, wie oben beschrieben, direkt in Richtung Lipidsynthese geleitet und als Folge dessen entstehen innerhalb der Zellen sichtbare Öltröpfchen (Ratledge, 2004; Wynn und Ratledge, 2005). Der typische Verlauf der Lipidakkumulation in oleogenen Mikroorganismen ist in Abbildung 21 dargestellt.

Die SCO-Produktion wird durch eine Reihe von Parametern beeinflusst. Dazu zählen u.a. die Auswahl von Kohlenstoff- und Stickstoffquelle, der Fermentationsmodus, pH,

Temperatur und die Versorgung mit Sauerstoff. Die optimale Kombination all dieser Parameter ist abhängig vom Stamm und kann daher nicht verallgemeinert werden (Carsanba et al., 2018).

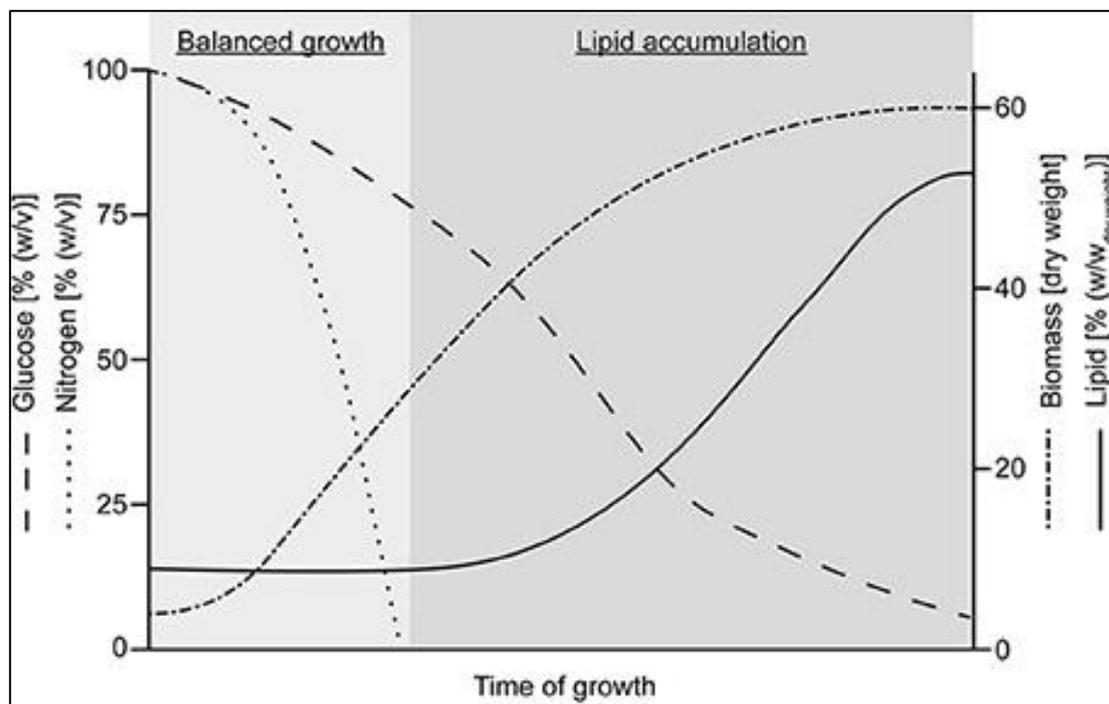


Abbildung 21: Typischer Verlauf der Lipidakkumulation in oleogenen Mikroorganismen (modifiziert nach Wynn und Ratledge, 2005) aus Ochsenreither et al., 2016.

3.3.1 Einflussfaktoren auf die SCO-Bildung und deren Wirtschaftlichkeit

- Stickstoffquellen

In der Literatur werden organische und anorganische Stickstoffverbindungen einzeln oder in Kombination verwendet. Dazu gehören Hefeextrakt, Harnstoff, Pepton, Glycin, KNO_3 , NH_4NO_3 und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Gao et al. (2013) untersuchten den Einfluss der Stickstoffquelle bei der Kultivierung von *M. isabellina* mit Xylose als Kohlenstoffquelle. Die höchste Lipidakkumulation pro Biotrockenmasse (64,2% w/w) wurde mit Hefeextrakt erreicht. Der Einfluss von Stickstoffverbindungen aus Tomatenabfallhydrolysat auf die Glucoseaufnahme wurde von Fakas et al. (2008) untersucht. Die Entfernung von organischem Stickstoff führte zu einer verminderten Glucoseaufnahme und großen Mengen an Biomasse mit niedrigem Lipidgehalt. Die

Lipidakkumulation wurde bei Verwendung von Glycerin als Kohlenstoffquelle nicht beeinflusst (Fakas et al., 2008). Organische Stickstoffquellen scheinen die SCO-Produktion positiv zu beeinflussen, ebenso wie die Zugabe von geringen Mengen an organischem Stickstoff während der SCO-Produktionsphase (Bellou et al., 2016a). Neben der Auswahl einer geeigneten Stickstoffquelle beeinflusst auch das C/N-Verhältnis die Lipidakkumulation. Die in der Literatur angegebenen Verhältnisse reichen von 35 bis 340 mol C pro mol N (Papanikolaou et al., 2004; Fakas et al., 2009a; Ruan et al., 2012).

- Kohlenstoffquellen

Der Einsatz kostengünstiger Substrate ist für die Wirtschaftlichkeit der SCO-Produktion entscheidend. Gleichzeitig kann bei Verwendung von Rest- und Abfallströmen die Umwelt entlastet werden. In der Literatur finden sich eine Vielzahl an Studien, die kostenneutrale Substrate für die nachhaltige Produktion von SCOs verwenden, darunter Rohglycerin aus der Biodieselherstellung, Lignocellulosehydrolysate und kurzkettige und daher flüchtige Fettsäuren (VFA) (Qin et al., 2017b).

Rohglycerin fällt bei der Biodieselproduktion in großen Mengen (10 % (w/w)) an und besteht aus ca. 80% Glycerin, 10% Wasser, 7% Asche und weniger als 1% Methanol (Bauer und Hulteberg, 2013). Die Reinigung von so großen Mengen an Rohglycerin ist aufwändig und zu teuer für kleine und mittelgroße Unternehmen (Kolouchová et al., 2016). Rohglycerin wird daher in den meisten Ländern als Industrieabwasser angesehen (Signori et al., 2016) und verschlechtert die Umweltbilanz von Biodiesel. Viele Mikroorganismen sind in der Lage, Glycerin als Kohlenstoffquelle für ihr Wachstum und die Synthese von Wertprodukten zu verwenden. Im Vergleich zu Zuckern ist Glycerin stärker reduziert und führt zu einer erhöhten Synthese von NADH im Zellmetabolismus. Zusätzlich dazu wird durch die Verwendung von Glycerin die Katabolitrepression vermieden. Die Verwendung von sauberem Glycerin ist für die meisten biotechnologischen Prozesse jedoch zu kostspielig. Daher wäre die Verwendung von Rohglycerin eine lohnende Alternative. Im Gegensatz zu reinem Glycerin enthält Rohglycerin weitere Makroelemente, die von den Mikroorganismen genutzt werden können. Die Reintegration von Biodiesel-Glycerin für die Kultivierung von oleogenen Hefen sorgt also nicht nur für eine Kostenreduktion der SCO-

Produktion, sondern verbessert auch die Umweltbilanz der Biodieselproduktion. Rohglycerin erwies sich als eine geeignete Kohlenstoffquelle für die SCO-Produktion mit vielen oleogenen Hefen (Qin et al., 2017b). Im Vergleich zu Kultivierungen mit Glucose oder sauberem Glycerin konnten durch die Verwendung von Rohglycerin höhere Konzentrationen an Biomasse und ein höherer Lipidanteil mit *R. toruloides* erzielt werden. Die im Rohglycerin enthaltenen Verunreinigungen, wie Salze und Tenside, schienen die SCO-Produktion eher positiv zu beeinflussen (Xu J. et al., 2012).

Ebenso können landwirtschaftliche Abfälle oder Nebenprodukte als Substrate für die SCO-Produktion genutzt werden. Bereits getestet wurden unter anderem Orangenschalen (Gema et al. 2002), Birnentrester (Fakas et al. 2009b), Süßsorghum (Economou et al. 2010; Matsakas et al. 2014), Abwässer aus der Olivenölherstellung, die mit weiteren kostengünstigen Kohlenstoffquellen angereichert wurden (z.B. Glucosesirup, Glycerin, etc.) (Sarris et al. 2011; Bellou et al. 2014; Dourou et al. 2016; Arous et al. 2017; Sarris et al. 2017), Molke (Vamvakaki et al. 2010; Tsolcha et al. 2015), Reishülsen (Economou et al. 2011), Lignocellulose-Hydrolysate (Ruan et al. 2013, 2014; Gardeli et al. 2017), Getreide (Čertík et al. 2013) und Hydrolysate von Nebenströmen aus der Weizenmehl- und Süßwarenindustrie (Tsakona et al. 2014, 2016; Arous et al. 2017).

Acetat ist ein weiteres, häufig anfallendes (Neben-)Produkt bei einer Reihe von Prozessen, z.B. bei der Hydrolyse oder Pyrolyse von lignocellulosehaltiger Biomasse, Syngas-Fermentation oder anderer anaerober Bioprozesse. Acetat wird nach der Aufnahme direkt zu Acetyl-CoA umgewandelt und in die Fettsäurebiosynthese eingeschleust. Acetat und auch andere flüchtige Fettsäuren, wie Propionat und Butyrat wurden bereits erfolgreich als Kohlenstoffquelle für viele oleogene Hefen eingesetzt (Hu et al., 2009; Fei et al., 2011; Chi et al., 2011; Xu et al., 2015; Béligon et al., 2015; Gong et al., 2015). Höhere Konzentrationen an Acetat und VFA sind meist toxisch für die Zellen (Ruan et al., 2015), daher müssen kontinuierlich niedrige Mengen zugefüttert werden, um die Toxizitätsgrenze nicht zu überschreiten. Allerdings können Acetat und VFAs nicht nur als Kohlenstoffquelle, sondern auch gleichzeitig als pH-Korrekturmittel eingesetzt werden. Dies ermöglicht die automatische Zufuhr an Kohlenstoffquelle, wenn der pH aufgrund der

Metabolisierung der Säuren steigt, so dass eine kontinuierliche pH-Stat Kultivierung durchgeführt werden kann (Chi et al., 2011).

- Sauerstoffzufuhr

Allgemein betrachtet, hat die Menge an verfügbarem Sauerstoff einen starken Effekt auf Wachstum, Metabolismus und auch auf die Fettsäurezusammensetzung mikrobieller Lipide. Dennoch bestehen Unterschiede zwischen Crabtree-negativen und Crabtree-positiven Organismen (Ratray et al., 1975): Bei Crabtree-positiven Hefen, wie z.B. *S. cerevisiae* ist die Gesamtmenge an Lipiden unter anaeroben Bedingungen niedriger als unter aeroben Bedingungen und die Fettsäurezusammensetzung wird von C16:0 und C18:0 unter aeroben Bedingungen zu kürzerkettigen Fettsäuren verschoben (Ratray et al., 1975). Crabtree-positive Organismen gären bei (zu) hohen Glucosekonzentrationen und bilden z.B. Ethanol als Nebenprodukt. Diese Nebenproduktbildung ist bei Crabtree-negativen Hefen, z.B. *Scheffersomyces stipitis*, *Cyberlindnera jadinii* (früher bekannt als *Candida utilis*) nicht von der Glucosekonzentration abhängig, sondern von der Sauerstoffkonzentration. Ethanolbildung findet daher bei Sauerstofflimitierung bzw. anaeroben Bedingungen statt (Papini et al., 2012). Für *Candida* Spezies (Crabtree-negativ) wurde festgestellt, dass die gebildete Lipidmenge nicht von der Begasungsrate abhängt, wohl aber die Fettsäurezusammensetzung. Unter aeroben Bedingungen erhöhte sich der Anteil an ungesättigten Fettsäuren. Es wurde allgemein geschlussfolgert, dass die Menge und Art an gebildeten Metaboliten mit der Kapazität der Atmungskette zusammenhängt (Ratray et al., 1975). Daher könnte mit der Begasungsrate und somit der Konzentration an gelöstem Sauerstoff auch die Nebenproduktbildung bei oleogenen Organismen gesteuert werden. *Y. lipolytica* bildet unter hohen Gelöstsauerstoffkonzentrationen größere Mengen an Citrat als Nebenprodukt (Kavšček et al., 2015), daher muss die Begasungsrate sorgfältig gewählt werden, um die Ausbeute des Hauptprodukts, SCO, zu maximieren. Die Korrelation von Sauerstoffbedarf und SCO-Produktion scheint allerdings je nach Spezies zu variieren und muss daher empirisch bestimmt werden (Sitepu et al., 2014; Calvay et al., 2016).

Für einige Spezies ist eine gute Versorgung mit Sauerstoff Voraussetzung für die SCO-Bildung. *Pichia segobiensis* DSM 27193 beispielsweise bildet in

Schüttelkolbenkultivierungen nur etwa 11 % SCO, und kann deshalb unter diesen Bedingungen laut Definition nicht als oleogene Spezies bezeichnet werden, während in Bioreaktorkultivierungen ein SCO-Anteil von ca. 25 % erreicht wurde und somit als oleogen gilt (Schulze et al., 2014). Ebenso wird in *Y. lipolytica* die SCO-Produktion unter mikro-aeroben oder anaeroben Bedingungen gehemmt. Der Sauerstoffbedarf für die Lipidbildung konnte allerdings in redox-optimierten Stämmen, bei denen die Verfügbarkeit von NADPH erhöht wurde, erheblich gesenkt werden. In diesen Stämmen kann NADPH aus NADH gewonnen werden und die Autoren vermuten, dass die Regeneration von NADH weniger Sauerstoff benötigt als von NADPH (Qiao et al., 2017). Daher könnte bei *Y. lipolytica* und eventuell auch bei *P. segobiensis* tatsächlich ein Zusammenhang zwischen der Kapazität der Atmungskette, Redoxäquivalente in ausreichender Menge zur Verfügung zu stellen, und der Metabolitproduktion bestehen. Bei ausreichender Menge an Sauerstoff wird NADPH kontinuierlich regeneriert und es findet Lipidproduktion statt. Dies kann bis zu einem gewissen Grad mit steigenden Sauerstoffkonzentrationen gesteigert werden. Bei zu hohen Sauerstoffkonzentrationen erreicht die NADPH Regeneration und somit die Lipidproduktion ihr Maximum. Citrat wird aus dem TCA-Zyklus schneller zur Verfügung gestellt als in die Lipidbiosynthese abfließen kann. Es häuft sich daher an und wird als Hauptnebenprodukt sekretiert.

Auch bei anderen Spezies, z.B. *Apiotrichum porosum* DSM 27194 (früherer Name: *Trichosporum porosum*) wird die SCO-Bildung bei guter Begasung erhöht: 24,5 % im Schüttelkolben vs. 34 % im Bioreaktor, während bei einigen Spezies, z.B. *Saitozyma podzolica* DSM 27192 (früherer Name: *Cryptococcus podzolicus*) und *Cutaneotrichum oleaginosum* ATCC 20509 (früherer Namen: *Cryptococcus curvatus*, *Apiotrichum curvatum*) die Lipidbildung nicht durch die Gelöstsauerstoffkonzentration beeinflusst wird (Schulze et al., 2014). Ebenso führte die Kultivierung von *M. isabellina* im Bioreaktor lediglich zu höheren Biomassekonzentrationen, aber nicht zu einem höheren Lipidanteil in den Zellen im Vergleich zu Schüttelkolbenkultivierungen (Chatzifragkou et al., 2010). Ein Vergleich von Schüttelkolbenkultivierungen mit und ohne Schikanen für *Schizochytrium* sp. zeigte wiederum, dass die Verwendung von Schüttelkolben mit Schikane die Biomasseproduktion, die Lipidakkumulation und die Konzentration von Docosahexaensäure erhöht (DHA, 22:6, ω -3; Ling et al., 2015).

Das Ziel einer Prozessoptimierung sollte nicht nur die Erhöhung des Lipidanteils in den Zellen, sondern auch die Verbesserung der Produktivität sein. So resultierte eine erhöhte Begasungsrate in Bioreaktorkultivierungen mit *R. toruloides* zwar zu einer erhöhten Wachstumsrate, jedoch auch zu einer Verringerung des Lipidgehaltes in den Zellen. Die Produktionsrate blieb dabei konstant bei etwa 0,012 g Lipid/g Biotrockenmasse * h. (Choi et al., 1982). Turcotte und Kosaric (1989) beschrieben, dass der Sauerstoffbedarf nach dem Eintreten der Stickstofflimitierung kurzfristig steigt, dann aber wieder fiel.

Auch wenn nicht bei allen oleogenen Hefespezies die SCO-Produktion bei niedrigeren Sauerstoffkonzentrationen gehemmt wird, sollte doch eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff sichergestellt werden, da die Sauerstoffversorgung einen Einfluss auf die spezifische Wachstumsrate und die Biomassekonzentration hat. Bei einem intrazellulären Produkt wie SCO bedeutet eine hohe Zelldichte eine hohe Produktkonzentration, so dass möglichst hohe Zelldichten erreicht werden sollten. Eine hohe Zelldichte wiederum bedeutet einen hohen Bedarf an Sauerstoff. In eigenen Experimenten (siehe Abschnitt 3.6) korreliert der Verbrauch der C-Quelle mit der Gelöstsauerstoffkonzentration (DOC). Daher könnte man die Zufütterung der C-Quelle mit der DOC koppeln, um den Prozess zu automatisieren.

- Wirtschaftlichkeit

In der Literatur sind nur wenige Studien zu finden, die die Wirtschaftlichkeit der SCO-Produktion bewerten, und deren Fazit unterscheidet sich je nach analysiertem Szenario beträchtlich. In einigen Studien, wie z.B. von Koutinas et al. (2014) und Ratledge und Cohen (2008), wird die SCO-Produktion mit Hefen im Vergleich zu der aus Pflanzenöl als teurer und damit als unwirtschaftlich angesehen. In der techno-ökonomischen Analyse von Koutinas et al. (2014) wurde die Biodieselherstellung mit SCO von *R. toruloides* betrachtet. Als Grundlage dienten dazu die ermittelten Ergebnisse von Li et al. (2007). In die Analyse flossen die fermentative Produktion mit Glucose als C- und Hefeextrakt als N-Quelle, Aufarbeitung und Extraktion sowie zwei unterschiedliche Szenarien für die Biodieselherstellung (direkte oder indirekte Transesterifizierung) im Maßstab einer jährlichen Produktion von 10.000 t SCO ein. Fast 80% der Herstellungskosten von 5,50 \$/kg SCO waren auf die Verwendung von

Glucose zurückzuführen, aber auch die Investitionskosten für die Produktionsanlage, die mit 71,5 Mio. \$ berechnet wurden, waren beachtlich.

Mehrere Studien (Lin et al., 2011; Fei et al., 2011; Park et al., 2014; 2017;) bewerteten die Wirtschaftlichkeit der SCO-Produktion für die Biodieselherstellung unter Verwendung von VFAs als Kohlenstoffquelle. Trotz unterschiedlicher Annahmen in Bezug auf Produktivitäten, Ausbeuten und Produktionsmaßstäbe, und ob Investitionskosten miteinbezogen wurden oder nicht, berechneten alle Studien einen Preis zwischen 1,70 \$/kg SCO (für eher kleinere Anlagen mit 20.000 t/a Produktionskapazität) und 0,88 \$/kg SCO (für größere Anlagen mit 1.000.000 t/a Produktionskapazität), wenn Substratkosten mit bis zu 0,60 \$/kg VFA anfallen. Dieser Preis sinkt drastisch auf 0,35 \$/kg SCO, wenn VFA als Kohlenstoffquelle kostenfrei bezogen werden konnten. Bei einem derartigen Preis für die SCO-Produktion (0,35 \$/kg SCO = 0,3 \$/L) könnte Biodiesel auf jeden Fall wirtschaftlich hergestellt werden, da der Pflanzenöl-Biodieselpreis laut Ricardo et al. (2017) bei 0,81 \$/L liegt.

Trotz aller Unterschiede zwischen den einzelnen Studien können dennoch folgende allgemeine Aussagen getroffen werden (Vasconcelos et al., 2019) (Abbildung 22):

1. Die Produktionskapazität der Anlage hat einen großen Einfluss auf die endgültigen Produktionskosten. Je größer die Anlagenkapazität ist, desto kleiner wird der Einfluss der Investitionskosten auf die Gesamtkosten.
2. Die Kosten für das Medium, insbesondere für die Kohlenstoffquelle, machen den Großteil der Kosten für die SCO-Produktion aus. Die Produktion von SCO für niedrigpreisige Anwendungen, wie die Herstellung von Kakaobutteräquivalenten oder Biodiesel, kann niemals wirtschaftlich sein, wenn Glucose verwendet wird. Die Kosten für die Kohlenstoffquelle müssen hierzu so niedrig wie möglich sein, aber dennoch hohe Ausbeuten und Produktivitäten ermöglichen. Deshalb sind Lignocellulosehydrolysate oder VFAs momentan die vielversprechendsten Kandidaten.
3. Der zweitgrößte Anteil der Produktionskosten wird durch den Fermentationsprozess, hauptsächlich aufgrund der hohen Investitionskosten und des Energiebedarfs, verursacht. Hier können große Anlagen zur Verringerung der Investitionskosten beitragen (siehe 1.). Energiekosten

könnten gesenkt werden, wenn SCO-Produktionsanlagen an andere Produktionsanlagen gekoppelt werden, die viel Abwärme produzieren.

4. Der drittgrößte Anteil besteht aus den Aufarbeitungskosten. Obwohl nur an dritter Stelle genannt, stellen sie nichtsdestotrotz einen signifikanten Anteil an den Gesamtkosten dar. Hier werden kostengünstige und effektive Methoden benötigt, insbesondere, wenn die direkte Transesterifizierung nicht in Frage kommt (siehe Abschnitt 3.4).

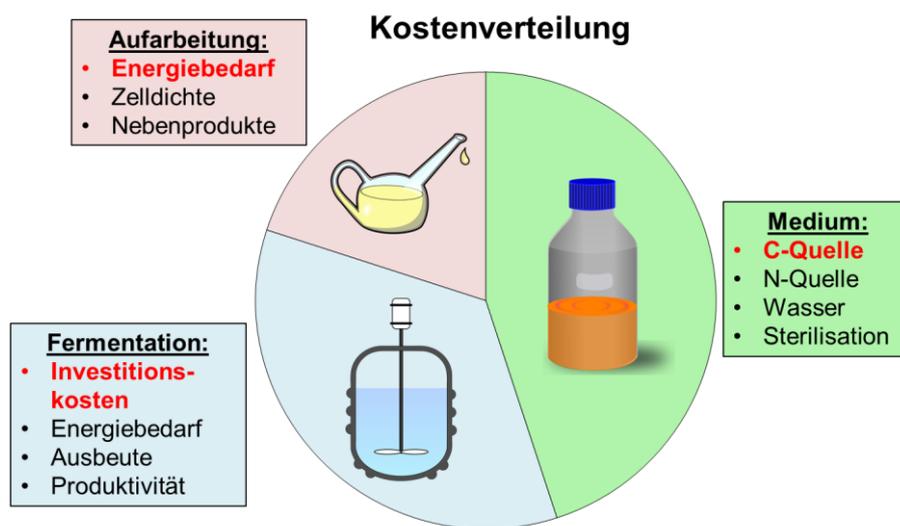


Abbildung 22: Kostenverteilung bei der mikrobiellen Einzellerölproduktion. Hauptkostenträger stellt die Medienzubereitung und insbesondere die Kohlenstoffquelle dar. An zweiter Stelle steht der Fermentationsprozess und hier insbesondere die nötigen Investitionskosten für die Produktionsanlage. Der drittgrößte Kostenanteil besteht aus der Aufarbeitung der intrazellulären Einzelleröle, wobei hier die Energiekosten den größten Anteil ausmachen. Nach Vasconcelos et al. (2019).

3.3.2. Prozessmodi

Prozesse zur mikrobiellen SCO-Produktion können entweder als Submers-Kultivierung oder im Festbettreaktor durchgeführt werden.

- Submerskultivierung

Submerskultivierungen können als Batch-, Fedbatch-, Repeated Batch- oder kontinuierliche Fermentation durchgeführt werden. Der Batch-Modus wird hauptsächlich im Schüttekolbenmaßstab eingesetzt, um nach neuen oleogenen Hefen zu suchen, deren Potenzial zu beurteilen und die optimalen Kultivierungsbedingungen zu bestimmen. Für Bioreaktorkultivierung wird fast ausschließlich der Fed-Batch Modus gewählt, da hier die bislang höchsten Produktivitäten für die oleogenen Hefen *Y. lipolytica*, *R. toruloides*, und *L. starkeyi* erzielt wurden (Vasconcelos et al., 2019). Für *C. oleaginosum*/*C. curvatus* wurden außerdem der Repeated-Batch Modus mit partiellem Biomasserecycling und ein kontinuierlicher Prozess mit Acetat erfolgreich getestet (Dillschneider et al., 2014; Gong et al., 2015). Wie oben beschrieben, können mit VFAs sehr leicht kontinuierliche Prozesse entwickelt werden. Dieses Konzept wurde ebenfalls in eigenen Forschungsarbeiten mit *S. podzolica* (*C. podzolicus*) und *A. porosum* (*T. porosum*) umgesetzt (Qian et al., 2019a).

Um möglichst viel Kohlenstoff in Form von SCO zu binden, wurden in einem integrierten Prozess die heterotrophe Kultivierung von *C. curvatus* mit einem phototrophen Prozess kombiniert. Das durch die Hefe freigesetzte CO₂ diente der oleogenen Mikroalge *Phaeodactylum tricornutum* als Kohlenstoffquelle für deren SCO-Produktion. Durch das unterschiedlich schnelle Wachstum beider Mikroorganismen wurden während einer Kultivierungsphase mit der Mikroalge über 15 Tage, drei Repeated-Batch Kultivierungen à 5 Tage mit der Hefe durchgeführt. In allen Prozessen wurde jeweils ein Lipidgehalt von ca. 40-45% (w/w) erreicht (Dillschneider et al., 2014). Hu et al. (2016) koppelten die Syngas-Fermentation mit *Moorella thermoacetica* und die SCO-Produktion mit *Y. lipolytica*, sodass SCO indirekt aus Kohlenmonoxid/Kohlendioxid und Wasserstoff über Acetat hergestellt werden konnte. Ein Lipidanteil von 36 % wurde in diesem Prozess erzielt.

Ein weiterer Ansatz ist die Co-Produktion von SCO mit weiteren Wertprodukten. Da die Produktion von weiteren Metaboliten für die Aufrechterhaltung des Stoffwechsels unvermeidlich ist, kann ein effektives Co-Produktionssystem vorteilhafter sein als die Inhibierung oder Deletion von Genen, die verantwortlich für die Synthese von Nebenprodukten sind, da so eventuell Stoffwechselungleichgewichte verhindert werden können (Liang und Qi, 2014). Darüber hinaus kann die Co-Produktion von SCO mit anderen Wertprodukten die optimale Nutzung von Nährstoffen im Kultivierungsmedium gewährleisten und so die Wirtschaftlichkeit der mikrobiellen Lipidproduktion verbessern (Zhang C. et al., 2016b). Mit der Co-Produktion z.B. von PHA mit Proteinen, Alkoholen und Biotensiden (Li et al., 2017); β -Galactosidase mit Ethanol (You et al., 2017); Erythritol mit Lipase (Liu X et al., 2017) und Milchsäure mit Chitin (Liu et al., 2010) wurden erfolgreiche Präzedenzfälle geschaffen. Einige Co-Produktionssysteme von SCO mit anderen Chemikalien wurden publiziert, von denen die meisten sich allerdings auf die Co-Produktion mit Bioethanol (Kim I. et al., 2015), Proteinen (Halim et al., 2016) und einigen fettlöslichen Produkten wie dem Carotinoid Fucoxanthin und anderen Pigmenten (Saenge et al., 2011; Bai et al., 2011; Gao et al., 2017) beschränkten. Der Co-Produktion von SCO mit anderen Grundchemikalien wurde bisher nur wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Beispiele hierfür wären z.B. die mögliche Co-Produktion von SCO und Citrat mit *Y. lipolytica* (noch nicht umgesetzt) oder von SCO mit Gluconsäure mit *S. podzolica* (Schulze et al., 2014; Qian et al., 2019b).

- Festbettprozesse (SSF)

Bei der Kultivierung auf Feststoffen werden natürliche mikrobiologische Prozesse imitiert, die auch in der Lebensmittelproduktion, Kompostierung und Silierung Anwendung finden (Pandey et al., 1999). Im Allgemeinen sind die Vorteile von SSF eine höhere Produktivität, die Möglichkeit der Verwendung kostengünstiger Medien, sowie reduzierte Energie- und Abwasserkosten. Nachteile sind beispielsweise Schwierigkeiten bei der Skalierbarkeit, bei der Kontrolle der Prozessparameter und steigende Kosten für die Produktaufarbeitung (Couto und Sanromán, 2006; Asadi et al., 2015).

Die Mengen der produzierten SCO werden in Gewichtsprozent bezogen auf die getrocknete Mischung aus Substrat und Biomasse angegeben und sind daher

schwer zu vergleichen. Die erreichten Werte liegen zwischen 1,7 und 15,8% SCO pro fermentierter Feststoffmasse. Hohe Mengen an besonders wertvollen PUFAs wurden in SSFs mit *Mortierella*-Arten produziert (Fakas et al., 2009b; Stressler et al., 2013). Um die Kosten zu senken, werden agroindustrielle Produkte oder Rückstände wie Weizenstroh, Getreideprodukte (Kleie, Stroh) und organische Abfälle (Orangenschalen, Birnentrester, Presskuchen, Brauereiabfälle) als Substrate für SSF-Prozesse verwendet (Conti et al., 2001; Gema et al., 2002; Fakas et al., 2009b; Jacobs et al., 2010; Lin et al., 2010; Stressler et al., 2013). In Abhängigkeit vom Substrat und der enzymatischen Aktivität des Produktionsstammes ist eine Vorbehandlung des Substrats (chemisch oder enzymatisch) erforderlich, um unlösliches Material in verfügbare Monomere zu zerlegen (Peng und Chen, 2008). Lin et al. (2010) zeigten die direkte mikrobielle Umwandlung von Cellulose und Weizenstroh durch *Aspergillus oryzae*. Darüber hinaus wird das Substrat oft mit Stickstoff ergänzt, um ein ideales C/N-Verhältnis zu erhalten (Ochsenreither et al., 2016).

3.4 Aufarbeitung der SCOs

Als intrazelluläre Speicherlipide, müssen SCOs für jede nachfolgende Anwendung zunächst extrahiert werden. Die einzige Alternative dazu wären Produktionsstämme, die in Lage sind, TAGs oder freie Fettsäuren zu sekretieren, was die Weiterverarbeitung drastisch vereinfachen würde. Die erfolgreiche Sekretion von TAGs wurde allerdings bisher nicht für oleogene Mikroorganismen berichtet, sondern lediglich für genetisch modifizierte *E. coli* - (Lu et al., 2008; Lennen und Pfleger, 2012; Liu et al., 2012; Meng et al., 2013; Xu et al., 2013) und *S. cerevisiae* - Stämme (Michinaka et al., 2003; Leber et al., 2015), die für nicht-oleogene Organismen vergleichsweise große Mengen an Lipiden oder Fettsäuren bilden. Trotz der Tatsache, dass viele Hefestämme in der Lage sind, amphiphile Moleküle zu sekretieren, wurden bisher nur sehr geringe Mengen an Glyceriden extrazellulär nachgewiesen. Glyceride werden vor allem aufgrund von Zellyse und nicht etwa durch aktive Transportprozesse in die extrazelluläre Umgebung abgegeben (Dourou et al., 2018).

Für die Extraktion von Lipiden aus mikrobieller Biomasse ist der Zellaufschluss von entscheidender Bedeutung, da dessen Effizienz direkt die nachfolgenden Aufarbeitungsschritte und die Extraktionseffizienz insgesamt stark beeinflusst (Senanayake und Fichtali, 2006). Prinzipiell stehen eine Vielzahl von Zellaufschluss- und Lipidextraktionsmethoden zur Verfügung, die grob in mechanische und nicht-mechanische Verfahren unterteilt werden können. Dennoch reduziert sich das Methodenspektrum abhängig von Mikroorganismus, Maßstab, Kostendruck und nachfolgender Verwendung der Lipide auf einige wenige Verfahren. Zum Beispiel können mikrobielle Lipide, die in der Lebensmittelindustrie eingesetzt werden sollen, nicht mit toxischen Lösungsmitteln extrahiert werden, bzw. Lösungsmittel sollten in diesem Fall möglichst ganz vermieden werden, um Lösungsmittelrückstände in Lebensmitteln oder Verunreinigungen mit Schwermetallen zu vermeiden (Uematsu et al., 2002; Sahena et al., 2009). Außerdem können einige Methoden zwar für analytische Zwecke sehr gut geeignet, aber dennoch, aufgrund hoher Kosten oder nicht skalierbarer Extraktionsverfahren, nicht in industriellen Maßstab anwendbar sein. Darüber hinaus muss eine für einen bestimmten Stamm optimierte Methode nicht zwangsläufig auf einen anderen Stamm übertragbar sein. Wie in Vergleichsstudien mit Mikroalgen gezeigt wurde, müssen Extraktionsmethoden individuell für jeden Stamm optimiert werden (Lee et al., 2010; Li Y. et al., 2014). Unter Berücksichtigung dieser Einschränkungen sollte die optimale Extraktionsmethode eine schnelle, reproduzierbare, quantitative, kostengünstige und ungiftige Extraktion der Lipide unter milden Bedingungen ermöglichen, um oxidative Schäden an mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu vermeiden.

Literatur, die systematisch groß angelegte Zellaufschluss- und Extraktionsmethoden vergleicht, ist eher spärlich vorhanden. Da die SCO-Produktion mit Algen in den letzten Jahren jedoch immer mehr an Bedeutung zu gewinnen scheint, liegen inzwischen mehrere aktuelle Vergleichsstudien über die Extraktion von Algenlipiden vor. In Bezug auf SCO-Extraktion aus oleogenen Hefen und filamentösen Pilzen ist noch weniger Literatur zu finden. Die meisten dieser Studien vergleichen verschiedene Lösungsmittelextraktionsmethoden, zermahlen jedoch per Hand das in flüssigem Stickstoff-gefrorene Myzel mechanisch im Mörser. Diese Ergebnisse sind schlecht auf einen größeren Maßstab übertragbar, könnten aber am ehesten mit einem Aufschluss in der Kugelmühle verglichen werden.

Im Folgenden wird ein Überblick über gängige Zellaufschluss- und Extraktionsmethoden gegeben (zusammengefasst auch in Tabelle 10).

3.4.1 Mechanische Aufschlussmethoden

Der Zellaufschluss durch mechanische Methoden erfolgt aufgrund von Kavitation, Scherbelastung und/oder Zellkollisionen, die durch hohen Druck, Reibung oder Ultraschall verursacht werden und zu einer unspezifischen Zerstörung der Zellwand führt (Chisti and Moo-Young, 1986; Harrison, 1991; Middelberg, 1995; Geciova et al., 2002). Mechanische Aufschlussmethoden werden oft mit einer anschließenden Lösungsmittlextraktion kombiniert. Im Hinblick auf die Effektivität des Zellaufschlusses haben mechanische Methoden ein großes industrielles Potenzial, da die Effizienz dieser Methoden weniger abhängig von der mikrobiellen Spezies zu sein scheinen (Klimek-Ochab et al., 2011; Lee et al., 2012) und viele davon im industriellen Maßstab anwendbar sind. Eine Verunreinigung der mikrobiellen Lipide durch Chemikalien ist unwahrscheinlich, solange keine Chemikalien zur Vorbehandlung verwendet werden. Beim Einsatz mechanischer Methoden kommt es jedoch zu Hitzeentwicklung, was eine Kühlung erforderlich macht, um Schäden an wärmeempfindlichen Lipiden zu vermeiden (Geciova et al., 2002; Lee et al., 2010; Lee et al., 2012). Die meisten der derzeit verwendeten Geräte wurden ursprünglich für andere kommerzielle Zwecke wie die Homogenisation und Dispersion von Farbe oder Milch entwickelt, konnten aber erfolgreich für den Zellaufschluss angepasst werden (Chisti und Moo-Young, 1986). Die Gewinnung von SCO durch mechanische Pressung, wie sie häufig für Ölsaaten wie Sonnenblume oder Raps verwendet wird, ist für Mikroorganismen nicht effektiv, da die Zellen aufgrund ihrer geringen Größe die Presse umgehen können. Darüber hinaus erfordert der obligatorische Trocknungsprozess vor dem Pressen viel Energie (de Boer et al., 2012). Der Zellaufschluss oleogener Hefen per Kugelmühle, Hochdruckhomogenisator und Ultraschall wurde im Rahmen der eigenen Projekte untersucht und wird daher im Folgenden näher beschrieben.

Tabelle 10: Vergleich gängiger Zellaufschluss- und Extraktionsmethoden für Mikroorganismen

Methode	Vorteile	Nachteile	Skalierbarkeit	Bemerkungen
Mechanische Methoden				Stark abhängig von der Spezies, effektiv, keine Produktkontamination
Kugelmühle	Einfach und effizient	Wenig effizient für Bakterien	Labor- bis Industriemaßstab	
Hochdruck-Homogenisator	Industriell gut etabliert für andere Anwendungen	Weniger geeignet für filamentöse Pilze	Labor- bis Industriemaßstab	
Ultraschall	Kann auch kontinuierlich betrieben werden	Hitzeentwicklung und Bildung von Radikalen	Nur im kleinen Maßstab anwendbar	
Physikalische Methoden				Begrenzte Skalierbarkeit
Dekompression	sanft, minimiert chemischen und physikalischen Stress und Hitzeentwicklung	Weniger geeignet für Mikroorganismen mit rigider Zellwand, z.B. Hefen, Pilze und Sporen	Möglicherweise auch im größeren Maßstab anwendbar	
Osmotischer Schock	sanft, Mikroorganismen mit Zellwand werden nur geschwächt, aber nicht zerstört	Hohe Kosten für die benötigten Additive	Nur im kleinen Maßstab möglich	
Mikrowellen	Trocknung nicht nötig, schnell und günstig	Hitzeentwicklung, Bildung von Radikalen	Industrieller Maßstab für andere Anwendungen	
Hochleistungs-Implulse		Zellsuspensionen sollten frei von Salzen sein, Effizienz des Zellaufschlusses wird schrittweise verringert	Möglicherweise auch im größeren Maßstab anwendbar	
Trocknung	Einfach Skalierbar	Abhängig von der verwendeten Methode besteht ein hoher Energiebedarf, wenig effektiv für Hefe- und Pflanzenzellen	Industrieller Maßstab für andere Anwendungen	
Chemische Methoden				Produktkontamination, ungeeignet für einige Anwendungen

III. Mikrobielle Produktion von Einzellölen (Single Cell Oils)

Lösungsmittel	Ermöglicht Kombination von Zellaufschluss und Extraktion	Zellwände vieler Mikroorganismen sind undurchlässig für die meisten Lösungsmittel, große Mengen an Lösungsmitteln sind notwendig	Industriemaßstab
<i>in situ</i> Transesterifikation	Ermöglicht Kombination von Zellaufschluss und Extraktion und Transesterifikation	Chemische Modifikation des Produktes --> geeignet zur Analytik oder zur Biodieselherstellung	Einfach skalierbar
Enzyme	Sanfte Reaktionsbedingungen, Substrat-spezifität, umweltfreundlich, Lebensmittel-kompatibel	Spezielle Enzymcocktails für jeden Organismus notwendig, möglicherweise sehr teuer	Großer Maßstab möglich, aber abhängig von den Enzymkosten

- Kugelmühle

Der Zellaufschluss mit der Kugelmühle ist einfach, effektiv und für eine Vielzahl von Mikroorganismen geeignet. Die Zellen werden durch die Interaktion mit den Mahlkörpern sowie durch Verdichtungs- und Scherbelastung und den daraus resultierenden Energietransfer zerkleinert (Middelberg, 1995). Die Effizienz des Zellaufschlusses hängt von der Größe und Art der Mahlkörper, der Agitationsschwindigkeit, der Durchflussrate, der Zellkonzentration, der Menge an eingesetzten Mahlkörpern in Relation zur Biomasse und dem Mikroorganismus selbst ab (Chisti und Moo-Young, 1986; Middelberg, 1995; Doucha und Lívanský, 2008). Es stehen verschiedene Typen von Kugelmühlen sowohl für den Labor- als auch für den industriellen Maßstab zur Verfügung. Ein effektiver Zellaufschluss wurde erfolgreich für zahlreiche Hefearten, z.B. *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *Candida boidinii* (Limon-Lason et al., 1979; Schütte et al., 1983; Hummel und Kula, 1989; van Gaver und Huyghebaert, 1991; Heim et al., 2007), diverse Algenarten, z.B. *Chlorella* P12, *Botryococcus* sp., *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. (Doucha und Lívanský, 2008; Lee et al., 2010), Pilzarten, z.B. *Rhodotorula gracilis*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium citrinum* (Klimek-Ochab et al., 2011), sowie für Bakterienarten, z.B. *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Rhodococcus* sp. (Hummel und Kula, 1989) nachgewiesen. Die Aufschlusseffizienz für Bakterien ist jedoch aufgrund der kleineren Zellgröße deutlich geringer (Schütte et al., 1983). In Bezug auf den Energiebedarf ist die Kugelmühle effizienter, wenn hohe Biomassekonzentrationen verarbeitet werden und die extrahierten Produkte anschließend leicht abgetrennt werden können (Greenwell et al., 2010). Um mikrobielle Öle zu gewinnen, wird in der Regel eine Lösungsmittlextraktion im Anschluss durchgeführt. Es hat sich gezeigt, dass die Kugelmühle vor der Lösungsmittlextraktion die Lipidextraktion für die oleogene Hefe *C. curvatus* im Vergleich zur Behandlung mit Mikrowellen oder Autoklaven verbessert. Für den oleogenen Pilz *M. isabellina* führte die Kugelmühle zu einer akzeptablen Lipidextraktion, wurde aber durch die direkte Soxhlet-Extraktion des Mycels übertroffen (Yu et al., 2015).

- Hochdruck-Homogenisierung

Neben dem ursprünglichen Zweck von Hochdruckhomogenisatoren zum Mischen, Dispergieren und Reduzieren der Partikelgröße in Emulsionen und Suspensionen wurde die Anpassung an den Zellaufschluss in der Biotechnologie zur Freisetzung

intrazellulärer Produkte erfolgreich realisiert und kann im großen Maßstab angewendet werden. Während des Homogenisierungsprozesses wird die Biomasse unter hohem Druck durch eine Öffnung gepresst (Chisti und Moo-Young, 1986; Middelberg, 1995). Die genauen Mechanismen und Ursachen für den Zellaufschluss werden noch immer diskutiert und wurden von Clarke et al. (2010) zusammengefasst. Die Effizienz des Zellaufschlusses ist abhängig von Druck, Anzahl der Durchgänge und Organismen (Chisti und Moo-Young, 1986) und wurde erfolgreich für Hefearten wie z.B. *S. cerevisiae* (Spiden et al., 2013), Algenarten, z.B. *Chlorococcum* sp. (Halim et al., 2012), Bakterienarten, z.B. *E. coli* (Ling et al., 1997), sowie einige filamentöse Pilze, z.B. *Rhizopus nigricans* (Keshavarz et al., 1990) eingesetzt. Der Zellaufschluss einiger filamentöser Pilze durch Hochdruckhomogenisierung hat sich jedoch als wenig geeignet erwiesen, da das Homogenisatorventil durch Mycel und Pilzpellets blockiert und verstopft wurde (Chisti und Moo-Young, 1986; Hopkins, 1994; Middelberg, 1995), was möglicherweise durch niedrige Biomassekonzentrationen verhindert werden kann (Keshavarz et al., 1990). Als Vorbehandlung für die mikrobielle Lipidextraktion wurde die Hochdruckhomogenisierung für die oleogenen Hefen *C. curvatus* (Thiru et al., 2011) und *Pichia kudriavzevii* (Sankh et al., 2013) untersucht. Allerdings wurde dies nicht mit anderen Vorbehandlungsmethoden in bezug auf die Effizienz der SCO-Gewinnung verglichen. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die Hochdruckhomogenisierung ursprünglich für die Bildung von Emulsionen entwickelt wurde und die Mischung aus feuchter Biomassebestandteile, SCOs und anderen intrazellulären Lipiden, insbesondere Phospholipiden, eine sehr stabile Emulsion erzeugt, die u.U. nicht einfach gebrochen werden kann, sodass die Lipidgewinnung erschwert werden könnte.

- Ultraschall

Ultraschall mit Frequenzen um 25 kHz stellt ein weiteres Scheerungs-Verfahren dar, das in anderen Industrien, z.B. bei der Emulgierung, Entgasung oder Entschäumung, häufig eingesetzt wird und sich zudem für den Zellaufschluss eignet. Die wichtigsten Auswirkungen des Ultraschalls auf Mikroorganismen sind mechanischer Natur und können der Kavitation zugeschrieben werden, d.h. durch Bildung und Implosion von Gasblasen. Die plötzliche Implosion der gebildeten Gasblasen in der Flüssigkeit führt zu Stoßwellen, die Scherkräfte erzeugen und die Zellen zerstören (Chisti und Moo-

Young, 1986; Thompson und Doraiswamy, 1999). Der Kavitationsprozess erzeugt jedoch hohe Temperaturen, die einerseits eine Kühlung erfordern und andererseits eine Radikalbildung fördern, die ein breites Spektrum chemischer Reaktionen mit möglichen Produktschäden ermöglicht (Suslick, 1989; Lee et al., 2012). Obwohl es möglich ist, Ultraschallgeräte chargenweise oder sogar kontinuierlich mit minimaler Wärmeentwicklung zu betreiben (James et al., 1972; Borthwick et al., 2005), ist die Anwendung eines großflächigen Zellaufschlusses aufgrund der schwierigen Energieübertragung auf größere Mengen nicht möglich (Chisti und Moo-Young, 1986). Für einen effizienten Zellaufschluss muss die Optimierung von Ultraschallzeit, Zelldichte, Leistungsaufnahme, Zyklusanzahl und Betriebsart (chargenweise oder kontinuierlich) für den jeweiligen Mikroorganismus angepasst werden. Nach der Optimierung der Bedingungen konnte ein effektiver Zellaufschluss für die Mikroalgen *Scenedesmus dimorphus* und *Nannochloropsis oculata* (McMillan et al., 2013; Wang und Yuan, 2015), die Hefe *S. cerevisiae* (Jayakar und Singhal, 2012), das Bakterium *E. coli* (Ho et al., 2006) und die filamentösen Pilze *P. citrinum* und *A. fumigatus* (Klimek-Ochab et al., 2011) nachgewiesen werden. Aufgrund der Unterschiede in Definition und Quantifizierung des Zellaufschlusses in den jeweiligen Studien ist jedoch eine allgemeine Aussage über die Eignung und Effizienz dieser Methode schwierig. In einigen Studien wird die Effizienz des Zellaufschlusses durch die Freisetzung spezifischer Enzyme oder allgemein von Proteinen oder anderer Metaboliten gemessen, in anderen Studien wird sie durch mikroskopische Untersuchungen der Zellen wie bei McMillan et al. (2013) bewertet. Durch Mikroskopie kann der Erfolg des Zellaufschlusses besser bewertet werden, aber die Freisetzung von Metaboliten oder die Aktivität eines bestimmten Enzyms geben eher Aufschluss darüber, ob Ultraschall zur Extraktion des jeweiligen Produkts geeignet ist. Um die Produktfreisetzung aus einer Zelle zu verbessern, ist möglicherweise ein vollständiger Zellschluss gar nicht erforderlich. Eine Permeabilisierung der Zelle in Kombination mit einem anderen Extraktionsschritt könnte ausreichen. Im Falle der Lipidextraktion wird Ultraschall oft in Kombination mit einer Lösungsmittelextraktion eingesetzt und dann als ultraschallunterstützte Extraktion bezeichnet. Für *C. curvatus* hat sich die ultraschallunterstützte Extraktion des SCOs im Vergleich zu anderen Methoden, z.B. mit der Mikrowelle, als vorteilhaft erwiesen, aber für *M. isabellina* oder *Chlorella* erwies sich die Verwendung von Ultraschall als ungeeignet (Yu et al.,

2015). Sonifikation kann zudem die Qualität der Lipide auf Grund der Hitzeentwicklung und der Bildung von Radikalen, z.B. durch Lipidoxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, verringern (Gerde et al., 2012).

3.4.2 Nicht-mechanische Aufschlussmethoden

Im Gegensatz zu den mechanischen Aufschlussmethoden erlauben nicht-mechanische Methoden einen schonenderen Zellaufschluss mit der Möglichkeit, gezielt einzelne Zellwandkomponenten anzugreifen. Diese Methoden benötigen weniger Energie, sind aber aufgrund von Kosten und Effizienz oft auf einen kleinen Maßstab beschränkt (Klimek-Ochab et al., 2011).

- Physikalische Methoden

Unter den physikalischen Methoden sind Dekompression, osmotischer Schock, Mikrowellenbehandlung, Hochspannungsimpulsverfahren und (Gefrier-)Trocknung prinzipiell für den Zellaufschluss geeignet. In eigenen Projekten wurden Mikrowellenbehandlung, Hochspannungsimpulsverfahren und (Gefrier-)Trocknung untersucht.

Mikrowellen sind oszillierende, nichtionisierende elektromagnetische Wellen mit Frequenzen zwischen 300 MHz und 300 GHz, die Wärme in dielektrischem oder polarem Material durch elektrisch feldinduzierte Polarisierung und Neuausrichtung von Molekülen erzeugen und so Reibung verursachen. Der effektivste Bereich der dielektrischen Erwärmung sind Mikrowellen mit Frequenzen zwischen 915 MHz (für industrielle Anwendungen mit größerer Eindringtiefe) und 2450 MHz (für Mikrowellenöfen und Extraktionsanwendungen im Haushalt; Leonelli und Mason, 2010; Routray und Orsat, 2012). Das große Potenzial von Mikrowellen beruht auf ihrer Wechselwirkung mit den reichlich vorhandenen freien Wassermolekülen innerhalb der Zellen, was zu einer lokalen Erwärmung führt, d.h. zu einem plötzlichen ungleichmäßigen Temperaturanstieg, insbesondere in Vakuolen, in denen freies Wasser in größeren Mengen vorliegt. Durch die Volumenausdehnung des erwärmten Wassers steigt der intrazelluläre Druck, gefolgt von einer spontanen Zerstörung der Zellwand (Chuanbin et al., 1998). Die Kombination der Mikrowellenbehandlung mit

der Lösungsmittlextraktion (mikrowellenunterstützte Lösungsmittlextraktion) hat das Potenzial einer schnellen und kostengünstigen Methode der Lipidextraktion, da die Menge an Lösungsmittel reduziert werden kann, die Trocknung der Biomasse vor der Extraktion nicht notwendig ist und die Ausbeute im Vergleich zu einer einfachen Wärmebehandlung erhöht werden kann (Cravotto et al., 2008; Balasubramanian et al., 2011; Mercer and Armenta, 2011; Rakesh et al., 2015). Da die Mikrowellenchemie bereits in vielen Bereichen im industriellen Maßstab eingesetzt wird, z.B. beim Trocknen, Auftauen, Lyophilisieren von Lebensmitteln oder Devulkanisieren von Gummi (Leonelli und Mason, 2010), sollte die Anwendung der mikrowellenunterstützten Lösungsmittlextraktion von mikrobiellen Lipiden in großem Maßstab möglich sein. Ähnlich wie bei der ultraschallunterstützten Extraktion können jedoch die Entwicklung von Wärme, die Entstehung freier Radikale sowie mögliche chemische Umwandlungen mehrfach ungesättigte Fettsäuren schädigen, die die Produktqualität beeinflussen (Yoshida et al., 1990; Günerken et al., 2015).

Der Zellaufschluss mit **Hochspannungsimpulsverfahren** geschieht im Wesentlichen aufgrund von Porenbildung in Zellmembran und Zellwand. Dieses Verfahren ist wesentlich bekannter im Zusammenhang mit DNA-Transformationsexperimenten durch Elektroporation (Ho und Mittal, 1996). Neben der Zellzerstörung führt das Hochspannungsimpulsverfahren auch zu einer Temperaturerhöhung, die intrazelluläre Moleküle beeinflusst und eventuell schädigt, sowie zu einer verbesserten Lipidextraktion (Sheng et al., 2011a; Zbinden et al., 2013; Lai et al., 2014). Das Hochspannungsimpulsverfahren in Kombination mit Extraktionsmethoden wurde bereits zur Gewinnung von Lipiden beschrieben und bietet das Potenzial einer großtechnischen Anwendung (10.000 L/h Kapazität, Diversified Technologies, 2010) mit kontinuierlicher Arbeitsweise (Flisar et al., 2014). Wie bei der Mikrowellenbehandlung kann auch hier feuchte Biomasse eingesetzt werden, allerdings muss die Zellsuspension frei von Ionen sein, was Waschschrte und/oder Deionisierungsschrte erforderlich macht. Zudem nimmt die Effizienz des Zellaufschlusses aufgrund der Erhöhung der Leitfähigkeit bei der Freisetzung intrazellulärer Verbindungen sukzessive ab (Günerken et al., 2015).

Die **Trocknung** von Biomasse erfolgt oft vor anderen Zellaufschluss- und/oder Extraktionstechniken. Tatsächlich verwenden die meisten in diesem Abschnitt

zitierten Studien trockene Biomasse für die weitere Verarbeitung oder Analytik und wird mit wenigen Ausnahmen als entscheidend für eine effektive Weiterverarbeitung angesehen. Die Art der Trocknung (Sonnentrocknung, Ofentrocknung oder Gefriertrocknung) hatte jedoch nur einen sehr geringen Einfluss auf den nachfolgenden Zellaufschluss für die Lipidgewinnung aus *Scenedesmus* sp. (Guldhe et al., 2014). In Kombination mit Auftauen kann das Trocknen selbst jedoch eine Zellaufschlussmethode sein. Während des langsamen Gefrierprozesses bilden sich innerhalb der Zellen große Eiskristalle, die zum Bruch intrazellulärer Membranen führen. Diese Methode ist kostengünstig und leicht skalierbar; Pflanzenzellen benötigen jedoch eine große Anzahl von Gefrier- und Auftauzyklen, während Hefezellen nur schwach geschädigt werden (Hopkins, 1994).

- Chemische Methoden

Zellaufschluss oder Permeabilisierung kann durch eine Vielzahl von Chemikalien erfolgen, z.B. Antibiotika, Chelatbildner, Chaotrope, Detergenzien, Lösungsmittel, Alkalien und Säuren mit unterschiedlicher Selektivität, Effizienz und Wirkungsweise auf die jeweiligen Zellwandkomponenten verschiedener Mikroorganismen. Viele chemische Behandlungen sind für Lebensmittelanwendungen ausgeschlossen oder erfordern zumindest eine intensive Weiterverarbeitung, da die Chemikalien die Produkte verunreinigen und oft Non-Food-Qualität aufweisen (Middelberg, 1995; Geciova et al., 2002). Harsche chemische Bedingungen können das Produkt zudem schädigen.

Die Verwendung von **Lösungsmitteln** bietet die Möglichkeit, Zellaufschluss und Lipidextraktion ohne weitere Vorbehandlung zu kombinieren. Klassische Methoden nach Bligh und Dyer (1959) und Folch et al. (1957) können für feuchte und trockene Biomasse verwendet werden, benötigen aber große Mengen an organischen und toxischen Lösungsmitteln wie Chloroform und Methanol. Alternativen unter Verwendung weniger toxischer Lösungsmittel, wie Hexan/Isopropanol, wurden bereits entwickelt (Hara und Radin, 1978). Die Lipidextraktion aus Mikroalgen mit wässrigem Isopropanol (Yao et al., 2013) und Ethanol (Yang et al., 2014) wurde erfolgreich durchgeführt. Allerdings sind die Zellwände der meisten Mikroorganismen in der Regel für die gängigen Lösungsmittel undurchlässig (Sobus und Homlund, 1976; Jacob, 1992; Lee et al., 1998; Ryckebosch et al., 2012), weshalb zumindest

eine Zellkonditionierung oder -vorbehandlung vor der Lösungsmittelbehandlung durchgeführt werden muss, um den Lösungsmittelkontakt und die Extraktionseffizienz zu verbessern (Jacob, 1992). Verschiedene Lösungsmittlextraktionsverfahren werden im Abschnitt Extraktionsverfahren ausführlich erläutert.

Säurekatalysierte *in situ*-Umesterung von feuchter (Johnson und Wen, 2009; Cerón-García et al., 2013; Kim B et al., 2015; Macías-Sánchez et al., 2015) wie auch trockener Biomasse (Liu und Zhao, 2007; Johnson und Wen, 2009; D'Oca et al., 2011; Li et al., 2011; Wahlen et al., 2011; Xu und Mi, 2011) kombiniert Zellaufschluss, Lipidextraktion und Umesterung zu Fettsäuremethyl- oder ethylestern (FAME bzw. FAEE) für die Biodieselproduktion. Obwohl intensiv für oleogene Mikroalgen untersucht, wird die *in situ*-Umesterung auch bei oleogenen Hefen, z.B. *L. starkeyi*, *R. toruloides* (Liu und Zhao, 2007) und Pilzen, z.B. *M. isabellina*, *A. candidus* (Liu und Zhao, 2007; Kakkad et al., 2015) angewendet. Bereits 1985 verglichen Harrington und D'Arcy-Evans "konventionelle und *in situ*-Methoden der Umesterung" von Sonnenblumenkernöl. Sie kamen zu dem Schluss, dass sich die Fettsäureesterzusammensetzung aus der *in situ*-Umesterung nicht von derjenigen der zuvor extrahierten Öle unterschied, die *in situ*-Umesterung jedoch höhere Ausbeuten erzielt. Bei der Verwendung von H₂SO₄ als Säure-Katalysator verringert sich die Ausbeute der Umesterung von feuchter Biomasse stark, so dass Trocknung absolut notwendig ist (Harrington und D'Arcy-Evans, 1985; Ehimen et al., 2010). Trocknung benötigt jedoch viel Energie und trägt erheblich zu den Gesamtproduktionskosten von geringwertigen Produkten wie Biodiesel bei (Molina Grima et al., 2003; Mata et al., 2010). Dennoch zeigten einige Studien, dass durch den Wechsel des Katalysators auf HCl (Kim et al., 2015) oder Acetylchlorid (Macías-Sánchez et al., 2015) auch feuchte Biomasse für eine effiziente direkte *in situ*-Umesterung genutzt werden kann.

3.4.3 Extraktionsmethoden

Die Lipidextraktion (wie jedes andere Extraktionsverfahren auch) zielt darauf ab, die gewünschte Lipidklasse effizient und spezifisch von anderen Zellkomponenten, d.h.

Proteinen, Polysacchariden, unerwünschten Lipidklassen und anderen kleinen Molekülen, zu trennen. Für eine effiziente und spezifische Lipidextraktion müssen die Eigenschaften der einzelnen Mikroorganismen hinsichtlich Zellwandstruktur und Lipidgehalt (Probenmatrix) sowie die chemische Struktur, Eigenschaften und Lokalisation des gewünschten Lipids berücksichtigt werden (Analyt; Mustafa und Turner, 2011). Darüber hinaus müssen die extrahierten Lipide vor Oxidation und enzymatischem Abbau geschützt werden. Zudem ist bei der Wahl der Extraktionsmethoden und Lösungsmittel die zukünftige Anwendung der Lipide zu berücksichtigen. Insbesondere bei Lebensmittelanwendungen werden ungiftige und unschädliche Lösungsmittel bevorzugt, die leicht entfernbar und/oder rückgewinnbar sind.

Die Wahl der Lösungsmittel hängt von der Polarität des zu extrahierenden Lipids ab. Speicherlipide, wie Triacylglyceride, sind neutrale Lipide und werden daher mit eher unpolaren Lösungsmitteln, z.B. Chloroform oder Hexan, extrahiert, während polarere Lipide, wie Phospholipide und Glycolipide mit polareren Lösungsmitteln, z.B. Alkoholen, extrahiert werden können. Mischungen von Lösungsmitteln, insbesondere von unpolaren und polaren, können die Extraktionseffizienz erhöhen (Lee et al., 1998; Ryckebosch et al., 2012; Li Y. et al., 2014; Ramluckan et al., 2014; Byreddy et al., 2015), da Lipide aus Protein-Lipid-Komplexen durch das polare Lösungsmittel besser freigesetzt und anschließend die Lipide im unpolaren Lösungsmittel gelöst werden. Eine Übersicht über die gängigen Extraktionsmethoden wird in Tabelle 11 gegeben.

- Klassische Extraktionsmethoden

Die Soxhlet-Extraktion wurde 1879 von Franz Soxhlet für die Extraktion von Lipiden aus Milchpulver entwickelt (Soxhlet, 1879) und ist eine der häufigsten semikontinuierlichen Methoden zur Lipidextraktion aus festen Lebensmittelproben. Die Probe wird getrocknet, zu einem feinen Pulver gemahlen und auf einen porösen Probenteller in der Extraktionskammer gelegt. Die Probe wird durch mehrere Waschgänge mit einem organischen Lösungsmittel (ursprünglich Petrolether) unter Rückfluss extrahiert. Nach der Extraktion wird das Lösungsmittel verdampft und der Rückstand gewogen, so dass die gesamte Trockenmasse des extrahierten Lipids erhalten bleibt. Mehrere automatisierte Soxhlet-Extraktionssysteme wurden entwickelt und sind kommerziell erhältlich, z.B. das Büchi-Extraktionssystem B-811,

jedoch ist die Soxhlet-Extraktion zeitaufwendig und erfordert einen hohen Lösungsmittelleinsatz. Dennoch wird in der Literatur die Soxhlet-Extraktion oft als Standardmethode beim Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden verwendet. Sie kann modifiziert werden, um den Extraktionskomfort zu erhöhen, z.B. durch Kombination mit Mikrowellen (mikrowellenunterstützte Soxhlet-Extraktion, García-Ayuso et al., 2000), was die Extraktionszeit und den Lösungsmittelverbrauch erheblich reduziert. Die Soxhlet-Extraktion ist eine sehr nützliche Extraktionsmethode für analytische Zwecke, da sie die Gesamtlipidmenge für die Klassenanalyse effektiv extrahiert. Wie McNichol et al. (2012) feststellten, ist es jedoch nicht sinnvoll, einzelne Lipidklassen zu extrahieren, z.B. TAGs zur Beurteilung des Biodieselpotenzials, da die Ausbeute an Gesamtfettsäuren aufgrund des Vorhandenseins mehrerer mäßig polarer Lipidklassen und anderer co-extrahierter Verbindungen deutlich überschätzt wird. Darüber hinaus ist die Soxhlet-Extraktion möglicherweise nicht für die Extraktion von Lipiden mit ungesättigten Fettsäuren geeignet, da diese bei höheren Temperaturen unter Rückfluss instabil sind (Guckert et al., 1988).

Die Extraktion nach Folch (Folch et al., 1957) ist als Standardtechnik zur Gewinnung von Gesamtlipiden allgemein anerkannt. Sie wurde ursprünglich als einfache Methode zur Extraktion von Gesamtlipiden aus tierischen Geweben (Gehirn, Leber und Muskel) entwickelt und verwendet Chloroform:Methanol (2:1) unter Zugabe von Salzen zum Rohextrakt. Durch Waschen des Rohextrakts mit Wasser oder einer Salzlösung entsteht ein zweiphasiges System, wobei sich die Lipidfraktion in der unteren Phase und die Nicht-Lipid-Fraktion in der oberen (wässrigen) Phase befindet. Die Folch-Methode ist die zuverlässigste Extraktionsmethode für Gesamtlipide und wird oft als Standardtechnik bei der Extraktion mikrobieller Lipide verwendet, ähnlich der Extraktionsmethode nach Bligh und Dyer (1959), die ebenfalls sehr oft zu diesem Zweck eingesetzt wird. Der Unterschied zwischen beiden Verfahren besteht im Verhältnis zwischen den einzelnen Lösungsmitteln und der Probe und dem Waschverfahren. Ursprünglich als schnelle und wirtschaftliche Methode zur Extraktion von Gesamtlipiden aus großen Feuchtproben (gefrorener Fisch) entwickelt, verwendet es eine minimale Menge an Chloroform und Methanol im Verhältnis (2:1). In Proben, die mehr als 2% Lipide enthalten, unterschätzt die Bligh und Dyer-Methode jedoch signifikant den Lipidgehalt mit größerer Ungenauigkeit bei

steigendem Lipidgehalt (Iverson et al., 2001). Deshalb sollten nur modifizierte Varianten dieser Methode für die Extraktion mikrobieller Lipide aus oleogenen Mikroorganismen verwendet werden.

Tabelle 11: Zusammenfassung gängiger Methoden für die Lipidextraktion

Methode	Vorteile	Nachteile	Skalierbarkeit
Klassische Methoden	Etablierte Methoden	Hoher Bedarf an Lösungsmitteln	Analytischer bis industrieller Maßstab
Soxhlet	Automatisierte Systeme erhältlich, Kombinierbar mit anderen Methoden	Zeitintensiv, hoher Bedarf an Lösungsmitteln, nicht geeignet für temperatursensitive Produkte	Analytischer bis großer Maßstab
Bligh & Dyer	Benötigt weniger Lösungsmittel als die Methode nach Folch, auch geeignet für feuchte Proben	Die nicht-modifizierte Methode unterschätzt signifikant den Lipidgehalt von Proben, die mehr als 2 % Lipide beinhalten	Analytischer bis großer Maßstab
Folch	Goldstandard für Lipidextraktion, sehr zuverlässig	Nur für trockene Proben, höherer Bedarf an Lösungsmitteln als bei Bligh & Dyer	Analytischer bis großer Maßstab
Hochdruck Flüssigkeits-Extraktion	Verbesserte Extraktionsleistung aufgrund erhöhter Produktlöslichkeit und verbessertem Massentransfer, 5x schneller und benötigt 20x weniger Lösungsmittel als Bligh & Dyer, automatisiert	Hohe Investitionskosten	Möglicherweise auch im größeren Maßstab anwendbar
Superkritische Flüssigkeits-Extraktion (CO₂)	Extraktion auf bei niedrigen Temperaturen möglich → gut für temperatursensitive Produkte, Schutz vor Oxidation, umweltfreundlich	Probenfeuchtigkeit vermindert, Extraktionseffizienz, hohe Investitionskosten	Industrieller Maßstab für andere Anwendungen

Wie bereits erwähnt, wurden auch andere Lösungsmittelsysteme evaluiert, um toxische Chloroform- und Methanolgemische auszutauschen. Hexan wird oft als unpolare Alternative eingesetzt und liefert gute Ergebnisse bei der Extraktion von Triacylglyceriden. Bei einer angestrebten Gesamtlipid-Extraktion führen jedoch andere Lösungsmittelsysteme als Chloroform-Methanol-Gemische zu einer

geringeren Extraktionseffizienz und sind empfindlicher gegenüber dem Wassergehalt der Probe (Fishwick and Wright, 1977; Hara and Radin, 1978; Guckert et al., 1988; Sheng et al., 2011b).

Weiterhin wurde festgestellt, dass aufgrund der hohen Variation zwischen den Organismen die Vorbehandlungs- und Extraktionsmethoden individuell angepasst werden müssen, was zu einer Vielzahl von unterschiedlichen Verfahren führt. Häufig werden auch neue oder vereinfachte Extraktionsmethoden in der Literatur eingeführt (z.B. Ryckebosch et al., 2012; Axelsson und Gentili, 2014), wobei diese Methoden jedoch hauptsächlich für eine sehr begrenzte Anzahl von Organismen oder Geweben getestet und angewendet wurden, sodass die Vergleichbarkeit und Übertragbarkeit auf andere Mikroorganismen sehr schwierig ist. Wie von Christie (1993) gefordert, ist die strikte Befolgung des jeweiligen Protokolls für konsistente Ergebnisse mit jeder Methode unerlässlich und ermöglicht nur so eine Vergleichbarkeit zwischen einzelnen Studien.

3.5 SCO-Anwendung

Einzelleröle sind chemisch äquivalent zu Pflanzenölen, daher können sie als vollwertiger Ersatz für diese für die Herstellung von Biodiesel, als Lebensmittelzusatz oder –ergänzungsmittel, in der Pharma- und Kosmetikindustrie eingesetzt werden. PUFA-reiche SCOs eignen sich hervorragend für Lebensmittelanwendungen und werden dafür auch kommerziell produziert. Daneben konzentriert sich die Forschung hauptsächlich auf die Herstellung von Biodiesel, während andere Anwendungsmöglichkeiten eher wenig beforscht werden.

- Anwendungen im Lebensmittelbereich

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren beeinflussen viele verschiedene physiologische Funktionen im menschlichen Körper und sind daher für die menschliche Gesundheit essentiell (Dyal und Narine, 2005; Bellou et al., 2016b). ω -3 und ω -6 PUFAs (z.B. α -Linolensäure (ALA; 18:3, ω -3) und Linolsäure (LA; 18:2, ω -3)) sind nicht nur Bestandteile von Membranphospholipiden, sondern dienen auch als

Vorläufermoleküle der Eicosanoide, die für alle Säugetiere essentiell sind (Sakuradani et al., 2009; Stressler et al., 2013).

In der Lebensmittelindustrie sind Lipide, die reich an PUFAs sind, sehr gefragt und werden als Lebensmittelzusatzstoffe verwendet, um die Fettsäurezusammensetzung bestimmter Lebensmittel wie Säuglingsnahrung zu verbessern und/oder zu ergänzen (Bellou et al., 2016b). Neben Säuglingsnahrung sind derzeit auch kommerzielle Milchprodukte wie Milch und Joghurt mit ω -3 PUFAs aus Leinsamen, Fischöl oder sogar marinen Mikroalgen angereichert (Ganesan et al., 2014). Darüber hinaus wurden pflanzliche und marine Mikroalgenöle verwendet, um erhebliche Mengen an ω -3 PUFAs für die Herstellung von angereicherten Fleischprodukten zu liefern (Jiménez-Colmenero, 2007), z.B. Putenhackfleisch, Frischwurst und Formschinken aus Schweinefleisch (Lee et al., 2006a, 2006b).

Das Fettsäureprofil vieler oleogener Hefen ähnelt stark dem von Pflanzenöl. Da Pflanzenöle vielfältig in der Lebensmittelproduktion eingesetzt werden, könnte dies eine mögliche Anwendung weniger hochwertiger Öle sein. Dafür müssten allerdings die Produktionskosten dieser Öle gesenkt werden.

- Biodieselherstellung

Die Erneuerbare-Energie-Direktive (RED) der EU sieht vor, dass bis 2020 10% aller Kraftstoffe aus erneuerbaren Ressourcen gewonnen werden soll (EU, 2009). In der neuesten Version dieser Direktive vom Dezember 2018 wurden Nachhaltigkeitskriterien definiert, um sicherzustellen, dass Nicht-Ackerflächen, die viel Kohlenstoff speichern, wie Wälder, Moore oder Feuchtgebiete nicht für den Anbau von Energiepflanzen verwendet werden. Dies soll verhindern, dass Treibhausgaseinsparungen, die sich aus der Zunahme von Biokraftstoffen ergeben, durch die Freisetzung von CO₂ aus diesen Flächen negiert wird (EU, 2015, 2018). Biodiesel (= Fettsäuremethyl- oder ethylester) ist besonders wichtig für die Umsetzung der RED, da er 2016 mit einem Anteil von ca. 80% der bedeutendste Biokraftstoff im EU-Verkehrssektor war (Europäische Kommission, 2018).

Aufgrund des hohen Anteils an Ölsäure eignet sich das SCO von Hefen besonders gut für die Biodieselherstellung. Da die SCO-Produktion im Bioreaktor stattfindet und daher überhaupt kein Ackerland benötigt wird, bestehen keine Probleme bezüglich

der Nachhaltigkeitsklausel der RED. Wie bereits weiter oben beschrieben, kann Biodiesel aus SCO unter bestimmten Bedingungen (Industriemaßstab, günstige Kohlenstoffquelle) bereits heute wirtschaftlich produziert werden. Das bei der Biodieselherstellung freiwerdende Roh-Glycerin kann direkt wieder für die SCO Produktion recycelt werden.

- Oleochemkalien

Oleochemikalien werden in der Regel als chemische Produkte definiert, die aus pflanzlichen oder tierischen Triacylglyceriden gewonnen werden (Rupilius und Ahmad, 2006). Nach Ansicht der Autoren sollten jedoch auch mikrobielle Öle in diese Definition miteinbezogen werden. Zu den grundlegenden oleochemischen Produkten gehören Fettsäuren, Fettalkohole und Methylester. Insbesondere Fettalkohole und Ester zwischen einer Fettsäure und einem Fettalkohol (= Wachsester) können für die Herstellung von z.B. Seifen, Waschmitteln, kosmetischen Zusatzstoffen, Pheromonen und Aromen verwendet werden (Noweck und Grafahrend, 2006; Steen et al., 2010). Fettalkohole und Wachsester werden entweder aus natürlichen Quellen, d.h. pflanzlichem und tierischem Öl, durch Hydrierung von Triacylglyceriden oder direkt aus Jojobaöl, das aus Wachsestern besteht, gewonnen. Alternativ kann auch die chemische Synthese aus petrochemischen Rohstoffen genutzt werden (Noweck und Grafahrend, 2006). Laut Steen et al. (2010) betrug der Marktwert für Fettalkohole, Aldehyde und Wachsester im Jahr 2004 ~3 Milliarden \$ mit einem Preis von 1500 \$/pro Tonne. Die mikrobielle Herstellung maßgeschneiderter Fettsäurederivate bietet daher einen riesigen Markt und eine lohnende Alternative. Die prinzipielle Machbarkeit dieses Ansatzes wurde von Steen et al. (2010) und Youngquist et al. (2013) nachgewiesen: Fettalkohole und Wachsester wurden mit einem genetisch modifiziertem *E. coli*-Stamm aus Glucose hergestellt. Die mikrobielle Herstellung von Oleochemikalien ist ebenfalls Gegenstand mehrerer Patente, z.B. Schirmer et al. (2012) (US 8.268.599 B2), Hu (2011) (EP 2 367 947 B1) und Osterhout und Burgard (2014) (US20140127765 A1).

3.6 Fazit und eigener Forschungsbeitrag

Pflanzliche und tierische Öle und Fette waren und sind die wichtigsten erneuerbaren Rohstoffe für die chemische Industrie zur Herstellung von Seifen, Estern, Amiden, Aminen, Fettalkoholen und deren Folgeprodukte. Fettalkohole beispielsweise könnten auch mittels Petrochemie aus Alkenen hergestellt werden. Jedoch ist der Anteil der Produktion aus erneuerbaren Ressourcen stetig von etwa 50 % im Jahr 2000 bis ca. 65 % im Jahr 2010 gewachsen (Rupilius und Ahmad, 2007; Biermann et al., 2011). Dieser Wandel zeigt, dass sich eine Transformation der chemischen Industrie von der Petrochemie zu grüneren Alternativen wie der Oleochemie bereits vollzieht. Um diesen Wandel erfolgreich voranzutreiben und mehr und mehr Chemikalien aus erneuerbaren Rohstoffen herstellen zu können, müssen jedoch noch einige Herausforderungen gelöst werden (Biermann et al., 2011):

Die Fettsäurezusammensetzung der derzeitig industriell genutzten Öle ist sehr einheitlich. Um die Produktvielfalt zu erhöhen, besteht daher das Interesse, Öle zu verwenden, die ein ungewöhnlicheres Fettsäureprofil aufweisen. Eine Erhöhung der Diversität an Pflanzenölen und ein gleichzeitig stetig steigender Bedarf an bereits etablierten Ölen insbesondere für die Biodieselproduktion führen aber zu einem sich weiter erhöhenden Bedarf an fruchtbaren Anbauflächen. Dies jedoch wird aber über kurz oder lang zu einem Ernährungsproblem einer stetig wachsenden Weltbevölkerung führen. Die Verwendung von bisher ungenutzter Nicht-Ackerfläche wie von Biermann et al. (2011) vorgeschlagen, ist aber durch die verschärften Regularien der EU keine Option mehr. Die Nachhaltigkeitskriterien der EU verlangen im Prinzip den Ausbau der Biokraftstoffproduktion. Da dies in Europa voraussichtlich hauptsächlich über Biodiesel umgesetzt wird, würde der Landbedarf zum einen für die Biodieselproduktion und zum anderen für den Anbau geeigneter Ölpflanzen für die Oleochemie wachsen. Beides sind prinzipiell begrüßenswerte Entwicklungen hinsichtlich der Reduktion von Treibhausemissionen, sind jedoch nicht mit den verfügbaren Flächen vereinbar. Wie für die Bioethanolproduktion auch ist daher die Zeit gekommen, Öle der zweiten Generation herzustellen, um den wachsenden Bedarf zu decken. Ausreichende Mengen in der geforderten Diversität können nur durch die mikrobielle Lipidproduktion zur Verfügung gestellt werden, um Pflanzenöle vollwertig ersetzen zu können. Auch wenn noch Forschungsbedarf auf diesem Feld

besteht, sind, wie in den vorherigen Kapiteln ausführlich beschrieben, die Potentiale immens. Da unter bestimmten Bedingungen (siehe 3.3.1) sogar die Herstellung von Biodiesel, dem Produkt mit der geringsten Wertschöpfung, wirtschaftlich geschehen kann, sollte dies auch für andere Produkte, die in geringeren Menge benötigt werden, machbar sein.

Von den eingangs erwähnten Themen, deren Erforschung für eine großtechnische Produktion von Einzellerölen für weitere Anwendungen über den Lebensmittelbereich nötig ist, wurden im Rahmen des BMBF-Projektes „OleoTech“ bearbeitet:

3.6.1 Sequenzierung und Charakterisierung neuer oleogener Hefestämme

In dem vorangegangenen ERA-IB Projekt „Bicycle“ wurden mit Hilfe der Sudan-Schwarz B-Färbung die drei neuen oleogenen Hefestämme *Saitozyma podzolica* (vormals *Cryptococcus podzolicus*) DSM 27192, *Apiotrichum porosum* (vormals *Trichosporon porosum*) DSM 27194 und *Scheffersomyces segobiensis* DSM 27193 aus Wald- und Moorbodenproben isoliert (Schulze et al., 2014) (Abbildung 23). In diesen Habitaten liegt ein hoher Überschuss an Kohlenstoff in Form von lignocellulose-haltiger Biomasse bei gleichzeitiger Stickstofflimitation vor, also ideale Produktionsbedingungen für Speicherstoffe, deren Bildung durch Nährstofflimitierung induziert wird, wie z.B. SCO. Zudem bestand die Hoffnung, dass die isolierten Stämme gute Verwerter von lignocellulose-assoziierten Mono-, Di- und/oder Polysacchariden sind und diese effizient als Substrat für die SCO-Produktion nutzen können. In der Studie von Schulze et al. (2014) fanden zudem eine Identifizierung der Stämme und erste grobe Untersuchungen bezüglich Lipidproduktion und Substratspektrum statt, in denen bestätigt wurde, dass es sich um oleogene Stämme handelt. Weiterhin zeigte es sich, dass *S. podzolica* und *A. porosum* beide in der Lage sind, Xylose mit vergleichbaren Ausbeuten wie Glucose als Kohlenstoffquelle für Wachstum und SCO-Produktion zu verwenden. *S. segobiensis* bildet unter Sauerstofflimitierung Ethanol als Nebenprodukt, während *S. podzolica* und *A. porosum* große Mengen an Gluconsäure bilden, wenn sie mit Glucose kultiviert werden. Das interessanteste Lipidprofil weist *S. segobiensis* auf, da es bis zu 16 % Palmitoleinsäure (C16:1) enthält, eine wertvolle Fettsäure, die sonst in nennenswerten Mengen nur in Sandorn- oder Macadamiaöl enthalten ist.

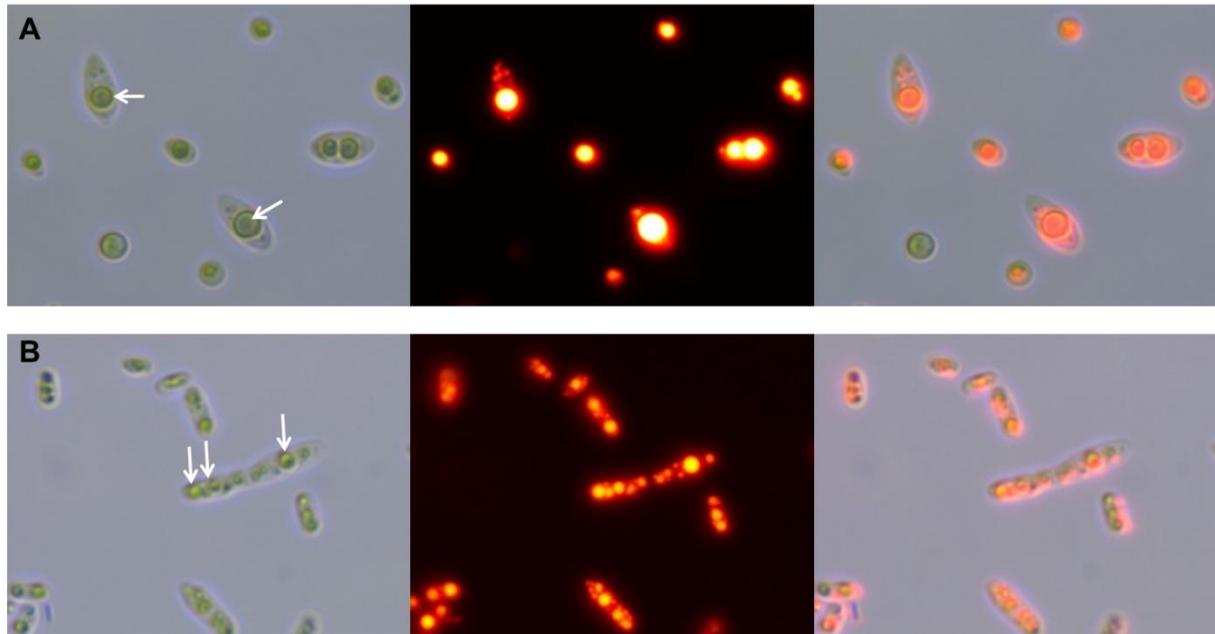


Abbildung 23: Lichtmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der beiden selbst-isolierten oleogenen Hefen *Saitozyma podzolica* DSM 27192 (A) und *Apiotrichum porosum* DSM 27194 (B). Einzellöle sind im Lichtmikroskop (links) als Lipidtröpfchen in den Hefezellen zu erkennen (weiße Pfeile). Nile-Rot färbt spezifisch neutrale Lipide, wie Einzellöle, an und sind unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Mitte) als orange-gelbe Tropfen zu erkennen (Anregung: 490 nm, Emission: 580 nm). Durch Überlagerung beider Aufnahmen (rechts) können Lipidtröpfchen im Lichtmikroskopbild identifiziert werden. Wie auf den Aufnahmen zu erkennen ist, bildet *A. porosum* wenige, aber dafür größere Lipidtröpfchen, während *S. podzolica* eher viele, aber kleine Lipidtröpfchen akkumuliert. Bildmaterial von Olga Gorte.

Im Rahmen des BMBF-Projektes „OleoTech“ wurden die Genome von *S. podzolica* (Aliyu et al., 2019) und *A. porosum* (Gorte et al., 2019) sequenziert, assembliert und annotiert. Bei *S. podzolica* bestand die finale Assemblierung aus 46 Contigs mit einer Gesamtgröße von 29.888.215 bp. Das Genom weist einen durchschnittlichen G+C-Gehalt von 58,79% auf und kodiert für 10.224 Proteine. *S. podzolica* gehört zur Ordnung der *Tremellales* (Abbildung 24). Im Vergleich zu anderen Mitgliedern der Gattungen *Dioszegia*, *Saitozyma* und *Tremella*, deren Genomgrößen sich im Bereich von 19.344.119 bis 28.639.919 bp bewegen, ist das Genom von *S. podzolica* deutlich größer und enthält eine wesentlich höhere Anzahl an Genen für CAZys (Enzyme, die an der Synthese, am Metabolismus und der Bindung von und an komplexen Kohlenhydraten beteiligt sind) sowie für proteolytische Enzyme (MEROPS). Im Vergleich zum nächsten Verwandten, *Cryptococcus* sp. JCM 24511, kodiert das Genom von *S. podzolica* für 1.689 einzigartige Proteine.

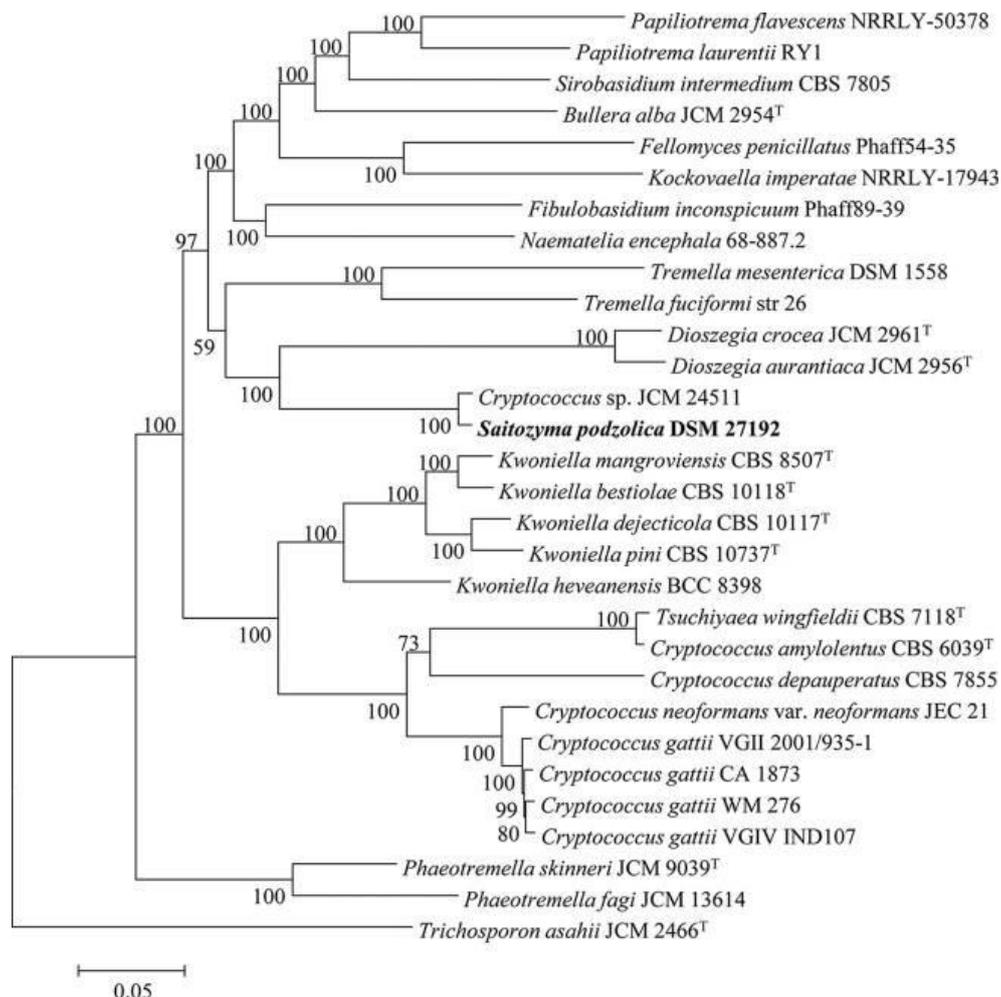


Abbildung 24: Maximum Likelihood-Analyse der Phylogenie der Kerngenome von 31 repräsentativen Mitgliedern der Ordnung *Tremellales* und *Trichosporon asahii* JCM2466^T als Outgroup (aus: Aliyu et al. 2019).

Aufgrund der vielen Unterschiede zu den anderen Mitgliedern der Ordnung *Tremellales* werden derzeit *S. podzolica* und weitere acht Spezies, die repräsentativ die einzelnen Cluster (mit Ausnahme der humanpathogenen Spezies) innerhalb der *Tremellales* abdecken (*Tremella mesenterica* DSM 1558, *Dioszegia aurantiaca* CBS 6980, *Bulleromyces albus* CBS 501 = *Bullera alba* JCM 2954^T, *Kwoniella mangroviensis* CBS 8507, *Sirobasidium intermedium* CBS 7805, *Cryptococcus amylolentus* CBS 6039, *Cryptococcus* sp. JCM 24511, *Cryptococcus fagi* = *Phaeotremella fagi* JCM 13614), phänotypisch weiter untersucht, um die Annotation insbesondere der CAZys experimentell zu verifizieren. Erste Ergebnisse bestätigten bereits, dass *S. podzolica* und *K. mangroviensis* sehr viele der getesteten Kohlenstoffquellen, u.a. Xylane, Cellulose und Pektin, verwerten können und somit

die „Spitzenreiter“ unter den getesteten Stämmen sind. Besonders interessant war dabei, dass bei beiden Stämmen filamentöses Wachstum bei der Kultivierung auf Cellulose induziert werden konnte.

Das finale assemblierte Genom von *A. porosum* besteht aus 32 Contigs mit einer Gesamtgröße von 25.479.456 bp, weist einen G+C-Gehalt von 59,15% auf und kodiert für 9.153 Proteine. Eine weitere Auswertung der Genannotationen ergab 570 putative CAZys, 575 mutmaßlich sekretierte Proteine und 265 vorhergesagte proteolytische Enzyme (MEROPS). *A. porosum* gehört zur Ordnung der *Trichosporonales* (Abbildung 25). Innerhalb der anderen sequenzierten *Apiotrichum* ssp. variieren Genomgröße und G+C-Gehalt reicht von 31.617.680 – 23.647.732 bp und 61,14 – 56,47%. Der selbst sequenzierte *A. porosum*-Stamm liegt innerhalb dieser Bereiche und weist auch zu seinem nächsten sequenzierten Verwandten, *Apiotrichum porosum* (syn. *Trichosporon porosum*) JCM 1458^T, nur geringe Unterschiede im G+C-Gehalt (DSM 27194: 59,10% vs. JCM 1458^T: 58,52%) und in der Anzahl einzigartiger Proteine (DSM 27194: 621 vs. JCM 1458^T: 705) auf.

Da die Ordnung *Trichosporonales* wesentlich homogener erscheint, was die Genomgröße und Anzahl an CAZys betrifft, und mehrere bestätigte oleogene Stämme enthält, ist es hier möglich, nah-verwandte oleogene und nicht-oleogene Stämme miteinander zu vergleichen. Deshalb wurden hier gezielt die 5'UTR- und Promotor-Regionen der an der SCO-Bildung beteiligten Gene auf Unterschiede im Vorhandensein regulatorischer DNA-Bindedomänen untersucht und verglichen, da dies ein Ansatz sein könnte, um auf genomischer Ebene oleogene von nicht-oleogenen Stämmen zu differenzieren. Tatsächlich konnten Unterschiede in den regulatorischen Sequenzen der Acetyl-CoA-Carboxylase, ATP-Citrat-Lyase und Isocitrat-Lyase festgestellt werden. Die Phylogenie dieser Gene bei den oleogenen Hefen deckt sich nicht mit der des Kerngenoms. Im Gegensatz zu den nicht-oleogenen Hefen konnten hier Transkriptionsbindedomänen identifiziert werden, die im Zusammenhang mit Nährstoffmangel, wie z.B. Stickstoff- oder Phosphat-Mangel, beschrieben wurden (Aliyu et al., eingereicht). Da unter exakt diesen Bedingungen die Lipidakkumulation einsetzt, ist dies ein wichtiger Hinweis auf die molekularen Hintergründe der Oleogenität.

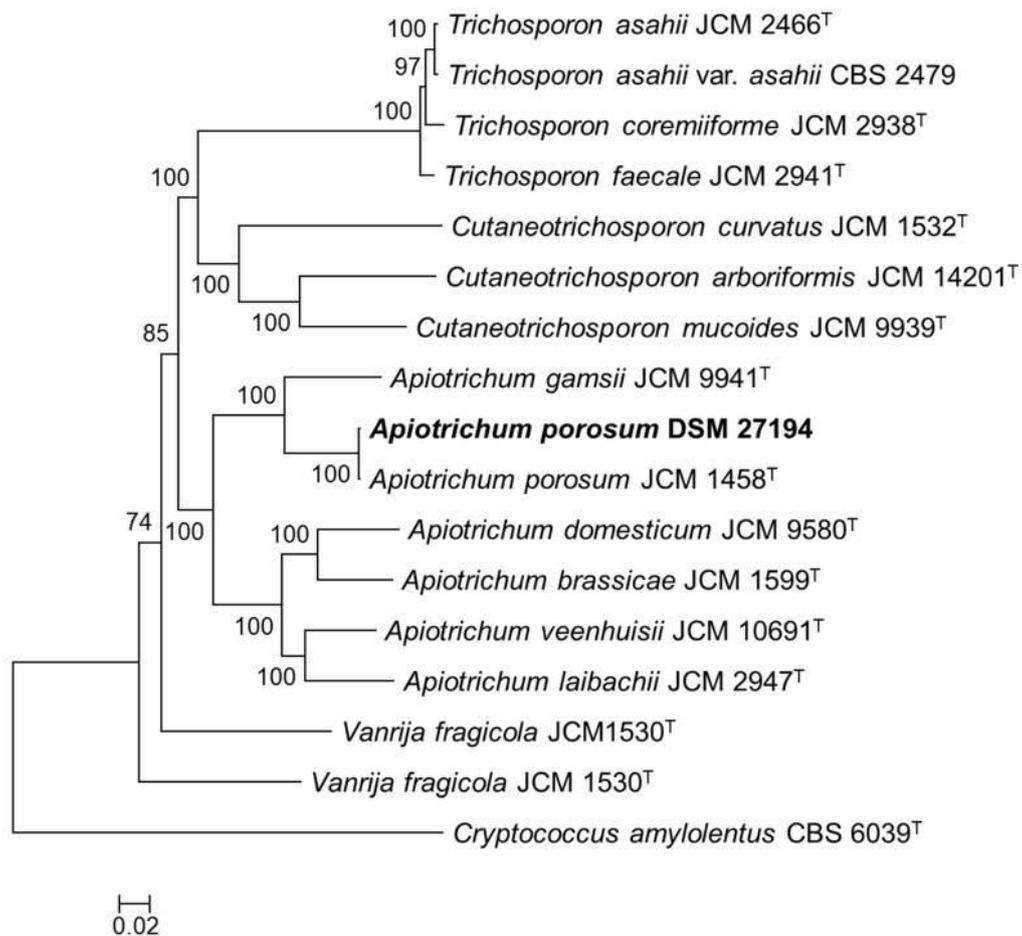


Abbildung 25: Maximum Likelihood-Analyse der Phylogenie der Kerngenome von 16 repräsentativen Mitgliedern der Ordnung *Trichosporonales* mit *Cryptococcus amyloilentus* CBS 6039^T als Outgroup (aus: Gorte et al., 2019).

Das Hauptnebenprodukt beider Hefestämme bei der Kultivierung auf Glucose ist Gluconsäure. Hauptverantwortlich dafür ist wahrscheinlich das Enzym Glucoseoxidase (β -D-Glucose-Oxidase, EC 1.1.3.4), das die Oxidation von Glucose durch molekularen Sauerstoff zu Glucono- δ -Lacton katalysiert, welches anschließend spontan zu Gluconsäure hydrolysiert (Leskovac et al., 2005). In den Genomen von *S. podzolica* und *A. porosum* jeweils mehrere putative Glucoseoxidase-Gene identifiziert werden. Um herauszufinden, welches dieser putativen Gene tatsächlich für die verantwortliche Glucoseoxidase kodiert, wurde die mRNA beider Pilze während der Gluconsäureproduktion isoliert und RT-PCRs mit spezifischen Primern für jedes putative Gen durchgeführt. Für die Glucoseoxidase aus *Aspergillus niger* ist bekannt, dass auch andere Zucker, z.B. Xylose, oxidiert werden können, wenn auch viel langsamer als Glucose (Mislovicová et al., 2010). Da bei der Kultivierung beider

Hefen auf Xylose die Bildung eines nicht-identifizierten Nebenproduktes beobachtet wurde (Schulze et al., 2014), wurde getestet, ob es sich dabei eventuell um Xylonsäure handeln könnte, die durch die Oxidation von Xylose durch die Glucoseoxidase entstanden ist. Die Produktion von Xylonsäure konnte tatsächlich für *S. podzolica* bestätigt werden. Die beiden Gene, deren Transkripte sowohl während der Produktion von Gluconsäure als auch von Xylonsäure nachgewiesen werden konnten, wurden für die Überexpression in *Pichia pastoris* kloniert und sollen charakterisiert werden. Für *A. porosum* konnte bisher nicht die Bildung von Xylonsäure nachgewiesen werden. Während der Produktion von Glucose konnte das Transkript eines putativen Glucoseoxidasegenes amplifiziert werden, welches nun ebenfalls kloniert und überexprimiert wird.

Das Genom von *S. segobiensis* DSM 27193 oder eines anderen *S. segobiensis*-Stammes wurde noch nicht sequenziert. In ersten Experimenten wurde die Hefe zunächst auf ihr Substratspektrum hinsichtlich ihres Wachstums untersucht, da dies in der Studie von Schulze et al. (2014) noch nicht erfolgt war. Hier zeigte sich, dass *S. segobiensis* in der Lage ist, auf den meisten getesteten Mono- und Disacchariden, sowie auf Xylan zu wachsen. Das beste Wachstum wurde mit Maltose festgestellt. Wird Maltose für die SCO-Produktion verwendet, wird ähnlich viel Lipid in den Zellen akkumuliert wie mit Glucose. Allerdings ist die Biomassekonzentration sehr viel höher und somit auch die Lipidkonzentration, und die Produktion des Nebenproduktes Ethanol wird gänzlich unterbunden. Zusätzlich wird der Palmitoleinsäureanteil am Gesamtlipid leicht von 16 % auf 24 % gesteigert. Zur weiteren Optimierung des Gesamtlipidgehaltes wie auch des Palmitoleingehaltes werden hier der Einfluss von Temperatur, Agitation, Begasungsrate und pH untersucht. Die nah-verwandte Art *S. stipitis* ist als crabtree-negativ beschrieben (Papini et al., 2012). Die Vermutung lag also nahe, dass eine gute Versorgung mit Sauerstoff die Ethanolbildung auch auf Glucose unterbinden würde. Allerdings konnte dies in ersten Experimenten nicht bestätigt werden. Sowohl bei der Gelöstsauerstoffkonzentration von mindestens 20 % als auch von mindestens 40 % wurde erhebliche Ethanolproduktion festgestellt.

3.6.2 Prozessoptimierung hinsichtlich SCO- und Co-Produkt-Bildung

Die Faktoren Kultivierungstemperatur, pH, Gelöstsauerstoffkonzentration, Substrat und Substratkonzentration können einen Einfluss auf die Produktion von Haupt- und Co-Produkt haben. So kann nicht nur der Lipidgehalt der Zellen bzw. die erzielte Lipidkonzentration gesteigert werden, sondern auch die Menge an gebildetem Nebenprodukt, hier Gluconsäure, unterbunden oder zeitlich verschoben werden, um die bestmögliche Verwertung des Substrates zu erzielen.

Zunächst wurde der Einfluss verschiedener Parameter auf die Co-Produktion von Gluconsäure und SCO in *S. podzolica* und *A. porosum* untersucht. Das Hauptaugenmerk wurde auf Glucosekonzentration, Stickstoffquelle und Gelöstsauerstoffkonzentration gelegt, weil diese Aspekte laut Literatur sowohl die SCO- wie auch die Gluconsäurebildung beeinflussen. Für *S. podzolica* zeigte sich, dass komplexe organische Stickstoffquellen, wie Hefeextrakt, die Lipidbildung positiv und die Gluconsäurebildung negativ beeinflussen, für die Biomasseproduktion jedoch anorganische Stickstoffquellen, wie Ammoniumsulfat, vorteilhafter sind. Ob dies allerdings auf dem enthaltenen organischen Stickstoffanteil beruht, oder eher auf den Vitaminen und/oder Spurenelementen, muss in weiteren Experimenten durch die Zugabe definierter organischer Stickstoffquellen geklärt werden. Durch die höheren Biomassekonzentrationen wird trotz niedriger Lipidgehalte (36,3% vs 39,6 – 50,0%) mit Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle die höchste Lipidkonzentration (14,7 g/L vs. 9,0 – 9,4 g/L mit organischen Stickstoffquellen) wie auch die höchste Gluconsäurekonzentration erreicht (17,5 g/L vs. 4,3 - 6,9 g/L mit komplexen organischen Stickstoffquellen). Durch die Verwendung von Hefeextrakt kann allerdings eine Separierung der Produktionsphasen von SCO und Gluconsäure erreicht werden: Nachdem der Höhepunkt der SCO-Bildung erreicht bzw. überschritten wurde, beginnt die Gluconsäureproduktion (Abbildung 26). Während der Lipidbildungsphase konnten keine nennenswerten Mengen an Gluconsäure gemessen werden. Sowohl die Zufütterung höherer Mengen an Glucose als auch Gelöstsauerstoffkonzentrationen über 40% steigerten sowohl Gluconsäure- als auch SCO-Bildung, verringerten jedoch die Biomassebildung. Auch hier zeigte sich eine Produktverschiebung von SCO zu Gluconsäure in der späten stationären Phase. Das Fettsäureprofil wurde nicht nennenswert durch die verschiedenen Prozessparameter

beeinflusst (Qian et al. 2019). Um weitere Einflussfaktoren zu identifizieren und gleichzeitig die Annotation zu verifizieren, werden Transcriptomics-Studien durchgeführt. Dazu werden in den unterschiedlichen Prozessphasen (Wachstumsphase, Übergang Wachstumsphase zur Produktionsphase bei beginnender Stickstofflimitierung, SCO-Hauptbildungsphase, Gluconsäure-Hauptbildungsphase) Proben gezogen und deren Transkriptprofile verglichen (Qian et al., 2019).

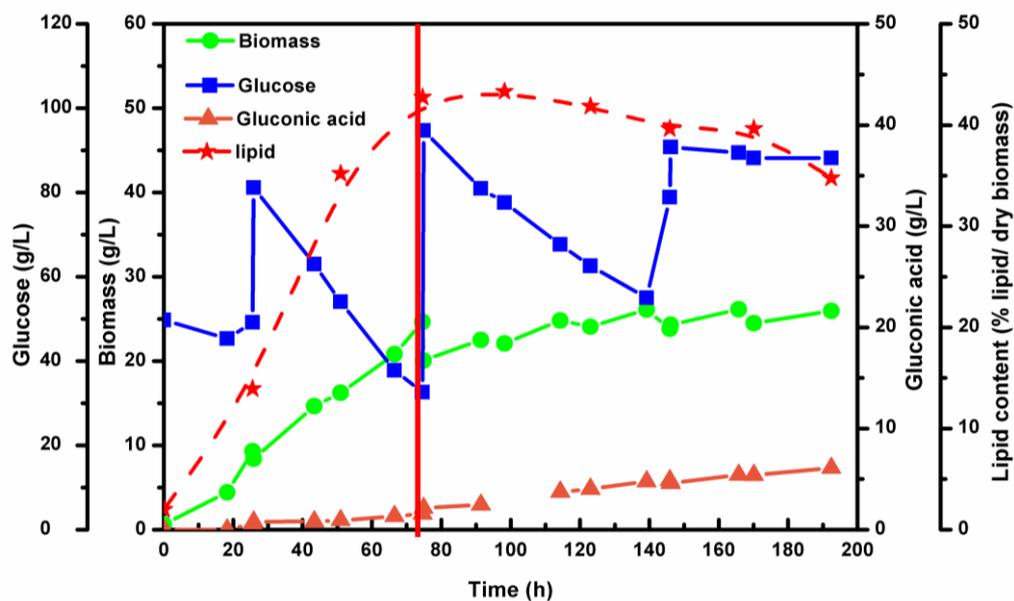


Abbildung 26: Fermentationsverlauf von *Saitozyma podzolica* DSM 27192 mit Hefeextrakt als Stickstoffquelle. Die rote Linie markiert Maximum der Lipidproduktion und den Beginn der Gluconsäureproduktion.

Lipidgehalt und Biomassekonzentration wurden in *A. porosum* durch den Wechsel von anorganischer zu organischen Stickstoffquellen, sowie hoher Substrat- wie auch Gelöstsauerstoffkonzentrationen über 40 % kaum beeinflusst. Die Kombination von höher Gelöstsauerstoffkonzentration und hohen Substratkonzentration steigerte die Gluconsäurebildung jedoch deutlich von 4,6 g/L unter Standardbedingungen auf 46,4 g/L (Qian et al., 2019).

Der Standardprozess für beide Hefen ist ein Fed-Batch-Prozess und basiert auf Glucose. Dies macht eine tägliche Messung der Glucosekonzentration zur Berechnung des Feeds nötig, der dann manuell zugegeben wird. Die Verwendung

von Acetat bzw. Mischungen flüchtiger, kurzkettiger Fettsäuren wäre nicht nur nachhaltiger und wirtschaftlicher, sondern unterdrückt auch die Gluconsäureproduktion und ermöglicht eine automatisierte, kontinuierliche Zufütterung des Substrates. Diese Strategie wurde für *S. podzolica* und *A. porosum* getestet. Es zeigte sich, dass beide Hefen gut mit 10 oder 20 g/L Acetat wachsen, wenn zu Kultivierungsbeginn 10 g/L Glucose als Stimulanz hinzugegeben werden. Durch die Verwendung von Acetat als pH-Korrekturmittel, wurde Acetat kontinuierlich in kleinen Mengen zugeführt und konnte als Kohlenstoffquelle genutzt werden. Beide Hefen akkumulierten bis zu 40 % Lipid pro Biotrockenmasse, jedoch war nur *A. porosum* in der Lage, mit 20 g/L Acetat als Startkonzentration größere Mengen an Lipid zu akkumulieren (Abbildung 27).

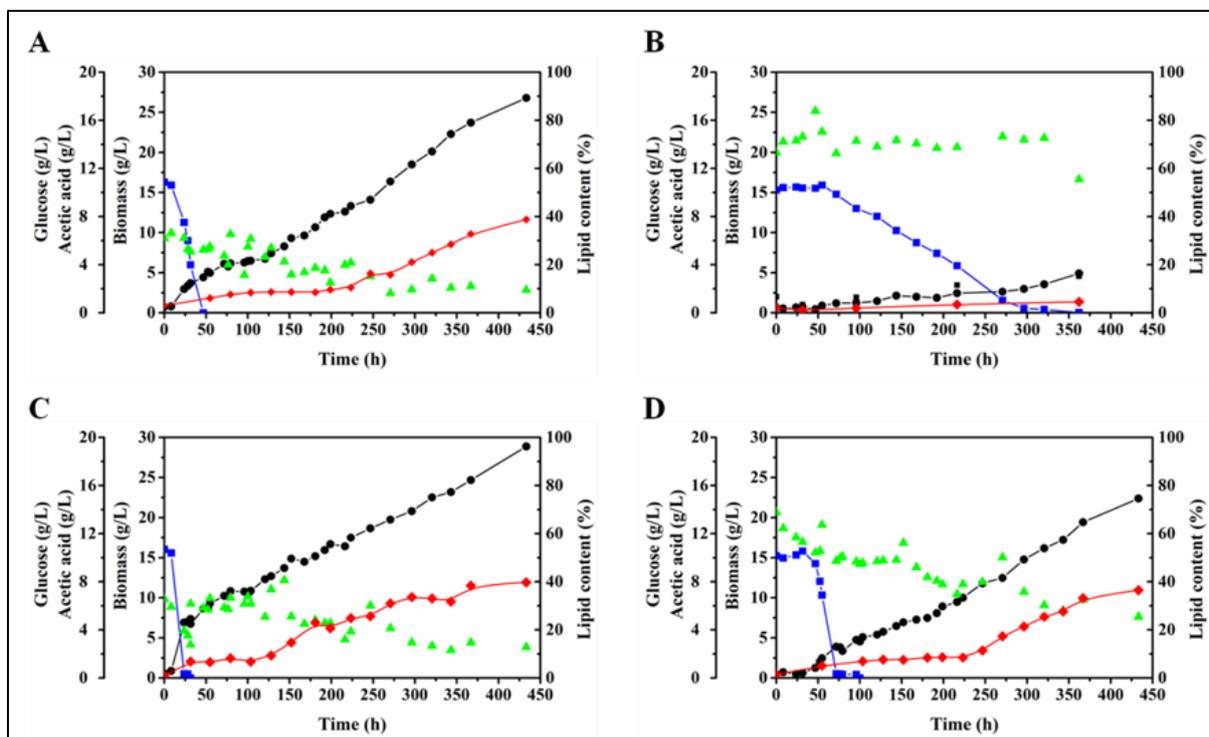


Abbildung 27: SCO-Produktion im Bioreaktor (2,5 L) mit *S. podzolica* DSM 27192 und *A. porosum* DSM 27194 mit automatisierter, kontinuierlicher Zufütterung (pH-stat) von Acetat. **A** und **B:** Wachstum, Substratverbrauch und Lipidproduktion von *S. podzolica* mit einer anfänglichen Natriumacetatkonzentration von 10 g/L (A) und 20 g/L (B). **C** und **D:** Wachstum, Substratverbrauch und Lipidproduktion von *A. porosum* mit einer anfänglichen Natriumacetatkonzentration von 10 g/L (C) und 20 g/L (D). Anfänglich wurden jeweils 10 g/L Glucose als Wachstumsstimulanz zugegeben. Schwarze Punkte: Biotrockenmasse, blaue Diamanten: Glukosekonzentration, grüne Dreiecke: Acetatkonzentration, rote Rauten: Lipidgehalt. Aus: Qian et al. (2020).

A. porosum erwies sich somit als wesentlich robuster und als besserer Kandidat für die Lipidproduktion mit flüchtigen Fettsäuren. Durch die Verwendung von Acetat als Kohlestoffquelle werden tendenziell mehr gesättigte Fettsäuren gebildet (Qian et al., 2020). In weiterführenden Experimenten wurde deshalb die Eignung verschiedener Mischungen an flüchtigen Fettsäuren, wie sie beispielsweise in Abwässern oder Belebtschlamm vorkommen, für die SCO-Produktion mit *A. porosum* untersucht. Dabei zeigte sich, dass ein VFA-Verhältnis von Acetat:Propionat:Butyrat von 6:1:1 am besten für die SCO-Produktion war und in über 30 % Lipidanteil pro Biotrockenmasse resultierte. Acetat wird hierbei bevorzugt verstoffwechselt, gefolgt von Butyrat. Je höher der Anteil an Propionat in der Mischung war, desto niedriger waren die erreichte Biomassekonzentrationen und der Lipidanteil an der Biotrockenmasse (Bai, 2019 [Bachelorarbeit]).

Bezüglich des Standardprozesses auf Glucosebasis soll ebenfalls eine Automatisierung erfolgen, indem die Zufütterung der Glucose an die gelöste Sauerstoffkonzentration gekoppelt wird.

3.6.3 Aufarbeitung der SCOs

Für die bestmögliche Gewinnung des Einzelleröls muss für jeden Produktionsorganismus zunächst die optimale Aufarbeitungsmethode ermittelt werden. Auch für relativ nahe verwandte Arten, wie bei den neu isolierten Stämmen *S. podzolica* und *A. porosum*, kann sich die Extraktionseffizienz für eine gegebene Methode stark unterscheiden. Dies ist ein bedeutender Unterschied zu Pflanzenöl, das in der Regel durch Pressen gewonnen wird, unabhängig davon, welche Ölsaart verwendet wird. Auch in Hinblick auf die Vergleichbarkeit und Aussagekraft publizierter Forschungsergebnisse ist es wichtig zu wissen, ob durch ein bestimmtes Vorgehen die Gesamtlipidmenge oder das Vorhandensein einzelner Fettsäurespezies unter- oder überschätzt wird. Daher wurden in diesem Projekt jeder Schritt der Aufarbeitung – Zellaufschluss, Extraktion, Probenvorbereitung für die Analytik und die Analytikmethode selbst - mit definierten Standards auf Wiederfindung und Sensitivität evaluiert. Anschließend wurde unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse die optimale Methode für die SCO-Gewinnung für *S. podzolica* und *A. porosum* ermittelt.

Die Zellen beider Hefestämme wurden mit dem Hochdruckhomogenisator, der Kugelmühle und durch Ultraschall aufgeschlossen. Alle Methoden eignen sich prinzipiell für die Verwendung im industriellen Maßstab. Der Hochdruckhomogenisator kann zusätzlich auch kontinuierlich betrieben werden. Um einen ersten Eindruck über den Erfolg des Zellaufschlusses zu bekommen, wurde dieser durch Mikroskopie und durch Anfärben der Zellen mit Nil-Rot überprüft. Anschließend erfolgte die Extraktion mit 3 unterschiedlichen Lösungsmittelsystemen (Chloroform:Methanol 2:1 (= Folch), Chloroform:Methanol 1:2 (= Bligh & Dyer), Ethanol:Hexan (= „Grün“)). Die extrahierte Gesamtlipidmenge wurde gravimetrisch nach Trocknung der Extrakte bestimmt. Zusätzlich wurde durch Gaschromatographie (GC) und durch Flüssigchromatographie (HPLC) die Fettsäurezusammensetzung der extrahierten Lipide und nochmals die Gesamtlipidmenge analysiert. Für die GC mussten die extrahierten Lipide zunächst zu Fettsäuremethylestern umgewandelt, für die HPLC die Fettsäuren durch Hydrolyse freigesetzt werden. Hydrolyse und Umesterung wurden mit unterschiedlichen Katalysatoren durchgeführt und auf deren Effizienz und Einfluss auf das erhaltene Fettsäureprofil hin untersucht. Als Vergleich diente die direkte *in situ*-Transesterifizierung gefriergetrockneter Biomasse.

Als Endergebnis zeigte sich, dass *S. podzolica* am besten mit dem Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen und das darin enthaltene SCO am effizientesten mit Ethanol:Hexan extrahiert werden kann. Der ermittelte Lipidgehalt war höher als mit der direkten *in situ*-Transesterifizierung. Im Gegensatz dazu erwiesen sich *A. porosum*-Zellen als zu robust für alle 3 Aufschlussmethoden. Die besten Ergebnisse konnten noch mit der Kugelmühle und anschließender Extraktion mit Ethanol:Hexan erzielt werden, jedoch war der mit der *in situ*-Transesterifizierung ermittelte Lipidgehalt etwa doppelt so hoch. Daher ist die direkte *in situ*-Transesterifizierung die derzeit am besten geeignete Methode für *A. porosum*. Es zeigte sich außerdem, dass die Wahl des Lösungsmittelsystems für die Lipidextraktion bei schlechtem Zellaufschluss keine signifikante Rolle spielt.

Bezüglich der Analytik sind GC und HPLC gleich gut geeignet, unterscheiden sich aber deutlich beim Aufwand für die Probenanalytik. Für die GC kann die Umesterung sowohl mit Schwefelsäure als auch mit Kalilauge erfolgen. Die Verwendung von Schwefelsäure erwies sich als minimal schonender für die ungesättigten Fettsäuren. Die vorbereitende Hydrolyse für die HPLC-Analytik war nur enzymatisch möglich.

Auch bei drastisch erhöhter Temperatur und großen Mengen an eingesetzter Kalilauge und Schwefelsäure wurden die Fettsäuren lediglich geschädigt, aber nicht vom Glyceringerüst abgelöst. Bei der enzymatischen Hydrolyse durch Lipasen muss berücksichtigt werden, dass aufgrund der Substratspezifität des Enzyms maximal nur 2 der 3 Fettsäuren vom Glyceringerüst abgespalten werden. Daher wird auch in Zukunft die Analytik standardmäßig mit der GC durchgeführt.

In einem zweiten Projekt in Kooperation mit Dr. Frey (IHM, KIT) wird das Hochspannungsimpulsverfahren für den Zellaufschluss von *S. podzolica* getestet. Dieses Verfahren erzielte bereits gute Ergebnisse für den Zellaufschluss und der anschließenden Lipidextraktion aus oleogenen Algen (Silve et al., 2018). Die prinzipielle Eignung dieser Methode für *S. podzolica* konnte bereits gezeigt werden. Derzeit werden Ionenstärke und Biomassekonzentration der Zellsuspension, Zyklusanzahl, Energieeintrag und Wartezeit vor der Lösungsmittelextraktion optimiert.

In einem dritten Projekt wird die mikrowellenunterstützte SCO-Extraktion mit stark eutektischen Lösungsmitteln (Deep Eutectic Solvents, DES) untersucht. DES bestehen aus einer Mischung von quartären Ammoniumsalzen und einem Wasserstoffbrückendonator, wie z.B. Zucker, Amine oder Carbonsäuren. Obwohl der Schmelzpunkt der Ausgangssubstanzen weit über Raumtemperatur liegt, ist die resultierende Salzschnmelze bei Raumtemperatur flüssig und kann als wasserfreies Lösungsmittel eingesetzt werden. Da DES aus günstigen Laborchemikalien bestehen, sind sie viel günstiger als z.B. Ionische Flüssigkeiten, die ähnliche Eigenschaften aufweisen. Zusätzlich sind sie ungiftig und biologisch abbaubar (Abbot et al., 2003, 2004). Tommasi et al. (2017) zeigten bereits, dass die Vorbehandlung von Algenzellen durch DES und Mikrowelle die anschließende Lipidextraktion mit Dimethylcarbonat und überkritischem CO₂ signifikant verbesserte. Daher wäre es interessant zu sehen, ob SCO aus *S. podzolica* alleinig durch mikrowellenunterstützte Extraktion gewonnen werden kann. Dazu werden derzeit unterschiedliche DES getestet. Als erstes Ergebnis zeigte sich, dass die Extraktion nur mit „sauren“ DES möglich ist, d.h. DES, zu denen eine Säure hinzugegeben wurde oder die eine Dicarbonsäure als Komponente enthalten.

3.6.4 Produktion von Biotensiden (Glykolipide)

Tenside sind amphiphile Moleküle, die in zahlreichen Produkten des täglichen Lebens wie z.B. Lebensmitteln, Kosmetika und Arzneimitteln vorkommen (Šabeder et al., 2006; Marchant und Banat, 2012). Fettsäurezuckerester, auch bekannt als Glykolipide, bilden eine spezielle Klasse von Tensiden, die aus einem Zuckeranteil und einem Fettsäurerest bestehen. Im Vergleich zu anderen Tensidklassen sind sie im Allgemeinen biologisch abbaubar, ungiftig und umweltfreundlich. Sie sind dabei sehr mild und gleichzeitig hautfreundlich (Chang und Shaw, 2009). Die Synthese von Glykolipiden kann sowohl durch chemische wie auch durch mikrobielle oder enzymatische Prozesse erfolgen (Ducret et al., 1996). Die enzymatische Synthese bietet allerdings die Möglichkeit einer grünen und nachhaltigen Produktion von maßgeschneiderten Glykolipiden. Die enzymatische Ver- bzw. Umesterung von Zucker und Fettsäure oder Fettsäureestern wird häufig durch Esterasen oder Lipasen in Reaktionsmedien mit geringer Wasseraktivität katalysiert (Pöhnlein et al., 2015). Unter diesen Bedingungen wird die hydrolytische Aktivität beider Enzymklassen umgekehrt und es entstehen Esterbindungen zwischen der Hydroxylgruppe eines Zuckermoleküls und der Carboxylgruppe der Fettsäure (Zaks und Klibanov, 1985; Klibanov, 1989). Als Reaktionsmedium kommen diverse organische Lösungsmittel, ionische Flüssigkeiten oder Stark-Eutektische-Lösungsmittelsysteme (DES) in Frage. In organischen Lösungsmitteln ist die Zuckerkomponente für die Glykolipid-Synthese nur schwer löslich, was die Synthesemenge limitiert. Ionische Flüssigkeiten (ILs) wurden daher verwendet, um eine gute Löslichkeit beider Substrate, Zucker und Fettsäure, zu gewährleisten (Shin et al., 2019). Es ist allgemein anerkannt, dass bestimmte ionische Flüssigkeiten, insbesondere solche, die Imidazolanionen enthalten, einen positiven Einfluss auf die Aktivität von Lipasen haben (Qin et al., 2016). Der grüne Aspekt von ILs wird jedoch oft in Frage gestellt und insbesondere DES werden als kostengünstige, biologisch abbaubare und erneuerbare Alternative gehandelt (Grüniger et al., 2019).

Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Zucker gleichzeitig als Wasserstoffbrückendonator für die DES-Bildung und als Substrat für die enzymatische Glykolipidproduktion dienen können (Siebenhaller et al., 2016). Weiterhin war es möglich, ein Cellulosefaserhydrolysat aus Buchenholz als Zuckerquelle sowohl für

die enzymatische Reaktion als auch als DES-Bestandteil zu verwenden, um Glykolipide zu synthetisieren (Siebenhaller et al., 2017). Die verwendeten Fettsäuren waren allerdings noch fossilem Ursprungs. Um die Nachhaltigkeit des Produkts zu erhöhen, wurden Fettsäuremethylester, die aus SCO gewonnen wurden, als Fettsäurequelle für die enzymatische Synthese verwendet. Das SCO selbst wurde in einer Fermentation mit der oleogenen Hefe *Cutaneotrichosporon oleaginosus* (vormals *Cryptococcus curvatus*) ATCC 20509 auf Cellulosefaserhydrolysat als Kohlenstoffquelle hergestellt (Abbildung 28). Dabei zeigte sich, dass sich das Buchenholz-Cellulosefaserhydrolysat aus dem Organosolv-Prozess hervorragend als günstige und nachhaltige Kohlenstoffquelle für die SCO-Produktion mit *C. oleaginosus* eignet. Sowohl Biomassekonzentration als auch Lipidgehalt waren vollständig vergleichbar mit Fermentationen, die auf reiner Glucose durchgeführt wurden. Die erfolgreiche Synthese von Glykolipiden in dem DES auf Cellulosefaserhydrolysat-Basis konnte mittels NMR-Analyse nachgewiesen werden. Es wurden mehrere Zucker(di-)ester wie Glucose-Palmitat oder -Oleat und Glucose-Di-Linoleat in verschiedenen MS-Experimenten nachgewiesen (Siebenhaller et al., 2018).

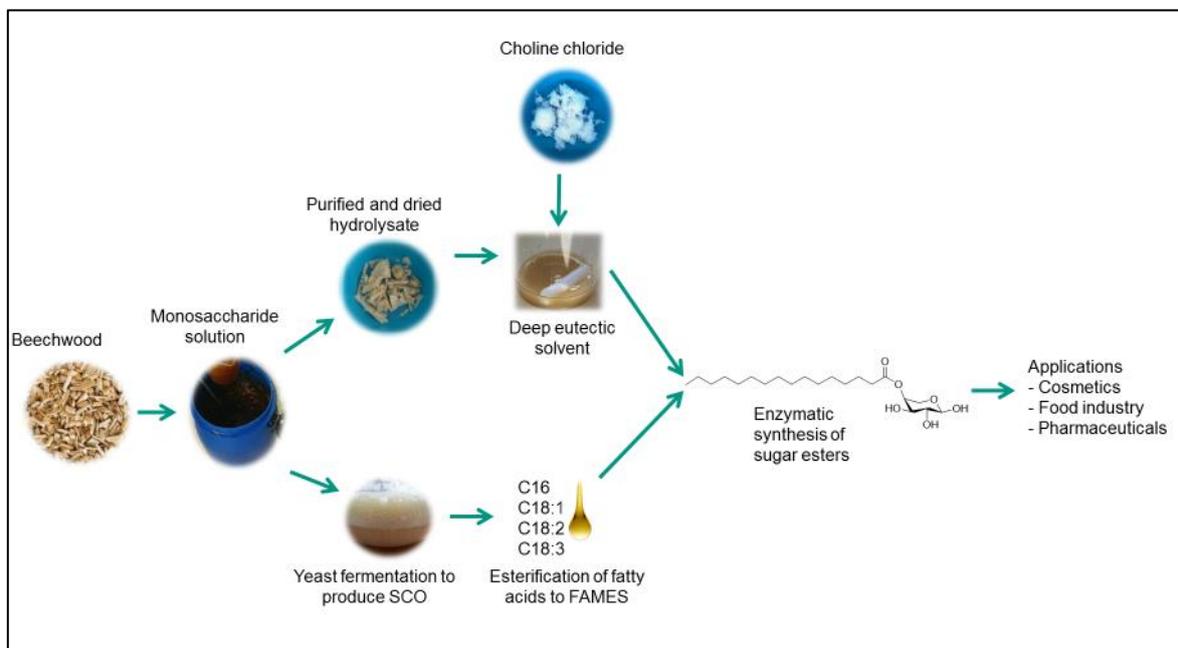


Abbildung 28: Enzymatische Produktion von Glykolipiden, die vollständig auf erneuerbaren Substraten basieren. Cellulosefaser-Hydrolysat wurde dabei sowohl als Kohlestoffquelle für die SCO-Produktion mit *C. oleaginosus* ATCC 20509 als auch als DES-Bestandteil und Zuckerbestandteil für die Glykolipidsynthese eingesetzt (Siebenhaller et al., 2018).

Derzeit wird geprüft, ob sich die Herstellung von SCO-basierten Glykolipiden als direkte Ein-Topf-Reaktion durchführen lässt, bei der die SCO-Extraktion aus gefriergetrockneter *S. podzolica*-Biomasse durch mikrowellenunterstützte DES-Extraktion durchgeführt wird und somit für die enzymatische Glykolipidsynthese zur Verfügung stehen. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass dieser Ansatz vielversprechend ist, und sich in der Mikrowelle direkt aus oleogener Biomasse Glykolipide synthetisieren lassen. Glykolipid-ähnliche Substanzen konnten mittels Dünnschichtchromatographie und Mitteldruckchromatographie nachweisen werden. Die Massen einzelner aufgetrennter Substanzen entsprechen denen von Glucose-Palmitat und Glucose-Stearat. Die direkte Synthese von Glykolipiden aus Biomasse stellt eine massive Einsparung von Arbeitsschritten und Reaktionszeit dar und ist somit eine bedeutende Weiterentwicklung des Ansatzes von Siebenhaller et al. (2018).

IV. Zusammenfassung und Ausblick

Für die erfolgreiche Etablierung einer biobasierten Wirtschaft spielen filamentöse Pilze und Hefen eine entscheidende Rolle, weil diese über ein einzigartiges und äußerst reichhaltiges Repertoire an Glykosid-Hydrolasen und anderen Kohlenhydrat-aktiven Enzymen („CAZys“) zum Abbau von Biomasse verfügen und in der Natur Schlüsselpositionen bei der Zersetzung von Lignocellulose besetzen. In diesem Kontext wurde 2013/14 mit der Einwerbung meines ersten Projektes die Arbeitsgruppe „Biotechnologie der Pilze“ ins Leben gerufen, die sich seitdem mit der mykologischen Stoffproduktion aus nachhaltigen biomasse-basierten Substraten befasst und auf das bereits vorher von mir etablierte Pilz-Fermentationstechnikum am Teilinstitut „Technische Biologie“ am KIT aufbaut. Dieser Themenschwerpunkt stellt ein Alleinstellungsmerkmal am KIT dar und findet sich deutschlandweit nur an wenigen Universitäten in ähnlicher Form wieder.

In der vorliegenden Habilitationsschrift möchte ich nun einen umfassenden Überblick über die Ergebnisse der letzten 5-6 Jahre sowie über die Prinzipien einer biobasierte Wirtschaft und über deren Umsetzungsstrategien, geben.

Mein erster Forschungsschwerpunkt besteht in der **Produktion der Plattformchemikalie L-Malat** mit dem filamentösen Schimmelpilz *Aspergillus oryzae* und beschäftigt sich konkret im Rahmen der BMBF-Projekte ValProWa und EvaOrg, dem DFG-Projekt SchweWa und dem MWK-Projekt Pyrolyseöl mit:

1. der Erweiterung des Substratspektrums hin zu kostengünstigen und nachhaltigen Kohlenstoffquellen, insbesondere Acetat, Pyrolyseprodukte auf Weizenstrohbasis, Lignocellulose-Hydrolysate, Melasse und Rohglycerin.

Hier wurde eine Vielzahl an Mono- und Disacchariden erstmals überhaupt auf ihre Eignung für die L-Malatproduktion hin untersucht und evaluiert. Zudem konnte erfolgreich gezeigt werden, dass Melasse, Roh-Glycerin und Lignocellulose-Hydrolysate sich hervorragend für die kostengünstige L-Malatproduktion einsetzen lassen. Ebenso konnte erstmals gezeigt werden, dass *A. oryzae* als einer der wenigen getesteten Pilze in der Lage ist, auf toxischen Pyrolyseprodukten als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. In weiterführenden Toxizitätstests wurde das bisher nicht als antimikrobiell beschriebene 2-Cyclopenten-1-on als potentes

Fungizid identifiziert, welches vermutlich zur ermittelten geringen Toleranz gegenüber Pyrolyseöl beiträgt. Mit Hilfe eines zweistufigen Prozesses konnte zudem L-Malat aus Synthesegas ($=\text{CO}$, $\text{CO}_2 + \text{H}_2$) produziert werden. Dies war die erste Studie, die gezeigt hat, dass L-Malat mikrobiell aus Synthesegas herstellbar ist und die die derzeitige höchste Ausbeute an C_4 -Körpern aus Synthesegas beschreibt.

2. der Prozessentwicklung und –optimierung, einschließlich der Medienoptimierung (C:N-Verhältnis, Stickstoffquelle und Anfangskonzentration der Kohlenstoffquelle), pH-Wert und Einfluss der pH-Kontrolle, Optimierung der Vorkultur und unterschiedlicher Prozessmodi.

Hier wurde erfolgreich der Standard-Batch-Prozess vom Schüttelkolben in den Bioreaktor übertragen, der den Ausgangspunkt für alle weiteren Prozessoptimierungsschritte bildet. Es zeigte sich, dass *A. oryzae* nicht durch hohe Substratkonzentrationen gehemmt wird, aber dass Produktinhibition bei L-Malatkonzentrationen von ca. 50 g/L vorliegt. Um diese Produktinhibition zu umgehen, konnte erfolgreich ein Repeated-Batch-Prozess im Schüttelkolbenmaßstab etabliert werden. *A. oryzae* bildet neben Malat weitere Säuren (u.a. Fumarat, Citrat, α -Ketoglutarat, Aconitat, Oxalacetat, Pyruvat, Acetat, Lactat und Succinat) als Nebenprodukte, deren Bildung stark durch das C:N-Verhältnis beeinflusst wird. Eine HPLC-Analytik, die alle genannten Säuren auftrennt, konnte zudem erfolgreich etabliert werden. Als bestes C:N-Verhältnis für die L-Malatproduktion wurde 200:1 ermittelt, was dem des Standardprozesses entspricht. Erstmals wurde für *A. oryzae* auch das pH-Optimum für die Malatproduktion bestimmt. Dazu musste das üblicherweise verwendete CaCO_3 durch eine andere, dosierbare Base ersetzt werden. Es zeigte sich, dass alle getesteten Basen die Malatproduktion verringerten, aber die Zugabe von Partikeln die Malatproduktion positiv beeinflusste. Mit der Kombination von NaHCO_3 und Talk-Partikeln konnte das pH-Optimum von pH 6,5 bestimmt werden. Diese Versuche dienen auch der Vorbereitung des Prozess-Scale-Ups.

3. der Stammentwicklung von *A. oryzae* zur Klärung des Einflusses von Transportprozessen auf die L-Malatproduktion, sowie zur Erhöhung der Toleranz gegenüber Inhibitoren in Pyrolyseprodukten.

Hier konnten erfolgreich verschiedene, bereits in der Literatur beschriebene, wie auch unbeschriebene Transportergene in *A. oryzae* transformiert werden. Ein weiterer Ansatzpunkt zur allgemeinen Steigerung der Malatproduktion wie auch der Erhöhung der Toleranz gegenüber Pyrolyseprodukten ist die Mutagenese mit EMS.

Die weitere Forschung auf diesem Gebiet wird sich zum einen auf die prozesstechnische Charakterisierung der Malatproduktion mit *A. oryzae* konzentrieren, um Optimierungspotentiale zu identifizieren und mehr über die physiologischen Hintergründe zu erfahren. Auch die Implementierung des Repeated-Batch-Verfahrens im Bioreaktor und die Weiterentwicklung dieses Ansatzes hin zur kontinuierlichen Prozessführung sollen kurzfristig erfolgen. Hier könnte die Verwendung von Acetat eine wichtige Rolle spielen, weil die automatische Zufütterung in einem pH-Stat relativ einfach zu realisieren ist. Weiterhin werden in den neuen Projekten mehr und mehr molekularbiologische Ansätze verwendet, um auch die genetischen Hintergründe der Malatproduktion zu beleuchten. Gentechnische Ansätze werden daher nur unter diesem Gesichtspunkt verfolgt. Insbesondere die Aufklärung der Transportprozesse stellt einen wichtigen Forschungszweig dar, weil diese zentral für die biotechnologische Produktion vieler, wenn nicht aller, organischen Säuren sind.

Der zweite Forschungsschwerpunkt liegt in der **Produktion von Einzellerölen mit oleogenen Hefen**. Mikrobielle Lipide sind chemisch äquivalent zu Pflanzenölen und gelten daher als potentieller Rohstoff für Oleochemikalien. Für eine flächendeckende großtechnische Produktion von Einzellerölen für weitere Anwendungen über den Lebensmittelbereich hinaus, besteht noch Forschungsbedarf beim Screening nach neuen Stämmen und der Stammentwicklung, der Verwendung kostengünstiger Substrate oder bei der Co-Produktion weiterer, höherpreisiger Chemikalien zusätzlich zu den Einzellerölen, sowie bei der Extraktion von Einzellerölen. Im Rahmen des BMBF-Projektes OleoTech, dem deutsch-chinesischem Doktorandenaustausch und der Zusammenarbeit mit anderweitig geförderten Projekten, fokussiert sich die eigene Forschung auf diesem Gebiet auf:

1. das Screening neuer oleogener Hefestämme, deren phylogenetische Einordnung und Charakterisierung, sowie die Verwendung kostengünstiger Kohlenstoffquellen, insbesondere Acetat und volatiler Fettsäure-Mischungen.

In vergangenen Projekten konnten drei sehr interessante oleogene Hefestämme isoliert werden, die sich zum einen durch ein breites Substratspektrum und Co-Produktbildung (*Saitozyma podzolica* und *Apiotrichum porosum*) sowie hohe Robustheit (*A. porosum*) und zum anderen durch ein besonderes Fettsäureprofil (*Scheffersomyces segobiensis*) auszeichnen. Die Genome von *S. podzolica* und *A. porosum* wurden erfolgreich sequenziert und annotiert. Beide Hefen konnten phylogenetisch eingeordnet werden. Gene für die Lipidbildung wurden in beiden Hefen identifiziert. In *A. porosum* konnten Unterschiede in den regulatorischen Sequenzen dreier Gene festgestellt werden, die auf einen regulatorischen Zusammenhang mit Nährstoffmangel, wie z.B. Stickstoff- oder Phosphat-Mangel, hindeuten. Da unter exakt diesen Bedingungen die Lipidakkumulation einsetzt, ist dies ein wichtiger Hinweis auf die molekularen Hintergründe der Oleogenität, der bisher noch nicht gezeigt werden konnte und daher erstmalig von uns beschrieben wurde. Weitergehende phänotypische Untersuchungen der selbst-isolierten Hefen konnten die Vorhersagen bezüglich der verwertbaren Kohlenstoffquellen bestätigen. Die Verwendung von Acetat bzw. Mischungen flüchtiger, kurzkettiger Fettsäuren ermöglicht eine automatisierte, kontinuierliche Zufütterung des Substrates. Diese Strategie wurde für *S. podzolica* und *A. porosum* erfolgreich umgesetzt. Durch die Verwendung von Acetat als pH-Korrekturmittel, wurde Acetat kontinuierlich in kleinen Mengen zugeführt und konnte als Kohlenstoffquelle genutzt werden. Beide Hefen akkumulierten bis zu 40 % Lipid pro Biotrockenmasse, jedoch war nur *A. porosum* in der Lage, mit höheren Acetat-Anfangskonzentrationen größere Mengen an Lipid zu akkumulieren.

2. die Prozessoptimierung hinsichtlich Einzelleröl- und Co-Produkt-Bildung (Gluconsäure und Ethanol).

Für *S. podzolica* konnte erfolgreich gezeigt werden, dass komplexe organische Stickstoffquellen, wie Hefeextrakt, die Lipidbildung positiv und die Gluconsäurebildung negativ beeinflussen, für die Biomasseproduktion jedoch anorganische Stickstoffquellen, wie Ammoniumsalze, vorteilhafter sind. Durch die Verwendung von Hefeextrakt konnte zudem eine erfolgreiche Separierung der Produktionsphasen von SCO und dem Co-Produkt Gluconsäure erreicht werden. Dieser Effekt zeigte sich nicht für *A. porosum*. *S. segobiensis* bildet in Glucose-

Fermentationen Ethanol als Co-Produkt. Dies lässt sich vollständig durch die Verwendung von Maltose als einziger Kohlenstoffquelle verhindern. Weitere Einflussfaktoren auf Haupt- und Co-Produktbildung waren pH-Wert, Kultivierungstemperatur und Begasungsrate.

3. die Bewertung unterschiedlicher Aufarbeitungsmethoden für die neu-isolierten Hefestämme.

Hier wurde jeder Schritt der Aufarbeitung – Zellaufschluss, Extraktion, Probenvorbereitung für die Analytik und die Analytikmethode selbst - mit definierten Standards auf Wiederfindung und Sensitivität evaluiert. Die Zellen beider Hefestämme wurden mit dem Hochdruckhomogenisator, der Kugelmühle und durch Ultraschall aufgeschlossen. Der Erfolg des Zellaufschlusses wurde durch Mikroskopie, durch Anfärben der Zellen mit Nil-Rot und der anschließenden SCO-Extraktion mit drei unterschiedlichen Lösungsmittelsystemen überprüft. *S. podzolica* konnte am besten mit dem Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen und das darin enthaltene SCO am effizientesten mit Ethanol:Hexan extrahiert werden. Der ermittelte Lipidgehalt war höher als mit der direkten *in situ*-Transesterifizierung (=Standardmethode). *A. porosum* erwies sich dahingegen als zu robust für alle drei Aufschlussmethoden. Für den Zellaufschluss von *S. podzolica* wurden zudem das Hochspannungsimpulsverfahren wie auch die Mikrowellen-unterstützte Extraktion mit Stark-Eutektischen-Lösungsmitteln (DES) erfolgreich getestet. Beide Verfahren wurden erstmalig auf oleogene Hefen angewendet.

4. die enzymatische Produktion von Glykolipiden aus Einzellerölen vollständig auf Basis von Lignocellulose.

Glykolipide sind Tenside und bestehen aus einem Zuckeranteil und einem Fettsäurerest. Daher stellen Glykolipide ein mögliches Folgeprodukt von SCOs dar, was deren Wertschöpfung erheblich steigern kann. Es wurden Fettsäuremethylester, die aus SCO gewonnen wurden, erfolgreich als Fettsäurequelle für die enzymatische Synthese von Glykolipiden verwendet. Das SCO selbst wurde in einer Fermentation mit der oleogenen Hefe *Cutaneotrichosporon oleaginosum* ATCC 20509 erstmalig und erfolgreich auf Cellulosefaserhydrolysat als Kohlenstoffquelle hergestellt. Sowohl Biomassekonzentration als auch Lipidgehalt waren vollständig vergleichbar mit

Fermentationen, die auf reiner Glucose durchgeführt wurden. Die erfolgreiche Synthese von Glykolipiden in dem DES auf Cellulosefaserhydrolysat-Basis konnte mittels NMR-Analyse nachgewiesen werden. Es wurden mehrere Zucker(di-)ester wie Glucose-Palmitat oder -Oleat und Glucose-Di-Linoleat in verschiedenen MS-Experimenten nachgewiesen. Dies ist die erste Studie, in der die enzymatische Glykolipidsynthese vollständig auf Lignocellulosebasis gelungen ist.

Auf diesem Forschungsgebiet wird eine **Weiterentwicklung** der enzymatischen Glykolipidsynthese in Richtung in Ein-Topf-Reaktion angestrebt, bei der die SCO-Extraktion aus gefriergetrockneter *S. podzolica*-Biomasse durch mikrowellenunterstützte DES-Extraktion durchgeführt und enzymatisch zu Glykolipiden umgewandelt wird. Die direkte Synthese von Glykolipiden aus Biomasse stellt eine massive Einsparung von Arbeitsschritten und Reaktionszeit gegenüber den bislang etablierten Verfahren dar. Weiterhin bietet die Sequenzierung der Genome der selbst-isolierten Hefen sehr viel Potential bezüglich der Erforschung der molekularen Hintergründe der Oleogenität. Dies kann insbesondere anhand der Ordnung Trichosporonales erfolgen, in die *A. porosum* eingeordnet wurde, da diese mehrere bestätigte oleogene Stämme enthält, und es hier möglich ist, nah-verwandte oleogene und nicht-oleogene Stämme miteinander zu vergleichen. Ebenso soll das Genom des dritten Hefestammes, *S. segobiensis*, sequenziert werden, um herauszufinden, ob die identifizierten Unterschiede in den regulatorischen Sequenzen der Lipid-Biosynthesegene auf alle oleogenen Hefen zutreffen, oder ob sich das Merkmal „Oleogenität“ mehrfach unabhängig voneinander entwickelt hat. Die SCO-Produktion mit allen drei Hefestämmen wird weiterhin untersucht und unter unterschiedlichen Gesichtspunkten (Co-Produkt, Ausbeute, Ökonomie und Fettsäureprofil) optimiert.

Vor kurzem wurde in meiner Arbeitsgruppe die Erforschung anaerober Pilze begonnen. Anaerobe Pilze haben den Vorteil, dass sie direkt auf unvorbehandelter Biomasse, wie z.B. Weizenstrohpartikeln, wachsen können, da sie ein reiches Repertoire an cellulolytischen und hemicellulolytischen Enzymen aufweisen. Als Stoffwechselendprodukte akkumulieren auch hier organische Säuren, so dass sich dieses Forschungsfeld nahtlos in das vorhandene Forschungsprofil einfügt und einen wichtigen Baustein für die biobasierte Wirtschaft darstellen könnte.

V. Literatur

Abbott, A.P., Capper, G., Davies, D.L., Rasheed, R.K., Tambyrajah, V. (2003). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem Commun (Camb)*. 1: 70-710. Doi:10.1039/b210714g

Abbott, A.P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D.L., Rasheed, R.K. (2004). Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids. *J Am Chem Soc*. 126: 9142–9147. Doi:10.1021/ja048266

Abdullah, R., Ikram-ul-Haq. (2015). Purification and characterisation of α -amylase produced by mutant strain of *Aspergillus oryzae* EMS-18. *Nat Prod Res*. 29: 710-716. Doi: 10.1080/14786419.2014.982648.

Abe, S., Furuya, A., Saito, T., Takayama, K. (1962). Method of producing L-malic acid by fermentation. US-Patent US 3,063,910.

ACS Green Chemistry Institute (2017). 12 principles of green chemistry. (https://www.acs.org/content/acs/en/greenchemistry/what-is-green_chemistry/principles/12-principles-ofgreen-chemistry.html) Stand: 06.04.2019.

Aldrich, D., Vink, W., Deptula, R.W., Muskus, D.J., Fronczkowski, P.R., Chrusch, M. (1979). Sugarless candies. US-Patent US 4,154,867.

Adrio, J.L. (2017). Oleaginous Yeasts: Promising Platforms for the Production of Oleochemicals and Biofuels. *Biotechnol Bioeng*. 114: 1915-1920. Doi: 10.1002/bit.26337.

Aliyu, H., Gorte, O., Neumann, A., Ochsenreither, K. (2019). Draft Genome Sequence of the Oleaginous Yeast *Saitozyma podzolica* (syn. *Cryptococcus podzolicus*) DSM 27192. *Microbiol Resour Announc*. 8. pii: e01676-18. Doi: 10.1128/MRA.01676-18.

Allcroft, R., Carnaghan, R. B.A. (1962). Groundnut toxicity. *Aspergillus flavus* toxin (aflatoxin) in animal products: preliminary communication. *Vet Rec*. 74: 863–864.

Ali, S., Nawaz, W. (2017). Optimisation of nutritional requirements for dopamine synthesis by calcium alginate-entrapped mutant strain of *Aspergillus oryzae* EMS-6. *Nat Prod Res*. 31: 281-288. Doi: 10.1080/14786419.2016.1233408.

Almeida, J.R.M, Modig, T., Petersson, A., Hähn-Hägerdal, B., Liden, G., Gorwa-Grauslund, M.F. (2007). Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Chem Technol Biotechnol*. 82: 340-349. Doi: 10.1007/s10295-014-1431-6.

Alonso, S., Rendueles, M., Díaz, M. (2015). Microbial production of specialty organic acids from renewable and waste materials. *Crit Rev Biotechnol*. 35: 497–513. Doi: 10.3109/07388551.2014.904269

Alvarez, H.M., Kalscheuer, R., Steinbüchel, A. (2000). Accumulation and mobilization of storage lipids by *Rhodococcus opacus* PD630 and *Rhodococcus ruber* NCIMB 40126. *Appl Microbiol Biotechnol*. 54: 218–223.

Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*. 101: 4851–4861. Doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.093

- Amoah, J., Kahar, P., Ogino, C., Kondo, A. (2019). Bioenergy and Biorefinery: feedstock, biotechnological conversion and products. *Biotechnol J.* 10:e1800494. Doi: 10.1002/biot.201800494
- Anastas, P.T., Warner, J.C. (1998). *Green chemistry: theory and practice*. Oxford University Press, New York.
- Anissimova, M., Allard, M. (2016). Method for the production of isoamyl alcohol. Patent. Veröffentlichungsnr: WO2016207267 A1.
- Anneken, D.J., Both, S., Christoph, R., Fieg, G., Steinberner, U., Westfechtel, A. (2006). Fatty Acids. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Doi: 10.1002/14356007.a10_245.pub2
- Arous, F., Atitallah, I.B., Nasri, M., Mechichi, T. (2017). A sustainable use of low-cost raw substrates for biodiesel production by the oleaginous yeast *Wickerhamomyces anomalus*. *3 Biotech.* 7:268. Doi: 10.1007/s13205-017-0903-6
- Asadi, S. Z., Khosravi-Darani, K., Nikoopour, H., Bakhoda, H. (2015). Evaluation of the effect of process variables on the fatty acid profile of single cell oil produced by *Mortierella* using solid-state fermentation. *Crit Rev Biotechnol.* 35: 94–102. Doi: 10.3109/07388551.2013.804805
- Auxenfans, T., Crônier, D., Chabbert, B., Paës, G. (2017). Understanding the structural and chemical changes of plant biomass following steam explosion pretreatment. *Biotechnol Biofuels.* 10:36. Doi: 10.1186/s13068-017-0718-z.
- Axelsson, M., Gentili, F. (2014). A single-step method for rapid extraction of total lipids from green microalgae. *PLoS ONE* 9:e89643. Doi: 10.1371/journal.pone.0089643
- Balasubramanian, S., Allen, J.D., Kanitkar, A., Boldor, D. (2011). Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system – design, optimization, and quality characterization. *Bioresour Technol.* 102: 3396–3403. Doi: 10.1016/j.biortech.2010.09.119
- Ballesteros, I., Oliva, J.M., Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, M. (2002). Enzyme hydrolysis of steamexploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particle sizes. *Process Biochem.* 38: 187–192. doi:10.1016/S0032-9592(02)00070-59
- Bai, X. (2019). Produktion mikrobieller Einzelleröle auf Grundlage erneuerbarer Substrate mit oleogenen Hefen. Bachelorarbeit, KIT.
- Banerjee, G., Car, S., Scott-Craig, J.S., Borrusch, M.S., Bongers, M., Walton, J.D. (2010). Synthetic multi-component enzyme mixtures for deconstruction of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol.* 101: 9097–9105. Doi:10.1016/j.biortech.2010.07.028.
- Bai, M.-D., Cheng, C.-H., Wan, H.-M., Lin, Y.-H. (2011). Microalgal pigments potential as byproducts in lipid production. *J Taiwan Inst Chem Eng.* 42: 783-786. Doi: 10.1016/j.jtice.2011.02.003
- Barakat, A., de Vries, H., Rouau, X. (2013). Dry fractionation process as an important step in current and future lignocellulose biorefineries: a review. *Bioresour Technol.* 134: 362-73. Doi: 10.1016/j.biortech.2013.01.169.
- Barbesgaard, P., Heldt-Hansen, H.P., Diderichsen, B. (1992). On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. *Appl Microbiol Biotechnol.* 36: 569-572. Doi: 10.1007/BF00183230
- Battat, E., Peleg, Y., Bercovitz, A., Rokem, J.S., Goldberg, I. (1991). Optimization of L-malic acid production by *Aspergillus flavus* in a stirred fermentor. *Biotechnol Bioeng.* 37: 1108-1116. Doi: 10.1002/bit.260371117

- Bauchop, T., Mountfort, D.O. (1981). Cellulose Fermentation by a Rumen Anaerobic Fungus in Both the Absence and the Presence of Rumen Methanogens. *Appl Environ Microbiol.* 42: 1103–1110.
- Bauer, F., Hulteberg, C. (2013). Is there a future in glycerol as a feedstock in the production of biofuels and biochemicals? *Biofuels Bioprod Biorefin.* 7: 43– 51. Doi: 10.1002/bbb.1370
- Behr, A., Seidensticker, T. (2018). Einführung in die Chemie nachwachsender Rohstoffe. Vorkommen, Konversion, Verwendung. Springer-Verlag GmbH Deutschland.
- Beidler, L.M. (1966). Chemical Excitation of Taste and Odor Receptors. In: Irwin Hornstein (Hg.): Flavor chemistry. A symposium sponsored by the division of Agricultural and Food Chemistry at the 149th meeting of the American Chemical Society, Detroit, Mich., April 6-7, 1965, Bd. 56. Washington, D.C.: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (Advances in chemistry series, 56), S. 1–28.
- Bellou, S., Makri, A., Sarris, D., Michos, K., Rentoumi, P., Celik, A., Papanikolaou, S., Aggelis, G. (2014). The olive mill wastewater as substrate for single cell oil production by *Zygomycetes*. *J Biotechnol.* 170: 50-59. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.11.015.
- Bellou, S., Triantaphyllidou, I.E., Mizerakis, P., Aggelis, G. (2016a). High lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* cultivated under double limitation of nitrogen and magnesium. *J Biotechnol.* 234:116–126. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.08.001
- Bellou, S., Triantaphyllidou, I.-E., Aggeli, D., Elazzazy, A.M., Baeshen, M.N., Aggelis, G. (2016b). Microbial oils as food additives: recent approaches for improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content. *Curr Opin Biotechnol.* 37: 24–35. Doi: 10.1016/j.copbio.2015.09.005
- Béligon, V., Poughon, L., Christophe, G., Lebert, A., Larroche, C., Fontanille, P. (2015). Improvement and modeling of culture parameters to enhance biomass and lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* grown on acetate. *Bioresour Technol.* 192: 582–591. Doi: 10.1016/j.biortech.2015.06.041.
- Béligon, V., Christophe, G., Fontanille, P., Larroche, C. (2016). Microbial lipids as potential source to food supplements. *Curr Opin Food Sci.* 7: 35–42. Doi: 10.1016/j.cofs.2015.10.002
- Bengelsdorf, F.R., Straub, M., Dürre, P. (2013). Bacterial synthesis gas (syngas) fermentation. *Environ Technol.* 34:1639–1651. Doi: 10.1080/09593330.2013.827747
- Bercovitz, A., Peleg, Y., Battat, E., Rokem, J.S., Goldberg, I. (1990). Localization of pyruvate carboxylase in organic acid-producing *Aspergillus strains*. *Appl Environ Microbiol.* 56: 1594-1597.
- Berovic, M., Legisa, M. (2007). Citric acid production. *Biotechnol Annu Rev.* 13: 303-343. Doi: 10.1016/S1387-2656(07)13011-8
- Berg, B., McClaugherty, C. (2014). Decomposer organisms. In: Plant Litter: Decomposition, Humus Formation, Carbon Sequestration. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 35–52. Doi: 10.1007/978-3-642-38821-7
- Berlin, A. (2013). No Barriers to Cellulose Breakdown. *Science* 342: 1454-1456. Doi: 10.1126/science.1247697.
- Bhutada, G., Kavšček, M., Ledesma-Amaro, R., Thomas, S., Rechberger, G.N., Nicaud, J.M., Natter, K. (2017). Sugar versus fat: elimination of glycogen storage improves lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res.* 17. Doi: 10.1093/femsyr/fox020.

- Biermann, U., Bornscheuer, U., Meier, M.A.R., Metzger, J.O., Schäfer, H.J. (2011). Oils and Fats as Renewable Raw Materials in Chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl.* 50: 3854-3871. Doi: 10.1002/anie.201002767.
- Bischof, R.H., Ramoni, J., Seiboth, B. (2016). Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. *Microb Cell Fact.* 15:106. Doi: 10.1186/s12934-016-0507-6.
- Bizzarri, R., Chiellini, F., Solaro, R., Chiellini, E., Cammas-Marion, S., Guerin, P. (2002). Synthesis and Characterization of New Malolactonate Polymers and Copolymers for Biomedical Applications. *Macromolecules* 35: 1215–1223. Doi: 10.1021/ma0111257.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem Physiol.* 37: 911–917. Doi: 10.1139/o59-099
- BMBF (2012). Roadmap Bioaffinerien. https://www.bmbf.de/upload_filestore/pub/Roadmap_Bioaffinerien.pdf. Heruntergeladen am 05.04.2019.
- Bologna, F.P., Andreo, C.S., Drincovich, M.F. (2007). Escherichia coli Malic Enzymes: Two Isoforms with Substantial Differences in Kinetic Properties, Metabolic Regulation, and Structure. *J Bacteriol.* 189: 5937–5946. Doi: 10.1128/JB.00428-07
- Bommareddy, R.R., Sabra, W., Maheshwari, G., Zeng, A.P. (2015). Metabolic network analysis and experimental study of lipid production in *Rhodospiridium toruloides* grown on single and mixed substrates. *Microb Cell Factories* 14: 36. Doi: 10.1186/s12934-015-0217-5
- Borthwick, K.A.J., Coakley, W.T., McDonnell, M.B., Nowotny, H., Benes, E., Gröschl, M. (2005). Development of a novel compact sonicator for cell disruption. *J Microbiol Methods* 60: 207–216. Doi: 10.1016/j.mimet.2004.09.012
- Botham, P.A., Ratledge, C. (1979). A biochemical explanation for lipid accumulation in *Candida* 107 and other oleaginous micro-organisms. *J Gen Microbiol.* 114: 361–375. Doi: 10.1099/00221287-114-2-361
- Boulton, C.A., Ratledge, C. (1981a). Correlation of lipid accumulation in yeasts with possession of ATP: citrate lyase. *J Gen Microbiol.* 127: 169–176.
- Boulton, C.A., Ratledge, C. (1981b). ATP: Citrate Lyase - The regulatory enzyme for lipid biosynthesis in *Lipornyces starkeyi*? *J Gen Microbiol.* 127: 423–426. Doi: 10.1099/00221287-127-2-423
- Bousba, H., Liazid, A., Sary, A., Tazerout, M. (2013). Numerical investigations on the use of waste animal fat as fuel on DI diesel engine. *J Pet Technol Altern Fuels* 47:143–154.
- Bozell, J.J., Petersen, G.R. (2010). Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy’s “Top 10” revisited. *Green Chem.* 12: 539-554. Doi: 10.1039/B922014C
- Bressler, E., Pines, O., Goldberg, I., Braun, S. (2002). Conversion of fumaric acid to L-malic by sol-gel immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in a supported liquid membrane bioreactor. *Biotechnol Prog.* 18: 445–450. Doi: 10.1021/bp010139t.
- Brethauer, S., Studer, M. (2015). Biochemical conversion processes of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals—a review. *Chimia.* 69: 572–581. Doi: 10.2533/chimia.2015.572
- Brown, S.H., Bashkirova, L., Berka, R., Chandler, T., Doty, T., McCall, K., McCulloch, M., McFarland, S., Thompson, S., Yaver, D., Berry, A. (2013). Metabolic engineering of *Aspergillus oryzae* NRRL

3488 for increased production of L-malic acid. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97: 8903-8912. Doi: 10.1007/s00253-013-5132-2.

Burgstaller, W. (2006). Thermodynamic boundary conditions suggest that a passive transport step suffices for citrate excretion in *Aspergillus* and *Penicillium*. *Microbiology.* 152: 887-893. Doi: 10.1099/mic.0.28454-0

Burns, N.Z., Baran, P.S., Hoffmann, R.W. (2009). Redox Economy in Organic Synthesis. *Angew Chem Int Edit.* 48: 2854-2867. doi:10.1002/anie.200806086

Byreddy, A.R., Gupta, A., Barrow, C.J., Puri, M. (2015). Comparison of cell disruption methods for improving lipid extraction from Thraustochytrid strains. *Mar Drugs* 13: 5111–5127. Doi: 10.3390/md13085111

Calvey, C.H., Su, Y.K., Willis, L.B., McGee, M., Jeffries, T.W. (2016). Nitrogen limitation, oxygen limitation, and lipid accumulation in *Lipomyces starkeyi*. *Bioresour Technol.* 200: 780-788. Doi: 10.1016/j.biortech.2015.10.104.

Cai, L. (2019). Evaluation of the microbial L-malic acid production with the natural producer *Aspergillus oryzae* and comparison to different recombinant production systems. Masterarbeit, KIT.

Cairns, T.C., Zheng, X., Zheng, P., Sun, J., Meyer, V. (2019). Moulding the mould: understanding and reprogramming filamentous fungal growth and morphogenesis for next generation cell factories. *Biotechnol Biofuels.* 12:77. Doi: 10.1186/s13068-019-1400-4.

Canari, R., Eyal, A.M. (2003). Effect of pH on Dicarboxylic Acids Extraction by Amine-Based Extractants. *Ind Eng Chem Res.* 42: 1293–1300. Doi: 10.1021/ie010579p.

Cao, N., Du, J., Gong, C.S., Tsao, G.T. (1996). Simultaneous Production and Recovery of Fumaric Acid from Immobilized *Rhizopus oryzae* with a Rotary Biofilm Contactor and an Adsorption Column. *Appl Environ Microbiol.* 62: 2926-2931.

Cao, S., Pu, Y., Studer, M., Wyman, C. L., Ragauskas, A. J. (2012). Chemical transformations of *Populus trichocarpa* during dilute acid pretreatment. *RSC Adv.* 2: 10925-10936. Doi: 10.1039/C2RA22045H

Cao, W., Luo, J., Zhao, J., Qiao, C., Ding, L., Qi, B., Su, Y., Wan, Y. (2012). Intensification of β -poly(L-malic acid) production by *Aureobasidium pullulans* ipe-1 in the late exponential growth phase. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 39: 1073-1080. Doi: 10.1007/s10295-012-1111-3.

Cao, W., Wang, Y., Shen, F., Luo, J., Yin, J., Qiao, C., Wan, Y. (2019). Efficient β -poly(L-malic acid) production from Jerusalem artichoke by *Aureobasidium pullulans* ipe-1 immobilized in luffa sponge matrices. *Bioresour Technol.* 288: 121497. Doi: 10.1016/j.biortech.2019.121497.

Capolupo, L., Faraco, V. (2016). Green methods of lignocellulose pretreatment for biorefinery development. *Appl Microbiol Biotechnol* 100: 9451. Doi: 10.1007/s00253-016-7884-y

Carlsen, M., Spohr, A.B., Nielsen, J., Villadsen, J. (1996). Morphology and physiology of an alpha-amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations. *Biotechnol Bioeng.* 49: 266-276. Doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960205)49:3<266::AID-BIT4>3.0.CO;2-I

Carman, G.M., Han, G.S. (2009). Phosphatidic acid phosphatase, a key enzyme in the regulation of lipid synthesis. *J Biol Chem.* 284: 2593–2597. Doi: 10.1074/jbc.R800059200

- Carroll, E., Trinh, T.N., Son, H., Lee, Y.W., Seo, J.A. (2017). Comprehensive analysis of fungal diversity and enzyme activity in nuruk, a Korean fermenting starter, for acquiring useful fungi. *J Microbiol.* 55: 357-365. Doi: 10.1007/s12275-017-7114-z.
- Carsanba, E., Papanikolaou, S., Erten, H. (2018). Production of oils and fats by oleaginous microorganisms with an emphasis given to the potential of the nonconventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *Crit Rev Biotechnol.* 38: 1230-1243. Doi: 10.1080/07388551.2018.1472065.
- Cavaco-Paulo, A., Cortez, J., Almeida, L. (1997). The effect of cellulase treatment in textile washing processes. *J Soc Dyers Col.* 113: 218–222. Doi: 10.1111/j.1478-4408.1997.tb01902.x.
- Cerón-García, M.C., Macías-Sánchez, M.D., Sánchez-Mirón, A., García-Camacho, F., Molina-Grima, E. (2013). A process for biodiesel production involving the heterotrophic fermentation of *Chlorella protothecoides* with glycerol as the carbon source. *Appl Energy* 103: 341–349. Doi: 10.1016/j.apenergy.2012.09.054
- Čertík, M., Adamechová, Z., Guothová, L. (2013). Simultaneous enrichment of cereals with polyunsaturated fatty acids and pigments by fungal solid state fermentations. *J Biotechnol.* 168: 130–134. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.03.016
- Chan, G.F., Bamadhaj, H.M., Gan, H.M., Rashid, N.A. (2012). Genome sequence of *Aureobasidium pullulans* AY4, an emerging opportunistic fungal pathogen with diverse biotechnological potential. *Eukaryot Cell.* 11: 1419-1420. Doi: 10.1128/EC.00245-12.
- Chang, S.W., Shaw, J.F. (2009). Biocatalysis for the production of carbohydrate esters. *N Biotechnol.* 26: 109–116. Doi: 10.1016/j.nbt.2009.07.003
- Chaturvedi, V., Verma, P. (2013). An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products. *3 Biotech.* 3: 415–431. Doi: 10.1007/s13205-013-0167-8
- Chatzifragkou, A., Fakas, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Aggelis, G., Papanikolaou, S. (2010). Commercial sugars as substrates for lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* fungi. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112: 1048–1057. Doi: 10.1002/ejlt.201000027
- Chatzifragkou, A., Makri, A., Belka, A., Bellou, S., Mavrou, M., Mastoridou, M., Mystrioti, P., Onjaro, G., Aggelis, G., Papanikolaou, S. (2011). Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy* 36: 1097–1108. Doi: 10.1016/j.energy.2010.11.040
- Chemler, J.A., Yan, Y., Koffas, M.A.G. (2006). Biosynthesis of isoprenoids, polyunsaturated fatty acids and flavonoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact.* 5: 20. Doi: 10.1186/1475-2859-5-20
- Chen, W.H., Xu, Y.Y., Hwang, W.S., Wang, J.B. (2011). Pretreatment of rice straw using an extrusion/extraction process at bench-scale for producing cellulosic ethanol. *Bioresour Technol.* 102: 10451–10458. Doi:10.1016/j.biortech.2011.08.118
- Chen, Y., Stevens, M.A., Zhu, Y., Holmes, J., Xu, H. (2013). Understanding of alkaline pretreatment parameters for corn stover enzymatic saccharification. *Biotechnol Biofuels.* 6:8. Doi: 10.1186/1754-6834-6-8.
- Chen, X., Wang, Y., Dong, X., Hu, G., Liu, L. (2017). Engineering rTCA pathway and C4-dicarboxylate transporter for L-malic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 101: 4041-4052. Doi: 10.1007/s00253-017-8141-8.
- Chen, X., Zhou, J., Ding, Q., Luo, Q., Liu, L. (2019). Morphology engineering of *Aspergillus oryzae* for L-malate production. *Biotech Bioeng.* 116: 2662–2673. Doi: 10.1002/bit.27089.

- Cheng, Y.F., Edwards, J.E., Allison, G.G., Zhu, W.-Y., Theodorou, M.K. (2009). Diversity and activity of enriched ruminal cultures of anaerobic fungi and methanogens grown together on lignocellulose in consecutive batch culture. *Bioresour Technol.* 100: 4821–4828. Doi: 10.1016/j.biortech.2009.04.031
- Cheng, C., Zhou, Y., Lin, M., Wei, P., Yang, S.T. (2017). Polymalic acid fermentation by *Aureobasidium pullulans* for malic acid production from soybean hull and soy molasses: Fermentation kinetics and economic analysis. *Bioresour Technol.* 223: 166-174. Doi: 10.1016/j.biortech.2016.10.042.
- Chi, Z.Y., Zheng, Y.B., Ma, J.W., Chen, S.L. (2011). Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* culture with dark fermentation hydrogen production effluent as feedstock for microbial lipid production. *Int J Hydrogen Energ.* 36: 9542–9550. Doi: 10.1016/j.ijhydene.2011.04.124.
- Chi, Z., Liu, G.L., Liu, C.G., Chi, Z.M. (2016). Poly(β -L-malic acid) (PMLA) from *Aureobasidium spp.* and its current proceedings. *Appl Microbiol Biotechnol.* 100: 3841-3851. Doi: 10.1007/s00253-016-7404-0.
- Chibata, I., Tosa, T., Sato, T., Yamamoto, K. (1975). Process for preparing L-malic acid. US-Patent US 3,922,195.
- Chisti, Y., Moo-Young, M. (1986). Disruption of microbial cells for intracellular products. *Enzyme Microb Technol.* 8: 194–204. Doi: 10.1016/0141-0229(86)90087-6
- Choi, S., Ryu, D., Rhee, J. (1982). Production of microbial lipid: effects of growth rate and oxygen on lipid synthesis and fatty acid composition of *Rhodotorula gracilis*. *Biotechnol Bioeng.* 24: 1165–1172. Doi: 10.1002/bit.260240513
- Christie, W.W. (ed.). (1993). "Preparation of lipid extracts tissues," in *Advances in Lipid Methodology - Two* (Dundee: Oily Press), 195–213.
- Chuanbin, L., Jian, X., Fengwu, B., Zhiguo, S. (1998). Trehalose extraction from *Saccharomyces cerevisiae* after microwave treatment. *Biotechnol Tech.* 12: 914–943. Doi: 10.1023/A:1008881915907
- Clark, J.H., Deswarte, F.E.I., Farmer, T.J. (2009). The integration of green chemistry into future biorefineries. *Biofuels, Bioprod Bioref.* 3: 72-90. doi:10.1002/bbb.119
- Clarke, A., Prescott, T., Khan, A., Olabi, A.B. (2010). Causes of breakage and disruption in a homogenizer. *Appl Energy* 87: 3680–3690. Doi: 10.1016/j.apenergy.2010.05.007
- Conti, E., Stredansky, M., Stredanska, S., and Zanetti, F. (2001). γ -Linolenic acid production by solid-state fermentation of *Mucorales* strains on cereals. *Bioresour Technol.* 76: 283–286. Doi: 10.1016/S0960-8524(00)00097-3
- Coulember, O., Degée, P., Hedrick, J.L., Dubois, P. (2006). From controlled ring-opening polymerization to biodegradable aliphatic polyester: Especially poly(β -malic acid) derivatives. *Prog Polym Sci.* 31: 723–747. Doi: 10.1016/j.progpolymsci.2006.08.004.
- Couto, S. R., Sanromán, M. Á. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *J Food Eng.* 76: 291–302. Doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022
- Cox, P.W., Paul, G.C., Thomas, C.R. (1998). Image analysis of the morphology of filamentous microorganisms. *Microbiology* 144: 817–827. Doi: 10.1099/00221287-144-4-817
- Cravotto, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M., Cintas, P. (2008). Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrason Sonochem.* 15: 898–902. Doi: 10.1016/j.ultsonch.2007.10.009

- Cui, Y.Q., van der Lans, R., Luyben, K.C. (1997). Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnol Bioeng.* 55: 715–726. Doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19970905)55:5<715::AID-BIT2>3.0.CO;2-E.
- Dahmen, N., Dinjus, E., Henrich, E. (2008). The Karlsruhe Process Bioliq®. Synthetic fuels from the biomass. In: Wengenmayr R, Bührke T (eds) *Renewable energy*. Wiley-VCH, Weinheim, pp 61–65
- Dahmen, N., Dinjus, E., Kolb, T., Arnold, U., Leibold, H., Stahl, R. (2012). State of the art of the Bioliq® process for synthetic biofuels production. *Environ Prog Sustain Energy* 31: 176–181. Doi: 10.1002/ep.10624
- Dahmen, N., Lewandowski, I., Zibek, S., Weidtmann, A. (2018). Integrated lignocellulosic value chains in a growing bioeconomy: Status quo and perspectives. *GCB Bioenergy* 11(1). Doi: 10.1111/gcbb.12586
- Dahmen, N., Henrich, E., Henrich, T. (2017). Synthesis Gas Biorefinery. In: Wagemann K., Tippkötter N. (eds) *Biorefineries. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol 166. Springer, Cham. Doi: 10.1007/10_2016_63
- Dai, Z., Zhou, H., Zhang, S., Gu, H., Yang, Q., Zhang, W., Dong, W., Ma, J., Fang, Y., Jiang, M., Xin, F. (2018). Current advance in biological production of malic acid using wild type and metabolic engineered strains. *Bioresour Technol.* 258: 345-353. Doi: 10.1016/j.biortech.2018.03.001.
- Dakin, H.D. (1924). The formation of l-malic acid as a product of alcoholic fermentation by yeast. *J Biol Chem* 61:139–145.
- Dale, M.C., Eagger, A., Okos, M.R. (1994). Osmotic inhibition of free and immobilized *K. marxianus* anaerobic growth and ethanol productivity in whey permeate concentrate. *Process Biochem.* 29: 535–544. Doi: 10.1016/0032-9592(94)80015-4
- Daniell, J., Köpke, M., Simpson, S.D. (2012). Commercial biomass syngas fermentation. *Energies* 5:5372–5417. Doi: 10.3390/en5125372
- Darby, R.A., Cartwright, S.P., Dilworth, M.V., Bill, R.M. (2012). Which yeast species shall I choose? *Saccharomyces cerevisiae* versus *Pichia pastoris* (review). *Methods Mol Biol.* 866: 11-23. Doi: 10.1007/978-1-61779-770-5_2.
- Das, R.K., Brar, S.K. (2014). Enhanced fumaric acid production from brewery wastewater and insight into the morphology of *Rhizopus oryzae* 1526. *Appl Biochem Biotechnol.* 172: 2974-2988. Doi: 10.1007/s12010-014-0739-z.
- Das, R.K., Brar, S.K., Verma, M. (2015). Enhanced fumaric acid production from brewery wastewater by immobilization technique. *J Chem Technol Biotechnol* 90: 1473-1479. Doi: 10.1002/jctb.4455.
- Das, R.K., Brar, S.K., Verma, M. (2016). Potential use of pulp and paper solid waste for the bio-production of fumaric acid through submerged and solid state fermentation. *J Clean Prod.* 112: 4435–4444. Doi: 10.1016/j.jclepro.2015.08.108.
- Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T.A., Qin, W. (2010). Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *Int J Biochem Mol Biol.* 1: 36–50.
- de Boer, K., Moheimani, N.R., Borowitzka, M.A., Bahri, P.A. (2012). Extraction and conversion pathways for microalgae to biodiesel: a review focused on energy consumption. *J Appl Phycol.* 24: 1681–1698. Doi: 10.1007/s10811-012-9835-z

- Delhomme, C., Weuster-Botz, D., Kühn, F.E. (2009). Succinic acid from renewable resources as a C₄ building-block chemical—a review of the catalytic possibilities in aqueous media. *Green Chem.* 11: 13-26. Doi: 10.1039/B810684C
- Delhomme, C., Goh, S.L.M., Kühn, F.E., Weuster-Botz, D. (2012). Esterification of bio-based succinic acid in biphasic systems: Comparison of chemical and biological catalysts. *J Mol Catal B Enzym.* 80: 39-47. Doi: 10.1016/j.molcatb.2012.03.010
- Denman, S., Xue, G.P., Patel, B. (1996). Characterization of a *Neocallimastix patriciarum* cellulase cDNA (celA) homologous to *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II. *Appl Environ Microbiol.* 62: 1889-1896.
- Dereix, M., Parker, W., Kennedy, K. (2006). Steam-explosion pretreatment for enhancing anaerobic digestion of municipal wastewater sludge. *Water Environ Res.* 78: 474-485. Doi:10.2175/106143006x95456.
- Deuss, P.J., Barta, K., de Vries, J.G. (2014). Homogeneous catalysis for the conversion of biomass and biomass-derived platform chemicals. *Catal Sci Technol.* 4: 1174-1196. Doi: 10.1039/C3CY01058A.
- Dillschneider, R., Schulze, I., Neumann, A., Posten, C., Syldatk, C. (2014). Combination of algae and yeast fermentation for an integrated process to produce single cell oils. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98: 7793-7802. Doi: 10.1007/s00253-014-5867-4
- Ding, H., Inoue, S., Ljubimov, A.V., Patil, R., Portilla-Arias, J., Hu, J., Konda, B., Wawrowsky, K.A., Fujita, M., Karabalin, N., Sasaki, T., Black, K.L., Holler, E., Ljubimova, J.Y. (2010). Inhibition of brain tumor growth by intravenous poly (β -L-malic acid) nanobioconjugate with pH-dependent drug release [corrected]. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107: 18143-18148. Doi: 10.1073/pnas.1003919107.
- Ding, Y., Li, S., Dou, C., Yu, Y., Huang, H. (2011). Production of fumaric acid by *Rhizopus oryzae*: role of carbon-nitrogen ratio. *Appl Biochem Biotechnol.* 164: 1461-1467. Doi: 10.1007/s12010-011-9226-y.
- Ding, S.Y., Liu, Y.S., Zeng, Y., Himmel, M.E., Baker, J.O., Bayer, E.A. (2012). How does plant cell wall nanoscale architecture correlate with enzymatic digestibility? *Science.* 338: 1055-1060. Doi: 10.1126/science.1227491.
- Ding, Q., Luo, Q., Zhou, J., Chen, X., Liu, L. (2018). Enhancing L-malate production of *Aspergillus oryzae* FMME218-37 by improving inorganic nitrogen utilization. *Appl Microbiol Biotechnol.* 102: 8739-8751. Doi: 10.1007/s00253-018-9272-2.
- Dinjus, E., Dahmen, N. (2012). The Bioliq Process Concept, Technology and State of Development. *Auto Tech Rev.* 1: 26. Doi: 10.1365/s40112-012-0030-z
- Diversified Technologies. (2010). Pulsed Electric Field Pre-treatment of Algae for Oil Extraction. Available online at: http://www.divtecs.com/data/File/papers/PDF/pef_algae_10_web_nb.pdf
- D'Oca, M.G.M., Viêgas, C.V., Lemões, J.S., Miyasaki, E.K., Morón-Villarreyes, J.A., Primel, E.G., Abreu, P.C. (2011). Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. *Biomass Bioener.* 35: 1533-1538. Doi: 10.1016/j.biombioe.2010.12.047
- Dörsam, S., Kirchhoff, J., Bigalke, M., Dahmen, N., Syldatk, C., Ochsenreither, K. (2016). Evaluation of pyrolysis oil as carbon source for fungal fermentation. *Front Microbiol.* 7:2059. doi: 10.3389/fmicb.2016.02059

- Dörsam, S., Fessler, J., Gorte, O., Hahn, T., Zibek, S., Syldatk, C., Ochsenreither, K. (2017). Sustainable carbon sources for microbial organic acid production with filamentous fungi. *Biotechnol Biofuels*. 10:242. doi: 10.1186/s13068-017-0930-x
- Dong, X., Chen, X., Qian, Y., Wang, Y., Wang, L., Qiao, W., Liu, L. (2017). Metabolic engineering of *Escherichia coli* W3110 to produce L-malate. *Biotechnol Bioeng*. 114: 656-664. Doi: 10.1002/bit.26190.
- Dos Santos, A.C., Ximenes, E., Kim, Y., Ladisch, M.R. (2018). Lignin-Enzyme Interactions in the Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. *Trends Biotechnol*. pii: S0167-7799(18)30306-8. Doi: 10.1016/j.tibtech.2018.10.010.
- Dourou, M., Kancelista, A., Juszczak, P., Sarris, D., Bellou, S., Triantaphyllidou, I., Rywinska, A., Papanikolaou, S., Aggelis, G. (2016). Bioconversion of olive mill wastewater into high-added value products. *J Clean Prod*. 139: 957–969. Doi: 10.1016/j.jclepro.2016.08.133
- Dourou, M., Mizerakis, P., Papanikolaou, S., Aggelis, G. (2017). Storage lipid and polysaccharide metabolism in *Yarrowia lipolytica* and *Umbelopsis isabellina*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 101: 7213–7226. Doi: 10.1007/s00253-017-8455-6
- Dourou, M., Aggeli, D., Papanikolaou, S., Aggelis, G. (2018). Critical steps in carbon metabolism affecting lipid accumulation and their regulation in oleaginous microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*. 102: 2509-2523. Doi: 10.1007/s00253-018-8813-z.
- Doucha, J., Lívanský, K. (2008). Influence of processing parameters on disintegration of *Chlorella* cells in various types of homogenizers. *Appl Microbiol Biotechnol*. 81: 431–440. Doi: 10.1007/s00253-008-1660-6
- Dowhan, W., and Bogdanov, M. (2013). “Functional roles of lipids in membranes,” in *Encyclopedia of Biophysics*, ed G. C. K. Roberts (Berlin; Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 868–875.
- Duangwang, S., Ruengpeerakul, T., Cheirsilp, B., Yamsaengsung, R., Sangwichien, C. (2016). Pilot-scale steam explosion for xylose production from oil palm empty fruit bunches and the use of xylose for ethanol production. *Bioresour Technol*. 203: 252-258. Doi: 10.1016/j.biortech.2015.12.065.
- Ducret, A., Giroux, A., Trani, M., Lortie, R. (1996). Characterization of enzymatically prepared biosurfactants. *J Am Oil Chem Soc*. 73: 109–113. Doi: 10.1007/BF02523456
- Dulermo, T., Nicaud, J.M. (2011). Involvement of the G3P shuttle and β -oxidation pathway in the control of TAG synthesis and lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *Metab Eng*. 13: 482-491. Doi: 10.1016/j.ymben.2011.05.002.
- Dulermo, T., Tréton, B., Beopoulos, A., Kabran Gnankon, A.P., Haddouche, R., Nicaud, J.M. (2013). Characterization of the two intracellular lipases of *Y. lipolytica* encoded by TGL3 and TGL4 genes: new insights into the role of intracellular lipases and lipid body organisation. *Biochim Biophys Acta*. 1831: 1486–1495. Doi: 10.1016/j.bbali.2013.07.001
- Dulermo, R., Dulermo, T., Gamboa-Meléndez, H., Thevenieau, F., Nicaud, J.M. (2015). Role of Pex11p in Lipid Homeostasis in *Yarrowia lipolytica*. *Eukaryot Cell*. 14:511-525. Doi: 10.1128/EC.00051-15.
- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Saez, F., Ballesteros, M. (2013). Optimization of integrated alkaline–extrusion pretreatment of barley straw for sugar production by enzymatic hydrolysis. *Process Biochem*. 48: 775-781. Doi: 10.1016/j.procbio.2013.03.003.
- Dyal, S.D., Narine, S.S. (2005). Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids. *Food Res Int*. 38: 445–467. Doi: 10.1016/j.foodres.2004.11.002

- Europäische Kommission (2018). EU energy in figures. Statistical pocketbook 2018. Doi: 10.2833/105297. <https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/99fc30eb-c06d-11e8-9893-01aa75ed71a1/language-en/format-PDF/source-79929745>
- Economou, C.N., Makri, A., Aggelis, G., Pavlou, S., Vayenas, D.V. (2010). Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil. *Bioresour Technol.* 101:1385–1388. Doi: 10.1016/j.biortech.2009.09.028
- Economou, C.N., Aggelis, G., Pavlou, S., Vayenas, D.V. (2011). Single cell oil production from rice hulls hydrolysate. *Bioresour Technol.* 102: 9737–9742. Doi: 10.1016/j.biortech.2011.08.025
- Ehimen, E.A., Sun, Z.F., Carrington, C.G. (2010). Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. *Fuel* 89: 677–684. Doi: 10.1016/j.fuel.2009.10.011
- Ellilä, S., Fonseca, L., Uchima, C., Cota, J., Goldman, G.H., Saloheimo, M., Sacon, V., Siika-Aho, M. (2017). Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for Brazilian biorefineries. *Biotechnol Biofuels.* 10:30. Doi: 10.1186/s13068-017-0717-0.
- Eisenberg, T., Büttner, S. (2014). Lipids and cell death in yeast. *FEMS Yeast Res.* 14: 179-197. Doi: 10.1111/1567-1364.12105.
- Estevez, M.M., Linjordet, R., Morken, J. (2012). Effects of steam explosion and co-digestion in the methane production from *Salix* by mesophilic batch assays. *Bioresour Technol* 104:749–756. Doi:10.1016/j.biortech.2011.11.017
- EU (2009). Renewable Energy Directive (2009/28/EC). <http://data.europa.eu/eli/dir/2009/28/oj>
- EU (2015). Directive to reduce indirect land use change for biofuels and bioliquids ((EU) 2015/1513). <http://data.europa.eu/eli/dir/2015/1513/oj>
- EU (2018). Revised Renewable Energy Directive (2018/2001/EU). <http://data.europa.eu/eli/dir/2018/2001/oj>
- Evans, C.T., Ratledge, C. (1984). Effect of nitrogen source on lipid accumulation in oleaginous yeasts. *Microbiology* 130: 1693–1704. Doi: 10.1099/00221287-130-7-1693
- Evans, C.T., Ratledge, C. (1985). Possible regulatory roles of ATP:citrate lyase, malic enzyme, and AMP deaminase in lipid accumulation by *Rhodospiridium toruloides* CBS 14. *Can J Microbiol.* 31: 1000–1005. Doi: 10.1139/m85-189
- Eyal, A.M., Canari, R. (1995). pH Dependence of carboxylic and mineral acid extraction by aminebased extractants: effects of pK_a, amine basicity, and diluent properties. *Ind Eng Chem Res.* 34: 1789–1798. Doi: 10.1021/ie00044a030
- Fakas, S. (2017). Lipid biosynthesis in yeasts: A comparison of the lipid biosynthetic pathway between the model nonoleaginous yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the model oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Eng Life Sci.* 17: 292–302. Doi: 10.1002/elsc.201600040
- Fakas, S., Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., and Aggelis, G. (2008). Organic nitrogen of tomato waste hydrolysate enhances glucose uptake and lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata*. *J Appl Microbiol.* 105: 1062–1070. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03839.x
- Fakas, S., Papanikolaou, S., Batsos, A., Galiotou-Panayotou, M., Mallouchos, A., and Aggelis, G. (2009a). Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by

- Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biomass Bioener.* 33: 573–580. Doi: 10.1016/j.biombioe.2008.09.006
- Fakas, S., Makri, A., Mavromati, M., Tselepi, M., and Aggelis, G. (2009b). Fatty acid composition in lipid fractions lengthwise the mycelium of *Mortierella isabellina* and lipid production by solid state fermentation. *Bioresour Technol.* 100: 6118–6120. Doi: 10.1016/j.biortech.2009.06.015
- Fahim, M.A., Al-Sahhaf, T.A., Elkilani, A. (2010). Chapter 1 – Introduction. In: *Fundamentals of Petroleum Refining*, Eds. Fahim, M.A., Al-Sahhaf, T.A., Elkilani, A. Amsterdam: Elsevier. Pages 1-9. Doi: 10.1016/B978-0-444-52785-1.00001-2.
- Faticenti, F., Farris, G.A., Deiana, P., Ceccarelli, S. (1984). Malic acid production and consumption by selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* under anaerobic and aerobic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol.* 19: 427-429. Doi: 10.1007/BF00454382
- Favaro, S.P., Miranda, C.H.B., Machado, F., Soares, I.P., Jensen, A.T., Medeiros, A.M.M.S. (2018). Oleaginous Biomass for Biofuels, Biomaterials, and Chemicals. In: Vaz Jr. S. (eds) *Biomass and Green Chemistry*. Springer, Cham. Doi: 10.1007/978-3-319-66736-2_3
- Feldbrügge, M., Kellner, R., Schipper, K. (2013). The biotechnological use and potential of plant pathogenic smut fungi. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97: 3253-3265. Doi: 10.1007/s00253-013-4777-1.
- Feng, J., Yang, J., Yang, W., Chen, J., Jiang, M., Zou, X. (2018). Metabolome- and genome-scale model analyses for engineering of *Aureobasidium pullulans* to enhance polymalic acid and malic acid production from sugarcane molasses. *Biotechnol Biofuels.* 11:94. Doi: 10.1186/s13068-018-1099-7.
- Feng, J., Li, T., Zhang, X., Chen, J., Zhao, T., Zou, X. (2019). Efficient production of polymalic acid from xylose mother liquor, an environmental waste from the xylitol industry, by a T-DNA-based mutant of *Aureobasidium pullulans*. *Appl Microbiol Biotechnol.* doi: 10.1007/s00253-019-09974-x.
- Fei, Q., Chang, H.N., Shang, L., Choi, J.D., Kim, N., Kang, J. (2011). The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production. *Bioresour Technol.* 102: 2695–2701. Doi: 10.1016/j.biortech.2010.10.141.
- Filippucci, S., Tasselli, G., Scardua, A., Di Mauro, S., Cramarossa, M.R., Perini, D., Turchetti, B., Onofri, A., Forti, L., Buzzini, P. (2016). Study of *Holtermanniella wattica*, *Leucosporidium creatinivorum*, *Naganishia adeliensis*, *Solicoccozyma aerea*, and *Solicoccozyma terricola* for their lipogenic aptitude from different carbon sources. *Biotechnol Biofuels.* 9: 259. Doi: 10.1186/s13068-016-0672-1.
- Fishwick, M.J., Wright, A.J. (1977). Comparison of methods for the extraction of plant lipids. *Phytochemistry* 16: 1507–1510. Doi: 10.1016/0031-9422(77)84011-9
- Flisar, K., Meglic, S.H., Morelj, J., Golob, J., Miklavcic, D. (2014). Testing a prototype pulse generator for a continuous flow system and its use for *E. coli* inactivation and microalgae lipid extraction. *Bioelectrochemistry* 100: 44–51. Doi: 10.1016/j.bioelechem.2014.03.008
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 226: 497–509.
- Forsberg, K.J., Patel, S., Witt, E., Wang, B., Ellison, T.D., Dantas, G. (2015). Identification of Genes Conferring Tolerance to Lignocellulose-Derived Inhibitors by Functional Selections in Soil Metagenomes. *Appl Environ Microbiol.* 82: 528-37. Doi: 10.1128/AEM.02838-15
- Foston, M., Ragauskas, A.J. (2010). Changes in lignocellulosic supramolecular and ultrastructure during dilute acid pretreatment of Populus and switchgrass. *Biomass Bioenerg.* 34: 1885-1895. Doi: 10.1016/j.biombioe.2010.07.023

- Friedlander, J., Tsakraklides, V., Kamineni, A., Greenhagen, E.H., Consiglio, A.L., MacEwen, K., Crabtree, D.V., Afshar, J., Nugent, R.L., Hamilton, M.A., Joe Shaw, A., South, C.R., Stephanopoulos, G., Brevnova, E.E. (2016). Engineering of a high lipid producing *Yarrowia lipolytica* strain. *Biotechnol Biofuels*. 29: 77. doi: 10.1186/s13068-016-0492-3.
- Ganesan, B., Brothersen, C., McMahon, D.J. (2014). Fortification of foods with omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 54: 98–114. Doi: 10.1080/10408398.2011.578221
- Gangl, I.C., Weigand, W.A., Keller F.A. (1990). Economic comparison of calcium fumarate and sodium fumarate production by *Rhizopus arrhizus*. *Appl Biochem Biotechnol*, 24: 663-677. Doi: 10.1007/BF02920287
- Gao, D., Chundawat, S.P., Krishnan, C., Balan, V., Dale, B.E. (2010). Mixture optimization of six core glycosyl hydrolases for maximizing saccharification of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreated corn stover. *Bioresour Technol*. 101: 2770–2781. Doi: 10.1016/j.biortech.2009.10.056
- Gao, D., Zeng, J., Zheng, Y., Yu, X., Chen, S. (2013). Microbial lipid production from xylose by *Mortierella isabellina*. *Bioresour Technol*. 133: 315–321. Doi: 10.1016/j.biortech.2013.01.132
- Gao, B.Y., Chen, A.L., Zhang, W.Y., Li, A.F., Zhang, C.W. (2017). Co-Production of Lipids, Eicosapentaenoic Acid, Fucoxanthin, and Chrysolaminarin by *Phaeodactylum tricorutum* Cultured in a Flat-Plate Photobioreactor Under Varying Nitrogen Conditions. *J Ocean Univ China*. 16: 916-924. Doi: 10.1007/s11802-017-3174-2
- Gao, C., Wang, S., Hu, G., Guo, L., Chen, X., Xu, P., Liu, L. (2018). Engineering *Escherichia coli* for malate production by integrating modular pathway characterization with CRISPRi-guided multiplexed metabolic tuning. *Biotechnol Bioeng*. 115: 661-672. Doi: 10.1002/bit.26486.
- Garay, L.A., Sitepu, I.R., Cajka, T., Chandra, I., Shi, S., Lin, T., German, J.B., Fiehn, O., Boundy-Mills, K.L. (2016). Eighteen new oleaginous yeast species. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 43: 887. Doi: 10.1007/s10295-016-1765-3
- García, J., Torres, N. (2011). Mathematical modelling and assessment of the pH homeostasis mechanisms in *Aspergillus niger* while in citric acid producing conditions. *J Theor Biol*. 282: 23-35. Doi: 10.1016/j.jtbi.2011.04.028.
- García-Ayuso, L.E., Velasco, J., Dobarganes, M.C., Luque de Castro, M.D. (2000). Determination of the oil content of seeds by focused microwave-assisted soxhlet extraction. *Chromatographia* 52: 103–108. Doi: 10.1007/BF02490801
- Gardeli, C., Athenaki, M., Xenopoulos, E., Mallouchos, A., Koutinas, A.A., Aggelis, G., Papanikolaou, S. (2017). Lipid production and characterization by *Mortierella (Umbelopsis) isabellina* cultivated on lignocellulosic sugars. *J Appl Microbiol*. 123: 1461–1477. Doi: 10.1111/jam.13587
- Geciova, J., Bury, D., Jelen, P. (2002). Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - a review. *Int Dairy J*. 12: 541–553. Doi: 10.1016/S0958-6946(02)00038-9
- Geiser, E., Wiebach, V., Wierckx, N., Blank, L.M. (2014). Prospecting the biodiversity of the fungal family *Ustilaginaceae* for the production of value-added chemicals. *BMC Fungal Biol Biotechnol*. 1:2. Doi: 10.1186/s40694-014-0002-y.
- Gema, H., Kavadia, A., Dimou, D., Tsagou, V., Komaitis, M., Aggelis, G. (2002). Production of gamma-linolenic acid by *Cunninghamella echinulata* cultivated on glucose and orange peel. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 58: 303–307. doi: 10.1007/s00253-001-0910-7

- Gerde, J.A., Montalbo-Lomboy, M., Yao, L., Grewell, D., Wang, T. (2012). Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. *Bioresour Technol.* 125: 175–171. Doi: 10.1016/j.biortech.2012.08.110
- Geyer M., Onyancha F.M., Nicol W., Brink H.G. (2018). Malic Acid Production by *Aspergillus oryzae*: The Role of CaCO₃. *Chemical Engineering Transactions.* 70: 1801-1806. Doi: 10.3303/CET1870301.
- Gibbs, P.A., Seviour, R.J., Schmid, F. (2000). Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. *Crit Rev Biotechnol.* 20: 17-48. Doi: 10.1080/07388550091144177
- Giorno, L., Drioli, E., Carvoli, G., Cassano, A., Donato, L. (2001). Study of an enzyme membrane reactor with immobilized fumarase for production of L-malic acid. *Biotechnol Bioeng.* 72: 77-84.
- Gnansounou, E., Vaskan, P., Pachón, E.R. (2015). Comparative techno-economic assessment and LCA of selected integrated sugarcane-based biorefineries. *Bioresour Technol* 196: 364–375. Doi: 10.1016/j.biortech.2015.07.072.
- Goldberg, I., Rokem, J.S., Pines, O. (2006). Organic acids: old metabolites, new themes. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81:1601–1611. Doi: 10.1002/jctb.1590
- Gong, Z., Shen, H., Zhou, W., Wang, Y., Yang, X., Zhao, Z.K. (2015). Efficient conversion of acetate into lipids by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Biotechnol Biofuels.* 8:189. Doi: 10.1186/s13068-015-0371-3.
- González, G., López-Santín, J., Caminal, G., Solà, C. (1986). Dilute acid hydrolysis of wheat straw hemicellulose at moderate temperature: a simplified kinetic model. *Biotechnol Bioeng.* 28: 288–293. Doi: 10.1002/bit.260280219.
- Gonzales, D., Searcy, E.M., Ekşioğlu, S.D. (2013). Cost analysis for high-volume and long-haul transportation of densified biomass feedstock. *Transp Res Part A Policy Pract.* 49: 48–61. Doi: 10.1016/j.tra.2013.01.005.
- Gorden, J., Zeiner, T., Brandenbusch, C. (2015). Reactive extraction of cis,cis-muconic acid. *Fluid Phase Equilib.* 393: 78–84. Doi: 10.1016/j.fluid.2015.02.030.
- Gore, V., Gadkar, M., Pokharkar, K. (2010). Novel Process to prepare almotriptan. US-Patent US 2010/0292290 A1.
- Gorte, O., Aliyu, H., Neumann, A., Ochsenreither, K. (2019). Draft Genome Sequence of the Oleaginous Yeast *Apiotrichum porosum* (syn. *Trichosporon porosum*) DSM 27194. *J Genomics.* 7: 11-13. Doi: 10.7150/jgen.32210.
- Gostinčar, C., Ohm, R.A., Kogej, T., Sonjak, S., Turk, M., Zajc, J., Zalar, P., Grube, M., Sun, H., Han, J., Sharma, A., Chiniquy, J., Ngan, C.Y., Lipzen, A., Barry, K., Grigoriev, I.V., Gunde-Cimerman, N. (2014). Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. *BMC Genomics.* 15:549. Doi: 10.1186/1471-2164-15-549.
- Greenwell, H.C., Laurens, L.M., Shields, R.J., Lovitt, R.W., Flynn, K.J. (2010). Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *J R Soc Interface* 7: 703–726. Doi: 10.1098/rsif.2009.0322
- Grethlein, A.J., Soni, B.K., Worden, R.M., Jain, M.K. (1992). Influence of hydrogen sulfide on the growth and metabolism of *Butyribacterium methylotrophicum* and *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Biochem Biotechnol* 34–35:233–246. Doi: 10.1007/BF02920548

- Gu, C., Zhou, Y., Liu, L., Tan T., Deng, L. (2003). Production of fumaric acid by immobilized *Rhizopus arrhizus* on net. *Bioresour Technol.* 131: 303-307. Doi: 10.1016/j.biortech.2012.12.148
- Guckert, J.B., Cooksey, K.E., Jackson, L.L. (1988). Lipid solvent systems are not equivalent for analysis of lipid classes in the microeukaryotic green alga, *Chlorella*. *J Microbiol Methods* 8: 139–149. Doi: 10.1016/0167-7012(88)90015-2
- Guerin, P., Vert, M., Braud, C., Lenz, R.W. (1985). Optically active poly (β -malic-acid). *Polym Bull.* 14: 187. Doi: 10.1007/BF00708479
- Guevarra, E.D., Tabuchi, T. (1990). Production of 2-hydroxyparaconic and itatartaric acids by *Ustilago cynodontis* and simple recovery process of the acids. *Agric Biol Chem.* 54: 2359–2365. Doi: 10.1271/bbb1961.54.2359.
- Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M.H.M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., Wijffels, R.H. (2015). Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnol Adv.* 33: 243–260. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.01.008
- Guldhe, A., Singh, B., Rawat, I., Ramluckan, K., Bux, F. (2014). Efficacy of drying and cell disruption techniques on lipid recovery from microalgae for biodiesel production. *Fuel* 128: 46–52. Doi: 10.1016/j.fuel.2014.02.059
- Guo, L., Zhang, F., Zhang, C., Hu, G., Gao, C., Chen, X., Liu, L. (2018). Enhancement of malate production through engineering of the periplasmic rTCA pathway in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.* 115: 1571-1580. Doi: 10.1002/bit.26580.
- Gusakov, A.V., Salanovich, T.N., Antonov, A.I., Ustinov, B.B., Okunev, O.N., Burlingame, R., Emalfarb, M., Baez, M., Sinitsyn, A.P. (2007). Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol Bioeng.* 97: 1028–1038. Doi: 10.1002/bit.21329
- Halim, R., Webley, P.A., Martin, G.J.O. (2016). The CIDES process: Fractionation of concentrated microalgal paste for co-production of biofuel, nutraceuticals, and high-grade protein feed. *Algal Res.* 19: 299-306. Doi: 10.1016/j.algal.2015.09.018
- Halpin, C. (2004). Investigating and Manipulating Lignin Biosynthesis in the Postgenomic Era. *Adv Bot Res.* 41: 63-106. Doi: 10.1016/S0065-2296(04)41002-7
- Hanaki, K., Hirunmasuwan, S., Matsuo, T. (1994). Protection of methanogenic bacteria from low pH and toxic materials by immobilization using polyvinyl alcohol. *Water Res.* 28: 877-885. Doi: 10.1016/0043-1354(94)90094-9
- Hansen, C.F., Hernandez, A., Mullan, B.P., Moore, K., Trezona-Murray, M., King, R.H., Pluske, J.R. (2009). A chemical analysis of samples of crude glycerol from the production of biodiesel in Australia, and the effects of feeding crude glycerol to growing-finishing pigs on performance, plasma metabolites and meat quality at slaughter. *Anim Prod Sci.* 49: 154-161. Doi: 10.1071/EA08210.
- Hara, A., Radin, N.S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal Biochem.* 90: 420–426. Doi: 10.1016/0003-2697(78)90046-5
- Hardman, D., McFalls, D., Fakas, S. (2017). Characterization of phosphatidic acid phosphatase activity in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* and its role in lipid biosynthesis. *Yeast.* 34: 83-91. Doi: 10.1002/yea.3216.
- Harrington, K.J., D'Arcy-Evans, C. (1985). A comparison of conventional and in situ methods of transesterification of seed oil from a series of sunflower cultivars. *J Am Oil Chem Soc.* 62: 1009–1013. Doi: 10.1007/BF02935703

- Harrison, S.T.L. (1991). Bacterial cell disruption: a key unit operation in the recovery of intracellular products. *Biotechnol Adv.* 9: 217–240. Doi: 10.1016/0734-9750(91)90005-G
- Hassan, S.S., Williams, G.A., Jaiswal, A.K. (2019). Lignocellulosic Biorefineries in Europe: Current State and Prospects. *Trends in Biotechnology*, 37: 231-234. Doi: 10.1016/j.tibtech.2018.07.002
- Heim, A., Kamionowska, U., Solecki, M. (2007). The effect of microorganism concentration on yeast cell disruption in a bead mill. *J Food Eng.* 83: 121–128. Doi: 10.1016/j.jfoodeng.2007.02.047
- Heipieper, H.J., Keweloh, H., Rehm, H.J. (1991). Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 57: 1213-1217.
- Ho, S.Y., Mittal, G.S. (1996). Electroporation of cell membranes: a review. *Crit Rev Biotechnol.* 16: 349–362. Doi: 10.3109/07388559609147426
- Ho, C.W., Chew, T.K., Ling, T.C., Kamaruddina, S., Tan, W.S., Tey, B.T. (2006). Efficient mechanical cell disruption of *Escherichia coli* by an ultrasonicator and recovery of intracellular hepatitis B core antigen. *Process Biochem.* 41: 1829–1834. Doi: 10.1016/j.procbio.2006.03.043
- Hong, U.G., Park, H.W., Lee, J., Hwang, S., Yi, J., Song, I.K. (2012). Hydrogenation of succinic acid to tetrahydrofuran (THF) over rhenium catalyst supported on H₂SO₄-treated mesoporous carbon. *Appl Catal A Gen.* 415–416: 141-148. 10.1016/j.apcata.2011.12.022
- Hooper, R.J., Li, J. (1996). Summary of the factors critical to the commercial application of bioenergy technologies. *Biomass Bioenerg.* 11: 469–474. Doi: 10.1016/S0961-9534(96)00054-2
- Hopkins, T.R. (1994). “Physical and chemical cell disruption for the recovery of intracellular proteins,” in *Purification and Analysis of Recombinant Proteins*, eds R. Seetharam and S. K. Sharma (New York, NY: Marcel Dekker), 57–83.
- Hossain, A.H., Li, A., Brickwedde, A., Wilms, L., Caspers, M., Overkamp, K., Punt, P.J. (2016). Rewiring a secondary metabolite pathway towards itaconic acid production in *Aspergillus niger*. *Microb Cell Fact.* 15:130. Doi: 10.1186/s12934-016-0527-2.
- Hosseinpour Tehrani, H., Geiser, E., Engel, M., Hartmann, S.K., Hossain, A.H., Punt, P.J., Blank, L.M., Wierckx, N. (2019). The interplay between transport and metabolism in fungal itaconic acid production. *Fungal Genet Biol.* 125: 45-52. Doi: 10.1016/j.fgb.2019.01.011.
- Hu, C.M., Zhao, X., Zhao, J., Wu, S.G., Zhao, Z.B.K. (2009). Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresour Technol.* 100: 4843–4847. Doi: 10.1016/j.biortech.2009.04.041.
- Hu, Z. (2011). *Methods for Producing Fatty Alcohols*. European Patent EP 2 367 947 B1. Munich; The Hague; Brussels; Vienna; Berlin: European Patent Office.
- Hu, S., Luo, X., Wan, C., Li, Y. (2012). Characterization of crude glycerol from biodiesel plants. *J Agric Food Chem.* 60: 5915-5921. Doi: 10.1021/jf3008629.
- Hu, P., Chakraborty, S., Kumar, A., Woolston, B.M., Liu, H., Emerson, D., Stephanopoulos, G. (2016). Integrated Bioprocess for Conversion of Gaseous Substrates to Liquids. *Proc Natl Acad Sci* 113: 3773–3778. Doi: 10.1073/pnas.1516867113
- Hu, G., Zhou, J., Chen, X., Qian, Y., Gao, C., Guo, L., Xu, P., Chen, W., Chen, J., Li, Y., Liu, L. (2018). Engineering synergetic CO₂-fixing pathways for malate production. *Metab Eng.* 47: 496-504. Doi: 10.1016/j.ymben.2018.05.007.

- Humbird, D., Davis, R., Tao, L., Kinchin, C., Hsu, D., Aden, A., Schoen, P., Lukas, J., Olthof, B., Worley, M., Sexton, D., Dudgeon, D. (2011). Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol: Dilute-Acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover. United States. Doi:10.2172/1013269.
- Hummel, W., Kula, M.-R. (1989). Simple method for small-scale disruption of bacteria and yeasts. *J Microbiol Methods* 9: 201–209. Doi: 10.1016/0167-7012(89)90037-7
- International Energy Agency (2017). Key world energy statistics 2017. <https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/KeyWorld2017.pdf> (heruntergeladen am 05.04.2019)
- Isikgor, F.H., Becer, C.R. (2015). Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polym Chem.*, 6: 4497. Doi: 10.1039/C5PY00263J
- Iverson, S.J., Lang, S.L.C., Cooper, M.H. (2001). Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids* 36: 1283–1287. Doi: 10.1007/s11745-001-0843-0
- Iyyappan, J., Baskar, G., Bharathiraja, B., Saravanathamizhan, R. (2018). Malic acid production from biodiesel derived crude glycerol using morphologically controlled *Aspergillus niger* in batch fermentation. *Bioresour Technol.* 269: 393–399. doi: 10.1016/j.biortech.2018.09.002
- Jacob, Z. (1992). Yeast lipids: extraction, quality analysis, and acceptability. *Crit Rev Biotechnol.* 12: 463–491. Doi: 10.3109/07388559209114236
- Jacobs, A., Botha, A., and Van Zyl, W. H. (2010). Sunflower press cake as a substrate for eicosapentaenoic acid production by representatives of the genus *Mortierella*. *Bioresources* 5: 1232–1243. Doi: 10.15376/biores.5.2.1232-1243
- James, C.X., Coakley, W.T., Hughes, D.E. (1972). Kinetics of protein release from yeast sonicated in batch and flow systems at 20 kHz. *Biotechnol Bioeng.* 14: 33–42. Doi: 10.1002/bit.260140105
- Jantama, K., Haupt, M.J., Svoronos, S.A., Zhang, X., Moore, J.C., Shanmugam, K.T., Ingram, L.O. (2008). Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate. *Biotechnol Bioeng.* 2008 99: 1140-1153. Doi: 10.1002/bit.21694
- Janusz, G., Pawlik, A., Sulej, J., Swiderska-Burek, U., Jarosz-Wilkolazka, A., Paszczynski, A. (2017). Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiol Rev.* 41: 941-962. Doi: 10.1093/femsre/fux049.
- Jayakar, S.S., Singhal, R.S. (2012). Development of an efficient cell disruption method for release of lipoic acid from *Saccharomyces cerevisiae*. *Glob J Biotechnol Biochem.* 7: 90–99. Doi: 10.5829/idosi.gjbb.2012.7.4.6546
- Jensen, W.B. (2007). The Origin of the Names Malic, Maleic, and Malonic Acid. *J Chem Educ.* 84: 924. Doi: 10.1021/ed084p924
- Ji, Z., Zhang, X., Ling, Z., Zhou, X., Ramaswamy, S., Xu, F. (2015). Visualization of *Miscanthus x giganteus* cell wall deconstruction subjected to dilute acid pretreatment for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnol Biofuels.* 8: 103. Doi: 10.1186/s13068-015-0282-3
- Jiménez-Colmenero, F. (2007). Healthier lipid formulation approaches in meat-based functional foods. Technological options for replacement of meat fats by non-meat fats. *Trends Food Sci Technol.* 18: 567–578. Doi: 10.1016/j.tifs.2007.05.006

- Johnson, E. (2016). Integrated enzyme production lowers the cost of cellulosic ethanol. *Biofuels*, *Bioprod Biorefin.* 10: 164–174. Doi: 10.1002/bbb.1634.
- Johnson, M.B., Wen, Z. (2009). Production of biodiesel fuel from microalga *Schizochytrium limacinum* by direct transesterification of algal biomass. *Energy Fuels* 23: 5179–5183. Doi: 10.1021/ef900704h
- Jørgensen, H., Kristensen, J.B., Felby, C. (2007). Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofpr.* 1: 119–134. Doi: 10.1002/bbb.4
- Ju, X., Grego, C., Zhang, X. (2013). Specific effects of fiber size and fiber swelling on biomass substrate surface area and enzymatic digestibility. *Bioresour Technol.* 144: 232-9. Doi: 10.1016/j.biortech.2013.06.100.
- Jurado, M., Prieto, A., Martínez-Alcalá, A., Martínez, A.T., Martínez, M.J. (2009). Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. *Bioresour Technol.* 100: 6378-6384. Doi: 10.1016/j.biortech.2009.07.049.
- Juriscic, V., Karunanithy, C., Julson, J.L. (2009) Effect of extrusion pretreatment on enzymatic hydrolysis of *Miscanthus*. ASABE paper no. 097178. ASABE, St. Joseph, Mich.
- Kajiyama, T., Kobayashi, H., Taguchi, T., Kataoka, K., Tanaka, J. (2004). Improved synthesis with high yield and increased molecular weight of poly(alpha,beta-malic acid) by direct polycondensation. *Biomacromolecules* 5: 169–174. Doi: 10.1021/bm0342990.
- Kakkad, H., Khot, M., Zinjarde, S., RaviKumar, A. (2015). Biodiesel production by direct *in situ* transesterification of an oleaginous tropical mangrove fungus grown on untreated agro-residues and evaluation of its fuel properties. *Bioener Res.* 8: 1788–1799. Doi: 10.1007/s12155-015-9626-x
- Kamm, B., Gruber, P.R., Kamm, M. (2016). Biorefineries – Industrial Processes and Products. In Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, (Ed.). doi:10.1002/14356007.l04_l01.pub2
- Kane, J.H., Finlay, A., Amann, P.F. (1943). Production of fumaric acid. US-Patent US 2,327,191.
- Kang, K.H., Hong, U.G., Bang, Y., Choi, J.H., Kim, J.K., Lee, J.K., Han, S.J., Song, I.K. (2015). Hydrogenation of succinic acid to 1,4-butanediol over Re–Ru bimetallic catalysts supported on mesoporous carbon. *Appl Catal A Gen.* 490: 153-162. Doi: 10.1016/j.apcata.2014.11.029
- Karaffa, L., Kubicek, C.P. (2019). Citric acid and itaconic acid accumulation: variations of the same story? *Appl Microbiol Biotechnol.* 103: 2889-2902. Doi: 10.1007/s00253-018-09607-9.
- Karnjanakom, S., Bayu, A., Xiaoketi, P., Hao, X., Kongparakul, S., Samart, C., Abudulaa, A., Guan, G. (2016). Selective production of aromatic hydrocarbons from catalytic pyrolysis of biomass over Cu or Fe loaded mesoporous rod-like alumina. *RSC Adv.* 6: 50618-50629. Doi: 10.1039/C6RA09431G
- Karunanithy, C., Muthukumarappan, K. (2010). Effect of extruder parameters and moisture content of switchgrass, prairie cord grass on sugar recovery from enzymatic hydrolysis. *Appl Biochem Biotech* 162: 1785–1803. Doi:10.1007/s12010-010-8959-3
- Karunanithy, C., Muthukumarappan, K. (2011a). Optimization of switchgrass and extruder parameters for enzymatic hydrolysis using response surface methodology. *Ind Crop Prod.* 33: 188–199. Doi:10.1016/j.indcrop.2010.10.008
- Karunanithy, C., Muthukumarappan, K. (2011b). Optimization of alkali soaking and extrusion pretreatment of prairie cord grass for maximum sugar recovery by enzymatic hydrolysis. *Biochem Eng J.* 54: 71–82. Doi:10.1016/j.bej.2011.02.001

- Kautola, H., Linko, Y.-Y. (1990). Production of fumaric acid with immobilized biocatalysts. *Appl Biochem Biotechnol.* 24/25: 161-170. Doi: 10.1007/BF02920242
- Kavšček, M., Bhutada, G., Madl, T., Natter, K. (2015). Optimization of lipid production with a genome-scale model of *Yarrowia lipolytica*. *BMC Syst Biol.* 9:72. Doi: 10.1186/s12918-015-0217-4.
- Kertes, A.S., King, C.J. (1986). Extraction chemistry of fermentation product carboxylic acids. *Biotechnol Bioeng.* 28: 269–282. Doi: 10.1002/bit.260280217
- Keshavarz, E., Bonnerjea, J., Hoare, M., Dunnill, P. (1990). Disruption of a fungal organism, *Rhizopus nigricans*, in a high-pressure homogenizer. *Enzyme Microb Technol.* 12: 494–498. Doi: 10.1016/0141-0229(90)90064-W
- Keweloh, H., Heipieper, H.J., Rehm, H.J. (1989). Protection of bacteria against toxicity of phenol by immobilization in calcium alginate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31: 383–389. Doi: 10.1007/BF00257609
- Khan, I., Nazir, K., Wang, Z.P., Liu, G.L., Chi, Z.M. (2014). Calcium malate overproduction by *Penicillium viticola* 152 using the medium containing corn steep liquor. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98: 1539-1546. Doi: 10.1007/s00253-013-5326-7.
- Klein-Marcuschamer, D., Oleskowicz-Popiel, P., Simmons, B.A., Blanch, H.W. (2012). The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnol Bioeng.* 109: 1083–1087. Doi: 10.1002/bit.24370.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.-P., Bohn, A. (2005). Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie International Edition*, 44: 3358–3393. Doi: 10.1002/anie.200460587
- Klimek-Ochab, M., Brzezińska-Rodak, M., Zymańczyk-Duda, E., Lejczak, B., Kafarski, P. (2011). Comparative study of fungal cell disruption - scope and limitations of the methods. *Folia Microbiol.* 56: 469–475. Doi: 10.1007/s12223-011-0069-2
- Klopper, T. (2017). Untersuchung unterschiedlicher Kultivierungsstrategien für die L-Äpfelsäureproduktion mit *Aspergillus oryzae* zur Vermeidung von Substrat- und Produktinhibierung. Bachelorarbeit, KIT.
- Kim, K.H., Tucker, M., Nguyen, Q. (2005). Conversion of bark-rich biomass mixture into fermentable sugar by two-stage dilute acid-catalyzed hydrolysis. *Bioresour Technol.* 96: 1249–1255. Doi: 10.1016/j.biortech.2004.10.017.
- Kim, S., Holtzapfle, M.T. (2005). Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresour Technol.* 96: 1994-2006. Doi: 10.1016/j.biortech.2005.01.014
- Kim, S., Holtzapfle, M.T. (2006). Delignification kinetics of corn stover in lime pretreatment. *Bioresour Technol.* 97: 778-785. Doi: 10.1016/j.biortech.2005.04.002
- Kim, Y., Mosier, N.S., Hendrickson, R., Ezeji, T., Blaschek, H., Dien, B., Cotta, M., Dale, B., Ladisch, M.R. (2008). Composition of corn dry-grind ethanol by-products: DDGS, wet cake, and thin stillage. *Bioresour Technol.* 99: 5165-5176. Doi: 10.1016/j.biortech.2007.09.028
- Kim, Y., Hendrickson, R., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., Bals, B., Balan, V., Dale, B.E., Dien, B.S., Cotta, M.A. (2010). Effect of compositional variability of distillers' grains on cellulosic ethanol production. *Bioresour Technol.* 101: 5385-5393. Doi: 10.1016/j.biortech.2010.02.054.

- Kim, B., Im, H., Lee, J. W. (2015). *In situ* transesterification of highly wet microalgae using hydrochloric acid. *Bioresour. Technol.* 185, 421–425. doi: 10.1016/j.biortech.2015.02.092
- Kim, I., Seo, Y.H., Kim, G.Y., Han, J.I. (2015). Co-production of bioethanol and biodiesel from corn stover pretreated with nitric acid. *Fuel*. 143: 285-289. Doi: 10.1016/j.fuel.2014.11.031
- Kim, J.S., Lee, Y.Y., Kim, T.H. (2016). A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol.* 199: 42-48. Doi: 10.1016/j.biortech.2015.08.085
- Kimura, T., Kitamoto, N., Kito, Y., Karita, S., Sakka, K., Ohmiya, K. (1998). Molecular cloning of xylanase gene *xynG1* from *Aspergillus oryzae* KBN 616, a Shoyu koji mold, and analysis of its expression. *J Ferment Bioeng.* 85: 10–16. Doi: 10.1016/S0922-338X(97)80346-7
- Kitahara, K., Fukui, S., Misawa, M. (1960): Preparation of L-Malate from Fumarate by a new process "Enzymatic Transcrystallization". *J Gen Appl Microbiol.* 6: 108–116. Doi: 10.2323/jgam.6.108.
- Klibanov, A.M. (1989). Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends Biochem Sci.* 14: 141–144. Doi: 10.1016/0968-0004(89)90146-1
- Knuf, C., Nookaew, I., Brown, S.H., McCulloch, M., Berry, A., Nielsen, J. (2013). Investigation of malic acid production in *Aspergillus oryzae* under nitrogen starvation conditions. *Appl Environ Microbiol.* 79: 6050-6058. Doi: 10.1128/AEM.01445-13.
- Knuf, C., Nookaew, I., Remmers, I., Khoomrung, S., Brown, S., Berry, A., Nielsen, J. (2014). Physiological characterization of the high malic acid-producing *Aspergillus oryzae* strain 2103a-68. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98: 3517-3527. Doi: 10.1007/s00253-013-5465-x.
- Kolouchová, I., Mařátková, O., Sigler, K., Masák, J., Řezanka, T. (2016). Lipid accumulation by oleaginous and non-oleaginous yeast strains in nitrogen and phosphate limitation. *Folia Microbiol.* 61: 431–438. Doi: 10.1007/s12223-016-0454-y
- Koopman, F., Wierckx, N., de Winde, J.H., Ruijsenaars, H.J. (2010). Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl)furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107: 4919-4924. Doi: 10.1073/pnas.0913039107.
- Koutinas, A.A., Chatzifragkou, A., Kopsahelis, N., Papanikolaou, S., Kookos, I.K. (2014). Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. *Fuel* 116: 566–577. Doi: 10.1016/j.fuel.2013.08.045
- Kubicek, C.P., Punt, P., Visser, J. (2011). Production of Organic Acids by Filamentous Fungi. In *Industrial Applications. The Mycota Volume 10*. Edited by: Hofrichter M. pp. 215–234. Springer, Berlin Heidelberg; Doi: 10.1007/978-3-642-11458-8_10.
- Kurabi, A., Berlin, A., Gilkes, N., Kilburn, D., Bura, R., Robinson, J., Markov, A., Skomarovsky, A., Gusakov, A., Okunev, O., Sinitsyn, A., Gregg, D., Xie, D., Saddler, J. (2005). Enzymatic hydrolysis of steam-exploded and ethanol organosolv-pretreated Douglas-Firby novel and commercial fungal cellulases. *Appl Biochem Biotechnol.* 121-124: 219-230.
- Kurtzman, C.P., Smiley, M.J., Robnett, C.J., Wicklow, D.T. (1986). DNA Relatedness Among Wild and Domesticated Species in the *Aspergillus flavus* Group. *Mycologia.* 78: 955-959. Doi: 10.1080/00275514.1986.12025355
- Lai, Y.S., Parameswaran, P., Li, A., Baez, M., Rittmann, B. E. (2014). Effects of pulsed electric field treatment on enhancing lipid recovery from the microalga, *Scenedesmus*. *Bioresour Technol.* 173: 457–461. Doi: 10.1016/j.biortech.2014.09.124

- Lamers, P. (2016). Developing the Global Bioeconomy. Technical, Market, and Environmental Lessons from Bioenergy. Elsevier Science. Doi: 10.1016/C2015-0-02444-3
- Lamsal B, Yoo J, Brijwani K, Alavi S (2010) Extrusion as a thermomechanical pre-treatment for lignocellulosic ethanol. *Biomass Bioenergy* 34: 1703–1710. Doi:10.1016/j.biombioe.2010.06.009
- Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G., Nilvebrant, N.O. (1999). The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme Microb Technol.* 24: 151–159.
- Larsson, S., Quintana-Sáinz, A., Reimann, A., Nilvebrant, N.O., Jönsson, L.J. (2000). Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Biochem Biotechnol.* 84-86: 617-632.
- Larsson, S., Cassland, P., Jönsson, L.J. (2001). Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. *Appl Environ Microbiol.* 67: 1163–1170. Doi: 10.1128/AEM.67.3.1163-1170.2001.
- Lazar, Z., Liu, N., Stephanopoulos, G. (2018). Holistic Approaches in Lipid Production by *Yarrowia lipolytica*. *Trends Biotechnol.* 36: 1157-1170. Doi: 10.1016/j.tibtech.2018.06.007.
- Leathers, T.D., Manitchotpisit, P. (2013). Production of poly(β -l-malic acid) (PMA) from agricultural biomass substrates by *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol Lett.* 35: 83-89. Doi: 10.1007/s10529-012-1045-x
- Leber, C., Polson, B., Fernandez-Moya, R., Da Silva, N. A. (2015). Overproduction and secretion of free fatty acids through disrupted neutral lipid recycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng.* 28: 54–62. Doi: 10.1016/j.ymben.2014.11.006
- Ledesma-Amaro, R., Dulermo, R., Niehus, X., Nicaud, J.M. (2016). Combining metabolic engineering and process optimization to improve production and secretion of fatty acids. *Metab Eng.* 38: 38-46. Doi: 10.1016/j.ymben.2016.06.004.
- Lee, B.S., Holler, E. (1999). Effects of culture conditions on β -poly(L-malate) production by *Physarum polycephalum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 51: 647–652. Doi: 10.1007/s002530051445
- Lee, S. J., Yoon, B.-Y., Oh, H.-M. (1998). Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. *Biotechnol Tech.* 12: 553–556. Doi: 10.1023/A:1008811716448
- Lee, S., Faustman, C., Djordjevic, D., Faraji, H., Decker, E.A. (2006a). Effect of antioxidants on stabilization of meat products fortified with n-3 fatty acids. *Meat Sci.* 72: 18–24. Doi: 10.1016/j.meatsci.2005.05.022
- Lee, S., Hernandez, P., Djordjevic, D., Faraji, H., Hollender, R., Faustman, C., Decker, E.A. (2006b). Effect of antioxidants and cooking on stability of n-3 fatty acids in fortified meat products. *J Food Sci.* 71: C233–C238. Doi: 10.1111/j.1365-2621.2006.tb15623.x
- Lee, J. Y., Yoo, C., Jun, S. Y., Ahn, C. Y., Oh, H. M. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresour Technol.* 101: 575–577. Doi: 10.1016/j.biortech.2009.03.058
- Lee, A. K., Lewis, D. M., Ashman, P. J. (2012). Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: processes and specific energy requirements. *Biomass Bioener.* 46: 89–101. Doi: 10.1016/j.biombioe.2012.06.034

- Leible, L., Kälber, S., Kappler, G. (2008). Energiebereitstellung aus Stroh und Waldrestholz. *BWK* 5: 56–63.
- Lennen, R.M., Pfleger, B.F. (2012). Engineering *Escherichia coli* to synthesize free fatty acids. *Trends Biotechnol.* 30: 659–667. Doi: 10.1016/j.tibtech.2012.09.006
- Leonard, C.A., Brown, S.D., Hayman, J.R. (2013). Random Mutagenesis of the *Aspergillus oryzae* Genome Results in Fungal Antibacterial Activity. *Int J Microbiol.* 2013:901697. Doi: 10.1155/2013/901697.
- Leonelli, C., Mason, T.J. (2010). Microwave and ultrasonic processing: now a realistic option for industry. *Chem Eng Process.* 49: 885–900. Doi: 10.1016/j.cep.2010.05.006
- Leschinsky, M., Zuckerstaetter, G., Weber, H.K., Patt, R., Sixta, H. (2008). Effect of autohydrolysis of *Eucalyptus globulus* wood on lignin structure: Part 2: Influence of autohydrolysis intensity. *Holzforschung*, 62, 653–658. Doi: 10.1515/HF.2008.117
- Leskovac, V., Trivić, S., Wohlfahrt, G., Kandrac, J., Pericin, D. (2005). Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. *Int J Biochem Cell Biol.* 37: 731-50. Doi: 10.1016/j.biocel.2004.10.014
- Li, Y., Zhao, Z., Bai, F., Kent, Z. (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzym Microb Technol.* 41: 312–317. Doi: 10.1016/j.enzmictec.2007.02.008
- Li, P., Miao, X., Li, R., Zhong, J. (2011). In situ biodiesel production from fast-growing and high oil content *Chlorella pyrenoidosa* in rice straw hydrolysate. *J Biomed Biotechnol.* 2011:141207. Doi: 10.1155/2011/141207
- Li, S.L., Lin, Q., Li, X.R., Xu, H., Yang, Y.X., Qiao, D.R., Cao, Y. (2012). Biodiversity of the oleaginous microorganisms in Tibetan Plateau. *Braz J Microbiol.* 43: 627-634. Doi: 10.1590/S1517-83822012000200026.
- Li, X., Liu, Y., Yang, Y., Zhang, H., Wang, H., Wu, Y., Zhang, M., Sung, T., Cheng, J., Wu, X., Pan, L., Jiang, S., Wu, H. (2014). High levels of malic acid production by the bioconversion of corn straw hydrolyte using an isolated *Rhizopus delemar* strain *Biotechnol Bioproc E.* 19: 478. Doi: 10.1007/s12257-014-0047-z.
- Li, Y., Ghasemi Naghdi, F., Garg, S., Adarme-Vega, T. C., Thurecht, K. J., Ghafor, W. A., Tannock, S., Schenk, P.M. (2014). A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. *Microb Cell Fact.* 13:14. Doi: 10.1186/1475-2859-13-14
- Li, Y., Wang, G. (2016). Strategies of isoprenoids production in engineered bacteria. *J Appl Microbiol.* 121: 932-940. Doi: 10.1111/jam.13237.
- Li, T., Elhadi, D., Chen, G.Q. (2017). Co-production of microbial polyhydroxyalkanoates with other chemicals. *Metab Eng.* 43: 29-36. Doi: 10.1016/j.ymben.2017.07.007.
- Lian, J., Garcia-Perez, M., Coates, R., Wu, H., Chen, S. (2012). Yeast fermentation of carboxylic acids obtained from pyrolytic aqueous phases for lipid production. *Bioresour Technol.* 118: 177-86. Doi: 10.1016/j.biortech.2012.05.010
- Liang, Y., Pan, L., Lin, Y. (2009). Analysis of extracellular proteins of *Aspergillus oryzae* grown on soy sauce koji. *Biosci Biotechnol Biochem.* 73: 192-195. Doi: 10.1271/bbb.80500

- Liang, Q., Qi, Q. (2014). From a co-production design to an integrated single-cell biorefinery. *Biotechnol Adv.* 32: 1328-1335. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.08.004
- Lidén, G. (2017). Carboxylic Acid Production. *Fermentation.* 3: 46. Doi: 10.3390/fermentation3030046.
- Limon-Lason, J., Hoare, M., Orsborn, C.B., Doyle, D.J., Dunnill, P. (1979). Reactor properties of a high-speed bead mill for microbial cell rupture. *Biotechnol Bioeng.* 21: 745–774. Doi: 10.1002/bit.260210503
- Lin, H., Cheng, W., Ding, H., Chen, X., Zhou, Q., Zhao, Y. (2010). Direct microbial conversion of wheat straw into lipid by a cellulolytic fungus of *Aspergillus oryzae* A-4 in solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* 101: 7556–7562. doi: 10.1016/j.biortech.2010.04.027
- Lin, J., Shen, H., Tan, H., Zhao, X., Wu, S., Hu, C., Zhao, Z.K. (2011). Lipid production by *Lipomyces starkeyi* cells in glucose solution without auxiliary nutrients. *J Biotechnol.* 152: 184–188. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.02.010
- Ling, Y., Wong, H.H., Thomas, C.J., Williams, D.R.G., Middelberg, A.P.J. (1997). Pilot-scale extraction of PHB from recombinant *E. coli* by homogenization and centrifugation. *Bioseparation 7:* 9–15. Doi: 10.1023/A:1007900416356
- Ling, X., Guo, J., Liu, X., Zhang, X., Wang, N., Lu, Y., Ng, I.-S. (2015). Impact of carbon and nitrogen feeding strategy on high production of biomass and docosahexaenoic acid (DHA) by *Schizochytrium* sp. LU310. *Bioresour Technol.* 184: 139–47. Doi: 10.1016/j.biortech.2014.09.130
- Liu, S.J., Steinbüchel, A. (1997). Production of poly(malic acid) from different carbon sources and its regulation in *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol Lett.* 19: 11. Doi: 10.1023/A:1018346516211
- Liu, S., Steinbüchel, A. (1996). Investigation of poly(β -L-malic acid) production by strains of *Aureobasidium pullulans*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 46: 273-278. Doi: 10.1007/s002530050816
- Liu, C., Wyman, C.E. (2005). Partial flow of compressed-hot water through corn stover to enhance hemicellulose sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose. *Bioresour Technol.* 96: 1978-85. Doi: 10.1016/j.biortech.2005.01.012
- Liu, B., Zhao, Z. (2007). Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *J Chem Technol Biotechnol.* 82: 775–780. Doi: 10.1002/jctb.1744
- Liu, Y., Liao, W., Chen, S. (2010). Co-production of lactic acid and chitin using a pelletized filamentous fungus *Rhizopus oryzae* cultured on cull potatoes and glucose. *J Appl Microbiol.* 105: 1521-1528. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03913.x
- Liu, H., Yu, C., Feng, D., Cheng, T., Meng, X., Liu, W., Zou, H., Mo, X. (2012). Production of extracellular fatty acid using engineered *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 11:41. Doi: 10.1186/1475-2859-11-41
- Liu, G., Qin, Y., Li, Z., Qu, Y. (2013). Development of highly efficient, low-cost lignocellulolytic enzyme systems in the post-genomic era. *Biotechnol Adv.* 31: 962-975. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.03.001.
- Liu, K., Xu, Y., Zhou, N.Y. (2015). Identification of a Specific Maleate Hydratase in the Direct Hydrolysis Route of the Gentisate Pathway. *Appl Environ Microbiol.* 81: 5753-5760. Doi: 10.1128/AEM.00975-15.
- Liu, H., Yue, X., Jin, Y., Wang, M., Deng, L., Wang, F., Tan, T. (2017). Preparation of hydrolytic liquid from dried distiller's grains with solubles and fumaric acid fermentation by *Rhizopus arrhizus* RH 7-13. *J Environ Manage.* 201: 172–176. Doi: 10.1016/j.jenvman.2017.05.054

- Liu, H.-H., Madzak, C., Sun, M.-L., Ren, L.-J., Song, P., Huang, H., Ji, X.-J. (2017). Engineering *Yarrowia lipolytica* for arachidonic acid production through rapid assembly of metabolic pathway. *Biochem Eng J.* 119 52–58. Doi: 10.1016/j.bej.2016.12.004
- Liu, X., Yu, X., Lv, J., Xu, J., Xia, J., Wu, Z., Zhang, T., Deng, Y. (2017), A cost-effective process for the coproduction of erythritol and lipase with *Yarrowia lipolytica* M53 from waste cooking oil. *Food Bioprod Process.* 103: 86-94. Doi: 10.1016/j.fbp.2017.03.002
- Liu, J., Xie, Z., Shin, H.D., Li, J., Du, G., Chen, J., Liu, L. (2017). Rewiring the reductive tricarboxylic acid pathway and L-malate transport pathway of *Aspergillus oryzae* for overproduction of L-malate. *J Biotechnol.* 253: 1-9. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.05.011.
- Liu, J., Li, J., Liu, Y., Shin, H.D., Ledesma-Amaro, R., Du, G., Chen, J., Liu, L. (2018). Synergistic Rewiring of Carbon Metabolism and Redox Metabolism in Cytoplasm and Mitochondria of *Aspergillus oryzae* for Increased L-Malate Production. *ACS Synth Biol.* 7: 2139-2147. Doi: 10.1021/acssynbio.8b00130.
- Ljubimova, J.Y., Black, K.L., Holler, E. (2007). Polymalic acid-based multi-functional drug delivery system. US-Patent US 2007/0259008 A1.
- Lohbeck, K., Haferkorn, H., Fuhrmann, W., Fedtke, N. (2003-). Maleic and Fumaric Acids. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*, Bd. 8. Ed 6 2003-. Weinheim: Wiley-Blackwell, S. 620.
- Lopez-Ruiz, J.A., Davis, R.J. (2014). Decarbonylation of heptanoic acid over carbon-supported platinum nanoparticles. *Green Chem.* 16: 683-694. Doi: 10.1039/C3GC41287C
- Lu, X., Vora, H., and Khosla, C. (2008). Overproduction of free fatty acids in *E. coli*: Implications for biodiesel production. *Metab Eng.* 10: 333–339. Doi: 10.1016/j.ymben.2008.08.006
- Lubowitz, H.R., La Roe, E.G. (1958). Fumaric acid fermentation process. U-Patent US 2,861,922.
- Lü, H., Shi, X., Li, Y., Meng, F., Liu, X., Yan, L. (2017). Multi-objective regulation in autohydrolysis process of corn stover by liquid hot water pretreatment. *Chin J Chem Eng.* 25: 499-506. Doi: 10.1016/j.cjche.2017.01.007.
- Lübbert, H. (2018). Charakterisierung der Vorkultur für die L-Äpfelsäureproduktion mit *Aspergillus oryzae*. Bachelorarbeit, KIT.
- Luque, R., Clark, J.H. (2010). Water-tolerant Ru-Starbon® materials for the hydrogenation of organic acids in aqueous ethanol. *Catal Commun.* 11: 928-931. 10.1016/j.catcom.2010.03.015
- Ma, H., Kubicek, C.P., Röhr, M. (1981). Malate dehydrogenase isoenzymes in *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol Lett.* 12: 147–151. Doi: 10.1111/j.1574-6968.1981.tb07630.x
- Ma, L., Zhang, J., Zou, G., Wang, C., Zhou, Z. (2011). Improvement of cellulase activity in *Trichoderma reesei* by heterologous expression of a beta-glucosidase gene from *Penicillium decumbens*. *Enzyme Microb Technol.* 49: 366–371. Doi: 10.1016/j.enzmictec.2011.06.013
- Ma, Y., Wang, G.Y., Liu, G.L., Wang, Z.P., Chi, Z.M. (2013). Overproduction of poly(β -malic acid) (PMA) from glucose by a novel *Aureobasidium sp.* P6 strain isolated from mangrove system. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97: 8931-8939. Doi: 10.1007/s00253-013-5150-0.
- Macías-Sánchez, M.D., Robles-Medina, A., Hita-Peña, E., Jiménez-Callejón, M.J., Estéban-Cerdán, L., González-Moreno, P.A., Molina-Grima, E. (2015). Biodiesel production from wet microalgal biomass by direct transesterification. *Fuel* 150: 14–20. Doi: 10.1016/j.fuel.2015.01.106

- Madzak, C. (2015). *Yarrowia lipolytica*: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99: 4559–4577. Doi: 10.1007/s00253-015-6624-z
- Magnuson, J.K., Lasure, L.L. (2004). Organic Acid Production by Filamentous Fungi. In: Tkacz JS, Lange, L. (eds.) *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine*. Springer US, Boston, MA, pp 307–340
- Makri, A., Fakas, S., Aggelis, G. (2010). Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. *Bioresour Technol.* 101: 2351–2358. Doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.024
- Malmay, G., Albet, J., Putranto, A., Hanine, H., Molinier, J. (1998). Measurement of partition coefficients of carboxylic acids between water and triisooctylamine dissolved in various diluents. *J Chem Eng Data.* 43: 849–851. Doi: 10.1021/je980087s
- Manitchotpit, P., Skory, C.D., Peterson, S.W., Price, N.P., Vermillion, K.E., Leathers, T.D. (2012). Poly(β -L-malic acid) production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium pullulans*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 39: 125-132. Doi: 10.1007/s10295-011-1007-7.
- Marchant, R., Banat, I.M. (2012). Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnol Lett.* 34: 1597–1605. Doi: 10.1007/s10529-012-0956-x
- Martinez, D., Berka, R.M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S.E., Chapman, J., Chertkov, O., Coutinho, P.M., Cullen, D., Danchin, E.G.J., Grigoriev, I.V., Harris, P., Jackson, M., Kubicek, C.P., Han, C.S., Ho, I., Larrondo, L.F., de Leon, A.L., Magnuson, J.K., Merino, S., Misra, M., Nelson, B., Putnam, N., Robbertse, B., Salamov, A.A., Schmoll, M., Terry, A., Thayer, N., Westerholm-Parvinen, A., Schoch, C.L., Yao, J., Barabote, R., Nelson, M.A., Detter, C., Bruce, D., Kuske, C.R., Xie, G., Richardson, P., Rokhsar, D.S., Lucas, S.M., Rubin, E.M., Dunn-Coleman, N., Ward, M., Brettin, T.S. (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat Biotechnol.* 26: 553–560. Doi: 10.1038/nbt1403.
- Martinez, I., Gao, H., Bennett, G.N., San, K.Y. (2018). High yield production of four-carbon dicarboxylic acids by metabolically engineered *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 45: 53-60. Doi: 10.1007/s10295-017-1991-3.
- Martins, M., Rodrigues-Lima, F., Dairou, J., Lamouri, A., Malagnac, F., Silar, P., Dupret, J.M. (2009). An acetyltransferase conferring tolerance to toxic aromatic amine chemicals: molecular and functional studies. *J Biol Chem.* 284: 18726-33. Doi: 10.1074/jbc.M109.015230.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew Sustain Energy Rev.* 14: 217–232. Doi: 10.1016/j.rser.2009.07.020
- Matsakas, L., Sterioti, A., Rova, U., Christakopoulos, P. (2014). Use of dried sweet sorghum for the efficient production of lipids by the yeast *Lipomyces starkeyi* CBS 1807. *Ind Crop Prod.* 62: 367–372. Doi: 10.1016/j.indcrop.2014.09.011
- McCann, M.C., Carpita, N.C. (2015). Biomass recalcitrance: a multi-scale, multi-factor, and conversion-specific property. *J Exp Bot.* 66: 4109-4118. Doi: 10.1093/jxb/erv267.
- McMillan, J. R., Watson, I. A., Ali, M., Jaafar, W. (2013). Evaluation and comparison of algal cell disruption methods: microwave, waterbath, blender, ultrasonic and laser treatment. *Appl Energy* 103: 128–134. Doi: 10.1016/j.apenergy.2012.09.020

- McNeil, B.A., Stuart, D.T. (2018). *Lipomyces starkeyi*: an emerging cell factory for production of lipids, oleochemicals and biotechnology applications. *World J Microbiol Biotechnol.* 34:147. Doi: 10.1007/s11274-018-2532-6.
- McNichol, J., MacDougall, K. M., Melanson, J. E., McGinn, P. J. (2012). Suitability of Soxhlet extraction to quantify microalgal fatty acids as determined by comparison with *in situ* transesterification. *Lipids* 47: 195–207. Doi: 10.1007/s11745-011-3624-3
- Meng, X., Shang, H., Zheng, Y., Zhang, Z. (2013). Free fatty acid secretion by an engineered strain of *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett.* 35: 2099–2103. Doi: 10.1007/s10529-013-1305-4
- Mercer, P., Armenta, R. E. (2011). Developments in oil extraction from microalgae. *Eur J Lipid Sci Technol.* 113: 539–547. Doi: 10.1002/ejlt.201000455
- Mlísková, K., Roux, E., Athenstaedt, K., d'Andrea, S., Daum, G., Chardot, T., Nicaud, J.M. (2004). Lipid accumulation, lipid body formation, and acyl coenzyme A oxidases of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol.* 70: 3918-3924. Doi: 10.1128/AEM.70.7.3918-3924.2004
- Michinaka, Y., Shimauchi, T., Aki, T., Nakajima, T., Kawamoto, S., Shigeta, S., Suzuki, O., Ono, K. (2003). Extracellular secretion of free fatty acids by disruption of a fatty acyl-CoA synthetase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng* 95: 435–440. Doi: 10.1016/S1389-1723(03)80041-5
- Middelberg, A.P.J. (1995). Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnol Adv.* 13: 491–551. Doi: 10.1016/0734-9750(95)02007-P
- Mills, T.Y., Sandoval, N.R., Gill, R.T. (2009). Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. *Biotechnol Biofuels.* 2:26. Doi: 10.1186/1754-6834-2-26.
- Miltenberger, K. (2000). Hydroxycarboxylic Acids, Aliphatic. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, (Ed.). doi:10.1002/14356007.a13_507
- Minh, D.P., Besson, M., Pinel, C., Fuertes, P., Petitjean, C. (2010). Aqueous-Phase Hydrogenation of Biomass-Based Succinic Acid to 1,4-Butanediol Over Supported Bimetallic Catalysts. *Top Catal.* 53: 1270–1273. Doi: 10.1007/s11244-010
- Mislovicová, D., Pätoprstý, V., Vikartovská, A. (2010). Enzymatic oxidation and separation of various saccharides with immobilized glucose oxidase. *Appl Biochem Biotechnol.* 162: 1669-1677. Doi: 10.1007/s12010-010-8948-6.
- Mohsenzadeh, A., Zamani, A., Taherzadeh, M.J. (2017). Bioethylene Production from Ethanol: A Review and Techno-economical Evaluation. *ChemBioEng Rev.* 4: 75-91. Doi: 10.1002/cben.201600025
- Mok, W.S., Antal, M.J. (1992). Uncatalyzed solvolysis of whole biomass hemicellulose by hot compressed liquid water. *Ind Eng Chem Res.* 31: 1157–1161. Doi: 10.1021/ie00004a026
- Molina Grima, E., Belarbi, E.H., Ación Fernández, F.G., Robles Medina, A., Chisti, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol Adv.* 20: 491–515. Doi: 10.1016/S0734-9750(02)00050-2
- Moon, S.Y., Hong, S.H., Kim, T.Y., Lee, S.Y. (2008). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of malic acid. *Biochem Eng J.* 40: 312-320. Doi: 10.1016/j.bej.2008.01.001
- Moreno, A.D., Ibarra, D., Fernández, J.L., Ballesteros, M. (2012). Different laccase detoxification strategies for ethanol production from lignocellulosic biomass by the thermotolerant yeast

- Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Bioresour Technol.* 106: 101-109. Doi: 10.1016/j.biortech.2011.11.108.
- Morrin, M., Ward, O.P. (1997). Relationships between fungal growth, morphology and fumaric acid production by *Rhizopus arrhizus*. *Mycol Res.* 94: 505-510. Doi: 10.1016/S0953-7562(10)80011-5
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M. (2005a). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol.* 96: 673-686. Doi: 10.1016/j.biortech.2004.06.025
- Mosier, N.S., Hendrickson, R., Brewer, M., Ho, N., Sedlak, M., Dreshel, R., Welch, G., Dien, B.S., Aden, A., Ladisch, M.R. (2005b). Industrial scale-up of pH-controlled liquid hot water pretreatment of corn fiber for fuel ethanol production. *Appl Biochem Biotechnol.* 125: 77-97.
- Mustafa, A., Turner, C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: a review. *Anal Chim Acta* 703: 8–18. Doi: 10.1016/j.aca.2011.07.018
- Nagata, N., Nakahara, T., Tabuchi, T. (1993). Fermentative Production of Poly(β -L-malic acid), a Polyelectrolytic Biopolyester, by *Aureobasidium sp.* *Biosci Biotechnol Biochem.* 57: 638-642. Doi: 10.1271/bbb.57.638
- Naude, A., Nicol, W. (2018). Malic acid production through the whole-cell hydration of fumaric acid with immobilised *Rhizopus oryzae*. *Biochem Eng J.* 137: 152–161. Doi: 10.1016/j.bej.2018.05.022.
- Nesbitt, B.F., O'Kelly, J., Sargeant, K., Sheridan, A. (1962). *Aspergillus flavus* and turkey X disease. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature.* 195: 1062-1063. Doi: 10.1038/1951062a0
- Neumann, A., Dörsam, S., Oswald, F., Ochsenreither, K. (2015). Microbial production of value -added chemicals from pyrolysis oil and syngas. In: Xian, M. (ed.) *Sustainable Production of Bulk Chemicals: Integration of Bio-, Chemo- Resources and Processes.* Springer Verlag, Dordrecht, The Netherlands. Doi: 10.1007/978-94-017-7475-8
- Nicoleit, T. (2016). Konditionierung von biogenen Energieträgern aus den Produkten der biolig Schnellpyrolyse. Dissertation KIT
- Nikodinovic-Runic, J., Guzik, M., Kenny, S.T., Babu, R., Werker, A., O Connor, K.E. (2013). Carbon-rich wastes as feedstocks for biodegradable polymer (polyhydroxyalkanoate) production using bacteria. *Adv Appl Microbiol.* 84: 139-200. Doi: 10.1016/B978-0-12-407673-0.00004-7.
- Nishiwaki, Y., Takahashi, T., Takahashi, K. (2010). Cleaning agent for semiconductor device and method for producing semiconductor device using the cleaning agent. US Patent US 2010/0137535 A1.
- Nitsos, C., Rova, U., Christakopoulos, P. (2018). Organosolv Fractionation of Softwood Biomass for Biofuel and Biorefinery Applications. *Energies* 11: 50. Doi: 10.3390/en11010050
- Norton, S., D'Amore, T. (1994). Physiological effects of yeast cell immobilization: Applications for brewing. *Enzyme Microb. Technol.* 16: 365–375. Doi: 10.1016/0141-0229(94)90150-3
- Noweck, K., Grafahrend, W. (2006). "Fatty alcohols," in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, ed B. Elvers (Weinheim: Wiley-VCH), 117–141. Doi: 10.1002/14356007.a10_277.pub2
- Oasmaa, A., Kuoppala, E., Gust, S., Solantausta, Y. (2003). Fast Pyrolysis of Forestry Residue. 1. Effect of Extractives on Phase Separation of Pyrolysis Liquids. *Energy Fuels* 17: 1-12. Doi: 10.1021/ef020088x

- Ochsenreither, K., Fischer, C., Neumann, A., Syltatk, C. (2014). Process characterization and influence of alternative carbon sources and carbon-to-nitrogen ratio on organic acid production by *Aspergillus oryzae* DSM1863. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98: 5449-60. Doi: 10.1007/s00253-014-5614-x.
- Oguri, E., Masaki, K., Naganuma, T., Iefuji, H. (2012). Phylogenetic and biochemical characterization of the oil-producing yeast *Lipomyces starkeyi*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 101: 359-368. Doi: 10.1007/s10482-011-9641-7.
- Oliveira, E.A., Costa, A.A.R., Figueiredo, Z.M.B., Carvalho, L.B. (1994). L-malic acid production by entrapped *Saccharomyces cerevisiae* into polyacrylamide gel beads. *ABAB* 47: 65–72. Doi: 10.1007/BF02788676.
- Ortiz, R.W.P., Benincá, C., Cardozo-Filho, L., Zanoelo, E.F. (2017). High-Pressure Acid-Catalyzed Isomerization and Hydration of Fumaric Acid in a Homogeneous Nonisothermal Batch Reactor. *Ind Eng Chem Res.* 56: 3873–3879. Doi: 10.1021/acs.iecr.7b00472.
- Osmani, S.A., Scrutton, M.C. (1983). The sub-cellular localisation of pyruvate carboxylase and of some other enzymes in *Aspergillus nidulans*. *Eur J Biochem.* 133: 551-560. Doi: 10.1111/j.1432-1033.1983.tb07499.x
- Osterhout, R.E., Burgard, A.P. (2014). Microorganisms and Methods for Production of Specific Length Fatty Alcohols and Related Compounds. US Patent US 20140127765 A1. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Oswald, F., Dörsam, S., Veith, N., Zwick, M., Neumann, A., Ochsenreither, K., Syltatk, C. (2016). Sequential Mixed Cultures: From Syngas to Malic Acid. *Front Microbiol.* 7:891. Doi: 10.3389/fmicb.2016.00891.
- Oswald, F., Zwick, M., Omar, O., Hotz, E.N., Neumann, A. (2018). Growth and Product Formation of *Clostridium ljungdahlii* in Presence of Cyanide. *Front. Microbiol.* 9:1213. Doi: 10.3389/fmicb.2018.01213
- Papagianni, M., Matthey, M., Kristiansen, B. (1999). The influence of glucose concentration on citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* in batch and culture. *Enzyme Microb Technol.* 25: 710–717. Doi: 10.1016/S0141-0229(99)00102-7
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Adv.* 22: 189-259. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2003.09.005
- Papagianni, M., Matthey, M. (2004). Physiological aspects of free and immobilized *Aspergillus niger* cultures producing citric acid under various glucose concentrations. *Process Biochemistry* 39: 1963-1970. Doi: 10.1016/j.procbio.2003.09.027
- Papagianni, M. (2007). Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnol. Adv.* 25: 244-263. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.01.002
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I., Aggelis, G. (2002). Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. *Appl Microbiol Biotechnol.* 58: 308-312. Doi: 10.1007/s00253-001-0897-0
- Papanikolaou, S., Aggelis, G. (2002). Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single stage continuous culture. *Bioresour. Technol.* 82, 43–49. doi: 10.1016/S0960-8524(01)00149-3

- Papanikolaou, S., Komaitis, M., Aggelis, G. (2004). Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresour Technol.* 95: 287–291. Doi: 10.1016/j.biortech.2004.02.016
- Papanikolaou, S., Aggelis, G. (2011). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *Eur J Lipid Sci Technol.* 113: 1031–1051. Doi: 10.1002/ejlt.201100014
- Papanikolaou, S., Aggelis, G. (2019). Sources of microbial oils with emphasis to *Mortierella (Umbelopsis) isabellina* fungus. *World J Microbiol Biotechnol.* 35: 63. Doi: 10.1007/s11274-019-2631-z.
- Papini, M., Nookaew, I., Uhlen, M., Nielsen, J. (2012). *Scheffersomyces stipitis*: a comparative systems biology study with the Crabtree positive yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact.* 4:136. Doi: 10.1186/1475-2859-11-136.
- Pan, L.-X., Yang, D.-F., Shao, L., Li, W., Chen, G.-G., Liang, Z.-Q. (2009). Isolation of the oleaginous yeasts from the soil and studies of their lipid-producing capacities. *Food Technol Biotechnol.* 47: 215–220.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C. R., and Nigam, P. (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr Sci.* 77: 149–162. Doi:
- Pandurić, N., Šalić, A., Zelić, B. (2017). Fully integrated biotransformation of fumaric acid by permeabilized baker's yeast cells with in situ separation of L-malic acid using ultrafiltration, acidification and electrodialysis. *Biochem Eng J.* 125: 221–229. Doi: 10.1016/j.bej.2017.06.005.
- Papadaki, A., Androutsopoulos, N., Patsalou, M., Koutinas, M., Kopsahelis, N., Machado de Castro, A., Papanikolaou, S., Koutinas, A.A. (2017). Biotechnological Production of Fumaric Acid: The Effect of Morphology of *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582. *Fermentation.* 3:33. Doi: 10.3390/fermentation3030033
- Park, S., Baker, J.O., Himmel, M.E., Parilla, P.A., Johnson, D.K. (2010). Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnol Biofuels.* 3: 10. doi: 10.1186/1754-6834-3-10.
- Park, G.W., Fei, Q., Jung, K., Chang, H.N., Kim, Y.C., Kim, N.J., Choi, J.D., Kim, S., Cho, J. (2014). Volatile fatty acids derived from waste organics provide an economical carbon source for microbial lipids/biodiesel production. *Biotechnol J.* 9: 1536–1546. Doi: 10.1002/biot.201400266
- Park, Y., Han, G.S., Mileykovskaya, E., Garrett, T.A., Carman, G.M. (2015). Altered lipid synthesis by lack of yeast Pah1 phosphatidate phosphatase reduces chronological life span. *J Biol Chem.* 290: 25382– 25394. Doi: 10.1074/jbc.M115.680314
- Park, G.W., Chang, H.N., Jung, K., Seo, C., Kim, Y.C., Choi, J.H., Woo, H.C., Hwang, I.J. (2017). Production of microbial lipid by *Cryptococcus curvatus* on rice straw hydrolysates. *Process Biochem.* 56: 147–153. Doi: 10.1016/j.procbio.2017.02.020
- Pascual, F., Carman, G.M. (2013). Phosphatidate phosphatase, a key regulator of lipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1831: 514–522. Doi: 10.1016/j.bbalip.2012.08.006
- Patel, V.R., Dumancas, G.G., Subong, J.J. (2016). Castor oil: properties, uses, and optimization of processing parameters in commercial production. *Lipid Insights* 9: 1–12. Doi: 10.4137/LPI.S40233
- Paloheimo, M., Haarmann, T., Mäkinen, S., Vehmaanperä, J. (2016). Production of Industrial Enzymes in *Trichoderma reesei*. In: Schmoll, M., Dattenböck, C. (Eds.). *Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications.* Springer International Publishing, pp. 23–57. Doi: 10.1007/978-3-319-27951-0_2.

- Payne, G.A., Nierman, W.C., Wortman, J.R., Pritchard, B.L., Brown, D., Dean, R.A., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Machida, M., Yu, J. (2006). Whole genome comparison of *Aspergillus flavus* and *A. oryzae*. *Med Mycol.* 44(Supplement_1):S9-S11. Doi: 10.1080/13693780600835716.
- Peleg, Y., Stieglitz, B., Goldberg, I. (1988). Malic acid accumulation by *Aspergillus flavus*. I. Biochemical aspects of acid biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 28: 69. Doi: 10.1007/BF00250501
- Peleg, Y., Barak, A., Scrutton, M.C., Goldberg, I. (1989). Malic acid accumulation by *Aspergillus flavus*. III. ¹³C NMR and isoenzyme analyses. *Appl Microbiol Biotechnol* 30: 176. Doi: 10.1007/BF00264008
- Peng, X., Chen, H. (2008). Single cell oil production in solid-state fermentation by *Microsphaeropsis sp.* from steam-exploded wheat straw mixed with wheat bran. *Bioresour Technol.* 99: 3885–3889. Doi: 10.1016/j.biortech.2007.08.015
- Pessôa, M.G., Vespermann, K.A.C., Paulino, B.N., Barcelos, M.C.S., Pastore, G.M., Molina, G. (2019). Newly isolated microorganisms with potential application in biotechnology. *Biotech Adv.* 37: 319-339. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.01.007
- Perez, J.A., Ballesteros, I., Ballesteros, M., Saez, F., Negro, M.J., Manzanares, P. (2008). Optimizing liquid hot water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production. *Fuel* 87: 3640–3647. Doi: 10.1016/j.fuel.2008.06.009
- Petruccioli, M., Angiani, E., Federici, F. (1996). Semi-continuous fumaric acid production by *Rhizopus arrhizus* immobilized in polyurethane sponge. *Process Biochemistry* 31: 463-469. Doi: 10.1016/0032-9592(95)00089-5
- Picataggio, S., Brown, R.C., Kristof, J.R., Lee, G., Prakash, P., Underwood, S.A., Watts, K. (2009). Methylbutanol as an advanced biofuel. Patent. Veröffentlichungsnr: WO2009076480 A2
- Pielhop, T., Amgarten, J., von Rohr, P.R., Studer, M.H. (2016). Steam explosion pretreatment of softwood: the effect of the explosive decompression on enzymatic digestibility. *Biotechnol Biofuels.* 9: 152. Doi: 10.1186/s13068-016-0567-1.
- Pines, O., Even-Ram, S., Elnathan, N., Battat, E., Aharonov, O., Gibson, D., Goldberg, I. (1996). The cytosolic pathway of L-malic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of fumarase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 46: 393-399. Doi: 10.1007/BF00166235
- Pines, O., Shemesh, S., Battat, E., Goldberg, I. (1997). Overexpression of cytosolic malate dehydrogenase (MDH2) causes overproduction of specific organic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 48: 248-255. Doi: 10.1007/s002530051046
- Pöhnlein, M., Hausmann, R., Lang, S., Syltatk, C. (2015). Enzymatic synthesis and modification of surface-active glycolipids. *Eur J Lipid Sci Technol.* 117: 145–155. Doi: 10.1002/ejlt.201400418
- Posada, J.A., Patel, A.D., Roes, A., Blok, K., Faaij, A.P., Patel, M.K. (2013). Potential of bioethanol as a chemical building block for biorefineries: preliminary sustainability assessment of 12 bioethanol-based products. *Bioresour Technol.* 135: 490-9. Doi: 10.1016/j.biortech.2012.09.058
- Presecki, A.V., Vasić-Racki, D. (2005). Production of L-malic acid by permeabilized cells of commercial *Saccharomyces sp.* strains. *Biotechnol Lett.* 27: 1835–1839. Doi: 10.1007/s10529-005-3890-3.
- Presečki, A.V., Zelić, B., Vasić-Rački, Đ. (2007). Comparison of the L-malic acid production by isolated fumarase and fumarase in permeabilized baker's yeast cells. *Enzyme Microb Technol.* 41: 605–612. Doi: 10.1016/j.enzmictec.2007.05.007.

- Qian, Y., Zhong, L., Gao, J., Sun, N., Wang, Y., Sun, G., Qu, Y., Zhong, Y. (2017). Production of highly efficient cellulase mixtures by genetically exploiting the potentials of *Trichoderma reesei* endogenous cellulases for hydrolysis of corncob residues. *Microb Cell Fact.* 16:207. Doi: 10.1186/s12934-017-0825-3.
- Qian, X., Gorte, O., Chen, L., Zhang, W., Dong, W., Ma, J., Xin, F., Jiang, M., Ochsenreither, K. (2019a). Continuous self-provided fermentation for microbial lipids production from acetate by using oleaginous yeasts *Cryptococcus podzolicus* and *Trichosporon porosum*. *Renew Energ.* 146: 737-743. Doi: 10.1016/j.renene.2019.07.013
- Qian, X., Gorte, O., Chen, L., Zhang, W., Dong, W., Ma, J., Jiang, M., Xin, F., Ochsenreither, K. (2019b). Co-production of single cell oil and gluconic acid by using oleaginous *Cryptococcus podzolicus* DSM 27192. *Biotech Biofuel.* 12:127. Doi: 10.1186/s13068-019-1469-9.
- Qiao, K., Wasylenko, T.M., Zhou, K., Xu, P., Stephanopoulos, G. (2017). Lipid production in *Yarrowia lipolytica* is maximized by engineering cytosolic redox metabolism. *Nat Biotech.* 35: 173-177. Doi: 10.1038/nbt.3763
- Qin, J., Zou, X., Lv, S., Jin, Q., Wang, X. (2016). Influence of ionic liquids on lipase activity and stability in alcoholysis reactions. *RSC Adv.* 6: 87703–87709. Doi:10.1039/C6RA19181A.
- Qin, L., Li, W.C., Zhu, J.Q., Li, B.Z., Yuan, Y.J. (2017). Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass to Sugars. In: Fang, Z., Smith, Jr. R., Qi, X. (eds.) *Production of Platform Chemicals from Sustainable Resources. Biofuels and Biorefineries.* Springer, Singapore. Doi: 10.1007/978-981-10-4172-3_1
- Qin, L., Liu, L., Zeng, A.P., Wie, D. (2017b). From low-cost substrates to Single Cell Oils synthesized by oleaginous yeasts. *Bioresour Technol.* 245: 1507-1519. Doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.163.
- Quispe, C.A.G., Coronado, C.J.R., Carvalho Jr., J.A. (2013). Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. *Renew Sust Energ Rev.* 27: 475–493. Doi: 10.1016/j.rser.2013.06.017
- Radošević, K., Ćurko, N., Gaurina Srček, V., Cvjetko Bubalo, M., Tomašević, M., Kovačević Ganić, K., Radojčić Redovniković, I. (2016). Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. *LWT* 73: 45–51. Doi: 10.1016/j.lwt.2016.05.037.
- Raffelt, K., Henrich, E., Koegel, A., Stahl, R., Steinhardt, J., Weirich, F. (2006). The BTL2 process of biomass utilization entrained-flow gasification of pyrolyzed biomass slurries. *Appl Biochem Biotechnol* 129:153–164. Doi: 10.1007/978-1-59745-268-7_11
- Rakesh, S., Dhar, D.W., Prasanna, R., Saxena, A.K., Saha, S., Shukla, M., Sharma, K. (2015). Cell disruption methods for improving lipid extraction efficiency in unicellular microalgae. *Eng Life Sci.* 15: 443–447. Doi: 10.1002/elsc.201400222
- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P.F., Marita, J.M., Hatfield, R.D., Ralph, S.A., Christensen, J.H., Boerjan, W. (2004). Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochem Rev.* 3: 29–60. Doi: 10.1023/B:PHYT.0000047809.65444.a4
- Ramluckan, K., Moodley, K.G., Bux, F. (2014). An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method. *Fuel* 116: 103–108. Doi: 10.1016/j.fuel.2013.07.118
- Rass-Hansen, J., Falsig, H., Jørgensen, B., Christensen, C.H. (2007). Bioethanol: fuel or feedstock? *J. Chem Technol Biotechnol.* 82: 329–333. Doi: 10.1002/jctb.1665

- Ratledge, C. (2002). Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochem Soc Trans.* 30: 1047–1050. Doi: 10.1042/bst0301047
- Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie* 86, 807–815. doi: 10.1016/j.biochi.2004.09.017
- Ratledge, C., Cohen, Z. (2008). Microbial and algal oils: do they have a future for biodiesel or as commodity oils? *Lipid Technol.* 20: 155–160. Doi: 10.1002/lite.200800044
- Ratray, J.B.M., Schibeci, A., Kidby, D. (1975). Lipids of Yeasts. *Bacteriol Rev.* 39: 197–231.
- Reis, C.E.R., Rajendran, A., Hu, B. (2017). New technologies in value addition to the thin stillage from corn-to-ethanol process. *Rev Environ Sci Biotechnol* 16: 175. Doi: 10.1007/s11157-017-9421-6.
- Rhodes, R.A., Lagoda, A.A., Jackson, R.W., Misenhei, T.J., Smith, M.L., Anderson R.F. (1962). Production of fumaric acid in 20 liter fermenters. *Appl Microbiol.* 10: 9-15.
- Ricardo, C., José, C., Neto, D., Thomaz, V., Bittencourt, E., Scopel, E., Bianchi, A., Medeiros, P., Porto, L., Vandenberghe, D.S. (2017). Pilot scale biodiesel production from microbial oil of *Rhodospiridium toruloides* DEBB 5533 using sugarcane juice : performance in diesel engine and preliminary economic study. *Bioresour Technol.* 223: 259–268. Doi: 10.1016/j.biortech.2016.10.055
- Roa Engel, C.A., Straathof, A.J., Zijlmans, T.W., van Gulik, W.M., van der Wielen, L.A. (2008). Fumaric acid production by fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 78: 379-89. Doi: 10.1007/s00253-007-1341-x.
- Roa Engel, C.A. (2010). Integration of fermentation and cooling crystallisation to produce organic acid. Dissertation, TU Delft. <http://resolver.tudelft.nl/uuid:0518e010-08f9-40c0-a731-e7edfe379c2d>
- Roa Engel, C.A., van Gulik, W.M., Marang, L., van der Wielen, L.A., Straathof, A.J. (2011). Development of a low pH fermentation strategy for fumaric acid production by *Rhizopus oryzae*. *Enzyme Microb Technol.* 2011 Jan 5;48(1):39-47. doi: 10.1016/j.enzmictec.2010.09.001.
- Rodrigues Reis, C.E., Bento, H.B.S., Carvalho, A.K.F., Rajendran, A., Hu, B., De Castro, H.F. (2019). Critical applications of *Mucor circinelloides* within a biorefinery context. *Crit Rev Biotechnol.* 31: 1-16. Doi: 10.1080/07388551.2019.1592104.
- Röttig, A., Atasayar, E., Meier-Kolthoff, J.P., Spröer, C., Schumann, P., Schauer, J., Steinbüchel, A. (2017). *Streptomyces jeddahensis* sp. nov., an oleaginous bacterium isolated from desert soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 67: 1676-1682. Doi: 10.1099/ijsem.0.001839.
- Rominger, L. (2017). Untersuchung des Einflusses von pH-Regulation und CO₂-Zugabe auf die Produktion von L-Äpfelsäure mit *Aspergillus oryzae*. Bachelorarbeit, KIT.
- Rosgaard, L., Pedersen, S., Langston, J., Akerhielm, D., Cherry, J.R., Meyer, A.S. (2007). Evaluation of minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently pretreated barley straw substrates. *Biotechnol Prog.* 23: 1270–1276. Doi: 10.1021/bp070329p.
- Routray, W., Orsat, V. (2012). Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food Bioproc Tech.* 5: 409–424. Doi: 10.1007/s11947-011-0573-z
- Roux, M.P., Kock, J.L., Botha, A., du Preez, J.C., Wells, G.V., Botes, P.J. (1994). *Mucor*-a source of cocoa butter and gamma-linolenic acid. *World J Microbiol Biotechnol.* 10: 417-422. Doi: 10.1007/BF00144464.

- Ruan, Z., Zanotti, M., Wang, X., Ducey, C., Liu, Y. (2012). Evaluation of lipid accumulation from lignocellulosic sugars by *Mortierella isabellina* for biodiesel production. *Bioresour Technol.* 110: 198–205. Doi: 10.1016/j.biortech.2012.01.053
- Ruan, Z., Zanotti, M., Zhong, Y., Liao, W., Ducey, C., Liu, Y. (2013). Co-hydrolysis of lignocellulosic biomass for microbial lipid accumulation. *Biotechnol Bioeng.* 110: 1039–1049. Doi: /10.1002/bit.24773
- Ruan, Z., Zanotti, M., Archer, S., Liao, W., Liu, Y. (2014). Oleaginous fungal lipid fermentation on combined acid- and alkali-pretreated corn stover hydrolysate for advanced biofuel production. *Bioresour Technol.* 163: 12–17. Doi: 10.1016/j.biortech.2014.03.095
- Ruan, Z.H., Hollinshead, W., Isaguirre, C., Tang, Y.J., Liao, W., Liu, Y. (2015). Effects of inhibitory compounds in lignocellulosic hydrolysates on *Mortierella isabellina* growth and carbon utilization. *Bioresour Technol.* 183: 18–24. Doi: 10.1016/j.biortech.2015.02.026.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, A.T. (2009). Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microb Biotechnol.* 2: 164-177. Doi: 10.1111/j.1751-7915.2008.00078.x.
- Rupilius, W., Ahmad, S. (2006). The changing world of oleochemicals. *Palm Oil Dev.* 44: 15–28.
- Ryckebosch, E., Muylaert, K., Foubert, I. (2012). Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. *J Am Oil Chem Soc.* 89: 189–198. Doi: 10.1007/s11746-011-1903-z
- S2Biom (2016). Vision for 1 Billion Dry Tonnes Lignocellulosic Biomass as a Contribution to Biobased Economy by 2030 in Europe. http://s2biom.alterra.wur.nl/doc/D8.2_S2Biom_Vision_for_1_billion_tonnes_biomass_2030.pdf
- Šabeder, S., Habulin, M., Knez, Ž. (2006). Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters. *J Food Eng.* 77: 880–886. Doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.08.016
- Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T.T., Bourtoom, T. (2011). Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochem.* 46: 210-218. Doi: 10.1016/j.procbio.2010.08.009
- Sahena, F., Zaidul, I. S. M., Jinap, S., Karim, A. A., Abbas, K. A., Norulaini, N. A. N., Omar, A.K.M. (2009). Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review. *J Food Eng* 95: 240–253. Doi: 10.1016/j.jfoodeng.2009.06.026
- Sakuradani, E., Ando, A., Ogawa, J., Shimizu, S. (2009). Improved production of various polyunsaturated fatty acids through filamentous fungus *Mortierella alpina* breeding. *Appl Microbiol Biotechnol.* 84: 1–10. Doi: 10.1007/s00253-009-2076-7
- Sakurai, J., Sugimoto, T., (2005). Detergent for metallic product. US-Patent US 2005/0054552 A1.
- Salek, S.S., van Turnhout, A.G., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M.C. (2015). pH control in biological systems using calcium carbonate. *Biotechnol Bioeng.* 112: 905-913. Doi: 10.1002/bit.25506.
- Samul, D., Leja, K., Grajek, W. (2014). Impurities of crude glycerol and their effect on metabolite production. *Ann Microbiol.* 64: 891-898. Doi: 10.1007/s13213-013-0767-x.
- Sankh, S., Thiru, M., Saran, S., Rangaswamy, V. (2013). Biodiesel production from a newly isolated *Pichia kudriavzevii* strain. *Fuel* 106: 690–696. Doi: 10.1016/j.fuel.2012.12.014

- Sarris, D., Galiotou-Panayotou, M., Koutinas, A.A., Komaitis, M., Papanikolaou, S. (2011). Citric acid, biomass and cellular lipid production by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on olive mill wastewater-based media. *J Chem Technol Biotechnol.* 86: 1439–1448. Doi: 10.1002/jctb.2658
- Sarris, D., Stoforos, N.G., Mallouchos, A., Kookos, I.K., Koutinas, A.A., Aggelis, G., Papanikolaou, S. (2017). Production of added-value metabolites by *Yarrowia lipolytica* growing in olive mill wastewater-based media under aseptic and non-aseptic conditions. *Eng Life Sci* 17: 695–709. Doi: 10.1002/elsc.201600225
- Sattler, J.H., Fuchs, M., Tauber, K., Mutti, F.G., Faber, K., Pfeffer, J., Haas T., Kroutil, W. (2012). Redox Self-Sufficient Biocatalyst Network for the Amination of Primary Alcohols. *Angew. Chem. Int. Ed.* 51: 9156–9159. Doi: 10.1002/anie.201204683
- Sauer, M., Porro, D., Mattanovich, D., Branduardi, P. (2008). Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends Biotechnol.* 26: 100-188. Doi: 10.1016/j.tibtech.2007.11.006.
- Scheller, H.V., Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol.* 61:263-89. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112315.
- Schirmer, A., Rude, M., Brubaker, S. (2012). Method for Producing a Fatty Alcohol or Fatty Aldehyde. US Patent US 8,268,599 B2. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Schuchmann, K., Müller, V. (2014). Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 12: 809–821. Doi: doi: 10.1038/nrmicro3365
- Schütte, H., Kroner, K. H., Hustedt, H., Kula, M.-R. (1983). Experiences with a 20 litre industrial bead mill for the disruption of microorganisms. *Enzyme Microb Technol.* 5: 143–148. Doi: 10.1016/0141-0229(83)90050-9
- Schultz, T.P., Biermann, C.J., McGinnis, G.D. (1983). Steam explosion of mixed hardwood chips as a biomass pretreatment. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 22: 344–348. Doi: 10.1021/i300010a034
- Schulze, I., Hansen, S., Großhans, S., Rudsuck, T., Ochsenreither, K., Syldatk, C., Neumann, A. (2014). Characterization of newly isolated oleaginous yeasts - *Cryptococcus podzolicus*, *Trichosporon porosum* and *Pichia segobiensis*. *AMB Express.* 4:24. Doi: 10.1186/s13568-014-0024-0.
- Schwartz, H., Radler, F. (1988). Formation of L(-)malate by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 27: 553-560. Doi: 10.1007/BF00451631
- Schwartz, C.M., Hussain, M.S., Blenner, M., Wheeldon, I. (2015). Synthetic RNA polymerase III promoters facilitate high efficiency CRISPR-Cas9 mediated genome editing in *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synth Biol.* 5: 356–359. Doi: 10.1021/acssynbio.5b00162
- Schwartz, C., Shabbir-Hussain, M., Frogue, K., Blenner, M., Wheeldon, I. (2017). Standardized markerless gene integration for pathway engineering in *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synth Biol.* 6: 402–409. Doi: 10.1021/acssynbio.6b00285
- Schwartz, T.J., Shanks, B.H., Dumesic, J.A. (2016). Coupling chemical and biological catalysis: a flexible paradigm for producing biobased chemicals. *Curr Opin Biotechnol.* 38: 54-62. Doi: 10.1016/j.copbio.2015.12.017
- Seip, J., Jackson, R., He, H., Zhu, Q., Hong, S.P. (2013). Snf1 is a regulator of lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol.* 79: 7360-7370. Doi: 10.1128/AEM.02079-13.

- Senanayake, S. P. J. N., Fichtali, J. (2006). "Single-cell oils as sources of nutraceutical and specialty lipids: processing technologies and applications," in *Nutraceutical and Specialty Lipids and their Co-Products*, ed F. Shahidi (Boca Raton, FL: CRC Press), 251–280.
- Seppälä, S., Wilken, S.E., Knop, D., Solomon, K.V., O'Malley, M.A. (2017). The importance of sourcing enzymes from non-conventional fungi for metabolic engineering and biomass breakdown. *Metab Eng.* 44: 45-59. Doi: 10.1016/j.ymben.2017.09.008.
- Shahbazi, A., Zhang, B. (2010). 5 - Dilute and concentrated acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. In: Waldron, K. (ed.) *Bioalcohol Production. Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass.* Woodhead Publishing Series in Energy, pp. 143-158. Doi: 10.1533/9781845699611.2.143
- Sharma, S., Kumar, R., Gaur, R., Agrawal, R., Gupta, R.P., Tuli, D.K., Das, B. (2005). Pilot scale study on steam explosion and mass balance for higher sugar recovery from rice straw. *Bioresour Technol.* 175: 350-357. Doi: 10.1016/j.biortech.2014.10.112.
- Sheldon, R.A. (2014). Green and sustainable manufacture of chemicals from biomass: state of the art. *Green Chem.* 16: 950-963. Doi: 10.1039/c3gc41935e
- Sheng, J., Vannela, R., Rittmann, B.E. (2011a). Evaluation of cell-disruption effects of pulsed-electric-field treatment of *Synechocystis* PCC 6803. *Environ Sci Technol.* 45: 3795–3802. Doi: 10.1021/es103339x
- Sheng, J., Vannela, R., Rittmann, B.E. (2011b). Evaluation of methods to extract and quantify lipids from *Synechocystis* PCC 6803. *Bioresour Technol.* 102: 1697–1703. Doi: 10.1016/j.biortech.2010.08.007
- Shin, D.W., Mai, N.L., Bae, S.-W., Koo, Y.-M. (2019). Enhanced lipase-catalyzed synthesis of sugar fatty acid esters using supersaturated sugar solution in ionic liquids. *Enzyme Microb Technol.* 126: 18–23. Doi:10.1016/j.enzmictec.2019.03.004.
- Siebenhaller, S., Muhle-Goll, C., Luy, B., Kirschhöfer, F., Brenner-Weiss, G., Hiller, E., Günther, M., Rupp, S., Zibek, S., Syldatk, C. (2016). Sustainable enzymatic synthesis of glycolipids in a deep eutectic solvent system. *J Mol Catal B Enzym.* 133: S281–S287. Doi: 10.1016/j.molcatb.2017.01.015
- Siebenhaller, S., Hajek, T., Muhle-Goll, C., Himmelsbach, M., Luy, B., Kirschhöfer, F., Brenner-Weiß, G., Hahn, T., Zibek, S., Syldatk, C. (2017). Beechwood carbohydrates for enzymatic synthesis of sustainable glycolipids. *Bioresour Bioprocess.* 4:25. Doi: 10.1186/s40643-017-0155-7
- Siebenhaller, S., Kirchoff, J., Kirschhöfer, F., Brenner-Weiß, G., Muhle-Goll, C., Luy, B., Haitz, F., Hahn, T., Zibek, S., Syldatk, C., Ochsenreither, K. (2018). Integrated Process for the Enzymatic Production of Fatty Acid Sugar Esters Completely Based on Lignocellulosic Substrates. *Front Chem.* 6:421. Doi: 10.3389/fchem.2018.00421.
- Shahruzzaman, M., Islam, M.S., Haque, M.M., Hossain, M.S., Bakr, M.A. (2015). Malic Acid Butane-1, 4-Diol-Glycerol Co-Polyester as an Enteric Coating Material. *IJSER* 6: 1460–1463. Doi: 10.14299/ijser.2015.03.007.
- Shimada, K., Matsushima, K. (1969). A Protease Inhibitor from *Penicillium cyclopium*. Part I. Purification and Partial Characterization. Part II. Some Properties of the Inhibitor. *Agric Biol Chem.* 544-553. Doi: 10.1080/00021369.1969.10859348.
- Shimada, K., Matsushima, K., Fukumoto, J., Yamamoto, T. (1969). Poly-(L)-malic acid; a new protease inhibitor from *Penicillium cyclopium*. *Biochem Biophys Res Commun.* 35: 619-624. Doi: 10.1016/0006-291x(69)90449-5.

- Signori, L., Ami, D., Posteri, R., Giuzzi, A., Mereghetti, P., Porro, D., Branduardi, P. (2016). Assessing an effective feeding strategy to optimize crude glycerol utilization as sustainable carbon source for lipid accumulation in oleaginous yeasts. *Microb Cell Fact.* 15: 75. Doi: 10.1186/s12934-016-0467-x.
- Sillanpää, M., Ncibi, C. (2017). Legacy of Petroleum-Based Economy. In: *A Sustainable Bioeconomy - The Green Industrial Revolution*. Springer International Publishing. Doi: 10.1007/978-3-319-55637-6.
- Silve, A., Papachristou, I., Wustner, R., Strassner, R., Schirmer, M., Leber, K., Guo, B., Interrante, L., Posten, C., Frey, W. (2018). Extraction of lipids from wet microalga *Auxenochlorella protothecoides* using pulsed electric field treatment and ethanol-hexane blends. *Algal Res.* 29: 212-222. Doi: 10.1016/j.algal.2017.11.016
- Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A. (2016). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. *Bioresour Technol.* 199: 76-82. Doi: 10.1016/j.biortech.2015.08.030
- Singh, D., Chen, S. (2008). The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 81: 399–417. Doi: 10.1007/s00253-008-1706-9
- Sitepu, I.R., Ignatia, L., Franz, A.K., Wong, D.M., Faulina, S.A., Tsui, M., Kanti, A., Boundy-Mills, K. (2012). An improved high-throughput Nile red fluorescence assay for estimating intracellular lipids in a variety of yeast species. *J Microbiol Methods.* 91: 321-328. Doi: 10.1016/j.mimet.2012.09.001
- Sitepu, I.R., Sestric, R., Ignatia, L., Levin, D., German, J.B., Gillies, L.A., Almada, L.A., Boundy-Mills, K.L. (2013). Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. *Bioresour Technol.* 144: 360-369. Doi: 10.1016/j.biortech.2013.06.047
- Sitepu, I.R., Garay, L.A., Sestric, R., Levin, D., Block, D.E., German, J.B., Boundy-Mills, K.L. (2014). Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnol Adv.* 32: 1336-1360. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.08.003.
- Sobus, M.T., Homlund, C.E. (1976). Extraction of lipids from yeast. *Lipids* 11: 341–348. Doi: 10.1007/BF02544064
- Solomon, K.V., Haitjema, C.H., Henske, J.K., Gilmore, S.P., Borges-Rivera, D., Lipzen, A., Brewer, H.M., Purvine, S.O., Wright, A.T., Theodorou, M.K., Grigoriev, I.V., Regev, A., Thompson, D.A., O'Malley, M.A. (2016). Early-branching gut fungi possess a large, comprehensive array of biomass-degrading enzymes. *Science* 351: 1192–1195. Doi: 10.1126/science.aad1431.
- Somasundaram, S., Eom, G.T., Hong, S.H. (2018). Efficient Malic Acid Production in *Escherichia coli* Using a Synthetic Scaffold Protein Complex. *Appl Biochem Biotechnol.* 184:1308-1318. Doi: 10.1007/s12010-017-2629-7.
- Soxhlet, F. (1879). Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes: von Dr. F. Soxhlet. *Dinglers Polytechnisches J.* 232: 461–465.
- Spagnuolo, M., Yaguchi, A., Blenner, M. (2019). Oleaginous yeast for biofuel and oleochemical production. *Curr Opin Biotechnol.* 57: 73-81. Doi: 10.1016/j.copbio.2019.02.011.
- Spiden, E.M., Scales, P.J., Kentish, S.E., Martin, G.J.O. (2013). Critical analysis of quantitative indicators of cell disruption applied to *Saccharomyces cerevisiae* processed with an industrial high pressure homogenizer. *Biochem Eng J.* 70: 120–126. Doi: 10.1016/j.bej.2012.10.008
- Stallcup, O.T. (1979). Use of malic acid as ruminant feed additive. US-Patent US 4,161,539

- Steen, E. J., Kang, Y., Bokinsky, G., Hu, Z., Schirmer, A., McClure, A., del Cardayre, S.B., Keasling, J.D. (2010). Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass. *Nature* 463: 559–562. Doi: 10.1038/nature08721
- Stojkovič, G., Žnidaršič-Plazl, P. (2012): Continuous synthesis of L-malic acid using whole-cell microreactor. *Process Biochem.* 47: 1102–1107. Doi: 10.1016/j.procbio.2012.03.023.
- Stoll, I.K., Boukis, N., Neumann, A., Ochsenreither, K., Zevaco, T.A., Sauer, J. (2019). The Complex Way to Sustainability: Petroleum-Based Processes versus Biosynthetic Pathways in the Formation of C₄ Chemicals from Syngas. *Ind Eng Chem Res.* doi: 10.1021/acs.iecr.9b01123
- Stolp, K.D. (1996) Maisstärke. In: Heiss, R. (eds) *Lebensmitteltechnologie*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp 131-138. Doi: 10.1007/978-3-642-97655-1_16
- Stookey, G.K. (2000). Prevention of dental calculus formation with polycarboxylic acids. US-Patent US 6,080,419.
- Straathof, A.J.J. (2011). The proportion of downstream costs in fermentative production processes. In: Moo-Young, M. (eds.) *Comprehensive biotechnology*. 2nd ed. Elsevier; 2011. pp. 811–814. Doi: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00492-X.
- Stressler, T., Eisele, T., Rost, J., Haunschild, E. M., Kuhn, A., and Fischer, L. (2013). Production of polyunsaturated fatty acids by *Mortierella alpina* using submerge and solid state fermentation. *Chem Ingenieur Tech.* 85: 318–322. Doi: 10.1002/cite.201200094
- Subhash, V.G., Mohan, V.S. (2011). Biodiesel production from isolated oleaginous fungi *Aspergillus sp.* using corncob waste liquor as a substrate. *Bioresour Technol.* 102: 9286-9290. Doi: 10.1016/j.biortech.2011.06.084.
- Sumikawa, S., Sakaguchi, S., Okiura, T. (1976). Process for the preparation of malic acid crystals. US Patent, Veröffentlichungsnr. US4035419A.
- Sun, M.-L., Madzak, C., Liu, H.-H., Song, P., Ren, L.-J., Huang, H., Ji, X.-J. (2017). Engineering *Yarrowia lipolytica* for efficient γ -linolenic acid production. *Biochem Eng J.* 117: 172–180. Doi: 10.1016/j.bej.2016.10.014
- Sun, X., Wu, H., Zhao, G., Li, Z., Wu, X., Liu, H., Zheng, Z. (2018). Morphological regulation of *Aspergillus niger* to improve citric acid production by *chsC* gene silencing. *Bioprocess Biosyst Eng.* 41: 1029-1038. Doi: 10.1007/s00449-018-1932-1.
- Suslick, K.S. (1989). The chemical effects of ultrasound. *Sci Am.* 260: 80–86. Doi: 10.1038/scientificamerican0289-80
- Szczęsna-Antczak, M., Struszczyk-Świta, K., Rzyska, M., Szelağ, J., Stańczyk, Ł., Antczak, T. (2018). Oil accumulation and *in situ* trans/esterification by lipolytic fungal biomass. *Bioresour Technol.* 265: 110-118. Doi: 10.1016/j.biortech.2018.05.094.
- Tai, M., Stephanopoulos, G. (2013). Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metab Eng.* 15: 1-9. Doi: 10.1016/j.ymben.2012.08.007.
- Tang, X., Chen, H., Chen, Y. Q., Chen, W., Garre, V., Song, Y., Ratledge, C. (2015). Comparison of biochemical activities between high and low lipid-producing strains of *Mucor circinelloides*: an explanation for the high oleaginity of strain WJ11. *PLoS ONE* 10:e0128396. Doi: 10.1371/journal.pone.0128396

- Terasawa, M., Nara, T., Yukawa, H., Yamagata, H., Satoo, Y. (1990). Method of preparing L-malic acid. US-Patent US 4,912,043.
- Terrett, O.M., Dupree, P. (2018). Covalent interactions between lignin and hemicelluloses in plant secondary cell walls. *Curr Opin Biotechnol.* 56: 97-104. Doi: 10.1016/j.copbio.2018.10.010.
- Thiru, M., Sankh, S., Rangaswamy, V. (2011). Process for biodiesel production from *Cryptococcus curvatus*. *Bioresour Technol.* 102: 10436–10440. Doi: 10.1016/j.biortech.2011.08.102
- Thompson, L.H., Doraiswamy, L.K. (1999). Sonochemistry: science and engineering. *Ind Eng Chem Res.* 38: 1215–1249. Doi: 10.1021/ie9804172
- Tommasi, E., Cravotto, G., Galletti, P., Grillo, G., Mazzotti, M., Sacchetti, G., Samori, C., Tabasso, S., Tacchini, M., Tagliavini, E. (2017). Enhanced and Selective Lipid Extraction from the Microalga *P. tricornutum* by Dimethyl Carbonate and Supercritical CO₂ Using Deep Eutectic Solvents and Microwaves as Pretreatment. *ACS Sustain Chem Eng.* 5: 8316–8322. Doi: 10.1021/acssuschemeng.7b0207
- Trichez, D., Auriol, C., Baylac, A., Irague, R., Dressaire, C., Carnicer-Heras, M., Heux, S., François, J.M., Walther, T. (2018). Engineering of *Escherichia coli* for Krebs cycle-dependent production of malic acid. *Microb Cell Fact.* 17:113. Doi: 10.1186/s12934-018-0959-y.
- Tsakona, S., Kopsahelis, N., Chatzifragkou, A., Papanikolaou, S., Kookos, I.K., Koutinas, A.A. (2014). Formulation of fermentation media from flourrich waste streams for microbial lipid production by *Lipomyces starkeyi*. *J Biotechnol.* 189: 36–45. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.08.011
- Tsolcha, O.N., Tekerlekopoulou, A.G., Akrotos, C.S., Bellou, S., Aggelis, G., Katsiapi, M., Moustakagouni, M., Vayenas, D.V. (2015). Treatment of second cheese whey effluents using a Choricystis-based system with simultaneous lipid production. *J Chem Technol Biotechnol.* 91: 2349–2359. Doi: doi.org/10.1002/jctb.4829
- Tu, G., Wang, Y., Ji, Y., Zou, X. (2015). The effect of Tween 80 on the polymalic acid and pullulan production by *Aureobasidium pullulans* CCTCC M2012223. *World J Microbiol Biotechnol.* 31: 219-226. Doi: 10.1007/s11274-014-1779-9.
- Tuck, C.O., Perez, E., Horvath, I.T., Sheldon, R.A., Poliakoff, M. (2012). Valorization of Biomass: Deriving More Value from Waste. *Science*, 337, 695–699. doi:10.1126/science.1218930
- Turcotte, G., Kosaric, N. (1989). Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. In: *Bioprocesses and Engineering. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol 40. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 74–92. Doi: 10.1007/BFb0009828
- Uematsu, Y., Hirata, K., Suzuki, K., Iida, K., Kamata, K. (2002). Survey of residual solvents in natural food additives by standard addition head-space GC. *Food Addit Contam.* 19: 335–342. Doi: 10.1080/02652030110088301
- U.S. Energy Information and Administration (2019). Short Term Energy Outlook, März 2019. https://www.eia.gov/outlooks/steo/pdf/steo_full.pdf (heruntergeladen am 05.04.2019)
- Uslu, H., Kırbaşlar, S.I. (2009). Purification of L-Malic Acid from Aqueous Solution by a Method of Reactive Extraction. *J Chem Eng Data.* 54: 2819-2826. Doi: 10.1021/je800750q
- Vamvakaki, A.N., Kandarakis, I., Kaminarides, S., Komaitis, M., Papanikolaou, S. (2010). Cheese whey as a renewable substrate for microbial lipid and biomass production by Zygomycetes. *Eng Life Sci.* 10: 348–360. Doi: 10.1002/elsc.201000063

- Vancov, T., McIntosh, S. (2011). Alkali Pretreatment of Cereal Crop Residues for Second-Generation Biofuels. *Energy & Fuels*. 25: 2754-2763. Doi: 10.1021/ef200241s
- Vandenbossche, V., Doumeng, C., Rigal, L. (2014). Thermomechanical and thermo-mechano-chemical pretreatment of wheat straw using a twin-screw extruder. *Bioresources* 9: 1519–1538
- van der Straat, L., de Graaff, L.H. (2014). Pathway transfer in fungi. *Bioengineered* 5: 335–339. Doi: 10.4161/bioe.29936.
- van der Straat, L., Vernooij, M., Lammers, M., van den Berg, W., Schonewille, T., Cordewener, J., van der Meer, I., Koops, A., de Graaff, L.H. (2014). Expression of the *Aspergillus terreus* itaconic acid biosynthesis cluster in *Aspergillus niger*. *Microb Cell Factories* 13:11. Doi: 10.1186/1475-2859-13-11.
- van der Werf, M.J., van den Tweel, W.J., Hartmans, S. (1993). Purification and Characterization of Maleate Hydratase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Appl Environ Microbiol*. 59: 2823-2829.
- van Gaver, D., Huyghebaert, A. (1991). Optimization of yeast cell disruption with a newly designed bead mill. *Enzyme Microb Technol*. 13: 665–671. Doi: 10.1016/0141-0229(91)90082-L
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W. (2010). Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol*. 153: 895-905. Doi: 10.1104/pp.110.155119.
- Vasconcelos, B., Teixeira, J.C., Dragone, G., Teixeira, J.A. (2019). Oleaginous yeasts for sustainable lipid production-from biodiesel to surf boards, a wide range of "green" applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 103: 3651-3667. Doi: 10.1007/s00253-019-09742-x.
- Vega, J.L., Klasson, K.T., Kimmel, D.E., Clausen, E.C., Gaddy, J.L. (1990). Sulfur gas tolerance and toxicity of CO-utilizing and methanogenic bacteria. *Appl Biochem Biotechnol*. 24–25: 329–340. Doi: 10.1007/BF02920257
- Venderbosch, R., Prins, W. (2010). Fast pyrolysis technology development. *Biofuels Bioprod Bioref*. 4:178-208. Doi: 10.1002/bbb.205
- Venderbosch, R.H. (2015). A critical view on catalytic pyrolysis of biomass. *ChemSusChem*. 8: 1306–1316. Doi: 10.1002/cssc.201500115
- Vert, M. (1998). Chemical routes to poly(β -malic acid) and potential applications of this water-soluble bioresorbable poly(β -hydroxy alkanooate). *Polym Degrad Stab*. 59: 169–175.
- Vrabl, P., Fuchs, V., Pichler, B., Schinagl, C.W., Burgstaller, W. (2012). Organic Acid Excretion in *Penicillium ochrochloron* Increases with Ambient pH. *Front Microbiol*. 3:121. Doi: 10.3389/fmicb.2012.00121.
- Wagemann, K., Tippkötter, N. (2019). Biorefineries: A Short Introduction. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 166: 1–12. Doi: 10.1007/10_2017_4
- Wagner, J.M., Alper, H.S. (2016). Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: Current tools and future advances. *Fungal Genet Biol*. 89: 126-136. Doi: 10.1016/j.fgb.2015.12.001.
- Wahlen, B.D., Willis, R.M., Seefeldt, L.C. (2011). Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. *Bioresour Technol*. 102: 2724–2730. Doi: 10.1016/j.biortech.2010.11.026
- Waldron, K. (2009). Handbook of waste management and co-product recovery in food processing. Boca Raton, Fla., Oxford, Oxford: CRC; Woodhead.

- Wan, C., Zhou, Y., Li, Y. (2011). Liquid hot water and alkaline pretreatment of soybean straw for improving cellulose digestibility. *Bioresour Technol.* 102: 6254-6259. Doi: 10.1016/j.biortech.2011.02.075.
- Wang, M., Yuan, W. (2015). Microalgal cell disruption in a high-power ultrasonic flow system. *Bioresour Technol.* 193: 171–177. Doi: 10.1016/j.biortech.2015.06.040
- Wang, X., Gong, C.S., Tsao, G.T. (1998). Production of L-malic acid via biocatalysis employing wild-type and respiratory-deficient yeasts. *ABAB* 70-72: 845–852. Doi: 10.1007/BF02920194.
- Wang, L., Neoh, K.G., Kang, E.T., Shuter, B., Wang, S.C. (2010). Biodegradable magnetic-fluorescent magnetite/poly(dl-lactic acid-co-alpha,beta-malic acid) composite nanoparticles for stem cell labeling. *Biomaterials.* 31: 3502-3511. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.081
- Wang, D., Hakim, S.H., Martin Alonso, D., Dumesic, J.A. (2013). A highly selective route to linear alpha olefins from biomass-derived lactones and unsaturated acids. *Chem Commun.* 49: 7040-7042. Doi: 10.1039/C3CC43587C
- Wang, H., Tucker, M., Ji, Y. (2013). Recent Development in Chemical Depolymerization of Lignin: A Review. *Journal of Applied Chemistry*, Article ID 838645. Doi: 10.1155/2013/838645
- Wang, Z.P., Xu, H.M., Wang, G.Y., Chi, Z., Chi, Z.M. (2013a). Disruption of the MIG1 gene enhances lipid biosynthesis in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* ACA-DC 50109. *Biochim Biophys Acta.* 1831:675-682. Doi: 10.1016/j.bbaliip.2012.12.010.
- Wang, Z.P., Wang, G.Y., Khan, I., Chi, Z.M. (2013b). High-level production of calcium malate from glucose by *Penicillium sclerotiorum* K302. *Bioresour Technol.* 143: 674-677. Doi: 10.1016/j.biortech.2013.06.051.
- Wang, C.L., Li, Y., Xin, F.H., Xin, F.-H., Liu, Y.-Y., Chi, Z.-M. (2014). Evaluation of Single cell oil production by *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* P10 isolated from mangrove systems for biodiesel making. *Proc Biochem.* 49: 725–731. Doi: 10.1016/j.procbio.2014.02.017
- Wang, Y.K., Chi, Z., Zhou, H.X., Liu, G.L., Chi, Z.M. (2015). Enhanced production of Ca²⁺-polymalate (PMA) with high molecular mass by *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans* MCW. *Microb Cell Fact.* 14:115. Doi: 10.1186/s12934-015-0296-3.
- Wang, W., Zhuang, X., Yuan, Z., Qi, W., Yu, Q., Wang, Q. (2016). Structural Changes of Lignin after Liquid Hot Water Pretreatment and Its Effect on the Enzymatic Hydrolysis. *BioMed research international*, 2016: 8568604. Doi:10.1155/2016/8568604
- Wang, Y., Song, X., Zhang, Y., Wang, B., Zou, X. (2016). Effects of nitrogen availability on polymalic acid biosynthesis in the yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans*. *Microb Cell Fact.* 15:146. Doi: 10.1186/s12934-016-0547-y.
- Wang, G., Bai, T., Miao, Z., Ning, W., Liang, W. (2018). Simultaneous production of single cell oil and fumaric acid by a newly isolated yeast *Aureobasidium pullulans* var. *aubasidani* DH177. *Bioprocess Biosyst* 41: 1707-1716. Doi: 10.1007/s00449-018-1994-0
- Wang, J., Zhu, K. (2018). Microbial production of alka(e)ne biofuels. *Curr Opin Biotechnol.* 50: 11-18. Doi: 10.1016/j.copbio.2017.08.009.
- Wasylenko, T.M., Ahn, W.S., Stephanopoulos, G. (2015). The oxidative pentose phosphate pathway is the primary source of NADPH for lipid overproduction from glucose in *Yarrowia lipolytica*. *Metab Eng.* 30: 27-39. Doi: 10.1016/j.ymben.2015.02.007.

- Wei, P., Cheng, C., Lin, M., Zhou, Y., Yang, S.T. (2017). Production of poly(malic acid) from sugarcane juice in fermentation by *Aureobasidium pullulans*: Kinetics and process economics. *Bioresour Technol.* 224: 581-589. Doi: 10.1016/j.biortech.2016.11.003.
- Werpy, T., Petersen, G. (2004). Top Value Added Chemicals from Biomass. Volume I: Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas. U.S. Department of Energy, Washington.
- West, T.P. (2011). Malic acid production from thin stillage by *Aspergillus* species. *Biotechnol Lett.* 33: 2463–2467. Doi: 10.1007/s10529-011-0720-7
- West, T.P. (2015). Fungal biotransformation of crude glycerol into malic acid. *Z Naturforsch. C* 70: 165–167. Doi: 10.1515/znc-2015-0115
- West, T.P (2017). Microbial Production of Malic Acid from Biofuel-Related Coproducts and Biomass. *Fermentation* 3: 14. Doi: 10.3390/fermentation3020014
- Wolschek, M.F., Kubicek, C.P. (1998). Biochemistry of citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. B. Kristiansen, et al. (Eds.), *Citric Acid Biotechnology*, Taylor and Francis, pp. 11-33.
- Wood, I.P., Cao, H.G., Tran, L., Cook, N., Ryden, P., Wilson, D.R., Moates, G.K., Collins, S.R., Elliston, A., Waldron, K.W. (2016). Comparison of saccharification and fermentation of steam exploded rice straw and rice husk. *Biotechnol Biofuels.* 9: 193. Doi: 10.1186/s13068-016-0599-6.
- Wood, T.M., Wilson, C.A. (1995). Studies on the capacity of the cellulase of the anaerobic rumen fungus *P. communis* P to degrade hydrogen bond-ordered cellulase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 43: 572–578. doi: 10.1007/BF00218468
- Wright, M.M., Brown, R.C., Boateng, A.A. (2008). Distributed processing of biomass to bio-oil for subsequent production of Fischer-Tropsch liquids. *Biofuels Bioprod Biorefin.* 2: 229–238. Doi: 10.1002/bbb.73
- Wu L, Arakane M, Ike M, Wada M, Takai T, Gau M, Tokuyasu K. (2011). Low temperature alkali pretreatment for improving enzymatic digestibility of sweet sorghum bagasse for ethanol production. *Bioresour Technol.* 102: 4793-4799. Doi: 10.1016/j.biortech.2011.01.023.
- Wynn, J.P., Hamid, A.A., Li, Y., Ratledge, C. (2001). Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. *Microbiology* 147: 2857–2864. Doi: 10.1099/00221287-147-10-2857
- Wynn, J.P., Ratledge, C. (2005). “Microbial production of oils and fats,” in *Food Biotechnology, Second Edition Food Science and Technology*, eds K. Shetty, G. Paliyath, A. Pometto, and R. E. Levin (Boca Raton, FL: CRC Press), 443–472.
- Xia, J., Xu, J., Hu, L., Liu, X. (2016). Enhanced poly(L-malic acid) production from pretreated cane molasses by *Aureobasidium pullulans* in fed-batch fermentation. *Prep Biochem Biotechnol.* 46: 798-802. Doi: 10.1080/10826068.2015.1135464.
- Xia, J., Xu, J., Liu, X., Xu, J., Wang, X., Li, X. (2017a). Economic co-production of poly(malic acid) and pullulan from Jerusalem artichoke tuber by *Aureobasidium pullulans* HA-4D. *BMC Biotechnol.* 17:20. Doi: 10.1186/s12896-017-0340-y.
- Xia, J., Li, R., He, A., Xu, J., Liu, X., Li, X., Xu, J. (2017b). Production of poly(β -L-malic acid) by *Aureobasidium pullulans* HA-4D under solid-state fermentation. *Bioresour Technol.* 244: 289-295. Doi: 10.1016/j.biortech.2017.07.148.

- Xu, R., Mi, Y. (2011). Simplifying the process of microalgal biodiesel production through *in situ* transesterification technology. *J Am Oil Chem Soc.* 88: 91–99. Doi: 10.1007/s11746-010-1653-3
- Xu, Z., Huang, F. (2014). Pretreatment Methods for Bioethanol Production. *Appl Biochem Biotechnol.* 174: 43–62. Doi: 10.1007/s12010-014-1015-y
- Xu, Q., Li, S., Fu, Y., Tai, C., Huang, H. (2010). Two-stage utilization of corn straw by *Rhizopus oryzae* for fumaric acid production. *Bioresour Technol.* 101: 6262–6264. Doi: 10.1016/j.biortech.2010.02.086.
- Xu, J., Zhao, X., Wang, W., Du, W., Liu, D. (2012). Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and the individual effect of some impurities on lipid production. *Biochem Eng J.* 65: 30–36. Doi: 10.1016/j.bej.2012.04.003
- Xu, Q., Li, S., Huang, H., Wen, J. (2012). Key technologies for the industrial production of fumaric acid by fermentation. *Biotechnol Adv.* 30: 1685–1696. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.08.007
- Xu, P., Gu, Q., Wang, W., Wong, L., Bower, A. G., Collins, C. H., Koffas, M.A.G. (2013). Modular optimization of multi-gene pathways for fatty acids production in *E. coli*. *Nat Commun.* 4:1409. Doi: 10.1038/ncomms2425
- Xu, X., Ji, Y.K., Hyun, U.C., Hye, R.P., Jong, M.P. (2015). Bioconversion of volatile fatty acids from macroalgae fermentation into microbial lipids by oleaginous yeast. *Chem Eng J.* 264: 735–743. Doi: 10.1016/j.cej.2014.12.011.
- Xu, P., Qiao, K., Ahn, W.S., Stephanopoulos, G. (2016). Engineering *Yarrowia lipolytica* as a platform for synthesis of drop-in transportation fuels and oleochemicals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113: 10848–10853. Doi: 10.1073/pnas.1607295113
- Xu, J., Liu, N., Qiao, K., Vogg, S., Stephanopoulos, G. (2017). Application of metabolic controls for the maximization of lipid production in semicontinuous fermentation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114: E5308–E5316. Doi: 10.1073/pnas.1703321114
- Xu, J., Liu, D. (2017). Exploitation of genus *Rhodospiridium* for microbial lipid production. *World J Microbiol Biotechnol.* 33: 54. Doi: 10.1007/s11274-017-2225-6
- Xue, S.J., Chi, Z., Zhang, Y., Li, Y.F., Liu, G.L., Jiang, H., Hu, Z., Chi, Z.M. (2018). Fatty acids from oleaginous yeasts and yeast-like fungi and their potential applications. *Crit Rev Biotechnol.* 38: 1049–1060. Doi: 10.1080/07388551.2018.1428167.
- Yadav, D.R., Kim, S.W., Adhikari, M., Um, Y.H., Kim, H.S., Kim, C., Lee, H.B., Lee, Y.S. (2015). Three new records of *Mortierella* species isolated from crop field soil in Korea. *Mycobiology* 43: 203–209. Doi: 10.5941/MYCO.2015.43.3.203
- Yang, B., Wyman, C.E. (2008). Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels Bioprod Bioref.* 2: 26–40. Doi: 10.1002/bbb
- Yang, S.-T., Huang, H., Tay, A., Qin, W., De Guzman, L., San Nicolas, E.C. (2007). Chapter 16 - Extractive fermentation for the production of carboxylic acids. Yang, S.-T. (Ed.). *Bioprocessing for value-added products from renewable resources. New technologies and applications.* Elsevier, p. 421–46. Doi: 10.1016/B978-044452114-9/50017-7
- Yang, S.T., Zhang, K., Zhang, B., Huang H. (2011). *Biobased chemicals - fumaric acid* (2nd ed.). Moo-Young, M. (Ed.). *Comprehensive Biotechnology 3*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. pp. 163–177.

- Yang, F., Hanna, M.A., Sun, R. (2012). Value-added uses for crude glycerol--a byproduct of biodiesel production. *Biotechnol Biofuels*. 5:13. Doi: 10.1186/1754-6834-5-13.
- Yang, F., Xiang, W., Sun, X., Wu, H., Li, T., Long, L. (2014). A novel lipid extraction method from wet microalga *Picochlorum* sp. at room temperature. *Mar Drugs* 12: 1258–1270. Doi: 10.3390/md12031258
- Yang, J., Yang, W., Feng, J., Chen, J., Jiang, M., Zou, X. (2018a). Enhanced polymeric acid production from the glyoxylate shunt pathway under exogenous alcohol stress. *J Biotechnol*. 275: 24-30. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.04.001.
- Yang, J., Hu, C.T., Shtukenberg, A.G., Yin, Q., Kahr, B. (2018). L-Malic acid crystallization: polymorphism, semi-spherulites, twisting, and polarity. *Cryst Eng Comm*. 20: 1383-1389. Doi: 10.1039/C7CE02107K
- Yao, L., Lee, S.-L., Wang, T., Gerde, J. A. (2013). Comparison of lipid extraction from microalgae and soybeans with aqueous isopropanol. *J Am Oil Chem Soc*. 90: 571–578. Doi: 10.1007/s11746-012-2197-5
- Yao, Q., Chen, H., Wang, S., Tang, X., Gu, Z., Zhang, H., Chen, W., Chen, Y.Q. (2019). An efficient strategy for screening polyunsaturated fatty acid-producing oleaginous filamentous fungi from soil. *J Microbiol Methods*. 158: 80-85. Doi: 10.1016/j.mimet.2018.12.023.
- Ye, X., Honda, K., Morimoto, Y., Okano, K., Ohtake, H. (2013). Direct conversion of glucose to malate by synthetic metabolic engineering. *J Biotechnol*. 164: 34-40. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.11.011.
- Yen, H.-W., Chen, T.-J., Pan, W.-C., Wu, H.-J. (2010). Effects of neutralizing agents on lactic acid production by *Rhizopus oryzae* using sweet potato starch. *World J Microbiol Biotechnol*. 26: 437–441. Doi: 10.1007/s11274-009-0186-0
- Yiin, C.L., Quitain, A.T., Yusup, S., Sasaki, M., Uemura, Y., Kida, T. (2016). Characterization of natural low transition temperature mixtures (LTTMs): Green solvents for biomass delignification. *Bioresour Technol*. 199: 258-264. Doi: 10.1016/j.biortech.2015.07.103.
- Yoshida, H., Hiroka, N., Kajimoto, G. (1990). Microwave energy effects on quality of some seed oils. *J Food Sci*. 55: 1412–1416. Doi: 10.1111/j.1365-2621.1990.tb03947.x
- You, S., Zhang, J., Yin, Q., Qi, W., Su, R., He, Z. (2017). Development of a novel integrated process for co-production of β -galactosidase and ethanol using lactose as substrate. *Bioresour Technol*. 230: 15-23. Doi: 10.1016/j.biortech.2017.01.019.
- Youngquist, J.T., Schumacher, M.H., Rose, J.P., Raines, T.C., Politz, M.C., Copeland, M.F., Pfleger, B.F. (2013). Production of medium chain length fatty alcohols from glucose in *Escherichia coli*. *Metab Eng*. 20: 177–186. Doi: 10.1016/j.ymben.2013.10.006
- Youssef, N.H., Couger, M.B., Struchtemeyer, C.G., Ligenstoffer, A.S., Prade, R.A., Najar, F.Z., Atiyeh, H.K., Wilkins, M.R., Elshahed, M.S. (2013). The genome of the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain C1A reveals the unique evolutionary history of a remarkable plant biomass degrader. *Appl Environ Microbiol*. 79: 4620-4634. doi: 10.1128/AEM.00821-13
- Yu, X., Dong, T., Zheng, Y., Miao, C., Chen, S. (2015). Investigations on cell disruption of oleaginous microorganisms: hydrochloric acid digestion is an effective method for lipid extraction. *Eur J Lipid Sci Technol*. 117: 730–737. Doi: 10.1002/ejlt.201400195

- Yu, D., Wang, X., Fan, X., Ren, H., Hu, S., Wang, L., Shi, Y., Liu, N., Qiao, N. (2018). Refined soybean oil wastewater treatment and its utilization for lipid production by the oleaginous yeast *Trichosporon fermentans*. *Biotechnol Biofuels*. 11: 299. Doi: 10.1186/s13068-018-1306-6.
- Yu, H., Liu, B., Luo, J., Cao, W., Qiao, C., Wan, Y. (2018). Toward understanding the key enzymes involved in β -poly (L-malic acid) biosynthesis by *Aureobasidium pullulans* ipe-1. *Eng Life Sci*. 18: 379-386. Doi: 10.1002/elsc.201700209
- Zabed, H., Sahu, J.N., Suely, A., Boyce, A.N., Faruq, G. (2017). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renew Sust Energy Rev*. 71: 475-501. Doi: 10.1016/j.rser.2016.12.076.
- Zaks, A., Klibanov, A.M. (1985). Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 82: 3192–3196. Doi: 10.1073/pnas.82.10.3192
- Zaldivar, J., Martinez, A., Ingram, L.O. (1999). Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*. 65: 24–33. Doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19991005)65:1<24::AID-BIT4>3.0.CO;2-2
- Zambanini, T., Sarikaya, E., Kleineberg, W., Buescher, J.M., Meurer, G., Wierckx, N., Blank, L.M. (2016a). Efficient malic acid production from glycerol with *Ustilago trichophora* TZ1. *Biotechnol Biofuels*. 9: 67. Doi: 10.1186/s13068-016-0483-4.
- Zambanini, T., Kleineberg, W., Sarikaya, E., Buescher, J.M., Meurer, G., Wierckx, N., Blank, L.M. (2016b). Enhanced malic acid production from glycerol with high-cell density *Ustilago trichophora* TZ1 cultivations. *Biotechnol Biofuels*. 9: 135. Doi: 10.1186/s13068-016-0553-7.
- Zambanini, T., Hosseinpour Tehrani, H., Geiser, E., Sonntag, C.K., Buescher, J.M., Meurer, G., Wierckx, N., Blank, L.M. (2017). Metabolic engineering of *Ustilago trichophora* TZ1 for improved malic acid production. *Metab Eng Commun*. 4: 12-21. Doi: 10.1016/j.meteno.2017.01.002.
- Zan, Z., Zou, X. (2013). Efficient production of polymalic acid from raw sweet potato hydrolysate with immobilized cells of *Aureobasidium pullulans* CCTCC M2012223 in aerobic fibrous bed bioreactor. *J Chem Technol Biotechnol*. 88: 1822–1827. Doi: 10.1002/jctb.4033
- Zbinden, M.D., Sturm, B.S., Nord, R.D., Carey, W.J., Moore, D., Shinogle, H., Stagg-Williams, S.M. (2013). Pulsed electric field (PEF) as an intensification pretreatment for greener solvent lipid extraction from microalgae. *Biotechnol Bioeng*. 110: 1605–1615. Doi: 10.1002/bit.24829
- Zelle, R.M., de Hulster, E., van Winden, W.A., de Waard, P., Dijkema, C., Winkler, A.A., Geertman, J.M., van Dijken, J.P., Pronk, J.T., van Maris, A.J. (2008). Malic acid production by *Saccharomyces cerevisiae*: engineering of pyruvate carboxylation, oxaloacetate reduction, and malate export. *Appl Environ Microbiol*. 74: 2766-2777. Doi: 10.1128/AEM.02591-07.
- Zelle, R.M., de Hulster, E., Kloezen, W., Pronk, J.T., van Maris, A.J.A. (2010a). Key process conditions for production of C(4) dicarboxylic acids in bioreactor batch cultures of an engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Appl Environ Microbiol*. 76: 744–750. Doi: 10.1128/AEM.02396-09
- Zelle, R.M., Trueheart, J., Harrison, J.C., Pronk, J.T., van Maris, A.J.A. (2010b). Phosphoenolpyruvate carboxykinase as the sole anaplerotic enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. 76: 5383–5389. Doi: 10.1128/AEM.01077-10
- Zeng, M., Ximenes, E., Ladisch, M.R., Mosier, N.S., Vermerris, W., Huang, C.P., Sherman, D.M. (2012). Tissue-specific biomass recalcitrance in corn stover pretreated with liquid hot-water: SEM imaging (part 2). *Biotechnol Bioeng*. 109: 398-404. Doi: 10.1002/bit.23335.

Zeng, Y., Himmel, M.E., Ding, S.Y. (2017). Visualizing chemical functionality in plant cell walls. *Biotechnol Biofuels*. 10:263. Doi: 10.1186/s13068-017-0953-3.

Zeng, W., Zhang, B., Liu, Q., Chen, G., Liang, Z. (2019a). Analysis of the L-malate biosynthesis pathway involved in poly(β -L-malic acid) production in *Aureobasidium melanogenum* GXZ-6 by addition of metabolic intermediates and inhibitors. *J Microbiol*. 57: 281-287. Doi: 10.1007/s12275-019-8424-0

Zeng, W., Zhang, B., Chen, G., Li, M., Liang, Z. (2019b). Efficient Production of Polymalic Acid by a Novel Isolated *Aureobasidium pullulans* Using Metabolic Intermediates and Inhibitors. *Appl Biochem Biotechnol*. 187: 612-627. Doi: 10.1007/s12010-018-2825-0.

Zhang, Y.H.P., Lynd, L.R. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol Bioeng*. 88: 797-824. Doi: 10.1002/bit.20282

Zhang, K., Yang, S.-T. (2015). *In situ* recovery of fumaric acid by intermittent adsorption with IRA-900 ion exchange resin for enhanced fumaric acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochem Eng J*. 96: 38-45. Doi: 10.1016/j.bej.2014.12.016

Zhang, X., Jantama, K., Moore, J.C., Jarboe, L.R., Shanmugam, K.T., Ingram, L.O. (2009a). Metabolic evolution of energy-conserving pathways for succinate production in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106: 20180–20185. Doi: 10.1073/pnas.0905396106

Zhang, X., Jantama, K., Shanmugam, K.T., Ingram, L.O. (2009b) Reengineering *Escherichia coli* for succinate production in mineral salts medium. *Appl Environ Microbiol*. 75: 7807–7813. Doi: 10.1128/AEM.01758-09

Zhang, J., Zhu, Z., Wang, X., Wang, N., Wang, W., Bao, J. (2010). Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resiniae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnol Biofuels*. 3:26. Doi: 10.1186/1754-6834-3-26.

Zhang, H., Cai, J., Dong, J., Zhang, D., Huang, L., Xu, Z., Cen, P. (2011). High-level production of poly (β -L: -malic acid) with a new isolated *Aureobasidium pullulans* strain. *Appl Microbiol Biotechnol*. 92: 295-303. Doi: 10.1007/s00253-011-3358-4.

Zhang, X., Wang, X., Shanmugam, K.T., Ingram, L.O. (2011). L-malate production by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 77: 427-434. Doi: 10.1128/AEM.01971-10.

Zhang, W., Cue Jr., B.W., (2012). *Green Techniques for Organic Synthesis and Medicinal Chemistry*. 1. Aufl. s.l.: Wiley. Doi:10.1002/9780470711828

Zhang, S., Xu, Y., Hanna, M.A. (2012). Pretreatment of corn stover with twinscrew extrusion followed by enzymatic saccharification. *Appl Biochem Biotechnol*. 166: 458–469. Doi:10.1007/s12010-011-9441-6

Zhang, H., Zhang, L., Chen, H., Chen, Y.Q., Ratledge, C., Song, Y., Chen, W. (2013). Regulatory properties of malic enzyme in the oleaginous yeast, *Yarrowia lipolytica*, and its non-involvement in lipid accumulation. *Biotechnol Lett*. 35: 2091-2098. Doi: 10.1007/s10529-013-1302-7.

Zhang, K., Yu, C., Yang, S.-T. (2015). Effects of soybean meal hydrolysate as the nitrogen source on seed culture morphology and fumaric acid production by *Rhizopus oryzae*. *Process Biochem*. 50: 173-179. Doi: 10.1016/j.procbio.2014.12.015

Zhang, T., Ge, C., Deng, L., Tan, T., Wang, F. (2015). C₄-dicarboxylic acid production by overexpressing the reductive TCA pathway. *FEMS Microbiol Lett*. 362pii: fnv052. Doi: 10.1093/femsle/fnv052.

- Zhang, C., Chen, L., Cheng, H., Zhu, X., Qi, Z. (2016a). Atomically dispersed Pd catalysts for the selective hydrogenation of succinic acid to γ -butyrolactone. *Catal Today* 276: 55-61. Doi: 10.1016/j.cattod.2016.01.028
- Zhang, C., Shen, H., Zhang, X., Yu, X., Wang, H., Xiao, S., Wang, J., Zhao, Z. (2016b). Combined mutagenesis of *Rhodospiridium toruloides* for improved production of carotenoids and lipids. *Biotechnol Lett.* 38: 1733-1738. Doi: 10.1007/s10529-016-2148-6.
- Zhang, K., Pei, Z., Wang, D. (2016). Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: A review. *Bioresour Technol.* 199: 21-33. Doi: 10.1016/j.biortech.2015.08.102.
- Zhang, Z., Wang, B., Zhou, P., Guo, D., Kang, R., Zhang, B. (2016). A novel approach of chemical mechanical polishing using environment-friendly slurry for mercury cadmium telluride semiconductors. *Sci Rep* 6: 22466. Doi: 10.1038/srep22466
- Zhang, Y., Han, P., Liu, H., Zhang, L., Liu, H., Fu, B. (2018). Effect of steam explosion on physicochemical properties of waste activated sludge and the performance of anaerobic digestion. *Water Sci Technol.* 77: 2687-2698. Doi: 10.2166/wst.2018.227.
- Zhang, X., Chen, J., Wu, D., Li, J., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y. (2019). Economical lipid production from *Trichosporon oleaginosus* via dissolved oxygen adjustment and crude glycerol addition. *Bioresour Technol.* 273: 288-296. Doi: 10.1016/j.biortech.2018.11.033.
- Zhao, X., Cheng, K., Liu, D. (2009). Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 82: 815-827. Doi: 10.1007/s00253-009-1883-1.
- Zhao, L., Zhang, H., Wang, L., Chen, H., Chen, Y. Q., Chen, W., Song, Y. (2015). ¹³C-metabolic flux analysis of lipid accumulation in the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. *Bioresour Technol.* 197: 23–29. Doi: 10.1016/j.biortech.2015.08.035
- Zhao, C., Luo, M.T., Huang, C., Chen, X.F., Xiong, L., Li, H.L., Chen, X.D. (2019). Determining intracellular lipid content of different oleaginous yeasts by one simple and accurate Nile Red fluorescent method. *Prep Biochem Biotechnol.* 31: 1-9. Doi: 10.1080/10826068.2019.1587624.
- Zhao, S.F., Jiang, H., Chi, Z., Liu, G.L., Chi, Z.M., Chen, T.J., Yang, G., Hu, Z. (2019). Genome sequencing of *Aureobasidium pullulans* P25 and overexpression of a glucose oxidase gene for hyperproduction of Ca²⁺-gluconic acid. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 112: 669-678. Doi: 10.1007/s10482-018-1197-3.
- Zheng, H., Wang, X., Yomano, L.P., Shanmugam, K.T., Ingram, L.O. (2012). Increase in furfural tolerance in ethanologenic *Escherichia coli* LY180 by plasmid-based expression of *thyA*. *Appl Environ Microbiol.* 78: 4346-4352. Doi: 10.1128/AEM.00356-12.
- Zheng, J., Rehmann, L. (2014). Extrusion pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Int J Mol Sci.* 15: 18967-18984. Doi: 10.3390/ijms151018967.
- Zhou, Y., Du, J., Tsao, G. (2002). Comparison of fumaric acid production by *Rhizopus oryzae* using different neutralizing agents. *Bioprocess Biosyst Eng.* 25: 179-181. Doi: 10.1007/s004490100224
- Zhou, J., Wang, Y., Chu, J., Luo, L., Zhuang, Y., Zhang, S. (2009). Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam-exploded corn stover by statistically designed experiments. *Bioresour Technol.* 100: 819–825. Doi: 10.1016/j.biortech.2008.06.068.

- Zhou, Z., Du, G., Hua, Z., Zhou, J., Chen, J. (2011). Optimization of fumaric acid production by *Rhizopus delemar* based on the morphology formation. *Bioresour Technol.* 102: 9345-9349. Doi: 10.1016/j.biortech.2011.07.120.
- Zhou, Y., Nie, K., Zhang, X., Liu, S., Wang, M., Deng, L., Wang, F., Tan, T. (2014). Production of fumaric acid from biodiesel-derived crude glycerol by *Rhizopus arrhizus*. *Bioresour Technol.* 163: 48-53. Doi: 10.1016/j.biortech.2014.04.021.
- Zhu, Q., Jackson, E.N. (2015). Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for industrial applications. *Curr Opin Biotechnol.* 36: 65-72. Doi: 10.1016/j.copbio.2015.08.010.
- Zhu, M., Yu, L.J., Liu, Z., Xu, H.B. (2004). Isolating *Mortierella alpina* strains of high yield of arachidonic acid. *Lett Appl Microbiol.* 39: 332–335. Doi: 10.1111/j.1472-765X.2004.01581.x.
- Zhu, Z., Sathitsuksanoh, N., Vinzant, T., Schell, D.J., McMillan, J.D., Zhang, Y.H. (2009). Comparative study of corn stover pretreated by dilute acid and cellulose solvent-based lignocellulose fractionation: Enzymatic hydrolysis, supramolecular structure, and substrate accessibility. *Biotechnol Bioeng.* 103: 715-724. Doi: 10.1002/bit.22307.
- Zou, X., Zhou, Y., Yang, S.T. (2013). Production of polymalic acid and malic acid by *Aureobasidium pullulans* fermentation and acid hydrolysis. *Biotechnol Bioeng.* 110: 2105-2113. Doi: 10.1002/bit.24876.
- Zou, X., Tu, G., Zan, Z. (2014). Cofactor and CO₂ donor regulation involved in reductive routes for polymalic acid production by *Aureobasidium pullulans* CCTCC M2012223. *Bioprocess Biosyst Eng.* 37: 2131-2136. Doi: 10.1007/s00449-014-1182-9.
- Zou, X., Wang, Y., Tu, G., Zan, Z., Wu, X. (2015). Adaptation and transcriptome analysis of *Aureobasidium pullulans* in corncob hydrolysate for increased inhibitor tolerance to malic acid production. *PLoS One.* 10:e0121416. Doi: 10.1371/journal.pone.0121416.
- Zou, X., Yang, J., Tian, X., Guo, M., Li, Z., Li, Y. (2016). Production of polymalic acid and malic acid from xylose and corncob hydrolysate by a novel *Aureobasidium pullulans* YJ 6–11 strain. *Process Biochem.* 51: 16-23. Doi: 10.1016/j.procbio.2015.11.018.
- Zou, X., Cheng, C., Feng, J., Song, X., Lin, M., Yang, S.T. (2019). Biosynthesis of polymalic acid in fermentation: advances and prospects for industrial application. *Crit Rev Biotechnol.* 39: 408-421. Doi: 10.1080/07388551.2019.1571008.

VI. Liste der eigenen Publikationen

Brzonkalik, K., Herrling, T., Sylдатk, C., Neumann, A. (2011). The influence of different nitrogen and carbon sources on mycotoxin production in *Alternaria alternata*. Int J Food Microbiol. 147: 120-126. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.016.

Brzonkalik, K., Herrling, T., Sylдатk, C., Neumann, A. (2011). Process development for the elucidation of mycotoxin formation in *Alternaria alternata*. AMB Express. 1:27. doi: 10.1186/2191-0855-1-27.

Brzonkalik, K., Hümmer, D., Sylдатk, C., Neumann, A. (2012). Influence of pH and carbon to nitrogen ratio on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in submerged cultivation. AMB Express. 1:28. doi: 10.1186/2191-0855-2-28.

Schulze, I., Hansen, S., Großhans, S., Rudsuck, T., Ochsenreither, K., Sylдатk, C., Neumann, A. (2014). Characterization of newly isolated oleaginous yeasts - *Cryptococcus podzolicus*, *Trichosporon porosum* and *Pichia segobiensis*. AMB Express. 4:24. doi: 10.1186/s13568-014-0024-0.

Ochsenreither, K., Fischer, C., Neumann, A., Sylдатk, C. (2014). Process characterization and influence of alternative carbon sources and carbon-to-nitrogen ratio on organic acid production by *Aspergillus oryzae* DSM1863. Appl Microbiol Biotechnol. 98: 5449-5460. doi: 10.1007/s00253-014-5614-x.

Sehlinger, A., Ochsenreither, K., Bartnick, N., Meier, MAR. (2015). Potentially biocompatible polyacrylamides derived by the Ugi four-component reaction. Eur Polym J. 65: 313-324. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2015.01.032

Neumann, A., Dörsam, S., Oswald, F., Ochsenreither, K. (2015). Microbial production of value-added chemicals from pyrolysis oil and syngas. In: Xian, M. (ed.) Sustainable Production of Bulk Chemicals: Integration of Bio-, Chemo- Resources and Processes. Springer Verlag, Dordrecht, The Netherlands. doi: 10.1007/978-94-017-7475-8_4

Voigt, K., Wolf, T., Ochsenreither, K., Nagy, G., Kaerger, K., Shelest, E., Papp, T. (2016). Genetic and metabolic aspects of primary and secondary metabolism of the Zygomycetes. In: Hoffmeister D (ed.) The Mycota Vol. III: Biochemistry and Molecular Biology. 3rd edition. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p. 361-385. doi: 10.1007/978-3-319-27790-5_15

Oswald, F., Dörsam, S., Veith, N., Zwick, M., Neumann, A., Ochsenreither, K., Sylдатk, C. (2016) Sequential mixed cultures: From syngas to malic acid. Front Microbiol., 7:891. doi: 10.3389/fmicb.2016.00891

Ochsenreither, K., Glück, C., Stressler, T., Fischer, L., Sylдатk, C. (2016). Production strategies and applications of microbial single cell oils. Front Microbiol. 7:1539. doi: 10.3389/fmicb.2016.01539

Dörsam, S., Kirchhoff, J., Bigalke, M., Dahmen, N., Syldatk, C., Ochsenreither, K. (2016). Evaluation of pyrolysis oil as carbon source for fungal fermentation. *Front Microbiol.* 7:2059. doi: 10.3389/fmicb.2016.02059

Dörsam, S., Fessler, J., Gorte, O., Hahn, T., Zibek, S., Syldatk, C., Ochsenreither, K. (2017). Sustainable carbon sources for microbial organic acid production with filamentous fungi. *Biotechnol Biofuels.* 10:242. doi: 10.1186/s13068-017-0930-x

Buß, O., Rudat, J., Ochsenreither, K. (2018). FoldX as protein engineering tool: Better than random based approaches? *Comput Struct Biotechnol J.* 16: 25-33. doi: 10.1016/j.csbj.2018.01.002

Siebenhaller, S., Gentes, J., Infantes, A., Muhle-Goll, C., Kirschhoefer, F., Brenner-Weiß, G., Ochsenreither, K., Syldatk, C. (2018). Lipase-Catalyzed Synthesis of Sugar Esters in Honey and Agave Syrup. *Front Chem.* 6:24. doi: 10.3389/fchem.2018.00024

Qian, X., Yan, W., Zhang, W., Dong, W., Ma, J., Ochsenreither, K., Xin, F., Jiang, M. (2018). Current status and perspectives of 2-phenylethanol, a natural flavor production through biotechnological process. *Crit Rev Biotechnol.* 39: 1-14. doi: 10.1080/07388551.2018.1530634

Siebenhaller, S., Kirchhoff, J., Kirschhöfer, F., Brenner-Weiß, G., Muhle-Goll, C., Luy, B., Hartz, F., Hahn, T., Zibek, S., Syldatk, C., Ochsenreither, K. (2018). Integrated process for the enzymatic production of glycolipids completely based on lignocellulosic substrates. *Front Chem.* 6:421. doi: 10.3389/fchem.2018.00421

Aliyu, H., Gorte O., Neumann, A., Ochsenreither, K. (2019). Draft genome sequence of the oleaginous yeast *Saitozyma podzolica* (syn. *Cryptococcus podzolicus*) DSM 27192. *Microbiol Resour Announc.* 8:e01676-18. doi:10.1128/MRA.01676-18.

Gorte O., Aliyu, H., Neumann, A., Ochsenreither, K. (2019). Draft genome sequence of the oleaginous yeast *Apiotrichum porosum* (syn. *Trichosporon porosum*) DSM 27194. *J Genomics* 7: 11-13. doi: 10.7150/jgen.32210.

Qian X., Gorte O., Zhang W., Dong W., Ma J., Xin, F., Jiang, M., Ochsenreither, K. (2020). Continuous self-provided fermentation for single cell oil production from acetate by using oleaginous yeasts *Cryptococcus podzolicus* and *Trichosporon porosum*. *Renew Energ.* 146: 737-743. doi: 10.1016/j.renene.2019.07.013

Qian X., Gorte O., Chen, L., Zhang, W., Dong, W., Ma, J., Jiang, M., Xin, F., Ochsenreither, K. (2019). Co-production of single cell oil and gluconic acid by using oleaginous *Cryptococcus podzolicus* DSM 27192. *Biotechnol Biofuels.* 12:127. doi: 10.1186/s13068-019-1469-9

Stoll, I.K., Boukis, N., Neumann, A., Ochsenreither, K., Zevaco, T.A., Sauer, J. (2019). The Complex Way to Sustainability: Petroleum based Processes versus Biosynthetic

Pathways in the Formation of C₄ Chemicals from Syngas. *Ind Eng Chem Res.* doi: 10.1021/acs.iecr.9b01123

Qian, X., Chen, L., Sui, Y., Chen, C., Zhang, W., Zhou, J., Dong, W., Jiang, M., Xin, F., Ochsenreither, K. (2019). Biotechnological potential and applications of microbial consortia. Submitted to *Biotechnology Advances*, major revisions. 1. Revision eingereicht, JBA-D-19-00212R1

Grüniger, J., Delavault, A., Ochsenreither, K. (2019). Enzymatic glycolipid synthesis from renewables. Submitted to *Process Biochemistry*, major revisions. 1. Revision eingereicht, PRBI_2019_636_R1

Kövilein, A., Kubisch, C., Cai, L., Ochsenreither, K. (2019). Malic acid production from renewables. Submitted to *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* JCTB-19-0855, Minor Revisions.

Aliyu, H., Gorte, O., De Maayer, P., Neumann, A., Ochsenreither, K. (2019). Comparative genomic analysis of members of the fungal family *Trichosporonaceae*: genomic insights into lifestyles and functional capacities including oleagenicity. Submitted to *Scientific Reports* SREP-19-32239