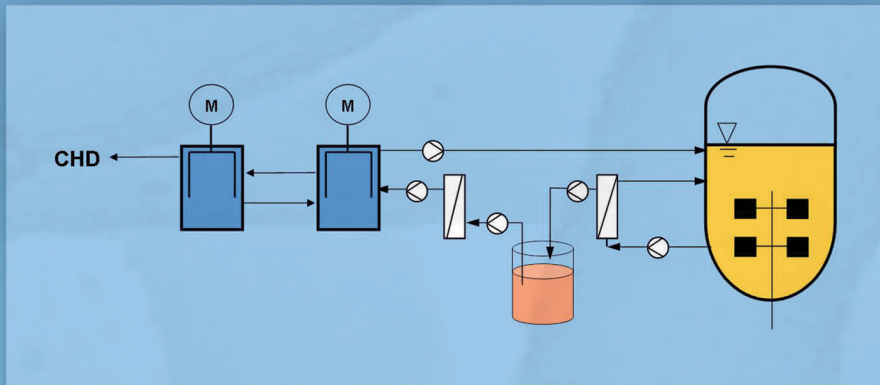


Bioprozessentwicklung und in-situ Produktgewinnung von trans-Cyclohexadien-Derivaten

Robert Bujnicki



Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences

Band/Volume 37

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Biotechnologie 2

Bioprozessentwicklung und in-situ Produktgewinnung von trans-Cyclohexadien-Derivaten

Robert Bujnicki

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences

Band/Volume 37

ISSN 1433-5549

ISBN 978-3-89336-498-5

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten sind im Internet
über <<http://dnb.d-nb.de>> abrufbar.

Herausgeber
und Vertrieb: Forschungszentrum Jülich GmbH
Zentralbibliothek, Verlag
52425 Jülich
Telefon: 02461 61-5368 · Telefax: 02461 61-6103
E-Mail: zb-publikation@fz-juelich.de
Internet: <http://www.fz-juelich.de/zb>

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2007

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences Band/Volume 37

D 91 (Diss., München, Techn. Univ., 2007)

ISSN 1433-5549
ISBN: 978-3-89336-498-5

Vollständig frei verfügbar im Internet auf dem Jülicher Open Access Server (JUWEL)
unter <http://www.fz-juelich.de/zb/juwel>

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Druck, Fotokopie oder
in einem anderen Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder
unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Abstract

From the economic view the accession to the pharmaceutical interesting active agent, the chiral *trans*-cyclohexadiene derivatives, in the industrial scale was not so far meaningful due to the complex chemical synthesis and complex down-stream processing procedures. The objective of this thesis was the development of a fermentation process for the production of the *trans*-cyclohexadiene derivatives 2,3-*trans*-CHD, 3,4-*trans*-CHD and 2,3-*trans*-CHA with recombinant *Escherichia coli* strains up to 300 litre pilot scale. The purposeful optimization of the fermentation process in connection with the improvement of *Escherichia coli* strains led to a multiple increasing of productivity. For the first time, *trans*-cyclohexadiene derivatives in the kg scale could be produced. On the basis of these developed fermentation processes an integrated product recovery procedure which is based on the reactive extraction was successfully established for the *trans*-cyclohexadien-diols 2,3-*trans*-CHD and 3,4-*trans*-CHD.

Zusammenfassung

Der Zugang zu den pharmakologisch interessanten Wirkstoffen, den chiralen *trans*-Cyclohexadien-Derivaten, im industriellen Maßstab war bisher aufgrund komplexer chemischer Synthesewege und aufwendiger Aufarbeitungsverfahren aus ökonomischer Sicht nicht sinnvoll. Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Fermentationsprozesses für die Produktion der *trans*-Cyclohexadien-Derivaten 2,3-*trans*-CHD, 3,4-*trans*-CHD und 2,3-*trans*-CHA mit rekombinanten *Escherichia coli* Stämmen bis in den 300 Liter-Maßstab. Die zielgerichtete Optimierung des Fermentationsprozesses in Zusammenhang mit der Stammverbesserung führte zu einer Erhöhung der Produktbildung um ein Vielfaches. Damit konnten erstmalig *trans*-Cyclohexadien-Derivate im kg-Maßstab gewonnen werden. Aufbauend auf diese Fermentationsprozesse wurde für die beiden *trans*-Cyclohexadiendiole 2,3-*trans*-CHD und 3,4-*trans*-CHD ein auf der Reaktivextraktion basierendes integriertes Aufarbeitungsverfahren erfolgreich etabliert.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christian Wandrey, Leiter des Instituts für Biotechnologie 2 der Forschungszentrum Jülich GmbH, danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, für die sehr gute fachliche Betreuung der Arbeit und für die Schaffung sehr guter Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz, Leiter des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik an der Technischen Universität München, möchte ich mich für die Betreuung dieser Promotionsarbeit bedanken.

Herrn Prof. Wolfgang H. Polifke Ph.D. (CCNY), Leiter des Lehrstuhls für Thermodynamik an der Technischen Universität München, danke ich für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfung.

Weiterhin danke ich Herrn PD Dr.-Ing. Ralf Takors, ehemaliger Leiter der Fermentationsgruppe am Institut für Biotechnologie 2 der Forschungszentrum Jülich GmbH, für die Betreuung der Promotionsarbeit, für die ständige Diskussionsbereitschaft sowie für die guten Ratschläge und wertvollen Anregungen.

Besonders möchte ich mich bei den Diplomanden Herrn Dipl.-Ing. Matthias Moch, Herrn Dipl.-Ing. Hannes Schobert und Herrn Dipl.-Chem. Niels Burmeister für ihren Beitrag zu dieser Promotionsarbeit bedanken.

Herrn Dipl.-Ing. Karsten Grönke danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Umsetzung des ¹³C-Markierungsexperimentes und Herrn Dr.-Ing. Aljoscha Wahl danke ich für die Unterstützung bei der Erstellung eines stöchiometrischen Modells.

Herrn Dr. Marco Oldiges möchte ich mich für die Etablierung neuer analytischer Methoden und für die Unterstützung bei deren Anwendung bedanken.

Mein Dank gilt allen Mitgliedern der Fermentationsgruppe am Institut für Biotechnologie 2 der Forschungszentrum Jülich GmbH. Die gegenseitige Unterstützung hat zum Gelingen der Arbeit einen großen Beitrag geleistet. Mein besonderer Dank gilt Frau Heidi Haase-Reiff für die HPLC-Analyse unzähliger Proben. Insbesondere möchte ich mich bei Dipl.-Ing. Melanie Rüping, Dipl.-Ing. Hans-Jürgen Brandt, Herrn Horst Kiehl und Dipl.-Ing. Andreas Franz bedanken.

Meinen Dank aussprechen möchte ich den Mitarbeitern der Firma DSM Biotech GmbH und dem Institut für Biotechnologie 1 der Forschungszentrum Jülich GmbH für die hervorragende Zusammenarbeit innerhalb des „Chorus-Projektes“.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern Christine und Peter Bujnicki für die großartige Unterstützung während meines gesamten Lebens.

Meiner Ehefrau Dr. Tuyen Bujnicki (geb. Tran) danke ich für ihre Liebe und ihre Unterstützung während meiner Promotionsarbeit.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI

1	Einleitung	1
2	Zielsetzung der Arbeit	5
3	Stand des Wissens	7
3.1	Biologische Grundlagen	7
3.1.1	Das Bakterium <i>Escherichia coli</i>	7
3.1.2	Stoffwechselwege in <i>E. coli</i>	7
3.1.3	Shikimat-Biosyntheseweg in <i>E. coli</i>	10
3.1.4	<i>E. coli</i> als Produktionsstamm	12
3.1.5	Prozesstechnische Optimierungen bei <i>E. coli</i> Produktionsstämmen	13
3.1.6	Struktur und physiologische Bedeutung der <i>trans</i> -Cyclohexadien-Derivaten	14
3.1.7	Mikrobieller Zugang zu den Cyclohexadien-Derivaten	14
3.2	Chemische Grundlagen	16
3.2.1	Verfahren zur chemischen Synthese von Cyclohexadien-Derivaten	16
3.3	Verfahrenstechnische Grundlagen der Produktabtrennung	17
3.3.1	Grundlagen der Extraktion	17
3.3.2	Grundlagen der Reaktivextraktion	18
3.3.2.1	Reaktivextraktion als ein Verfahren zur <i>in situ</i> Produktgewinnung	19
3.3.2.2	Lipophile Gegenionen bei der Reaktivextraktion	20
3.3.2.3	Lösungsmittel bei der Reaktivextraktion	21
3.3.2.4	Reaktivextraktion der <i>trans</i> -Cyclohexadiendiole	22
3.3.2.5	Theorie des Stoffübergangs	25
3.3.2.6	Aufbau der Flüssig-Flüssig-Extraktoren	27
3.3.2.7	Theorie der Phasentrennung	28
3.4	Reaktionstechnische Grundlagen	29
3.4.1	Prozessführung im Bioreaktor	29
3.4.2	Kinetische Parameter	31
3.4.3	Bilanzierung des Kohlenstoffs	33
3.5	Grundlagen der „Metabolischen Stoffflussanalyse“	34
3.5.1	Praktische Umsetzung der ¹³ C-Stoffflussanalyse	34
4	Material und Methoden	37
4.1	Das biologische System	37
4.1.1	<i>E. coli</i> Überproduzenten	37
4.1.2	Stammhaltung und Vorkultivierung	38
4.2	Analytische Verfahren	38
4.2.1	Bestimmung der off-line Werte	38
4.2.1.1	High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC)	39
4.2.1.2	¹ H-NMR-Messung	39
4.2.2	Bestimmung der on-line Werte	40
4.2.2.1	Messdaten vom Bioreaktor	40
4.2.2.2	Bestimmung der Glukosekonzentration	41

4.3	Apparativer Aufbau und Fermentationsdurchführung	43
4.3.1	Fermentationsprozess im Zulaufverfahren im 7,5 Liter Bioreaktor	43
4.3.2	Fermentationsprozess im Zulaufverfahren im 42 Liter Bioreaktor	46
4.3.3	Fermentationsprozess im Zulaufverfahren im 300 Liter Maßstab	47
4.3.4	Master/Sensor-Fermentationstechnik für das ¹³ C-Markierungsexperiment	48
4.3.5	Integration der Reaktivextraktion an den Fermentationsprozess	50
4.3.6	Datenerfassung	52
4.3.7	Prozesskontrolle	54
5	Ergebnisse und Diskussion der Prozessentwicklung des fermentativen Zugangs zum 2,3-<i>trans</i>-CHD	57
5.1	Entwicklung des Fermentationsverfahrens	57
5.1.1	Suche nach einem geeigneten 2,3- <i>trans</i> -CHD-Überproduzenten	57
5.1.2	Untersuchung der Ursachen der Nebenproduktakkumulation	62
5.1.3	Experiment zur Vermeidung der Nebenproduktbildung	65
5.1.4	Zugang zum 2,3- <i>trans</i> -CHD im halbtechnischen Maßstab	68
5.2	Diskussion zur 2,3- <i>trans</i> -CHD-Prozessentwicklung	71
5.2.1	Die Suche nach den Ursachen der Glukonsäurebildung	71
5.2.2	Die Folgen der Nebenproduktbildung auf die Stoffflüsse in dem Produktionsstamm	74
5.2.3	Ursache der Glukonsäurebildung	75
5.2.4	Vermeidung der Glukonsäurebiosynthese während der Produktion von 2,3- <i>trans</i> -CHD	77
5.2.5	Abhängigkeit der Produktbildung vom Zellwachstum	79
5.2.6	Zugang zum 2,3- <i>trans</i> -CHD im halbtechnischen Maßstab	81
6	Ergebnisse und Diskussion der Prozessentwicklung des fermentativen Zugangs zum 3,4-<i>trans</i>-CHD	83
6.1	Entwicklung des 3,4- <i>trans</i> -CHD Fermentationsverfahrens	83
6.1.1	Zugang zum 3,4- <i>trans</i> -CHD im g/l-Maßstab	83
6.1.2	Optimierung der 3,4- <i>trans</i> -CHD-Biosynthese	86
6.1.3	Produktion von 3,4- <i>trans</i> -CHD im 300 Liter-Maßstab	88
6.1.4	Metabolischen Stoffflussanalyse mittels eines ¹³ C-Markierungsexperiments	90
6.2	Diskussion zur 3,4- <i>trans</i> -CHD-Prozessentwicklung	95
6.2.1	Optimierung der 3,4- <i>trans</i> -CHD-Biosynthese	95
6.2.2	Vergleich des fermentativen Zugangs zu unterschiedlichen Produkten des Aromaten-Biosyntheseweges	97
6.2.3	¹³ C-Markierungsexperiment	99
6.2.4	Modellgestützte Optimierung der CHD-Biosynthese	100
7	Fermentativer Zugang zu der β-Aminosäure 2,3-<i>trans</i>-CHA	103
7.1	Ergebnis der Fed-Batch Fermentation im 300 Liter Maßstab	103
7.2	Diskussion der Arbeiten zum fermentativen Zugang zum 2,3- <i>trans</i> -CHA	105

8 Ergebnisse und Diskussion der Untersuchung der Reaktivextraktion als Verfahren zur <i>in situ</i> Gewinnung von 2,3-<i>trans</i>-CHD und 3,4-<i>trans</i>-CHD	107
8.1 Voruntersuchungen zur Identifizierung der geeigneten Lösungsmittel- und Akzeptorphase für die Reaktivextraktion von <i>trans</i> -CHD	107
8.1.1 Untersuchung der Lösungsmittelphase	108
8.1.2 Untersuchung der Akzeptorphase	108
8.1.3 Analyse der Biokompatibilität der eingesetzten Lösungsmittelphasen	109
8.2 Untersuchungen zur off-line Reaktivextraktion	110
8.2.1 Off-line Reaktivextraktion von 3,4- <i>trans</i> -CHD	110
8.2.2 Off-line Reaktivextraktion von 2,3- <i>trans</i> -CHD	111
8.3 Untersuchungen zur <i>in situ</i> Reaktivextraktion	113
8.3.1 <i>In situ</i> Reaktivextraktion von 2,3- <i>trans</i> -CHD	114
8.3.2 <i>In situ</i> Reaktivextraktion von 3,4- <i>trans</i> -CHD	118
8.4 Diskussion zur Entwicklung des Reaktivextraktionsverfahrens zur <i>in situ</i> Gewinnung von 2,3- <i>trans</i> -CHD und 3,4- <i>trans</i> -CHD	121
8.4.1 Grundlagen der Reaktivextraktion von 2,3- <i>trans</i> -CHD und 3,4- <i>trans</i> -CHD	121
8.4.2 <i>In situ</i> Reaktivextraktion von 2,3- <i>trans</i> -CHD und 3,4- <i>trans</i> -CHD	124
9 Zusammenfassung	129
10 Ausblick	131
11 Literaturverzeichnis	135
12 Anhang	143
12.1 Zusammensetzung von Medien und Lösungen	143
12.1.1 Stammlösung	143
12.1.2 Spurenelementstammlösung	143
12.1.3 Vorkulturmedium	143
12.1.4 Hauptkulturmedium	144
12.1.5 LB-Medium	144
12.1.6 Zulaufmedien: Glukose und Aminosäuren	145
12.1.7 Antischaummittel, pH-Korrekturmittel und IPTG-Lösung	145
12.1.8 Puffer für die kontinuierliche Glukose-Analytik (OLGA)	145
12.2 Chemikalienliste	146
12.2.1 Datenblatt der chemischen und physikalischen Eigenschaften von TOMAC	147
12.3 HPLC-Geräteparameter	147
12.3.1 HPLC für Aminosäuren	147
12.3.2 HPLC für organische Säuren	148
12.3.3 HPLC für Produkte, Nebenprodukte und Abbauprodukte	148
12.4 ¹ H-NMR-Geräteparameter	152
12.5 Geräteliste	154
12.6 Fehlerbetrachtung	156
12.7 Abbildungsverzeichnis	158
12.8 Tabellenverzeichnis	163

Abkürzungsverzeichnis:

Abkürzungen:

2,3- <i>trans</i> -CHA	(2S)-Amino-(3S)-Hydroxy-2,3-Dihydrobenzoesäure
2,3- <i>trans</i> -CHD	(2S,3S)-Dihydroxy-2,3-Dihydrobenzoesäure
3,4- <i>trans</i> -CHA	(3R)-Hydroxy-(4R)-Amino-3,4-Dihydrobenzoesäure
3,4- <i>trans</i> -CHD	(3R,4R)-Dihydroxy-3,4-Dihydrobenzoesäure
4-HB	4-Hydroxy-Benzoat
Abb.	Abbildung
ADC	4-Aminodesoxychorisminsäure
ADIC	2-Aminodesoxyisochorisminsäure
<i>amp</i> ^R	Ampicillinresistenzgen
AroA	EPSP Synthase
AroB	3-Dehydroquinat Synthase
AroC	Chorismat Synthase
AroD	3-Dehydroquinat Dehydratase
AroE	Shikimat Dehydrogenase
AroF	3-desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat-Synthase (L-Tyr spezifisch)
AroG	3-desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat-Synthase (L-Phe spezifisch)
AroK	Shikimat-Kinase I
AroL	Shikimat-Kinase II
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BTM	Biotrockenmasse
bzw	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
CHA	Cyclohexadienaminoalkohol
CHD	Cyclohexadiendiol
D ₂ EHPA	Di-(2-Ethylhexyl)-Phosphorsäure
D ₂ O	Deuteriumoxid
Da	Dalton
DAD	Photodiodenarraydetektor
DAH(P)	3-Desoxy-D-arabino-heptulosonat(-7-phosphat)
DHQ	3-Dehydroquininsäure (3-Dehydrochinasäure)
DHS	3-Dehydroshikimisäure
Diff.	Differentiell
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E-4-P	Erythrose-4-Phosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EntA	2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoat-Dehydrogenase
EntB	Isochorismat-Lyase oder Isochorismatase
EntC	Isochorismat-Synthase
<i>entCEBA</i>	Operon, das Gene zur Biosynthese von Enterobactin kodiert
EPSP	5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat
<i>et al.</i>	et alteri
etc.	et cetera
g	Gramm (Masseneinheit)
Glf	Glukose Facilitator
h	Stunde
H	Wasserstoff
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (engl.: High Performance Liquid Chromatography)
IBT	Institut für Biotechnologie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
ISPR	<i>In situ</i> Produkt Gewinnung (engl.: <i>in situ</i> product recovery)
k	Präfix: kilo

Kap.	Kapitel
Konz.	Konzentration
LB	Lauria Bertani
ln	natürlicher Logarithmus
log	Logarithmus
LOQ	Quantifizierungsgrenze
L-Phe	L-Phenylalanin
L-Trp	L-Tryptophan
L-Tyr	L-Tyrosin
m	Meter (Längeneinheit) und Präfix: milli
max.	maximal
mol	molar
min	Minute (Zeiteinheit)
NAD(H)	Nicotin-adenin-dinukleotid (oxidierte und reduzierte Form)
n	Nanometer Präfix: nano
NMR	Protonen-Kernresonanz-Spektrometrie
OD	optische Dichte
OLGA	On Line General Analyser
OTR	Sauerstofftransferrate
OUR	Sauerstoffverbrauchsrate
PC	Personal Computer
PEP	Phosphoenolpyruvat
PheA	Chorisminsäure-Mutase/Prephensäure-Dehydratase
PhzD	Isochorismatase aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
P _i	Anorganisches Phosphat
PID	Proportional-Integrativ-Differentiell
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
Ppc	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
ppm	parts per million
Pps	PEP Synthase
PP-Weg	Pentose-Phosphat-Weg
PT	Phosphotransferase
pts	Phosphotransferase-Systems
Pyk	Pyruvat-Kinase
rpm	Umdrehungen pro Minute
S.	Seite
S-3-P	Shikimat-3-Phosphat
SIA	Sequential Injection Analyser
spez.	spezifisch
Tab.	Tabelle
TBS	Tetra-Butyl-Silyl
TktA	Transketolase A
TrpE	Anthranilat-Synthase
TSP	3-Trimethylsilyl-Propion-2,2,3,3-d-Säure
TyrA	Chorisminsäure-Mutase/Prephensäure-Dehydrogenase
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
vol.	volumetrisch
WHO	Weltgesundheitsorganisation
vvm	Begasungsrate pro Reaktorvolumen

Formelzeichen:

A	Fläche	m ²
c	Konzentration	g/l oder mol/l
CTR	Kohlendioxidbildungsrate	mol/l/h
d	Durchmesser	m
D	Diffusionsquotient	

Abkürzungen

F	Kraft	N
g	Erdbeschleunigung	m/s ²
J	flächenspezifischer Stofffluss	mol/m ² /s
k	Stoffübergangskoeffizient	m ² /s
K _m	Michaelis Menten Konstante - Enzymsättigungskonstante für den Metaboliten m	mol/l
M	Molmasse	g/mol
OTR	Sauerstofftransportrate	mol/l/h
p	Druck	bar
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration	
Q _p	differentielle Produktivität	mol/l/h
r	Radius	m
RQ	Respirationsquotient	
RZA	integrale Raum-Zeit-Ausbeute	mol/l/h
t	Zeit	h
T	Temperatur	°C
V	Volumen	l
Y	Selektivität/Ausbeute	mol/mol

Griechische Symbole:

β	Stoffübergangskoeffizient	cm/s
δ	Schichtdicke des laminaren Grenzfilms	mm
η	Dynamische Viskosität	Pa*s/l
λ	Wellenlänge	nm
μ	Wachstumsrate	h ⁻¹
π	biomassespezifische Produktbildungsrate	mol/g/h
ρ	Dichte	g/l
σ	Substratverbrauchsrate	g/(l*h)
γ	Schergeschwindigkeit	1/s
τ	Schubspannung	Pa
ω	Winkelgeschwindigkeit	m/s

Indizes:

0	zum Zeitpunkt 0
aq	Wässrige Lösung (aqua ist das lateinische Wort für Wasser)
aus	Fluss aus dem Reaktor
C	Kohlenstoff
diff	differentiell
f	flüssig
fbr	„feedback“ dereguliert
i	zum Zeitpunkt i
in	Fluss in den Reaktor
max	maximal
n	Stöchiometrischer Koeffizient
org	organische Phase
P	Produkt
PDF	Phasengrenzfläche
S	Substrat
spez	spezifisch
t	Tropfen
w	wässrige Phase
wt	Wildtyp
X	Biomasse

1 Einleitung

Was versteht man unter dem Begriff „Biotechnologie“?

Die Europäische Föderation Biotechnologie hat die folgende Definition formuliert:

„Die Biotechnologie ist die integrierte Anwendung von Biowissenschaften, Chemie und Verfahrenstechnik mit dem Ziel, die Anwendung von Organismen, Zellen und molekularen Analogen zu erreichen.“

Im Mittelpunkt der Biotechnologie stehen Mikroorganismen wie Hefen, Bakterien und Pilze, tierische und pflanzliche Zellkulturen sowie Enzyme, die in technischen Prozessen erzeugt oder verwendet werden können. Mit ihrer Hilfe ist es möglich, Substanzen abzubauen, Moleküle herzustellen oder zu modifizieren.

Die Geschichte der Biotechnologie

Der Einsatz von Mikroorganismen zur Herstellung von Nahrungsmitteln oder zur Verbesserung der Haltbarkeit der Lebensmittel begann im Laufe der Menschheitsgeschichte mit empirischen Methoden. Im Laufe der Jahrhunderte wurden Methoden zur Herstellung von Bier, Wein, Essig, Sake, Milchprodukten, Sauerteig und Sauerkraut verfeinert. Nach den Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird heutzutage ein Großteil der Nahrungsmittel fermentativ produziert oder konserviert.

Mit den ersten Erkenntnissen über Mikroorganismen durch Louis Pasteur und Robert Koch am Ende des 19. Jahrhunderts konnte eine gerichtete Herstellung von Produkten wie Ethanol, Glycerin, Aceton, Butanol, Essig-, Zitronen- und Milchsäure zum Anfang des 20. Jahrhunderts verwirklicht werden (Klämbt et al. 1991). Alle diese Verfahren fanden unter unsterilen Bedingungen statt. Der Meilenstein der weißen Biotechnologie wurde 1940 durch den sogenannten Oxforder Arbeitskreis (u.a. Ernst Boris Chain und Walter Florey) mit der Entwicklung des Verfahrens zur Penicillin-Herstellung gelegt (Chain et al. 1940). Die technische Umsetzung der Produktion wurde durch die Entwicklung neuer Methoden zur Steriltechnik und der Versorgung mit Sauerstoff ermöglicht. Außerdem wurden genetische Methoden zur Stammverbesserung und Methoden zur Handhabung von Mikroorganismen im Produktionsmaßstab etabliert (Klämbt et al. 1991). In den folgenden Jahrzehnten wurde der Weg zu über 20 weiteren Antibiotika geschaffen. Neben dem Zugang zu den Antibiotika wurden sowohl Vitamine wie Ascorbinsäure, Riboflavin und B₁₂ als auch Enzyme und Aminosäuren als Produkte entdeckt. Seit mehreren Jahrzehnten werden Enzyme wie die Protease, Glukose-Isomerase und Amylase industriell hergestellt (Klämbt et al. 1991).

Die Gegenwart der Biotechnologie

Die moderne Biotechnologie zählt neben der Nanotechnologie weltweit zu den Kerngebieten des zukünftigen Fortschritts mit großer industrieller Bedeutung. Sie zeichnet sich durch eine interdisziplinäre Ausrichtung aufgrund der integrierten Anwendung unterschiedlicher natur- und ingenieurwissenschaftlicher Disziplinen aus (Abb. 1.1). Die Anwendungsmöglichkeiten und das ökonomische Potenzial erstrecken sich von der Chemie, der Medizin, dem

Umweltschutz und der Landwirtschaft über die Pharma-, Lebensmittel- und Futtermittelindustrie bis hin zur Gewinnung neuer Verbindungen aus nachwachsenden Rohstoffen.

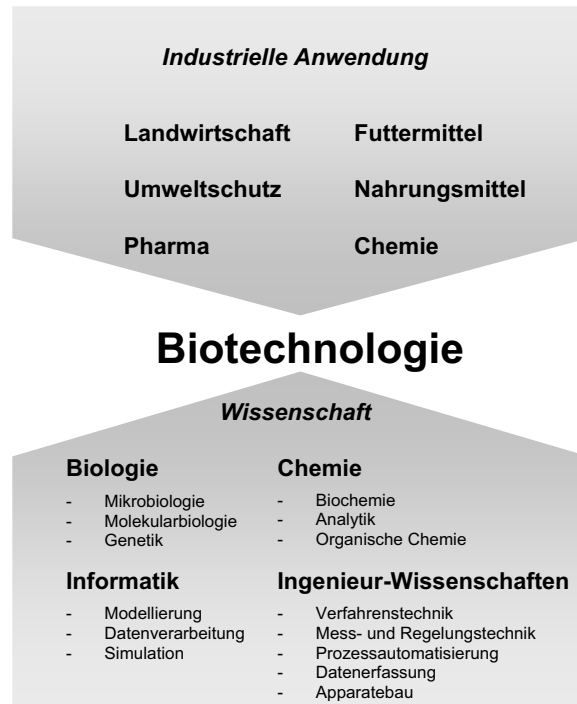


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des interdisziplinären Charakters und der Vielzahl der Anwendungsfelder der Biotechnologie.

Chiralität – Die Stärke der Biotechnologie

Die Chiralität ist die Eigenschaft von chemischen, optisch aktiven Molekülen (Isomerie), sich mit ihrem Spiegelbild nicht zur Deckung bringen zu lassen (z.B. D- und L-Aminosäuren). Eines der ersten biotechnologischen Verfahren zur Synthese chiraler Metabolite ist seit Ende der Sechziger Jahre die Produktion des Geschmacksverstärkers L-Glutaminsäure sowie weiterer Aminosäuren (Budzinski 2001). Die Weltproduktion der fermentativ hergestellten Aminosäuren (u.a. L-Glutaminsäure, L-Lysin und L-Threonin) beläuft sich heute auf mehr als 1,75 Millionen Tonnen pro Jahr, was einem Volumen von über drei Milliarden US \$ entspricht. Diese Aminosäuren werden als Lebensmittel- oder als Futtermittelzusätze eingesetzt.

In den letzten Jahren wurden verstärkt Bestrebungen im Bereich der niedermolekularen Chiraltechnologie beobachtet. Eine Vielzahl von Feinchemikalienherstellern ergänzen ihre Geschäftsbereiche um „Chirale Technologien“. Den Angaben der Analyse der Unternehmensberatung Frost und Sullivan (Frost&Sullivan 2003) nach wird das Umsatzvolumen im Gesamtmarkt für Chiraltechnologie weltweit von fast acht Milliarden US \$ auf ca. 15 Milliarden US \$ im Jahr 2009 anwachsen.

Ein für die mikrobielle Biosynthese bedeutendes chirales Molekül ist das Chorismat. Chorismat, ein Intermediat der Aromaten-Biosynthese, wurde zum ersten Mal 1962 von Gibson (Gibson et al. 1962a) beschrieben. Es fungiert als Schlüsselmetabolit auf dem Biosyntheseweg einer Vielzahl aromatischer Verbindungen, wie der Aminosäuren L-Tyrosin, L-Phenylalanin und L-Tryptophan. Aus diesem Grund wurde dieser Abzweig-Metabolit von Gibson (Gibson et al. 1962a; Gibson et al. 1962b) nach dem griechischen Wort $\chi\omega\rho\iota\sigma\mu\acute{\alpha}\xi$ (bedeutet Scheideweg, Aufteilung) benannt. In der Arbeit von Franke (Franke 2002) konnte gezeigt werden, dass Chorismat als Ausgangssubstanz für die Biosynthese einer Vielzahl chiraler Verbindungen dienen kann.

Produktgewinnung

Der Fermentationsprozess liefert am Ende eine Mischung aus dem Produkt, der Biomasse, den Zell- sowie Medienbestandteilen und den Nebenprodukten. Die Separation der Zielmoleküle kann bei biotechnologischen Verfahren eine Vielzahl einzelner Schritte beinhalten. Abhängig von dem Verwendungszweck des Produktes entstehen unterschiedliche Anforderungen an die Reinheit der Zielsubstanz. Die Kosten der Produktaufarbeitung können abhängig von diesen Vorgaben zwischen 20 und 80 % der gesamten Produktionskosten ausmachen. Es werden vorwiegend Trennverfahren zur Produktgewinnung durchgeführt, die unabhängig von der Fermentation sind. Im Bereich der Zitronensäureproduktion (Wieczorek et al. 1998a; Wieczorek et al. 1998b) und bei der Gewinnung der Aminosäure L-Phenylalanin (Gerigk 2001; Maass 2001; Rüffer 2004) konnte eine Optimierung des Prozesses durch den Einsatz einer integrierten Produktabtrennung erreicht werden.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung der vorliegenden Promotionsarbeit ist die Entwicklung eines fermentativen mikrobiellen Verfahrens für die Produktion und Gewinnung der *trans*-Cyclohexadien-Derivate 2,3-*trans*-CHA ((3R)-Hydroxy-(4R)-Amino-3,4-Dihydrobenzoesäure), 2,3-*trans*-CHD ((2S, 3S)-Dihydroxy-2,3-Dihydrobenzoesäure) und 3,4-*trans*-CHD ((3R, 4R)-Dihydroxy-3,4-Dihydrobenzoesäure). Diese chiralen Bausteine könnten zur Herstellung neuer pharmakologisch interessanter Wirkstoffe eingesetzt werden oder die Synthesewege bereits produzierter Zielmoleküle vereinfachen. Der Einsatz der nachhaltigen Bioproduktion ist verbunden mit der Verwendung von nachwachsenden Rohstoffen wie Kohlenhydrate (z.B. D-Glukose).

Die Komplexität der Aufgabe setzt für den Erfolg des Projektes die Zusammenarbeit unterschiedlicher wissenschaftlicher Arbeitsgruppen voraus. Die Entwicklung der Produktionsstämme soll im Institut für Biotechnologie 1 (IBT 1) der Forschungszentrum Jülich GmbH in Kooperation mit der Firma DSM Biotech GmbH stattfinden. Die Prozessentwicklung soll am Institut für Biotechnologie 2 (IBT 2) und der damaligen Firma DSM Biotech GmbH¹ durchgeführt werden. Die Arbeiten im Bereich der Folgesynthese ausgehend von den Zielmolekülen sollen am Institut für Biotechnologie 2 umgesetzt werden. Alle diese Aufgaben wurden unter der Bezeichnung CHORUS-Projekt zusammengefasst.

Die verfahrenstechnischen Arbeiten im Bereich der Fermentation und der Aufarbeitung sollen den Zugang zu den Produkten im Labor- und halbtechnischen Maßstab ermöglichen. Die Fortschritte in der Molekularbiologie sollen zu Verbesserungen im Bereich der Stammentwicklung führen. Die chemischen und biochemischen Ansätze sollen den Zugang zu neuen Substanzklassen, ausgehend von den fermentativ hergestellten *trans*-CHDs und *trans*-CHAs, eröffnen.

Das erste Ziel dieser Promotionsarbeit ist die Entwicklung von industriell verwendbaren Fermentationsprozessen zur Biosynthese von 2,3-*trans*-CHA, 2,3-*trans*-CHD und 3,4-*trans*-CHD. Dafür sollen unterschiedliche Produktionsstämme eingesetzt werden. Unter der Verwendung unterschiedlicher Fermentationsverfahren und Anwendung komplexer Regelungssysteme soll die Vielzahl der eingesetzten Stämme mit hoher Effizienz in Hinblick auf die Biosyntheseigenschaften charakterisiert werden. Der Einsatz des zu entwickelnden Fermentationsverfahrens soll folgende Vorteile bringen:

- Durch den Einsatz komplexer Prozesstechniken soll eine schnelle Identifikation geeigneter Produktionsstämme ermöglicht werden. Dabei sollen mögliche reaktionslimitierende Schritte in den Biosynthesewegen eliminiert werden.
- Die entstehenden Nebenprodukte sollen erkannt und identifiziert werden. Durch prozesstechnische und stammtechnische Optimierungen soll die mögliche Nebenproduktbildung reduziert werden.
- Durch die Anwendung einer optimierten Prozesstechnik, verbunden mit der Entwicklung effizienterer Produktionsstämme, sollen die bisher erzielten maximalen

¹ Kontaktadresse: Roel Bovenberg, DSM Anti-Infectives B.V., DAI-Innovation, Postal Point 624-0270, P.O. Box 425, 2600 AK Delft, The Netherlands

Produktkonzentrationen von 4,6 g/l 2,3-*trans*-CHD und 0,7 g/l 3,4-*trans*-CHD (Franke 2002) übertroffen werden.

- Die Selektivität und die Raum-Zeit-Ausbeute sollen erhöht werden. Die Reproduzierbarkeit des Fermentationsprozesses soll gewährleistet werden.
- Die Möglichkeit der Übertragung des Verfahrens in den industriellen Bereich soll durch den „scale up“ in den halbertechnischen Maßstab gezeigt werden.

In den Arbeiten von Maass (Maass 2001), Gerigk (Gerigk 2001) und Rüffer (Rüffer 2004) wurde ein Fermentationsverfahren zur Biosynthese von L-Phenylalanin mit integrierter Produktgewinnung mittels Reaktivextraktion entwickelt. Der Grund für den Einsatz der *in situ* Aufarbeitung lag in der inhibierenden Wirkung des Produktes L-Phenylalanin auf die Biosynthese. Bei dem Aufbereitungsverfahren nach Maass (Maass et al. 2002) wurde als organische Phase ein Gemisch aus dem Lösungsmittel Kerosin und dem kationen-selektiven Vermittler Di-(2-Ethylhexyl)-Phosphorsäure (D₂EHPA) eingesetzt. Das extrahierte L-Phenylalanin wurde aus der organischen Phase in eine H₂SO₄-haltige Akzeptorphase übertragen. Dieses Aufbereitungsverfahren erlaubte die selektive Abtrennung von Molekülen mit einer oder mehreren Aminogruppen. Aufgrund dessen kann dieses Verfahren zur Gewinnung der β -Aminosäure 2,3-*trans*-CHA eingesetzt werden.

Eine mögliche inhibierende Wirkung der Produkte 2,3- und 3,4-*trans*-CHD setzt die Entwicklung eines Trennverfahrens für die simultane Abtrennung dieser Verbindungen aus dem Fermentationsüberstand voraus. Die fehlende Amino-Gruppe bei den CHD-Molekülen macht die Entwicklung eines alternativen Aufbereitungsverfahrens erforderlich. Deshalb ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Entwicklung eines *in situ* Extraktionsverfahrens zur integrierten Abtrennung von Molekülen mit einer oder mehreren Carboxyl-Gruppen. Es sollen folgende Aufgaben erbracht werden:

- Die Untersuchung und Etablierung eines oder mehrerer Systeme zur Reaktivextraktion von *trans*-CHD sollen durchgeführt werden. Dabei sollen unterschiedliche organische Phasen, bestehend aus dem Lösungsmittel und dem Vermittler, auf ihre Extraktionsleistung untersucht werden. Des Weiteren soll eine geeignete Akzeptorphase identifiziert werden.
- Die eingesetzten Reaktivextraktionssysteme sollen auf ihre Biokompatibilität überprüft werden.
- Eine Anlage für die *in situ* Abtrennung von 2,3- und 3,4-*trans*-CHD aus einer Fed-Batch Fermentation soll aufgebaut und optimiert werden.
- Der Einfluss der organischen Phase während der *in situ* Aufarbeitungsphase auf die Produktbildung der Zellen im Bioreaktor soll untersucht werden.

Ausgehend von den gewonnenen *trans*-Cyclohexadien-Derivaten sollen im Rahmen des CHORUS-Projektes im Bereich der bioorganischen Chemie am IBT 2 unter der Leitung von Prof. Müller eine Vielzahl von Folgeprodukten synthetisiert werden. Weiterhin soll eine Ökobilanzierung des zu entwickelnden Prozesses durch die Arbeitsgruppe von Dr. Sell (DECHEMA) durchgeführt werden.

3 Stand des Wissens

3.1 Biologische Grundlagen

3.1.1 Das Bakterium *Escherichia coli*

Das Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) ist gram-negativ, stäbchenförmig und peritrich begeißelt (Abb. 3.1). *E. coli* gehört zur Familie der Enterobacteriaceae (griechisch „enteron“: Darm) (Neidhardt 1996; Schlegel 1992). Es dient als Indikator für die fäkale Verunreinigung von Wasser. *E. coli* ist eines der am besten untersuchten Mikroorganismen (Schlegel 1992). Das relativ kleine Genom von *E. coli* ($\sim 5 \cdot 10^6$ Kilobasenpaare) wurde als eines der ersten Prokaryonten vollständig sequenziert (Blattner et al. 1993). *E. coli* gilt deswegen unter anderem als ein Modellorganismus der modernen Biotechnologie (Römpf 1999). Es gehört zu den fakultativ anaeroben Mikroorganismen und besitzt damit die Fähigkeit, Energie sowohl durch Atmung als auch durch gemischte Säuregärung zu gewinnen. *E. coli* kann leicht auf synthetischen Nährlösungen aus Kohlenstoffquelle, Mineralien- und Ammonium-Salzen kultiviert werden. Unter Verwendung komplexer Medien (z. B. Hefeextrakt, Pepton) kann die Generationszeit 20 bis 60 Minuten betragen. *E. coli* ist ein mesophiler und neutrophiler Organismus. Das bedeutet, dass das Bakterium für die Kultivierung eine Temperatur von 37°C und einen pH-Wert im Bereich zwischen 6,0 und 7,8 benötigt. *E. coli* dient als Basis für eine Vielzahl von Erkenntnissen über die genetischen und stoffwechselphysiologischen Vorgänge in Prokaryonten. Aufgrund dieser Fakten findet *E. coli* eine breite Verwendung in der modernen Biotechnologie (Neidhardt 1996).

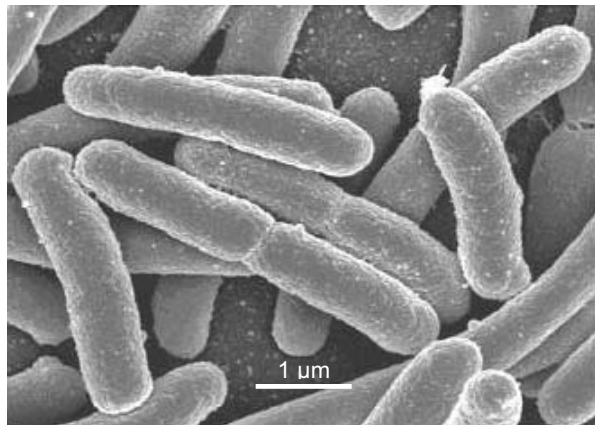


Abb. 3.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *E. coli* (Quelle: www3.niaid.nih.gov)

3.1.2 Stoffwechselwege in *E. coli*

Die Bakterien-Familie der Enterobacteriaceae besitzt die Fähigkeit, eine breite Palette unterschiedlicher Kohlenstoffquellen zu verwerten. Diese Prokaryonten können u. a. viele

organische Säuren, zum Beispiel Acetat und Kohlenhydrate wie Glukose, Mannose und Fruktose, als Substrat verwerten.

Glukoseverwertung

Die Aufnahme von Glukose und anderer Kohlenhydrate erfolgt in *E. coli* durch das Phosphotransferase-System (PT-System) (Chen et al. 1997a; Chen et al. 1997b; Ferenci 1996; Lengeler et al. 1999). Bei diesem System handelt es sich um eine Gruppentranslokation. Die Glukosemoleküle werden während des aktiven Transportes in die Zelle über eine Phosphorylierungskaskade chemisch zu Glukose-6-Phosphat modifiziert. Die Affinität für die Aufnahme von Glukose kann bei dem Glukose-spezifischen PT-System einen K_m -Wert² von 3 bis 10 $\mu\text{mol/l}$ erreichen (Ferenci 1996; Postma et al. 1993). Des Weiteren kann Glukose auch über das Mannose-spezifische PT-System mit einem höheren K_m -Wert von 1 mmol/l aufgenommen werden (Ferenci 1996).

Die Glukoseverwertung bei *E. coli* als fakultativ anaerober Mikroorganismus findet unter aeroben Bedingungen zu 70% über den Fructosebisphosphat-Weg (Glykolyse) und den Tricarbonsäure-Zyklus (TCA-Zyklus) statt (Abb. 3.2) (Lengeler et al. 1999). Auf diesem Weg werden ATP und Reduktionsäquivalente wie NADH_2 und FADH_2 und Zwischenprodukte wie Pyruvat und PEP gebildet. Die Intermediate Pyruvat und PEP sind Vorstufen für viele Biosynthesewege. Sowohl NADH_2 als auch FADH_2 können in der Atmungskette zur Bildung von ATP verwendet werden. Die aerobe Veratmung von 1 Mol Glukose kann in *E. coli* zur Bildung von bis zu 26 ATP führen (Schlegel 1992).

Der Tricarbonsäure-Zyklus spielt eine wichtige Rolle in der Bereitstellung vieler Ausgangsstoffe der Biosynthese. Die Reaktion von Pyruvat zu Acetyl-CoA und die Synthese mit Oxalacetat zu Citrat stellt eine Verbindung zwischen Glykolyse und TCA-Zyklus her (Abb. 3.2). Eine weitere Verbindung besteht über die anaplerotischen Reaktionen. Der Entzug von PEP kann durch die anaplerotischen Reaktionen ausgeglichen werden. Des Weiteren kann PEP durch die Phosphorylierung von Pyruvat zu PEP, katalysiert durch die PEP-Synthase (*Pps*), biosynthetisiert werden (Abb. 3.2).

Ungefähr 30% der Glukose werden in *E. coli* unter aeroben Bedingungen über den Pentose-Phosphat-Weg (PP-Weg) verwertet (Abb. 3.2). Der Pentose-Phosphat-Weg stellt der Zelle eine Vielzahl von Intermediaten bereit. Ribose-5-Phosphat wird für die Nucleotidsynthese und Erythrose-4-Phosphat für die Synthese von aromatischen Aminosäuren eingesetzt. Für die Synthese von Erythrose-4-Phosphat sind zwei enzymatische Reaktionen entscheidend. Durch die Transketolase (*Tkt*) wird ein C_2 -Fragment von Fructose-6-Phosphat auf Triosephosphat (Glyceral-3-Phosphat) übertragen (Abb. 3.2). Dadurch entstehen Xylulose-5-Phosphat und Erythrose-4-Phosphat. Unter der katalytischen Reaktion des Enzyms Transaldolase (*Tal*) dient Erythrose-4-Phosphat als Akzeptor für ein C_3 -Fragment. Donator des C_3 -Fragments ist Fructose-6-Phosphat. Als Produkt entstehen Sedoheptulose-7-Phosphat und Glyceral-3-Phosphat. In einer weiteren Transketolasereaktion werden durch C_2 -Transfer von Sedoheptulose-7-Phosphat als Donor Ribose-5-Phosphat und Xylulose-5-Phosphat gebildet (Neidhardt 1996).

² K_m -Wert – Michaelis Menten Konstante: beschreibt die Konzentration, bei der 50% der maximalen Substrat-Transportrate erreicht wird

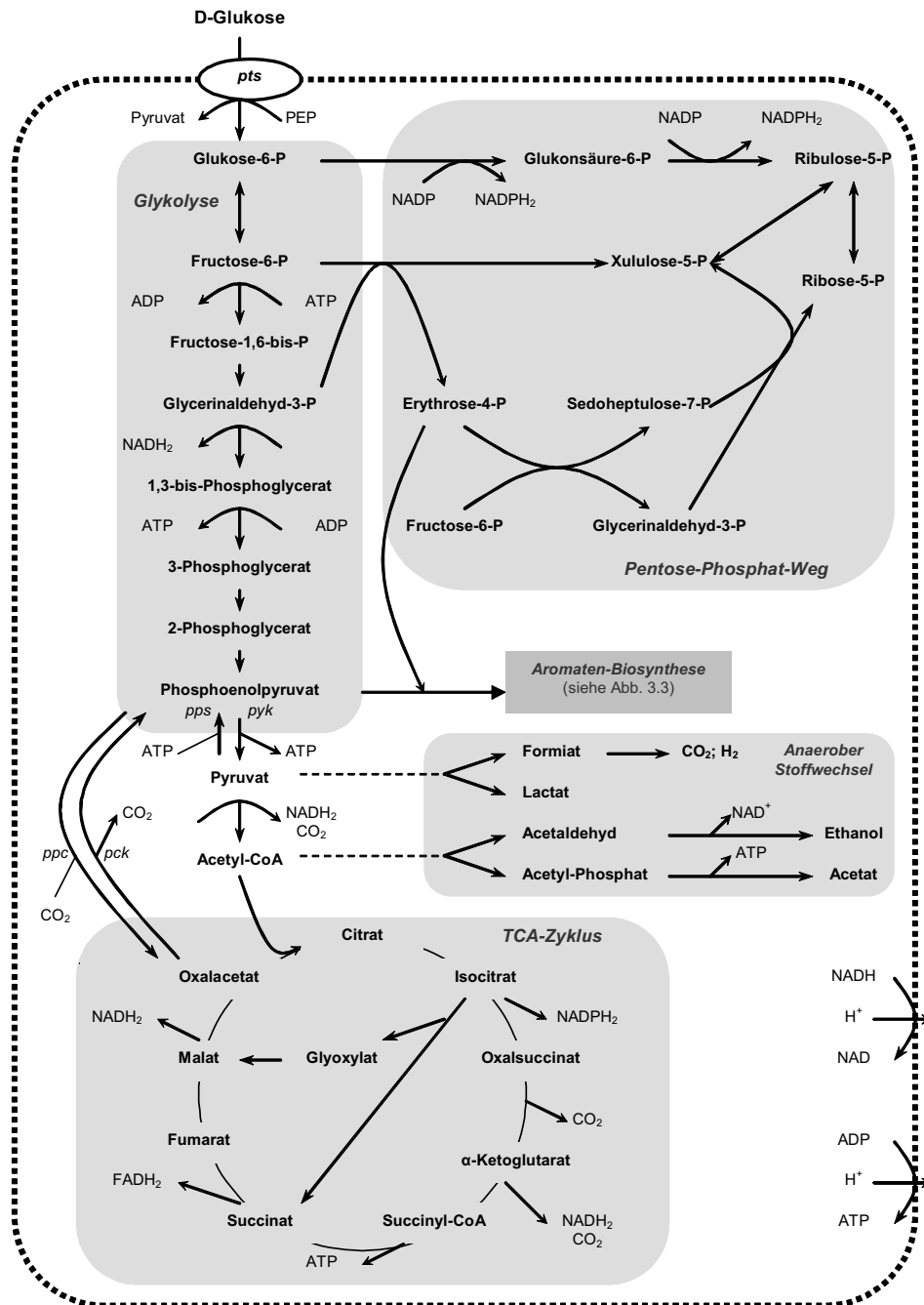


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der Glukoseverwertung in *E. coli*. Die über das PT-System aufgenommene Glukose wird durch die Glykolyse, den Pentose-Phosphat-Weg und den Tricarbonsäure-Zyklus (TCA-Zyklus) verwertet.

Eine untergeordnete Rolle in der Glukoseverwertung bei *E. coli* spielt der Entner-Doudoroff-Weg, auch 2-Keto-3-Desoxy-6-PhosphoGlukonat-Weg genannt. Die Zucker werden dabei zu Pyruvat und weiter zu Ethanol und CO₂ abgebaut. Dieser Biosyntheseweg liefert nur je ein Mol ATP, NADH₂ und NADPH₂ pro Mol des eingesetzten Kohlenhydrats (Schlegel 1992). Über den Entner-Doudoroff-Weg kann *E. coli* auch Glukonsäure verstoffwechseln (Lengeler et al. 1999).

Unter anaeroben Bedingungen besitzt *E. coli* die Fähigkeit der Gewinnung von Energie über die gemischte Säuregärung (Abb. 3.2). Bei der Gärung werden organische Substanzen zu Kohlendioxid, Protonen und organischen Säuren wie Acetat, Formiat und Lactat abgebaut. Diese Verbindungen dienen der Zelle anstelle von Sauerstoff als Elektronenakzeptor. Die Gärung ist ein ATP-regenerierender Stoffwechselprozess, bei dem aus 1 Mol Glukose 2 bis 3 Mol ATP gewonnen werden können (Neidhardt 1996; Schlegel 1992).

Bei einer Überversorgung mit Glukose erfolgt bei *E. coli* eine Glukose-Überschuss-Reaktion (Crabtree-Effekt) (Ko et al. 1993; Xu et al. 1999a; Xu et al. 1999b). Trotz ausreichender Versorgung mit Sauerstoff werden Abbauprodukte der Glykolyse, wie Acetat, akkumuliert. Dabei wird Acetyl-CoA zu Acetyl-Phosphat und anschließend zu Acetat umgesetzt. Bei dieser Reaktion wird ein Molekül ATP pro Molekül Acetat synthetisiert. Die Akkumulation von Acetat kann das Wachstum und die Produktbildung hemmen (Luli et al. 1990). Eine Minimierung dieser Reaktion kann durch die Verstärkung der anaplerotischen Flüsse erreicht werden (Farmer et al. 1997).

3.1.3 Shikimat-Biosyntheseweg in *E. coli*

Über den Shikimat-Biosyntheseweg, auch Aromaten-Biosyntheseweg genannt, werden in Bakterien, Pflanzen und Pilzen (u.a. Hefen) unter anderem die aromatischen Aminosäuren L-Tyrosin, L-Phenylalanin und L-Tryptophan synthetisiert. Die Aromaten-Biosynthese dient dem Prokaryonten ebenfalls zur Synthese von Menachinon, Enterobactin, Folsäure und weiterer Metabolite (Frost et al. 1995; Knaggs 2003; Pittard 1996).

Die Intermediate für die Synthese der aromatischen Aminosäuren leiten sich von den Vorläufermetaboliten PEP (Glykolyse) und Erythrose-4-Phosphat (Pentose-Phosphat-Weg) ab (Abb. 3.2). Die Biosynthese aller aromatischen Aminosäuren verläuft bis zum Chorismat gleich (Abb. 3.3).

Die optimale Substratverwertung verbunden mit einem schnellen Wachstum verschafft *E. coli* einen Vorteil gegenüber anderen Mikroorganismen. Für die optimale Proteinsynthese ist eine konstante Versorgung mit Aminosäuren Voraussetzung. Deswegen verfügen die Zellen über komplexe Regulationsmechanismen, um die Synthese der Aminosäuren an den Bedarf der Zelle anzupassen (Frost et al. 1995; Knaggs 2003; Neidhardt 1996; Pittard 1996). Die Regulationssysteme in Mikroorganismen ermöglichen eine maximale Verwertung von Substraten und die optimale Produktion von Metaboliten. Eine wirkungsvolle Form der Regelung der Synthese ist die allosterische Hemmung des Enzyms 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulon-7-Phosphat-Synthase (DAHP-Synthase) durch die drei aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan (Frost et al. 1995; Knaggs 2003; Pittard 1996). Dabei wird das betroffene Isoenzym DAHP-Synthase durch erhöhte intrazelluläre Konzentrationen der aromatischen Aminosäuren gehemmt. Bei der DAHP-Synthase, kodiert durch die Gene *aroF*, *aroG* und *aroH*, handelt es sich um drei

isofunktionelle Metalloenzyme. Die Aminosäure L-Tryptophan inhibiert die durch *aroH* kodierte DAHP-Synthase zu maximal 60% (Pittard 1996).

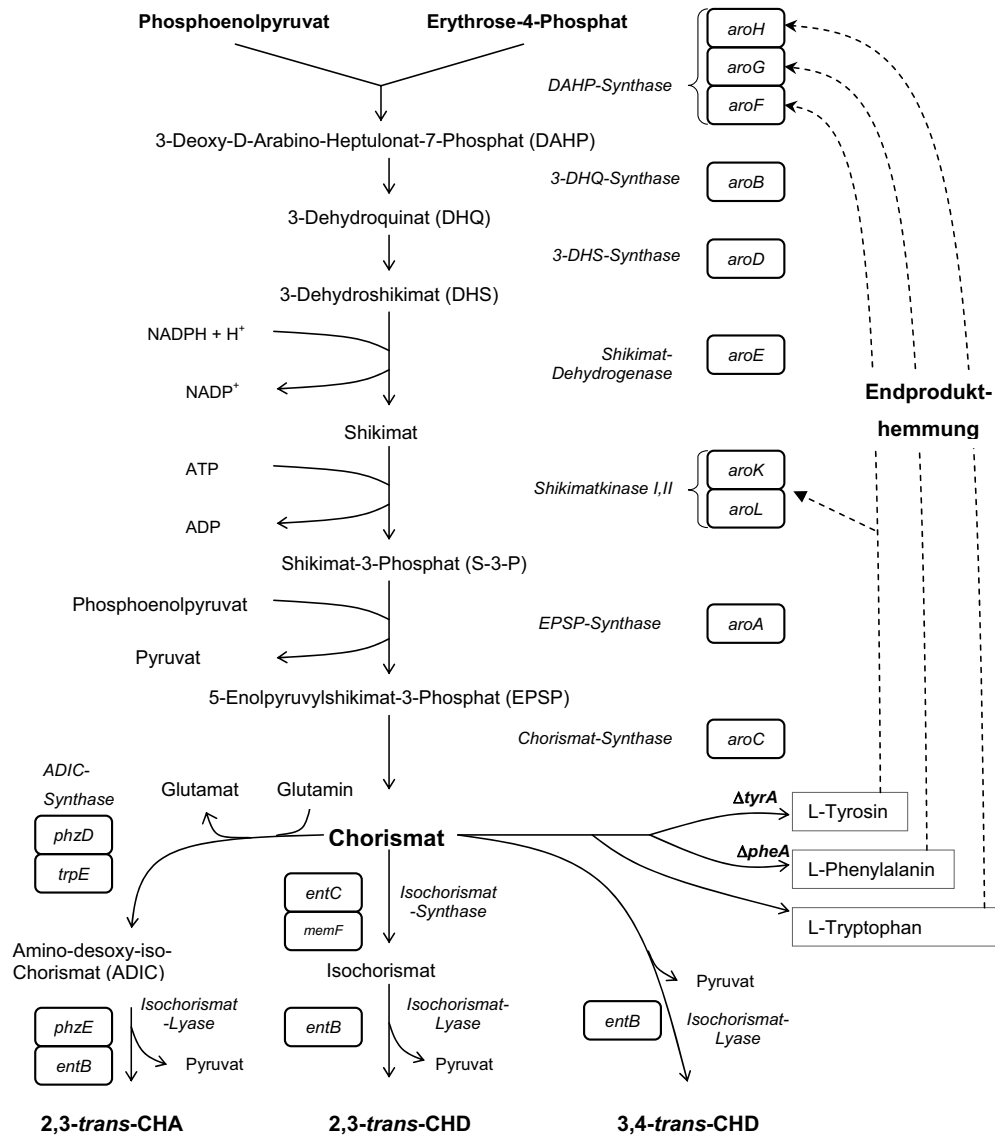


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der Aromaten-Biosynthese bis Chorismat und der Biosynthese der Produkte 2,3-*trans*-CHA, 2,3- und 3,4-*trans*-CHD.

L-Phenylalanin inhibiert hauptsächlich die von *aroG* kodierte DAHP-Synthase. Das Gen *aroF* kodiert die DAHP-Synthase, die von L-Tyrosin gehemmt wird. Bei hohen L-Phenylalaninkonzentrationen erfolgt jedoch auch eine Hemmung dieser L-tyrosinspezifischen DAHP-Synthase (Frost et al. 1995; Knaggs 2003; Pittard 1996). Die Hemmung der spezifischen DAHP-Synthase durch die jeweiligen Aminosäuren L-Phenylalanin oder L-Tyrosin wirkt sich bis zu ungefähr 95% aus (Pittard 1996).

Ein weiteres Angriffsziel der Regulationsmechanismen auf die L-tyrosinspezifische DAHP-Synthase ist die Transkription. Die aromatischen Aminosäuren wirken dabei als Corepressoren. Die Transkription wird reprimiert durch die Aktivierung des *tyrR*-Regulons (Pittard 1996). Die Repression tritt schon bei einer L-Tyrosinkonzentration höher als 36 mg/l ein und wirkt fast vollständig (86%) inhibierend (Förberg et al. 1988). Die gleichen L-Tyrosinmengen wirken ebenfalls hemmend auf die Transkription des L-phenylalaninspezifischen Enzyms.

Ein weiterer regulatorischer Angriffspunkt in der Aromaten-Biosynthese ist die Repression der Transkription des Gens *aroL* der Shikimatkinase II. Dabei lösen erhöhte L-Tyrosin- und L-Tryptophankonzentrationen den Regulationsmechanismus aus. Diese Repression kann die Translation von Shikimatkinase II auf 10 % reduzieren (Ely et al. 1979).

Als reaktionslimitierende Schritte bei der Aromaten-Biosynthese wurden ebenfalls die Aktivitäten der Enzyme 3-Dehydroquinat-Synthase, 5-Enol-Pyruvoyl-Shikimat-3-Phosphat-Synthase und Chorismatsynthase identifiziert (Dell et al. 1993). Alle anderen an der Aromaten-Biosynthese beteiligten Enzyme werden weder reguliert noch reprimiert, bzw. die Mechanismen sind nicht bekannt (Knaggs 2003; Pittard 1996).

3.1.4 *E. coli* als Produktionsstamm

E. coli zeichnet sich durch eine hohe Substratausbeute für Kohlenhydrate wie Glukose und eine hohe Wachstumsrate aus (Förberg et al. 1988). Das Bakterium wird unter anderem zur Synthese von Aminosäuren wie L-Phenylalanin eingesetzt (Gerigk 2001; Rüffer 2004). Unter Verwendung molekulargenetischer Methoden werden gezielt Stoffwechselwege in Mikroorganismen verändert, um eine erhöhte Produktbildung zu erreichen (Bongaerts et al. 2001). Bei der Bildung von aromatischen Aminosäuren durch Mikroorganismen wird die gentechnische Optimierung verstärkt auf den Aromaten-Biosyntheseweg konzentriert (Bongaerts et al. 2001; Frost et al. 1995; Patnaik et al. 1994; Patnaik et al. 1995; Patnaik et al. 1995b; Pittard 1996). In Wildtypstämmen werden mehrere Enzyme durch die Endprodukthemmung reguliert (Kap. 3.1.3; Abb. 3.3). Die entsprechenden Enzyme können durch die deregulierten „feedback“-resistenten Varianten ersetzt werden. So wird das Gen der L-tyrosinspezifischen DAHP-Synthase, die Erythrose-4-Phosphat und PEP zu DAHP kondensiert, durch das „feedback“-resistente Gen *aroF^{fb}* ersetzt (Backman et al. 1990).

In der Arbeit von Frost (Frost et al. 1995) wurden weitere Enzyme der Aromaten-Biosynthese auf ihre limitierende Wirkung auf die L-Phenylalaninbildung untersucht. Durch eine Überexpression der Enzyme EPSP-Synthase (*aroA*), 3-Dehydroquinat synthase (*aroB*), Chorismatsynthase (*aroC*) und Shikimatkinase II (*aroL*) konnte eine erhöhte Produktausbeute erreicht werden.

Bei der Biosynthese der Produkte der Aromaten-Biosynthese werden oft Stämme mit L-Tyrosin-Auxotrophie eingesetzt. Dadurch besteht die Möglichkeit, das Wachstum der Biomasse über die Zufuhr von L-Tyrosin zu regeln. Die Untersuchungen zeigten eine optimale L-Phenylalaninbildung bei der Fermentation, bei der nach einer Wachstumsphase

mit einer annähernd maximalen Wachstumsrate die L-Tyrosinzufuhr anschließend limitiert wurde (Förberg et al. 1988). Um die Biosynthese von L-Tyrosin zu verhindern, wurde das für die spezifische Synthese von L-Tyrosin benötigte Gen *tyrA* aus dem *E. coli*-Genom durch Deletion oder Mutation ausgeschaltet. Entsprechend kann die L-Phenylalaninbildung durch die Deletion des Enzyms Chorismat-Mutase/ Prephenatdehydratase, kodiert durch das Gen *pheA*, verhindert werden. Damit entstehen L-Tyrosin und L-Phenylalanin auxotrophe Stämme.

Eine Optimierung der Synthese von DAHP, des ersten Intermediats der Aromaten-Biosynthese, konnte durch die Überexpression der Enzyme PEP-Synthase und Transketolase erreicht werden (Abb. 3.2) (Patnaik et al. 1994; Patnaik et al. 1995).

3.1.5 Prozesstechnische Optimierungen bei *E. coli* Produktionsstämmen

Neben der gentechnischen Optimierung der Produktionsstämmen können auch prozesstechnische Fortschritte zu einer verbesserten Produktbildung führen. In den Arbeiten von Konstantinov (Konstantinov et al. 1991; Konstantinov et al. 1990a; Konstantinov et al. 1990b) wurde unter anderem der Einfluss unterschiedlicher Substratkonzentrationen auf die Produkt- und Nebenproduktbildung bei L-Tyrosinlimitierung untersucht. Es wurde eine erhöhte Bildung des Nebenproduktes Acetat nach Beginn der L-Tyrosinlimitierung festgestellt. Da Acetat eine inhibierende Wirkung auf Mikroorganismen hat, ist eine Reduzierung der Acetatbildung vorteilhaft. Bei einem Überschuss an Kohlenhydraten kann die Acetatbildung auch bei aerober Kultivierung auftreten. Das überschüssige Substrat kann durch die abzweigenden Wege der Glykolyse nur eingeschränkt verstoffwechselt werden (Crabtree Effekt, Kap. 3.1.2) (Ko et al. 1993; Xu et al. 1999b). Dadurch wird die maximale Oxidationskapazität der Zelle überschritten und die Intermediate PEP und Pyruvat werden akkumuliert. Treten hohe Intermediatkonzentrationen auf, werden sie in Form von Acetat aus der Zelle ausgeschieden. Bei Untersuchungen in Fed-Batch Experimenten wurde bei Acetatkonzentrationen über 5 g/l ein Abbruch der Produktbildung festgestellt (Konstantinov et al. 1991; Konstantinov et al. 1990a). Es zeigte sich, dass eine Minimierung der Acetatbildung eine ausreichende Glukoselimitierung voraussetzt. Bei strenger Glukoselimitierung trat jedoch eine verstärkte Kohlendioxidbildung auf.

Eine Optimierung des Fermentationsprozesses konnte durch einen von der Substratzufuhr entkoppelten L-Tyrosinzulauf in der Wachstumsphase erreicht werden (Takagi et al. 1996). Die Reduktion dieses Zulaufs in der Produktionsphase kompensierte den L-Tyrosinverbrauch durch den Erhaltungsstoffwechsel, so dass sich eine L-Tyrosinlimitierung einstellte. Eine Optimierung dieses Ansatzes wurde durch den Einsatz einer indirekten Regelung der Aminosäuren-Zufuhr bei auxotrophen Produktionsstämmen erreicht (Gerigk 2001). Die Regelung basierte auf einem empirischen Zusammenhang zwischen der volumetrischen Sauerstoffverbrauchsrate und der L-Tyrosinverbrauchsrate (Kap. 4.3.6; Gl. 4-3, S. 55). Die Limitierung der L-Tyrosinkonzentration während der Wachstums- und Produktionsphase erlaubte die Verwendung von „Wildtyp“-Enzymen, z. B. der L-tyrosinspezifischen DAHP-Synthase. Durch den Einsatz der „Wildtyp“-Varianten dieser Enzyme konnte im Vergleich zu den „feedback“-resistenten Varianten eine Verbesserung der Produktbildung erreicht werden (Gerigk 2001; Gerigk et al. 2002a).

3.1.6 Struktur und physiologische Bedeutung der *trans*-Cyclohexadien-Derivaten

Die *trans*-Cyclohexadien-Derivate 2,3-*trans*-CHD, 3,4-*trans*-CHD und 2,3-*trans*-CHA kommen in der Natur als Folgemetabolite des Aromaten-Biosyntheseweges vor (Kap. 3.1.3, Abb. 3.3). Die Carbonsäure fungiert bei diesen Verbindungen als funktionelle Gruppe. Die *trans*-CHDs verfügen über zwei *trans*-konfigurierte Hydroxy-Gruppen. 2,3-*trans*-CHA verfügt anstelle einer Hydroxy- über eine Amino-Gruppe (Abb. 3.4). Die Bedeutung dieser Moleküle als Ausgangsverbindung zur Synthese pharmakologisch interessanter Wirkstoffe nahm in den letzten Jahren zu. Das Produkt 2,3-*trans*-CHD ist in *E. coli* ein Intermediat der Biosynthese zu dem Eisenchelator Enterobactin (Abb. 3.5) (Gehring et al. 1997). Eine physiologische Bedeutung der Produkte 3,4-*trans*-CHD und der β -Aminosäure 2,3-*trans*-CHA ist bis jetzt nicht bekannt. Mittels Hydrolasen kann das Produkt jedoch durch enzymatische Spaltung *in vitro* (Young et al. 1969) und *in vivo* (Müller et al. 1996) aus Chorismat synthetisiert werden.

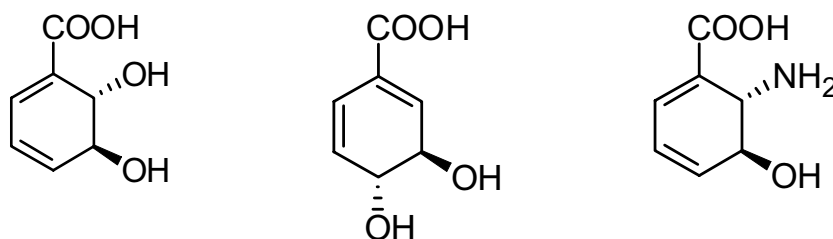


Abb. 3.4: Die chemische Struktur der Produkte 2,3-*trans*-CHD (links), 3,4-*trans*-CHD (Mitte) und 2,3-*trans*-CHA (rechts).

Das Produkt 2,3-*trans*-CHD ist in einer wässrigen Lösung mit extremen pH-Werten (bis 3 und ab 11) oder bei Temperaturen ab 85°C instabil (Franke 2002). Unter diesen Bedingungen tritt eine schnelle Aromatisierung ein. Als Abbauprodukt kann unter sauren Bedingungen 2- und 3-Hydroxybenzoesäure entstehen. Im basischen Milieu zerfällt 2,3-*trans*-CHD zu 3-Hydroxybenzoesäure und 2,3-Dihydroxybenzoesäure. Im pH-Bereich zwischen 4 und 10 und einer Temperatur unter 80°C wurde eine Zerfallskonstante von unter 0,1 d⁻¹ beobachtet (Franke 2002). Eine Untersuchung der Zerfallskonstante für die Produkte 2,3-*trans*-CHA und 3,4-*trans*-CHD ist nicht bekannt.

3.1.7 Mikrobieller Zugang zu den Cyclohexadien-Derivaten

Der Vorteil der mikrobiellen Synthese von *trans*-CHD und *trans*-CHA ist die Enantiomerenreinheit. Damit entsteht ein ideales Ausgangsmaterial für die Naturstoff- und Wirkstoffsynthese.

Erkenntnisse, die bei der Produktion von aromatischen Aminosäuren gewonnen wurden, können eingesetzt werden, um mikrobielle *trans*-CHD Produzenten zu konstruieren. Ein optimierter Stofffluss in der Aromaten-Biosynthese bis Chorismat kann durch eine plasmidkodierte oder chromosomale Überexpression von Genen gewährleistet werden, die für potenziell limitierende Enzyme (Kap. 3.1.3; Abb. 3.3) kodieren (Bongaerts et al. 2001).

Das Produkt 2,3-*trans*-CHD kann, ausgehend von Chorismat, durch zwei enzymatische Reaktionsschritte gebildet werden (Abb. 3.5). Dabei katalysiert das Enzym Isochorismat-Synthase, kodiert durch das Gen *entC*, die Synthese von Chorismat zu Isochorismat. Die Isochorismat-Lyase (Gen *entB*) katalysiert die Synthese von Isochorismat zu 2,3-*trans*-CHD durch die Abspaltung von Pyruvat (Gehring et al. 1997). Der K_m -Wert dieser Reaktion beträgt 14 μ M (Rusnak et al. 1990). Die nachfolgende Reaktion von 2,3-*trans*-CHD zu 2,3-Dihydroxy-Benzoat wird durch das Enzym 2,3-Dihydroxy-Benzoat-Synthase (Gen *entA*) katalysiert. Durch mehrere nachfolgende Reaktionen entsteht das Siderophor Enterobactin. Enterobactin löst extrazellulär Eisen aus seinen Salzen und spielt eine Rolle beim Transport von Schwermetallen in die Zelle (Seiffert et al. 1993).

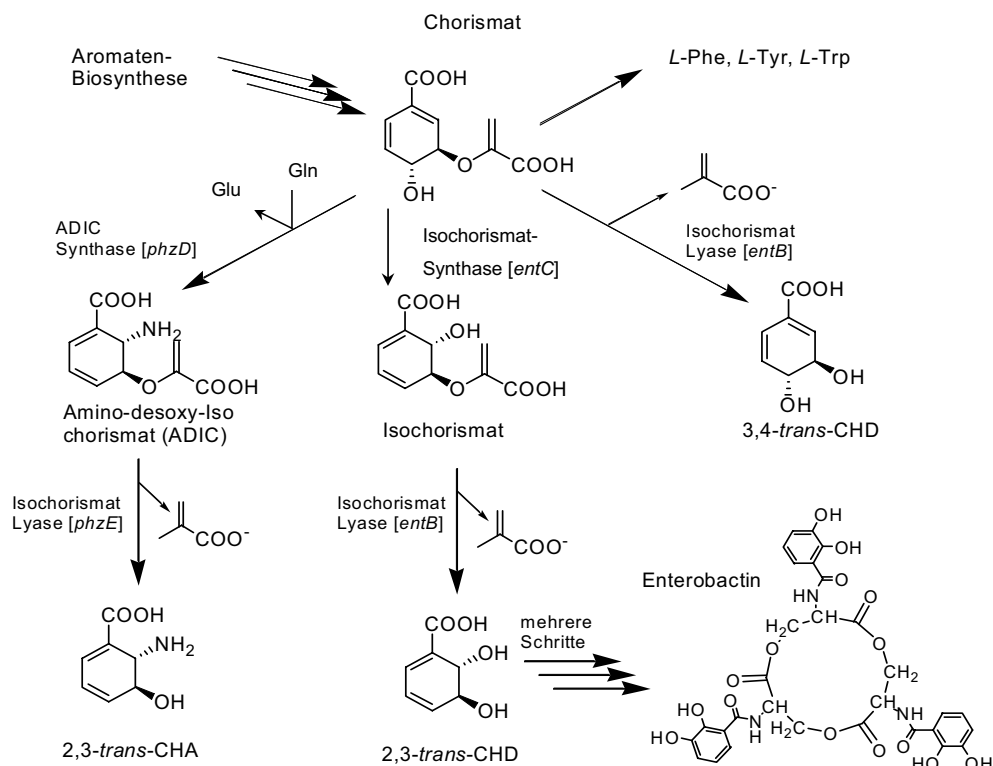


Abb. 3.5: Biosynthesewege zu 2,3-*trans*-CHA, 2,3- und 3,4-*trans*-CHD ausgehend von dem Intermediat Chorismat.

Das Produkt 3,4-*trans*-CHD kann über die Abspaltung von Pyruvat aus Chorismat gewonnen werden. Diese Reaktion wird ebenfalls durch das Enzym Isochorismat-Lyase (Gen *entB*) katalysiert (Franke 2002). Die Isochorismat-Lyase weist für diese Reaktion jedoch eine signifikant niedrigere Substrataffinität auf. Der K_m -Wert beträgt dabei mehr als 37 mM (Rusnak et al. 1990).

Durch die plasmidkodierte oder chromosomale Überexpression der Gene *entC* und/oder *entB* kann der metabolische Fluss von Chorismat in Richtung der *trans*-CHDs verstärkt werden. In der Arbeit von Franke (Franke 2002) konnte gezeigt werden, dass die

plasmidkodierte Überexpression dieser Gene eine mikrobielle Produktion von 2,3-*trans*-CHD ermöglicht. Durch den Einsatz von *E. coli*-Produktionsstämmen mit einer Deletion des Gens *entA* konnte eine hohe Produktbildung von maximal 4,6 g/l erreicht werden. Dadurch konnte die Folgebiosynthese von 2,3-*trans*-CHD zu Enterobactin verhindert werden.

Die Biosynthese von 3,4-*trans*-CHD konnte durch den Einsatz von *E. coli*-Produktionsstämmen mit einer plasmidkodierten Überexpression des Gens *entB* optimiert werden. Dabei wurden in Schüttelkolben-Experimenten bis zu 0,7 g/l 3,4-*trans*-CHD gebildet (Franke 2002). Der mikrobielle Zugang zum 2,3-*trans*-CHA kann durch die plasmidkodierte oder chromosomale Überexpression der Gene *phzD* und *phzE* erreicht werden (Abb. 3.5). Ausgehend von Chorismat kann mittels des Enzyms ADIC-Synthase (Gen *phzD*) das Molekül Amino-Desoxy-Isochorismat biosynthetisiert werden. Die Synthese von 2,3-*trans*-CHA erfolgt über die Abspaltung von Pyruvat von Amino-Desoxy-Isochorismat durch das Enzym Isochorismat-Lyase (Gen *phzE*). Der Zugang wurde von McCormick et al. (McCormick et al. 1962) mit dem Stamm *Streptomyces aureofaciens* mit einer maximalen Konzentration von über 6 g/l 2,3-*trans*-CHA beschrieben.

3.2 Chemische Grundlagen

3.2.1 Verfahren zur chemischen Synthese von Cyclohexadien-Derivaten

Die chemische Synthese von *trans*-CHD kann durch Totalsynthese aus *cis*-CHD verwirklicht werden. Die Umsetzung erfolgt durch Inversion eines Stereozentrums oder durch Hydrolyse von mikrobiell erzeugten Enolpyruvoylverbindungen (Franke 2002). Diese Synthese ist jedoch mit einer niedrigen Ausbeute und hohen Kosten verbunden.

Die chemische Synthese von 2,3-*trans*-CHD kann ebenfalls über funktionalisierte Benzen-Epoxide umgesetzt werden (DeMarinis et al. 1974). Die Ausbeute eines regio- und stereoselektiven Produktes beträgt bei diesem Syntheseweg 5%. Andere Synthesewege führen zu racematischen Produkten (Trost et al. 1998).

Die mehrstufige chemische Synthese von 3,4-*trans*-CHD führt zu einem racemischen Produkt mit einer Ausbeute von 20% (DeMarinis et al. 1974). Die Überführung des racemischen Produktes in die enantiomerenreine Form ist bis jetzt noch nicht untersucht.

Nachteil der chemischen Synthese von *trans*-CHD ist die geringe Ausbeute, eine Vielzahl von Syntheseschritten sowie die Bildung von racemischen Produkten. Ein weiterer Nachteil der chemischen Synthese von *trans*-CHD ist die Verwendung von giftigen, explosiven oder umweltgefährdenden Substanzen. Durch die aufwendige Syntheseführung ist die Umsetzung in den präparativen Maßstab kompliziert und unökonomisch. Zu den *trans*-CHDs bestand bis vor kurzem kein effizienter Zugang. Dementsprechend gibt es nur wenige Synthesebeispiele und keine Wirkstoff-Anwendungen (Franke 2002). Der ökonomisch günstigere Zugang zu den *trans*-CHD-Verbindungen, zum Beispiel mittels biotechnologischer Verfahren, könnte die Wirkstoff-Forschung ausgehend von CHD-Molekülen vorantreiben.

Im Gegensatz zu den *trans*-CHDs, lassen sich die *cis*-CHDs durch mikrobielle Oxidation *via* Dioxygenase-Katalyse aus den Aromaten herstellen (Gibson et al. 1970; Gibson et al. 1968). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde eine große Anzahl pharmakologisch interessanter Naturstoffe und Wirkstoffe synthetisiert (Hudlicky et al. 1991).

3.3 Verfahrenstechnische Grundlagen der Produktabtrennung

Die effiziente Gewinnung des Produktes aus dem Fermentationsüberstand gehört unverzichtbar zu der Entwicklung eines erfolgreichen Produktionsprozesses. Nach der Abtrennung der Biomasse mittels Filtrationsanlagen wird das Produkt aus der Fermentationsbrühe separiert. Die Gewinnung des Produktes kann unter anderem über Kristallisation, Ionenaustauschchromatographie, Elektrodialyse oder das Extraktionsverfahren erfolgen.

3.3.1 Grundlagen der Extraktion

Die Bezeichnung Extraktion stammt von dem lateinischen Wort „extrahere“ (herausziehen) ab. Die Extraktion ist ein klassisches Verfahren, welches zur Aufkonzentrierung von Zielsubstanzen eingesetzt wird. Bei der Extraktion wird das Produkt mit Hilfe eines Extraktionsmittels entweder aus einem Feststoff (Fest-Flüssig-Extraktion) oder aus einer flüssigen Mischphase zweier Flüssigkeiten (Flüssig-Flüssig-Extraktion) abgetrennt (Römpf 1999). Zwischen dem Lösungsmittel und der gelösten Substanz soll keine chemische Reaktion stattfinden.

Fest-Flüssig-Extraktion

Bei diesem Trennverfahren werden Substanzen zwischen der festen stationären Phase und der flüssigen mobilen Phase ausgetauscht. Als Beispiele für die Fest-Flüssig-Extraktion kann die Extraktion von pflanzlichen Ölen aus Ölsamen (Raps, Mais) mit Hexan oder die Extraktion von Mineralsalzen aus Erzen genannt werden (Römpf 1999).

Flüssig-Flüssig-Extraktion

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion beruht auf der Unlöslichkeit des Extraktionsmittels mit der ursprünglichen Lösung und der Ausbildung eines Zweiphasengemisches. Die Voraussetzung für ein erfolgreiches Verfahren liegt in der Löslichkeit des Produktes im Extraktionsmittel. Im technischen Maßstab zur quantitativen Trennung von Substanzen mit geringen Löslichkeitsunterschieden werden spezielle Verfahren wie die Gegenstromextraktion eingesetzt. Als Beispiel kann die kontinuierliche Gegenstromextraktion von Penicillin aus einer wässrigen Lösung mittels des Lösungsmittels Amyl- oder Butylacetat genannt werden (Römpf 1999). Die zu extrahierende Lösung und das Lösungsmittel werden an den entgegengesetzten Enden einer Reihe von Extraktionsstufen zugegeben und wandern kontinuierlich im Gegenstrom durch das System. Der Prozess beruht auf der unterschiedlichen Verteilung des Produktes zwischen den beiden nichtmischbaren Phasen und wird durch das Nernst'sche Verteilungsgesetz beschrieben:

$$K = \frac{c_{org}}{c_w} \quad (3-1)$$

K	Verteilungskoeffizient	
c_{org}	Konzentration in der organischen Phase	[g/l]
c_w	Konzentration in der wässrigen Phase	[g/l]

Das Verteilungsverhalten wird durch Größen wie die Temperatur, den pH-Wert und die Ionenstärke der Lösung beeinflusst. Eine Veränderung des Verteilungsverhaltens kann durch Zusatzstoffe, die mit dem Produkt reagieren, erreicht werden (Reaktivextraktion) (Kap. 3.3.2). Eine weitere wichtige Größe bei der Beschreibung des Extraktionsverhaltens ist der Extraktionskoeffizient (Gl. 3-2). Er beschreibt die Verteilung in den Phasen:

$$E = K \cdot \frac{V_{org}}{V_w} \quad (3-2)$$

E	Extraktionskoeffizient	
V_{org}	Volumen der organischen Phase	[l/h]
V_w	Volumen der wässrigen Phase	[l/h]

3.3.2 Grundlagen der Reaktivextraktion

Eine spezielle Form der Flüssig-Flüssig-Extraktion ist die Reaktivextraktion. Bei der Trennung von Produkten, die sehr schwer in die Lösungsmittelphase übergehen, werden lipophile Gegenionen als Lösungsvermittler (engl. Carrier) eingesetzt. Diese Substanzen sind sehr gut löslich in der organischen Phase und besitzen gleichzeitig die Fähigkeit, eine Bindung mit dem Zielmolekül einzugehen. Damit können hydrophile Substanzen (z.B. Anionen, Kationen) selektiv extrahiert werden. Außerdem können durch den Einsatz der Reaktivextraktion die Verteilungskoeffizienten (Gl. 3-1) verbessert werden (Schlichting et al. 1987). Abhängig von der Zielsubstanz können unterschiedliche lipophile Gegenionen (Kap. 3.3.2.2) und Lösungsmittel (Kap. 3.3.2.3) eingesetzt werden.

Die praktischen Untersuchungen der Reaktivextraktion wurden hauptsächlich im Bereich der Abtrennung von organischen Säuren durchgeführt. Beispielhaft wurde Milch-, Malein-, Fumar-, und Bernsteinsäure mit Hilfe des lipophilen Gegenions Trioctylmethylammoniumchlorid (TOMAC) (Produktbezeichnung: Alamine 336, Aliquat 336) extrahiert (Tamada et al. 1990a; Tamada et al. 1990b; Tamada et al. 1990c). Außerdem wurde eine Vielzahl von Untersuchungen zur Abtrennung von Citrat (Bizek et al. 1992) und Oxalsäure (Kirsch et al. 1996; Kirsch et al. 1997) durchgeführt. Die Reaktivextraktion von Glukonsäure mittels unterschiedlicher Trialkylamine und Lösungsmittel (z.B. Trioktylamin (TOA)/1-Butanol) wurde von Hirth et al. (Hirth et al. 2002; Hirth et al. 2003) untersucht. Dabei wurden mit einem Anteil von 20 bis 30% des Lösungsvermittlers Tri-n-Oktylamin in der organischen Phase die höchsten Verteilungskoeffizienten erreicht. Eine weitere wichtige Zielgruppe für die Anwendung der Reaktivextraktion sind Aminosäuren. In der Arbeit von Bart (Bart et al. 1990) wurde bei basischen pH-Werten Untersuchungen zur Reaktivextraktion von L-Phenylalanin mittels quarternärer und tertiärer Amine durchgeführt. Eine Vielzahl weiterer Aminosäuren wurde in der Arbeit von Hano (Hano et al. 1991) mittels der Reaktivextraktion abgetrennt. Weiterhin wurden Alternativen zur reinen Solventextraktion bei der Gewinnung von Penicillin G mit einem Reaktivextraktionsverfahren entwickelt (Likidis et al. 1989).

3.3.2.1 Reaktivextraktion als ein Verfahren zur *in situ* Produktgewinnung

Unter einem Verfahren zur *in situ* Produktgewinnung (ISPR) versteht man die Kombination eines Fermentationsprozesses mit einem Aufarbeitungsverfahren. Durch das Zusammenführen beider Verfahren entstehen verfahrenstechnische und ökonomische Vorteile für den Gesamtprozess. Zum Beispiel kann aufgrund der räumlichen und zeitlichen simultanen Fahrweise die Anzahl der Aufarbeitungsschritte reduziert werden. Gleichzeitig werden durch die kontinuierliche Betriebsweise Volumenströme verringert und die Produktbildung pro eingesetztem Arbeitsvolumen erhöht (Freeman et al. 1993; Maass 2001). Aufgrund dieser Optimierungen können Anlagen kompakter und kostengünstiger gebaut werden. Durch die Rückführung der essentiellen Medienbestandteile wie Spurenelemente und Nährsalze kann eine Reduktion der laufenden Materialkosten bezogen auf die gebildete Produktmenge erzielt werden (Maass 2001; Martek et al. 1997). Bei Verfahren, bei denen Produkte oder Nebenprodukte mit einer inhibierenden oder toxischen Wirkung entstehen, kann durch die Reduktion der Konzentrationen die Wertschöpfung dieser Prozesse erhöht werden (Rüffer 2004; Wieczorek et al. 1998a). Alle diese Vorteile, verbunden durch die vollständige Rückführung des Mediums, erhöhen die Ausbeute eines Fermentationsverfahrens.

Ein Beispiel für die integrierte Produktabtrennung ist die Produktion und Gewinnung von Zitronensäure (Wieczorek et al. 1998a; Wieczorek et al. 1998b). Bei diesem kontinuierlichen Verfahren mit der Rückführung des Fermentationsmediums wurde als Produktionsstamm der Pilz *Aspergillus niger* eingesetzt. Als Aufarbeitungsverfahren wurde die anionenselektive Reaktivextraktion mit einer organischen Phase, bestehend aus dem Amin Tridodecylamin und dem Lösungsmittel 1-Oktanol oder/und Kerosin, verwendet. Der höchste Verteilungskoeffizient wurde mit einem System aus 30% Tridodecylamin und einem Gemisch mit einem Anteil von je 35% 1-Oktanol und Kerosin erreicht (Wieczorek et al. 1998b). Bei diesem Verfahren zeigte sich, dass diese organische Phase eine negative Wirkung auf die Produktbildung besitzt. Aus diesem Grund wurde vor der Rückführung des Fermentationsmediums ein Reinigungsschritt mit einem Aktivkohlefilter vorgeschaltet. Im Vergleich zu dem standardmäßig eingesetzten Batchverfahren konnte die Produktbildung und Produktgewinnung optimiert werden (Wieczorek et al. 1998b).

Ein weiteres Beispiel für den Einsatz integrierter Produktaufarbeitung ist die Gewinnung von L-Phenylalanin (Maass 2001; Maass et al. 2002; Rüffer 2004). Durch den Einsatz von Flüssig-Flüssig-Extraktoren für die Reaktivextraktion konnte eine Optimierung des bestehenden Fermentationsverfahrens erreicht werden. Für die selektive Reaktivextraktion dieser Aminosäuren wurde ein kationenselektives System mit dem lipophilen Gegenion D₂EHPA und dem Lösungsmittel Kerosin eingesetzt. In Biokompatibilitätsexperimenten konnte in Konzentrationen niedriger als 25 mg/l eine positive Wirkung des Lösungsvermittlers D₂EHPA auf die Produktbildung nachgewiesen werden (Maass et al. 2002). Es wurde angenommen, dass der Einsatz des lipophilen Gegenions die Zellmembrandurchgängigkeit von L-Phenylalanin erhöht hat und dadurch die Produktinhibierung reduziert wurde.

Trotz der vielen Vorteile kommt das integrierte Produktaufarbeitungsverfahren nur vereinzelt zum Einsatz. Die Gründe dafür liegen im komplexen Aufbau solcher Anlagen und der damit verbundenen Anfälligkeit für Störungen. Weiterhin führte der Eintrag toxischer Substanzen in den Fermentationsprozess zum Abbruch der Produktbildung, oder sie setzte den Einsatz unspezifischer Filtrationsverfahren (z.B. Aktivkohle) voraus (Wieczorek et al. 1998b). Die

Einführung von Bestandteilen der organischen Phase kann sich vor allem bei Substanzen, die als Endprodukte eingesetzt werden sollen, negativ auswirken.

3.3.2.2 Lipophile Gegenionen bei der Reaktivextraktion

Die entscheidenden Eigenschaften bei der Wahl eines lipophilen Gegenions sind u.a. seine Löslichkeit im organischen Lösungsmittel sowie seine thermische und chemische Stabilität (Maass 2001). Die Substanz sollte keine Tendenz zur Emulsionsbildung haben sowie eine geringe Viskosität und Dichte aufweisen. Die Wiederverwendung des Lösungsvermittlers ist eine Voraussetzung, um Kosten zu reduzieren. Der Carrier sollte selektiv sein und eine hohe Kapazität für das Produkt besitzen (Bart 2001).

Die Extraktion von organischen Säuren erfolgt durch drei Gruppen von Extraktionsmitteln: sauerstofftragende Kohlenwasserstoffe, hochmolekulare, aliphatische Amine und Phosphor-Sauerstoffverbindungen bzw. Schwefel-Sauerstoffverbindungen (Kertes et al. 1986). Die sauerstofftragenden Kohlenwasserstoffe, wie Alkohole, Ketone, Acetat und Ether, erzeugen Bindungen, die unspezifisch und schwach ausgebildet sind. Für die Extraktion der CHD-Moleküle aus Fermentationsüberständen sind diese Verbindungen deshalb nicht geeignet.

Die organischen Phosphor- und Schwefel-Sauerstoffverbindungen sind starke Basen. Das Zielmolekül wird als Kation gebunden. Ein Vertreter der organischen Phosphorverbindungen ist der flüssige Kationenaustauscher Di-2-ethylhexylphosphorsäure (D₂EHPA). Diese Verbindung eignet sich zur Extraktion von Aminosäuren (Teramoto et al. 1991). In Verbindung mit dem Lösungsmittel Kerosin wurde D₂EHPA zur Extraktion von L-Phenylalanin eingesetzt (Maass 2001; Rüffer 2004). Da die Zielmoleküle als Kationen vorliegen müssen, ist dieses lipophile Gegenion für die Extraktion von 2,3- und 3,4-*trans*-CHD nicht geeignet. D₂EHPA könnte jedoch zur Reaktivextraktion von 2,3-*trans*-CHA und anderer Verbindungen mit Amino-Gruppen verwendet werden.

Die aliphatischen Amine bilden mit dem Zielmolekül durch den Übergang von dissoziierten Säuren stabile neutrale Ionenpaarbindungen aus. Die wässrige Lösung wird wegen des mitextrahierten Säure-Protons neutralisiert. Bei den aliphatischen Aminen wird nur das Säure-Anion extrahiert. Die Ammoniumverbindungen sind wegen des höheren Verteilungskoeffizienten (Gl. 3-1) im Vergleich zu Kohlenwasserstoffen sehr effizient bei der Extraktion von Metaboliten mit Carboxyl-Gruppen. Ein Beispiel für die quarternäre Ammoniumverbindung ist das Ammoniumsalz Trioctylmethylammoniumchlorid (TOMAC) (Abb. 3.6). Dieser Anionentauscher wird häufig zur Reaktivextraktion von Aminosäuren, zum Beispiel L-Phenylalanin (Uddin et al. 1990; Uddin et al. 1992), organischen Säuren (Wieczorek et al. 1998b) oder Enzymen eingesetzt (Cardoso 1997). TOMAC gehört zu der Gruppe der ionischen Flüssigkeiten. Die ionischen Flüssigkeiten sind Salze, die praktisch keinen Dampfdruck besitzen und bei Temperaturen niedriger als 100°C schmelzen. Als Ersatz für Lösungsmittel wurden ionische Flüssigkeiten bei Biotransformationen eingesetzt (Lau et al. 2000; Schöfer et al. 2001).

Die CHD-Moleküle müssen für die Extraktion als Anionen vorliegen. Durch die Erhöhung des pH-Wertes kann der anionische Charakter des Zielmoleküls verstärkt werden. Um die Koextraktion von Hydroxyionen zu verhindern, sollte der pH-Wert jedoch nicht zu hoch gewählt werden (Maass 2001; Schügerl 1994).

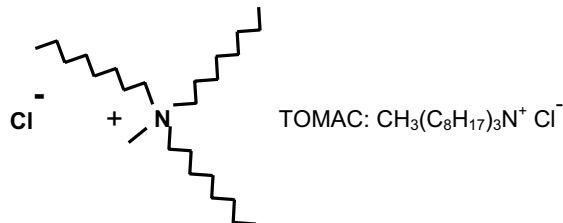


Abb. 3.6: Chemische Formel des Carriers TOMAC.

Die Vorteile des Carriers TOMAC für den technischen Einsatz liegen in dem hohen Flammpunkt von über 110°C, der relativ niedrigen Dichte, einer guten Löslichkeit in C₈-C₁₂ Alkoholen und einer relativ niedrigen Löslichkeit in Wasser. Auf der anderen Seite gibt es Hinweise auf ein toxisches Potenzial von TOMAC (Martek et al. 1997).

3.3.2.3 Lösungsmittel bei der Reaktivextraktion

Das lipophile Gegenion TOMAC (Kap. 3.3.2.2) ist eine hochviskose Substanz (Schügerl 1994). Um den Carrier zur Reaktivextraktion mittels Flüssig-Flüssig-Extraktoren einsetzen zu können, muss er durch ein geeignetes Lösungsmittel verdünnt werden. Der Einsatz von Lösungsmitteln soll hauptsächlich das Fließverhalten der organischen Phase optimieren (Hampe 1978). Die Viskosität, das Absetzverhalten, die Emulsionsneigung und die Reduktion der Löslichkeit mit der wässrigen Phase sind die wichtigsten Eigenschaften von Lösungsmitteln. Eingesetzt werden verschiedene Alkohole, Ketone, Ester oder Kohlenwasserstoffverbindungen.

Die Wahl des Extraktionsmittels kann eine Verbesserung des Verteilungskoeffizienten herbeiführen und dementsprechend die Extraktionsleistung optimieren. Für die Extraktion von polaren Molekülen, wie Aminosäuren, eignen sich polare Verdünnungsmittel besser (Stuckey 1996).

Der Einsatz bei der Reaktivextraktion stellt eine Vielzahl von Ansprüchen an die eingesetzten Lösungsmittel:

- physikalische und chemische Stabilität
- keine Neigung zur Emulsionsbildung
- geringe Verdunstungsverluste
- hohes Lösungsvermögen für das Extraktionsmittel
- geringe Löslichkeit im Wasser und geringe Aufnahmekapazität der wässrigen Phase
- Verträglichkeit für die Biomasse

Die Toxizität eines Lösungsmittels kann anhand der Polarität abgeschätzt werden (Franke 2002). Als Richtwert für die Polarität kann der logP-Wert verwendet werden (Gl. 3-3). Der logP-Wert von Oktanol ist definiert als Logarithmus des Verteilungskoeffizienten in einem Zwei-Phasen-Gemisch aus Wasser und Oktanol:

$$\log P = \log \frac{C_{LM}^{1-Oktanol}}{C_{LM}^{H_2O}} \quad (3-3)$$

Hydrophobe Lösungsmittel mit einem logP-Wert größer als 1 (z.B. Dodekanol) gelten als weniger toxisch für die Biomasse. Der Nachteil dieser Moleküle liegt aber in der geringeren Sättigungskonzentration für hydrophile Verbindungen wie CHD oder organische Säuren. Der Einsatz hydrophiler Lösungsmittel (z.B. Hexanol) könnte sich wiederum inhibierend oder toxisch auf die Zellen auswirken. Die Wahl des geeigneten Lösungsmittels für die Reaktivextraktion ist ein Kompromiss aus Sättigungskapazität und Biokompatibilität.

Beispielsweise wurden für die Reaktivextraktion der Aminosäure L-Phenylalanin verschiedene Lösungsmittel (u.a. Oktanol, Dekanol, Dekan und Kerosin) untersucht (Maass 2001). Für die *in situ* Experimente wurde das Lösungsmittel Kerosin, eine Mischung aus C₁₂ bis C₁₆ Alkanen, eingesetzt. Bei der *in situ* Gewinnung von Zitronensäure wurde das Lösungsmittel 1-Oktanol mit dem Lösungsvermittler TOMAC verwendet (Wieczorek et al. 1998a; Wieczorek et al. 1998b).

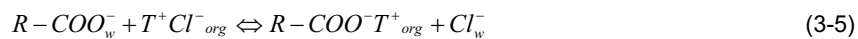
3.3.2.4 Reaktivextraktion der *trans*-Cyclohexadiendiole

Bei der Reaktivextraktion von 2,3- und 3,4-*trans*-CHD wird selektiv die Carboxyl-Gruppe des Produktes durch das lipophile Gegenion TOMAC (T) gebunden. Bei einem neutralen pH-Wert um 7 liegt die Säure-Gruppe in der wässrigen Phase deprotoniert vor (Gl. 3-4). Die Dissoziationskonstante K_D kann mittels der Gleichung 3-4a beschrieben werden (Schügerl 1994):

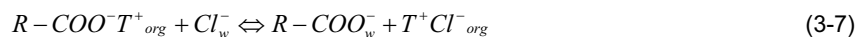


$$K_D = \frac{[R-COO^-]_w \cdot [H^+]}{[R-COOH]_w} \quad (3-4a)$$

Das lipophile Gegenion TOMAC liegt an der Phasengrenzfläche als Kation vor. Das in der wässrigen Donorphase als Anion vorliegende CHD-Molekül kann an der Phasengrenzfläche (Abb. 3.7) eine Bindung mit dem Lösungsvermittler eingehen (Gl. 3-5). Die Koextraktion der OH-Ionen durch TOMAC wird mittels der Gleichung 3-6 beschrieben (Schügerl 1994):



Aufgrund der Instabilität der CHD-Moleküle im basischen und sauren Milieu (Kap. 3.1.6) kann die Rückextraktion von CHD in die Akzeptorphase im Gegensatz zu der Rückextraktion von Aminosäuren nur unter neutralem pH-Wert stattfinden. Für die Rückextraktion können Ionen, zum Beispiel Chlorid (Cl⁻), eingesetzt werden. Das Gleichgewicht wird durch die Gleichung 3-7 beschrieben:



Die Gleichgewichtskonstante K_{CHD} für die Extraktion des Produktes aus der wässrigen in die organische Phase kann mit Hilfe der Gleichung 3-8 beschrieben werden.

$$K_{CHD} = \frac{[R-COO^-T^+]_{org} \cdot [Cl^-]_w}{[T^+Cl^-]_{org} \cdot [R-COO^-]_w} \quad (3-8)$$

Für das Produkt kann folgende Massenbilanz aufgestellt werden:

$$[R-COOH]_0 = [R-COOH]_w + [R-COO^-]_w + [R-COO^-T^+]_{org} \quad (3-9)$$

Aufgrund des hydrophilen Charakters von CHD findet ein diffusiver Transport des Produktes in die organische Phase kaum statt. Demzufolge kann die Bindung zwischen dem Anion CHD^- und den Kation $TOMAC^+$ ausschließlich an der Phasengrenzfläche stattfinden. Ein vergleichbares Verhalten wurde für den Transport von L-Phenylalanin ($L-Phe^+$) mittels D_2EHPA^- postuliert (Maass 2001; Maass et al. 2002; Takors 2004). Eine schematische Darstellung des Transportes, ausgehend vom Fermentationsüberstand, ist in der Abbildung 3.7 dargestellt.

Der biomasse- und proteinfreie Fermentationsüberstand wird im ersten Flüssig-Flüssig-Extraktor mit der organischen Phase vermischt. An der Phasengrenzfläche kommt es zur Bindung zwischen dem lipophilen Gegenion $TOMAC$ und dem deprotonierten Produkt. Der Komplex aus $TOMAC$ und CHD gelangt in die organische Phase. Anschließend wird durch die Zentrifugalkraft die wässrige Phase von der organischen Phase getrennt. Über eine Pumpe gelangt die leichte organische Phase in den zweiten Flüssig-Flüssig-Extraktor. Durch den Kontakt mit der wässrigen Akzeptorphase (5 bis 10% $NaCl$) findet an der Phasengrenzfläche der Austausch von Anionen statt. Das Produkt wird gegen das Chloridion ausgetauscht. Der Lösungsvermittler $TOMAC$ ist dadurch regeneriert und kann wieder im ersten Flüssig-Flüssig-Extraktor beladen werden.

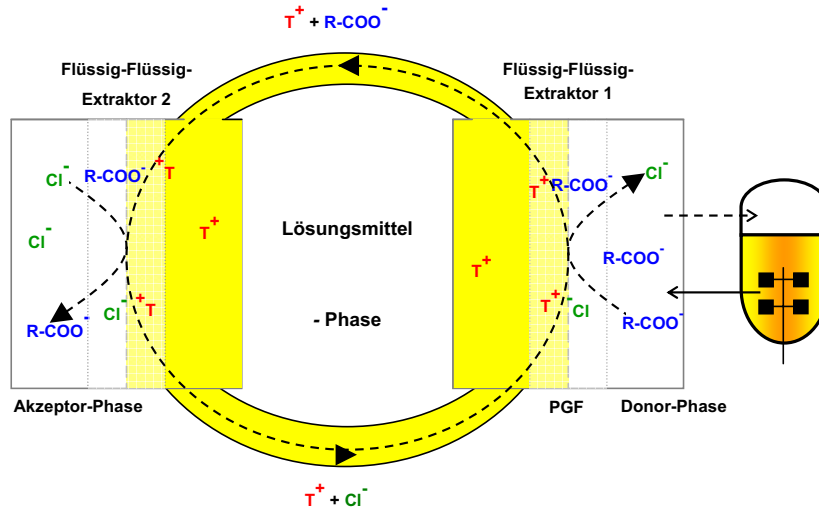


Abb. 3.7: Modell der Reaktivextraktion von Anionen ($R-COO^-$) mittels zweier Flüssig-Flüssig-Extraktoren mit dem lipophilen Gegenion (z.B. TOMAC, T^+) aus einem angereicherten Fermentationsüberstand. Als Gegenion können Chlorid-Ionen (Cl^-) fungieren.

Beim Transport der einzelnen CHD-Anionen werden mehrere TOMAC-Moleküle zu einem Konglomerat vereint. Dabei entstehen an der Phasengrenzfläche kugelförmige Mizellen (Abb. 3.8) (Cardoso et al. 1999; Cardoso et al. 2000; Hauer et al. 1991; Siebenhofer et al. 1985). Der hydrophobe Teil des lipophilen Gegenions TOMAC bildet die äußere Schicht der Mizelle. Im Inneren grenzen die hydrophilen Bereiche des Kations einen Raum für den Transport der Säuremoleküle oder der Gegenionen ab. Der Transport der CHD-Moleküle findet dementsprechend nicht stöchiometrisch zwischen den TOMAC- und CHD-Molekülen statt.

Eine weitere Besonderheit der Mizellenbildung mittels anionenselektiver Lösungsvermittler ist die Mitextraktion der wässrigen Phase, die durch den hydroskopischen Einschluss in dem Mizellen-Innenraum verursacht wird. Der Verteilungskoeffizient für das Zielmolekül steigt mit der Konzentration des Vermittlers und der Löslichkeit des Produktes in der organischen Phase an (Hauer et al. 1991). Die maximale Konzentrationsgrenze des lipophilen Gegenions wird durch die steigende Emulsionsbildung und ungünstige Hydrodynamik beeinflusst. Des Weiteren verschlechtert die steigende Anzahl der Hydroxygruppen des Zielproduktes die Extraktion (Hauer et al. 1991).

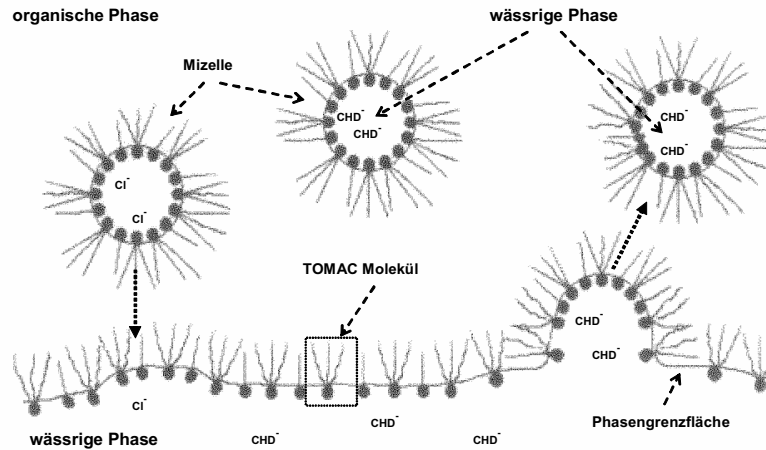


Abb. 3.8: Darstellung der Phasengrenzfläche. Bei dem Transport von CHD in die organische Phase kommt es zur Bildung von Mizellen (verändert nach Cardoso (Cardoso et al. 1999)). Jede Mizelle besteht aus mehreren TOMAC-Molekülen, die einen hydrophilen Bereich einschließen.

3.3.2.5 Theorie des Stoffübergangs

Die Diffusion kann grundsätzlich durch das 1. Ficksche Gesetz beschrieben werden. Das Gesetz beschreibt den Diffusionsvorgang eines gelösten Stoffes bei konstantem Konzentrationsgradienten ($\frac{dc}{dx}$). Für den Stoffmengenstrom ($\frac{dn}{dt}$) durch den Querschnitt (q) gilt:

$$\frac{dn_{CHD}}{dt} = -qD_{CHD} \frac{dc_{CHD}}{dx} \quad (3-10)$$

Der Diffusionskoeffizient (D) ist abhängig von der Beschaffenheit des Lösungsmittels, der Temperatur, dem diffundierendem Produkt und seiner Konzentration. Bei einem instationären System mit einem sich mit der Zeit verändernden Konzentrationsgradienten gilt das 2. Ficksche Gesetz, dass die Bestimmung der Konzentration als Funktion des Ortes und der Zeit erlaubt:

$$\left(\frac{dn_{CHD}}{dt} \right)_x = D_{CHD} \left(\frac{\partial^2 c_{CHD}}{\partial x^2} \right) \quad (3-11)$$

Bei Extraktionsverfahren findet der Stoffübergang diffusiv über die Phasengrenzfläche statt. Der Stofftransport kann mittels der Zweifilmtheorie beschrieben werden (Whitman 1923). Es

treten zwei Widerstände in Reihe auf: in der wässrigen Phase und in der organischen Phase (Abb. 3.9). Für den flächenspezifischen Stofffluss (J_{CHD}) gilt:

$$-J_{CHD} = \beta_w \cdot (c_w - c_{w_{PGF}}) = \beta_{org} \cdot (c_{org_{PGF}} - c_{org}) \quad (3-12)$$

J_{CHD}	flächenspezifischer Stofffluss	[mol/m ² /s]
β	Stoffübergangskoeffizient	[m/s]
c	Konzentration im Fluid	[mol/m ³]
c_{PDF}	Konzentration an der Phasengrenzfläche	[mol/m ³]

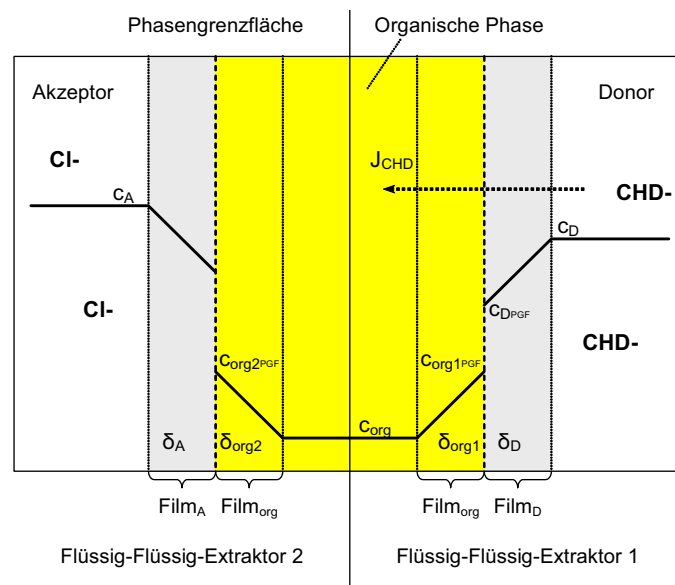


Abb. 3.9: Vereinfachte Darstellung des Stoffübergangs von CHD-Molekülen zwischen der wässrigen und der organischen Phase bei der Reaktivextraktion. In dem Extraktor 1 findet der Übergang der CHD-Ionen aus der Donor-Phase in die organische Phase statt. In dem Extraktor 2 werden die CHD-Ionen anschließend aus der organischen Phase in die Akzeptor-Phase übertragen. Indizes: Akzeptor- (A), Donor- (D), organische Phase (org), Phasengrenzfläche (PGF).

Nach der Zweifilmtheorie wird der Diffusionswiderstand durch die Schichtdicke des laminaren Grenzfilms bestimmt, die sich mit wachsender Strömungsgeschwindigkeit verkleinert. Nach dem 1. Fickschen Gesetz (Gl. 3-10) kann der Stoffübergangskoeffizient wie folgt ausgedrückt werden:

$$\beta = \frac{D}{\delta} \quad (3-13)$$

D	Diffusionsquotient	[m ² /s]
δ	Schichtdicke des laminaren Grenzfilms	[mm]

Der Stofftransport wird größer, wenn eine Reaktion an der Phasengrenzfläche stattfindet. Durch die Reaktion nimmt die Produktkonzentration an der Phasengrenzfläche ab. Die abnehmende Produktkonzentration vergrößert den Diffusionsgradienten. Die Bestimmung des Stoffübergangs in dem Flüssig-Flüssig-Extraktor ist aufgrund der komplexen Vorgänge in den unterschiedlichen Bereichen der Zentrifugen (Kap. 3.3.2.7) nicht möglich (Boychyn et al. 2001).

3.3.2.6 Aufbau der Flüssig-Flüssig-Extraktoren

Die Funktionsweise der Flüssig-Flüssig-Extraktoren der Firma CINC (Coster Industries Nevada Corp.) basiert auf dem Mixer-Settler-Prinzip. Die Mischung und Trennung der Phasen findet in einer Einheit statt. Im ersten Schritt wird die organische Phase, bestehend aus dem Gemisch aus Lösungsmittel und dem lipophilen Gegenion TOMAC, mit der wässrigen Phase des Fermentationsüberstandes tangential zusammengeführt (Abb. 3.10).

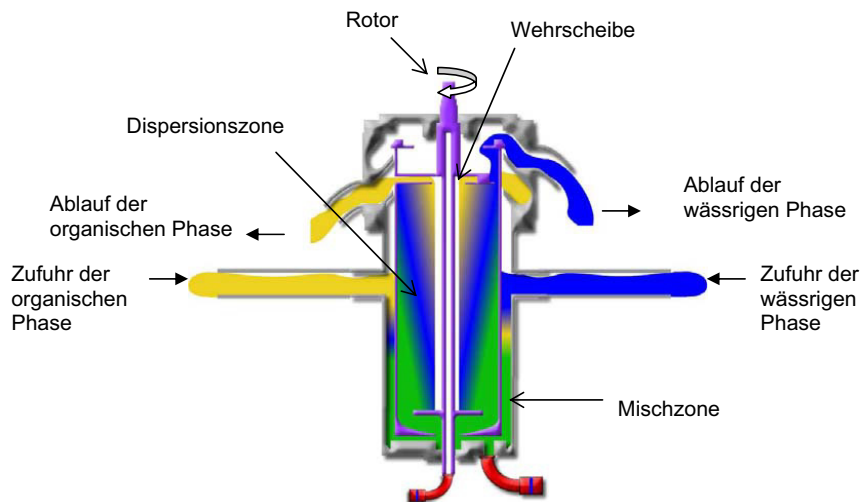


Abb. 3.10: Schematische Darstellung des Flüssig-Flüssig-Extraktors der Firma CINC (Quelle: www.cinc.de).

Die beiden Fluide werden in der Mischzone zwischen dem feststehenden Gehäuse und dem sich drehenden Rotor dispergiert. Die feine Dispersion der beiden Phasen ermöglicht die Vergrößerung der Phasengrenzflächen, wodurch die Extraktion der CHD-Moleküle optimiert wird. Die Rotation des Rotors erzeugt eine Zentripetalkraft in der Dispersionszone, wodurch die Trennung der wässrigen von der organischen Phase beschleunigt wird. Der Rotor besteht aus vier vertikalen Kammern. Die Kammern ermöglichen, dass die Flüssigkeiten sich mit der gleichen Geschwindigkeit bewegen wie der Rotor (Leonard 1988; Leonard et al. 1980). Durch die kontinuierliche Zufuhr neuer wässriger und organischer Phasen bewegt sich das Gemisch nach oben in Richtung der Wehrscheibe. Die Größe der Wehrscheibe regelt den Abfluss der organischen Phase. Der Einsatz einer Wehrscheibe mit einem größeren Innendurchmesser mindert den Gegendruck, führt zu einer Verschiebung der Trenngrenze radial nach außen und erhöht die Abflussrate der organischen Phase. Eine

Erhöhung des Durchsatzes führt zur Vergrößerung der Dispersionsphase. Im Extremfall führt das zur Verunreinigung der austretenden Phasen. In der Mitte des Extraktors wird die separierte leichte organische Phase ausgetragen. Die schwere wässrige Phase läuft am äußeren Mantel der Zentrifuge ab. Entscheidend für eine vollständige Phasentrennung und einen optimalen Stoffübergang sind die Rotationsgeschwindigkeit, die Scherkräfte und die Durchsatzmengen. Weiterhin spielen Faktoren wie die Viskosität und die Mischbarkeit der Fluide eine wichtige Rolle. Der eingesetzte Flüssig-Flüssig-Extraktor erreicht über die Rotationsgeschwindigkeit eine Zentrifugalbeschleunigung bis zu 1000 g (Meikrantz et al. 2002; Meikrantz et al. 2001). Die Wirkung einer Zentrifuge wird durch die Zentrifugalkennzahl (Z) charakterisiert. Es gilt:

$$Z = \frac{r \cdot \omega^2}{g} \quad (3-14)$$

r	Radius	[m]
ω	Winkelgeschwindigkeit	[m/s]
g	Erdbeschleunigung	[m/s ²]

3.3.2.7 Theorie der Phasentrennung

Der Phasenübergang bei dem eingesetzten Flüssig-Flüssig-Extraktor findet in der Mischzone in dem Raum zwischen dem äußeren Gehäuse und dem Rotor, im Inneren des Rotors und der Dispersionszone statt (Abb. 3.10). In dem Ringspalt zwischen den coaxialen Zylindern, dem äußeren Mantel und dem Rotor entstehen durch die Rotationsgeschwindigkeit des Rotors Reibungskräfte. Durch den Geschwindigkeitsgradienten zwischen dem rotierenden Zylinder im Inneren und dem ruhenden äußeren Mantel entstehen radiale Wirbel, die auch als Taylor-Wirbel genannt werden. Das führt zur Emulsion der beiden Fluide und zur Vergrößerung der Phasengrenzfläche. Diese Kräfte können mittels des Newtonschen Schubspannungsansatzes (oder Newtonscher Viskositätsgesetz) beschrieben werden:

$$\tau = \frac{F}{A} = -\eta \cdot \gamma \quad (3-15)$$

τ	Schubspannung	[Pa]
F	mechanische Kraft	[N]
A	Flächeneinheit	[m ²]
η	dynamische Viskosität	[Pa*s]
γ	Schergeschwindigkeit	[1/s]

Das Gesetz beschreibt das Fließverhalten bei Einwirkung einer Schergeschwindigkeit. Dieser Ansatz findet Anwendung bei der Bestimmung der Viskosität von Fluiden. Mit Hilfe eines Rotationsviskosimeters können über die Drehmomentmessungen Schubspannungen ermittelt werden, die sich proportional zur Viskosität verhalten.

Das Sinken der Phasen im Inneren des Rotors kann mit Hilfe des Stokes'schen Gesetzes beschrieben werden:

$$w = \frac{d_t^2 (\rho_w - \rho_{org})}{18\eta} \cdot r\omega^2 \quad (3-16)$$

w	Sinkgeschwindigkeit im Zentrifugalfeld	[m/s]
d_t	Tropfendurchmesser	[m]
ρ_w	Dichte der wässrigen Phase	[kg/m ³]
ρ_{org}	Dichte der organischen Phase	[kg/m ³]
η	Dynamische Viskosität	[Pa*s]
r	Zylinderradius	[m]
ω	Winkelgeschwindigkeit	[rad/s]

Die Voraussetzung für die Bestimmung der Absetzgeschwindigkeit mittels der Gleichung 3-16 ist der Einsatz Newtonscher Flüssigkeiten. Weiterhin sollen laminare Strömungen vorliegen, und das Absetzen der Fluide soll nicht eingeschränkt sein.

Eine verbesserte Phasentrennung wird auch durch die Verlängerung der Verweilzeit mittels geringerer Volumenströme oder eines vergrößerten Arbeitsvolumen erzielt. Die Erhöhung der Rotordrehzahl führt zur Verkleinerung der Tropfengröße und dadurch zur Vergrößerung der Phasengrenzfläche. Die erhöhte Rotationsgeschwindigkeit begünstigt jedoch die Emulsionsbildung und erschwert daher die Phasentrennung. Ein weiterer Faktor, der den Stofftransport erleichtert, ist der Einsatz von Detergenzien. Diese Substanzen besitzen einen hydrophilen und lipophilen Bereich. Diese lagern sich bevorzugt an der Phasengrenzfläche an und setzen die Oberflächenspannung herab (Weatherley 1994). Zu dieser Gruppe gehören Zellbestandteile wie Fettsäuren, Proteine und andere Polymere aber auch ionische Flüssigkeiten wie TOMAC.

3.4 Reaktionstechnische Grundlagen

3.4.1 Prozessführung im Bioreaktor

Die Bioreaktoren können vereinfacht als ideale Rührkessel (Abb. 3.11) betrachtet werden (Nielsen 1994). Für diese Reaktortypen können drei Betriebsarten unterschieden werden: Batch, Fed-Batch und kontinuierliche Fermentationen.

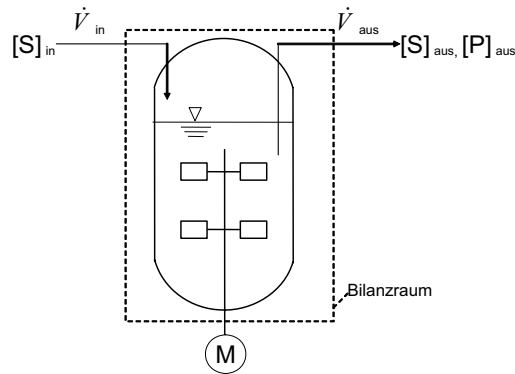


Abb. 3.11: Schema eines idealen Rührreaktors (Substrat (S); Produkt (P); Volumenstrom ($\dot{V}$)).

Für diese Betriebsarten gilt folgende Bilanzgleichung:

$$\frac{d}{dt} (V_R \cdot c_R) = \dot{V}_{in} \cdot c_{in} - \dot{V}_{aus} \cdot c_{aus} \pm r_i \cdot V_R \quad (3-17)$$

$\dot{V}_{in}$	Volumenstrom in den Reaktor	[l/h]
$\dot{V}_{aus}$	Volumenstrom aus dem Reaktor	[l/h]
r_i	volumenbezogene Reaktionsrate	[mol/l]
c	Konzentration	[mol/l]
V_R	Volumen des Reaktors	[l]

Bei dem Einsatz eines Batch- oder satzweisen Verfahrens werden die Substrate vorgelegt. Es werden ausschließlich pH-Korrekturmittel Säure und Lauge und bei Bedarf das Antischaummittel zugegeben. Bei aeroben Fermentationen wird Sauerstoff in den Bioreaktor hineingepumpt. Der Einsatz eines satzweisen Verfahrens zeichnet sich durch einen geringen apparativen Aufwand aus. Es gilt:

$$c(X, S, P) = f(t) \quad X\text{-Biomasse; } S\text{-Substrat; } P\text{-Produkt}$$

$$V_R = \text{const} \text{ und } \dot{V}_{in} = \dot{V}_{aus} = 0$$

Die kontinuierlichen Verfahren erfordern nach der Wachstumsphase durchgehend die Zugabe von frischem Medium in gleichem Maß, wie Fermentationslösung abgezogen wird. Dadurch wird ein Fließgleichgewicht erreicht. Das Wachstum im Chemostaten wird durch die limitierte Zugabe eines Substrates reguliert. Für kontinuierliche Verfahren gilt:

$$c(X, S, P) = \text{const}$$

$$V_R = \text{const} \text{ und } \dot{V}_{in} = \dot{V}_{aus} = \text{const}$$

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Fermentationsexperimente wurden im Zulaufverfahren, auch Fed-Batch genannt, durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden ein oder mehrere Substrate nicht vollständig im Bioreaktor vorgelegt und während der Fermentation zugegeben. Es wird aber kein Fermentationsmedium abgezogen. Die Vorteile dieser Betriebsweise zeichnen sich durch die verlängerte Wachstums- und Produktionsphase aus. Dadurch können höhere Biomasse- und Produktkonzentrationen erreicht werden. Durch den Einsatz komplexer Regelungssysteme für den Zulauf kann die Substratkonzentration auf einem konstanten Niveau gehalten werden. Dadurch kann eine mögliche inhibierende Wirkung des Substrates auf das Wachstum und/oder die Produktbildung verhindert werden. Es gilt:

$$c(X, P) = f(t)$$

$$V_R = f(t); \dot{V}_{in} = \dot{f}(t) \text{ und } \dot{V}_{aus} = 0$$

Für Fed-Batch Fermentation gilt die Gleichung (3-17) mit $\dot{V}_{aus} = 0$

$$\frac{d}{dt} (V_R \cdot c_R) = \dot{V}_{in} \cdot c_{in} \pm r_i \cdot \dot{V}_R \quad (3-18)$$

3.4.2 Kinetische Parameter

Wachstum, Substratverbrauch und Produktbildung

Die Änderung der Biomassekonzentration über die Zeit entspricht dem Wachstum der Mikroorganismen. Die Wachstumsrate μ ist ein Maß für das Wachstum (Gl. 3-19). Für die biomassenspezifische Substratverbrauchsrate σ gilt die Gleichung 3-20. Die biomassenspezifische Produktbildungsrate π wird durch die Gleichung 3-21 beschrieben.

$$\mu = \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_X}{dt} \quad (3-19)$$

$$\sigma = \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_S}{dt} \quad (3-20)$$

$$\pi = \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_P}{dt} \quad (3-21)$$

Bilanzierung der Gasphase

Die Bestimmung des Sauerstoffverbrauches und der Kohlendioxidbildung erfolgt über die Massenbilanz in der Gasphase. Die Konzentrationen in der Flüssigphase werden vernachlässigt. Für die Sauerstoff- (OTR) und die Kohlendioxidtransferrate (CTR) gilt:

$$OTR = \frac{\dot{V}_g}{V_R} \cdot (c_{O_2 in} - c_{O_2 aus}) \quad (3-22)$$

$$CTR = \frac{\dot{V}_g}{V_R} \cdot (c_{CO_2 aus} - c_{CO_2 in}) \quad (3-23)$$

$\dot{V}_g$ Gasvolumenstrom [l/h]

Für die Berechnung der Sauerstoffaufnahme (OUR, Gl. 3-24) und der Kohlendioxidbildungsrate (CER, Gl. 3-25) (Nielsen 1994) gilt:

$$OUR = \frac{\dot{V}_g^{in}}{V_R \cdot 22,414} \cdot \left(Y_{O_2}^{in} - \frac{(1 - Y_{O_2}^{in} - Y_{CO_2}^{in})}{(1 - Y_{O_2}^{aus} - Y_{CO_2}^{aus})} \cdot Y_{O_2}^{aus} \right) \quad (3-24)$$

$$CER = \frac{\dot{V}_g^{in}}{V_R \cdot 22,414} \cdot \left(Y_{CO_2}^{aus} \cdot \frac{(1 - Y_{O_2}^{in} - Y_{CO_2}^{in})}{(1 - Y_{O_2}^{aus} - Y_{CO_2}^{aus})} - Y_{CO_2}^{in} \right) \quad (3-25)$$

Y_{O_2/CO_2} Anteil in der Gasphase (Sauerstoff/Kohlendioxid) [-]

Kinetische Größen

Die Berechnung der differentiellen Selektivitätskoeffizienten, wie der substratbezogene Biomasseausbeutekoeffizient $Y_{X/S}$ oder der biomassebezogene Produktausbeutekoeffizient $Y_{P/X}$ und der substratbezogene Produktausbeutekoeffizient $Y_{P/S}$ erfolgt mit Hilfe folgender Gleichungen:

$$Y_{X/S} = \frac{dc_X}{dc_S} = \frac{\frac{1}{x} \frac{dx}{dt}}{\frac{1}{s} \frac{ds}{dt}} = \frac{\mu}{\sigma} \quad (3-26)$$

$$Y_{P/X} = \frac{dc_P}{dc_X} = \frac{\pi}{\mu} \quad (3-27)$$

$$Y_{P/S} = \frac{dc_P}{dc_S} = \frac{\pi}{\sigma} \quad (3-28)$$

Für die Beschreibung des Gesamtprozesses werden integrale Größen wie die Selektivität berechnet (Gl. 3-29). Dabei wird das Zeitintervall von $t = 0$ bis $t = t_{\max}$ betrachtet. Die Selektivität beschreibt die Effizienz, mit der das Substrat zum Produkt umgesetzt wird. Des Weiteren können mit Hilfe der Gleichung 3-30 die integrale Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) und mit Hilfe der Gleichung 3-31 die differentielle Produktivität (Qp) bestimmt werden.

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (3-29)$$

$$RZA = \frac{c_{P_{end}} - c_{P_0}}{t_{end}} \quad (3-30)$$

$$Q_P = \frac{dc_P}{dt} \quad (3-31)$$

Bei der Bestimmung der kinetischen Größen addieren sich viele kleine Messfehler zu einem Messrauschen, das eine Interpretation der resultierenden Daten erschwert. Aufgrund dessen werden in dieser Arbeit die in die differentiellen und integrativen Parameter einfließenden Werte der Biomasse-, Substrat- und Produktkonzentrationen mittels eines spline-Programms nach der Monte-Carlo-Methode (Sobol 1991; Sobol 1994) geglättet (Kap. 12.6).

3.4.3 Bilanzierung des Kohlenstoffs

Die Massenbilanzen können in biologischen Systemen für eine Vielzahl von Grundelementen (Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff, Phosphor oder Wasserstoff) aufgestellt werden. Die Umsetzung der Elemente in Biomasse, Produkte und Nebenprodukte im Bioreaktor wird aus dem Massenfluss in den Bioreaktor abzüglich des Massenflusses aus dem Bioreaktor berechnet. Die Berechnung des Kohlenstoffanteils der Biomasse erfolgt anhand der Konzentration der Biotrockenmasse. Die für die Berechnung notwendige Zusammensetzung der Biomasse basiert auf einer empirischen Annahme von Nielsen (Nielsen 1994).

Die über die Begasung eingetragene Kohlendioxidkonzentration von 0,03% wird vernachlässigt. Auch der gelöste CO₂-Anteil in der wässrigen Phase von ungefähr 0,1% geht nicht mit in die Berechnung ein. Für die integrale Kohlenstoffbilanz gilt die Gleichung 3-32. Die Bilanzen anderer Elemente ergeben sich analog. Für die Bilanzierung eines satzweise geführten Verfahrens mit $\dot{V}_{in} = \dot{V}_{aus} = 0$ entfallen alle Terme, die den Volumenstrom des Mediums durch den Reaktor ($\dot{V}_{in}$; $\dot{V}_{aus}$) beinhalten. Für einen Prozess im Zulaufverfahren entfallen alle Terme, die einen Abflussvolumenstrom ($\dot{V}_{aus}$) enthalten.

$$\begin{aligned} & \left[\frac{w_C \cdot [X]_{R(t)} \cdot V_{R(t)}}{M_C} + \sum_{n=1}^m v_n \cdot [P]_{nR(t)} \cdot V_{R(t)} + \sum_{n=1}^m v_n \cdot [S]_{nR(t)} \cdot V_{R(t)} \right] = \\ & \left[\frac{w_C \cdot [X]_{R(0)} \cdot V_{R(0)}}{M_C} + \sum_{n=1}^m v_n \left([S]_{nR(0)} \cdot V_{R(0)} + \int_0^{t_{ende}} ([S]_{n(in)} \cdot \dot{V}_{in}) dt \right) \right] - \\ & \left[\sum_{n=1}^m v_n \left(\int_0^{t_{ende}} ([S]_{n(aus)} \cdot \dot{V}_{aus}) dt \right) + \sum_{n=1}^m v_n \left(\int_0^{t_{ende}} ([P]_{n(aus)} \cdot \dot{V}_{aus}) dt \right) \right] - \left[v_{CO_2} \cdot \int_0^{t_{ende}} (c_{CO_2} \cdot \dot{V}_g) dt \right] \end{aligned} \quad (3-32)$$

w_C	Kohlenstoffanteil der Biomasse
M_C	Molmasse des Kohlenstoffs
n	Bezeichnung der Komponente
m	Anzahl der Komponenten
v_n	stöchiometrischer Koeffizient des Stoffes n
$[X, S, P]$	Konzentration (X-Biomasse; S-Substrat; P-Produkt)
$\dot{V}$	Volumenstrom

3.5 Grundlagen der „Metabolischen Stoffflussanalyse“

Die Anwendung der „Metabolic Engineering“-Methoden führt zur Optimierung der Stoffwechselvorgänge in Mikroorganismen. Eine quantitative Beurteilung dieser Vorgänge kann durch den Einsatz der metabolischen Stoffflussanalyse (MFA) erreicht werden (Wiechert et al. 1996). Die gewonnenen Daten bilden die Basis für die Quantifizierung der intrazellulären Flüsse. Die ermittelten Flüsse ermöglichen die Identifizierung möglicher Abflussengpässe. Damit können unter anderem Hinweise für eine gerichtete gentechnische Veränderung der untersuchten Stämme gesammelt werden. Diese Veränderungen können mit Hilfe weiterer MFA-Experimente überprüft werden. Dadurch kann eine gerichtete Stammverbesserung erreicht werden.

3.5.1 Praktische Umsetzung der ^{13}C -Stoffflussanalyse

Durch die Verstoffwechselung von ^{13}C -Glukose wird in der Biomasse die Markierungsinformation verteilt. Der Markierungszustand verändert sich im Laufe des Experiments vom isotopisch instationären bis zum stationären Zustand (Abb. 3.12) (Wiechert 1996). Dieses Gleichgewicht kann bei den intrazellulären Metaboliten nach ca. einer Stunde und in der Biomasse nach ungefähr zwei bis drei Stunden erreicht werden. Durch das gezielte Variieren der Position der ^{13}C -Markierung an einer oder mehreren Positionen des Kohlenstoff-Gerüsts können unterschiedliche Informationen über die intrazellulären Flüsse gewonnen werden (Wiechert 1996).

Nach Erreichen des isotopisch stationären Zustands werden die Zellen zur Analyse des Proteoms hydrolysiert und für die Messung aufbereitet (Bacher et al. 1999). Für eine Untersuchung der Metabolite mittels LC-MS/MS müssen die Zellen mit -70°C kaltem Methanol gequenchet werden, um die Stoffwechselaktivitäten der Organismen sofort zu stoppen. Im Anschluss werden die Zellen zur intrazellulären Bestimmung des Zellinhalts abgetrennt und aufgeschlossen.

Die Bestimmung der intrazellulären Flüsse erfolgt aus den gemessenen extrazellulären Flüssen der Produktbildungsraten, Substratverbrauchsraten und der ^{13}C -Markierungsinformation (Abb. 3.12). Die intrazelluläre Markierung durchläuft einen isotopisch instationären Markierungszustand und geht in einen isotopisch stationären Markierungszustand über.

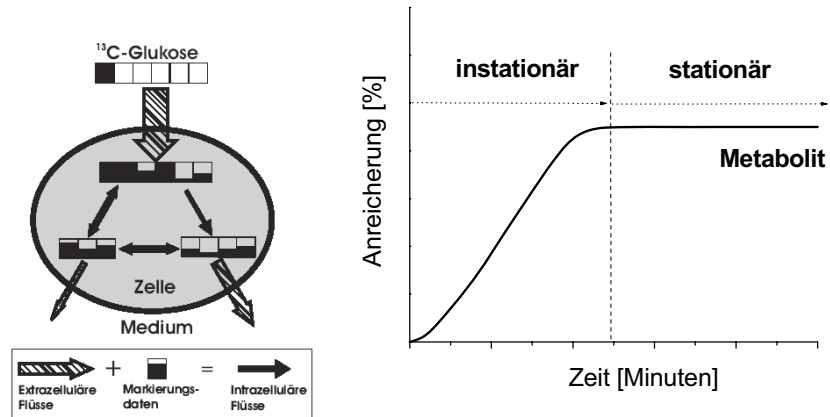


Abb. 3.12: Links: Grafische Darstellung des Prinzips der ^{13}C -Stoffflussanalyse nach Wiechert (Wiechert 1996). Rechts: Übergang der intrazellulären Markierung aus dem isotopisch instationären Markierungszustand in einen isotopisch stationären Markierungszustand.

4 Material und Methoden

4.1 Das biologische System

4.1.1 *E. coli* Überproduzenten

Die für die Produktion der *trans*-Cyclohexadien-Derivaten eingesetzten Stämme basieren auf *E. coli* K12 W3110-Stämmen (Zeppenfeld et al. 2000). Die Stämme wurden optimiert, indem gezielt Deletionen oder Überexpression einzelner Gene durchgeführt wurden. Die Überexpression fand auf einem Plasmid oder durch Integration des Gens in das Genom des Stammes statt. Die Arbeiten zur Stammoptimierung wurden am IBT 1 der Forschungszentrum Jülich GmbH und bei dem Kooperationspartner DSM Biotech GmbH durchgeführt.

Um die Biomassebildung kontrollieren zu können und einen Abfluss des Intermediats Chorismat in Richtung der aromatischen Aminosäuren L-Tyrosin und L-Phenylalanin zu vermeiden, wurden Produktionsstämme verwendet, die auxotroph für diese beiden Aminosäuren sind. Die Auxotrophie wurde durch die Deletion der Gene *tyrA* und *pheA* erreicht. Weiterhin wurde das Gen *aroF*^{wt} deletiert, das für die DAHP-Synthase kodiert. Für die Überproduktion der beiden *trans*-CHDs wurde in die Zellen der Expressionsvektor pJF119EH transformiert. Auf dem Vektor befinden sich die Gene der Aromaten-Biosynthese *aroF*^{wt} und *aroB*^{wt}, die für die DAHP-Synthase und 3-Dehydroquinat-Synthase kodieren, sowie das Gen *aroL*^{wt}, das für die Shikimatkinase II kodiert. Weiterhin wurde für die Biosynthese der Produkte das Gen *entB*^{wt}, kodierend für die Isochorismat-Lyase, überexprimiert. Bei der Produktion von 2,3-*trans*-CHD wurden die Stämme zusätzlich mit dem Gen *entC* ausgestattet, das für die Isochorismat-Synthase kodiert. Als Selektionsmarker wurde eine Ampicillinresistenz verwendet. Als Promotor wurde ein IPTG-induzierbarer, Glukose-resistenter, synthetischer P_{tac}-Promotor eingesetzt.

Tab. 4.1: Eingesetzte *E. coli*-Stämme.

Produkt	Bezeichnung	Genotyp
2,3-CHD	F4 pDF3	LJ110, $\Delta(pheA\ tyrA\ aroF)$ pJF119EH <i>entC entB</i> ^{wt} , (amp ^R)
	F82 pC20 (Abb. 5.2; S.59)	LJ110, $\Delta(pheA\ tyrA\ aroF)$ $\Delta(entCEBA)::cat$ pJF119EH <i>aroF</i> ^{wt} <i>entC entB</i> ^{wt} <i>aroB</i> ^{wt} <i>aroL</i> ^{wt} , (amp ^R)
	F82 pC88	LJ110, $\Delta(pheA\ tyrA\ aroF)$ $\Delta(entCEBA)::cat$ pJF119EH <i>aroF</i> ^{wt} <i>entC</i> ^{wt} <i>entB</i> ^{wt} <i>aroB</i> ^{wt} <i>aroL</i> ^{wt} , (amp ^R)
	F85 pC20	LJ110, $\Delta(trpE)$ $\Delta(pheA\ tyrA\ aroF)$ $\Delta(entCEBA)::cat$ pJF119EH <i>aroF</i> ^{wt} <i>entC entB</i> ^{wt} <i>aroB</i> ^{wt} <i>aroL</i> ^{wt} , (amp ^R)
	F111 pC20 (Abb. 5.13; S.66)	LJ110, $\Delta(pheA\ tyrA\ aroF)$ $\Delta(entCEBA)::FRT\ \Delta(gcd)::cat$ pJF119EH <i>aroF</i> ^{wt} <i>entC entB</i> ^{wt} <i>aroB</i> ^{wt} <i>aroL</i> ^{wt} , (amp ^R)
3,4-CHD	F4 pDF1	LJ110, $\Delta(pheA\ tyrA\ aroF)$ pJF119EH <i>entB</i> ^{wt} , (amp ^R)
	F82 pC22 (Abb. 6.1; S.83)	LJ110, $\Delta(pheA\ tyrA\ aroF)$ $\Delta(entCEBA)::cat$ pJF119EH <i>aroF</i> ^{wt} <i>entB</i> ^{wt} <i>aroB</i> ^{wt} <i>aroL</i> ^{wt} , (amp ^R)
	F143 pC22 (Abb. 6.6; S.87)	$\Delta(pheA\ tyrA\ aroF)$ $\Delta(entCEBA)::FRT\ \Delta(lacI-lacZYA)::(P_{tac}-aroC-aroA-rrnB)$ pJF119EH <i>aroF</i> ^{wt} <i>entB</i> ^{wt} <i>aroB</i> ^{wt} <i>aroL</i> ^{wt} , (amp ^R)
2,3-CHA	KB532/pC27	$\Delta(pheA\ tyrA)$ <i>aroF</i> ^{fbt} pJF119EH <i>phzD phzE</i> , (amp ^R)

Für die Produktion von 2,3-*trans*-CHA wurden zwei Gene aus der Phenazinbiosynthese von *Pseudomonas fluoreszens phzD* und *phzE* in den Expressionsvektor pJF119EH kloniert. Sie kodieren Enzyme, die Chorismat über ADIC in 2,3-*trans*-CHA umsetzen (Abb. 3.5). Als Wirtstamm wurde ein DSM eigener Stamm verwendet, der ebenfalls L-Tyrosin- und L-Phenylalanin-auxotroph ist, aber eine Kopie des Feed-back deregulierten *aroF* Gens (*aroF^{fb}*) hinter einen konstitutiven Promoter chromosomal integriert trägt.

In der Tabelle 4.1 sind die Genotypen der verwendeten *E. coli*-Stämme und Plasmide dargestellt.

4.1.2 Stammhaltung und Vorkultivierung

Für die Stammhaltung wurden Kryokulturen benutzt. Diese wurden auf folgende Art erstellt. Von einer Agarplattenkultur wurden 100 ml LB-Medium (Kap. 12.1.5) mit 0,1 g/l Ampicillin angeimpft und in einem 1 Liter-Erlenmeyerkolben mit Schikanen kultiviert.

Die Anzucht wurde im Schüttelinkubator bei 37°C mit 150 rpm durchgeführt. Die Kultivierung wurde bei einer optischen Dichte (OD) von ca. 3 bis 4 beendet. Anschließend wurde die Kultur mit 100 ml sterilem Glycerin vermischt. Jeweils 1,8 ml wurden in Nalgene-Kryoröhrchen portioniert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Die Kultivierung der Vorkultur erfolgte in einem 1 Liter-Erlenmeyerkolben mit Schikanen, die je nach Fermentation mit 100 bis 200 ml Vorkulturmedium befüllt wurden (Kap. 12.1.3). Abhängig vom verwendeten Stamm wurden pro 100 ml Vorkulturmedium je 0,3 bis 0,4 ml der Kryokultur eingesetzt. Die Anzucht erfolgte bei 37°C bei 150 rpm und dauerte stammbabhängig zwischen 14 und 16 Stunden bis zum Erreichen einer OD von 2 bis 3.

4.2 Analytische Verfahren

4.2.1 Bestimmung der off-line Werte

Biotrockenmasse, optische Dichte und Glukose

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse wurden 2 bis 10 ml der Probe durch einen getrockneten, vorgewogenen Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm) filtriert. Anschließend wurde der Filter mit der gleichen Menge Kochsalzlösung gespült. Die Filter wurden im Trockenschrank (75°C) für 24 Stunden getrocknet. Nach einem Tag im Exsiccator wurden die Filter ausgewogen. Die Gewichts Differenz ergab die Biotrockenmasse.

Für die Messung der optischen Dichte wurde ein Shimadzu UV-160 Zweistrahl-Spektralphotometer verwendet. Die Messung der Adsorption erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 620$ nm. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz hängt die Stärke der Absorption von der Zelldichte ab. Die Proben wurden nach geeigneter Verdünnung mit 0,9% NaCl-Lösung gegen entsprechende Kochsalzlösung gemessen.

Die Bestimmung der Glukosekonzentration erfolgte off-line mit einem „accutrend sensor“ (Boehringer Mannheim). Dafür wurden jeweils 10 µl der Fermentationsprobe auf dem Sensor

aufgetragen. Die in der Fermentationsprobe vorhandene Glukose wurde durch das auf dem Sensor immobilisierte Enzym Glukoseoxidase in Glukonolacton umgewandelt. Das dabei äquimolar entstandene H_2O_2 wurde amperometrisch gemessen. Der Messbereich liegt zwischen 0,1 und 6 g/l Glukose. Bei Bedarf wurde die Fermentationsprobe mit 0,9% NaCl-Lösung verdünnt.

4.2.1.1 High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC)

Bestimmung der Produkt- und Nebenproduktkonzentrationen

Die Bestimmung der Produkt-, Nebenprodukt- (z.B. Chorismat) und Abbauproduktkonzentrationen (z.B. 4-Hydroxybenzoat) erfolgte über eine Reversed Phase HPLC mit einem Photodiodenarraydetektor (DAD) (Kap. 12.3). Die Detektion der Substanzen fand bei einer Wellenlänge von $\lambda=275$ nm statt. Bei Konzentrationen über 0,5 g/l 2,3-*trans*-CHA, 2,3- oder 3,4-*trans*-CHD wurden die Proben mit Wasser verdünnt. Die LOQ-Werte für alle Substanzen betrug ≤ 40 μM (≤ 9 mg/l). Für alle Substanzen lag die Nachweisgrenze bei ≤ 7 μM (≤ 1 mg/l).

Bestimmung der Konzentration der Aminosäuren und organischen Säuren

Zur Quantifizierung der Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tyrosin, L-Alanin und L-Glutamat wurde eine Reversed Phase HPLC eingesetzt. Um die Proben in der HPLC messen zu können, wurden sie mit ortho-Phtaldialdehyd und Mercaptoethanol derivatisiert und mit einem Gradienten der Eluat A und B eluiert. Die Substanzen wurden an einem Fluoreszenzdetektor gemessen (Kap. 12.3).

Die Messung der organischen Säuren Acetat, Citrat, Lactat, Fumarat, Oxoglutarat, Pyruvat und Shikimat erfolgte mittels Ionenausschluss-HPLC. Die Proben wurden aufgetrennt und bei $\lambda=215$ nm durch einen UV-Detektor photometrisch bestimmt. Die Proben wurden dem Messbereich entsprechend verdünnt (Kap. 12.3).

4.2.1.2 ^1H -NMR-Messung

Diese Methode erlaubt die qualitative und quantitative Bestimmung der Produkte (2,3-*trans*-CHA, 2,3- und 3,4-*trans*-CHD), der extrazellulären Intermediate der Aromaten-Biosynthese (u.a. Shikimat, Shikimat-3-Phosphat) und der organischen Säuren. Die ^1H -NMR-Analytik wurde an einem mit der Puls-Fourier-Transform-Technik ausgestatteten NMR-Spektrometer (Betriebsfrequenz 300 MHz) durchgeführt (Kap. 12.4).

Als Referenzverbindung und für die Quantifizierung wurde die Lösung 3-Trimethylsilyl-Propion-2,2,3,3-d-Säure (TSP) verwendet. Als Lösungsmittel fungierte D_2O . Bei 32 Scans lag die Nachweisgrenze der gemessenen Substanzen bei ungefähr 0,2 g/l. Die für die Auswertung der Daten benötigten Referenzspektren wurden mit der Reinsubstanz oder durch die Messung des Fermentationsüberstandes erstellt.

4.2.2 Bestimmung der on-line Werte

4.2.2.1 Messdaten vom Bioreaktor

Die Übertragung der Messdaten erfolgte bei Fermentationen im 7,5 und 300 Liter Maßstab von der Prozesssteuerung analog über einen Messverstärker an den A/D-Wandler (Siemens). Die digitalisierten Daten wurden anschließend in der LabVIEW-Software bearbeitet. Bei Experimenten unter Einsatz der 42 Liter Bioengineering Anlage wurden die Messdaten über die Profibus-Einheit digital an die LabVIEW-Software übertragen. Die Regelung der Messgrößen erfolgte mittels des PID-Reglers.

Bestimmung des Sauerstoffpartialdrucks

Die Bestimmung der Gelöstsauerstoffkonzentration erfolgte mittels einer polarographischen pO_2 -Elektrode. Die Elektrode wurde vor der Kalibrierung im Bioreaktor sterilisiert. Die Kalibrierung des 100% Wertes erfolgte bei 37°C, einer Begasungsrate von 2 vvm (Raumlufte) und einem Überdruck von 400 mbar. Die Rührerdrehzahl betrug bei Fermentationen im 7,5 Liter Maßstab 1000 rpm, bei Fermentationen im 42 Liter Maßstab 500 rpm. Für den Abgleich des Nullpunktes wurde der Bioreaktor entweder mit Stickstoff begast oder die 0%-Kalibrierung fand ohne Begasung bei einer Temperatur von 100°C statt.

Bestimmung der Temperatur, des Drucks, des pH-Wertes und der Begasungsrate

Die Messung des pH-Wertes erfolgte mittels einer Gel-pH-Elektrode. Die Sterilisation der Elektrode fand im Bioreaktor statt. Die Zwei-Punkt-Kalibrierung erfolgte bei pH 4 und 7. Ein integrierter PID-Regler steuerte eine Schlauchpumpe an und führte bei einem Abfall des pH-Wertes eine 25 %-ige Ammoniaklösung oder ein Gemisch aus 5 M KOH- und 25 %-iger Ammoniaklösung im Verhältnis 1:1 zu. Die Säurezugabe fand bei dieser Prozessführung nicht statt. Die Prozessparameter Temperatur und Druck wurden mit Hilfe entsprechender Sensoren gemessen. Eine Kalibrierung zu Versuchsbeginn war nicht notwendig, da die Werte in der Prozesssteuereinheit gespeichert sind.

Bestimmung der Kohlendioxid- und Sauerstoffkonzentration in der Abluft

Die Messung der Kohlendioxid- und Sauerstoffkonzentration erfolgte in einem Teilstrom der Abluft. Kohlendioxid wurde durch Nahinfrarotabsorption, Sauerstoff paramagnetisch gemessen. In das Gerät war eine Pumpe integriert, durch die ein konstanter Gasstrom von 1 l/min eingestellt wurde. Für den Nullabgleich wurde Kalibriergas aus 100% Stickstoff eingesetzt. Die Kalibrierung des O_2 -Richtwertes wurde mit Raumlufte (20,9% O_2), die des CO_2 -Richtwertes mit Kalibriergas (10% CO_2) durchgeführt. Für den Kohlendioxidabgleich (0,03%) wurde Raumlufte verwendet.

4.2.2.2 Bestimmung der Glukosekonzentration

Es wurden zwei unterschiedliche semi-kontinuierliche Messsysteme zur Bestimmung der Glukosekonzentration verwendet. Bei Fermentationen im 7,5 Liter Bioreaktor wurde ein auf SIA-Technik basierender on-line Glukose Analysator (OLGA – On Line General Analyser, IBA GmbH, Göttingen) verwendet (Schuhmann et al. 1995). Bei Fermentationen im 42 Liter Maßstab wurde für die Messung der Glukose das System Trace verwendet (Tollnick et al. 1999).

OLGA-System

Beim OLGA-System waren die Kopplung eines Umlaufs an den Bioreaktor und die Verwendung eines Filtrationsmoduls erforderlich, um eine kontinuierliche Bereitstellung von zellfreiem Fermentationsüberstand (Permeat) zu ermöglichen (Gerigk 2001). Die Probenahme erfolgte im Abstand von ungefähr zwei Minuten direkt aus dem Permeatstrom. Die Messung mittels des OLGA-Systems erfolgte druckfrei. Die Bestimmung der Glukosekonzentration erfolgte mit Hilfe eines Biosensors (Firma SensLab), der vor jeder Fermentation neu in die Messküvette des Gerätes eingesetzt wurde. Auf dem Biosensor war das Enzym Glukoseoxidase immobilisiert. Die Glukoseoxidase katalysiert die Reaktion der Glukose in Glukonolacton. Als Nebenprodukt dieser Reaktion wurde jeweils eine äquimolare Menge Wasserstoffperoxid (H_2O_2) frei, die amperometrisch gemessen werden konnte. Das gemessene Signal wurde über einen Verstärker an einen PC weitergeleitet und mit Hilfe der OLGA-Software ausgewertet. Die Auswertung erfolgte über eine Kalibriergerade, die automatisch alle 30 bis 60 Minuten mittels einer Zwei-Punkt-Kalibrierung erstellt wurde. Die Dauer der Messung, beginnend mit der Probenahme bis zur Auswertung, dauerte ungefähr zwei Minuten. Als Medium für die Spül- und Verdünnungsvorgänge diente der OLGA-Puffer (Kap. 12.1.8). Die Glukosekonzentration wurde auf ungefähr 3 g/l geregelt.

Process Trace-Technik

Die on-line Glukosemessung mittels der Process Trace-Technik wurde für die ISPR und ^{13}C -Markierungsexperimente im 42 Liter Maßstab eingesetzt. Die Messung beruht auf dem Verfahren der Fließdiffusionsanalyse mit einer zeitabhängigen Probenanreicherung (Tollnick et al. 1999). Die Probe wurde zellfrei über eine im Bioreaktor sterilisierte Dialysesonde entnommen (Abb. 4.1).

Die Glukose diffundierte aus der Fermentationsbrühe über eine Dialysemembran in die in der Dialysesonde fließende Pufferlösung. Diese angereicherte Lösung floss zum Detektor. Auf dem Biosensor war das Enzym Glukoseoxidase immobilisiert. Die Messung erfolgte amperometrisch, indem Glukose zu Glukonolacton und Wasserstoffperoxid umgesetzt wurde. Die Messung erfolgte in Intervallen von maximal 2,5 Minuten. Das System wurde mit Standardlösungen von 4 und 20 g/l Glukose kalibriert. Die Rekalibrierung erfolgte während der Fermentation im Abstand von 100 Messungen. Nach Bedarf wurde die Rekalibrierung manuell durch die Anpassung des Systems, ausgehend von off-line gemessenen Werten, durchgeführt.



Abb. 4.1: Links: Abbildung der Dialysesonde der Process Trace-Technik. Rechts: Abbildung des on-line Analysesystems Process Trace (Quelle: Trace GmbH).

4.3 Apparativer Aufbau und Fermentationsdurchführung

In der Abbildung 4.2 sind die zeitlichen Verläufe der wichtigsten Fermentationsparameter idealisiert dargestellt.

Das Hauptkulturmedium beinhaltet sowohl das Substrat Glukose als auch die Aminosäuren L-Tyrosin und L-Phenylalanin für das Wachstum der auxotrophen Stämme. Die Glukose wurde in einer Konzentration von 10 g/l vorgelegt. Durch einen geregelten Zulauf wurde die Glukosekonzentration nach der Batchphase auf einen festen Wert eingestellt. Die Zuführung von L-Tyrosin und L-Phenylalanin ist für das Wachstum der auxotrophen Mikroorganismen notwendig. Der Start der CHD-Produktion wurde durch Zugabe von IPTG induziert.

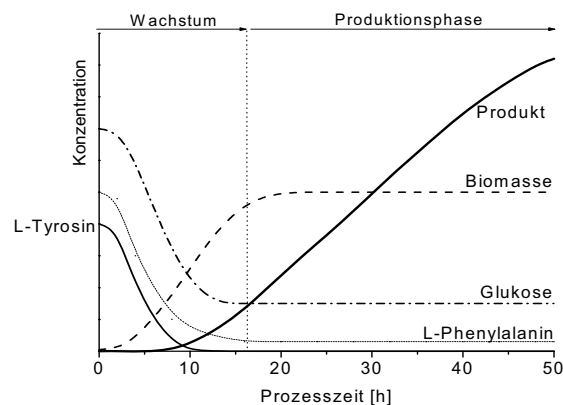


Abb. 4.2: Graphische Darstellung des theoretischen Verlaufs der Fermentation im Zulaufverfahren (Fed-Batch).

4.3.1 Fermentationsprozess im Zulaufverfahren im 7,5 Liter Bioreaktor

Für die Experimente zur Prozessentwicklung und Stammentwicklung wurden Fermentationen im Zulaufverfahren im 7,5 Liter Bioreaktor der Firma Bioengineering durchgeführt (Abb. 4.3). Die Anlage war mit einer on-line Glukosemessung (OLGA) für den geregelten Zulauf des Substrates und mit einer Regelung der Zugabe der Aminosäurelösung ausgestattet (Abb. 4.4).

Vor dem Start der Fermentation wurde die pH-Elektrode kalibriert und mit der Sauerstoffelektrode in den Bioreaktor eingebaut. Die Zulaufflaschen mit den zugehörigen Schläuchen wurden nach der Sterilisation (Autoklav, 121°C und 20 Minuten) am Bioreaktor angebracht. Der Filtrationsumlauf zur kontinuierlichen Entnahme von zellfreiem Fermentationsüberstand wurde chemisch durch Spülen mit NaOH sterilisiert. An das Filtrationsmodul wurde ein Analysesystem zur kontinuierlichen Bestimmung der Glukosekonzentration (OLGA) angeschlossen. Der Bioreaktor, vom Umlauf getrennt, wurde 20 Minuten bei 121°C sterilisiert.

Die Kalibrierung der pO_2 -Elektrode und der Abgasanalytik erfolgte bei einem pH-Wert von 6,5 und einer Temperatur von 37°C. Die Datenübermittlung der Abgasanalytik an die Prozesssteuerung erfolgte analog (Kap. 4.3.6).

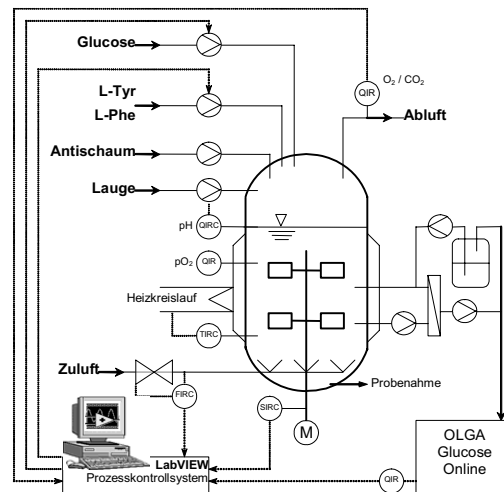


Abb. 4.3: Schematischer Aufbau des Fermentationsprozesses im 7,5 Liter Bioreaktor mit der Peripherie zur on-line Glukoseregulation (Geräteliste Kap. 11.5).

Die Bereitstellung von zellfreiem Fermentationsüberstand für die on-line Glukosemessung wurde durch den Einsatz eines Hohlfaserultrafiltrationsmoduls mit einer aktiven Fläche von 23 cm² und einer Porenausschlussgrenze von 500 kDa ermöglicht. Das Modul funktionierte nach dem Cross-Flow Prinzip. Die Verbindung des Umlaufs mit dem Bioreaktor erfolgte mittels zweier Animpfnadeln. Für den Umlauf wurde eine Schlauchpumpe mit einer Förderleistung von 1,6 l/min verwendet. Das Innenvolumen des Umlaufs betrug ungefähr 20 ml, wodurch eine Verweilzeit von unter zwei Sekunden erreicht wurde. Dadurch konnte eine Sauerstofflimitierung innerhalb des Umlaufs vermieden werden. Das Ultrafiltrationsmodul konnte während der Fermentation bis zu 2 ml/min zellfreies Permeat fördern. Über einen Teflonschlauch wurde das Permeat an die on-line Glukosemessung OLGA geleitet. Abhängig von dem eingestellten Programm wurden im Abstand von je 90 bzw. 120 Sekunden jeweils 10 µl Proben aus dem Permeatstrom entnommen. Die Rückführung des nicht verwendeten Permeatstroms in den Bioreaktor erfolgte über eine Druckausgleichflasche. Nach Abschluss der Fermentation wurde der Filtrationsumlauf von dem Bioreaktor getrennt und chemisch mit 5 %iger Natronlauge gereinigt und mit Wasser gespült.

Zur Peripherien der Anlage gehörten Glukose- und L-Tyrosin/L-Phenylalaninzuläufe. Die Glukosekonzentration in dem Vorratsbehälter betrug 700 g/l. Die Aminosäurelösung wurde in 10 %-iger Ammoniaklösung (pH ~ 12) mit einer Konzentration von 25 g/l L-Tyrosin und 22,8 g/l L-Phenylalanin angesetzt. Zu den beiden Zulaufsystemen gehörten Waagen, Dosierstrecken und Schlauchpumpen, die über serielle Schnittstellen verfügten. Zu der pH-Regelung gehörte ein 25 %iges Ammoniakwasser-System mit Waage und Dosierstrecke, die

analoge Messsignale sendete. Das Antischaummittel wurde über eine Schlauchpumpe manuell zugegeben.

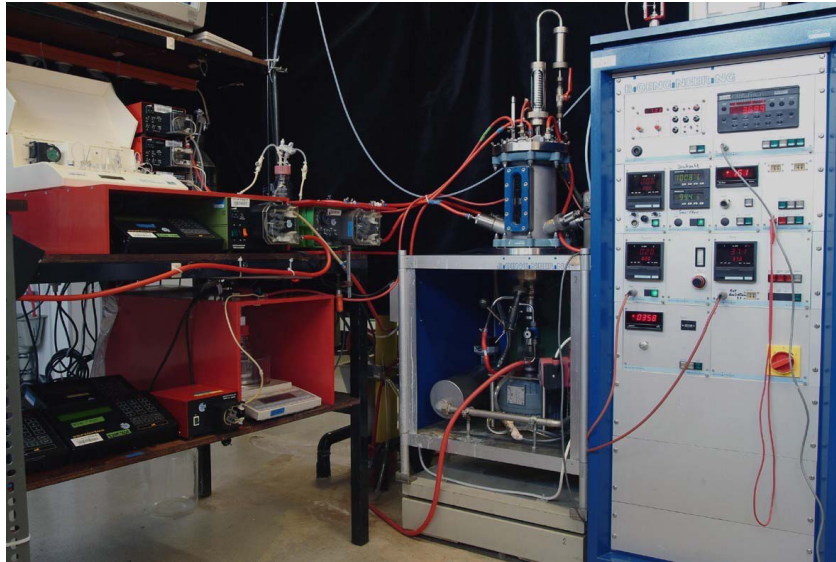


Abb. 4.4: Foto des 7,5 Liter Bioreaktors mit dem integrierten OLGA-System (oben links) zur on-line Glukosemessung.

Nach der Sterilisation wurden 3,15 Liter des Hauptkulturmediums (Kap. 11.1.4) über ein Mikrofiltrationsmodul ($0,2\ \mu\text{m}$) in den Bioreaktor filtriert. Das Medium wurde in einer Konzentration von 110 % angesetzt, damit nach der 10 %-igen Inokulation der Vorkultur die Ausgangskonzentrationen eingestellt wurden. Die Fermentation wurde mit einer Rührerdrehzahl von 400 rpm, einem Anfangsüberdruck von 0,2 bar und einer Begasungsrate von 1,5 l/min begonnen. Der Sauerstoffpartialdruck wurde während der Fermentation durch Einstellung der Drehzahl (max. 1300 rpm), der Begasungsrate (max. 10 l/min) und des Überdruckes (max. 0,8 bar) über einem Wert von 30 % gehalten. Der Sauerstoffpartialdruck betrug dabei einen Wert von minimal 75,4 mbar bei einem Überdruck von 0,2 bar und von minimal 113 mbar bei einem Überdruck von 0,8 bar. Die Fermentation wurde durch die Inokulation von 350 ml Vorkultur gestartet. Die optische Dichte der Vorkultur betrug zwischen 2 und 3. Die IPTG-Induktion erfolgte nach Erreichen einer optischen Dichte zwischen 6 und 8. Für die optimale Biomasse- und Produktbildung während der Wachstumsphase wurde die Zufuhr der Aminosäuren mittels einer empirischen Gleichung (Gl. 4-3, S. 55) geregelt. Der Start der L-Tyrosin- und L-Phenylalanin-Zugabe erfolgte bei einer optischen Dichte zwischen 10 und 12. Sank die vorgelegte Glukosekonzentration von 10 g/l auf ca. 5 g/l, wurde der Zulauf der Glukose gestartet. Die Glukosezulauftrate wurde über die kontinuierliche Bestimmung der Glukosekonzentration (OLGA) und durch den Einsatz eines entsprechenden Regelkonzeptes angeglichen (Kap. 4.3.7).

4.3.2 Fermentationsprozess im Zulaufverfahren im 42 Liter Bioreaktor

Für die Experimente zur Prozessentwicklung im Bereich der *in situ* Produktgewinnung (ISPR) und der ^{13}C -Markierungsexperimente mittels der Sensor-Master-Technik wurden Fermentationen im Zulaufverfahren im 42 Liter Bioreaktor der Firma Bioengineering durchgeführt (Abb. 4.5). Die Anlage war mit einem TRACE-System zur on-line Glukosemessung und einem geregelten Zulaufsystem für die Glukose- bzw. Aminosäurelösung ausgestattet.

Bei Experimenten zur *in situ* Produktgewinnung wurde ein Filtrationsumlauf zur kontinuierlichen Entnahme von zellfreiem Fermentationsüberstand angeschlossen. Der Filtrationsumlauf wurde vor der Sterilisation des Bioreaktors chemisch durch Spülen mit NaOH sterilisiert.

Bei den ^{13}C -Markierungsexperimenten mittels der Sensor-Master-Technik wurde an den 42 Liter-Bioreaktor ein Verrohrungssystem inklusive eines Ventils zur Entnahme der Fermentationsbrühe angeschlossen (Kap. 4.3.4).

Vor der Sterilisation wurden 18 Liter des Hauptkulturmediums (Kap. 12.1.4) in den Bioreaktor gepumpt. Das Medium wurde in einer Konzentration von 110 % angesetzt, damit nach der 10 %-igen Inokulation der Vorkultur die Ausgangskonzentrationen eingestellt wurden. Anschließend wurde der Bioreaktor, durch zwei Ventile von dem Verrohrungssystem getrennt, 20 Minuten bei 121 °C sterilisiert.

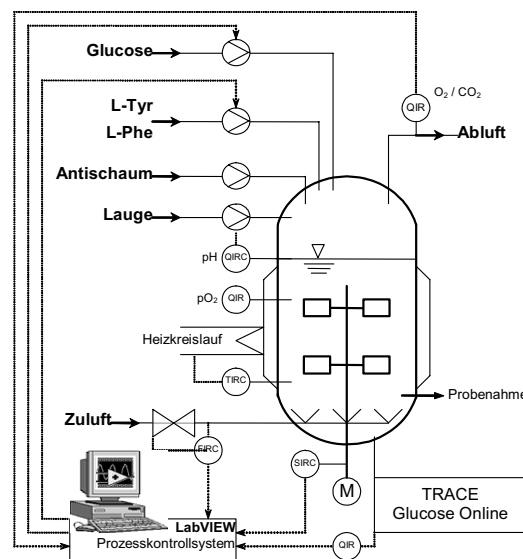


Abb. 4.5: Schematischer Aufbau des Fermentationsprozesses im 42 Liter Maßstab (Kap. 11.5).

Die Vorgehensweise bei der Vorbereitung und dem Zulauf des Substrates und der Aminosäuren entsprach den Angaben im Kapitel 4.3.1. Die Glukosezulaufzeiten wurden über die kontinuierliche Bestimmung der Substratkonzentration (TRACE) und den Einsatz eines entsprechenden Regelkonzeptes angeglichen (Kap. 4.3.7). Für die optimale Biomasse- und

Produktbildung während der Wachstumsrate wurde die Zufuhr der Aminosäuren mittels einer empirischen Gleichung (Gl. 4-3, S. 55) geregelt.

Zu Beginn der Fermentation wurde eine Rührerdrehzahl von 400 rpm, ein Anfangsüberdruck von 0,2 bar und eine Begasungsrate von 8,5 l/min eingestellt. Der Sauerstoffpartialdruck wurde während der Fermentation durch Einstellung der Drehzahl (max. 1000 rpm), der Begasungsrate (max. 70 l/min) und des Überdruckes (max. 1 bar) über einem Wert von 30 % gehalten. Minimal wurden 125,7 mbar Sauerstoffpartialdruck bei einem Überdruck von 1,0 bar erreicht. Die Fermentation wurde durch die Inokulation von zwei Liter Vorkultur gestartet. Die optische Dichte der Vorkultur betrug zwischen zwei und drei.

4.3.3 Fermentationsprozess im Zulaufverfahren im 300 Liter Maßstab

Für die Experimente zur Produktion von 2,3-*trans*-CHA, 2,3- und 3,4-*trans*-CHD wurden Fermentationen im Zulaufverfahren im 300 Liter Bioreaktor der Firma Chemap durchgeführt (Abb. 4.6 und 4.7).

Die Vorgehensweise bei der Vorbereitung und der Fermentation entsprach den Vorgaben aus dem Kapitel 4.3.1. Abweichend wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- Vor der Sterilisation wurden 135 bzw. 150 Liter des Hauptkulturmediums (Kap. 11.1.4) in den Bioreaktor gepumpt.
- Das Zulaufverfahren beinhaltete die Zugabe von Glukose- (Stammlösung bei Produktion von 2,3-*trans*-CHA: 600 g/l, 3,4- und 2,3-*trans*-CHD: 700 g/l) und Aminosäurelösung.
- Zu Beginn der Fermentation wurden eine Rührerdrehzahl von 400 rpm, ein Anfangsüberdruck von 0,2 bar und eine Begasungsrate von 75 l/min eingestellt.
- Der Sauerstoffpartialdruck wurde während der Fermentation durch Einstellung einer maximalen Drehzahl von 1000 rpm, einer maximalen Begasungsrate von 200 l/min und des maximalen Überdruckes von 1,0 bar über einem Wert von 30 % gehalten. Der minimale Wert des Sauerstoffpartialdrucks betrug 125,7 mbar bei einem Überdruck von 1,0 bar.
- Die Fermentation wurde durch die Inokulation von 15 Liter Vorkultur (OD 6) aus einem 30 Liter Vorkultur Chemap-Bioreaktor gestartet.
- Die Zufuhr der Aminosäuren wurde nach einem im 7,5 Liter Maßstab gewonnenen Feedprofil gesteuert. Der Start der L-Tyrosin/L-Phenylalanin-Zufuhr erfolgte bei einer optischen Dichte zwischen 10 und 12.
- Bei Erreichen der gewünschten Glukosekonzentration wurde die gesteuerte Zufuhr des Substrates gestartet. Es wurde keine on-line Glukosemessung eingesetzt.
- Die IPTG-Induktion erfolgte nach Erreichen einer optischen Dichte zwischen 6 und 8.

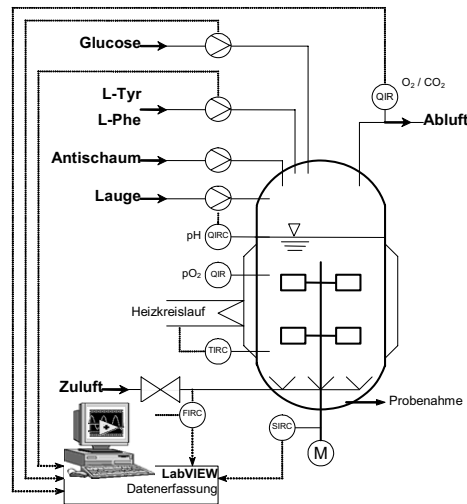


Abb. 4.6: Schematischer Aufbau des Fermentationsprozesses im 300 Liter Chemap Bioreaktor (Geräteliste Kap. 12.5).



Abb. 4.7: Foto des 300 Liter Bioreaktors.

4.3.4 Master/Sensor-Fermentationstechnik für das ^{13}C -Markierungsexperiment

Die Sensor-Reaktor-Technik wurde am IBT2 der Forschungszentrum Jülich GmbH entwickelt (Abb. 4.8) (El Massaoudi et al. 2003). Der Sensor-Reaktor ist ein elektropolierter Edelstahlreaktor der Firma Infors (Abb. 4.9). Das Totalvolumen des Reaktors beträgt zwei Liter mit einem maximalen Arbeitsvolumen von einem Liter. Der Sensor-Reaktor war mit

einer pH-, pO_2 -, Temperatur- und Druckelektrode ausgestattet. Die Pulsmarkierungseinheit war mit einer Düse mittels einer Schnellverschlusskupplung in der Höhe des mittleren Rührers angebracht.

Die Regelung erfolgte mittels einer Labfors-Kontrolleinheit (Infors). Die aktuellen Prozessdaten des Master-Reaktors wurden jede Sekunde aufgenommen. Jeweils fünf Werte wurden gemittelt. Über eine am IBT2 programmierte LabVIEW-Software wurden diese Sollwerte an die Labfors-Kontrolleinheit übertragen. Die Fermentation im Master-Reaktor wurde nach den Vorgaben aus Kapitel 4.3.1 durchgeführt.

Beim Start der Parallelfertmentation wurde 1 Liter der Fermentationsbrühe aus dem 42 Liter Master-Fermenter in den 2 Liter Sensor-Reaktor inkuliert. Bei einem Markierungsexperiment wurde die aktuelle Konzentration enzymatisch bestimmt, um die berechnete ^{13}C -Glukosemenge für das geplante Markierungsverhältnis nach dem Inokuliertvorgang zuzupulsen. Die Probenahme erfolgte zeitgleich im Master- und Sensor-Reaktor im Abstand von 30 Minuten. Neben der zugepulsten Glukosemenge wurden bei Fed-Batch Fermentationen im Sensor-Reaktor ein Zulauf der ^{13}C -Glukose zugeschaltet. Um ein konstantes Verhältnis der markierten Glukose während des Experimentes zu gewährleisten (stationäre Stoffflussanalyse), ist die gleiche Konzentrationsverteilung der markierten und unmarkierten Glukose im Zulaufmedium notwendig.

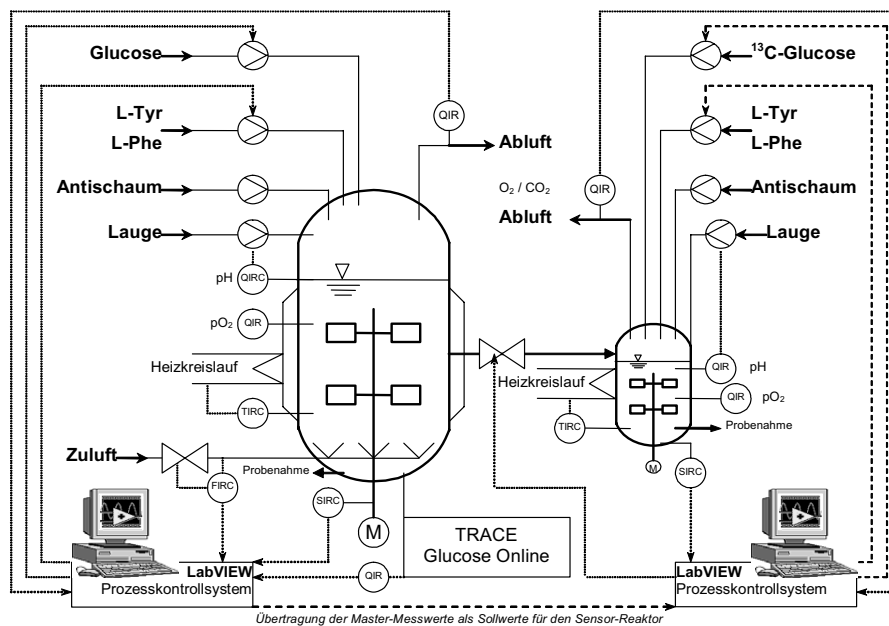


Abb. 4.8: Schema des Reaktoraufbaus beim ^{13}C -Markierungsexperiment.

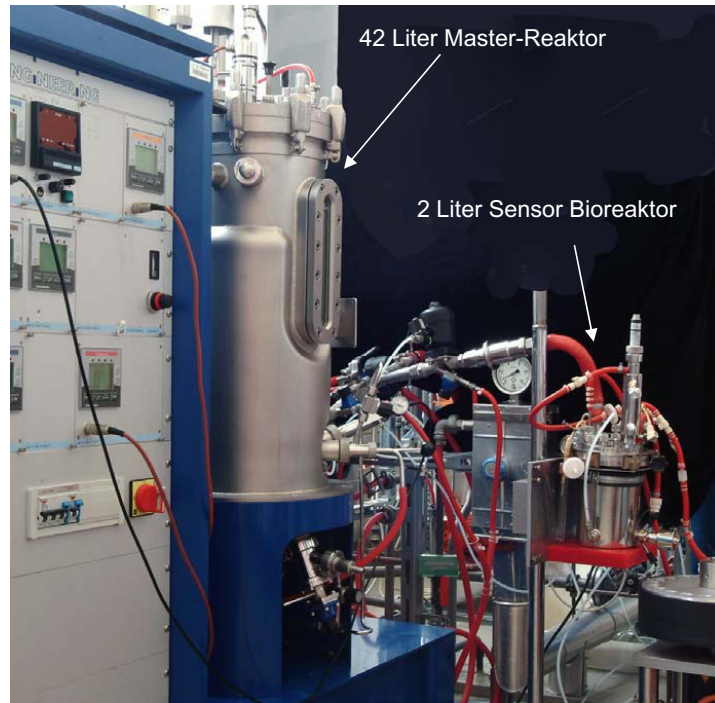


Abb. 4.9: Foto des Reaktoraufbaus beim ^{13}C -Markierungsexperiment.

Die NMR-Analytiktechnik ermöglichte es, die eingestellten Markierungsverhältnisse und die relativen Isotopenanteile zu bestimmen. Mit Hilfe dieser Daten und der Modelliersoftware (^{13}C -Flux) ließen sich die intrazellulären Flüsse quantifizieren. Bei der Untersuchung des Metaboloms war es notwendig, den Stoffwechsel der Produktionsstämme zu unterbrechen. Deswegen wurden die zu untersuchenden Proben sofort mit -50°C kaltem Methanol versetzt. Anschließend wurden die Zellen mittels KOH aufgeschlossen (Buchholz et al. 2001; Oldiges 2004) und bei -80°C eingefroren. Bei der Analyse des Proteoms wurde die Biomasse bei -20°C gelagert.

4.3.5 Integration der Reaktivextraktion an den Fermentationsprozess

Für Experimente zur *in situ* Gewinnung von 2,3- und 3,4-*trans*-CHD wurde ein 42 Liter Bioreaktor eingesetzt (Kap. 4.3.2). Die Fermentationsführung bis zum Beginn der Aufarbeitungsphase entsprach den Vorgaben aus den Kapiteln 4.3.1 und 4.3.2. Der schematische Aufbau der Reaktivextraktionsanlage kann der Abbildung 4.10 entnommen werden.

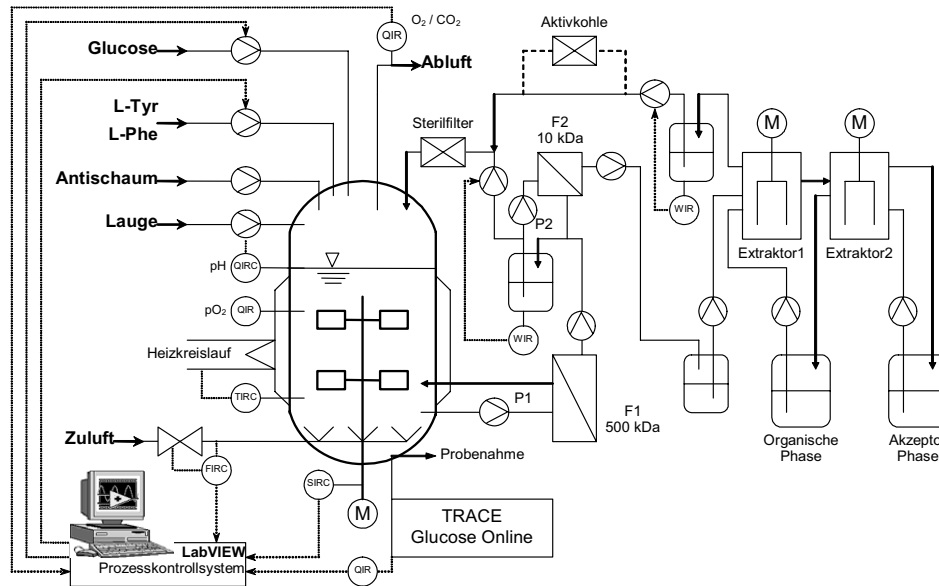


Abb. 4.10: Schematische Darstellung der Anlage zur *in situ* Produktgewinnung. An den 42 Liter Bioreaktor ist eine Peripherie zur Zell- und Proteinrückhaltung und zur Reaktivextraktion angeschlossen.

Die Fermentationsbrühe wurde zu Beginn der *in situ* Aufarbeitungsphase über eine Seitenführung mittels der Pumpe P1 (Schlauchpumpe 71 I/4, Watson-Marlow, USA) durch das Mikrofiltrationsmodul F1 (UFP-500-E35, AG Techn. Corp., USA) befördert. Das Modul besaß eine Porenausschlussgrösse von 500 kDa auf einer effektiven Membranfläche von 0,36 m². Die Wirkungsweise entsprach dem Cross-Flow-Prinzip. Der biomassefreie Fermentationsüberstand wurde mittels einer Schlauchpumpe (Schlauchpumpe 503U, Watson-Marlow, USA) in den ersten Vorlagebehälter befördert. Der Füllstand wurde mit Hilfe eines Systems aus einem Dosimaten (Sartorius, Göttingen), einer Waage (Sartorius, Göttingen) und einer Pumpe (Schlauchpumpe 501 U, Watson-Marlow, USA), die den Fermentationsüberstand zurück in den Bioreaktor pumpt, auf ein Niveau von ca. 500 ml geregelt. Aus dem gleichen Vorlagebehälter wurde mittels der Pumpe P2 (Schlauchpumpe 71 I/4, Watson-Marlow, USA) die Suspension zur Proteinabtrennung durch die Membrankassetten F2 mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa (Cross-Flow-Prinzip, Schleicher & Schuell) befördert. Die Kassetten besaßen eine effektive Membranfläche von 0,07 m². Der biomasse- und proteinfreie Fermentationsüberstand wurde im zweiten Vorlagebehälter gesammelt (maximal 500 ml), um eine stetige Versorgung des ersten Flüssig-Flüssig-Extraktors zu gewährleisten (Abb. 4.11).

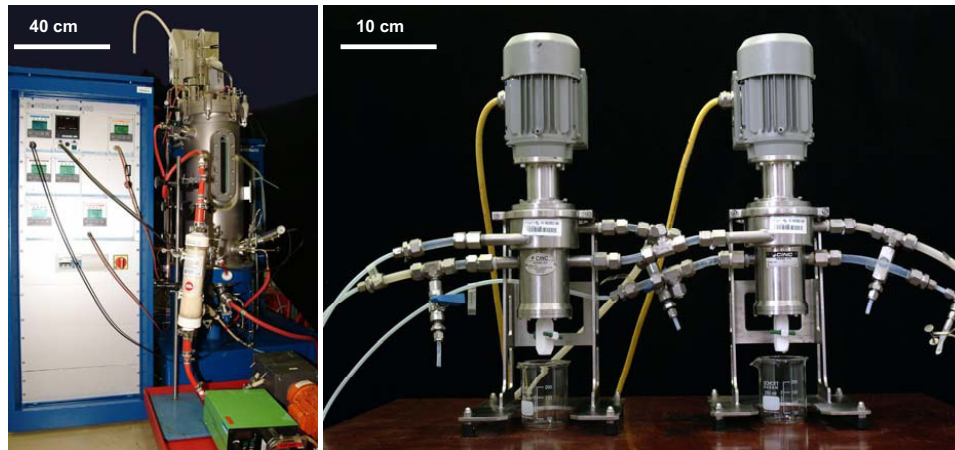


Abb. 4.11: Links: Foto des 42 Liter Bioreaktors mit dem angeschlossenen Mikrofiltrationsmodul MF zur sterilen kontinuierlichen Biomasseabtrennung für die *in situ* Reaktivextraktion. Rechts: Foto der Flüssig-Flüssig-Extraktoren zur on-line Gewinnung von 2,3- und 3,4-*trans*-CHD aus dem Fermentationsüberstand.

Die Förderung fand mittels einer Pumpe (Schlauchpumpe 501 U, Watson-Marlow, USA) statt. Die Raffinatphase wurde in einem Auffangbehälter auf ein Niveau von unter 300 ml geregelt. Damit sollte ein unerwünschter Transport größerer Mengen der organischen Phase verhindert werden. Eine Pumpe förderte die Raffinatphase (Schlauchpumpe 501 U, Watson-Marlow, USA) durch einen Sterilfilter in den Bioreaktor. Bei Bedarf könnte der Rückfluss zusätzlich durch einen Aktivkohlefilter zur unselektiven Abtrennung der Bestandteile der organischen Phase geführt werden. Alle Verbindungen bestanden aus teflonbeschichteten Schläuchen und „Swagelock“ Verbindungen.

4.3.6 Datenerfassung

7,5 Liter Bioreaktor

Die Datenerfassung bei der 7,5 Liter Fermentationsanlage erfolgte über einen Prozessrechner mit der LabVIEW-Software. Die analogen Werte der Prozessgrößen (Begasungsrate, pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck, Druck, Temperatur, Rührerdrehzahl, Gewicht und Abgaswerte für Sauerstoff und Kohlendioxid) wurden in einem SMP-Interface digitalisiert. Die digitalen Daten wurden anschließend an den Prozessrechner geleitet. Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde manuell über die Rührerdrehzahl, den Druck und die Begasungsrate eingestellt. Bis auf das Gewicht wurden alle weiteren Variablen über einen in den Bioreaktor integrierten PID-Regler kontrolliert. Über eine serielle Schnittstelle wurden die Waagen- und Zuflusswerte des pH-Korrekturmittels, der Glukose und Aminosäurelösung in den Prozessrechner eingelesen. Das Prozesskontrollsystem steuerte über Dosierstrecken (Sartorius) die Zugabe der Glukose- und Aminosäurelösung.

Das Messsignal der Glukosekonzentration wurde über eine serielle Schnittstelle von OLGA über die OLGA-Software mittels einer weiteren seriellen Schnittstelle an den LabVIEW-

Prozessrechner geleitet. In der LabVIEW-Software wurden die Messwerte gefiltert und die Verbrauchsrate ermittelt (Gl. 4-1). Die optimalen Zuflussraten wurden vom Prozessrechner an die Dosierstrecke weitergeleitet.

Die volumetrische Sauerstoffaufnahme (OUR) konnte, basierend auf den Volumendaten der Fermentationsbrühe und den Abgaswerten, berechnet werden. Mit Hilfe dieser Werte wurde aus einem empirischen Zusammenhang (Gl. 4-3, S. 55) in der LabVIEW-Software die volumetrische L-Tyrosin/L-Phenylalanin-Verbrauchsrate bestimmt und die optimale Zulaufrate berechnet.

42 Liter Bioreaktor

Die Datenerfassung bei der 42 Liter Bioengineering Fermentationsanlage fand mit Hilfe eines Prozessrechners mit der LabVIEW-Software statt. Die Werte der Prozessgrößen (Begasungsrate, pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck, Druck, Temperatur, Rührerdrehzahl und Gewicht) wurden digital über Profi-Bus Einheiten an den Prozessrechner weitergeleitet. Bis auf das Gewicht wurden alle Variablen über integrierte PID-Regler kontrolliert. Die Abgaswerte für Sauerstoff und Kohlendioxid wurden analog an die SMP-Interface Einheit geleitet. Die digitalisierten Daten wurden an den Prozessrechner weitergeleitet. Die Waagen- und Zuflußwerte der Glukoselösung, der Aminosäurelösung und des pH-Korrekturmittels wurden über eine serielle Schnittstelle in den Prozessrechner eingelesen. Das Prozesskontrollsystem steuerte über Sartorius Dosierstrecken die Zugabe der Glukose- und Aminosäurelösung.

Die kontinuierliche Bestimmung der Glukosekonzentration erfolgte mit Hilfe von TRACE. Das Messsignal der Glukosekonzentration wurde durch eine serielle Schnittstelle an den LabVIEW-Prozessrechner weitergeleitet. In der LabVIEW-Software wurden die Messwerte aufgenommen, die optimale Glukosezuflussrate ermittelt (Gl. 4-1) und diese über eine Sartorius Dosierstrecke realisiert.

Die Bestimmung der Stellgrößen zur indirekten Regelung der Aminosäurezufuhr erfolgte wie bei der 7,5 Liter Fermentationsanlage.

300 Liter Bioreaktor

Die Datenerfassung bei der 300 Liter Fermentationsanlage erfolgte wie bei dem 7,5 Liter Bioreaktor. Es gab folgende Unterschiede zwischen den Anlagen:

- Bei den 300 Liter Fermentationen wurden keine kontinuierlichen Messungen der Glukosekonzentration ermittelt
- Die Dosierung der Aminosäure- und Glukosezuflüsse erfolgte manuell. Als Basisdaten für die Steuerung der Zuläufe diente das im 7,5 Liter Maßstab gewonnene Zulaufprofil.
- Der pO_2 wurde während der Produktionsphase über den PID-Regler der Fermentationsanlage bei 30 % gehalten.

4.3.7 Prozesskontrolle

Regelung der Glukosezufuhr

Bei den Fed-Batch Fermentationen im 7,5 Liter Maßstab erfolgte die kontinuierliche Bestimmung der Glukosekonzentration mit Hilfe des on-line Glukose Analysators OLGA GL2b der Firma IBA GmbH (Kap. 4.2.2.2). Die Messsignale der OLGA wurden mittels der OLGA-Software ausgewertet. Die Messwerte wurden über eine serielle Schnittstelle an den Prozessrechner weitergeleitet. Die on-line Glukosewerte der 42 Liter Fermentationen wurden mittels der TRACE-Technik ermittelt. Bei der Bestimmung der Glukosekonzentration über TRACE wurden die Messdaten direkt über eine serielle Schnittstelle an den Prozessrechner übermittelt.

Die Regelung der Glukosekonzentration erfolgte mit Hilfe eines predikativen Regelkonzepts nach Kleman (Kleman et al. 1991) (Gl. 4-1). Der Regler wurde in die LabView-Prozesssoftware implementiert. Die Vorhersage der nachfolgenden Verbrauchsrate erfolgte über die lineare Regression der vier letzten Glukosezulaufzeiten (Gl. 4-2). Es gilt:

$$\dot{V}_F = \dot{V}_0 + \frac{(c_0 - c_{SP})}{(t_F - t_0)} \quad (4-1)$$

$$\dot{V}_0 = \tilde{\dot{V}}_0 = \int_0^4 \frac{\dot{V}_i}{\tilde{\dot{V}}_{i+1}} dt \quad (4-2)$$

$\dot{V}_F$	geschätzte volumetrische Glukosezulaufzeit	[g/(l*h)]
$\dot{V}_0$	volumetrische Glukosezulaufzeit zum Zeitpunkt der Messung t_0	[g/(l*h)]
$\dot{V}_i$	volumetrische Glukosezulaufzeit zum Zeitpunkt i	[g/(l*h)]
c_{SP}	Glukosesollwert	[g/l]
c_0	aktuelle Glukosekonzentration zum Zeitpunkt der Messung t_0	[g/l]

Die Regelung erfolgte im geschlossenen Regelkreis über ein spezifisches Reglersystem. Für die Regelung verrauschter und totenzeitbehafteter Zustandsgrößen bei nichtlinearem Verhalten der Regelstrecke war in LabVIEW ein modellgestütztes parameteradaptives Regelkonzept implementiert (Striegel 1993). Die Echtzeitbestimmung der Prozessvariablen (geschätzte Konzentration und geschätzter Verbrauch) erfolgte mit einem erweiterten semikontinuierlichen Kalman-Filter (Wiechert 1991). Der Kalman-Filter minimierte die Varianz des Schätzfehlers aller geschätzten Größen beim Eintreffen eines diskreten, totenzeitbehafteten Analysewertes.

Die geschätzte Substratkonzentration und der geschätzte Substratverbrauch zur nächsten Abtastzeit wurden dem Minimal-Varianz-Regler übermittelt (Striegel 1993). Der Minimal-Varianz-Regler veränderte daraufhin die Stellgröße, um die Einhaltung des Sollwertes (Substratkonzentration) zu gewährleisten. Der Regler bezog nicht die aktuelle, sondern die zu erwartende Regelgrößenabweichung ein. Der Arbeitspunkt der Stellgröße entsprach dem Wert, bei dem sich unter stationären Bedingungen automatisch der Sollwert der Substratkonzentration einstellen würde. Da dieser Wert im Zulaufverfahren nicht konstant war, wurde näherungsweise ein Mittelwert der letzten Stellgrößen als Gleichwert genommen. Der Mittelwert wurde aus den letzten 4 Stellgrößen berechnet (Gl. 4-2).

Der Gewichtungsfaktor bestimmt, wie schnell die Stellgrößenabweichung akzeptiert und die Regelgrößenabweichung minimiert wird. Für die Regelung der Glukosekonzentration wurde eine Gewichtung von 15 gewählt. Damit sollte die Stellgröße an den Gleichwert angepasst werden. Die Regelung wurde kurz vor dem Erreichen des eingestellten Sollwertes gestartet. Der eingesetzte Kalman-Filter wurde zwei Stunden, der Minimal-Varianz-Regler eine Stunde vor dem Start der Glukosezufuhr eingeschaltet. Die Messwerte wurden im Abstand von ungefähr drei Minuten ermittelt. Die Totzeit betrug ca. 90 Sekunden.

Indirekte Regelung der Aminosäurezufuhr

Im Rahmen der Arbeit von Gerigk (Gerigk 2001; Gerigk et al. 2002a) über die Prozessentwicklung zur Produktion der Aminosäure L-Phenylalanin wurde die heuristische indirekte Regelung die L-Tyrosinverbrauchsrate (Gl. 4-3) und L-Tyrosinzulauftrate (Gl. 4-4) etabliert.

$$\dot{V}_{L-Tyr} = \frac{OUR_{vol} - 30}{m} \quad (4-3)$$

$$V_{L-Tyr} = \frac{\dot{V}_{L-Tyr} \cdot V_R \cdot \rho}{c_{L-Tyr}} \quad (4-4)$$

$\dot{V}_{L-Tyr}$	volumetrische L-Tyrosinverbrauchsrate	[g/(l*h)]
V_{L-Tyr}	L-Tyrosinzulauftrate	[g/h]
OUR_{vol}	volumetrische Sauerstoffverbrauchsrate	[mmol/(l*h)]
m	Zulauffaktor	[mmol/g]
ρ	Dichte der Fermentationsbrühe	[g/l]
c_{L-Tyr}	L-Tyrosinkonzentration	[g/l]

Da die CHD-produzierenden Stämme auxotroph für L-Tyrosin und L-Phenylalanin waren, war es erforderlich, eine optimale Versorgung mit diesen Aminosäuren zu gewährleisten. Gleichzeitig musste eine Akkumulation von L-Tyrosin in Konzentrationen höher als 36 mg/l (Förberg et al. 1988) aufgrund der inhibierenden Wirkung auf die L-tyrosinsensitive DAHP-Synthase vermieden werden (Kap. 3.1.3). Deswegen wurde während der Wachstumsphase die Regelungsstrategie nach Gerigk (Gerigk 2001) eingeführt. Ausgehend von den Abgaswerten konnte on-line die volumetrische Sauerstoffverbrauchsrate (OUR) (Gl. 3-24, S. 32) berechnet werden. Es wurde angenommen, dass der Sauerstoffverbrauch proportional zu der Biomassebildung zunimmt. Basierend auf den OUR-Wert wurde mit Hilfe des empirischen Zusammenhangs (Gl. 4-3) die volumetrische L-Tyrosin-Verbrauchsrate berechnet. Die Zahl 30 in der Gleichung 4-3 berücksichtigt den ungefähren Sauerstoffbedarf der Biomasse ohne Wachstum (Erhaltungsstoffwechsel). Die Zugabe der zweiten essentiellen Aminosäure L-Phenylalanin erfolgte im selben Zulauf mit L-Tyrosin. Es sollte eine leichte Akkumulation der Aminosäure L-Phenylalanin während der Fermentation gewährleistet werden. Um eine L-Tyrosinlimitierung zu erreichen, wurde ein Zulauffaktor von 2 gewählt (Gerigk et al. 2002a). Am Ende der exponentiellen Wachstumsphase wurde die Regelung unterbrochen und ein konstanter Aminosäureneinfluss für den Erhaltungsstoffwechsel von ca. 0,4 g/(l*h) eingestellt.

5 Ergebnisse und Diskussion der Prozessentwicklung des fermentativen Zugangs zum 2,3-*trans*-CHD

In den nachfolgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der Prozess- und Stammentwicklung zur Biosynthese von 2,3-*trans*-CHD präsentiert und diskutiert. Der Schwerpunkt der Arbeiten lag in der Erhöhung der Produktbildung und der Vermeidung der Akkumulation von Nebenprodukten. Die Lösung einzelner Problemstellungen ist beispielhaft für die Fortschritte der modernen „weißen“ Biotechnologie.

5.1 Entwicklung des Fermentationsverfahrens

Das Produkt 2,3-*trans*-CHD kann, ausgehend von Chorismat, durch zwei enzymatische Reaktionsschritte gebildet werden (Abb. 3.5). Dabei katalysiert das Enzym Isochorismat-Synthase, das durch das Gen *entC* kodiert wird, die Synthese von Chorismat zu Isochorismat. In einem weiteren Reaktionsschritt wird Isochorismat zu 2,3-*trans*-CHD durch die Abspaltung von Pyruvat umgesetzt. Diese Reaktion wird durch das Enzym Isochorismatase (Gen *entB*) katalysiert (Gehring et al. 1997). Die Produktion von 2,3-*trans*-CHD kann durch die plasmidkodierte Überexpression der Gene *entB* und *entC* erreicht werden. Die Ergebnisse von Franke (Franke 2002) zeigten, dass eine fermentative Synthese von 2,3-*trans*-CHD unter Einsatz von *E. coli*-Produktionsstämmen erfolgreich bis zu einer Produktkonzentration von 29 mmol/l (4,6 g/l) durchgeführt werden konnte.

5.1.1 Suche nach einem geeigneten 2,3-*trans*-CHD-Überproduzenten

Der *E. coli* Stamm 4 (F4) wurde für die Untersuchung der Biosynthese der aromatischen Aminosäure L-Phenylalanin entwickelt (Bongaerts et al. 2001; Gerigk 2001). Durch die Transformation des Plasmids pDF3 in diesem Stamm wurde der erste 2,3-*trans*-CHD-Überproduzent hergestellt. Durch den Einsatz des Stammes F4pDF3 (Tab. 4.1) in einem 7,5 Liter Bioreaktor (Kap. 4.3.1) konnte das Produkt 2,3-*trans*-CHD bis zu einer Konzentration von 57 mmol/l (8,9 g/l) fermentativ akkumuliert werden.

Der weitere Entwicklungsschritt auf dem Weg zu einem optimalen 2,3-*trans*-CHD-Produzenten wurde mit dem Stamm F82pC20 gesetzt. In den Arbeiten von Frost (Frost 1994), Gerigk (Gerigk 2001) und Rüffer (Rüffer 2004) konnte gezeigt werden, dass die plasmidkodierte Überexpression des Enzyms DAHP-Synthase, das durch das Gen *aroF^{wt}* kodiert wird, eine Voraussetzung für eine effektive Überproduktion aromatischer Aminosäuren ist. Deshalb wurde in dem Stamm F82pC20 dieses Gen plasmidkodierend überexprimiert. Die Voraussetzung für die optimale CHD-Biosynthese beim Einsatz des Gens *aroF^{wt}* war die Limitierung der L-Tyrosinkonzentration, da L-Tyrosin feedback-inhibierend auf die DAHP-Synthase wirkt (Kap. 3.1.3). Das machte den Einsatz eines Regelungssystems während der Wachstumsphase erforderlich. Es wurde die heuristische indirekte Regelung der L-Tyrosinzufuhr eingesetzt (Kap. 4.3.7). Um einen möglichen Abfluss des Intermediats Chorismat in Richtung von Enterobactin zu vermeiden, wurde zusätzlich das *ent*-Operon des *E. coli*-Produktionsstammes deletiert. Zusätzlich zu den Genen *aroF^{wt}*, *entB* und *entC* wurden die Gene *aroB* und *aroL* in das Plasmid pC20 integriert. Diese Gene

kodieren für die Enzyme 3-Dehydroquinat-Synthase und Shikimatkinase II (Abb. 3.3), die ebenfalls als reaktionslimitierende Schritte bei der Aromaten-Biosynthese identifiziert wurden (Bongaerts et al. 2001; Dell et al. 1993; Oldiges 2004). Aufgrund der Auxotrophien des Stammes F82pC20 für die Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin wurden diese beiden Aminosäuren im Laufe der Fermentation zugeführt.

Neben der Regelung der Aminosäuren-Zufuhr wurde die Regelung der Glukosekonzentration in das Fermentationssystem integriert (Kap. 4.3.7). Damit sollte eine mögliche Nebenproduktbildung minimiert werden. Die kontinuierliche Bestimmung der Glukosekonzentration wurde mittels des „OLGA“-Meßsystems durchgeführt (Kap. 4.2.2.2) (Schuhmann et al. 1995). Ab der Prozessstunde 6,6 wurde die Glukosekonzentration auf ca. 15 mmol/l (3 g/l) geregelt (Abb. 5.1).

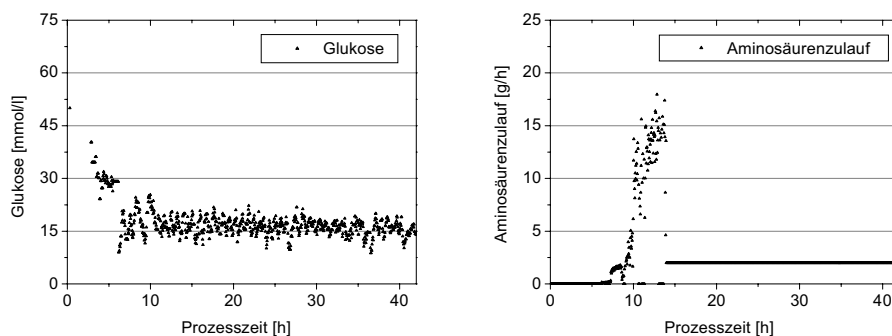


Abb. 5.1: Verlauf der Glukosekonzentration (links) und der Zuflussraten der Aminosäurelösung (rechts) während der 7,5 Liter Fed-Batch Fermentation mit dem Stamm F82pC20. Die online Messung erfolgte mit dem OLGA-Meßsystem.

Die fermentative Biosynthese von 2,3-*trans*-CHD wurde in einem 7,5 Liter Bioreaktor (Kap. 4.3.1) durchgeführt. Das Startvolumen betrug 3,5 Liter. Die 2,3-*trans*-CHD-Produktion erfolgte nach Zugabe von 100 μ M IPTG. Die Induktion wurde beim Erreichen von ungefähr 10% der maximalen Biomassekonzentration nach 7 Stunden durchgeführt. In der Abbildung 5.2 ist der Verlauf der Produktkonzentration dargestellt. Nach einer Fermentationsdauer von 35 Stunden wurde eine maximale 2,3-*trans*-CHD-Konzentration von 118,4 mmol/l (18,5 g/l) erreicht. Am Ende des Experimentes konnten bis zu 0,72 mol des Produktes akkumuliert werden.

Während der Batchphase wurden die Aminosäuren L-Tyrosin mit einer Konzentration von 1,7 mmol/l (0,3 g/l) und L-Phenylalanin mit 3,0 mmol/l (0,5 g/l) vorgelegt (Abb. 5.3). Diese Vorlage ermöglichte die Bildung von maximal 5,5 g/l Biomasse (OD 18). Der Start der Regelung des Zulaufes der Aminosäurelösung begann nach 9,1 Stunden bei Erreichen einer optischen Dichte von 14. Die optimale Zulauftrate während der Wachstumsphase wurde durch Verwendung des Zulauffaktors $m=2$ zur Berechnung der volumetrischen L-Tyrosin-Verbrauchsrate erreicht (Gl. 4-3, S. 55). Die Wachstumsphase wurde nach 13,2 Stunden beendet. Bis dahin flossen 7,3 mmol L-Tyrosin und 9,6 mmol L-Phenylalanin in den Bioreaktor. Es wurde eine Biomassekonzentration von ungefähr 20 g/l erreicht. Die Regelung

der Aminosäuren ermöglichte die notwendige Limitierung der L-Tyrosinkonzentration während der Wachstumsphase (Abb. 5.3). Durch die Einstellung des Flusses von 2 g/h während der Produktionsphase konnte die L-Tyrosinkonzentration limitiert und die L-Phenylalaninkonzentration auf einem konstanten Niveau unter 1 mmol/l gehalten werden.

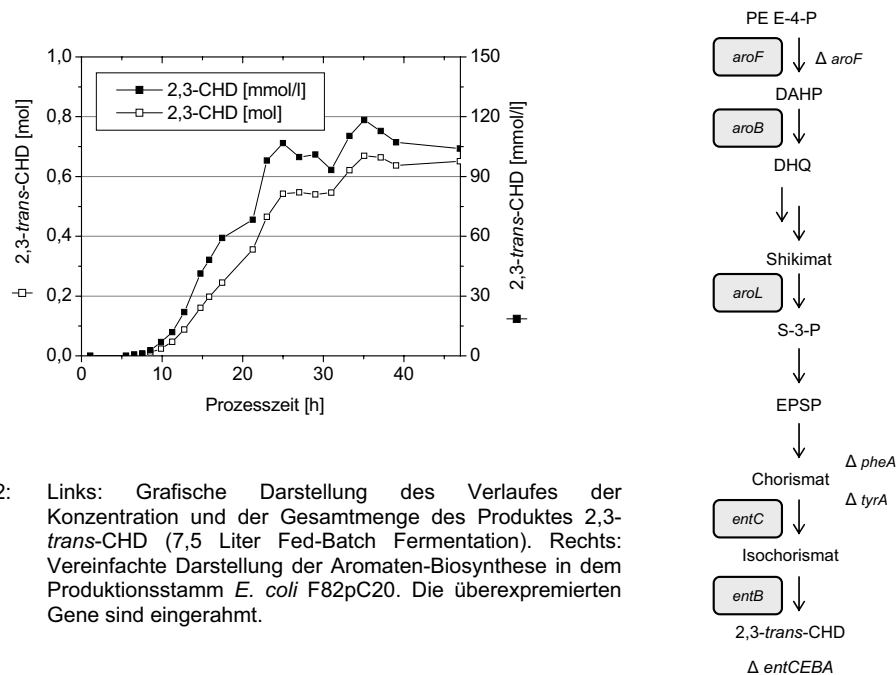


Abb. 5.2: Links: Grafische Darstellung des Verlaufes der Konzentration und der Gesamtmenge des Produktes 2,3-*trans*-CHD (7,5 Liter Fed-Batch Fermentation). Rechts: Vereinfachte Darstellung der Aromaten-Biosynthese in dem Produktionsstamm *E. coli* F82pC20. Die überexprimierten Gene sind eingerahmt.

Während der Wachstumsphase wurde eine Acetatkonzentration von bis zu 16 mmol/l gemessen (Abb. 5.4). Die Konzentration stieg während der Produktionsphase auf maximal 59 mmol/l (4 g/l). Neben Acetat wurde ein weiteres Nebenprodukt, die Glukonsäure, nachgewiesen. Nach 25 Stunden wurde eine Glukonsäurekonzentration von 166 mmol/l und nach weiteren zehn Stunden von 193 mmol/l (43 g/l) gemessen.

Während der Fed-Batch Fermentation mit dem Stamm F82pC20 stieg die differentielle Ausbeute in der Wachstumsphase auf maximal 18,7 %mol/mol (Abb. 5.5). Ab der 27. Prozessstunde sank der Wert unter 10 %mol/mol. Die maximale integrale Selektivität von 14,9 %mol/mol wurde nach 25 Stunden erreicht. Nach der IPTG-Induktion stieg die Produktivität kontinuierlich bis zur Prozessstunde 23 auf 8,9 mmol/(l*h). In den folgenden Stunden sank der Wert unter 2 mmol/(l*h). Die maximale integrale Raum-Zeit-Ausbeute betrug 4,2 mmol/(l*h) (Abb. 5.5).

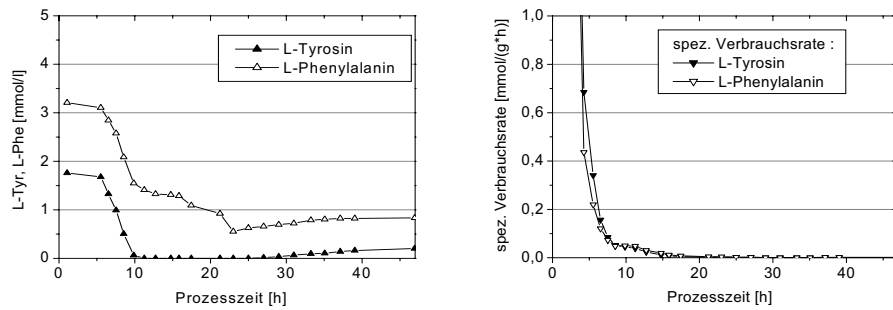


Abb. 5.3: Verlauf der Konzentrationen der aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin (links) sowie Verlauf der spezifischen Aminosäure-Verbrauchsrate (7,5 Liter Fed-Batch Fermentation; *E. coli* F82pC20).

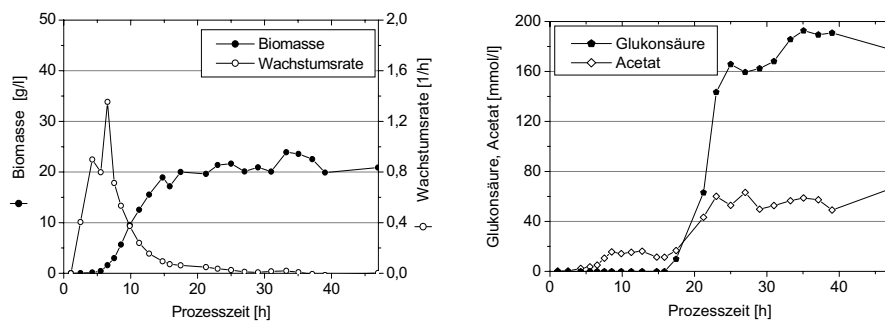


Abb. 5.4: Links: Grafischer Verlauf der Biomassekonzentration und der Wachstumsrate. Rechts: Darstellung der Nebenproduktbildung (7,5 Liter; *E. coli* F82pC20).

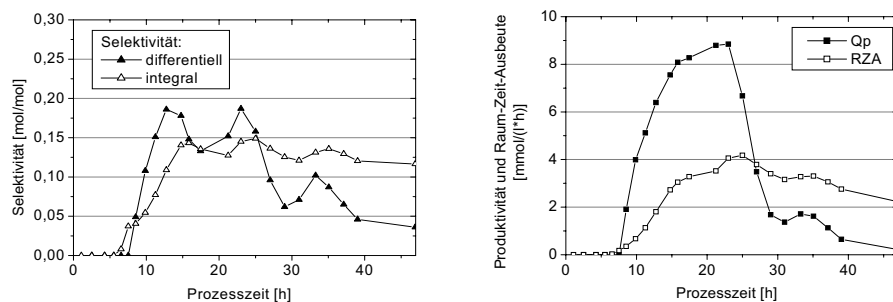


Abb. 5.5: Links: Verlauf der differentiellen und integralen Selektivität. Rechts: Grafische Darstellung der differentiellen Produktivität und der Raum-Zeit-Ausbeute (7,5 Liter; *E. coli* F82pC20).

Zwischen den Prozessstunden 8 und 25 konnte eine konstante spezifische, differentielle Produktbildungsrate von ca. 0,45 mmol/(g*h) ermittelt werden (Abb. 5.6). Ab der 29. Stunde lag der Wert unter 0,1 mmol/(g*h). Die Biosynthese der Glukonsäure begann nach 17 Stunden. Die maximale Glukonsäurebildungsrate wurde nach 23 Stunden mit 1,61 mmol/(g*h) gemessen. Der Wert sank bis zur Prozeßstunde 40 unter 0,1 mmol/(g*h). Vor dem Start der Glukonsäurebildung wurden 8,2 mmol/(g*h) CO₂ gebildet. Bis zur Stunde 21,2 nahm der Wert um 76% auf 2 mmol/(g*h) ab. Ab der 25. Stunde erhöhte sich die spezifische differentielle CO₂-Bildungsrate um 61% auf 5,1 mmol/(g*h). In dem Zeitraum zwischen Prozessstunde 15 und 18 stieg die Glukoseverbrauchsrate um 18% von 3,65 auf 4,46 mmol/(g*h). Nach 33 Stunden fiel die Substratverbrauchsrate unter 1,1 mmol/(g*h) ab.

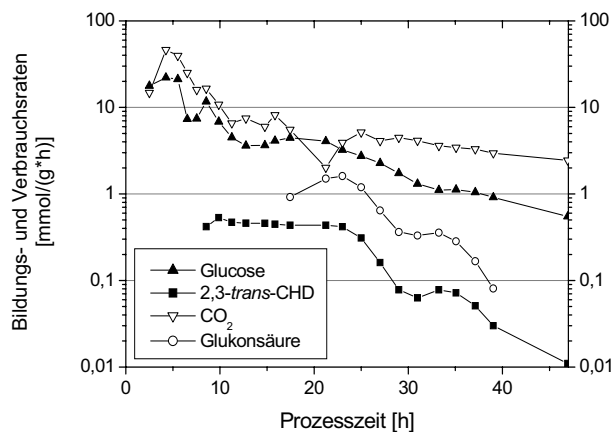


Abb. 5.6: Logarithmische Auftragung des Verlaufes der differentiellen spezifischen Glukoseverbrauchsrate und der spezifischen 2,3-*trans*-CHD-, Glukonsäure- und CO₂-Bildungsrate (7,5 Liter Fed-Batch Fermentation; *E. coli* F82pC20).

Für das Element Kohlenstoff kann aus dem Substrat-Massenfluss in den Bioreaktor und der Akkumulation von Biomasse, CO₂, Produkt und Nebenprodukten im Bioreaktor eine Bilanz erstellt werden. In der Abbildung 5.7 sind die integralen Verläufe der Kohlenstoffverteilung ab dem Zeitpunkt der IPTG-Induktion bis zum Ende der Fermentation dargestellt. Bis zur Prozessstunde 17 wurden 15 %C-Mol des Kohlenstoffs in das Produkt 2,3-*trans*-CHD umgewandelt. Der maximale Wert von 16,9 %C-Mol wurde nach 25 Stunden erreicht. Die Synthese von Glukonsäure nahm nach 35 Stunden einen Anteil von 25,2 %C-Mol ein. Am Ende der Fermentation wurden bis zu 39 %C-Mol des Kohlenstoffs zum Produkt 2,3-*trans*-CHD und zu den Nebenprodukten Glukonsäure und Acetat umgesetzt. Der Anteil des Produktes betrug dabei 13,7 %C-Mol. Am Ende der Fermentation flossen bis zu 45 %C-Mol des eingesetzten Kohlenstoffs ins Kohlendioxid.

Weiterhin wurde im Laufe der Fermentation die Plasmidstabilität des Stammes F82pC20 untersucht. Im Verlauf des Experimentes konnte eine kontinuierliche Abnahme der Anzahl von Zellen, die das Plasmid pC20 enthielten, beobachtet werden. Im Vergleich zu den

Proben während der Batchphase konnte am Ende der Fed-Batch Fermentationen eine signifikante Abnahme von *E. coli* Zellen mit dem Plasmid pC20 festgestellt werden. Die Anzahl von Zellen mit dem Plasmid pC20 lag nur bei ca. 50%.

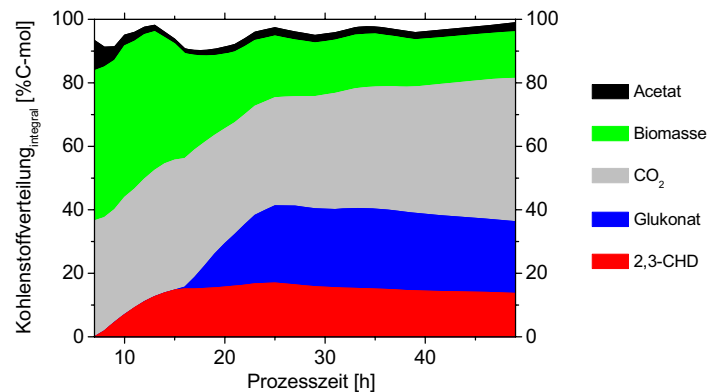


Abb. 5.7: Darstellung der integralen Kohlenstoffbilanz bei der 2,3-*trans*-CHD-Biosynthese mit dem Produktionsstamm *E. coli* F82pC20. Der Verlauf stellt den Zeitraum der Produktion dar.

5.1.2 Untersuchung der Ursachen der Nebenproduktakkumulation

Die im Kapitel 5.1.1 beschriebene Bildung des Nebenproduktes Glukonsäure sollte in weiteren Experimenten untersucht werden. Die Reproduktion der Fed-Batch Fermentation mit dem Stamm F82pC20 führte wiederholt zur Bildung der Glukonsäure, ähnlich den Verläufen in der Abbildung 5.4. In einem weiteren Experiment sollten die möglichen Gründe der Glukonsäurebildung untersucht werden. Zielsetzung des Experimentes war es, den Einfluss reduzierter Wachstumsraten auf die Induktion der Glukonsäurebiosynthese zu prüfen. Weiterhin sollte der Einfluss der einzelnen Phasen während der Fermentation sowie der Produkt- und Nebenproduktkonzentrationen auf die Glukonsäurebildung untersucht werden.

Abweichend zu der Prozessführung im Kapitel 5.1.1 wurde eine 50% geringere Aminosäurezulaufrate gewählt (Gl. 4-3, S. 55, Zulauffaktor $m=4$; Abb. 5.10). Die IPTG-Induktion wurde beim Erreichen von ungefähr 10% der maximalen Biomassekonzentration durchgeführt. Im Vergleich zum Experiment aus Kapitel 5.1.1 fand die IPTG-Induktion nach 7,6 Stunden statt.

Der Verlauf der Produktkonzentration ist in der Abbildung 5.8 dargestellt. Nach einer Fermentationsdauer von 51 Stunden wurde eine maximale 2,3-*trans*-CHD-Konzentration von 99,5 mmol/l (15,6 g/l) erreicht. Zum Schluss des Experimentes wurden bis zu 0,6 mol des Produktes akkumuliert.

Während der Wachstumsphase wurde Acetat bis zu einer Konzentration von 18,7 mmol/l gebildet (Abb. 5.8). Im weiteren Verlauf der Fermentation nahm die Acetatbildung ab. Die

Glukonsäurebildung begann nach 37 Stunden. Am Ende der Fermentation wurden 170 mmol/l Glukonsäure akkumuliert.

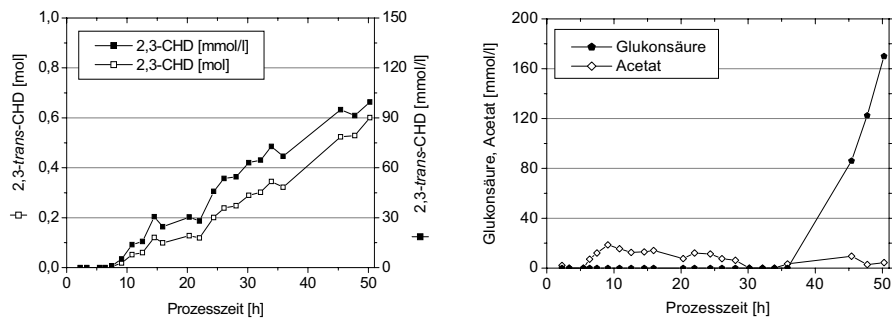


Abb. 5.8: Links: Verlauf der Konzentrationen und der Gesamtmenge des Produktes 2,3-*trans*-CHD bei Fed-Batch Fermentation mit F82pC20 mit dem Aminosäurezulauffaktor $m=4$ (Gl. 4-3, S. 55). Rechts: Konzentrationsverläufe der gebildeten Nebenprodukte Acetat und Glukonsäure.

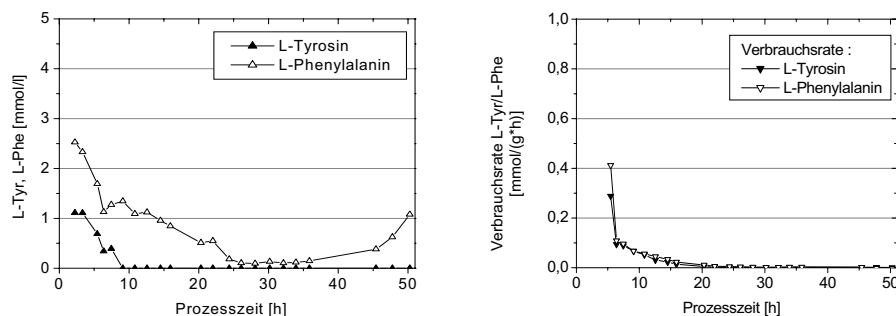


Abb. 5.9: Links: Konzentrationsverlauf der aromatischen Aminosäuren. Rechts: Darstellung der L-Phenylalanin und L-Tyrosin spezifischen Verbrauchsraten (7,5 Liter; F82pC20; $m=4$).

Die Regelung des Zulaufes der Aminosäurelösung begann nach 7 Stunden bei Erreichen einer optischen Dichte von 14. Nach 16,4 Stunden wurde die Wachstumsphase beendet. Es wurden insgesamt 7,3 mmol L-Tyrosin und 9,6 mmol L-Phenylalanin während der Wachstumsphase zugegeben. Es wurde eine Biomassekonzentration von 23,8 g/l ermittelt. Anschließend wurde der Zulauf auf einen konstanten Wert von 1 g/h und ab der Prozessstunde 33 auf 2 g/h gesetzt.

Die maximale differentielle spezifische Produktbildungsrate von 0,91 mmol/(g*h) wurde nach der IPTG-Induktion ermittelt (Abb. 5.11). Im weiteren Verlauf der Fermentation nahm die Produktbildung auf unter 0,19 mmol/(g*h) ab. Die Biosynthese des Nebenproduktes Glukonsäure begann nach 36 Stunden. Die maximale Glukonsäurebildungsrate von 0,69 mmol/(g*h) wurde am Ende der Fermentation erzielt. Bis zur Prozessstunde 36 wurden

3,8 mmol/(g*h) CO₂ gebildet. Während der Glukonsäurebildung nahm die Kohlendioxidbildung um 32% auf 2,6 mmol/(g*h) ab. In dem gleichen Zeitraum stieg die Glukoseverbrauchsrate um 41% von 0,78 auf 1,33 mmol/(g*h).

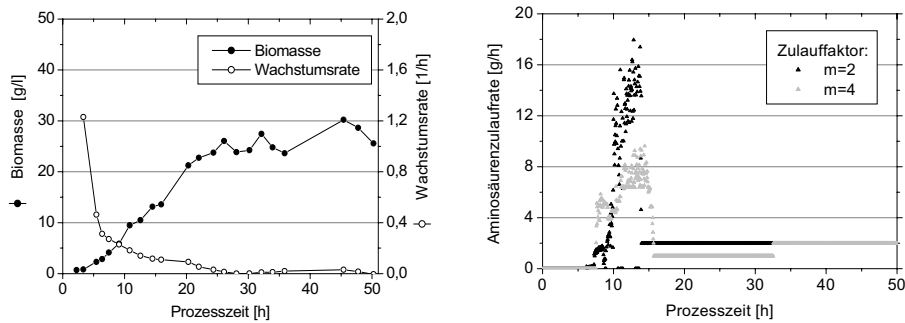


Abb. 5.10: Links: Verlauf der Biomassekonzentration und der Wachstumsrate (7,5 Liter; *E. coli* F82pC20; m=4). Rechts: Vergleich der Verläufe der Aminosäurenzulaufzeiten bei Experimenten mit einem Zulauffaktor von m=2 und m=4 (Gl. 4-3, S. 55).

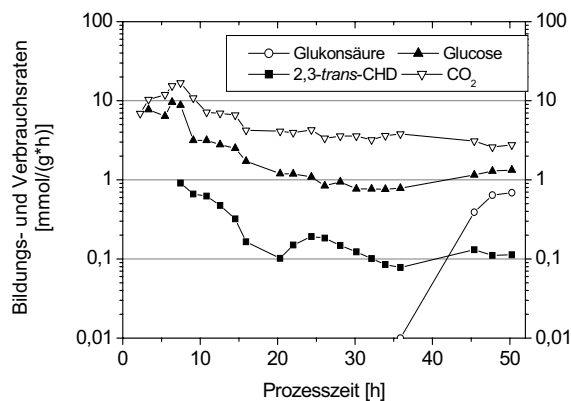


Abb. 5.11: Logarithmische Darstellung des Verlaufes der differentiellen spezifischen Glukoseverbrauchsrate und der spezifischen 2,3-*trans*-CHD-, Glukonsäure- und CO₂-Bildungsraten (7,5 Liter; *E. coli* F82pC20; m=4).

Es wurde eine maximale differentielle substratbezogene Ausbeute von 13,6 %mol/mol erreicht (Abb. 5.12). Nach der Induktion der Glukonsäurebiosynthese stagnierte der Wert auf einem Niveau von 6 bis 8 %mol/mol. Die integrale Selektivität ergab ein Maximum von 8,3 %mol/mol. Nach dem Ende des Wachstums wurde die maximale Produktivität von 4,2 mmol/(l*h) erreicht. Im weiteren Verlauf der Fermentation sank der Wert auf 2 bis

3 mmol/(l*h) ab. Integriert über die Prozesszeit wurde eine maximale Raum-Zeit-Ausbeute von 2,1 mmol/(l*h) ermittelt.

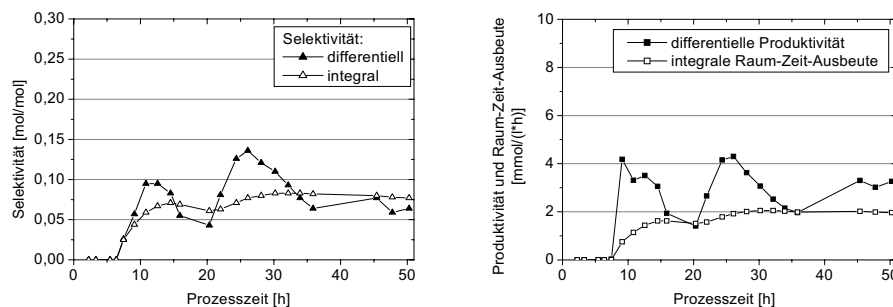


Abb. 5.12: Verlauf der differentiellen und integralen Selektivität (links), der Produktivität und der Raum-Zeit-Ausbeute (rechts) (7,5 Liter; *E. coli* F82pC20; m=4).

5.1.3 Experiment zur Vermeidung der Nebenproduktbildung

Die Biosynthese des Nebenproduktes Glukonsäure führte zur Reduktion der Produktbildung und der Selektivität und würde komplexe Aufarbeitungsverfahren zur Trennung von 2,3-*trans*-CHD und Glukonsäure notwendig machen. Im weiteren Verlauf der Forschungsarbeiten sollte die Vermeidung der Glukonsäurebildung oder die Separation des Nebenproduktes untersucht werden. Einerseits wurde der Einsatz eines *in situ* Aufarbeitungsverfahrens zur kontinuierlichen Reduktion der Produktkonzentration untersucht (Kap. 8). Andererseits sollte die Vermeidung der Nebenproduktbildung durch den Einsatz eines genetisch optimierten Produktionsstammes verfolgt werden, was zu der Konstruktion des *E. coli*-Produktionsstammes F111pC20 führte (Tab. 4.1). Die genetischen Veränderungen bei diesem Stamm entsprachen den Vorgaben des Stammes F82pC20. Zusätzlich wurde das für die PQQ-abhängige Glukosedehydrogenase kodierende Gen *gcd* deletiert (Kap. 5.2.4).

Die Prozessführung entsprach der Fed-Batch Fermentation des Stammes F82pC20 (Kap. 4.3.1). Für den Glukose- und Aminosäurenzulauf wurden die Regelungssysteme eingesetzt. Die Induktion der Produktbildung erfolgte nach 6,6 Stunden bei Erreichen von ungefähr 10 % der maximalen Biomassekonzentration. Der Einsatz des neuen Produktionsstammes führte zur Akkumulation von bis zu 140,2 mmol/l (21,9 g/l) des Produktes (Abb. 5.13). Damit wurden nach 51,4 Stunden 0,75 mol 2,3-*trans*-CHD gebildet. Die Regelung des Zulaufes der Aminosäurelösung begann nach 7,6 Stunden ab einer optischen Dichte von 14. Es wurde der Zulauffaktor m=2 eingesetzt (Gl. 4-3, S. 55). Die Wachstumsphase wurde nach 15,2 Stunden beendet. Insgesamt wurden 7,3 mmol L-Tyrosin und 9,6 mmol L-Phenylalanin eingesetzt. Es wurde eine Biomassekonzentration von ca. 12 g/l erreicht (Abb. 5.15). Der Zulauf der Aminosäurelösung wurde anschließend auf einen konstanten Wert von 2 g/h eingestellt. Die Konzentration der Biomasse stieg bis zum Ende des Experimentes auf 22,4 g/l. Die Akkumulation des Nebenproduktes Glukonsäure wurde

während der gesamten Fermentation nicht beobachtet. Das Nebenproduktspektrum reduzierte sich auf die Bildung von maximal 18,6 mmol/l (1,1 g/l) Acetat (Abb. 5.15).

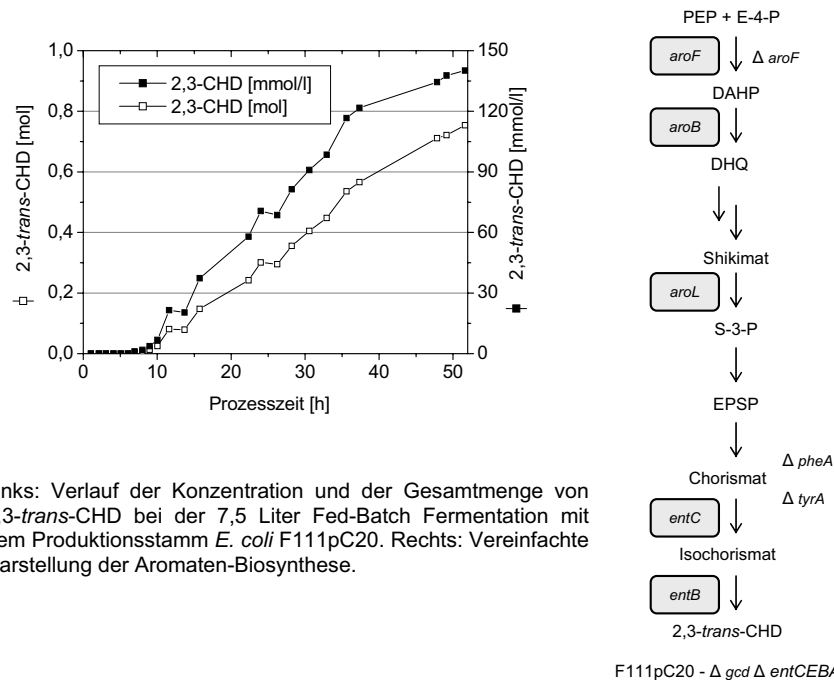


Abb. 5.13: Links: Verlauf der Konzentration und der Gesamtmenge von 2,3-*trans*-CHD bei der 7,5 Liter Fed-Batch Fermentation mit dem Produktionsstamm *E. coli* F111pC20. Rechts: Vereinfachte Darstellung der Aromaten-Biosynthese.

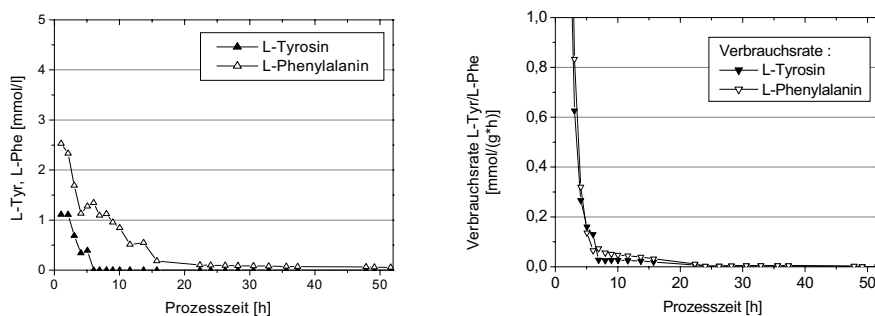


Abb. 5.14: Verlauf der Aminosäurenkonzentrationen (links) und der spezifischen Verbrauchsrate von L-Tyrosin und L-Phenylalanin (rechts) (7,5 Liter; *E. coli* F111pC20).

Während der Wachstumsphase stieg der differentielle substratbezogene Produktausbeutekoeffizient kontinuierlich bis auf 14,9 %mol/mol (Abb. 5.16). Der maximale Wert wurde mit 24 %mol/mol nach 35,6 Stunden erreicht. Die integrale Selektivität stieg konstant bis zur Prozessstunde 37,3 auf 15,4 %mol/mol. Die Produktivität nahm während der

Wachstumsphase bis $5 \text{ mmol}/(\text{l}^*\text{h})$ zu. Nach 35,6 Stunden wurde ein maximaler Wert von $5,4 \text{ mmol}/(\text{l}^*\text{h})$ ermittelt. Integriert stieg die Raum-Zeit-Ausbeute bis zur Prozessstunde 37,4 bis auf $3,2 \text{ mmol}/(\text{l}^*\text{h})$.

Ab der Induktion der Produktbildung (Stunde 6,6) bis zum Ende der Wachstumsphase (15,2 Stunde) betrug die spezifische differentielle Produktbildungsrate maximal $0,51 \text{ mmol}/(\text{g}^*\text{h})$. Zwischen den Prozessstunden 22 und 37 wurde ein Wert zwischen 0,35 und $0,27 \text{ mmol}/(\text{g}^*\text{h})$ ermittelt (Abb. 5.17). Nach 48 Stunden sank der Wert unter $0,15 \text{ mmol}/(\text{g}^*\text{h})$. Die CO_2 -Bildungsrate nahm von $4,6 \text{ mmol}/(\text{g}^*\text{h})$ am Ende der Wachstumsphase auf ungefähr $3 \text{ mmol}/(\text{g}^*\text{h})$ während der Produktionsphase ab. Der Verbrauch der Glukose fiel zwischen dem Ende der Wachstumsphase und der Prozessstunde 24 um 50% von 3,2 auf $1,6 \text{ mmol}/(\text{g}^*\text{h})$. Bis zum Ende der Fermentation sank die Glukoseverbrauchsrate auf $1,2 \text{ mmol}/(\text{g}^*\text{h})$.

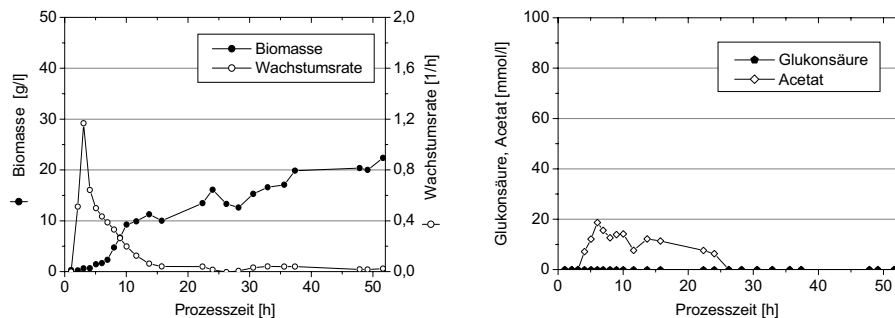


Abb. 5.15: Verlauf der Biomassekonzentration und der Wachstumsrate (links) sowie Konzentrationsverlauf von Acetat und Glukonsäure (rechts) (7,5 Liter; *E. coli* F111pC20).

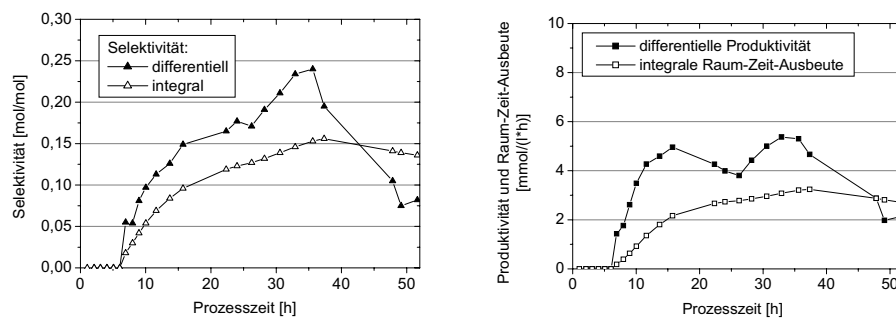


Abb. 5.16: Links: Grafische Darstellung des Verlaufes des differentiellen und integralen substratbezogenen Produktausbeutekoeffizienten. Rechts: Verlauf der Produktivität und der Raum-Zeit-Ausbeute (7,5 Liter; *E. coli* F111pC20).

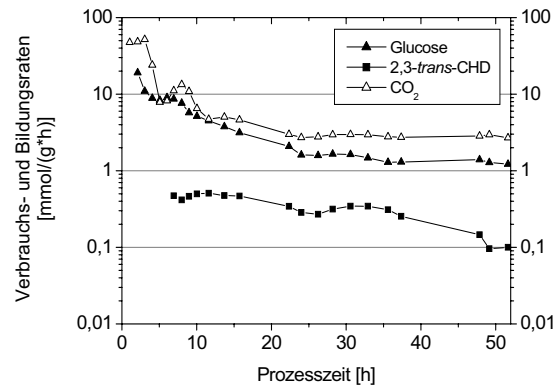


Abb. 5.17: Logarithmische Auftragung des Verlaufes der differentiellen Glukoseverbrauchsrate und der 2,3-*trans*-CHD- und CO₂-Bildungsraten während der Fed-Batch Fermentation mit *E. coli* F111pC20.

Die Untersuchungen der Plasmidstabilität beim Stamm F111pC20 ergaben, dass am Ende der Fermentation nur noch ca. 50% der Zellen das Plasmid enthielten.

5.1.4 Zugang zum 2,3-*trans*-CHD im halbertechnischen Maßstab

Basierend auf den Daten der 7,5 Liter Fermentationen mit dem Stamm F111pC20 (Kap. 5.1.3) sollte der Zugang zu 2,3-*trans*-CHD im Kilogramm-Maßstab umgesetzt werden. Die manuelle Glukosezugabe im 300 Liter Maßstab basierte auf den im 7,5 Liter Maßstab gewonnenen Verbrauchsrate. Die Glukosekonzentration im Medium lag im Laufe der Fermentation im Bereich von 2 bis 15 g/l. Das Startvolumen betrug 152 Liter. Die Zugabe von 100 µM IPTG erfolgte bei ca. 10% der maximalen Biomassekonzentration.

Basierend auf den Daten der 7,5 Liter Fermentationen wurde die Zufuhr der Aminosäurenlösung anhand des berechneten Profils manuell gesteuert. Die L-Tyrosinkonzentration konnte damit unter einem Wert von 0,2 mmol/l gehalten werden (Abb. 5.19). Die L-Phenylalaninkonzentration stieg im Laufe der Fermentation auf über 4,5 mmol/l.

In der Abbildung 5.18 sind die Verläufe der 2,3-*trans*-CHD-Konzentration und der gebildeten Gesamtmenge des Produktes dargestellt. Am Ende des Experimentes wurden 101 mmol/l (15,8 g/l) gebildet. Insgesamt wurden bis zu 23 mol (3,6 kg) 2,3-*trans*-CHD im Fermentationsüberstand akkumuliert.

Die maximale Biomassekonzentration betrug 23,2 g/l (Abb. 5.19). Während der Wachstumsphase wurde eine maximale Acetatkonzentration von 35 mmol/l gemessen. Die Konzentration des Nebenproduktes nahm im Laufe des Experimentes ab. Am Ende der Fermentation wurde der Glukosezulauf gestoppt. In der Folgezeit wurden das Substrat Glukose und das Nebenprodukt Acetat vollständig verstoffwechselt.

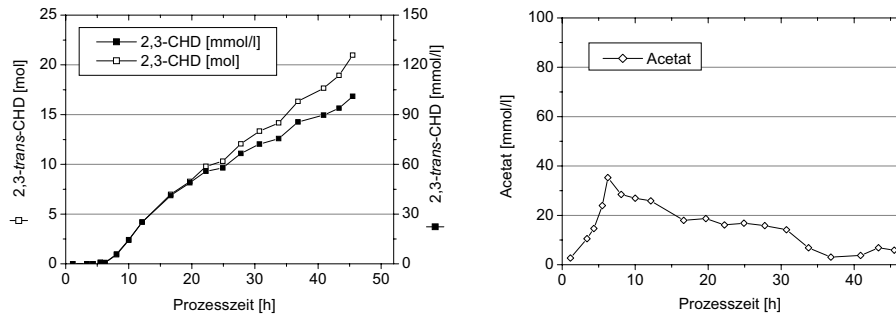


Abb. 5.18: Links: Verlauf der 2,3-*trans*-CHD-Konzentration und der -Gesamtmenge. Rechts: Verlauf der Acetatkonzentration (300 Liter Fed-Batch; *E. coli* F111pC20).

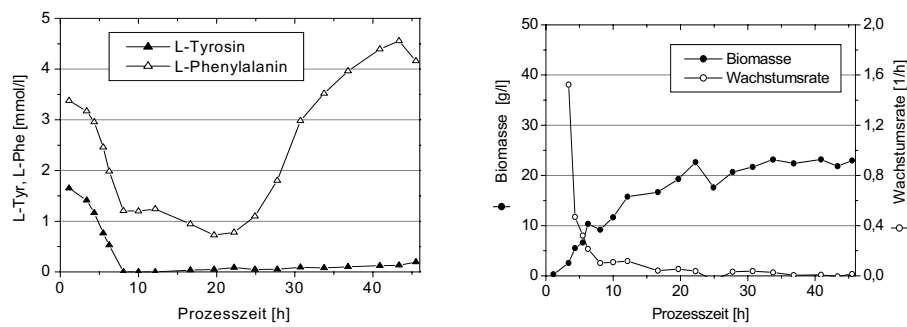


Abb. 5.19: Verlauf der L-Tyrosin- und L-Phenylalaninkonzentration (links) und Darstellung der Biomassekonzentration und der Wachstumsrate (rechts) (300 Liter; *E. coli* F111pC20).

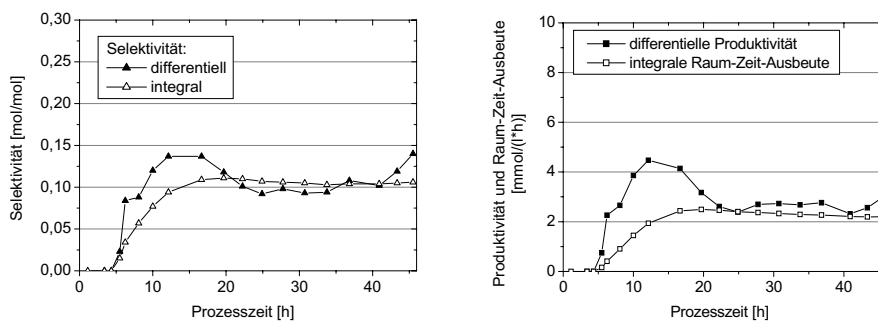


Abb. 5.20: Verlauf der differentiellen und integralen Selektivität (links) und der Produktivität und der integralen Raum-Zeit-Ausbeute (rechts) (300 Liter; *E. coli* F111pC20).

Während der Fermentation wurde eine differentielle Selektivität von maximal 13,7 %mol/mol in der Wachstumsphase und 9,8 %mol/mol während der Produktionsphase ermittelt (Abb. 5.20). Die integrale substratbezogene Ausbeute betrug am Ende der Produktion 10,6 %mol/mol. Die Produktivität stieg in den ersten 15 Stunden bis zu 4,5 mmol/(l*h). Der Wert fiel in den folgenden Stunden auf ungefähr 2,7 mmol/(l*h). Integriert über die Zeit wurde nach 46 Stunden eine Raum-Zeit-Ausbeute von 2,2 mmol/(l*h) gemessen.

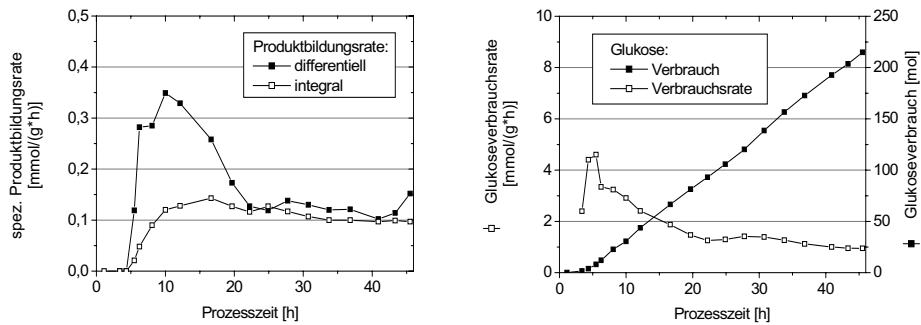


Abb. 5.21: Verlauf der differentiellen und integralen spezifischen Produktbildungsrate (links), der differentiellen Glukoseverbrauchsrate und des gesamten Glukoseverbrauchs (rechts) (300 Liter; *E. coli* F111pC20).

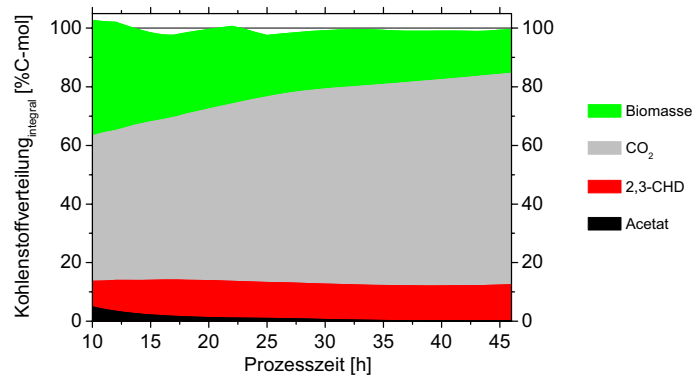


Abb. 5.22: Darstellung der integralen Kohlenstoffbilanz während der 300 Liter Fed-Batch Fermentation mit dem Produktionsstamm *E. coli* F111pC20.

In der Abbildung 5.22 sind die integralen Verläufe der Kohlenstoffverteilung ab der Prozessstunde 10 bis zum Ende der Fermentation dargestellt. Der Anteil des Produktes an der Kohlenstoffverteilung lag während der Fermentation zwischen 10 und 12,6 %C-Mol. Als Nebenprodukt wurden bis zu 5 %C-Mol Acetat akkumuliert. Der Biomasseanteil lag am Ende der Fermentation bei 15 %C-Mol. Die Kohlendioxidbildung nahm einen Anteil von bis zu 70 %C-Mol an der Kohlenstoffverteilung ein.

5.2 Diskussion zur 2,3-*trans*-CHD-Prozessentwicklung

In der Arbeit von Franke (Franke 2002) konnte gezeigt werden, dass der mikrobielle Zugang zu 2,3-*trans*-CHD im Fed-Batch-Verfahren bis zu einer Konzentration von 4,6 g/l umsetzbar war. Die Biosynthese dieses Moleküls wurde durch die plasmidkodierte Transformation der Gene *entB* und *entC* in den Produktionsstamm erreicht. Die Zielsetzung der in dem Kapitel 5.1 beschriebenen Arbeiten war die Erhöhung der Produktbildung von 2,3-*trans*-CHD.

Das Produkt 2,3-*trans*-CHD kann als eine Ausgangsverbindung zur chemischen Synthese verschiedener Moleküle eingesetzt werden. Die Carboxyl-Gruppe, die beiden Hydroxy-Gruppen und die zwei Doppelbindungen können als Angriffspunkte für die chemische Synthese dienen (Esser 2003; Franke 2002; Lorbach 2004; Lorbach et al. 2002). Der Vorteil der Biotechnologie gegenüber der Chemie bei der Synthese von 2,3-*trans*-CHD liegt in der Fähigkeit der Bildung von enantiomerreinen Zielmolekülen. Als Beispiel für den Einsatz von 2,3-*trans*-CHD als Ausgangsverbindung zur Synthese von Medikamenten kann die in der Abbildung 5.23 vereinfacht dargestellte Synthese von Acarbose dienen (Trost et al. 1998).

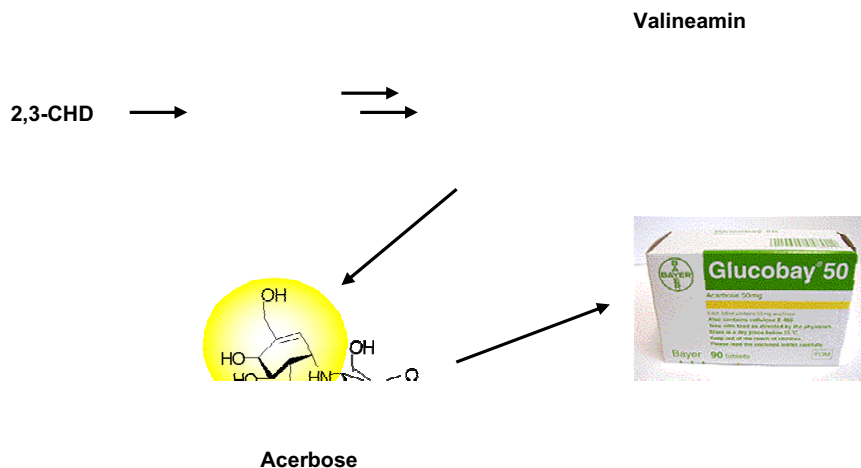


Abb. 5.23: Das Produkt 2,3-*trans*-CHD kann als Ausgangspunkt für die chemische Synthese von Valineamin dienen (Trost et al. 1998). Valineamin fungiert als eine funktionelle Gruppe der Acarbose. Diese Substanz wird unter der Bezeichnung Glucobay von der Firma Bayer als Medikament gegen Diabetes vertrieben.

5.2.1 Die Suche nach den Ursachen der Glukonsäurebildung

Durch den Einsatz der Regelungsstrategien zur optimaler Glukose- und Aminosäureversorgung und die Verwendung von Produktionsstämmen, die einen effektiveren intrazellulären Fluss bis zum Chorismat besaßen, wurde 2,3-*trans*-CHD in Konzentrationen bis zu 18,5 g/l produziert. Damit wurde im Vergleich zur publizierten Konzentration von 4,6 g/l 2,3-*trans*-CHD (Franke 2002) eine Vervielfachung des Produkttiters erreicht.

Während der Fermentation wurde festgestellt, dass die 2,3-*trans*-CHD-Synthese in der Produktionsphase durch die Anhäufung des Nebenproduktes Glukonsäure inhibiert wurde. Es wurden bis zu 43 g/l Glukonsäure gebildet (Abb. 5.4). Bei einer weiteren Fermentation wurden bis zu 50 g/l Glukonsäure gemessen. Eine vergleichbare Glukonsäurekonzentration ist als Nebenprodukt oder als Produkt bei Fermentationen mit *E. coli* nicht publiziert worden. Die Ursache der Nebenproduktbildung konnte anhand der gesammelten Daten nicht ermittelt werden. Aufgrund dessen wurde ein Experiment mit einer reduzierten Aminosäurezuflussrate durchgeführt (Kap. 5.1.2). Das Ziel des Experimentes war es, die möglichen Gründe für die Induktion der Nebenproduktbildung zu untersuchen. Die Induktion der Glukonsäurebildung erfolgte beim Versuch mit dem Zulauffaktor $m=2$ (Kap. 4.3.7) am Ende der Wachstumsphase bei einer Wachstumsrate von $0,095 \text{ h}^{-1}$ (Kap. 5.1.1). Beim Experiment mit der reduzierten Zulauftrate (Zulauffaktor $m=4$) wurde die Induktion der Glukonsäurebildung bei einer Wachstumsrate von $0,02 \text{ h}^{-1}$ festgestellt. Damit konnte gezeigt werden, dass die Induktion der Glukonsäurebildung unabhängig von der Wachstumsrate und der Wachstumsphase war. Die Biomassekonzentration lag zum Zeitpunkt der Induktion der Nebenproduktbildung bei beiden Versuchen im Bereich zwischen 20 und 25 g/l (Abb. 5.24).

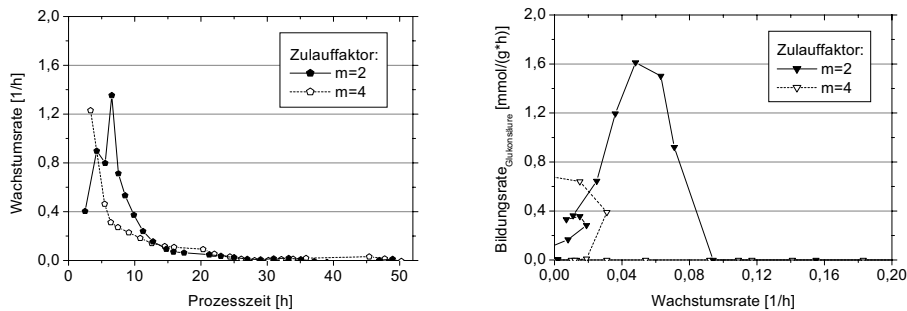


Abb. 5.24: Fed-Batch Fermentationen mit dem Stamm F82pC20 zur Produktion von 2,3-*trans*-CHD mit unterschiedlichen Aminosäurezuflussraten. Links: Vergleich der Wachstumsraten. Rechts: Gegenüberstellung der Wachstumsraten und der Glukonsäurebildungsrate.

Das langsamere Wachstum führte zur Reduktion der spezifischen Produktbildungsrate (Abb. 5.25). Abhängig von dem gewählten Zulauffaktor erfolgte die Induktion der Glukonsäurebildung bei einer Produktbildungsrate von $0,45 \text{ mmol/(g*h)}$ ($m=2$) im Vergleich zu $0,08 \text{ mmol/(g*h)}$ beim Experiment mit der reduzierten Aminosäurezuflussrate ($m=4$). Damit wurde bei dem Standardprozess ($m=2$) die Glukonsäurebildung bei einer fast sechsfach höheren Produktbildungsrate begonnen.

Eine Abhängigkeit der Nebenproduktbildung von der Prozesszeit konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Die Induktionszeitpunkte lagen mit 16 und 36 Stunden weit voneinander entfernt (Abb. 5.25). Dementsprechend können die Faktoren Wachstum und Prozesszeit als Auslöser der Induktion der Glukonsäurebiosynthese ausgeschlossen werden.

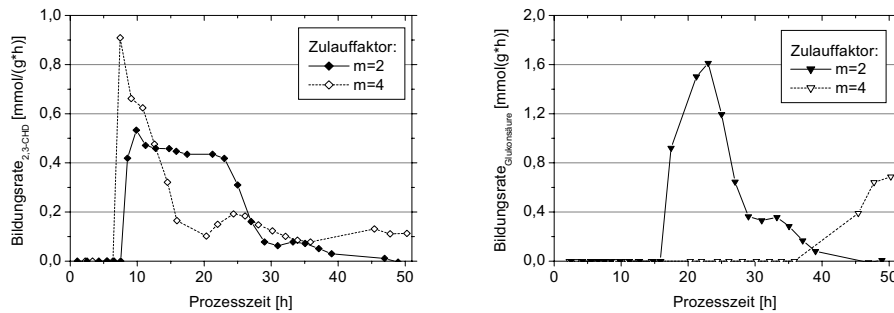


Abb. 5.25: Fed-Batch Fermentationen von 2,3-*trans*-CHD mit unterschiedlichen Aminosäurezufuhraten (7,5 Liter; *E. coli* F82pC20). Links: Gegenüberstellung der spezifischen 2,3-*trans*-CHD-Bildungsrate. Rechts: Vergleich der Verläufe spezifischer Glukonsäurebildungsraten.

Die graphische Darstellung der biomassespezifischen Produktbildungsrate gegenüber den biomassespezifischen Glukonsäurebildungsraten zeigt, dass die Induktion der Nebenproduktbiosynthese nicht in Verbindung mit der maximalen spezifischen 2,3-*trans*-CHD-Bildungsrate steht (Abb. 5.26).

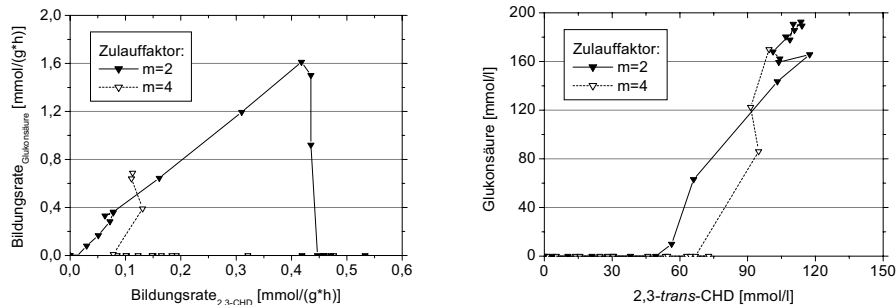


Abb. 5.26: Gegenüberstellung der spezifischen 2,3-*trans*-CHD- und der Glukonsäurebildungsraten (links) sowie Gegenüberstellung der Produkt- und der Nebenproduktkonzentration (rechts) bei Fed-Batch Fermentationen von 2,3-*trans*-CHD mit unterschiedlichen Aminosäurezufuhraten (7,5 Liter; *E. coli* F82pC20).

Bei der graphischen Gegenüberstellung der Produkt- und Glukonsäurekonzentration wurde trotz unterschiedlicher Fahrweise eine Ähnlichkeit beobachtet. Die Glukonsäurebiosynthese begann bei beiden Experimenten bei einer extrazellulären 2,3-*trans*-CHD-Konzentration höher als 50 mmol/l (8 g/l). Bei dem Fed-Batch Experiment mit reduzierten Wachstumsraten lag diese Konzentration mit ungefähr 67 mmol/l (10 g/l) um 2 g/l höher als bei dem Standard-Experiment. Damit konnte das Produkt 2,3-*trans*-CHD als ein möglicher direkter oder indirekter Auslöser für die Glukonsäurebildung identifiziert werden.

5.2.2 Die Folgen der Nebenproduktbildung auf die Stoffflüsse in dem Produktionsstamm

Bei den Fermentationen mit dem Stamm F82pC20 wurden verschiedene Veränderungen der Stoffflüsse nach Induktion der Glukonsäurebildung beobachtet. Unter anderem wurde eine Abnahme der Kohlendioxidbildung registriert (Abb. 5.27 und 5.28). Innerhalb von 5,5 Stunden nahm die spezifische differentielle CO_2 -Bildungsrate um 76% ab. Gleichzeitig stieg die Glukoseverbrauchsrate um 18%. Die Glukonsäurebiosynthese nahm in diesem Zeitraum auf den maximalen Wert von $1,6 \text{ mmol/(g}\cdot\text{h)}$ zu. Die 2,3-*trans*-CHD-Produktbildungsrate blieb auf einem konstanten Niveau.

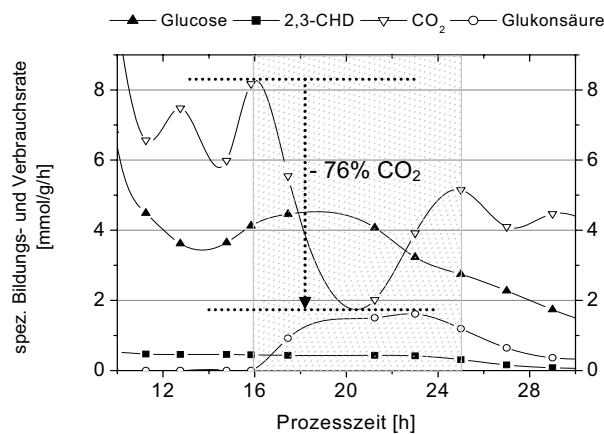


Abb. 5.27: Verlauf der differentiellen spezifischen Glukoseverbrauchsrate und der spezifischen 2,3-*trans*-CHD-, Glukonsäure- und CO_2 -Bildungsrate bei der Fermentation mit dem Stamm F82pC20 (siehe Abbildung 5.6). Dargestellt ist der Zeitraum zwischen der Prozessstunde 10 und 30. Markiert ist der Zeitraum ab der Induktion der Glukonsäurebiosynthese bis zur Reduktion der Produktbildung.

Die Ursache für die Abweichungen in den Bildungsrate kann nur durch Veränderungen in den Stoffflüssen oder der Substrataufnahme erklärt werden. Aufgrund der konstanten Produktbildung in dieser Phase kann ein gleichbleibender Stofffluss in die Aromaten-Biosynthese angenommen werden. Die Biosynthese des Intermediats DHAP und Chorismat als Ausgangsstoffe zur Bildung von 2,3-*trans*-CHD war anscheinend nicht unterbrochen. Damit hat sich die notwendige Versorgung der Aromaten-Biosynthese mit den Ausgangsverbindungen PEP und Erythrose-4-Phosphat nicht verändert. Die Reduktion der Kohlendioxidbildung könnte durch die Reduktion der TCA-Aktivität verursacht sein. Als Substrat für den TCA dient das Intermediat der Glykolyse Pyruvat. Pyruvat fällt bei der Biosynthese von 2,3-*trans*-CHD an. Pro Mol Produkt entsteht ein Mol Pyruvat. Da die CHD-Produktionsrate unverändert blieb, blieb auch die dabei entstehende Menge an Pyruvat konstant.

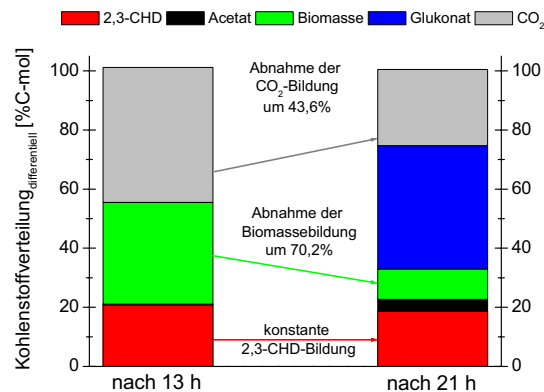


Abb. 5.28: Darstellung der differentiellen Kohlenstoffbilanz bei der 2,3-*trans*-CHD-Biosynthese mit dem Produktionsstamm *E. coli* F82pC20. Dargestellt ist die Phase kurz vor dem Start der Glukonsäureakkumulation (Prozesszeit 13) und während der maximalen Glukonsäuresynthese (Prozesszeit 21).

Eine andere Reaktion, bei der Pyruvat als Nebenprodukt entsteht, ist die Glukoseaufnahme über das PT-System. Dabei entsteht pro Mol aufgenommene Glukose aufgrund der Phosphorylierung zu Glukose-6-Phosphat aus einem Mol PEP ein Mol Pyruvat. Durch eine Reduktion der Glukoseaufnahme würde auch die Akkumulation von Pyruvat und dadurch auch die TCA-Aktivität sowie die Kohlendioxidbildung abnehmen. Eine auf sechs Prozessstunden beschränkte Reduktion der Glukoseaufnahme kann nicht mit einer Veränderung des PT-Systems erklärt werden. Die extrazelluläre Glukosekonzentration in der Fermentationsbrühe betrug zu diesem Zeitpunkt ungefähr 3 g/l. Die Ursache muss mit einer PT-System-spezifischen Glukoselimitierung in Verbindung stehen. Das bedeutet, dass trotz ausreichender Substratkonzentration in dem Fermentationsmedium das PT-System während der Glukonsäurebildung Glukose limitiert gewesen war. Das könnte zum Beispiel durch eine in dem periplasmatischen Raum stattfindende chemische oder enzymatische Oxidation von Glukose zu Glukonsäure erklärt werden.

5.2.3 Ursache der Glukonsäurebildung

Nachdem mögliche Auslöser der Glukonsäurebildung, wie die Prozesszeit, die Wachstumsrate und die maximale Produktbildungsrate, ausgeschlossen wurden (Kap. 5.2.1), soll nun die mögliche Induktion der Nebenproduktbildung durch das Produkt 2,3-*trans*-CHD erörtert werden.

Basierend auf den Fermentationsergebnissen wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Sprenger (Sprenger 2003) eine Hypothese für die Glukonsäurebiosynthese aufgestellt. Diese Hypothese besagt, dass die Glukonsäure, ausgehend von dem Substrat Glukose, mittels des PQQ-abhängigen Enzyms Glukose-Dehydrogenase (EC 1.1.99.17) oxidiert wird (Abb. 5.29).

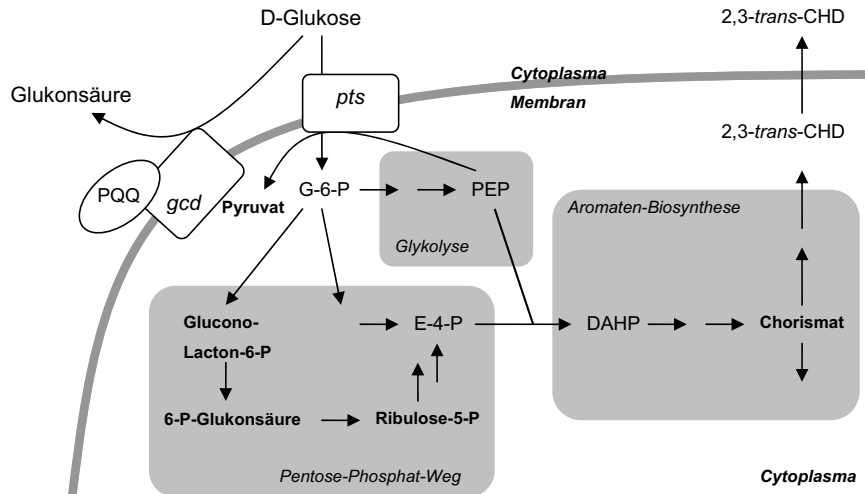


Abb. 5.29: Vereinfachte Darstellung des möglichen Biosyntheseweges in *E. coli* zur Bildung von Glukonsäure ausgehend von Glukose. Die Bildung der Glukonsäure wird durch das PQQ-abhängige Enzym Glukose-Dehydrogenase (EC 1.1.99.17) katalysiert (Yamada et al. 2003; Yamada et al. 1993). Die Glukose-Dehydrogenase wird durch das Gen *gcd* kodiert.

Die PQQ-abhängige Glukose-Dehydrogenase wurde das erste Mal 1993 von Davidson (Davidson 1993) beschrieben. Die PQQ-abhängige Glukose-Dehydrogenase ist ein 88,4 kDa großes membrangebundenes Protein (Marcinkeviciene et al. 1999). Das Enzym besitzt eine hohe thermische Stabilität (Matshushita et al. 1987) und die Fähigkeit, Elektronen von Glukose auf die zu oxidierenden Verbindungen zu transferieren (Davidson 1993). Die Michaelis-Menten-Konstante des Enzyms für D-Glukose beträgt 3,2 mM (Marcinkeviciene et al. 1999). Die natürlichen Substrate der Glukose-Dehydrogenase sind Ubiquinone (Matshushita et al. 1987). Das aktive Zentrum, an dem die Reaktion von Glukose zu Glukonsäure katalysiert wird, befindet sich in dem periplasmatischen Raum. Aufgrund dessen erfolgt die Versorgung mit dem Substrat Glukose unabhängig von dem Glukoseaufnahmesystem (PT-System, *pts*). Die Biosynthese von Glukonsäure kann durch die Glukose-Dehydrogenase nur unter dem Einsatz des Co-Faktors PQQ (Pyrrolo-Quinolin-Quinon) katalysiert werden (Yamada et al. 2003; Yamada et al. 1993) (Abb. 5.30). Die Biosynthese des Co-Faktors PQQ wurde bei Bakterien wie *Klebsiella pneumoniae* beschrieben (Matshushita et al. 1997). Bei genetisch veränderten Klonen von *E. coli* wurde die Bildung von PQQ ebenfalls beobachtet (Matshushita et al. 1997). Die Biosynthese des Co-Faktors PQQ durch den Produktionsstamm F82pC20 wurde jedoch als unwahrscheinlich betrachtet (Sprenger 2003). Aufgrund der unterschiedlichen Größe und der Struktur der Moleküle PQQ und 2,3-trans-CHD wurde eine mögliche Funktion des Produktes als Co-Faktor für das Enzym Glukose-Dehydrogenase als unwahrscheinlich betrachtet. Die für die Katalyse der Reaktion der Glukose-Dehydrogenase notwendige PQQ-Konzentration liegt im mikromolaren Bereich (Knaggs 2003; Pittard 1996). Als möglicher Auslöser der Glukonsäurebiosynthese könnten jedoch Zerfallsprodukte von 2,3-trans-CHD fungieren. In der Arbeitsgruppe von Prof. Sprenger an der Universität Stuttgart wurden weitere Untersuchungen zur Ursache der Glukonsäurebildung begonnen.

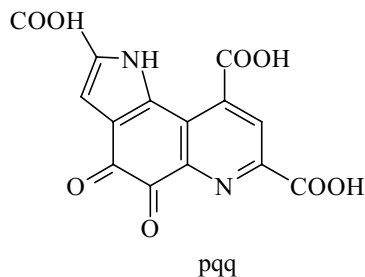


Abb. 5.30: Chemische Formel des Moleküls PQQ (Yamada et al. 2003; Yamada et al. 1993).

5.2.4 Vermeidung der Glukonsäurebiosynthese während der Produktion von 2,3-*trans*-CHD

Die hohe Nebenproduktbildung führte zu einer Reduktion der Produktbildung und der Ausbeute von 2,3-*trans*-CHD. Eine direkte Inhibierung der *E. coli*-Zellaktivität durch das Molekül Glukonsäure ist bisher nicht bekannt. Die Anhäufung dieses Moleküls kann jedoch indirekt zur Inhibierung der Zellaktivität führen. Die Oxidation des nicht ionischen Moleküls Glukose durch das PQQ-abhängige Enzym Glukose-Dehydrogenase führte zur Bildung der Glukonsäure. Die Akkumulation der Säure senkte den pH-Wert der Lösung. Um einen konstanten pH-Wert zu erhalten, wurde Base (Ammoniak) in die Fermentationsbrühe titriert. Dadurch wurde bei den Fermentationen mit der Akkumulation von Glukonsäure auch eine hohe Ammoniumkonzentration gemessen. Zum Zeitpunkt der Reduktion der Produkt- und Nebenproduktbildung wurden 0,26 Liter einer 25%-igen Ammoniaklösung zugegeben und eine Ammoniumkonzentration in der Fermentationsbrühe von über 93 mM (1,8 g/l) gemessen. Eine hohe Ammoniumkonzentration im Bereich von 3 g/l wirkt sich inhibierend oder toxisch auf die Zellen aus (Konstantinov et al. 1991; Konstantinov et al. 1990a; Konstantinov et al. 1990b).

Für die großtechnische Produktion von 2,3-*trans*-CHD verbunden mit der Akkumulation von Glukonsäure würden komplexe Aufarbeitungsverfahren zur Abtrennung des Nebenproduktes notwendig sein. Aufgrund dessen wurden zwei Lösungswege zur Vermeidung der Nebenproduktbildung verfolgt: einerseits wurde der Einsatz eines *in situ* Aufarbeitungsverfahrens zur kontinuierlichen Reduktion der Produktkonzentration untersucht (Kap. 8). Der zweite Lösungsweg beinhaltete die Entwicklung eines genetisch optimierten Produktionsstammes. Auf diesem Weg entstand der *E. coli*-Produktionsstamm F111pC20 (Tab. 4.1). Die genetischen Veränderungen entsprachen den Optimierungen des Stammes F82pC20. Basierend auf der Hypothese der Glukonsäurebildung durch die Glukose-Dehydrogenase (Abb. 5.29), wurde zusätzlich das Gen *gcd* deletiert, das für die PQQ-abhängige Glukose-Dehydrogenase kodiert. Diese genetische Veränderung des Produktionsstammes sollte die Expression der PQQ-abhängigen Glukose-Dehydrogenase verhindern. Die Biosynthese von Glukonsäure bei höheren 2,3-*trans*-CHD-Konzentrationen sollte dadurch vermieden werden. Eine Deletion des Gens *gcd* in einem Produktionsstamm wurde bisher nicht beschrieben. Aufgrund dessen bestand die Gefahr, dass die Deletion des

Gens der PQQ-abhängigen Glukose-Dehydrogenase möglicherweise eine negative Auswirkung auf die Zellstruktur, Zellaktivität oder Produktbildung haben könnte.

Die in der Tabelle 5.1 zusammengefassten und im Kapitel 5.1.3 dargestellten Ergebnisse der Fermentationen mit dem Stamm F111pC20 zeigen, dass die Deletion des Gens *gcd* erfolgreich die Akkumulation des Nebenproduktes Glukonsäure verhindern konnte. Dadurch konnte die durch die Glukonsäure verursachte Inhibierung der Produktbildung unterbunden werden. Die maximale 2,3-*trans*-CHD-Konzentration konnte auf einen Wert von 21 g/l (140 mmol/l) erhöht werden. Eine Verlängerung der Produktionsphase ermöglichte eine Steigerung der integralen Raum-Zeit-Ausbeute um 21% auf einen Wert von 2,8 mmol/(l*h). Die Vermeidung der Glukonsäuresynthese wirkte sich ebenfalls positiv auf die Reduktion der Acetatbiosynthese aus. Die verlängerte Produktbildung führte zu einem höheren Bedarf an PEP für die CHD-Biosynthese. Dadurch wurde die Akkumulation von Acetat um 82% reduziert.

Die Unterschiede bei der biomassespezifischen Produktbildungsrate und der Selektivität können der Abbildung 5.31 entnommen werden. In den ersten 25 Stunden der Fermentationen mit den Stämmen F82pC20 und F111pC20 gab es keine Differenzen. Die Abweichung lag in dieser Phase bei maximal 0,1 mmol/(g*h). Nach einer Prozesszeit von 25 Stunden betrug die Glukonsäurekonzentration bei der Fermentation mit dem Stamm F82pC20 über 30 g/l. Aufgrund dessen wurde die Produktbildung bis zum Ende der Fermentation inhibiert. Im Vergleich dazu konnte mit dem Stamm F111pC20 die Produktbildungsrate bis zum Ende der Fermentation erhalten werden. Die maximale Differenz zwischen den Stämmen betrug bis zu 0,27 mmol/(g*h). Einen ähnlichen Verlauf stellt die Gegenüberstellung des substratbezogenen Produktausbeutekoeffizientes dar (Abb. 5.31). In den letzten 25 Stunden der Fed-Batch Fermentation betrug die Differenz zwischen den beiden Stämmen bis zu 15%mol/mol.

Tab. 5.1: Vergleich der maximalen differentiellen und integralen kinetischen Parameter und der Konzentrationen bei Fed-Batch Fermentationen mit verschiedenen Produktionsstämmen und bei unterschiedlichen Prozessführungen. Der Zulauf der Aminosäurelösung erfolgte entweder manuell oder mittels der indirekten Regelung (Kap. 4.3.7). Abhängig von der vorgegebenen Wachstumsrate wurde der Zulauffaktor m gewählt (Gl. 4-3, S. 55).

Stamm	Zulauf-Strategie	Produktivität		Selektivität		2,3- <i>trans</i> -CHD		Glukonsäure		Acetat
		Qp	RZA	diff.	integral	Konz.	Bildungs-rate	Konz.	Bildungs-rate	Konz.
		[mmol/(l*h)]		[%mol/mol]		[mmol/l]	[mmol/(g*h)]	[mmol/l]	[mmol/(g*h)]	[mmol/l]
F82pC20	geregelt $m=2$	8,9	2,2	18,7	14,9	118,4	0,53	192,7	1,61	81,1
F82pC20	geregelt $m=4$	4,2	2,0	14,0	8,3	117,5	0,91	170	0,69	18,7
F111pC20	geregelt $m=2$	5,4	2,8	24,0	15,6	140,2	0,51	0	0	14,2
F111pC20 (300 Liter)	manuell	4,5	2,2	13,7	11,1	101,5	0,36	0	0	35,3

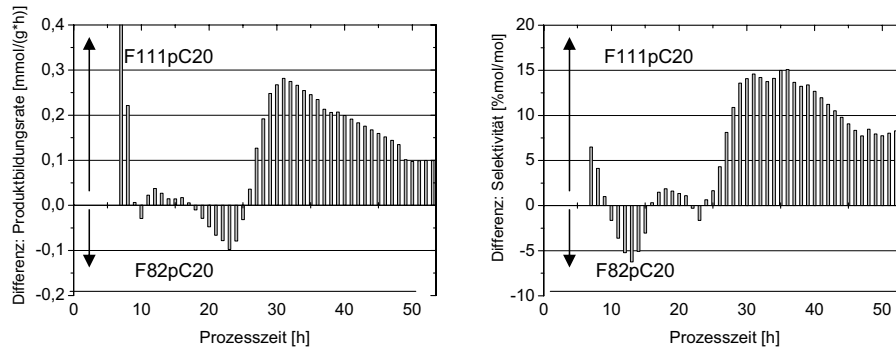


Abb. 5.31: Links: Differenz zwischen den biomassespezifischen Produktbildungsrate bei Fermentationen mit dem Stamm F82pC20 und dem Stamm F111pC20 mit der Deletion des Gens *gcd*. Rechts: Differenz zwischen den differentiellen substratbezogenen Produktausbeutekoeffizienten.

Damit konnte gezeigt werden, dass die Deletion des Gens *gcd* die Biosynthese des Nebenproduktes Glukonsäure bei 2,3-*trans*-CHD produzierenden *E. coli*-Stämmen verhinderte. Gleichzeitig konnte mit dem gentechnisch optimierten Stamm eine vergleichbare Produktbildung und Selektivität erreicht werden. Durch die längere Produktbildung konnte eine um 16% höhere Produktkonzentration, bei einer um 21% höheren Raum-Zeit-Ausbeute erreicht werden. Die gentechnische Veränderung hatte gleichzeitig keine negative Auswirkung auf die 2,3-*trans*-CHD-Biosynthese. Die Vermeidung der Glukonsäurebildung mit *gcd*-deletierten *E. coli*-Produktionsstämmen wurde zum Patent angemeldet (Bongaerts et al. 2004).

5.2.5 Abhängigkeit der Produktbildung vom Zellwachstum

Bei allen 2,3- und 3,4-*trans*-CHD Fed-Batch Fermentationen konnte beobachtet werden, dass die Produktbildungsrate während der Wachstumsphase höher gewesen ist als in der Produktionsphase (Abb. 5.32). Ein inhibierender Einfluss der beiden CHD-Moleküle auf die Produktbildung zu Beginn der Fermentationen war unwahrscheinlich, da die Reduktion der Produktbildung bei unterschiedlichen Produktkonzentrationen beobachtet wurde. Eine Gegenüberstellung der Glukoseverbrauchsrate, der Produktbildungsrate und der Wachstumsrate zeigte, dass eine partielle Abhängigkeit der Produktbildung vom Wachstum bestand. In der Batchphase lag die Wachstumsrate bei einem Wert von über $0,4 \text{ h}^{-1}$ und die spezifische Glukoseverbrauchsrate bei maximal $9,0 \text{ mmol/(g*h)}$ (2,3-CHD) und $6,1 \text{ mmol/(g*h)}$ (3,4-CHD) (Abb. 5.32). Im weiteren Verlauf der Fermentationen nahm die Wachstumsrate kontinuierlich ab. Die spezifische Produktbildungsrate in dieser Phase lag bei beiden Produkten im Bereich von $0,4$ bis $0,5 \text{ mmol/(g*h)}$. Der Reduktion der Aminosäurezufluhrate folgte eine signifikante Abnahme der Wachstumsrate auf Werte unter $0,1 \text{ h}^{-1}$. In dieser Phase sank mit dem Wachstum auch die Glukoseverbrauchsrate auf unter 3 mmol/(g*h) .

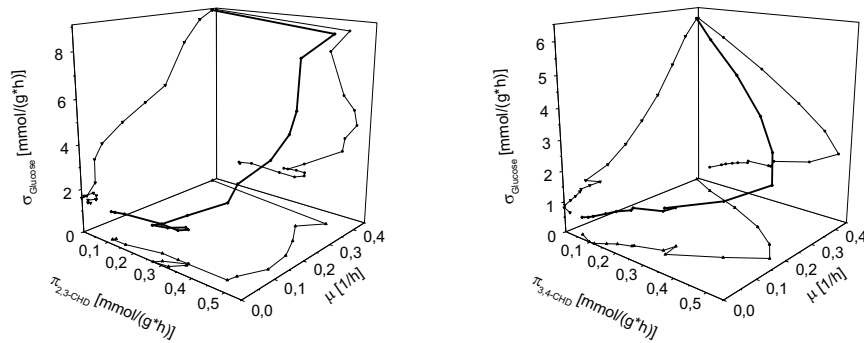


Abb. 5.32: Gegenüberstellung der Wachstumsrate (μ), der Substratverbrauchsrate (σ) und der Produktbildungsrate (π) bei der Fermentation mit dem 2,3-*trans*-CHD-Produktionsstamm F111pC20 (links) und dem 3,4-*trans*-CHD-Produktionsstamm F82pC22 (rechts).

Eine Optimierung des Prozesses könnte durch drei Ansätze bewerkstelligt werden: eine Verlängerung der Wachstumsphase, eine kontinuierliche oder semikontinuierliche Prozessführung und eine Stammverbesserung. Eine Verlängerung der Wachstumsphase gegenüber der Produktionsphase könnte durch die Erhöhung der Biomassekonzentration erreicht werden. Das kann durch das Aufkonzentrieren des Batch-Mediums erreicht werden. Dadurch könnten die integrale spezifische Produktbildungsrate und die Raum-Zeit-Ausbeute erhöht werden. Durch die höhere Biomassekonzentration steigt jedoch der Sauerstoffbedarf signifikant und der substratbezogene Ausbeutekoeffizient der Fermentation nimmt ab. Eine Übertragung dieser Prozessführung in den großtechnischen Ansatz könnte an dem nicht ausreichenden Sauerstoffeintrag der Produktionsreaktoren scheitern. Außerdem entstehen Kosten bei der Entsorgung der Biomasse.

Der Einsatz einer kontinuierlichen oder semikontinuierlichen Prozessführung würde durch die konstante Zufütterung der Medienbestandteile eine höhere Wachstumsrate über die Fermentationsdauer ermöglichen. Dadurch könnte die spezifische Produktbildungsrate auf einem höheren Niveau gehalten werden. Aufgrund der hohen Plasmidinstabilität bei den Stämmen F82pC20 (Kap. 5.1.1), F111pC20 (Kap. 5.1.3) und F82pC22 (Kap. 6.1) war es nicht möglich, diese Stämme für kontinuierliche Fermentationen einzusetzen. Die Konstruktion neuer Produktionsstämme mit der chromosomalen Integration der Gene *entBC* und *aroBFL* oder die Verwendung von Plasmiden mit einer höheren Stabilität würde die Entwicklung des kontinuierlichen Verfahrens sinnvoll machen.

Die Reduktion der Aminosäurekonzentration am Ende der Wachstumsphase führte zur Abnahme der Biomassebildung und verursachte eine Veränderung der Stoffwechselwege. Aufgrund dessen könnte es zu einer Anhäufung der Metabolite des Pentose-Phosphat-Weges, des TCA-Zyklus und der Glykolyse kommen. Die Akkumulation dieser Metabolite könnte eine inhibierende Wirkung auf die Produktbildung haben. Zum Beispiel könnte der Metabolit Pyruvat eine Beeinflussung der Produktbildung bewirken. Pyruvat entsteht während der Aufnahme von Glukose in die Zelle während der enzymatischen Umwandlung von Isochorismat zu 2,3-*trans*-CHD und in der Glykolyse (Abb. 3.2 und 3.5). Pyruvat fließt unter aeroben Bedingungen hauptsächlich über Acetyl-CoA in den TCA-Zyklus ein. Die

Abnahme der Biomassebildung führt zu einer Reduktion der TCA-Aktivität, und dadurch müsste es zu einer Erhöhung der intrazellulären Pyruvatakkumulation kommen. Die Reduktion der intrazellulären Pyruvatmenge könnte durch eine Optimierung der Produktionsstämme umgesetzt werden. Als möglicher Angriffspunkt für Stammoptimierung könnte die Substrataufnahme dienen. Das Substrat Glukose könnte anstatt über das aktive Phosphotransferase-System (Kap. 3.1.2) über ein diffusives Aufnahmesystem in die Zelle gelangen. Im Rahmen der Arbeiten zur Prozessentwicklung von L-Phenylalanin wurde ein diffusives heterologes Glukoseaufnahmesystem aus *Zymomonas mobilis* in *E. coli*-Produktionsstämmen untersucht (Bujnicki 2001; Rüffer 2004). Die Glukoseaufnahme erfolgt hierbei über ein Membranprotein (Glukose-Facilitator) und wird durch den Substratgradienten angetrieben. In der Zelle findet durch die Glukokinase die Phosphorylierung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat unter Verbrauch von ATP statt.

Bei der L-Phenylalanin Prozessentwicklung konnte keine signifikante Verbesserung des Prozesses durch den Einsatz des Glukose-Facilitators erzielt werden (Bujnicki 2001; Rüffer 2004). Einer der Gründe lag in der reduzierten Glukoseaufnahme aufgrund der geringeren Affinität des Glukose-Facilitators für das Substrat (K_m -Wert: 4,1 mM) (Weisser et al. 1995). Im Gegensatz dazu konnte bei der fermentativen Herstellung des Intermediats der Aromaten-Biosynthese 3-Dehydroshikimat (DHS) durch den Einsatz des Glukose-Facilitators eine Optimierung der Biosynthese erzielt werden (Yi et al. 2003). Im Vergleich zu den Daten, die mit dem *E. coli* Stamm mit dem PT-System (Tab. 6.2) erzielt wurden, konnte durch den zusätzlichen Einsatz des Glukose-Facilitators eine Verbesserung der Ausbeute um 1 %mol/mol und der Raum-Zeit-Ausbeute um über 28% erzielt werden (Yi et al. 2003). Durch eine wahrscheinlich höhere Akkumulation von Pyruvat während der CHD-Biosynthese könnte eine zusätzliche Verwendung des Glukose-Facilitators bei CHD-Überproduzenten vorteilhaft für die PEP-Versorgung sein. Damit könnte eine Verbesserung der Ausbeute erzielt werden.

5.2.6 Zugang zum 2,3-*trans*-CHD im halbtechnischen Maßstab

Die Zielsetzung der 300 Liter Fermentation war es, die Auswirkung der Maßstabsvergrößerung auf die 2,3-*trans*-CHD-Produktion zu untersuchen. Ferner sollte die gewonnene Fermentationsbrühe für die Aufarbeitung des Produktes eingesetzt werden.

Die im 7,5 Liter Maßstab ermittelten Profile für den Glukose- und Aminosäurezulauf konnten in den halbtechnischen Maßstab nicht vollständig übertragen werden. Der hohe Sauerstoffbedarf am Ende der Wachstumsphase konnte trotz der hohen Drehzahl, der Belüftungsrate und des maximalen Überdrucks nur eingeschränkt eingetragen werden. Durch die Reduktion der Aminosäurezulaufzeiten, die dadurch bedingt zu einer geringen Wachstumsrate führte, konnte die Gelöstsauerstoffkonzentration im unteren Drittel des Bioreaktors oberhalb von 30% gehalten werden. In der oberen Hälfte des Reaktorraumes wurde eine geringere Gelöstsauerstoffkonzentration angenommen. Es könnte eventuell sogar eine Sauerstoff-Limitierung eingetreten sein. Das könnte die Ursache für die höhere Acetatbildung während der Wachstumsphase sein. Im Vergleich dazu wurde im Labormaßstab eine deutlich niedrigere Acetatkonzentration gemessen (Abb. 5.33). Durch die Reduktion der Aminosäurezulaufzeiten und den Start der Produktionsphase nahm die Acetatkonzentration bis zum Ende des Prozesses vollständig ab.

Weiterhin können die Unterschiede bei der Selektivität und der Raum-Zeit-Ausbeute gegenüber der Fermentation im 7,5 Liter Maßstab durch eine mögliche Sauerstofflimitierung bei der Maßstabvergrößerung erklärt werden (Abb. 5.33). Ein weiterer Faktor für die geringe Reduktion der Produktbildung und der Selektivität lag in der verkürzten Wachstumsphase gegenüber dem Standard-Prozess im 7,5 Liter Maßstab.

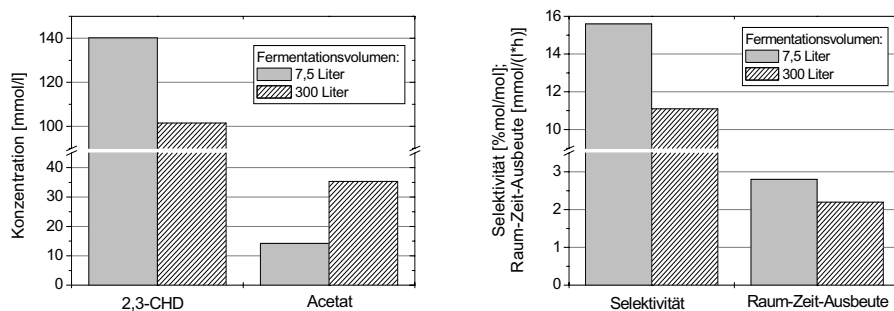


Abb. 5.33: Links: Vergleich der 2,3-*trans*-CHD- und Acetat-Akkumulation bei Fed-Batch Fermentationen im 7,5 und 300 Liter Maßstab. Rechts: Gegenüberstellung der maximalen Selektivität und Raum-Zeit-Ausbeute.

Insgesamt konnte mit diesem Experiment eine erfolgreiche Maßstabvergrößerung zur Produktion von 2,3-*trans*-CHD gezeigt werden. Mittels einer kontinuierlichen Zentrifugation wurden 150 Liter eines biomassefreien Fermentationsüberstandes mit einer Gesamtmenge von 3,5 kg 2,3-*trans*-CHD hergestellt. Dieser Fermentationsüberstand wurde für die Aufarbeitung des Produktes mittels Gegenstrom-Extraktion der Firma Jülich Fine Chemicals zur Verfügung gestellt.

6 Ergebnisse und Diskussion der Prozessentwicklung des fermentativen Zugangs zum 3,4-*trans*-CHD

In dem folgenden Kapitel werden die Ergebnisse zur Prozessentwicklung und Optimierung der Biosynthese von 3,4-*trans*-CHD vorgestellt. Das Ziel war es, den fermentativen Zugang zu einem bisher nicht erschlossenen Produkt zu eröffnen und zu optimieren. Eines der Hauptziele war die Identifikation limitierender enzymatischer Reaktionen auf dem Weg zum Produkt. Unter anderem wurde ein ^{13}C -Markierungsexperiment mittels der Master-Sensor-Technik durchgeführt. Diese Untersuchung sollte experimentelle Daten für die Bestimmung intrazellulärer Flüsse liefern. Anhand dieser Daten könnten mögliche Engpässe im Stofffluss zum Produkt diagnostiziert werden.

6.1 Entwicklung des 3,4-*trans*-CHD Fermentationsverfahrens

6.1.1 Zugang zum 3,4-*trans*-CHD im g/l-Maßstab

Das Experiment wurde im 7,5 Liter Maßstab durchgeführt (Kap. 4.3.1). Das Startvolumen betrug 3,5 Liter. Die Biosynthese von 3,4-*trans*-CHD wurde nach der Zugabe von 100 μM IPTG beim Erreichen von 10% der maximalen Biomassekonzentration gestartet. Der Verlauf der Produktkonzentration während der Fermentation ist in der Abbildung 6.1 dargestellt. Es wurden bis zu 164 mmol/l (25,9 g/l) 3,4-*trans*-CHD in dem Fermentationsüberstand akkumuliert. Das entsprach einer Gesamtmenge von 0,91 mol 3,4-*trans*-CHD.

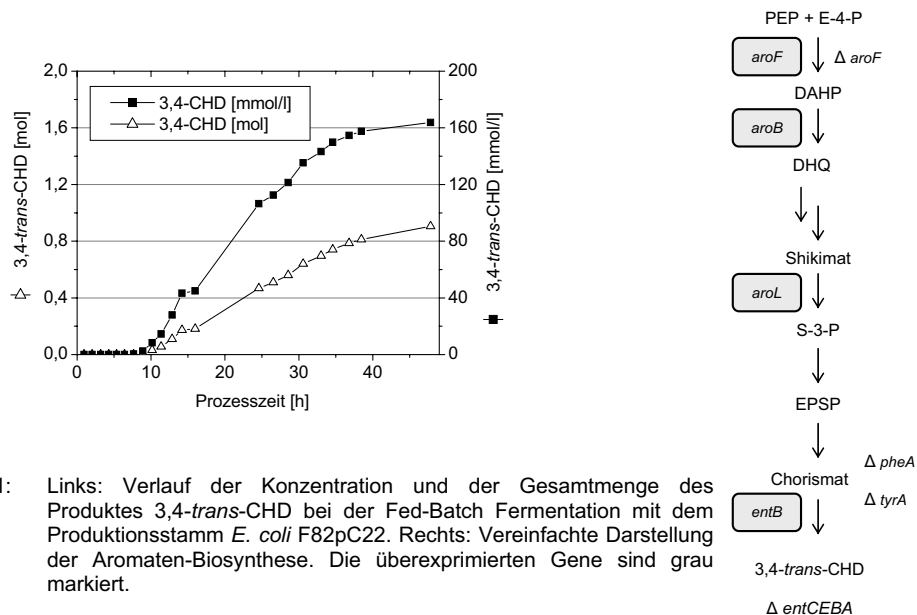


Abb. 6.1: Links: Verlauf der Konzentration und der Gesamtmenge des Produktes 3,4-*trans*-CHD bei der Fed-Batch Fermentation mit dem Produktionsstamm *E. coli* F82pC22. Rechts: Vereinfachte Darstellung der Aromaten-Biosynthese. Die überexprimierten Gene sind grau markiert.

Während der Batchphase wurden 1,7 mmol/l (0,3 g/l) L-Tyrosin und 3,0 mmol/l (0,5 g/l) L-Phenylalanin vorgelegt (Abb. 6.2). Die indirekte Regelung des Zulaufes der Aminosäurelösung wurde nach 6,8 Stunden gestartet. Die Biomassekonzentration betrug zu diesem Zeitpunkt 4,8 g/l. Für die Regelung der Zulaufzeiten wurde der Faktor $m=2$ verwendet (Gl. 4-3, S. 55). Die Regelung wurde nach 13,2 Stunden durch einen konstanten Zulauf von 2 g/h ersetzt. Bis dahin flossen 7,3 mmol L-Tyrosin und 9,6 mmol L-Phenylalanin in den Bioreaktor. Die maximale Biomassekonzentration wurde mit 25 g/l nach 29 Stunden erreicht. Die Regelung der Aminosäuren ermöglichte die Limitierung der L-Tyrosinkonzentration während der Wachstumsphase (Abb. 6.2). Die L-Phenylalaninkonzentration stieg während der Produktionsphase auf maximal 3,7 mmol/l.

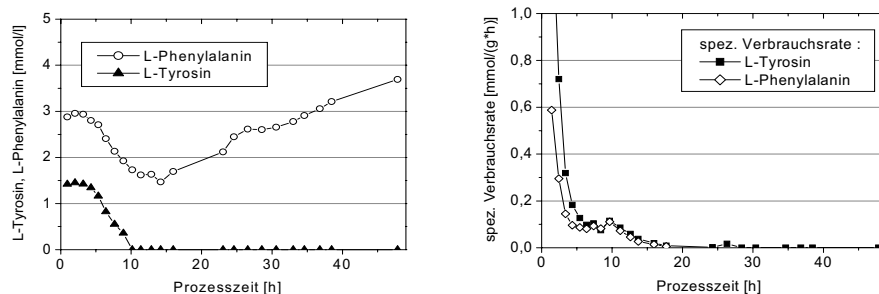


Abb. 6.2: Grafische Darstellung der Aminosäurekonzentrationen (links) und der spezifischen Verbrauchsrate der Aminosäuren L-Tyrosin und L-Phenylalanin (7,5 Liter Fed-Batch Fermentation; *E. coli* F82pC22).

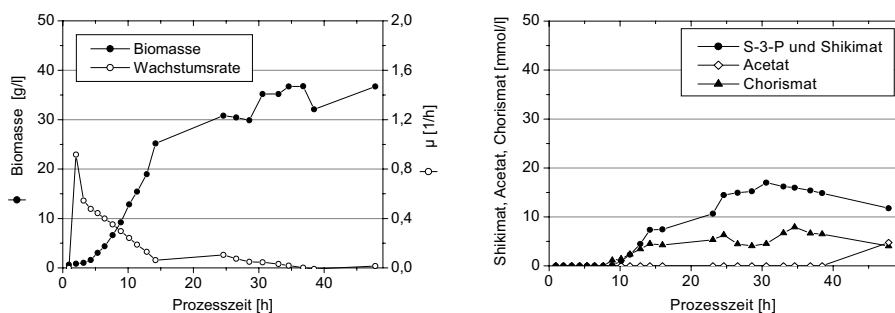


Abb. 6.3: Links: Verlauf der Biomassekonzentration und der Wachstumsrate. Rechts: Verlauf der Nebenproduktkonzentrationen (7,5 Liter; *E. coli* F82pC22).

Der substratbezogene Produktausbeutekoeffizient stieg auf maximal 21,9 %mol/mol (Abb. 6.4). Nach einer Fermentationsdauer von 38 Stunden sank die Selektivität unter 10 %mol/mol. Die maximale integrale Selektivität wurde nach 24,6 Stunden mit 17,9 %mol/mol erreicht. Es wurde eine maximale Produktivität von 8,6 mmol/(l·h) gemessen. Die integrale Raum-Zeit-Ausbeute betrug nach 30,5 Stunden 4,4 mmol/(l·h).

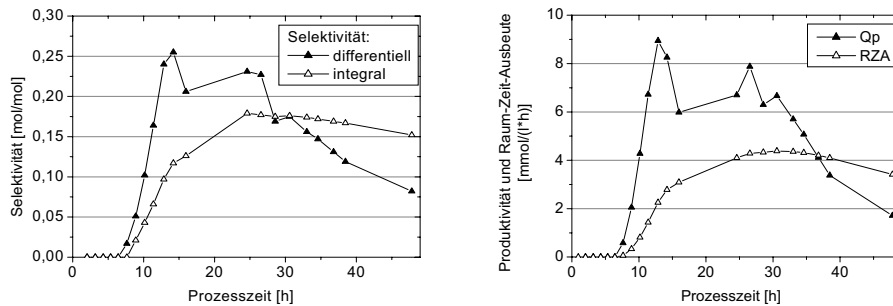


Abb. 6.4: Verlauf der differentiellen und integralen Selektivität (links) und grafische Darstellung der differentiellen Produktivität und der integralen Raum-Zeit-Ausbeute (rechts) (7,5 Liter; *E. coli* F82pC22).

Bei Fermentationen mit dem Produktionsstamm F82pC22 wurde eine Vielzahl von Nebenprodukten akkumuliert. In der Abbildung 6.5 sind die Verläufe der spezifischen differentiellen Produkt- und Nebenproduktbildungsrate dargestellt. Nach der IPTG-Induktion stieg die Produktbildungsrate auf einen maximalen Wert von 0,52 mmol/(g*h). Gleichzeitig wurde Shikimat-3-Phosphat, ein Intermediat der Aromaten-Biosynthese, gebildet. Die maximale spezifische Shikimat-Bildungsrate betrug 0,09 mmol/(g*h). Chorismat, ein weiteres Intermediat der Aromaten-Biosynthese, wurde während der Wachstumsphase akkumuliert. Die maximale Chorismat-Bildungsrate wurde nach 10,2 Stunden mit 0,05 mmol/(g*h) gemessen. Im Laufe der Produktionsphase wurden die Nebenprodukte Shikimat und 4-Hydroxy-Benzoesäure akkumuliert.

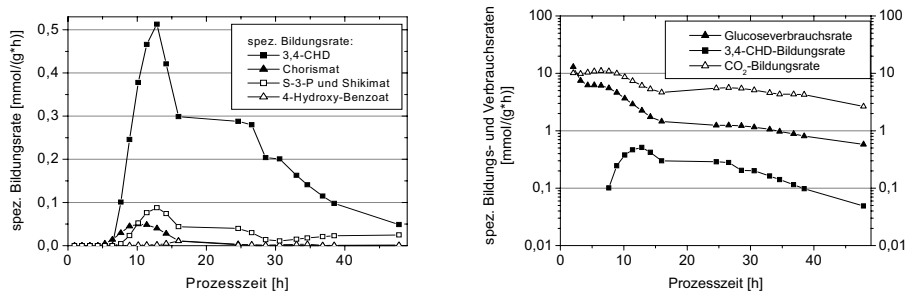


Abb. 6.5: Links: Verlauf der differentiellen biomassespezifischen Bildungsrate des Produkts 3,4-*trans*-CHD, des Nebenproduktes 4-Hydroxy-Benzoesäure und der Intermediate der Aromaten-Biosynthese Chorismat, Shikimat-3-Phosphat und Shikimat. Rechts: Logarithmische Darstellung der differentiellen Glukoseverbrauchsrate, der 3,4-*trans*-CHD- und Kohlendioxidbildungsrate (7,5 Liter; *E. coli* F82pC22).

6.1.2 Optimierung der 3,4-*trans*-CHD-Biosynthese

Um die Akkumulation des Intermediats Shikimat-3-Phosphat während der Wachstumsphase zu reduzieren, wurde der *E. coli*-Produktionsstamm F143pC22 konstruiert (Kap. 4.1.1). Die Besonderheit bei diesem Stamm ist die chromosomale Integration der Gene *aroC* (kodiert für die Chorismat-Synthase) und *aroA* (kodiert für die 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase) (Abb. 3.3). Diese Stammveränderung soll die Shikimat-3-Phosphat-Akkumulation reduzieren und den Abfluss zu Chorismat optimieren. Die eingesetzte Prozesstechnik entsprach den Vorgaben des Versuchs aus Kapitel 6.1.1.

In der Abbildung 6.6 sind die Verläufe der Produktkonzentration und der Gesamtausbeute dargestellt. Die maximale Produktkonzentration am Ende des Experimentes betrug 127 mmol/l (20 g/l). Nach 56 Stunden wurden insgesamt 0,79 mol 3,4-*trans*-CHD akkumuliert.

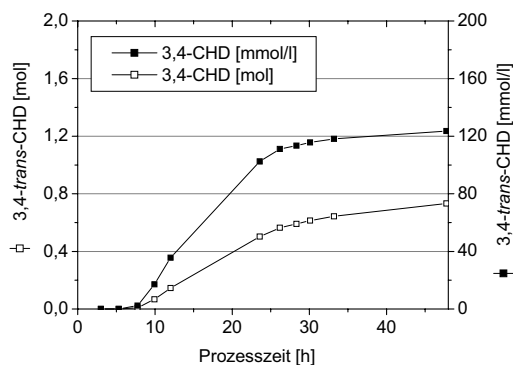
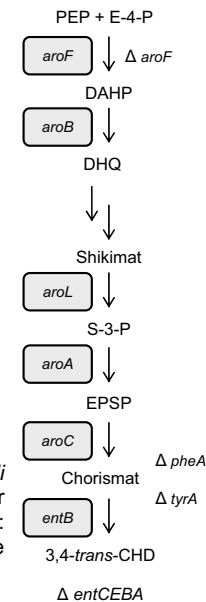


Abb. 6.6: Fed-Batch Fermentation mit dem Produktionsstamm *E. coli* F143pC22. Links: Darstellung der Konzentration und der Gesamtmenge des gebildeten Produktes 3,4-*trans*-CHD. Rechts: Vereinfachte Darstellung der Aromaten-Biosynthese. Die überexprimierten Gene sind markiert.



Während der Batchphase wurden die für das Wachstum essentiellen Aminosäuren L-Tyrosin (0,3 g/l) und L-Phenylalanin (0,5 g/l) vorgelegt. Der Zulauf der Aminosäurelösung während der Wachstumsphase entsprach den Zuflussraten bei der Fermentation mit dem Stamm F82pC22 (Kap. 6.1.1). Die Wachstumsphase wurde nach 13 Stunden beendet. In dieser Phase flossen 7,3 mmol L-Tyrosin und 9,6 mmol L-Phenylalanin in den Bioreaktor. Die Biomassekonzentration stieg nach dem Ende der Wachstumsphase auf fast 30 g/l. Anschließend wurde der Zulauf auf einen konstanten Wert von 2 g/h gesetzt. Die maximale Wachstumsrate von 1,2 h⁻¹ wurde nach 5,3 Stunden erreicht (Abb. 6.7). Nach 28 Stunden wurde die maximale Biomassekonzentration von 40 g/l ermittelt.

Im Laufe der Fermentation wurde Shikimat-3-Phosphat angehäuft (Abb. 6.7). Aufgrund des kontinuierlichen Zerfalls von Shikimat-3-Phosphat zu Shikimat wurde der Konzentrationsverlauf der beiden Metabolite als Summe dargestellt. Nach 23,6 Prozessstunden wurden

3 mmol/l gebildet. Die maximale Konzentration wurde am Ende der Fermentation mit 5,3 mmol/l gemessen. Des Weiteren wurde Chorismat in Konzentrationen von 9,4 mmol/l festgestellt. Die Untersuchung der Nebenproduktbildung ergab außerdem eine steigende 4-Hydroxy-Benzoat-Konzentration. Die höchste Konzentration wurde gegen Ende des Experimentes mit 18,5 mmol/l bestimmt (Abb. 6.7).

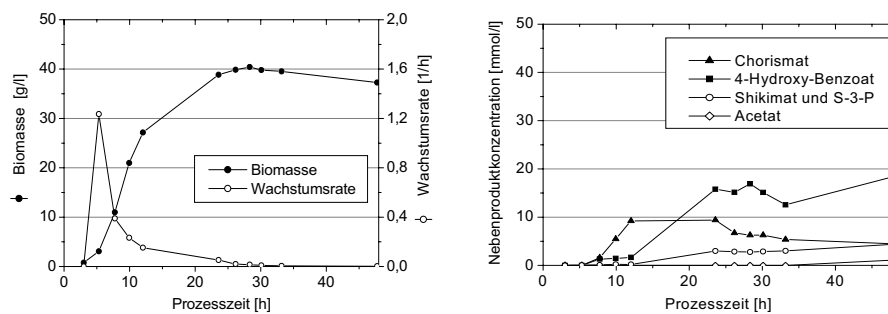


Abb. 6.7: Links: Biomassekonzentration und Wachstumsrate. Rechts: Verlauf der Nebenproduktkonzentrationen (7,5 Liter Fed-Batch Fermentation; *E. coli* F143pC22).

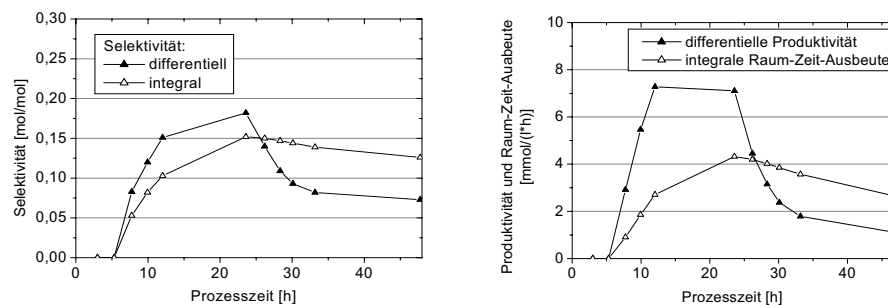


Abb. 6.8: Links: Verlauf der differentiellen und integralen Selektivität. Rechts: Darstellung der Produktivität und der Raum-Zeit-Ausbeute (7,5 Liter; *E. coli* F143pC22).

Der maximale substratbezogene Produktausbeutekoeffizient wurde mit 18,2 %mol/mol nach 24 Stunden erreicht (Abb. 6.8). Der Wert sank nach 30 Prozessstunden unter 10 %mol/mol. Die maximale integrale Selektivität betrug 15,2 %mol/mol. Nach 12 Stunden wurde die maximale differentielle Raum-Zeit-Ausbeute von 7,3 mmol/(l*h) ermittelt. Der Wert sank ab der Prozessstunde 29 bis zu 3 mmol/(l*h). Die höchste integrale Raum-Zeit-Ausbeute von 4,3 mmol/(l*h) wurde nach 24 Stunden bestimmt.

Die Produktbildungsrate stieg während der Wachstumsphase bis auf 0,34 mmol/(g*h) (Abb. 6.9). Gleichzeitig wurde Shikimat-3-Phosphat, ein Intermediat der Aromaten-Biosynthese, akkumuliert. Es wurden bis zu 0,02 mmol/(g*h) Shikimat-3-Phosphat gebildet. Die Biosynthese von Chorismat stieg während der ersten 24 Stunden auf fast 10 mmol/l. Die

maximale Chorismat-Bildungsrate wurde mit 0,05 mmol/(g*h) nach 10,2 Stunden gemessen. Außerdem wurden die Nebenprodukte Shikimat und 4-Hydroxy-Benzoat nachgewiesen.

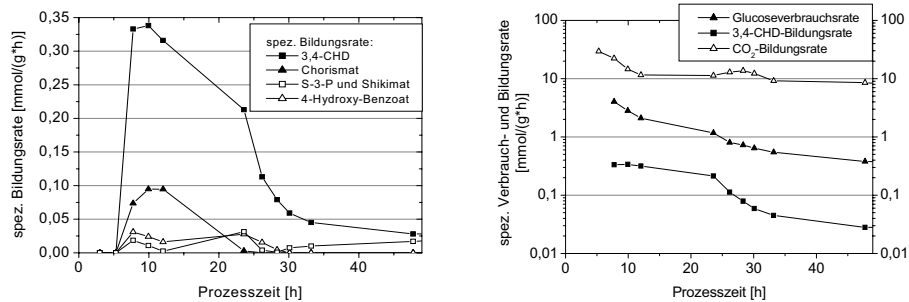


Abb. 6.9: Links: Verlauf der differentiellen biomassespezifischen Bildungsrate des Produktes 3,4-*trans*-CHD, des Nebenproduktes 4-Hydroxy-Benzoat und der Intermediate der Aromaten-Biosynthese Chorismat, Shikimat-3-Phosphat und Shikimat. Rechts: Logarithmische Darstellung der differentiellen Glukoseverbrauchsrate, der 3,4-*trans*-CHD- und Kohlendioxidbildungsrate (7,5 Liter; *E. coli* F143pC22).

6.1.3 Produktion von 3,4-*trans*-CHD im 300 Liter-Maßstab

Als Basis für die Produktion im 300 Liter Maßstab dienen die Daten der 7,5 Liter Fed-Batch Fermentationen mit dem Produktionsstamm F82pC22 (Kap. 6.1.1). Der Zulauf der Aminosäurelösung und der Glukose wurde manuell gesteuert. Das Profil wurde mittels der im 7,5 Liter-Maßstab gewonnenen Daten ermittelt. Die gemessene Glukosekonzentration im Medium lag während der Wachstumsphase im Bereich von 9 bis 19 g/l. Sie konnte während der Produktionsphase zwischen 2 und 5 g/l gehalten werden. Das Volumen zu Beginn der Fermentation betrug 152 Liter. Bei ungefähr 10% der maximalen Biomassekonzentration erfolgte die Zugabe von 100 µM IPTG. Der Verlauf der 3,4-*trans*-CHD-Biosynthese ist in der Abbildung 6.10 dargestellt. Es wurden bis zu 20,6 mol (3,21 kg) des Produktes akkumuliert. Die Prozesszeit betrug 38,7 Stunden. Die maximale 3,4-*trans*-CHD-Konzentration betrug am Ende der Fermentation 92,9 mmol/l (14,5 g/l).

Durch den Einsatz des im 7,5 Liter-Maßstab gewonnenen Profils konnte die L-Tyrosinkonzentration nach der Batchphase limitiert werden (Abb. 6.11). Die Aminosäure L-Phenylalanin wurde bis zu einer Konzentration von fast 2 mmol/l akkumuliert. Die Biomassekonzentration stieg im Laufe der Fermentation bis auf 25 g/l (Abb. 6.12). Die maximale Wachstumsrate wurde nach 3,4 Stunden mit 0,8 h⁻¹ erreicht. Die Nebenproduktkonzentrationen Shikimat-3-Phosphat, Shikimat, Chorismat und Acetat lagen am Ende der Fermentation im Bereich von maximal 10 mmol/l.

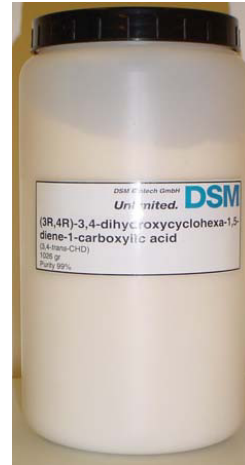
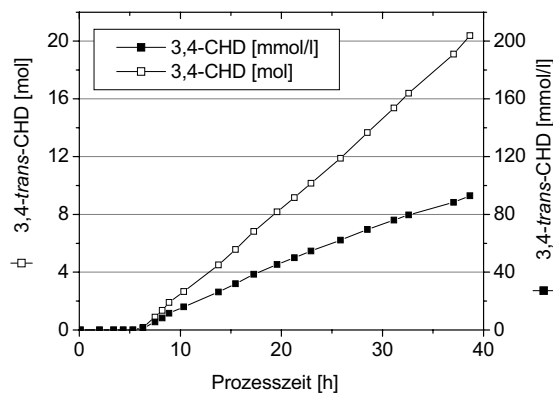


Abb. 6.10: Produktion von 3,4-*trans*-CHD mit dem Stamm *E. coli* F82pC22 im 300 Liter-Maßstab. Links: Darstellung der Konzentrationen und der Gesamtmenge des Produktes 3,4-*trans*-CHD. Rechts: Foto eines Behälters mit einem Kilogramm des Produktes 3,4-*trans*-CHD mit einer Reinheit von $\geq 99\%$. Das Produkt wurde aus dem Überstand der 300 Liter-Fermentation gewonnen.

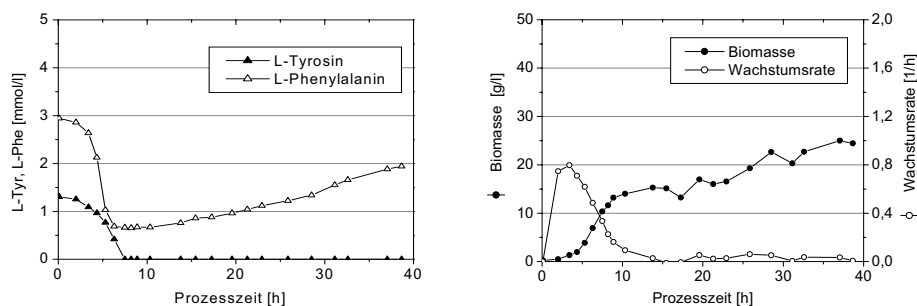


Abb. 6.11: Grafische Darstellung der Aminosäurekonzentrationen (links) und der Verlauf der Biomassekonzentration und der Wachstumsrate (rechts) (300 Liter; *E. coli* F82pC22).

Die differentielle Ausbeute betrug maximal 15 %mol/mol (Abb. 6.12). Der Wert blieb über die Fermentationsdauer auf einem konstanten Niveau zwischen 10 und 12 %mol/mol. Die integrale Selektivität betrug am Ende der Produktion 10 %mol/mol. Die maximale Produktivität von 4 mmol/(l*h) wurde während der Wachstumsphase bestimmt. Integriert über die Zeit wurden nach 31 Stunden eine Raum-Zeit-Ausbeute von 2,5 mmol/(l*h) biosynthetisiert.

Die differentielle spezifische Produktbildungsrate stieg nach der IPTG-Induktion bis auf 0,44 mmol/(g*h) (Abb. 6.13). Am Ende der Wachstumsphase sank der Wert auf 0,23 mmol/(g*h). Nach 39 Stunden wurden 0,13 mmol 3,4-*trans*-CHD pro Gramm Biomasse und Stunde gebildet. Die Bestimmung der integralen spezifischen Produktbildungsrate ergab ein Maximum von 1,5 mmol/(g*h) nach 17,3 Stunden.

Für die Bildung von 20,6 mol 3,4-*trans*-CHD wurden insgesamt 210 mol Glukose verbraucht. Die Glukoseverbrauchsrate fiel während der Wachstumsphase von 8,5 auf 2,5 mmol/(g*h). In der Produktionsphase blieb der Wert zwischen 2 und 1,5 mmol/(g*h).

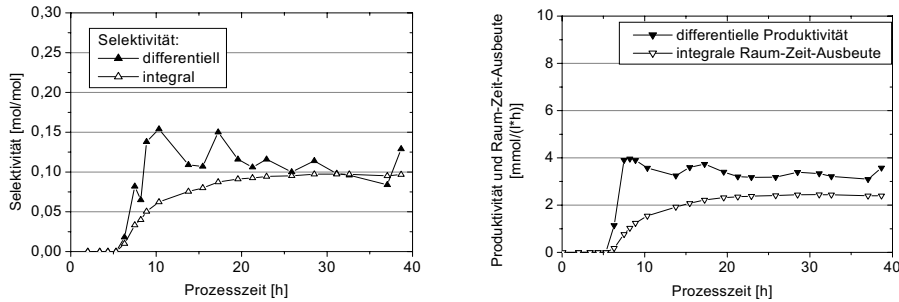


Abb. 6.12: Links: Differenzielle und integrale Selektivität. Rechts: Verlauf der Produktivität und der integralen Raum-Zeit-Ausbeute (300 Liter Fed-Batch Fermentation; *E. coli* F82pC22).

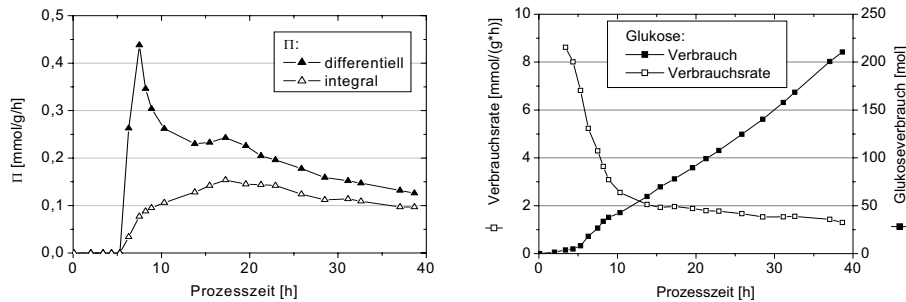


Abb. 6.13: Links: Verlauf der differentiellen und integralen spezifischen Produktbildungsrate (Π). Rechts: Verlauf der differentiellen Glukoseverbrauchsrate und des gesamten Glukoseverbrauchs (300 Liter Fed-Batch Fermentation; *E. coli* F82pC22).

6.1.4 Metabolische Stoffflussanalyse mittels eines ^{13}C -Markierungsexperiments

Das ^{13}C -Markierungsexperiment hat als Ziel, die intrazellulären Flüsse in dem 3,4-*trans*-CHD-Produktionsstamm F82pC22 während einer instationären Fed-Batch Fermentation zu bestimmen. Während des Experiments sollen die Wachstumsphase, der Übergang aus der Wachstums- in die Produktionsphase und die Produktionsphase untersucht werden (Abb. 6.5). Anschließend sollen die unterschiedlichen Produktbildungsraten und die intrazellulären Flüsse der drei Phasen miteinander verglichen werden.

Die Aufgabenstellung der metabolischen Stoffflussanalyse der 3,4-*trans*-CHD-Produzenten wurde in vier Teilbereiche unterteilt. Die technische Umsetzung des Experimentes wurde im Rahmen dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit Grönke (Grönke 2007) durchgeführt. Die 3,4-

trans-CHD Fed-Batch Fermentationen wurden basierend auf den Arbeiten im Kapitel 6.1.1 durchgeführt. Die Umsetzung des Experimentes fand im Master-Bioreaktor mit einem Volumen von 42 Litern statt. Die ^{13}C -Markierung wurde im Rahmen der 2 Liter-Sensor-Bioreaktor-Fermentationen durchgeführt (El Massaoudi 2003) (Kap. 4.3.4). Die Fermentation im Sensor-Reaktor und die Bearbeitung der Proben wurde von Grönke (Grönke 2007) durchgeführt. Die Messung der ^{13}C -markierten Metabolite erfolgte bei der DSM und bei Prof. Müller an der Universität Freiburg. Die Modellierung der Messergebnisse wurde von Wahl (Wahl 2005) und Grönke am IBT2 in Jülich durchgeführt.

Das erste Experiment wurde während der Wachstumsphase direkt nach der IPTG-Induktion gestartet. Die Dauer des Experimentes betrug 2,7 Stunden. Nach dem Ende der Wachstumsphase wurde das zweite Markierungsexperiment nach einer Prozesszeit von 13,2 Stunden begonnen. Dieses Experiment wurde nach einer Dauer von drei Stunden beendet. Das letzte ^{13}C -Markierungsexperiment wurde 30,5 Stunden nach dem Start der Hauptfermentation begonnen. Aufgrund des hohen Anteils an nicht markiertem Produkt dauerte diese Phase 4,4 Stunden.

In der Abbildung 6.14 sind die Verläufe der Konzentration von 3,4-*trans*-CHD dargestellt. Die Produktkonzentration lag am Ende des ersten Experimentes nach 2,7 Stunden im Sensor-Reaktor um 1,9 mmol/l höher. Es wurde ein Regressionskoeffizient von 98,9% berechnet. Während des zweiten Experimentes wurde eine Konzentrationsdifferenz von 1,3 mmol/l bestimmt. Der ermittelte Regressionskoeffizient betrug 94,2%. Bei dem letzten Versuch wurde nach 4,4 Stunden eine um 4,1 mmol/l höhere Konzentration im Master-Reaktor gemessen. Der Regressionskoeffizient für das letzte Experiment ergab einen Wert von 67,9%.

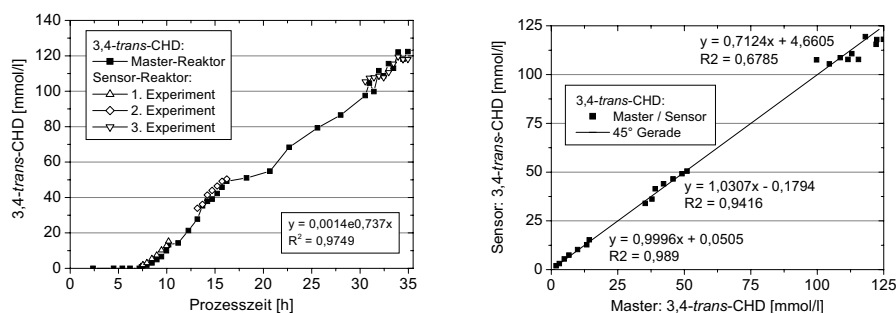


Abb. 6.14: ^{13}C -Markierungsexperiment mit dem Produktionsstamm *E. coli* F82pC22. Links: Verlauf der 3,4-*trans*-CHD-Konzentration. Rechts: Gegenüberstellung der Verläufe des Master- und Sensor-Bioreaktors.

Neben den Verläufen der Produktkonzentration wurde auch die Nebenproduktbildung verglichen. Die Bildung der Intermediate der Aromaten-Biosynthese Shikimat-3-Phosphat und Shikimat verlief im Master- und Sensor-Modus vergleichbar (Abb. 6.15). Als weiteres Intermediat wurde Chorismat akkumuliert. Während der Wachstumsphase stieg die Chorismat-Synthese während des ersten ^{13}C -Markierungsexperimentes auf über 4 mmol/l. Die Konzentration nahm im Laufe des zweiten Experimentes auf ungefähr 8 mmol/l zu. Weiterhin wurde das Abbauprodukt 4-Hydroxy-Benzoesäure in Konzentrationen bis zu

3 mmol/l gebildet. Die Acetatkonzentration betrug während der Fermentationen im Master- und Sensor-Reaktor maximal 10 mmol/l.

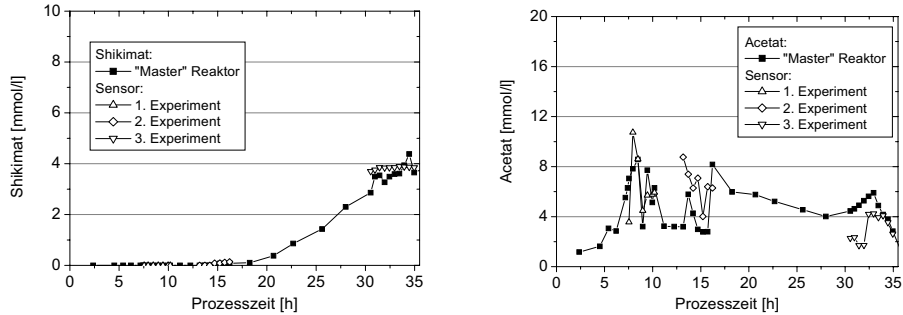


Abb. 6.15: Gegenüberstellung der Verläufe der Konzentrationen der Nebenprodukte Shikimat (links) und Acetat (rechts) im Master- und Sensor-Reaktor (*E. coli* F82pC22).

Während des ersten ^{13}C -Markierungsexperimentes stieg im Master- und Sensor-Reaktor die Produktivität auf Werte zwischen 4,83 und 4,93 mmol/(l*h) an (Abb. 6.16). Die Produktbildung verlief in beiden Reaktoren vergleichbar. Der Wert stieg zwischen der 20. und 30. Prozessstunde auf 5,4 mmol/(l*h) im Master-Reaktor. Gleichzeitig lag die differentielle Produktivität im Sensor-Reaktor durchschnittlich um 0,29 mmol/(l*h) höher. Während des letzten ^{13}C -Markierungsexperimentes sank die Produktivität auf 4,1 mmol/(l*h). Im Sensor-Reaktor wurde ein Wert von 3,8 mmol/(l*h) bestimmt. Die integrale Darstellung der Raum-Zeit-Ausbeute ergab vergleichbare Verläufe während der ersten beiden Experimente. Während des letzten Experimentes trat eine Abweichung von 0,1 mmol/(l*h) im Sensor-Reaktor auf.

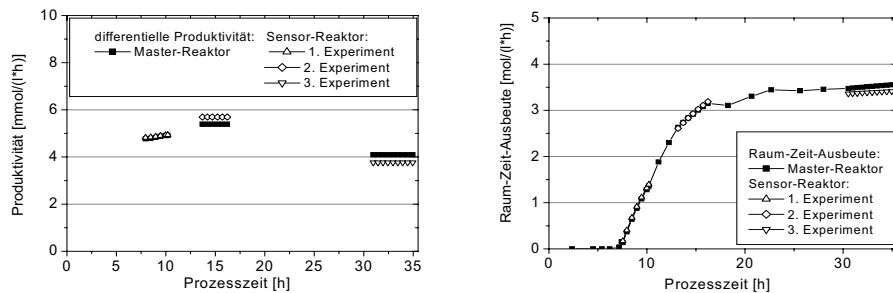


Abb. 6.16: Links: Verläufe der Produktivität im Master- und Sensor-Reaktor während der drei ^{13}C -Markierungsphasen. Rechts: Grafische Darstellung der Raum-Zeit-Ausbeute (*E. coli* F82pC22).

Die spezifische Produktbildungsrate sank während des ^{13}C -Markierungsexperimentes in der Wachstumsphase in beiden Reaktoren um 50% von 0,6 auf 0,3 mmol/(g*h) (Abb. 6.17). Der Wert fiel auf ungefähr 0,29 mmol/(g*h) nach 13,7 Stunden. Im Sensor-Reaktor wurde

während des zweiten Experimentes eine um 0,02 mmol/(g*h) höhere Produktbildung gemessen. Während des letzten Experimentes wurde eine mittlere spezifische Produktbildungsrate von 0,16 mmol/(g*h) ermittelt. Die Abweichung zwischen den beiden Prozessen lag bei 0,01 mmol/(g*h).

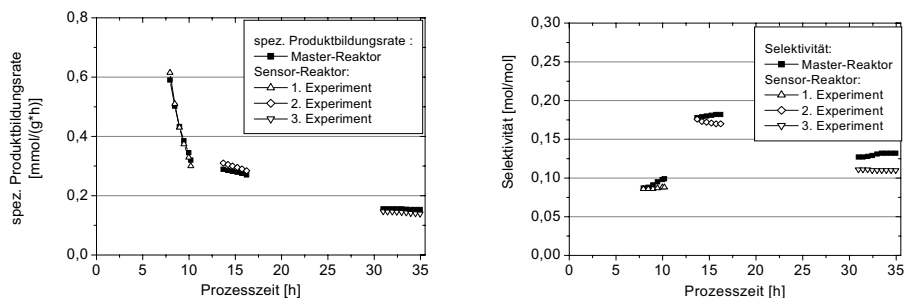


Abb. 6.17: Verlauf der differentiellen spezifischen Produktbildungsrate (links) und der differentiellen Selektivität (rechts) im Master- und Sensor-Reaktor während der ^{13}C -Markierungsphasen (*E. coli* F82pC22).

Die Bestimmung des differentiellen substratbezogenen Produktausbeutekoeffizienten ergab während der Wachstumsphase einen Wert zwischen 9 und 10 %mol/mol (Abb. 6.17). Gegen Ende des ersten Experimentes wurde eine Differenz von 1 %mol/mol berechnet. Während des zweiten ^{13}C -Markierungsexperimentes lagen die maximalen Selektivitäten bei bis zu 18,2%mol/mol im Master-Prozess und 17,6 %mol/mol im Sensor-Reaktor. In der letzten Phase wurden durchschnittlich 13 %mol/mol Glukose in 3,4-*trans*-CHD umgesetzt. Im Sensor-Reaktor lag der Wert um 2 %mol/mol niedriger.

In der Abbildung 6.18 sind die integralen Verläufe der Kohlenstoffverteilung während der Fed-Batch Fermentation im 42 Liter-Maßstab im Master-Modus dargestellt. Im Vergleich dazu sind die jeweiligen Kohlenstoff-Bilanzen der drei ^{13}C -Markierungsexperimente im Sensor-Reaktor abgebildet. Während des ersten Experimentes konnte die Kohlenstoffverteilung im Master- und Sensor-Modus zu 85 bis 95 %C-Mol geschlossen werden. Die Kohlenstoffanteile des Produktes und der Nebenprodukte waren im Master- und Sensor-Reaktor vergleichbar. Bei der Bestimmung der Verteilung des Kohlendioxids im ersten Experiment wurde im Master-Reaktor ein höherer Anteil von 5 %C-Mol festgestellt. Die Kohlenstoffverteilung in der Phase der zweiten ^{13}C -Markierung konnte bis auf 2 %C-Mol geschlossen werden. Die Differenz beim CO_2 -Anteil lag nach der Versuchsdauer von drei Stunden bei 3,5 %C-Mol. Die dritte Phase konnte im Master- und Sensor-Prozess bis zu 98-100 %C-Mol geschlossen werden.

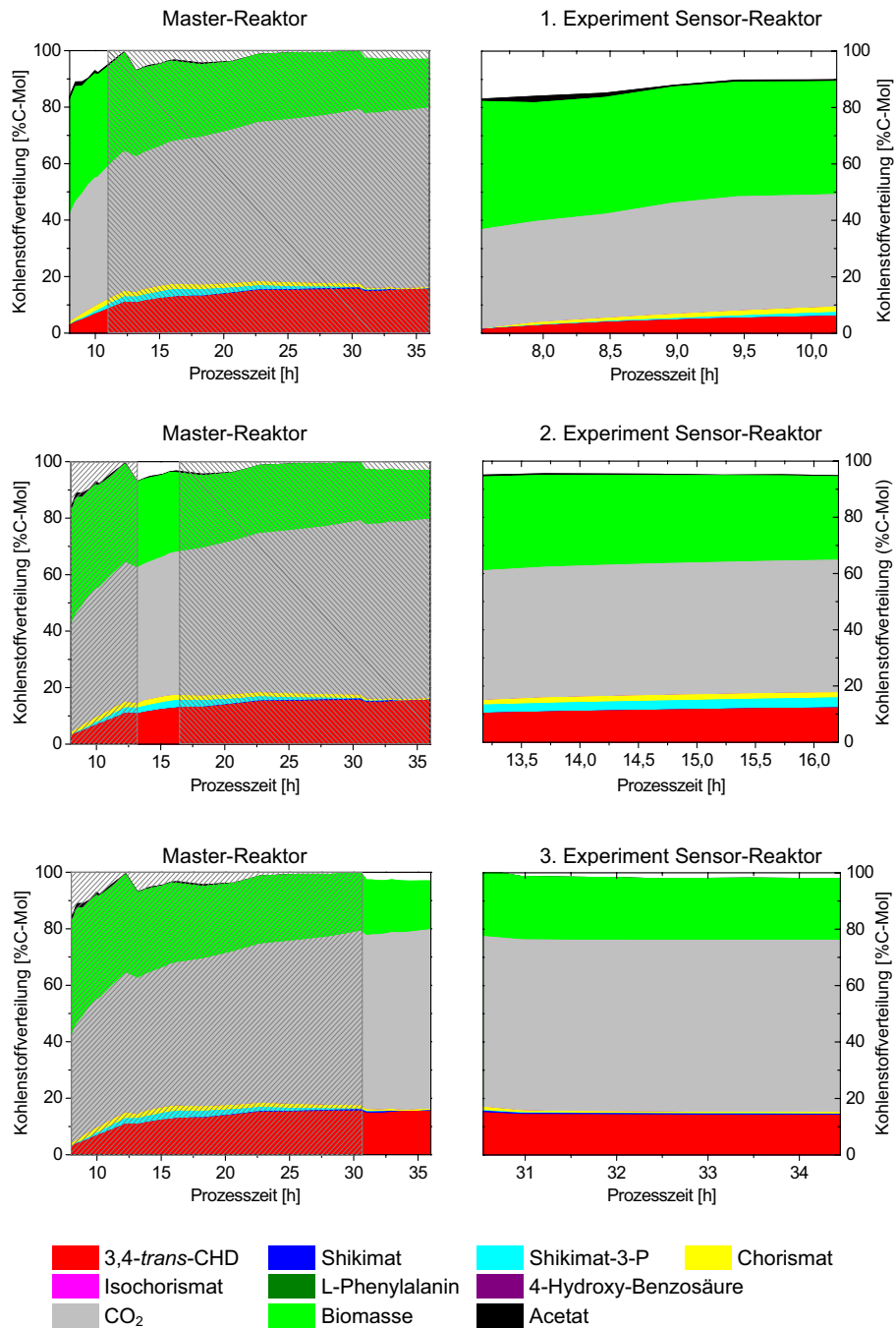


Abb. 6.18: Kohlenstoffverteilung während eines Master-Sensor-Experiments. Links: Bilanz im Master-Reaktor. Rechts: Darstellung der Verteilung während der drei Experimente im Sensor-Reaktor (*E. coli* F82pC22).

6.2 Diskussion zur 3,4-*trans*-CHD-Prozessentwicklung

Bei 3,4-*trans*-CHD handelt es sich nicht um ein Intermediat bestimmter Stoffflusswege (Kap. 3.1.7). Bisher konnte keine physiologische Bedeutung von 3,4-*trans*-CHD für *E. coli* nachgewiesen werden. Auch wurde eine Überproduktion des Moleküls in Wildtyp-Stämmen bisher nicht beobachtet. Ausschließlich eine gerichtete plasmidkodierte Überexpression des Gens *entB* führte zur extrazellulären Anhäufung von 0,7 g/l 3,4-*trans*-CHD (Franke 2002). Durch die Optimierung der 3,4-*trans*-CHD-Bildung bestand die Möglichkeit, dass die Akkumulation dieses Produkts eine inhibierende oder toxische Wirkung auf die Stoffflüsse in *E. coli* besitzen könnte. Durch die geringere Affinität der Isochorismat Lyase (Gen *entB*) für Chorismat bestand die Gefahr, dass bei der Synthese von 3,4-*trans*-CHD eine Vielzahl von Nebenprodukten entstehen könnte. Ein Schwerpunkt der Arbeiten im Bereich der 3,4-*trans*-CHD-Produktion lag deshalb auf dem Nachweis und der Quantifizierung der bei der 3,4-*trans*-CHD-Synthese entstehenden Nebenprodukte (Moch 2003).

Weiterhin wurden Untersuchungen zur *in situ* Gewinnung des Produktes 3,4-*trans*-CHD aus einem Fed-Batch Fermentationsprozess begonnen (Kap. 7).

6.2.1 Optimierung der 3,4-*trans*-CHD-Biosynthese

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Produkt 3,4-*trans*-CHD im Labormaßstab bis zu einer Konzentration von 164 mmol/l (25,9 g/l) hergestellt werden konnte (Tab. 6.1). Damit konnte die bisher erzielte maximale 3,4-*trans*-CHD-Konzentration deutlich verbessert werden.

Tab. 6.1: Vergleich der maximalen differentiellen und integralen kinetischen Parameter und der Konzentrationen bei Fed-Batch Fermentationen mit verschiedenen Produktionsstämmen und unterschiedlichen IPTG-Induktionskonzentrationen. Die Ergebnisse der Untersuchungen der IPTG-Induktionsmengen von 50 und 200 µM sind der Arbeit von Moch (Moch 2003) entnommen (gekennzeichnet mit *).

Stamm	IPTG-Konz.	Produktivität		Selektivität		3,4- <i>trans</i> -CHD		S-3-P	Chorismat	4-HB
		Qp	RZA	diff.	integral	Konz.	Bildungsrate	Konz.	Konz.	Konz.
		[mmol/(l*h)]		[%mol/mol]		[mmol/l]	[mmol/(g*h)]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]
F82pC22	50 µM*	7,4	4,2	18,0	16,8	130	0,35	8	21	3,4
F82pC22	100 µM	8,6	4,4	27,5	17,9	164	0,52	17	6,7	1,9
F82pC22	200 µM*	7,3	4,1	25,0	19,0	160	0,42	13	6,0	1,4
F82pC22 (300 Liter)	100 µM	3,6	2,5	16,7	13,2	92,9	0,43	39	-	-
F143pC22	100 µM	7,3	4,3	18,2	15,2	127	0,34	5,3	9,4	18,3

Bei der Biosynthese von 3,4-*trans*-CHD wurde eine erhöhte extrazelluläre Akkumulation der Intermediate der Aromaten-Biosynthese festgestellt. Während der Fed-Batch Fermentation mit dem Stamm F82pC22 kam es zur Anhäufung der Intermediate Shikimat-3-Phosphat, Shikimat und Chorismat (Abb. 6.3). Die Bildung des Nebenproduktes Acetat wurde ausschließlich am Ende der Fermentation in geringen Konzentrationen beobachtet. Durch die plasmidkodierte Überexpression der Gene *aroF*, *aroB* und *aroL* wurde der Fluss bis zum Shikimat-3-Phosphat optimiert. Die Ursache für die Akkumulation von Shikimat-3-Phosphat

liegt an der nicht ausreichenden Aktivität des Enzyms EPSP-Synthase, das durch das Gen *aroA* kodiert wird (Abb. 3.3). Die Akkumulation des Nebenproduktes Shikimat-3-Phosphat sollte deshalb durch die chromosomale Integration des Gens *aroA* verhindert werden. Die Überexpression des Gens *aroA* beim Stamm F143pC22 führte erfolgreich zu der Reduktion der extrazellulären Akkumulation von Shikimat-3-Phosphat und Shikimat (Kap. 6.1.2). Die Nebenproduktkonzentration konnte von maximal 17 auf 4 mmol/l reduziert werden (Abb. 6.19). Die Reduktion der Nebenproduktbildung führte jedoch nicht zur Erhöhung der Produktbildungsrate. Es trat sogar eine Verringerung der 3,4-*trans*-CHD-Biosynthese auf. Der maximale Wert von über 0,5 mmol/(g*h) mit dem Stamm F82pC22 sank beim Stamm F143pC22 auf 0,34 mmol/(g*h).

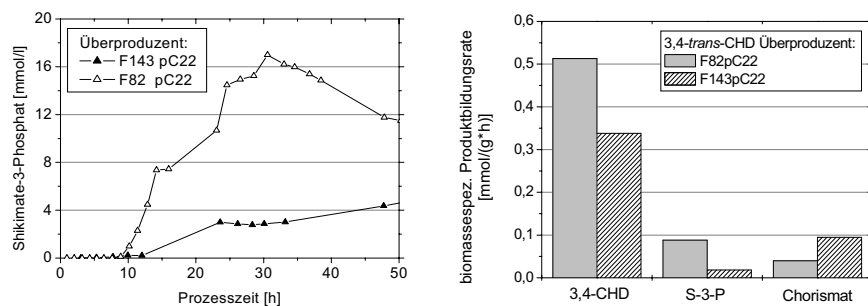


Abb. 6.19: Fed-Batch Fermentationen mit den 3,4-*trans*-CHD Überproduzenten F82pC22 und F143pC22. Links: Gegenüberstellung der Konzentrationsverläufe des Nebenproduktes Shikimat-3-Phosphat. Rechts: Vergleich der biomassespezifischen 3,4-*trans*-CHD-, Shikimat-3-Phosphat- und Chorismatbildungsraten.

Die Reduktion der Shikimat-3-Phosphat Akkumulation war mit einem deutlichen Anstieg der Konzentration der Nebenprodukte Chorismat und 4-Hydroxy-Benzoat verbunden (Abb. 6.20). Das Nebenprodukt 4-Hydroxy-Benzoat entsteht als Abbauprodukt von Chorismat (Moch 2003). Aufgrund dessen ist die Akkumulation von 4-Hydroxy-Benzoat direkt von der Chorismat-Anhäufung abhängig.

Die Reduktion der Produktbildung um über 30% beim Stamm F143pC22 könnte an der Akkumulation der Vielzahl von Nebenprodukten liegen, die sich von Chorismat ableiten (Tab. 6.1). Die neunfach höhere 4-Hydroxy-Benzoat-Konzentration könnte eine inhibierende Wirkung auf den Stamm F143pC22 im Vergleich zur Fermentation mit dem Stamm F82pC22 haben (Abb. 6.20). Eine Reduktion der Nebenproduktbildung bei dem Stamm F143pC22 würde einen positiven Effekt auf die Ausbeute und die Produktbildung haben.

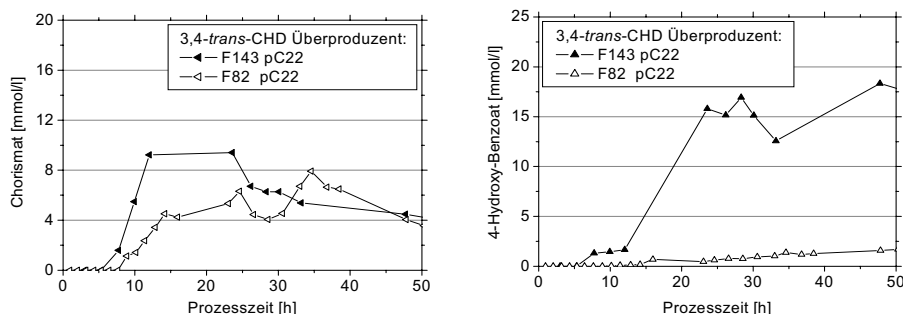


Abb. 6.20: Vergleich der Konzentrationsverläufe der Nebenprodukte Chorismat (links) und 4-Hydroxy-Benzoat (rechts) bei Fed-Batch Fermentationen mit den Produktionsstämmen F82pC22 und F143pC22.

Der Fluss in Richtung Chorismat konnte durch die Verstärkung der EPSP-Synthase-Aktivität optimiert werden. Die Verbesserung der Produktbildung war jetzt von dem nächsten enzymatischen Schritt abhängig, der Aktivität des Enzyms Isochorismat-Lyase (Gen *entB*). Die extrazelluläre Akkumulation von Chorismat bis zu einer Konzentration von 9 mmol/l war durch die geringe Affinität des Substrates Chorismat für das Enzym Isochorismat-Lyase bedingt (Abb. 3.3). Der K_m -Wert beträgt dabei mehr als 37 mM im Vergleich zu 0,014 mM bei der Reaktion von Isochorismat zu 2,3-*trans*-CHD (Rusnak et al. 1990). Die Optimierung der 3,4-*trans*-CHD-Biosynthese kann durch eine gentechnische Veränderung der Isochorismat-Lyase oder durch eine stärkere Überexpression des Gens *entB* umgesetzt werden. Die Verstärkung der Affinität für Chorismat könnte zum Beispiel durch eine Veränderung des Aktiven-Zentrums der Isochorismat-Lyase erfüllt werden. Diese Maßnahme könnte durch gerichtete gentechnische Methoden oder durch Mutagenese erfolgen. Die Konstruktion eines neuen Produktionsstammes mit der Überexpression des Gens *aroA* und der Optimierung der Isochorismat-Lyase-Aktivität sollte eine deutliche Verbesserung der Produktbildungsraten bei gleichzeitiger Reduktion der Nebenproduktbildung ermöglichen.

6.2.2 Vergleich des fermentativen Zugangs zu unterschiedlichen Produkten des Aromaten-Biosyntheseweges

Im Rahmen dieses Kapitels sollen die Ergebnisse der fermentativen Synthese von 2,3- und 3,4-*trans*-CHD mit Ergebnissen der Fermentationen anderer Produkte der Aromaten-Biosynthese verglichen werden. Als Beispiel kann die Biosynthese von L-Phenylalanin mit dem *E. coli* Stamm 4pF81 (Rüffer 2004) und die Biosynthese von 3-Dehydroshikimat mit dem *E. coli* Stamm KL3/pKL5.17A (Yi et al. 2003) genannt werden. Die Biosynthese der vier Produkte verläuft bis 3-Dehydroshikimat identisch (Abb. 3.3). Bis zum Chorismat ist der Stofffluss zu der aromatischen Aminosäure und den beiden CHD-Molekülen gleich. Der Stamm 4pF81 ist im Vergleich zu den Stämmen F82pC22 und F111pC20 nur für die Aminosäure L-Tyrosin auxotroph. Des Weiteren unterscheiden sich der L-Phenylalanin-Stamm und die CHD-Stämme durch die Plasmide und die Deletion des *ent*-Operons. Bis auf diese Faktoren basieren die beiden CHD-Überproduzenten F82 und F111 auf dem

L-Phenylalanin-Produzenten 4 (Tab. 4.1). Der 3-Dehydroshikimat-Überproduzent ist mit den CHD- und L-Phenylalanin-Stämmen nicht verwandt und zeichnet sich unter anderem durch eine plasmidkodierte Überexpression der Transketolase aus (Yi et al. 2003).

Tab. 6.2: Gegenüberstellung der Ergebnisse der fermentativen Synthese von 2,3-*trans*-CHD, 3,4-*trans*-CHD, L-Phenylalanin (Rüffer 2004), 3-Dehydroshikimat (Yi et al. 2003) und Shikimat (Gibson et al. 2001).

Produkt	<i>E. coli</i> Stamm	Produktivität		Selektivität		3,4- <i>trans</i> -CHD		Biomasse
		Qp	RZA	diff.	integral	Konz.	Bildungsrate	Konz.
		[mmol/(l*h)]		[%mol/mol]		[mmol/l]	[mmol/(g*h)]	[g/l]
L-Phe	4pF81	12,5	4,1	20,8	14,2	206	0,48	33
2,3-CHD	F111pC20	5,4	2,8	24,0	15,6	140,2	0,51	22,8
3,4-CHD	F82pC22	8,6	4,4	27,5	17,9	164	0,52	36,8
DHS	KL3/pKL5.17A	-	6,8	-	26	285	0,25*	25
Shikimat	<i>E. coli</i> PTS+	-	-	-	18	299	-	-

* integrale spezifische Produktbildungsrate

Im Vergleich zur Produktion von L-Phenylalanin wurde bei der Fed-Batch Fermentation von 3,4-*trans*-CHD eine 7% höhere integrale Raum-Zeit-Ausbeute bei einer 10% höheren Biomassekonzentration ermittelt (Tab. 6.2). Die 32% geringere Raum-Zeit-Ausbeute bei der Fermentation von 2,3-*trans*-CHD war verbunden mit einer 31% geringeren Biomassekonzentration. Nach der Induktion der Produktbildung wurde ein vergleichbarer Anstieg der differentiellen Produktbildungsrate beobachtet (Abb. 6.21).

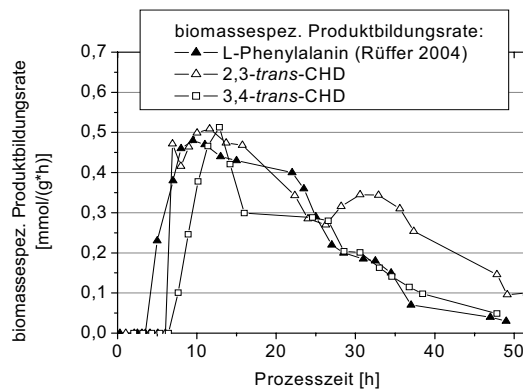


Abb. 6.21: Gegenüberstellung der biomassespezifischen differentiellen Produktbildungsrate bei Fed-Batch Fermentationen von L-Phenylalanin mit *E. coli* 4pF81 (Rüffer 2004), von 2,3-*trans*-CHD mit *E. coli* F111pC20 (Kap. 5) und von 3,4-*trans*-CHD mit *E. coli* F82pC22.

Ab der Prozessstunde 55 fiel die L-Phenylalanin- und 3,4-*trans*-CHD-Produktbildungsrate bis auf unter 0,1 mmol/(g*h). Die Abnahme der L-Phenylalanin-Biosynthese hing mit der inhibierenden Wirkung des Produktes ab einer Konzentration von über 20 g/l zusammen (Gerigk 2001; Rüffer 2004). Die spezifische Produktbildungsrate bei der Biosynthese von 2,3-*trans*-CHD lag ab diesem Zeitpunkt deutlich über dem Wert von L-Phenylalanin und 3,4-*trans*-CHD. Die geringere Produktbildungsrate von 3,4-*trans*-CHD könnte zu der Annahme

führen, dass dieses Produkt eine inhibierende Wirkung auf die Biosynthese hat. Da 3,4-*trans*-CHD aber kein Endprodukt oder Intermediat der Aromaten-Biosynthese ist, sollte eine inhibierende Wirkung dieses Moleküls unwahrscheinlich sein. Aufgrund der analogen Struktur des Moleküls 3,4-*trans*-CHD im Vergleich zu den Intermediaten 2,3-*trans*-CHD, 2,3-Benzoesäure und der Chorismat-Abbauprodukte könnten hohe 3,4-*trans*-CHD-Konzentrationen die Biosynthese trotzdem beeinflussen.

Die Ausbeute bei der L-Phenylalanin-Fermentation lag integriert über die Zeit bei 1,4 (2,3-CHD) bis 3,7 %mol/mol (3,4-CHD) niedriger. Die höhere Selektivität bei CHD-Molekülen kann möglicherweise durch die Abspaltung von Pyruvat auf dem Weg von Chorismat zu 2,3- und 3,4-*trans*-CHD erklärt werden (Abb. 3.4). Die höhere Akkumulation von Pyruvat könnte die Umsetzung von Pyruvat zu Phosphoenolpyruvat durch das Enzym PEP-Synthase verstärken. Die höhere Verfügbarkeit von Phosphoenolpyruvat wiederum könnte für die Biosynthese von DAHP eingesetzt werden und dadurch die CHD-Ausbeute verbessern.

Bei der Synthese des Intermediats der Aromaten-Biosynthese 3-Dehydroshikimat wurde im Vergleich zu den CHD-Fermentationen eine höhere Produktbildung und eine integrale Ausbeute von 26 %mol/mol erreicht (Tab. 6.2). Die unbekannten Mutationen des 3-Dehydroshikimat-Überproduzenten lassen einen direkten Vergleich der unterschiedlichen Prozesse nicht zu. Eine Überexpression des Transketolase-Gens kann anhand der Ergebnisse von Yi (Yi et al. 2003) jedoch als signifikant für eine optimale Bildung und Ausbeute aller Aromaten-Biosynthese Produkte betrachtet werden.

6.2.3 ¹³C-Markierungsexperiment

Während der CHD-Fermentationen wurde in der Wachstumsphase eine spezifische Produktbildungsrate von über 0,5 mmol/(g*h) gemessen. Nachdem das Wachstum der Zellen durch die Reduktion der Aminosäurezugabe verlangsamt wurde, fiel der Wert zuerst unter 0,3 mmol/(g*h) und im weiteren Verlauf der Fermentation unter 0,2 mmol/(g*h). Der typische Verlauf der biomassespezifischen 3,4-*trans*-CHD-Bildungsrate kann der Abbildung 6.5 entnommen werden.

Es konnte ein Zusammenhang zwischen der Wachstums- und der Produktbildungsrate hergestellt werden (Kap. 5.2.5). Eine weitere Information zur Beurteilung der Fermentation kann der Kohlenstoffbilanz entnommen werden (Abb. 6.18). In der Wachstumsphase betrug der Anteil des Nebenproduktes Kohlendioxid ca. 40 Mol% bei einer Bildungsrate von ca. 6 mmol/(g*h) (Abb. 6.5). Anhand all dieser Daten konnte eine genaue qualitative und quantitative Aussage über die Ursache der Veränderungen der extrazellulären Werte jedoch nicht getroffen werden. Es war deshalb notwendig, weitere Informationen über die intrazellulären Flüsse zu gewinnen. Dieses Vorhaben sollte im Rahmen des ¹³C-Markierungsexperimentes umgesetzt werden. Die Zielsetzung des Experimentes war die Untersuchung der Produktbildung und der intrazellulären Flussverteilung während einer Fed-Batch Fermentation. Eine ähnliche Fragestellung trat bei der Untersuchung der L-Phenylalanin-Biosynthese auf (Gerigk 2001; Rüffer 2004). Das ¹³C-Markierungsexperiment wurde dabei mittels der Master-Sensor-Technik durchgeführt (El Massaoudi 2003). Eines der Ergebnisse dieser Untersuchungen war der Hinweis auf die Erhöhung des Flusses in den TCA-Zyklus von 114 Mol% in der Wachstumsphase auf 160 Mol% in der Produktionsphase (Wahl 2005; Wahl 2006; Wahl et al. 2004). Diese Veränderung der intrazellulären Flüsse war verbunden mit der Erhöhung der Kohlendioxidbildung um 16% und der Reduktion des

Flusses in Richtung des Produktes von 20 auf 11 Mol%. Als wichtiger Faktor für die Beurteilung der L-Phenylalanin-Biosynthese wurde außerdem die Veränderung des Nettoflusses von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat identifiziert (Wahl 2005; Wahl 2006; Wahl et al. 2004). Entscheidend dabei ist die Aktivität der Enzyme Pyruvat-Kinase und Phosphoenolpyruvat-Synthase (Abb. 3.2). Bei der Biosynthese von L-Phenylalanin wurde ein Anstieg des Nettoflusses in Richtung Pyruvat von 14 Mol% in der Wachstumsphase bis auf 60 Mol% in der Produktionsphase beobachtet (Wahl 2005; Wahl 2006; Wahl et al. 2004). Ein ähnliches Ergebnis wurde bei der Bestimmung der maximalen theoretischen Ausbeute für die CHD-Moleküle ermittelt (Abb. 6.22). Die Verläufe der extrazellulären Raten während der Fed-Batch Fermentationen von 3,4-*trans*-CHD untermauern diese Vermutung (Tab. 6.2 und Abb. 6.21). Nach der Verlangsamung der Wachstumsrate auf unter $0,1 \text{ h}^{-1}$ durch die Reduktion des Aminosäurezyklus wurde eine stetige Abnahme der Produktbildungsrate beobachtet. Gleichzeitig wurde ein Anstieg der Kohlendioxidbildung auf ca. 60 Mol% ermittelt (Abb. 6.5). Aufgrund der fehlenden intrazellulären Messungen kann die Erhöhung des Nettoflusses von PEP zu Pyruvat nur angenommen werden. Die Ergebnisse, die bei der Untersuchung der intrazellulären Flüsse bei der L-Phenylalanin-Biosynthese erzielt wurden, können nur bedingt auf die 3,4-*trans*-CHD-Bildung übertragen werden. Der Grund liegt in der notwendigen Abspaltung von Pyruvat bei der Umwandlung von Chorismat zum Endprodukt durch das Enzym Isochorismat-Lyase (Abb. 3.3 und 3.5). Die höhere Akkumulation von Pyruvat beeinflusst wahrscheinlich die intrazellulären Flüsse. Eine quantitative Beantwortung dieser Frage kann nur durch die Bestimmung der intrazellulären Flüsse im Rahmen eines ^{13}C -Markierungsexperiments erfolgen. Die experimentelle Umsetzung wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit unter dem Einsatz der Sensor-Master-Technologie in Zusammenarbeit mit Grönke (Grönke 2007) durchgeführt (Kap. 6.1.4). Der Vergleich der Konzentration des Produktes, der Nebenprodukte und der Parameter im Master- und Sensor-Reaktor zeigte, dass das Experiment erfolgreich verlief. Bis auf geringe Abweichungen zeigten alle Sensor-Fermentationen annähernd identische Verläufe gegenüber dem Master-Prozess. Die Messung der ^{13}C -markierten Intermediate erfolgte in Kooperation mit der Firma DSM und Prof. Müller an der Universität Freiburg. Die Modellierung der Daten erfolgte mit Unterstützung von Wahl (Wahl 2005). Die Ergebnisse des ^{13}C -Markierungsexperimentes werden im Rahmen der Promotionsarbeit von Grönke (Grönke 2007) beschrieben.

6.2.4 Modellgestützte Optimierung der CHD-Biosynthese

In Zusammenarbeit mit Wahl (Wahl 2005) wurde ein stöchiometrisches Modell für die Berechnung des optimalen Flusses von Kohlenstoff, ausgehend von Glukose, bis zum Produkt *trans*-CHD in einem nicht wachsenden Stamm erstellt (Abb. 6.22).

Anhand des Modells konnte beim Einsatz von Glukose als Substrat für die Biosynthese der beiden CHD-Moleküle eine maximale Ausbeute von über 77 Mol% ermittelt werden. Die Glukose wird über das PT-System in die Zelle aufgenommen (Kap. 3.1.2). Dabei wird je Mol Glukose ein Mol Phosphoenolpyruvat in ein Mol Pyruvat umgesetzt. Weiterhin wird bei der letzten enzymatischen Reaktion der Synthese der beiden CHD-Moleküle ein Mol Pyruvat pro Mol *trans*-CHD gebildet. Die Akkumulation von Pyruvat sollte im optimalen Fall durch eine hohe Aktivität des Enzyms PEP-Synthase (*pps*) kompensiert werden. Dabei sollte Pyruvat in PEP umgesetzt werden. Das Modell ergab einen notwendigen Fluss von ca. 80 Mol%.

Nur unter der Voraussetzung, dass Pyruvat zu PEP regeneriert wird, könnte die maximale *trans*-CHD-Ausbeute realisiert werden. Das Modell ergab des Weiteren, dass im optimalen Fall ein Teil des Pyruvats (ca. 20 Mol%) in den TCA-Zyklus abfließen müsste. Pyruvat würde über den TCA-Zyklus entweder in die Biomasse oder Kohlendioxid umgesetzt werden. Damit konnte gezeigt werden, dass die optimale *trans*-CHD Synthese von dem Wachstum der Biomasse abhängig ist. Die Ergebnisse der Untersuchungen der 2,3-*trans*-CHD-Bildung konnten damit bestätigt werden (Kap. 5.2.5 und Abb. 5.32).

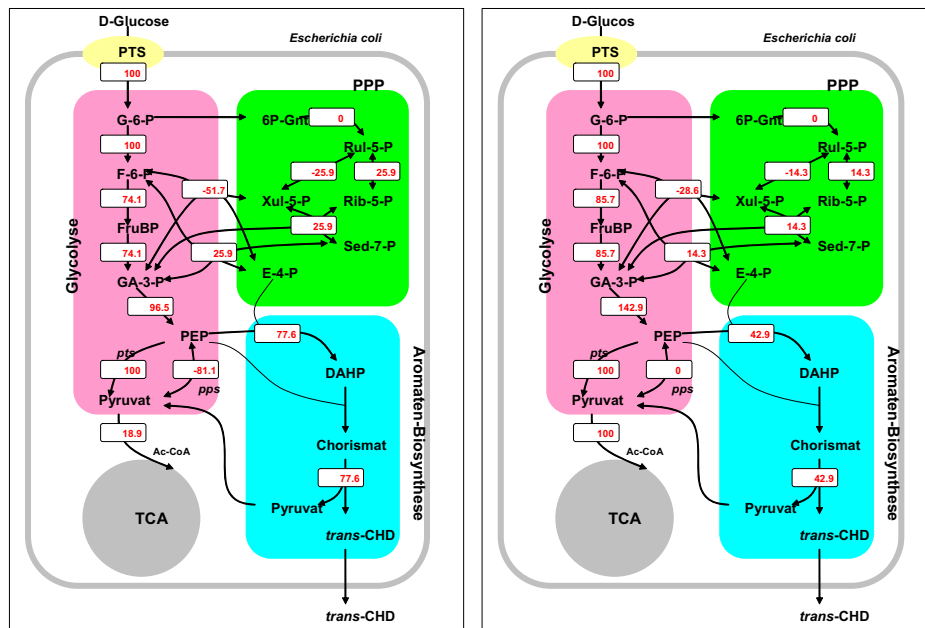


Abb. 6.22: Stöchiometrisches Modell der optimalen theoretischen intrazellulären Flüsse: für die maximale CHD-Ausbeute bei nicht-wachsenden Zellen (links) und bei einem neutralen Nettofluss zwischen Phosphoenolpyruvat und Pyruvat, katalysiert durch die Enzyme Pyruvat Kinase (Gen *pyk*) und PEP-Synthase (Gen *pps*) (rechts).

Der Nettofluss zwischen Phosphoenolpyruvat und Pyruvat, katalysiert durch die Enzyme Pyruvat Kinase und PEP-Synthase, wurde bei L-Phenylalanin Fermentationen mit maximal 14 Mol% bestimmt (Wahl 2005). Bei dem Modell für *trans*-CHD wurde ein Nettofluss von Null angenommen (Abb. 6.22). Dabei sank die CHD-Ausbeute um ca. 34 Mol% auf ca. 43 Mol%. Die maximale gemessene differentielle Ausbeute bei Fed-Batch Fermentationen mit dem Stamm F82pC22 wurde mit 27,5 Mol% bestimmt (Tab. 6.2).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein 3,4-*trans*-CHD-Produktionsstamm konstruiert, bei dem eine plasmidkodierte Überexpression des Gens *pps* (PEP-Synthase) umgesetzt wurde. Die Fed-Batch Fermentation mit diesem Stamm, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, führte jedoch nicht zu einer Verbesserung der Produktbildung und einer Erhöhung der Ausbeute von 3,4-*trans*-CHD. Die negative Auswirkung der *pps*-Überexpression könnte mehrere Ursachen haben. Aufgrund der Größe des *pps*-Gens könnte diese die Effizienz der Überexpression negativ beeinflussen. Außerdem könnte aufgrund der zentralen Bedeutung der PEP-Synthase eine hohe Verfügbarkeit des Enzyms eine negative

Auswirkung auf den Stoffwechsel haben. Weiterhin könnte die Überexpression der PEP-Synthase und damit eine Erhöhung des Flusses von Pyruvat zu Phosphoenolpyruvat für die Optimierung der CHD-Bildung nicht ausreichend sein. Bei den Untersuchungen von Patnaik (Patnaik et al. 1994; Patnaik et al. 1995) konnte eine Optimierung der Biosynthese von DAHP, des ersten Intermediats der Aromaten-Biosynthese, durch die Überexpression der Gene der Enzyme DAHP-Synthase (*aroG*), PEP-Synthase (*pps*) und Transketolase (*tktA*) erzielt werden. Die Bestimmung der theoretischen maximalen Ausbeute für den Aromaten-Biosyntheseweg ergab, dass eine Verdoppelung der Ausbeute durch die Rücksynthese von Pyruvat zu PEP und dadurch eine Reduktion des Kohlenstoffflusses in Richtung des TCA-Zyklus erreicht werden konnte. Die Untersuchungen von Patnaik (Patnaik et al. 1994; Patnaik et al. 1995) zeigten außerdem, dass die einzelne Überexpression der Gene *aroG*, *pps* oder *tktA* keine signifikante Verbesserung der Ausbeute ergab.

Die Rückgewinnung von PEP aus Pyruvat ist notwendig aufgrund des PEP-Verbrauchs bei der Glukoseaufnahme (Kap. 3.1.2), aber auch aufgrund der Abspaltung von Pyruvat durch das Enzym Isochorismat-Lyase bei der CHD-Synthese. Bei einem Glukoseüberschuss ist jedoch das Enzym PEP-Synthase nicht aktiv (Patnaik et al. 1994).

Demnach sollten zur Verbesserung der CHD-Biosynthese Produktionsstämme mit der Überexpression der Gene *aroG*, *pps* oder *tktA* konstruiert werden. Als Basisstamm für die Biosynthese von 3,4-*trans*-CHD könnte F82pC22 dienen. Um Nebenproduktbildung in Form von Shikimat-3-Phosphat und Chorismat zu vermeiden, müssten außerdem die Gene *aroA* und *entB* überexprimiert werden (Kap. 6.2.1). Als Basisstamm für die Biosynthese von 2,3-*trans*-CHD könnte F111pC20 dienen (Kap. 5.2.4).

7 Fermentativer Zugang zu der β -Aminosäure 2,3-*trans*-CHA

In diesem Kapitel wird die fermentative Produktion des CHA-Moleküls 2,3-*trans*-CHA beschrieben. Basierend auf den Erkenntnissen der 300 Liter-Fermentation von 2,3- und 3,4-*trans*-CHD sollte 2,3-*trans*-CHA direkt in großem Maßstab produziert werden.

7.1 Ergebnis der Fed-Batch Fermentation im 300 Liter Maßstab

Die Voruntersuchungen zur Biosynthese der β -Aminosäure 2,3-*trans*-CHA erfolgten im 2 Liter-Maßstab in der Sixfors Fermentationsanlage (Moch 2004). Die höchste Produktivität wurde mit dem *E. coli*-Produktionsstamm KB532pC27 erzielt. Zur Produktion von 2,3-*trans*-CHA im 300 Liter-Maßstab wurde der Aminosäurezufluss entsprechend der 2,3-*trans*-CHD-Produktion manuell gesteuert. Das Zulaufprofil entsprach dem im 2 Liter-Maßstab eingesetzten Fluss. Die Glukoselösung wurde manuell zugegeben. Das Volumen zu Beginn der Fermentation betrug 152 Liter. Die Induktion der Produktbildung mit 100 μ M IPTG erfolgte bei ca. 10% der maximalen Biomassekonzentration.

Das Ergebnis zeigt, dass insgesamt 18 mol (2,9 kg) 2,3-*trans*-CHA fermentativ produziert werden konnten (Abb. 7.1). Es wurde eine maximale Produktkonzentration von 100,3 mmol/l (15,7 g/l) nach einer Prozesszeit von 37 Stunden erreicht.

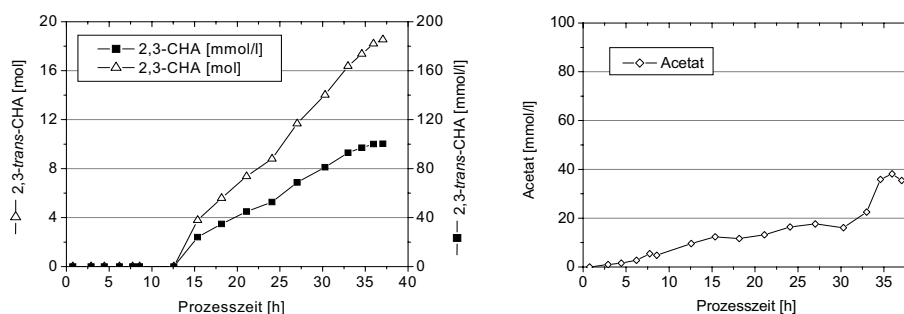


Abb. 7.1: Links: 2,3-*trans*-CHA Gesamtmenge und Konzentration während der 300 Liter Fed-Batch Fermentation mit dem Produktionsstamm *E. coli* KB532pC27. Rechts: Darstellung der Nebenproduktkonzentration.

Das Wachstum der auxotrophen Stämme war abhängig von der Zufuhr der Aminosäuren L-Tyrosin und L-Phenylalanin (Abb. 7.2). Die gewählten Zulaufzeiten führten zur Limitierung der L-Tyrosinkonzentration. Die Aminosäure L-Phenylalanin wurde bis zu einer Konzentration von 6,9 mmol/l akkumuliert.

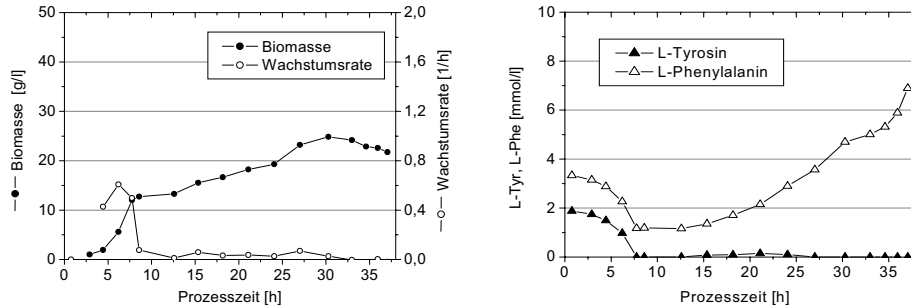


Abb. 7.2: Links: Verlauf der Biomassekonzentration und der Wachstumsrate bei der Produktion von 2,3-*trans*-CHA. Rechts: Verlauf der Aminosäurekonzentrationen (300 Liter Fed-Batch Fermentation; *E. coli* KB532pC27).

Die Wachstumsphase wurde nach 8 Stunden bei einer Biomassekonzentration von 12 g/l beendet (Abb. 7.2). Die maximale Biomassekonzentration von 24,8 g/l wurde nach 30 Stunden erreicht. Die höchste Wachstumsrate wurde mit $0,61 \text{ h}^{-1}$ nach 6,2 Stunden ermittelt. Als Nebenprodukt wurde Acetat mit bis zu 38 mmol/l akkumuliert. Am Ende der Fed-Batch Fermentation wurde der Zulauf der Glukoselösung abgebrochen. In der Folgezeit wurden Glukose und Acetat vollständig verstoffwechselt.

Die Produktbildung lag im Bereich von $0,2 \text{ mmol}/(\text{g} \cdot \text{h})$ (Abb. 7.3). Integriert über die Prozesszeit wurde ein Wert von $0,13 \text{ mmol}/(\text{g} \cdot \text{h})$ erreicht. Die Produktivität betrug während der Produktionsphase 4 bis 5 $\text{mmol}/(\text{l} \cdot \text{h})$. Die integrale Raum-Zeit-Ausbeute betrug am Ende der Fermentation $2,8 \text{ mmol}/(\text{l} \cdot \text{h})$.

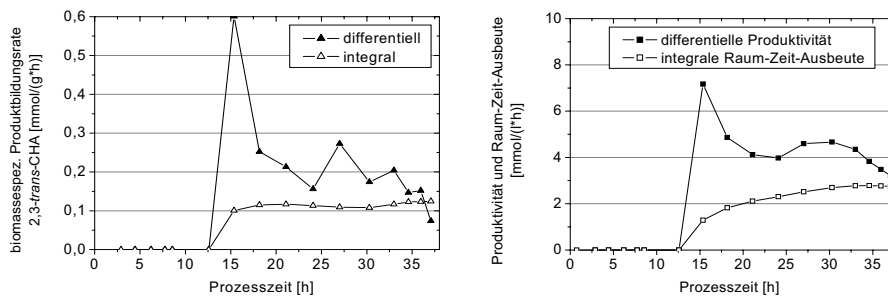


Abb. 7.3: Grafische Darstellung der differentiellen und integralen biomassespezifischen Produktbildungsrate (links) und der Raum-Zeit-Ausbeute (rechts) (300 Liter; *E. coli* KB532pC27).

7.2 Diskussion der Arbeiten zum fermentativen Zugang zum 2,3-*trans*-CHA

Der fermentative Zugang zum 2,3-*trans*-CHA wurde von McCormick (McCormick et al. 1962) bis zu einer Konzentration von über 6 g/l beschrieben. Durch die Konstruktion von Stämmen mit der Überexpression der Gene *phzD* und *phzE* wurde im Rahmen des CHORUS-Projektes der Zugang zu 2,3-*trans*-CHA eröffnet. Im Vorfeld der Produktion im 300 Liter-Maßstab wurde der mögliche Produktionsstamm im 2 Liter-Maßstab charakterisiert (Moch 2004). Es zeigte sich, dass mit dem *E. coli*-Produktionsstamm KB532pC27 die höchste Produktivität erzielt werden konnte.

Während der 300 Liter Fed-Batch Fermentation mit dem Stamm KB532pC27 wurden bis zu 38 mmol/l Acetat akkumuliert (Abb. 7.2). Die Ursache für die Akkumulation von Acetat ist auf die nicht ideale Durchmischung des 300 Liter-Bioreaktors zurückzuführen. Eine Limitierung der Sauerstoffkonzentration in dem oberen Bereich des Bioreaktors kann trotz eines pO_2 -Messwertes von 30% nicht ausgeschlossen werden. Das führte sowohl bei der Fermentation von 2,3-*trans*-CHA als auch 2,3-*trans*-CHD zu einer signifikanten Anhäufung der organischen Säure (Abb. 7.4).

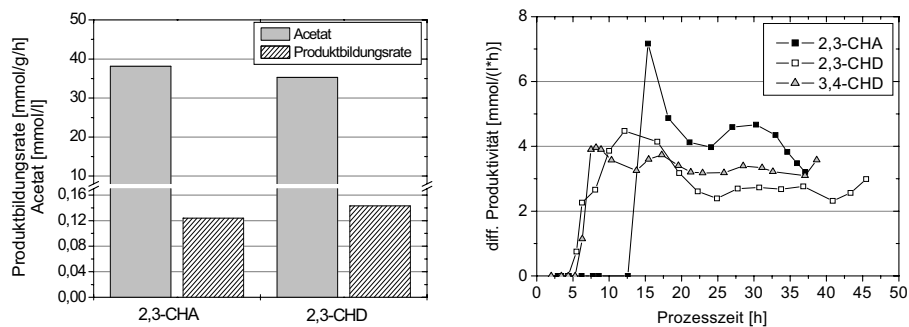


Abb. 7.4: Links: Gegenüberstellung der biomassespezifischen integralen Produktbildungsrate und der maximalen Acetatakkumulation bei der 300 Liter Fed-Batch Fermentation von 2,3-*trans*-CHA und 2,3-*trans*-CHD. Rechts: Darstellung der Produktivität während der Produktion im 300 Liter Maßstab von 2,3-*trans*-CHA, 2,3-*trans*-CHD und 3,4-*trans*-CHD.

Im Vergleich zu der Produktion von 2,3-*trans*-CHD konnte bei der Fermentation der β -Aminosäure eine 13% geringere biomassespezifische Produktbildungsrate erreicht werden (Abb. 7.4). Die Darstellung der differentiellen Werte, zum Beispiel der Produktivität, zeigte, dass bei der Produktion des CHA-Moleküls ein um ca. 10% höherer Wert errechnet werden konnte. Die geringeren integralen Werte können mit einer längeren lag-Phase verbunden mit einer späteren IPTG-Induktion erklärt werden.

8 Ergebnisse und Diskussion der Untersuchung der Reaktivextraktion als Verfahren zur *in situ* Gewinnung von 2,3-*trans*-CHD und 3,4-*trans*-CHD

Der Abschluss eines Fermentationsprozesses liefert eine Biosuspension, bestehend aus dem Produkt, der Biomasse, der Zellmatrix, den Bestandteilen des Mediums und den Nebenprodukten. Die Kosten der Produktaufarbeitung können abhängig von dem Erzeugnis zwischen 20 und 80 Prozent der gesamten Produktionskosten ausmachen. Vorwiegend werden Trennverfahren zur Produktgewinnung eingesetzt, die unabhängig von dem Fermentationsprozess verlaufen.

Die Zielsetzung der Untersuchungen zur integrierten Produktabtrennung von Cyclitolen war der Aufbau einer Plattform zur Gewinnung niedermolekularer Verbindungen aus einem Fermentationsprozess. Im Bereich der Zitronensäureproduktion (Wieczorek et al. 1998a) und bei der Untersuchung der L-Phenylalanin-Produktion (Gerigk et al. 2002b; Maass et al. 2002; Rüffer et al. 2004) konnte eine Optimierung des Prozesses durch den Einsatz der integrierten Produktabtrennung erreicht werden. Bei der integrierten Abtrennung der aromatischen Aminosäure L-Phenylalanin wurde ein Gemisch aus dem Lösungsmittel Kerosin und dem kationenselektiven Lösungsvermittler D₂EHPA als organische Phase eingesetzt. Dieses System könnte zur selektiven Abtrennung von anderen Aminosäuren oder Verbindungen mit einer oder mehreren Amino-Gruppen verwendet werden (z.B. Amino-Cyclitol 2,3-*trans*-CHA). Für die Abtrennung der Cyclitole 2,3-*trans*-CHD und 3,4-*trans*-CHD war dieses Verfahren aufgrund der fehlenden Amino-Gruppe nicht geeignet. Die Cyclitole verfügen über drei funktionelle Gruppen: zwei Hydroxy-Gruppen und eine Carboxyl-Gruppe (Abb. 3.4). Im neutralen und basischen Bereich liegt die Carboxyl-Gruppe deprotoniert vor. Die Ladung des als Anion vorliegenden Cyclitols könnte dabei als Angriffspunkt für den Einsatz der Reaktivextraktion fungieren.

8.1 Voruntersuchungen zur Identifizierung der geeigneten Lösungsmittel- und Akzeptorphase für die Reaktivextraktion von *trans*-CHD

In diesem Kapitel werden die Arbeiten zur Entwicklung eines Verfahrens zur integrierten CHD-Abtrennung mittels anionenselektiver Reaktivextraktion vorgestellt.

Vor dem Einsatz der Reaktivextraktion zur *in situ* Abtrennung der Produkte aus dem Fermentationsprozess waren grundlegende Forschungen im Bereich der Extraktionsfähigkeit von Cyclitolen notwendig. Der Schwerpunkt der Arbeiten wurde auf die Untersuchung des Extraktionssystems und die technische Umsetzbarkeit gelegt. Das Extraktionssystem sollte aus Phasen bestehen, die eine optimale Phasentrennung ermöglichen und ein hohes Lösungsvermögen für die Produkte besitzen. Aufgrund der hohen Löslichkeit der Cyclitole in der wässrigen Phase wurden nur organische Lösungsmittel mit schwach hydrophoben Eigenschaften, aber einer ausreichenden Phasentrennung untersucht. Die für die Reaktivextraktion von Cyclitolen geeigneten Lösungsmittelsysteme wurden anschließend auf die Biokompatibilität analysiert.

8.1.1 Untersuchung der Lösungsmittelphase

Die ersten Untersuchungen im Schütteltrichter-Maßstab beschäftigten sich mit der Auswahl des optimalen Extraktionssystems für die Abtrennung der Cyclitole. Die Schütteltrichter-Experimente wurden mit 10 ml einer 3,4-*trans*-CHD-Lösung (65 mmol/l) und 10 ml einer organischen Phase, bestehend aus dem Lösungsmittel und dem Lösungsvermittler (20 % w/w), begonnen (Schobert 2004). Nach 30 Minuten wurden die beiden Phasen voneinander getrennt. Die organische Phase wurde anschließend mit 10 ml der Akzeptorphase (5%-ige NaCl-Lösung) versetzt. Für die Bestimmung der Extraktionsrate wurde die 3,4-*trans*-CHD-Konzentration in der Donor- und Akzeptorphase ermittelt.

Es wurden die lipophilen Gegenionen Trioctylmethylammoniumchlorid (TOMAC), Tri-n-Oktyl-Phosphinoxid (TOPO) und Tri-n-Oktylamin (TOA) in Verbindung mit dem Lösungsmittel Oktanol untersucht (Schobert 2004). Es konnte gezeigt werden, dass mit dem System, bestehend aus dem lipophilen Gegenion TOMAC und dem Lösungsmittel Oktanol eine bis zu fünffach höhere Extraktionsrate von 3,4-*trans*-CHD erreicht werden konnte (Abb. 8.1).

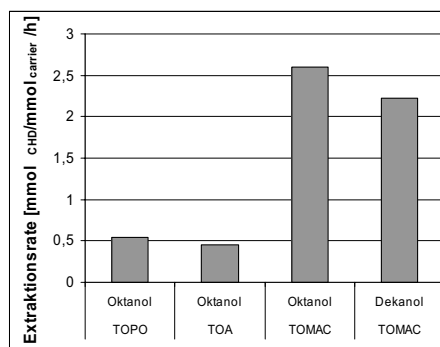


Abb. 8.1: Vergleich der integralen Extraktionsraten von 3,4-*trans*-CHD bei off-line Reaktivextraktionsexperimenten im Schütteltrichter-Maßstab mit den Lösungsmitteln Oktanol und Dekanol und den lipophilen Gegenionen Tri-n-Oktyl-Phosphinoxid (TOPO), Tri-n-Oktylamin (TOA) und Trioctylmethylammoniumchlorid (TOMAC). Als Akzeptorphase wurde Kochsalzlösung eingesetzt.

8.1.2 Untersuchung der Akzeptorphase

Für die Reaktivextraktion der Cyclitole aus dem Fermentationsüberstand ist es notwendig, geeignete Gegenanionen einzusetzen (Abb. 3.7). Aufgrund der Instabilität der Produkte bei pH-Werten unter 3 und über 11 war es nicht möglich, eine basische Akzeptorphase mit einem Überschuss an OH⁻-Anionen einzusetzen (Kap. 3.1.6). Deswegen wurde als Akzeptorphase eine Kochsalzlösung eingesetzt. Die Verwendung einer zu hohen Salzkonzentration in der Akzeptorphase könnte jedoch zu einer Korrosion der Produktionsanlage führen. Deshalb sollte die minimale NaCl-Konzentration, mit der noch ein geeigneter Extraktionsgrad erzielt werden kann, experimentell bestimmt werden.

Die Untersuchung der Akzeptorphase wurde im Schütteltrichtermaßstab durchgeführt. Dabei wurden unterschiedliche Kochsalzkonzentrationen für die Bestimmung des Extraktions-

grades eingesetzt (Abb. 8.2). Als Donorphase wurden 10 ml einer Modelllösung mit ca. 10 g/l 3,4-*trans*-CHD, gelöst in VE-Wasser, verwendet. Als Lösungsmittelphase wurde ein Gemisch, bestehend aus Oktanol und TOMAC, eingesetzt. Die beiden Phasen wurden zwei Minuten miteinander vermischt und nach einer 30-minütigen Ruhephase erfolgte die Trennung der beiden Phasen. Die mit 3,4-*trans*-CHD beladene Lösungsmittelphase wurde mit Akzeptorphasen mit einer 0%-igen, 1%-igen, 10%-igen und 36%-igen Kochsalzlösung versetzt. Auch diese beiden Phasen wurden miteinander vermischt. Der Extraktionsgrad wurde anhand der 3,4-*trans*-CHD-Konzentrationsdifferenz zwischen der Donor- und der Akzeptorphase bestimmt.

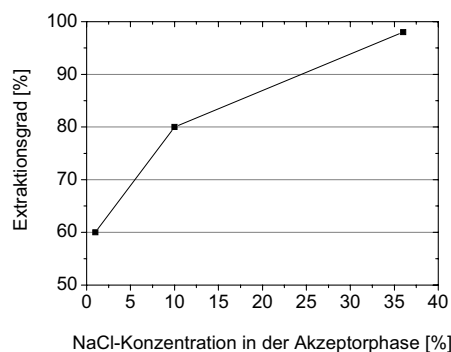


Abb. 8.2: Abhängigkeit des 3,4-*trans*-CHD-Extraktionsgrades von der NaCl-Konzentration in der Akzeptorphase (Schobert 2004).

Bei dem Schütteltrichterexperiment wurde beim Einsatz einer gesättigten Kochsalzlösung (36%) als Akzeptorphase der höchste Extraktionsgrad von über 98% erzielt. Eine Reduktion der Salzkonzentration auf 10% führte zu einem Abfall des Wertes auf 80%. Bei einer Akzeptorphase aus 1% NaCl wurde ein Extraktionsgrad von 60% erreicht.

8.1.3 Analyse der Biokompatibilität der eingesetzten Lösungsmittelphasen

Für die Untersuchung der Biokompatibilität wurden Schüttelkolben-Experimente mit dem 3,4-*trans*-CHD-Produzenten F82pC22 durchgeführt. Der Stamm *E. coli* F82pC22 wurde in einem Erlenmeyerkolben mit 100 ml LB-Medium (Kap. 12.1.5) bis zur optischen Dichte von ca. 1 kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen mit 100 μ M IPTG induziert. Bei einer optischen Dichte von ca. 3 wurden der Flüssigkultur ca. 100 μ l der Lösungsmittelphase, bestehend aus Oktanol oder Dekanol bzw. aus dem Gemisch aus Oktanol/TOMAC oder Dekanol/TOMAC, zugeführt. Die optische Dichte wurde 1,5 Stunden nach Zugabe der Lösungsmittelphase erneut gemessen.

Durch die Zuführung der Lösungsmittelphasen wurde eine Verlangsamung der Wachstumsrate festgestellt. Im Vergleich zu der Kontrolle ohne Zugabe der Lösungsmittelphase wurde durch den Einsatz von Oktanol eine stärkere Inhibierung des Zellwachstums als mit Dekanol festgestellt. Des Weiteren wurde durch die Zugabe des Gemisches, bestehend aus dem Lösungsmittel Dekanol und dem lipophilen Gegenion

TOMAC, das Wachstum der Zellen schwächer reduziert als mit dem Gemisch, bestehend aus Oktanol und TOMAC.

8.2 Untersuchungen zur off-line Reaktivextraktion

Bei allen off-line Reaktivextraktionsexperimenten wurde als Donorphase der Überstand einer 2,3-*trans*-CHD- oder 3,4-*trans*-CHD-Fermentation eingesetzt (Kap. 5 und 6). Dabei wurde die Fermentationsbrühe mittels eines Mikrofiltrationsmoduls mit einer Porenausschlussgrösse von 500 kDa von der Biomasse getrennt (Kap. 4.3.5). Anschließend wurde der biomassefreie Fermentationsüberstand mittels fünf Membrankassetten (MWCO) mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa von den Proteinen befreit (Kap. 4.3.5). Die Wirkungsweise beider Filtrationsschritte entspricht dem Cross-Flow-Prinzip. Die Abtrennung der Proteine aus dem Fermentationsüberstand sollte eine Proteinausfällung in der ersten Zentrifuge verhindern (Rüffer 2004). Im Rahmen der Diplomarbeit von Schobert (Schobert 2004) wurde bei der off-line Reaktivextraktion des 3,4-*trans*-CHD-Fermentationsüberstandes ohne Proteinabtrennung eine Feststoffablagerung festgestellt. Bei allen weiteren Reaktivextraktionsexperimenten wurde deshalb eine Proteinabtrennung durchgeführt. Die so behandelte Donorphase beinhaltete Medienbestandteile, Produkte, Nebenprodukte, Substrate, Proteinbruchstücke und Peptide.

8.2.1 Off-line Reaktivextraktion von 3,4-*trans*-CHD

Die 3,4-*trans*-CHD-Konzentration in den Fermentationsüberständen, die für die off-line Reaktivextraktionsexperimente eingesetzt wurden, lag im Bereich zwischen 95 und 105 mmol/l. In der Abbildung 8.3 sind die Konzentrationsverläufe der Donor- und der Akzeptorphase eines Reaktivextraktionsexperimentes dargestellt. Die Lösungsmittelphase bestand aus dem Lösungsmittel 1-Oktanol und 20% (w/w) des lipophilen Gegenions TOMAC. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass bei Experimenten mit dem Gemisch aus Oktanol und TOMAC die höchsten Extraktionsraten erreicht werden konnten (Abb. 8.1). Als Akzeptorphase wurde eine 5 %-ige Kochsalzlösung eingesetzt. Die Volumenströme der Donor- und der Akzeptorphase betrugen jeweils 2 l/h. Der Volumenstrom der Lösungsmittelphase wurde mit 1,5 l/h gewählt. Für das Experiment wurden 0,8 Liter des proteinfreien Fermentationsüberstandes sowie 0,4 Liter der Akzeptor- und 0,5 Liter der Lösungsmittelphase eingesetzt.

In den ersten 30 Minuten des Reaktivextraktionsexperimentes wurde eine signifikante Abnahme der 3,4-*trans*-CHD-Produktkonzentration unter 90 mmol/l in der Donorphase beobachtet (Abb. 8.3). Die 3,4-*trans*-CHD-Konzentration nahm in den folgenden vier Stunden auf 60 mmol/l ab. In der Akzeptorphase wurde das Produkt von Beginn an angereichert. Am Ende des Experimentes betrug die 3,4-*trans*-CHD-Konzentration 78 mmol/l. Zum Zeitpunkt des Experiments war die Analyse der Produktkonzentration in der Lösungsmittelphase noch nicht etabliert. Aufgrund dessen wurde die Massenbilanz, basierend auf der absoluten 3,4-*trans*-CHD-Menge in der Donor- und der Akzeptorphase berechnet. Die Massenbilanz blieb über die Zeit konstant bei einem Wert von 80 mmol.

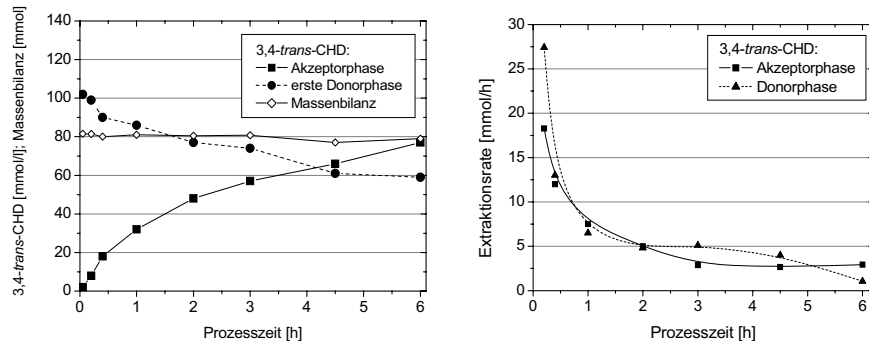


Abb. 8.3: Grafische Darstellung eines der off-line 3,4-*trans*-CHD Reaktivextraktionsexperimente (Schobert 2004). Links: Auftragung der Massenbilanz und der 3,4-*trans*-CHD-Konzentrationen in der Akzeptorphase und der Donorphase. Rechts: Grafische Darstellung der Verläufe der 3,4-*trans*-CHD-Extraktionsraten der Donor- und Akzeptorphase.

Die Extraktionsrate nahm innerhalb der ersten 20 Minuten des Experimentes deutlich ab (Abb. 8.3). Die Verläufe der Extraktionsrate aus der Donorphase und in die Akzeptorphase waren annähernd gleich und sank gleichzeitig mit der abnehmenden CHD-Konzentration in der Donorphase. Die Extraktionsrate aus der Donorphase nahm nach 20 Minuten von einem maximalen Wert von ca. 27,4 mmol/h auf 13 mmol/h und nach drei Stunden auf 5,1 mmol/h ab. In den nächsten drei Stunden des Experimentes wurde ein Wert von minimal 1,1 mmol/h ermittelt. Integriert über die sechs Stunden Versuchszeit wurde ein Wert von 5,7 mmol/h erreicht. Der maximale Wert der Extraktionsrate aus der Lösungsmittelphase in die Akzeptorphase war mit 18,3 mmol/h deutlich geringer als der Übergang aus der Donorphase in die Lösungsmittelphase. Die Differenz kann durch den Einsatz neuer CHD-freier Lösungsmittelphase erklärt werden. Die Akzeptorphase musste zuerst mit dem Produkt 3,4-*trans*-CHD angereichert werden. Aufgrund dessen war der Übergang des Produktes aus der Lösungsmittelphase in die Akzeptorphase zeitlich verzögert. Im weiteren Verlauf des Experimentes nahm die Extraktionsrate auf 5 mmol/h nach zwei Stunden und auf 2,9 mmol/h bis zum Ende des Versuchs ab. Integriert über die Versuchszeit, wurde eine Extraktionsrate von 5,3 mmol/h ermittelt.

8.2.2 Off-line Reaktivextraktion von 2,3-*trans*-CHD

Bei den Experimenten zur off-line Reaktivextraktion von 2,3-*trans*-CHD wurde als Donorphase ein biomasse- und proteinfreier Fermentationsüberstand mit einer Produktkonzentration im Bereich zwischen 90 und 95 mmol/l eingesetzt. Die Akzeptorphase bestand aus einer 5%-igen Kochsalzlösung. Bei einem der Experimente wurde nach einer Prozesszeit von mehr als vier Stunden die bis auf 27 mmol/l abgereicherte Donorphase gegen eine neue Donorphase ausgetauscht (Abb. 8.3)(Schobert 2004). Der Volumenstrom der Donorphase betrug 3 l/h. Die Lösungsmittelphase wurde mit einer Geschwindigkeit von 1,5 l/h gefördert. Der Volumenstrom der Lösungsmittelphase betrug 2 l/h. Das Experiment wurde mit 0,8 Liter des proteinfreien Fermentationsüberstandes begonnen. Nach über vier

Stunden wurden erneut 0,8 Liter der neuen Donorphase eingesetzt. Das Volumen der Akzeptorphase betrug 0,4 Liter und der organischen Phase 0,5 Liter.

Zu Beginn des Experimentes wurden in den ersten 10 Minuten bis zu 13,6% (12,6 mmol/l) des Produktes 2,3-*trans*-CHD aus der Donorphase extrahiert (Abb. 8.4). Die Produktkonzentration nahm kontinuierlich bis zur Prozessstunde 4,2 auf 27 mmol/l ab. Die Anreicherung der Akzeptorphase verlief konstant bis zu einer Konzentration von 100 mmol/l. Die Messung der 2,3-*trans*-CHD-Konzentration in der Lösungsmittelphase ergab einen Anstieg in den ersten 10 Minuten auf über 27 mmol/l. Die Produktkonzentration sank im weiteren Verlauf des Experimentes unter 20 mmol/l. Die Massenbilanz lag im Bereich von 92 bis 108%.

Nach 4,2 Stunden wurde die abgereicherte Donorphase durch einen neuen biomasse- und proteinfreien Fermentationsüberstand ersetzt. Die Akzeptorphase konnte im weiteren Verlauf des Experimentes bis auf über 135 mmol/l 2,3-*trans*-CHD angereichert werden. Gleichzeitig wurde die neue Donorphase auf unter 35 mmol/l abgereichert. Die Produktkonzentration in der organischen Phase stieg nach dem Wechsel der Donorphase auf 27 mmol/l.

Der Verlauf der Extraktionsraten des Produktes 2,3-*trans*-CHD ist in der Abbildung 8.5 dargestellt. Die maximale Extraktionsrate wurde in den ersten 10 Minuten erreicht. Der maximale Wert lag bei dem Übergang aus der Donorphase in die Lösungsmittelphase bei 60,6 mmol/h. Gleichzeitig wurde ein Nettofluss in die organische Phase von 54,7 mmol/h bestimmt. Die Extraktionsrate aus der Lösungsmittelphase in die Akzeptorphase betrug nach 5 Minuten 19,9 mmol/h. Sie stieg in den folgenden Minuten auf 38 mmol/h und fiel in der Folgezeit auf 9,4 mmol/h. Nach über vier Stunden betrug der Wert ca. 5,4 mmol/h. Integriert über die 4,1 Stunden Versuchszeit bis zum Austausch der Donorphase wurde ein Wert von 19,3 mmol/h erreicht. Die Extraktionsrate aus der Donor- in die Lösungsmittelphase fiel von dem maximalen Wert um 60,6 auf 12,2 mmol/h ab. Bis zur Prozessstunde 4,2 blieb dieser Wert knapp über 10 mmol/h. Der Nettofluss in die organische Phase nahm innerhalb von 10 Minuten von 54,7 auf unter 0 mmol/h ab. Ein negativer Nettofluss in der Lösungsmittelphase bedeutet, dass der Übergang des Produktes aus der Lösungsmittel- in die Akzeptorphase höher ist, als der Fluss aus der Donor- in die organische Phase. Der Nettofluss fiel nach 15 Minuten auf -7,8 mmol/h. Im weiteren Verlauf der Reaktivextraktion stieg der Wert auf 2,5 mmol/h.

Nach einer Prozesszeit von 4,2 Stunden wurde die Donorphase gegen einen neuen mit ca. 90 mmol/l 2,3-*trans*-CHD angereicherten Fermentationsüberstand ausgetauscht (Abb. 8.4 und 8.5). Die Extraktionsrate aus der Donorphase in die organische Phase stieg auf 24,6 mmol/h. Die Extraktionsrate in die Akzeptorphase stieg von 5,4 auf 12 mmol/h. Der Nettofluss in die Lösungsmittelphase fiel kurz nach dem Wechsel der Donorphase auf -10 mmol/h. Im weiteren Verlauf des Experiments stabilisierte sich der Wert im Bereich um 0 mmol/h.

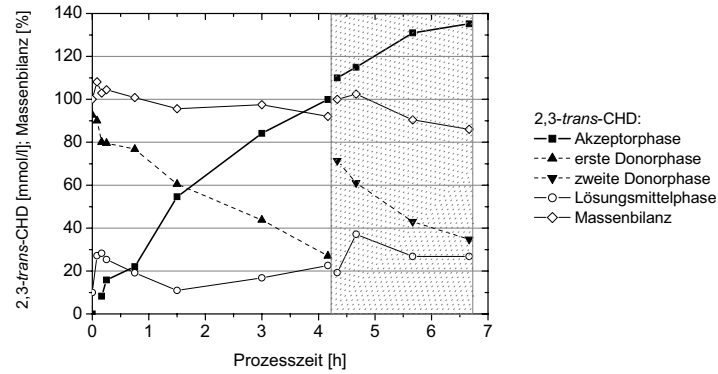


Abb. 8.4: Grafische Darstellung des off-line 2,3-trans-CHD Reaktivextraktionsexperimentes. Aufgetragen sind die Massenbilanz und die Verläufe der 2,3-trans-CHD-Konzentration der Akzeptorphase, der Donorphase und der Lösungsmittelphase. Die erste abgereicherte Donorphase wurde nach über vier Stunden gegen eine neue Donorphase ausgetauscht (markiert).

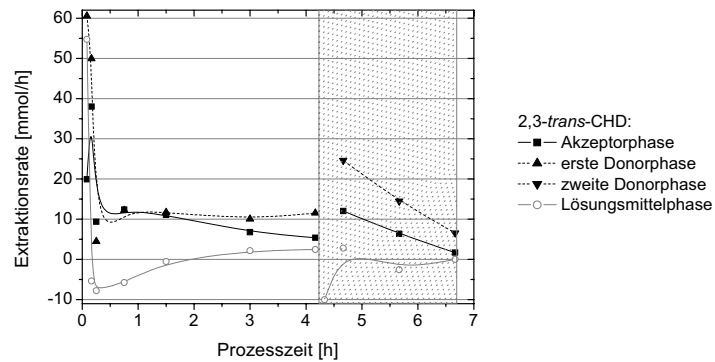


Abb. 8.5: Verlauf der 2,3-trans-CHD-Extraktionsraten der Donor-, Lösungsmittel- und Akzeptorphase bei einem off-line Reaktivextraktionsexperiment. Die erste abgereicherte Donorphase wurde nach über vier Stunden gegen eine neue Donorphase ausgetauscht (markiert).

8.3 Untersuchungen zur *in situ* Reaktivextraktion

Die Ergebnisse der off-line Experimente zur Reaktivextraktion der beiden Cyclitole aus dem Kapitel 8.2 und der Diplomarbeit von Schobert (Schobert 2004) wurden als Basis für die Entwicklung integrierter Aufbereitungsverfahren verwendet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in diesem Kapitel dargestellt.

8.3.1 *In situ* Reaktivextraktion von 2,3-*trans*-CHD

Entwicklung des Verfahrens zur in situ-Gewinnung von 2,3-trans-CHD

Die Basis für das Hybridverfahren mit der integrierten Reaktivextraktion von 2,3-*trans*-CHD war eine Fed-Batch Fermentation mit dem Stamm F111pC20 (Tab. 4.1). Alle Fermentationen zur *in situ* Aufarbeitung wurden nach Vorgaben aus dem Kapitel 4.3.2 durchgeführt. Der Aufbau und das Prinzip der integrierten Produktabtrennung sind im Kapitel 4.3.5 beschrieben. Der schematische Aufbau der Reaktivextraktionsanlage kann der Abbildung 4.10 entnommen werden.

Im Rahmen der ersten *in situ* Experimente sollte die technische Realisierbarkeit des komplexen Verfahrens gezeigt werden. Bei der Fermentation wurden Maßnahmen zur Minimierung der Kontaminationsgefahr überprüft (Kap. 4.3.5). Weiterhin wurde die kontinuierliche Bereitstellung des Permeats optimiert. Diese Maßnahmen sollten die Langzeitstabilität des Extraktionssystems während der *in situ* Produktaufarbeitung erhöhen. Ferner sollten die Langzeitversuche den Einfluss der on-line Reaktivextraktion auf die Produktbildung und die Aktivität der Biomasse zeigen.

Das Experiment wurde mit einem Batch-Prozess mit einem Startvolumen von 22 Litern gestartet. Nach einer Prozesszeit von ca. 5 Stunden wurde mit dem Glukosezulauf der Fed-Batch-Prozess begonnen. Die Wachstumsphase endete nach einer Prozesszeit von 17 Stunden. Die Induktion der Produktbildung begann nach 5,2 Stunden. Der Verlauf der Produktkonzentration ist in der Abbildung 8.6 dargestellt.

Nach der Induktion der Produktbildung stieg die 2,3-*trans*-CHD-Konzentration in der Fermentationsbrühe bis auf 120,8 mmol/l (18,8 g/l) (Abb. 8.6). Nach einer Prozesszeit von 27,5 wurde mit der Ultrafiltration der Fermentationsbrühe begonnen. Da die Leistung der Ultrafiltrationsmodule im Laufe des Experimentes abnahm, wurden nach einer Laufzeit von ca. 10 Stunden die 10 kDa Ultrafiltrationskassetten gegen regenerierte Kassetten ausgetauscht. Anschließend wurden höhere Filtrationsraten bestimmt. Das Ultrafiltrationssystem lieferte einen biomasse- und proteinfreien Fermentationsüberstand, der für den Start der Reaktivextraktion eingesetzt wurde. Vergleichbar zu den off-line Reaktivextraktionsexperimenten (Kap. 8.1) wurde für die Donor- und die Akzeptorphase ein Volumenstrom von 2 l/h gewählt. Der Volumenstrom der Lösungsmittelphase wurde mit 1,5 l/h eingestellt. Die Frequenz der Flüssig-Flüssig-Extraktoren betrug 50 Hz. Das Volumen der eingesetzten organischen Phase betrug 3 Liter. Sie bestand aus einem Gemisch aus 1-Oktanol und 30% TOMAC. Die Akzeptorphase, bestehend aus einer 5%-igen NaCl-Lösung, hatte ein Volumen von 5 Litern. Um dauerhaft eine konstante Extraktionsrate zu erreichen, musste am Anfang ein stabiles Extraktionssystem hergestellt werden. Nachdem die Phasentrennung dauerhaft etabliert wurde (Prozesszeit 28 Stunden), wurde das *in situ* Reaktivextraktionsexperiment gestartet. Der Rückfluss des abgereicherten Permeats in den Bioreaktor erfolgte ohne Aktivkohle-Filtration zur Abtrennung der organischen Phase. Der Volumenstrom betrug 2 l/h.

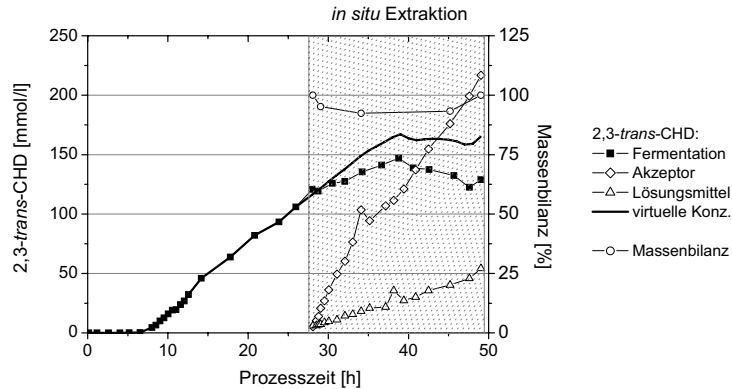


Abb. 8.6: Grafische Darstellung der Konzentrationsverläufe während einer Fed-Batch Fermentation und der *in situ* Reaktivextraktion von 2,3-*trans*-CHD (42 Liter Fed-Batch Fermentation; *E. coli* F111pC20). Der virtuelle Verlauf der Gesamtproduktkonzentration ist eine Summe der Konzentrationen der Fermentationsbrühe, der Lösungsmittelphase und der Akzeptorphase. Die Lösungsmittelphase bestand aus Oktanol und 30% TOMAC. Als Akzeptorphase wurde eine 5%-ige Kochsalzlösung eingesetzt.

Zu Beginn der *in situ* Reaktivextraktion (Prozesszeit 28 bis 38,3 Stunden) stieg die Produktkonzentration in der Fermentationsbrühe von 120,8 auf 147 mmol/l (Abb. 8.6). Bis zum Ende der integrierten Produktgewinnung nach 48 Stunden fiel die 2,3-*trans*-CHD-Konzentration in dem Bioreaktor auf 122,5 mmol/l. Nach dem Abschluss des Reaktivextraktionsexperimentes (Prozessstunde 47,6) stieg die Produktkonzentration in der Fermentationsbrühe auf 128,9 mmol/l. Der virtuelle Verlauf der 2,3-*trans*-CHD-Konzentration entsprach bis zum Start der integrierten Produktgewinnung der Konzentration im Bioreaktor (Abb. 8.6). Mit dem Beginn der *in situ* Reaktivextraktion stieg die virtuelle Konzentration als Bilanz der Konzentrationen in der Fermentationsbrühe sowie der Akzeptor- und der Lösungsmittelphase bis zur Prozessstunde 39 auf einen Wert von 167,2 mmol/l. Bis zum Ende des Extraktionsexperiments blieb die virtuelle Konzentration auf einem konstanten Niveau zwischen 159 und 163,7 mmol/l. Am Ende des Experimentes wurde eine virtuelle Produktkonzentration von 165,1 mmol/l ermittelt.

Mit dem Beginn der *in situ* Produktgewinnung nach 28 Stunden begann die Anreicherung der Akzeptorphase (Abb. 8.6). In den ersten 5 Stunden der Reaktivextraktion stieg die 2,3-*trans*-CHD-Konzentration in der Akzeptorphase bis auf 76,5 mmol/l. In dieser Phase wurde das Extraktionssystem instabil, was zu einer nicht optimalen Phasentrennung geführt hatte. Ein Teil der organischen Phase (ca. 30 ml) gelangte in den Permeatlauf. Die kontinuierliche Versorgung mit dem biomasse- und proteinfreien Fermentationsüberstand und der Permeat-Rückfluss in den Bioreaktor wurden für ca. 30 Minuten unterbrochen. Die mit der Lösungsmittelphase kontaminierte, abgereicherte Permeatlösung (0,5 l) wurde entsorgt. Eine Kontamination der Fermentationsbrühe mit der organischen Phase kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Wie zu Beginn des Experimentes wurde erneut ein stabiles Extraktionssystem mit einer optimalen Phasentrennung hergestellt. Anschließend wurde der Kreislauf zwischen dem Bioreaktor und der Extraktionsanlage erneut begonnen. Die *in situ* Reaktivextraktion wurde fortgesetzt. Ab der Prozessstunde 33 stieg die

Produktkonzentration in der Akzeptorphase bis zum Ende der Extraktion auf 216,8 mmol/l (33,8 g/l). Die Messung der 2,3-*trans*-CHD-Konzentration in der Lösungsmittelphase stieg im Laufe der Reaktivextraktion auf einen maximalen Wert von 54,3 mmol/l (Abb. 8.6).

Biomassebildung und Zellaktivität

Nach einer lag-Phase von ca. zwei bis drei Stunden begann die Wachstumsphase. Diese Phase wurde durch die Reduktion des Aminosäurenzulaufs nach 14,2 Stunden bei einer Biomassekonzentration von 23,6 g/l unterbrochen (Abb. 8.7). Im weiteren Verlauf der Fed-Batch Fermentation stieg die Biomassekonzentration bis zur Prozessstunde 28 auf 34,4 g/l. Anschließend wurde die *in situ* Reaktivextraktion gestartet. Die Biomassekonzentration blieb im Verlauf des Experimentes auf einem konstanten Niveau von 30 bis 34 g/l. Am Ende der Fed-Batch Fermentation wurde eine Biomassekonzentration von 30,9 g/l gemessen.

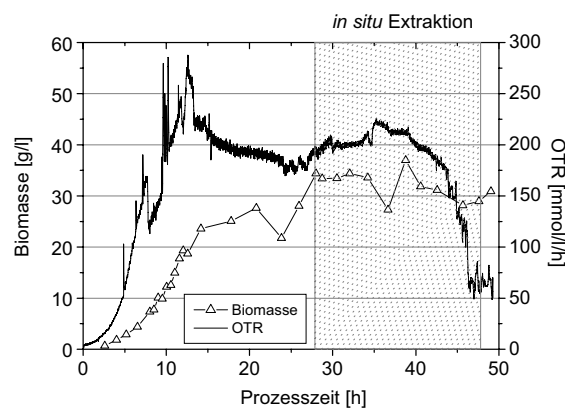


Abb. 8.7: Verlauf der Biomassekonzentration und der Sauerstofftransferate (OTR) während der Fed-Batch Fermentation und der *in situ* Reaktivextraktion von 2,3-*trans*-CHD.

In der Abbildung 8.7 ist neben dem Verlauf der Biomassekonzentration die Sauerstofftransferate (OTR) dargestellt. Nach dem Beimpfen lag der Sauerstofftransfer im Bereich von 3 bis 10 mmol/(l*h) (lag-Phase). Der OTR-Wert stieg während der Wachstumsphase auf maximal 220 bis 260 mmol/(l*h). In der Folgezeit fiel die Sauerstofftransferate auf Werte zwischen 180 und 200 mmol/(l*h). Zu Beginn der *in situ* Reaktivextraktion betrug die Sauerstofftransferate 200 mmol/(l*h). Im Verlauf der on-line Produktseparation stieg der OTR-Wert auf 222 mmol/(l*h) nach einer Prozesszeit von ca. 35 Stunden. Während der weiteren neun Stunden sank der Sauerstoffbedarf auf ca. 180 mmol/(l*h). In der Folgezeit fiel die Sauerstofftransferate innerhalb von zwei Stunden auf 60 bis 70 mmol/(l*h). Der OTR-Wert blieb bis zum Ende des Experiments auf diesem Niveau.

Raum-Zeit-Ausbeute und Extraktionsrate

Nach der Induktion der Produktbildung in der Prozessstunde 6 stieg die Produktivität der Fed-Batch Fermentation auf einen Wert von 8,6 mmol/(l*h) (Abb. 8.8). Nach der Wachstumsphase (Prozessstunde 14) lag die Produktivität zwischen 5,4 und 6,4 mmol/(l*h). Zu Beginn der *in situ* Reaktivextraktion stieg der Wert auf 6,6 mmol/(l*h). Ab der Prozessstunde 37, ca. neun Stunden nach dem Beginn der *in situ* Reaktivextraktion, fiel die Produktivität auf unter 4 mmol/(l*h). Im weiteren Verlauf des Experimentes wurde ein Wert zwischen 0 und 2 mmol/(l*h) bestimmt. Nach dem Ende des Reaktivextraktionsexperimentes stieg die Produktivität auf bis zu 7,2 mmol/(l*h).

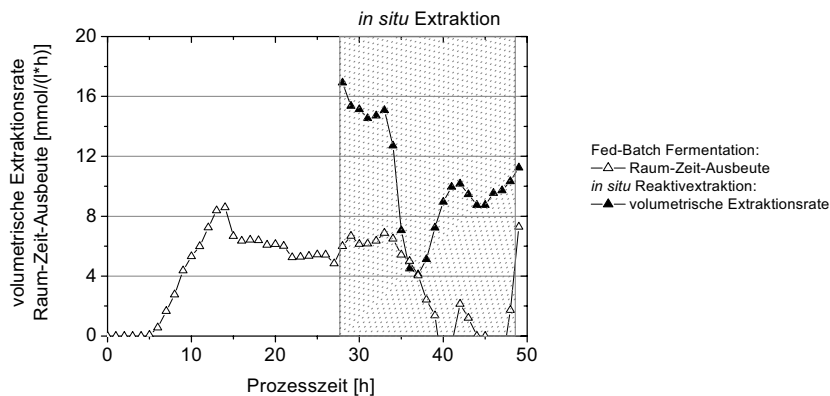


Abb. 8.8: Verlauf der Produktivität von 2,3-*trans*-CHD während der *in situ* Produktgewinnung sowie Verlauf der volumetrischen Extraktionsrate.

Bezogen auf das Volumen der Akzeptorphase von 5 Liter wurde in der ersten Phase des on-line Reaktivextraktionsexperimentes eine differentielle Extraktionsrate von 16,9 mmol/(l*h) ermittelt (Abb. 8.8). Damit lag dieser Wert ungefähr zweifach höher als der maximale Wert der Produktivität der Fermentation. In den ersten fünf bis sechs Stunden des Extraktionsversuchs blieb der Wert im Bereich von 15-16 mmol/(l*h). In dieser Phase war das Extraktionssystem stabil. Anschließend wurde die Phasentrennung gestört. Die *in situ* Reaktivextraktion musste unterbrochen werden. Die Extraktionsrate fiel auf ca. 4 mmol/(l*h). Nach dem erneuten Start der on-line Extraktion stieg die differentielle Extraktionsrate auf 10,2 mmol/(l*h) nach 42 Stunden. Integriert über die 21 Stunden Versuchszeit wurde ein Wert von 10,3 mmol/h erreicht.

Entsprechend der Darstellung der Produktivität der Fermentation (Abb. 8.8) ist in der Abbildung 8.9 der Verlauf der biomassespezifischen Produktbildungsrate dargestellt. Nach der Induktion der Produktbildung durch die Zugabe von IPTG stieg die Produktbildungsrate nach 10 Stunden bis auf 0,53 mmol/(g*h). Beim Start der *in situ* Produktaufarbeitung lag die Rate bei ca. 0,2 mmol/(g*h). Mit dem Beginn der integrierten Reaktivextraktion blieb in den folgenden sechs Stunden die spezifische Produktbildung im Bereich von 0,2 mmol/(g*h). In

der darauf folgenden Zeit fiel der Wert auf unter $0,08 \text{ mmol}/(\text{g}\cdot\text{h})$. Nach dem Ende des *in situ* Extraktionsexperimentes stieg die biomasse-spezifische Produktbildungsrate auf bis zu $0,26 \text{ mmol}/(\text{g}\cdot\text{h})$.

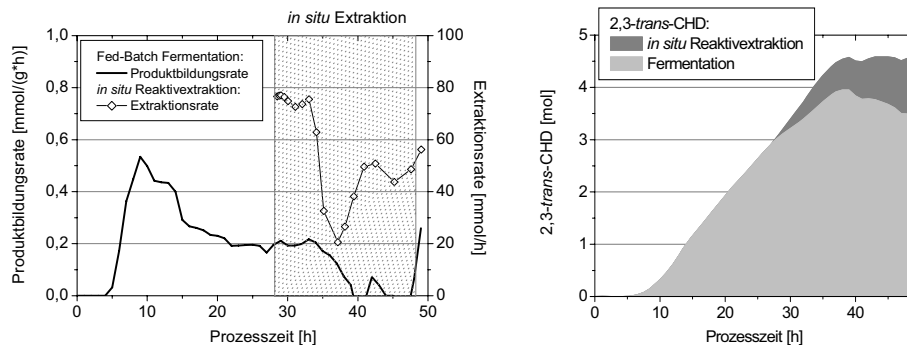


Abb. 8.9: Links: Verläufe der biomassespezifischen Produktbildungsrate während der 2,3-*trans*-CHD-Fermentation und der *in situ* Produktabtrennung sowie Verlauf der Extraktionsrate. Rechts: Grafische Darstellung der 2,3-*trans*-CHD-Gesamtmenge.

In der Abbildung 8.9 ist der Verlauf der Extraktionsrate dargestellt. Nach dem Start des *in situ* Reaktivextraktionsexperimentes wurde eine Extraktionsrate von $76,6 \text{ mmol}/\text{h}$ ermittelt. Die Extraktionsrate blieb in den ersten sechs Stunden stabil im Bereich von $72,6$ bis $77 \text{ mmol}/\text{h}$. Durch das Anhalten der *in situ* Extraktion in der Prozessstunde 44 fiel der Wert auf $20,6 \text{ mmol}/\text{h}$. Die Wiederaufnahme der on-line Produktgewinnung führte zum Anstieg der Extraktionsrate auf ca. $50 \text{ mmol}/\text{h}$. Am Ende des Experimentes wurde ein Wert von $56,2 \text{ mmol}/\text{h}$ ermittelt. Über die Prozesszeit integriert wurde eine Extraktionsrate von $51,6 \text{ mmol}/\text{h}$ bestimmt.

Im Laufe der Fed-Batch Fermentation wurde bis Prozessstunde 28 eine Gesamtmenge von 3 mol (470 g) 2,3-*trans*-CHD akkumuliert (Abb. 8.9). Mit dem Start der *in situ* Produktseparation wurde ein Teil des Produktes in die Akzeptorphase extrahiert. Am Ende des Experimentes wurden insgesamt $4,8 \text{ mol}$ (743 g) 2,3-*trans*-CHD in bis zu $35,5$ Litern Fermentationsmedium gebildet. Davon wurden in den 5 Litern der Akzeptorphase 24% der erzeugten 2,3-*trans*-CHD-Gesamtmenge separiert.

8.3.2 *In situ* Reaktivextraktion von 3,4-*trans*-CHD

Basierend auf einer Fed-Batch Fermentation mit dem Stamm F82pC22 (Tab. 4.1) wurden Experimente zur *in situ* Reaktivextraktion von 3,4-*trans*-CHD gestartet. Die Beschreibung der Fermentation kann dem Kapitel 4.3.2, der Aufbau der *in situ* Produktseparation dem Kapitel 4.3.5 entnommen werden.

Der Prozess wurde mit 22 Litern Reaktionsvolumen gestartet. Der Fed-Batch Prozess wurde durch den Zulauf der Glukoselösung nach 5 Stunden begonnen. Das Ende der Wachstumsphase erfolgte nach 17 Stunden durch die Reduktion der Aminosäurezulauftrate.

Durch die IPTG-Induktion nach ca. 7 Stunden wurde die Produktbildung gestartet. Der Verlauf der 3,4-*trans*-CHD-Konzentration kann der Abbildung 8.10 entnommen werden.

Bis zur Prozessstunde 36,5 stieg die Produktkonzentration bis auf 131,3 mmol/l (20,5 g/l). Anschließend wurde das Ultrafiltrationssystem gestartet. Die Leistung der Ultrafiltrationsmodule nahm im Laufe des Experimentes ab. Aufgrund dessen wurden nach einer Laufzeit von ca. 10 Stunden die fünf 10 kDa Ultrafiltrationskassetten gegen regenerierte Kassetten ausgetauscht. Dadurch konnte eine signifikante Steigerung der Filtrationsleistung erreicht werden. Nach einer Ultrafiltrationszeit von ca. 30 Minuten wurden 0,5 Liter eines biomasse- und proteinfreien Fermentationsüberstands für den Beginn der Reaktivextraktion eingesetzt. Die Flüssig-Flüssig-Extraktoren wurden bei 50 Hz betrieben. Basierend auf den Erfahrungen der off-line Reaktivextraktionsexperimente (Kap. 8.1) wurde für die Donor- und die Akzeptorphase ein Volumenstrom von 2 l/h gewählt. Der Volumenstrom der organischen Phase betrug 1,5 l/h. Das Volumen der Akzeptorphase (5%ige Kochsalzlösung) betrug 5 Liter. Die Lösungsmittelphase bestand aus einem Gemisch aus 1-Oktanol und 30% TOMAC. Das Volumen der organischen Phase wurde mit 3 Liter gewählt.

Zu Beginn des Reaktivextraktionsexperimentes sollte ein stabiles Extraktionssystem hergestellt werden. Damit sollte eine lange Extraktionsphase gewährleistet werden. Ab der Prozesszeit 40, nachdem das Extraktionssystem stabilisiert wurde, wurde das abgereicherte Permeat mit einer Flussrate von 0,2 l/h über einen Aktivkohlefilter in den Fermenter zurückgeführt. Ab der Prozessstunde 42 wurde die Flussrate über den Aktivkohlefilter auf 2 bis 3 l/h erhöht. In den ersten acht Stunden der integrierten Reaktivextraktion stieg die 3,4-*trans*-CHD-Konzentration in der Fermentationsbrühe von 131,3 auf 150,3 mmol/l (Abb. 8.10). Ab der Prozesszeit 44,4 fiel die Produktkonzentration innerhalb von fast fünf Stunden auf 103,4 mmol/l. Bis zum Ende der Fermentation nach 57,5 Stunden fiel die 3,4-*trans*-CHD-Konzentration auf 94,8 mmol/l.

Mit dem Start der on-line Reaktivextraktion begann die Anreicherung der Akzeptorphase (Abb. 8.10). Innerhalb der ersten fünf Stunden der Reaktivextraktion wurden 64,2 mmol/l 3,4-*trans*-CHD akkumuliert. Der Wert stieg in der Folgezeit auf bis zu 144 mmol/l (22,5 g/l). Die Messung der Produktkonzentration in der Lösungsmittelphase ergab einen Anstieg bis auf 14,4 mmol/l zum Ende des Experimentes. Über die Prozesszeit integriert wurde eine Extraktionsrate von 32,4 mmol/h ermittelt.

Die Bilanzierung der Produktkonzentration, akkumuliert in der Fermentationsbrühe, der Akzeptor- und der organischen Phase, ist in der Abbildung 8.10 dargestellt. Bis zum Start der on-line Reaktivextraktion entsprach die Bilanz dem Verlauf in der Fermentationsbrühe. In den ersten fünf Stunden der integrierten Reaktivextraktion stieg die virtuelle Produktkonzentration auf den maximalen Wert von 166,7 mmol/l (26 g/l). Im weiteren Verlauf des Experimentes fiel die bilanzierte 3,4-*trans*-CHD-Konzentration auf 132,9 mmol/l.

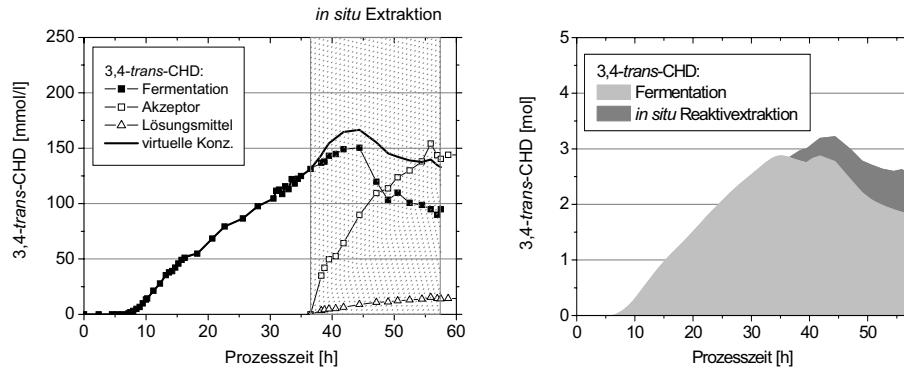


Abb. 8.10: Fed-Batch Fermentation in Verbindung mit der *in situ* Reaktivextraktion des Moleküls 3,4-*trans*-CHD. Links: Darstellung der Konzentrationsverläufe in der Fermentationsbrühe, in der Akzeptorphase und der Lösungsmittelphase. Des Weiteren ist der virtuelle Verlauf der Gesamtproduktkonzentration aus der Fermentationsbrühe, der Lösungsmittelphase und der Akzeptorphase abgebildet. Die Lösungsmittelphase bestand aus Oktanol und 30% TOMAC. Als Akzeptorphase wurde eine 5%ige Kochsalzlösung eingesetzt. Rechts: Grafische Darstellung der 2,3-*trans*-CHD-Gesamtmenge.

Die Fed-Batch Fermentation mit dem Stamm F82pC22 führte bis zur Prozessstunde 35 zur Bildung von 2,9 mol (452 g) 3,4-*trans*-CHD (Abb. 8.10). Mit dem Start der *in situ* Produktseparation wurde ein Teil des Produktes in die Akzeptorphase extrahiert. Zum Abschluss des Experiments wurden insgesamt 2,5 mol (390 g) 3,4-*trans*-CHD gebildet. In den 5 Litern der Akzeptorphase wurden 28% der erzeugten 3,4-*trans*-CHD Gesamtmenge separiert.

8.4 Diskussion zur Entwicklung des Reaktivextraktionsverfahrens zur *in situ* Gewinnung von 2,3-*trans*-CHD und 3,4-*trans*-CHD

Der Beginn der Arbeiten im Bereich der integrierten Aufarbeitung der Cyclitole war durch zwei Fragestellungen motiviert. Einerseits sollte ergänzend zu den Arbeiten über die *in situ* Gewinnung von L-Phenylalanin (Gerigk et al. 2002b; Maass et al. 2002; Rüffer et al. 2004) eine Plattform für die on-line Gewinnung von organischen Säuren oder Hydroxysäuren etabliert werden. Auf der anderen Seite wurde eine prozesstechnische Lösung für das Problem der Glukonsäurebildung gesucht. Im Kapitel 5.2.2 wurde postuliert, dass eine hohe 2,3-*trans*-CHD-Konzentration die Induktion der Glukonsäurebildung verursachte. Das Ziel war nun, die Produktkonzentration während der Fed-Batch Fermentation in einem bestimmten Konzentrationsbereich zu halten.

8.4.1 Grundlagen der Reaktivextraktion von 2,3-*trans*-CHD und 3,4-*trans*-CHD

Auswahl des optimalen Reaktivextraktionssystems und die Untersuchung der Biokompatibilität

Für die Auswahl des optimalen Extraktionssystems für die Abtrennung der Cyclitole wurden die lipophilen Gegenionen TOMAC, TOPO und TOA in Verbindung mit dem Lösungsmittel Oktanol untersucht (Schobert 2004). Es konnte gezeigt werden, dass mit dem TOMAC/Oktanol-System die höchste Extraktionsrate erzielt wurde (Abb. 8.1). Weiterhin wurde das Lösungsmittel Dekanol untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass mit dem Lösungsmittel Oktanol im Vergleich zu Dekanol eine bis zu 20% höhere Extraktionsrate erreicht werden konnte. Diese Eigenschaft wurde auf die höhere Löslichkeit des Produktes in Oktanol zurückgeführt. Dies könnte zur Folge haben, dass umgekehrt das Lösungsmittel eine höhere Löslichkeit in dem Fermentationsüberstand besitzt. Aufgrund dessen bestand die Möglichkeit, dass das Lösungsmittel im Laufe der *in situ* Reaktivextraktion stärker in der Fermentationsbrühe akkumuliert werden könnte. Das könnte zu einer inhibierenden oder toxischen Wirkung des TOMAC/Oktanol-Gemisches auf die Zellen führen. Diese Fragestellung sollte durch die Untersuchung der Biokompatibilität des Extraktionssystems mit dem Stamm F82pC22 überprüft werden (Kap. 8.1.3). Es zeigte sich, dass die Zugabe der Lösungsmittel Dekanol und Oktanol oder des Gemisches, bestehend aus dem Lösungsmittel und den lipophilen Gegenionen TOMAC, eine negative Wirkung auf das Zellwachstum im Schüttelkolben hatte. Am stärksten wurde das Wachstum der Zellen nach der Zugabe der organischen Phase aus Oktanol und TOMAC inhibiert.

Wie im Kapitel 3.3.2.3 beschrieben wurde, kann die Toxizität eines Lösungsmittels anhand der Polarität abgeschätzt werden. Als Richtwert für die Polarität kann der logP-Wert verwendet werden (Gl. 3-3, S. 22). Demnach gelten hydrophobe Lösungsmittel mit einem logP-Wert größer als 1 (z.B. Dodekanol) als weniger toxisch für die Biomasse. Der Nachteil dieser Moleküle liegt aber in der geringeren Sättigungskonzentration für hydrophobe Verbindungen wie CHD oder organische Säuren. Der Einsatz hydrophiler Lösungsmittel (z.B. Hexanol) könnte sich wiederum inhibierend oder toxisch auf die Zellen auswirken. Die Wahl des geeigneten Lösungsmittels für die Reaktivextraktion ist ein Kompromiss aus Sättigungskapazität und Biokompatibilität. Deshalb wurden für die on-line Experimente trotz

der inhibierenden Wirkung auf das Zellwachstum das Extraktionssystem bestehend aus dem Lösungsmittel Oktanol und dem lipophilen Gegenion TOMAC ausgewählt. Die Entscheidung für diese organische Phase wurde aufgrund der höheren Extraktionsrate getroffen, die mit diesem System erzielt wurden. Bei den *in situ* Experimenten könnte als eine Barriere für das TOMAC/Oktanol-Gemisch beim Rückfluss des Raffinats ein Aktivkohlefilter eingesetzt werden (Wieczorek et al. 1998b).

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Effektivität der Reaktivextraktion ist die Konzentration der Gegenionen in der Akzeptorphase. In der Diplomarbeit von Schobert (Schobert 2004) wurden unterschiedliche NaCl-Konzentrationen untersucht. Es zeigte sich, dass mit einer gesättigten Kochsalzlösung der maximale Extraktionsgrad erreicht werden konnte (Abb. 8.2). Der Einsatz einer gesättigten Kochsalzlösung ist aufgrund der hohen Salzfracht für die weitergehenden Aufarbeitungsexperimente jedoch nicht von Vorteil. Auf der anderen Seite konnten bei off-line Experimenten mit weniger als 1% NaCl in der Akzeptorphase nur kurzfristig hohe Extraktionsraten erreicht werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für alle *in situ* Reaktivextraktionsexperimente eine Akzeptorphase mit 5% NaCl verwendet.

Analyse der off-line Reaktivextraktionsexperimente von 2,3- und 3,4-trans-CHD

Im Rahmen der Untersuchungen der off-line Reaktivextraktionen wurde eine Differenz in dem Extraktionsverhalten von 2,3- und 3,4-trans-CHD festgestellt. Bei der gleichen Beschaffenheit der Akzeptorphase (5% NaCl-Lösung) und der organischen Phase (Gemisch aus Oktanol und 20% TOMAC) wurde bei der Reaktivextraktion von 3,4-trans-CHD eine integrale volumetrische Extraktionsrate von 7,1 mmol/(l*h) gemessen. Bei einem Vergleichsexperiment mit 2,3-trans-CHD betrug dieser Wert 24,1 mmol/(l*h). Bei der Gegenüberstellung der differentiellen Extraktionsraten zeigte sich, dass zu Beginn des Experimentes eine höhere Extraktionsrate für 2,3-trans-CHD ermittelt wurde. Nach 30 Minuten wurde eine doppelt so hohe Extraktionsrate erzielt (Abb. 8.11).

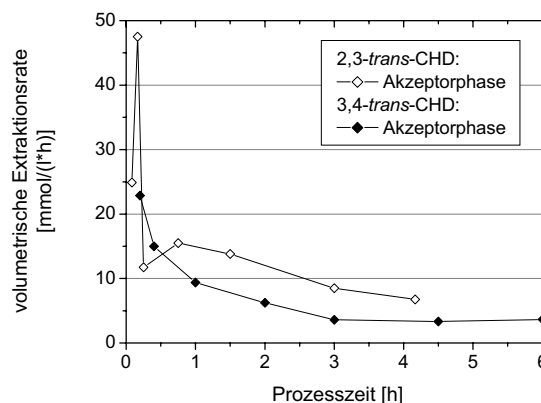


Abb. 8.11: Gegenüberstellung der Extraktionsraten in die Akzeptorphase bei der off-line Reaktivextraktion von 2,3- und 3,4-trans-CHD.

Die Ursache für die deutliche Differenz bei den Extraktionsraten kann auf die Struktur der beiden Produkte zurückgeführt werden. Die beiden Moleküle bestehen aus einem Ring mit zwei Doppelbindungen (Abb. 8.12). Dieser Bereich der Cyclitole besitzt einen hydrophoben Charakter. Weiterhin besitzen beide Moleküle drei hydrophile funktionelle Gruppen. Die Carboxyl-Gruppe ist am ersten Kohlenstoffatom des Ringes verankert. An der Position drei im Ring sitzt die erste Hydroxy-Gruppe. Der Unterschied zwischen den beiden Molekülen liegt an der Position der zweiten Hydroxy-Gruppe. Bei 2,3-*trans*-CHD ist diese Gruppe an der Position zwei und bei 3,4-*trans*-CHD an der Position vier verankert. Aufgrund dieser Verteilung erzeugen die nebeneinander stehenden funktionellen Gruppen bei 2,3-*trans*-CHD einen Bereich mit einem hydrophilen Charakter. Die beiden Hydroxy-Gruppen sowie die Carboxyl-Gruppe wirken anziehend für Wassermoleküle. Diese Struktur vereinfacht die Löslichkeit des Moleküls in der wässrigen Phase und verbessert den Übergang des Moleküls aus der organischen Phase in die Akzeptorphase. Aufgrund dieser Verteilung entsteht auf der gegenüber liegenden Seite des Moleküls ein Bereich mit hydrophobem Charakter. Dieser Teil des Ringes mit den beiden Doppelbindungen besitzt eine höhere Affinität zu organischen Lösungsmitteln wie Oktanol. Aufgrund dessen kann bei 2,3-*trans*-CHD angenommen werden, dass der Widerstand beim Übergang aus der Donor- in die organische Phase gegenüber 3,4-*trans*-CHD geringer ausfällt. Außerdem könnte es bei dem Molekül 2,3-*trans*-CHD bevorzugt zur Ausbildung von Mizellen kommen, die die hydrophile bzw. hydrophobe Ausrichtung des Moleküls verstärken.

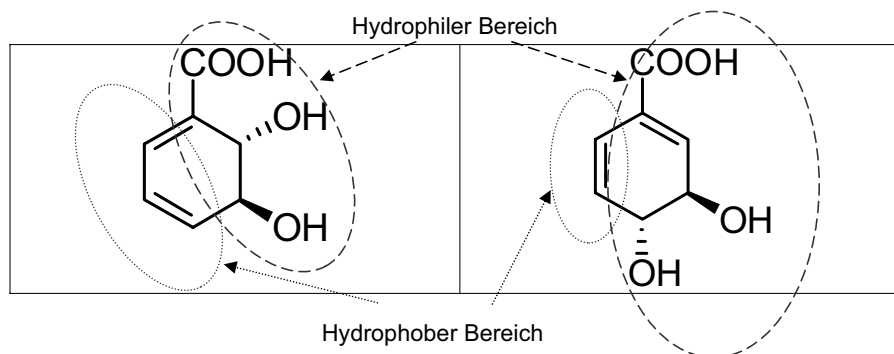


Abb. 8.12: Die chemische Struktur der Produkte 2,3-*trans*-CHD (links) und 3,4-*trans*-CHD (rechts). Markiert sind die hydrophilen und hydrophoben Bereiche der beiden Moleküle.

In der wässrigen Phase könnten mehrere 2,3-*trans*-CHD-Moleküle mit den funktionellen Gruppen nach außen eine Hydrathülle ausbilden. Im Inneren dieses Konglomerats würde ein gegenüber der wässrigen Phase abgetrennter lipophiler Bereich entstehen. Beim Übergang in die organische Phase kann eine Ausbildung von Mizellen, bestehend aus TOMAC-Molekülen, angenommen werden (Abb. 3.8). Die hydrophoben Ketten des Lösungsvermittlers bilden die äußere Schicht der Mizelle. Im Inneren der Mizelle entsteht ein Raum, der abgegrenzt ist durch die positiv geladenen TOMAC-Ionen. Dieser hydrophile Bereich könnte die hydrophilen 2,3-*trans*-CHD-Konglomerate einschließen und sie in die Akzeptorphase transportieren.

Bei dem Aufbau des 3,4-*trans*-CHD-Moleküls kann ein hydrophober und ein hydrophiler Bereich nicht so eindeutig beschrieben werden (Abb. 8.12). Die Ausbildung eines Konglomerats ist unwahrscheinlich. Aufgrund dessen kann eine geringere Affinität beim Übergang von 3,4-*trans*-CHD in die Lösungsmittelphase angenommen werden. Damit könnten die geringeren Extraktionsraten erklärt werden.

8.4.2 *In situ* Reaktivextraktion von 2,3-*trans*-CHD und 3,4-*trans*-CHD

Die Grundlage der technischen Realisierbarkeit der *in situ* Produktgewinnung wurde im Rahmen der off-line Reaktivextraktionsexperimente gelegt (Kap. 8.1). In diesem Abschnitt werden die Untersuchungen zur Auswirkung der integrierten Reaktivextraktion auf die Biomasse diskutiert. Für die Fermentation zur on-line Separation von 2,3-*trans*-CHD wurde der im Kapitel 5 vorgestellte *E. coli* Stamm F111pC20 eingesetzt. Bei Experimenten zur Gewinnung des Cyclitols 3,4-*trans*-CHD wurde der *E. coli* Stamm F82pC22 verwendet. Die Ergebnisse der Fed-Batch Fermentation mit diesem Stamm sind im Kapitel 6 beschrieben.

Untersuchung der in situ Reaktivextraktion von 2,3-trans-CHD und 3,4-trans-CHD

Wie im Rahmen der off-line Reaktivextraktionsexperimente gezeigt werden konnte, kann mittels einer organischen Phase, bestehend aus Oktanol und 20 bis 30% TOMAC, das Produkt 2,3-*trans*-CHD aus dem Fermentationsüberstand extrahiert werden (Kap. 8.2.1). Voraussetzung war jedoch ein biomasse- und proteinfreier Fermentationsüberstand. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass als Akzeptorphase eine 5%-ige Kochsalzlösung eingesetzt werden kann. Gestützt auf die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurde ein Versuchsaufbau zur *in situ* Reaktivextraktion von 2,3-*trans*-CHD durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Separation des Produktes 2,3-*trans*-CHD mit einer hohen Extraktionsrate von fast 17 mmol/(l*h) möglich war (Abb. 8.8). In der Akzeptorphase konnte eine Produktkonzentration von ca. 34 g/l (216 mmol/l) akkumuliert werden. Damit wurde gegenüber der Fermentationsbrühe eine Aufkonzentrierung um den Faktor 1,6 erreicht. Eine Sättigung der 2,3-*trans*-CHD-Konzentration in der Akzeptorphase konnte am Ende des Experiments nicht beobachtet werden. Eine weiterführende Aufkonzentrierung des Produktes über die erreichte Konzentration von 216 mmol/l in der Akzeptorphase wäre also möglich. Um die Reaktivextraktion von 2,3-*trans*-CHD effizienter zu gestalten, müsste das Arbeitsvolumen der Zentrifugen mindestens vervierfacht werden. Bezogen auf das Fermentationsvolumen von ungefähr 25 Liter müsste das Arbeitsvolumen der Zentrifugen anstatt 0,14 l mindestens 0,56 l betragen. Das würde einem Verhältnis von 1:45 zwischen dem Arbeitsvolumen der Zentrifuge und dem Fermentationsvolumen entsprechen.

Aufgrund der Resultate der Untersuchungen zur Biokompatibilität (Kap. 8.1.3) wurde das *in situ* Reaktivextraktionsexperiment erst nach dem Ende der Wachstumsphase begonnen. Der Start der *in situ* Reaktivextraktion während der Wachstumsphase ist wegen der möglichen inhibierenden Wirkung auf die wachsenden Zellen weniger sinnvoll.

Vergleich der Extraktionsraten bei der *in situ* Reaktivextraktion von 2,3- und 3,4-*trans*-CHD

Im Kapitel 8.4.1 wurden unter anderem die Unterschiede bei der Reaktivextraktion der Produkte 2,3- und 3,4-*trans*-CHD diskutiert. Die off-line Experimente wiesen eine mehr als dreifach höhere Extraktionsrate bei der Gewinnung von 2,3-*trans*-CHD im Vergleich zu 3,4-*trans*-CHD auf (Abb. 8.11). Die Ursache für diese Differenz kann in der unterschiedlichen chemischen Struktur der beiden Moleküle begründet sein (Abb. 8.12). Ein vergleichbares Verhalten wurde bei der Reaktivextraktion im Rahmen der *in situ* Produktgewinnung beobachtet (Abb. 8.13). Die Extraktionsraten bei der Reaktivextraktion von 3,4-*trans*-CHD lagen zu Beginn des Experimentes im Bereich von 7 mmol/(l*h). Im Vergleich dazu konnten bei dem Produkt 2,3-*trans*-CHD eine um mehr als 2,5-fach höhere volumetrische Extraktionsrate erreicht werden. Im weiteren Verlauf der beiden Experimente wurden bis zu fünffach höhere Werte bei 2,3-*trans*-CHD festgestellt.

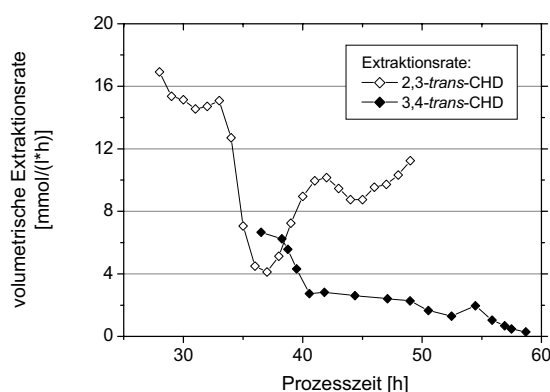


Abb. 8.13: Gegenüberstellung der Verläufe der differentiellen volumetrischen Extraktionsrate bei den *in situ* Reaktivextraktionsexperimenten der beiden Produkte 2,3- und 3,4-*trans*-CHD.

Die zukünftigen Arbeiten im Bereich der Verbesserung der Reaktivextraktion von 3,4-*trans*-CHD sollten sich mit der Optimierung der organischen Phase beschäftigen. Die Zielsetzung sollte sein, eine höhere Löslichkeit des Produktes in der Lösungsmittelpase zu erreichen. Damit verbunden sollte eine Reduzierung des Widerstandes beim Phasenübergang erzielt werden. Eine mögliche Optimierung könnte durch eine Erhöhung der TOMAC-Konzentration in der organischen Phase erreicht werden. Weiterhin sollten alternative lipophile Gegenionen und Lösungsmittel untersucht werden.

Im großtechnischen Maßstab ist der Einsatz von Kochsalzlösung als Akzeptorphase nur bedingt möglich. Die Chloridionen haben eine korrodierende Wirkung auf den Stahl. Dementsprechend sollten sich weitergehende Experimente ebenfalls mit der Optimierung der Akzeptorphase beschäftigen. Als Ziel sollte die Reduktion der Ionenkonzentration in der Akzeptorphase angestrebt werden oder der Einsatz alternativer Anionen bei der Reaktivextraktion untersucht werden.

Untersuchung der Wirkung der organischen Phase auf die Biomasse während der *in situ* Extraktionsexperimente

Als Nachteil beim Einsatz der Reaktivextraktion mit den Zentrifugalextraktoren wurde der mögliche Eintrag des organischen Lösungsmittels oder des Carriers in die Fermentation postuliert (Wieczorek et al. 1998b). Im Rahmen des 2,3-*trans*-CHD *in situ* Reaktivextraktionsexperimentes konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation der organischen Phase in der Fermentationsbrühe eine inhibierende Wirkung auf die Biomasse hat (Kap. 8.3.1). Nach einer Dauer von ca. 6 Stunden brach die Phasentrennung für eine Dauer von einigen Minuten ein. Ein Teil der organischen Phase gelangte mit dem Permeatfluss in den Bioreaktor. Ungefähr 11 Stunden nach dem Beginn der *in situ* Reaktivextraktion nahm die Produktbildung im Reaktor nach einer Fermentationszeit von 39 Stunden ab. Nach weiteren fünf Stunden führte die Akkumulation der Lösungsmittelphase in der Fermentationsbrühe zur Abnahme der Aktivität der Zellen (Abb. 8.14). Die Inhibierung der Produktbildung und die Abnahme der Sauerstofftransferrate hängen wahrscheinlich mit der Akkumulation der organischen Phase in der Fermentationsbrühe zusammen.

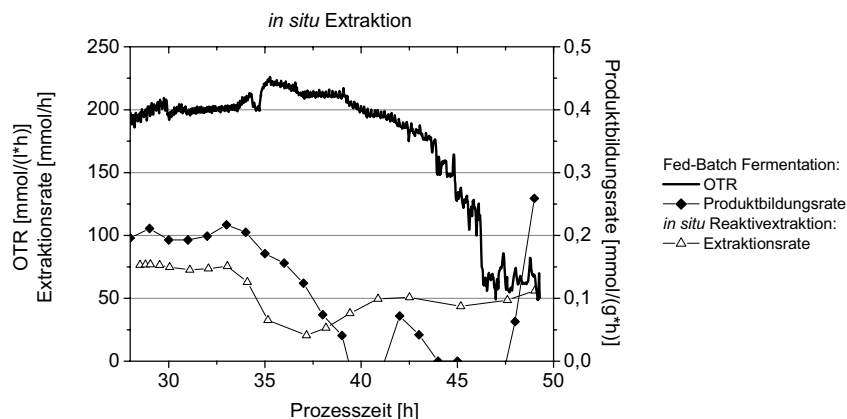


Abb. 8.14: Gegenüberstellung der Verläufe der Sauerstofftransferrate (OTR), der Extraktionsrate und der spezifischen Produktbildungsrate während der *in situ* Reaktivextraktion von 2,3-*trans*-CHD.

Aufgrund dieser Erfahrungen wurde bei dem Experiment zur *in situ* Reaktivextraktion von 3,4-*trans*-CHD beim Rückfluss des Permeats in dem Fermenter ein Aktivkohlefilter vorgeschaltet (Kap. 8.3.2). Der Aktivkohlefilter sollte verhindern, dass ein Teil der organischen Phase in den Bioreaktor zurückgeführt wird (Wieczorek et al. 1998b). Der Einsatz des Aktivkohlefilters führte dazu, dass das Produkt 3,4-*trans*-CHD, das noch im Permeat vorhanden war, an die Aktivkohle gebunden wurde. Ein Teil des Produktes ist dadurch verloren gegangen. Aufgrund dessen ist eine genaue Bilanzierung dieses Experimentes nicht möglich. Das Verfahren mit dem Aktivkohlefilter reduzierte zwar den Eintrag der organischen Phase in die Fermentationsbrühe, die Bindung des Produktes an die Aktivkohle reduzierte die Effektivität dieses Verfahrens.

Das Problem des Eintrags der organischen Phase in die Fermentationsbrühe könnte durch den Einbau einer Waschstufe (Hauer et al. 1991; Wieczorek et al. 1998b) mit einer zweiten organischen Phase gelöst werden. Diese zweite organische Phase könnte aus einem stark hydrophoben Lösungsmittel bestehen. Dieses Verfahren könnte im Rahmen einer kontinuierlichen Gegenstromextraktion nach dem „Mixer-Settler“-Prinzip durchgeführt werden. Der CHD-abgereicherte Fermentationsüberstand, der wiederum mit Oktanol und TOMAC angereichert ist, könnte im Gegenstrom mit einer stark hydrophoben Phase, zum Beispiel einem Lösungsmittel wie Hexan, Dodekanol oder Pflanzenöl versetzt werden. Es würde dazu führen, dass Oktanol und ein Teil des lipophilen Gegenions in die hydrophobe Phase übergehen würden. Das Produkt in dem Permeat würde aufgrund seines hydrophilen Charakters nicht in die organische Phase übergehen. Dadurch würde nur ein kleiner Teil des Lösungsmittels in den Bioreaktor zurückgeführt werden. Eine Gefährdung der Biomasse durch die hydrophobe Waschstufe könnte aufgrund der geringen Löslichkeit des Lösungsmittels im Wasser verhindert werden. Eine Alternative zu der kontinuierlichen Gegenstromextraktion wäre der Einsatz eines weiteren Flüssig-Flüssig-Extraktors. Das Permeat könnte in der Mischzone mit der hydrophoben Lösungsmittelphase dispergiert werden (Abb. 3.9). Durch die Zentrifugalkraft des Rotors könnten die beiden Phasen in der Dispersionszone wieder voneinander getrennt werden.

9 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Fermentationsprozess für die Produktion von 2,3-*trans*-CHD, 3,4-*trans*-CHD und 2,3-*trans*-CHA mit rekombinanten *Escherichia coli* Stämmen bis in den 300 Liter-Maßstab entwickelt werden. Die Verfahren wurden unter Einsatz eines synthetischen Mediums, der Kohlenstoffquelle Glukose, und den für das Wachstum auxotropher Stämme essentiellen Aminosäuren L- Phenylalanin und L-Tyrosin durchgeführt. Weiterhin wurde für 2,3- und 3,4-*trans*-CHD ein auf der Reaktivextraktion basierendes integriertes Aufarbeitungsverfahren erfolgreich etabliert.

Prozessentwicklung für 2,3-*trans*-CHD

Durch eine optimierte Prozesstechnik und den Einsatz verbesserter Produktionsstämme ist es erstmals gelungen, die bisher publizierte maximale 2,3-*trans*-CHD-Konzentration von 4,6 g/l (Franke 2002) auf 17 g/l zu erhöhen. Die Akkumulation des Nebenproduktes Glukonsäure führte jedoch zum Abbruch der Produktbildung. Durch eine Veränderung in der Prozessführung konnte die Ursache der Glukonsäuresynthese identifiziert werden. Demnach wurde die Glukonsäurebildung ab einer 2,3-*trans*-CHD-Konzentration zwischen 8 und 10 g/l induziert. Das PQQ-abhängige Enzym Glukose-Dehydrogenase (Gen *gcd*) wurde als möglicher Katalysator der Oxidation von Glukose zu Glukonsäure identifiziert. Durch die Deletion des Gens *gcd* in dem Produktionsstamm konnte die Glukonsäurebildung wirksam verhindert werden. Das führte zu einer Optimierung der Biosynthese und zu einer Akkumulation von bis zu 21,9 g/l 2,3-*trans*-CHD. Durch die prozesstechnischen Verbesserungen der Fermentation und die Verwendung neuer Produktionsstämme wurde die Raum-Zeit-Ausbeute von 0,7 mmol/(l*h) (Franke 2002) auf 2,2 mmol/(l*h) erhöht. Durch die Verhinderung der Glukonsäurebildung konnte die Raum-Zeit-Ausbeute weiter auf 2,8 mmol/(l*h) verbessert werden. Die integrale Selektivität konnte von 5 % mol/mol (Franke 2002) auf 14,9 %mol/mol trotz Nebenproduktbildung erhöht werden. Bei *E. coli*-Produzenten mit der Deletion des Gens *gcd* wurde die integrale Selektivität bis auf 15,4 %mol/mol verbessert. Damit konnten im Rahmen dieser Arbeit die 2,3-*trans*-CHD-Produktkonzentration und die Parameter Selektivität und Raum-Zeit-Ausbeute um den Faktor drei bis vier erhöht werden.

Das fermentative Verfahren zur Herstellung von 2,3-*trans*-CHD und die Strategie zur Vermeidung der Glukonsäurebildung durch die Deletion des Gens *gcd* in *E. coli*-Produktionsstämmen wurden zum Patent angemeldet (Bongaerts et al. 2004).

Weiterhin konnte die Übertragung des Verfahrens in den industriellen Maßstab durch den „scale up“ in den halbtechnischen Maßstab (300 Liter) gezeigt werden. Damit konnte zum ersten Mal das Produkt 2,3-*trans*-CHD im Kilogramm-Maßstab (3,6 kg im Fermentationsüberstand) zugänglich gemacht werden.

Prozessentwicklung für 3,4-*trans*-CHD

Die prozesstechnischen Optimierungen führten zur Produktion von bis zu 164 mmol/l (26 g/l) 3,4-*trans*-CHD. Damit konnte die bisher erzielte maximale 3,4-*trans*-CHD-Konzentration von 0,7 g/l (Franke 2002) weit übertroffen werden. Es wurde eine integrale Raum-Zeit-Ausbeute von 4,4 mmol/(l*h) und eine biomassespezifische Produktbildung von maximal 0,52 mmol/(g*h) erreicht.

Bei der Biosynthese von 3,4-*trans*-CHD wurde die Akkumulation von Shikimat-3-Phosphat, Chorismat und der Abbauprodukte von Chorismat beobachtet. Eine Reduzierung der Akkumulation von Shikimat-3-Phosphat um fast zwei Drittel konnte wirksam durch die Überexpression des Gens *aroA*, kodierend für das Enzym EPSP-Synthase, ermöglicht werden. Durch erfolgreiche Fed-Batch Fermentationen im halbertechnischen Maßstab (300 Liter) konnte die Möglichkeit der Übertragung des Verfahrens in den industriellen Maßstab gezeigt werden. Es konnten bis zu 3,2 kg des Produktes 3,4-*trans*-CHD angereichert werden. Mittels Gegenstrom-Extraktion konnten über 1 kg des Produktes 3,4-*trans*-CHD mit einer Reinheit von mehr als 99% gewonnen werden.

Prozessentwicklung für 2,3-*trans*-CHA

Während einer 300 Liter Fed-Batch Fermentation konnte die β -Aminosäure 2,3-*trans*-CHA zum ersten Mal in einer Gesamtmenge von fast 3 kg fermentativ hergestellt werden. Es wurde eine maximale Produktkonzentration von bis zu 100,3 mmol/l (15,7 g/l) erreicht. Damit wurde die bisher höchste publizierte 2,3-*trans*-CHA-Konzentration von über 6 g/l (McCormick et al. 1962) deutlich übertroffen.

In situ Gewinnung von 2,3- und 3,4-*trans*-CHD

Neben dem fermentativen Zugang zum 2,3- und 3,4-*trans*-CHD wurde ein neuartiger Hybridprozess, bestehend aus einer 42 Liter Fermentationsanlage und einem Aufarbeitungssystem, etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass mittels der Reaktivextraktion die beiden Produkte simultan zu der Fed-Batch Fermentation separiert werden konnten. Der Einsatz des Hybridprozesses führte erfolgreich zu der Akkumulation von bis zu 216,8 mmol/l (33,8 g/l) 2,3-*trans*-CHD und bis zu 144 mmol/l (22,5 g/l) 3,4-*trans*-CHD in der Akzeptorphase. Im Rahmen der *in situ* Experimente konnte für 3,4-*trans*-CHD eine Extraktionsrate von 32,4 mmol/h erreicht werden. Für das Produkt 2,3-*trans*-CHD wurde eine Extraktionsrate von bis zu 51,4 mmol/h erzielt.

10 **Ausblick**

Die drei Produkte 2,3-*trans*-CHA, 2,3-*trans*-CHD und 3,4-*trans*-CHD weisen eine ähnliche chemische Struktur auf. Der Stoffwechselweg bis zu Chorismat ist bei allen drei Verbindungen identisch. Die Biosynthese der drei Substanzen unterscheidet sich ausschließlich durch die letzten beiden enzymatischen Reaktionen. Aufgrund dessen wurde zu Beginn dieser Arbeit angenommen, dass die Erkenntnisse, die bei der Erforschung eines der drei Produkte gewonnen werden, für die Prozessentwicklung der beiden anderen Produkte eingesetzt werden könnten. Das Auftreten unterschiedlicher Nebenprodukte bei der Produktion von 2,3-*trans*-CHD und 3,4-*trans*-CHD zeigte jedoch, dass für jedes Produkt eine eigene Forschungsstrategie entwickelt werden musste. Dementsprechend muss die Optimierung der einzelnen Verfahren weitgehend produktspezifisch erfolgen.

Stammoptimierung

Eine Optimierung der CHD-Bildung könnte durch den Einsatz alternativer Glukoseaufnahme-Systeme erzielt werden. Dabei könnte die Substrataufnahme diffusiv über das heterologe Glukoseaufnahmesystem aus *Zymomonas mobilis* (Glukose-Facilitator) anstatt aktiv über das PT-System erfolgen (Bujnicki 2001; Rüffer 2004). Bei diesem durch den Substratgradienten angetriebenen System findet die Phosphorylierung der Glukose unter ATP-Verbrauch durch das Enzym Glukokinase statt. Die Einführung des Glukose-Facilitators als einziges Glukoseaufnahme-System bei einem L-Phenylalanin-Überproduzenten führte aber zu keiner grossen Verbesserung der Produktion (Bujnicki 2001; Rüffer 2004). Bei der fermentativen Synthese von 3-Dehydroshikimat konnte durch das Einbringen des Glukose-Facilitators ergänzend zu dem PT-System und einer Glukose-limitierenden Fahrweise eine deutliche Verbesserung der Raum-Zeit-Ausbeute erreicht werden (Yi et al. 2003). Weiterhin konnte eine signifikante Steigerung der Ausbeute um 8 %mol/mol erzielt werden. Eine wichtige Differenz zwischen dem 3-Dehydroshikimat- und den CHD- und L-Phenylalanin-Überproduzenten liegt in der plasmid-kodierten Überexpression der Transketolase (Yi et al. 2003). Die Überexpression der Transketolase könnte zu einer Erhöhung der Verfügbarkeit des Metabolits Erythrose-4-Phosphat führen, der für die Aromaten-Biosynthese essentiell ist, und dadurch eine Optimierung der Ausbeute ermöglichen. Ferner könnte eine Überexpression der PEP-Synthase eine Verbesserung der CHD-Produktion bewirken. In der Arbeit von Li (Li et al. 2003) konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der Gene Transketolase und der PEP-Synthase eine Verbesserung der DAHP-Ausbeute bis in die Nähe des maximalen theoretischen Wertes ermöglichte. Die Erhöhung der Verfügbarkeit des Eingangsmetabolits des Aromaten-Biosyntheseweges DAHP würde auch bei der Biosynthese der CHD- und CHA-Moleküle eine Verbesserung der Ausbeute zur Folge haben.

Des Weiteren sollte eine Optimierung der Affinität von Chorismat für das Enzym Isochorismat-Lyase untersucht werden. Damit könnte eine Reduktion der Nebenproduktbildung verbunden mit der Erhöhung der Ausbeute und der Produktivität bei der Biosynthese von 3,4-*trans*-CHD erreicht werden.

Prozessentwicklung

Alternative Produkte

3,4-*trans*-CHA

Das Ziel des CHORUS-Projektes war es, den mikrobiellen Zugang zu den vier Produkten 2,3-*trans*-CHD und 3,4-*trans*-CHD sowie den β -Aminosäuren 2,3-*trans*-CHA und 3,4-*trans*-CHA herzustellen. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde der fermentative Zugang zu den drei Molekülen 2,3-*trans*-CHA sowie 2,3- und 3,4-*trans*-CHD im Kilogramm-Maßstab hergestellt. In der Arbeit von Kozak konnte der mikrobielle Zugang zum 3,4-*trans*-CHA bis zu einer Konzentration von 11 mmol/l (1,7 g/l) gezeigt werden (Kozak 2006; Wubbolts et al. 2005). Basierend auf den in dieser Promotionsarbeit entwickelten Fermentationsverfahren für die CHD-Moleküle könnte mit dem 3,4-*trans*-CHA-Überproduzenten die Produktbildung und Ausbeute optimiert werden. Die 3,4-*trans*-CHA-Biosynthese führte zur Akkumulation des Nebenproduktes 3,4-*trans*-CHD bis zu einem dreifachen Überschuss (Kozak 2006). Durch die Anwendung der *in situ* Reaktivextraktion könnten die CHD-Moleküle kontinuierlich aus der Fermentationsbrühe separiert werden. Die β -Aminosäure 3,4-*trans*-CHA ist mit einer Amino-Gruppe ausgestattet. Damit könnte das Produkt 3,4-*trans*-CHA mittels eines kationenselektiven Reaktivextraktionsverfahrens von dem Nebenprodukt 3,4-*trans*-CHD getrennt werden. Für die kontinuierliche 3,4-*trans*-CHA-Separation könnte die für die Gewinnung von Aminosäuren entwickelte *in situ* Reaktivextraktion mit dem lipophilen Gegenion D₂EHPA und dem Lösungsmittel Kerosin eingesetzt werden (Maass 2001).

Ein Zugang zu der β -Aminosäure 3,4-*trans*-CHA im Kilogramm-Maßstab würde die Möglichkeit eröffnen, das Molekül als chiralen Synthesebaustein für Natur- und Wirkstoffsynthese einzusetzen. Die Firma Roche stellt fermentativ Oseltamivir (Markenname Tamiflu) aus dem Edukt Shikimat her. Eine Vereinfachung der Synthese von Oseltamivir könnte durch den Einsatz von 3,4-*trans*-CHA als Ausgangsverbindung erfolgen. Oseltamivir gehört zu den Neuroaminidase-Hemmern und wird für die Therapie der humanen Influenza eingesetzt. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat zur Verhinderung der befürchteten Influenza-Pandemie durch eine Mutante des Vogelgrippe-Virus H5N1 den Staaten empfohlen, große Mengen an Tamiflu vorrätig zu halten. Die Firma Roche konnte durch die Empfehlung der WHO 2005 den Tamiflu-Umsatz auf über eine Milliarde Euro verünfachen (Roche 2005).

Produkte der Natur- und Wirkstoffsynthese

Ausgehend von den Produkten 2,3-*trans*-CHA, 3,4-*trans*-CHA, 2,3-*trans*-CHD und 3,4-*trans*-CHD konnte in der Arbeitsgruppe von Prof. Müller eine breite Palette an Natur- und Wirkstoffsynthesen erarbeitet werden (Esser 2006; Franke 2002; Franke et al. 2003; Lorbach et al. 2004; Lorbach et al. 2002). Durch die Optimierung des Fermentationsverfahrens von 2,3-*trans*-CHA, 2,3-*trans*-CHD und 3,4-*trans*-CHD und dem damit verbundenen Zugang zu den Produkten im Kilogramm-Maßstab ist der Grundstein für den kommerziellen Zugang zu diesen Natur- und Wirkstoffen gelegt.

Optimierung der Reaktivextraktion

Im Rahmen der Promotionsarbeit konnte die Verwendung der *in situ* Reaktivextraktion zur Gewinnung von CHD-Molekülen erfolgreich gezeigt werden. Damit wurde ein Hybrid-System etabliert, mit dem Moleküle mit Carboxyl-Gruppen separiert werden können. Die weiteren Untersuchungen der *in situ* Reaktivextraktion sollen als Zielsetzung eine Optimierung der Akzeptor- und der organischen Phase haben. Die Verwendung von NaCl hat den Nachteil, dass Chlorid-Ionen korrosiv auf Stahl wirken. Für großtechnische Verfahren sollte eine alternative Akzeptor-Phase eingesetzt werden. Für eine Vielzahl von Molekülen, die im basischen Milieu stabil bleiben, könnte eine basische NaOH-Lösung eingesetzt werden. Dabei würden die OH-Ionen als Gegenionen für die Carboxyl-Gruppen der Produkte dienen. Für Verbindungen wie 2,3- und 3,4-*trans*-CHD, die im sauren und basischen Milieu instabil sind, könnten alternativ Salze wie Ammoniumsulfat oder Calciumcarbonat untersucht werden.

Die Optimierung des entwickelten *in situ* Reaktivextraktionssystems könnte durch den Einbau einer Waschstufe, die im Kapitel 8.4.2 beschrieben ist, verwirklicht werden. Die zusätzliche organische Phase sollte aus einem hydrophoben Lösungsmittel oder pflanzlichen Öle bestehen. Diese Phase sollte die Oktanol- und TOMAC-Moleküle auffangen, die im zurückfließenden abgereicherten Fermentationsüberstand gelöst sind, bevor sie in den Bioreaktor gelangen. Dadurch könnte eine inhibierende Wirkung der organischen Phase verhindert werden. Weiterhin sollte der Einsatz eines alternativen hydrophoberen Lösungsmittels wie Dodekanol oder Hexan überprüft werden.

Der Verwendung des lipophilen Gegenions TOMAC für die *in situ* Reaktivextraktion war aufgrund der hohen Viskosität dieser ionischen Flüssigkeit nur in Verbindung mit einem Lösungsmittel möglich. Die Entwicklungen auf dem Gebiet der ionischen Flüssigkeiten ermöglicht eine gezielte Konstruktion neuer Verbindungen. Eine Alternative zu der eingesetzten organischen Phase, bestehend aus Oktanol und TOMAC, könnte eine bei Raumtemperatur wenig viskose ionische Flüssigkeit mit den lösungsvermittelnden Eigenschaften von TOMAC sein. Diese Verbindung sollte keine toxische oder inhibierende Wirkung auf die Biomasse haben.

11 Literaturverzeichnis

- Bacher A, Rieder C, Eichinger D, Arigoni D, Fuchs G, Eisenreich W. 1999. Elucidation of novel biosynthetic pathways and metabolite flux patterns by retrobiosynthetic NMR analysis. *FEMS Microbiology reviews* 22(5):567-598.
- Backman K, Oconnor MJ, Maruya A, Rudd E, Mckay D, Balakrishnan R, Radjai M, Dipasquantonio V, Shoda D, Hatch R and others. 1990. Genetic-Engineering of Metabolic Pathways Applied to the Production of Phenylalanine. *Annals Of The New York Academy Of Sciences* 89(5):16-24.
- Bart HJ. 2001. Reactive extraction. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Bart HJ, Marr R, Bauer U. 1990. Reactive Extraction of L-Phenylalanine by a Non-Weste Process. ISEC Tokyo.
- Bizek V, Horacek J, Rericha R, Kousova M. 1992. Amine Extraction of Hydroxycarboxylic Acids .1. Extraction of Citric-Acid with 1-Octanol N-Heptane Solutions of Trialkylamine. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 31(6):1554-1562.
- Blattner FR, Burland V, Plunkett G, Sofia HJ, Daniels DL. 1993. Analysis of the Escherichia Coli Genome. 4. DNA-Sequence of the Region from 89.2 to 92.8 Minutes. *Nucleic Acids Research* 21(23):5408-5417.
- Bongaerts JJ, Krämer M, Müller U, Raeven LJRM, Wubbolts M. 2001. Metabolic Engineering for Microbial Production of Aromatic Amino Acids and Derived Compounds. *Metabolic Engineering* 3(4):289-300.
- Bongaerts JJ, Raeven LJRM, Sprenger G, Kuhm A, Takors R, Bujnicki RP. 2004. Improved biosynthetic production of [5S,6S]-5,6-dihydroxycyclohexa-1,3-diene-1-carboxylic acid (2,3-trans-CHD). WO 2006/133898.
- Boychyn M, Yim S, Ayza S, Shamlou P, Blumer M, More J, Hoare M. 2001. Characterization of flow intensity in continuous centrifuges for the development of laboratory mimics. *Chemical Engineering Sciences* 56(16):4759-4770.
- Buchholz A, Takors R, Wandrey C. 2001. Quantification of intracellular metabolites in Escherichia coli K12 using liquid chromatographic-electrospray ionization tandem mass spectrometric techniques. *Analytical Biochemistry* 295(2):129-137.
- Budzinski A. 2001. Aminosäuren, Peptide und die Chemie dazu. *Chemische Rundschau* 6:10.
- Bujnicki R. 2001. Untersuchung reaktionstechnischer Parameter zur Produktion von L-Phenylalanin mit Escherichia coli in Fed-Batch Verfahren. Forschungszentrum Jülich; Diplomarbeit.
- Cardoso JP. 1997. Purification of Penicillin G Amidase using quaternary ammonium salts and effect on the activity of the immobilised enzymes. *Bioprocess Engineering* 16(4):209-218.
- Cardoso MM, Barradas MJ, Kroner KH, Crespo JG. 1999. Amino acid solubilization in cationic reversed micelles: factors affecting amino acid and water transfer. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 74(8):801-811.
- Cardoso MM, Viegas RMC, Crespo JPSG. 2000. Kinetics of phenylalanine extraction and reextraction by cationic reversed micelles using a diffusion cell. *Chemica Engineering Science* 55(15):2835-2847.
- Chain E, Florey HW, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA, Orr-Ewing J, Sanders AG. 1940. *Lancet* 240:226.
- Chen RZ, Hatzimanikatis V, Yap W, Postma PW, Bailey JE. 1997a. Metabolic consequences of phosphotransferase (PTS) mutation in a phenylalanine-producing recombinant Escherichia coli. *Biotechnology Progress* 13(6):768-775.
- Chen RZ, Yap W, Postma PW, Bailey JE. 1997b. Comparative studies of Escherichia coli strains using different glucose uptake systems: Metabolism and energetics. *Biotechnology and Bioengineering* 56(5):583-590.
- Davidson VL. 1993. Principles and Applications of Quinoproteins. Publisher: (Dekker, New York, N. Y.):453 pp.
- Dell KA, Frost JW. 1993. Identification and Removal of Impediments to Biocatalytic Synthesis of Aromatics from D-Glucose: Rate-Limiting Enzymes in the Common Pathway of

- Aromatic Amino Acid Biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* 115(24):11581-11589.
- DeMarinis RM, Filer CN, Waraszkiewicz SM, Bertchold GA. 1974. *J. Am. Chem. Soc.* 96:1193-1197.
- El Massaoudi M. 2003. Entwicklung eines Sensor Reaktor Systems für metabolische Stoffflussanalysen in instationären Fermentationen. Dissertation; Berichte des Forschungszentrum Jülich.
- El Massaoudi M, Spelthahn J, Drysch A, de Graaf A, Takors R. 2003. Production process monitoring by serial mapping of microbial carbon flux distributions using a novel sensor reactor approach: I-Sensor reactor system. *Metabolic Engineering* 5(2):86-95.
- Ely B, Pittard J. 1979. Aromatic Amino Acid Biosynthesis: Regulation of Shikimate Kinase in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 138(3):933-943.
- Esser S. 2003. Mündliche Mitteilung. Forschungszentrum Jülich.
- Esser S. 2006. Von Chorismat abgeleitete funktionalisierte Cyclohexadien-trans-diole: Optimierung der mikrobiellen Produktion, Untersuchungen zur Reaktivität und Synthese beider Enantiomere des Naturstoffs Valienon. Dissertation; Universität Freiburg im Breisgau.
- Farmer WR, Liao JC. 1997. Reduction of aerobic acetate production by *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 63(8):3205-3210.
- Ferenci T. 1996. Adaptation to life at micromolar nutrient levels: The regulation of *Escherichia coli* glucose transport by endoinduction and cAMP. *FEMS Microbiology Reviews* 18(4):301-317.
- Förberg C, Häggström L. 1988. Phenylalanine production from a recombinant *Escherichia coli* strain in fed-batch culture. *Journal of Biotechnology* 8(44):291-300.
- Franke D. 2002. Funktionalisierte Cyclohexadien-trans-1,2-diole: Zugang durch Techniken des metabolic engineering und Verwendung als Bausteine in der Naturstoff- und Wirkstoffsynthese. Dissertation; Berichte des Forschungszentrum Jülich (3992).
- Franke D, Lorbach V, Esser S, Dose C, Sprenger GA, Halfar M, Thommes J, Müller R, Takors R, Müller M. 2003. (S,S)-2,3-dihydroxy-2,3-dihydrobenzoic acid: Microbial access with engineered cells of *Escherichia coli* and application as starting material in natural-product synthesis. *Chemistry - A European Journal* 9(17):4188-4196.
- Freeman A, Woodley JM, Lilly MD. 1993. In Situ Product Removal as a Tool for Bioprocessing. *Bio-Technology* 11(9):1007-1012.
- Frost JW. 1994. Deblocking the common pathway of aromatic amino acid synthesis. *PCT Int. Appl.* CODEN:PIXXD2; WO9414955:46 pp.
- Frost JW, Draths KM. 1995. Biocatalytic Syntheses of Aromatics from D-Glucose - Renewable Microbial Sources of Aromatic-Compounds. *Annual Review of Microbiology* 49:557-579.
- Frost & Sullivan. 2003. Analysis Of Developments In Global Chiral Technology Markets. Report of the Management Consulting Company Frost & Sullivan.
- Gehring AM, Bradley KA, Walsh CT. 1997. Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: Isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate. *Biochemistry* 36(28):8495-8503.
- Gerigk MR. 2001. Integrierte Prozessentwicklung zur Herstellung von L-Phenylalanin mit *Escherichia coli*. Dissertation; Berichte des Forschungszentrum Jülich (3933).
- Gerigk MR, Bujnicki R, E.-Nkwenkwa E, Bongaerts J, Sprenger G, Takors R. 2002a. Process Control for Enhanced L-Phenylalanine Production Using Different Recombinant *Escherichia coli* Strains. *Biotechnology and Bioengineering* 80(7):746-754.
- Gerigk MR, Maass D, Kreutzer A, Sprenger G, Bongaerts J, Wubbolts M, Takors R. 2002b. Enhanced pilot-scale fed-batch L-phenylalanine production with recombinant *Escherichia coli* by fully integrated reactive extraction. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 25(1):43-52.
- Gibson DT, Hensley M, Yoshioka H, Mabry JJ. 1970. Formation of (+)-cis-2,3-Dihydroxy-1-methylcyclohexa-4,6-diene from Toluene by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* 9(7):1626-1630.

- Gibson DT, Koch JR, Schuld CL, Kallio RE. 1968. Oxidative Degradation of Aromatic Hydrocarbons by Microorganisms. 11. Metabolism of Halogenated. *Biochemistry* 7(11):3795-3802.
- Gibson JM, Thomas PS, Thomas JD, Barker JL, Chandran SS, Harrup MK, Draths KM, Frost JW. 2001. *Angewandte Chemie Int. Ed.* 40:1945-1948.
- Gibson MI, Gibson F. 1962a. New Intermediate in Aromatic Biosynthesis. *Biochimica Et Biophysica Acta* 65(1):160.
- Gibson MI, Gibson F, Doy CH, Morgan P. 1962b. Branch Point in Biosynthesis of Aromatic Amino-Acids. *Nature* 195(4847):1172.
- Grönke K. 2007. Laufende Dissertation; Forschungszentrum Jülich.
- Hampe M. 1978. Flüssig/Flüssig-Extraktion: Einsatzgebiete und Lösungsmittel-Auswahl. *Chemie Ingenieur Technik* 50(9):647 - 655.
- Hano T, Ohtake T, Matsumoto M, Kitayama D, Hori F, Nakashio F. 1991. Extraction equilibria of amino acids with quaternary ammonium salt. *Journal of Chemical Engineering of Japan* 24(1):20-24.
- Hauer E, Marr R. 1991. Extraktive Stofftrennverfahren in der Biotechnologie. *Chemie Ingenieur Technik* 63(8):809-816.
- Hirth J, Bicker M, Vogel H. 2002. Isolierung von Kohlenhydratcarbonsäuren aus wässrigen Lösungen durch Reaktivextraktion. *Chemie Ingenieur Technik* 74(3):345-350.
- Hirth J, Bicker M, Vogel H. 2003. Trennung von Glucoseoxigenaten durch Reaktivextraktion. *Chemie Ingenieur Technik* 75(3):294-298.
- Hudlicky T, Rulin F, Tsunoda T, Luna H, Andersen C, Price JD. 1991. Biocatalysis as a rational approach to enantiodivergent synthesis of highly oxygenated compounds: (+)- and (-)-pinitol and other cyclitols. *Israel Journal of Chemistry* 31(3):229-238.
- Kertes AS, King CJ. 1986. Extraction chemistry of fermentation product carboxylic acids. *Biotechnology and Bioengineering* 28(2):269 - 282.
- Kirsch T, Maurer G. 1996. Distribution of Oxalic Acid between Water and Organic Solutions of Tri-n-octylamine. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 35(5):1722 -1735.
- Kirsch T, Ziegenfuss H, Maurer G. 1997. Distribution of citric, acetic and oxalic acids between water and organic solutions of tri-n-octylamine. *Fluid Phase Equilibria* 129(1-2):235-266.
- Klämbt D, Kreiskott H, Streit B. 1991. *Angewandte Biologie*. Weinheim, New York, Basel, Cambridge: VCH.
- Kleman GL, Chalmers JJ, Luli GW, Strohl WR. 1991. A Predictive and Feedback-Control Algorithm Maintains a Constant Glucose-Concentration in Fed-Batch Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 57(4):910-917.
- Knaggs AR. 2003. The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports* 20(1):119-136.
- Ko YF, Bentley WE, Weigand WA. 1993. An Integrated Metabolic Modeling Approach to Describe the Energy Efficiency of Escherichia coli Fermentations under Oxygen-Limited Conditions - Cellular Energetics, Carbon Flux, and Acetate Production. *Biotechnology and Bioengineering* 42(7):843-853.
- Konstantinov KB, Nishio N, Seki T, Yoshida T. 1991. Physiologically Motivated Strategies for Control of the Fed-Batch Cultivation of Recombinant Escherichia coli for Phenylalanine Production. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 71(5):350-355.
- Konstantinov KB, Nishio N, Yoshida T. 1990a. Glucose Feeding Strategy Accounting for the Decreasing Oxidative Capacity of Recombinant Escherichia coli in Fed-Batch Cultivation for Phenylalanine Production. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 70(4):253-260.
- Konstantinov KB, Yoshida T. 1990b. Online Monitoring of Representative Structural Variables in Fed-Batch Cultivation of Recombinant Escherichia coli for Phenylalanine Production. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 70(6):420-426.
- Kozak S. 2006. Mikrobielle Biosynthese von (3S,4R)-4-Amino-3-hydroxycyclohexa-1,5-dien-carbonsäure mit rekombinanten Escherichia coli-Zellen: Molekulargenetische und biochemische Untersuchungen. Dissertation; Universität Stuttgart.

- Lau RM, van Rantwijk F, Seddon KR, Sheldon RA. 2000. *Org. Lett.* 2(26):4189-4191.
- Lengeler JW, Drews G, Schlegel HG. 1999. *Biology of the Prokaryotes* - 5. Multiple Roles of Prokaryotic Cell Membranes. Thieme Verlag.
- Leonard RA. 1988. Recent advances in centrifugal contactor design. *Separation Science and Technology* 23:1473-1487.
- Leonard RA, Bernstein GJ, Zeigler AA, Pelto RH. 1980. Annular centrifugal contactors for solvent extraction. *Separation Science and Technology* 15:925-943.
- Li Y, Liu Y, Wang S, Tong Z, Xu Q. 2003. Coexpressions of phosphoenolpyruvate synthetase A (ppsA) and transketolase A (tktA) Genes of *Escherichia coli*. 19(3):301-306.
- Likidis Z, Schlichting E, Bischoff L, Schügerl K. 1989. Reactive extraction of penicillin G from mycel-containing broth in a countercurrent extraction decanter. *Biotechnology and Bioengineering* 33(11):1385-1392.
- Lorbach V. 2004. Von Chorisat abgeleitete funktionalisierte Cyclohexadiene: Verwendung als chirale Synthesebausteine und Erweiterung der mikrobiell zugänglichen Produktpalette um einen Aminoalkohol. Dissertation; Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Lorbach V, Franke D, Esser S, Dose C, Sprenger GA, Müller M. 2004. Microbially produced functionalized cyclohexadiene-trans-diols as a new class of chiral building blocks in organic synthesis: on the way to green and combinatorial chemistry. *Highlights in Bioorganic Chemistry*:511-525.
- Lorbach V, Franke D, Nieger M, Müller M. 2002. Cyclohexadiene-trans-diols as versatile starting material in natural product synthesis: short and efficient synthesis of isocrotopoxide and ent-senepoxide. *Chemical Communications* 5:494-495.
- Luli GW, Strohl WR. 1990. Comparison of Growth, Acetate Production, and Acetate Inhibition of *Escherichia coli* Strains in Batch and Fed-Batch Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 56(4):1004-1011.
- Maass D. 2001. Prozeßentwicklung zur simultanen Produktabtrennung von L-Phenylalanin. Dissertation; Berichte des Forschungszentrum Jülich (3888).
- Maass D, Gerigk MR, Kreutzer A, Weuster-Botz D, Wubbolts M, Takors R. 2002. Integrated L-phenylalanine separation in an *E. coli* fed-batch process: from laboratory to pilot scale. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 25(2):85-96.
- Marcinkeviciene L, Bachmatova I, Semenaite R, Rudomanskis R, Brazenas G, Meškiene R, Meškys R. 1999. Purification and characterisation of PQQ-dependent glucose dehydrogenase from *Erwinia* sp. 34-1. *Biotechnology Letters* 21(3):187-192.
- Martek J, Sabalova E. 1997. Toxicity of Organic Solvents used in situ in Fermentation of Lactic Acid by *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnology Techniques* 11(2):71-75.
- Matshushita K, Arents JC, Bader R, Yamada M, Adachi O, Postma PW. 1997. *Escherichia coli* is unable to produce pyrroloquinoline quinone (PQQ). *Microbiology* 143:3149-3156.
- Matshushita K, Nonobe M, Shinsdawa E, Matsushita K, Ameyama M. 1987. *Journal of Bacteriology* 169:205-209.
- McCormick JRD, Hirsch U, Sjolander NO, Reichenthal J. 1962. Biosynthesis of Tetracyclines - 3. New Amino Acid from *Streptomyces-Aureofaciens* - (+)-Trans-2,3-Dihydro-3-Hydroxyanthranilic Acid. *Journal of the American Chemical Society* 84(19):3711.
- Meikrantz DH, Macaluso LL, Flim WD, Heald CJ, Mendoza G, Meikrantz SB. 2002. A new annular centrifugal contactor for pharmaceutical processes. *Chemical Engineering Communications* 189:1629-1639.
- Meikrantz DH, Meikrantz SB, Macaluso LL. 2001. Annular centrifugal contactors for multiple stage extraction processes. *Chemical Engineering Communications* 188:115-127.
- Moch M. 2003. Untersuchungen reaktionstechnischer Parameter zur Produktion von 3,4-trans-CHD mit rekombinanten *Escherichia coli* im fed-batch Verfahren. Diplomarbeit, Fachhochschule Aachen.
- Moch M. 2004. Mündliche Mitteilung. Forschungszentrum Jülich.

- Müller R, Breuer M, Wagener A, Schmidt K, Leistner E. 1996. Bacterial production of transdihydroxycyclohexadiene carboxylates by metabolic pathway engineering. *Microbiology* 142(4):1005-1012.
- Neidhardt FC. 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella* - Cellular and Molecular Biology. Washington DC : ASM Press 2. Edition.
- Nielsen J. 1994. *Bioreaction Engineering Principles*. Plenum Press, New York, London.
- Oldiges M. 2004. Metabolomanalyse zur Untersuchung der Dynamik im Aromatenbiosyntheseweg in L-Phenylalanin Produzenten von *Escherichia coli*. Dissertation; Forschungszentrum Jülich.
- Patnaik R, Liao JC. 1994. Engineering of *Escherichia coli* central metabolism for aromatic metabolite production with near theoretical yield. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3903-3908.
- Patnaik R, Spitzer R, Liao JC. 1995. Pathway engineering for production of aromatics in *Escherichia coli*: confirmation of stoichiometric analysis by independent modulation of AroG, TktA and Pps activities. *Biotechnology and Bioengineering*. 46:361-370.
- Patnaik R, Spitzer RG, Liao JC. 1995b. Pathway Engineering for Production of Aromatics in *Escherichia coli* - Confirmation of Stoichiometric Analysis by Independent Modulation of AroG, TktA, and Pps Activities. *Biotechnology and Bioengineering* 46(4):361-370.
- Pittard AJ. 1996. *Biosynthesis of the Aromatic Amino Acids*. Washington DC : ASM Press 2. Edition:458-484.
- Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR. 1993. Phosphoenolpyruvate - Carbohydrate Phosphotransferase Systems of Bacteria. *Microbiological Reviews* 57(3):543-594.
- Roche. 2005. Jahresbericht 2005. Roche AG.
- Römpp. 1999. *Lexikon Chemie*. Stuttgart, Thieme Verlag 2. Auflage.
- Rüffer N. 2004. Fermentative Produktion von L-Phenylalanin mit *Escherichia coli* und integrierter Produktabtrennung. Dissertation; Berichte des Forschungszentrum Jülich (4145).
- Rüffer N, Heidersdorf U, Kretzers I, Sprenger GA, Raeven L, Takors R. 2004. Fully integrated L-phenylalanine separation and concentration using reactive-extraction with liquid-liquid centrifuges in a fed-batch process with *E. coli*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 26(4):239-248.
- Rusnak F, Liu J, Quinn N, Berchtold GA, Walsh CT. 1990. Subcloning of the Enterobactin Biosynthetic Gene EntB - Expression, Purification, Characterization, and Substrate-Specificity of Isochorismatase. *Biochemistry* 29(6):1425-1435.
- Schlegel HG. 1992. *Allgemeine Mikrobiologie*. Stuttgart : Thieme Verlag 7. Auflage.
- Schlichting E, Halwachst W, Schügerl K. 1987. Reactive Extraction of Salicylic Acid and D/L Phenylalanine in a Stirred Cell. *Chemical Engineering Communications* 151:193-205.
- Schobert H. 2004. Prozessentwicklung zur integrierten Produktabtrennung bei der Herstellung von Cyclitolen mit rekombinanten *Escherichia coli*. Diplomarbeit, RWTH Aachen.
- Schöfer SH, Kafzik N, Wasserscheid P, Kragl U. 2001. *Chem. Commun.*:425-426.
- Schügerl K. 1994. *Solvent Extraction in Biotechnology - Recovery of Primary and secondary Metabolites*. Springer-Verlag.
- Schuhmann W, Wohlschläger H, Huber J, Schmidt HL, Stadler H. 1995. Development of an extremely flexible automatic analyzer with integrated biosensors for on-line control of fermentation processes. *Analytica Chimica Acta* 315(1):113-122.
- Seiffert A, Goeke K, Fiedler HP, Zahner H. 1993. Production of the Siderophore Enterobactin - Use of 4 Different Fermentation Systems and Identification of the Compound by Hplc. *Biotechnology and Bioengineering* 41(2):237-244.
- Siebenhofer M, Marr R. 1985. Auswirkung der Extraktionsmittel- Zusammensetzung auf den Stoffaustausch und die Apparateauswahl am Beispiel der Essigsäure-Extraktion. *Chemie Ingenieur Technik* 57(6):558-559.
- Sobol IM. 1991. *Die Monte-Carlo-Methode*. Verlag Harri Deutsch 4. Auflage.
- Sobol IM. 1994. *A Primer for the Monte Carlo Method*. CRC Press.
- Sprenger G. 2003. Mündliche Mitteilung. Universität Stuttgart.

- Striegel B. 1993. Entwurf und Implementierung von Regelungskonzepten für biotechnologische Prozesse. Dissertation, RWTH Aachen.
- Stuckey DC. 1996. Solvent extraction in biotechnology. ISEC '96 Proceedings, Value Added Through Solvent Extraction 1:25-34.
- Takagi M, Nishio Y, Oh G, Yoshida T. 1996. Control of L-phenylalanine production by dual feeding of glucose and L-tyrosine. *Biotechnology and Bioengineering* 52(6):653-660.
- Takors R. 2004. Model-based analysis and optimization of an ISPR approach using reactive extraction for pilot-scale L-phenylalanine production. *Biotechnology Progress* 20(1):57-64.
- Tamada JA, King CJ. 1990a. Extraction of Carboxylic Acids with Amine Extractants. 1. Equilibria and Law of Mass Action Modeling. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 29:1319-1326.
- Tamada JA, King CJ. 1990b. Extraction of Carboxylic Acids with Amine Extractants. 2. Chemical Interactions and Interpretation of Data. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 29:1327-1333.
- Tamada JA, King CJ. 1990c. Extraction of Carboxylic Acids with Amine Extractants. 3. Effect of Temperature, Water Coextraction, and Process Considerations. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 29:1333-1338.
- Teramoto M, Yamashiro T, Inoue A, Yamamoto A, Matsuyama H, Miyake Y. 1991. Extraction of Amino Acid by Emulsion Liquid Membranes Containing Di-(2-ethylhexyl) Phosphoric Acid as Carrier. *Membrane Science* 58(1):11-32.
- Tollnick C, Beuse M. 1999. Lückenlose Prozeßüberwachung: Online-Glukosemessung in der Biotechnologie. *CAV* 9:104-106.
- Trost BM, Chupak LS, Lübbers T. 1998. *Journal of the American Chemical Society* 120:1732-1740.
- Uddin MS, Hidajat K, Lim BG, Ching CB. 1990. Interfacial mass transfer in extraction of amino acid by ALIQUAT 336 in organic phase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 48(4):415-426.
- Uddin MS, Hidajat K, Lim BG, Ching CB. 1992. Interfacial mass transfer in stripping of phenylalanine in a liquid-liquid extraction process. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 53(4):353-357.
- Wahl A. 2005. Methoden zur Analyse metabolischer Netzwerke im stationären und instationären Zustand. Dissertation; Universität Siegen.
- Wahl A, El Massaoudi M, Schipper D, Wiechert W, Takors R. 2004. Serial 13C-Based Flux Analysis of an L-Phenylalanine-Producing *E. coli* Strain Using the Sensor Reactor. *Biotechnology Progress* 20(3):706-714.
- Weatherley LR. 1994. *Engineering Processes for Bioseparations*. Oxford: Butterworth Heinemann.
- Weisser P, Kramer R, Sahm H, Sprenger GA. 1995. Functional expression of the glucose transporter of *Zymomonas mobilis* leads to restoration of glucose and fructose uptake in *Escherichia coli* mutants and provides evidence for its facilitator action. *Journal of Bacteriology* 177(11):3351-3354.
- Whitman WG. 1923. A preliminary experimental confirmation of the two-film theory of gas absorption. It seems to explain satisfactorily the well-recognized differences of absorption rate for varying concentrations. *Chem. Metall. Eng.* 29(4):146-148.
- Wiechert W. 1991. Interaktive Datenanalyse bei biotechnischen Prozessdaten. Dissertation; Universität Bonn.
- Wiechert W. 1996. Metabolische Kohlenstoff-Markierungssysteme. *Berichte des Forschungszentrum Jülich* (3301).
- Wiechert W, de Graaf AA. 1996. In vivo stationary flux analysis by 13C-labeling experiments. *Metabolic Engineering* 54:11-154.
- Wieczorek S, Brauer H. 1998a. Continuous production of citric acid with recirculation of the fermentation broth after product recovery Part 1: Continuous production of citric acid. *Bioprocess Engineering* 18(2):1-5.

- Wieczorek S, Brauer H. 1998b. Continuous production of citric acid with recirculation of the fermentation broth after product recovery Part 2: Product recovery and recirculation of the fermentation broth. *Bioprocess Engineering* 18(2):75-77.
- Wubbolts MG, Bongaerts JJ, Bovenberg RAL, Kozak S, Sprenger G, Müller M. 2005. Biosynthetic production of 4-amino-4-deoxychorismate (ADC) and [3R,4R]-4-amino-3-hydroxycyclohexa-1,5-diene-1-carboxylic acid (3,4-CHA). WO 2005/118829.
- Xu B, Jahic M, Blomsten G, Enfors SO. 1999a. Glucose overflow metabolism and mixed-acid fermentation in aerobic large-scale fed-batch processes with *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51(5):564-571.
- Xu B, Jahic M, Enfors SO. 1999b. Modeling of overflow metabolism in batch and fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress* 15(1):81-90.
- Yamada M, Elias, Matsushita K, Migita CT, Adachi O. 2003. *Escherichia coli* PQQ-containing quinoprotein glucose dehydrogenase: its structure comparison with other quinoproteins. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1647(1-2):185-192.
- Yamada M, Sumi K, Matsushita K, Adachi O, Yamada Y. 1993. Topological Analysis of Quinoprotein Glucose-Dehydrogenase in *Escherichia-Coli* and Its Ubiquinone-Binding Site. *Journal of Biological Chemistry* 268(17):12812-12817.
- Yi J, Draths KM, Li K, Frost JW. 2003. Altered Glucose Transport and Shikimate Pathway Product Yields in *E. coli*. *Biotechnology Progress* 19(5):1450-1459.
- Young IG, Gibson F. 1969. The enzymic and chemical formation of 3,4-dihydro-3,4-dihydroxybenzoic acid: a new compound derived from chorismic acid. *Biochem. Biophys. Acta* 177(1):182-183.
- Zaja S. 2001. Entwicklung analytischer Methoden zur Quantifizierung ausgewählter Intermediate des Aromatenbiosyntheseweges in rekombinaten Stämmen des Organismus *Escherichia coli*. Forschungszentrum Jülich; Diplomarbeit.
- Zeppenfeld T, Larisch C, Lengeler JW, Jahreis K. 2000. Glucose transporter mutants of *Escherichia coli* K-12 with changes in substrate recognition of IICB(Glc) and induction behavior of the *ptsG* gene. *Journal of Bacteriology* 182(16):4443-4452.

12 Anhang

12.1 Zusammensetzung von Medien und Lösungen

12.1.1 Stammlösung

FeSO ₄ * 7 H ₂ O / Natrium Citrat	7,5 g/l / 100 g/l
Vitamin B ₁ (Thiamin * HCl)	7,5 g/l
Glukosemonohydrat	770 g/l
Ampicillin	100 g/l

Alle Substanzen wurden in bidestilliertem Wasser gelöst. Das Eisensulfat mit der Natriumcitrat-Lösung wurde in einer dunklen, lichtundurchlässigen Flasche aufbewahrt. Die Thiamin- und die Ampicillinlösung wurden bei –20°C eingefroren. Die Glukoselösung wurde nach dem Autoklavieren bei Raumtemperatur aufbewahrt.

12.1.2 Spurenelementstammlösung

Al ₂ (SO ₄) ₃ * 18 H ₂ O	2 g/l
CoSO ₄ * 7 H ₂ O	0,75 g/l
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	2,5 g/l
H ₃ BO ₃	0,5 g/l
MnSO ₄ * 1 H ₂ O	24 g/l
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	3 g/l
NiSO ₄ * 6 H ₂ O	6 g/l
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	15 g/l

Die Salze wurden in bidestilliertem Wasser bei pH 1-2 gelöst (bei Zugabe von ungefähr 30 ml konzentrierten Salzsäure) und bei Raumtemperatur gelagert.

12.1.3 Vorkulturmedium

<i>Mediumbestandteil</i>	<i>Einsatz pro ein Liter Medium</i>	<i>Endkonzentration</i>
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	-	0,3 g/l
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	-	0,015 g/l
KH ₂ PO ₄	-	3 g/l
K ₂ HPO ₄	-	12 g/l
NaCl	-	5 g/l
FeSO ₄ * 7 H ₂ O / Na-Citrat	10 ml/l	0,075 g/l / 1 g/l
Spurenelementlösung	1,5 ml/l	-
Vitamin B ₁ (Thiamin * HCl)	1,0 ml/l	0,0075 g/l
L-Tyrosin	-	0,08 g/l
L-Phenylalanin	-	0,08 g/l
Ampicillin	1,0 ml/l	0,1 g/l
Glukose	-	5 g/l

Der gepufferte pH-Wert des Mediums betrug 7,2. Das Medium wurde in einer autoklavierten Vorratsflasche sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

12.1.4 Hauptkulturmedium

Die angegebenen Endkonzentrationen beziehen sich auf die Werte nach der Inokulation der Vorkultur.

<i>Mediumbestandteil</i>	<i>Einsatz pro ein Liter Medium</i>	<i>Endkonzentration</i>
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	-	3 g/l
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	-	0,015 g/l
KH ₂ PO ₄	-	3 g/l
NaCl	-	1 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	5 g/l
FeSO ₄ * 7 H ₂ O/Na-Citrat	15 ml/l	0,1125 g/l / 1,5g/l
Spurenelementlösung	1,5 ml/l	-
Vitamin B ₁ (Thiamin * HCl)	10 ml/l	0,075 g/l
L-Tyrosin	-	0,3 g/l
L-Phenylalanin	-	0,3 g/l
Ampicillin	1,0 ml/l	0,1 g/l
Glukose	-	10 g/l

Das Medium wurde vor der Fermentation in dem Bioreaktor bei 121°C 20 Minuten sterilisiert. Der Medienbestandteil FeSO₄ * 7H₂O/Na-Citrat wurde separat bei 121°C 20 Minuten sterilisiert. Die Ampicillin- und Vitamin B₁-Lösung wurden über ein Mikrofilter (0,2 µm) in die FeSO₄ * 7 H₂O/Na-Citrat Lösung steril filtriert. Diese Bestandteile wurden zusammen in den sterilen Bioreaktor gepumpt. Der pH-Wert wurde mit Hilfe der pH-Regelung des Bioreaktors auf 6,5 eingestellt.

12.1.5 LB-Medium

Bacto-Trypton	10 g/l
Hefe-Extrakt	10 g/l
Natriumchlorid	5 g/l
Agar-Agar	15 g/l
Ampicillin	0,1 g/l

Die Zugabe von Agar-Agar erfolgte ausschließlich bei der Herstellung von Agarplatten. Die Substanzen wurden in bidest. H₂O gelöst. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,2 eingestellt. Das Medium wurde 20 Min. bei 121°C autoklaviert. Beim Abkühlen wurde dem Medium Ampicillin zugegeben. Die Lagerung fand steril bei 4°C statt.

12.1.6 Zulaufmedien: Glukose und Aminosäuren

Als Substrat wurde Glukosemonohydrat in einer Konzentration von 770 g/l verwendet. Die Glukose wurde mit bidestilliertem Wasser angesetzt und frisch autoklaviert (20 min, 121°C). Als zweites Zulaufmedium diente L-Tyrosin (138 mmol/l, 25 g/l) und L-Phenylalanin (138 mmol/l, 22,8 g/l) in einer 10 %igen Ammoniaklösung. Die Lösung war autosteril. Sie wurde bei 4°C gelagert.

12.1.7 Antischaummittel, pH-Korrekturmittel und IPTG-Lösung

Als Antischaummittel wurde eine unverdünnte Lösung von Sigma 289 eingesetzt. Vor dem Einsatz wurde diese Lösung autoklaviert (20 min, 121°C).

Für die pH-Regelung wurde ein autosteriles Gemisch aus 12,5%ige Ammoniaklösung und 5 M KOH verwendet. Bei der Produktion von 2,3-*trans*-CHA wurde für die Regelung des pH-wertes eine 25%ige Ammoniaklösung verwendet.

Die verwendete IPTG-Lösung wurde in der Konzentration von 200 mM eingesetzt. Die Lösung wurde in bidestilliertem Wasser angesetzt und unsteril bei –20°C gelagert. Bei der Induktion wurde die Lösung über einen 0,2 µm Einwegfilter in den Bioreaktor eingespritzt. Die IPTG-Endkonzentration in dem Medium betrug 100 µM.

12.1.8 Puffer für die kontinuierliche Glukose-Analytik (OLGA)

Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O	8,36 g/l
KH ₂ PO ₄	2,28 g/l
NaCl	5,84 g/l

Die Salze wurden in bidestilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mit HCl auf 7,35 eingestellt und die Lösung mit 0,1 ml/l TWEEN 20 versetzt. Zum Entgasen wurde der Puffer über Nacht bei 80°C verwahrt und anschließend bei 4°C gelagert.

12.2 Chemikalienliste

Chemikalie	Firma
Aceton	Merck
$\text{Al}_2(\text{SO}_4) \cdot 18 \text{ H}_2\text{O}$	Merck
Ammoniak	Merck
Ammoniumsulfat	Merck
Ampicillin	Merck
Antischaum S289	Sigma
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	Merck
CASYTON	SchärfeSystem
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$	Merck
D_2O	Aldrich
Ethanol	Merck
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	Merck
Glukosemonohydrat	Roquette Italia S.P.A.
Glutardialdehyd 25% _{aq}	Sigma-Aldrich
Glycerin	Merck
Hefeextrakt	Merck
IPTG	Roth
Isopropanol	Merck
K_2HPO_4	Merck
KCl	Merck
KH_2PO_4	Merck
L-Phenylalanin	Merck
L-Tyrosin	Merck
Magnesiumnitrat	Fluka
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	Merck
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Merck
NaCl	Merck
NaOH	Merck
Natriumcitrat	Merck
NaH_2PO_4	Merck
NaOH	Merck
NuPage 4-12% Bis-Tris Gel	Novex
Pepton	Merck
Rinderserumalbumin, Fraktion V	Merck
Silver Xpress Silver Staining Kit	Novex
Trichloressigsäure	Merck
TOMAC	Serva
TSP	Lanchaster Synthesis
Tween 20	Merck
Vitamin B ₁ (Thiamin · HCl)	Merck
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	Merck

12.2.1 Datenblatt der chemischen und physikalischen Eigenschaften von TOMAC

Name	Trioctylmethylammoniumchlorid (TOMAC)
Summenformel	$(C_8H_{17})_2CH_3NCl$
Handelsname (Hersteller)	Serva
Dichte	0,88 kg/l
Molare Masse	404,17 g/mol
Löslichkeit in H ₂ O bei 20°C	< 1 g/l
Flammpunkt	> 110 °C
Affinität	Anionen selektiv

12.3 HPLC-Geräteparameter

12.3.1 HPLC für Aminosäuren

HPLC		Sycam
Säule	Lichrospher 100 RP 18-5 EC	Merck
Fluoreszenzdetektor	RF-535	Shimadzu

Geräteparameter der HPLC für Aminosäuren:

stationäre Phase	Lichrospher 100 RP 18-5 EC
Säule	125 X 4 mm
Eluent A	Phosphatpuffer (10mM, pH 7,2) 0,5 % Tetrahydrofuran (THF)
Eluent B	50 % Phosphatpuffer (10 mM, pH 7,2) 35 % Methanol 15 % Acetonitril
Gradient	0 min 75 % B 7 min 90 % B 8,5 min 100 % B 13,5 min 100 % B 14,5 min 75 % B
Fluss	0,9 ml/min
Probenvolumen	5 µl
Vorsäulenderivatisierung	90 s mit OPA (ortho-Phtaldialdehyd)
Säulentemperatur	40 °C
Detektor	Fluoreszenzdetektor RF-535
Wellenlänge Anregung	330 nm
Wellenlänge Emission	450 nm

12.3.2 HPLC für organische Säuren

HPLC		Sycam
Säule	Aminex HPX-87H	BioRad
DAD	UVD 340S	Sycam

Geräteparameter der HPLC für organische Säuren:

stationäre Phase	Aminex HPX-87H
Säule	300 X 7,8 mm
Eluent	0,2 N H ₂ SO ₄ (isokratisch)
Fluss	0,5 ml/min
Probenvolumen	100 µl
Säulentemperatur	40 °C
Detektor	DAD
Wellenlänge Anregung	215 nm

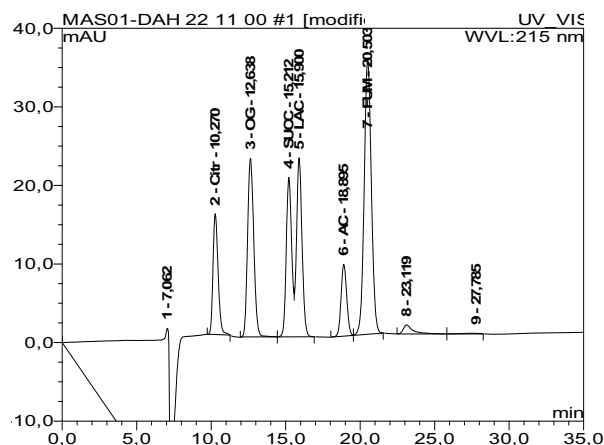


Abb.12.1: HPLC-Spektrum des Standards für organische Säuren.

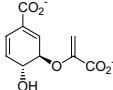
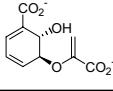
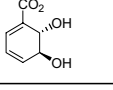
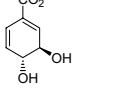
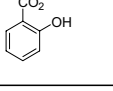
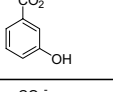
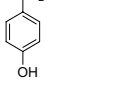
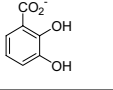
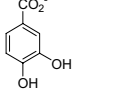
12.3.3 HPLC für Produkte, Nebenprodukte und Abbauprodukte

HPLC für 2,3- und 3,4- <i>trans</i> -CHD, Chorismat, Hydroxybenzoate:		HP Serie 1100 von Hewlett Packard
Säule :	Lichrospher C8	CS Chromatographie Service GmbH
Vorsäule	Lichrospher 100 RP-8-5EC	CS Chromatographie Service GmbH
DAD		HP

Geräteparameter:

stationäre Phase	Lichrospher C8
Säule	250 x 3 mm
Vorsäule	20 mm x 3 mm
Eluent A	0,1% (vol/vol) Trifluoressigsäure
Eluent B	100 % Methanol
Gradient	0,45 ml/min Eluent A ab 5 Minuten linearer Gradient von Eluent B bis 50% Methanol bei 40 Minuten
Probenvolumen	5 µl
Säulentemperatur	23 °C
Detektor	DAD
Wellenlänge	275 nm

Tab. 12.1: Retentionszeiten und UV-Charakteristika und LOQ-Werte der Metabolitquantifizierung durch RP-HPLC (Franke 2002).

Substanz	UV-Maxima [nm]	R _t [min]	LOQ* [mg/l] ([μM])
Chorismat 	273	25,0	9 (40)
Isochorismat 	278	21,2	4 (19)
2,3- <i>trans</i> -CHD 	278	4,4	5 (23)
3,4- <i>trans</i> -CHD 	272	6,7	6 (43)
2-Hydroxybenzoat 	202 230 295	38,0	4 (29)
3-Hydroxybenzoat 	199 289	26,2	3 (22)
4-Hydroxybenzoat 	194 150	23,3	3 (22)
2,3-Dihydroxybenzoat 	206 238 305	27,8	2 (13)
3,4-Dihydroxybenzoat 	204 253 290	27,5	2 (13)

*Quantifizierungsgrenze (LOQ) gemessen bei λ = 275 nm

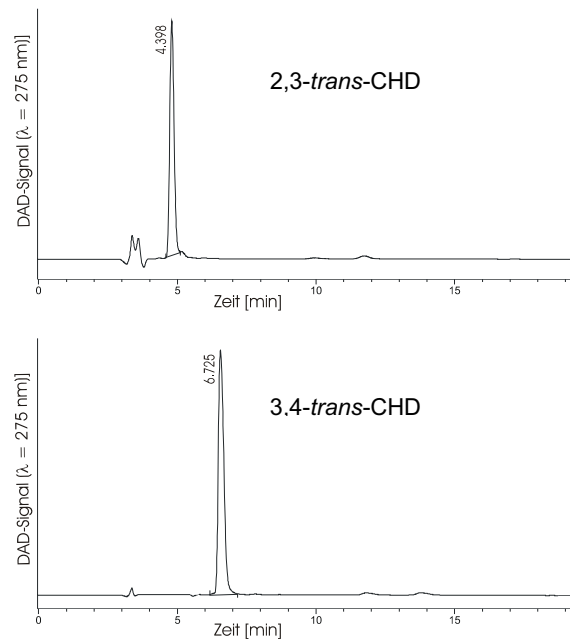


Abb. 12.2: HPLC-Chromatogramm von 2,3-*trans*-CHD (oben) und 3,4-*trans*-CHD (unten) aufgenommen bei einer Wellenlänge von $\lambda = 275$ nm.

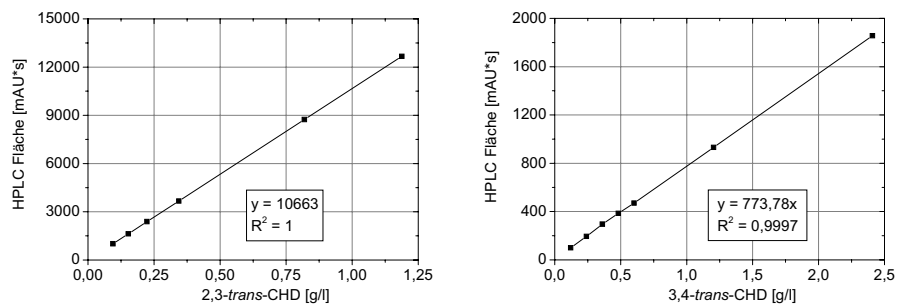


Abb. 12.3: Links: HPLC-Kalibriergerade für das Produkt 2,3-*trans*-CHD. Rechts: HPLC-Kalibriergerade für das Produkt 3,4-*trans*-CHD (Moch 2003).

12.4 ¹H-NMR-Geräteparameter

PFT-NMR-Spektrometer Bruker Physik AG		
Superconducting Ultrashield™ NMR Magnet System	Spule Nr. BZH 14/300/70A	

Technische Daten:

Proton Frequenz	300 MHz
Zentrales Feld	7,05 T
Spuleninduktion	14,4 Henry
Magnetische Energie	52 kJ
Magn. Zentrum von der Spitze der Flanke	459 mm
Hauptspulenerhitzer	120 mA
Shim Spulenerhitzererhitzer	150 mA

Tab. 12.2: ¹H-NMR-Daten der gemessenen Substanzen (Zaja 2001).

Substanz	¹ H-NMR-Daten (D ₂ O)	Signal zur Quantifizierung	Daten aus:
2,3- <i>trans</i> -CHD	δ 4,5 (s, 1H); δ 4,6 (s, 1H); δ 6 (s, 1H); δ 6,3 (s, 1H); δ 6,6 (s, 1H)	δ 6 (s, 1H); δ 6,3 (s, 1H); δ 6,6 (s, 1H)	Fermentationslösung
3,4- <i>trans</i> -CHD	δ 4,5 (s, 1H); δ 4,6 (s, 1H); δ 6 (s, 1H); δ 6,3 (s, 1H); δ 6,6 (s, 1H)	δ 6 (s, 1H); δ 6,3 (s, 1H); δ 6,6 (s, 1H)	Standardlösung
Acetat	δ 1,9 (s, 3H)	δ 1,9	Standardlösung
Chorismat	δ 5,5 (s, 2H), δ 5,95 (s, 1H), δ 6,05 (s, 1H), δ 6,25 (s, 1H), δ 6,35 (s, 1H), δ 6,95 (s, 1H)	nicht detektiert	Standardlösung
Glukonat	δ 4,5 (s, 1H); δ 4,6-5,5 (Multiplet)	δ 6 (s, 1H)	Standardlösung
L-Alanin	δ 1,48	δ 1,48	Standardlösung
L-Phenylalanin	δ 3,1 (dd, J=7,0; 6,0 Hz, 1H), δ 3,23 (dd, J= 10,0; 5,0 Hz, 1H), δ 3,95 (dd, J=5,0; 6,0 Hz, 1H), δ 7,45 (m, Aromatenresonanz, 5 H)	δ 3,1; δ 3,23	Standardlösung
Shikimat-3-P	δ 2,19 (dd, J=6,2; 18,4 Hz, 1H), δ 2,69 (dd, J= 4,9; 18,1 Hz, 1H), δ 3,84 (dd, J= 4,0; 8,1 Hz, 1H), δ 6,55 (t, J=1,8 Hz, 4H)	nicht detektiert	Literatur
Shikimat	δ 2,2 (ddd, J=18,0; 6,6; 2 Hz, 1H), δ 2,75 (dd, J=18,0; 5,3 Hz, 1H), δ 4,03 (dd, J=6,6; 5,3 Hz, 1H), δ 4,4 (d, J=4,0 Hz, 1H), δ 6,7 (dd, J= 4,0; 1,6 Hz, 1H)	δ 2,75; δ 4,4	Standardlösung

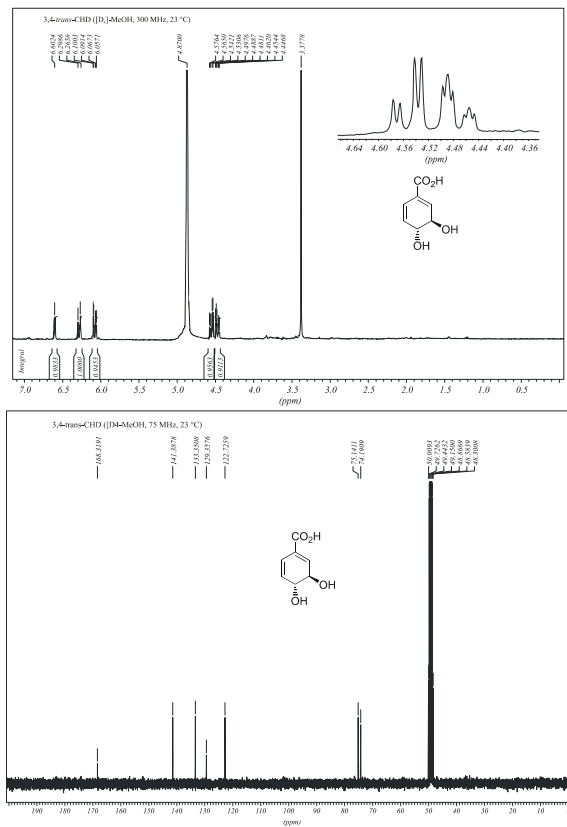


Abb. 12.3: ^1H -NMR-Spektrum der Fermentationslösung des Stammes F82pC22. Die Daten der einzelnen Signale sind der Tabelle 12.2 zu entnehmen.

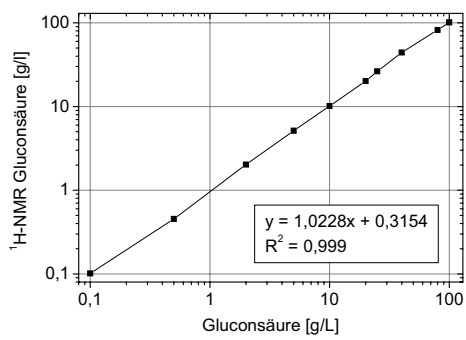


Abb. 12.4: Kalibriergerade für die Glukonsäure ermittelt mittels ^1H -NMR.

12.5 Geräteliste

Tab. 12.3: Geräte für die Fermentation in Schüttelkolben.

<i>Schüttelkolbenanlage</i>		
Schüttelkolbeninkubator	3033	GLF

Tab. 12.4: Geräte für die 7,5 Liter Fermentation im Zulaufverfahren (Kap. 4.3.1).

Bioreaktor und Peripherie		
Bioreaktor	L 1523	Bioengineering
Sauerstoffelektrode	12 mm OxyProbe	Broadley James
pH-Elektrode	F-615-B130-DH	Broadley James
A/D Wandler	SMP Interface	Siemens
Abgasanalytik	Binos 100 2M	Fisher-Rosemount
Dosiertechnik	YFC 01Z	Sartorius AG
Glukoseanalytik	OLGA GL2b	IBA GmbH
Permeatabtrennung	UFP-500-4A	Schleicher&Schüll
Messdatensicherung	LabVIEW	National Instruments
Prozesskontrolle	LabVIEW	National Instruments
Pumpen	U101; U501; U504	Watson Marlow
Pumpenschläuche	Mapren	Watson Marlow
Waagen	IP 65	Sartorius AG
Waage	3807 MP	Sartorius AG

Tab. 12.5: Geräte für die 42 Liter Fermentation im Zulaufverfahren (Kap. 4.3.2).

Bioreaktor und Peripherie		
Bioreaktor	L 1523	Bioengineering
Sauerstoffelektrode	12 mm OxyProbe	Broadley James
pH-Elektrode	F-615-B130-DH	Broadley James
A/D Wandler	SMP Interface	Siemens
Abgasanalytik	Binos 100 2M	Fisher-Rosemount
Dosiertechnik	YFC 01Z	Sartorius AG
Glukoseanalytik	TRACE	TRACE
Permeatabtrennung	UFP-500-4A	Schleicher&Schüll
Messdatensicherung	LabVIEW	National Instruments
Prozesskontrolle	LabVIEW	National Instruments
Pumpen	U101; U501; U504	Watson Marlow
Pumpenschläuche	Mapren	Watson Marlow
Waagen	IP 65	Sartorius AG
Waage	3807 MP	Sartorius AG

Tab. 12.6: Geräte für die 300 Liter Fermentation im Zulaufverfahren (Kap. 4.3.3).

Bioreaktor und Peripherie		
Bioreaktor 30 Liter		Chemap AG
Bioreaktor 300 Liter		Chemap AG

Sauerstoffelektrode	12 mm OxyProbe	Broadley James
pH-Elektrode	F-615-B130-DH	Broadley James
A/D Wandler	SMP Interface	Siemens
Abgasanalytik	Binos 100 2M	Fisher-Rosemount
Messdatensicherung	LabVIEW	National Instruments
Prozesskontrolle	LabVIEW	National Instruments
Pumpen	U101; U501; U504	Watson Marlow
Pumpenschläuche	Mapren	Watson Marlow
Waagen	IP 65	Sartorius AG
Waage	3807 MP	Sartorius AG

Tab. 12.7: Geräte zur Analytik.

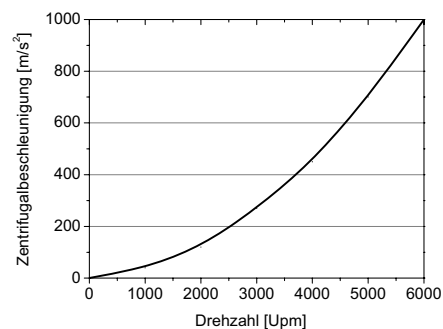
Trockenschrank		Memmert GmbH
Photometer	UV 160	Shimadzu
Zentrifuge	Diverse	Beckmann; Heaereus
Spritzenfilter	0,2 µm	Schleicher&Schüll
Glukosemessung	Accutrend Sensor	Roche Diagnostics
NMR	AMX 300	Bruker Physik AG
Vakuumzentrifuge (NMR)	Speed Vac Concentrator	Backofer
Schüttelkolbeninkubator	3033	GLF

Geräte zur Reaktiv Extraktion mit technischen Daten

Flüssig-Flüssig-Extraktoren der Firma CINC Model V-2

Technische Daten:

Rotor Größe	508 mm
Durchsatz	max. 2 l/min
Druck max.	3,1 bar
Gewicht	11,4 kg
Höhe des Arbeitsvolumens	2300 mm
Höhe (mit Motor)	6400 mm
Auflagefläche	2300 mm x 2300 mm
Anschlüsse (Einlaß/Auslaß)	3/8" / 3/8"
Arbeitsspannung	220 V



Geräteparameter für on line Glukosemessung mittels TRACE

Signalausgabe	analog
Verstärkung	2000 nA
Messbereich des Sensors	5-40 g/l
Kalibrierlösung A	4 g/l
Kalibrierlösung B	20 g/l
Messintervall	0
Rekalibrierung	je 50 Proben
Messungen pro Standard	2
Temperatur	25°C

Messzyklus:

Equilibrierung	30 sek.
Vorlauf	240 sek.
Basislinie 1	2 sek.
Akkumulation Diffusionsmodul	30 sek.
Akkumulation Dialysesonde	45 sek.
Peakdetektionsfenster	60 sek.
Basislinie 2	48 sek.

Tab. 12.8 Software für die Auswertung und Erfassung der Daten.

<i>Programm</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Zweck</i>
Chromeleon	Dionex	HPLC Auswertung
Excel	Microsoft Inc.	Auswertung
Fed Batch Pro	DASGIP AG	Datenerfassung und Steuerung
Lab View	National Instruments Corp.	Datenerfassung
Origin	Microcal Software Inc.	Auswertung

12.6 Fehlerbetrachtung

Bei der Datenerfassung, Bearbeitung und der analytischen Messung der Proben muss eine Abweichung der Meßwerte angenommen werden. Die Auswertung der Ergebnisse ist nur unter der Annahme folgender Abweichungen möglich:

- Auf das Volumen des Reaktors wurde aufgrund der Verdunstung, verursacht durch die Belüftung und die Probenahme, ein Fehler von 5 % angenommen. Im Rahmen der Reaktivextraktionsexperimente wurde aufgrund der kontinuierlichen Entnahme der Fermentationsbrühe ein Fehler von bis zu 10% angenommen.
- Vor jeder Fermentation wurde eine Kalibrierung des Abgasanalysegerätes durchgeführt. Dadurch konnten die Messwerte des Abgasanalysegerätes auf einem Fehler von 5 % reduziert werden.
- Die Messwerte der pH- und pO₂-Elektroden in dem Reaktor wurden mit einem Fehler von je 2 % abgeschätzt.
- Bei den für den Zulauf der Kohlenstoffquelle, Ammoniaklösung und Aminosäurelösung eingesetzten Waagen wurde eine Abweichung von 2% angenommen. Die Zulaufpumpen wurden mit einem Fehler von 3% geschätzt.
- Die Berechnung der volumetrischen Sauerstoffverbrauchsrate basierte auf die Prozessparameter Begasungsrate, Flüssigkeitsvolumen und Abgasanalytik. Für die Messwerte wurde eine Gesamtabweichung von maximal 10 % angenommen.
- Die Messwerte der semi-kontinuierlichen Bestimmung der Glukosekonzentration mit den OLGA- und Trace-Geräten wurden mit einem relativen Fehler von maximal 5 % behaftet. Die Messabweichung wurde trotz der Mehrfachbestimmung und der wiederholten Rekalibrierung hauptsächlich durch die Abnahme der enzymatischen Aktivität des Biosensors verursacht.

- Bei dem Einsatz des accutrend sensors (Firma Boehringer Mannheim) (Messbereich 0,1 bis 5,5 g/l) für die Bestimmung der off-line Glukosemesswerte wurde ein Messfehler von 5 % angenommen.
- Die optische Dichte der Fermentationsbrühe wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 620 nm bestimmt. Bei unverdünnten Proben wurde eine Abweichung von 5% geschätzt. Durch die Verdünnung der höher konzentrierten Proben wurde ein Fehler von 10% angenommen.
- Bei der Bestimmung der Biotrockenmasse aus Fermentationsproben wurde eine durch die Antischaummittel verursachte Abweichung von bis zu 10 % angenommen.
- Die Produkt-, Aminosäuren-, Nebenproduktkonzentrationen wurde mittels HPLC quantitativ bestimmt. Bei den Messungen wurde eine Referenzbestimmung durchgeführt. Der Messfehler betrug ca. 3 %. Aufgrund notwendiger Verdünnungen wurde ein Fehler von 5 % angenommen.
- Die Intermediate der Aromaten-Biosynthese und die Glukonsäure wurden mit Hilfe der ^1H -NMR quantifiziert. Die Fermentationsproben wurden im Verhältnis 1:2 verdünnt gemessen. Die Abweichungen betrugen 5%. Die Nachweisgrenze lag bei ca. 3 mmol/l.

Datennachbearbeitung

Bei der Berechnung der kinetischen Parameter und der Kohlenstoffbilanz trat durch die Addition der einzelnen Messabweichungen ein Fehler auf, der die Aussagekraft der berechneten Raten und Bilanzen einschränkte. Aufgrund dessen wurden für die Berechnungen dieser Parameter die Verläufe der Biotrockenmasse-, der Produkt-, Nebenprodukt-, Kohlendioxidkonzentration und des Reaktorvolumens mittels einer Ausgleichskurve idealisiert. Dafür wurde ein nichtparametrischer kubischer Ausgleichsspline eingesetzt (Sobol 1991; Sobol 1994). Mit Hilfe des Ausgleichssplines wurde zwischen zwei Messpunkten ein Polynom berechnet, was zu einer stetigen Funktion führte. Bei allen Experimenten und für alle Verläufe wurde eine Gewichtung von 0,1 eingesetzt.

12.7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Schematische Darstellung des interdisziplinären Charakters und der Vielzahl der Anwendungsfelder der Biotechnologie.	2
Abb. 3.1:	Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>E. coli</i>	7
Abb. 3.2:	Schematische Darstellung der Glukoseverwertung in <i>E. coli</i> . Die über das PT-System aufgenommene Glukose wird durch die Glykolyse, den Pentose-Phosphat-Weg und den Tricarbonsäure-Zyklus (TCA-Zyklus) verwertet.....	9
Abb. 3.3:	Schematische Darstellung der Aromaten-Biosynthese bis Chorismat und der Biosynthese der Produkte 2,3- <i>trans</i> -CHA, 2,3- und 3,4- <i>trans</i> -CHD.	11
Abb. 3.4:	Die chemische Struktur der Produkte 2,3- <i>trans</i> -CHD (links), 3,4- <i>trans</i> -CHD (Mitte) und 2,3- <i>trans</i> -CHA (rechts).....	14
Abb. 3.5:	Biosynthesewege zu 2,3- <i>trans</i> -CHA, 2,3- und 3,4- <i>trans</i> -CHD ausgehend von dem Intermediat Chorismat.....	15
Abb. 3.6:	Chemische Formel des Carriers TOMAC.....	21
Abb. 3.7:	Modell der Reaktivextraktion von Anionen (R-COO ⁻) mittels zweier Flüssig-Flüssig-Extraktoren mit dem lipophilen Gegenion (z.B. TOMAC, T ⁺) aus einem angereicherten Fermentationsüberstand.....	24
Abb. 3.8:	Darstellung der Phasengrenzfläche. Bei dem Transport von CHD in die organische Phase kommt es zur Bildung von Mizellen.....	25
Abb. 3.9:	Vereinfachte Darstellung des Stoffübergangs von CHD-Molekülen zwischen der wässrigen und der organischen Phase bei der Reaktivextraktion.....	26
Abb. 3.10:	Schematische Darstellung des Flüssig-Flüssig-Extraktors der Firma CINC.....	27
Abb. 3.11:	Schema eines idealen Rührreaktors.....	30
Abb. 3.12:	Links: Grafische Darstellung des Prinzips der ¹³ C-Stoffflussanalyse nach Wiechert. Rechts: Übergang der intrazellulären Markierung aus dem isotopisch instationären Markierungszustand in einen isotopisch stationären Markierungszustand.	35
Abb. 4.1:	Links: Abbildung der Dialysesonde der Process Trace-Technik. Rechts: Abbildung des on-line Analysesystems Process Trace.....	42
Abb. 4.2:	Graphische Darstellung des theoretischen Verlaufs der Fermentation im Zulaufverfahren (Fed-Batch).....	43
Abb. 4.3:	Schematischer Aufbau des Fermentationsprozesses im 7,5 Liter Bioreaktor mit der Peripherie zur on-line Glukoseregulierung.....	44
Abb. 4.4:	Foto des 7,5 Liter Bioreaktors mit dem integrierten OLGA-System (oben links) zur on-line Glukosemessung.....	45
Abb. 4.5:	Schematischer Aufbau des Fermentationsprozesses im 42 Liter Maßstab.....	46
Abb. 4.6:	Schematischer Aufbau des Fermentationsprozesses im 300 Liter Chemap Bioreaktor.....	48
Abb. 4.7:	Foto des 300 Liter Bioreaktors.....	48
Abb. 4.8:	Schema des Reaktoraufbaus beim ¹³ C-Markierungsexperiment.....	49
Abb. 4.9:	Foto des Reaktoraufbaus beim ¹³ C-Markierungsexperiment.....	50
Abb. 4.10:	Schematische Darstellung der Anlage zur <i>in situ</i> Produktgewinnung. An den 42 Liter Bioreaktor ist eine Peripherie zur Zell- und Proteinrückhaltung und zur Reaktivextraktion angeschlossen.....	51
Abb. 4.11:	Links: Foto des 42 Liter Bioreaktors mit dem angeschlossenen Mikrofiltrationsmodul MF zur sterilen kontinuierlichen Biomasseabtrennung für die <i>in situ</i> Reaktivextraktion. Rechts: Foto der Flüssig-Flüssig-Extraktoren zur on-line Gewinnung von 2,3- und 3,4- <i>trans</i> -CHD aus dem Fermentationsüberstand.....	52
Abb. 5.1:	Verlauf der Glukosekonzentration (links) und der Zuflussraten der Aminosäurelösung (rechts) während der 7,5 Liter Fed-Batch Fermentation mit dem Stamm F82pC20.....	58
Abb. 5.2:	Links: Grafische Darstellung des Verlaufes der Konzentration und der Gesamtmenge des Produktes 2,3- <i>trans</i> -CHD (7,5 Liter Fed-Batch Fermentation). Rechts: Vereinfachte Darstellung der Aromaten-Biosynthese in dem Produktionsstamm <i>E. coli</i> F82pC20.....	59
Abb. 5.3:	Verlauf der Konzentrationen der aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin (links) sowie Verlauf der spezifischen Aminosäure-Verbrauchsrate.....	60
Abb. 5.4:	Links: Grafischer Verlauf der Biomassekonzentration und der Wachstumsrate. Rechts: Darstellung der Nebenproduktbildung.....	60
Abb. 5.5:	Links: Verlauf der differentiellen und integralen Selektivität. Rechts: Grafische Darstellung der differentiellen Produktivität und der Raum-Zeit-Ausbeute.....	60

Abb. 5.6: Logarithmische Auftragung des Verlaufes der differentiellen spezifischen Glukoseverbrauchsrate und der spezifischen 2,3- <i>trans</i> -CHD-, Glukonsäure- und CO ₂ -Bildungsraten.	61
Abb. 5.7: Darstellung der integralen Kohlenstoffbilanz bei der 2,3- <i>trans</i> -CHD-Biosynthese mit dem Produktionsstamm <i>E. coli</i> F82pC20.....	62
Abb. 5.8: Links: Verlauf der Konzentrationen und der Gesamtmenge des Produktes 2,3- <i>trans</i> -CHD bei Fed-Batch Fermentation mit F82pC20 mit dem Aminosäurezulauffaktor m=4. Rechts: Konzentrationsverläufe der gebildeten Nebenprodukte Acetat und Glukonsäure.	63
Abb. 5.9: Links: Konzentrationsverlauf der aromatischen Aminosäuren. Rechts: Darstellung der L-Phenylalanin und L-Tyrosin spezifischen Verbrauchsrate.	63
Abb. 5.10: Links: Verlauf der Biomassekonzentration und der Wachstumsrate (7,5 Liter; <i>E. coli</i> F82pC20; m=4). Rechts: Vergleich der Verläufe der Aminosäurezulauffraten bei Experimenten mit einem Zulauffaktor von m=2 und m=4.	64
Abb. 5.11: Logarithmische Darstellung des Verlaufes der differentiellen spezifischen Glukoseverbrauchsrate und der spezifischen 2,3- <i>trans</i> -CHD-, Glukonsäure- und CO ₂ -Bildungsraten.	64
Abb. 5.12: Verlauf der differentiellen und integralen Selektivität (links), der Produktivität und der Raum-Zeit-Ausbeute (rechts).	65
Abb. 5.13: Links: Verlauf der Konzentration und der Gesamtmenge von 2,3- <i>trans</i> -CHD bei der 7,5 Liter Fed-Batch Fermentation mit dem Produktionsstamm <i>E. coli</i> F111pC20. Rechts: Vereinfachte Darstellung der Aromaten-Biosynthese.....	66
Abb. 5.14: Verlauf der Aminosäurenkonzentrationen (links) und der spezifischen Verbrauchsrate von L-Tyrosin und L-Phenylalanin (rechts).	66
Abb. 5.15: Verlauf der Biomassekonzentration und der Wachstumsrate (links) sowie Konzentrationsverlauf von Acetat und Glukonsäure (rechts).	67
Abb. 5.16: Links: Grafische Darstellung des Verlaufes des differentiellen und integralen substratbezogenen Produktausbeutekoeffizienten. Rechts: Verlauf der Produktivität und der Raum-Zeit-Ausbeute.	67
Abb. 5.17: Logarithmische Auftragung des Verlaufes der differentiellen Glukoseverbrauchsrate und der 2,3- <i>trans</i> -CHD- und CO ₂ -Bildungsraten während der Fed-Batch Fermentation mit <i>E. coli</i> F111pC20.	68
Abb. 5.18: Links: Verlauf der 2,3- <i>trans</i> -CHD-Konzentration und der -Gesamtmenge. Rechts: Verlauf der Acetatkonzentration (300 Liter Fed-Batch; <i>E. coli</i> F111pC20).	69
Abb. 5.19: Verlauf der L-Tyrosin- und L-Phenylalaninkonzentration (links) und Darstellung der Biomassekonzentration und der Wachstumsrate (rechts) (300 Liter; <i>E. coli</i> F111pC20).	69
Abb. 5.20: Verlauf der differentiellen und integralen Selektivität (links) und der Produktivität und der integralen Raum-Zeit-Ausbeute (rechts) (300 Liter; <i>E. coli</i> F111pC20).	69
Abb. 5.21: Verlauf der differentiellen und integralen spezifischen Produktbildungsrate (links), der differentiellen Glukoseverbrauchsrate und des gesamten Glukoseverbrauchs (rechts) (300 Liter; <i>E. coli</i> F111pC20).	70
Abb. 5.22: Darstellung der integralen Kohlenstoffbilanz während der 300 Liter Fed-Batch Fermentation mit dem Produktionsstamm <i>E. coli</i> F111pC20.	70
Abb. 5.23: Das Produkt 2,3- <i>trans</i> -CHD kann als Ausgangspunkt für die chemische Synthese von Valineamin dienen. Valineamin fungiert als eine funktionelle Gruppe der Acarbose.	71
Abb. 5.24: Fed-Batch Fermentationen mit dem Stamm F82pC20 zur Produktion von 2,3- <i>trans</i> -CHD mit unterschiedlichen Aminosäurezulauffraten. Links: Vergleich der Wachstumsraten. Rechts: Gegenüberstellung der Wachstumsraten und der Glukonsäurebildungsraten.	72
Abb. 5.25: Fed-Batch Fermentationen von 2,3- <i>trans</i> -CHD mit unterschiedlichen Aminosäurezulauffraten (7,5 Liter; <i>E. coli</i> F82pC20). Links: Gegenüberstellung der spezifischen 2,3- <i>trans</i> -CHD-Bildungsrate. Rechts: Vergleich der Verläufe spezifischer Glukonsäurebildungsraten.	73
Abb. 5.26: Gegenüberstellung der spezifischen 2,3- <i>trans</i> -CHD- und der Glukonsäurebildungsraten (links) sowie Gegenüberstellung der Produkt- und der Nebenproduktkonzentration (rechts) bei Fed-Batch Fermentationen von 2,3- <i>trans</i> -CHD mit unterschiedlichen Aminosäurezulauffraten.	73
Abb. 5.27: Verlauf der differentiellen spezifischen Glukoseverbrauchsrate und der spezifischen 2,3- <i>trans</i> -CHD-, Glukonsäure- und CO ₂ -Bildungsrate bei der Fermentation mit dem Stamm F82pC20. Dargestellt ist der Zeitraum zwischen der Prozessstunde 10 und	

30. Markiert ist der Zeitraum ab der Induktion der Glukonsäurebiosynthese bis zur Reduktion der Produktbildung.....	74
Abb. 5.28: Darstellung der differentiellen Kohlenstoffbilanz bei der 2,3- <i>trans</i> -CHD-Biosynthese mit dem Produktionsstamm <i>E. coli</i> F82pC20. Dargestellt ist die Phase kurz vor dem Start der Glukonsäureakkumulation (Prozesszeit 13) und während der maximalen Glukonsäuresynthese (Prozesszeit 21).....	75
Abb. 5.29: Vereinfachte Darstellung des möglichen Biosyntheseweges in <i>E. coli</i> zur Bildung von Glukonsäure ausgehend von Glukose. Die Bildung der Glukonsäure wird durch das PQQ-abhängige Enzym Glukose-Dehydrogenase (EC 1.1.99.17) katalysiert.	76
Abb. 5.30: Chemische Formel des Moleküls PQQ.....	77
Abb. 5.31: Links: Differenz zwischen den biomassespezifischen Produktbildungsrate bei Fermentationen mit dem Stamm F82pC20 und dem Stamm F111pC20 mit der Deletion des Gens <i>gcd</i> . Rechts: Differenz zwischen den differentiellen substratbezogenen Produktausbeutekoeffizienten.....	79
Abb. 5.32: Gegenüberstellung der Wachstumsrate (μ), der Substratverbrauchsrate (σ) und der Produktbildungsrate (π) bei der Fermentation mit dem 2,3- <i>trans</i> -CHD-Produktionsstamm F111pC20 (links) und dem 3,4- <i>trans</i> -CHD-Produktionsstamm F82pC22 (rechts).	80
Abb. 5.33: Links: Vergleich der 2,3- <i>trans</i> -CHD- und Acetat-Akkumulation bei Fed-Batch Fermentationen im 7,5 und 300 Liter Maßstab. Rechts: Gegenüberstellung der maximalen Selektivität und Raum-Zeit-Ausbeute.....	82
Abb. 6.1: Links: Verlauf der Konzentration und der Gesamtmenge des Produktes 3,4- <i>trans</i> -CHD bei der Fed-Batch Fermentation mit dem Produktionsstamm <i>E. coli</i> F82pC22. Rechts: Vereinfachte Darstellung der Aromaten-Biosynthese. Die überexprimierten Gene sind grau markiert.....	83
Abb. 6.2: Grafische Darstellung der Aminosäurekonzentrationen (links) und der spezifischen Verbrauchsrate der Aminosäuren L-Tyrosin und L-Phenylalanin.....	84
Abb. 6.3: Links: Verlauf der Biomassekonzentration und der Wachstumsrate. Rechts: Verlauf der Nebenproduktkonzentrationen.....	84
Abb. 6.4: Verlauf der differentiellen und integralen Selektivität (links) und grafische Darstellung der differentiellen Produktivität und der integralen Raum-Zeit-Ausbeute (rechts).....	85
Abb. 6.5: Links: Verlauf der differentiellen biomassespezifischen Bildungsraten des Produktes 3,4- <i>trans</i> -CHD, des Nebenproduktes 4-Hydroxy-Benzoat und der Intermediate der Aromaten-Biosynthese Chorismat, Shikimat-3-Phosphat und Shikimat.....	85
Abb. 6.6: Fed-Batch Fermentation mit dem Produktionsstamm <i>E. coli</i> F143pC22. Links: Darstellung der Konzentration und der Gesamtmenge des gebildeten Produktes 3,4- <i>trans</i> -CHD. Rechts: Vereinfachte Darstellung der Aromaten-Biosynthese.	86
Abb. 6.7: Links: Biomassekonzentration und Wachstumsrate. Rechts: Verlauf der Nebenproduktkonzentrationen.....	87
Abb. 6.8: Links: Verlauf der differentiellen und integralen Selektivität. Rechts: Darstellung der Produktivität und der Raum-Zeit-Ausbeute.....	87
Abb. 6.9: Links: Verlauf der differentiellen biomassespezifischen Bildungsraten des Produktes 3,4- <i>trans</i> -CHD, des Nebenproduktes 4-Hydroxy-Benzoat und der Intermediate der Aromaten-Biosynthese Chorismat, Shikimat-3-Phosphat und Shikimat.....	88
Abb. 6.10: Fed-Batch Fermentation im 300 Liter-Maßstab mit dem Produktionsstamm <i>E. coli</i> F82pC22 zur Produktion von 3,4- <i>trans</i> -CHD. Links: Darstellung der Konzentrationen und der Gesamtmenge des Produktes 3,4- <i>trans</i> -CHD. Rechts: Foto eines Behälters mit einem Kilogramm des Produktes 3,4- <i>trans</i> -CHD mit einer Reinheit von $\geq 99\%$	89
Abb. 6.11: Grafische Darstellung der Aminosäurekonzentrationen (links) und Verlauf der Biomassekonzentration und der Wachstumsrate (rechts) (300 Liter; <i>E. coli</i> F82pC22).....	89
Abb. 6.12: Links: Differentielle und integrale Selektivität. Rechts: Verlauf der Produktivität und der integralen Raum-Zeit-Ausbeute (300 Liter Fed-Batch Fermentation; <i>E. coli</i> F82pC22).....	90
Abb. 6.13: Links: Verlauf der differentiellen und integralen spezifischen Produktbildungsrate. Rechts: Verlauf der differentiellen Glukoseverbrauchsrate und des gesamten Glukoseverbrauchs (300 Liter Fed-Batch Fermentation; <i>E. coli</i> F82pC22).....	90
Abb. 6.14: ^{13}C -Markierungsexperiment mit dem Produktionsstamm <i>E. coli</i> F82pC22. Links: Verlauf der 3,4- <i>trans</i> -CHD-Konzentration. Rechts: Gegenüberstellung der Verläufe des Master- und Sensor-Bioreaktors.....	91

Abb. 6.15: Gegenüberstellung der Verläufe der Konzentrationen der Nebenprodukte Shikimat-3-Phosphat (links) und Chorismat (rechts) im Master- und Sensor-Reaktor (<i>E. coli</i> F82pC22)	92
Abb. 6.16: Links: Verläufe der Produktivität im Master- und Sensor-Reaktor während der drei ¹³ C-Markierungsphasen. Rechts: Grafische Darstellung der Raum-Zeit-Ausbeute (<i>E. coli</i> F82pC22)	92
Abb. 6.17: Verlauf der differentiellen spezifischen Produktbildungsrate (links) und der differentiellen Selektivität (rechts) im Master- und Sensor-Reaktor während der ¹³ C-Markierungsphasen (<i>E. coli</i> F82pC22)	93
Abb. 6.18: Kohlenstoffverteilung während eines Master-Sensor-Experiments. Links: Bilanz im Master-Reaktor. Rechts: Darstellung der Verteilung während der drei Experimente im Sensor-Reaktor (<i>E. coli</i> F82pC22)	94
Abb. 6.19: Fed-Batch Fermentationen mit den 3,4- <i>trans</i> -CHD Überproduzenten F82pC22 und F143pC22. Links: Gegenüberstellung der Konzentrationsverläufe des Nebenproduktes Shikimat-3-Phosphat. Rechts: Vergleich der biomassespezifischen 3,4- <i>trans</i> -CHD-, Shikimat-3-Phosphat- und Chorismatbildungsraten	96
Abb. 6.20: Vergleich der Konzentrationsverläufe der Nebenprodukte Chorismat (links) und 4-Hydroxy-Benzoat (rechts) bei Fed-Batch Fermentationen mit den Produktionsstämmen F82pC22 und F143pC22.	97
Abb. 6.21: Gegenüberstellung der biomassespezifischen differentiellen Produktbildungsraten bei Fed-Batch Fermentationen von L-Phenylalanin mit <i>E. coli</i> 4pF81, von 2,3- <i>trans</i> -CHD mit <i>E. coli</i> F111pC20 und von 3,4- <i>trans</i> -CHD mit <i>E. coli</i> F82pC22	98
Abb. 6.22: Stöchiometrisches Modell der optimalen theoretischen intrazellulären Flüsse: für die maximale CHD-Ausbeute bei nicht-wachsenden Zellen (links) und bei einem neutralen Nettofluss zwischen Phosphoenolpyruvat und Pyruvat, katalysiert durch die Enzyme Pyruvat Kinase (Gen <i>pyk</i>) und PEP-Synthase (Gen <i>pps</i>) (rechts).	101
Abb. 7.1: Links: 2,3- <i>trans</i> -CHA Gesamtmenge und Konzentration während der 300 Liter Fed-Batch Fermentation mit dem Produktionsstamm <i>E. coli</i> KB532pC27. Rechts: Darstellung der Nebenproduktkonzentration.	103
Abb. 7.2: Links: Verlauf der Biomassekonzentration und der Wachstumsrate bei der Produktion von 2,3- <i>trans</i> -CHA. Rechts: Verlauf der Aminosäurekonzentrationen (300 Liter Fed-Batch Fermentation; <i>E. coli</i> KB532pC27)	104
Abb. 7.3: Grafische Darstellung der differentiellen und integralen biomassespezifischen Produktbildungsrate (links) und der Raum-Zeit-Ausbeute (rechts) (300 Liter; <i>E. coli</i> KB532pC27)	104
Abb. 7.4: Links: Gegenüberstellung der biomassespezifischen integralen Produktbildungsrate und der maximalen Acetatakkumulation bei der 300 Liter Fed-Batch Fermentation von 2,3- <i>trans</i> -CHA und 2,3- <i>trans</i> -CHD.	105
Abb. 8.1: Vergleich der integralen Extraktionsraten von 3,4- <i>trans</i> -CHD bei off-line Reaktivextraktionsexperimenten im Schütteltrichter-Maßstab.	108
Abb. 8.2: Abhängigkeit des 3,4- <i>trans</i> -CHD-Extraktionsgrades von der NaCl-Konzentration in der Akzeptorphase	109
Abb. 8.3: Grafische Darstellung eines der off-line 3,4- <i>trans</i> -CHD Reaktivextraktionsexperimente	111
Abb. 8.4: Grafische Darstellung des off-line 2,3- <i>trans</i> -CHD Reaktivextraktionsexperimentes. Aufgetragen sind die Massenbilanz und die Verläufe der 2,3- <i>trans</i> -CHD-Konzentration der Akzeptorphase, der Donorphase und der Lösungsmittelphase.	113
Abb. 8.5: Verlauf der 2,3- <i>trans</i> -CHD-Extraktionsraten der Donor-, Lösungsmittel- und Akzeptorphase bei einem off-line Reaktivextraktionsexperiment.	113
Abb. 8.6: Grafische Darstellung der Konzentrationsverläufe während einer Fed-Batch Fermentation und der <i>in situ</i> Reaktivextraktion von 2,3- <i>trans</i> -CHD.	115
Abb. 8.7: Verlauf der Biomassekonzentration und der Sauerstofftransferrate (OTR) während der Fed-Batch Fermentation und der <i>in situ</i> Reaktivextraktion von 2,3- <i>trans</i> -CHD.	116
Abb. 8.8: Verlauf der Produktivität von 2,3- <i>trans</i> -CHD während der <i>in situ</i> Produktgewinnung sowie Verlauf der volumetrischen Extraktionsrate	117
Abb. 8.9: Links: Verläufe der biomassespezifischen Produktbildungsrate während der 2,3- <i>trans</i> -CHD-Fermentation und der <i>in situ</i> Produktabtrennung sowie Verlauf der Extraktionsrate. Rechts: Grafische Darstellung der 2,3- <i>trans</i> -CHD-Gesamtmenge.	118
Abb. 8.10: Fed-Batch Fermentation in Verbindung mit der <i>in situ</i> Reaktivextraktion des Moleküls 3,4- <i>trans</i> -CHD.	120
Abb. 8.11: Gegenüberstellung der Extraktionsraten in die Akzeptorphase bei der off-line Reaktivextraktion von 2,3- und 3,4- <i>trans</i> -CHD.	122

Abb. 8.12: Die chemische Struktur der Produkte 2,3- <i>trans</i> -CHD (links) und 3,4- <i>trans</i> -CHD (rechts). Markiert sind die hydrophilen und hydrophoben Bereiche der beiden Moleküle.....	123
Abb. 8.13: Gegenüberstellung der Verläufe der differentiellen volumetrischen Extraktionsrate bei den <i>in situ</i> Reaktivextraktionsexperimenten der beiden Produkte 2,3- und 3,4- <i>trans</i> -CHD.	125
Abb. 8.14: Gegenüberstellung der Verläufe der Sauerstofftransferrate (OTR), der Extraktionsrate und der spezifischen Produktbildungsrate während der <i>in situ</i> Reaktivextraktion von 2,3- <i>trans</i> -CHD.	126

12.8 Tabellenverzeichnis

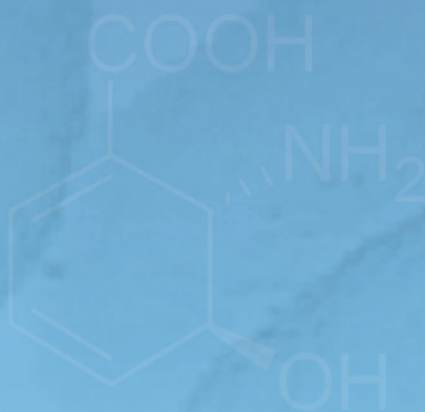
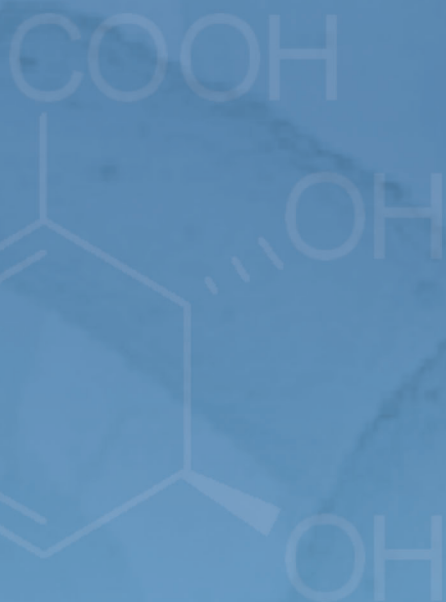
Tab. 4.1: Eingesetzte <i>E coli</i> -Stämme.....	37
Tab. 5.1: Vergleich der maximalen differentiellen und integralen kinetischen Parameter und der Konzentrationen bei Fed-Batch Fermentationen mit verschiedenen Produktionsstämmen und bei unterschiedlichen Prozessführungen.	78
Tab. 6.1: Vergleich der maximalen differentiellen und integralen kinetischen Parameter und der Konzentrationen bei Fed-Batch Fermentationen mit verschiedenen Produktionsstämmen und unterschiedlichen IPTG-Induktionskonzentrationen.	95
Tab. 6.2: Gegenüberstellung der Ergebnisse der fermentativen Synthese von 2,3- <i>trans</i> -CHD, 3,4- <i>trans</i> -CHD, L-Phenylalanin (Rüffer 2004), 3-Dehydroshikimat (Yi et al. 2003) und Shikimat (Gibson et al. 2001).....	98
Tab. 12.1: Retentionszeiten und UV-Charakteristika und LOQ-Werte der Metabolitquantifizierung durch RP-HPLC (Franke 2002).....	150
Tab. 12.2: ¹ H-NMR-Daten der gemessenen Substanzen	152
Tab. 12.3: Geräte für die Fermentation in Schüttelkolben.....	154
Tab. 12.4: Geräte für die 7,5 Liter Fermentation im Zulaufverfahren (Kap. 4.3.1).....	154
Tab. 12.5: Geräte für die 42 Liter Fermentation im Zulaufverfahren (Kap. 4.3.2).....	154
Tab. 12.6: Geräte für die 300 Liter Fermentation im Zulaufverfahren (Kap. 4.3.3).....	154
Tab. 12.7: Geräte zur Analytik.....	155
Tab. 12.8: Software für die Auswertung und Erfassung der Daten.....	156

1. **Toxizitätsprüfungen in Zellkulturen für eine Vorhersage der akuten Toxizität (LD50) zur Einsparung von Tierversuchen**
von W. Halle (1998), 92 Seiten
ISBN: 978-3-89336-221-9
2. **Die Rolle der Reaktionstechnik in der mikrobiellen Verfahrensentwicklung**
von D. Weuster-Botz (1999), II, 320 Seiten
ISBN: 978-3-89336-245-5
3. **Cell Culture Models as Alternatives to Animal Experimentation for the Testing of Neuroprotective Compounds in Stroke Research**
Practical Handbook of Methods
edited by A. J. Carter, H. Kettenmann (1999), 144 pages
ISBN: 978-3-89336-250-9
4. **Action and Visuo-Spatial Attention**
Neurobiological Bases and Disorders
Book of Abstracts
collected by P. H. Weiss (2000), XIV, 56 pages
ISBN: 978-3-89336-272-1
5. **Genomweite Genexpressionsanalysen mit DNA-Chips zur Charakterisierung des Glucose-Überflussmetabolismus von *Escherichia coli***
von T. Polen (2003), 100 Seiten
ISBN: 978-3-89336-337-7
6. **Auslegung des Detektorsystems für einen hochauflösenden Positronen-Emissions-Tomographen mit hoher Sensitivität**
von U. Heinrichs (2003), IV, 238 Seiten
ISBN: 978-3-89336-340-7
7. **Biological Principles Applied to Technical Asymmetric Catalysis**
by A. Liese (2003), VI, 206 pages
ISBN: 978-3-89336-344-5
8. **Designstudie eines μ CT-Zusatzes für einen hochauflösenden Positronen-Emissions-Tomographen: Beispiel für ein multimodales bildgebendes System**
von M. Khodaverdi (2004), III, 162 Seiten
ISBN: 978-3-89336-360-5
9. **Bioprocess Development for the Generation of Monocyte-Derived Dendritic Cells: Applicability in Breast Cancer Immunotherapy**
by H.R. Bohnenkamp (2004), XLII, 128 pages
ISBN: 978-3-89336-364-3

- 10. Regulation der *clp*-Genexpression durch ClgR und Definition des ClgR-Regulons aus *Corynebacterium glutamicum***
von S. Engels (2004), V, 125 Seiten
ISBN: 978-3-89336-379-7
- 11. Metabolomanalyse zur Untersuchung der Dynamik im Aromaten-biosyntheseweg in L-Phenylalanin Produzenten von *Escherichia coli***
von M. Oldiges (2005), XVI, 181 Seiten
ISBN: 978-3-89336-380-3
- 12. Identifizierung und Charakterisierung eines Transkriptionsregulators der Aconitase von *Corynebacterium glutamicum***
von A. Krug (2005), VI, 122 Seiten
ISBN: 978-3-89336-382-7
- 13. Prozessentwicklung der elektroenzymatischen Sulfoxidation mit Chloroperoxidase**
von S. Lütz (2005), XIV, 178 Seiten
ISBN: 978-3-89336-387-2
- 14. Export von Proteinen mit Zwillingsarginin-Signalsequenzen über den Tat-Weg in *Escherichia coli***
von P. J. Kreutzenbeck (2005), 118 Seiten
ISBN: 978-3-89336-388-9
- 15. Untersuchungen zur Fettsäure- und Zellwandsynthese sowie zur Glutamatbildung mit *Corynebacterium glutamicum***
von E. Radmacher (2005), 130 Seiten
ISBN: 978-3-89336-389-6
- 16. Monomodale und multimodale Registrierung von autoradiographischen und histologischen Bilddaten**
von A. Vieten (2005), 116 Seiten
ISBN: 978-3-89336-390-2
- 17. Biosynthese von Phosphonaten: Charakterisierung des rekombinanten Enzyms Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494**
von S. Johnen (2005), 128 Seiten
ISBN: 978-3-89336-400-8
- 18. Ex-vivo Generierung von neutrophilen Zellen zur Prävention und Therapie der Sepsis**
von R. Herbold (2005), 202 Seiten
ISBN: 978-3-89336-407-7

- 19. Entwicklung eines Donor/Akzeptor-Konzeptes für die asymmetrische Synthese unsymmetrischer Benzoine mit Hilfe ThDP-abhängiger Enzyme**
von P. Dünkermann (2005), 222 Seiten
ISBN: 978-3-89336-408-4
- 20. Analyse der Bindungsspezifität der humanen Lck-SH3-Domäne anhand artifizierender und physiologischer Peptid-Liganden und strukturelle Charakterisierung dieser Peptide im Komplex mit SH3-Domänen**
von T. T. Tran (2005), 155 Seiten
ISBN: 978-3-89336-412-1
- 21. Modeling Based Process Development of Fed-Batch Bioprocesses: L-Valine Production by *Corynebacterium glutamicum***
by M. Brik Ternbach (2005), 202 pages
ISBN: 978-3-89336-413-8
- 22. Charakterisierung der Ausscheidung von L-Glutamat bei *Corynebacterium glutamicum***
von K. C. Stansen (2005), 151 Seiten
ISBN: 978-3-89336-416-9
- 23. Metabolic and Bioprocess Engineering – a Fruitful Symbiosis**
by R. Takors (2005), 399 pages
ISBN: 978-3-89336-420-6
- 24. Reaktionstechnische Untersuchungen zur enzymatischen *de novo* Synthese von GDP- β -L-Fucose und der *in situ* Fucosylierung von Oligosacchariden**
von C. Hoh (2005), 240 Seiten
ISBN: 978-3-89336-423-7
- 25. Humane Primärzellen als Feederzellen für die Kokultur mit hämatopoetischen Stammzellen aus Nabelschnurblut**
von A. S. Magin (2006), 206 Seiten
ISBN: 978-3-89336-424-4
- 26. Vergleichende Analyse der Sec- und Tat-abhängigen sekretorischen Proteingewinnung mit Gram-positiven Bakterien als Wirtsorganismen**
von D. Meißner (2006), 140 Seiten
ISBN: 978-3-89336-427-5
- 27. Energie- und Redoxstoffwechsel von *Corynebacterium glutamicum***
von A. Kabus (2006), VI, 115 Seiten
ISBN: 978-3-89336-439-8
- 28. NMR-Lösungsstruktur der humanen Hck SH3-Domäne im Komplex mit einem artifizierender, hochaffinen Peptid-Liganden**
von H. Schmidt (2006), XII, 115 Seiten
ISBN: 978-3-89336-441-1

- 29. Entwicklung und Untersuchung eines Verfahrens zur integrierten Aufreinigung von Plasmid DNA mittels wässriger Zweiphasenextraktion**
von A. Frerix (2006), VII, 127 Seiten
ISBN: 978-3-89336-442-8
- 30. Advanced Methods in Multiplexing Multi-Pinhole Imaging**
Design and Implementation of a High-Resolution and High-Sensitivity Small-Animal SPECT Imaging System
by C. Lackas (2006), XX, 176 pages
ISBN: 978-3-89336-451-0
- 31. Enantioselektive C-C Knüpfung mit Enzymen**
Charakterisierung und reaktionstechnische Bearbeitung der Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* Biovar I
von T. Stillger (2006), XIV, 146 Seiten
ISBN: 978-3-89336-457-2
- 32. Echtzeitsystem für Phasenrücksetzanalysen und Neuro-Rückkopplungen am MEG**
von H. Rongen (2006), 176 Seiten
ISBN: 978-3-89336-461-9
- 33. Analyse des Mechanismus der Phosphatregulation in *Corynebacterium glutamicum***
von U. Sorger-Herrmann (2006), 117 Seiten
ISBN: 978-3-89336-466-4
- 34. Enantioselective Reduction of Hydrophobic Keto Compounds in Multiphase Bioreactor**
by M. Villela Filho (2007), XVI, 196 pages
ISBN: 978-3-89336-470-1
- 35. Untersuchung der Sec2-abhängigen Proteintranslokation in nicht-pathogenen Gram-positiven Bakterien**
von M. Caspers (2007), 164 Seiten
ISBN: 978-3-89336-488-6
- 36. Regulation der Phosphatmangelgene von *Corynebacterium glutamicum* durch das Zweikomponenten-System PhoRS**
von S. Schaaf (2007), VI, 114 Seiten
ISBN: 978-3-89336-496-1
- 37. Bioprozessentwicklung und in-situ Produktgewinnung von trans-Cyclohexadien-Derivaten**
von R. Bujnicki (2007), II, VIII, 163 Seiten
ISBN: 978-3-89336-498-5



Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Band / Volume 37
ISBN 978-3-89336-498-5

Lebenswissenschaften
Life Sciences