



Institut für Biotechnologie

***Reaktionstechnische Untersuchungen
zur L-Isoleucin Herstellung
mit Corynebacterium glutamicum***

Leon Raeven

***Reaktionstechnische Untersuchungen
zur L-Isoleucin Herstellung
mit Corynebacterium glutamicum***

Leon Raeven

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3798

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-3798

D 82 (Diss. RWTH Aachen, 2000)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Reaction engineering studies for the production of L-isoleucine with *Corynebacterium glutamicum*

Abstract

This study presents the development of a fed-batch process for the production of L-isoleucine with the Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. Based on investigations concerning the transport of L-isoleucine it was discovered that production was energy limited. Further reaction engineering research showed that the energy limitation is indirectly caused by a substrate limitation. With the aid of principal component analysis citrate was identified as the significant limiting process-variable and further research showed that this is due to its role as an iron-chelator. By specifically feeding significant substrates like L-leucine and substituting citrate by a more specific iron-chelator 3,4-hydroxybenzoate, a L-isoleucine concentration up to 220 mM with a space-time-yield of $5,4 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ and a integral yield of 14 % (g/g) was accomplished.

Zusammenfassung

Diese Arbeit beschreibt die Verfahrensentwicklung zur Herstellung von L-Isoleucin mit dem Gram-positiven Bakterium *Corynebacterium glutamicum*. Untersuchungen zum Transport von L-Isoleucin zeigten, daß die Produktivität energielimitiert war. Mit weiteren reaktionstechnischen Untersuchungen konnte diese Limitierung als eine Substratlimitierung identifiziert werden. Mit Hilfe der Haupt-Komponenten-Analyse wurde Citrat als signifikante limitierende Prozeßgröße identifiziert, und weitere Untersuchungen zeigten, daß es die Funktion als Eisen-Chelator übernimmt. Durch die gezielte Nachführung von signifikanten Substraten wie L-Leucin und die Substitution von Citrat durch den spezifischen Eisen-Chelator 3,4-Hydroxybenzoat konnte eine L-Isoleucinkonzentration bis zu 220 mM mit einer maximalen Raum-Zeit-Ausbeute von $5,4 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ und einer integralen L-Isoleucin-Selektivität bis 14% (g/g) erreicht werden.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	3
3	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	5
3.1	AMINOSÄUREPRODUKTION MIT <i>CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM</i>	5
3.1.1	Kohlenhydratkatabolismus und Anaplerotik	6
3.1.2	Oxidative Phosphorylierung	13
3.1.3	L-Isoleucin-Biosynthese	13
3.1.4	L-Isoleucin-Transport	15
3.2	REAKTIONSTECHNISCHE GRUNDLAGEN	16
3.2.1	Prozeßführung in Bioreaktoren	16
3.2.2	Massenbilanzierung von Prozessen im Rührkesselreaktor	18
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	25
4.1	AUSGANGSSITUATION UND LÖSUNGSANSÄTZE	25
4.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR PRODUKTINHIBIERUNG	29
4.2.1	Vorversuche im Schüttelkolben	29
4.2.2	Ansatzweise Verfahren im Rührkessel mit verschiedenen L-Isoleucin-Konzentrationen	30
4.2.3	Ansatzweise Verfahren im Rührkessel mit L-Isoleucin-Puls	35
4.2.4	Ansatzweise Verfahren im Rührkessel mit verschiedenen hydrophoben Aminosäuren	36
4.2.5	Versuche im Diafiltrationsverfahren (ganzheitlicher Ansatz)	40
4.3	UNTERSUCHUNGEN ZUR SUBSTRATLIMITIERUNG	48
4.3.1	Identifizierung limitierender Prozeßvariablen mit Hilfe der Haupt-Komponenten-Analyse	48
4.3.2	Charakterisierung der identifizierten Prozeßgrößen	53
4.4	ÜBERTRAGUNG DER GEWONNENEN DATEN AUF DAS ZULAUFVERFAHREN	60
5	AUSBLICK	67
6	ZUSAMMENFASSUNG	69
ANHANG A: MATERIAL UND METHODEN		71
A.1	ORGANISMUS	71
A.2	STAMMHALTUNG	71
A.3	MEDIENZUSAMMENSETZUNG	72
A.3.1	Medium für Schüttelkolben	72
A.3.2	Vorlagemedium für das ansatzweise Verfahren im 7,5 l-Bioreaktor	73

A.3.3	Medium im Zulaufverfahren im 30 l-Bioreaktor.....	73
A.3.4	Medium im Diafiltrationsverfahren im 7,5 l-Bioreaktor.....	74
A.3.5	Medium im Zulaufverfahren mit Feedprofil im 7,5 l-Bioreaktor.....	74
A.3.6	Spurenlösung 1.....	76
A.3.7	Spurenlösung 2.....	76
A.3.8	Biotin-stammlösung.....	76
A.3.9	Kanamycinsulfat-stammlösung.....	76
A.3.10	Chloramphenicol-stammlösung.....	76
A.3.11	Lauge.....	77
A.3.12	Antischaummittel.....	77
A.3.13	FIA-Puffer.....	77
A.4	APPARATIVER AUFBAU UND DURCHFÜHRUNG DER VERFAHREN.....	77
A.4.1	Schüttelkolbenkultivierung.....	77
A.4.2	Ansatzweise Verfahren.....	77
A.4.3	Diafiltrationsverfahren.....	78
A.4.4	Zulaufverfahren.....	81
A.5	ON-LINE-ANALYTIK.....	83
A.5.1	CO ₂ und O ₂ im Abgas.....	83
A.5.2	pO ₂	83
A.5.3	pH-Wert.....	83
A.5.4	Glucosebestimmung im Prozeßmedium.....	83
A.6	DATENERFASSUNG UND PROZESSREGULATION.....	84
A.7	OFF-LINE-ANALYTIK.....	86
A.7.1	Biotrockenmasse (optische Dichte).....	86
A.7.2	Aminosäuren und Ammonium.....	86
A.7.3	Organische Säuren.....	87
A.7.4	Glucosekonzentration.....	87
A.7.5	ATP-Gehalt der Zellen.....	87
A.7.6	Membranpotential der Zelle.....	88
A.7.7	Bestimmung des Cytoplasmavolumens.....	89
A.8	BERECHNUNG DIFFERENTIELLER GRÖßEN.....	89
A.9	FEHLERBERECHNUNG.....	90
A.9.1	Theorie der Monte Carlo Simulation.....	90
A.9.2	Monte Carlo Simulation in Matlab.....	91
A.10	HAUPT-KOMPONENTEN-ANALYSE.....	94
A.10.1	Haupt-Komponenten-Analyse in Matlab.....	95
ANHANG B: ABKÜRZUNGEN UND INDIZES		97
B.1	ABKÜRZUNGEN.....	97
B.2	LATEINISCHE BUCHSTABEN.....	98
B.3	GRIECHISCHE BUCHSTABEN.....	99

B.4	INDIZES.....	99
ANHANG C: LITERATUR		101

1 Einleitung

Seit mehr als zwei Jahrzehnten gilt die Biotechnologie als eine der Schlüsseltechnologien des 20. Jahrhunderts. Aber, wie Prof. Dr. Winnacker im „Ersten Deutschen Biotechnologie Report 98“ (Schitag Ernst and Young, 1998) schreibt:

„Es war die Schlechteste, es war die Beste aller Zeiten“, um mit Charles Dickens zu sprechen, wenn man auf die vergangenen 15 Jahre Biotechnologie in Deutschland zurückblickt. Bis zum Anfang der 90er Jahre war die kontroverse öffentliche Diskussion um die Risiken der Gentechnik ein entscheidender Schritt für die wirtschaftliche Entwicklung der modernen, auf Gentechnik basierten Biotechnologie in unserem Lande.

Die Änderung dieser Lage ist im Grunde eine Reaktion auf drei Ereignisse: Ein Gentechnikgesetz, das die Sicherheitsauflagen der tatsächlichen Risikolage im Umgang mit gentechnisch veränderten Organismen anpaßte. Die aktive Beteiligung von verschiedenen Landesregierungen an der Einrichtung von Genzentren und molekularbiologisch ausgerichteten Universitätsinstituten. Und nicht zuletzt die Ausschreibung des BioRegio-Wettbewerbes durch den Bundesforschungsminister Dr. Jürgen Rüttgers.

Laut Prognos-Arbeitsbericht (Prognos, 1996) soll der Gesamtumsatz aller bio- und gentechnischen Produkte in Deutschland im Jahr 2000 4,1 Mrd. DM erreichen. Dabei werden besonders hohe Wachstumsraten für den Pharmabereich und für die Herstellung von Feinchemikalien erwartet (Suijdam and Roels, 1994).

Seit 90 Jahren setzt der Mensch isolierte Aminosäuren, mehr oder weniger bewußt, im täglichen Leben ein. Dieser Prozeß begann 1908, als in Japan L-Glutaminsäure aus Konbu, einer bis dahin als Würzmittel verwendeten Alge, isoliert und gezielt als Geschmacksverstärker eingesetzt wurde. Im Laufe der Jahre wurden zahlreiche Anwendungsgebiete für isolierte Aminosäuren erschlossen, so daß die technische Aminosäuregewinnung heute von wesentlichem wirtschaftlichen Interesse ist. Neben der Lebensmittelindustrie werden großtechnisch hergestellte Aminosäuren heute in der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie sowie in der Landwirtschaft eingesetzt. Die Weltjahresproduktion an Aminosäuren lag 1992 bei 800.000 t mit einem Marktwert von umgerechnet 2,4 Mrd US \$ und steigt jährlich zwischen 5 und 10 % (Hodgson, 1994).

Die weltweite Jahresproduktion von L-Isoleucin beträgt ca. 400 t und weist mit ca. 60-70 DM·kg⁻¹ einen überdurchschnittlich hohen Preis auf (Leuchtenberger, 1996). L-Isoleucin findet überwiegend in der pharmazeutischen Industrie Anwendung, wo es im Rahmen parenteraler Ernährungstherapien und bedarfsadaptierter Diäten in Infusionslösungen eingesetzt wird.

Um den ständig wachsenden Bedarf an L-Isoleucin, wie auch der anderen Aminosäuren, decken zu können, ist die Entwicklung von wirtschaftlichen, aber umweltverträglichen Produktionsverfahren von aktuellem Interesse. Zur Herstellung von L-Isoleucin stehen vier Verfahrenskonzepte zur Verfügung.

In extraktiven Verfahren werden wirtschaftlich relevante Proteinquellen durch saure Hydrolyse gespalten und L-Isoleucin anschließend durch fraktionierte Trennung des Aminosäuregemisches mittels extraktiver und chromatographischer Verfahren gewonnen (Steinmetzer, 1979). Bei der chemischen Synthese von L-Isoleucin aus 2-Methylbutyraldehyd und HCN entsteht das racemische Gemisch der vier Diastereomere, die durch fraktionierte Kristallisation oder stereoselektive Racematspaltung getrennt werden (Greenstein, 1954). Im enzymatischen Verfahren kann L-Isoleucin aus racemischen Gemischen von z.B. acylierten oder amidierten Isoleucinderivaten gewonnen werden (Greenstein, 1954). Einer industriellen Anwendung dieses Herstellungsprozesses steht der hohe Preis der eingesetzten Substrate und Enzyme entgegen.

Der Einsatz spezifischer Produktionsstämme ermöglicht im Rahmen fermentativer Verfahren die Produktion von L-Isoleucin aus preiswerten Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie geeigneten Vorstufen des Endproduktes (Ikeda *et al.*, 1976 a+b; Kase und Nakayama, 1977; Komatsubara *et al.*, 1980). Neben der flexiblen Einsetzbarkeit der für die Fermentation verwendeten Anlagen stellt besonders die selektive Synthese des L-Isomers durch die Mikroorganismen den für die Wirtschaftlichkeit entscheidenden Vorteil dieser Verfahren dar (Hoppe und Martens, 1973).

Die industrielle Herstellung von L-Isoleucin erfolgt heute nur zu einem geringen Anteil durch Extraktion von Proteinhydrolysaten. Der größte Teil wird, vorwiegend in Japan, in mikrobiellen Prozeßverfahren unter Einsatz von Hochleistungsstämmen der Gattungen *Corynebacterium*, *Brevibacterium* oder *Serratia* aus einfachen Zuckern und chemisch synthetisierten Vorstufen von L-Isoleucin produziert (Enei *et al.*, 1989; Hodgson, 1994).

Die industrielle Anwendung rekombinanter Organismen zur kommerziellen Produktion von L-Isoleucin wurde bisher noch nicht beschrieben.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Die mehrjährige Entwicklung definierter Aminosäure-produzierender *Corynebacterium glutamicum* Stämme am Institut für Biotechnologie 1 (IBT 1, Prof. Sahm) des Forschungszentrums Jülichs resultierte zunächst in dem L-Leucin-auxotrophen L-Lysin Produzenten *C. glutamicum* MH20 22b.

Durch die weitere Anwendung von r-DNA-Techniken und die Integration des vorhandenen Wissens auf Basis der L-Lysin Produzenten wurden im IBT 1 verschiedene L-Isoleucin produzierende Stämme hergestellt (Morbach *et al.*, 1995 a+b und 1996). Diese ebenfalls L-Leucin-auxotrophen Stämme produzieren L-Isoleucin mit Glucose als Hauptkohlenstoffquelle.

Mit dem von Kelle etablierten Verfahren und dem im IBT 1 entwickelten Produktionstamm *C. glutamicum* DR17 pECM3::*ilvA38* ist es möglich, eine L-Isoleucinkonzentration zwischen 150 und 160 mM zu erreichen, mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von $4.3 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ und einer Produktselektivität von $0,14 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Kelle, 1996).

Auffällig bei den Ergebnissen von Kelle *et al.* (1996) ist der hohe CO_2 -Anteil (ca. 65 %) an der Kohlenstoffbilanz. Betrachtet man die relevanten Stoffwechselwege, so wird klar, daß der Großteil der Decarboxylierungsreaktionen im Kohlenhydratkatabolismus vorkommt. Dieser dient primär der Energiegewinnung. Aus der L-Isoleucin-Synthese wird in der Nettobilanz kein CO_2 gebildet. Eine hohe CO_2 -Produktion weist auf einen hohen Anteil des Energiestoffwechsels am Gesamtumsatz während der L-Isoleucin-Produktion mit *C. glutamicum* DR17 pECM3::*ilvA38* hin.

Ebenfalls Auskunft über den Zustand des Energiestoffwechsels gibt der respiratorische Quotient ($\text{RQ} = \text{CER}/\text{OUR}$; Oxygen Uptake Rate = Sauerstoffaufnahme-rate, Carbon Evolution Rate = Kohlendioxidbildungsrate). Im Pentosephosphatweg, der oxidativen Decarboxylierung und im Tricarbonsäure-Zyklus werden äquivalent zur entstehenden CO_2 -Menge, Reduktionsäquivalente gebildet. Bei reinem aeroben Stoffwechsel wird für deren Regeneration in der Atmungskette jeweils theoretisch 1 mol O_2 pro mol NADH_2 (bzw. NADPH_2 oder FADH_2) verbraucht. Unter optimalen Bedingungen liegt demzufolge der RQ zwischen 0,8 und 1. Die Ergebnisse der RQ-Bestimmung in der Arbeit von Kelle (1996) zeigen einen RQ-Wert > 1 (meistens ist RQ ca. 1.3). Ein $\text{RQ} > 1$ deutet darauf hin, daß die Zelle ihren Energiebedarf nicht allein aus aeroben Abbauwegen deckt, sondern auch anaerobe bzw. anoxische Wege (Gärung) zur Regeneration von Reduktionsäquivalenten nutzt. Die maximale Kapazität der Glycolyse und des Pentosephosphatwegs ist wesentlich größer als die Atmungskapazität der Atmungskette. Bei hoher Aktivität der Glucoseabbauwege kann es deshalb zu einer Anhäufung von Reduktionsäquivalenten kommen. Die Zelle regeneriert dies durch Übertragung der Protonen auf alternative Akzeptoren unter Decarboxylierung derselben (*Overflow-*

Mechanismus), ohne dabei jedoch Energie zu gewinnen oder Sauerstoff zu verbrauchen (Babel, 1986; Alberts *et al.*, 1989; Coccagn-Bousquet und Lindley, 1995).

Untersuchungen der Transportvorgänge bei der L-Isoleucinproduktion in diesem Verfahren durch Kelle und Hermann (Kelle *et al.*, 1996) zeigten, daß die cytoplasmatische L-Isoleucinkonzentration nach einer kurzen lag-Phase von etwa 5 Stunden von ca. 10 mM bis 50 mM nach 50 Stunden ansteigt. Eine Limitierung des Exportes liegt hier als Erklärung nahe. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde durch Hermann (1998) die Exportkapazität der Zelle während des Prozesses bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, daß die Exportrate 25 Stunden lang konstant zwischen 0,25 und 0,3 min⁻¹ bleibt und anschließend bis ca. 0,46 min⁻¹ zunimmt. Der Anstieg der Exportkapazität geht einher mit dem Anstieg der cytoplasmatischen L-Isoleucinkonzentration. Offensichtlich wird der Exportcarrier aufgrund der ansteigenden intrazellulären L-Isoleucinkonzentration induziert. Trotzdem ist die Zelle nicht in der Lage, das gesamte gebildete L-Isoleucin aus der Zelle zu exportieren.

Mit Hilfe des Diffusionskoeffizienten für L-Isoleucin (Hermann und Krämer, 1996) und bei Annahme einer maximalen aktiven L-Isoleucin-Aufnahme können alle in die Zelle gerichteten L-Isoleucin-Flüsse berechnet werden. Es zeigte sich, daß die mit steigendem L-Isoleucin-Gradienten zunehmende Rückdiffusion in die Zelle durch die Zunahme der Exportcarrier-Aktivität bei gleichbleibender Carrier-Expression kompensiert wird. Die Carrier-vermittelte L-Isoleucin-Exkretion erreicht ein Maximum von 1,5 mmol·g⁻¹·h⁻¹ bei 25 Stunden. Aufgrund der hohen L-Isoleucin-Rückdiffusion von -1,0 mmol·g⁻¹·h⁻¹ bei 25 Stunden wurde jedoch nur eine maximale biomassespezifische L-Isoleucin-Produktivität (oder Nettoexport) von 0,45 - 0,5 mmol·g⁻¹·h⁻¹ erreicht. Nach 30 Stunden nimmt die biomassespezifische L-Isoleucin-Produktivität ab bis auf 0 mmol·g⁻¹·h⁻¹ und korreliert mit einem Anstieg der intrazellulären L-Isoleucin-Konzentration und der darauffolgenden Induktion der Carrier-Expression (Hermann und Krämer, 1996). Kelle *et al.* (1996) zeigte, daß, obwohl der Carrier-vermittelte Export nach 30 Stunden zwischen 1,0 und 1,5 mmol·g⁻¹·h⁻¹ bleibt und die Glucoseaufnahme abnimmt, sich die intrazelluläre L-Isoleucin-Konzentration nur geringfügig (von ca. 10 bis 50 mM) erhöht. Damit kann für die in diesem Verfahren eingestellten Reaktionsbedingungen der Transport als geschwindigkeitslimitierender Schritt in der L-Isoleucin-Produktion mit *C. glutamicum* DR17 pECM3::ilvA38 weitgehend ausgeschlossen werden.

Ziel dieser Arbeit ist, eine Erklärung für die Abnahme der biomassespezifischen Produktivität und die metabolische Aktivität der Zelle nach 30 Stunden zu finden und anschließend das gewonnene Wissen in ein verbessertes L-Isoleucin Produktionsverfahren zu integrieren. Der hohe CO₂-Anteil an der Kohlenstoffbilanz und der hohe RQ in Zusammenhang mit einer Abnahme der Transportaktivität trotz steigender Transportkapazität soll als Basis für Untersuchungen des energetischen Zustand der Zelle während des Prozesses dienen. Auch soll der Einfluß von L-Isoleucin und Nebenprodukten auf das Ergebnis des Verfahrens untersucht werden.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Aminosäureproduktion mit *Corynebacterium glutamicum*

Die dominierende Rolle von *C. glutamicum* unter den Aminosäureproduzenten ist ursprünglich historisch bedingt. Entdeckt wurde *C. glutamicum* von Kinoshita *et al.* 1957 in Japan. Durch gezielte Screening-Programme wurde dieses L-Glutamat-ausscheidende Bakterium unter dem Namen *Micrococcus glutamicus* aus dem Boden isoliert. Eine Reihe weiterer Organismen, die Aminosäuren produzieren, wurden in den folgenden Jahren isoliert. Sie stellten sich aber nach näherem Vergleich als systematisch untereinander eng verwandt heraus (Eikmanns *et al.*, 1991). Diese Gram-positiven, nicht sporulierenden, unbeweglichen, aeroben und Biotin-auxotrophen Organismen wurden in der Gattung *Corynebacterium* zusammengefaßt, die sich durch das keulenförmige Aussehen (*coryne* [griech.] = Keule) und das „Schnappen“ der Zellen während der Teilung auszeichnen. *C. glutamicum* hat einen hohen G/C-Gehalt, welcher aufgrund der 23S rRNA- (Roller *et al.*, 1992) und 16S rRNA-Analyse (Pascuala *et al.*, 1995) zusammen mit anderen Chemotyp IV und Mycolsäure enthaltenden Taxen eine phylogenetische Einheit bildet. Die Lipidbarriere des Mycol-Arabinogalactans der Zellwand verhindert die Entfärbung bei der Ziehl-Nielsen-Färbung (Trüper und Schleifer, 1991). *Corynebacterium* zeichnet sich durch die Zellwand-Bestandteile meso-Diaminopimelinsäure, Galactose und Arabinose aus (Lechevalier und Lechevalier, 1970; Schleifer und Kandler, 1972).

Die Gattung enthält auch einige pathogene Arten, wie das microaerophile *Corynebacterium diphtheriae*, und weitverbreitete Erreger von Pflanzenkrankheiten (*C. michiganense*, *C. poinsettiae* und *C. fascians*).

Zur Aminosäureproduktion ist *C. glutamicum* nicht nur aus historischen Gründen anderen Organismen überlegen, es hat im Vergleich zu den gut untersuchten Stämmen *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* direkte Vorteile:

- Dem Biosyntheseweg liegt eine einfache Regulation zugrunde.
- *C. glutamicum* besitzt nur wenige Isoenzyme, was in der geringen Genomgröße von 3082 kb begründet sein könnte (Bathe *et al.*, 1996).
- In dem Stoffwechsel von *C. glutamicum* sind nur wenige katabole Enzyme für den Abbau von Aminosäuren vorhanden (Kinoshita, 1985).

- In den letzten zehn Jahren wurden viele molekulargenetische Methoden mit *Corynebacterium* etabliert, besonders für die Konstruktion von Klonierungsvektoren und für den effektiven DNA-Transfer (Martin *et al.*, 1987; Schäfer *et al.*, 1994).

Somit liegt mit *C. glutamicum* (Abbildung 3-1) ein besonders geeigneter Organismus zur Aminosäuresynthese vor, in dem durch gentechnische Eingriffe die gewünschte Aminosäure überproduziert werden kann.

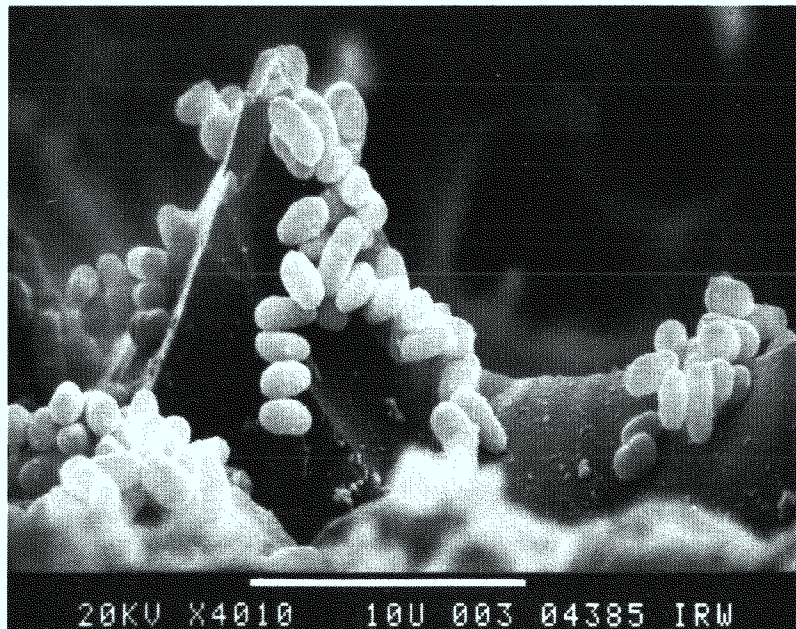


Abbildung 3-1. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Corynebacterium glutamicum* auf Sinterglas (Die Länge des weißen Balkens am unteren Bildrand entspricht 10 µm.)

3.1.1 Kohlenhydratkatabolismus und Anaplerotik

Während über den Stoffwechsel der saprophytisch (absorbieren deren Nutrienten von abgestorbener, organische Materie) wachsenden Gattungen auch heute noch sehr wenig bekannt ist, wurde der Metabolismus der als Aminosäureproduzenten eingesetzten Arten, insbesondere *C. glutamicum* und *Brevibacterium flavum*, in den letzten Jahren molekulargenetisch und physiologisch eingehend charakterisiert. Im Folgenden soll ein Überblick über die für die L-Isoleucinproduktion wichtigen Stoffwechselsequenzen von *C. glutamicum* gegeben werden (Abbildung 3-2 und Abbildung 3-2).

3.1.1.1 Glucose Transport

Erste Untersuchungen zur Aufnahme von Zuckern durch Corynebakterien beschrieben die Glucokinase als einziges Glucose-phosphorylierendes Enzym (Shiio *et al.*, 1959). Spätere Arbeiten von Mori und Shiio (Mori and Shiio, 1987a+b) und Shiio *et al.* (1990) bewiesen jedoch die Anwesenheit von drei Phosphoenolpyruvat:Zucker-Phosphotransferase-Systemen mit unterschiedlichen Substratspektren in *B. flavum*. Alle drei Phosphotransferase Systeme (PTS)

transportieren und phosphorylieren den entsprechenden Zucker unter Dephosphorylierung von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat.

Das Phosphoenolpyruvat:Glucose-PTS ist konstitutiv exprimiert und katalysiert neben Glucose auch den Transport von Mannose, Glucosamin und 2-Desoxyglucose, nicht jedoch von Fructose. Das hierfür vorhandene Fructose-PTS katalysiert die Bildung von Fructose-1-phosphat, welches mittels 1-Phosphofructokinase zu Fructose-1,6-Bisphosphat reagiert und in die Glykolyse eingeschleust wird. Das Substratspektrum des Phosphoenolpyruvat:Fructose-PTS umfaßt weiterhin Xylitol sowie Glucose, wenn auch mit geringer Aktivität. Das Phosphoenolpyruvat:Saccharose-PTS transportiert das Disaccharid unter Phosphorylierung des Glucose-Restes. Intrazellulär erfolgt die hydrolytische Spaltung in Fructose und Glucose-6-phosphat, wobei der Fructose-Rest, durch das Fructose-spezifische PTS katalysiert, zu Fructose-1-phosphat reagiert. Eine Fructokinase konnte nicht nachgewiesen werden. Die PTS für Fructose und Saccharose werden jeweils substratspezifisch induziert (Mori and Shii, 1987a+b).

Tatsache ist, daß die Phosphorylierung von Glucose in *C. glutamicum* trotz Anwesenheit der Glucokinase ausschließlich über das Phosphoenolpyruvat:Glucose-PTS erfolgt. Mutanten ohne Phosphoenolpyruvat:Glucose- und Fructose-PTS sind nicht befähigt, in Gegenwart von Glucose als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen.

3.1.1.2 Glycolyse

Die Glycolyse (Tabelle 3-1) umfaßt die Umsetzung von Glucose-6-phosphat zu Pyruvat. Die komplette Enzymsequenz dieses katabolischen Stoffwechselweges wurde für *Brevibacterium flavum* beschrieben (Shii *et al.*, 1959 und 1961) und von Kinoshita (1962) für *C. glutamicum* bestätigt. Im Rahmen von Studien zum Zentralstoffwechsel wurden mittlerweile die Gene der Glycolyse-Enzyme Fructosebisphosphat-Aldolase (Osten von der, Gioanetti *et al.*, 1989), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Triosephosphat-Isomerase (Eikmanns, 1992) und Pyruvat-Kinase (Gubler, Jetten *et al.*, 1994) isoliert und charakterisiert. Arbeiten von Sugimoto und Shii (Sugimoto and Shii, 1989; Sugimoto and Shii, 1989) beschreiben die Kinetiken der 6-Phosphofructokinase und der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase von *Brevibacterium flavum*. Beide Enzyme weisen eine Michaelis-Menten-Kinetik auf, wobei ersteres Enzym durch Adenosindiphosphat und letzteres durch Erythrose-4-phosphat inhibiert wird.

Mit Ausnahme der Phosphofructokinase und der Pyruvatkinase lassen alle Enzyme sowohl die Hin- als auch die Rückreaktion zu. Im Verlauf der Gluconeogenese wird die Dephosphorylierung des Fructose-1,6-bisphosphates durch die Hexosebisphosphatase katalysiert, während die Reaktion der Pyruvat-Kinase im Rahmen des anaplerotischen Stoffwechsels umgangen wird.

Tabelle 3-1: Reaktionen der Glycolyse

Glucose-6-phosphat-Isomerase	Glc6P	$\leftrightarrow$	Fruc6P
Phosphofructokinase	Fruc6P + ATP	$\rightarrow$	Fruc-1,6-bP
Fructosebisphosphat-Aldolase	Fruc-1,6-bP	$\leftrightarrow$	DAP + GAP
Triosephosphat-Isomerase	DAP	$\leftrightarrow$	GAP
Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	GAP + NAD + P _i	$\leftrightarrow$	G-2,3-bP + NADH ₂
Phosphoglyceratkinase	G-2,3-bP + ADP	$\leftrightarrow$	G3P + ATP
Phosphoglyceromutase	G3P	$\leftrightarrow$	G2P
Enolase	G2P	$\leftrightarrow$	PEP + H ₂ O
Pyruvatkinase	PEP + ADP	$\rightarrow$	ATP + Pyr

3.1.1.3 Pyruvat-Dehydrogenase-Reaktion

Pyruvat als zentrale Verbindung des Intermediärstoffwechsels stellt den Ausgangspunkt für die Bildung zahlreicher Syntheseprodukte dar. In aerob wachsenden Zellen wird der überwiegende Teil des während des Katabolismus auftretenden Pyruvats über den Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplex zu Acetyl-Coenzym A oxidiert.

3.1.1.4 Tricarbonsäure-Zyklus

Der Tricarbonsäure-Zyklus (Tabelle 3-2 und Abbildung 3-2) dient der weiteren Oxidation der C₂-Körper zu Kohlendioxid. Der dabei abgespaltene Wasserstoff wird auf NAD⁺ und NADP⁺, in der Reaktion der Succinat-Dehydrogenase auf FAD⁺ übertragen.

Der Nachweis der Enzyme des Tricarbonsäure-Zyklus in *C. glutamicum* wurde von Kinoshita *et al.* (1957) erbracht. Kompletierende Arbeiten wurden durch Shiio und Uijigawa-Takeda (1980) und Eikmanns (1997) durchgeführt.

Tabelle 3-2: Reaktionen des Tricarbonsäure-Zyklus

Citrat-Synthase	Acetyl-CoA + OAA + H ₂ O	$\rightarrow$	Cit + CoA
Aconitase	Cit	$\leftrightarrow$	IsoCit
Isocitrat-Dehydrogenase	IsoCit + NADP	$\leftrightarrow$	α KG + NADPH ₂ + CO ₂
α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex	α KG + Coenzym A + NAD	$\leftrightarrow$	SucCoA + CO ₂ + NADH ₂
Succinyl-CoA-Synthetase	SucCoA + ADP + P _i	$\leftrightarrow$	Suc + CoA + ATP
Succinat-Dehydrogenase	Suc + FAD	$\leftrightarrow$	Fum + FADH ₂
Fumarat-Hydratase	Fum + H ₂ O	$\leftrightarrow$	Mal
Malat-Dehydrogenase	Mal + NAD	$\leftrightarrow$	OAA + NADH

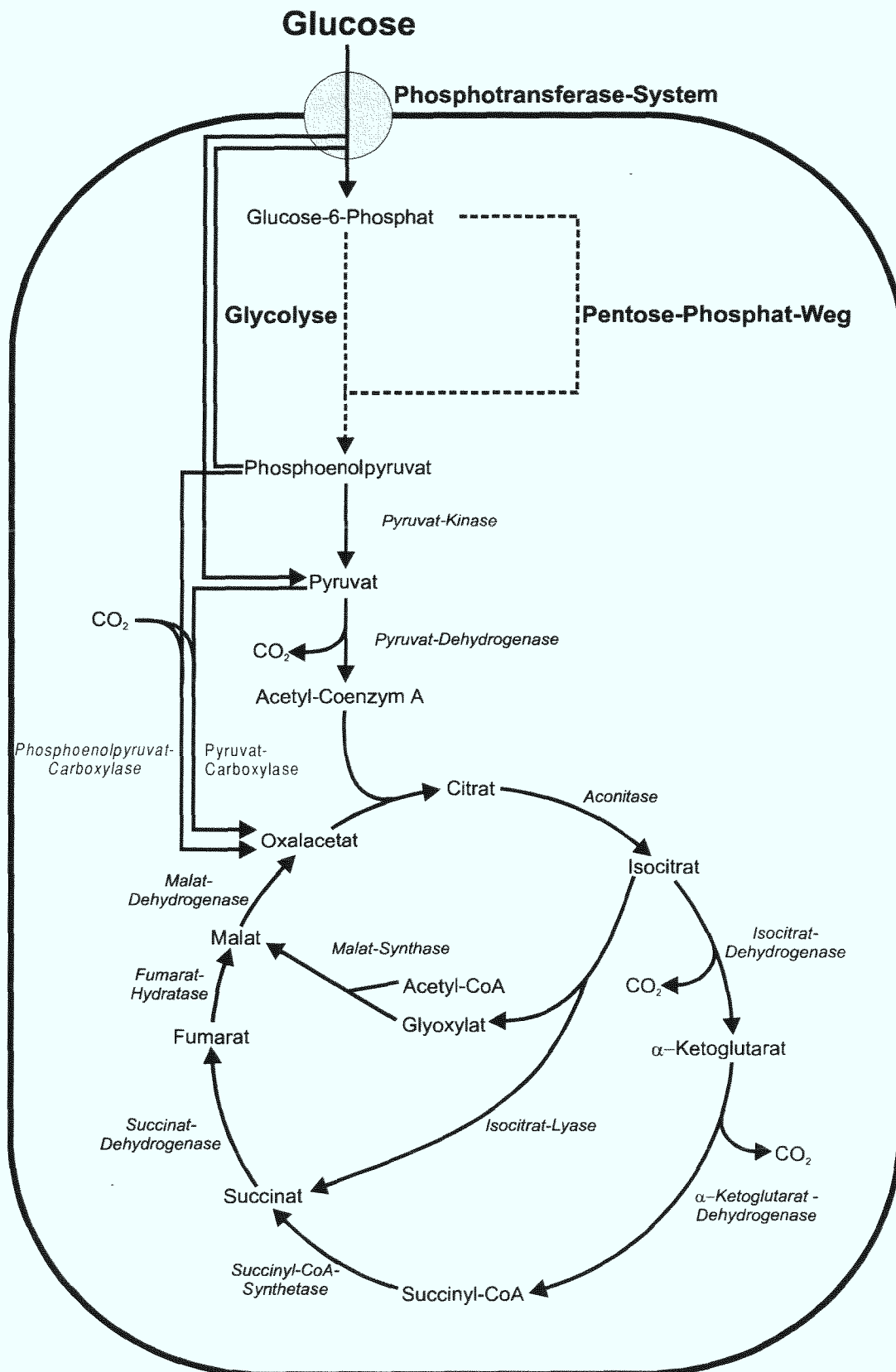


Abbildung 3-2. Schematische Darstellung des Zentralstoffwechsels von *C. glutamicum*. Detailliert dargestellt sind der Tricarbonsäure-Zyklus und die anaplerotischen Reaktionen der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase und des Glyoxylat-Zyklus.

Einige Enzyme des Tricarbonsäure-Zyklus wurden in ihrer Kinetik und ihrer Regulation für *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* näher beschrieben. Die Citrat-Synthase ist für den Kohlenstofffluß in den Tricarbonsäure-Zyklus verantwortlich und wird durch Zwischenprodukte des Zyklus nicht signifikant in ihrer Aktivität beeinflusst. Eine Regulation erfolgt in *Corynebacterium* weder auf Gen- noch auf Enzymebene (Eikmanns, 1997). Die Isocitrat-Dehydrogenase reagiert spezifisch mit NADP^+ und wird durch Glyoxalat und Oxalacetat synergistisch inhibiert (Shiio und Ozaki, 1968). Die Expression des Enzyms ist konstitutiv und abhängig von der Kohlenstoffquelle (Eikmanns, 1997). Die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase wird durch verschiedene Metabolite des Primärstoffwechsels reguliert. Eine Induktion des Enzyms erfolgt durch Glutamat, während Citrat zur Repression führt (Shiio und Ujigawa, 1980). Weitere Untersuchungen wurden zum membranassoziierten Succinat-Dehydrogenase-Komplex (Ruklish *et al.*, 1978) und zur konstitutiv exprimierten Malat-Dehydrogenase unternommen (Ruklish *et al.*, 1981).

3.1.1.5 Pentose-Phosphat-Weg

Die Oxidation von Glucose über den Pentose-Phosphat-Weg dient der Generierung von NADPH und Vorstufen für die Nukleotid-Synthesen. Die Hexose wird über eine lineare Reaktionssequenz zu Ribulose-5-phosphat, das über Isomerisierung bzw. Epimerisierung mit Ribose-5-phosphat und Xylose-5-phosphat im Gleichgewicht steht, oxidiert. Über reversible Transketolase- und Transaldolase-Reaktionen erfolgt ein Umbau der Pentosen zu Fructose-6-phosphat und Glycerin-3-phosphat (Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3: Reaktionen des Pentose-Phosphat-Weges

Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	$\text{Glc6P} + \text{NADP}$	$\rightarrow$	$6\text{PGL} + \text{NADPH}_2$
Lactonase	Rub5P	$\rightarrow$	Rib5P
6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	$\text{Rub5P} + \text{NADP}$	$\rightarrow$	$\text{Xyl5P} + \text{NADPH}_2$
Phosphopentose-Isomerase	Rib5P	$\leftrightarrow$	Rub5P
Phosphopentose-Epimerase	Rub5P	$\leftrightarrow$	Xyl5P
Transketolase	$\text{Xyl5P} + \text{Rib5P}$	$\leftrightarrow$	$\text{Sed7P} + \text{GAP}$
	$\text{Xyl5P} + \text{E4P}$	$\leftrightarrow$	$\text{Fruc6P} + \text{GAP}$
Transaldolase	$\text{Sed7P} + \text{GAP}$	$\leftrightarrow$	$\text{Fruc6P} + \text{E4P}$

Erste Hinweise auf die Existenz des Pentose-Phosphat-Weges in *Corynebacterium* erhielten Shiio *et al.* (Shiio *et al.*, 1960) durch Markierungsexperimente mit *B. flavum* und Otsuka *et al.* (1965) durch ähnliche Untersuchungen an *C. glutamicum*. Ein weiteres Indiz war die Entdeckung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase durch Shiio *et al.* (1959). Diese Ergebnisse stimmen mit neueren Untersuchungen mittels ^{13}C NMR-Technik überein, die das Vorhandensein des kompletten Pentose-Phosphat-Weges in *C. glutamicum* bewiesen (Ishino *et al.*, 1986).

Die NADP-Spezifität der oxidierenden Enzyme Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase aus *B. flavum* wurde durch deren Aufreinigung und Charakterisierung gezeigt. Beide Enzyme werden durch die reduzierte Form der prosthetischen

Gruppe sowie Oxalacetat und Fructose-1,6-bisphosphat inhibiert. Die Induktion erfolgt durch das jeweilige Substrat. Die Untersuchungen zur Transketolase und Transaldolase wurden ebenfalls an *B. flavum* durchgeführt. Die Transketolase wird durch Acetat, Citrat und Fructose induziert (Sugimoto und Shii, 1987 und 1989b).

3.1.1.6 Anaplerotische Reaktionen

Während des Wachstums und besonders während der Aminosäure-Produktion benötigt der Tricarbonsäure-Zyklus von *C. glutamicum* eine kontinuierliche und effektive Regenerierung von Oxalacetat, um die Intermediate des Tricarbonsäure-Zyklus, die für Biosynthesen abgezogen wurden, wieder aufzufüllen. Diese Funktion übernehmen sogenannte anaplerotische (griech.: auffüllende) Enzyme.

In *C. glutamicum* und verwandten Biotin-auxotrophen, Glutamat-produzierenden Bakterien wurden anaplerotische Reaktionen aufgrund ihrer zentralen Rolle bei der Synthese von Aminosäuren schon früh untersucht. So konnte 1960 gezeigt werden, daß *C. glutamicum* ssp. *Flavum* über C₃-carboxylierende Enzyme ebenso wie über den Glyoxylat-Zyklus (Abbildung 3-2) verfügt (Shiio *et al.*, 1960).

In *Corynebacterium* wurden in Abhängigkeit von den Wachstumbedingungen vier anaplerotische Reaktionen nachgewiesen (Tabelle 3-4).

Tabelle 3-4: Anaplerotische Reaktionen in *Corynebacterium*

Phosphoenolpyruvat-Carboxylase	Phosphoenolpyruvat + CO ₂	→	Oxalacetat + P _i
Pyruvat-Carboxylase	Pyruvat + CO ₂ + ATP	→	Oxalacetat + ADP + P _i
Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase	Phosphoenolpyruvat + CO ₂ + NDP	↔	Oxalacetat + NTP
<u>Glyoxylat-Weg:</u>			
Isocitrat-Lyase	Isocitrat	→	Succinat + Glyoxylat
Malat-Synthase	Glyoxylat + Acetyl-Coenzym A	→	Malat + Coenzym A

Es wurde lange Zeit angenommen, daß *C. glutamicum* nur über die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase als anaplerotisches Enzym beim Wachstum auf Glucose verfügt. Peters-Wendisch (1996) zeigte in ihrer Arbeit, daß die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase in *C. glutamicum* nicht das einzige C₃-carboxylierende anaplerotische Enzym ist. Die Pyruvat-Carboxylase konnte eindeutig als alternatives anaplerotisches Enzym in *C. glutamicum* nachgewiesen und charakterisiert werden. Außerdem wurden mit der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, dem *Malat-Enzym* und der Oxalacetat-Decarboxylase drei potentiell gluconeogenetische aktive Enzyme in *C. glutamicum* nachgewiesen.

Phosphoenolpyruvat-Carboxylase zeigt eine allosterische Regulation und wird von Acetyl-Coenzym A und Phosphoenolpyruvat aktiviert, von Aspartat inhibiert. Die Hemmung der

Phosphoenolpyruvat-Carboxylase von *C. glutamicum* durch Aspartat entspricht einer typischen *Feedback*-Regulation, da Aspartat direkt aus Oxalacetat, dem Produkt der anaplerotischen Reaktion, entsteht. Dagegen stellt Acetyl-Coenzym A ein aktiviertes Zwischenprodukt der katabolen Verstoffwechselung der C-Quelle dar, das einen vermehrten anaplerotischen Bedarf signalisiert, wenn es sich anstaut. Es ist daher verständlich, daß bei hohen Acetyl-Coenzym A Konzentrationen die anaplerotische Reaktion aktiviert wird. Andererseits deutet ein Anstau an Aspartat darauf hin, daß genügend Aminosäuren für die Synthese von Biomasse vorhanden sind und somit keine weiteren Intermediate aus dem Tricarbonsäure-Zyklus abgezogen werden müssen. Es ist also sinnvoll, die anaplerotische Reaktion zu inhibieren. Diese Regulation entspricht dem klassischen Prinzip der Regulation einer anaplerotischen Reaktion nach Kornberg (Kornberg, 1966). Mutanten mit fehlender Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, die über ungerichtete Mutagenese erzeugt wurden, waren Glutamat-auxotroph (Shiio und Ujigawa, 1978; Sano *et al.*, 1987). Dieser Befund deutet an, daß der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase in *C. glutamicum* eine entscheidende Bedeutung bei der Aminosäureproduktion zukommt, und daß sie das einzige anaplerotische Enzym beim Wachstum auf Glucose darstellt (Liebl, 1991).

Tosaka *et al.* postulierten 1985, daß *C. glutamicum* ssp. *lactofermentum* neben der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase auch eine Biotin-abhängige Pyruvat-Carboxylase besitzt. Der Nachweis dieses Enzyms konnte jedoch von einer Reihe anderer Arbeitsgruppen für *C. glutamicum* nicht verifiziert werden (Gubler *et al.*, 1994b; Jetten *et al.*, 1994; Coccagn-Bousquet und Lindley, 1995). Da die Möglichkeit bestand, daß das Enzym sehr labil ist, wurde durch Peters-Wendisch (1996) ein Testsystem für permeabilisierte Zellen entwickelt. Mit diesem *in situ* Enzymtest gelang es erstmals, Pyruvat-Carboxylase reproduzierbar in *C. glutamicum* nachzuweisen. Die Pyruvat-Carboxylase von *C. glutamicum* wird durch ADP und AMP gehemmt, wobei AMP mit einem K_i -Wert von 0,8 mM wesentlich effektiver hemmt als ADP mit einem K_i -Wert von ca. 2,6 mM. Damit wird die Aktivität der Pyruvat-Carboxylase durch eine niedrige Energieladung (Atkinson, 1977) der Zelle gehemmt. Die Pyruvat-Carboxylase von *C. glutamicum* ist wie alle bisher bekannten Pyruvat-Carboxylasen ein Biotin enthaltendes Enzym.

Durch die Hemmung der Oxalacetat-bildenden Reaktion der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase durch ADP und ATP, die zellintern mit Konzentrationen von 2 bis 10 mM vorliegen (Liebl, 1991; Gutmann *et al.*, 1993), ist es unwahrscheinlich, daß dieses Enzym *in vivo* anaplerotisch aktiv ist.

Der Glyoxylat-Weg besteht aus zwei Enzymreaktionen, Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase, und bietet die Möglichkeit, die Decarboxylierungsreaktionen des Tricarbonsäure-Zyklus zu umgehen. Die so realisierte Synthese von C_4 -Körpern aus Acetyl-Coenzym A erfüllt die Funktion einer anaplerotischen Auffüllreaktion (Kornberg, 1966). Die Existenz dieser Reaktionssequenz in Organismen der Gattung *Corynebacterium* wurde mehrfach bewiesen, die Induktion ist jedoch von den Kulturbedingungen abhängig. Während die Enzyme beim Wachstum auf Acetat in hoher Aktivität vorhanden sind, findet in *C. glutamicum* beim Einsatz von Glucose als primäre Kohlenstoffquelle keine Induktion statt (Shiio *et al.*, 1961).

3.1.2 Oxidative Phosphorylierung

Die von den Substraten stammenden Reduktionsäquivalente (Protonen und Elektronen) werden im Zuge des Elektronentransports über die Atmungskette (Protonen) durch die Cytoplasmamembran transportiert. Diese Protonentranslokation hat die Bildung eines elektrochemischen Gradienten (*pmf*) zur Folge. Diese elektrochemische Potentialdifferenz für Protonen (*proton-motive-force*) setzt sich zusammen aus der pH-Differenz (ΔpH) und dem elektrischen Membranpotential ($\Delta\Psi$);

$$pmf = \Delta\Psi - \left(2.3 \cdot R \cdot \frac{T}{F} \right) \cdot \Delta pH$$

Gleichung 1

Beim Rückstrom der Protonen in die Zelle entlang des elektrochemischen Gradienten durch den Enzymkomplex ATPase/ATP-Synthase (Elston *et al.*, 1998) wird dieses Energiepotential direkt zur Phosphorylierung von ADP zu ATP genutzt und steht dann dem Zellstoffwechsel in dieser Form zur Verfügung. Diese Reaktion ist reversibel. Der elektrochemische Gradient ist die treibende Kraft bei vielen Transportprozessen, wie z.B. beim L-Isoleucin-Transport (Hermann und Krämer, 1996; Hermann, 1998).

3.1.3 L-Isoleucin-Biosynthese

L-Isoleucin gehört neben L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin zu den Aminosäuren der Aspartatfamilie. Die Bildung dieser Aminosäuren erfolgt in *C. glutamicum* in einem verzweigten Biosyntheseweg (Abbildung 3-3). Dabei ist die L-Isoleucinbildung zusätzlich mit der Synthese von L-Leucin, L-Valin und Pantothensäure verbunden, da einige Enzyme auch Reaktionen in diesen Biosynthesewegen katalysieren. Soll eine ausgewogene Versorgung der Zelle mit den jeweils benötigten Metaboliten garantiert sein, erfordert der Reaktionsweg eine komplexe Regulation.

In *C. glutamicum* werden bei der L-Isoleucinbildung ausgehend vom L-Aspartat 5 der 10 Reaktionen auf enzymatischer oder genetischer Ebene reguliert. Die Aspartatkinase, die am Beginn der Reaktionskette steht und somit eine Schlüsselfunktion bei der Synthese aller Aminosäuren der Aspartatfamilie besitzt, unterliegt einer allosterischen Hemmung durch L-Lysin und L-Threonin (Shiio und Miyajima, 1969). Der Kohlenstofffluß in Richtung L-Isoleucin wird ferner auf der Ebene der Homoserin-Dehydrogenase kontrolliert. Dieses Enzym ist für die Bereitstellung der Vorstufen der L-Methionin-, der L-Threonin- und der L-Isoleucinbiosynthese verantwortlich. Es konkurriert mit der Dihydrodipicolonat-Synthase, einem Enzym des L-Lysinbiosynthesewegs, um das gemeinsame Substrat L-Aspartatsemialdehyd und wird in einem allosterischen Mechanismus durch L-Threonin und L-Isoleucin inhibiert (Miyajima und Shiio, 1970).

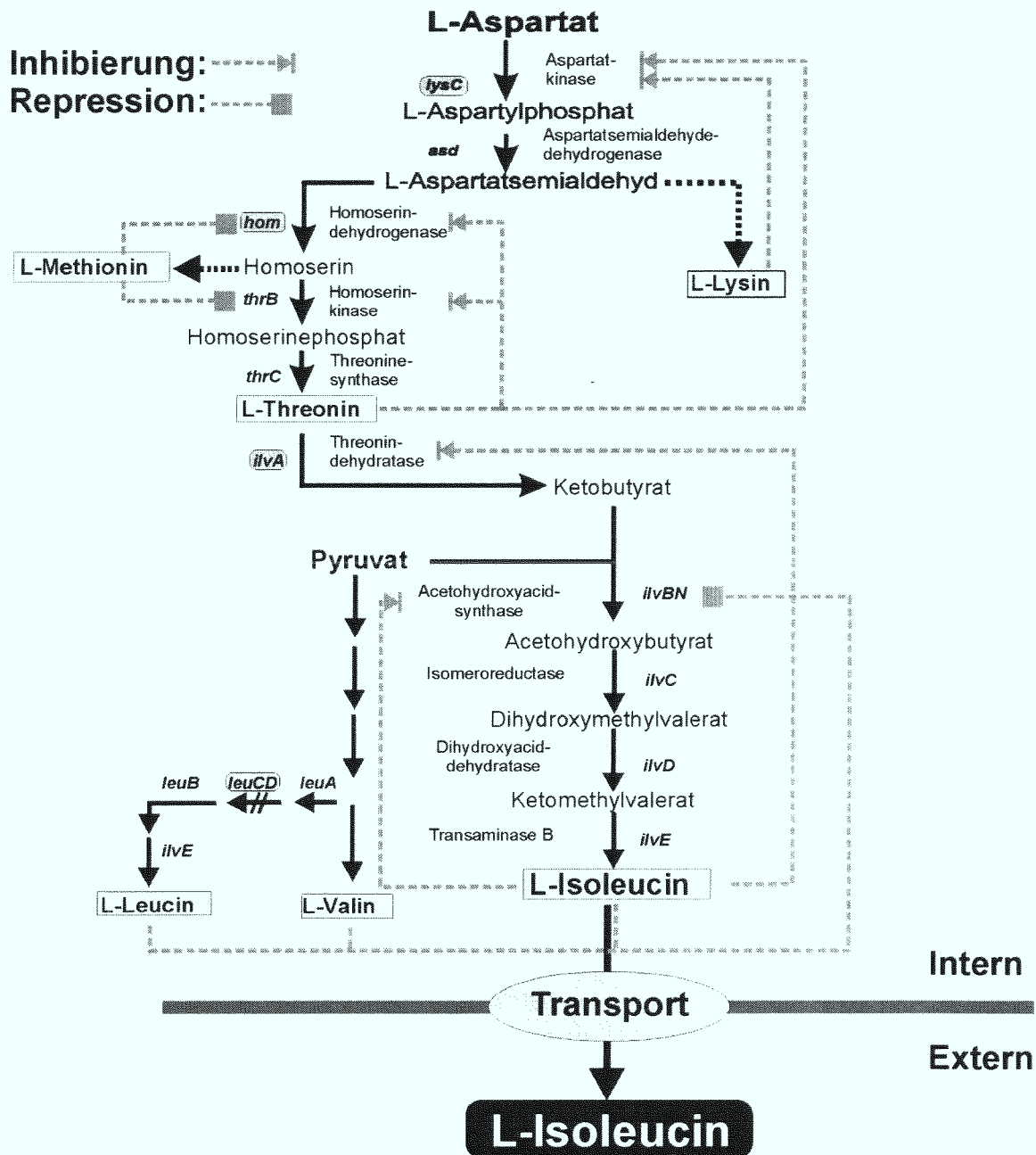


Abbildung 3-3. L-Isoleucin-Biosynthese in *Corynebacterium glutamicum*. Die Bezeichnung der Strukturgene ist kursiv dargestellt. Grau hinterlegte Strukturgene sind bei dem in dieser Arbeit verwendeten Produktionsstamm verändert. Die *feedback*-Inhibierung von Enzymen ist durch eine Linie mit Pfeilende dargestellt. Eine Repression der Genexpression ist durch eine Linie mit Quadratende dargestellt. Die letzten vier enzymatischen Umsetzungen sind identisch für die L-Isoleucin- und die L-Valin-Biosynthese. Bei der L-Isoleucin-Biosynthese wird ein Ketobutyrat und ein Pyruvat umgesetzt. Bei der L-Valin-Biosynthese werden dagegen zwei Pyruvat umgesetzt.

Das nachfolgende Enzym, die Homoserinkinase, unterliegt ebenfalls einer Aktivitätsregulation. Allerdings liegt hier ein kompetitiver Mechanismus vor (Miyajima *et al.*, 1968; Colón *et al.*, 1994). Die Aktivität dieser beiden Enzyme wird zusätzlich durch die L-Methionin-abhängige Repression der korrespondierenden Gene *hom* und *thrB* reguliert (Miyajima und Shiio, 1971; Mizukami *et al.*, 1986; Folletie *et al.*, 1988). Die Threonindehydratase katalysiert die erste Reaktion des eigentlichen L-Isoleucinbiosyntheseweges und ist gleichzeitig das einzige spezifische Enzym der

L-Isoleucinbildung. Alle nachfolgende Enzyme katalysieren ebenfalls Reaktionen in der Synthese von L-Leucin und L-Valin. Um eine spezifische Regulation zu ermöglichen, wird daher die Aktivität der Threonindehydratase allosterisch durch L-Isoleucin gehemmt (Miyajima und Shio, 1972; Möckel *et al.*, 1992). Eine weitere Kontrolle der Synthese erfolgt durch die Acetohydroxyacidsynthase (AHAS), die sowohl in der Aktivität als auch durch die Repression des *ilvBNC*-Operons reguliert wird (Eggeling *et al.*, 1987; Keilhauer *et al.*, 1993).

3.1.4 L-Isoleucin-Transport

Neben der Biosynthese muß im Hinblick auf die Aminosäureproduktion auch der Transport als eine Reaktion betrachtet werden, die an der Aminosäurebildung beteiligt ist. Der Transport über die Zellmembran dient unter physiologischen Bedingungen unter anderem der Regulation des Fließgleichgewichtes im Metabolit-Pool in Abhängigkeit von der momentanen Versorgungslage der Zelle. Produktionsbedingungen weichen jedoch sowohl in zahlreichen physikalischen Parametern, als auch bezüglich der induzierten Stoffwechselleistungen stark von natürlichen, physiologischen Konditionen ab, damit in möglichst kurzer Zeit ein gewünschtes Produkt mit hoher Selektivität produziert werden kann. Wird der Export dabei zum limitierenden Faktor, steigt die Konzentration des Produktes im Cytoplasma an, was in Abhängigkeit von den auftretenden Regulationsphänomenen zur Inhibierung der Biosynthese und damit zur Einstellung der Produktion oder zu übermäßiger Nebenproduktsynthese führen kann.

3.1.4.1 Aufnahmesysteme für verzweigtkettige Aminosäuren

Die Aufnahme von Aminosäuren und Peptiden ist für ein Bodenbakterium wie *C. glutamicum* von großer Bedeutung, da Proteine und ihre Abbauprodukte einen bedeutenden Teil ihres Substratspektrums ausmachen (Erdmann *et al.*, 1993; Erdmann und Krämer, 1994). Desweiteren wird für einen Aminosäureproduzenten wie *C. glutamicum* postuliert, daß die Aufnahmesysteme (unter Energieverbrauch) die Aufgabe der zyklischen Retention übernehmen und daß die Aminosäuren, die wegen ihres amphiphilen Charakters aus der Zelle herausgelangen, wiederum aufgenommen werden (Ingraham *et al.*, 1983; Boles *et al.*, 1993).

3.1.4.2 Exkretion von L-Isoleucin bei *C. glutamicum*

Biochemisch muß die Frage beantwortet werden, warum ein Organismus ein mit großem Energieaufwand synthetisiertes Molekül exkretiert oder zumindest die Option erhält, es zu exkretieren. Effluxcarrier können wie die Exporter der MDR-Familie (*multi drug resistance*) den Export von toxischen Substanzen wie Antibiotika oder interkalierenden Agentien katalysieren und erlauben das Wachstum in toxischer Umgebung. Handelt es sich um die fermentative Bildung von Stoffwechselendprodukten, so ist eine Exkretion wichtig (z.B. Lactat bei *E. coli*) und kann sogar der Generation von metabolischer Energie dienen (z.B. Export von Nitrit bei der Nitrat-Atmung). Dies gilt allerdings in der Hauptsache für Mono- und Dicarboxysäuren, nicht jedoch für die beispielsweise von *C. glutamicum* mit großem Energieaufwand gebildeten Aminosäuren. Hier treffen zwei andere Gründe zu. *C. glutamicum* trifft im Boden auf Peptide, die es als C- und

Energiequelle nutzt. Dabei werden nur diejenigen Aminosäuren katabolisiert, die nahe verwandt mit Molekülen des Zentralstoffwechsels sind (Glutamat, Aspartat und Alanin). Die übrigen Aminosäuren, wie L-Lysin oder L-Isoleucin, werden nicht metabolisiert und müssen unter diesen Wachstumsbedingungen exkretiert werden (Erdmann *et al.*, 1993; Krämer, 1994). Das *overflow metabolism* Konzept geht davon aus, daß es unter gewissen Bedingungen zur Exkretion von Stoffen kommen kann, die normalerweise nicht exkretiert werden, wie etwa Pyruvat, 2-Ketoglutarat oder Gluconsäure. Dies ist dann der Fall, wenn eine C- oder Energiequelle im Überfluß vorhanden ist, weil das Wachstum aufgrund eines Mangels eines einzigen Nährstoffs limitiert ist oder aber, wenn die Aufnahme eines Substrates nicht effektiv reguliert ist (Tempest und Neijssel, 1992; Krämer, 1994). Beide Bedingungen führen zum Anstieg intermediärer Metabolite im Cytoplasma, die dann nach außen transportiert werden.

Auch für L-Isoleucin wurde bei *C. glutamicum* ein aktiver Export nachgewiesen (Ebbighausen *et al.*, 1989). Bereits in dieser Studie wurde eine Abhängigkeit der Exkretion vom Membranpotential postuliert. Im Vergleich zum L-Lysintransport ist der L-Isoleucintransport bedeutend schwieriger zu untersuchen, da neben aktiver Aufnahme und Exkretion aufgrund des amphiphilen Charakters des L-Isoleucins auch passive Diffusion über die Membran stattfindet. Zitrlich und Krämer (1994) gelang es, die drei L-Isoleucinflüsse über die Membran zu quantifizieren. Die L-Isoleucinexkretion wird auf Ebene der Transport-Aktivität reguliert, unterhalb cytoplasmatischer Konzentrationen von 8 mM ist keine Exkretion zu beobachten. Oberhalb dieses Schwellenwertes wird eine Michaelis-Menten-Kinetik mit einem K_m von 21 mM (8 mM Schwellenwert + 13 mM) und einem V_{max} von 14.5 nmol·min⁻¹·mg BTM⁻¹ beobachtet. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Exkretion spezifisch ist für L-Isoleucin und daß D-Isoleucin lediglich über die Membran diffundiert.

3.2 Reaktionstechnische Grundlagen

3.2.1 Prozeßführung in Bioreaktoren

Bioreaktoren werden bezüglich des Reaktortyps (z.B. Rührkessel, Säulenreaktor oder Strömungsrohr) und der Betriebsführung eingeteilt (Dunn *et al.*, 1992). Die Betriebsführung bestimmt wesentlich die Zeitprofile der Substrat- und Produktkonzentrationen, welche häufig die Raten biologischer Reaktionen (Wachstum, Substratverbrauch, Produktbildung) bestimmen.

Der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Reaktortyp wird vereinfachend als idealer Rührkessel (Nielsen und Villadsen, 1994) betrachtet. Eine exakte Charakterisierung des Systems wurde nicht vorgenommen. Für diesen Reaktortypus werden drei Betriebsarten unterschieden.

Im Ansatzweisen-Verfahren (batch-, Satz-Betrieb) werden alle Substrate im Bioreaktor vorgelegt. Im Verlauf des Prozesses wird außer Sauerstoff, meist in Form von Luft, und Korrekturmitteln (Säure, Lauge, Antischaum) nichts zugegeben (es muß darauf hingewiesen werden daß eigentlich jeder aerober Prozeß im Prinzip schon ein Zulaufverfahren ist). Der Prozeß läuft in der Regel so lange, bis ein essentielles Substrat aufgebraucht ist oder das sich anreichernde Produkt den Organismus weitgehend inhibiert. Für den ideal gemischten Rührkessel im batch-Betrieb gilt:

$\dot{V}_{in} = \dot{V}_{out} = 0 \rightarrow V_R = \text{const.}$	$\Rightarrow$ Zeitveränderliche Reaktionsbedingungen
$c(X,S,P) = f(t)$	$\Rightarrow$ Diskontinuierlicher Prozeß
	$\Rightarrow$ Begrenzte Anlagenverfügbarkeit durch Rüstzeiten

Im Zulaufverfahren (fed-batch) werden nicht alle Substrate vollständig im Reaktor vorgelegt, sondern ein oder mehrere Substrate während des Prozesses zudosiert. Diese Dosierung kann nach einem vorgegebenen Dosierprofil erfolgen oder unter Einbeziehung direkter (Online-Substratmessung) oder indirekter (Respirations-Quotient) Meßgrößen geregelt werden.

Dieses Verfahren ist geeignet zur Kontrolle und Optimierung eines bestimmten Produktionskriteriums. (z.B. reprimierende/toxische Substrate oder starke Nebenproduktbildung). Es gilt im Idealfall:

$\dot{V}_{in} = f(\sigma)$ oder $\dot{V}_{in} = f(t)$	$\Rightarrow$ Verlängerung von Wachstum und Produktbildung
$\dot{V}_{out} = 0$	$\Rightarrow$ Höhere Biomasse- und Produktkonzentrationen
$V_R = f(t)$	$\Rightarrow$ Substratkonzentrationen im Reaktor können durch Zulaufstrategien gesteuert werden
$c(X,S,P) = f(t)$	
für nutristatische Substratregelung: $c(S) = \text{const.}$	

Durch Ablassen von Reaktorinhalt bei Bedarf kann ein Prozeß im Zulaufverfahren in ein semikontinuierliches Verfahren übergeleitet werden.

Im kontinuierlichen Verfahren schließlich wird während des Prozesses ständig Medium in den Reaktor dosiert und die entsprechende Menge wieder abgezogen. Im Regelfall des chemostatisch betriebenen Bioreaktors sind Volumenstrom und Konzentration des Mediums konstant. Im Fließgleichgewichtszustand gilt für den kontinuierlich betriebenen Bioreaktor:

$\dot{V}_{in} = \dot{V}_{out} = \text{const.}$	$\Rightarrow$ Stationärer Zustand nach Anlaufphase
$V_R = \text{const.}$	$\Rightarrow$ Konstante Reaktionsbedingungen
$c(X,S,P) = \text{const.}$	$\Rightarrow$ Hohe Anlagenverfügbarkeit
$\mu = D$	

Der in dieser Arbeit eingesetzte Diafiltrationsreaktor (Abbildung 3-4) entspricht jedoch keinem der oben beschriebenen Reaktortypen, sondern stellt einen Mischtyp dar. Mit diesem Versuchsaufbau ist es möglich durch Verdünnung mit frischem Medium ($\dot{V}_{verd.}$) und Abziehen von Permeat ($\dot{V}_{out}$) das gesamte Produktspektrum zu kontrollieren. (Biomasse ist entkoppelt von der Verweilzeit des Mediums). Gleichzeitig wird die anhand der *online*-Analytik (FIA, siehe Absatz A.5.4) ermittelte Glucosekonzentration im Bioreaktor durch die Zudosierung von Glucoselösung ($\dot{V}_{Glc}$) auf einem konstanten Wert eingeregelt.

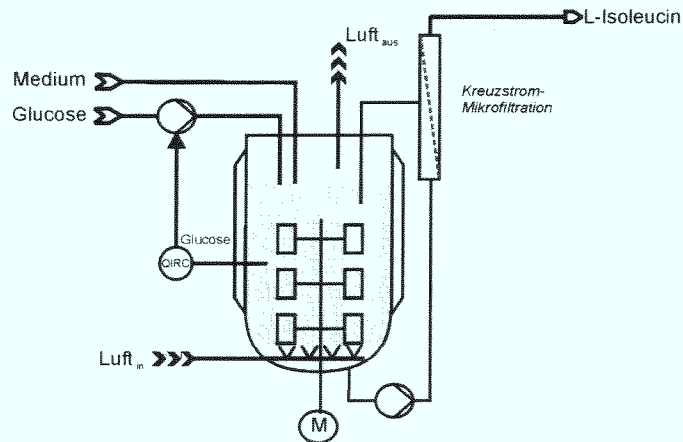


Abbildung 3-4. Schema der Diafiltrationsanlage

Für diesen Verfahrensansatz gilt:

$$\dot{V}_{verd.} = \text{const.}$$

⇒ Diskontinuierlicher Prozeß

$$\dot{V}_{Glc} = f(\sigma_{Glc})$$

⇒ Hohe Biomassekonzentrationen möglich

$$\dot{V}_{in} = \dot{V}_{out} = \dot{V}_{verd.} + \dot{V}_{Glc}$$

$$V_R = \text{const.}$$

$$c(Glc) = \text{const.}$$

⇒ Substrat- und Produktkonzentrationen im Bioreaktor unabhängig voneinander steuerbar

$$c(X, P, S(\text{nicht Glc})) = f(t)$$

Die sich daraus ergebenden Konsequenzen für die Bilanzierung werden im nachfolgenden Kapitel ausführlich behandelt.

3.2.2 Massenbilanzierung von Prozessen im Rührkesselreaktor

Die während des Prozesses in der Zelle ablaufenden Reaktionen lassen sich naturgemäß nicht beobachten. Auch die aufwendige Analyse von Zellproben kann stets nur Momentaufnahmen von Metabolitkonzentrationen bieten. Die Zellen im Bioreaktor stellen also eine „*Black Box*“ dar. Den für die Beschreibung eines Bioprozesses nötigen Aufschluß über die Abläufe im Bioreaktor kann nur eine Bilanzierung der Stoffströme in und aus dem Bioreaktor (Abbildung 3-5) bringen (Moser, 1981).

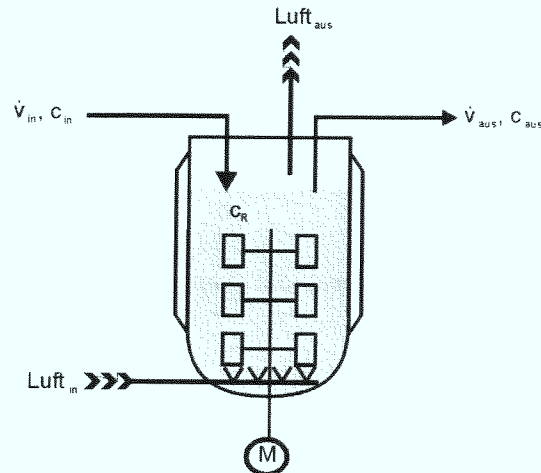


Abbildung 3-5. Idealer ($c_R = c_{aus}$) Bioreaktor als „Black Box“

Der erste Schritt bei der Formulierung einer Stoffbilanz ist die Definition der Bilanzgrenzen. Im Rührkesselreaktor ist der Bilanzraum das Bioreaktolvolumen (grau in Abbildung 3-5). Im Falle des Diafiltrationsreaktors ist auch das Filtrationsmodul mit in den Bilanzraum einzubeziehen.

Im Versuch werden die Stoffströme über die Bilanzgrenzen hinweg erfaßt. Anhand der so gewonnenen Daten werden die Reaktionen im Bioreaktor ermittelt. Die hierzu verwendeten Gleichungen ergeben sich dabei unmittelbar aus der jeweiligen Prozeßführung. Die Berechnung von Bildungs- und Verbrauchsgeschwindigkeiten in den einzelnen Versuchen ist aufgrund der ganz unterschiedlichen Versuchsanordnungen und der daraus resultierenden Stoffflüsse jeweils für die entsprechenden Bilanzgleichungen anzupassen.

Für alle Anordnungen gilt die allgemeine differentielle Bilanzgleichung für ideale Rührkesselreaktoren mit einer beliebigen Konzentration c :

$$\frac{d(V_R \cdot c_R)}{dt} = \dot{V}_{in} \cdot c_{in} - \dot{V}_{out} \cdot c_{out} \pm r_i \cdot V_R \quad \text{Gleichung 2}$$

wobei r_i jede volumenbezogene Reaktionsrate, also $\pi_{\text{volumetrisch}}$ oder $\sigma_{\text{volumetrisch}}$ sein kann (Moser, 1981). Diese Gleichung stellt somit neben der Bilanz gleichzeitig die Definitionsgleichung einer Bildungs- ($r_i > 0$) oder Verbrauchsgeschwindigkeit ($r_i < 0$) dar. Für Umsatzberechnungen in diskontinuierlichen Versuchsanordnungen muß eine Integration vorgenommen werden.

Im Batch-Ansatz reduziert sich Gleichung 2 zu:

$$\frac{dc}{dt} = \pm r_i \quad \text{Gleichung 3}$$

da $\dot{V} = 0$ und $V_R = \text{constant}$ ist. Die Volumenveränderung durch die Probenahme ist zu vernachlässigen, da die Konzentrationsverhältnisse im Reaktor in keiner Weise verändert werden.

Im Zulaufverfahren reduziert sich Gleichung 2 zu:

$$\frac{d(V_R \cdot c_R)}{dt} = \dot{V}_{in} \cdot c_{in} \pm r_i \cdot V_R \quad \text{Gleichung 4}$$

da $dV/dt \neq 0$ und $\dot{V}_{out} = 0$ ist. Auch hier ist die Volumenveränderung durch die Probenahme zu vernachlässigen.

Im kontinuierlichen Verfahren gilt Gleichung 2. Vereinfacht ergibt sich:

$$\frac{d(V_R \cdot c_R)}{dt} = \dot{V}(c_{in} - c_{out}) \pm r_i \cdot V_R \quad \text{Gleichung 5}$$

da $\dot{V}_{in} = \dot{V}_{out} = \dot{V}$ und $V_R = \text{konstant}$ ist. Verwendet man die Größe der mittleren Verweilzeit $\bar{\tau}$ [h] bzw. die sogenannte Durchflußrate D [h⁻¹]

$$D \stackrel{\text{Def}}{=} \frac{1}{\bar{\tau}} = \frac{\dot{V}}{V_R} \quad \text{Gleichung 6}$$

so erhält man aus Gleichung 5

$$\frac{dc}{dt} = D(c_{in} - c_{out}) \pm r_i \quad \text{Gleichung 7}$$

Für den stationären Fall ($dc/dt = 0$) lautet somit die Bilanzgleichung des kontinuierlichen Rührkessels

$$D(c_{in} - c_{out}) = \pm r_i \quad \text{Gleichung 8}$$

Ist z.B. im Falle eines mikrobiellen Wachstumsprozesses in einem kontinuierlichen Rührkessel $X_{in} = 0$, so erhält man unter Verwendung von Gleichung 13 (Seite 21) für die Wachstumsgeschwindigkeit die bekannte Beziehung für den Gleichgewichtszustand, der die Grundlage des sogenannten Chemostat-Betriebes von kontinuierlichen Prozessen bildet:

$$D = \mu \quad \text{Gleichung 9}$$

Alle bislang aufgeführten Gleichungen beschreiben Bilanzen unter Einbeziehung von Reaktionstermen und konvektiven Stoffströmen. Für die Bilanzierung der Stofftransporte, die über die Gasphase hinweg stattfinden (Diffusion), ist die Betriebsführung des Bioreaktors unerheblich, da die gelöste Form ein- bzw. ausgetragener Gasmengen zur Vereinfachung oftmals nicht berücksichtigt werden. Die für Gase üblichen Größen (Oxygen Uptake Rate = Sauerstoffaufnahme-rate, Carbon Evolution Rate = Kohlendioxidbildungsrate) berechnen sich wie folgt:

$$OUR \stackrel{\text{Def}}{=} \frac{\dot{V}_g([O_2]_{in} - [O_2]_{aus})}{V_R} \quad \text{Gleichung 10}$$

$$CER \stackrel{\text{Def}}{=} \frac{\dot{V}_g([CO_2]_{aus} - [CO_2]_{in})}{V_R} \quad \text{Gleichung 11}$$

Von der gezeigten Stoffbilanz ausgehend kann eine Elementbilanz, meist für die Hauptelemente (C,N,O und P), durchgeführt werden. Da Elemente nicht verändert werden, kann auf die Einführung von Reaktionstermen verzichtet werden, und es ergibt sich für die Elementbilanz ein einfaches Schema. Die Akkumulation im Bioreaktor ergibt sich aus dem Massefluß in den

Bioreaktor abzüglich des Masseflusses aus dem Bioreaktor. Üblicherweise wird angegeben, welcher Anteil des Elementes aus den Edukten in den Produkten wiedergefunden wird. Über eine Elementbilanz lassen sich Exaktheit und Vollständigkeit der durchgeführten Analysen überprüfen.

Das über die Begasung eingetragene CO_2 , sowie die über die wäßrige Phase ein- und ausgetragenen Mengen werden oft vernachlässigt. Die integrale Kohlenstoffbilanz ergibt sich wie folgt:

$$\begin{aligned} & \left[\frac{w_c \cdot [X]_{R(t)} \cdot V_{R(t)}}{M_c} + \sum_{n=1}^m v_n \cdot [P]_{nR(t)} \cdot V_{R(t)} + \sum_{n=1}^m v_n \cdot [S]_{nR(t)} \cdot V_{R(t)} \right] = \\ & \left[\frac{w_c \cdot [X]_{R(0)} \cdot V_{R(0)}}{M_c} + \sum_{n=1}^m v_n \left([S]_{nR(0)} \cdot V_{R(0)} + \int_0^{t_{\text{Ende}}} ([S]_{n(in)} \cdot \dot{v}_{in}) dt \right) \right] - \\ & \left[\sum_{n=1}^m v_n \left(\int_0^{t_{\text{Ende}}} ([S]_{n(aus)} \cdot \dot{v}_{aus}) dt \right) + \sum_{n=1}^m v_n \left(\int_0^{t_{\text{Ende}}} ([P]_{n(aus)} \cdot \dot{v}_{aus}) dt \right) \right] - \\ & \left[v_{\text{CO}_2} \cdot \int_0^{t_{\text{Ende}}} ([\text{CO}_2] \cdot \dot{v}_g) dt \right] \end{aligned} \quad \text{Gleichung 12}$$

Die Bilanzen aller anderen Elemente ergeben sich analog. Für die Bilanzierung eines Ansatzweise-Verfahrens mit $\dot{v}_{in} = \dot{v}_{aus} = 0$ entfallen alle Termen aus der Gleichung, die den Volumenstrom des Mediums durch den Bioreaktor ($\dot{v}_{in}, \dot{v}_{aus}$) beinhalten, für einen Prozeß im Zulaufverfahren entfallen alle Terme, die einen Abflußvolumenstrom ($\dot{v}_{aus}$) enthalten.

Das Wachstum vom Mikroorganismen wird in der Regel durch die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit

$$\mu \stackrel{\text{Def}}{=} \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_X}{dt} \quad \text{Gleichung 13}$$

beschrieben. Damit wird unter dem Wachstum μ die spezifische Biomassezunahme pro Zeiteinheit verstanden. Zeitliche Änderungen der Zellzahl und des Zellvolumens sind demnach nur indirekt beinhaltet.

Analog dazu erfolgt die Definition der biomassespezifischen Substratverbrauchsrate

$$\sigma \stackrel{\text{Def}}{=} \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_S}{dt} \quad \text{Gleichung 14}$$

Analog zur Formulierung der biomassespezifischen Substratverbrauchsrate wird die biomassespezifische Produktbildungsrate π_p des Produktes c_p definiert als

$$\pi_p \stackrel{\text{Def}}{=} \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_p}{dt} \quad \text{Gleichung 15}$$

Als Bindeglied zwischen den Reaktionstermen werden Selektivitätskoeffizienten (*Yield-Koeffizienten*) definiert, die z.B. den Anteil der Biomassezunahme am Substratverbrauch angeben.

$$Y_{XS} \stackrel{\text{Def}}{=} \frac{dc_X}{dc_S} \quad \text{Gleichung 16}$$

$$Y_{XP} \stackrel{Def}{=} \frac{dc_X}{dc_P}$$

Gleichung 17

$$Y_{PS} \stackrel{Def}{=} \frac{dc_P}{dc_S}$$

Gleichung 18

Hier ist besonders die Bedeutung der Produkt-Substrat-Selektivität (Y_{PS}) hervorzuheben, da sie angibt, wieviel Produkt unter Verwendung welcher Menge an Substrat produziert wird. Bei der Modellierung der biomassespezifischen Produktbildung π_p haben sich vier unterschiedliche Arten der Produktbildung durchgesetzt.

Bei der Produktbildung mit Hilfe ruhender Zellen ($\mu=0$) werden diese lediglich als „Enzymträger“ für eine Biotransformation verwendet. Der Substratverbrauch beschränkt sich auf die Aufrechterhaltung des Erhaltungsstoffwechsels. Beispiele solcher Produktionsverfahren sind die Steroidtransformation und die Vitamin E-Synthese mit *Saccharomyces cerevisiae* (Moser, 1981; Faber, 1992).

Die wachstumsassoziierte Produktbildung zeichnet sich durch einen direkten Zusammenhang zwischen Produktbildungsgeschwindigkeit π_p und Wachstumsgeschwindigkeit μ aus. Produkte der Zellen stammen direkt aus dem Energiestoffwechsel.

Nicht immer ist eine eindeutige Kopplung zwischen Wachstum und Produktbildung erkennbar. Wenn das Produkt indirekt mit dem Energiestoffwechsel in Beziehung steht, wird es oftmals erst in einer späteren Wachstumsphase gebildet. Dies trifft für die Essigsäureproduktion (von Eysmond *et al.*, 1990) oder die Aminosäureherstellung (Kiss und Stephanopoulos, 1991 und 1992) zu.

Bei wachstumentkoppelter Produktbildung gibt es keinen Zusammenhang zwischen Energiestoffwechsel und Produkt. Dies ist beispielsweise bei der Antibiotikaproduktion (Penicillin, Streptomycin) der Fall (Moser, 1981).

Eine umfassende Beschreibung für alle Arten der Produktbildung schlugen Ludeking und Piret (1959) vor. Ihr Ansatz

$$\pi_p \stackrel{Def}{=} \frac{\mu}{Y_{XP}} + K_p$$

Gleichung 19

beinhaltet sowohl einen wachstumsgekoppelten (μ/Y_{XP}) als auch einen wachstumentkoppelten (K_p) Produktbildungsanteil. Abbildung 3-6 bietet einen Überblick über die unterschiedlichen Formen der Produktbildung.

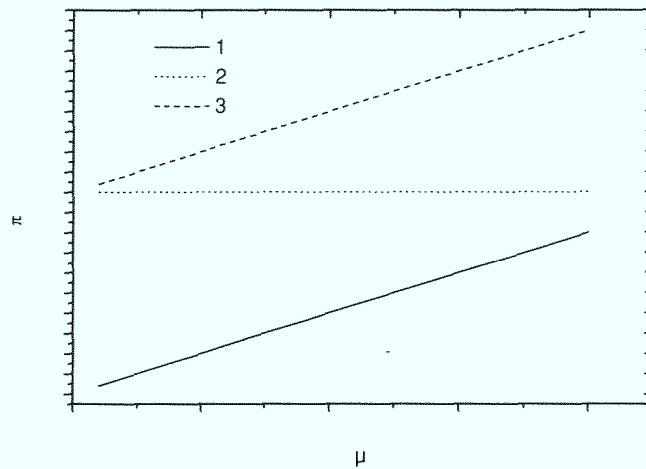


Abbildung 3-6. Spezifische Produktbildungsrate π in Abhängigkeit von der spezifischen Wachstumsrate μ . Die Ziffern kennzeichnen wachstumsgekoppelte (1), teilweise wachstumsgekoppelte (2) und wachstumsentkoppelte (3) Produktbildung.

Neben der Bestimmung der differentiellen Selektivität wird eine integrale Selektivitätsbestimmung zur Beurteilung des Gesamtprozesses eingesetzt, z.B. für die Biomasse ist

$$Y_{XS} \stackrel{\text{Def}}{=} \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad \text{Gleichung 20}$$

Dabei wird die über den ganzen Zeitraum akkumulierte Biomasse durch die gesamte verbrauchte Substratmenge geteilt.

Neben der Bestimmung der differentiellen Produktivität wird eine integrale Produktivitätsbestimmung zur Beurteilung des Gesamtprozesses eingesetzt, auch integrale Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) genannt.

$$RZA \stackrel{\text{Def}}{=} \frac{C_{P,\max} - C_{P,I=0}}{t_{\max}} \quad \text{Gleichung 21}$$

Die RZA ist ein Quotient aus Gesamtproduktmenge bezogen auf Prozeßzeit und Reaktorvolumen. Für die differentielle Raum-Zeit-Ausbeute gilt

$$RZA_{\text{diff}} \stackrel{\text{Def}}{=} \frac{dc_p}{dt} \quad \text{Gleichung 22}$$

4 Ergebnisse und Diskussion

Mit dem von Kelle *et al.* (1996) etablierten Zulaufverfahren und dem im IBT1 entwickelten Produktionsstamm *C. glutamicum* DR17 pECM3::ilvA38 ist es möglich, eine L-Isoleucinkonzentration zwischen 150 und 160 mM zu erreichen, mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von $4,3 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ und einer Produktselektivität von $0,14 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$. Die Charakterisierung des transmembranen L-Isoleucin-Transportes zeigte, daß *C. glutamicum* DR17 pECM3::ilvA38 bei der L-Isoleucin-Produktion sehr viel Energie verwendet, um das in die Zelle zurückdiffundierende Produkt mit dem aktiven Exportsystem zu sekretieren. Es wird eine biomassespezifische L-Isoleucin Produktbildungsrate von $4,3 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ erreicht. Nach 30 Stunden nimmt die biomassespezifische L-Isoleucin-Produktbildungsrate ab und sinkt bis $0 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ nach 50 Stunden.

4.1 Ausgangssituation und Lösungsansätze

Aufgrund dieser Ergebnisse (Kelle, 1996) und des L-Isoleucins-Transports (Hermann, 1998) wurde der energetische Zustand der Zellen während des Prozesses untersucht. Dazu wurden zwei 30 l-Versuche im Zulaufverfahren vergleichbar mit den 300 l-Versuchen von Kelle *et al.* (1996) durchgeführt. Um auch im Labormaßstab gleiche Bedingungen zu garantieren, wurden noch einmal alle bereits gemessenen Parameter verifiziert, wie z.B. externe und cytoplasmatische L-Isoleucin-Konzentration, L-Isoleucin-Transportrate und die biomassespezifische L-Isoleucin-Produktbildungsrate (Abbildung 4-1).

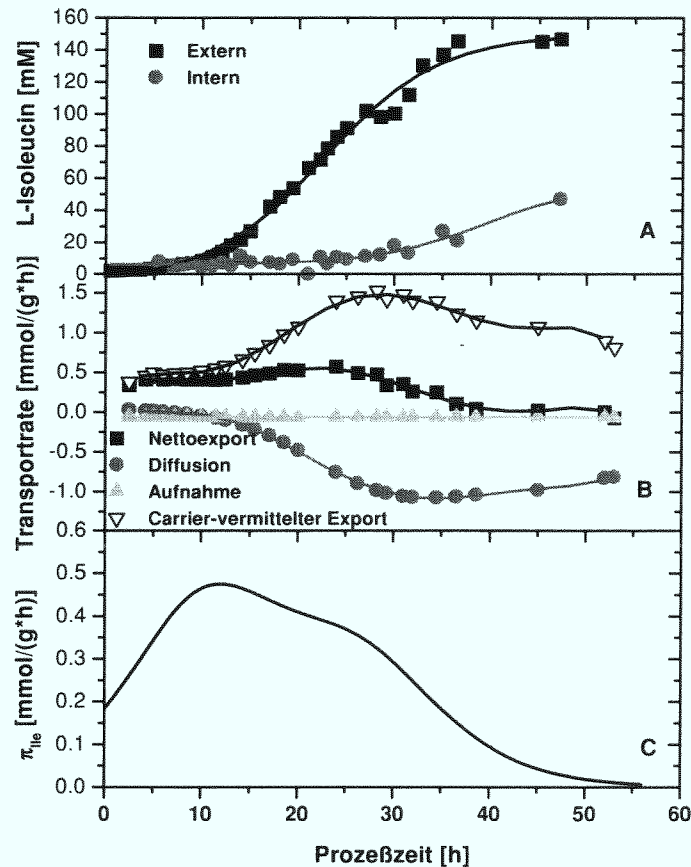


Abbildung 4-1. Verlauf der cytoplasmatischen (●) und der externen (■) L-Isoleucinkonzentration (A), Transportraten (B) und biomassespezifische L-Isoleucin-Produktbildungsrate (C) während eines 30-l-Versuches im Zulaufverfahren mit *C. glutamicum* DR17 pECM::ilvA38. Zur Beschreibung der Transportprozesse (B) sind über die Zeit aufgetragen: Diffusion (●), berechnet aus der biomassespezifischen L-Isoleucin-Produktbildungsrate (C), L-Isoleucinaufnahmerate (○), experimentell bestimmt (Hermann und Krämer, 1996), tatsächlicher Carrier-vermittelter Export (▽), berechnet aus Nettoexport(+)-Diffusion-L-isoleucinaufnahmerate. Positive Vorzeichen stehen für Export, negative für einen Import in die Zellen.

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben aus dem Reaktor entnommen und die Messung der ATP-Konzentration und des Membranpotentials unmittelbar durchgeführt. Das Membranpotential steigt während des Versuchs innerhalb von 30 Stunden von -160 auf -100 mV und erreicht -90 mV nach 50 Stunden (Abbildung 4-2). Bei diesen hohen Werten zeigte Hermann (1998), daß die Effluxrate bei $0,17 \text{ min}^{-1}$ (-110 mV) und $0,04 \text{ min}^{-1}$ (-90 mV) liegt.

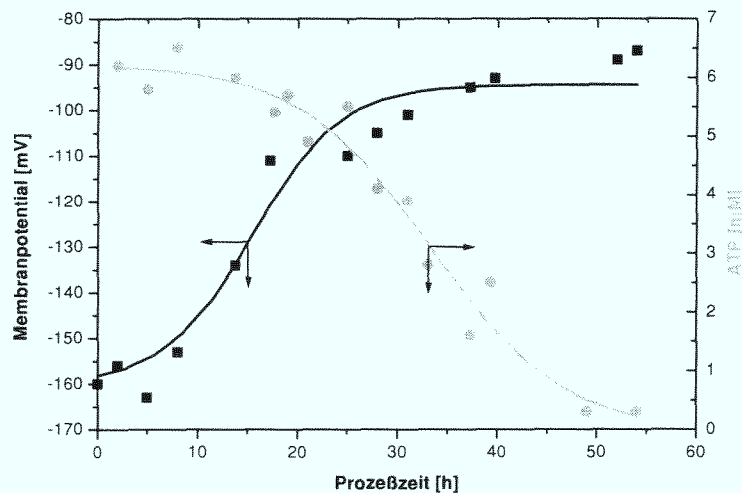


Abbildung 4-2. L-Isoleucin Herstellung im Zulaufverfahren: Zeitlicher Verlauf des Membranpotentials (■) und der cytoplasmatischen ATP-Konzentration (●).

Das bedeutet, daß trotz steigender Exportkapazität das zunehmende Membranpotential die Exportrate auf etwa 15 % des Ausgangswertes verringert. Der pH-Gradient über die Zellmembran verändert sich im Verlauf des Versuchs nicht (Δ pH 0,3 - 0,5). Die Energie (ATP) der Zelle bricht nach 30 Stunden zusammen, dies kann eine Abnahme der biomassespezifischen L-Isoleucin-Produktbildungsrate von $0,3 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ nach 30 Stunden bis ca. $0 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ nach 50 Stunden zur Folge haben. Interessant ist die zeitliche Korrelation der oben beschriebenen Phänomene mit der starken Abnahme der biomassespezifischen L-Isoleucin-Produktbildungsrate (Abbildung 4-1 und Abbildung 4-2).

Diese Phänomene können mit verschiedenen Arbeitshypothesen erklärt werden:

1. Bildung toxischer Nebenprodukte

Bezüglich der L-Isoleucin-Biosynthese, ausgehend von D,L- α -Hydroxybutyrat, hat Wilhelm *et al.* (1989) das Nebenproduktspektrum charakterisiert und die Bildung der verschiedenen Komponenten über die Zeit verfolgt. Hierbei konnten diverse Abbauprodukte der in der L-Isoleucin-Biosynthese integrierten Stoffwechselintermediate nachgewiesen werden, wobei einige aus der chemischen Decarboxylierung herrühren und andere Produkte enzymatische Folgereaktionen sind. Generell gilt dabei, daß beim gegebenen Substratspektrum der Enzyme des Stoffwechselweges für verzweigtkettige Aminosäuren die Erhöhung der intrazellulären Konzentration der Ketosäuren oder der Aktivität der Ketosäuren verwertenden Enzyme eine vermehrte Synthese toxischer Nebenprodukte zur Folge hat (Eggeling *et al.*, 1988; Eggeling *et al.*, 1997). Beispiele sind die Bildung von Metabolit-Analoga, die im Bezug auf den Stoffwechsel deregulierend sein können. Bei hohen Ketobutyrate-Konzentrationen kann die Isopropylmalatsynthase, die normalerweise Ketovalin umsetzt, auch mit Ketobutyrate reagieren, so daß Norvalin entsteht. Diese nicht natürliche Aminosäure ist ein Analogon zu L-Valin und kann regulatorisch wirken, ohne jedoch die Funktion

von L-Valin zu erfüllen. Ferner ist auch bekannt, daß die Isopropylmalatsynthase auch Ketoisoleucin umsetzt, wobei dann einen L-Isoleucin-Analogon (Homoisoleucin) entsteht (Wilhelm, 1987; Wilhelm *et al.*, 1989).

2. Veränderung der Fluidität der Zellmembran durch L-Isoleucin

Aufgrund des hydrophoben Charakters der aliphatischen Seitenkette des L-Isoleucins kann diese in Interaktion mit den ebenfalls hydrophoben Alkylresten von Lipiden der Plasmamembran treten. Es ist durchaus vorstellbar, daß dadurch eine Veränderung der Eigenschaften der Zellmembran, z.B. hinsichtlich Fluidität oder Permeabilität hervorgerufen wird. Im physiologisch normalen Zustand sind Membranen für Ionen weitgehend undurchlässig, so daß die Protonen nur durch entsprechende Ionenkanäle in die Zelle strömen können. Würde nun durch eine postulierte Veränderung der Plasmamembran deren Permeabilität für Ionen erhöht, käme dies letztendlich einer Entkopplung der Atmungskette gleich.

3. Entkopplung durch L-Isoleucin

In *C. glutamicum* stehen für den Transport von L-Isoleucin durch die Zellmembran aktive, energieabhängige Import- und Exportsysteme zur Verfügung. Gleichzeitig diffundiert L-Isoleucin in Abhängigkeit von seinem Konzentrationsgradienten mit hoher Diffusionskonstante durch die Membran. In Abhängigkeit von der steigenden extrazellulären L-Isoleucin-Konzentration bei annähernd konstanter intrazellulärer Konzentration erhöht sich der diffusive Fluß von L-Isoleucin in die Zelle im Verlauf des Versuchs ständig. Nach bisherigen Erkenntnissen ist die Kapazität des L-Isoleucin-Export-Carriersystems über weite Strecken des Versuchs nicht limitierend, erst bei sehr hohen Konzentrationen stößt es an die Grenzen seiner Leistungsfähigkeit. Das L-Isoleucin-Export-Carriersystem kann den diffusiven Zufluß an L-Isoleucin zwar zunächst noch ausgleichen, verbraucht aber dabei zusätzliche Energie. Anschließend steigt der cytoplasmatische L-Isoleucingehalt an und der Export-Carrier wird stärker exprimiert (Hermann, 1998). Durch diesen zunehmenden „Kurzschlußstrom“, der unter den gewählten Bedingungen nach etwa 25 bis 30 Stunden einsetzt, verstärkt sich der Abbau des elektrochemischen Potentials über der Membran (durch Entkopplung). L-Isoleucin ruft ein *futile cycling* hervor, indem es gleichzeitig aktiv exkretiert und aufgenommen wird, bzw. passiv in die Zelle diffundiert (Ebbighausen und Krämer, 1989).

4. Fehlbeladung der tRNA

Durch das hohe intrazelluläre L-Isoleucin/L-Valin-Verhältnis im L-Isoleucin-Produktionsstamm *C. glutamicum* DR17 pECM3::ilvA38 (Kelle *et al.*, 1996) wäre es vorstellbar, daß L-Isoleucin aufgrund der Ähnlichkeit zu L-Valin zu einer verstärkten Fehlbeladung der Valyl-tRNA-Synthetase führt und so über eine Beeinflussung der Proteinbiosynthese zu einer schwer zu definierenden Inhibierung des Metabolismus führt.

5. Sonstige Ursachen

Über die beschriebenen möglichen Auswirkungen des L-Isoleucins hinaus ist auch noch vorstellbar, daß eine toxische, inhibierende oder limitierende Wirkung auf andere, bislang nicht betrachtete Bereiche des Zentralstoffwechsels durch L-Isoleucin selbst oder andere Metabolite vorliegt.

Es muß davon ausgegangen werden, daß die anfangs beschriebene energetische Limitierung des Zellstoffwechsels, verbunden mit einer Abnahme der biomassespezifischen L-Isoleucin-Produktivität, nicht auf eine einzige, klar umrissene Ursache zurückzuführen ist. Vielmehr ist anzunehmen, daß die Ursachen von pleiotropischer Art sind.

4.2 Untersuchungen zur Produktinhibierung

4.2.1 Vorversuche im Schüttelkolben

Als erster Schritt zur Aufklärung der beschriebenen Phänomene sollte in Schüttelkolben-Experimenten festgestellt werden, ob L-Isoleucin einem hemmenden/toxischen Effekt auf den Stoffwechsel der Zelle hat. Eine auftretende Hemmung sollte dabei bezüglich der Größenordnung charakterisiert werden. In zwei Versuchsreihen wurde *C. glutamicum* DR17 pECM3::ilvA38 in Schüttelkolben, analog zur zweiten Vorkulturstufe, mit verschiedenen Konzentrationen von L-Isoleucin im Medium inkubiert. Es wurde jeweils ein Doppelansatz aus einer Komplexkultur (Erste Vorkulturstufe des Prozesses, siehe Anhang A.3.1) angeimpft.

Der Verlauf der Biotrockenmassekonzentration zeigt, daß bereits eine geringe Konzentration von 10 mM L-Isoleucin eine deutliche Wachstumshemmung hervorruft. Die Wachstumskurve für den Ansatz mit 20 mM L-Isoleucin liegt zwischen denen für 10 und 30 mM. Die Ansätze mit höheren Konzentrationen liegen entsprechend noch tiefer (Abbildung).

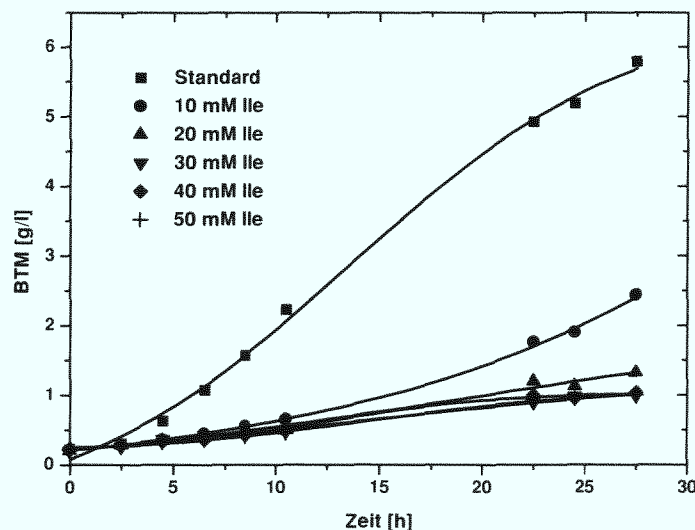


Abbildung 4-3. Schüttelkolbenversuch zur Bestimmung des Einflusses von L-Isoleucin: Zeitlicher Verlauf der Biotrockenmasse. Die L-Isoleucin-Konzentration im Medium wurde variiert von 0 (■), 10 (●), 20 (▲), 30 (▼), 40 (◆) bis 50 mM (+). Der Versuch wurde nach 27,5 Stunden abgebrochen.

Im Zulaufverfahren im Bioreaktor werden zum Vergleich etwa 160 mM L-Isoleucin erreicht, ein Faktor 3,2 höher als die maximal vorgelegte L-Isoleucin-Konzentration. Der pH blieb bei allen Ansätzen (7,5 - 8,0) durch die hohe Pufferkapazität des ungelösten CaCO_3 unverändert.

In der Wiederholung der Versuchsreihe mit niedrigeren L-Isoleucinkonzentrationen (1, 2, 5, und 10 mM) zeigte sich, daß Konzentrationen unter 10 mM L-Isoleucin keine signifikante Änderung des Wachstums im Schüttelkolben hervorrufen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Neben L-Isoleucin könnten auch andere (Neben-)Produkte an diesen toxischen/hemmenden Effekten beteiligt sein. Um den Einfluß möglicher toxischer Substanzen aufzuklären, wurde im Medium nach entsprechenden Nebenprodukten gesucht. Dabei zeigte sich, daß am Ende des Prozesses im Zulaufverfahren neben 160 mM L-Isoleucin, 25 mM Ketoisoleucin, 10 mM Pyruvat, 4,5 mM Lactat und 2,5 mM Acetat im Medium vorlagen. Jede dieser Substanzen könnte für die gefundenen Effekte mit verantwortlich sein, z.B. Acetat und Lactat wie bei Axe und Bailey beschrieben (1995). Die daneben im Medium gefundenen Aminosäuren Lysin (20 mM), Homoserin (1,8 mM) und Threonin (1,5 mM) sind als Ursache eher unwahrscheinlich. Ob die oben genannten Substanzen einen Einfluß auf die Zelle haben, wurde schon durch Hermann (1998) mit dem Wildtyp *C. glutamicum* ATCC 13032 im Schüttelkolben untersucht. Die Ergebnisse zeigten, daß auch hier L-Isoleucin den deutlichsten Einfluß hat. Substanzen wie Acetat, Lactat und Ketoisoleucin üben bei niedrigen Konzentrationen (<25 mM) nur einen geringen Effekt aus. Die kombinierte Zugabe aller Substanzen hat den größten hemmenden/toxischen Effekt auf die Zelle.

Überraschend ist, daß schon ab einer Konzentration von 10 mM L-Isoleucin eine Hemmung beobachtet wurde, obwohl im Zulaufverfahren daß sechzehnfache erreicht wird. Wahrscheinlich adaptieren die Zellen sich an den graduellen Anstieg der L-Isoleucin-Konzentration.

4.2.2 Ansatzweise Verfahren im Rührkessel mit verschiedenen L-Isoleucin-Konzentrationen

Nachdem im Schüttelkolben bereits die hemmende Wirkung von L-Isoleucin in der Medienvorlage gezeigt werden konnte, sollten diese Ergebnisse im Bioreaktor reproduziert und die auftretenden Effekte genau untersucht werden. Dazu wurden mehrere Versuche im 7,5-l-Bioreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 5 l durchgeführt. Als einziger Prozeßparameter wurde dabei die L-Isoleucin-Konzentration in der Vorlage variiert. Aufgrund der im Schüttelkolben ermittelten Daten wurden als Vorlagekonzentrationen 0, 10 und 25 mM L-Isoleucin ausgewählt.

Bei der Betrachtung des Verlaufs der Biomassekonzentration und der Wachstumsrate (Abbildung 4-4) zeigt sich wie schon im Schüttelkolbenversuch zunächst eine deutliche Verlängerung der lag-Phase ($\mu_{\max}$ wird später erreicht). Abbildung 4-4 C zeigt, daß bei der Berechnung der Wachstumsrate in den ersten 12 Stunden erhebliche Abweichungen zu beobachten sind und daher keine Aussage möglich ist. Erst bei einer Vorlage von 25 mM L-Isoleucin ist eine deutliche, signifikante Verlängerung erkennbar. Eine Abnahme der maximalen Wachstumsrate konnte allerdings für beide L-Isoleucinkonzentrationen nicht signifikant nachgewiesen werden.

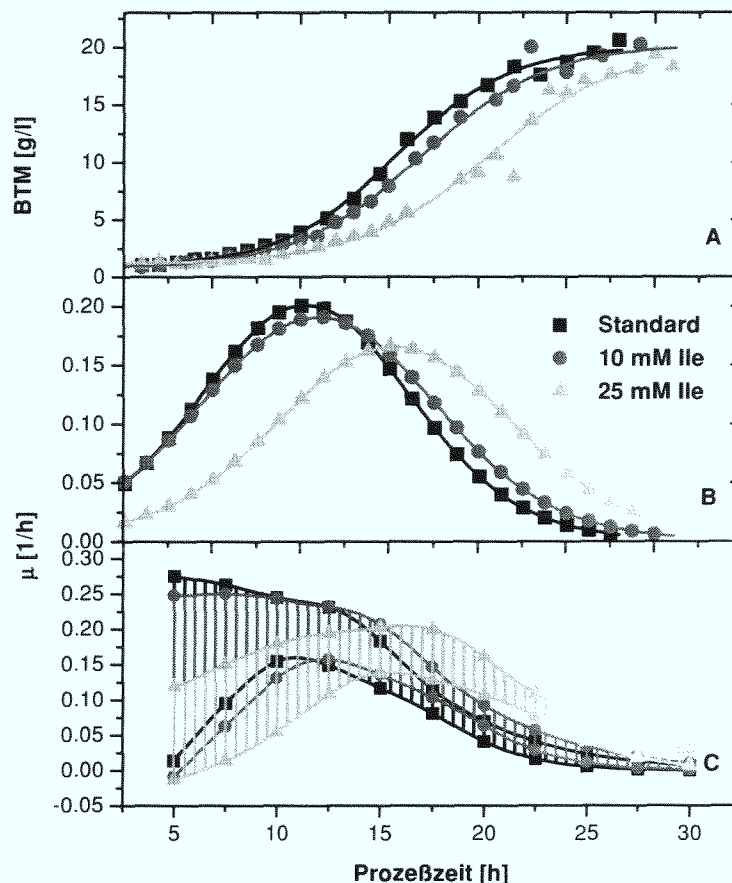


Abbildung 4-4. Ansatzweise-Verfahren mit verschiedenen L-Isoleucinvorlagen. Einfluß der L-Isoleucin-Konzentration im Vorlagemedium auf das Biomassewachstum: Zeitliche Verläufe der Biotrockenmassekonzentration (A) und Wachstumsrate (B), berechnet aus der Anpassung der gemessenen Parameter und dem 95%-Vertrauensbereich (C) dieser Berechnung (siehe Anhang A.8 und A.9).

Betrachtet man hingegen die Produktbildung (Abbildung 4-5), so fällt auf, daß die Verzögerung der Produktbildung und die Erniedrigung der volumetrischen Produktbildungsrate auf die niedrigere Biomassekonzentration im Bioreaktor zurückzuführen ist. Bei der biomassespezifischen L-Isoleucin-Produktbildungsrate (Abbildung 4-5) ist kein deutlicher Zusammenhang zur L-Isoleucin-Konzentration im Vorlagemedium erkennbar. Die vorhandenen Unterschiede sind nur während der letzten 8 Stunden des Prozesses signifikant. Entgegen der Erwartung übt L-Isoleucin keinen signifikanten inhibierenden Einfluß auf die biomassespezifische L-Isoleucin-Produktbildungsrate aus, sondern es verzögert den Zeitpunkt der Abnahme der L-Isoleucin-Produktivität der Zelle. Die Verlängerung der lag-Phase des Wachstums durch L-Isoleucin könnte auch zur Folge haben, daß eine eventuelle Substrat-Limitierung oder Nebenprodukt-Inhibierung sich später zeigt.

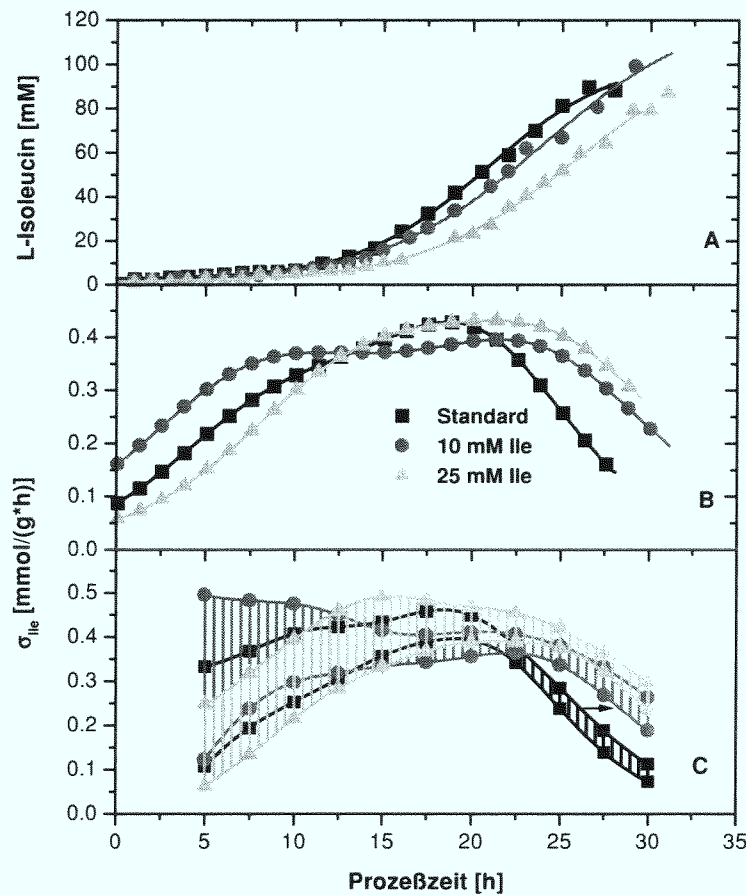


Abbildung 4-5. Ansatzweise-Verfahren mit verschiedenen L-Isoleucinvorlagen. Einfluß der L-Isoleucin-Konzentration im Vorlagemedium auf die biomassespezifische L-Isoleucin-Produktbildung: Zeitliche Verläufe der L-Isoleucin-Konzentration (A), der biomassespezifischen Produktbildungsrate (B), berechnet aus der Anpassung der gemessenen Parameter und dem 95%-Vertrauensbereich (C) dieser Berechnung (siehe Anhang A.8 und A.9). Die gemessene L-Isoleucin-Konzentration wurde jeweils um die L-Isoleucin-Vorlagekonzentration korrigiert.

Der Verlauf der internen ATP-Konzentration der Zellen zeigt keinen Zusammenhang mit der L-Isoleucin-Konzentration (Abbildung 4-6). Bei dem Ansatz mit 25 mM L-Isoleucin in der Vorlage bleibt die ATP-Konzentration über eine längere Zeit stabil im Vergleich zu den anderen Versuchen. Offensichtlich sind die Zellen bei niedrigerer Wachstumsrate besser in der Lage, unter den gegebenen Bedingungen den zellinternen ATP-Pool aufrechtzuerhalten als bei normalem Wachstum. Ein direkter Zusammenhang zwischen der L-Isoleucin-Konzentration und dem zellinternen ATP-Pool konnte nicht nachgewiesen werden (Abbildung 4-6).

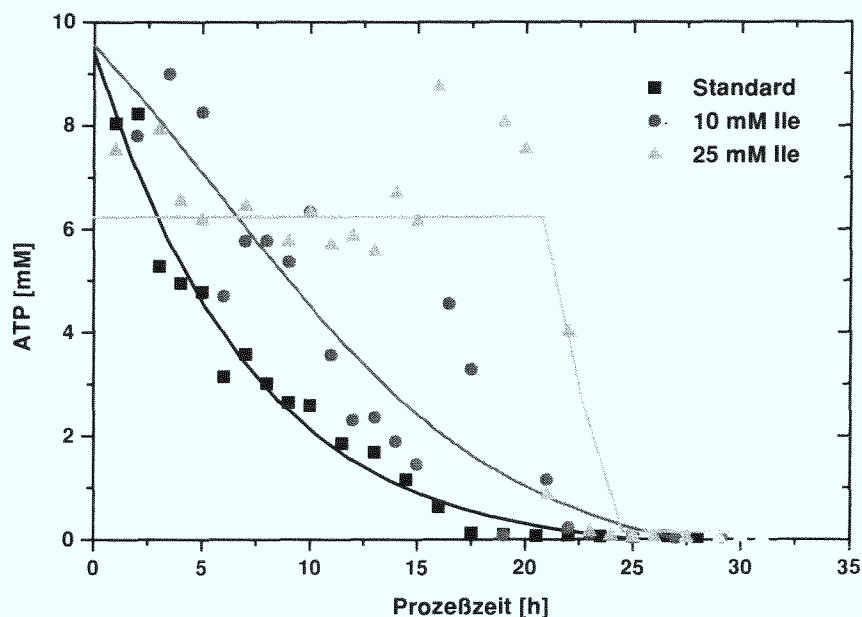


Abbildung 4-6. Ansatzweise-Verfahren mit verschiedenen L-Isoleucin-Konzentrationen im Vorlagemedium. Einfluß der L-Isoleucin-Konzentration im Vorlagemedium auf den Energiestoffwechsel: Zeitlicher Verlauf der zellinternen ATP-Konzentration, wobei die durchgezogenen Linien jeweils die Tendenzen andeuten.

Sollte ein eventueller toxischer oder entkoppelnder Effekt ganz oder teilweise auf die Produktion des L-Isoleucins zurückzuführen sein, sollte man auch eine erhöhte Atmungsaktivität der Zellen messen können, die in Gegenwart von L-Isoleucin gewachsen sind bzw. wachsen. Hermann (1998) zeigte, daß die Atmungsaktivität in Gegenwart von 200 mM L-Isoleucin ansteigt und mit dem Sprung der Expressionsrate des Exportcarriers korreliert. Auch wurde ein hemmender Einfluß von L-Isoleucin auf die Aktivität der Atmungskettenenzyme (NADH- und Succinat-Dehydrogenase) festgestellt.

Die Ergebnisse der biomassespezifischen Sauerstoffverbrauchs- (σ_{O_2}) und Kohlendioxidproduktionsrate (π_{CO_2}) (Abbildung 4-7) in dem Versuch mit hoher L-Isoleucin-Konzentration in der Vorlage (25 mM) zeigen einen signifikanten Unterschied zu dem Standard- und 10 mM L-Isoleucin-Prozeß. Bei dem Standard-Prozeß wird eine maximale biomassespezifische σ_{O_2} und π_{CO_2} von ca. 10 bzw. 8 mmol·g_{BTM}⁻¹·h⁻¹ erreicht. Dagegen erreichen diese beiden Prozeßparameter maximal ca. 16 mmol·g_{BTM}⁻¹·h⁻¹ in dem Prozeß mit 25 mM L-Isoleucin. Allerdings ist die biomassespezifische Glucoseverbrauchsrate bei dem Prozeß mit 25 mM L-Isoleucin während des gesamten Verlaufs niedriger als im Standard-Prozeß. Der Kohlenstofffluß geht bei steigender L-Isoleucin-Konzentration in der Vorlage mehr in Richtung der CO₂-Bildung statt in die Biomasse.

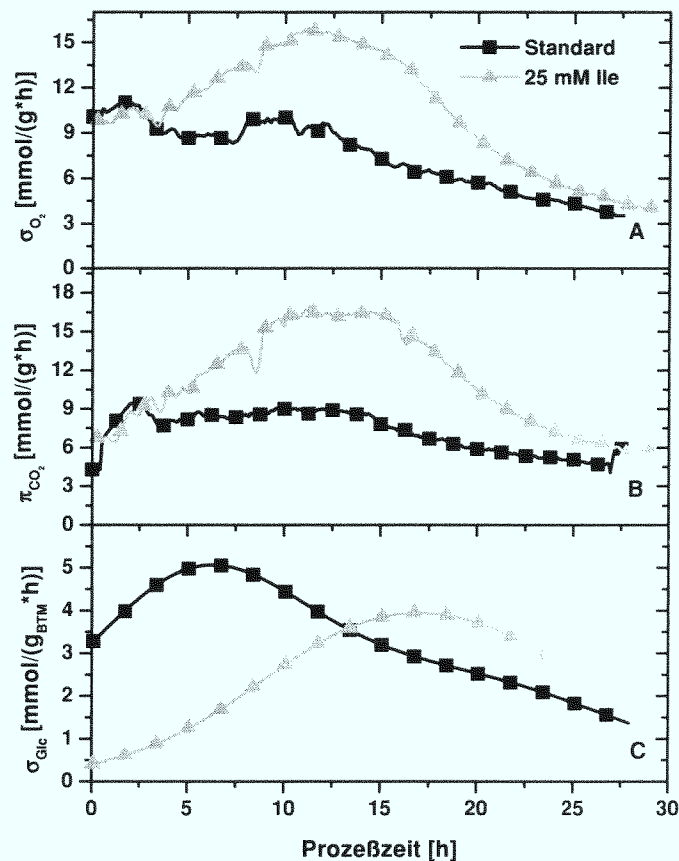


Abbildung 4-7. Ansatzweise-Verfahren mit verschiedenen L-Isoleucin-Konzentrationen (Standard (■) und 25 mM L-Isoleucin (▲)) im Vorlagemedium. Einfluß der L-Isoleucin-Konzentration im Vorlagemedium auf die biomassespezifische O_2 -SubstratVerbrauchsrate (A), CO_2 -Produktbildungsrate (B) und Glucose-Substratverbrauchsrate (C) (Der Verlauf für den Versuch mit 10 mM L-Isoleucin ist wegen des geringen Unterschieds zu dem Standard Versuch nicht dargestellt).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß der inhibierende Einfluß von L-Isoleucin ausschließlich für das Biomassewachstum und die daran gekoppelte Glucose-Verbrauchsrate gezeigt werden, nicht aber für die Produktbildung und den Zeitverlauf der Aufrechterhaltung des ATP-Pools der Zelle. Die Auffassung, daß die steigende L-Isoleucin Konzentration im Zulaufverfahren das Hauptproblem darstellt, konnte somit nicht länger aufrecht erhalten werden. Eine Erklärung für den Einbruch der biomassespezifischen L-Isoleucin Produktbildungsrate und der Stoffwechselaktivität der Zelle nach 30 Stunden im Zulaufverfahren könnte auch die Anreicherung anderer, noch nicht bekannter toxischer Metabolite oder eine Substratlimitierung/inhibierung sein. Auffällig ist, daß der Effekt von L-Isoleucin in der Vorlage nicht so eindeutig ist wie beiden Versuchen im Schüttelkolben. Wahrscheinlich adaptieren die Zellen sich während der Kultivierung in dem verschiedenen Vorkulturstufen und sind anschließend im Ansatzweise-Verfahren weniger empfindlich für L-Isoleucin in der Vorlage.

4.2.3 Ansatzweise Verfahren im Rührkessel mit L-Isoleucin-Puls

Zunächst sollte die Adaptierung der Zelle an höhere L-Isoleucin-Konzentrationen genauer charakterisiert werden. In einem weiteren Versuch wurde L-Isoleucin nicht zu Beginn, sondern erst nach 9 Stunden auf 25 mM erhöht. Die L-Isoleucin-Konzentration betrug zu diesem Zeitpunkt ca. 5 mM. Eine signifikante Verzögerung des Zellwachstums ist nicht zu sehen (Abbildung 4-8). Ein hemmender Effekt von L-Isoleucin auf $\mu_{\max}$ konnte auch in diesem Fall nicht gezeigt werden.

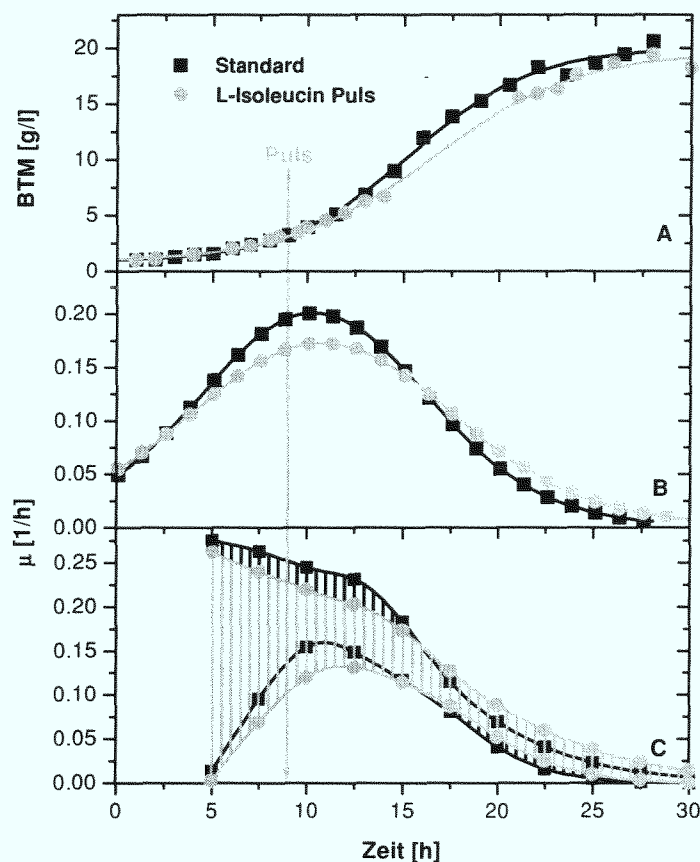


Abbildung 4-8. Ansatzweise Verfahren mit L-Isoleucin Puls. Einfluß einer pulsartigen Zugabe von 25 mM L-Isoleucin nach 9 Stunden Prozeßdauer auf das Biomassewachstum: Zeitlicher Verlauf der Biomassekonzentration (A), der Wachstumsrate, berechnet aus der Anpassung der gemessenen Parameter und dem 95%-Vertrauensbereich (C) dieser Berechnung (siehe Anhang A.8 und A.9).

Zu späteren Prozeßzeitpunkten ist also die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber dem hemmenden Einfluß von L-Isoleucin kleiner als zu Beginn. Zu Beginn des Versuchs sind die Zellen durch den plötzlichen Wechsel des Mediums (z.B. Änderung der Osmolarität, der Substrate und/oder pH) starkem Stress ausgesetzt. Die Anpassung an die veränderten Verhältnisse bedingt die zu beobachtende Lag-Phase im Biomassewachstum. In den Versuchen mit L-Isoleucin in der Vorlage wurde ein weiterer Streßfaktor addiert. Nach 9 Stunden befinden sich die Zellen jedoch bereits in der exponentiellen Wachstumsphase. Tatsächlich wurde der Zeitpunkt des L-Isoleucinpulses anhand der vorliegenden Daten so gewählt, daß die Kultur mit maximaler Geschwindigkeit wuchs. Es ist deutlich, daß die Zellen unter diesen Bedingungen weit weniger empfindlich auf L-Isoleucin

reagieren als unmittelbar nach dem Animpfen des Bioreaktors. Darüber hinaus kann sich die Zelle bereits an das bereits in diesem Zeitraum produzierte L-Isoleucin adaptiert haben.

Eine signifikante Beeinflussung der Produktbildung, Kohlenstoffbilanz oder der Energie der Zelle (Daten nicht gezeigt) ist auch in diesem Versuch nicht festzustellen.

4.2.4 Ansatzweise Verfahren im Rührkessel mit verschiedenen hydrophoben Aminosäuren

Die vorherigen Ergebnisse zeigen, daß die Vorlage von L-Isoleucin zu einer Verlängerung der Lag-Phase (Abbildung 4-9) führt und $\mu_{\max}$ nicht signifikant beeinflußt. Zum besseren Verständnis der bisherigen Erkenntnisse wurde eine Reihe von Versuchen durchgeführt, bei denen L-Isoleucin-ähnliche Aminosäuren im Medium vorgelegt wurden. Diese Aminosäuren, L-Leucin und L-Valin, sind L-Isoleucin sowohl hinsichtlich ihrer Molekularstruktur als auch ihrer Biosynthese sehr ähnlich.

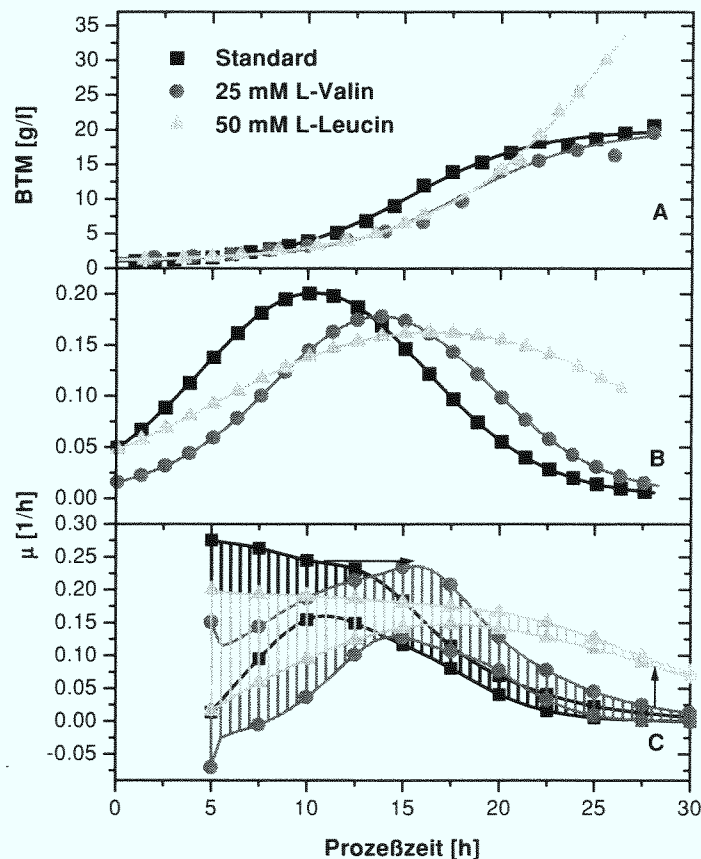


Abbildung 4-9. Ansatzweise Verfahren mit verschiedenen Aminosäuren im Vorlagemedium. Einfluß von L-Leucin und L-Valin auf das Biomassewachstum: Zeitliche Verläufe von Biomassekonzentration (A) und Wachstumsrate (B), berechnet aus der Anpassung der gemessenen Parameter und dem 95%-Vertrauensbereich (C) dieser Berechnung (siehe Anhang A.8 und A.9).

Der Verlauf des Biomassewachstums und der L-Isoleucin Produktbildung zeigen, daß sowohl die Vorlagen von L-Leucin und L-Valin einen Einfluß auf den Wachstumsverlauf der Zellen (Abbildung 4-9) und auf die biomassespezifische L-Isoleucin Produktbildungsrate ausüben (Abbildung 4-10).

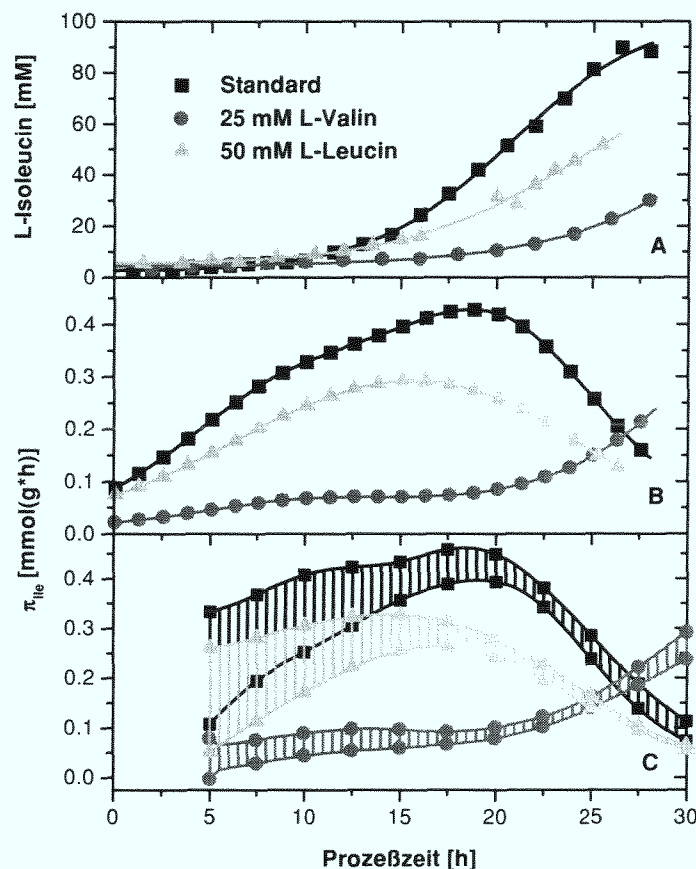


Abbildung 4-10. Ansatzweise Verfahren mit verschiedenen Aminosäuren im Vorlagemedium. Einfluß von L-Isoleucin (Standard, ■), L-Leucin (▲) und L-Valin (●) auf die Produktbildung: Zeitliche Verläufe der L-Isoleucin-Konzentration (A) und der biomassespezifischen L-Isoleucin-Produktbildungsrate (B), berechnet aus der Anpassung der gemessenen Parameter und dem 95%-Vertrauensbereich (C) dieser Berechnung (siehe Anhang A.8 und A.9).

Mit L-Leucin in der Vorlage sinkt die Wachstumsrate signifikant langsamer ab, so daß letztendlich eine höhere Biomassekonzentration als in den Standardversuch erreicht wird. Dies ist eine Folge der Auxotrophie des verwendeten Produktionsstamm *C. glutamicum* DR17 pECM3::ilvA38.

Zu dem Zeitpunkt, wo in dem Standardversuch die biomassespezifische L-Leucin-Verbrauchsrate ihr Maximum erreicht und anschließend abfällt, steigt sie bei L-Leucin im Überschuß weiter an und fällt erst später, wenn andere Faktoren limitierend werden, ab. Die höhere L-Leucin-Konzentration wirkt sich direkt auf die biomassespezifische L-Leucin-Verbrauchsrate aus. Dies wird deutlich, wenn man diese in Beziehung zur Wachstumsrate setzt (Abbildung 4-11).

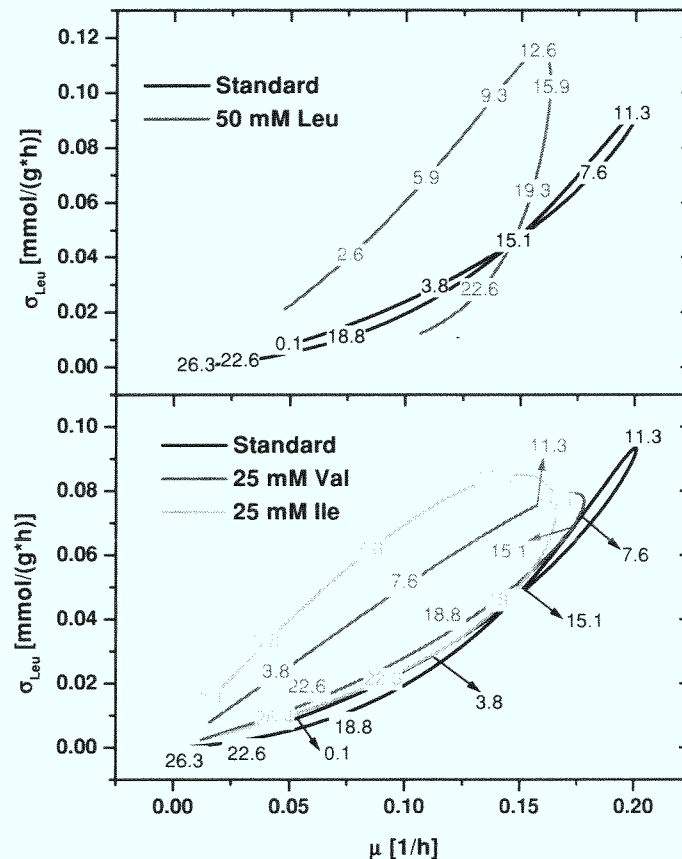


Abbildung 4-11. Ansatzweise Verfahren mit verschiedenen Aminosäuren im Vorlagemedium. Auftragung der biomassespezifischen L-Leucin-Verbrauchsrate (σ) als Funktion der Wachstumsrate (μ). An den Kurven ist zusätzlich die Prozeßzeit (in h) angegeben.

Auffällig ist, daß auch in den Versuchen mit L-Isoleucin und L-Valin in der Vorlage die L-Leucin-Verbrauchsrate gegenüber dem Standardversuch erhöht ist (Abbildung 4-11). Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Substrataufnahme und dem Energieniveau der Zelle wurde bereits an früherer Stelle diskutiert. Substratverbrauch und -aufnahme sind direkt vom Protonenpotential (pmf) über die Zellmembran abhängig. Darüberhinaus steht sie auch mit der ATP-Konzentration im thermodynamischen Gleichgewicht. Es konnte in einem Experiment (Abbildung 4-6) gezeigt werden, daß eine niedrige Wachstumsrate sich positiv auf den ATP-Pool der Zellen auswirkt. In diesem Zusammenhang ist auch verständlich, daß bei langsamerem Wachstum mehr Substrat aufgenommen werden kann.

Vergleicht man den Leucin-Versuch mit dem Versuch mit 25 mM L-Isoleucin in der Vorlage, so kommt es nicht zu einer Verlängerung der lag-Phase. Dabei ist jedoch zu beachten, daß die L-Leucin-Konzentration mit insgesamt 56 mM mehr als doppelt so hoch lag wie die L-Isoleucin-Konzentration in dem entsprechenden Versuch.

Im Gegensatz zu L-Isoleucin wird durch Vorlage von L-Leucin und L-Valin die Produktbildung drastisch beeinflusst, die Raum-Zeit-Ausbeute über 27 h liegt bei $1,9 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ im L-Leucin-

Versuch (Abbildung 4-10) und bei $0,89 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ im L-Valin-Versuch im Vergleich zu $2,3 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ in dem Versuch mit 25 mM L-Isoleucin in der Vorlage. Die anfangs niedrige biomassespezifische L-Isoleucin-Produktbildungsrate in dem Ansatz mit 25 mM L-Valin ist signifikant. Sie steigt erst in die letzten 10 Stunden des Versuchs langsam an.

Die Ergebnisse bezüglich L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin könnten mit dem Enzym Acetohydroxysäure-Synthase (AHAS) in Zusammenhang stehen. Dieses Enzym, das in der Synthese aller drei genannten, verzweigtkettigen Aminosäuren eine zentrale Rolle spielt, wird durch diese allosterisch inhibiert. In *in-vitro*-Experimenten wurde festgestellt, daß die Reduktion der Enzymaktivität durch den gemeinsamen Einfluß aller drei Repressoren bis zu 50 % betragen kann. Durch L-Leucin allein wird die Enzymaktivität *in vitro* um 27 %, durch L-Isoleucin um 45 % und durch L-Valin alleine auch schon um 50 % reduziert. Die Konzentrationen betrugen jeweils 5 mM. Die Affinität des allosterischen Zentrums zu seinen Effektoren wird mit $K_i = 0,36 \text{ mM}$ für L-Valin, mit $K_i = 3,7 \text{ mM}$ für L-Isoleucin und mit $K_i = 9,6 \text{ mM}$ für L-Leucin angegeben (Weinstock *et al.*, 1992). Die stabile Etablierung einer feedback-resistenten AHAS in *C. glutamicum* ist bislang nicht gelungen. Da die Acetohydroxysäure-Synthase das einzige regulatorische Enzym ist, das an der Synthese sowohl von L-Isoleucin als auch von L-Leucin und L-Valin beteiligt ist, ist nur dieses Enzym als Angriffspunkt der beobachteten Hemmung anzunehmen. Anhand dieser Tatsachen erscheint es widersprüchlich, daß durch L-Isoleucin keine signifikante Inhibierung der Produktsynthese hervorgerufen wird, wohl aber durch den schwächeren Inhibitor L-Leucin. Dabei sollte aber beachtet werden, daß die Konzentrationen aufgrund unterschiedlicher Export- und Aufnahmeraten intrazellulär und extrazellulär unterschiedlich sind.

Anhand des Vergleiches zwischen den Versuchen mit 25 mM L-Isoleucin in der Vorlage bzw. mit der Zugabe von 25 mM L-Isoleucin zu einem späteren Zeitpunkt des Versuchs wurde bereits die Möglichkeit einer Adaptierung der Zellen an diesen Streßfaktor diskutiert. In dem Versuch mit L-Valin scheint ebenfalls eine solche Adaptierung aufzutreten. Bis zu dem Zeitpunkt $t = 20 \text{ h}$ steigt die L-Isoleucin-Konzentration im Medium nur sehr langsam an (Abbildung 4-10). Nach 20 h wird der Anstieg deutlich steiler, ebenso der der biomassespezifischen L-Isoleucin-Produktbildungsrate. Die L-Valin-Konzentration ist zu diesem Zeitpunkt gegenüber der Startkonzentration von 25 mM erst um ca. 10% abgesunken.

Ein direkter Einfluß der vorgelegten Aminosäuren auf den ATP-Pool der Zelle (Abbildung 4-12) ist, wie bei L-Isoleucin, aus den gemessenen Daten nicht herzuleiten. Wie schon bei den Versuchen mit L-Isoleucin-Vorlage ist es auch bei dieser Versuchsreihe so, daß der Ansatz mit der niedrigsten Wachstumsrate über die längste Zeit eine stabile ATP-Konzentration zeigt. Gleichzeitig ergibt dieser Ansatz auch die geringste biomassespezifische L-Isoleucin-Produktbildungsrate, insgesamt also einen vergleichsweise niedrigen Stoffumsatz.

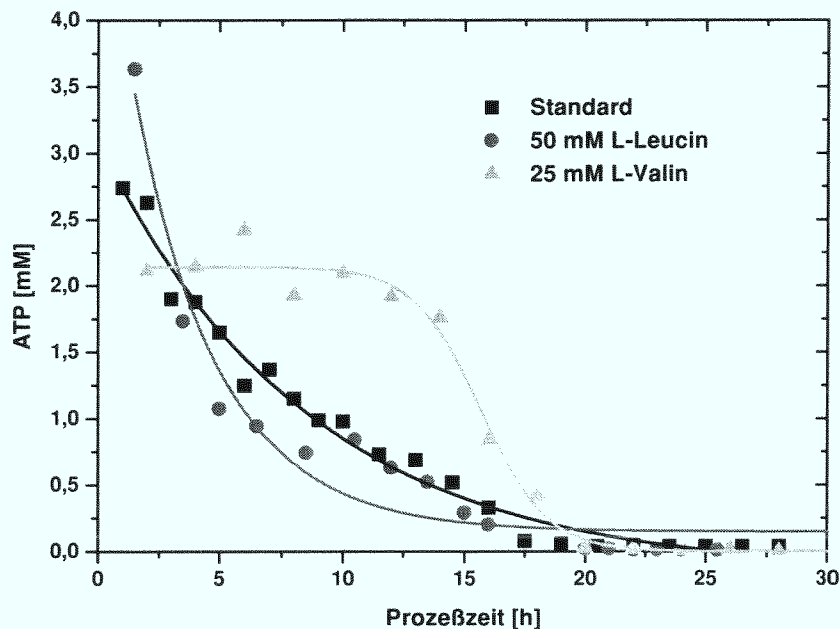


Abbildung 4-12. Ansatzweise Verfahren mit verschiedenen, hydrophoben Aminosäuren in der Vorlage. Einfluß von L-Leucin und L-Valin auf den zellinternen ATP-Pool.

Insgesamt werden durch die Aminosäuren L-Leucin und L-Valin vergleichbare Effekte wie durch L-Isoleucin hervorgerufen. Das Wachstum bei *C. glutamicum* wird in ganz ähnlicher Weise beeinflusst. Es wird deshalb angenommen, daß dieser Wirkung auch der gleiche Mechanismus zugrunde liegt. Darüberhinaus wird durch L-Leucin und L-Valin auch die Produktbildung drastisch reduziert.

4.2.5 Versuche im Diafiltrationsverfahren (ganzheitlicher Ansatz)

In den vorangegangenen Versuchen konnte eine Verlängerung der lag-Phase bereits durch geringe Konzentrationen von L-Isoleucin im Medium nachgewiesen werden. Allerdings wurde ein Einfluß auf die Produktivität nicht festgestellt. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Lage sind, sich an die wachstumshemmende Wirkung von L-Isoleucin zu adaptieren. Zur weiteren Aufklärung der im Zulaufverfahren beobachteten Effekte sollte der Prozeß mit Hilfe einer Verweilzeitentkopplung der Biomasse von der Produkt- und Substratkonzentration durch Verdünnung des Mediums kontrolliert werden. Es wurden bislang nur Untersuchungen mit vergleichsweise niedrigen L-Isoleucin-Konzentrationen (maximal 25 mM L-Isoleucin) durchgeführt. Im Zulaufverfahren werden aber ca. 150-160 mM L-Isoleucin erreicht. Weiterhin ist es möglich, daß ein Nebenprodukt sich im Medium anreichert und den Zellstoffwechsel inhibiert. Zur Umsetzung dieses Zieles wurde der im Anhang A.4.3 (Seite 78) beschriebene Versuchsaufbau eingesetzt.

Durch Variation der Verdünnungsrate ist es möglich, die Akkumulation der Konzentration von L-Isoleucin und Nebenprodukten weitestgehend zu steuern. Aufgrund der L-Isoleucin-Produktbildungsrate im Zulaufverfahren wurde für die ersten Versuche eine Verdünnungsrate von $D = 0,45 \text{ h}^{-1}$ bei einem Arbeitsvolumen von 5,5 l so gewählt, daß die L-Isoleucinbildung ausgeglichen werden sollte. Eine geringfügige zusätzliche Verdünnung kam durch die Dosierung von Glucose zustande. Gleichzeitig wurden dem Bioreaktor über das Verdünnungsmedium ständig alle auch im Vorlagemedium vorhandenen Substrate zugeführt. Es galt zunächst, die Medienkonzentration so auf die Durchflußrate abzustimmen, daß der Prozeß nicht durch ständiges Nachdosieren von Substraten zu schnell in eine Sauerstofflimitierung läuft. Anschließend sollte dann die Verdünnungsrate sukzessive reduziert und gleichzeitig die Konzentration des Verdünnungsmediums C_{in} angepaßt werden, so daß pro Zeiteinheit die gleiche Menge an Substraten in den Bioreaktor dosiert wird.

$$D \cdot C_{in} = \text{konst.}$$

Gleichung 23

In dem ersten Versuch wurde das Verdünnungsmedium so angesetzt, daß es hinsichtlich aller Konzentrationen dem Vorlagemedium entsprach. Die vorherigen Ergebnisse zeigten, daß mit dieser Zusammenstellung des Mediums erst nach 20 Stunden Prozeßdauer das Membranpotential und die zellinterne ATP-Konzentration der Zellen und 10 Stunden später die biomassespezifische L-Isoleucin-Produktbildungsrate zusammenbricht. Deshalb sollte eine Verdünnung mit diesem Medium, in dem Fall, daß eine Substratlimitierung die Ursache für die vorherigen Prozeß-Phänomene wäre, bei allen Verdünnungsraten denselben Einfluß haben.

Die Verdünnung mit $D = 0,45 \cdot \text{h}^{-1}$ wurde 14,5 Stunden nach Prozeßbeginn eingeschaltet. Der Zeitpunkt wurde empirisch aus den vorangegangenen Versuchen festgelegt. Zu diesem Zeitpunkt entspricht die L-Isoleucin-Konzentration im Medium in der Größenordnung der Vorlage-Konzentration der zuvor beschriebenen Versuche.

Der Verlauf des Versuchs zeigt (Abbildung 4-13), daß die Konzentration des Verdünnungsmediums zu hoch gewählt war. Innerhalb von nur sechs Stunden nach dem Einschalten der Verdünnung war die Biomasse (sehr stark angestiegen (von ca. 18 g/l bei 15 Stunden bis 63 g/l nach 27 Stunden. Durch diese hohe Biomasse-Konzentration in Kombination mit einer hohen Wachstumsrate ($> 0,1 \text{ h}^{-1}$) ist der Sauerstoffverbrauch so hoch, daß die Sauerstoffeintragsleistung des Bioreaktors nicht mehr ausreichte und die Gelöstsauerstoffkonzentration nach 20 Stunden auf Null sank.

Die gewählte Verdünnungsrate hingegen erwies sich als günstig. Die L-Isoleucin-Konzentration im Medium wurde effektiv kontrolliert (zwischen 30 und 40 mM L-Isoleucin). Ebenso bemerkenswert ist das Verhalten der zellinternen ATP-Konzentration (Abbildung 4-13). Bis zum Einschalten der Verdünnung war sie bereits auf Null abgefallen, wie es im ansatzweisen Verfahren und Zulaufverfahren auch der Fall ist. Nach dem Start stieg die ATP-Konzentration schnell auf Werte oberhalb der Startkonzentration wieder an und blieb dann konstant, auch unter sauerstofflimitierten Bedingungen. Das Membranpotential konnte in diesem Versuch aus technischen Gründen nicht gemessen werden. Der Anstieg der ATP-Konzentration (nach starkem Abfall) läßt darauf schließen, daß der vorherige Abfall nicht durch eine L-Isoleucininhibierung (L-Isoleucin-Konzentration bleibt ungefähr gleich), sondern durch eine Nebenproduktinhibierung oder

sogar eine Substratlimitierung zustande kommt, die nach Einschalten der Verdünnung aufgehoben wird.

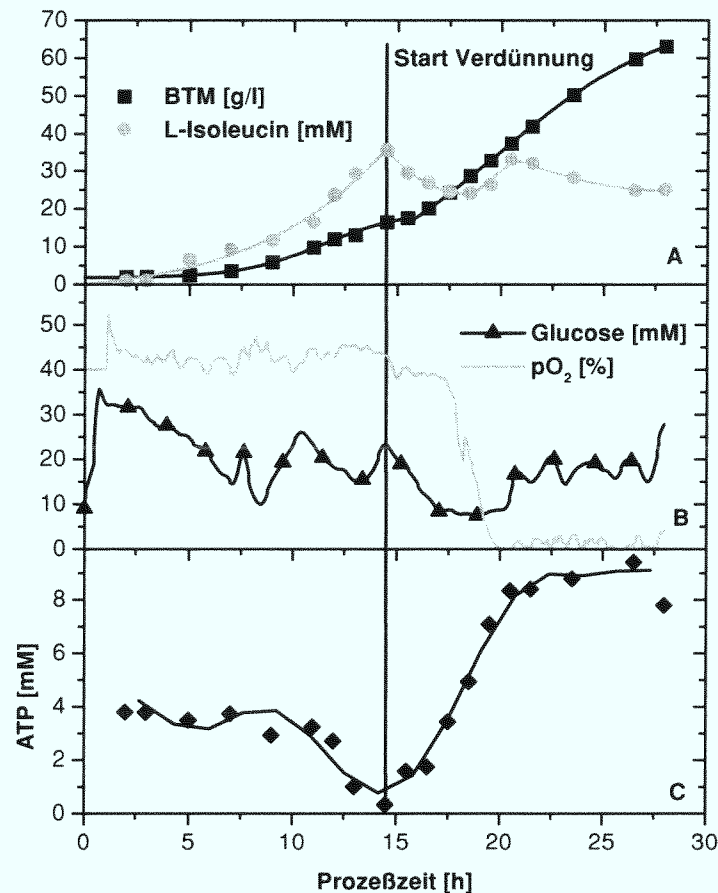


Abbildung 4-13. Versuchen im Diafiltrationsverfahren (Verdünnungsmedium = Vorlagemedium; $D = 0,45 \text{ h}^{-1}$ nach 14,5 Stunden). Zeitlicher Verlauf der (A) Biotrockenmasse- (■), L-Isoleucin- (●), (B) Glucose- (▲), Gelöstsauerstoff-Konzentration (graue Linie) und (C) ATP-Konzentration.

Für die weiteren Versuche wurde die Substratmenge im Verdünnungsmedium gegenüber diesem ersten Versuch auf 10 % reduziert. Die Verdünnungsrate wurde zunächst beibehalten. Der Zeitpunkt des Einschaltens der Verdünnung wurde für die folgenden Versuche auf 7 Stunden vor verlegt, da nach 14,5 Stunden die Wachstumsrate und die biomassespezifische L-Isoleucin-Produktbildungsrate bereits stark abgesunken waren. In den darauffolgenden Diafiltrationsversuchen wurde die Verdünnungsrate schrittweise herabgesetzt und dadurch die sich einstellende L-Isoleucin-Konzentration erhöht. Aufgrund der unterschiedlichen Verdünnungsraten kommt es dabei zu unterschiedlichen Auswaschungen (Abbildung 4-14) bei den einzelnen Versuchen. Für die Startbedingungen und die Substratkonzentration zu Beginn des Versuchs gilt

$$c_R^0 = \text{konst.}$$

Gleichung 24

In allen Versuchen wurde die Glucosekonzentration auf 20 mM geregelt. Die Glucose wird dadurch als limitierende Einflußgröße eliminiert.

Wenn nun die im Zulaufverfahren beobachteten Effekte überwiegend auf einer Inhibierung durch L-Isoleucin beruhen, sollte die Gesamtleistung der L-Isoleucin-Produktion der Bioreaktorkultur mit sinkender Verdünnungsrate (steigender Produktkonzentration) abnehmen. Stellt hingegen eine Substratlimitierung den dominierenden Effekt dar, ist mit einer verbesserten oder sogar stationären Leistung (das unterschiedliche Auswaschen des Vorlagemediums hat dann wahrscheinlich keinen großen Effekt) im Zusammenhang mit dem Absenken der Verdünnungsrate zu rechnen.

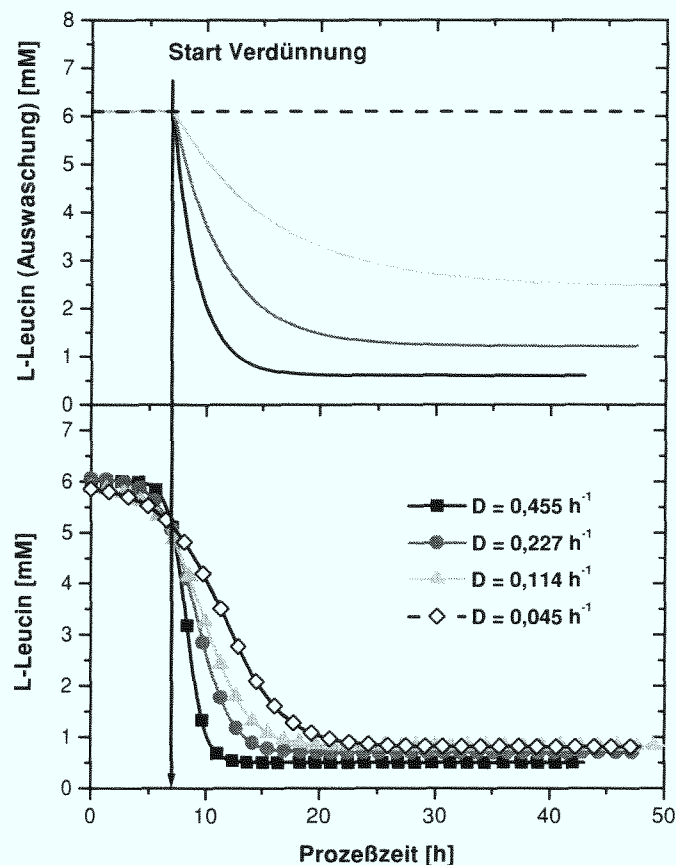


Abbildung 4-14. Versuche im Diafiltrationsverfahren; Abhängigkeit der Substratkonzentration von der Verdünnungsrate am Beispiel der L-Leucin-Konzentration. In der oberen Graphik ist die Auswaschung des L-Leucins durch die eingestellte Verdünnung ohne Verbrauch dargestellt, in der unteren die Anpassung an die realen Meßwerte.

Insgesamt wurden vier verschiedene Verdünnungsraten mit den entsprechenden Substratkonzentrationen eingestellt (Tabelle 4-1), ohne daß eine Sauerstofflimitierung auftrat. In Abbildung 4-15 sind die sich einstellende L-Isoleucin-Konzentration und biomassespezifische L-Isoleucin-Produktbildungsrate dargestellt. Mit abnehmender Verdünnungsrate und damit zusammenhängend steigender L-Isoleucin- und Nebenprodukt-Konzentration, nimmt die erreichte Biomassekonzentration (Abbildung 4-16) zu. Die in dem Versuch mit einer Verdünnungsrate von $0,114 \text{ h}^{-1}$ auftretende, vierstündige Glucoselimitierung (Fehler in der online Glucose-analyse) hat

auf das Biomassewachstum keinen nachhaltigen Einfluß. Nach neuerlicher Zudosierung von Glucose setzt sich das Biomassewachstum ohne erkennbare Verzögerung fort. In allen Versuchen geht die Kultur nach einer exponentiellen Phase infolge der Verdünnung in lineares Wachstum über.

Tabelle 4-1. Übersicht der Versuche im Diafiltrationsverfahren.

Verdünnungsvolumenstrom [ml·h ⁻¹]	Faktor	Verdünnungsrate D [h ⁻¹]	Verdünnungsmedium
2500	1	0,455	0,1*Vorlagemedium
1250	0,5	0,227	0,2*Vorlagemedium
625	0,25	0,114	0,4*Vorlagemedium
250	0,1	0,045	1,0*Vorlagemedium

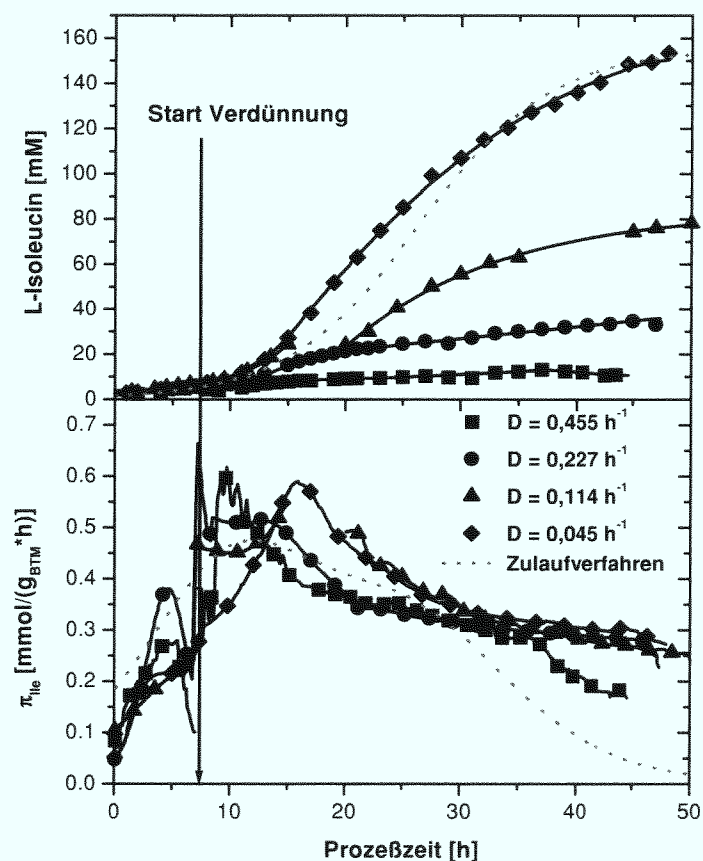


Abbildung 4-15. Versuche mit verschiedenen Verdünnungsvolumenströmen. Zeitliche Verläufe der L-Isoleucin-Konzentration und biomassespezifischen L-Isoleucin-Produktbildungsrate. In dem Versuch mit einer Verdünnungsrate von $0,114 \text{ h}^{-1}$ war für ca. 4 h die Glucose-Konzentration auf 0 mM abgesunken (Problem mit der online Glucose-analyse). Für den betreffenden Zeitraum (16-20 h) ist keine L-Isoleucin-Konzentration angegeben. Zum Vergleich sind die zeitlichen Verläufe der beiden Parameter des Zulaufverfahrens als grau gestrichelte Linie dargestellt.

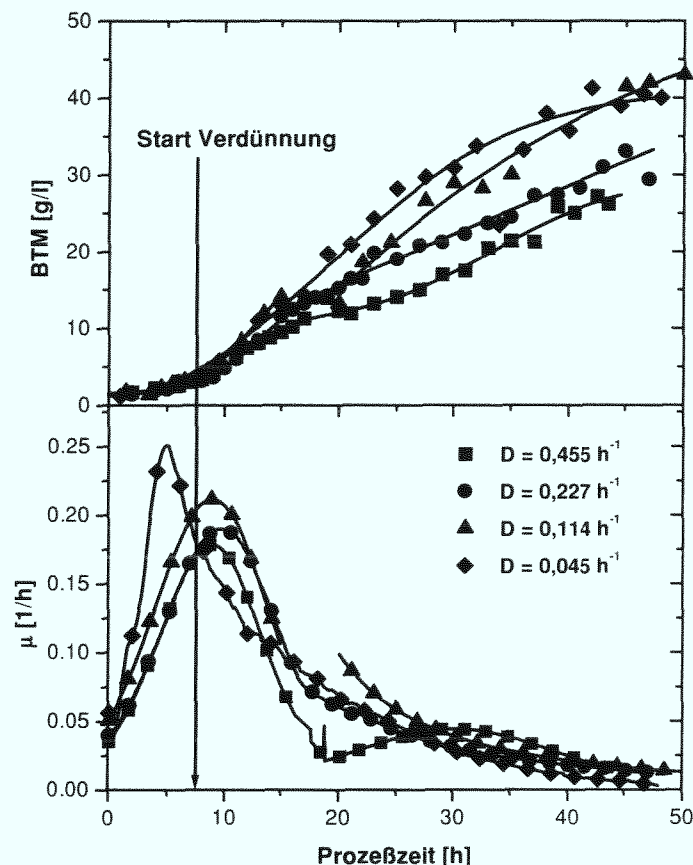


Abbildung 4-16. Versuche im Diafiltrationsverfahren mit verschiedenen Verdünnungsraten. Einfluß der Verdünnungsrate auf die Biomassekonzentration: Zeitliche Verläufe von der Biotrockenmassekonzentration und Wachstumsrate. In dem Versuch mit einer Verdünnungsrate von $0,114 \text{ h}^{-1}$ war für ca. 4h die Glucose-Konzentration auf 0 mM abgesunken (Problem mit der online Glucose-analyse). Für den betreffenden Zeitraum (16-20 h) ist Biotrockenmassekonzentration angegeben.

Bei einer Verdünnungsrate von $0,045 \text{ h}^{-1}$ zeigt sich jedoch anhand der Biomassekonzentrationen zum Ende hin ein deutlicher Übergang von der exponentiellen in die stationäre Phase. Während in den ersten 40 Stunden die Biomassekonzentration noch höher liegt als in allen Versuchen mit höheren Verdünnungsraten, liegt die Endkonzentration der Biomasse niedriger als in den Versuch mit $D = 0,114 \text{ h}^{-1}$, obwohl dieser während 4 Stunden Glucose limitiert war. Die Wachstumsrate sinkt zum Ende des Versuchs auf Null, was bei keinem der anderen Versuchsansätze zu beobachten ist. Da die zudosierte Substratmenge genau so groß ist wie in allen anderen Diafiltrationsversuchen, ist eine Limitierung ausgeschlossen. Als Ursache ist deshalb eine Wachstumshemmung durch die hohe L-Isoleucin- oder Nebenprodukt-Konzentration wahrscheinlich.

In diesen Versuchen ist ein Zusammenhang zwischen der L-Isoleucin-Konzentration (oder Nebenprodukt-Konzentration) und der Energie der Zelle zu sehen (Abbildung 4-17). Bei hohen L-Isoleucin-Konzentrationen (niedrige Verdünnungsrate) ist die Energie der Zelle niedrig und *vice versa*.

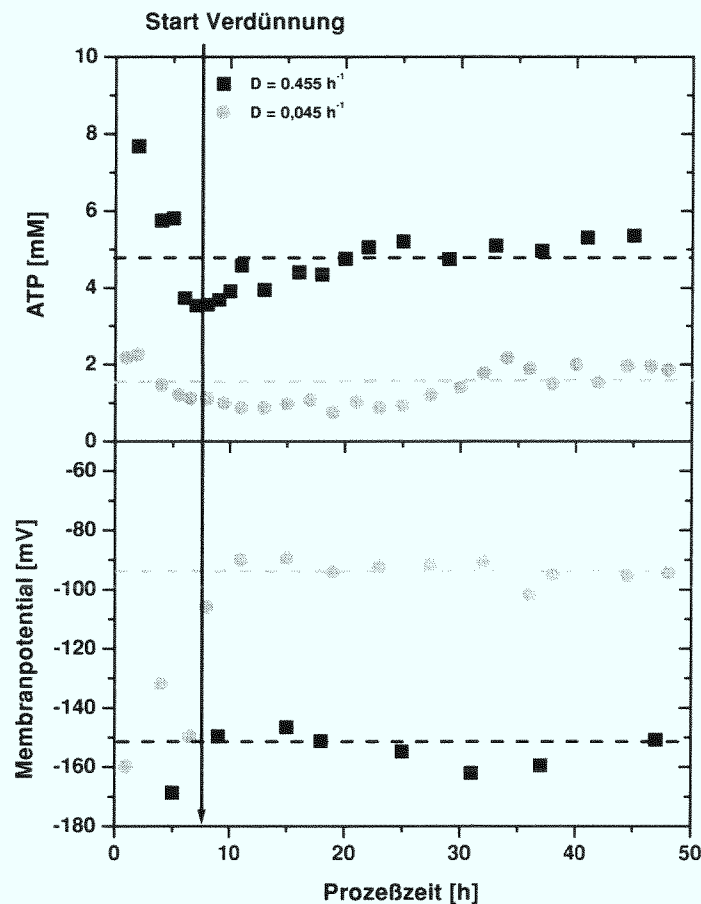


Abbildung 4-17. Versuche im Diafiltrationsverfahren. Einfluß der Verdünnungsrate auf den Energiestoffwechsel.

Bei den durchgeführten ATP-Messungen treten durchgängig Schwankungen bezüglich der absoluten Werte auf. Mit der verwendeten Meßmethode können noch kleinste Konzentrationen erfaßt werden, die Ergebnisse sind aber mit hohen relativen Fehlern belastet. Die Ergebnisse zeigen aber deutlich daß bei eine hohe Verdünnungsrate ($D = 0,455$) die Energie der Zelle (in Form von ATP und Membranpotential) ausreichend ist, was bei eine niedrigen Verdünnungsrate ($D = 0,045 \text{ h}^{-1}$) genau umgedreht ist. Dies ist ein Hinweis auf eine (Neben)Produkt-Inhibierung bezogen auf den Energiestoffwechsel.

Betrachtet man zusätzlich die Kohlenstoffbilanzen (Abbildung 4-18) der Diafiltrationsversuche, so zeigt sich hier derselbe Effekt. Der Anteil der Biomasse an der Kohlenstoffbilanz reduziert sich mit abnehmender Verdünnungsrate von 24,3 % bei $D = 0,455 \text{ h}^{-1}$ auf 15,9 % bei $D = 0,045 \text{ h}^{-1}$. Es findet eine deutliche Verschiebung des Kohlenstoffstroms von der Biomasse hin zum Kohlendioxid statt. Dies wurde auch schon in den Versuchen im Ansatzweise-Verfahren mit verschiedenen L-Isoleucin-Konzentrationen im Vorlagemedium festgestellt (Seite 36). Der steigende Anteil der Nebenprodukte an der Kohlenstoffbilanz läßt sich weniger auf einen realen Anstieg als vielmehr auf eine bessere analytische Erfäßbarkeit zurückführen. Bei niedrigeren Verdünnungsraten steigt die Konzentration der Nebenprodukte (wie z.B. Pyruvat, Acetat, Lactat, Ketoisoleucin, etc.). Daraus resultiert eine vollständigere Analytik der Nebenprodukte. In Versuchen mit niedrigen

Nebenproduktkonzentrationen (hohe Verdünnungsraten) konnte deshalb die Kohlenstoffbilanz nur zu durchschnittlich 73 % geschlossen werden. In Zulaufverfahren konnte die Bilanz zu über 87 % geschlossen werden.

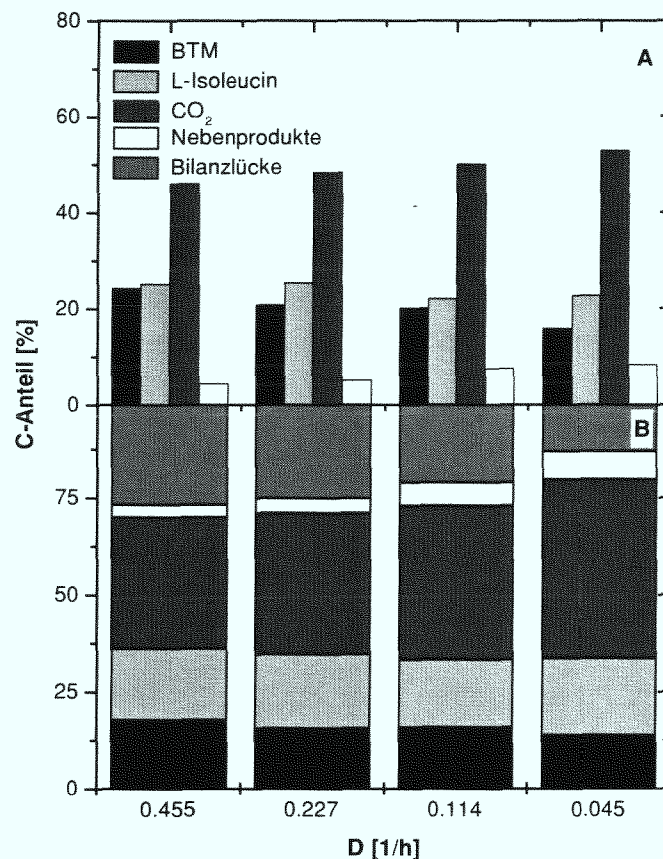


Abbildung 4-18. Versuche im Diafiltrationsverfahren. Einfluß der Verdünnungsrate auf die Kohlenstoffbilanz: Relative (A) und absolute (B) Verteilung des Kohlenstoffs.

Ein inhibierenden Einfluß von L-Isoleucin auf die biomassespezifische Produktbildungs rate konnte somit in diesen Versuchen nicht nachgewiesen werden. Dagegen wurde eine Hemmung des Wachstum bei höheren L-Isoleucin-Konzentrationen festgestellt (Abbildung 4-16). Offensichtlich findet also eine Adaptierung der Zellen an den durch L-Isoleucin hervorgerufenen Stress statt, wie in Kapitel 4.2.3 gezeigt.

Im Gegensatz zum Einfluß von L-Isoleucin auf das Biomassewachstum kann ein Einfluß auf die biomassespezifische L-Isoleucin-Produktbildungsrate selbst durch hohe Konzentrationen nicht festgestellt werden (Abbildung 4-15). Die biomassespezifische L-Isoleucin-Produktbildungsrate ist für die Anfangsphase des Versuchs stark fehlerbehaftet und kaum vergleichbar. Der hohe Fehleranteil in der Anfangszeit liegt in den sich sehr schnell ändernden niedrigen Konzentrationsverhältnissen begründet. Dadurch wirken sich bereits kleine Abweichungen in den Analysendaten stark aus. In der Phase des Versuchs (nach ca. 20 Stunden), für die aussagekräftige Daten ermittelt werden konnten, sind bezüglich der biomassespezifischen

Produktbildungsraten keinerlei signifikante Unterschiede zu beobachten. Ein direkter Zusammenhang zwischen L-Isoleucin-Konzentration und Produktbildung läßt sich in den Versuchen im Diafiltrationsverfahren genausowenig nachweisen wie in den vorangegangenen Vorlageexperimenten. Auch die Kohlenstoffbilanz (Abbildung 4-18) läßt keinerlei signifikante Änderungen des L-Isoleucin-Anteils im Zusammenhang mit der L-Isoleucin-Konzentration bzw. der Verdünnungsrate erkennen. Bei ausreichender Substratversorgung ist die biomassespezifische L-Isoleucin-Produktbildungsrate von der L-Isoleucin-Konzentration im Medium innerhalb der betrachteten Konzentrationsbereiche unabhängig. Die im Zulaufverfahren festgestellte Abnahme der L-Isoleucinbildung muß folglich seine Ursache in einer Substratlimitierung haben.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß L-Isoleucin oder die Nebenprodukte nicht die Stoffwechselaktivität/biomassespezifische Produktivität der Zelle beeinflussen. Die Hypothese ist, daß die maximale L-Isoleucin-Konzentration und die Raum-Zeit-Ausbeute des Zulaufverfahrens nach 30 Stunden durch eine Limitierung und nicht durch eine Inhibierung begrenzt ist.

4.3 Untersuchungen zur Substratlimitierung

4.3.1 Identifizierung limitierender Prozeßvariablen mit Hilfe der Haupt-Komponenten-Analyse

Bei der Aufklärung, welche Prozeßvariablen einen signifikanten Einfluß auf das Ergebnis des Versuchs haben, stößt man auf die Problematik der komplexen Matrix dieser Prozeßvariablen. Die Änderung der einen Variablen könnte den Verlauf der restliche Variablen beeinflussen (z. B. die Verbrauchs- und Produktionsraten). Auch sind neue Versuche und anschließend aufwendige Analysen zur Aufklärung von eventuellen Korrelationen zwischen den Prozeßvariablen notwendig. Daten der vorherigen Versuche können meistens nicht benutzt werden, da das Ziel der Untersuchungen anderer Art war.

Eine geeignete Methode zur Analyse komplexer Datensätze ist die Haupt-Komponenten-Analyse, eine Methode, bei der nach linearen Zusammenhängen zwischen den Prozeßvariablen gesucht wird. Die Hauptkomponenten werden nach Wichtigkeit unter Nutzung der bestehenden Daten identifiziert mit Gewichtung der Einflußgröße (siehe Theorie der Haupt-Komponenten-Analyse, Anhang A.10, Seite 94). Dabei werden normierte Größen verwendet, was einen Vergleich unterschiedlicher Prozeßvariablen möglich macht. Die Ergebnisse dieser Methode sollen als Diskussionsbasis für weitere Experimente dienen.

4.3.1.1 Haupt-Komponenten-Analyse der Konzentrationen

In Abbildung 4-19 sind die Ergebnisse der Haupt-Komponenten-Analyse unter Berücksichtigung von Konzentrationen verschiedener Prozeßgrößen (Biotrockenmasse-, L-Isoleucin-, Citrat-, L-Leucin-, Glucose-, Ammonium- und Phosphat-Konzentration) der durchgeführten Versuche im Zulaufverfahren, Ansatzweise-Verfahren und Diafiltrationsverfahren dargestellt.

Die Schüttelkolbenversuche sind in diese Haupt-Komponenten-Analyse nicht aufgenommen worden, da im Laufe dieses Prozesses eine Sauerstofflimitierung ($pO_2 = 0$) auftritt und der pH nicht

korrigiert wird. Der Einfluß dieser beide Größen ist hinlänglich bekannt. Sie werden ohne zusätzlichen Informationsgewinn in der Haupt-Komponenten-Analyse identifiziert und stören letztlich das Ergebnis nur. Der Versuch mit 25 mM L-Valin in der Vorlage ist auch nicht in diese Haupt-Komponenten-Analyse aufgenommen, da die Daten für L-Valin nicht für alle Versuche zur Verfügung stehen. Jedoch ist der Effekt dieser Aminosäure schon in vorherigen Versuchen geklärt worden (siehe Abschnitt 4.2.4). Außerdem ist die L-Valin-Konzentration im Zulaufverfahren (L-Isoleucin/L-Valin Verhältnis ≥ 300) zu vernachlässigen.

Eine Fehlerbetrachtung wurde in diese Haupt-Komponenten-Analyse nicht mit aufgenommen. Deshalb sind auf Basis dieser Haupt-Komponenten-Analyse nur generelle Aussagen möglich.

Das Ergebnis der Haupt-Komponenten-Analyse der vorher untersuchten 7 Prozeßgrößen sind 7 Haupt-Komponenten (HK), wobei die ersten drei den größten Anteil (94,9 %) der Gesamtvarianz des Datensatzes beinhalten. Folglich ist eine signifikante Aussage auf Basis dieser 3 Hauptkomponenten gestattet, da das Kriterium $\Sigma \text{Variation}_{\text{HK}1, \dots, 3} \geq 90 \%$ erfüllt ist. Von den drei Haupt-Komponenten ist die erste stark dominierend und hat einen 78,1 %-igen Anteil an der gesamten Variation des Datensatzes.

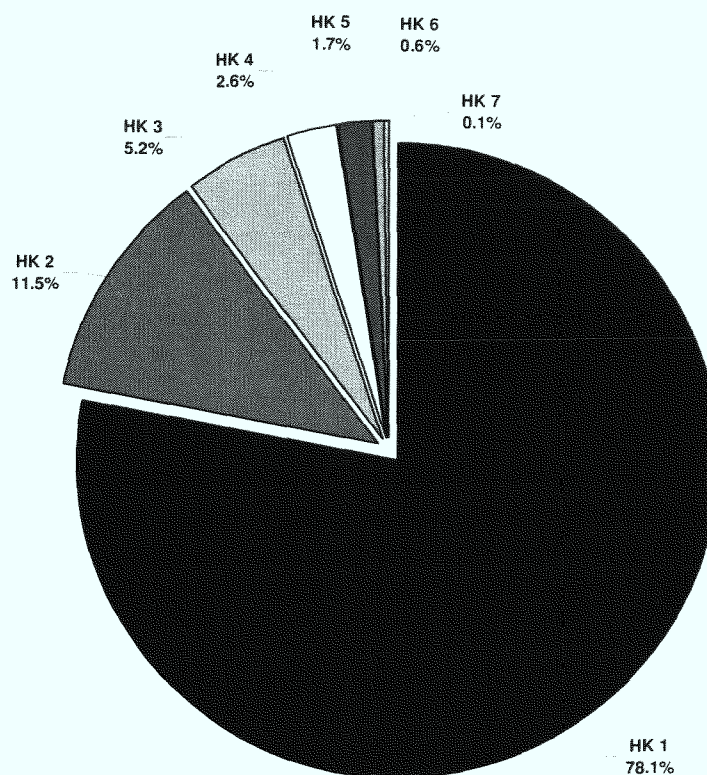


Abbildung 4-19. Zusammenstellung der Haupt-Komponenten (HK) von allen bisherigen Versuchen (Versuch mit 25 mM L-Valin in der Vorlage und die Schüttelkolbenversuche sind nicht in diese Haupt-Komponenten-Analyse eingegangen) bezogen auf die Biotrockenmasse-, L-Isoleucin-, Citrat-, L-Leucin-, Glucose-, Ammonium- und Phosphat-Konzentration.

Die Zusammenstellung des Eigenvektors der Haupt-Komponente 1 (Abbildung 4-20) zeigt, daß die Konzentration von Citrat ($\text{Loadingvector-Citrat} = -0.991$) das Ergebnis der Versuche dominiert (Haupt-Komponente 1 bestimmt 78,11 % der gesamten Varianz). Die Vorzeichen des

Loadingvectors von Citrat und L-Isoleucin sind entgegengestellt. Das bedeutet, daß bei hohen Citrat-Konzentrationen nur niedrige L-Isoleucin-Konzentrationen erreicht werden.

Die Haupt-Komponente 2 (Abbildung 4-20) mit einem 11,55 %-igen Anteil an der gesamten Daten-Varianz zeigt, daß die Konzentration von L-Leucin ein signifikanter Prozeßparameter ist. Die Zusammenstellung des Eigenvektors zeigt (Abbildung 4-20), daß die L-Leucin-Konzentration einen entgegengerichteten Einfluß auf die L-Isoleucin- und Biotrockenmassekonzentration (die Produkte der Versuche) hat. Diese Aussage ist nicht überraschend, da vorherige Ergebnisse schon zeigten, daß L-Leucin einen inhibierenden Einfluß auf die Wachstumsrate und die biomassespezifische L-Isoleucin-Produktbildungsrate hat (Abbildung 4-9 und Abbildung 4-10).

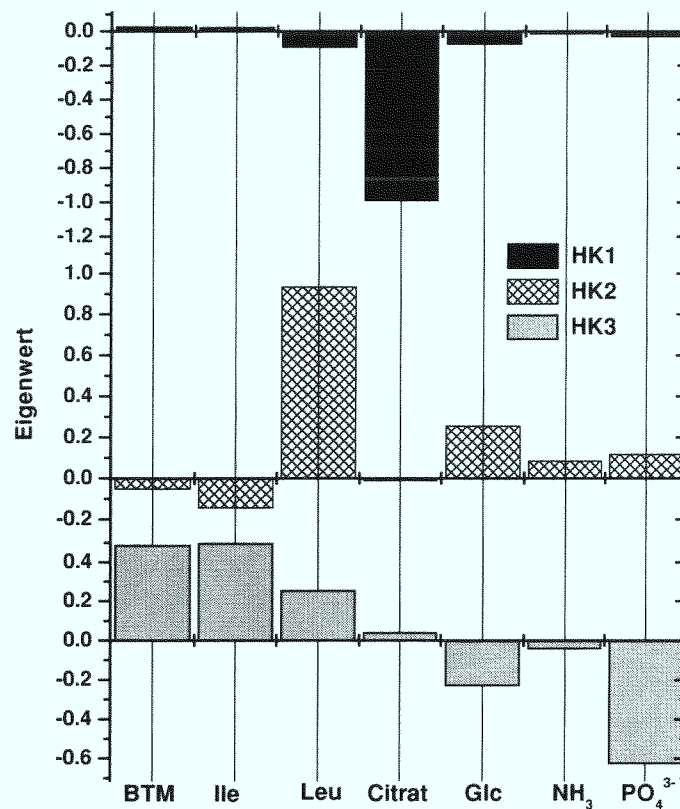


Abbildung 4-20. Zusammenstellung der Eigenvektoren der ersten drei Hauptkomponenten 1, 2 und 3 (bestimmen zusammen 94,9 % der gesamten Varianz des Datensatzes). Dargestellt sind die Eigenwerte der Eigenvektoren der jeweiligen Hauptkomponenten.

Haupt-Komponente 3 (Abbildung 4-19) hat nur einen sehr geringen Anteil an der gesamten Varianz (5,24 %), und die Zusammenstellung des Eigenvektors zeigt, daß niedrige Phosphat-Konzentrationen mit hohen L-Isoleucin- und Biotrockenmasse-Konzentrationen korrelieren.

Ein entgegengerichteter Einfluß von L-Isoleucin auf die Biotrockenmasse konnte in dieser Haupt-Komponenten-Analyse nicht nachgewiesen werden. Dies ist auch ein Hinweis für den schon vorher erwähnten Befund (siehe Kapitel 4.2.4, Seite 40), daß die Zellen sich an die steigende L-Isoleucin-Konzentration adaptieren.

Die Aussage der Haupt-Komponenten-Analyse der Konzentrationsverläufe muß aber kritisch betrachtet werden, da diese unter anderem auch auf die Daten der Diafiltrationsversuche bezogen ist. Durch die Verdünnung ändert sich auch die L-Isoleucin-Konzentration (dies gilt nicht für die Biomasse-Konzentration), und dieser Einfluß wird in der Haupt-Komponenten-Analyse nicht berücksichtigt. Es wäre bezüglich der Diafiltrationsversuche besser, die biomassespezifische Produktbildungsrate und Substratverbrauchsraten der jeweiligen Prozeßgrößen für die Haupt-Komponenten-Analyse zu verwenden.

4.3.1.2 Haupt-Komponenten-Analyse der Reaktionsgeschwindigkeiten

Die Ergebnisse der Haupt-Komponenten-Analyse der 6 biomassespezifischen Reaktionsgeschwindigkeiten (Abbildung 4-21) zeigt, daß es 6 Haupt-Komponenten gibt, wovon die ersten drei 90 % der Varianz des Datensatzes bestimmen. Deshalb ist eine signifikante Aussage anhand dieser drei Haupt-Komponenten auch in diesem Fall möglich.

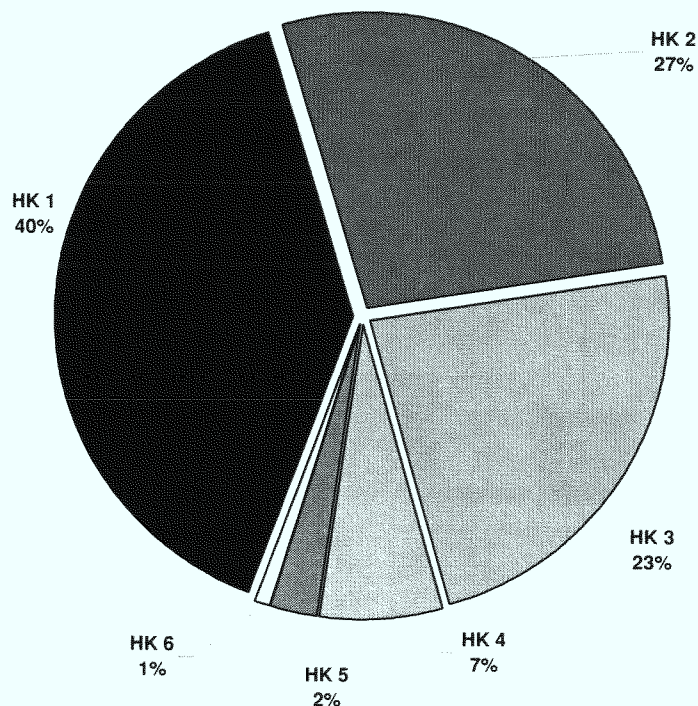


Abbildung 4-21. Zusammenstellung der Hauptkomponenten (HK) von allen bisherigen Versuchen (Versuch mit 25 mM L-Valin in der Vorlage und die Schüttelkolbenversuche sind nicht in diese Haupt-Komponenten-Analyse eingegangen) bezogen auf die biomassespezifische Wachstumsrate, L-Isoleucin-Produktbildungsrate, Glucose-, L-Leucin-, Citrat- und Phosphat-Substratverbrauchsraten.

Bei dieser Haupt-Komponenten-Analyse ist die biomassespezifische Ammoniumverbrauchsraten nicht mit aufgenommen. Die Menge an Ammonium, die über die Gasphase den Bioreaktor verläßt, ist nicht bestimmt. Dieser Anteil würde in die Berechnung der biomassespezifischen Ammoniumverbrauchsraten nicht aufgenommen und würde deshalb die Haupt-Komponenten-Analyse verfälschen.

Die Zusammenstellung des Eigenvektors der Hauptkomponente 1 (Abbildung 4-22) ist verteilt. Der *Loadingvector* für die biomassespezifische Phosphat-Substratverbrauchsrate ist relativ hoch (0,702). Eine eindeutige Dominanz ist hier nicht ohne weiteres erkennbar. Die *Loadingvectors* für die biomassespezifische Biomassewachstumsrate, Glucose-, L-Leucin- und Citrat-Verbrauchsrate sind nämlich mit 0,258, 0,374, 0,532 und 0,128 auch hoch.

Die Eigenvektoren der Hauptkomponenten 2 und 3 (Abbildung 4-22) zeigen die Dominanz der biomassespezifische Citrat- und Glucose-Substratverbrauchsrate. Aber für Hauptkomponenten 1, 2 und 3 gilt immer, daß der *Loadingvector* der biomassespezifischen L-Isoleucin-Produktbildungsrate gleichgerichtet ist mit dem *Loadingvector* der biomassespezifischen Citrat-Substratverbrauchsrate. Dieses Ergebnis zeigt eine deutliche Korrelation zwischen diesen beiden Prozeßgrößen.

Die Vorzeichen des *Loadingvectors* von z.B. der biomassespezifischen Glucose-Substratverbrauchs- und L-Isoleucin-Produktbildungsrate sind nicht in allen 3 der Hauptkomponenten gleichgerichtet. Diese gegenläufigen („nicht eindeutigen“) Einflüsse von bestimmten Prozeßparametern kommen aus der ganzheitlichen Prozeßbetrachtung. Es gibt Phasen im Prozeß, wo die Entwicklungen gegenläufig sind, die aber bei der integralen Betrachtung der Haupt-Komponenten-Analyse nicht identifiziert werden. In diesem Fall ist eine zeitliche differentielle Auftragung der Haupt-Komponenten-Analyse nötig. Dafür muß eine aufwendige Fehlerberechnung mit aufgenommen werden, welche im diesem Fall vorerst weggelassen wurde.

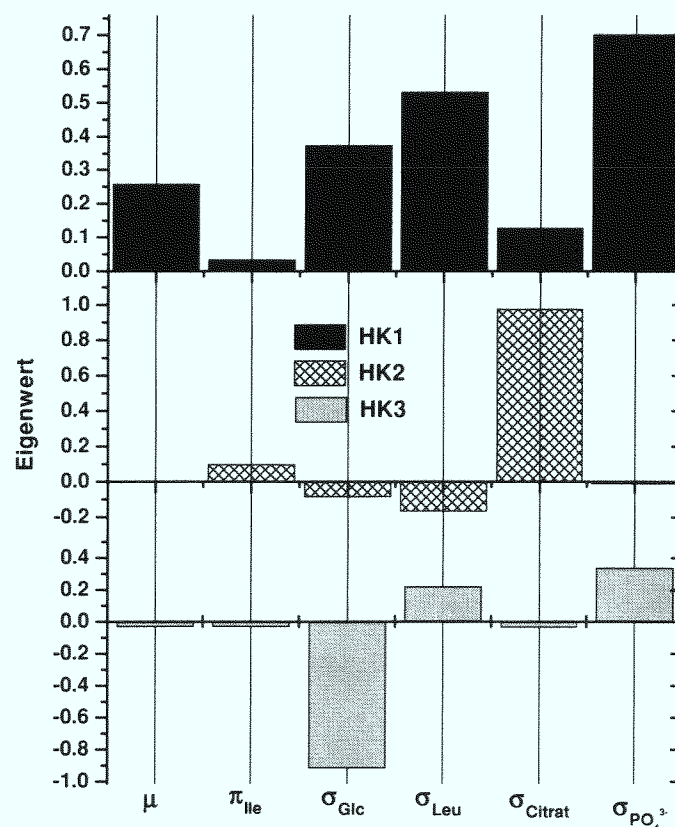


Abbildung 4-22. Zusammenstellung der Eigenvektoren der ersten drei Hauptkomponenten 1, 2 und 3 (bestimmen zusammen 94,9 % der Varianz). Dargestellt sind die Eigenwerte der Eigenvektoren der jeweiligen Hauptkomponenten.

4.3.2 Charakterisierung der identifizierten Prozeßgrößen

Die Haupt-Komponenten-Analysen der Konzentrationen und Reaktionsgeschwindigkeiten der Prozeßgrößen zeigen, daß der Einfluß von Phosphat und Glucose auf die Gesamtvarianz nicht eindeutig ist. Dies könnte durch die gegenläufige Entwicklung in verschiedenen Prozeßphasen verursacht werden. Dagegen korreliert eindeutig die Prozeßgröße Citrat-Substratverbauchsrate mit der Prozeßgröße L-Isoleucin-Produktbildungsrate.

Zum besseren Verständnis der Ergebnisse der Haupt-Komponenten-Analyse wurde eine Reihe von Versuchen durchgeführt, bei denen der Einfluß von Phosphat, Glucose und Citrat näher untersucht wurde.

4.3.2.1 Prozeßgröße Phosphat

Die Reproduktion des von Kelle etablierten Zulaufverfahrens zeigt, daß der Verlauf der Phosphat-Konzentration mit der biomassespezifischen L-Isoleucin-Produktbildungsrate (Abbildung 4-22) korreliert.

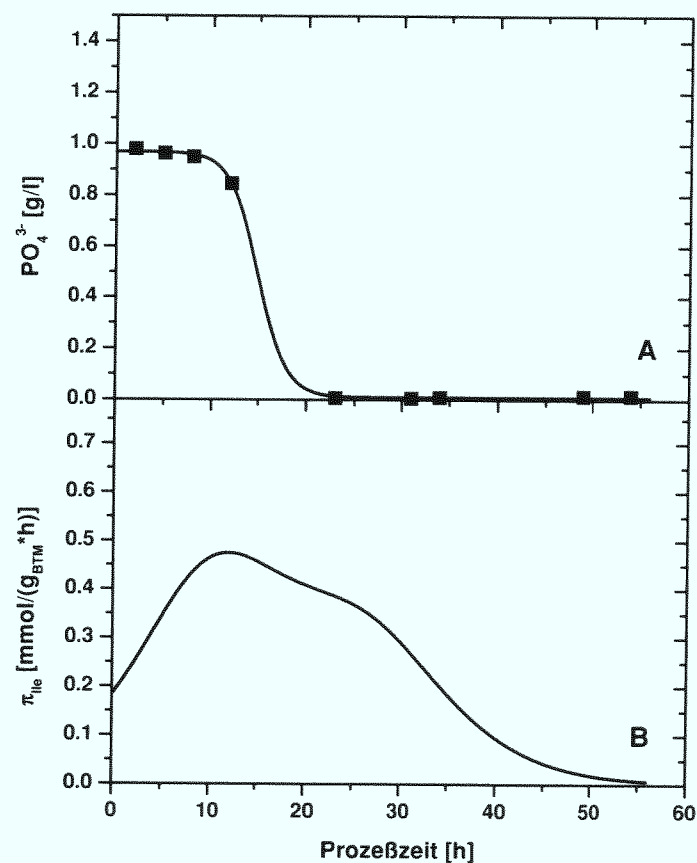


Abbildung 4-23. Verlauf der Phosphat-Konzentration (A) und der biomassespezifischen L-Isoleucin-Produktbildungsrate (B) während eines 30-l-Versuchs im Zulaufverfahren mit *C. glutamicum* DR17 pECM3::ilvA38.

Die Phosphat-Konzentration ist nach ungefähr 23 Stunden Prozeßzeit von 0,98 auf <0,005 g/l abgesunken. Die biomassespezifische L-Isoleucin-Produktbildungsrate nimmt stark ab von 0,3-

0,35 nach 25 Stunden bis $0 \text{ mmol-g}_{\text{BTM}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ nach 50 Stunden Prozeßzeit. Eine Verzögerung der Reaktion der Zelle bezüglich ihrer Stoffwechselaktivität auf eine Phosphat/Phosphor-Limitierung wurde auch durch Mason und Egli (1993) und Büchs (Büchs, 1988; Büchs *et al.*, 1988) festgestellt.

Mason und Egli (1993) zeigten, daß sich die Effekte einer Phosphat/Phosphor-Limitierung von einer Stickstoff- oder Kohlenstoff-Limitierung unterscheiden. Nachdem Phosphat verbraucht ist, nimmt die Biomasse weiter linear zu. Der Gehalt an DNA und Protein bleibt unverändert, wobei der RNA-Pool um ungefähr 10-15% pro Stunde abnimmt. Intrazelluläre Phosphat-Pools sind in *C. glutamicum* bisher noch nicht festgestellt worden (de Graaf, 1998) und konnten mit Hilfe der NMR-Spektroskopie auch nicht detektiert werden.

Weitere Untersuchungen im Ansatzweise-Verfahren zeigen, daß das Wachstum (Abbildung 4-24) in diesen Versuchen nicht durch Phosphat, sondern, wie erwartet, durch L-Leucin limitiert wird.

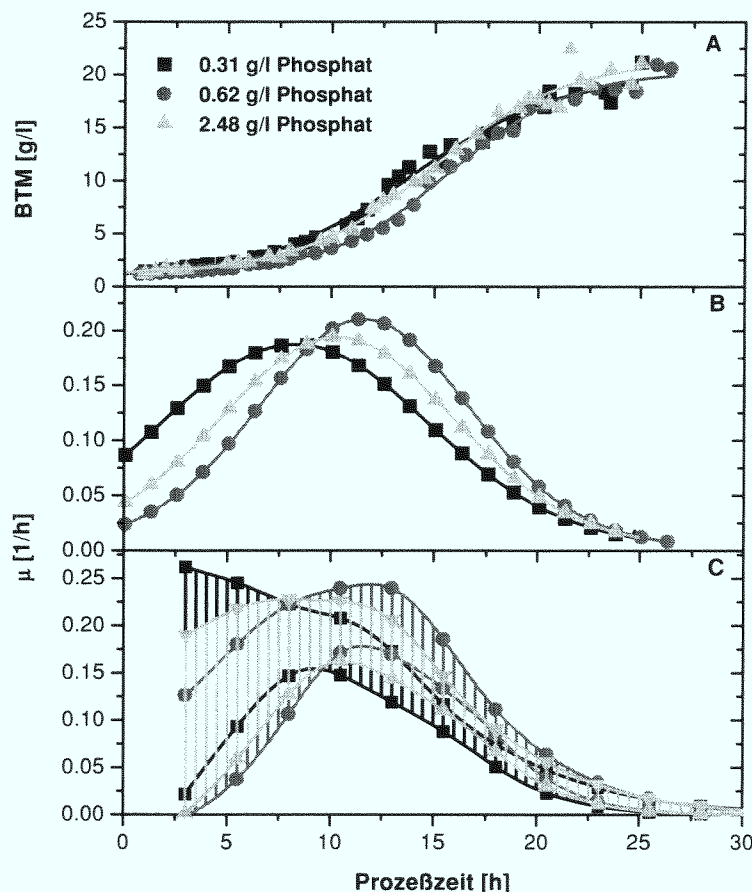


Abbildung 4-24. Ansatzweise-Verfahren mit 0,31 (■), 0,62 (●) und 2,48 (▲) g/l Phosphat im Vorlagemedium. Einfluß von Phosphat auf die Wachstumsrate: Zeitliche Verläufe der Biotrockenmasse-Konzentration (A), biomassespezifischen Wachstumsrate (B) berechnet aus der Anpassung der gemessenen Parameter und dem 95%-Vertrauensbereich (C) dieser Berechnung (siehe Anhang A.8 und A.9).

Eine Phosphat-Konzentration von 2,48 g/l sollte theoretisch bei einer Zusammensetzung von 15 $\text{mg}_\text{P} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{BTM}}$ (Kelle, 1996) der Biomasse (gemessen unter Phosphor-gesättigten Bedingungen) für eine Biotrockenmasse-Konzentration von $>30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ausreichen.

Weiter zeigte sich, daß Phosphat nur einen leichten Einfluß auf den Zeitpunkt der maximalen Wachstumsrate hat, als Folge von unterschiedlich langen lag-Phase. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß für Phosphat wahrscheinlich ein Konzentrations-Optimum vorhanden ist.

Auch die L-Isoleucin-Konzentration (Abbildung 4-25) wird durch die Phosphatsalze nicht signifikant beeinflusst. Dagegen ist die biomassespezifische L-Isoleucin-Produktbildungsrate des Versuchs mit 0,62 g/l Phosphat über einen signifikant längeren Zeitraum auf maximalem Niveau (ca. $0,35 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Für das Phosphat im Vorlagemedium gilt wahrscheinlich ein Konzentrations-Optimum, da eine weitere Steigerung auf 2,48 g/l Phosphat die biomassespezifische L-Isoleucin-Produktbildung inhibiert. Ähnliche Ergebnisse für die Wachstumsrate und die biomassespezifische L-Isoleucin-Produktbildungsrate wurden bezüglich der Phosphat-Konzentration bereits beobachtet.

Eine Korrelation zwischen Phosphat und der Energie der Zelle (Daten nicht gezeigt) konnte in diesen Versuchen nicht nachgewiesen werden.

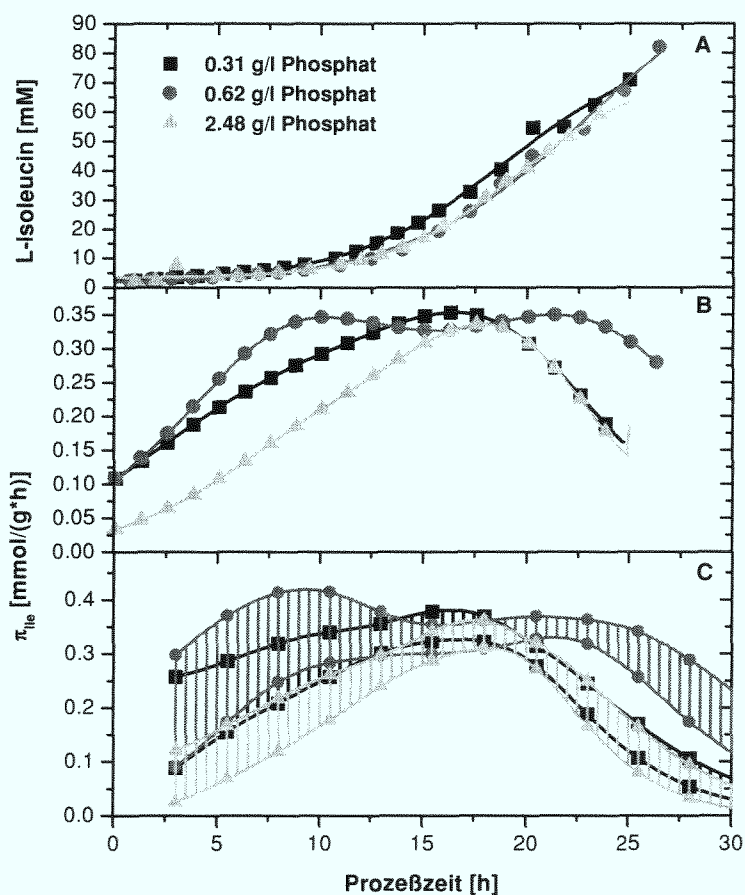


Abbildung 4-25. Ansatzweise-Verfahren mit 0,31 (■), 0,62 (●) und 2,48 (▲) g/l Phosphat im Vorlagemedium. Einfluß von Phosphat auf die L-Isoleucin-Bildung: Zeitliche Verläufe der L-Isoleucin-Konzentration (A), der biomassespezifischen L-Isoleucin-Produktbildungsrate (B) berechnet aus dem Fit der gemessenen Parameter und dem 95%-Vertrauensbereich (C) dieser Berechnung (siehe Anhang A.8 und A.9).

Die nicht eindeutige Aussage der durchgeführten Haupt-Komponenten-Analyse im Falle des Phosphatverbrauchs und der Phosphat-Konzentration könnte vielleicht durch das Vorhandensein eines Phosphat-Konzentrations-Optimums erklärt werden oder durch den vorher erwähnten Effekt der ganzheitlichen Betrachtung des Prozesses. Dasselbe gilt auch für die Verbrauchsdaten.

4.3.2.2 Prozeßgröße Glucose

Die Produktion von L-Lysin und L-Isoleucin im substratgeregelten Zulaufverfahren mit definierten L-Leucin-auxotrophen *Corynebacterium glutamicum* Stämmen wurde von Kelle (Kelle, 1995; Kelle *et al.*, 1996) etabliert. Die Reaktorkonzentration der Glucose als Hauptkohlenstoffquelle wurde mit einer modellgestützten, parameteradaptiven Regelstrategie im geschlossenen Regelkreis auf einem konstanten Sollwert (20 mM) eingestellt. Versuche im Ansatzweise-Verfahren mit circa 620 mM Glucose in der Vorlage zeigten vergleichbare Produktbildungs- und Substratverbrauchs-profile. Da Glucose-Konzentration im Ansatzweise-Verfahren mehr als 30-fach höher ist als im substratgeregelten Zulaufverfahren, ist es gerechtfertigt zu sagen, daß die Glucose-Konzentration im nicht-limitierenden Bereich keinen signifikanten Einfluß auf das Ergebnis des Versuchs hat. Die Osmotoleranz von *C. glutamicum* ist sehr hoch (bis zu 1 M NaCl), wodurch ein Einfluß der Osmolarität durch Glucose erst bei Konzentrationen > 1,5 M zu erwarten ist. Außerdem zeigte ein Versuch im Diafiltrationsverfahren mit $D = 0,114 \text{ h}^{-1}$ (Abbildung 4-15 und 4-16, Seite 44 und 45), daß eine vierstündige Glucoselimitierung den Verlauf der Wachstumsrate und Produktbildungsrate nicht signifikant beeinflußt hat. Somit ist Glucose nur im limitierenden Bereich der bestimmende Faktor des Prozesses

4.3.2.3 Prozeßgröße Citrat

Das Ergebnis der Haupt-Komponenten-Analyse, daß Citrat eine der signifikanten Prozeßgröße bei der L-Isoleucin-Produktbildung sei, entsprach nicht den Erwartungen. Die Aktivität der Anaplerotik und des TCA-Zyklus von *C. glutamicum* sollte ausreichend sein, um Citrat als Substrat für die Herstellung der langkettigen Aminosäuren zur Verfügung zu stellen. (Sonntag *et al.*, 1995; Peters-Wendisch, 1996; Eikmanns, 1997).

Die Arbeit von Büchs (1988) zeigt jedoch, daß der Zusatz von Citrat und EDTA einen positiven Einfluß auf die Stoffwechselaktivität von *C. glutamicum* hat. Untersuchungen von Liebl, Nakayama und von der Osten *et al.* (Nakayama *et al.*, 1964a+b; Liebl *et al.*, 1989; Osten *et al.*, 1989) zeigen, daß *C. glutamicum* auxotroph für Siderophore (griechisch für „Eisen-Träger“) ist. Die Zugabe von eisenkomplexierenden Verbindungen (Siderophoren) stimuliert das Wachstum von *C. glutamicum*. Zu diesen Eisen-Chelatoren gehören Dihydroxyphenole und auch Citrat.

Eisen ist essentiell für die Wirkung von verschiedenen Enzymen (Co-Faktor), speziell für solche, die am Sauerstoffmetabolismus und Elektronen-Transport beteiligt sind. Die Aufnahme des Eisens aus dem Medium ist also sehr wichtig für aerobe Organismen. Allerdings ist die extrem schlechte Löslichkeit von Eisen meistens der limitierende Faktor für das Wachstum der Zelle. Unter aeroben Bedingungen liegt es als Eisen(III) in der oxidierten Form vor und bildet bei neutralem pH-Wert unlösliche Oxyhydroxid-Polymere. Die Konzentration an Eisen(III)-Ionen unter diesen Bedingungen beträgt nur 10^{-18} M . Im anaeroben Milieu hingegen ist das reduzierte Eisen (II) relativ gut löslich (maximal 10^{-1} M) und somit für die Zellen leichter zugänglich (Neilands, 1995).

Eine Lösung für dieses Problem unter aeroben Bedingungen ist die Herstellung und Exkretion von Siderophoren durch den Organismus. Diese niedermolekularen Komponenten binden Eisen mit extrem hoher Affinität (Stabilitätskonstanten etwa 10^{30}) (Schlegel, 1992). Der Eisen-Siderophore-Komplex wird durch ein spezifisches Transport-System in der Zellmembran in die Zelle aufgenommen. Darauf folgend wird das Eisen intrazellulär durch enzymatische Spaltung des Siderophores oder Reduktion des komplexierten Eisen(III)-Ions freigesetzt. Die Affinität des Siderophores für Eisen(III)-Ionen ist viel größer als für Eisen(II)-Ionen.

Die Ergebnisse des Zulaufverfahrens zeigten deutlich, daß die Zelle Schwierigkeiten hat mit ihrem Energie-Haushalt (Membranpotential nimmt zu von -160 mV bis -90 mV). Eine Erklärung könnte sein, daß die Zelle durch eine Citrat-Limitierung indirekt Eisen-limitiert ist (im Zusammenhang mit seiner Funktion als Siderophor). Wie oben schon erwähnt, ist Eisen essentiell für die Enzyme der Atmungskette, die eine sehr große Rolle bezüglich der Energiegewinnung spielen. Deshalb sollte der Effekt von Citrat weiter untersucht werden.

Eigene Ergebnisse und die von von der Osten *et al.* (1989) zeigen, daß Citrat das Wachstum der Zelle hemmt. Dabei ist die wissenschaftliche Aussagekraft in Experimenten mit erhöhter Citrat-Konzentration gering, da Citrat nicht nur mit Eisen, sondern auch mit anderen zweiwertigen Ionen, komplexiert (Tabelle 4-2) und außerdem als Kohlenstoffquelle direkt verstoffwechselt wird.

Tabelle 4-2. Komplexbildungskonstante von verschiedene Metall-Ionen für Citrat

Metall-Ion:	Komplexbindungskonstante (log K):
Fe^{3+}	10,9
Cu^{2+}	6,1
Ni^{2+}	4,8
Pb^{2+}	5,7
Zn^{2+}	4,5
Cd^{2+}	4,2
Co^{2+}	4,4
Fe^{2+}	3,2
Mn^{2+}	3,4
Ca^{2+}	3,5
Mg^{2+}	2,8

Als alternatives Siderophor wurde 3,4-Hydroxybenzoat untersucht, ein Siderophor mit einer sehr hohen Affinität für Eisen ($\log K = 30$ (Winkelmann und Winge, 1994)) und einer Wirkung in niedrigen Konzentrationsbereichen ($> 10^{-5}$ mM) (Osten *et al.*, 1989).

Die Zugabe von 3,4-Hydroxybenzoat im Vorlagemedium (Start-Konzentration: 1 mM) hat eine positive Auswirkung auf die Biotrockenmasse-Konzentration und die daran korrelierende Wachstumsrate (Abbildung 4-26). Die Biotrockenmasse-Konzentration beträgt mit Zusatz von 3,4-Hydroxybenzoat nach 25 Stunden 25 g/l statt 20 g/l, eine Steigerung von 25 %. Die Wachstumsrate ist gleich am Anfang des Versuchs maximal ($0,2 \text{ h}^{-1}$) und nimmt nach 10 Stunden

signifikant ab bis 0 h^{-1} nach 25 Stunden. Die integrale Biotrockenmasse-Selektivität für L-Leucin ist von 21,5 auf 29,1 $\text{g}_{\text{BTM}}/\text{g}_{\text{Leu}}$ um 35 % gestiegen und für Glucose mit 0,15-0,16 $\text{g}_{\text{BTM}}/\text{g}_{\text{Glc}}$ konstant.

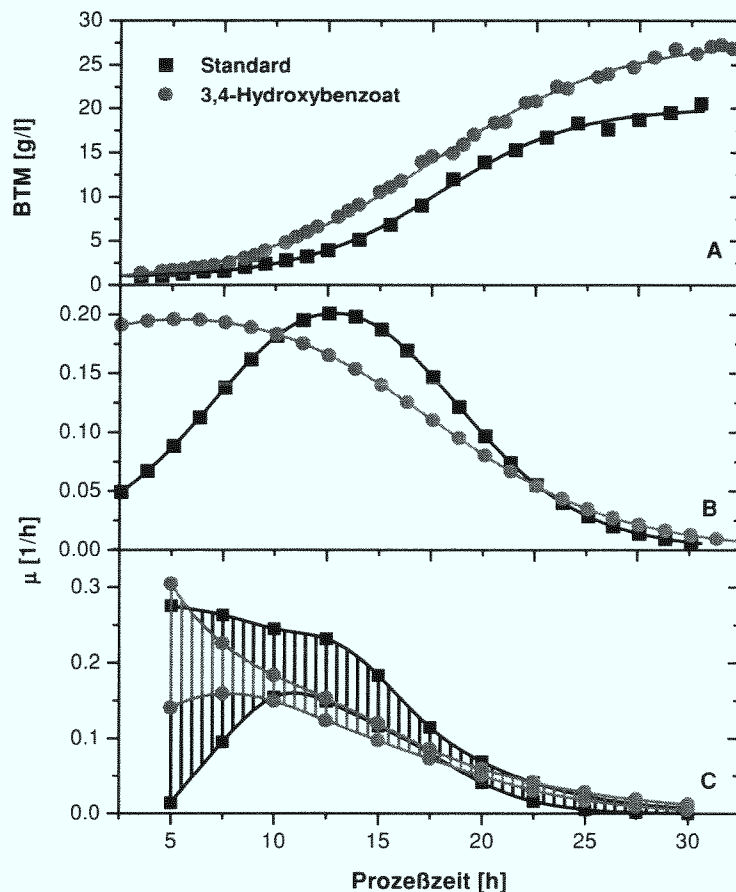


Abbildung 4-26. Ansatzweise-Verfahren mit (■) Citrat (Standard) oder (●) 3,4-Hydroxybenzoat (natürliches Siderophor) als Eisen-Chelator. Zeitliche Verläufe der Biotrockenmasse-Konzentration (A), biomassespezifischen Wachstumsrate (B) berechnet aus der Anpassung der gemessenen Parameter und dem 95%-Vertrauensbereich (C) dieser Berechnung (siehe Anhang A.8 und A.9).

Auch in Bezug auf die L-Isoleucin-Produktbildung hat dieses Siderophor einen positiven Einfluß. Die L-Isoleucin-Konzentration (Abbildung 4-27) steigt viel schneller an als in dem Versuch ohne 3,4-Hydroxybenzoat und erreicht nach 25 Stunden 130 mM statt 70 mM, eine Steigerung um 86 %. In dem Versuch mit Standard-Vorlagemedium ist die Glucose nach 27 Stunden verbraucht. Die integrale Selektivität beträgt 0,11 $\text{mol}_{\text{Ile}}/\text{mol}_{\text{Glc}}$. In dem Versuch mit 3,4-Hydroxybenzoat ist die integrale Selektivität um 36% auf 0,15 $\text{mol}_{\text{Ile}}/\text{mol}_{\text{Glc}}$ gestiegen. Die Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) des Versuchs mit Standard Vorlagemedium beträgt 2,9 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Dagegen ist die RZA des Ansatzweise-Verfahren mit 3,4-Hydroxybenzoat 4,9 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ und konnte damit im Vergleich zum etablierten Zulaufverfahren (Kelle, 1996) um 14 % gesteigert werden (RZA von 4,3 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ bei einer L-Isoleucin-Konzentration von 160 mM).

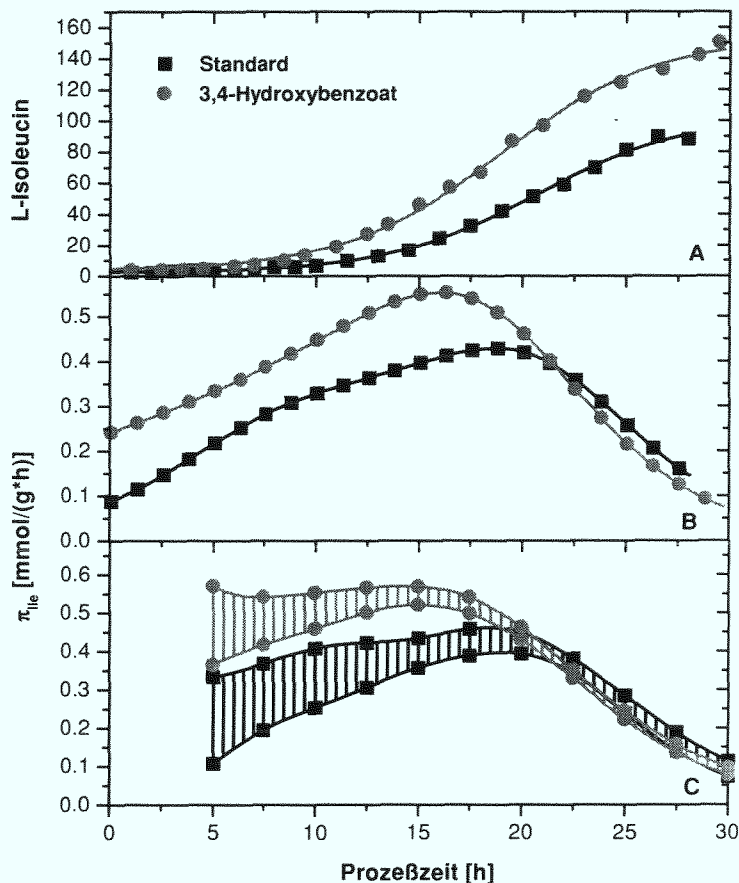


Abbildung 4-27. Ansatzweise Verfahren mit (■) Citrat (Standard) oder (●) 3,4-Hydroxybenzoat (natürliches Siderophor) als Eisen-Chelator. Zeitliche Verläufe der L-Isoleucin-Konzentration (A), biomassespezifischen L-Isoleucin-Produktbildungsrate (B) berechnet aus der Anpassung der gemessenen Parameter und dem 95%-Vertrauensbereich (C) dieser Berechnung (siehe Anhang A.8 und A.9).

Die Glucose-Konzentration war am Anfang durch einen Anstätz-Fehler höher (910 statt 690 mM) als geplant und war deshalb erst nach 30 Stunden vollständig verbraucht. Die Wiederholung des Versuchs mit einer Glucose-Konzentration von 690 mM zeigte keinen signifikanten Unterschied in den Profilen, bis Glucose der limitierenden Faktor war. Dies bestätigt die Aussage, die in Abschnitt 4.3.2.2. gemacht wurde, daß hohe Glucose-Konzentrationen keinen negativen Einfluß auf das Prozeß-Ergebnis haben.

Der Verlauf des Membranpotentials (Abbildung 4-28) zeigt, daß die Supplementierung mit 3,4-Hydroxybenzoat als Siderophor einen positiven Effekt auf den Energiehaushalt der Zelle hat. Das Membranpotential verläuft bis zu 10 Stunden parallel mit dem des Standard-Ansatzweise-Verfahrens und steigt im Zeitraum von 10 - 30 h auf -100 mV an (Standard:-80 mV nach 25 h).

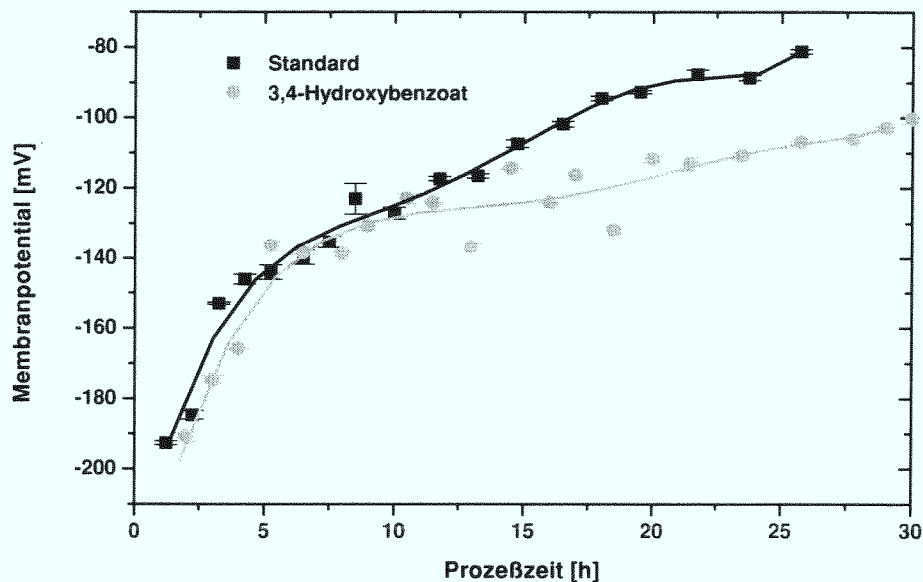


Abbildung 4-28. Ansatzweise-Verfahren mit (■) Citrat (Standard) oder (○) 3,4-Hydroxybenzoat als Eisen-Chelator. Zeitlicher Verlauf des Membranpotentials.

4.4 Übertragung der gewonnenen Daten auf das Zulaufverfahren

Die Ergebnisse der oben beschriebenen Versuche dienen als Basis für ein neues Zulaufverfahren. Allerdings zeigten die Versuche auch, daß Glucose-Konzentrationen oberhalb der Sättigungsgrenze keinen signifikanten Einfluß auf das Ergebnis hat. Deshalb ist ein geregeltes Zulaufverfahren mit einer modellgestützten, parameteradaptiven Regelstrategie im geschlossenen Regelkreis auf einen konstanten Glucose-Sollwert nicht erforderlich, wenn es gelingt, eine Glucose-Limitierung zu vermeiden.

Abbildung 4-29 zeigt, daß die biomassespezifische L-Isoleucin-Produktbildungsrate ($0,55 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) bei einer Wachstumsrate von $0,1 \text{ h}^{-1}$ maximal ist. Die Auftragung der biomassespezifischen L-Leucin-Substratverbrauchsrate gegen die Wachstumsrate zeigt, daß bei dieser Wachstumsrate die L-Leucin-Substratverbrauchsrate sehr niedrig ist ($0,02 \text{ mmol}/(\text{g} \cdot \text{h})$). Eine ähnliche Korrelation zwischen der biomassespezifischen L-Isoleucin-Produktbildungsrate und der Wachstumsrate konnte auch in den Diafiltrationsversuchen beobachtet werden (Abbildung 4-15 und Abbildung 4-16, Seite 44 und 45).

Die Arbeit von Scheer *et al.* (1987) besagt, daß sich unter L-Leucin limitierenden Bedingungen die spezifische Aktivität des Acetohydroxysäure Synthase Enzyms (Abbildung 3-3, Seite 14) verdoppelt. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, daß die biomassespezifische L-Isoleucin-Produktbildungsrate erst ihre maximale Aktivität erreicht, wenn die Wachstumsrate durch L-Leucin limitiert wird. Die starke Abnahme der biomassespezifischen L-Isoleucin-Produktbildungsrate bei

einer Wachstumsrate $<0,1 \text{ h}^{-1}$ ist wahrscheinlich Folge einer Abnahme der Stoffwechselaktivität durch Hungern der Zelle, weil kein L-Leucin mehr zur Verfügung steht.

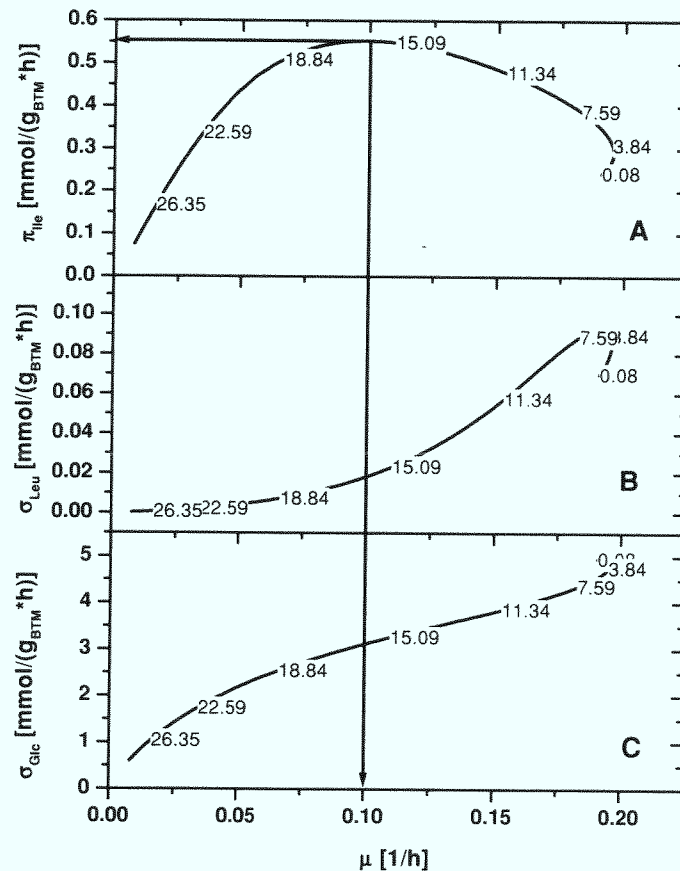


Abbildung 4-29. Ansatzweise-Verfahren mit Zusatz von 3,4-Hydroxybenzoat. Korrelation der biomassespezifischen L-Isoleucin-Produktbildungsrate (A), L-Leucin- (B) und Glucose-Substratverbrauchsrate (C) mit der Wachstumsrate. An den Kurven ist zusätzlich die Prozeßzeit (in h) angegeben.

Aufgrund dieser Hypothese wurde anhand der Substratverbrauchsdaten von Glucose und L-Leucin aus Abbildung 4-29, ein Feedprofil (Abbildung 4-30) berechnet. Es handelt sich um ein exponentielles Profil, wobei der Prozeß in einer bestimmten Zeit in die Sauerstofflimitierung läuft. Die Biotrockenmasse sollte mit einer konstanten Wachstumsrate von $0,1 \text{ h}^{-1}$ kontinuierlich steigen, bis die maximale Oxygen-Transfer-Rate des Bioreaktors erreicht ist. Weiterhin könnte durch den Feed das Arbeitsvolumen des Bioreaktors der limitierende Faktor sein.

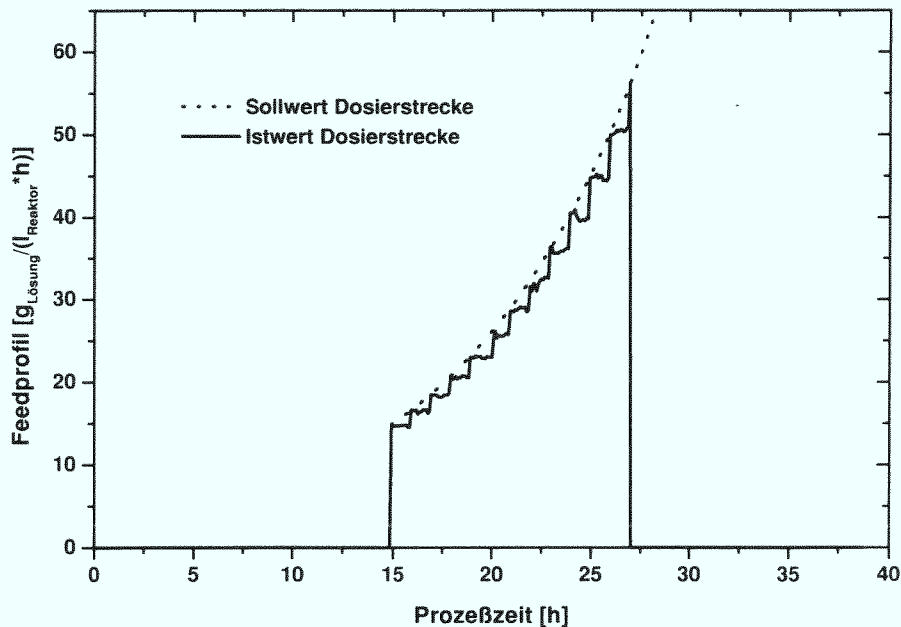


Abbildung 4-30. Feedprofil für das Zulaufverfahren im 7.5 L-Bioreaktor. Das auf Basis der Verbrauchsdaten im ansatzweise Verfahren berechnete Feedprofil wurde nach 27 Stunden gestoppt.

Mit diesem Feedprofil ist es nicht möglich, die Wachstumsrate (Abbildung 4-31 B) auf $0,1 \text{ h}^{-1}$ zu halten. Trotz der Zugabe von L-Leucin (und der restlichen Medienkomponenten) nimmt die Wachstumsrate innerhalb von 20 Stunden auf $0,05 \text{ h}^{-1}$ ab. Nach einer (kurzen) stationären Wachstumsphase von 5 Stunden (zwischen 20 und 25 Stunden) steigt die Wachstumsrate auf $0,075 \text{ h}^{-1}$. Die Feedphase wurde nach 27 Stunden beendet, da die Glucose-Konzentration stark anstieg ($\mu < \mu_{\text{berechnet}}$) (Abbildung 4-32). Auch die L-Leucin-Konzentration stieg ab 22 Stunden stark an. Durch das Beenden des Feedprofils nach 27 Stunden sinkt nach 30 Stunden die Wachstumsrate von $0,075$ auf 0 h^{-1} .

Die biomassespezifischen Glucose- und L-Leucin-Substratverbrauchsdaten (Abbildung 4-32) bei einer Wachstumsrate zwischen $0,05$ und $0,075 \text{ h}^{-1}$ entsprechen ungefähr den Erwartungen aus dem ansatzweise-Verfahren mit 3,4-Hydroxybenzoat. Allerdings ist die biomassespezifische L-Isoleucin-Produktbildungsrate mit $0,3 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ niedriger als der Erwartungswert von $0,35$ - $0,4 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Abbildung 4-29).

Bei der Berechnung des Feedprofils wurde angenommen, daß die Wachstumsrate nur von der L-Leucin-Konzentration anhängig ist und daß in diesem Fall eine einfache Michaelis-Menten-Beziehung zutrifft. Ebbighausen *et al.* (1989) beschrieben ein Aufnahmesystem für verzweigt-kettige Aminosäuren in *C. glutamicum*. Der beschriebene Transporter arbeitet dabei mit verschiedenen Affinitäten für seine Substrate, so liegt der K_m für L-Isoleucin bei $5,4 \mu\text{M}$, für L-Leucin bei $9,0 \mu\text{M}$ und für L-Valin bei $9,5 \mu\text{M}$.

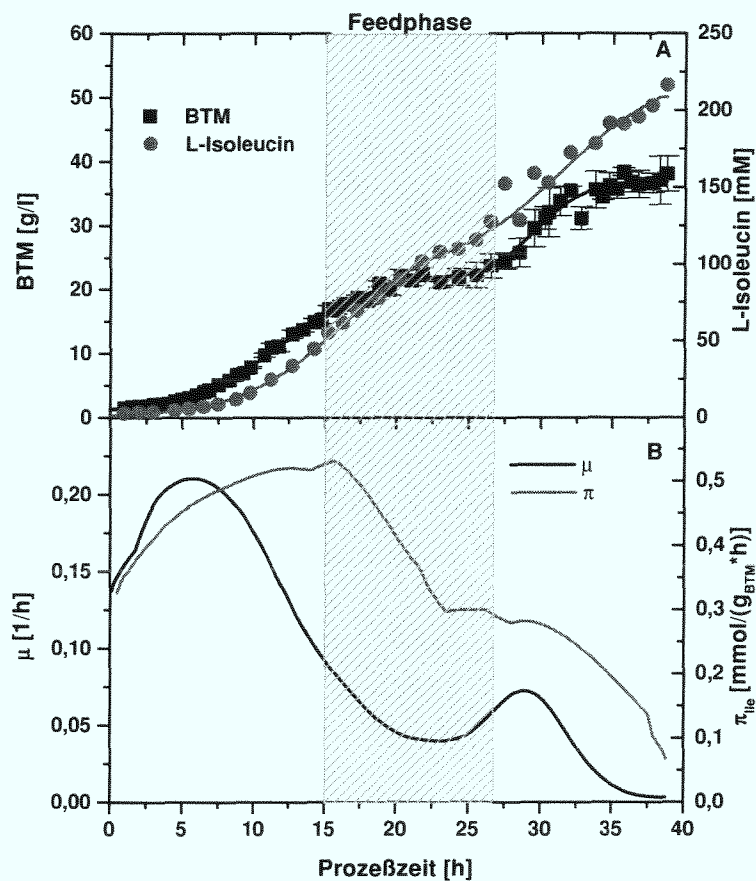


Abbildung 4-31. Versuch im Zulaufverfahren mit berechnetem Feedprofil. Zeitlicher Verlauf von Biotrockenmasse- (■) und L-Isoleucin-Konzentration (●) (A) und Wachstumsrate und biomasse-spezifischer L-Isoleucin-Produktbildungsrate (B). In der Grafik ist auch die feedphase dargestellt (siehe Abbildung 4-30).

Die maximale Aufnahmerate liegt für alle verzweigtkettigen Aminosäuren zwischen 0,94 und 1,3 mmol·min⁻¹·g_{BTM}⁻¹. Die Aufnahmerate von L-Leucin ist deswegen nicht nur abhängig von der L-Leucin-Konzentration sondern auch von dem L-Isoleucin/L-Leucin-Verhältnis. Hohe L-Isoleucin-Konzentrationen könnten somit direkt die L-Leucin-Aufnahme hemmen und indirekt die Wachstumsrate beeinflussen. Die Versuche im Ansatzweise-Verfahren mit L-Isoleucin in der Vorlage und im Diafiltrationsverfahren bestätigen diese Hypothese.

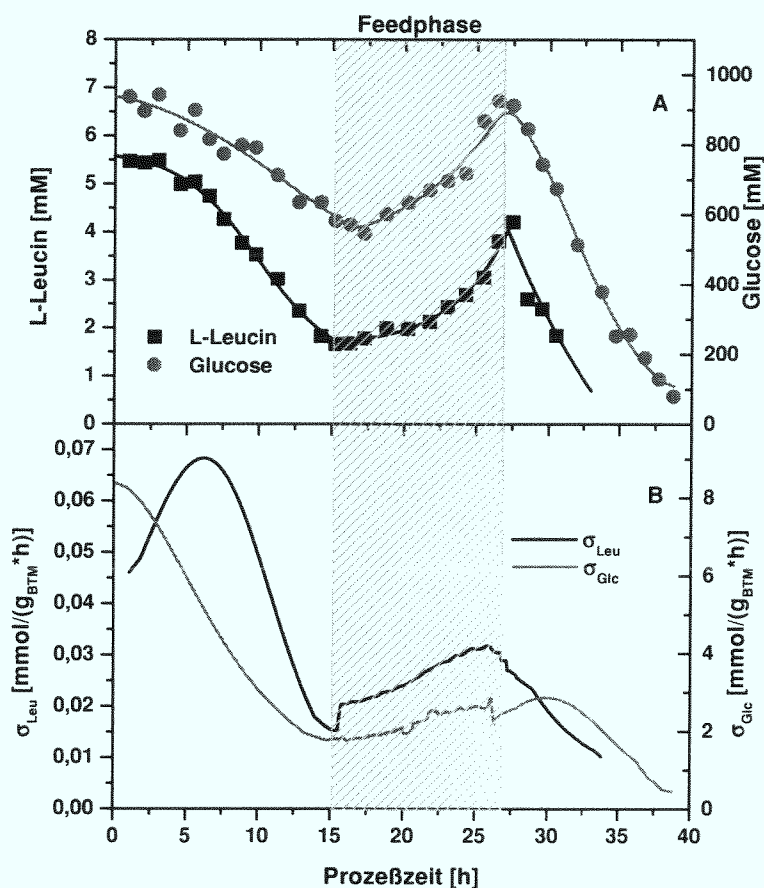


Abbildung 4-32. Versuch im Zulaufverfahren mit berechnetem Feedprofil. Zeitlicher Verlauf der L-Leucin- (■) und Glucose-Konzentration (●) (A) und der biomasse-spezifischen L-Leucin- und Glucose-Substratverbrauchsrate (B). In der Grafik ist auch die feedphase dargestellt (siehe Abbildung 4-30).

Auch der Verlauf des Membranpotentials (Abbildung 4-33) zeigt, daß mit Zugabe des Siderophores 3,4-Hydroxybenzoat die Zellen keine energetischen Probleme mehr haben. Das Membranpotential ist zu Beginn des Prozesses ca. 15-10 mV niedriger als die erwarteten -160 mV und steigt nicht weiter als -140 mV. Bei diesem Membranpotential ist die Zelle nicht im Bezug auf ihre *Proton-Motiv-Force* limitiert (da die Zugänglichkeit von Eisen verbessert ist). Eine Analyse des zellinternen ATP-Pools konnte aufgrund eines Defektes bei der Lagerung der Proben nicht durchgeführt werden.

Mit Hilfe dieses Zulaufverfahrens konnte der Produkttiter von 150 auf 220 mM gesteigert werden, eine **Zunahme von 47 %**. Die Raum-Zeit-Ausbeute stieg von 4,3 auf 5,4 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, eine **Verbesserung um 25 %**. Die Kohlenstoffbilanz der L-Isoleucin-Produktion nach 40 Stunden ist zu 87 % geschlossen. Im Zulaufverfahren wird eine Vielzahl von Substanzen in kleinen Mengen ausgeschieden, die in ihrer Summe einen großen Teil der Bilanzlücke (13 %) ausmachen könnten. Auch könnten eventuelle Meßfehler der Analytik und der Dosierstrecke für einen Teil dieser Bilanzlücke verantwortlich sein. Aus der Bilanz ergibt sich eine integrale L-Isoleucin-Selektivität von 0,14 $\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ bei 40 Stunden, vergleichbar mit der die R. Kelle in seiner Arbeit gefunden hat

(1995). Der CO_2 -Anteil wurde von **68% auf 41% reduziert**. Damit ist der Energiebedarf der Organismen bei der L-Isoleucin-Produktion auf ein normales Niveau reduziert.

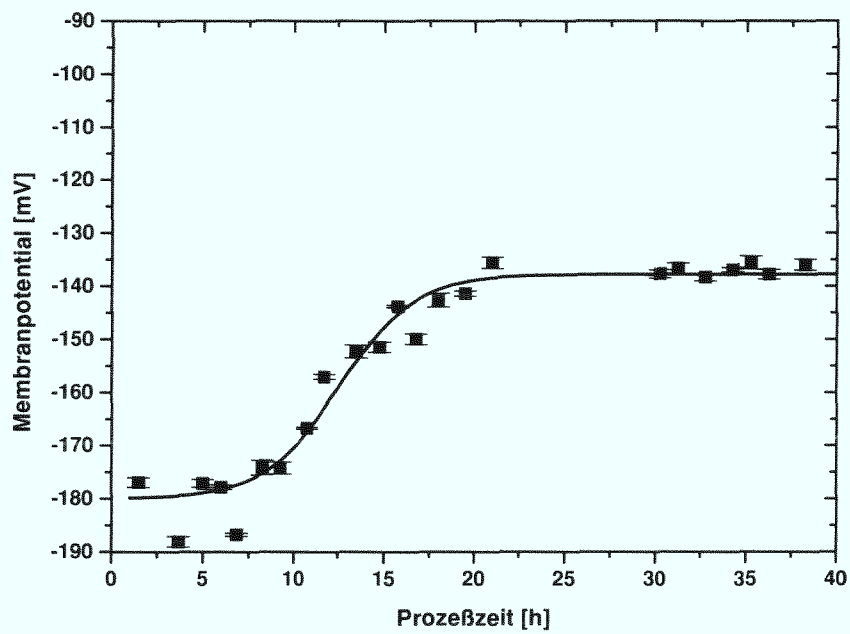


Abbildung 4-33. Versuch im Zulaufverfahren mit berechnetem Feedprofil. Zeitlicher Verlauf des Membranpotentials.

5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt die reaktionstechnischen Untersuchungen und die darauf basierende Verfahrensentwicklung zur fermentativen Produktion von L-Isoleucin mit *Corynebacterium glutamicum* DR17 pECM3::ilvA38. Eine Einordnung im Vergleich zu alternativen Verfahren (Übersicht der fermentativen Verfahren zur Produktion von L-Isoleucin bei Kelle (Kelle, Wandrey et al., 1996) und Karutz (Karutz, 1999)) verdeutlicht, daß das entwickelte Verfahren einen wesentlichen Fortschritt bei der fermentativen L-Isoleucinherstellung mit einem synthetischen Medium und Glucose als Hauptkohlenstoffquelle darstellt.

Inhalt weiterführender Untersuchungen sollte sein:

- Alternative Siderphore

In dieser Arbeit wurde festgestellt, daß die L-Isoleucin Produktion hauptsächlich durch mangelnde Verfügbarkeit des Eisens für die Zelle limitiert wurde. Dieses Problem wurde durch Addition des natürlichen Siderphores 3,4-Hydroxybenzoat gelöst. Bei der Wirtschaftlichkeitsbetrachtung des entwickelten Prozesses könnten die hohen Kosten des 3,4-Hydroxybenzoats die Attraktivität des realisierten Konzeptes verringern. Die Versuche im Diafiltrationsverfahren zeigen aber, daß die Zudosierung des ursprünglichen Eisen-Chelators Citrat oder Fe-Citrat, als kostengünstige Alternative ausreichen sollte. Dabei müssen die Effektivität und die Kosten des 3,4-Hydroxybenzoates und des (Fe-)Citrats in Betracht gezogen werden.

- Verlängerung der Produktionsphase

Das in diesem Zulaufverfahren eingesetzte Feedprofil sollte als Beginn weiterführender Entwicklungen gesehen werden. Gezeigt wurde, daß es mit L-Leucin als signifikantem Prozeßparameter möglich ist, die Wachstumsrate und damit indirekt die biomassespezifische L-Isoleucin-Produktbildungsrate zu beeinflussen. Die Kinetik der L-Leucin Aufnahme ist abhängig von dem L-Leucin/L-Isoleucin Verhältnis im Medium (Ebbighausen *et al.*, 1989). Mit Hilfe dieses biochemischen Wissens könnte ein makrokinetisches Modell entwickelt werden, auf Grund dessen eine gezielte Feed-Strategie zur Anwendung käme, mit der die Produktionsphase kontrolliert verlängert werden könnte.

- Stoffflußanalysen

Um gezielt in den Stoffwechsel von Produktionsstämmen eingreifen zu können, ist das Verständnis zellulärer Vorgänge mittels der Metabolitfluß-Bestimmung von zentraler Bedeutung (Bailey, 1991; Farmer und Liao, 1996; Nielsen, 1998). Mit Hilfe des von Marx *et al.* (1996 und 1997) entwickelten Verfahrens ist es möglich, alle *in vivo*-Metabolitflüsse des Zentralstoffwechsels zu ermitteln. Mit dieser Technik kann, in einem Chemostat-Verfahren bei verschiedenen Wachstumsraten (und damit korrelierenden L-Leucin-Konzentrationen) die Stoffflußverteilung (stationäre Stoffwechsel Untersuchungen) des Produktionstammes bestimmt werden. Aber die stationären Zustände in Chemostaten geben nur in den seltensten Fällen reale Stoffwechselsituationen im Zulaufverfahren wieder. In Zukunft wird es durch weitere Entwicklungen dieser Technik vielleicht möglich sein, auch in einem dynamischen System Ermittlungen zur Stoffflußverteilung durchführen zu können (Schmidt, 1999).

6 Zusammenfassung

Dieser Arbeit beschreibt die Verfahrensentwicklung zur Herstellung von L-Isoleucin mit Glucose als Hauptkohlenstoffquelle. Durch die Nachführung von signifikanten Substraten wie L-Leucin und die Substitution von Citrat durch 3,4-Hydroxybenzoat als Eisen-Chelator konnte eine L-Isoleucinkonzentration bis zu 220 mM mit einer maximalen Raum-Zeit-Ausbeute von 5,4 mmol·l⁻¹·h⁻¹ und einer integralen L-Isoleucin-Selektivität bis 14% erreicht werden. Der CO₂-Anteil ist in diesem Verfahren von 68% auf 41% reduziert worden, und die Membranpotential stieg nicht weiter als -140 mV. Damit wurde der Energiebedarf von *Corynebacterium glutamicum* im Gegensatz zu Kelle bei der L-Isoleucin-Produktion auf ein normales Niveau reduziert.

In Zusammenarbeit mit T. Hermann, Institut für Biotechnologie 1 (Prof. Krämer) ist der Verlauf des transmembranen L-Isoleucin-Transportes und die biomassespezifische L-Isoleucin-Produktbildungsrate untersucht worden. Die Abnahme des Carrier-vermittelten L-Isoleucin-Exports von maximal 1,5 mmol/(g·h) bei 30 Stunden bis auf 1,0 mmol/(g·h) am Ende des Prozesses und der Einbruch der biomassespezifischen L-Isoleucin-Produktbildungsrate nach 30 Stunden von 0,4 mmol/(g·h) bis auf 0 mmol/(g·h) korreliert mit den Zusammenbrechen des zellinternen ATP-Pools und dem Membranpotential der Zelle. Die Membranpotential stieg innerhalb 40 Stunden von einem physiologisches Niveau von -160 mV bis auf einen unphysiologischen Wert von -90 mV an, und die zellinterne ATP-Konzentration nahm nach ca. 20-25 Stunden ab von 6,5 mM bis fast 0 mM.

Untersuchungen zur Produktinhibierung im Schüttelkolben und im Ansatzweise-Verfahren im Rührkessel zeigen, daß die Zellen am Anfang empfindlich sind, sich aber im Verlauf des Prozesses an höhere L-Isoleucinkonzentrationen (> 10 mM) adaptieren. Dies zeigt sich durch eine Verlängerung der lag-Phase, wobei aber die maximale biomassespezifische Wachstumsrate nicht beeinflußt wird. Die Erhöhung der extrazellulären L-Isoleucinkonzentration hat auch eine Verzögerung der Abnahme des zellinternen ATP-Gehalts zur Folge, allerdings wird die biomassespezifische L-Isoleucin-Produktbildungsrate dadurch nicht signifikant beeinflußt.

Zur weiteren Klärung der im Zulaufverfahren beobachteten Effekte wurde ein Verfahren entwickelt, bei dem durch Variation der Verdünnungsrate und gleichzeitiges Zurückhalten der Biomasse (Diafiltrationsverfahren) die Akkumulation von L-Isoleucin und Nebenprodukten weitestgehend gesteuert werden kann. Dabei wird die zudosierte Substratmenge konstant gehalten wird. Trotz Variation der Verdünnungsrate von 0,455 h⁻¹ bis 0,045 h⁻¹ (Verdünnungsmedium entspricht dan 0,1 bis 1* dem Vorlagemedium) und der damit steigenden Produktkonzentration, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des zeitlichen Verlaufs der biomassespezifischen Wachstumsrate und L-Isoleucin-Produktbildungsrate. Statt des vorher erwähnte Einbruchs der biomassespezifischen L-Isoleucin-Produktbildungsrate nach 30 Stunden von 0,4 mmol/(g·h) bis 0

mmol/(g*h) im Zulaufverfahren blieb die biomassespezifische L-Isoleucin-Produktbildungsrate im Diafiltrationsverfahren zwischen 0,3 und 0,35 mmol/(g*h). Dies zeigt eine Limitierung anstatt einer Inhibierung an.

Mit Hilfe der Haupt-Komponenten-Analyse wurde Citrat als signifikante limitierende Prozeßgröße indentifiziert, und weitere Untersuchungen zeigten, daß es die Funktion als Eisen-Chelator übernimmt. Mit Hilfe eines spezifischen Eisen-Chelators, 3,4-Hydroxybenzoat ($\log K_{\text{Citrat}} = 10,9$ und $\log K_{3,4\text{-Hydroxybenzoat}} = 30$), wurde der Zugang von Eisen für die Zelle im Prozeß gesteigert. Die Zelle ist jetzt besser in der Lage, die benötigte Energie zu liefern, da bestimmte Enzyme der Atmungskette nicht mehr Eisenlimitiert sind.

Anhang A: Material und Methoden

A.1 Organismus

Der in dieser Arbeit eingesetzte Produktionsstamm *C. glutamicum* DR17 pECM3::ilvA38 wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Eggeling am Institut für Biotechnologie 1 (Prof. Sahm) des Forschungszentrums Jülich entwickelt (Schrumpf *et al.*, 1992; Morbach *et al.*, 1995).

Der verwendete Stamm zeichnet sich gegenüber dem Wildtyp durch die folgenden Veränderungen aus (Abbildung 3-3, Seite 14): Der Stamm trägt im Chromosom das Gen für eine *feedback*-resistente Asparate-Kinase (*lysC^{fbr}*) in einfacher Kopie sowie das Gen für eine ebenfalls *feedback*-resistente Homoserin-Dehydrogenase (*hom^{fbr}*) in dreifacher Kopie. Zusätzlich zu dem Wildtyp-Gen wurde das Gen *ilvA^{fbr}* in das Chromosom integriert und auf einem Derivat des multicopy Plasmides ECM3 in den Organismus transformiert. Dieses Gen codiert für eine *feedback*-resistente Threonin-Dehydratase. Diese Enzyme bzw. die kodierenden Gene sind gegenüber der Feedbackhemmung durch nachgeschaltete Metabolite resistent, wodurch der Kohlenstofffluß verstärkt in die Richtung des L-Isoleucins gelenkt wird.

Weiterhin wurde das Gen für die native Homoserin-Kinase (*thrB*) vervielfältigt, so daß es viermal im Chromosom vorliegt. Dieses Gen ist nicht gegen *Feedback*-Reprimierung resistent, durch die Erhöhung der Gendosis ist die Effektivität der Repression schwächer.

Der Stamm ist aufgrund einer Mutation im Gen *leuCD*, das für das Enzym Isopropylmalat-Dehydrogenase codiert, und einer in das Gen *leuA* inserierten Kanamycin-Resistenz auxotroph für L-Leucin. Ferner ist der Stamm (+)Biotin-auxotroph.

A.2 Stammhaltung

Die Aufbewahrung der Organismen erfolgte in Glycerinkryokulturen. Zur Herstellung dieser Kryokulturen wurden die Organismen in Schüttelkolben in 100 ml des unten beschriebenen Komplexmediums bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 13 ($\lambda = 600 \text{ nm}$) bei 30 °C und 150 rpm kultiviert. Nach lichtmikroskopischer Untersuchung auf Kontamination wurde die Kultur mit 30 ml sterilisiertem, 85 %igen Glycerin versetzt und steril in Portionen von 1,8 ml in (sterile) Nalgene-Kryoröhrchen aliquotiert. Bis zur Verwendung wurden die Glycerinkulturen bei -80 °C aufbewahrt.

A.3 Medienzusammensetzung

A.3.1 Medium für Schüttelkolben

- Komplexmedium für die erste Vorkulturstufe:

Pepton aus Casein	10,0	g·l ⁻¹
Hefeextrakt	10,0	g·l ⁻¹
NaCl	2,50	g·l ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25	g·l ⁻¹
Glucose·H ₂ O	20,0	g·l ⁻¹
Kanamycin-Sulfat	25,0	mg·l ⁻¹
Chloramphenicol	3,0	mg·l ⁻¹

Alle Komponenten bis auf Glucose und die Antibiotika wurden entsprechend einem Endvolumen von 100 ml in 80 ml H₂O_{deion.} gelöst und in einem 1 l-Erlenmeyerkolben mit Schikanen autoklaviert. Glucosemonohydrat wurde als Stammlösung mit einer Konzentration von 100 g·l⁻¹ getrennt autoklaviert und nach dem Abkühlen in entsprechender Menge zugegeben. Die Antibiotika wurden als sterile Stammlösungen (A.3.9 und A.3.10) zugesetzt.

- Synthetisches Medium für die zweite Vorkulturstufe:

(NH ₄) ₂ SO ₄	46,0	g·l ⁻¹
Harnstoff	5,0	g·l ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0,5	g·l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,5	g·l ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,285	g·l ⁻¹
L-Leucin	0,315	g·l ⁻¹
Polypropylenglycol 2040	200,0	μl·l ⁻¹
Glucose·H ₂ O	110,0	g·l ⁻¹
CaCO ₃	5,0	g·l ⁻¹
Chloramphenicol	3,0	mg·l ⁻¹
Kanamycinsulfat	25,0	mg·l ⁻¹
Spurenlösung 1	1,0	ml·l ⁻¹
Spurenlösung 2	1,0	ml·l ⁻¹
Biotinlösung	0,85	ml·l ⁻¹

Alle Medienbestandteile bis auf Glucose, Antibiotika, Biotin und die Spurenlösungen 1 + 2 wurden gemeinsam in 80 % des Endvolumens gelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde die getrennt autoklavierte Glucose als Stammlösung mit einer Konzentration von 500 g·l⁻¹ zugegeben. Die Antibiotika wurden als sterile Stammlösungen, Biotin und die Spurenlösungen 1 + 2 über einen sterilen Spritzenfilter zugegeben (A.3.6, A.3.7 und A.3.8).

A.3.2 Vorlagemedium für das ansatzweise Verfahren im 7,5 l-Bioreaktor

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	60,0	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Harnstoff	6,0	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
K_2HPO_4	0,5	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
KH_2PO_4	0,5	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,285	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
L-Leucin	0,8	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
CaCl_2	0,05	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
EDTA	0,1	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Citrat- H_2O	0,1	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Glucose- H_2O	110,0	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Chloramphenicol	3,0	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
Spurenlösung 1	1,0	$\text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$
Spurenlösung 2	1,0	$\text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$
Biotinlösung	0,85	$\text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$

Alle Medienkomponenten wurden gelöst und dann über einen Sterilfilter in den Bioreaktor gepumpt. Dabei wurde das Volumen von einem Liter Wasser zum Nachspülen des Filters sowie das Volumen des Inokulums berücksichtigt.

A.3.3 Medium im Zulaufverfahren im 30 l-Bioreaktor▪ Vorlagemedium

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50,0	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Harnstoff	6,0	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
K_2HPO_4	1,0	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
KH_2PO_4	1,0	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,285	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
L-Leucin	0,8	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
CaCl_2	0,05	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
EDTA	0,1	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Citrat- H_2O	0,1	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Chloramphenicol	3,0	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
Spurenlösung 1	1,0	$\text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$
Spurenlösung 2	1,0	$\text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$
Biotinlösung	0,85	$\text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$

Alle Medienkomponenten wurden gelöst und dann über einen Sterilfilter in den Bioreaktor gepumpt. Dabei wurde das Volumen von einem Liter Wasser zum Nachspülen des Filters sowie das Volumen des Inokulums berücksichtigt.

- Zulaufmedium

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,238	g·l ⁻¹
CaCl ₂ ·H ₂ O	0,04	g·l ⁻¹
EDTA	0,08	g·l ⁻¹
Citrat·H ₂ O	0,08	g·l ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0,8	g·l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,8	g·l ⁻¹
L-Leucin	1,25	g·l ⁻¹
Glucose·H ₂ O	500,0	g·l ⁻¹
Spurenlösung 1	1,0	ml·l ⁻¹
Spurenlösung 2	1,0	ml·l ⁻¹
Biotinlösung	0,85	ml·l ⁻¹

Alle Medienbestandteile bis auf L-Leucin, Biotin und Spurenlösungen 1 + 2 wurden gemeinsam gelöst und autoklaviert. L-Leucin wurde getrennt gelöst und autoklaviert und nach dem Abkühlen unter sterilen Bedingungen zugegeben. Biotin und die Spurenlösungen 1 + 2 wurden über einen sterilen Spritzenfilter durch ein an dem Gefäß angebrachtes Septum zugesetzt.

A.3.4 Medium im Diafiltrationsverfahren im 7,5 l-Bioreaktor

- Vorlagemedium

Das Vorlagemedium entspricht der für das Zulaufverfahren angegebenen Zusammensetzung.

- Zulaufmedium

Das Verdünnungsmedium entspricht in der Zusammensetzung dem Vorlagemedium und wird um den jeweils angegebenen Faktor verdünnt eingesetzt. Lediglich das Chloramphenicol wurde immer in der angegebenen Konzentration zugegeben. Der pH-Wert wurde mit konzentriertem NaOH auf pH ≈ 7,3 eingestellt. Es wurden alle Medienbestandteile gelöst und dann über einen Sterilfilter in eine trocken autoklavierte Vorratsflasche gepumpt.

A.3.5 Medium im Zulaufverfahren mit Feedprofil im 7,5 l-Bioreaktor

- Vorlagemedium

(NH ₄)SO ₄	10	g/l
Harnstoff	6	g/l
L-Leucin	0,8	g/l
K ₂ HPO ₄	1	g/l
KH ₂ PO ₄	1	g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,285	g/l

CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,05	g/l
K ₂ SO ₄	0,7	g/l
EDTA	0,1	g/l
3,4-Hydroxybenzoat	0,154	g/l
Glucose	140	g/l
Spurenlösung 1	1	ml/l
Spurenlösung 2	1	ml/l
Biotinlösung	0,85	ml/l
Chloramphenicol	3	mg/l

Alle Medienkomponenten wurden gelöst und dann über einen Sterilfilter in den Bioreaktor gepumpt. Dabei wurde das Volumen von einem Liter Wasser zum Nachspülen des Filters sowie das Volumen des Inokulums berücksichtigt.

▪ Zulaufmedium

Glucose	700	g/l
L-Leucin	3,63	g/l
K ₂ HPO ₄	1,5	g/l
KH ₂ PO ₄	1,5	g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,33	g/l
CaCl ₂ ·7H ₂ O	0,06	g/l
3,4-Hydroxybenzoat	0,154	g/l
Spurenlösung 1	1,5	ml/l
Spurenlösung 2	1,5	ml/l
Biotinlösung	1	ml/l
Chloramphenicol	3	mg/l

Alle Medienbestandteile bis auf L-Leucin, Biotin, Chloramphenicol, Spurenlösungen 1 + 2 und 3,4-Hydroxybenzoat wurden gemeinsam gelöst und autoklaviert. L-Leucin wurde getrennt gelöst und autoklaviert und nach dem Abkühlen unter sterilen Bedingungen zugegeben. Biotin, Chloramphenicol, 3,4-Hydroxybenzoat und die Spurenlösungen 1 + 2 wurden über einen sterilen Spritzenfilter durch ein an dem Gefäß angebrachtes Septum zugesetzt.

A.3.6 Spurenlösung 1

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	28,5	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16,5	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,7625	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6,3	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,13	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$4,25 \cdot 10^{-2}$	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$6,50 \cdot 10^{-2}$	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$
$\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	$2,80 \cdot 10^{-2}$	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$
$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$1,93 \cdot 10^{-2}$	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$

Das Wasser wird vor Herstellung der Lösung mit 2 ml konzentrierter H_2SO_4 angesäuert, um ein Ausfallen der Salze zu vermeiden.

A.3.7 Spurenlösung 2

H_3BO_3	$5,0 \cdot 10^{-2}$	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$
$\text{SrCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$5,0 \cdot 10^{-2}$	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$
$\text{Ba}_2\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$5,0 \cdot 10^{-2}$	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$

A.3.8 Biotin-stammlösung

(+)Biotin	1,0	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$
-----------	-----	--------------------------------

Alkalisierung mit NaOH auf $\text{pH} < 9$

Die Spurenkonzentrate und die Biotinlösung wurden nach dem Ansetzen bis zum Verbrauch bei -20°C eingefroren, um eine Änderung der Oxidationsstufe der eingesetzten Ionen bzw. einen Zerfall des Biotins zu vermeiden.

A.3.9 Kanamycinsulfat-stammlösung

$50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Kanamycinsulfat wurden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gelöst und in Portionen von 1 ml über ein steriles Spritzenfilter in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben. Bis zum Verbrauch wurden sie bei -20°C eingefroren.

A.3.10 Chloramphenicol-stammlösung

$50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Chloramphenicol wurden in absolutem Ethanol gelöst. Die autosterile Lösung wurde bis zum Verbrauch bei -20°C aufbewahrt.

A.3.11 Lauge

Zur Regelung des pH-Wertes wurde eine 25 %ige Ammoniaklösung (autosteril) eingesetzt.

A.3.12 Antischaummittel

Zur Niederschlagung des während des Versuches im Bioreaktor entstehenden Schaumes wurde eine 10 %ige Suspension von Polypropylenglycol 2040 in Wasser eingesetzt. Die Suspension wurde vor dem Einsatz autoklaviert.

A.3.13 FIA-Puffer

K_2HPO_4	11,6	$g \cdot l^{-1}$
KH_2PO_4	4,53	$g \cdot l^{-1}$
Na_2SO_4	7,10	$g \cdot l^{-1}$
NaN_3	0,15	$g \cdot l^{-1}$

Bei Abweichung von $pH = 7,0$ wurde der pH-Wert mit H_3PO_4 bzw. KOH nachgestellt. Durch die Zugabe von Natriumazid (toxisch) wurde ein Bewachsen des Puffers und der FIA verhindert.

A.4 Apparativer Aufbau und Durchführung der Verfahren

A.4.1 Schüttelkolbenkultivierung

Als erste Vorkultur wurde ein 1 l-Erlenmeyerkolben (4 Schikanen) mit 100 ml des Komplexmediums mit einer Glycerinkultur angeimpft und 12 h bei 30 °C und 150 rpm im Schüttler kultiviert.

Für die zweite Vorkultur wurde das beschriebene synthetische Medium mit einem Inokulum von 5 % aus der ersten Vorkultur angeimpft. Die Kultivierung erfolgte in 200 ml Medium je 1 l-Erlenmeyerkolben (4 Schikanen) bei 30 °C und 150 rpm für 24 h. Das Gesamtvolumen betrug 20 % des Startvolumens des Prozesses.

A.4.2 Ansatzweise Verfahren

Für alle Versuche kam ein 7,5 l-Bioreaktor (Typ ISF 200, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) zum Einsatz. Über die dazugehörige Meß- und Regeleinheit konnten Rührerdrehzahl, Reaktorinnendruck, Zuluft, pH (7.0), Temperatur (30 °C), Sauerstoffpartialdruck (> 30%), Antischaum-Zugabe und Gewicht gemessen bzw. geregelt werden. Die Sterilisation des Kulturgefäßes sowie der fest angebauten Peripherie (Zuluft-, Abluftstrecke und Gleitringdichtung) wurde ebenfalls durch die Meß- und Regeleinheit gesteuert.

Zusätzlich wurde in den Abluftstrom des Reaktors eine Abgasanalytik installiert, mit der die Konzentrationen von O_2 und CO_2 gemessen wurden.

Die von der Meß- und Regeleinheit des Reaktors aufgenommenen Werte wurden über eine parallele Schnittstelle direkt durch den Prozeßrechner abgelesen, die Übertragung der Daten der externen Meßgeräte erfolgte über analoge Signale.

Der Reaktor wurde mit eingebauten Sonden und einem Inhalt von 3 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ bei 122 °C für 20 min sterilisiert. Anschließend wurde das Wasser über das Probenahmeventil abgelassen und 4 l Medium über einen Sterilfilter zugepumpt. Dann wurden pO_2 -Sonde und Abgasanalytik geeicht (vgl. A.5.1 und A.5.2) sowie die Startparameter eingestellt.

Über eine sterile Animpfnadel wurde zu Beginn des Prozesses das Inokulum mit einem Volumen von 1 l zugegeben, so daß sich ein Arbeitsvolumen von 5 l ergab.

Während des Prozesses wurde die Gelöstsauerstoffkonzentration manuell durch Variation von Zuluft, Druck und Rührerdrehzahl auf 30-40 % Luftsättigung reguliert, in den letzten 10 h des Versuchs wurden auch höhere Werte zugelassen. Die Zugabe von Antischaummittel sowie die pH-Regulation erfolgten automatisch.

Das Prozeßende war erreicht, wenn durch den plötzlichen, drastischen Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration sowie den Anstieg des pH-Wertes im Bioreaktor der vollständige Umsatz der vorgelegten C-Quelle angezeigt wurde.

A.4.3 Diafiltrationsverfahren

Für die Versuche im Diafiltrationsverfahren (Verweilzeitentkopplung) wurden Aufbau und Vorgehensweise, wie sie für die Versuche im Ansatzweise-Verfahren beschrieben sind, mit einer Reihe von Erweiterungen übernommen. Das Arbeitsvolumen betrug 5,5 l, um das Umlaufvolumen auszugleichen. Der Versuchsaufbau (Abbildung A-1 und A-2) sollte die Möglichkeit bieten, durch Verdünnung des Reaktorinhaltes mit frischem Medium die Produktkonzentration zu kontrollieren. Dazu wurde über eine Sartorius-Dosierstrecke (Sartorius YFC01Z, Sartorius, Göttingen, Deutschland) ein konstanter Volumenstrom aus einer 50 l Vorratsflasche in den Reaktor dosiert. Die Dosierstrecke steuert die Pumpe so an, daß aus einer gewichtskontrollierten Flasche ein vorgegebener Massestrom eingehalten wird. Eine zweite Pumpe füllt die Dosierflasche bei Unterschreitung eines Mindestgewichtes automatisch nach.

Gleichzeitig wurde anhand der durch die FIA ermittelten Werte die Glucosekonzentration im Reaktor durch die Zudosierung von Glucoselösung auf einen konstanten Wert eingeregelt. Dazu diente ein in das Steuerprogramm „Medusa“ implementierter Minimalvarianzregler als Regelglied und eine weitere Schlauchpumpe als Stellglied.

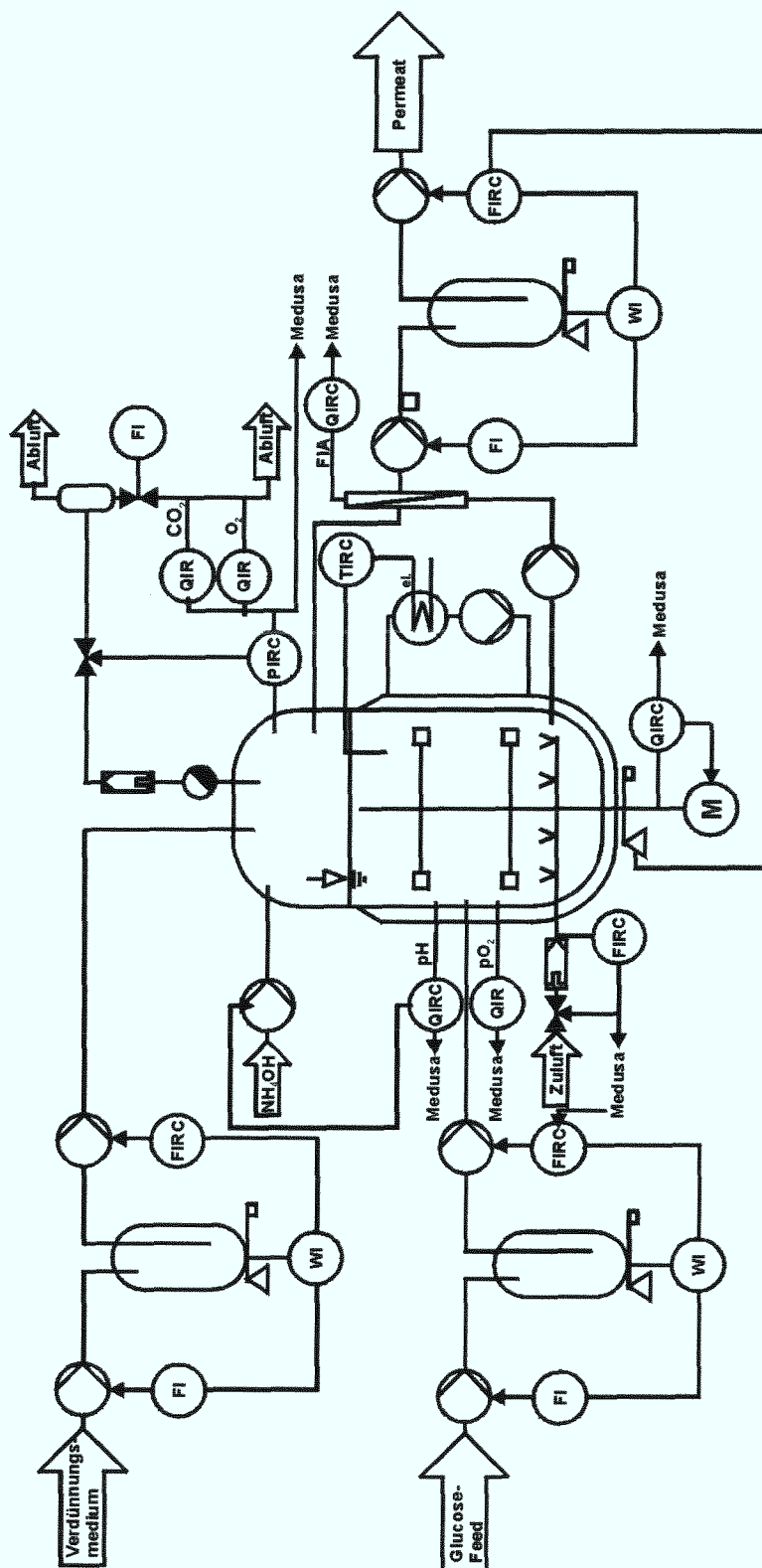


Abbildung A-1. Anlagenschema der Diafiltrationsanlage: Diafiltrationsverfahren zur Verweilzeitentkopplung bei der L-Isoleucin-Herstellung im 7,5 l Bioreaktor. Alle Daten werden mit einer Abtastzeit von 5 min. durch das Datenerfassungsprogramm „Medusa“ aufgenommen. Die Übertragung der mittels FIA *on-line* gemessenen Glucosekonzentration erfolgt jeweils nach Ablauf eines Meßzyklus.

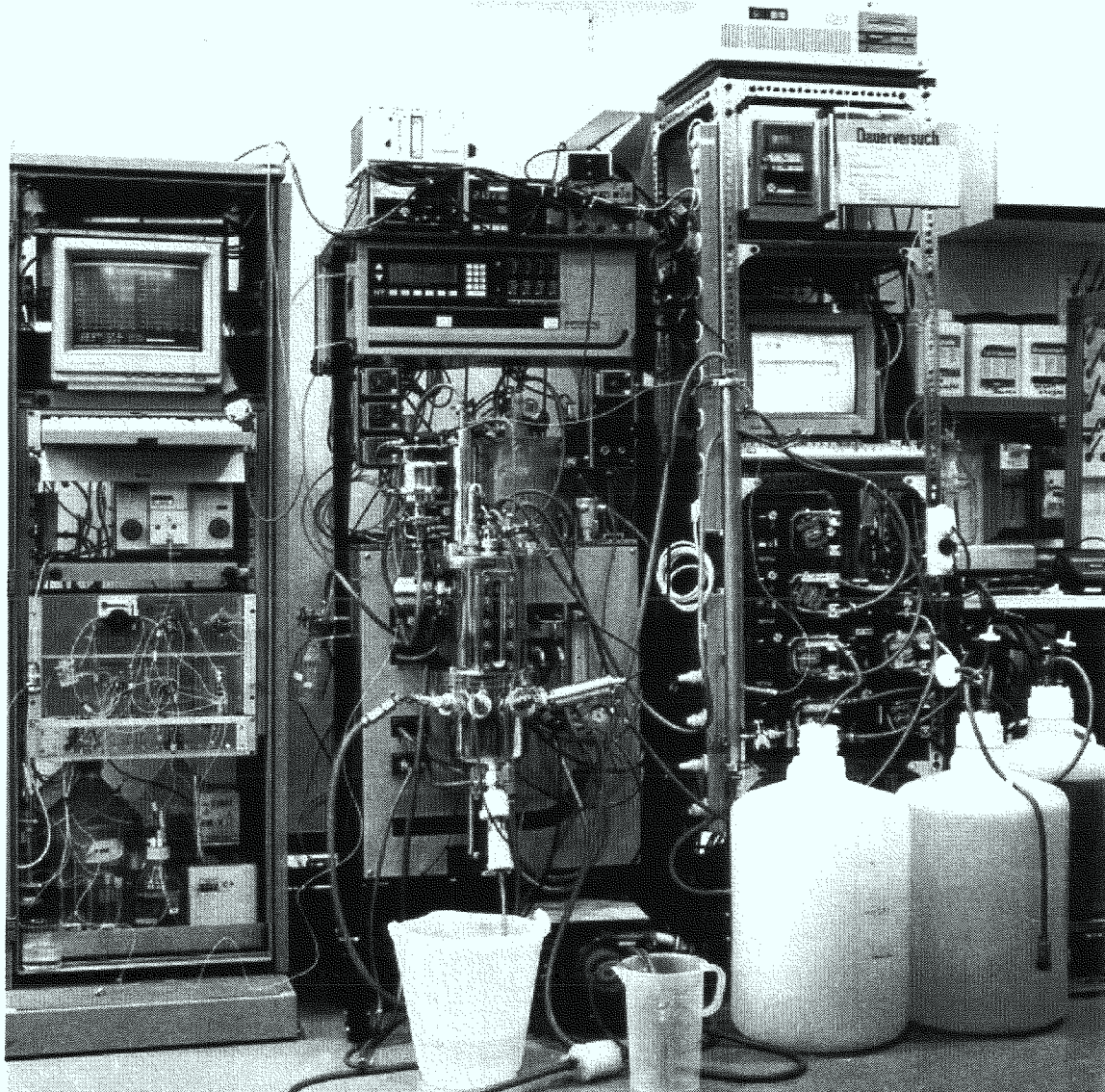


Abbildung A-2. Foto der Diafiltrationsanlage. Der Geräteschrank im linken Bildteil enthält die Fließinjektionsanalytik mit zugehörigem Steuerrechner. In der Mitte befindet sich der Bioreaktor mit der Steuereinheit, darüber die Analysegeräte für die Abgasanalytik. Unter dem Bioreaktor steht die Umlaufpumpe der Filtrationsstrecke. Auf den Regalen im rechten Bildteil sind Dosier- und Nachfüllpumpen, Dosierstrecke und –waagen sowie der Prozeßrechner untergebracht. Vor den Regalen stehen die Vorratsgefäße für das Verdünnungsmedium, die Glucoselösung und das Ablaufgefäß. Das SMP-Interface befindet sich auf einem Wandregal hinter dem Steuerrechner und ist im Bild nicht erkennbar.

Über einen in der Bioreaktorsteuerung enthaltenen PID-Regler wurde über ein im Umlauf installiertes Diafiltrationsmodul (keramisches Rohrmodul, Ceraflow, Millipore, $0,2\ \mu\text{m}$) mit einer inneren Oberfläche von ca. $0,5\ \text{m}^2$, Permeat abgezogen. Über dieses Filtrationsmodul erfolgte auch die kontinuierliche Probenahme für die FIA.

Der Anschluß des Diafiltrationsumlaufs an den Bioreaktor erfolgte über Stutzen, die in zwei gegenüberliegenden Sondeneinschüben des Bioreaktors eingesetzt wurden, der Durchmesser aller Teile des Umlaufs betrug mindestens 8 mm. Das Kulturmedium wurde mit einer Schlauchpumpe (Watson-Marlow 504U, 170 rpm, Watson Marlow, Falmouth Cornwall, Großbritannien) mit einem Durchsatz von $4400\ \text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ durch den Umlauf gepumpt. Bei einem

Gesamtvolumen des Umlaufs von ca. 400 ml ergibt sich daraus eine Verweilzeit des Mediums von 5,5 s im Umlauf ($OUR_{\max} = 110 \text{ mmol}/(\text{l}\cdot\text{h})$). Durch diese niedrige Verweilzeit wurde eine Sauerstofflimitierung der Zellen verhindert.

Die Sterilisation des Bioreaktors wurde wie im vorigen Kapitel beschrieben durchgeführt. Vor der Sterilisation wurden die Anschlüsse für den Diafiltrationsumlauf eingesetzt. Der Diafiltrationsloop wurde durch Durchströmen mit Heißdampf (0,8-0,9 bar, 3 h) sterilisiert und unter sterilen Bedingungen an den Bioreaktor angeschlossen. Die Verschlauchungen der Dosierstrecken wurden autoklaviert und unter sterilen Bedingungen an den Bioreaktor angeschlossen.

A.4.4 Zulaufverfahren

Geregeltes Zulaufverfahren

Für das geregelte Zulaufverfahren im Labormaßstab wurde ein 30 l-Chemap-Bioreaktor (Chemap, Volketswil, Schweiz) mit fest verrohrter Peripherie eingesetzt (Abbildung A-3). Die Sterilisation der Peripherie (Gleitringdichtung, Zuluftstrecke, Abluftstrecke, Transferleitung und Korrekturmittelbehälter) und des Bioreaktors erfolgte über Programme, die in einer speicherprogrammierbaren Steuerung (SPS) fest vorgegeben sind. Die Sterilisation des Bioreaktors erfolgte mit eingebauten Sonden und 15 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$, welches nach der Sterilisation gegen 11 l sterilfiltriertes Vorlagemedium ausgetauscht wurde. Zu den 11 l Vorlagemedium wurden 2,4 l Inokulum (vgl. A.4.1) gegeben.

Ein Steuerschrank übernahm die Meßwertaufnahme und Regelung von pH (7.0), pO_2 (> 30%), Temperatur (30 °C), Druck, Zuluft, Drehzahl und Gewicht. Diese Meßwerte wurden zusammen mit den Meßwerten externer Analysengeräte an den Prozeßrechner weitergeleitet.

Während des Prozesses wurde die Gelöstsauerstoffkonzentration manuell durch Variation von Zuluft, Druck und Rührerdrehzahl auf 30-40 % Luftsättigung reguliert, in den letzten 10 h des Prozesses wurden auch höhere Werte zugelassen. Die Zugabe von Antischaum wurde nicht geregelt, sondern manuell durchgeführt.

Für die sterile, zellfreie Probenahme zur Online-Analytik der Glucosekonzentration wurde ein Cross-flow-Mikrofiltrationsmodul (keramisches Rohrmodul, Ceraflow, Millipore) mit einer inneren Oberfläche von ca. $0,15 \text{ m}^2$ in einem Umlauf integriert. Der Reaktorinhalt wurde mit einer Schlauchpumpe (Watson Marlow 401U, 170 rpm, Falmouth Cornwall, Großbritannien) durch den Umlauf gepumpt. Die Dosierung des Zulaufmediums erfolgte mit einer Dosierstrecke YFC01Z (Sartorius, Göttingen, Deutschland) durch Ansteuerung einer Dosierpumpe (Watson Marlow 101 U, 50 rpm, Falmouth Cornwall, Großbritannien) und einer Nachfüllpumpe (Watson Marlow 401 U, 170 rpm, Falmouth Cornwall, Großbritannien).

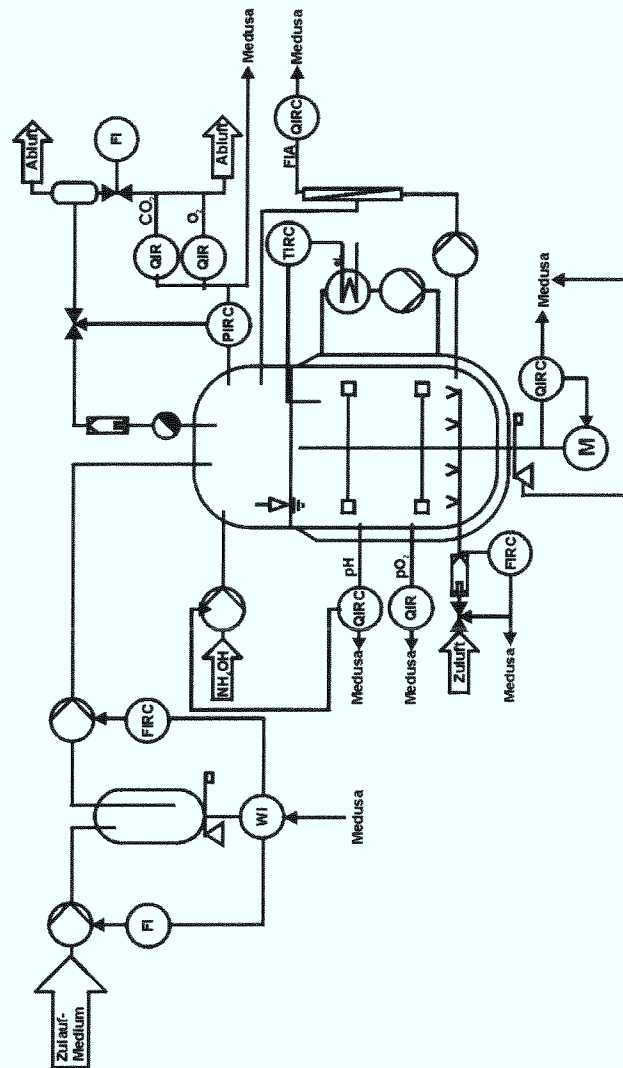


Abbildung A-3. Anlagenschema des Zulaufverfahrens bei der L-Isoleucin-Herstellung im 30 l Bioreaktor (mit Substrat-Regelung) und 7,5 l Bioreaktor (ohne Substrat-Regelung). Alle Daten werden mit einer Abtastzeit von 5 min durch das Datenerfassungsprogramm „Medusa“ aufgenommen. Die Übertragung der mittels FIA *on-line* gemessenen Glukosekonzentration erfolgt jeweils nach Ablauf eines Meßzyklus.

Zulaufverfahren mit Dosierprofil

Für die Versuche im Zulaufverfahren mit Dosierprofil im 7,5l-Bioreaktor entsprachen Aufbau und Vorgehensweise den Versuchen im geregelten Zulaufverfahren (Abbildung A-3) ohne Verwendung der *on-line* Analytik und Regelung mit „*closed-loop-control*“. In diesem Verfahren wurde über eine Sartorius-Dosierstrecke (YFC01Z, Sartorius, Göttingen, Deutschland) ein fest vorgegebenes Feedprofil („Medusa“) in den Bioreaktor dosiert. Die Dosierstrecke steuert die Pumpe so an, daß aus einer gewogenen Flasche ein vorgegebener Massestrom gefördert wird, und füllt durch eine zweite Pumpe die Dosierflasche bei Unterschreitung eines Mindestgewichtes automatisch nach.

Das benutzte Dosierprofil entspricht

$$Pumprate_t = V_R \cdot (-3,39 \cdot 10^{-5} + 14,89 \cdot e^{t/9,05})$$

Gleichung 25

A.5 On-line-Analytik

A.5.1 CO₂ und O₂ im Abgas

Für die Abgasanalytik wurde ein Teil des Abluftstromes nach dem Sterilfilter durch einen Abgaskühler mit integriertem Kondensatabscheider (Firma M&C Products GmbH, Ratingen, Deutschland) geleitet. Anschließend wurde die CO₂-Konzentration im Abgas mittels eines Binos 1.1 (Firma Leybold-Hereaus, Hanau, Deutschland) bestimmt, die O₂-Konzentration mit einem Oxykos 100 (Firma Rosemount, Hanau, Deutschland). Der Gasstrom durch die in Serie geschalteten Geräte wurde durch eine nachgeschaltete Membranpumpe und ein vorgeschaltetes Handventil bei 1 l·min⁻¹ konstant gehalten. Die Analysengeräte wurden vor jedem Versuch mit definierten Gasgemischen geeicht.

A.5.2 pO₂

Die Messung des Sauerstoff-Partialdrucks (pO₂) erfolgte amperometrisch mit einer pO₂-Elektrode (Firma Ingold/Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland). Der Nullpunkt der Elektrode wurde während der Sterilisation bei 1,2 bar Überdruck und 122 °C (30 l-Chemap-Bioreaktor), bzw. bei 30 °C, 500 rpm, 0,5 bar Überdruck und einem Begasungsvolumenstrom von 1 vvm mit reinem Stickstoff, eingestellt (7,5 l-Infors-Bioreaktor). Die 100 % Einstellung erfolgte bei 0,5 bar Überdruck, 30 °C, 500 rpm und 1 vvm Belüftung mit Raumluft (Preßluft). Bei Versuchen im Diafiltrationsverfahren wurde die Eichung bei angeschlossenem Umlauf und laufender Pumpe durchgeführt.

A.5.3 pH-Wert

Die Messung bzw. Regelung des pH-Wertes erfolgte mit einer gelstabilisierten Meßkette (Firma Broadley James, Santa Anna Ca., USA) oder einer Einstab Meßzelle mit zwei Elektrolytkammern vom Typ In Trac 776 (Ingold/Mettler-Toledo, Gießen, D).

A.5.4 Glucosebestimmung im Prozeßmedium

Zur Analyse des Prozeßmediums wurde eine am Institut für Biotechnologie 2 des Forschungszentrums Jülich entwickelte enzymatische Fließ-Injektion-Analyse (FIA) eingesetzt (Joks, 1996). Die Glucose wird anhand der enzymatischen Oxidation von β -D-Glucose durch Glucose-Dehydrogenase (EC 1.1.1.118) zu D-Gluconolacton bei gleichzeitiger Reduktion von NAD⁺ zu NADH₂ bestimmt. Durch die spontane irreversible Hydrolyse des Lactons zu Gluconat wird das Gleichgewicht der Reaktion auf die Produktseite verschoben, und die Glucose wird quantitativ umgesetzt. Die Glucose-Dehydrogenase ist zusammen mit Mutarotase (EC 5.1.3.3) auf derivatisiertem Sinterglas mit Glutaraldehyd immobilisiert. Die Mutarotase bewirkt eine beschleunigte Rotation von α -D-Glucose zu β -D-Glucose.

Die zellfreie Probe aus dem Bioreaktor wird in einen Pufferstrom injiziert und durchläuft gleichzeitig mit einem zweiten Pufferstrom, der ein NAD⁺-Segment enthält, eine Dialysezelle. Die Glucose diffundiert durch die Dialysemembran in das NAD⁺-Segment und wird durch einen Festbettreaktor mit immobilisierten Enzymen transportiert, in dem die Reaktion stattfindet. Anschließend erfolgt die

Detektion des NADH_2 in einem Fluoreszenzdetektor mit Durchflußküvette. Die Steuerung aller Hardware-Komponenten wird mit dem Programm FIASKO (Forschungszentrum Jülich GmbH, IBT 2) konfiguriert. Die aus dem Detektorsignal berechneten Analysenergebnisse werden über eine RS232-Schnittstelle an den Prozeßrechner übertragen. Vor jeder Übertragung wird ein Analogsignal an den Prozeßrechner übermittelt, damit dort andere serielle Kommunikationen unterbunden werden und der Empfang des FIA Signals abgewartet werden kann. Die Totzeit des Analysensystems liegt zwischen 4 und 8 min und ist stark abhängig vom Totvolumen des Mikrofiltrationsmoduls im Reaktorumlauf, dem Strömungsverhalten im Enzymreaktor und den Geschwindigkeiten der Pufferströme. Nach der Kalibrierung mit Eichlösungen bleibt die Messung für den gesamten Prozeßverlauf stabil.

A.6 Datenerfassung und Prozeßregulation

Die Datenerfassung in allen durchgeführten Experimenten erfolgte durch einen Prozeßrechner mit dem Programm Medusa 2.0 (Forschungszentrum Jülich GmbH, IBT 2). Alle von der Steuereinheit des Bioreaktors erfaßten Daten (Temperatur, Drehzahl, pH, pO_2 , Zuluft, Druck und Gewicht) wurden über serielle Schnittstellen digital in den Prozeßrechner eingelesen (7,5 l-Infors-Bioreaktor). Für die Erfassung analoger Signale (30 l-Chemap-Bioreaktor) der Chemap-Steuerschränke (Temperatur, Druck, Drehzahl, Zuluft, pO_2 , pH und Gewicht) und der externer Analysengeräte (Abgas- O_2/CO_2 und Waagen der Dosierstrecke) wurde jeweils ein Analogeingang am SMP-Interface (Siemens AG, Karlsruhe, D) des Prozeßrechners konfiguriert.

Die Regulation aller Prozeßvariablen im Bioreaktor erfolgte über in die Meß- und Regeleinheit des Bioreaktors eingebaute PID-Regler mit Ausnahme der Sauerstoffsättigung, die manuell durch Veränderung von Druck, Drehzahl und Zuluft geregelt wurde.

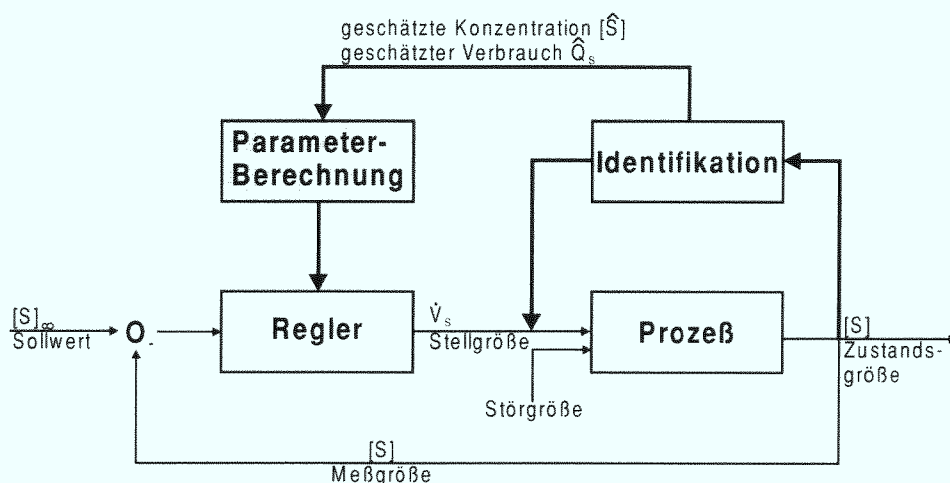


Abbildung A-4. Schema des modellgestützten, adaptiven Regelkonzeptes zur Substratregelung in Prozessen (Weuster-Botz *et al.*, 1994). Basierend auf einem einfachen Prozeßmodell werden mit der totzeitbehafteten Meßgröße $[S]$ (Substratkonzentration) und der Stellgröße $\dot{V}_S$ (Pumprate) die geglätteten, aktuellen Zustandsgrößen geschätzt ($[\hat{S}]$ und $\hat{Q}_S$). Mit dieser Information werden die Reglerparameter der Prozeßdynamik angepaßt.

Für die Substratregelung im geschlossenen Regelkreis wird in Medusa die serielle Kommunikation mit der Substratanalytik (FIA) und mit dem Stellglied (Dosierstrecke) individuell konfiguriert. Für die Regelung verrauschter, diskreter und totzeitbehafteter Zustandsgrößen bei nicht linearem Verhalten der Regelstrecke ist in Medusa ein modellgestütztes, parameteradaptives Regelkonzept implementiert (Striegel, 1993). Das Prinzip dieses Regelungskonzeptes ist in Abbildung A-4 dargestellt. Es wird dabei zu der in der Regelungstechnik üblichen Nomenklatur gewechselt (Vektoren als Großbuchstaben und Differenzen der Vektoren als Kleinbuchstaben), die ausschließlich in diesem Abschnitt verwendet wird und nicht im Formelverzeichnis aufgeführt ist. Die Echtzeitbestimmung der Prozeßvariablen $[\hat{S}]$ und $\hat{Q}_S$ erfolgt mit einem erweiterten, semikontinuierlichen Kalmanfilter (Wiechert, 1991). Der Kalman-Filter minimiert die Varianz des Schätzfehlers aller geschätzten Größen bei Eintreffen eines diskreten, totzeitbehafteten Analysenwertes. Die Bestimmung der Glucosekonzentration und des Glucoseverbrauchs zur nächsten Abtastzeit erfolgt durch die Lösung der Differentialgleichungen eines Prozeßmodells (Gleichung 25 bis 27) und der Meßwertgleichung 28 zur nächsten Abtastzeit.

$$\frac{d[\hat{S}]_R}{dt} = \frac{\dot{V}_{in} \cdot ([S]_{in} - [S]_R)}{V_R} + \hat{r}_S + g_1$$

Gleichung 26

$$\frac{d\hat{r}_S}{dt} = \hat{c} + g_2$$

Gleichung 27

$$\frac{dc}{dt} = \hat{c} \cdot \frac{\dot{V}_{in}}{V_R} + g_3$$

Gleichung 28

$$[S]_m = [S]_R + g_4$$

Gleichung 29

Die Änderung der geschätzten Substratkonzentration $[\hat{S}]$ über die Zeit in Gleichung 25 ergibt sich aus dem zudosierten Substratvolumenstrom und der geschätzten Substratverbrauchsrate ($\hat{r}$). Der stochastische Anteil g_1 berücksichtigt das Meßrauschen. Um eine exponentielle Veränderung der Verbrauchsrate zu erfassen, wird die Zeitabhängigkeit der geschätzten Verbrauchsrate durch zwei weitere Differentialgleichungen (Gleichungen 26 und 27) berücksichtigt, die ebenfalls stochastische Terme (g_2 und g_3) beinhalten. Die Meßwertgleichung berücksichtigt das Meßrauschen mit dem stochastischen Anteil g_4 . Die Änderung von $\hat{c}$ hängt nach einem Vorschlag von Stephanopoulos und San (1984) von der Zeitkonstante des Zulaufverfahrens ($\dot{V}_{in}/V_R$) ab. Die Lösung von Gleichung 26 macht deutlich, daß ein exponentieller Verlauf von $\hat{c}$ berücksichtigt wird:

$$\hat{c} = \exp\left(\frac{\dot{V}_{in}}{V_R} \cdot t\right) + const.$$

Gleichung 30

Die geschätzte Substratkonzentration und der geschätzte Substratverbrauch zur nächsten Abtastzeit werden dem Minimal-Varianz-Regler (Striegel, 1993) übermittelt, der daraufhin die Stellgröße verändert, um die Einhaltung des Konzentrations-Sollwertes zu gewährleisten. Dazu wird eine Funktion $F_{(t+1)}$ minimiert, welche die Abweichung der geschätzten Glucosekonzentration zur nächsten Abtastzeit vom Sollwert ($s_{(t+1)}$) und die Abweichung der aktuellen Pumprate vom Arbeitspunkt ($\dot{V}_{(t)}$) beinhaltet:

$$F_{(t+1)} = \{s_{(t+1)}^2 + u \cdot \dot{v}_{(t)}^2\}$$

Gleichung 31

$s = ([S] - [S]_{\infty}) = \text{Regelgrößenabweichung}$

$\dot{v} = (\dot{V} - \dot{V}_{\infty}) = \text{Stellgrößenabweichung}$

$u = \text{Gewichtungsfaktor}$

Es ist zu beachten, daß der Regler somit nicht die aktuelle, sondern die zu erwartende Regelgrößenabweichung in das Gütekriterium einbezieht. Der Arbeitspunkt der Stellgröße entspricht dem Wert, bei dem sich unter stationären Bedingungen automatisch der Sollwert der Substratkonzentration einstellen würde. Da dieser Wert im Zulaufverfahren nicht konstant ist, wird näherungsweise ein Mittelwert der letzten Stellgrößen als Gleichwert genommen. Der Gewichtungsfaktor (u) bestimmt, wie schnell die Stellgröße an den Gleichwert herangeführt wird. Bei $u > 1$ wird die Stellgröße weitgehend an den Gleichwert angepaßt, bei $u < 1$ wird eine größere Stellgrößenabweichung akzeptiert und die Regelgrößenabweichung minimiert.

Für die individuelle Konfiguration des Reglers steht in Medusa eine Benutzeroberfläche zur Verfügung, die die Eingabe aller relevanten Parameter ermöglicht. Für die Regelung der Glucosekonzentration im Zulaufverfahren werden folgende Parametereinstellungen vorgenommen:

Rauschanteil g_1 :	0,5 absolut	20 %	Relativ
Rauschanteil g_2 :	0,5 absolut	10 %	Relativ
Rauschanteil g_3 :	0,5 absolut	5 %	Relativ
Meßrauschen g_4 :	0,5 absolut	5 %	Relativ
Gewichtung u :	1		
Gleichwert $\dot{V}_{\infty}$:	Mittelwert aus den letzten 5-10 Stellgrößen		

A.7 Off-line-Analytik

A.7.1 Biotrockenmasse (optische Dichte)

Zur Messung der Biotrockenmasse wurde ein Aliquot (1-3 ml) der Bioreaktorinhalt mit einer Injektionspritze durch ein getrocknetes und vorgewogenes Spritzenfilter (Porengröße 0.2 μm) gedrückt. Nach Trocknung im Trockenschrank (> 48 h) wurden die Spritzenfilter ausgewogen. Die optische Dichte der Bioreaktorinhalt wurde nach geeigneter Verdünnung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ in einem Shimadzu UV-160 Zweistrahl-Spektrophotometer bei $\lambda = 600 \text{ nm}$ gegen Wasser gemessen. Der Korrelationsfaktor zwischen Biotrockenmasse und OD_{600} beträgt mit nur geringen Schwankungen 0,25.

A.7.2 Aminosäuren und Ammonium

Aminosäuren und Ammonium werden mittels *Reversed-Phase*-HPLC (Firma Sykam, Gilching, Deutschland) gemessen. Nach der Derivatisierung mit ortho-Phthaldialdehyd und Mercaptoethanol werden die Analyte auf eine Säule der Firma Merck (Lichrospher 100 RP 18-5, Länge: 125 mm, Durchmesser: 4 mm, Porengröße 100 Å) getrennt und fluorimetrisch gemessen (Ex.: 330 nm, Em.:

450 nm, Shimadzu RF-535, Duisburg, Deutschland). Die Elution erfolgt mit einem Gradienten der beiden Puffer A und B bei 40 °C.

Elutionspuffer A: 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,2)
0,5 % Tetrahydrofuran

Elutionspuffer B: 50 % 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,2)
35 % Methanol
15 % Acetonitril

Die Vorbereitung der Proben wurde wie folgt durchgeführt: von 1000 µl Bioreaktorinhalt wurden die Zellen abzentrifugiert (13.000 rpm). Der zellfreie Überstand wurde bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C eingefroren. Vor der Messung wurden eventuell noch in der Probe vorhandene Proteine mit Trichloressigsäure ausgefällt. Nach Neutralisierung der Probe mit 4 N NaOH wurde die Probe entsprechend dem zu erwartenden Konzentrationsbereich verdünnt.

A.7.3 Organische Säuren

Organische Säuren (α -Ketoglutarat, Keto-Methylvalerat, Lactat, Pyruvat, Acetat, Fumarat und Citrat) werden mittels Ionenausschluß-HPLC aufgetrennt und photometrisch ($\lambda = 215$ nm) mit einem UV-Detektor (S3300 Sykam, Gilching, Deutschland) gemessen. Die Trennung erfolgt auf einer Säule der Firma BioRad (München, Deutschland) (Aminex HPX-87H, Länge = 300 mm, Durchmesser = 7,8 mm). Eluiert wird isokratisch mit 0,2 N H₂SO₄ bei 40 °C. Gemessen wurde aus dem nicht weiter behandelten, verdünnten Zentrifugationsüberstand (A.7.2).

A.7.4 Glucosekonzentration

Die off-line Analyse der Glucose im Medium erfolgt durch einen enzymatischen Test mit Hexokinase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und beruht auf der Reduktion von NAD zu NADH₂ unter ATP-Verbrauch. Die Analyse wird mit Hilfe eines Biomek[®] 2000 (Beckmann Instruments, München, Deutschland) Laborroboters in 96-Well-Mikrotiterplatten vorbereitet. Die Extinktion des gebildeten NADH₂ wird mit einem Thermo_{max} Mikrotiterplattenphotometer (Firma Molecular Devices, Sunnyvale Ca., USA) gemessen.

A.7.5 ATP-Gehalt der Zellen

Die Lichtemission bei Umsatz von ATP durch das Luciferin/Luciferase-System bildet die Grundlage des Nachweises des Adeninnukleotid ATP (modifiziert nach Lundin *et al.*, 1976; Schimz *et al.*, 1981):



Der verwendete Luciferin/Luciferase-Rohextrakt liefert keine zeitlich konstante Lichtemission wie hochgereinigte Extrakte, so daß statt der Emissionsrate die Lichtemission während der ersten 20

Sekunden nach Start der Reaktion bestimmt wird. Die Proportionalität dieses Meßwertes zum ATP-Gehalt der Probe wird mit Hilfe von ATP-Standards überprüft.

Extraktion und Probenvorbereitung

Zur Bestimmung des internen ATP-Gehaltes der Biomasse wurden unmittelbar nach der Probenahme 50 µl Probe zum Aufschluß der Zellen in 350 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) pipettiert, gevortext und für ca. 5 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden 1600 µl eiskaltes H₂O_{bidest.} zugegeben. Die so aufgearbeitete Probe wurde bis zur Messung bei –20 °C aufbewahrt.

Durchführung der Messung

Der Inhalt einer Flasche (50 mg Lyophilisat *Firefly Lantern Extract*, Sigma) des Extraktes wurde in 20 ml des folgenden Puffers gelöst:

Tris-H ₂ SO ₄	50 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,5 mM
K ₂ SO ₄	2,5 mM
EDTA	0,6 mM
H ₂ SO ₄	Ad pH 7,4

Die unlöslichen Bestandteile des Extraktes wurden durch Zentrifugation entfernt. Die Analyse wurde durchgeführt in einem Lumat LB 9507 Luminometer (Firma EG & G Berthold, Bad Wildbad, Deutschland), bei einer Meßzeit von 20 s nach Start der Reaktion und einem Proben- bzw. Reagenzvolumen von jeweils 100 µl. Die Messung erfolgte durch Zählung der emittierten Lichtquanten bei der Reaktion des vorliegenden ATPs mit Luciferin/Luciferase Suspension.

A.7.6 Membranpotential der Zelle

Zur Ermittlung des elektrischen Potentials über die Cytoplasmamembran von *C. glutamicum* wurde das lipophile Kation TPP⁺ ([¹⁴C]-Tetraphenylphosphoniumbromid) als Sonde eingesetzt (Rottenberg, 1979; Kashket, 1985). Diese Sonde vermag die Cytoplasmamembran von Zellen zu durchdringen und wird in Anwesenheit eines elektrischen Potentials über dieser Membran (innen negativ) aufgrund seiner positiven Ladung im Innern der Zellen akkumuliert. Im Gleichgewicht entspricht das chemische Potential der Sonde dem elektrischen Potential über der Membran, und letzteres kann mit Hilfe der experimentell bestimmbaren intra- und extrazellulären Sondenkonzentration berechnet (Gleichung 31) werden.

$$\Delta\Psi = -2,303 \cdot R \cdot T \cdot \log \frac{[TPP_{in}^{+}]}{[TPP_{ex}^{+}]} \quad \text{Gleichung 32}$$

Voraussetzung für eine genaue Bestimmung des Membranpotentials ist der Einsatz der Sonde in sehr niedriger Konzentration, so daß der Abbau des zu messenden Membranpotentials durch die Äquilibration der Sonde vernachlässigbar gering ist. Diese Voraussetzung wurde erfüllt, indem

radioaktiv markiertes TPP^+ mit hoher spezifischer Aktivität verwendet wurde. Die Bestimmung der intra- und extrazellulären TPP^+ -Konzentrationen erfolgte dann über Szintillationszählung.

Sein lipophiler Charakter ist dafür verantwortlich, daß TPP^+ stark an Membranen bindet. Durch Messung der Menge zellassozierten TPP^+ s wird daher die intrazelluläre TPP^+ -Konzentration überschätzt. Eine Korrektur des TPP^+ -Meßwertes wurde durch Vergleich von $\Delta\Psi$ -Messungen mit TPP^+ und Rubidium-86 als Sonden vorgenommen. Rubidium, das von vielen Kaliumtransportsystemen und -ionophoren als Substrat akzeptiert wird, zeigt keine Bindung an zelluläre Strukturen. Es vermag analog zu TPP^+ , ein Membranpotential anzuzeigen, wenn die Membran zuvor durch Einbau von Valinomycin für Kalium und Rubidium permeabel gemacht wurde. Potentiale unterschiedlicher Größe wurden in Anwesenheit von Valinomycin durch Variation der externen Kaliumkonzentrationen vorgegeben (Kaliumdiffusionspotentiale) und dann mit beiden Sonden bestimmt. Die erhaltene Eichkurve diente der Korrektur der TPP^+ -Meßwerte. Im Bereich niedriger Meßwerte weist die $\Delta\Psi$ -Messung generell einen großen methodischen Fehler auf. Stark erniedrigte Meßwerte wurden daher als ≥ -50 mV angegeben.

A.7.7 Bestimmung des Cytoplasmavolumens

Zur Bestimmung des cytoplasmatischen Volumens wurden die internen und externen Konzentrationen einer permeablen Substanz ($^3\text{H}_2\text{O}$) und einer nicht permeablen Substanz (Inulin- ^{14}C -carboxylsäure) gemessen (Rottenberg, 1979). Die permeable Sonde zeigt das Gesamtvolumen, die nicht permeable das externe Volumen an. Das intrazelluläre Volumen ergibt sich aus der Differenz dieser beide Volumina. Nach Inkubation (1 min) einer Zellsuspension (500 μl , ca. OD 5) mit beiden radioaktiv markierten Sonden wurde eine Silikonölzentrifugation (5 Proben à 100 μl) durchgeführt. Die Volumenaktivität der Sonden im Reaktionsansatz betrug ca. 100 KBq/ml für $^3\text{H}_2\text{O}$ und 25 KBq/ml für Inulin- ^{14}C -carboxylsäure. Die Radioaktivität der beiden Isotope (in den Überständen und Sedimenten) wurde in einem Flüssig-Szintillationszähler (Rackbeta 1214, LKB) bestimmt. Aus der Differenz des „ H_2O -Raumes“ und des „Inulin-Raumes“ ergab sich das cytoplasmatische Volumen. Unter den verwendeten Meßbedingungen wurde für *C. glutamicum* ein intrazelluläres Volumen von $1,8 \mu\text{l} \cdot \text{mg}_{\text{BTM}}^{-1}$ gefunden. Dieser Wert wurde für alle Berechnungen verwendet.

A.8 Berechnung differentieller Größen

Die Ermittlung aller differentiellen Größen erfolgte anhand der online und offline ermittelten Konzentrationen der zu bilanzierenden Stoffe. Soweit möglich wurden die diskreten offline-Daten durch nichtlineare Regression interpoliert, so daß sie mit den Werten der online-Messungen verrechnet werden konnten. Dazu wurden an die Meßwerte ein oder mehrere sigmoidale Funktionsansätze der Form

$$y = \frac{A_1 + A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2 \quad (\text{Boltzman-Funktion})$$

Gleichung 33

durch Minimierung der Fehlerquadratsumme angenähert. Die entsprechende Funktion wurde direkt in die Bilanzgleichungen eingesetzt. In den Fällen, wo für die Glucosekonzentration sowohl online-

als auch offline-Daten ermittelt wurden, wurden die anhand der präziseren offline-Messung korrigierten online-Daten zur Berechnung herangezogen. Verrauschte Daten wurden durch gleitende Durchschnittsbildung geglättet.

Bei der Auswertung der Verdünnungsexperimente war es teilweise nicht möglich, die Konzentrationsverläufe durch eine Funktion in der oben genannten Form hinreichend genau zu beschreiben. Hier mußte deshalb direkt mit den geglätteten offline-Daten gerechnet werden. Die Anpassung der offline-Daten an die Boltzman Funktion wurde mit dem Software-Programm Microcal Origin 4.0/5.0 (Microcal Software, Inc., USA) durchgeführt.

A.9 Fehlerberechnung

Um eine signifikante Aussage bezüglich des Verlaufs bestimmter differentieller Prozeßgrößen im Ansatzweise-Verfahren zu machen, sollte eine Fehlerberechnung durchgeführt werden. Für die Bestimmung der Biomasse- und L-Isoleucin-Konzentration wurde ein Fehler von 10 bzw. 5 % angenommen. Der Fehler der Anpassung der Boltzman-Funktion an diese Meßwerte wird durch das Software-Programm Origin berechnet. Anhand dieser Daten ist es möglich, eine Fehlerberechnung der differentiellen Prozeßgrößen durchzuführen.

Eine spezifisches Problem bei dieser Art der Fehlerberechnung ist es, eine analytische Lösung zu finden, wenn zwei Stochasten dividiert werden. Besonders da, wo der Fehler des Nenner viel größer ist als der Nenner selbst (Vertrauensintervall geht nach + oder – unendlich). Deshalb ist in dieser Arbeit eine numerische Approximation via Monte Carlo Simulation durchgeführt worden.

A.9.1 Theorie der Monte Carlo Simulation

Die Berechnung der biomassespezifischen Wachstumsrate (μ) mit Gleichung 13 (Theorie, Seite 21) kann auch wie folgt beschrieben werden,

$$\mu = f(\bar{\Theta}_X, t) \quad \text{Gleichung 34}$$

wobei t die Zeit (h) ist und Vektor $\bar{\Theta}_X = (A1, A2, x_0, dx)$ das Ergebnis der Anpassung der Boltzman-Funktion (Gleichung 32) an die Meßergebnisse der Biomassekonzentration ist. Für die Berechnung der biomassespezifischen L-Isoleucin-Produktbildungsrate mit Hilfe von Gleichung 15 (Theorie, Seite 23) gilt,

$$\pi_{lle} = f(\bar{\Theta}_X, \bar{\Theta}_P, t) \quad \text{Gleichung 35}$$

wobei Vektor $\bar{\Theta}_P = (A1, A2, x_0, dx)$ das Ergebnis der Anpassung der Boltzman-Funktion an die Meßergebnisse der L-Isoleucin-Konzentration ist.

Für beide Prozeßgrößen gilt generell,

$$y = f(\bar{\Theta}_X, \bar{\Theta}_P) + \Sigma(\sim \text{Rauschen}) \quad \text{Gleichung 36}$$

$$\hat{E}_y = f(\bar{\Theta}_X, \bar{\Theta}_P) \quad \text{Gleichung 37}$$

$$\sigma_{\hat{E}_y}^2 = f(\sigma_X^2, \sigma_P^2) \quad \text{Gleichung 38}$$

Das geschätzte Ergebnis $\hat{E}_y$ und die Varianz $\sigma_{E_y}^2$ werden bestimmt aus einer Reihe von Beobachtungen von E , die generiert werden durch mehrere Ziehungen (n) für Vektor $\bar{\Theta}_x$ und $\bar{\Theta}_p$ aus einer bestimmten Verteilung, die die Varianz und Kovarianz von $\bar{\Theta}_x$ und $\bar{\Theta}_p$ als Basis hat. Die verschiedenen Beobachtungen (n) für E werden berechnet mit Hilfe der Gleichung 35. Die statistische Verteilung $\sigma_{E_y}^2$ wird bestimmt aus den verschiedenen Beobachtungen (n) für E .

Um dies zu erreichen, wird eine Monte Carlo Simulation durchgeführt. Mit Hilfe eines Zufallsgenerators wird für $\bar{\Theta}_x$ und $\bar{\Theta}_p$ ein Satz von 4 Werten (A_1 , A_2 , x_0 und dx) generiert (Vektor $\bar{x}$). Mit Hilfe einer Transformation werden diese Sätze (n) umgewandelt in Beobachtungen (n) mit der statistische Verteilung von $\bar{\Theta}_x$ und $\bar{\Theta}_p$. Es gilt

$$\bar{\Theta}_{x,p} = \bar{\bar{\Theta}}_{x,p} + A \cdot \bar{x}$$

Gleichung 39

wobei Vektor $\bar{x}$ einer Standard-Normal-Verteilung unterliegt und Vektor $\bar{\bar{\Theta}}_{x,p}$ die Parameter der Anpassung der Boltzman-Funktion für Biomasse und L-Isoleucin an die Meßergebnisse darstellt.

Matrix A wird aus der Kovarianz-Matrix von $\bar{\bar{\Theta}}_{x,p}$ bestimmt und ändert durch lineare Transformation die Verteilung von $\bar{x}$.

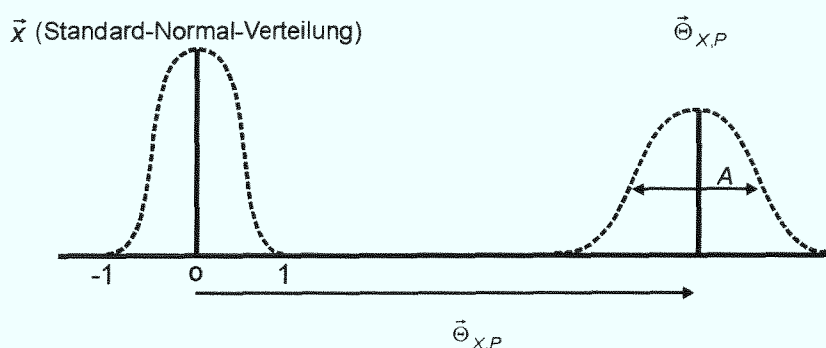


Abbildung A-5. Die Transformation des Vektors $\bar{x}$ (Standard-Normal-Verteilung) in Vektor $\bar{\Theta}_{x,p}$.

Gleichung 36 wird benutzt, um eine Beobachtung für E zu bestimmen. Die Verteilung von E ist im Prinzip abhängig von der Verteilung des Zufallsgenerators und der Propagation durch die Transformation und Funktion f .

A.9.2 Monte Carlo Simulation in Matlab

Zur Fehlerberechnung der biomassespezifischen differentiellen Prozeßgrößen wurde ein Programm für das Software-Paket Matlab geschrieben. Dies berücksichtigt die zuvor beschriebene Monte Carlo Theorie. Der Programmcode sieht wie folgt aus:

```
% yest ist ein Vektor mit Parametern (A1, A2, X0 und dX) der Anpassung der offline Biomasse-Konzentration
% Daten an der Boltzman-Funktion durchgeführt mit dem Software-Programm Microcal Origin 5.0.
% Sy ist die entsprechende Kovarianz-Matrix dieser Anpassung.
```

```
Sy=[
```

```
sigma^2_A1    sigma_A1,A2    sigma_A1,x0    sigma_A1,dx ;...
```

```

 $\sigma_{A_2,A_1}$     $\sigma_{A_2}^2$     $\sigma_{A_2,x_0}$     $\sigma_{A_2,dx}; \dots$ 
 $\sigma_{x_0,A_1}$     $\sigma_{x_0,A_2}$     $\sigma_{x_0}^2$        $\sigma_{x_0,dx}; \dots$ 
 $\sigma_{dx,A_1}$     $\sigma_{dx,A_2}$     $\sigma_{dx,x_0}$     $\sigma_{dx}^2; \dots$ 
];
yest =[A1; A2; X0; dX];

```

% **yest** ist ein Vektor mit Parametern (A₁, A₂, X₀ und dX) der Anpassung der offline L-Isoleucin-Konzentration
 % Daten an der Boltzman-Funktion durchgeführt mit dem Software-Programm Microcal Origin 5.0.
 % **Sy** ist die entsprechende Covarianz-Matrix dieser Anpassung.

```

Syy=[
 $\sigma_{A_1}^2$        $\sigma_{A_1,A_2}$     $\sigma_{A_1,x_0}$     $\sigma_{A_1,dx}$ 
 $\sigma_{A_2,A_1}$     $\sigma_{A_2}^2$        $\sigma_{A_2,x_0}$     $\sigma_{A_2,dx}$ 
 $\sigma_{x_0,A_1}$     $\sigma_{x_0,A_2}$     $\sigma_{x_0}^2$       $\sigma_{x_0,dx}$ 
 $\sigma_{dx,A_1}$     $\sigma_{dx,A_2}$     $\sigma_{dx,x_0}$     $\sigma_{dx}^2$ 
];
yyest =[ A1; A2; X0; dX];

```

% x ist ein Skalar von Zufallszahlen der Standard-Normal-Verteilung.
 % y wird bestimmt aus x (Zufallszahlen) wobei yest (Durchschnitt) und Sy (Covarianz-Matrix) als
 % statistische Basis dient für y:
 % $y = yest + A \cdot x$
 % so daß: $Sy = A \cdot A'$
 % Genauso für yy:
 % $yy = yyest + AA \cdot xx$
 % $Syy = AA \cdot AA'$
 % Bestimme Matrix A mit Hilfe einer Eigenwert Dekomposition: $Sy = C \cdot K$ (K ist eine Diagonal-Matrix und C ist
 % eine Matrix mit den Eigenvektoren) und
 % $Syy = CC \cdot KK$

```

[C,K]=eig(Sy);
A=C*diag(sqrt(diag(K)));
[CC,KK]=eig(Syy);
AA=CC*diag(sqrt(diag(KK)));

```

% Die generierten Zufallswerte y werden kontrolliert bezüglich deren Verteilung. Dazu wird die
 % Covarianz berechnet von n Datensätzen des Vektors y (Parameter der Boltzman-Funktion für
 % Biomasse-Konzentration) und yy (Parameter der Boltzman-Funktion für L-Isoleucin-
 % Konzentration) und verglichen mit der eingesetzten Covarianz-Matrix Sy (Biomasse) und Syy (L-
 % Isoleucin).
 % n Datensätze der Vektoren y (Biomasse) und yy (L-Isoleucin) werden generiert mit Hilfe einer
 % Schleife.
 % Anfang der Schleife:

```

n=10000;
Y=zeros(4,n); % Zusätzliche Matrizen Y und YY um die Covarianz-Matrizen der generierten
YY=zeros(4,n); % Vektoren y und yy zu kontrollieren
tsteps=60; % Achtung: die Vektoren haben auch t=0, deshalb tsteps+1
ttot=60;
tstepsize=0.5;

```

```

Cp=zeros(n,tsteps+1); % Matrix für simulierte L-Isoleucin-Konzentrationen
Cx=zeros(n,tsteps+1); % Matrix für simulierte Biomasse-Konzentrationen
mu=zeros(n,tsteps+1); % Matrix für simulierte Wachstumsraten
time=zeros(1,tsteps+1); % Matrix für simulierte Zeit
for i=1:tsteps+1
    time(i)=(i-1)*tstepsize; % generiert Werte für Zeit (Stunden).
end
for i=1:n
    x=randn(4,1);
    y=yest+A*x;
    Y(:,i)=y(:,1);
    xx=randn(4,1); % Es wird angenommen das x (y) unabhängig ist von xx (yy).
    yy=yest+AA*xx;
    YY(:,i)=yy(:,1);
    %  $C_x(t) = A_2 + (A_1 - A_2) / (1 + \exp((t - x_0)/dx)) = A_2 + (A_1 - A_2) / (1 + z_x)$ 
    % und  $z_x(t) = \exp((t - x_0)/dx)$ 
    %  $dC_x/dt = (A_2 - A_1) * z_x / (dx * (1 + z_x)^2)$ 
    %  $\mu = (1/C_x) * (dC_x/dt)$ 
    % dabei ist  $y = [A_1 \ A_2 \ x_0 \ dx]$  !!!!!!!
    for k=1:tsteps+1
        t = tstepsize*(k-1); % 30 Stunden lang wird jede halbe Stunde ein Wert generiert.
        zy = exp((t-y(3))/y(4));
        zyy = exp((t-yy(3))/yy(4));
        Cx(i,k) = y(2)+(y(1)-y(2))/(1+zy);
        Cp(i,k) = yy(2)+(yy(1)-yy(2))/(1+zyy);
        mu(i,k) = (1/Cx(i,k))*(y(2)-y(1))*zy/(y(4)*(1+zy)*(1+zy));
        qp(i,k) = (1/Cx(i,k))*(yy(2)-yy(1))*zyy/(yy(4)*(1+zyy)*(1+zyy));
    end
end

% Ende der Schleife
% Berechnung der Kovarianz der simulierten Werte

cov(Y')
cov(YY')

% Berechnung der 95%-Vertrauensintervalle der simulierten Daten für
% die Biomasse-Konzentration:

Cxconf=zeros(ttot+1,3);
for ii=1:ttot+1
    Cxconf(ii,1)=mean(Cx(:,ii))-1.96*sqrt(cov(Cx(:,ii)));
    Cxconf(ii,2)=mean(Cx(:,ii));
    Cxconf(ii,3)=mean(Cx(:,ii))+1.96*sqrt(cov(Cx(:,ii)));
end

% die Wachstumsrate:

muconf=zeros(ttot+1,3);
for ii=1:ttot+1
    muconf(ii,1)=mean(mu(:,ii))-1.96*sqrt(cov(mu(:,ii)));
    muconf(ii,2)=mean(mu(:,ii));
    muconf(ii,3)=mean(mu(:,ii))+1.96*sqrt(cov(mu(:,ii)));
end

```

```

end

% die L-Isoleucin-Konzentration:

Cpconf=zeros(ttot+1,3);
for ii=1:ttot+1
    Cpconf(ii,1)=mean(Cp(:,ii))-1.96*sqrt(cov(Cp(:,ii)));
    Cpconf(ii,2)=mean(Cp(:,ii));
    Cpconf(ii,3)=mean(Cp(:,ii))+1.96*sqrt(cov(Cp(:,ii)));
End

% die biomassespezifische L-Isoleucin-Produktbildungsrate:

qpconf=zeros(ttot+1,3);
for ii=1:ttot+1
    qpconf(ii,1)=mean(qp(:,ii))-1.96*sqrt(cov(qp(:,ii)));
    qpconf(ii,2)=mean(qp(:,ii));
    qpconf(ii,3)=mean(qp(:,ii))+1.96*sqrt(cov(qp(:,ii)));
end

```

A.10 Haupt-Komponenten-Analyse

Zur Identifizierung und Quantifizierung signifikanter Prozeßgrößen wurde die Methode der Haupt-Komponenten-Analyse eingesetzt. Diese statistische Methode ist eine der ältesten Multivarianten-Analyse-Methoden und wurde erstmals von Pearson (1901) vorgestellt und unabhängig durch Hotteling (1933) weiter entwickelt.

Die Haupt-Komponenten-Analyse verfolgt die Idee, einen komplexen, multidimensionalen Datensatz durch Berechnung von Hauptkomponenten so zu reduzieren, daß ein Maximum der Gesamtvarianz im Hauptkomponentensystem enthalten ist. Die Hauptkomponenten entsprechen dabei den Eigenvektoren und stehen somit senkrecht aufeinander. Analog zum Varianzteil, den die Hauptkomponenten an der Gesamtvarianz besitzen, sind sie geordnet; d.h. die Hauptkomponente mit der größten Varianz ist die Hauptkomponente 1, gefolgt von der Hauptkomponente mit der zweitgrößten Varianz etc. Die hier verwendete Haupt-Komponenten-Analyse ist ein linearer Ansatz. Der zeitliche Verlauf der Zustandsvariablen wird durch eine Linearkombination der Eigenvektoren α mit den Zustandsvariablen beschrieben. Der Wert einer Hauptkomponente pc_i zu einem bestimmten Zeitpunkt des Prozesses (ausgedrückt durch den Zustandsvektor x_i) kann mit Hilfe des Eigenvektors α_k berechnet werden zu:

$$pc_i = \alpha_k \cdot x_i$$

Gleichung 40

Bei der Formulierung des Zustandsvektors muß beachtet werden, daß die verwendeten Prozeßgrößen in der Regel unterschiedliche Dimensionen besitzen, daher sollten nur normierte Größen verwendet werden. Der Eigenvektor α_k wurde so bestimmt, daß die Varianz des Gesamtsystems maximiert wird. Gemäß dieser Vorgehensweise beschreiben die dazugehörigen Eigenwerte die anteilige Varianz dieser Hauptkomponente an der Gesamtvarianz.

Für die theoretische Grundlage der Haupt-Komponenten-Analyse wird auf die entsprechende Literatur (Jolliffe, 1986; Shimizu *et al.*, 1997) verwiesen.

A.10.1 Haupt-Komponenten-Analyse in Matlab

Zur Durchführung dieser Haupt-Komponenten-Analyse wurde ein Programm für das Software-Paket Matlab geschrieben auf der Basis der oben beschriebenen Theorie der Haupt-Komponenten-Analyse. Der Programmcode sieht wie folgt aus:

```
% Haupt-Komponenten-Analyse
clear
clf

load 'FILENAME.txt'
numDat_1 = 670; % Anzahl der Daten der verschiedenen Prozeßgrößen von Datensatz 1 in FILENAME.txt
numDat_2 = 338; % Anzahl der Daten der verschiedenen Prozeßgrößen von Datensatz 2 in FILENAME.txt
numDat_3 = 589; % Anzahl der Daten der verschiedenen Prozeßgrößen von Datensatz 3 in FILENAME.txt
numDat_4 = 680; % Anzahl der Daten der verschiedenen Prozeßgrößen von Datensatz 4 in FILENAME.txt
numDat_5 = 597; % Anzahl der Daten der verschiedenen Prozeßgrößen von Datensatz 5 in FILENAME.txt
numDat_6 = 590; % Anzahl der Daten der verschiedenen Prozeßgrößen von Datensatz 6 in FILENAME.txt

% Der gesamte Datensatz wird normiert
A = FILENAME
Mittelwert = mean(A);
Mittelwert
dimData = size(A);
for i = 1: dimData(2),
    A(:,i) = (A(:,i)-Mittelwert(i))/Mittelwert(i);
End

% Bestimmung der Hauptkomponenten (PCA_**)
B = A';
C = B * A;
C = C/(dimData(1)-1)

[Eigenvektoren, Eigenwerte, percentage] = pcacov(C);
Eigenvektoren
Eigenwerte
percentage

dimEigen = length(Eigenwerte);
dimEigen
dimEigenVec = size(Eigenvektoren)
dimEigenVecComponenten = dimEigenVec(1);
sum = 0
for i = 1: dimEigen,
    sum = sum + Eigenwerte(i);
end
sum

for i = 1: numDat_1,
    PCA_11(i) = A(i,:) * Eigenvektoren(:, 1);
    PCA_21(i) = A(i,:) * Eigenvektoren(:, 2);
    PCA_31(i) = A(i,:) * Eigenvektoren(:, 3);
end

save 'Pcf1.res' PCA_11 PCA_21 PCA_31 -ascii -tabs;
```

```
grenze = i
for i = 1 + grenze: numDat_2 + grenze,
    PCA_12(i-grenze) = A(i,:) * Eigenvektoren(:, 1);
    PCA_22(i-grenze) = A(i,:) * Eigenvektoren(:, 2);
    PCA_32(i-grenze) = A(i,:) * Eigenvektoren(:, 3);
end
save 'PCf2.res' PCA_12 PCA_22 PCA_32 -ascii -tabs;

grenze = i
for i = 1+grenze: numDat_3 + grenze,
    PCA_13(i-grenze) = = A(i,:) * Eigenvektoren(:, 1);
    PCA_23(i-grenze) = = A(i,:) * Eigenvektoren(:, 2);
    PCA_33(i-grenze) = = A(i,:) * Eigenvektoren(:, 3);
end
save 'PCf3.res' PCA_13 PCA_23 PCA_33 -ascii -tabs;

grenze = i
for i = 1+grenze: numDat_4 + grenze,
    PCA_14(i-grenze) = = A(i,:) * Eigenvektoren(:, 1);
    PCA_24(i-grenze) = = A(i,:) * Eigenvektoren(:, 2);
    PCA_34(i-grenze) = = A(i,:) * Eigenvektoren(:, 3);
end
save 'PCf4.res' PCA_14 PCA_24 PCA_34 -ascii -tabs;

grenze = i
for i = 1+grenze: numDat_5 + grenze,
    PCA_15(i-grenze) = = A(i,:) * Eigenvektoren(:, 1);
    PCA_25(i-grenze) = = A(i,:) * Eigenvektoren(:, 2);
    PCA_35(i-grenze) = = A(i,:) * Eigenvektoren(:, 3);
end
save 'PCf5.res' PCA_15 PCA_25 PCA_35 -ascii -tabs;

grenze = i
for i = 1+grenze: numDat_6 + grenze,
    PCA_16(i-grenze) = = A(i,:) * Eigenvektoren(:, 1);
    PCA_26(i-grenze) = = A(i,:) * Eigenvektoren(:, 2);
    PCA_36(i-grenze) = = A(i,:) * Eigenvektoren(:, 3);
end
save 'PCf6.res' PCA_16 PCA_26 PCA_36 -ascii -tabs;
```

Anhang B: Abkürzungen und Indizes

B.1 Abkürzungen

Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Cit	Citrat
CoA	Coenzym A
CO ₂	Kohlendioxid
DAP	Dihydroxyacetonphosphat
r-DNA	rekombinante Desoxyribonucleinsäure
E4P	Erythrose-4-phosphat
FAD(H ₂)	Flavinadenindinukleotid
Fruc6P	Fructose-6-phosphat
Fruc-1,6-bP	Fructose-1,6-bisphosphat
Fum	Fumarat
GAP	Glyceraldehyd-diphosphat
G-2,3-bP	Glyceraldehyd-2,3-bisphosphat
G2P	Glyceraldehyd-2-phosphat
G3P	Glyceraldehyd-3-phosphat
Glc6P	Glucose-6-phosphat
H ₂ O-bidest	bidestilliertes Wasser
IsoCit	Isocitrat
αKG	α-Ketoglutarat
Mal	Malat
NAD(H ₂)	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP(H ₂)	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NDP	Nucleotiddiphosphat
NTP	Nucleotidtriphosphat
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OAA	Oxalacetat
P _i	Pyrophosphat
PEP	Phosphoenolpyruvat
6PGL	6-Phosphoglucolacton

PTS	Phosphotransferasesystem
Pyr	Pyruvat
Rib5P	Ribulose-5-phosphat
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
Rub5P	Rubilose-5-phosphat
RQ	Respiration Quotient
Sed7P	Sedoheptulose-7-phosphat
Suc	Succinat
SucCoA	Succinyl-Coenzym A
TPP ⁺	[¹⁴ C]-Tetraphenylphosphonium
Xyl5P	Xylose-5-phosphat

B.2 Lateinische Buchstaben

c	mM	Konzentration
D	h^{-1}	Durchflußrate
F	$\text{J} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$	Faraday Konstante ($9,6485 \cdot 10^4$)
g	-	stochastischer Rauschterm
n	-	Anzahl der Meßwerte
M_c	$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	Molmasse des Kohlenstoffs
P	mol	Produktmenge im Reaktor
Q_s	$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	Substratverbrauch der Regelstrecke
$\hat{Q}_s$	$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	geschätzter Substratverbrauch der Regelstrecke
r	$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ $\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	volumenspezifische Reaktionsgeschwindigkeit
$\hat{r}$	$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	geschätzte Reaktionsgeschwindigkeit
R	$\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$	Gaskonstante (8,314)
S	mol	Substratmenge im Reaktor
$[S]$	$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	Substratkonzentration
$[S]_m$	$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	gemessene Substratkonzentration
$[\hat{S}]$	$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	geschätzte Substratkonzentration
CER	$\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	biomassenspezifische CO ₂ -Bildung
OUR	$\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	biomassenspezifische O ₂ -Verbrauch
t	h	Zeit
T	°C	Temperatur
V	l	Volumen
$\dot{V}$	$\text{l} \cdot \text{h}^{-1}$	Volumenfluß
v_n	-	stöchiometrische Koeffizient des Stoffes n
w_c	$\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	Kohlenstoffanteil der Biomassa

X	g	Biotrockenmasse im Reaktor
$[X]$	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$	Biotrockenmassekonzentration
Y	-	Selektivitätskoeffizient

B.3 Griechische Buchstaben

μ	h^{-1}	spezifische Wachstumsrate
π	$\text{mmol}/(\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h}), \text{g}/(\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h})$	biomassespezifische Produktbildungsrate
σ	$\text{mmol}/(\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h}), \text{g}/(\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h})$	biomassespezifische Substratverbrauchsrate
$\bar{\tau}$	h	mittlere Verweilzeit
$\Delta\Psi$	mV	Membranpotential

B.4 Indizes

BTM	Biotrockenmasse
C	Kohlenstoff
C	Konzentration
g	Gas
Glc	Glucose
Ile	L-Isoleucin
i	Variable Substrat oder Produkt
in	Reaktorzulauf
Leu	Leucin
m	Zählvariable (Anzahl der Komponenten)
out	Reaktorablauf
P	Produkt
R	Reaktor
S	Substrat
Verd.	Verdünnungsmedium
X	Biomasse

Anhang C: Literatur

- Akashi, K., H. Shibai, Y. Hirose. (1979).** Effect of oxygen supply on L-lysine, L-threonine and L-isoleucine fermentations. *Agric. Biol. Chem.* **43**: 2087-2092.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, D. Watson. (1989).** Molecular biology of the cell. New York & London, Garland Publishing, Inc.
- Atkinson, D. E. (1977).** Cell Energy Metabolism and Regulation. New York, Academic Press Inc.
- Axe, D., J. Bailey. (1995).** Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **47**: 8-19.
- Babel, W. (1986).** Some theoretical considerations on overflow production of metabolites. *Acta Biotechnol.* **6**: 215-219.
- Bailey, J. (1991).** Toward a science of metabolic engineering. *Science.* **252**: 1668-1675.
- Bathe, B., J. Kalinowski, A. Pühler. (1996).** A physical genetic map of the *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 chromosome. *Mol. Gen. Genet.* **252**: 255-265.
- Boles, E., H. Ebbighausen, B. Eikmanns, R. Krämer. (1993).** Unusual regulation of the uptake system for branched-chain amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* **159**: 147-152.
- Büchs, J. (1988).** Immobilisierung von aeroben Mikroorganismen an Glassintermaterial am Beispiel der L-Leucin-Produktion mit *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation T. U. Hamburg-Harburg.
- Büchs, J., S. Mozes, C. Wandrey, P. Rouxhet. (1988).** Cell adsorption control by culture conditions; Influence of phosphate on surface properties, flocculation and adsorption behaviour of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 119-128.
- Cocaign-Bousquet, M., N. Lindley (1995).** Pyruvate overflow and carbon flux within the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on lactate. *Enz. Microbial. Technol.* **17**: 260-267.
- Colón, G., M. Jetten, T. Nguyen, M. Gubler, M. Follettie, A. Sinskey, G. Stephanopoulos. (1994).** Effect of inducible *thrB* expression on amino acid production in *Corynebacterium lactofermentum* ATCC 21799. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 74-78.
- Dunn, I., E. Heinzle, J. Ingham, J. Prenosil. (1992).** Biological reaction engineering. Principles, applications and modelling with PC simulation. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft.

- Ebbighausen, H., B. Weil, R. Krämer. (1989a).** Isoleucine excretion in *Corynebacterium glutamicum*: evidence for a specific efflux carrier system. Appl. Microbiol. Biotechnol. **151**: 184-190.
- Ebbighausen, H., B. Weil, R. Krämer. (1989b).** Transport of branched-chain amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. Arch. Microbiol. **151**: 238-244.
- Eggeling, L., E. Scheer, C. Cordes, A. Nassenstein, H. Sahm. (1988).** Isoleucine formation from hydroxybutyrate with *Corynebacterium glutamicum*: Biochemistry, limiting reactions, genes, VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Eggeling, L., S. Cordes, L. Eggeling, H. Sahm. (1987).** Regulation of acetohydroxy acid synthase in *Corynebacterium glutamicum* during fermentation of ketobutyrate to L-Isoleucine. Appl. Microbiol. Biotechnol. **25**: 346-351.
- Eggeling, L., S. Morbach and H. Sahm. (1997).** The fruits of molecular physiology: engineering the L-Isoleucin biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum*. J. Biotechnol. **56**: 167-182.
- Eikmanns, B. J. (1992).** Identification, sequence analysis, and expression of a *Corynebacterium glutamicum* gene cluster encoding the three glycolytic enzymes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 3-phosphoglycerate kinase and triosephosphate isomerase. J. Bacteriol. **174**: 6076-68.
- Eikmanns, B. J., E. Kleinertz, W. Liebl, H. Sahm. (1991).** A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. Gene **102**: 93-98.
- Eikmanns, B., H. Sahm. (1993).** Molecular aspects of lysine, threonine, and isoleucin biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. Kluwer Academic Publishers.
- Eikmanns, B. (1997).** Genetische und physiologische Untersuchungen zum Zentralstoffwechsel und zur Glutamat- und Threoninbiosynthese von *Corynebacterium glutamicum*. Habilitationsschrift.
- Elston, T., S. Wang, G. Oster. (1998).** Energy transduction in ATP synthase. Nature. **391**: 510-513.
- Enei, H., K. Yokozeki, K. Akashi. (1989).** Recent progress in microbial production of amino acids. Japanese technology reviews. Vol. 5. Gordon and Breach Science Publishers, New York.
- Erdmann, A., B. Weil, R. Krämer. (1993).** Lysine secretion by wild-type *Corynebacterium glutamicum* triggered by dipeptide uptake. J. Gen. Microbiol. **139**: 3115-3122.
- Erdmann, A., R. Krämer. (1994).** Lysine secretion by *Corynebacterium glutamicum* wild type: regulation of secretion carrier activity. Appl. Microbiol. Biotechnol. **42**: 604-610.

- Eysmond, J., D. Vasic-Racki, C. Wandrey. (1990).** Acetic acid production by *Acetogenium kivui* in continuous culture: Kinetic studies and computer simulations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 344-349.
- Faber, K. (1992).** Biotransformations in Organic Chemistry. Berlin/New York, Springer Verlag.
- Farmer, W., J. Liao (1996).** Progress in metabolic engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**: 198-204.
- Folletie, M., H. Shin, A. Sinskey. (1988).** Organization and regulation of the *Corynebacterium glutamicum* *hom-thrB* and *thrC* loci. *Mol. Microbiol.* **2**: 53-62.
- Greenstein, J. P. (1954).** The resolution of racemic alpha-amino acids. *Adv. Prot. Chem.* **9**: 27-30.
- Gubler, M., M. Jetten, S. Lee, A. Sinskey. (1994a).** Cloning of the pyruvate kinase gene (*pyk*) of *Corynebacterium glutamicum* and site-specific inactivation of *pyk* in a lysine producing *Corynebacterium lactofermentum* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2494-2500.
- Gubler, M., S. M. Park, M. Jetten, G. Stephanopoulos, A. Sinskey. (1994b).** Effects of phosphoenolpyruvate carboxylase deficiency on metabolism and lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 857-863.
- Guirard, B. M. (1958).** Microbial nutrition. *Ann. Rev. Microbiol.* **12**: 247-278.
- Gutmann, M. (1993).** Glutamatsekretion bei *Corynebacterium glutamicum*: Mechanismus und physiologische Bedeutung des Carrier-vermittelten Exports. Dissertation Universität, Düsseldorf.
- Hermann, T. (1998).** Untersuchungen zum Transport von Isoleucin bei *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation Universität Düsseldorf.
- Hermann, T., R. Krämer (1996).** Mechanism and regulation of isoleucine excretion in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3238-3244.
- Hodgson, J. (1994).** Bulk amino acid fermentation: technology and commodity trading. *Bio/Technology* **12**: 152-155.
- Hoppe, B., J. Martens. (1983).** Aminosäure – Bausteine des Lebens, *Chemie in unserer Zeit* **17**: 41-53.
- Hotteling, H. (1933).** Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *J. Educ. Psychol.* **24**: 417-441.
- Ikeda, S., I. Fujita, F. Yoshinaga. (1976a).** Screening of L-isoleucine producers among methionine resistant mutants of L-threonine producing bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **40**: 511-516.
- Ikeda, S., I. Fujita, Y. Hirose. (1976b).** Culture condition of L-isoleucine formation from acetic acid. *Agric. Biol. Chem.* **40**: 517-522.
- Ingraham, J., O. Maaloe, F. Neidhardt. (1983).** Growth of the bacterial cell. Sunderland, Sinauer.

- Ishino, S., T. Kuga, K. Yamaguchi, K. Shirahata, K. Araki. (1986). ^{13}C NMR studies of histidine fermentation with *Corynebacterium glutamicum* mutant. Agric. Biol. Chem. **50**: 307-310.
- Jetten, M., G. Pitoc, M. Follettie, A. Sinskey. (1994). Regulation of phosphoenolpyruvate and oxaloacetate-converting enzymes in *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **41**: 47-52.
- Joks, B. (1996). Integration von Online-Analysenverfahren zur Substratregelung von Fermentationen im geschlossenen Regelkreis. Dissertation, Universität Bonn.
- Jolliffe, I. T. (1986). Principal Component Analysis. New York, Springer-Verlag.
- Karutz, M. (1999). Prozeßentwicklung zur fermentativen L-Isoleucinproduktion mit *Corynebacterium glutamicum*. Laufende Dissertation, Universität Bonn.
- Kase, H., K. Nakayama. (1977). L-Isoleucine production by analog-resistant mutants derived from threonine-producing strain of *Corynebacterium glutamicum*. Agric. Biol. Chem. **41**: 109-116.
- Kashket, E. R. (1985). The proton motive force in bacteria: a critical assessment of methods. Ann. Rev. Microbiol. **39**: 219-242.
- Keilhauer, C., L. Eggeling, H. Sahm. (1993). isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. J. Bacteriol. **175**:5595-5603.
- Kelle, R., T. Hermann, D. Weuster-Botz, L. Eggeling, R. Krämer, C. Wandrey. (1996). Glucose controlled L-isoleucine fed-batch production with recombinant strains of *Corynebacterium glutamicum*. J. Biotechnol. **50**:123-136.
- Kelle, R. (1996). Substratgeregelte Aminosäureproduktion mit *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation RWTH Aachen.
- Kinoshita, S., S. Ukada, M. Shimono. (1957). Studies on the amino acid fermentation: I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. J. Gen. Appl. Microbiol. **3**:193-205.
- Kinoshita, S. (1962). Production of amino acids with special consideration of the function of biotin. Rec. Prog. Microbiol. **8**: 334-340.
- Kinoshita, S. (1985). Glutamic acid bacteria. Biology of industrial microorganisms. A. L. Demain and N. A. Solomon. London U. K., The Benjamin/Cummings Publishing Company: 115-142.
- Kiss, R., G. Stephanopoulos. (1991). Metabolic activity control of the L-lysine fermentation by restrained growth fed-batch strategies. Biotechn. Prog. **7**: 501-509.
- Kiss, R., G. Stephanopoulos. (1992). Metabolic characterization of a L-lysine producing strain by continuous culture. Biotechn. Bioeng. **39**: 565-574.
- Kogyo, S. and K. Hatten (1996). Fermentation with improved yield of phenylalanine - by batch fermentation using Coryneform bacterium, used as artificial sweetener. Japanisches Patent nr. J08322584 Ab 961210 DW9708 C12P-013-22.

- Komatsubara, S., M. Kisumi, I. Chibata. (1980).** Transductional construction of an L-isoleucine-producing strain *Serratia marcescens*. J. Gen Microbiol. **119**: 51-61.
- Kornberg, H. L. (1966).** Anaplerotic sequences and their role in metabolism. New York, Academic Press.
- Krämer, R. (1994).** Secretion of amino acids by bacteria: Physiology and mechanism. FEMS Microbiol. Rev. **13**: 75-94.
- Krämer, R. (1996).** Genetic and Physiological approaches for the production of amino acids. J. Biotechnol. **45**:1-21.
- Kwong, S., G. Rao (1991).** Utility of culture redox potential for identifying metabolic state changes in amino acid fermentation. Biotech. Bioeng. **38**: 1034-1040.
- Lankford, C., T. Kustoff, T. Sergeant. (1957).** Chelating agents in growth initiation of *Bacillus globigii*. J. Bacteriol. **74**: 737-748.
- Lechevalier, M., H. Lechevalier (1970).** Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. Int. J. Syst. Bacteriol. **20**: 435-443.
- Leuchtenberger, W. (1996).** Amino acids technical production and use. S. 455-502. Rehm, H., G. Reed. Products of primary metabolism. Biotechnology Vol. 6, VHC Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Deutschland.
- Liebl, W. (1991).** The Genus *Corynebacterium* - nonmedical. Heidelberg, Springer Verlag.
- Liebl, W., R. Klammer, K. Schleifer. (1989).** Requirement of chelating compounds for the growth of *Corynebacterium glutamicum* in synthetic media. Appl. Microbiol. Biotechnol. **32**: 205-210.
- Ludeking, R., E. Piret (1959).** A kinetic study of the lactic acid fermentation. J. Biochem. Microbiol. Tech. Eng. **1**: 303-412.
- Lundin, A., A. Rickardson, A. Thore. (1976).** Continuous monitoring of ATP-converting reactions by purified firefly luciferase. Anal. Biochem. **75**: 611-620.
- Martin, J., R. Santamaria, H. Sandoval, G. del Real, L. Mateos, J. Gil, A. Aguilar. (1987).** Cloning systems in amino acid-producing *Corynebacteria*. Bio/Technology **5**: 137-146.
- Marx, A., A. de Graaf, W. Wiechert, L. Eggeling, H. Sahm. (1996).** Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolite balancing. Biotechnol. Bioeng. **49**: 111-129.
- Marx, A., K. Striegel, A. A. de Graaf, H. Sahm, L. Eggeling. (1997).** Response of the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* to different flux burdens. Biotechnol. Bioeng. **56**:168-180.
- Mason, C., S. Egli (1993).** Dynamics of microbial growth in the decelerating and stationary phase of batch culture. Starvation in Bacteria. S. Kjelleberg. Plenum Press, New York und London.

- Miyajima, R., S. Otsuka, I. Shio. (1968).** Regulation of aspartate family amino acids biosynthesis in *Brevibacterium flavum*. Inhibition by amino acids of the enzyme in threonine biosynthesis. J. Biochem. **63**: 139-148.
- Miyajima, R., I. Shio. (1970).** Regulation of aspartate family amino acids biosynthesis in *Brevibacterium flavum* III. Properties of homoserine dehydrogenase. J. Biochem. **68**: 311-319.
- Miyajima, R., I. Shio. (1971).** Regulation of aspartate family amino acids biosynthesis in *Brevibacterium flavum*. Repression of the enzymes in threonine biosynthesis. Agric. Biol. Chem. **35**: 424-430.
- Miyajima, R., I. Shio. (1972).** Regulation of aspartate family amino acids biosynthesis in *Brevibacterium flavum*. Effects of isoleucine and valine on threonine dehydratase activity and formation. J. Biochem. **71**: 951-960.
- Mizukami, T., M. Yahisawa, T. Oka, A. Furuya. (1986).** Improvement of the stability of recombinants carrying the threonine operon in an L-threonine-hyperproducing strain of *Escherichia coli* W. Agric. Biol. Chem. **50**: 1019-1027.
- Möckel, B., L. Eggeling, H. Sahm. (1992).** Functional and structural analysis of threonine dehydratase from *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. **174**: 8065-8072.
- Morbach, S., R. Kelle, S. Winkels, H. Sahm and L. Eggeling. (1995a).** Engineering the homoserine dehydrogenase and threonine dehydratase control points to analyse flux towards L-Isoleucine in *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **45**: 612-620.
- Morbach, S., H. Sahm and L. Eggeling. (1995b).** Use of feedback-resistant threonine dehydratase of *Corynebacterium glutamicum* to increase carbonflux towards L-Isoleucine. Applied Environmental Microbiology **61**.
- Morbach, S., H. Sahm, L. Eggeling. (1996).** L-Isoleucine production with *Corynebacterium glutamicum*: Further flux increase and limitation of export. Applied and Environmental Microbiology **62**: 4345-4351.
- Morbach, S. (1997).** Bildung von L-Isoleucin mit *Corynebacterium glutamicum* und Analysen zur Genregulation des ilvBNC-Operons. Dissertation, Universität Düsseldorf.
- Mori, M., I. Shio (1987a).** Pyruvate formation and sugar metabolism in an amino acid producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. Agric. Biol. Chem. **51**: 29-138.
- Mori, M., I. Shio (1987b).** Phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase systems and sugar metabolism in *Brevibacterium flavum*. Agric. Biol. Chem. **51**: 2671-2678.
- Moser, A. (1981).** Bioprozeßtechnik; Berechnungsgrundlagen der Reaktionstechnik biokatalytischer Prozesse. Wien, Springer-Verlag.
- Nakayama, K., Z. Sato, S. Kinoshita. (1964a).** Growth of a glutamic acid producing bacterium and related bacteria. I. Effect of iron salts, ferrichrome, amino acids and some other compounds. J. Gen. Appl. Microbiol. **10**: 143-155.

- Nakayama, K., Z. Sato, H. Tanaka, S. Kinoshita. (1964b).** Growth of a glutamic acid producing bacterium and related bacteria. II. Effects of chelating agent and its relation to inorganic salts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **10**: 181-199.
- Neilands, J. (1995).** Siderophores; Structures and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *J. Biol. Chem.* **270**: 26723-26726.
- Nielsen, J. (1998).** Metabolic engineering: Techniques for analysis of targets for genetic manipulations. *Biotechnol. Bioeng.* **58**: 125-132.
- Nielsen, J., J. Villadsen. (1994).** *Bioreaction Engineering Principles*. Plenum Press, New York und London.
- Osten von der, C., C. Gioanetti, A. Sinskey. (1989).** Design of a medium for growth of *Corynebacterium glutamicum* in which citrate facilitates iron uptake. *Biotechnol. Lett.* **11**: 11-16.
- Otsuka, S.-I., R. Miyajima, I. Shiio. (1965).** Comparative studies on the mechanism of microbial glutamate formation - Part I. Pathway of glutamate formation from glucose in *Brevibacterium flavum* and in *Micrococcus glutamicus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **11**: 285-294.
- Pascuala, C., P. Lawson, J. Farrow, M. Gimenez, M. Collins. (1995).** Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 724-728.
- Pearson, K. (1901).** On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Phil. Mag.* **2**(6): 559-572.
- Peters-Wendisch, P. (1996).** Anaplerotische Reaktionen in *Corynebacterium glutamicum*; Untersuchungen zur Bedeutung der PEP-Carboxylase und der Pyruvat-Carboxylase im Zentralstoffwechsel und bei der Aminosäure-Produktion. Dissertation, Universität Düsseldorf.
- Peters-Wendisch, P. (1997).** Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology.* **104**: 269-274.
- Prognos, A. (1996).** Arbeitsbericht für das Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie. Basel.
- Roller, C., W. Ludwig, K. Schleifer. (1992).** Gram-positive bacteria with high DNA G+C content are characterized by common insertion within 23S rRNA genes. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1167-1175.
- Rottenberg, H. (1979).** The measurement of membrane potential and pH in cells, organelles, and vesicles. *Meth. Enzymol.* **55**: 547-569.
- Ruklish, M. P., D. F. Marauska, U. Viestur. (1978).** Nature of the regulation of enzymes of glucose and acetic acid metabolism in lysine producing *Brevibacterium* strains. *Microbiol.* **51**: 12-15.
- Ruklish, M., D. Marauska, J. Shvinka, M. Toma, N. Galynina. (1981).** Coordination of energy and carbon metabolism in lysine producing *Brevibacterium* strains. *Biotechnol. Lett.* **3**: 465-470.

- Sano, K., K. Ito, K. Miwa, S. K. Nakamori. (1987).** Amplification of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Brevibacterium lactofermentum* to improve amino acid production. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 597-599.
- Schäfer, A., A. Schwarzer, J. Kalinowski, A. Pühler. (1994).** Cloning and characterization of a DNA region encoding a stress-sensitive restriction system from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 and analysis of its role in intergenic conjugation with *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**: 7309-7319.
- Scheer, E., C. Cordes, L. Eggeling, H. Sahm. (1987).** Regulation of acetohydroxy acid synthase in *Corynebacterium glutamicum* during isoleucine formation from α -hydroxybutyric acid. *Arch. Microbiol.* **149**: 173-174.
- Schimz, K., S. Rütten, M. Tretter. (1981).** Determination of adenosine nucleotides with luciferin/luciferase from crude firefly lantern extract on a bioluminescence analyzer. *Adv. Biotechnol.* **1**: 457-462.
- Schitag, Ernst und Young. (1998).** Aufbruchstimmung 1998. Erster Deutscher Biotechnologie Report: 8-9.
- Schlegel, H. G. (1992).** Allgemeine Mikrobiologie. Stuttgart-New York, Georg Thieme Verlag.
- Schleifer, K.-H., O. Kandler. (1972).** Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**: 407-477.
- Schmidt, K. (1999).** Persönliche Mitteilung.
- Schrumpf, B., L. Eggeling, H. Sahm. (1992).** Isolation and prominent characteristics of an L-Lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 566-571.
- Sergeant, T., C. Lankford, R. Traxler. (1957).** Initiation of growth of *Bacillus* species in a chemically defined medium. *J. Bacteriol.* **74**: 728-736.
- Shio, I., S. Otsuka, T. Tsunoda. (1959).** Glutamic acid formation from glucose by bacteria - Part I. Enzymes of the Embden-Meyerhof-Parnas pathway, the Krebs cycle, and the glyoxylate bypass in cell extracts of *Brevibacterium flavum* No. 2247. *J. Biochem.* **46**: 1303-1311.
- Shio, I., A. Sasaki, T. Tsunoda. (1960).** Glutamic acid formation from glucose. IV. Carbon dioxide fixation and glutamate formation in *Brevibacterium flavum* No. 2247. *J. Biochem.* **48**: 110-120.
- Shio, I., S. Otsuka, M. Takahashi. (1961).** Effect on growth substrate on levels of glyoxylate bypass enzymes in a glutamate forming bacterium, *Brevibacterium flavum* No. 2247. *J. Biochem.* **49**: 262-263.
- Shio, I., S.-I. Otsuka, M. Takahashi. (1961).** Glutamic acid formation from glucose by bacteria- Part V. Oxidative metabolism of glucose in *Brevibacterium flavum* No. 2247. *J. Biochem.* **49**: 397-403.

- Shiio, I., H. Ozaki (1968).** Concerted inhibition of isocitrate dehydrogenase by glyoxylate plus oxalacetate. *J. Biochem.* **64**: 45-53.
- Shiio, I., R. Miyajima (1969).** Concerted inhibition and its reversal by end products of aspartate kinase in *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.* **65**: 849-850.
- Shiio, I., K. Ujigawa (1978).** Enzymes of the glutamate and aspartate synthetic pathways in a glutamate-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.* **84**: 647-657.
- Shiio, I., K. Ujigawa (1980).** Presence and regulation of α -ketoglutarate dehydrogenase complex in a glutamate production bacteria, *Brevibacterium flavum* No. 2247. *Agric. Biol. Chem.* **44**: 1897-1904.
- Shiio, I., S. Sugimoto, K. Kawamura. (1990).** Effect of carbon source sugars on the yield of amino acid production and source metabolism in *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 1513-1519.
- Shimizu, H., K. Yasuoka, K. Uchiyama, K. S. Shioya. (1997).** On-line fault diagnosis for optimal rice α -amylase production process of a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae* by an autoassociative neural network. *J. Ferm. Bioeng.* **83**: 433-442.
- Sonntag, K., J. Schwinde, A. A. de Graaf, A. Marx, B. J. Eikmanns, W. Wiechert and H. Sahm. (1995).** ^{13}C NMR studies of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* during growth and overproduction of amino acids in batch cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 489-495.
- Steinmetzer, W. (1979).** Verfahren zur Gewinnung von L-Leucin, L-phenylalanin und von L-Cystein. Deutsche Patentanmeldung DE 2906034A1.
- Stephanopoulos, G. and K. San (1984).** Studies on on-line bioreactor identification. I. Theory. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: 1176-1188.
- Striegel, B. (1993).** Entwurf und Implementierung von Regelungskonzepten für biotechnische Prozesse. Dissertation, RWTH Aachen.
- Sugimoto, S.-I., I. Shiio. (1987).** Regulation of 6-phosphogluconate-dehydrogenase in *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 1257-1263.
- Sugimoto, S.-I., I. Shiio (1989).** Fructose metabolism and regulation of 1-phosphofructokinase and 6-phosphofructokinase in *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 1261-1268.
- Sugimoto, S.-I., I. Shiio (1989).** Regulation of enzymes for erythrose-4-phosphate synthesis in *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 2081-2087.
- Suijdam, J. C., J. A. Roels (1994).** Strategies of Biotechnological Industries - Biotechnology in the Nineties: Back to Business, Elsevier Science B.V.
- Tempest, D., O. Neijssel. (1992).** Physiological and energetic aspects of bacterial metabolite overproduction. *FEMS Microbiol. Lett.* **100**: 169-176.

- Tosaka, O., H. Morioka, K. Takinami. (1985).** The role of biotin dependent pyruvate carboxylase in L-lysine production. *Agric. Bio. Chem.* **43**: 1513-1519.
- Trüper, H., K.-H. Schleifer (1991).** Prokaryote characterization and identification. The prokaryotes. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.-H. Schleifer. New York, Springer. S. 126-148.
- Vallino, J., G. Stephanopoulos (1993).** Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. *Biotechnol. Bioeng.* **41**: 633-646.
- Weinstock, O. C. Sella, D. Chipman, Z. Barak. (1992).** Properties of subcloned subunits of bacterial acetohydroxy acid synthases. *J. Bacteriol.* **174**: 5560-5566.
- Weuster-Botz, D., H. Paschold, B. Striegel, M. Kula, C. Wandrey. (1994).** Continuous computer controlled production of formate dehydrogenase (FDH) and isolation on a pilot scale. *Chem. Eng. Technol.* **17**: 131-137.
- Wiechert, W. (1991).** Interaktive Datenanalyse bei biotechnischen Prozeßdaten. Dissertation, Universität Bonn.
- Wilhelm, C. (1987).** Analyse von Nebenprodukten bei der Bildung von L-Isoleucin aus Hydroxybutyrat, sowie Ketobutyrat durch *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Fachhochschule Jülich.
- Wilhelm, C., I. Eggeling, A. Nassenstein, C. Jeben, L. Eggeling, H. Sahm. (1989).** Limitations during hydroxybutyrate conversion to isoleucine with *Corynebacterium glutamicum* as analysed by the formation of by-products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 458-462.
- Winkelmann, G., D. R. Winge. (1994).** Metal ions in fungi. *Mycology*. **2**. Marcel Dekker, Inc., New York-Basel-Hong Kong.
- Zittrich, S. and R. Krämer (1994).** Quantitative discrimination of carrier-mediated excretion of isoleucine from uptake and diffusion in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **176**: 6892-6899.

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen meiner Tätigkeit am Institut für Biotechnologie (IBT 2) des Forschungszentrums Jülich GmbH.

Mein besonderer Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. C. Wandrey für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen während der Promotionszeit und für die Übernahme des Hauptreferates.
- Herrn Prof. Dr. W. Hartmeier danke ich für sein Interesse an der Arbeit, die freundliche Aufnahme am Lehrstuhl für Biotechnologie der RWTH Aachen und die Übernahme des Korreferates.
- Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Fermentation und Informatik sowie der mechanischen und elektronischen Werkstatt und den Mitarbeitern des Fotolabors am IBT 2 für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und die tatkräftige Unterstützung, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.
- Frau Heidi Haase-Reiff danke ich für die kompetente und zuverlässige HPLC-Analytik der Aminosäuren und organischen Säuren. Anschließend auch für ihre kritische Korrektur meines Deutsch in dieser Arbeit.
- Den vielen Händen, die bei der praktischen Durchführung der Arbeit hilfreich zur Stelle waren. Insbesondere seien hier genannt Hr. Simon Curvers, Hr. Andreas Heerwagen, Ina Dahmen und Fr. Susanne Stevens.
- Herrn Dr. R. Takors und Privat Doz. Dr. D. Weuster-Botz für deren Unterstützung und die kritische Durchsicht dieser Arbeit.
- Herrn Prof. Krämer und Herrn Dr. L. Eggeling vom Institut für Biotechnologie 1 (IBT1) des Forschungszentrums Jülich möchte ich ebenfalls für die Zusammenarbeit und die Anregungen zur Durchführung dieser Arbeit danken. Ebenfalls danke ich Susanne Morbach (IBT1) für die Überlassung des L-Isoleucin-Produktionsstammes und Thomas Hermann (IBT1) für die hervorragende Zusammenarbeit bei den Untersuchungen zum Transport und des zellulären Energie im Prozeß.

Und – nicht zuletzt- meiner Ehefrau Petra, die immer Verständniss zeigte, wenn das Privatleben hinter experimentellen Notwendigkeiten zurückstehen mußte.

Forschungszentrum Jülich



Jül-3798
Juli 2000
ISSN 0944-2952

