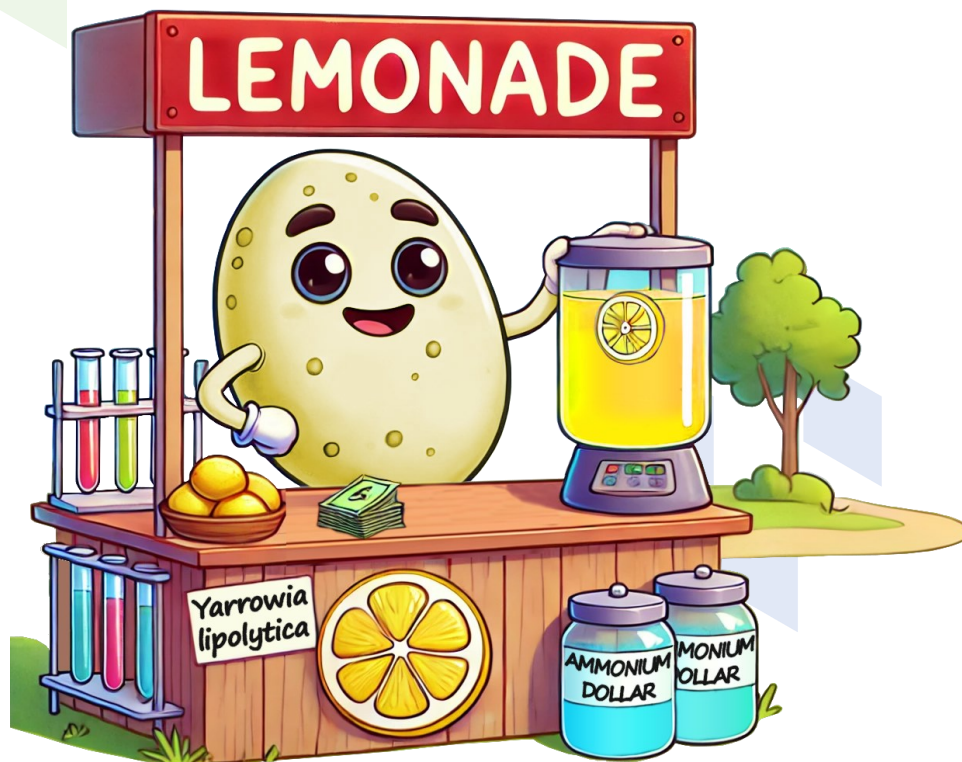


Wettbewerb um den besten

99 € - BIOREAKTOR

zur Citratproduktion mit *Yarrowia lipolytica*



Dresden, 10. - 11. Juli 2025

gesponsert von:



Adresse:

Netzwerk Bioverfahrenstechnik e.V.
Bergstraße 120
01069 Dresden

Telefon:

0351 / 463 32781

E-Mail:

vorstand@netzwerk-bioverfahrenstechnik.de

Webseite:

www.netzwerk-bioverfahrenstechnik.de

99 € - Bioreaktor zur Citratproduktion mit *Yarrowia lipolytica*

HINTERGRUND

Die industrielle Produktion von Zitronensäure ist ein zentraler Bestandteil der globalen biotechnologischen Wertschöpfungskette. Mit einer jährlichen Produktionsmenge von mehreren Millionen Tonnen wird Citrat als Säuerungsmittel, Konservierungsstoff und Komplexbildner in der Lebensmittel-, Pharma- und Kosmetikindustrie eingesetzt. Der Fermentationsprozess mit dem Schimmelpilz *Aspergillus niger* ist seit Jahrzehnten der Industriestandard. Allerdings bringt dieser Produktionsweg einige Herausforderungen mit sich, darunter die potenzielle Bildung von Mykotoxinen, hohe Anforderungen an die Sterilität und begrenzte Substratflexibilität. Angesichts steigender Sicherheitsanforderungen und des wachsenden Bedarfs an nachhaltigen biotechnologischen Prozessen wird die Entwicklung alternativer Produktionsorganismen zunehmend relevant.

Eine vielversprechende Alternative stellt die Hefe *Yarrowia lipolytica* dar. Dieser Organismus bietet mehrere Vorteile gegenüber *Aspergillus niger*, die ihn besonders für den industriellen Einsatz attraktiv machen. Einer der bedeutendsten Vorteile liegt in der inhärenten Sicherheit von Hefen im Vergleich zu filamentösen Pilzen: *Yarrowia lipolytica* ist nicht pathogen und bildet keine toxischen Nebenprodukte, was das Risiko einer Kontamination der Endprodukte minimiert. Dadurch wird der gesamte Produktionsprozess sicherer und regulatorisch einfacher handhabbar.

Neben sicherheitstechnischen Aspekten überzeugt *Yarrowia lipolytica* auch durch ihre hohe metabolische Flexibilität. Während *Aspergillus niger* primär auf Glucose als Kohlenstoffquelle angewiesen ist, kann *Yarrowia lipolytica* eine große Bandbreite an Substraten nutzen, darunter industrielle Nebenströme wie Glycerin, Fettsäuren und Pflanzenöle. Dies eröffnet neue Möglichkeiten für eine ressourcenschonende und wirtschaftlich attraktive Citratproduktion, insbesondere im Hinblick auf eine möglichst vollständigen Nutzung von Ressourcen.

In diesem Kontext soll beim diesjährigen Bioreaktorwettbewerb mit dem begrenzten Budget vom 99€, durch eine kreative Auslegung von Kultivierung, Reaktor und Prozesssteuerung, eine maximale Produktion von Citrat mit *Yarrowia lipolytica* erzielt werden.

gesponsert von:



ABLAUF & TERMINE

Durchführung des Demonstrationsexperiments an der Technischen Universität Dresden im Labor der Professur für Bioverfahrenstechnik:

Anmeldung			bis 02.06.2025
Donnerstag	10.07.2025	12.00 Uhr	Begrüßung aller Teams, Laborführung, Platzeinweisung & Aufbau der Bioreaktoren
		15:00 Uhr	Inokulation der Bioreaktoren & Fermentationsstart
		ca. 20.00 Uhr	Abendveranstaltung
Freitag	11.07.2025	14.00 Uhr	Gastvortrag von Pharmatech GmbH - A Syntegon Company
		15.00 Uhr	Fermentationsstop & Probenahme
		bis 17.00 Uhr	Auswertung der Zielparameter
		ab 19.00 Uhr	feierliche Siegerehrung mit Preisübergabe & Posterpräsentation der Bioreaktoren, Sommerfest der Dresdener Bioverfahrenstechnik.

VERSUCHSZIEL

Die Kultivierung von *Yarrowia lipolytica* ist durch Reaktordesign und Prozessführung so zu gestalten, dass eine möglichst hohe Masse an Citrat produziert wird. Mit einem Budget von maximal 99,- € (brutto) soll ein, nur mit den vorgegebenen Anschlüssen, autark funktionierender Reaktor konstruiert und gebaut werden. Als weitere Herausforderung werden Kohlenstoff- und Stickstoffquelle separat zur Verfügung gestellt. Die stickstoffhaltige Fraktion darf erst kurz vor oder während der Kultivierung zugesetzt werden. Die erzielte Masse an Citrat wird in einem enzymatischen Assay aus dem geernteten Medium nach 24-stündiger Kultivierung bestimmt.

TEAMS

Die Empfehlung zur Teamzusammensetzung sind ca. drei bis vier Studierende, die von einem Teamleiter unterstützt werden. Unter dem Begriff Studierende sind Teilnehmende ohne Master- bzw. Diplomabschluss zu verstehen. Die Leitung des Teams soll von einer Person übernommen werden, die einen Abschluss auf dem Gebiet der Bioverfahrenstechnik/ Biotechnologie/ Chemical Engineering oder Vergleichbarem hält. Ein Teammitglied muss als Kontaktperson gegenüber dem Veranstalter angegeben werden.

gesponsert von:



VERSUCHSBEDINGUNGEN

BEREITGESTELLTE ANSCHLÜSSE:

- elektrischer Anschluss 230 V AC (max. 1.000 W)
- Kühlwasser (10 – 15 °C), Anschluss über Schlauchverbindung mit Adapter,
- Aufbauort im Labor der TU Dresden, Bioverfahrenstechnik: 1 x Standardwerkbank, Raumtemperatur 22 – 28 °C (nicht klimatisiert),
- Zugang zur Sterilwerkbank für Versuchsvorbereitung.

ZUM WETTBEWERB BEREITGESTELLTER ORGANISMUS:

- *Yarrowia lipolytica* H222 (Bei Bedarf kann der Stamm **nach Anmeldung** zum Wettbewerb zugesandt werden. Der Versand erfolgt als Agar-Kulturplatte)
- Vorkultur: 24 h kultiviert in Kulturmedium (Tabelle 1), beimpft von Agar-Platten (Tabelle 2)
- Inokulum: 20 mL Vorkultur aus exp. Phase mit einer Biomassekonzentration von ca. 40 g/L

ANFORDERUNGEN AN DEN ZU ENTWERFENDEN BIOREAKTOR:

- Startvolumen: 800 mL (inklusive Inokulum),
- Arbeitsvolumen: ~ 1.200 mL,
- Inokulation erfolgt am Bioreaktorstandort (z. B. über Spritze / Kanüle durch Septum),
- Aufbau des bereits sterilisierten Bioreaktors vor Ort (alternativ: Autoklavieren am Vortag),
- Fermentationsdauer: 24 h,
- Sensorik und Aktorik zum Betrieb aller notwendigen Steuer- und Regelkreise,
- weitere elektrische und elektronische Komponenten (z. B. Spannungsquelle, Benutzerschnittstelle, etc.),
- Programme für die Steuerung und Regelung müssen nach Versuchsbeginn autark agieren (ein zusätzlicher Laptop/PC zur Steuerung, sofern er nicht im Budget enthalten ist, ist nach dem Start nicht erlaubt),
- alle **elektronischen Einrichtungen** müssen **spritzwasser- und berührungsgeschützt gehaust** sein; zudem ist ein **elektrischer Kurzschluss** im Falle einer Überflutung der Werkbank (Wasserstand 10 mm) **konstruktiv auszuschließen**; bei Nichteinhaltung behält sich der Veranstalter den Ausschluss des Teams vom Wettbewerb vor,

Der Bioreaktor muss außerhalb der bereitgestellten Schnittstellen autark sein.

NÄHRMEDIUM ZUM WETTBEWERB:

- Medienzusammensetzung befindet sich im Anhang
- bereitgestellte Menge für initiale Batch-Phase (ohne Stickstoffquelle): 780 mL + 20 mL Inokulum
- bereitgestellte Stickstoffquelle: 20 mL 400 g/L (NH₄)₂SO₄ -Lösung
- Auf Wunsch bereitgestellte Substanzen:
 - bis zu 200 mL 2 M NaOH-Lösung
 - bis zu 50 mL 1 M H₂SO₄-Lösung

ANALYTIK ZUR BESTIMMUNG DER MASSE AN CITRAT:

- Protokolle zur Bestimmung des Volumens und enzymatischen Bestimmungen der Masse an produziertem Citrat befinden sich im Anhang

gesponsert von:



ANHANG NÄHRMEDIUM — NACHTRAG/ÄNDERUNG

ZUSAMMENSETZUNG DES FLÜSSIGMEDIUMS

Für die Kultivierung wird sowohl für die Vorkultur als auch für die Hauptkultur ein definiertes Mineralmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle verwendet (siehe Tabellen 1 und 2). Für die Herstellung von 1 L Mineralmedium, werden die Makroelemente (außer Glucose) in 400 mL entionisiertem Wasser gelöst. Die Glucose wird ebenfalls in 400 mL entionisiertem Wasser gelöst. Beide Lösungen werden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Anschließend werden die Lösungen nach ausreichendem Abkühlen steril vereinigt. Des Weiteren werden 0,4 mL Spurenelementelösung (siehe Tabelle 3) und 1,6 mL Vitaminlösung (siehe Tabelle 4) steril zu der 800 mL Makroelementelösung zugegeben. Abschließend wird der pH-Wert auf 6 eingestellt und das Medium auf 1L mit entionisiertem Wasser aufgefüllt.

Zur Herstellung des Vorkulturmediums wird die Makroelementelösung aus Tabelle 1 verwendet. Die Zugabe von MES-Puffer ist nur bei einer Vorkultur im Schüttelkolben erforderlich und kann bei der Kultivierung im Reaktor entfallen. Mit diesem Vorkulturmedium kann eine Biomassekonzentration von ca. 10 g_{BTM}/L erreicht werden.¹

Für das Inokulum wird die Biomasse aus der Vorkultur durch Zentrifugation abgetrennt und in 20 mL PBS (*Phosphate Buffered Saline*) wieder gelöst mit einer Konzentration von 40 g_{BTM}/L.

Das Medium für die Hauptkultur wird nach der obigen Anleitung mit der Makroelementelösung aus Tabelle 2, und den Spurenelemente- und Vitaminlösungen aus den Tabellen 3 und 4 hergestellt. Stickstoff, in Form von Ammoniumsulfat, kann nach Bedarf über eine separate Stickstoffquelle zugegeben werden (siehe Versuchsbedingungen - Nährmedium zum Wettbewerb).

Tabelle 1 - Zusammensetzung der Makroelementelösung für die Vorkultur angegeben als Konzentration in 1 L vereinigten Kultivierungsmedium.

Komponenten	Konzentration [g L ⁻¹]
Glucose	20
(NH ₄) ₂ SO ₄	5
KH ₂ PO ₄	3
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5
NaCl	0,1
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,001
MES-Puffer (nur bei Vorkultur im Schüttelkolben)	27,3

Tabelle 2 - Zusammensetzung der Makroelementelösung für die Hauptkultur angegeben als Konzentration in 1 L vereinigten Kultivierungsmedium.

Komponenten	Konzentration [g L ⁻¹]
Glucose	100
KH ₂ PO ₄	3
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5
NaCl	0,1
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,001

gesponsert von:



ANHANG NÄHRMEDIUM

Tabelle 3 - Zusammensetzung der Spurenelementelösung mit Konzentrationen der Stammlösung.

Komponenten	Konzentration [g L ⁻¹]
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	25
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	25
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	5
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	5
CoSO ₄ · 7 H ₂ O	1
H ₃ BO ₃	1
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,5
NiSO ₄ · 6 H ₂ O	0,5
KI	0,5

-> jeweils in etwas entionisiertem Wasser lösen, 300 mL 1 N HCl zugeben, auf 1 L auffüllen, autoklavieren (121 °C, 20 min)

Tabelle 4 - Zusammensetzung der Vitaminlösung mit Konzentrationen der Stammlösung.

Komponenten	Konzentration [mg L ⁻¹]
Inositol	12,5 · 10 ³
-> in 200 mL 20 mM NaOH lösen	
Calciumpanthothenat	500
Nicotinic acid	500
Thiamine · HCl	500
Pyridoxin · HCl	500
4-Aminobenzoat	100
Riboflavin	100
Folsäure	100
Biotin	25

-> jeweils in 100 mL 20 mM NaOH lösen, zu 1 L Vitaminlösung kombinieren und sterilfiltrieren

¹ Für die Wettbewerbsvorbereitung wird ein Vorkulturmedium verwendet, dessen Bestandteile in höheren Konzentrationen, aber im gleichen Verhältnis vorliegen, um in einem Bioreaktor die für die Inokula notwendige Biomasse zu erzeugen.

gesponsert von:



ANHANG ANALYSEMETHODEN

MESSUNG DES VERBLIEBENEN FLÜSSIGVOLUMENS

1. Zielsetzung

Ziel der Messung ist es, das nach Prozessstop verbliebene Flüssigvolumen zu bestimmen.

2. Material

Im Reaktor verbliebenes Medium und Messzylinder.

3. Durchführung

Nach Prozessende werden die Reaktoren von jedem Team in je ein bereitgestelltes Gefäß entleert. Im Anschluss daran wird von den Veranstaltern das Volumen festgestellt und protokolliert.

gesponsert von:



ANHANG BESTIMMUNG DES ZIELPARAMETERS — NACHTRAG/ÄNDERUNG

ENZYMATISCHE BESTIMMUNG DES CITRATGEHALTS DES KULTURMEDIUMS

1. Zielsetzung

Ziel der Messung ist es, die Konzentration von Citrat, in einer repräsentativen Probe, aus dem zum Ende der Kultivierung verbleibenden Medium, zu bestimmen. Bevor das Assay mit der Probe durchgeführt wird, wird die Biomasse per Zentrifugation abgetrennt. Aus dieser Konzentration wird mit dem bestimmten Volumen an verbliebenen Medium die Masse an produzierten Citrat berechnet.

2. Material und Messprinzip

Zur Bestimmung des Citratgehalts wird das Assay Kit K-CITR (SKU: 700004274, Megazyme Ltd., Wicklow, Irland) zur Bestimmung der Citratkonzentration der repräsentativen Probe.

Oxalacetat und Acetat werden aus Zitronensäure (Citrat) durch das Enzym Citrat-Lyase (1) gebildet.



Das produzierte Oxalacetat wird in Gegenwart von NADH und dem Enzym L-Malat-Dehydrogenase (L-MDH) in L-Malat und NAD⁺ umgewandelt (2).



Ist jedoch das Enzym Oxalacetat-Decarboxylase in der Probe vorhanden, wird ein Teil des Oxalacetats zu Pyruvat umgewandelt. Um sicherzustellen, dass Zitronensäure quantitativ gemessen wird, wird D-Lactat-Dehydrogenase (D-LDH) eingesetzt, um das entstandene Pyruvat effizient in D-Lactat und NAD⁺ umzuwandeln (3).



Die in der obigen Reaktionskette gebildete Menge an NAD⁺ ist stöchiometrisch mit der Menge an Zitronensäure äquivalent. Der NADH-Verbrauch wird durch die Abnahme der Absorption bei 340 nm gemessen. Die Bestimmung der Absorption erfolgt mit einem Photometer

3. Durchführung

Die Messung der Absorption erfolgt mit folgenden Parametern:

Wellenlänge: 340 nm

Küvette: 1 cm Lichtweg (Glas oder Kunststoff)

Temperatur: ~ 25 °C

Endvolumen: 2,74 mL

Probenlösung: 1,0–100 µg Zitronensäure pro Küvette

Messung gegen Luft (ohne eine Küvette im Lichtweg) oder gegen Wasser

gesponsert von:



ANHANG BESTIMMUNG DES ZIELPARAMETERS

Folgende Lösungen sind in der dargestellten Reihenfolge in die Küvette zu pipettieren:

in Küvette pipettieren	Blank	Probe
entionisiertes Wasser (bei ~25 °C)	2,00 mL	1,80 mL
Probe	-	0,20 mL
bottle 1	0,50 mL	0,50 mL
NADH-Lösung	0,20 mL	0,20 mL
bottle 3	0,02 mL	0,02 mL
Mischen, Absorption nach etwa 4 min messen (A ₁) und Reaktion starten durch Zugabe von:		
Citrat-Lyase-Lösung	0,02 mL	0,02 mL
Mischen, Absorption nach Ende der Reaktion (etwa 5 min) messen (A ₂)		

Das Mischen erfolgt beispielsweise mit einem Glasstab oder durch vortexen.

Die Berechnung des Citratgehalts erfolgt mit dem Mega-Calc™ Excel-File von der Produktseite des Kits (<https://www.megazyme.com/citric-acid-assay-kit>).

gesponsert von:

