

Integrierte Prozessentwicklung zur Herstellung von L-Phenylalanin mit Escherichia coli

Marc Gerigk

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3933
ISSN 0944-2952
Institut für Biotechnologie Jül-3933
D 83 (Diss., Berlin, Techn. Univ., 2001)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461/61-5220 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

ZUSAMMENFASSUNG - ABSTRACT

Diese Arbeit fasst die integrierte Prozessentwicklung zur fermentativen Produktion von L-Phenylalanin mit *Escherichia coli* zusammen. Der Begriff „integriert“ bezeichnet dabei die parallele, sich gegenseitig beeinflussende, Entwicklung eines Fermentationsprozesses und die Identifikation eines geeigneten, genetisch veränderten Produktionsstammes. Zudem beschreibt diese Arbeit die Integration einer zeitgleich am Institut etablierten Methode zur Aufreinigung der Aminosäure mittels Reaktiv-Extraktion. Zur Charakterisierung der L-Tyrosinauxotrophen, potentiellen L-Phenylalaninproduzenten wurde ein hierfür universell einsetzbarer Fermentationsprozess entwickelt. Dieser zeichnet sich insbesondere durch eine Regelung der Glucose- und L-Tyrosinzufuhr aus. Um eine optimale Produktion zu gewährleisten, erwies sich eine limitierte Zugabe der essentiellen Aminosäure während der Wachstumsphase und ein Glucoseüberschuss von 5g/l über den Fermentationszeitraum als optimal.

Dieser Prozess war reproduzierbar und in den halbertechnischen Maßstab scale-up fähig. Der Einsatz der geregelten L-Tyrosinzufuhr ermöglichte die Verwendung der für L-Tyrosin feedback-sensitiven DAHP-Synthase (*aroF*). Durch die Überexpression dieses nativen Enzyms und der Identifikation sowie Eliminierung reaktionslimitierender Schritte innerhalb der Aromatenbiosynthese wurde die L-Phenylalaninproduktion signifikant gesteigert. Zum Ende der Stammentwicklung konnten bei geschlossener Kohlenstoffbilanz keine Intermediate der Aminosäuresynthese mehr nachgewiesen werden.

Im Verlauf der Stamm- und Prozessentwicklung wurde die Fermentationsdauer, zur Bildung von über 30g/l L-Phenylalanin, von 50h auf 25h halbiert. Die integrale Produktselektivität wurde von 16,2% auf 24,4% und die integrale Raum-Zeit-Ausbeute von 0,8g/(l*h) auf 1,2g/(l*h) gesteigert.

Nach einem Scale-up des etablierten Fermentationsprozesses (300L) wurde durch die Integration des Aufarbeitungsverfahrens L-Phenylalanin simultan abgetrennt und auf über 98% aufgereinigt. Durch die Verringerung der L-Phenylalaninakkumulation konnte die integrale Produktselektivität von 15% auf über 20% gesteigert werden. Mit der Rückführung des Fermentationsüberstands in den Bioreaktor, wurde in dieser Arbeit ein so genannter Hybridprozess geschaffen und dessen Funktionsfähigkeit erstmals im Pilotmaßstab gezeigt.

This work gives a summary of an integrated process development for the production of L-phenylalanine by *Escherichia coli*. Hereby, the term „integrated“ describes the simultaneous development of the process and of different genetically engineered strains. Furthermore, this work summarises the results obtained by the integration of a reactive-extraction DSP unit into the fermentation process. An universal fermentation strategy was developed in order to characterise potential auxotroph production strains of L-tyrosine. Two closed loop control strategies for glucose (main carbon source) and L-tyrosine were introduced. To obtain optimal amino acid production, L-tyrosine accumulation had to be prevented by limited feeding. Nevertheless, optimal growth should be achieved. Furthermore, an glucose excess of 5g/l was found to be positive for high production rates.

This process was reproducible and a scale-up to pilot scale was successful. The L-tyrosine feed control permitted the use of feed-back sensitive DAHP-synthase (*aroF*). Overexpressing the native enzyme and further identification and elimination of bottlenecks within the aromatic amino acid pathway lead to a significant increase in L-phenylalanine production. Fermentation of the final production strain resulted in the prevention of aromatic amino acid intermediates accumulation.

Genetic engineering as well as process development lead to increasing production rates. Therefore, the fermentation time to reach more than 30g/l L-phenylalanine was reduced from 50h to 25h. The integral product yield increased from 16.2% to 24.4% and the integral space time yield from 0.8g/(l*) to 1.2g/(l* h).

The down stream operation unit was successfully integrated after scale-up to the pilot scale (300L bioreactor). L-phenylalanine was extracted simultaneously from the fermentation process and concentrated up to over 98% using only one purification step. Furthermore, the decreasing amino acid concentration during the fermentation lead to an increase in product yield from 15% to more than 20%. By recirculating the fermentation medium back into the bioreactor, a so-called hybrid process was established which proved its function for the first time in pilot scale.

Inhalt

NOMENKLATUR	XI
1. EINLEITUNG	1
2. STAND DES WISSENS	3
2.1. Biologische Grundlagen	3
2.1.1. Glucoseverwertung in <i>Escherichia coli</i>	3
2.1.2. Synthese aromatischer Aminosäuren in <i>Escherichia coli</i>	5
2.1.3. Möglichkeiten der L-Phenylalaninsynthese mit <i>Escherichia coli</i>	8
2.1.4. Stand der Prozessentwicklung zur L-Phenylalaninproduktion	11
2.2. Reaktionstechnische Grundlagen	15
2.2.1. Prozessführung in Bioreaktoren	15
2.2.2. Kinetische Größen	18
2.2.3. Kohlenstoffbilanz	20
2.3. Verfahrenstechnische Grundlagen der Membranfiltration	21
2.3.1. Einteilung der Membranen und Membrantrennverfahren	22
2.3.2. Vergleich einiger Membran- und Modulkonstruktionen	24
2.3.3. Stofftransport an der Membran	26
2.3.4. Einsatz von Hohlfasermodulen zur Zellabtrennung	31
2.4. Grundlagen der ^1H-NMR	32
2.5. Integration der Produktabtrennung	36
2.5.1. Motivation für den integrierten Ansatz	36
2.5.2. Anforderungen an die Produktabtrennung	37
2.5.3. Reaktiv-Extraktion in der Biotechnologie	38
3. PROBLEMSTELLUNG	41
4. MATERIAL UND METHODEN	45
4.1. Medien und Lösungen	45
4.1.1. LB-Medium	45
4.1.2. Stammlösungen der Salze	45
4.1.3. Spurenelementestammlösung	45
4.1.4. Vorkulturmedium	46

4.1.5.	Hauptkulturmedium	46
4.1.6.	Zulaufmedium 1	47
4.1.7.	Zulaufmedium Glucose	47
4.1.8.	Zulaufmedium L-Tyrosin	47
4.1.9.	Lauge	47
4.1.10.	Antischaummittel	47
4.1.11.	IPTG-Lösung	48
4.1.12.	Proteinmessung und DAHP-Synthaseaktivitätsbestimmung	48
4.1.13.	Fixierlösung für Rasterelektronenmikroskopie	48
4.1.14.	Puffer für on-line Glucoseanalyse	49
4.2.	Biologisches System	49
4.2.1.	Verwendete <i>E. coli</i> Stämme	49
4.2.2.	Stammmhaltung und Vorkultivierung	50
4.3.	Off-line Analytik	51
4.3.1.	Glucose	51
4.3.2.	Optische Dichte	51
4.3.3.	Biotrockenmasse	51
4.3.4.	Plasmidstabilität	52
4.3.5.	HPLC	52
4.3.6.	HPLC intrazellulärer Metabolite	52
4.3.7.	Proteinbestimmung	53
4.3.8.	DAHP-Synthaseaktivität	53
4.3.9.	Raster-Elektronen-Mikroskopie	54
4.3.10.	Zellzahl und Zellgrößenverteilung	55
4.3.11.	¹ H-NMR extrazellulärer Metabolite	55
4.4.	On-line Analytik	56
4.4.1.	pH-Wert	56
4.4.2.	Sauerstoffpartialdruck	56
4.4.3.	Druck, Temperatur, Begasung	56
4.4.4.	CO ₂ und O ₂ im Abgas	57
4.4.5.	Glucose	57
4.5	Filtration	60
4.5.1.	Verwendete Hohlfaserfiltrationsmodule und Pumpen	61
4.5.2.	Handhabung von Hohlfasermodulen	62
5.	APPARATIVER AUFBAU UND FERMENTATIONS DURCHFÜHRUNG	63
5.1.	Fermentation im Schüttelkolben (Zulaufverfahren)	63

5.2. Fermentation im 7,5 l Bioreaktor (Zulaufverfahren)	65
5.2.1. Anschluss des Filtrationsumlaufs	67
5.3. Fermentation im 7,5 l Bioreaktor (kontinuierliches Verfahren)	69
5.4. Fermentation im 20 l Bioreaktor (Zulaufverfahren)	72
5.4.1. Prozessdatenerfassung	75
5.4.2. Kontinuierliche Probenahme	76
5.4.3. Regelung der Glucosekonzentration	78
5.4.4. Indirekte Regelung der L-Tyrosinzufuhr	80
5.5. Fermentation im 300 l Bioreaktor (Zulaufverfahren)	81
5.5.1. Kontinuierliche Permeatabtrennung	82
5.5.2. Integration der Reaktiv-Extraktion	85
6. ERGEBNISSE	89
6.1. Voruntersuchungen im Schüttelkolben und 20 l Bioreaktor	89
6.1.1. Auswahl eines geeigneten Mediums	89
6.1.2. IPTG-Induktion	90
6.1.3. Temperatur und pH-Wert	91
6.1.4. L-Phenylalanineinfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit	94
6.2. Verfahrensentwicklung zur L-Phenylalaninproduktion	95
6.2.1. Ausgangssituation	96
6.2.2. Regelung der Glucosezufuhr	97
6.2.3. Einfluss der Glucosekonzentration auf den Prozess	98
6.2.4. Indirekte Regelung der L-Tyrosinzufuhr	103
6.2.5. Einfluss der L-Tyrosinzufuhr auf den Prozess	107
6.2.6. Übertragung in den Pilotmaßstab	112
6.2.7. Ansatz zur weiteren Prozessoptimierung	113
6.2.8. Einfluss von D ₂ EHPA auf den Fermentationsverlauf	115
6.3. Auswirkung des Produktes auf das biologische System	117
6.3.1. Kontinuierliche Fermentation von <i>E. coli</i> 4pF26	118
6.4. Fermentationstechnik in der Stammentwicklung	122
6.4.1. Ausgangssituation	122
6.4.2. Fermentation von <i>E. coli</i> 4pF20	124
6.4.3. Fermentation von <i>E. coli</i> 4pF26	126
6.4.4. Fermentation von <i>E. coli</i> 4pF69	128
6.4.5. Fermentation von <i>E. coli</i> 4pF79	130

6.4.6.	Fermentation von <i>E. coli</i> 4 _p F79 _p F63	133
6.4.7.	Fermentation von <i>E. coli</i> 4 _p F81	134
6.4.8.	Fermentation von <i>E. coli</i> 18	137
6.5.	Integration der Aufarbeitung	138
6.5.1.	Verfahrensentwicklung zur Permeatabtrennung	139
6.5.2.	Integration der Filtration im Pilotmaßstab	142
6.5.3.	Integration der Reaktiv-Extraktion im Pilotmaßstab	144
7.	FEHLERBETRACHTUNG	151
8.	DISKUSSION	155
8.1.	Voruntersuchungen zur Prozessentwicklung	155
8.1.1.	Medienauswahl	155
8.1.2.	IPTG-Konzentration	156
8.1.3.	Temperatur und pH-Wert	156
8.1.4.	Einfluss von L-Phenylalanin auf das Wachstum	157
8.2.	Verfahrensentwicklung zur L-Phenylalaninproduktion	158
8.2.1.	Regelung der Glucosezufuhr	158
8.2.2.	Einfluss der Glucosekonzentration	159
8.2.3.	Regelung der L-Tyrosinzufuhr	162
8.2.4.	Einfluss der L-Tyrosinregelung	163
8.2.5.	Ansatz zur Prozessoptimierung	166
8.3.	Maßstabsvergrößerung	167
8.4.	Untersuchungen zum Zellzustand	168
8.4.1.	Einfluss von D ₂ EHPA auf den Fermentationsverlauf	168
8.4.2.	Einfluss von L-Phenylalanin auf den Zellzustand	170
8.5.	Integration der Aufarbeitung	171
8.6.	Stammentwicklung	177
8.6.1.	<i>E. coli</i> 4 _p F20	178
8.6.2.	<i>E. coli</i> 4 _p F26	179
8.6.3.	<i>E. coli</i> 4 _p F69	180
8.6.4.	<i>E. coli</i> 4 _p F79	181
8.6.5.	<i>E. coli</i> 4 _p F81	182
8.6.6.	<i>E. coli</i> 4 _p F79 _p F63 und <i>E. coli</i> 18	184
8.6.7.	Kohlenstoffverteilung und Qualität der Analytik	185
8.6.8.	Gegenüberstellung der L-Phenylalaninproduzenten	187

9. ZUSAMMENFASSUNG	197
10. AUSBLICK	201
11. LITERATURVERZEICHNIS	207
12. ANHANG	225
12.1. Chemikalienliste	225
12.2. Geräteliste	226
12.3. ¹ H-NMR-Geräteparameter	228
12.4. HPLC-Geräteparameter	229
12.5. Zusätzliche Nährmedien	230
12.6. Prüfbereich zur Untersuchung von L-Phenylalanin	233
12.7. Stöchiometrische Annahmen zur Stoffflussanalyse	236
12.8. REM-Aufnahmen	237
12.9. ¹ H-NMR-Spektren	242

NOMENKLATUR

Lateinische Symbole und Formelzeichen:

ΔA	Absorptionsänderung	[1/min]
B	Homogenes, statisches Magnetfeld	[T]
B_0	äußeres Magnetfeld	[T]
C	Konzentration	[mol/l]; [g/l]
CER	Kohlendioxidbildungsrate („Carbondioxide Evolution Rate“)	[mol/(l*h)]
CTR	Kohlendioxidtransportrate	[mol/(l*h)]
D	Durchmesser	[m]
D	Diffusionskoeffizient	[m ² /s]
D	Durchflussrate	[l/h]
D	Küvettenbreite	[cm]
Def	Definition	
E	Empfindlichkeit	[J]
J	Permeatfluss	[l/(m ² *h)]
K	Stoffübergangskoeffizient	[-]
K_S	Aufnahmekoeffizient	[mol/l]
L	Länge des Filtrationsmoduls	[m]
M	Molmasse	[g/mol]
M	Zulauffaktor	[mM/g]
OTR	Sauerstofftransportrate	[mol/(l*h)]
OUR	Sauerstoffaufnahme („Oxygen Uptake Rate“)	[mol/(l*h)]
P	Eigendrehimpuls	[J/s]
P	Produkt	
P; p	Druck	[bar]
PH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration (potentia hydrogenii)	[-]
Ppm	“parts per million”	
R	Reaktionsrate	[1/h]
R	Widerstand	[1/m]
Re	Reynoldszahl	[-]
RQ	Respirationsquotient	[-]

RZA	Raum-Zeit-Ausbeute	[g/(l*h)]
S	Substrat	
Sc	Schmidtzahl	[-]
Sh	Sherwoodzahl	[-]
t	Zeit	[h]
T	Temperatur	[°C]
TMP	Transmembrandruck	[bar]
U	Enzymaktivität	[mg/min]
V	Volumen	[l]
v	Volumenstrom	[l/h]
v	Probevolumen	[l]
w	Anteil	[g/g]; [mol/mol]
X	Biomasse	
Y	molarer Anteil	[mol/mol]
Y	Selektivität / Ausbeute	[mol/mol]

Griechische Symbole und Formelzeichen:

α, β, γ	prozessspezifische Konstanten	[-]
β	Stoffübergangskoeffizient	[cm/s]
δ	chemische Verschiebung	[-]
δ	Schichtdicke	[m]
ε	Extinktionskoeffizient	[1/(M*cm)]
γ	magnetogyrisches Verhältnis	[rad/Ts]
η	dynamische Viskosität	[Pa*s]
λ	Wellenlänge	[nm]
μ	magnetisches Moment	[Gy*A]
μ	Wachstumsrate	[g/(g*h)]
ν	kinematische Viskosität	[m²/s]
ν	Resonanzfrequenz	[1/s]
ν	stöchiometrischer Koeffizient	[-]
π	Produktbildungsrate	[g/(g*h)]; [g/(l*h)]
ρ	Dichte	[g/l]
σ	Abschirmungskonstante	[-]

σ	Substratverbrauchsrate	[g / (g*h)]; [g / (l*h)]
τ	Verweilzeit	[h]
ω	Überströmungsgeschwindigkeit	[m/s]

Indizes:

0	Zum Zeitpunkt 0
α	Eingang
aq	aqua (wässrige Lösung)
B	Komponente in Richtung B_0
B	Komponenten im Fermentationsüberstand
C	Kohlenstoff
diff	Differentiell
eff	Effektiv
F	Flüssig
F	Flüssig
F	Zulauf ("Feed")
fbr	feedback-resistant
Ferm	Fermentationsvolumen
G	Gasförmig
G	Gas
G	Gelschicht
G	Grenzschicht
ges	Gesamt
I	Innen
I	Zum Zeitpunkt i
in	Am Einlauf des Reaktors
integr	Integrativ
M	Anzahl der Komponenten
M	Mittleres
M	Membran
max	Maximal
N	Bezeichnung der Komponente
out	Am Auslauf des Reaktors
P	Produkt

P	Permeat
PW	Porenwand
R	Reaktor
R	Resistenz
S	Substrat
spez	spezifisch
tyr	L-Tyrosin
wt	wildtyp
X	Biomasse
ω	ausgang

Abkürzungen:

$^1\text{H-NMR}$	Proton-Kernresonanz-Spektrometrie („Nuclear-Magnetic-Resonance“)
A/D	Analog/Digital
amp^R	Ampicillinresistenzgen
aroA^{wt}	Wildtypgen der 3-Enolpyruvylshikimat-5-Phosphat-Synthase von <i>E. coli</i>
aroB^{wt}	Wildtypgen der 3-Dehydroquinsynthese von <i>E. coli</i>
aroC^{wt}	Wildtypgen der Chorismatsynthase von <i>E. coli</i>
aroF^{fbr}	Gen der feedback deregulierten L-Tyrosinspezifischen 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat-Synthase von <i>E. coli</i>
aroF^{wt}	Wildtypgen der L-Tyrosinspezifischen 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat-Synthase von <i>E. coli</i>
<i>AroG</i>	Gen der L-Phenylalaninspezifischen 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat-Synthase von <i>E. coli</i>
<i>AroH</i>	Gen der L-Tryptophanspezifischen 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat-Synthase von <i>E. coli</i>
aroL^{wt}	Wildtypgen der Shikimatkinase II von <i>E. coli</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BTM	Biotrockenmasse
BTP	1,3-bis[tris(Hydroxymethyl)methylamino]propan
cam^R	Kanamycinresistenzgen
CASY	Cell Counter and Analyser System
CIP	Cleaning in place

CW-NMR	Continuous-Wave-Nuclear-Magnetic-Resonance
D ₂ EHPA	Di-2-Ethylhexyl-Phosphorsäure
DAH	3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat
DAHP	3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat
DHQ	3-Dehydroquinat
DHS	Dehydroshikimat
DSP	Down Stream Process
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E4P	Erythrose-4-Phosphat
ELM	Emulsion Liquid Membrane
EPSP	5-Enolpyrovylshikimat-3-Phosphat
FBP	Fructose-1,6-Bis-Phosphat
<i>glf</i>	Gen des Glucosefacilitators von <i>Zymomonas mobilis</i>
<i>glk</i>	Gen der Glucosekinase von <i>Zymomonas mobilis</i>
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography
IBT	Institut für Biotechnologie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
<i>lac</i>	Promotor des β-Galaktosidasegens von <i>E. coli</i>
LB	Lauria Bertani
L-Phe	L-Phenylalanin
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MS	Massenspektrometrie
MV	Minimalvarianz
NAD(H)	Nikotinaminadenindinukleotid(reduziert)
NADP(H)	Nikotinaminadenindinukleotidphosphat(reduziert)
OD _{620nm}	Optische Dichte bei 620 nm
OLGA	On-line Glucose Analyser
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	Personal Computer
PEP	Phosphoenolpyruvat
PFT-NMR	Pulse-Fourier-Transform- Nuclear-Magnetic-Resonance
<i>pheA^{fb}</i>	Gen der feedback deregulierten L-Phenylalaninspezifischen Chorismatmutase-/Prephenatdehydratase von <i>E. coli</i>
<i>pheA^{wt}</i>	Wildtypgen der L-Phenylalaninspezifischen Chorismatmutase-

	/Prephenatdehydratase von <i>E. coli</i>
PID	Proportional-Integrativ-Differentiell
pO ₂	„Gelöstsauerstoffkonzentration“ [%] (Sauerstoffpartialdruck)
<i>ppc</i>	Gen der PEP-Carboxylase von <i>E.coli</i>
PPP	Pentose-Phosphate-Pathway
<i>pps</i>	Gen der Phosphoenolpyruvat-Synthase von <i>E. coli</i>
PTS	Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System
<i>pts</i>	Gen des Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System von <i>E.coli</i>
PVC	Polyvinylchlorid
<i>pyk</i>	Gen der Pyruvatkinase von <i>E.coli</i>
Pyr	Pyruvat
REM	Raster-Elektronen-Mikroskopie
RP	Reversed Phase
rpm	Umdrehung pro Minute
S3P	Skikimat-3-Phosphat
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SIA	Sequential-Injection-Analyser
SIP	Sterilisation in place
spez.	spezifisch
<i>tac</i>	Gentechnisch modifizierter Promotor des β -Galaktosidasgens von <i>E. coli</i>
<i>tal</i>	Gen der Transaldolase von <i>E. coli</i>
TCA	Tri Carbon Acid
<i>tkt</i>	Gen der Transketolase von <i>E. coli</i>
TOF	time of flight
TSP	3-tri-methylsilyl-propion-2,2,3,3-d-säure
<i>tyrA^{wt}</i>	Wildtypgen der L-Tyrosinspezifischen Chorismatmutase- /Prephenatdehydrogenase von <i>E. coli</i>
<i>tyrR</i>	Gen des L-Tyrosinregulons von <i>E. coli</i>
UV	Ultraviolett
vol.	volumetrisch

„Die Wissenschaft braucht Zusammenarbeit,
in der sich das Wissen des einen
durch die Entdeckungen des anderen bereichert“

José Ortega y Gasset

1. EINLEITUNG

Die Biotechnologie ist definitionsgemäß die integrierte Anwendung von Naturwissenschaften und Ingenieurwissenschaften mit dem Ziel, Organismen, Zellen, Teile daraus und molekulare Analoge technisch zu nutzen [1].

Schon seit fünf- bis sechstausend Jahren hat der Mensch dieses Arbeitsgebiet erschlossen. Zunächst wurden die natürlichen Stoffwechselleistungen von Mikroorganismen zur Produktion von Nahrungsmitteln wie Bier, Wein, Essig, Joghurt und Käse genutzt. Anfang des 20. Jahrhunderts begann die gezielte Produktion von Metaboliten, wie der Citronensäure. Im Zuge der technischen Entwicklung wurden durch Selektionsdruck und Mutagenese, Hochleistungsproduktionsstämme erzeugt, jedoch ohne über ein fundiertes Verständnis der Zellphysiologie und Stoffwechselwege zu verfügen.

Im Laufe der letzten Jahrzehnte hat insbesondere die Molekulargenetik zu einem immer größeren Verständnis der Zellfunktion geführt. So eröffnen heute moderne Techniken wie Genomanalyse, Proteindesign oder „Metabolic Engineering“, noch vor einigen Jahren ungeahnte Möglichkeiten, niedermolekulare Substanzen, pharmazeutische Wirkstoffe oder Proteine, durch Mikroorganismen effektiv herstellen zu können. Durch Umsetzung dieses Wissens in neue Produkte, ist so in den letzten zehn bis zwanzig Jahren ein neuer Wirtschaftszweig entstanden.

Ein Teil dieser anwendungsorientierten Wissenschaft befasst sich mit der Herstellung von niedermolekularen Molekülen. Hierbei spielt die Produktion von Aminosäuren eine bedeutende Rolle. Im Laufe der Jahre wurden zahlreiche Anwendungsgebiete für isolierte Aminosäuren erschlossen, so dass die technische Aminosäuregewinnung heute von wesentlichem wirtschaftlichem Interesse ist. Neben der Lebensmittelindustrie, werden großtechnisch hergestellte Aminosäuren heute in der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie, sowie in der Landwirtschaft eingesetzt. Lag die Weltjahresproduktion 1992 bei 800.000 t mit einem Marktwert von umgerechnet 2,4 Mrd. US \$ [2], so erreicht heute allein die jährliche Produktion der Aminosäuren L-Glutamat und L-Lysin einen Umfang von 1.200.000 t pro Jahr [3].

Die Aminosäure L-Phenylalanin wird zum überwiegenden Teil für die Produktion des künstlichen Süßstoffes Aspartam eingesetzt. Mit ungefähr 10.000 t/a gehört sie zu den Aminosäuren mit einem der größeren Marktvolumen. Aufgrund des wachsenden Süßstoffmarktes ist auch ein steigender Bedarf an L-Phenylalanin zu erwarten [4]. Zur Herstellung der Aminosäure wurden anfangs enzymatische Methoden oder Ganzzellbiotransformationen eingesetzt. Die kostenintensive Bereitstellung von synthetischen Vorstufen führte jedoch zur Entwicklung von Fermentationsverfahren mit Überproduzenten,

die die direkte Produktion von L-Phenylalanin aus Glucose und Ammoniak ermöglichen [193].

Die Holland Sweetener Company, ein Joint Venture der niederländischen DSM und der japanischen Tosoh, gehört zusammen mit NutraSweet Kelco Company und Ajinomoto zu den größten Aspartamproduzenten der Welt [210]. Das hier angewendete Verfahren basiert auf der enantioselektiven Kopplung von Z-Aspartat und L-Phenylalanin-methylester. Aufgrund der Eigenschaften des verwendeten Enzyms ist der Einsatz von D/L-Phenylalanin möglich [94]. Das verbleibende D-Phenylalanin muss anschließend racemisiert werden, wodurch zusätzliche Kosten entstehen. Eine Verwendung von fermentativ hergestelltem L-Phenylalanin ist daher ökonomisch sinnvoller.

Die Entwicklung eines fermentativen Produktionsverfahrens erfolgt meistens sequentiell. Zunächst wird der Produktionsstamm gentechnisch hergestellt, anschließend erfolgt die Entwicklung des Fermentationsprozesses und die Optimierung der Reaktionsbedingungen. Zum Abschluss wird ein Verfahren zur Produktabtrennung und -aufreinigung etabliert. Diese Vorgehensweise führt zu langen Entwicklungszeiten und sehr oft zu nicht optimalen Gesamtprozessen. Durch die parallele Entwicklung von Produktionsstamm, Fermentationsprozess und Aufarbeitung, kann die Zeit bis zum vollständigen Prozess wesentlich verkürzt, und durch aktive gegenseitige Beeinflussung der Teilbereiche, ein besseres Gesamtverfahren etabliert werden. Eine solche Entwicklungsstrategie setzt allerdings ein interdisziplinäres Team und ein hohes Maß an Zusammenarbeit voraus.

Während der fermentativen Herstellung von L-Phenylalanin mit *E. coli* akkumuliert das Produkt im Reaktor. Verschiedene Autoren vermuten, dass eine Produktinhibierung durch die Aminosäure zu einer Reduktion der erreichbaren Raum-Zeit-Ausbeute führt [31]. Arbeiten zur Analyse dieser Inhibierungen waren bisher nur biochemischer Art in Form von *in vitro* Untersuchungen [34]. Bei der fermentativen Herstellung von L-Tryptophan konnte jedoch eine Produktinhibierung beobachtet werden. Durch Integration eines Aufarbeitungsprozesses in den Produktionsprozess zur selektiven Abtrennung von L-Phenylalanin, könnte eine Akkumulation vermieden und demzufolge eine höhere Raum-Zeit-Ausbeute erreicht werden.

Im Rahmen des BioRegio-Projektes „Mikrobielle Aromatensynthese auf Zuckerbasis“ sollte, ausgehend von einem *Escherichia coli* Wildtypstamm, unter anderem ein fermentativer Zugang zu L-Phenylalanin gefunden werden. Ziel war die effiziente Entwicklung eines Produktionsprozesses - durch parallele Arbeiten - in allen drei Teilen der Verfahrensentwicklung. Die Projektpartner waren die Institute für Biotechnologie 1 und 2 des Forschungszentrums Jülich und die DSM-Biotech, ein Tochterunternehmen der holländischen DSM.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Entwicklung des Fermentationsprozesses zur Herstellung von L-Phenylalanin mit *Escherichia coli*. Den reaktionstechnischen Untersuchungen kam eine zentrale Bedeutung zu, da diese Ergebnisse, neben der verfahrenstechnischen Entwicklung, auch zur Stammentwicklung beitragen sollten. Vergleichbares galt auch für die Entwicklung des Aufarbeitungsprozesses. Hier sollte durch die Integration der Aufarbeitung in den Fermentationsprozess, ein neuartiger Hybridprozess entstehen. Dieses Verfahren sollte bis in den industriellen Maßstab scale-up fähig sein.

2. STAND DES WISSENS

2.1. BIOLOGISCHE GRUNDLAGEN

Escherichia coli ist ein umfassend untersuchter Prokaryont. Es zählt zu den ersten vollständig sequenzierten Organismen. Viele Erkenntnisse über genetische und stoffwechselphysiologische Vorgänge in Prokaryontenzellen wurden durch die Arbeit mit ihm gewonnen. *E. coli* ist ein einfach zu kultivierender Organismus mit einem kleinen Genom ($\sim 5 \cdot 10^6$ Kilobasenpaare) [5].

E. coli ist gram-negativ, peritrich begeißelt, und bildet keine Sporen. Als Darmbewohner gehört es zur Gruppe der Enterobacteriaceae (lat. „enteron“: Darm). Aufgrund begrenzter Überlebensfähigkeit außerhalb des Darmes dient es als Indikator für die fäkale Verunreinigung von Wasser [5].

Die Energiegewinnung erfolgt bei *E. coli* sowohl durch Atmung als auch durch gemischte Säuregärung. Das befähigt *E. coli* zu einer fakultativ anaeroben Lebensweise.

2.1.1. GLUCOSEVERWERTUNG IN *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli kann Glucose als Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen. Sie wird unter aeroben Bedingungen zu über 70% über den Fructose-1,6-Bis-Phosphat-Weg (FBP-Weg) und zu fast 30 % über den Pentose-Phosphat-Weg (PP-Weg) abgebaut [5]. Der 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat-Weg spielt nur eine untergeordnete Rolle.

Der PP-Weg dient der Bereitstellung wichtiger Intermediate, z.B. Ribose-5-Phosphat für die Nucleotidsynthese, Erythrose-4-Phosphat (E4P) für die Synthese aromatischer Aminosäuren und NADPH₂ als Reduktionsäquivalent [6].

Der Glucoseabbau über den FBP-Weg führt unter aeroben Bedingungen in den Tricarbonacidzyklus (TCA-Zyklus) (siehe Abbildung 1). Dabei werden ATP und Reduktionsäquivalente in Form von NADH₂ und FADH₂ gebildet, die in der Atmungskette zur Bildung von ATP verwendet werden können. Die dabei freiwerdenden Elektronen werden auf Sauerstoff übertragen. Gebildetes NADPH₂ findet im anabolischen Stoffwechsel als Reduktionsmittel Verwendung. Die Glucose wird neben der Oxidation zu CO₂ im aeroben Stoffwechsel auch als Kohlenstoffquelle für die Synthese von Biomasse und Produkten verwendet [7].

Neben der Erzeugung von Energie- und Reduktionsäquivalenten spielt der TCA-Zyklus auch eine wichtige Rolle in der Bereitstellung von Vorstufen für die Biosynthese. Da ihm dabei die Intermediate entzogen werden, muss der Zyklus durch anaplerotische Reaktionen wieder aufgefüllt werden. Die wichtigste anaplerotische Reaktion ist die Carboxylierung von PEP (Phosphonolpyruvat) zu Oxalacetat [8].

Escherichia coli ist neben der aeroben Lebensweise auch in der Lage, unter anaeroben Bedingungen zu leben. Sauerstoff steht den Zellen dann als terminaler Elektronenakzeptor nicht zur Verfügung. Bei obligaten Aerobiern kommt die Atmungskette zum Erliegen und die Zellen sterben ab.

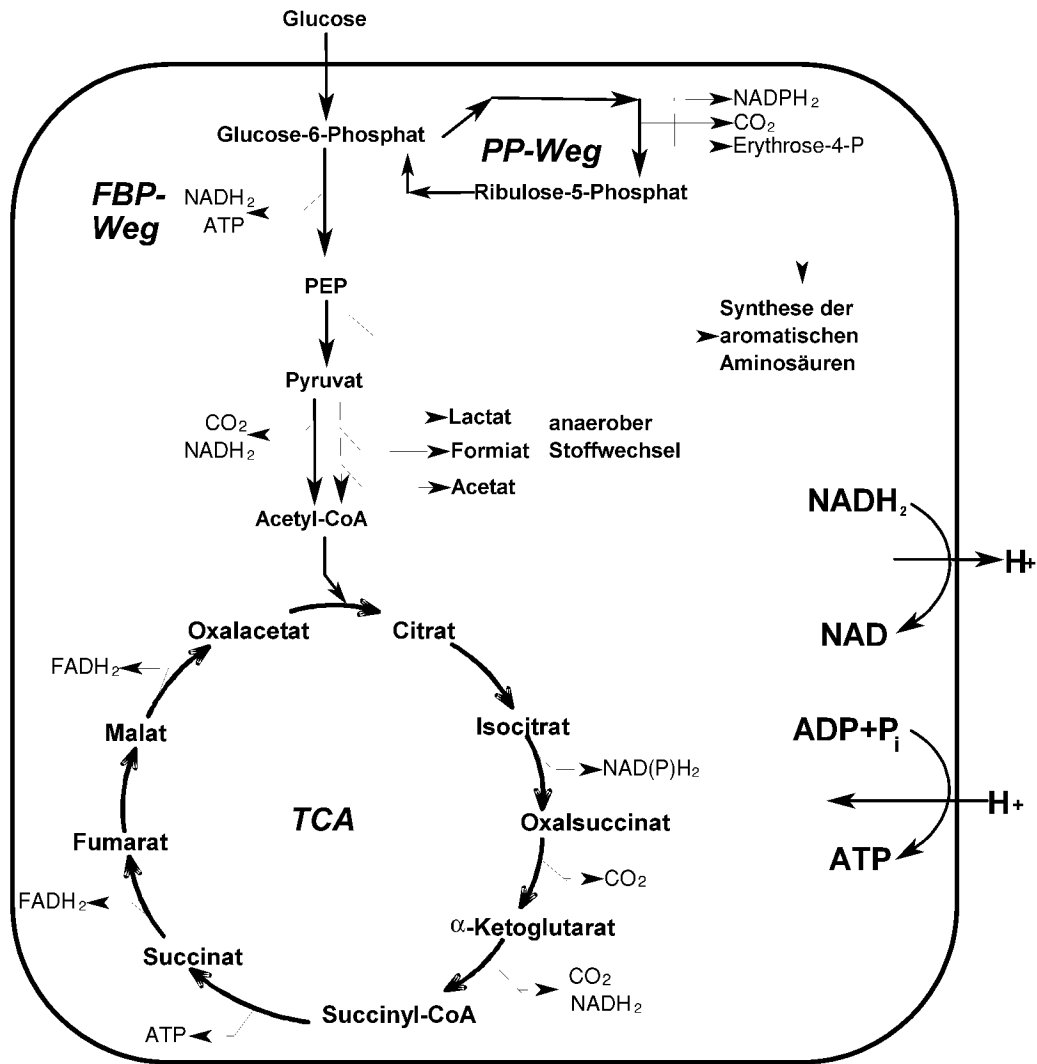


Abbildung 1: Schema der Glucoseverwertung bei *Escherichia coli*.

Viele Anaerobier haben durch Gärung die Möglichkeit, organische Substrate zu Spaltprodukten, CO₂ und Protonen abzubauen. Die Spaltprodukte dienen als Elektronenakzeptoren und werden ausgeschieden, Art und Zusammensetzung der Gärprodukte variieren dabei. *Escherichia coli* scheidet verschiedene Gärprodukte aus, z.B. Acetat, Lactat, Ethanol, Succinat und Formiat [5].

Die Energieausbeute ist unter anaeroben Bedingungen schlechter als bei aeroben Verhältnissen. Bei der Veratmung von 1 mol Glucose kann *E. coli* 26 mol ATP regenerieren, die Vergärung von 1 mol Glucose führt, je nach Stoffwechselweg, zu 1 bis 4 mol ATP [5].

Die Organismen reagieren auf Sauerstoffmangel mit einem gesteigerten Substratumsatz, da für die Gewinnung einer der Atmung entsprechenden Menge an ATP ein Vielfaches an Substrat umgesetzt werden muss.

Der Substratumsatz wird auch durch hohe Glucosekonzentrationen bei ausreichender Sauerstoffversorgung erhöht. Es kommt zu einer Art Überschussstoffwechsel, dem sogenannten bakteriellen „Crabtree-Effekt“. Diesem liegen keine aktiven Regulationsmechanismen zugrunde, sondern ein „Glucose-Überschuss-Metabolismus“. Der

Substratüberschuss führt zu einem so hohen Stofffluss durch den Fructose-1,6-Bis-Phosphat-Weg, dass die Endprodukte akkumulieren, in Acetat umgewandelt und von der Zelle ausgeschieden werden. Dieses führt zu einer partiellen aeroben Gärung (vgl. Abbildung 1).

Für die Biotechnologie ist die Kenntnis dieser Stoffwechselvorgänge von großer Bedeutung. So ist die aerobe Prozessführung und eine geeignete Kontrolle der Glucosekonzentration für die Produktion einer Aminosäure mit *Escherichia coli* unerlässlich, weil das Substrat beim Auftreten des „Glucose-Überschuss-Metabolismus“ in unerwünschte Nebenprodukte umgewandelt wird. Dadurch sinkt die Produktausbeute und die Aufarbeitung wird aufwendiger [9, 10, 11].

Neben der Bereitstellung von Sauerstoff, Substrat und Spurenelementen als Cofaktoren, muss bei vorliegenden Auxotrophien eine Versorgung der Zellen mit entsprechenden Vitaminen und Aminosäuren gewährleistet werden.

2.1.2. SYNTHESE AROMATISCHER AMINOSÄUREN IN ESCHERICHIA COLI

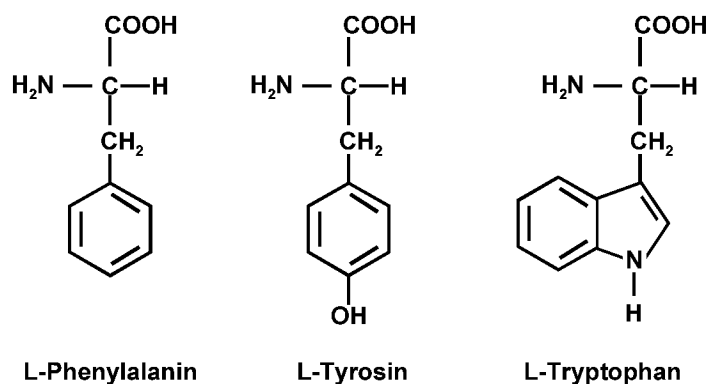


Abbildung 2: Die Familie der natürlich vorkommenden aromatischen Aminosäuren.

Zu der Familie der aromatischen Aminosäuren gehören L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan. Abbildung 2 zeigt die Struktur der drei Aminosäuren. Das Kohlenstoffgerüst stammt von 2 mol PEP und 1 mol E4P, also Intermediaten der Glycolyse bzw. des PP-Weges (vgl. Abbildung 1). Bis zum Chorismat ist der Syntheseweg für alle drei Aminosäuren gleich (siehe Abbildung 3).

Aus Chorismat wird Prephenat gebildet, wenn L-Phe oder L-Tyrosin hergestellt werden soll. Für die Synthese von L-Tryptophan muss Chorismat zunächst zu Anthranilat umgewandelt werden. Die Aminogruppe wird erst im letzten Syntheseschritt auf das Kohlenstoffgerüst übertragen [192].

Die Aktivität einiger Enzyme dieses Stoffwechselwegs ist von der Anwesenheit bestimmter Metallionen abhängig. Zum Beispiel benötigen die L-Phe (*aroG*), L-Tyrosin (*aroF*) und L-Tryptophan (*aroH*)-spezifischen Isoenzyme der DAHP-Synthase (3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat-Synthase, siehe Abbildung 3) Eisen [12], während die Chorismatsynthase (*aroC*) durch zu hohe Eisenkonzentrationen inhibiert wird [13]. Die

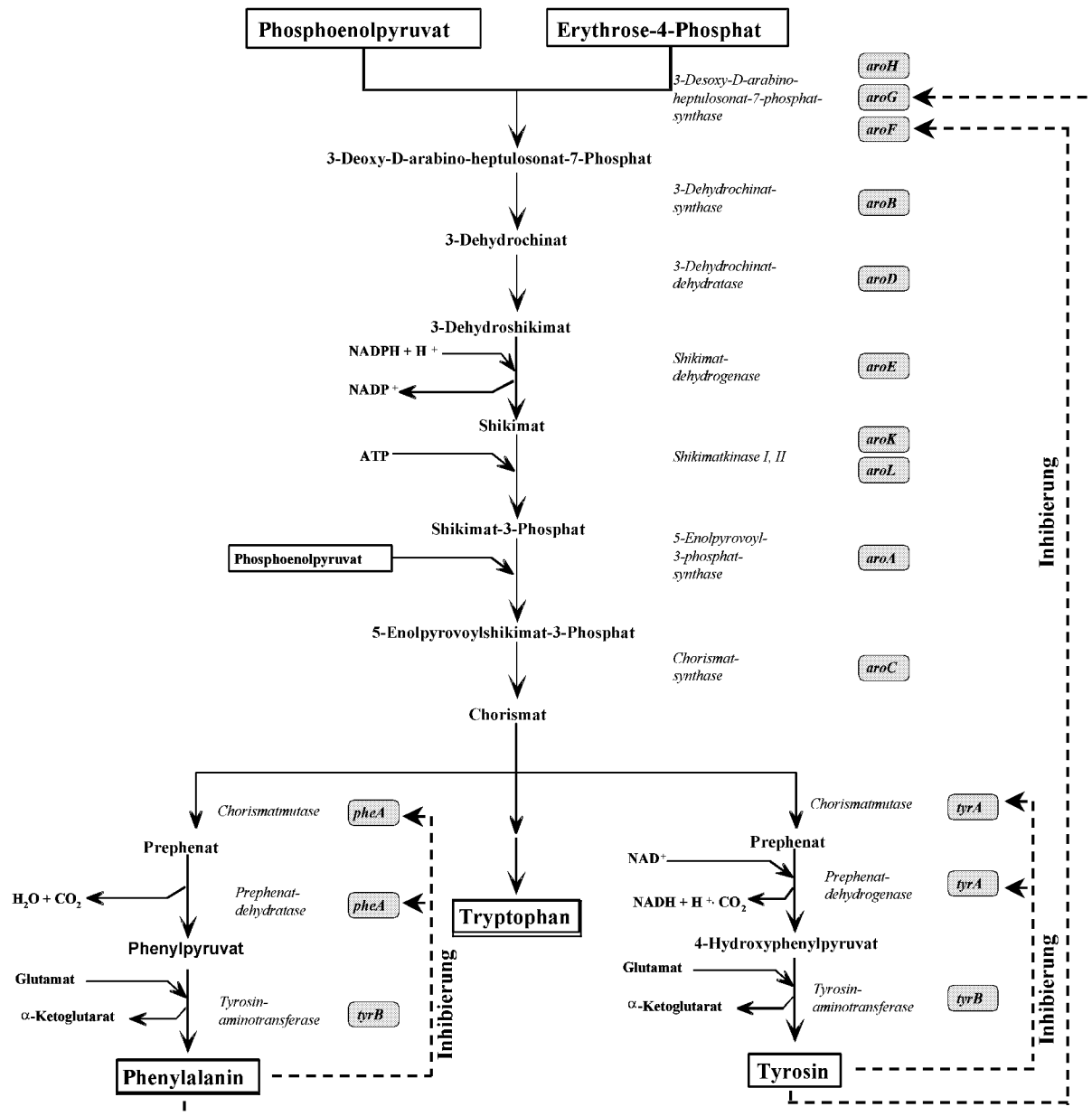


Abbildung 3: Schema der Synthese aromatischer Aminosäuren bei *E. coli*.

Für die Zelle ist es energetisch sinnvoll, ähnliche Substanzen über die gleichen Synthesewege herzustellen und nicht alle Enzyme konstitutiv bereitzustellen. Die Existenz von effektiven Regulationsmechanismen ist unerlässlich, um die Biosynthese an den aktuellen Bedarf der Zelle anpassen zu können.

Im ersten Schritt der Synthese aromatischer Aminosäuren, der Verknüpfung von PEP und E4P zu DAHP (3-Desoxy-D-Arabino-Heptulose-7-Phosphat), findet eine Regulation der Enzymaktivität und Genexpression statt. Für die Kondensation zum DAHP stehen drei isofunktionelle Metalloenzyme zur Verfügung, die sich in ihrer Struktur unterscheiden. Sie werden von den Genen *aroH*, *aroG* und *aroF* kodiert (siehe Abbildung 3). Die Synthese und

die Aktivität jedes Enzyms wird hauptsächlich durch die Konzentration von jeweils einer aromatischen Aminosäure reguliert. So inhibiert L-Phe die durch *aroG* kodierte DAHP-Synthase, wogegen L-Tyrosin spezifisch die DAHP-Synthase, kodiert durch *aroF* und L-Tryptophan, spezifisch das durch *aroH* kodierte Enzym hemmt. Keine Inhibierung ist jedoch vollständig. Während L-Phe und L-Tyrosin die entsprechenden spezifischen Enzyme zu ungefähr 95 % hemmen, wird die L-Tryptophanspezifische DAHP-Synthase nur zu max. 60 % inhibiert [15]. Zudem ist bekannt, dass die L-Tyrosinspezifische DAHP-Synthase auch durch hohe Konzentrationen an L-Phe gehemmt wird, das L-Phe-spezifische Enzym wiederum durch L-Tryptophan reguliert wird [16].

Auf der Ebene der Transkription ist die Regulation ähnlich ausgeprägt. Pittard fasst zusammen [192], dass die L-Tyrosinspezifische DAHP-Synthase durch die Aktivierung des *tyrR*-Regulons, in Anwesenheit von L-Tyrosin- (> 36 mg/l [140]) oder auch sehr hohen L-Phe-Konzentrationen, reprimiert wird (Expressionrate verringert sich auf ungefähr 2,5 %). Gleiches gilt für die L-Phe-spezifische DAHP-Synthase, nur, dass hier die Regulation wesentlich schwächer ausgeprägt ist. Über eine Repression von *aroH* ist nichts bekannt.

Der zweite stark regulierte Schritt in der Aromatenbiosynthese, bezogen auf L-Tyrosin und L-Phe, ist die Umwandlung von Chorismat (siehe Abbildung 3). L-Phe hemmt die Chorismat-Mutase/Prephenatdehydratase (kodiert durch *pheA*), L-Tyrosin inhibiert die Chorismat-Mutase/Prephenatdehydrogenase, die durch *tyrA* kodiert wird [192]. L-Phe kann die erste Aktivität des bifunktionalen Enzyms zu maximal 90 %, die zweite Aktivität zu maximal 55 % hemmen [17,18]. Auf Ebene der Transkription findet bei diesem Enzym (*pheA*) keine Repression statt, sondern eine Regelung der Expressionsrate über Attenuation [19].

Eine weitere Regulation der Aromatenbiosynthese findet über die Expressionsrate der Shikimatkinase II, kodiert durch *aroL*, statt (siehe Abbildung 3). Dieses Enzym wird nicht inhibiert, jedoch erfolgt bei einem Überschuss an L-Tyrosin oder L-Tryptophan über die Expression des *tyrR*-Regulons eine Repression der Transkription. Dadurch wird nur ein Zehntel der normal vorhandenen Enzymmenge gebildet [20]. Vor allem durch diese Regulationsschritte ist der Organismus in der Lage, das Ausmaß der Chorismatbildung und die weitere Umwandlung des Chorismats an seinen aktuellen Bedarf an aromatischen Aminosäuren anzupassen [192].

Alle weiteren an der L-Phe-Synthese beteiligten Enzyme im Aromatenbiosyntheseweg werden weder reprimiert noch reguliert. Ihre Expression erfolgt konstitutiv [21]. Trotzdem können auch hier Limitierungen der L-Phe-Synthese hervorgerufen werden. So konnte Ogino et. al. zeigen [22], dass bei Verwendung eines *E. coli* Stammes, der über eine feedback-resistente DAHP-Synthase verfügt, DAHP in den Zellen akkumulierte. Dies ist ein Hinweis, dass auch die 3-Dehydrochinatsynthese (siehe Abbildung 3), kodiert durch *aroB*, zum reaktionslimitierenden Schritt werden kann. Vergleichbares gilt für die Chorismatsynthese (siehe Abbildung 3), kodiert durch *aroC*. Hier konnte gezeigt werden, dass die spezifische Aktivität nur bei 10 - 20 % der Aktivität der stromaufwärts liegenden EPSP-Synthase (5-

Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat) (*aroA*) liegt [23] und somit bei hohen Produktbildungsraten reaktionslimitierend sein kann.

Die Überproduktion einer aromatischen Aminosäure in einem Wildstamm von *Escherichia coli* ist wegen der Regulationsmechanismen nicht möglich, weil die gebildete Menge an Aminosäure immer nur dem Bedarf der Zelle entspricht [193]. Die Produktbildungsrate der Zellen kann aber durch den Einsatz gentechnischer Methoden erhöht werden.

2.1.3. MÖGLICHKEITEN DER L-PHENYLALANINSYNTHESE MIT *ESCHERICHIA COLI*

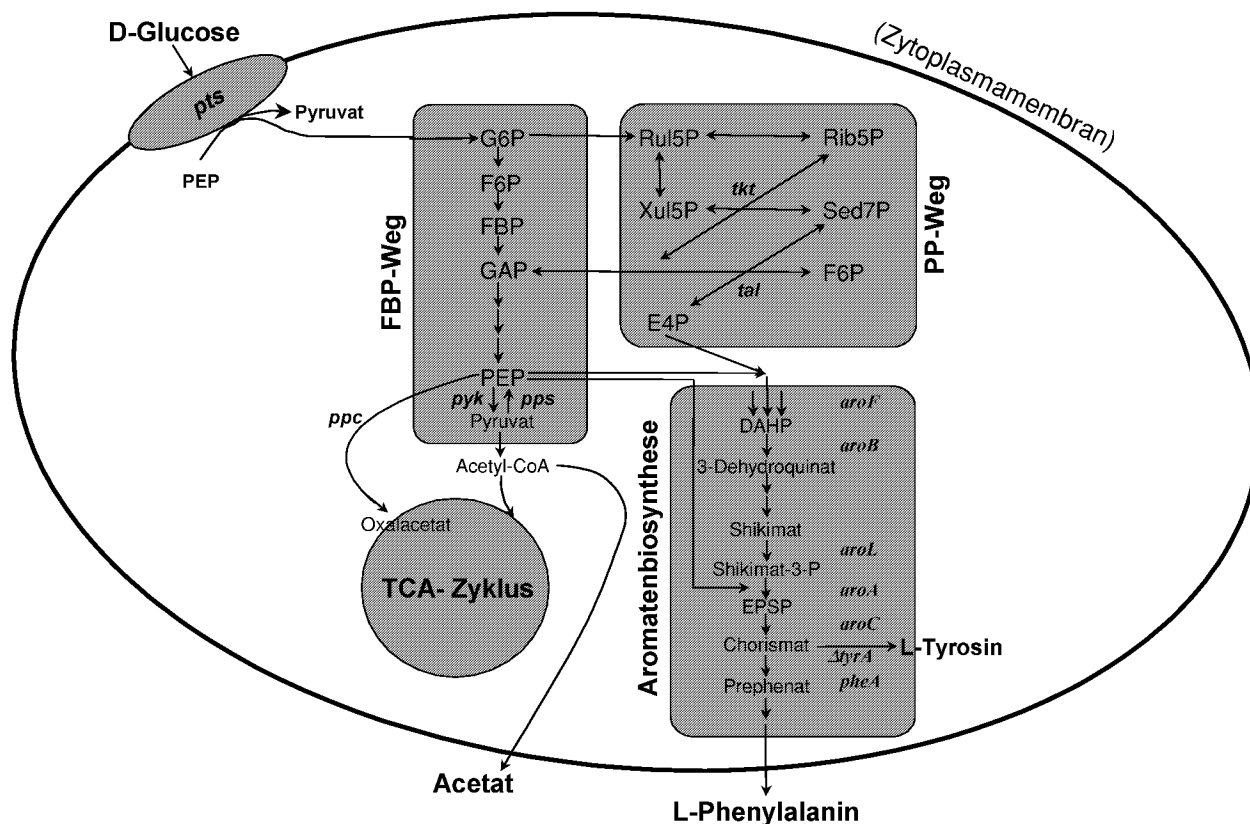
Verschiedene Autoren fassten zusammen, wie sich mit Hilfe des „Metabolic Engineering“ gezielt Informationen, unter Verwendung gentechnischer Methoden, in Mikroorganismen verändern lassen, um Produkte mit höheren Ausbeuten und Raten zu produzieren [24, 25, 26, 27]. Für die Synthese aromatischer Aminosäuren in Bakterien wie *Escherichia coli* spielt dabei der Shikimisäureweg die entscheidende Rolle [192].

Die Aromatenbiosynthese in *E. coli* ist auf mehreren Ebenen stark reguliert [28, 29, 30, 31, 32]. Der erste Schritt, die Kondensation von E4P und PEP zu DAHP, wird durch Repression und Feedback-Inhibierung reguliert (vgl. Abschnitt 2.1.2). Verschiedene Autoren, wie Frost et. al. [33] und Backmann et. al. [34], schlugen die Überexpression einer deregulierten, feedback-resistenten Variante der L-Tyrosinspezifischen DAHP-Synthase vor (*aroF*) (vgl. Abbildung 3), um diese Reaktion zu deregulieren. Es wird von Backmann et. al. [34] jedoch darauf hingewiesen, dass bei unphysiologisch hohen Konzentrationen an L-Phe weiterhin eine Feedback-Inhibierung der DAHP-Synthase auftreten kann.

Der zweite, sowohl durch Feedback-Inhibierung, als auch durch Attenuation auf Transkriptionsebene regulierte Schritt, ist die Chorismat-Mutase/Prephenatdehydratase (*pheA*) (vgl. Abschnitt 2.1.2). Auch hier wird die Überexpression einer deregulierten Variante empfohlen [35].

Die Shikimatkinase II wird nur auf der Ebene der Transkription reguliert [20]. Ist die Aminosäure L-Tyrosin im Überschuss vorhanden, wird jedoch das *tyrR*-Regulon exprimiert [36, 37]. Das gebildete Protein setzt die Expression von *aroL* (vgl. Abschnitt 2.1.2) auf ein Zehntel der normalen Rate herab [20]. Es wird deshalb auch hier eine Überexpression des Gens empfohlen [38].

Alle weiteren Gene der Aromatenbiosynthese, bis hin zum L-Phenylalanin, werden weder reprimiert noch deren Enzyme inhibiert. Dennoch können sie zum limitierenden Schritt der Produktbildung werden, da auch der natürlichen Expressionsrate Grenzen obliegt. So wurde von Frost in mehreren Artikeln beschrieben [39, 40, 41], dass die 3-Dehydroquinsynthese (*aroB*) (vgl. Abbildung 3), bei Deregulation der stromaufwärts lokalisierten DAHP-Synthase, die notwendige Umsatzgeschwindigkeit nicht mehr erreicht und es zur Akkumulation von DAHP bzw. DAH kommt [22]. Vergleichbares gilt für die EPSP-Synthase (*aroA*) und die Chorismatsynthase (*aroC*) (vgl. Abbildung 3) [30, 34]. Untersuchungen von Frost et. al.



Um die unerwünschte Produktion der jeweils anderen aromatischen Aminosäuren zu unterdrücken, wurden Gene für die spezifischen Schritte der L-Tyrosinsynthese in L-Phe-Produzenten durch Mutationen oder Deletionen ausgeschaltet, wodurch eine L-Tyrosinauxotrophie entstand [192]. Der zusätzliche Vorteil dieser L-Tyrosinauxotrophen Stämme ist, dass durch Limitierung der L-Tyrosinzufuhr die Biomassebildung gesteuert werden kann [43].

Neben der Deregulation der Aromatenbiosynthese ist bei der Entwicklung und Optimierung eines Produktionsstammes zur Herstellung einer aromatischen Aminosäure, der Transport der Zielsubstanz aus der Zelle wichtig [44]. Ein Transport in die Zelle wurde sowohl für L-Phe [45, 46, 47], als auch für L-Tyrosin [48, 49] beschrieben. Ein Transportsystem zur Aminosäuresekretion, wie es zum Beispiel für den L-Lysintransport aus *Corynebacterium glutamicum* beschrieben wurde [50], konnte für L-Phenylalanin bisher nicht nachgewiesen werden. Einerseits weisen durchgeführte Untersuchungen auf einen unspezifischen Export

durch Diffusion hin [51], andererseits werden Stämme mit einem selektiv verstärkten L-Phe-Export durch die Membran beschrieben, was auf einen enzymatisch geregelten Export der Aminosäure deutet [44]. Diese Untersuchungen konnten bisher nicht durch andere Autoren bestätigt werden [52, 53, 54]. Dennoch wäre das Auffinden und die Überexpression eines L-Phe-Exportsystems ein großer Schritt in der Stammentwicklung, wie schon für *Corynebacterium glutamicum* gezeigt werden konnte [50].

Die Art der Durchführung der gentechnischen Veränderungen ist ebenfalls von Bedeutung. Bei der Entwicklung von Produktionsstämmen wurden Gene des Aromatenbiosyntheseweges zu Genkassetten zusammengefasst und unter die Kontrolle von Fremdpromotoren gestellt. Dies erlaubt die Expression der betreffenden Gene zum gewünschten Zeitpunkt (z.B. durch Zusatz von Induktoren wie IPTG bei *lac*- und *tac*-Promotoren). Die Gene wurden dabei auf einem Plasmid zusammengefasst, wobei dies und der Austausch des Promotors zu einer höheren Kopienzahl und höheren Enzymaktivitäten führte [27, 29]. Andererseits führte die chromosomale Integration von Genkassetten zur Stabilisierung von Expression und Enzymaktivität [42].

Neben einem uneingeschränkten Stofffluss durch die Aromatenbiosynthese, ist die Bereitstellung von Vorläufermetaboliten von ebenso großer Bedeutung. Abbildung 3 und Abbildung 4 fassen zusammen, dass zur Herstellung von 1 mol L-Phe, 2 mol PEP und 1 mol E4P benötigt werden. Um deren Bereitstellung zu erhöhen, kann an mehreren Stellen des Zentralstoffwechsels eingegriffen werden.

Phosphoenolpyruvat:

Wie in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden konnte, wirkt sich eine vermehrte Bereitstellung von PEP vorteilhaft auf die Bildung von aromatischen Aminosäuren bzw. auf den Eingangsmetaboliten DAHP aus [77]. Eine Steigerung der PEP-Verfügbarkeit wurde durch Ausschaltung der PEP-Carboxylase (kodiert durch *ppc*; vgl. Abbildung 4), oder der beiden Pyruvatkinasen (kodiert durch *pyk*; vgl. Abbildung 4) erreicht [55], d.h., durch eine „Entkopplung“ des Tricarbonsäurezyklusses (vgl. Abbildung 1). Als zweite Möglichkeit wurde das Recycling von Pyruvat zu PEP durch Steigerung der PEP-Synthaseaktivität (kodiert durch *pps*; vgl. Abbildung 4) beschrieben [26, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63].

Phosphotransferase-System:

In *Escherichia coli* wird über das PEP-abhängige Phospho-Transferase-System (PTS) (kodiert durch *pts*; vgl. Abbildung 4) stöchiometrisch 1 mol PEP zur Aufnahme und Phosphorylierung von 1 mol Glucose verbraucht und steht in der Folge nicht mehr der L-Phe-Produktion zur Verfügung [55, 64, 65, 66, 67]. Die Ausprägung eines Transportsystems, bei dem Glucose nach der Aufnahme durch eine ATP-abhängige Kinase phosphoryliert wird, erspart den PEP-Verbrauch und ermöglicht die Bereitstellung eines höheren Anteils PEP für die Biosynthese über den Aromatenbiosyntheseweg. Verschiedene PTS-negative Stämme wurden beschrieben (vgl. Abbildung 4), wobei in den meisten Arbeiten die Glucoseaufnahme dadurch wieder ermöglicht wurde, dass der ATP-abhängige Glucosefacilitator aus *Zymomonas mobilis* zusammen mit einer Glucosekinase in die Zelle eingebracht wurde [66, 68, 69, 70, 71, 72].

Erythrose-4-Phosphat:

Neben der erhöhten Bereitstellung von PEP ist auch die vermehrte Bereitstellung von E4P vorteilhaft (vgl. Abbildung 4) für die Bildung von aromatischen Aminosäuren [73, 74]. Eine erhöhte Aktivität der Transketolase (kodiert durch *tkt*; vgl. Abbildung 4) bei Überexpression des entsprechenden Gens von *E. coli*, in Kombination mit einer deregulierten DAHP-Synthase, führte zu einer verbesserten Produktion von L-Phe [75, 76, 77] oder Intermediaten der Aromatenbiosynthese [78]. Zur weiteren, verbesserten Bereitstellung von E4P für die Aromatenbiosynthese wurde auch die Expression der Transaldolase (kodiert durch *tal*; vgl. Abbildung 4) verstärkt und auch hier konnte eine höhere DAHP-Bildung nachgewiesen werden [26, 79].

2.1.4. STAND DER PROZESSENTWICKLUNG ZUR L-PHENYLALANINPRODUKTION

Die in der Vergangenheit entwickelten Verfahren zur Synthese von L-Phe basierten oft auf enzymatischen Methoden, wobei u.a. isolierte Enzyme aus *Pseudomonas putida* [80], *Brevibacterium* sp. [81], *Rhodococcus* sp. M4 [82], *Sporosarcina ureae* [83] oder *Paracoccus denitrificans* [84] verwendet wurden. Ganzzellbiotransformationen von Phenylpyruvat zu L-Phenylalanin wurden mit ruhenden [85], immobilisierten [86, 87] oder wachsenden *E. coli* [88, 89, 90] oder *Corynebacterium glutamicum* Zellen [91] durchgeführt, genauso wie die Co-Expression von Enzymen in *Escherichia coli* oder *Candida boidinii* [92, 93]. Aufgrund der Kosten für die Herstellung der jeweiligen synthetischen Vorstufen, sind heute direkte Fermentationsverfahren mit L-Phe-Überproduzenten, ausgehend von Glucose und Ammoniak, ökonomisch sinnvoller [193]. Neben der Ökonomie ist ein biotechnisches Verfahren auch ökologisch vorteilhaft, da statt Erdöl ein erneuerbarer, preiswerter (0,3 €/kg) Rohstoff in Form von Zucker eingesetzt wird.

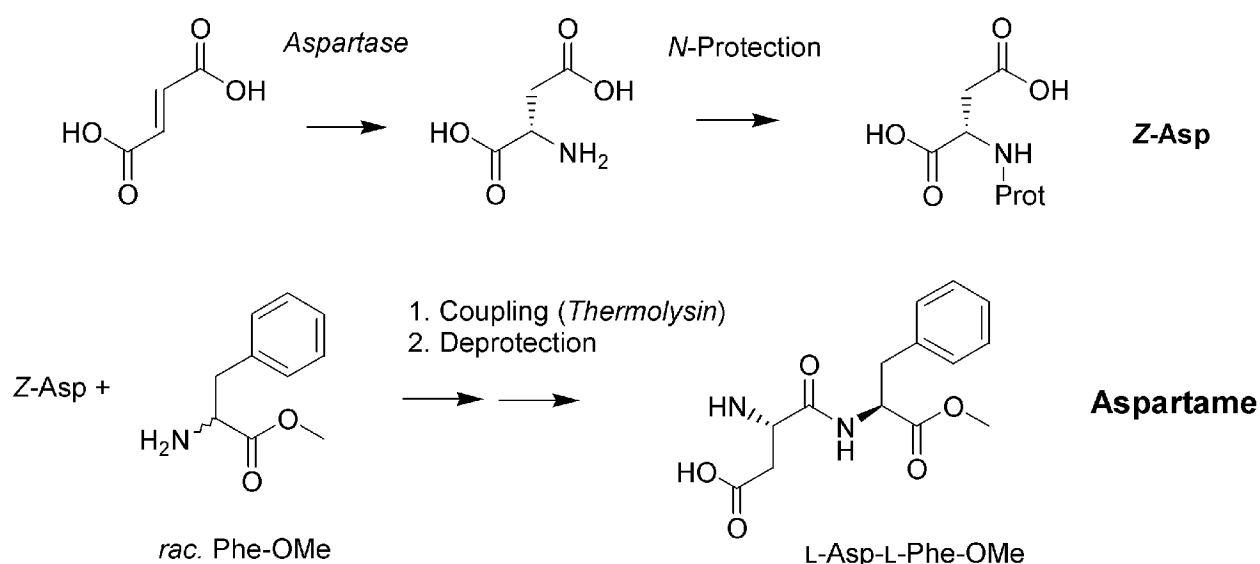


Abbildung 5: Biokatalytische Schritte zur Herstellung von Aspartam mittels des chemoenzymatischen „Thermolysin-Prozesses“ der Firma HSC (Holland Sweetener Company) [94].

Ausnahmen gibt es aber dennoch: Der größte Anteil des weltweit produzierten L-Phe wird zur Aspartamproduktion (L- α -Aspartyl-L-Phenylalanin-Methylester) verwendet [4]. Hierfür wird von der Firma HSC (Niederlande) ein chemoenzymatisches Verfahren angewandt [94]. Die Vorstufen Fumarsäure und D-/L-Phenylalanin-Methylester werden chemisch synthetisiert. Mit dem Enzym Aspartase wird enantioselektiv eine Aminogruppe mit Fumarsäure verknüpft und Z-Aspartat gebildet. Anschließend wird Z-Aspartat mit dem racemischen Gemisch aus D-/L-Phenylalanin-Methylester verbunden. Diese Reaktion wird von dem Enzym Thermolysin katalysiert, das selektiv L-Phenylalanin-Methylester mit der α -Carboxyl-Gruppe des L-Aspartat verbindet und es zu Aspartam umsetzt. Das zurückbleibende D-Phenylalanin kann wieder racemisiert und recycelt werden. Abbildung 5 zeigt ein Schema dieser Reaktion.

Die ersten fermentativen Prozesse zur L-Phe-Herstellung wurden für verschiedene Organismen entwickelt, die zum Teil auch genetisch verändert waren. So wurden u.a. *Corynebacterium glutamicum* [95, 96, 97], *Brevibacterium lactofermentum* [98], *Bacillus subtilis* [99], *Bacillus flavum* [100] oder *Escherichia coli* [44, 101, 102, 103, 104, 105] eingesetzt. Entscheidend für die Auswahl eines geeigneten Organismus für die L-Phe-Produktion waren jedoch auch hier letztendlich ökonomische Aspekte und die freie Verfügbarkeit von Wissen über den Organismus. Wie Backman et. al. [34] und Park und Rogers [106, 107] zusammenfassen und auf Basis des „Metabolic Engineering“, unter Zuhilfenahme von Genom-, Proteom- und Metabolomanalysetechniken, besteht heute das meiste publizierte Wissen über *E. coli*.

Für eine ökonomisch basierte Prozessentwicklung bringt *E. coli* die Vorteile hoher Wachstums- und Produktbildungsrate, kombiniert mit hohen Substratausbeuten mit sich. Zudem ist der Einsatz einfacher, definierter Medienzusammensetzungen möglich, wodurch die Produktaufreinigung vereinfacht wird. Es wurde deshalb insbesondere in die Prozessentwicklung zur Produktion von L-Phe mit *E. coli* viel Arbeit investiert und viele Ansätze sind bereits patentiert [70, 71, 75, 108, 109, 110].

Förberg et. al. [138, 140] entwickelte unter Einsatz eines rekombinanten L-Tyrosin auxotrophen *E. coli* Stammes einen Fed-Batch Prozess, bei dem die Zugabe von Glucose und L-Tyrosin gesteuert wurde. Nach Limitierung des Wachstums schloss sich unter weiterer Zugabe von Glucose im limitierenden Bereich, die Produktbildungsphase auf hohem Niveau mit ruhenden Zellen an. Die Produktbildung startete hier nicht schon während der Wachstumsphase, da die überexprimierte L-Tyrosinspezifische DAHP-Synthase L-Tyrosinsensitiv war (*aroF^{wt}*). Da L-Tyrosin in der Wachstumsphase teilweise im Überschuss vorlag, wurde das Enzym reprimiert. Mit diesem Prozessansatz konnten integrale Produktselektivitäten von bis zu 20 % erreicht werden. Konstantinov et. al. [111, 112, 113, 114] entwickelte eine auf Kalkulation der OUR (**O**xygen **U**ptake **R**ate) basierende, modellgestützte Regelungsstrategie, die über einen parameteradaptiven Regler eine Glucosekonzentration im limitierenden Bereich einstellte. Durch diese Regelungsstrategie sollte die Bildung von Nebenprodukten wie Acetat vermieden werden. Mit diesem Prozess konnten bis zu 46 g/l L-Phenylalanin innerhalb von 48 h produziert werden, wobei eine

substratbezogene L-Phe-Ausbeute von bis zu 17 % (w/w), bei einer integralen Raum-Zeit-Ausbeute von 0,85 g/(l*h), erreicht wurden. Als maximale, bisher erreichte L-Phe-Ausbeute mit einem mehrfach veränderten *E. coli* Stamm, wird ein Wert von 20 % (w/w) angegeben [42, 138].

Der von Takagi et. al. [141] beschriebene Prozess basierte auf der Strategie von Konstantinov et. al. [113, 114], jedoch verfeinerte er die von der Glucosezufuhr entkoppelte L-Tyrosinzugabe während der Wachstumsphase und kompensierte durch kontinuierliche Zugabe geringer Mengen an L-Tyrosin, während der Produktionsphase, den Verbrauch durch den Erhaltungsstoffwechsel.

Unter Verwendung des temperatursensitiven λ -Promotors zur Steuerung der Überexpression deregulierter Enzyme des Aromatenbiosyntheseweges konnte durch Aufprägen periodischer Temperaturshifts, mit Hilfe eines Wärmeaustauschers im Umlauf eines Bioreaktors, die L-Phe-Konzentration um 55 % auf 28,5 g/l verbessert werden [115, 116].

Verschiedene Autoren vermuten eine Produktinhibierung durch L-Phe im Produktionsprozess [31, 103, 114], die durch eine Inhibierung der deregulierten L-Tyrosinspezifischen DAHP-Synthase bei unphysiologisch hohen L-Phe-Konzentrationen hervorgerufen werden könnte [34]. Arbeiten zur makrokinetischen Analyse dieser Produktinhibierung, oder zur simultanen Produktabtrennung bei der fermentativen L-Phe-Produktion zur Vermeidung einer Akkumulation, sind bisher nicht bekannt.

2.1.4.1. Regelung der Glucose-Zufuhr

Wie schon von vielen Autoren beschrieben wurde, führt bei fast allen *E. coli*-Prozessen, bei denen Glucose als Hauptkohlenstoffquelle verwendet wird, ein Substratüberschuss zur Bildung von Acetat [117, 118, 119, 120]. Die Akkumulation dieses Nebenprodukts inhibiert die weitere Produktbildung. Insbesondere bei der industriellen Produktion von niedermolekularen Substanzen, aber auch bei der Herstellung von Proteinen oder Enzymen wird dieses Problem aufgrund der Gradientenbildung in großen Reaktoren noch bedeutsamer [121, 122, 123].

Die Bildung von Acetat erfolgt, wenn die maximale Oxidationskapazität der Zellen erreicht ist. Dies ist der Fall, wenn aufgrund eines Glucoseüberschusses im Medium die über das PTS-System aufgenommene und im FBP-Weg verstoffwechselte Glucose, nicht in den abzweigenden Wegen des Zentralstoffwechsel schnell genug „abfließen“ kann. Die akkumulierenden Intermediate, insbesondere PEP und Pyruvat, können nicht weiter oxidiert werden und müssen in Form von Acetat in das Medium sekretiert werden.

Um die Bildung von Acetat bei einem *E. coli* Fermentationsprozess zur L-Phe-Produktion nach der Wachstumslimitierung durch L-Tyrosin zu vermeiden, wurde die Produktbildung im Fed-Batch Prozess bei verschiedenen gesteuerten Zulaufzeiten für Glucose untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Glucosezufuhr so erfolgen muss, dass eine ausreichende Substratlimitierung in der Produktionsphase vorhanden ist, um die Bildung von Acetat zu vermeiden. Auf der anderen Seite muss jedoch eine strenge Glucoselimitierung vermieden werden, da ansonsten die maximale L-Phe-Produktbildungsrate nicht erreicht wird. Von

Konstantinov et. al. [124, 125] wurde auf Grundlage dieser Untersuchungen ein auf Basis der OUR-Berechnung empirisch ermittelter Regelalgorithmus für die Glucosezufuhr in der Produktionsphase der Fermentation eingesetzt. Off-line Analysen ergaben einen sigmoiden Verlauf der L-Phe-Konzentration im Reaktor. Jedoch fiel die Annäherung des Verlaufs an die L-Phe-Endkonzentration zusammen mit der Bildung von bis zu 5 g/l Acetat [112, 113, 114]. Diese Konzentration hat, abgesehen von einem Einbruch der Kohlenstoffselektivität, erste inhibierende Auswirkungen auf die Zellen [126, 127]. Von den Autoren wurde diese Änderung des Fermentationsverlaufs als Abbruchkriterium gewertet.

Auch andere Strategien zur Regelung der Glucosezufuhr im limitierenden Bereich, unter Verwendung empirischer Zusammenhänge und parameteradaptiver Regler, sind beschrieben worden [128, 129, 130, 131] und werden in industriellen Fermentationsprozessen eingesetzt [122, 123]. Eine weitere Möglichkeit zur Regelung der Glucosezufuhr bildet die direkte Messung der Konzentration im Bioreaktor. Hierzu wurden verschiedene Systeme beschrieben [132, 133, 134, 200]. Bei diesen Regelungsansätzen wird jedoch nicht versucht, den Glucoseverbrauch zu limitieren, sondern unter Verwendung entsprechender Regler eine möglichst geringe Konzentration im Reaktor einzustellen und konstant zu halten [135, 136, 137].

Über eine Regelung der Glucosekonzentration im weit übersättigten Bereich auf konstantem Niveau mit Hilfe dieser Techniken, unter Einsatz von *E. coli*, wurde bisher nicht berichtet. In Bezug auf die Produktion von L-Phe wurden diese Techniken auch zur Regelung geringer Glucosekonzentrationen nicht eingesetzt.

2.1.4.2. Regelung der L-Tyrosin-Zufuhr

Die Produktion von L-Phe mit *E. coli*, ausgehend von Glucose und Ammoniak, wurde bisher in Batch-, Fed-Batch- und kontinuierlichen Ansätzen untersucht. Es zeigte sich, dass die Art der aufgezwungenen Wachstumslimitierung von entscheidender Bedeutung für die Selektivität der L-Phe-Bildung und die Höhe der erreichbaren spezifischen Produktbildungsrate ist [102, 103, 106, 108, 138, 139].

Da Überproduzenten von L-Phe in der Regel L-Tyrosinauxotroph sind, bietet sich eine Wachstumslimitierung über diese Aminosäure an. Mit Hilfe von unterschiedlichen Dosiergeschwindigkeiten konnte gezeigt werden, dass maximale spezifische Produktbildungsraten nach L-Tyrosinlimitierung erreichbar sind, wenn zuvor eine maximale Wachstumsrate eingestellt wurde [138, 139, 140]. Die Wachstumselektivität $Y_{X/S}$ für L-Tyrosin lag dabei bei 36 g Biotrockenmasse pro g L-Tyrosin. Takagi et. al. [141] zeigte zudem, dass bei kontinuierlicher Zugabe geringer Mengen an L-Tyrosin von 10-20 mg/(l*h) während der Produktionsphase (Kompensation des Erhaltungsstoffwechsels), die spezifische L-Phe-Bildungsrate über eine längere Fermentationsperiode auf hohem Niveau gehalten werden konnte. Über eine Regelung der L-Tyrosinzufuhr während der Wachstumsphase, ist hingegen nichts bekannt.

2.2. REAKTIONSTECHNISCHE GRUNDLAGEN

2.2.1. PROZESSFÜHRUNG IN BIOREAKTOREN

Bioreaktoren werden bezüglich des Reaktortyps (z.B. Rührkessel, Säulenreaktor oder Strömungsrohr) und der Betriebsführung [142] eingeteilt. Die Betriebsführung bestimmt wesentlich die Zeitprofile der Substrat- und Produktkonzentrationen, die häufig die Raten biologischer Reaktionen (Wachstum, Substratverbrauch, Produktbildung) bestimmen. Der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Reaktortyp wird vereinfachend als idealer Rührkessel betrachtet [143]. Eine exakte Charakterisierung des Systems wurde nicht vorgenommen. Für diesen Reaktortyp werden drei allgemeine Betriebsarten unterschieden. Für alle Betriebsarten gilt die allgemeine Bilanzgleichung 2-1:

$$\frac{d(V_R \cdot c_R)}{d t} = \dot{v}_{in} \cdot c_{in} - \dot{v}_{out} \cdot c_{out} \pm r_i \cdot V_R \quad (2-1)$$

Mit:

- $r_i \cdot V_R$: Reaktorbezogene Reaktionsrate
(Produktbildungsrate π oder Substratverbrauchsrate σ)
- $\dot{v}_{in}$: Volumenstrom in den Reaktor
- $\dot{v}_{out}$: Volumenstrom aus dem Reaktor
- V_R : Arbeitsvolumen des Reaktors
- c : Konzentration

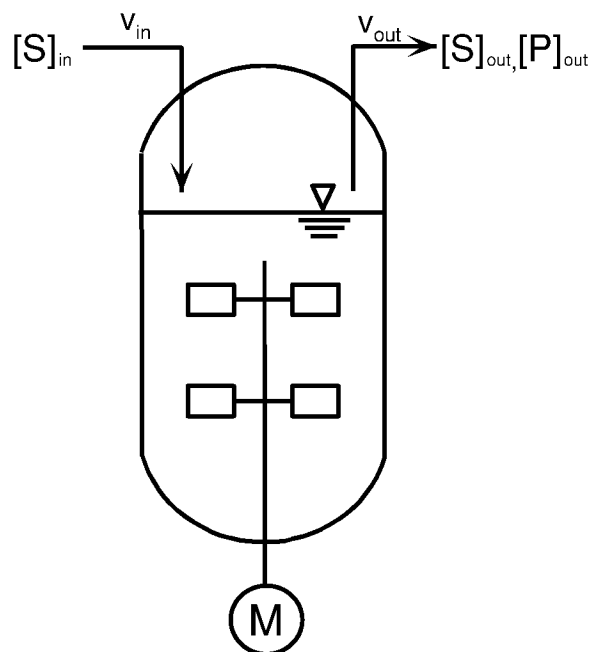


Abbildung 6: Schema eines idealen Rührreaktors. Die Konzentrationen im Ablauf entsprechen den Konzentrationen im Reaktor.

Auf der Basis experimenteller Daten kann unter Verwendung von Gleichung 2-1 die Reaktionsrate abgeleitet werden. Für Umsatzberechnungen in diskontinuierlichen Versuchsanordnungen, muss eine Integration vorgenommen werden. In Abbildung 6 ist das Schema eines idealen Rührkesselreaktors dargestellt.

In *batch- oder satzweisen Verfahren* werden alle Substrate vorgelegt, während der Fermentation werden nur Sauerstoff (bei aeroben Prozessen) und Korrekturmittel (Säure, Lauge, Antischaummittel) zugegeben. Der Prozess wird in der Regel so lange betrieben, bis ein essentielles Substrat verbraucht ist oder ein gebildetes Produkt inhibierend bzw. toxisch wirkt. Der Batchprozess zeichnet sich durch einen geringen apparativen Aufwand aus. Für ihn gilt:

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

$$V_{ferm} = const.$$

$$\dot{v} = \dot{v}_{out} = 0$$

Diese Verfahrensweise zeichnet sich aus durch:

- zeitveränderliche Reaktionsbedingungen
- diskontinuierlicher Prozessverlauf
- begrenzte Anlagenverfügbarkeit durch Rüstzeiten

Im Batchansatz reduziert sich Gleichung 2-1 auf:

$$\frac{dc}{dt} = \pm r_i \quad (2-2)$$

da $\dot{v} = 0$ und $V_R = const.$ ist. Die Volumenänderung durch die Probenahme ist zu vernachlässigen, da die Konzentrationsverhältnisse im Reaktor nicht verändert werden.

Beim *kontinuierlichen Verfahren* wird nach der Anwachsphase ständig frisches Medium im gleichen Maß in den Bioreaktor dosiert wie Fermentationslösung abgezogen wird, so dass ein Fließgleichgewicht erreicht wird. Das Wachstum im Chemostaten wird durch die limitierte Zugabe eines Substrates gesteuert. Im Fließgleichgewichtszustand gilt für den kontinuierlich betriebenen Bioreaktor:

$$c(X,P,S) = const.$$

$$V_{ferm} = const.$$

$$\dot{v} = \dot{v}_{out} = const.$$

Diese Verfahrensweise zeichnet sich aus durch:

- stationärer Zustand nach Anlaufphase
- konstante Reaktionsbedingungen
- hohe Anlagenverfügbarkeit

Im kontinuierlichen Verfahren gilt Gleichung 2-1; vereinfacht heißt das:

$$\frac{d(V_R \cdot c_R)}{dt} = \dot{v}(c_{in} - c_{out}) \pm r_i \cdot V_R \quad (2-3)$$

da $\dot{v}_{in} = \dot{v}_{out} = \dot{v}$ und $V_R = const.$ ist. Verwendet man die Größe der mittleren Verweilzeit $\bar{\tau}$ [h] bzw. die sogenannte Durchflussrate D [h⁻¹] ergibt sich:

$$D \stackrel{Def}{=} \frac{1}{\bar{\tau}} = \frac{\dot{v}}{V_R} \quad (2-4)$$

so erhält man aus Gleichung 2-3:

$$\frac{dc}{dt} = D(c_{in} - c_{out}) \pm r_i \quad (2-5)$$

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

$$D(c_{in} - c_{out}) = r_i \quad (2-6)$$

Ist im Fall eines mikrobiellen Wachstumsprozesses in einem kontinuierlichen Rührkessel $X_{in} = 0$, so erhält man unter Verwendung der Wachstumsrate μ die bekannte Beziehung für den Gleichgewichtszustand (Gleichung 2-7), der die Grundlage des sogenannten Chemostatbetriebs von kontinuierlichen Prozessen bildet:

$$D = \mu \quad (2-7)$$

Die Prozessdauer kann bis zu mehreren Wochen betragen. Den gut definierten, reproduzierbaren Bedingungen eines funktionierenden Verfahrens stehen oft die Probleme gegenüber, die das Erreichen des Fließgleichgewichts erschweren oder verhindern. Diese stellen sich unter anderem durch eine falsche Steuerung oder Immobilisierung von Biomasse an der Reaktorwand dar. Zudem kann es, bedingt durch die Selektion auf Wachstum und optimale Substratausbeute, zur Anreicherung von Mutanten oder, bei Einsatz von Plasmiden, zum Verlust dieser kommen [144].

Bei *Fermentationen im Zulaufverfahren* (engl.: fed-batch) werden nicht alle Substrate im Bioreaktor vorgelegt, sondern man führt ein oder mehrere Substanzen im Laufe des Prozesses zu. Diese Zufuhr kann nach einem vorgegebenen Dosierprofil erfolgen oder unter Einbeziehung direkter oder indirekter Messgrößen geregelt werden. Es wird keine Fermentationslösung abgezogen. Bei Fermentationen im Zulaufverfahren gilt:

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

$$V_{ferm} = f(t)$$

$$\dot{v}_{in} = f(t) \vee \dot{v}_{in} = f(\sigma) \quad \dot{v} = 0$$

Für nutristatische Substratregelung:

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

Diese Verfahrensweise zeichnet sich aus durch:

- verlängerte Wachstum- und Produktionsphase
- höhere Biomasse- und Produktkonzentration
- die Einstellung von Substratkonzentrationen durch Regelung oder Steuerung der Zulaufraten

Im Zulaufverfahren gilt Gleichung 2-1; mit $\dot{v} = 0$ ergibt sich:

$$\frac{d(V_R \cdot c_R)}{dt} = \dot{v}_m \cdot c_m \pm r_i \cdot V_R \quad (2-8)$$

Die Wahl der Betriebsart für einen Prozess wird maßgeblich von der Reaktionskinetik bestimmt. Beispielsweise verzögern katabolitreprimierte Prozesse das Wachstum in einer satzweisen Fermentation. Der Mehraufwand der Fed-Batch-Fermentation lohnt sich hier, da durch eine geringe Substratkonzentration im Reaktor eine Verzögerung des Wachstums vermieden werden kann [145].

Neben den hier beschriebenen Betriebsarten gibt es noch zahlreiche Spezialanwendungen, z.B. Bioreaktoren mit Biomasserückhaltung oder kontinuierliche Kaskaden.

2.2.2. KINETISCHE GRÖßEN

2.2.2.1. Wachstum

Das mikrobielle Wachstum kann als die Änderung der Biotrockenmassekonzentration über die Zeit beschrieben werden. Das Differential dc_X/dt bezogen auf die Biomassekonzentration ist dann die Wachstumsrate μ , also ein Maß für das Wachstum.

$$\mu \stackrel{\text{Def}}{=} \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_X}{dt} \quad (2-9)$$

2.2.2.2. Substratverbrauch und Produktbildung

Analog zur Wachstumsrate beschreiben die auf die Biomassekonzentration bezogenen Differentiale dc_S/dt und dc_P/dt die Substratverbrauchsrate σ bzw. die Produktbildungsrate π :

$$\sigma \stackrel{\text{Def}}{=} \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_S}{dt} \quad (2-10)$$

$$\pi \stackrel{\text{Def}}{=} \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_P}{dt} \quad (2-11)$$

2.2.2.3. O_2 und CO_2

Der Sauerstoffverbrauch und die Kohlendioxidbildung werden über die Massenbilanz in der Gasphase bestimmt. Da die Konzentrationen in der Flüssigphase sehr gering sind, werden sie vernachlässigt (die CO_2 -Konzentration ist druck- und pH-abhängig, und kann bei einer Änderung der Werte zu Fehlern führen). Die für die Gase üblichen Größen *OUR* (*Oxygen Uptake Rate* = Sauerstoffaufnahme) und *CER* (*Carbon Evolution Rate* = Kohlendioxidbildungsrate) berechnen sich wie folgt:

$$OUR \stackrel{Def}{=} \frac{\dot{V}_g \cdot ([O_2]_{in} - [O_2]_{out})}{V_R} \quad (2-12)$$

$$CTR \stackrel{Def}{=} \frac{\dot{V}_g \cdot ([CO_2]_{out} - [CO_2]_{in})}{V_R} \quad (2-13)$$

Ohne auf die detaillierte Beschreibung des Bilanzraumes einzugehen (siehe hierzu [145]), lassen sich Gleichung 2-12 und 2-13 zu den Gleichungen 2-14 und 2-15 umformen, die eine Berechnung durch Prozessgrößen ermöglichen. Hierbei wird berücksichtigt, dass O_2 bzw. CO_2 sowohl in der Zuluft (α) als auch in der Abluft (ω) enthalten sind:

$$OUR = \frac{\dot{V}_G^\alpha}{V_F \cdot 22,414} \cdot \left(Y_{O_2}^\alpha - \frac{(1 - Y_{O_2}^\alpha - Y_{CO_2}^\alpha)}{(1 - Y_{O_2}^\omega - Y_{CO_2}^\omega)} \cdot Y_{O_2}^\omega \right) \quad (2-14)$$

$$CER = \frac{\dot{V}_G^\alpha}{V_F \cdot 22,414} \cdot \left(Y_{CO_2}^\omega \cdot \frac{(1 - Y_{O_2}^\alpha - Y_{CO_2}^\alpha)}{(1 - Y_{O_2}^\omega - Y_{CO_2}^\omega)} - Y_{CO_2}^\alpha \right) \quad (2-15)$$

2.2.2.4. Selektive Größen

Als Bindeglied zwischen den Reaktionsthermen (Gleichungen 2-9, 2-10 und 2-11) werden differentielle Selektivitätskoeffizienten definiert, wie den differentiellen substratbezogenen Biomasseausbeutekoeffizienten $Y_{X/S}$ oder den differentiellen substratbezogenen Produkt-ausbeutekoeffizienten $Y_{P/S}$:

$$Y_{XS} \stackrel{Def}{=} \frac{dc_X}{dc_S} \quad (2-16)$$

$$Y_{PX} \stackrel{Def}{=} \frac{dc_P}{dc_X} \quad (2-17)$$

$$Y_{PS} \stackrel{Def}{=} \frac{dc_P}{dc_S} \quad (2-18)$$

Neben der Bestimmung der differentiellen Selektivität, wird eine integrale Selektivitätsbestimmung zur Beurteilung des Gesamtprozesses eingesetzt, wie für die substratspezifische Produktbildung:

$$Y_{PS} \stackrel{Def}{=} \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (2-19)$$

Dabei wird von $t = 0$ bis zu einem gewählten Zeitpunkt (meistens $t = t_{end}$) das über den Zeitraum gebildete Produkt durch die gesamte verbrauchte Substratmenge dividiert.

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

$$RZA_{integr} \stackrel{Def}{=} \frac{c_{P,max} - c_{P,t=0}}{t_{max}} \quad (2-20)$$

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

$$RZA_{diff} \stackrel{Def}{=} \frac{dc_P}{dt} \quad (2-21)$$

2.2.3. KOHLENSTOFFBILANZ

Massenbilanzen werden oft für die Hauptelemente C, H, N, O oder auch P berechnet. Da Elemente nicht verändert werden können, kann auf die Einführung von Reaktionstermen verzichtet werden und es ergibt sich für die Massenbilanz ein einfaches Schema. Die Akkumulation im Bioreaktor berechnet sich aus dem Massenfluss in den Bioreaktor, abzüglich des Massenflusses aus dem Bioreaktor. Üblicherweise wird angegeben, welcher Anteil des Elementes aus den Edukten in den Produkten wiedergefunden wird. Über eine Massenbilanz lassen sich die Exaktheit und die Vollständigkeit der durchgeführten Analysen überprüfen.

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

$$\begin{aligned} & \left[\frac{w_c \cdot [X]_{R(t)} \cdot V_{R(t)}}{M_c} + \sum_{n=1}^m v_n \cdot [P]_{nR(t)} + \sum_{n=1}^m v_n \cdot [S]_{nR(t)} \cdot V_{R(t)} \right] = \\ & \left[\frac{w_c \cdot [X]_{R(0)} \cdot V_{R(0)}}{M_c} + \sum_{n=1}^m v_n \left([S]_{nR(0)} \cdot V_{R(0)} + \int_0^{t_{ende}} ([S]_{n(in)} \cdot \dot{v}_{in}) dt \right) \right] - \\ & \left[\sum_{n=1}^m v_n \left(\int_0^{t_{ende}} ([S]_{n(out)} \cdot \dot{v}_{out}) dt \right) + \sum_{n=1}^m v_n \left(\int_0^{t_{ende}} ([P]_{n(out)} \cdot \dot{v}_{out}) dt \right) \right] - \\ & \left[v_{CO_2} \cdot \int_0^{t_{ende}} ([CO_2] \cdot \dot{v}_g) dt \right] \end{aligned} \quad (2-22)$$

Mit:

w_C	= Kohlenstoffanteil der Biomasse
M_C	= Molmasse des Kohlenstoffs
n	= Bezeichnung der Komponente
m	= Anzahl der Komponenten
$[X]_{R(t)}$	= Biomassekonzentration zum Zeitpunkt t
$[X]_{R(0)}$	= Biomassekonzentration zum Zeitpunkt 0
ν_n	= stöchiometrischer Koeffizient des Stoffes n
$[P]_{nR(t)}$	= Konzentration des Produkts n zum Zeitpunkt t
$[P]_{nR(0)}$	= Konzentration des Produkts n zum Zeitpunkt 0
$[S]_{nR(t)}$	= Konzentration des Substrats n zum Zeitpunkt t
$[S]_{nR(0)}$	= Konzentration des Substrats n zum Zeitpunkt 0
$[S]_{n(in)}$	= Konzentration des Substrats n im Zulauf
$[P]_{n(out)}$	= Konzentration des Produkts n im Ablauf
$[S]_{n(out)}$	= Konzentration des Substrats n im Ablauf
$\dot{v}$	= Volumenstrom

Die Bilanzen anderer Elemente ergeben sich analog. Für die Bilanzierung eines satzweise geführten Verfahrens mit $\dot{v}_{in} = \dot{v}_{out} = 0$ entfallen alle Terme aus der Gleichung, die den Volumenstrom des Mediums durch den Reaktor ($\dot{v}_{in}$, $\dot{v}_{out}$) beinhalten. Für einen Prozess im Zulaufverfahren entfallen alle Terme, die einen Abflussvolumenstrom ($\dot{v}_{out}$) enthalten.

2.3. VERFAHRENSTECHNISCHE GRUNDLAGEN DER MEMBRANFILTRATION

Im weitesten Sinne ist jede Membran ein Filter. Die Trennung erfolgt dadurch, dass mindestens eine Komponente der zu trennenden Phase die Membran nahezu ungehindert passieren kann, während andere Komponenten mehr oder weniger stark zurückgehalten werden [208]. Durch die auf die Bestandteile der Phasen wirkenden unterschiedlichen treibenden Kräfte, kommt es zu einer Anreicherung von einer oder von mehreren Substanzen in einer der Phasen [146]. Membrantrennverfahren sind deshalb definiert als Trennungen von zwei oder mehr gelösten oder ungelösten Komponenten aus einem Flüssigkeits- oder Gasstrom [147].

Der Markt für Membranmaterial ist in den letzten Jahren stark gestiegen: Während er 1985 noch 1 Mrd. US-\$ betrug [146], lautete eine Schätzung allein für den US-Markt auf 1,3 Mrd. US-\$ im Jahr 1998. Dieser gliederte sich 1998 wie folgt auf (Abbildung 7):

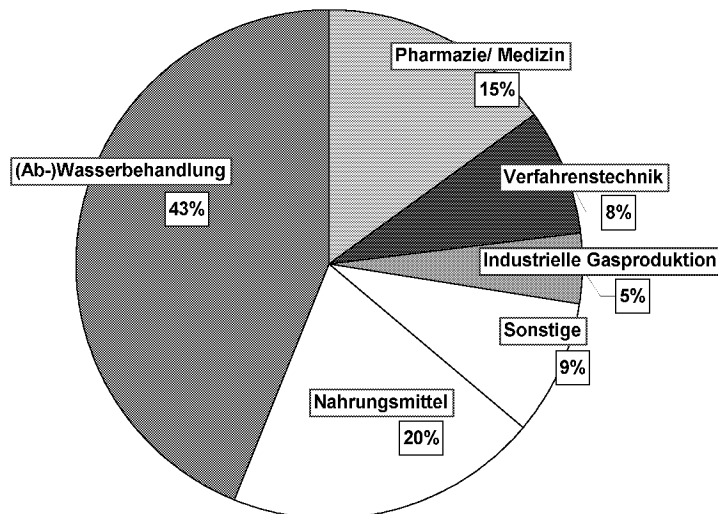


Abbildung 7: Aufteilung des US- Marktes für Membranmaterialien 1998; der Gesamtmarkt beträgt 1,3 Mrd. US-\$ (nach [148]).

Membrantrennverfahren zeichnen sich, im Gegensatz zur herkömmlichen Filtration, durch eine Trennung bis in den molekularen Bereich aus und stehen damit in Konkurrenz zu klassischen Grundoperationen der Verfahrenstechnik wie der Destillation und der Adsorption [208].

2.3.1. Einteilung der Membranen und Membrantrennverfahren

Membranen können nach verschiedenen Kriterien eingeteilt werden [147, 208]:

- Herkunft: natürliche/synthetische Membranen
- Werkstoff: flüssige/feste Membranen, organische/anorganische Membranen
- Struktur und Morphologie: poröse/nicht-poröse Membranen, asymmetrische/symmetrische Membranen
- Wirkungsmechanismen: adsorbierende, diffundierende, ionenaustauschende, osmotische Membranen

In der Membrantechnik werden größtenteils feste, synthetische Membranen aus organischen Polymeren verwendet [208]. Zu den gebräuchlichsten Rohstoffen zählen hierbei Celluloseacetat, Polyamide und Polysulfone.

Technisch relevante, anorganische Membranen bestehen aus Metallen, Kohlenstoff oder Keramik. Sie sind im Gegensatz zu synthetischen Membranen sehr teuer und überwiegend für Mikrofiltrationen, d.h. mit Porengrößen zwischen 0,8 bis 10 µm, erhältlich [147, 208].

Symmetrische Membranen zeichnen sich durch definierte Porengrößen aus. Bei der Auftrennung können Teilchen in die Poren dringen und sie verstopfen, so dass die Standzeiten der Membranen reduziert werden. Symmetrische Membranen sind nicht für den Ultrafiltrationsbereich geeignet, da sie neben dem schnellen Verstopfen einen zu geringen Permeatvolumenstrom aufweisen [146, 147].

Asymmetrische Membranen bestehen aus einer 0,1-0,5 μm dicken Membran, die zur Stabilisierung auf eine 150-300 μm dicke Stützschrift aufgebracht ist. Das Trennvermögen der Membran wird dadurch kaum beeinflusst. Durch die dünne Membran kann der Forderung nach möglichst hohen Permeatflüssen nachgekommen werden, von denen die Kosten für Membransysteme direkt abhängen [149].

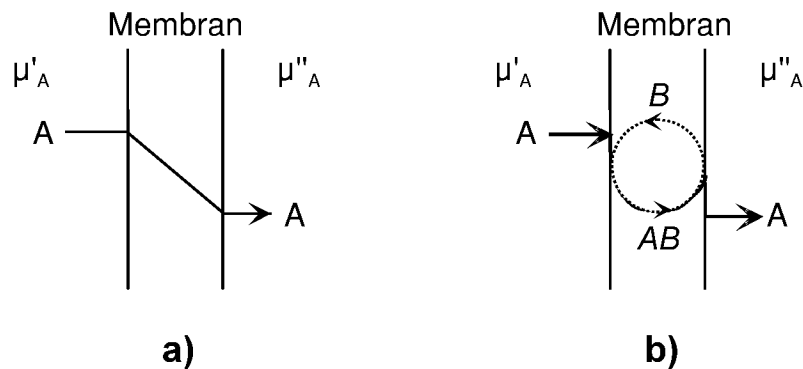


Abbildung 8: Vereinfachte schematische Darstellung des Stofftransports an einer synthetischen Membran. a) passiver Transport b) trägergebundener passiver Transport. μ : chemisches Potential. $\mu'_A > \mu''_A$. (nach [146]).

Membrantrennverfahren werden anhand der Partikel- oder Molekülgröße, sowie nach dem Trennprinzip aufgeteilt. Sie decken ein Größenspektrum von wenigen nm bis mm ab. Die treibende Kraft für den Transport über die Membran wird durch einen Gradienten im chemischen Potential über die Membran bewirkt (Abbildung 8) [208].

$$\mu_i(T, p, x_i) = \mu_i^0(T, p^0) + RT \ln a_i(T, p^0, x_i) + \tilde{V}_i(p - p^0) \quad (2-23)$$

Mit:

- μ_i = chemisches Potential der Komponente i [J/mol]
- T = Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]
- p = Druck [bar]
- x_i = Molenbruch der Komponente i [-]
- μ^0, p^0 = Referenzzustand
- R = allgemeine Gaskonstante [J/(mol*K)]
- a_i = Aktivität der Komponente i [-]
- $\tilde{V}_i$ = partielles molares Volumen der Komponente i [l/mol]

Wie Gleichung 2-23 zeigt (Symbole werden nur hier verwendet und sind nicht in der Nomenklatur enthalten), kann eine Änderung des chemischen Potentials durch eine Konzentrations-, Druck- oder Temperaturdifferenz zwischen den, über die Membran in Verbindung stehenden, Phasen entstehen. Kann die zu transportierende Komponente entlang ihres Gradienten frei durch die Membran diffundieren, so handelt es sich um einen passiven Transport. Eine andere Möglichkeit ist der trägergebundene, passive Transport, bei dem die zu transportierende Substanz während des Transports an eine Membrankomponente gebunden ist. Häufig bewirken mehrere Faktoren die Auftrennung: Bei der Ultrafiltration erfolgt sie

aufgrund der Membranbeschaffenheit, der Partikelgröße und des hydrostatischen Drucks [146].

Membranen werden zu Modulen mit unterschiedlicher Konfiguration angeordnet. Unterschieden werden zwei Bauklassen: Schlauch- und Flachmodule (vgl. Abbildung 9).

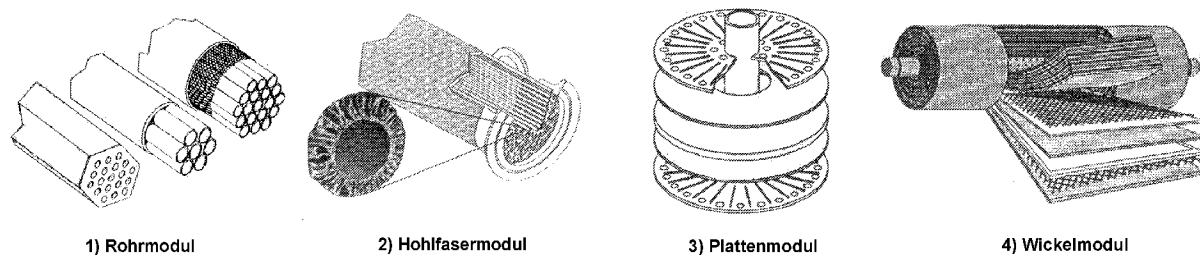


Abbildung 9: Beispiele für Schlauch- (1,2) und Flachmodule (3,4).

Dabei werden folgende Anforderungen an ein Modul gestellt:

- mechanische, chemische, thermische Stabilität
- kostengünstige Fertigung
- gute Reinigungsmöglichkeit
- möglichst günstiges Oberflächen-/Volumenverhältnis

Nicht jeder Membran- und Modultyp erfüllt alle Anforderungen gleichermaßen. Für die Entwicklung bzw. Optimierung eines Prozesses ist es daher entscheidend, das am besten geeignete Modul zu identifizieren.

2.3.2. VERGLEICH EINIGER MEMBRAN- UND MODULKONSTRUKTIONEN

Innerhalb der Arbeit von Silberbach [204] sollte ein geeignetes Modul zur Biomasserückhaltung ausgewählt werden. Dabei standen drei Module mit unterschiedlichen Konstruktionen zur Auswahl:

- ein Hohlfasermodule für die Ultrafiltration
- ein Rohrmodul für die Ultrafiltration
- ein Rohrmodul für die Mikrofiltration

Bei Ultra- sowie Mikrofiltrationen zur Permeatabtrennung ist der Transmembrandruck die Ursache für die Änderung des chemischen Potentials und damit die treibende Kraft des Verfahrens (vgl. Abbildung 8 und Gleichung 2-23) [146, 208]. Ein Vorteil dieser Verfahren ist die minimale Veränderung der Milieuumgebung; da Ionen und niedermolekulare Substanzen die Membran passieren, bleiben pH-Wert und Ionenstärke konstant. Da bei relativ geringem Transmembrandruck gearbeitet wird, ist der Energieeintrag geringer als bei anderen Membranverfahren [147]. Die Unterschiede zwischen den Filtrationsverfahren sind in Tabelle 1 aufgelistet:

Tabelle 1: Unterschiede zwischen Mikro- und Ultrafiltration.

	Mikrofiltration	Ultrafiltration
Trennbereich	Partikelgröße 0,08-10 µm	Molekulargewicht 1-1000 kDa
Transmembrandruck	1 bis 3 bar	1 bis 10 bar
Membranaufbau	symmetrisch	asymmetrisch
typ. Modulkonstruktionen	Wickel-, Platten-, Rohrmodule	Hohlfasermodule
typischer Einsatzbereich	Konzentrierung von Suspensionen	Fraktionierung und Reinigung von niedermolekular gelösten Stoffen und Makromolekülen

Die Trennbereiche der Verfahren überschneiden sich, weil die Abtrennung neben der Größe der Komponenten auch durch ihre Gestalt und Wechselwirkungen mit der Membran beeinflusst wird. Mikrofiltrationsmembranen können symmetrisch sein, weil aufgrund der Porengröße ein relativ geringer Strömungswiderstand auftritt. Dem erhöhten Strömungswiderstand der Ultrafiltrationsmembranen wird mit sehr dünnen Membranen, in asymmetrischer Bauweise, entgegengewirkt. Zellen können sich in die Poren der Mikrofiltrationsmembranen einlagern und diese verblocken. Bei Ultrafiltrationsmembranen ist eine Einlagerung in die sehr viel kleineren Poren weniger leicht möglich.

Tabelle 2: Wesentliche Unterschiede zwischen Hohlfaser- und Rohrmodulen.

	Hohlfasermodule	Rohrmodule
Struktur	selbsttragend	Stützrohr
Oberfläche: Volumen	$< 10.000 \text{ m}^2\text{m}^{-3}$	$< 80 \text{ m}^2\text{m}^{-3}$
Druckverlust in Faser	hoch	gering
Gefahr der Faserverstopfung	hoch	gering
Strömung	laminar	turbulent

Aufgrund der Modulkonstruktion (vgl. Tabelle 1) ergibt sich für Mikrofiltrationsmembranen ein ungünstigeres Oberflächen/Volumen-Verhältnis, was eine geminderte Filtrationsleistung mit sich bringt. Weitere Unterschiede zwischen Rohr- und Hohlfasermodule sind in Tabelle 2 zusammenstellt.

Die beschriebenen Module werden alle im Kreuzstromverfahren (engl.: crossflow-) betrieben. Der Zulauf strömt parallel an der Membran entlang, das Permeat wird senkrecht zur Strömungsrichtung durch die Membran gedrückt (vgl. Abbildung 10). Dabei werden Scher- und Auftriebskräfte an der Membranoberfläche erzeugt, was eine verringerte Deckschichtbildung durch die Rückdiffusion von Partikeln zur Folge hat [150, 208]. Letztendlich wird dadurch eine Steigerung der Filtrationsleistung erzielt.

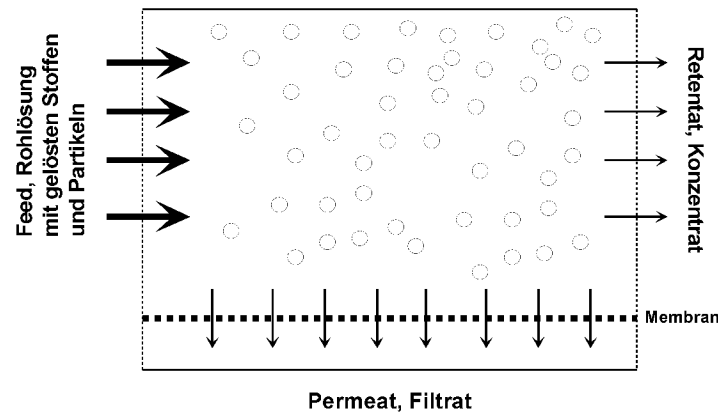


Abbildung 10: Schema der Kreuzstromfiltration.

2.3.3. STOFFTRANSPORT AN DER MEMBRAN

Der wichtigste Parameter für die Einschätzung der Filtrationsleistung ist der Permeatfluss, der als das auf die Membranfläche bezogene Volumen definiert ist, welches pro Zeiteinheit abgetrennt werden kann. Die mechanistischen Wirkungsprinzipien sind nicht vollständig verstanden. Dadurch wird die Modellierung des Permeatflusses als Funktion der Betriebsparameter des Systems erschwert [147].

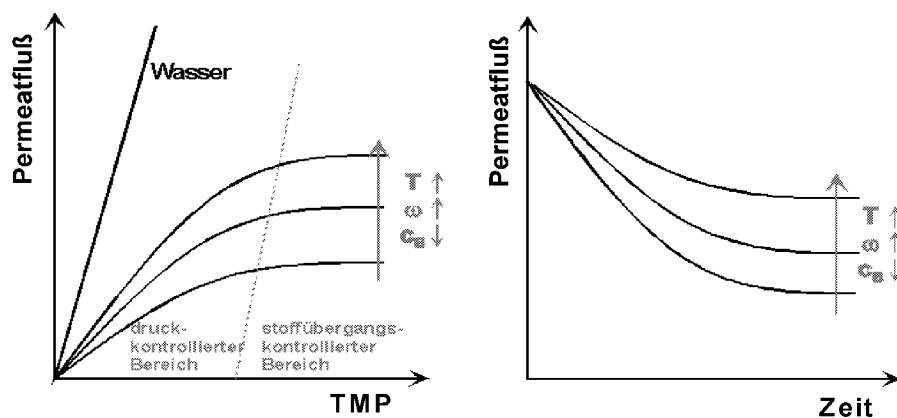


Abbildung 11: Entwicklung des Permeatflusses während eines Prozesses; dabei sind: TMP: Transmembrandruck, T: Temperatur, ω : Überströmungsgeschwindigkeit; c_B : Konzentration der Komponenten im Zulauf.

Zwei Prozesse bewirken die Reduktion des Permeatflusses während der Filtration (vgl. Abbildung 11): die Konzentrationspolarisation und das Fouling. Beide werden durch ein Absetzen von Partikeln an der Membran verursacht.

Unter *Konzentrationspolarisation* versteht man die Aufkonzentrierung von zurückgehaltenen Zulaufkomponenten an der Membran, dadurch bildet sich eine Deckschicht. Übersteigt die Konzentration einer Komponente an der Membran die Löslichkeitsgrenze, kristallisiert sie aus. Die Deckschichtbildung ist reversibel und kann durch eine Änderung der Betriebsparameter gemindert werden, so dass der Permeatfluss wieder steigt. *Fouling* ist das

Ergebnis der Wechselwirkungen zwischen Membran sowie den Komponenten des Zulaufs. Es ist daher systemabhängig. Fouling wird bevorzugt durch Proteine, Lipide und niedermolekulare, hydrophobe Substanzen hervorgerufen [147, 151]. Die Konformation der Proteine ist vom pH-Wert, der Salzkonzentration und der Ionenstärke abhängig. Ein Bestandteil der bakteriellen Zellwand ist Murein, welches Peptidketten enthält. Dadurch können Zellen stark zum Fouling einer Membran beitragen. Fouling ist ein irreversibler Prozess, der ursprüngliche Permeatfluss kann nur wieder durch die Reinigung der Membran erreicht werden [147, 151].

Im idealen Zustand, d.h. bei gleich großen Poren in der Membran und Vernachlässigbarkeit von Konzentrationspolarisation und Fouling, beschreibt das Hagen-Poiseuille'sche Gesetz den Flüssigkeitsstrom in Ultrafiltrationsmodulen (Gleichung 2-24):

$$J = \frac{d_i^2}{32 \cdot \eta} \cdot \frac{TMP}{L} \quad (2-24)$$

Mit:

J = Permeatfluss [$l/(m^2 \cdot h)$]
 d_i = Kanalinnendurchmesser [m]
 η = dynamische Viskosität [$Pa \cdot s$]
 TMP = Transmembrandruck [bar]
 L = Modullänge [m]

Dieses Gesetz zeigt einen linearen Zusammenhang von Permeatfluss J und dem angewandten Transmembrandruck TMP als treibende Kraft. In experimentellen Ergebnissen ist allerdings erkennbar, dass J bei hohen TMP nicht mehr druckabhängig ist, er wird dann vom Stoffübergang kontrolliert (vgl. Abbildung 11). Dieser ist von verschiedenen Parametern des Systems abhängig.

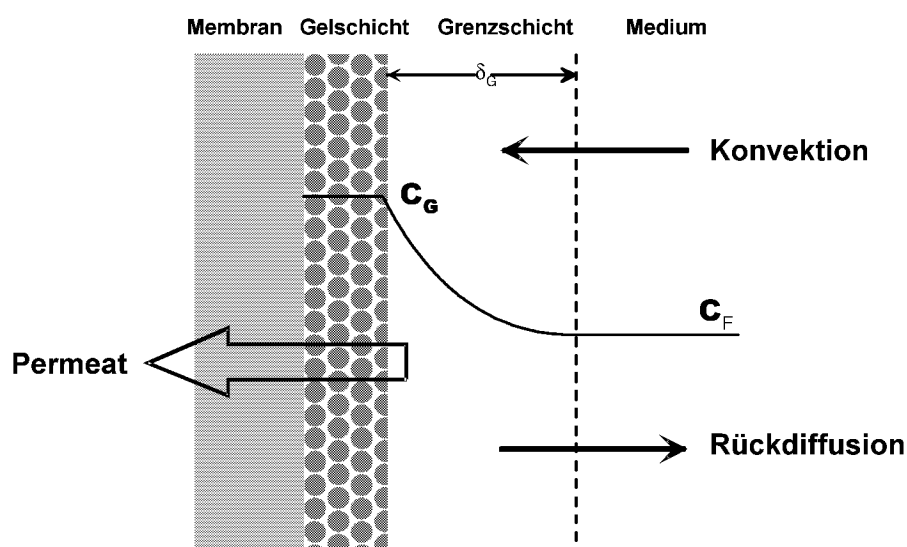


Abbildung 12: Schema der Konzentrationspolarisation an der Ultrafiltrationsmembran.

Die einfachste Erklärung für den stoffübergangskontrollierten, druckunabhängigen Permeatfluss beruht auf der Film-Theorie (vgl. Abbildung 12). Die gelösten Stoffe des Zulaufs mit der Konzentration c_F werden durch Konvektion zur Membran transportiert. Durch das Rückhalten einiger Zulaufkomponenten, entsteht ein Konzentrationsgradient an der Membran. Bei hohen Konzentrationen der Komponenten c_G , bildet sich eine Gelschicht an der Membran, deren Sättigung ein Ausfallen der Komponenten zur Folge hat. Der Konzentrationsgradient bewirkt außerdem eine Rückdiffusion (Stefan-Strom) in das Medium. Befinden sich Konvektion und Stefan-Strom der Zulaufkomponenten im Gleichgewicht, sind die Konzentrationen im Zulauf c_F und in der Grenzschicht c_G konstant. Unter den Annahmen, dass stationäre Verhältnisse vorliegen und dass weder membranparallele Konzentrationsgradienten, noch chemische Reaktionen vorliegen, führt die Integration einer Stoffbilanz über die zulaufseitige Konzentrationsgrenzschicht zur Gleichung 2-25 [208].

$$\frac{(c_G - c_P)}{(c_F - c_P)} = \exp\left(-\frac{J \cdot \delta_G}{D}\right) \quad (2-25)$$

Mit:

$c_{G,P,F}$ = Konzentration in Gelschicht, Permeat, Zulauf [g/l]

δ_G = Grenzschichtdicke der Gelschicht [m]

D = Diffusionskoeffizient [m²/s]

Bei vollständigem Rückhaltevermögen der Membran ist die Konzentration der betrachteten Komponenten im Permeat gleich Null ($c_P = 0$). Der Diffusionskoeffizient D und die Grenzschichtdicke δ_G können wie in Gleichung 2-26 zum Stoffübergangskoeffizienten k zusammengefasst werden.

$$J = \frac{D}{\delta_G} \cdot \ln \frac{c_G}{c_F} = k \cdot \ln \frac{c_G}{c_F} \quad (2-26)$$

Mit:

k = Stoffübergangskoeffizient [-]

Die Konzentrationen c_G und c_F können nur durch Variation der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Rohlösung verändert werden, diese sind bei einem vorgegebenen Fermentationsverfahren konstant. Eine Verbesserung der Filtrationsleistung kann in diesem Fall nur durch eine Steigerung des Stoffübergangskoeffizienten k bzw. einer Reduzierung der Grenzschichtdicke δ_G erreicht werden (siehe Abschnitt 2.3.3.1).

Die Abschätzung des Stoffübergangskoeffizienten kann durch dimensionslose Kennzahlen erfolgen. Es gelten:

$$\text{Sherwood - Zahl(Sh)} = \frac{\text{konvektiver Stoffübergang}}{\text{diffusiver Stoffübergang}} = \frac{k \cdot d_i}{D} \quad (2-27)$$

$$\text{Schmidt - Zahl}(\text{Sc}) = \frac{\text{innere Reibung}}{\text{diffusiver Stoffübergang}} = \frac{\nu}{D} \quad (2-28)$$

$$\text{Reynolds - Zahl}(\text{Re}) = \frac{\text{Trägheitskräfte}}{\text{innere Reibung}} = \frac{\omega \cdot d_i}{\nu} \quad (2-29)$$

Mit:

ν = kinematische Viskosität [m²/s]

ω = Überströmungsgeschwindigkeit [m/s]

Sh, Re und Sc können auf der Basis des Stofftransportes folgendermaßen in Beziehung gesetzt werden (Gleichung 2-30) [152]:

$$\text{Sh} = \text{const.} \cdot \left(\frac{d_i}{L} \right)^\gamma \cdot \text{Re}^\alpha \cdot \text{Sc}^\beta \quad (2-30)$$

α , β und γ sind prozessspezifische Konstanten. In der Ultrafiltration mit laminarer Strömung, d.h. mit einer Reynolds- Zahl von < 2300 [152], gilt Gleichung 2-31 [208]:

$$\text{Sh} = 1,62 \cdot (\text{Re} \cdot \text{Sc} \cdot \frac{d_i}{L})^{0,33} \quad (2-31)$$

Durch Einsetzen der Gleichungen 2-27, 2-28 und 2-29 in Gleichung 2-31 ergibt sich für k :

$$k = 1,62 \cdot \left(\frac{\omega \cdot D^2}{d_i \cdot L} \right)^{0,33} \quad (2-32)$$

Nach Gleichung 2-32 ist der Stoffübergangskoeffizient nicht primär von der Viskosität abhängig. Allerdings nimmt der Diffusionskoeffizient gemäß der Stokes-Einstein-Beziehung

$$\eta \cdot D = \text{const.} \quad (2-33)$$

mit zunehmender Viskosität ab. Die Kombination der Gleichungen 2-32 und 2-33 ergibt, dass der Stoffübergangskoeffizient mit steigender Viskosität abnimmt (Gleichung 2-34).

$$k \sim \eta^{-0,667} \quad (2-34)$$

Eine Deckschichtbildung, die eine Verminderung der Porenfläche zur Folge hat, tritt in nahezu allen Fällen der Ultra- und Mikrofiltration auf. Mikrofiltrationsmembranen können durch diese zusätzliche Selektionsbarriere wie Ultrafiltrationsmembranen wirken [153], bei der Ultrafiltration kann sich eine virenundurchlässige Schicht bilden [218].

Ein Modell, das sowohl den druckkontrollierten, sowie den stoffübergangskontrollierten Bereich der Filtration einschließt, ist das Widerstandsmodell. Demnach gilt eine Reihenschaltung der auftretenden Widerstände (Gleichung 2-35):

$$J = \frac{TMP}{\eta_F \cdot R} = \frac{TMP}{\eta_F \cdot (R_M + R_G + R_{PW})} \quad (2-35)$$

R ist die Summe des membraneigenen Widerstandes R_M und der Widerstände durch die Gelschicht R_G , und durch die Adsorption von Partikeln an den Porenwänden R_{PW} [154].

Der Transmembrandruck (TMP) ist folgendermaßen definiert (Gleichung 2-38):

$$TMP = \frac{P_{Ein} + P_{Aus}}{2} - P_{Permeat} \quad (2-36)$$

Bei der Filtration von reinem Wasser sind R_G und R_{PW} gleich Null. Der membraneigene Widerstand ist eine Konstante, so dass der Permeatflux nur vom an die Membran angelegten Transmembrandruck abhängt. Bei der Filtration einer Fermentationslösung kommt es zu einer Deckschichtbildung und eventuell zum Membranfouling. Für Gleichung 2-35 bedeutet das ein Ansteigen von R_G und R_{PW} , so dass der Transmembrandruck an Einfluss verliert und J zunehmend von den Transportwiderständen abhängig wird.

In der Praxis liegen die Permeatflüsse oft höher als durch Kalkulation erwartet [147, 149]. Dieses sogenannte „Flux-Paradoxon“ zeigt, dass die hier dargestellten Modelle die tatsächlichen Vorgänge an der Membran nicht hinreichend beschreiben [147, 149]. In der Literatur sind eine ganze Reihe von exakteren Modellen zu finden, die aber häufig nur auf das jeweils untersuchte System zutreffen [147, 149, 155, 156].

2.3.3.1. Minimierung von Konzentrationspolarisation und Fouling

Um die Filtrationsleistung zu maximieren und die Reinigungskosten zu verringern, müssen Konzentrationspolarisation und Membranfouling minimiert werden. Die Verringerung der Zulaufkonzentration c_F oder der Grenzschichtdicke δ_G führen zu einer Reduzierung der Konzentrationspolarisation. Abbildung 13 zeigt hierzu einige Möglichkeiten.

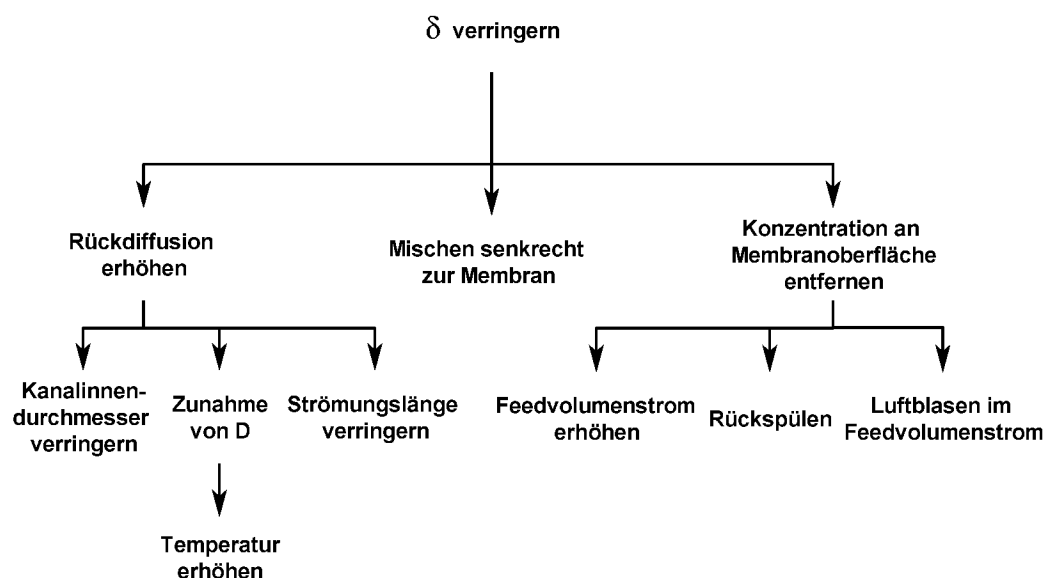


Abbildung 13: Schema der Möglichkeiten zur Reduzierung der Grenzschichtdicke (nach [147, 157, 158]).

Der Einfluss der Modulgeometrie geht direkt aus Gleichung 2-30 hervor. Die Temperaturerhöhung und die Verringerung von c_F sind für einen bereits optimierten mikrobiellen Produktionsprozess unerwünscht. Das Mischen senkrecht zur Membran erfordert einen höheren Energieeintrag, sowie einen gesteigerten technischen Aufwand und ist in Hohlfaser- oder Rohrmodulen mit engem Kanaldurchmesser nicht realisierbar.

Die Methode der Rückspülung (engl.: backwashing) ist in der Trink- und Abwassertechnologie zur Erhöhung der Membranstandzeiten etabliert [157, 159]. Durch kurze Druckimpulse wird das Permeat wieder durch die Membran zurückgepresst, dadurch löst sich die Gelschicht. Die Rückspülung erfordert permeatseitig druckstabile Membranen und eine vorsichtige Durchführung, weil es sonst zu internen Verblockungen kommen kann [205, 208]. Der apparative Aufwand kann eine Anwendung in anderen Bereichen der Biotechnologie unmöglich machen, zumal ein Permeatverlust pro Zeiteinheit einkalkuliert werden muss [158].

Sowohl die Erhöhung der Überströmungsgeschwindigkeit, als auch das Einpressen von Luftblasen in die Hohlfasern, bewirkt eine Erhöhung der Scherkräfte, die die Gelschichtbildung reduzieren [155, 157, 158]. Dabei muss eine Schädigung der Mikroorganismen vermieden werden. Demgegenüber steht eine Begünstigung der Gelschichtbildung aufgrund einer Steigerung des Druckgefälles im Modul, das durch die Erhöhung der Überströmungsgeschwindigkeit hervorgerufen wird. Außerdem erfordert diese Erhöhung einen gesteigerten Energieeintrag [208]. Dagegen kann der Energieeintrag durch den zusätzlichen Luftstrom im Modul bei deutlich gesteigerter Filtrationsleistung gesenkt werden [157, 158].

Die bisher vorgestellten Maßnahmen eignen sich allerdings nicht, um das Membranfouling zu verhindern, weil die Wechselwirkungen der Lösungsbestandteile stärker sind als wirkende Scherraten [151]. Das Fouling ist im wesentlichen von der Konformation der anwesenden Proteine abhängig [151-157]. Diese kann durch Temperatur- und pH-Änderung oder der Zugabe von Chelatbildnern variiert werden, allerdings muss mit Einflüssen auf den mikrobiellen Prozess gerechnet werden. Ein Fouling durch hydrophobe Substanzen kann durch die Verwendung einer hydrophileren Membran gemindert werden.

2.3.4. EINSATZ VON HOHLFASERMODULEN ZUR ZELLABTRENNUNG

Verfahren zur Abtrennung von zellfreien Fermentationsüberständen mittels Keramik- oder Hohlfaser-Filtrationsmodulen, wurden schon von einigen Autoren beschrieben [153, 154, 155, 158, 201, 208] und in den Abschnitten 2.3 und 4.5 zusammengefasst.

Hohlfaserfiltrationsmodule aus Polysulfon zeichnen sich gegenüber Keramikmodulen oder auch Rohrmodulen aus Polysulfon durch im Verhältnis geringere Volumenströme und Energieeinträge aus [204]. Dies führt zu wesentlich weniger Scherstress für die Zellen.

Hohlfasermodule aus Polysulfon hatten jedoch in der Vergangenheit den gravierenden Nachteil, dass die einzelne Faser aus einer Stützschrift bestand, die aus Makrovoids

aufgebaut war und auf dessen Oberfläche die Membran aufgetragen wurde [160]. Dieser Aufbau führte unter anderem bei pulsierenden Druckschwankungen, wie sie Schlauchpumpen verursachen, zu Defekten an der Membranoberfläche und Phasendurchbrüchen von der Retentat- zur Permeatseite [161, 205]. Diese Hohlfilterfiltrationstechnik war deshalb nur bedingt einsetzbar. Der wesentliche Unterschied der in dieser Arbeit eingesetzten Hohlfilterfiltrationsmodul zu herkömmlichen Ultrafiltrationsmembranen, ist eine schaumförmige Struktur der Stützschrift (siehe Abbildung 14), die den Hohlfiltern eine hohe mechanische Stabilität verleiht. Durch den schaumförmigen Aufbau der Membranstruktur ist eine sogenannte „Pin-hole-Bildung“ (Löcher in der Membran, die zu Phasendurchbrüchen führen) nicht mehr möglich [160]. Durch weitere Änderungen an der Konstruktion des Moduls konnte zudem erreicht werden, dass die Module autoklavierbar bzw. dampfsterilisierbar sind [205].

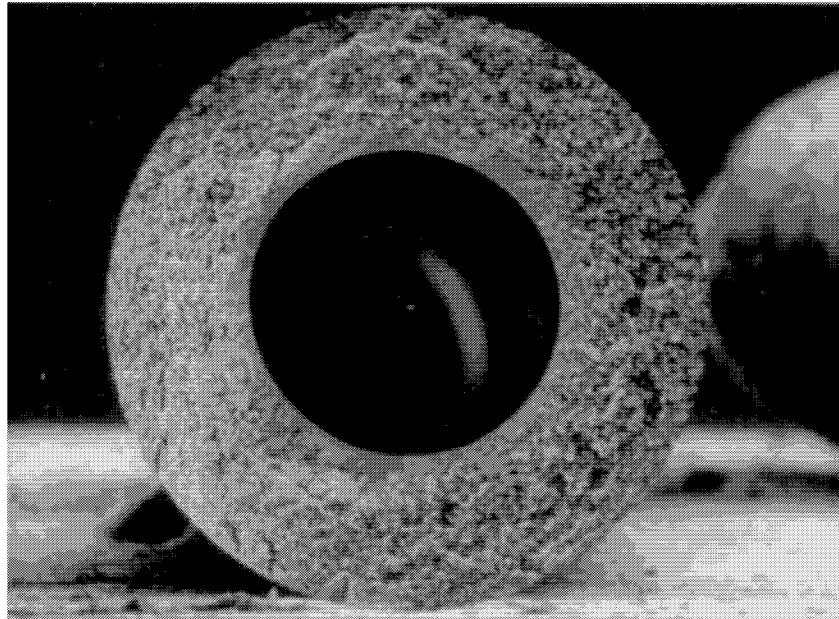


Abbildung 14: Querschnitt durch einen Kanal des Hohlfiltermoduls mit schaumförmiger Stützschrift (42-fache Vergrößerung; Schleicher&Schüll).

Verschiedene Publikationen berichten über den Einsatz dieser Module in der Biotechnologie, wie zum Beispiel zur Essigfiltration [162], aber auch zur Separation von Insektenzellen [163] oder zur Virusfiltration und Separation tierischer Zellen [161]. Auch die Aufkonzentrierung von Fermentationen der Hefe *Pichia pastoris* bis zu Zelldichten von 600 g/l Feuchtmasse, wurde bereits beschrieben [164].

2.4. GRUNDLAGEN DER ^1H -NMR

Die Kernresonanz-Spektrometrie (NMR) als strukturanalytisches Hilfsmittel besitzt eine überragende Stellung in der Chemie. Die physikalische Grundlage der NMR ist der Kernmagnetismus. Die Atomkerne gewisser Elemente wie Wasserstoff (^1H), Kohlenstoff

(^{13}C) und Phosphor (^{31}P) besitzen einen Eigendrehimpuls $\vec{p}$ und damit ein magnetisches Dipolmoment (Gleichung 2-37).

$$\vec{\mu} = \gamma \cdot \vec{p} \quad (2-37)$$

Mit :

$\vec{p}$ = Eigendrehimpuls [J/s]

γ = magnetogyrisches Verhältnis [rad/Ts]

$\vec{\mu}$ = magnetisches Moment [GyA]

Das magnetogyrische Verhältnis γ ist dabei eine für die einzelnen Kernarten charakteristische Konstante. Die Wechselwirkungen der magnetischen Kernmomente einer Substanz mit einem äußeren Magnetfeld $\vec{B}_0$, führt zu einem Kern-Energieniveau-Schema, da sich die Kernmomente nur in bestimmten Energielagen zum äußeren Feld ausrichten. Diese sogenannten Kern-Zeeman-Niveaus haben die Energie (Gleichung 2-38):

$$E_m = -\gamma \cdot \vec{p}_b \cdot \vec{B}_0 \quad (2-38)$$

Mit :

$\vec{p}_b$ = Komponente des Eigendrehimpuls in $\vec{B}_0$ [J / s]

$\vec{B}_0$ = äußeres Magnetfeld [T]

γ = magnetogyrisches Verhältnis [rad/Ts]

E_m = Energie [J]

Mittels eines Hochfrequenzpulses können Übergänge zwischen den einzelnen Energieniveaus induziert werden. Die dabei absorbierte Energie wird als Resonanzsignal dargestellt. Für Kerne in unterschiedlichen Molekülpositionen werden Resonanzsignale bei verschiedenen Frequenzen gemessen, da bei konstantem $\vec{B}_0$ der genaue Wert der Energie zwischen den einzelnen Kernzuständen von der elektronischen Umgebung des Kerns innerhalb des Moleküls abhängt. Durch die Analyse der Signale bezüglich ihrer Frequenzlage, Intensität, Linienformen und Aufspaltung lassen sich schließlich chemische Strukturen, sowie deren räumliche Anordnung und Dynamik aufklären [165].

Die exakte Resonanzfrequenz einer bestimmten Kernsorte hängt in charakteristischer Weise von der Kernumgebung ab. Da sich die effektive Magnetfeldstärke am Kernort vom Magnetfeld $\vec{B}_0$ um das induzierte Feld $\sigma\vec{B}_0$ unterscheidet, geht die Abschirmungskonstante σ in die Resonanzbedingungen mit ein (Gleichung 2-39 und 2-40).

$$\vec{B}_{eff} = \vec{B}_0 - \sigma\vec{B}_0 \quad (2-39)$$

Mit:

σ = Abschirmungskonstante [-]

$\vec{B}_0$ = äußeres Magnetfeld [T]

$$\text{und} \quad \nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 (1 - \sigma) \quad (2-40)$$

Mit :

ν = Resonanzfrequenz [1/s]

B_0 = homogenes, statisches Magnetfeld [T]

σ = Abschirmungskonstante [-]

γ = magnetogyrisches Verhältnis [rad/Ts]

Da die Lage der Kernresonanz-Absorption wegen $\nu = f(\vec{B}_0)$ nicht durch eine absolute Skala von ν oder $\vec{B}_0$ angegeben werden kann, wird die Signallage auf eine Referenzverbindung bezogen. Bei ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrometrie wird 3-tri-methylsilyl-propion-2,2,3,3-d-säure (TSP) häufig verwendet. Daraus ergibt sich für die Differenz der Signallage von untersuchtem Kern X und TSP folgendes Verhältnis (Gleichung 2-41):

$$\Delta\nu = \nu(x) - \nu(\text{TSP}) = \frac{\gamma}{2\pi} \Delta B \quad (2-41)$$

Mit :

ν = Resonanzfrequenz [1/s]

B = homogenes, statisches Magnetfeld [T]

γ = magnetogyrisches Verhältnis [rad/Ts]

Zur Bestimmung der Signallage definiert man als chemische Verschiebung δ [-] des Kernes X den Zahlenwert (Gleichung 2-42):

$$\delta(x) = 10^6 \cdot \frac{\Delta\nu}{\nu} \quad (2-42)$$

Mit :

$\delta(\text{TSP}) = 0$

Die chemische Verschiebung δ ist eine von der Messfrequenz bzw. Magnetfeldstärke unabhängige, für den betrachteten Kern in seiner Umgebung charakteristische Größe. Da $\Delta\nu$ im Vergleich zu ν sehr klein ist, wurde der Faktor 10^6 eingeführt. So wird δ in ppm angegeben. Der Umfang der δ -Skala beträgt bei der ^1H -NMR etwa 10, bei der ^{13}C -NMR rund 200 ppm. Die Fläche unter der Absorptionskurve eines Kernresonanz-Signals ist ein Maß für die Intensität der Übergangs. Die Integration wird vom NMR-Spektrometer in Form von Stufenkurven geliefert. Bei der ^1H -NMR-Spektrometrie ist die Intensität proportional zu der Zahl der an dieser Stelle absorbierenden ^1H -Kerne des Moleküls.

Die in der Kernresonanz gemessenen Signale zeigen zumeist eine Feinstruktur (Aufspaltung). Nach der Anzahl der Teilbanden können sie als Singulett, Duplett, Triplett oder Multipllett auftreten. Die Ursache der Aufspaltung liegt in der Wechselwirkung mit den Nachbarkernen, die ein magnetisches Moment besitzen.

Kernresonanz-Spektren werden in der Analytik zumeist in deuterierten Lösungsmitteln (CDCl_3 , D_2O) aufgenommen. Der Deuterierungsgrad liegt meistens unter 100 %, so dass mit

Lösungsmittelsignalen (z.B. HDO-Signal) gerechnet werden muss. Als Referenzsubstanz zur Fixierung des Nullpunktes und als interner Standard für die Quantifizierung wird üblicherweise TSP verwendet.

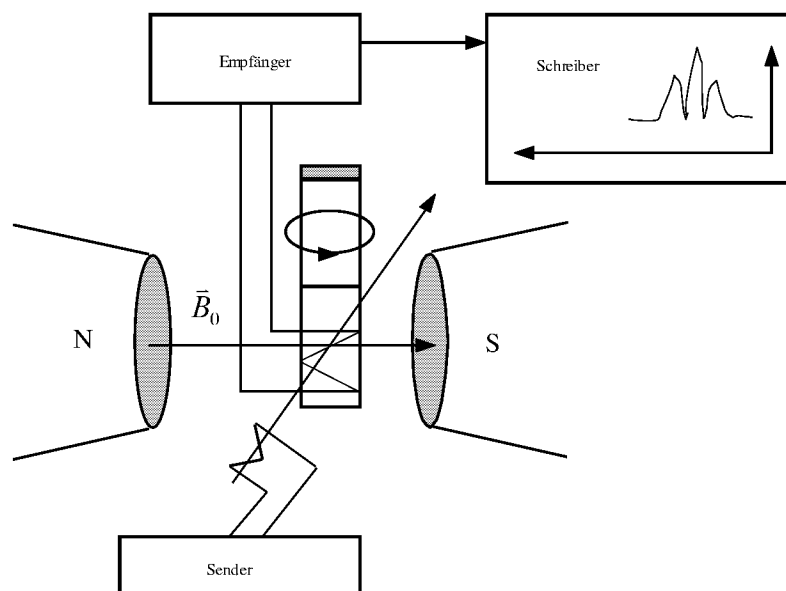


Abbildung 15: Schematischer Aufbau eines CW-NMR-Spektrometers.

In Abbildung 15 ist der schematische Aufbau eines Kernresonanz-Spektrometers dargestellt. Das Probenröhrchen befindet sich bei der Messung in den Polschuhen eines Permanent- oder Elektromagneten, der ein statisches, homogenes Magnetfeld B_0 erzeugt. Um die horizontalen Feldinhomogenitäten zu vermeiden, rotiert das Probenröhrchen um seine Längsachse. Die Kerne werden bei der Messung durch einen Hochfrequenzsender hoher Stabilität angeregt. Dabei wird in der senkrecht zur Senderspule und zum Magnetfeld angeordneten Empfängerspule im Resonanzfall durch die in der Probe bei der Spin-Inversion induzierte Magnetisierung ein Strom erzeugt. Das verstärkte Signal wird aufgezeichnet.

Die Resonanzbedingungen können auf zwei Arten erfüllt werden:

- bei konstanter Feldstärke B_0 die Frequenz variieren.
- bei konstanter Frequenz das Magnetfeld variieren.

In beiden Fällen werden die einzelnen Resonanzen nacheinander durch kontinuierliche Veränderung der Resonanzfrequenz bzw. der Feldstärke erfasst. Diese Methode wird als Continuous-Wave-Technik (CW-Technik) bezeichnet.

Aufgrund der Tatsache, dass die Signale einer Substanz unter gleichen pH-Bedingungen immer an der gleichen Stelle der ppm-Skala des ^1H -NMR-Spektrums auftauchen und die Anzahl der Protonen durch die Referenzsubstanz bestimmt werden kann, bietet diese Methode den Vorteil, quantitative Analysen durchführen zu können, ohne die Reinsubstanz als Standard zu benötigen. Zur genauen Identifizierung müssen die Resonanzlagen, die Signalformen sowie die Kopplungskonstanten der Substanz bekannt sein. Außerdem ist es erforderlich, alle Signale der gesuchten Substanz im Spektrum zu finden. Die Möglichkeit,

dass eine andere Substanz an der gleichen Stelle gleiche Signale aufweist, muss ausgeschlossen sein. Da alle Intermediate des Aromatenbiosyntheseweges bekannt sind, ist die Quantifizierung mittels $^1\text{H-NMR}$ möglich. Eine detaillierte Beschreibung der theoretischen Grundlagen zur $^1\text{H-NMR}$ -Messung ist der Arbeit von Zaja zu entnehmen [166].

2.5. INTEGRATION DER PRODUKTABTRENNUNG

2.5.1. MOTIVATION FÜR DEN INTEGRIERTEN ANSATZ

Die Produktion niedermolekularer Metabolite wie Aminosäuren, Vitamine oder Derivate hiervon durch fermentative Prozesse, wird oft erst ökonomisch sinnvoll, wenn hohe Produktbildungsraten und Raum-Zeit-Ausbeuten erreicht werden können. Insbesondere durch die heute etablierten, sehr effizienten Techniken der Gentechnik können rekombinante Stämme entwickelt werden, mit denen unter Einsatz entsprechender Prozesstechnik diese hohen Produktbildungsraten, Substratausbeuten, wie auch Raum-Zeit-Ausbeuten, erreicht werden. Um den genannten Kriterien zu entsprechen, wird im allgemeinen die Fed-Batch-Fermentationstechnik eingesetzt (vgl. Abschnitt 2.2.1). Bei diesem Verfahren akkumuliert das Produkt über die Prozesszeit und wird nach Beendigung der Fermentation und Abtrennung der Zellen aufgereinigt. Bei Einsatz traditioneller Aufarbeitungsverfahren, wie z.B. Festbettadsorption oder auch Ionenaustauschchromatographie, sinken die Aufarbeitungskosten mit steigender Produktkonzentration.

Die Produktakkumulation während der Fermentation, kann sich jedoch aufgrund von stoffwechselphysiologisch bedingten Inhibierungen der Enzymreaktionen negativ auf die weitere Produktbildung auswirken. Hat das Produkt sogar toxische Eigenschaften, ist oft der gesamte Fermentationsprozess in Frage gestellt. Hier sind auch der modernen Molekulargenetik oft Grenzen auferlegt. Um diese negativen Effekte im Vorfeld zu vermeiden, gibt es aber einen prozesstechnischen Lösungsansatz. Über eine simultane Produktabtrennung, d.h. durch Integration des Aufarbeitungsprozesses in den Produktionsprozess, kann das Produkt sofort abgetrennt und damit eine Akkumulation vermieden werden.

Unter einem integrierten Ansatz wird in der vorliegenden Arbeit eine an den Bioreaktor gekoppelte und zur Fermentation simultan ablaufende, kontinuierliche Abtrennung des Produktes (L-Phe) verstanden. Dabei wird über einen Umlauf zellfreier und produktreicher Fermentationsüberstand entnommen, das Produkt über einen Aufarbeitungsprozess selektiv abgetrennt und das produktarme Permeat in einem geschlossenen Kreislauf in den Bioreaktor zurückgeführt. Durch den integrierten Ansatz wird eine Verbesserung der Wirtschaftlichkeit des Gesamtprozesses erwartet. Die Gründe hierfür lassen sich in biologische und technische Aspekte einteilen.

Biologische Gründe:

Bei der Aromatenbiosynthese in *E. coli* handelt es sich um ein hochgradig reguliertes System [7, 15], wobei insbesondere die von der DAHP-Synthase katalysierte Eingangsreaktion von zentraler Bedeutung ist (vgl. Abschnitt 2.1.2). Zwar konnte eines der drei hier vorliegenden Isoenzyme, die L-Tyrosinspezifische DAHP-Synthase, dereguliert werden (vgl. Abschnitt 2.1.4), jedoch führen auch unphysiologisch hohe Konzentrationen an L-Phe zu einer Inhibierung des Enzyms [34, 167]. Weitere Autoren vermuten, dass hohe L-Phe-Konzentrationen einen insgesamt sich negativ auswirkenden Effekt auf *E. coli* haben [31, 103, 114]. Trennt man das produzierte L-Phe durch entsprechende Techniken bereits während der Fermentation ab, lässt sich dieser negative Effekt vermutlich vermeiden, wie schon für andere Produkte gezeigt werden konnte [168].

Technische Gründe:

Auch technische Aspekte lassen eine integrierte Produktabtrennung interessant erscheinen [169]. Verschiedene Autoren [170, 171] nennen relevante ökonomische Vorteile durch eine integrierte Abtrennung des Wertstoffes aus der laufenden Fermentation. Ein wichtiger Aspekt ist die theoretische Ausbeute von 100 % in der ersten Trennoperation. In vollständig integrierten Ansätzen kann diese Ausbeute erreicht werden, weil die Fermentationslösung im Kreislauf gefahren und vollständig recycelt wird. Des Weiteren können vorgelegte Nährsalze und Substrate bei selektiver Abtrennung des Produktes und Rückführung des Permeates in den Fermentationsprozess, weiter genutzt werden. Eine bessere Ausnutzung des Reaktorvolumens durch die Integration, führt ebenfalls zur Kostenersparnis [172]. Aufgrund der kontinuierlich betriebenen Aufarbeitung und der im Vergleich zu satzweisen Aufarbeitungsschritten kleinen Volumenströme, sollten Investitionskosten eingespart werden können [173, 174].

2.5.2. ANFORDERUNGEN AN DIE PRODUKTABTRENNUNG

Ein Aufarbeitungsverfahren, das in einen Fermentationsprozess integriert wird, sollte folgende Merkmale aufweisen:

- keine toxischen Effekte auf den Fermentationsprozess
- geringe oder keine Veränderung der Ionenstärke des Fermentationsüberstands
- keine Beeinflussung der Mikroorganismen durch eine Gradientenbildung im Umlauf (pO₂, pH)
- möglichst geringe Verluste an vorgelegten Medienbestandteilen (Glucose, Salze)
- selektive Abtrennung des Produkts
- Aufkonzentrierung des Produkts

Verschiedene Aufarbeitungsverfahren wurden auf Basis der definierten Kriterien bewertet und die Reaktiv-Extraktion, in den Arbeiten von Maaß [218], als aussichtsreichstes Verfahren ausgewählt. Bei diesem Aufarbeitungsverfahren handelt es sich um ein Flüssigmembran-

verfahren. Dabei wird die filtrierte Fermentationslösung in einem geeigneten Kontaktor mit einer organischen Phase in Kontakt gebracht. Aufgrund des ionischen Charakters des L-Phe, kann es ohne eine Maskierung der Ladung nicht in die unpolare, organische Phase übergehen. In der organischen Phase ist ein Carrier gelöst, der als Flüssigionentauscher fungiert und die Ladung des L-Phe maskiert, so dass es sich in der unpolaren Phase lösen kann. In einem zweiten Kontaktor kann das L-Phe durch Gegenionen vom Carrier verdrängt werden und in eine wässrige Phase rückextrahiert werden. Abbildung 16 stellt schematisch die Integration der Reaktiv-Extraktion in den Fermentationsprozess dar.

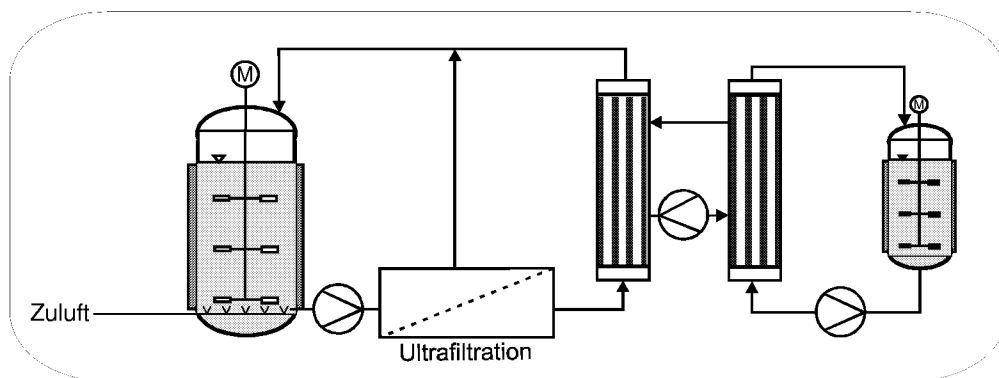


Abbildung 16: Integration der Reaktiv-Extraktion in den Fermentationsprozess [218].

Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in der Selektivität, welche durch die Affinität des aromatischen Rings am L-Phe zu einer organischen Phase und der Ladung des Carriers erzeugt wird. Durch diese Affinität werden mit einer hohen Selektivität Ionen extrahiert, die über einen aromatischen Rest verfügen und eine Aminogruppe zur Maskierung besitzen. Der einstellbare Gradient in Form der Gegenionen ermöglicht eine Extraktion entgegen des L-Phe-Gradienten, so dass auch aufkonzentriert werden kann [223]. Ein Nachteil ist die mögliche Toxizität des Carriers auf die Zellen in der Fermentation [175].

2.5.3. REAKTIV-EXTRAKTION IN DER BIOTECHNOLOGIE

Die Gewinnung und Reinigung von fermentativ hergestellten Produkten stellt spezifische Anforderungen an das Aufbereitungsverfahren. Die Komponenten liegen in stark verdünnten wässrigen Lösungen vor und sind oft Temperatur- und pH-sensitiv. Die bei Fermentationen entstehenden Gemische bestehen meist aus Stoffen mit sehr ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften. Zur Trennung dieser Komponenten stellt die Reaktiv-Extraktion ein interessantes Werkzeug dar [218].

Die Reaktiv-Extraktion bietet gegenüber anderen Trennverfahren, für den Einsatz in der Biotechnologie, einige Vorteile:

- Die Extraktionsausbeute kann wegen der höheren Verteilungskoeffizienten gegenüber der Extraktion erheblich gesteigert werden [176, 177, 178].
- Die selektive Abtrennung stark polarer Carbonsäuren, wie Milchsäure oder Aminosäuren, ist nur durch Reaktiv-Extraktion möglich [177, 178, 179, 180, 181].
- Die Abtrennung von Citronensäure aus Fermentationslösungen, mittels Reaktiv-Extraktion, wurde von Wieczorek und Brauer beschrieben [182].
- Die reaktive Aufspaltung eines Gemisches von Aminosäuren ist wegen der hohen Selektivität der Extraktionsmittel in Verbindung mit der organischen Phase als Selektionsbarriere möglich [183].
- Die Extraktion von Penicillin kann durch den Einsatz von Reaktivkomponenten vom stark sauren, in den neutralen pH-Bereich verschoben werden. Dadurch wird die Stabilität des Penicillins erheblich gesteigert [177, 180].

Außer in den Arbeiten von Wieczorek und Brauer [182] ist es bisher jedoch nicht möglich gewesen, das Raffinat direkt in den Bioreaktor zurückzuführen. Statt dessen wurden aufwendige Reinigungs- und Regenerationsschritte beschrieben, bevor eine Rückführung möglich ist.

Auch die nicht integrierte Reaktiv-Extraktion von L-Phe mit der ELM-Technologie (Emulsion Liquid Membrane) ist bereits in der Literatur beschrieben worden [184, 185, 186, 187, 188]. Dabei wurden sowohl klassische Verfahren, wie eine pulsierte Siebbodenkolonne [189], als auch membrangestützte Techniken [190] eingesetzt. Jedoch waren die Trennleistungen und erreichten Selektivitäten sehr gering. Die hohe Toxizität der in den oben genannten Arbeiten eingesetzten Carrier auf die Zellen, machen jedoch den Einsatz dieser Techniken für einen industriellen Produktionsprozess unmöglich.

3. PROBLEMSTELLUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung eines Fermentationsprozesses zur Produktion von L-Phenylalanin mit *Escherichia coli*. Parallel zu der Prozessentwicklung werden in enger Zusammenarbeit von den Projektpartnern im IBT 1 potentielle *E. coli* Produktionsstämme entwickelt und im IBT 2 ein Aufarbeitungsverfahren in Form einer Reaktiv-Extraktion etabliert.

Anschließend sollen unter Einsatz des entwickelten Fermentationsprozesses verschiedene Stämme charakterisiert und hinsichtlich der L-Phe-Bildung bewertet werden. Ziel ist die Identifikation eines geeigneten Produktionsstammes durch Eliminierung reaktionslimitierender Schritte innerhalb der Aromatenbiosynthese. In publizierten Ansätzen zur Prozessentwicklung konnte eine maximale integrale Produktselektivität von 20 % [140] bei einem differentiellen Maximum von 23 % erreicht werden. Konstantinov et. al. [114] berichtet über einen Prozess, in dem eine maximale differentielle Produktselektivität von 24 % und eine integrale Raum-Zeit-Ausbeute von 0,85 g/(l*h) erreicht wurde. In dieser Fermentation wurden nach 50 h 46 g/l L-Phe gebildet. Park und Rogers [106] publizierten einen Prozess, in dem 22,4 g/l L-Phe bei einer maximalen Raum-Zeit-Ausbeute von 0,72 g/(l*h) erreicht wurden.

Eine den Arbeiten zugrunde liegende ökonomische Abschätzung [235] fasst zusammen, dass die fermentative Herstellung von L-Phenylalanin mit dem Erreichen einer Produktselektivität von 35 % und einer Raum-Zeit-Ausbeute von 45 g/(l*d) eine wirtschaftlich relevante Alternative zur chemischen Synthese darstellt.

Außerdem soll zum Abschluss der Prozessentwicklung, nach einer Maßstabsvergrößerung, die Reaktiv-Extraktion zur simultanen L-Phe-Abtrennung in den Produktionsprozess integriert werden. Eine Produktinhibierung durch L-Phe sollte so vermieden und die Produktselektivität des Gesamtprozesses erhöht werden.

Basierend auf den zur Entwicklung eines Produktionsprozesses notwendigen Teilbereichen Stammentwicklung, Fermentation und Aufarbeitung, ergeben sich auch für die vorliegende Arbeit drei Aufgabengebiete:

1. Entwicklung eines Fermentationsprozesses mit dem Ziel, neben einer hohen Raum-Zeit-Ausbeute, integralen Selektivität und Konzentration an L-Phe, eine hohe Reproduzierbarkeit zu gewährleisten und die Industrierelevanz, durch eine Maßstabsvergrößerung, zu zeigen. Zudem muss dieser Prozess so ausgelegt sein, dass die Fermentation unterschiedlicher, gentechnisch veränderter, potentieller *E. coli* Produktionsstämme möglich ist. Dadurch soll eine Charakterisierung unter Vergleichbaren Produktionsbedingungen ermöglicht werden. Die Stämme können sich unter anderem durch unterschiedliche Wachstums-, Substratverbrauchs- oder Produktbildungs-raten voneinander unterscheiden. Unter Verwendung eines synthetischen Mediums müssen deshalb Strategien entwickelt werden, um die Substrate Glucose und L-Tyrosin, entsprechend den Bedürfnissen der verschiedenen Stämme, zuzuführen.

2. Unter Verwendung des etablierten Fermentationsprozesses und einer umfangreichen Analytik, sollen verschiedene *E. coli* Stämme fermentiert und deren Eignung als Produktionsstämme beurteilt werden. Da die Stammentwicklung vorerst das Ziel hat, die Aromatenbiosynthese zu deregulieren (siehe hierzu Abschnitt 2.1.3), liegt der Schwerpunkt dieser Arbeit in der Identifikation reaktionslimitierender Schritte innerhalb der Aromatenbiosynthese. Die Ergebnisse sollen der Weiterentwicklung des Produktionsstammes im IBT 1 dienen.
Außerdem sollen mögliche Nebenprodukte identifiziert und quantifiziert werden. Nach dem Auffinden der Ursache für die Nebenproduktbildung soll deren Konzentration, durch Veränderungen der Prozessstrategie, gering gehalten werden.
3. Nach erfolgreicher Etablierung des Fermentationsprozesses im Pilotmaßstab, soll in diesem Maßstab eine Integration der Reaktiv-Extraktion in den Produktionsprozess erfolgen. Da für dieses Aufarbeitungsverfahren die Bereitstellung von zellfreiem Fermentationsüberstand notwendig ist, muss zuvor ein geeignetes Verfahren zur kontinuierlichen Permeatabtrennung identifiziert und charakterisiert werden. Anschließend sollen die Fermentation, Permeatabtrennung und Reaktiv-Extraktion zu einem Hybridprozess verbunden, und in einem Demonstrationsversuch die Auswirkungen der einzelnen Prozessteile aufeinander untersucht werden. Neben den ökonomischen Vorteilen einer simultan zur Produktion verlaufenden Produktaufreinigung, soll durch dieses Verfahren, die die weitere L-Phe-Bildung inhibierende Akkumulation des Produktes verringert, und so eine höhere Produktselektivität erreicht werden.

Die Aufgabenziele gliedern sich im Einzelnen wie folgt:

Prozessentwicklung:

- Etablierung einer grundlegenden Fermentationsstrategie im Zulaufverfahren, zur Produktion von L-Phenylalanin mit *E. coli*.
- Entwurf einer Strategie zur Regelung der Glucosezufuhr innerhalb der Zulaufphase der Fermentation. Dazu soll im Reaktor die Glucosekonzentration on-line gemessen und mittels eines modellgestützten, adaptiven Reglers, entsprechend dem Substratverbrauch, nachgeführt werden. Durch Einstellung verschiedener Glucosekonzentrationen sollte der Einfluss verschiedener Substratniveaus auf Produkt- und Nebenproduktbildung abgeschätzt werden.
- Nach der Identifizierung von Schlüsselkomponenten (z.B. L-Tyrosinverbrauch) sollen diese durch Implementierung weiterer, vom Glucoseverbrauch unabhängiger Regelungsstrategien, optimal zugeführt werden.
- Nach der Überprüfung der Reproduzierbarkeit des entwickelten Prozesses, soll die Fähigkeit zur Charakterisierung verschiedener Produktionsstämme untersucht werden.
- Eine Maßstabsübertragung in den 300 l Pilotmaßstab soll die Industrierelevanz der Prozessstrategie zeigen.

Stammcharakterisierung:

- Eine umfangreiche off-line Analytik, sowie die differentielle bzw. integrale Beschreibung der Kohlenstoffflüsse, soll der Einschätzung der Qualität neuer potentieller Produktionsstämme dienen.
- Auf Basis des entwickelten Fermentationsprozesses, sollen in der Aromatenbiosynthese gentechnisch veränderte Stämme charakterisiert werden. Ziel dieser Untersuchungen ist die Identifizierung eines Stammes, der, unter Vermeidung von Nebenprodukten, eine empirisch einzuschätzende, optimale Kombination aus hoher Raum-Zeit-Ausbeute, integraler Produktselektivität und Konzentration an L-Phenylalanin erreichen soll. Diese Arbeiten müssen in enger Zusammenarbeit mit der Stammentwicklung des IBT 1 stattfinden.

Integrierter Ansatz:

- In Voruntersuchungen müssen die Auswirkungen der Integration der Reaktiv-Extraktion auf den Fermentationsprozess abgeschätzt werden.
- Die Etablierung, Charakterisierung und Maßstabsvergrößerung eines Systems zur kontinuierlichen Permeatabtrennung soll die Verknüpfung von Fermentation und Reaktiv-Extraktion zu einem Hybridprozess ermöglichen.
- In einem Demonstrationsversuch im Pilotmaßstab soll in enger Zusammenarbeit mit Maaß [218] der Einfluss der integrierten Reaktiv-Extraktion auf den Fermentationsprozess untersucht werden. Aus zellfreiem Fermentationsüberstand soll L-Phenylalanin kontinuierlich und selektiv abgetrennt und das produktarme Permeat direkt in den Produktionsprozess zurückgeführt werden. Untersucht werden die Auswirkungen auf den Produktionsverlauf.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. MEDIEN UND LÖSUNGEN

4.1.1. LB-MEDIUM

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

Die Substanzen wurden in H₂O bidest. gelöst und der pH-Wert mit NaOH auf 7,2 eingestellt. Bei Verwendung in Petrischalen wurde Agar-Agar zugegeben. Das Medium wurde 20 min bei 121 °C autoklaviert. Im Falle der Herstellung von Stammkulturen (LB-Medium) oder der Untersuchung auf Plasmidstabilität (LB-Agar), wurde nach dem Abkühlen auf 60 °C Ampicillin gegeben. Medium und Agarplatten wurden steril bei 4 °C gelagert.

4.1.2. STAMMLÖSUNGEN DER SALZE

MgSO ₄ *7 H ₂ O	300 g/l
CaCl ₂ *2 H ₂ O	15 g/l
KH ₂ PO ₄	150 g/l
K ₂ HPO ₄	600 g/l
NaCl	100 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	250 g/l
FeSO ₄ *7 H ₂ O/Na-Citrat	7,5/100 g/l
Vitamin B ₁ (Thiamin*HCl)	7,5 g/l
Glucose	500 g/l
Ampicillin	100 g/l

Die Salze wurden in H₂O bidest. gelöst und bei Raumtemperatur gelagert. Die Eisensulfat-/ Natriumcitrat-Lösung wurde dunkel aufbewahrt, die Thiamin- und die Ampicillinlösung wurden bei -20 °C verwahrt. Die Glucose wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

4.1.3. SPURENELEMENTESTAMMLÖSUNG

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

Die Salze wurden in H₂O bidest. bei pH 1 - 2 gelöst (Zugabe von $\approx$ 30 ml konz. HCl) und bei Raumtemperatur gelagert.

4.1.4. VORKULTURMEDIUM

Stammlösung	Einsatz pro 1 l Medium [ml/l]	Endkonzentration [g/l]
MgSO ₄ *7 H ₂ O	1,0 ml/l	0,3 g/l
CaCl ₂ *2 H ₂ O	1,0 ml/l	0,015 g/l
KH ₂ PO ₄	20 ml/l	3,0 g/l
K ₂ HPO ₄	20 ml/l	12 g/l
NaCl	1,0 ml/l	0,1 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 ml/l	5,0 g/l
FeSO ₄ *7 H ₂ O/Na-Citrat	10 ml/l	0,075/1,0 g/l
Spurenelementlösung	1,5 ml/l	-
Vitamin B ₁ (Thiamin*HCl)	1,0 ml/l	0,0075 g/l
L-Tyrosin	-	0,08 g/l
Glucose	10 ml/l	5,0 g/l
Ampicillin	1,0 ml/l	0,1 g/l

Bis auf die stark saure Spurenelementlösung, wurden die Stammlösungen nacheinander in H₂O bidest. gegeben. Anschließend wurde die Spurenelementlösung und das ungelöste L-Tyrosin zugegeben. Um das feste L-Tyrosin zu lösen, wurde das Medium für ungefähr eine Stunde gerührt. Der gepufferte pH-Wert lag bei 7,2. Das Medium wurde in eine zuvor autoklavierte Vorratsflasche sterilfiltriert, bei 4 °C gelagert und, bei Bedarf, in zuvor sterilisierte Erlenmeyerkolben umgefüllt.

4.1.5. HAUPTKULTURMEDIUM

Stammlösung	Einsatz pro 1 l Medium [ml/l]	Endkonzentration [g/l]
MgSO ₄ *7 H ₂ O	10 ml/l	3,0 g/l
CaCl ₂ *2 H ₂ O	1,0 ml/l	0,015 g/l
KH ₂ PO ₄	20 ml/l	3,0 g/l
NaCl	10 ml/l	1,0 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 ml/l	5,0 g/l
FeSO ₄ *7 H ₂ O/Na-Citrat	15 ml/l	0,1125/1,5 g/l
Glucose	30 ml/l	15 g/l
Spurenelementlösung	1,5 ml/l	-
Ampicillin	1,0 ml/l	0,1 g/l
Vitamin B ₁ (Thiamin*HCl)	10 ml/l	0,075 g/l
L-Tyrosin	-	0,3 g/l

Alle Komponenten wurden in der angegebenen Reihenfolge in H₂O bidest. gegeben und nach Zugabe des festen L-Tyrosin für mehrere Stunden unter Rühren gelöst. Anschließend wurde das Medium durch ein Mikrofiltrationsmodul (0,2 µm, Satobran, Satorius) in den zuvor autoklavierten Bioreaktor steriltriftriert. Der pH-Wert wurde mit Hilfe der pH-Regelung des Bioreaktors auf 6,5 eingestellt. Die angegebenen Endkonzentrationen beziehen sich auf die Medienzusammensetzung nach Inokulation der Vorkultur.

4.1.6. ZULAUFMEDIUM 1

Glucose	700 g/l
L-Tyrosin	8,0 g/l

Die Glucose wurde mit H₂O bidest. angesetzt und frisch autoklaviert (20 min, 121 °C). Das feste L-Tyrosin wurde für 12 h bei 160 °C hitzeinaktiviert. Anschließend wurde das L-Tyrosin steril in die flüssige Glucoselösung gegeben. Das L-Tyrosin blieb ungelöst und bildete unter Rühren eine Suspension.

4.1.7. ZULAUFMEDIUM GLUCOSE

Glucose	700 g/l
---------	---------

Die Glucose wurde mit H₂O bidest. angesetzt und frisch autoklaviert (20 min, 121 °C). In den Schüttelkolbenexperimenten (vgl. Abschnitt 5.1) wurde eine Lösung mit 500 g/l Glucose verwendet.

4.1.8. ZULAUFMEDIUM L-TYROSIN

L-Tyrosin	25,0 g/l
(NH ₄)OH-Lösung	5 %

H₂O bidest. wurde mit 25 % (NH₄)OH-Lösung versetzt, um anschließend das L-Tyrosin darin zu lösen. Die Lösung war autosteril und wurde bei 4 °C gelagert.

4.1.9. LAUGE

Für die pH-Regelung wurde autosterile eine 25 % (NH₄)OH-Lösung verwendet.

4.1.10. ANTISCHAUMMITTEL

Eingesetzt wurde unverdünntes, autoklaviertes (20 min, 121 °C) Sigma 289.

4.1.11. IPTG-LÖSUNG

IPTG 200 mM

Die Lösung wurde in H₂O bidest angesetzt und unsteril bei –20 °C gelagert. Bei Induktion der Produktion (100 µM Endkonzentration) wurde die Lösung über einen 0,2 µm Einwegfilter in den Bioreaktor injiziert.

4.1.12. PROTEINMESSUNG UND DAHP-SYNTHEAKTIVITÄTSBESTIMMUNG

Bradford-Reagenz

Coomassie brilliant blue G-250 100 mg/l
Ethanol abs. 50 ml/l
H₃PO₄ 85% 100 ml/l

Das Coomassie blue wurde in Ethanol_{abs.} gelöst und mit Phosphorsäure versetzt. Das Gemisch wurde eine Stunde gerührt, mit H₂O bidest. aufgefüllt und durch einen Faltenfilter filtriert. Die Lösung wurde unter Lichtausschluss bei 4 °C gelagert.

Aufschlusspuffer

Phosphoenolpyruvat (PEP) 0,034 g/l
1,3-Bis(tris(hydroxymethyl)-methyl-amino)propan (BTP) 2,72 g/l

Die Substanzen wurden in H₂O bidest. gelöst und bei 4 °C gelagert.

Lösungen zur Photometrie

1,3-Bis(tris(hydroxymethyl)-methyl-amino)propane (BTP) 27,2 g/l
Phosphoenolpyruvat (PEP) 1,68 g/l
FeSO₄ * 7 H₂O 0,28 g/l
Erythrose-4-Phosphat (E4P) 9,9 g/l

Von jeder Chemikalie wurde eine den Konzentrationen entsprechende Lösung frisch mit H₂O bidest. angesetzt.

4.1.13. FIXIERLÖSUNG FÜR RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE

Glutardialdehyd 25%_{aq.} 20 ml/l
NaH₂PO₄ 4,1 g/l
Na₂HPO₄ * H₂O 12,5 g/l

Die Substanzen wurden in H₂O bidest. gelöst. Im Falle der Verwendung als Waschpuffer, wurde auf die Zugabe von Glutardialdehyd verzichtet.

4.1.14 PUFFER FÜR ON-LINE GLUCOSEANALYSE

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

Die Substanzen wurden in H₂O bidest. gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert auf 7,35 - 7,4 mit HCl eingestellt und 0,1 ml/l TWEEN 20 zugefügt. Zum Entgasen wurde der Puffer über Nacht bei 80 °C verwahrt und anschließend bei 4 °C gelagert.

4.2. BIOLOGISCHES SYSTEM

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene, am Institut für Biotechnologie 1 und in Zusammenarbeit mit der DSM Biotech GmbH, hergestellte, gentechnisch veränderte Stämme verwendet. Die Möglichkeiten der Stammentwicklung mittels des „Metabolic Engineering“ mit dem Ziel der Überproduktion von L-Phe mit *E. coli*, wurden bereits in Abschnitt 2.1.3 erläutert. Für die bisherige Prozess- und Stammentwicklung wurden Stämme verwendet, bei denen in die Aromatenbiosynthese eingegriffen wurde. Mögliche Veränderungen im Glucoseaufnahmesystem oder in Bezug auf eine generelle Verbesserung der Bereitstellung von Vorläufermetaboliten der Aromatenbiosynthese, werden in der laufenden Arbeit von Rüffer [191] bearbeitet.

4.2.1. VERWENDETE *E. COLI* STÄMME

Basierend auf *E. coli* K12 W3110, wurde vom Institut für Biotechnologie 1 der genetisch veränderte Stamm *E. coli* 4pF20 entwickelt. Auf diesem Stamm beruht die Entwicklung des Fermentationsprozesses.

E. coli 4pF20 ist durch eine Deletion des Gens *tyrA* (Chorismatmutase/Prephenatdehydrogenase) L-Tyrosinauxotroph (Abbildung 3). *tyrA* liegt im *E. coli* Chromosom benachbart zu den Genen *aroF* und *pheA*. Auch diese stark regulierten Gene (siehe hierzu Abschnitt 2.1.2) wurden deletiert. Der Stamm ist deshalb auch L-Phe-auxotroph. Zur L-Phe-Produktion wurde in diesen Stamm, der als *E. coli* 4 bezeichnet wurde, das Plasmid pF20 transformiert. Das Plasmid basiert auf dem Expressionsvektor pJF119EH und besitzt eine Ampicillinresistenz als Selektionsmarker. Als Promotor ist ein IPTG-induzierbarer, synthetischer *tac*-Promotor enthalten, der glucoseresistent ist. In den Vektor kloniert sind die Gene *aroF^{fbr}* und *pheA^{fbr}* (*fbr*: feedback-resistant) (Abbildung 3), die die stark regulierten Stufen der L-Phe-Produktion deregulieren sollen [192, 193]. Das gentechnisch veränderte *aroF^{fbr}* kodiert die L-Tyrosinspezifische 3-Desoxy-D-Arabinose-Heptusonat-7-Phosphat-Synthase (DAHP-Synthase) und ist feedback-resistent gegen L-Tyrosin. Die L-Phe-spezifische DAHP-Synthase, kodiert durch *aroG*, wurde nicht weiter verändert. Das Gen *pheA^{fbr}* kodiert für die Chorismatmutase/Prephenatdehydratase und ist feedback-resistent gegenüber L-Phe. Durch die Überexpression der Gene auf einem Vektor, wurden auch die Regulationsmechanismen auf der Ebene der Transkription ausgeschaltet.

Die weiteren, in dieser Arbeit eingesetzten Stämme basieren alle auf *E. coli* 4pF20, d.h., es wurde immer das Standardplasmid verwendet und Gene zugefügt oder ausgetauscht. Bei den zugefügten Genen handelt es sich wahlweise um *aroL^{wt}* (*wt*: wildtyp) (kodiert für Shikimatkinase II), *aroB^{wt}* (kodiert für 3-Dehydrochinat-Synthase) und *aroF^{wt}* (kodiert für DAHP-Synthase) (Abbildung 3). Das L-Tyrosinspezifische Gen *aroF*, des stark regulierten ersten Enzyms der Aromatenbiosynthese wurde gentechnisch modifiziert, so dass das Enzym feedback-resistent gegenüber L-Tyrosin ist. Das so genannte *aroF^{fbr}* wurde in *E. coli* 4pF20 und 4pF26 überexprimiert. In *E. coli* 4pF69, 4pF79 und 4pF81 wurde hingegen das L-Tyrosinsensitive *aroF^{wt}* kloniert. Alle anderen, durch diese Gene kodierten Enzyme werden nicht inhibiert und wurden daher nicht gentechnisch verändert, sondern als Wildtypgen überexprimiert.

Die einzige Ausnahme bildet *E. coli* LJ110, bei dem es sich um den *E. coli* K12 W3110 Basisstamm handelt und *E. coli* 18, der über kein Plasmid verfügt, dafür jedoch die Gene *aroF^{fbr}*, *pheA^{fbr}* und *aroL^{wt}* zusammen mit dem *tac*-Promotor, als Kassette chromosomal integriert, enthält.

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die eingesetzten Stämme:

Tabelle 3: Übersicht der im Labormaßstab charakterisierten *E. coli* Stämme.

Bezeichnung: <i>E. coli</i>	Name, Genotyp:
LJ110	<i>E. coli</i> K12 W3110
4pF20	LJ110, $\Delta(pheA\ tyrA\ aroF)$, pJF119EH <i>aroF^{fbr}</i> <i>pheA^{fbr}</i> (<i>amp^R</i>)
4pF26	LJ110, $\Delta(pheA\ tyrA\ aroF)$, pJF119EH <i>aroF^{fbr}</i> <i>phe^{fbr}</i> <i>aroL^{wt}</i> (<i>amp^R</i>)
4pF69	LJ110, $\Delta(pheA\ tyrA\ aroF)$, pJF119EH <i>aroF^{wt}</i> <i>pheA^{fbr}</i> <i>aroL^{wt}</i> (<i>amp^R</i>)
4pF79	LJ110, $\Delta(pheA\ tyrA\ aroF)$, pJF119EH <i>aroF^{wt}</i> <i>pheA^{fbr}</i> <i>aroB^{wt}</i> (<i>amp^R</i>)
4pF79pF63	LJ110, $\Delta(pheA\ tyrA\ aroF)$ pJF119EH <i>aroF^{wt}</i> <i>pheA^{fbr}</i> <i>aroB^{wt}</i> (<i>amp^R</i>) pACYCtac <i>aroL^{wt}</i> (<i>cam^R</i>)
4pF81	LJ110, $\Delta(pheA\ tyrA\ aroF)$, pJF119EH <i>aroF^{wt}</i> <i>pheA^{fbr}</i> <i>aroB^{wt}</i> <i>aroL^{wt}</i> (<i>amp^R</i>)
18	LJ110, $\Delta(pheA\ tyrA\ aroF)::(P_{tac}-\ aroFfbr\ phefbr\ aroLwt)$

4.2.2. STAMMHALTUNG UND VORKULTIVIERUNG

Für die Herstellung von Kryokulturen wurden 100 ml LB-Medium mit 0,1 g/l Ampicillin angesetzt und von einer Agarplattenkultur beimpft. Die Kultivierung erfolgte in einem Schüttelinkubator bei 37 °C mit 150 rpm und wurde bei einer optischen Dichte von ungefähr 3,5 beendet (ungefähr 8 – 10 h). Die Kultur wurde in 100 ml steriles Glycerin gegeben, gut vermischt, und ungefähr 1,8 ml in Nalgene® Kryoröhrchen abgefüllt. Diese wurden bei –80 °C gelagert.

Die Anzucht der Vorkulturen erfolgte unter Verwendung von Vorkulturmedium in 1 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen. 250 ml Medium wurde stammabhängig mit 0,5 bis 1,5 ml Kryokultur angeimpft und über Nacht mit 150 rpm bei 37°C inkubiert. Die Anzucht bis zu einer optischen Dichte von ungefähr 3,0 dauerte 15 - 20 h (stammabhängig).

Die Einhaltung der maximalen optischen Dichte der Kryo- und Vorkulturen ist notwendig, da die Zellen ansonsten aufgrund der Nährstofflimitation die stationäre Wachstumsphase erreichen. Dies kann in einer Fermentation zu einer Beeinträchtigung von Wachstum und Produktbildung führen.

4.3. OFF-LINE ANALYTIK

4.3.1. GLUCOSE

Die Bestimmung der Glucosekonzentration erfolgte mit einem Accutrend® Teststreifen und entsprechendem Messgerät. Das auf dem Teststreifen immobilisierte Enzym Glucoseoxidase wandelt die in der Probe enthaltene Glucose in Gluconolacton um. Das dabei äquimolar frei werdende H₂O₂ kann amperometrisch gemessen werden.

Der Messbereich des Accutrend® liegt bei 0,1 bis 6,0 g/l. Fermentationsproben wurden entsprechend ihrer vermeintlichen Konzentration mit 0,9 % NaCl-Lösung verdünnt. Ungefähr 10 µl der Probe wurde auf den Einweg-Teststreifen gegeben. Nach ungefähr einer Minute konnte das Ergebnis vom Display abgelesen werden.

4.3.2. OPTISCHE DICHT

Zur Bestimmung der optischen Dichte (OD_{620nm}), wurden die Proben nach geeigneter Verdünnung mit 0,9 % NaCl-Lösung in einem Shimadzu UV-160 Zweistrahl-Spektralphotometer (UV 160, Shimadzu), gegen 0,9 %ige NaCl-Lösung, vermessen. Gemessen wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 620$ nm. Die Stärke der Absorption korreliert mit der Zelldichte (Lambert-Beer'sches Gesetz).

4.3.3. BIOTROCKENMASSE

Die Messung der Biotrockenmassekonzentration erfolgte durch Filtration von 2,5-10 ml einer Fermentationsprobe, durch einen getrockneten, vorgewogenen Einweg-Sterilfilter (Ausschlussgrenze 0,2 µm). Anschließend wurde der Filter mit einem entsprechenden Volumen 0,9 % NaCl-Lösung gespült. Die Filter wurden im Trockenschrank (80 °C) für 24 h getrocknet. Nach 24 h Abkühlen im Exsiccator wurden die Filter erneut gewogen und die Biotrockenmassekonzentration berechnet.

4.3.4. PLASMIDSTABILITÄT

Um die Plasmidstabilität abzuschätzen, wurden insbesondere für die kontinuierlichen Fermentationen, Proben auf LB-Platten mit und ohne Ampicillin als Selektionsmittel ausgestrichen. Hierzu wurden Proben mit 0,9 % NaCl-Lösung von 10^{-7} bis 10^{-9} verdünnt. Von jeder Verdünnung wurden zweimal je 100 µl auf LB-Platten mit und ohne Ampicillin ausgestrichen, für 12 h bei 37 °C kultiviert und die gebildeten Kolonien gezählt. Aus dem Verhältnis der Anzahl der Kolonien auf den Platten, mit/ohne Ampicillin, ließ sich die prozentuale Plasmidstabilität berechnen.

4.3.5. HPLC

Aminosäuren im Fermentationsüberstand

Die Konzentrationen der Aminosäuren L-Phe und L-Tyrosin wurden mittels reversed-phase-HPLC gemessen.

Da sowohl L-Phe, als auch L-Tyrosin, wenn es während der Fermentation in höheren Konzentrationen vorliegt, ausfällt, wurden sofort nach der Probenahme 1:10 Verdünnungen mit 0,9 % NaCl-Lösung vorgenommen. Entsprechend des linearen Messbereiches der HPLC von 10 - 200 µM wurden verschiedene Verdünnungen vorgenommen, um sowohl L-Phe, als auch L-Tyrosin quantifizieren zu können. Teilweise wurde mittels dieser Methode auch L-Alanin, L-Glutamat und Ammonium quantifiziert.

Für die Messung wurden die Proben in der HPLC mit ortho-Phtaldialdehyd und Mercaptoethanol derivatisiert und mit einem Gradienten der Puffer A und B eluiert (vgl. Abschnitt 12.2). Die Analyten wurden an einem Fluoreszenzdetektor gemessen (HPLC-Geräteparameter in Abschnitt 12.2).

Organische Säuren und Ethanol im Fermentationsüberstand

Die organischen Säuren Acetat, Citrat, Lactat, Fumarat, Oxoglutarat, Pyruvat und Shikimat sowie Ethanol wurden mittels Ionenausschluß-HPLC chromatographisch getrennt und bei $\lambda=215$ nm durch einen UV-Detektor photometrisch bestimmt. Die Proben wurden zuvor geeignet verdünnt (HPLC-Geräteparameter in Abschnitt 12.2).

4.3.6. HPLC INTRAZELLULÄRER METABOLITE

Zur Untersuchung des möglichen, inhibierenden Effektes hoher L-Phe-Konzentrationen auf die weitere Produktbildung, sollten in kontinuierlich geführten Fermentationen verschiedene Produktkonzentrationen eingestellt werden (Abschnitt 5.3). In diesen Versuchen sollte zudem die intrazelluläre L-Phe-Konzentration gemessen werden. Hierfür wurden bei jedem "steady state" drei Proben zu je 5 ml 20 Minuten bei 4 °C und 15000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 5 ml eisgekühlter 0,9 % NaCl-Lösung resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet mit 2 ml 34,75 %iger HClO_4 versetzt und resuspendiert [194]. Nach Zentrifugation, wurde der Überstand mit

1 ml 5 M K_2CO_3 -Lösung neutralisiert. Ausgefallenes $KClO_4$ wurde durch Zentrifugation entfernt. Der Überstand wurde bei $-18\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert und zur Quantifizierung mittels HPLC geeignet verdünnt.

In Verbindung mit der Messung der Zellzahl und Zellgrößenverteilung (Abschnitt 4.3.10), sollte die intrazelluläre L-Phe-Konzentration bestimmt werden. Da bei der Berechnung des Zellvolumens (Gleichung 4-1) auch Zellmembranen enthalten sind, ist die Berechnung der intrazellulären L-Phe-Konzentration entsprechend fehlerbehaftet.

$$\text{Zellvolumenanteil}[-] = \text{Zellzahl}[ml^{-1}] \cdot \text{mittleres Zellvolumen}[ml] \quad (4-1)$$

$$\text{zell intern L - Phe}[g/l] = L - Phe_{\text{Überstand}}[g/l] \cdot \text{Zellvolumenanteil}[-] \quad (4-2)$$

4.3.7. PROTEINBESTIMMUNG

Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Fermentationsüberstand, erfolgte durch den Bradfordtest [195]. Dabei binden die γ -Aminogruppen der Proteine ionisch an den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue. Die dadurch bewirkte Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs, kann photometrisch bei $\lambda = 570\text{ nm}$ gemessen werden. Sie korreliert mit dem Gesamtproteingehalt der Probe.

Für die Erstellung der Kalibrierreihe wurde Rinderserumalbumin, Fraktion V, in Konzentrationen zwischen 5-50 mg/l verwendet. Die photometrische Messung der Proben, wurde in einem Zweistrahl-Spektralphotometer (UV-160, Shimadzu) gegen H_2O durchgeführt. Zu 990 μl Bradfordtestlösung wurden in eine Quarzglasküvette 10 μl des Zellextraktes gegeben und eine Minute bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde das Absorptionsmaximum der Lösung im Spektralphotometer gemessen.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde für die Messung der spezifischen Enzymaktivität benötigt, die auf die Gesamtproteinkonzentration bezogen wurde.

4.3.8. DAHP-SYNTASEAKTIVITÄT

Bei der DAHP-Synthase handelt es sich um das erste Enzym der Aromatenbiosynthese, welches auf verschiedenen Ebenen stark reguliert wird (Abschnitt 2.1.2). Da es für einige Aspekte der vorliegenden Arbeit wichtig war, die Aktivität dieses entscheidenden Enzyms unter verschiedenen Versuchsbedingungen zu kennen, wurden Enzymaktivitätstests durchgeführt [196]. Hierzu wurden während der Probenahme 5,0 ml Probe abzentrifugiert, der Überstand verworfen, und das so erhaltene Zellpellet dreimal mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen. Die so erhaltenen Zellpellets wurden bis zur weiteren Untersuchung bei $-18\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Zur Bestimmung der Enzymaktivität mussten die Zellpellets zunächst mit je 1,0 ml Aufschlusspuffer (Abschnitt 4.1.12) versetzt und sechsmal im 30 s Intervall mit einer Ultraschallsonde aufgeschlossen werden. Zwischen den Behandlungen wurde eine Pause von

30 s eingelegt, um eine zu starke Erwärmung zu vermeiden. Nach dem Aufschluss wurden die Proben eine Stunde bei 4 °C und 15.300 U/min zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Zu 50 µl Zellextrakt in einer Quarzglasküvette, wurden 500 µl BTP-Lösung, 10 µl Eisen-(II)-Lösung, 50 µl PEP-Lösung und 360 µl H₂O bidest. gegeben.

Die zeitliche Änderung der Extinktion wurde mit einem Spektrophotometer (DU 640, Beckmann) aufgezeichnet.

Nach der Hälfte der Zeit wurden 30 µl E4P-Lösung hinzugefügt, um die Enzymreaktion zu induzieren und wiederum die zeitliche Änderung der Extinktion gemessen. Gleichung 4-3 wurde zur Berechnung der Aktivität verwendet:

$$\text{Aktivität[U]} = \frac{\Delta A / \text{min} \cdot V}{\epsilon \cdot v \cdot d} \quad (4-3)$$

Mit:

$\Delta A / \text{min}$	= Änderung der Absorption pro Minute des Hauptlaufes, korrigiert um den Wert des Vorlaufes
V	= Anfangsreaktionsvolumen
ϵ	= 28800 [M ⁻¹ cm ⁻¹]
d	= Breite des Strahlengangs [cm]
v	= Probenvolumen [µl]
Aktivität [U]	= 1 Unit [µmol min ⁻¹] ist die Menge Substrat, die ein Enzym in einer Minute umsetzt

Die Steigung des Vorlaufs (ohne E4P), wurde von der Steigung des Hauptlaufs (mit E4P) abgezogen. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität, musste der erhaltene Wert auf die Proteinkonzentration in der Probe bezogen werden (Gleichung 4-4).

$$U_{\text{spez}} = \frac{U}{\text{mg}_{\text{Protein}}} \quad (4-4)$$

Das Ergebnis hat die Einheit U/mg und bezeichnet die Menge an Substrat in µmol, die pro Minute, bezogen auf ein mg Gesamtprotein, umgesetzt wurde.

4.3.9. RASTER-ELEKTRONEN-MIKROSKOPIE

Zur detaillierten Untersuchung der Zellmorphologie, wurde bei der Durchführung der kontinuierlichen Experimente, die Raster-Elektronen-Mikroskopie angewandt. 500 µl der Fermentationsprobe wurden durch einen Celluloseacetatfilter filtriert und die anhaftenden Zellen mit Filter - erschütterungsfrei - für 12 Stunden in Fixierlösung gelegt. Der so behandelte Filter wurde anschließend vorsichtig mit Pufferlösung gewaschen und für jeweils zwei Stunden nacheinander in 40 %, 60 %, 80 %, 100 % Aceton /H₂O bidest. eingelegt. Die so entwässerten Zellen wurden, bis zur weiteren Probenvorbereitung, bei 4 °C in Aceton gelagert.

Die gesammelten Proben wurden in einem Bal-Tek CPD030 (Critical Point Dryer) mit flüssigem CO₂ am kritischen Punkt getrocknet und nach dem Aufbringen auf einen Objekträger sofort im Bal-Tek MED020 mit einer Goldschicht belegt (vergoldet). Die Dicke

der Beschichtung wurde während des Vorganges von einem MES010 der Firma Bal-Tek kontrolliert. Von den so vorbereiteten Proben wurden mit dem Rasterelektronenmikroskop (JEOL JSM-6300F, Beschleunigerspannung 5kV) Bilder angefertigt. Die Bilddaten wurden elektronisch gespeichert.

4.3.10. ZELLZAHL UND ZELLGRÖßENVERTEILUNG

Mit dem CASY[®]1 (Cell Counter and Analyser System 1), wurden Anzahl und Volumenverteilung der Zellen in einer Fermentationsprobe gemessen. Das Gerät misst die Leitfähigkeit. Hierzu werden die Zellen in einem schwachen Elektrolyten suspendiert und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Kapillare definierter Geometrie gesaugt. Während der Messung wird über zwei Platinelektroden eine Spannung an die Kapillarstrecke angelegt. Die elektrolytgefüllte Kapillare stellt einen definierten elektrischen Widerstand dar. Beim Durchtritt durch die Kapillare verdrängen die Zellen eine ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung, es kommt zu einer Verringerung der Leitfähigkeit entlang der Kapillarstrecke. Diese ist das Maß für das Volumen der Zellen. Über eine Pulsflächenanalyse wird das Messsignal vom Gerät ausgewertet. Mit der verwendeten Kapillare konnten Partikel mit einer Größe von 0,1 - 5,0 µm erfasst werden.

Zur Messung wurde zunächst eine Verdünnung von 1:10 000 pro OD der Fermentationsprobe mit dem Elektrolyten CASYTON (vgl. Abschnitt 12.1) hergestellt. Von dieser Verdünnung wurden mehrere Proben von je 10 ml gemessen und gemittelt. Aus diesen Daten ließ sich das Zellvolumen pro ml Fermentationsprobe berechnen. Neben der Zellzahl und Größenverteilung, ist dieser Wert für die Berechnung der intrazellulären L-Phe-Konzentration entscheidend (Abschnitt 4.3.6).

4.3.11. ¹H-NMR EXTRAZELLULÄRER METABOLITE

Die ¹H-NMR-Analytik wurde an einem mit Puls-Fourier-Transform-Technik ausgestatteten NMR-Spektrometer durchgeführt. Die Betriebsfrequenz des Spektrometers betrug 300 MHz. Im Rahmen der Etablierung der ¹H-NMR-Analytik wurden Versuche zur Probenvorbereitung, der Standardlösung, der Quantifizierbarkeit, der Reproduzierbarkeit, der Bestimmung der Nachweisgrenze, der Empfindlichkeit und des Linearitätsbereichs durchgeführt [166].

Für die Messungen mittels der ¹H-NMR-Analytik wurde als Lösungsmittel D₂O verwendet. Als Referenzverbindung und für die Quantifizierung, wurde der Lösung 3-Trimethyl-Silyl-Propion-2,2,3,3-d-säure (TSP) zugefügt. Das TSP-Signal trat als Singulett auf und entsprach neun Protonen pro Molekül. Für die Auswertung wurde die Fläche unter dem Signal integriert. Anschließend wurden die restlichen Signale des Spektrums integriert und auf die Integralfäche des TSP-Signals bezogen. Die Auswertung erfolgte nach Gleichung 4-5:

$$c(X) = \text{Integralfäche (X)} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot c(\text{TSP}) \quad (4-5)$$

Diese Arbeiten wurden von Zaja im Rahmen einer Diplomarbeit bearbeitet [166]. Die Methode ließ eine Quantifizierung der gemessenen Substanzen mit einer Nachweisgrenze von 0,5 bis 1,0 g/l zu und war reproduzierbar [166]. Die Fermentationsüberstände mussten nach der entwickelten Methode aufbereitet und gemessen werden. Von den Fermentationsüberständen wurden jeweils 400 µl entnommen, zwei Stunden in der Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 800 µl, einer Lösung aus 4 mM TSP in D₂O, gelöst. Die Probenlösung wurde in Messröhrchen umgefüllt und mittels ¹H-NMR-Spektrometrie mit 96 Scans, bei einer Betriebsfrequenz von 300 MHz, analysiert.

Die für die Auswertung der Daten benötigten Referenzspektren der Intermediate, wurden mit der Reinsubstanz erstellt. Da manche der zu untersuchenden Substanzen kommerziell nicht erhältlich waren, wurden die Daten über die Kopplungen, die Resonanzlagen und die Signalformen aus der Literatur [197, 198, 199] entnommen.

4.4. ON-LINE ANALYTIK

4.4.1. pH-WERT

Zur Messung des pH-Wertes wurde eine Gel-pH-Elektrode verwendet, die nach Kalibrierung (Zwei-Punkt-Kalibrierung bei pH 4,01 und 7,0) mit dem Bioreaktor sterilisiert werden musste. Der gemessene pH-Wert wurde über einen Messverstärker an die Prozesssteuerung übertragen und vom Prozessrechner aufgezeichnet. Ein integrierter PID-Regler steuerte eine Schlauchpumpe an und führte bei einem Abfall des pH-Wertes 25 %ige Ammoniaklösung zu. Eine Säurezugabe war bei dieser Prozessführung nicht notwendig.

4.4.2. SAUERSTOFFPARTIALDRUCK

Zur Messung der Gelöstsauerstoffkonzentration wurde eine pO₂-Elektrode verwendet, die vor der Kalibrierung gemeinsam mit dem Bioreaktor sterilisiert werden musste. Die Kalibrierung erfolgte im Fall einer Standardfermentation bei 37,0 °C, 1000 rpm und 0,4 bar Überdruck, bei einer Begasung von 1 vvm. Für den Abgleich des Nullpunktes wurde mit Stickstoff begast. Die Einstellung der maximalen Sauerstoffsättigung erfolgte mit Raumluft. Der gemessene pO₂-Wert wurde über einen Messverstärker an die Prozesssteuerung übertragen und vom Prozessrechner aufgezeichnet.

4.4.3. DRUCK, TEMPERATUR, BEGASUNG

Die Prozessparameter wurden durch entsprechende Elektroden gemessen. Eine Kalibrierung zu Versuchsbeginn war nicht notwendig. Die gemessenen Werte wurden über Messverstärker an die Prozesssteuerung übertragen und vom Prozessrechner aufgezeichnet. Integrierte PID-Regler stellten konstante Werte ein.

4.4.4. CO₂ UND O₂ IM ABGAS

Die prozentualen Anteile beider Gase wurden in einem Teilstrom der Abluft bestimmt. Das Gerät zur Abgasanalyse arbeitete nach zwei Messprinzipien. CO₂ wurde durch Nahinfrarotabsorption, O₂ paramagnetisch gemessen. In das Gerät war eine Pumpe integriert, durch die ein konstanter Gasstrom von 1 l/min eingestellt wurde.

Die Kalibrierung erfolgte am vorbereiteten Bioreaktor, vor dem Inokulieren. Für den Nullabgleich wurde mit Stickstoff begast. Die Kalibrierung des O₂-Setpoints wurde mit Raumluft (20,9 %), die des CO₂-Setpoints mit Kalibriergas (10 %) durchgeführt.

4.4.5. GLUCOSE

Die semi-kontinuierliche Messung der Glucosekonzentration im Bioreaktor hatte das Ziel, das Substratniveau durch entsprechende Mess- und Regelungstechnik (Abschnitt 5.4.3 und 5.4.1) nach Beendigung der Batchphase konstant zu halten.

Der Anschluss eines Umlaufs und die Integration eines Filtrationsmoduls (siehe hierzu Abschnitt 5.4.2), ermöglichten die kontinuierliche Bereitstellung von zellfreiem Fermentationsüberstand (Permeat). Das Permeat wurde am Verteiler (Manifold), eines auf SIA-Technik (Sequential Injection Analyser) basierenden **OnLine Glucose Analyser (OLGA)** vorbeigeführt [200]. In Intervallen von ungefähr 120 s wurde aus dem Permeatstrom eine 10 µl Probe entnommen und die Glucosekonzentration bestimmt. Abbildung 17 stellt den schematischen Aufbau des Analysegerätes dar.

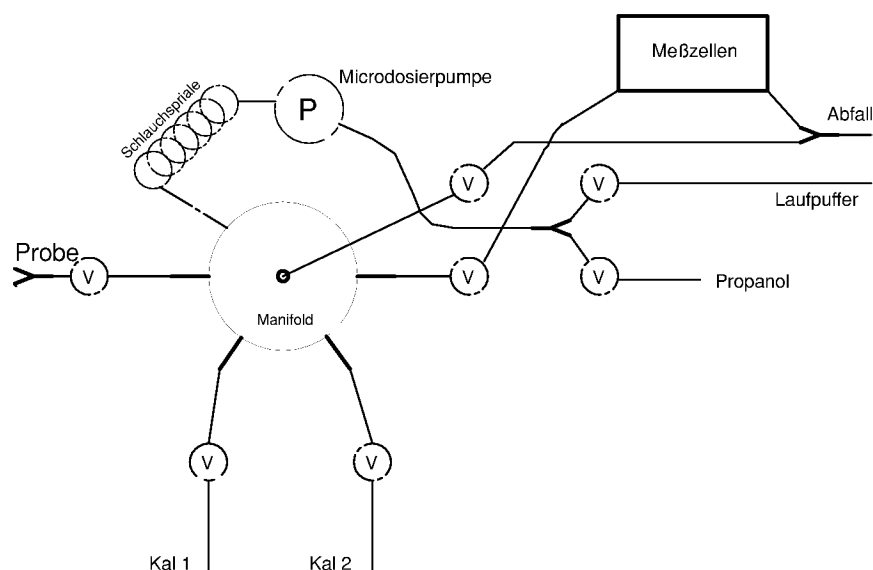


Abbildung 17: Fließbild der OLGA (IBA GmbH, Göttingen).

Zur Konzentrationsbestimmung wurde in die Messküvette des Gerätes, vor jedem Versuch, ein frischer Biosensor eingesetzt. Das auf dem Biosensor immobilisierte Enzym Glucoseoxidase wandelt die in der Probe enthaltene Glucose in Gluconolacton um. Das dabei äquimolar frei werdende H_2O_2 , kann amperometrisch gemessen werden. Über einen Messverstärker wurde das Signal an einen OLGA eigenen PC (OLGA spezifische Software unter Windows 3.1.) weitergeleitet und dort ausgewertet. Die Auswertung erfolgte über eine Kalibriergerade. Die hierfür notwendige Zwei-Punkt-Kalibrierung erfolgte automatisch in Abständen von 60 - 90 min mit Kalibrierlösungen von 2,0 und 10,0 g/l Glucose (gelöst in OLGA-Puffer). Als Medium für die verschiedenen Spül- und Verdünnungsvorgänge, die von dem Gerät durchgeführt wurden, diente der OLGA-Puffer (Abschnitt 4.1.14). Die Totzeit des gesamten Systems, d.h. von der Probenahme bis zur Auswertung, lag bei unter 120 s. Abbildung 18 zeigt ein Foto der OLGA mit Kennzeichnung der einzelnen Komponenten.

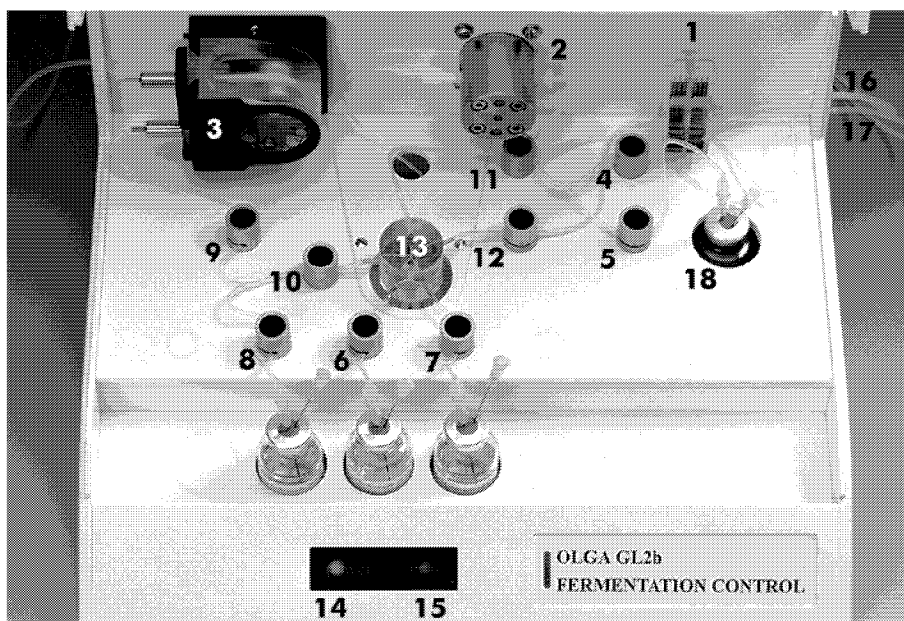


Abbildung 18: Foto vom Aufbau der OLGA. Die Funktion der Komponenten ist wie folgt: 1 Messzelle; 2 Mikrodosierpumpe; 3 Schlauchpumpe; 4 Ventil für Laufpuffer; 5 Ventil für Isopropanol; 6 Ventil für Kalibrierlösung 1; 7 Ventil für Kalibrierlösung 2; 8 Ventil für Spüllösung; 9 Ventil für Probe; 10 Bioreaktorventil; 11 Abfallventil; 12 Messzellenventil; 13 Injektionsmanifold; 14 Kontroll-Leuchte „Power“; 15 Kontroll-Leuchte „Error“; 16 Schlauchführung Abfall; 17 Schlauchführung Laufpuffer; 18 Isopropanol.

Bei den meisten Fermentationen sollte eine Glucosekonzentration von 5,0 g/l im Bioreaktor eingestellt werden. Die hierfür notwendigen Geräteeinstellungen der OLGA waren wie folgt:

Sensormessbereich:	1,0-30 mM		
Kalibrierlösung 1:	2,0 g/l		
Kalibrierlösung 2:	10,0 g/l		
Allgemein:	Injektionen pro Probe:	1	
	Injektionen pro Standard:	2	
	Auswertung:	Signalhöhe	
	Zyklen bis Rekalibrierung:	30	
	Zyklen bis Isopropanol:	60	
Standardinjektionszyklus:	Vorspülen:	20 s	25 µl/s
	Injektion:	2 s	5 µl/s
	Zelle vorspülen:	10 s	30 µl/s
	Messung:	40 s	50 µl/s
	Injektionspause:	3 s	3 µl/s
	Messzyklenpause:	3 s	3 µl/s
	Isopropanol:	5 s	25 µl/s
	Nachspülen:	60 s	25 µl/s
Bioreaktor:	Ansaugen:	10 s	25 µl/s
	Ausspülen:	15 s	25 µl/s
Kalibrierung:	Ansaugen:	5 s	15 µl/s
	Ausspülen:	8 s	20 µl/s

Bei Fermentationen, die bei 0,1 g/l und 30 g/l geregelt werden sollten, wurden folgende Parameter verändert.

30 g/l:	Sensormessbereich:	10-30 mM	
	Kalibrierlösung 1:	25 g/l	
	Kalibrierlösung 2:	35 g/l	
	Auswertung:	Signalhöhe/-fläche	
	Injektion:	20 s	5 µl/s
0,1 g/l:	Sensormessbereich:	1,0-10 mM	
	Kalibrierlösung 1:	0,1 g/l	
	Kalibrierlösung 2:	1,0 g/l	
	Auswertung:	Signalhöhe/-fläche	
	Injektion:	5 s	10 µl/s

4.5 FILTRATION

Zur Auswahl standen Filtrationsmodule von drei Firmen, die laut Herstellerangaben über vergleichbare Filtrationsleistungen verfügen:

Tabelle 4: Vergleich der Filtrationsmodule.

Hersteller	1. Schleicher & Schuell	2. Millipore	3. ETL Verfahrenstechnik GmbH
Gehäusematerial	Polysulfon	Edelstahl	PVC
Länge	0,37 m	0,807 m	0,539 m
d_i	1,0 mm	2,3 mm	11 mm
Anzahl Kanäle	50	19	1
Membranfläche	0,042 m ²	0,111 m ²	0,018 m ²
Trenngrenze	500 kDa	0,2 µm	100 kDa
Material	Polysulfon	Keramik	Polysulfon
Trennverfahren	Ultrafiltration	Mikrofiltration	Ultrafiltration
Modulkonstruktion	Hohlfasermodul	Rohrmodul	Rohrmodul
Strömungsführung	laminar	turbulent	turbulent
Scherrate an der Membran	10160 s ⁻¹	61182 s ⁻¹	42080 s ⁻¹
Druckstabilität	max. 3,5 bar	hoch	1,5- 6 bar
max. Temperatur	autoklavierbar	autoklavierbar	45°C
pH-Stabilität	2-13	1-14	2-12
empf. Fördervolumen	180 l/h	5000 l/h	1800 l/h

Der Kalkulation der Scherraten lagen die von den Herstellern empfohlenen Volumenströme für Wasser - als Referenzsystem - zugrunde. Sie erfolgte nach folgender Gleichung 4-6:

$$\gamma = \frac{32}{\pi} \cdot \frac{\dot{V}_F}{\text{Anzahl der Fasern}} \cdot \left(\frac{1}{d_i} \right)^3 \quad (4-6)$$

Mit:

$\dot{V}_F$ = Volumenstrom des Zulaufs [m³/s]

d_i = Kanalinnendurchmesser [m]

Die Vorteile der beiden Rohrmodule (Nr. 2, 3) liegen in der turbulenten Strömungsführung, der Unempfindlichkeit gegen Verstopfung und dem geringen Druckverlust. Die Triebkraft des Prozesses bleibt, bei relativ geringer Tendenz zur Konzentrationspolarisation, über die Länge des Moduls erhalten. Bei beiden Modulen kann die Membran einfach aus dem Stützrohr entfernt und ausgetauscht werden.

Das Mikrofiltrationsmodul (Nr. 2) zeichnet sich durch die Stabilität seiner Keramikmembran aus, die durch Autoklavierbarkeit und Chemikalienbeständigkeit leicht zu handhaben ist. Bakterien können die Poreneingänge der Mikrofiltrationsmodule leichter verstopfen [201, 202]. Für die hohe, empfohlene Überströmungsgeschwindigkeit, muss eine entsprechende Pumpe zur Verfügung stehen.

Die Investitionskosten für das Ultrafiltrationsrohrmodul (Nr. 3) sind geringer, als für die anderen beiden Module. In einem Experiment mit Wasser konnte eine geringe Druckstabilität des Stützrohrs aus PVC gezeigt werden, da es aus mehreren geschweißten Teilen besteht. Außerdem besitzt das Modul nur eine Packungsdichte von $57,14 \text{ m}^2/\text{m}^3$.

Die Polysulfonmembran beider Ultrafiltrationsmodule (Nr. 1, 3) besitzt aufgrund ihrer Hydrophobizität eine erhöhte Bindungskapazität für Proteine. Beide Ultrafiltrationsmodule sind nur bedingt autoklavierbar, so dass eine chemische Sterilisation erforderlich ist.

Das Hohlfasermodule besitzt eine sehr hohe Packungsdichte. Dies ist vorteilhaft, da hierdurch das Innenvolumen des Moduls und folglich auch die Verweilzeit der Zellen im Umlauf (mögliche Sauerstofflimitierung) gering gehalten werden kann. Zudem ist ein vergleichsweise geringer Förderstrom durch das Modul notwendig. Dies ist besonders in Anbetracht der benötigten Pumpkapazität für einen späteren Scale-up des Filtrationsmoduls, wichtig. Ein weiterer Vorteil ist die geringe Scherrate an der Membran. Die Scherrate des Hohlfasermoduls ist um 83,33 % niedriger, als im Mikrofiltrationsmodul und 75 % niedriger als im Rohrmodul zur Ultrafiltration (Tabelle 4). Eine hohe Scherrate kann sich negativ auf die Stabilität von Plasmiden auswirken [203].

In den Arbeiten von Silberbach [204] wurde eine detaillierte Charakterisierung der drei genannten Filtrationsmodule durchgeführt. In Hinblick auf die Problemstellung waren die Parameter Scherrate, Förderstrom und Verweilzeit im Modul von besonderer Bedeutung. Dabei wurden die besten Ergebnisse mit dem Hohlfasermodule erreicht. In den weiteren Arbeiten, in denen eine Abtrennung von Permeat notwendig war, wurde deshalb mit diesem Modultyp gearbeitet.

4.5.1. VERWENDETE HOHLFASERFILTRATIONSMODULE UND PUMPEN

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden drei Hohlfaserfiltrationsmodule der Firma Schleicher&Schüll eingesetzt. Alle Module hatten einen Hohlfaserinnendurchmesser von 1,0 mm und eine Porenausschlussgrenze von 500 kDa.

- Kontinuierliche Probenahme (Abschnitt 5.4.2):

Modultyp:	UFP-500-E-1A
Länge:	0,185 m
Filtrationsfläche:	0,0023 m ²

- Untersuchung des Einflusses der Permeatabtrennung (Abschnitt 5.2.1):

Modultyp:	UFP-500-E-4A
Länge:	0,362 m
Filtrationsfläche:	0,042 m ²

- Integration der Aufarbeitung im Pilotmaßstab (Abschnitt 5.5.1):

Modultyp:	UFP-500-E-65
Länge:	0,732 m
Filtrationsfläche:	4,4 m ²

Die für die Biomasserückhaltung zu verwendende Pumpe, sollte folgende Kriterien erfüllen:

- geringe Verweilzeit zur Vermeidung einer Sauerstofflimitation der Organismen
- geringe Pulsation zur Vermeidung einer hohen mechanischen Belastung durch Kavitation
- geringe Scherraten zur Vermeidung einer hohen mechanischen Belastung
- Gewährleistung von Sterilität; im Pilotmaßstab zudem CIP- und SIP-Fähigkeit
- Druckstabilität bei Überdruck im Reaktor oder Aufbau eines Transmembrandrucks

Bei allen drei Applikationen wurde sich für Schlauchpumpen der Firma Watson&Marlow entschieden. Folgende Pumpen kamen zum Einsatz:

- Kontinuierliche Probenahme (Abschnitt 5.4.2):
Typ: U501; Förderstrom: bis zu 1,6 l/min
- Untersuchung des Einflusses der Permeatabtrennung (Abschnitt 5.2.1):
Typ: U504; Förderstrom: bis zu 3,5 l/min
- Integration der Aufarbeitung im Pilotmaßstab (Abschnitt 5.5.1):
Typ: VRI840; Förderstrom: bis zu 150 l/min

4.5.2. HANDHABUNG VON HOHLFASERMODULEN

Vor dem ersten Einsatz wurde jedes Modul, der Bedienungsanleitung entsprechend, eine Stunde lang mit einer 50%igen EthanolLösung gespült, da es zum Schutz vor Austrocknung mit Glycerin gefüllt war. Anschließend wurde es mit H₂O bidest. 2 h gereinigt [205].

Die chemische Sterilisation der Module erfolgte mit einer 0,5 bis 2,0 M NaOH-Lösung (abhängig vom Einsatzort und Alter des Moduls), die 0,5 bis 2 h durch das Modul gepumpt wurde (detaillierte Beschreibung von Konstruktion und Sterilisation in Abschnitt 5.2.1, Abschnitt 5.4.2, Abschnitt 5.5.1). Der Umlauf wurde anschließend sofort an den Bioreaktor angeschlossen, der dann autoklaviert wurde.

Die Reinigung des Moduls erfolgte im allgemeinen mit 0,5 bis 2,0 M NaOH-Lösung, die je nach Einsatzort und Verschmutzungsgrad des Moduls, 2 bis 20 h zirkulierte. Anschließend wurde für mindestens 2 h mit H₂O bidest. gespült. Die Reinigungsschritte wurden bei 50 °C (NaOH) bzw. Raumtemperatur (H₂O) durchgeführt.

5. APPARATIVER AUFBAU UND FERMENTATIONSDURCHFÜHRUNG

Um den Aufbau der im Folgenden beschriebenen Prozessführungen in Bioreaktoren und die Durchführung der Fermentationen zu verdeutlichen, ist der theoretisch zu erwartende Verlauf einer Fermentation in Abbildung 19 dargestellt worden. Das im Medium vorgelegte L-Tyrosin, sowie die Glucose, werden von den Zellen zum Wachstum benötigt. Sobald die Konzentration der Substrate einen festgelegten Wert unterschritten haben, wird ihr Zulauf gestartet. Die Konzentration soll auf konstantem Niveau gehalten werden, die Wachstumsrate wird durch die direkte Abhängigkeit von der L-Tyrosinverfügbarkeit bestimmt. Die Produktion von L-Phe wird durch die Zugabe von IPTG induziert. Sind die Zellen bis zu einer bestimmten optischen Dichte gewachsen, wird das weitere Wachstum durch Limitierung der L-Tyrosinzufuhr gestoppt. Die anschließende Glucosezufuhr dient der L-Phe-Synthese. Der in Abbildung 19 dargestellte theoretische Fermentationsverlauf ist stark idealisiert. Die Glucosezufuhr wurde anfangs nicht geregelt, sondern manuell gesteuert. Die Zufuhr von L-Tyrosin erfolgte innerhalb der Prozessentwicklung, unter Einsatz verschiedener Strategien.

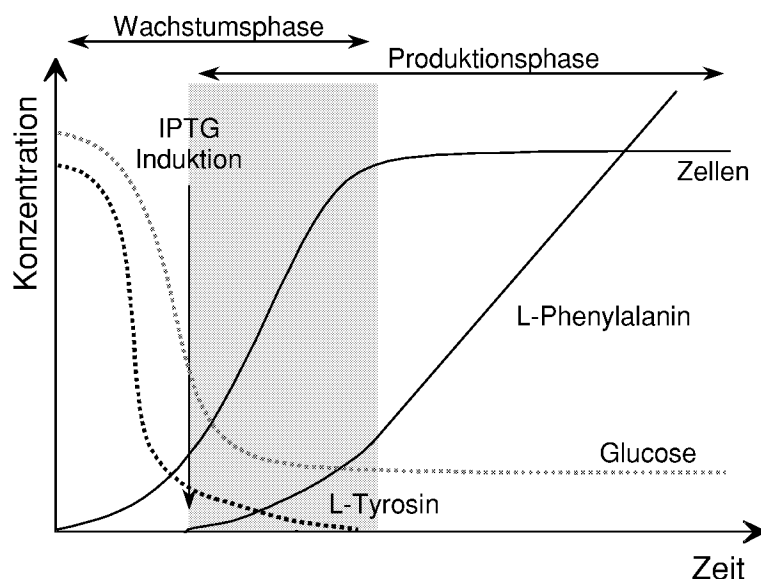


Abbildung 19: Theoretischer Verlauf einer Fermentation im Zulaufverfahren.

5.1. FERMENTATION IM SCHÜTTELKOLBEN (ZULAUFVERFAHREN)

Die Versuche wurden in einem umgebauten Schüttelkolbeninkubator durchgeführt, in dem 12 1 l Schüttelkolbenansätze mit Temperatur-, und pH-Regelung, sowie Substratdosierung, parallel untersucht werden konnten [206, 207]. Die Kolben waren hierfür mit pH-Elektroden versehen, deren Messsignal über einen parallelen Messverstärker zu einem zentralen Prozessrechner weitergeleitet wurde. Die in die Software des Prozessrechners integrierten PID-Regler, steuerten ein für jeden Kolben separates Schlauchquetschventil, mit dem das pH-Korrekturmittel (5 M KOH in 17,5 % Ammoniakwasser) dosiert werden konnte (siehe Abbildung 20). Jeder Kolben wurde in einer festgelegten Abfolge bedient.

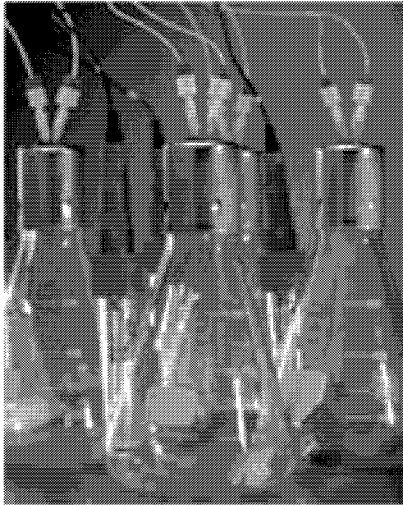


Abbildung 20: Bild eines pH-geregelten Schüttelkolbens im Fed-Batch-Betrieb.

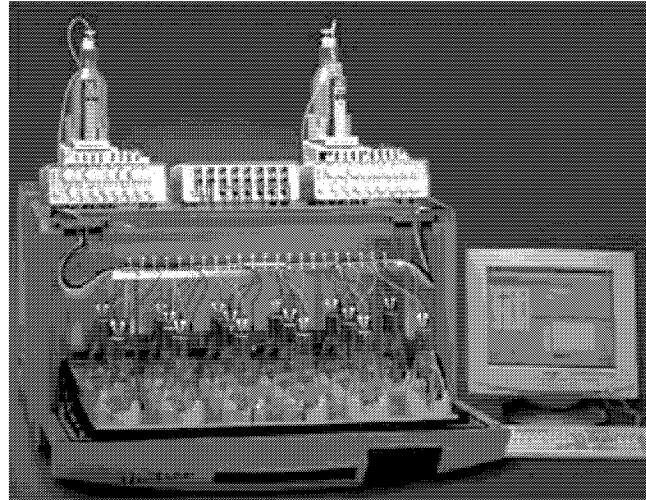


Abbildung 21: Bild der Fed-Batch-Schüttelkolbenanlage Unitron von Dasgip mbH (Jülich; Deutschland).

Über ein zweites, baugleiches System wurde das Substrat zugeführt (Glucose, 500 g/l), wobei hier ein, zuvor für jeden Ansatz individuell berechnetes Steuerungsprofil, in den Prozessrechner programmiert wurde. Sowohl das Prozessdatenerfassungsprogramm (Fed-Batch Pro), als auch die parallelen pH-Messverstärker und Schlauchquetschventile, lieferte die Firma Dasgip mbH (Jülich; Deutschland). Eine vergleichbare Anlage ist in Abbildung 21 dargestellt.

Die Schüttelkolben wurden, nach Kalibrierung der pH-Elektroden, mit jeweils 90 ml Fermentationsmedium gefüllt, autoklaviert und nach dem Einbau in die Anlage mit 10 ml Inokulum versetzt. Nach dem Start der Fermentation wurde bei einer OD_{620nm} von ungefähr 5 die Produktbildung, durch Zugabe von 100 μM steriler IPTG-Lösung gestartet. Nach Erreichen einer Glucosekonzentration von 5-7 g/l, wurde die Substratdosierung gestartet. Diese konnte, abhängig von der Glucoseverbrauchsrate, im Verlauf der Fermentation individuell angepasst werden. Nach 24 h wurde ein L-Tyrosin-Puls (0,05 g/l Endkonzentration) zugegeben. Die Fermentationsdauer betrug 30 h. Anschließend wurde von jedem Kolben das Endvolumen bestimmt, um bei einer späteren Berechnung von volumenbezogenen Raten, den durch die Probenahme entstandenen Volumenfehler zu berücksichtigen.

Neben den Untersuchungen in Schüttelkolben im Zulaufverfahren, sollten auch einfache Batchexperimente in 1 l Kolben mit Schikanen unternommen werden (250 ml Medium). Die Ansätze wurden in einem Schüttelkolbeninkubator bei 37 °C und 145 rpm durchgeführt und beendet, wenn in den entnommenen Proben keine Glucose mehr nachgewiesen werden konnte.

5.2. FERMENTATION IM 7,5 L BIOREAKTOR (ZULAUFVERFAHREN)

Im Vorfeld der Integration der Aufarbeitung im Pilotmaßstab, musste ein Verfahren zur Permeatabtrennung in Form eines Filtrationsumlaufs etabliert werden. Dieser sollte später die Bereitstellung von Permeat für die Reaktiv-Extraktion gewährleisten. Unter Verwendung eines 7,5 l Bioreaktors sollte ein geeignetes Filtrationsmodul ausgewählt, charakterisiert und dessen Einfluss auf den Fermentationsprozess untersucht werden. Da die Aufarbeitung zu einem Eintrag des organischen Lösungsmittels und Carriers (D_2EHPA -Kerosin) in die Fermentation führt, sollte in diesem Maßstab außerdem der Einfluss der Reaktiv-Extraktion auf den Produktionsprozess „simuliert“ werden. Durch entsprechende, manuelle Zugabe des Gemisches konnten die Auswirkungen untersucht werden. Die in diesem Bioreaktor durchgeführte Prozessführung ist in einem Fließbild in Abbildung 22 dargestellt.

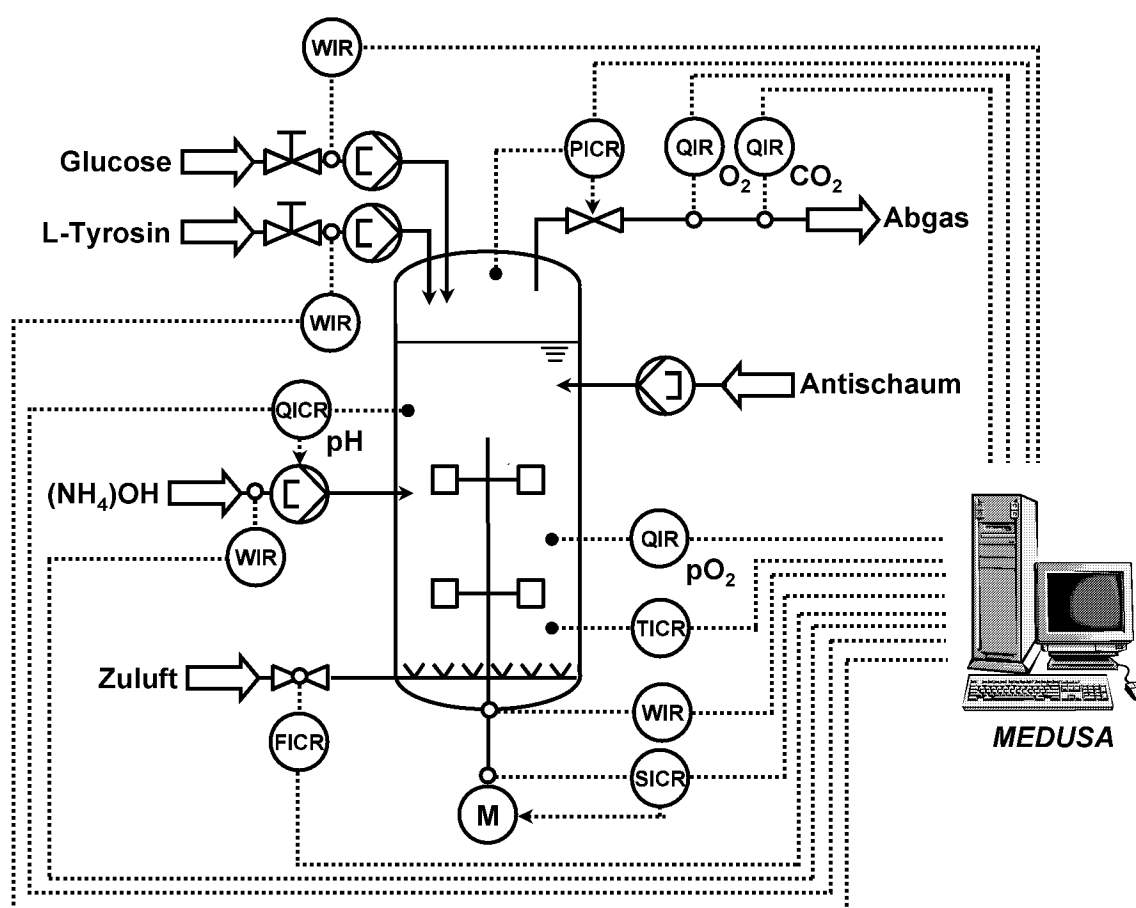


Abbildung 22: Aufbau der 7,5 l Fed-Batch-Fermentation (Geräteliste in Abschnitt 12.2). Der in Abschnitt 5.2.1 detailliert beschriebene Filtrationsumlauf, wurde im Fließbild vernachlässigt. Auf einen vollständigen Prozessaufbau wird in den folgenden Abschnitten zur Apparatechnik von Fermentationen im Zulaufverfahren verzichtet und nur die wesentlichen Elemente dargestellt.

Der Reaktor (L 1523, BioEngineering; Schweiz) war mit einer Mess- und Regeleinheit verbunden, über die Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck, Drehzahl, Zuluft und Reaktorinnendruck gemessen bzw. geregelt wurden. Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalt der

Abluft konnten über eine Abgasanalytik bestimmt werden. Die Einstellung der Substratzufuhr erfolgte manuell. Die eingestellten Zulaufzeiten wurden über ein Dosiersystem, bestehend aus Waage, Schlauchpumpe und Dosierstrecke, geregelt zugeführt und die Zuflussraten, als Analogsignale, an das Prozessdatenerfassungsprogramm Medusa weitergeleitet.

Vor der Sterilisation des Reaktors (121 °C, 20 min) wurde die Verschlauchung, d.h. Zulaufflaschen, Schläuche und Anstechnadeln autoklaviert und angebracht sowie die pH-Elektrode kalibriert. Nach der Sterilisation wurden 3,6 l Fermentationsmedium über ein Mikrofiltrationsmodul in den Reaktor sterilfiltriert. Nach Einstellung von Temperatur (37 °C) und pH-Wert (6,5) wurde die pO₂-Elektrode und Abgasanalytik kalibriert.

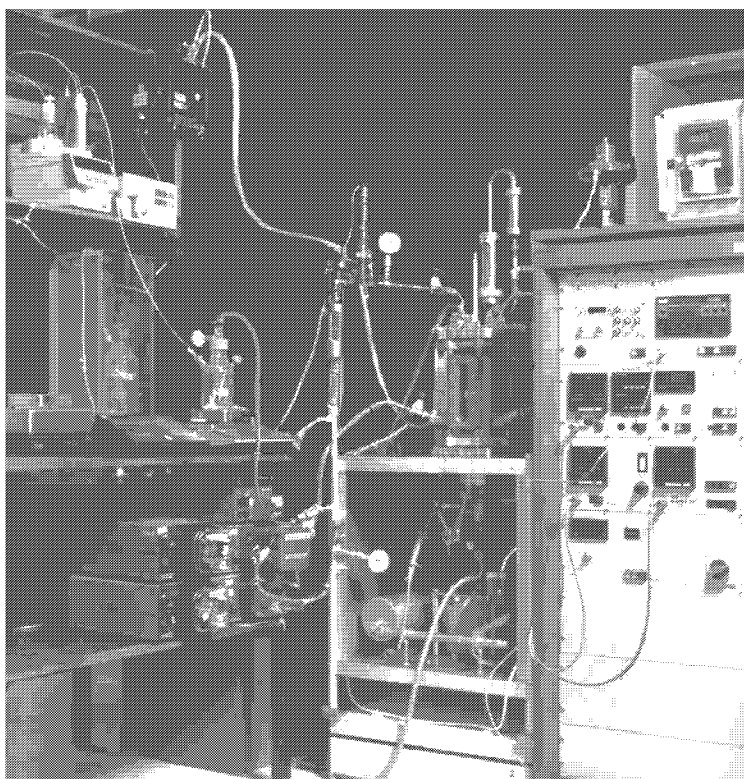


Abbildung 23: Bild des 7,5 l Bioreaktors mit Peripherie.

Zum Start der Fermentation wurden 400 ml Vorkultur inokuliert. Drehzahl und Zuluft wurden auf 250 rpm bzw. 1 vvm eingestellt und im Fermentationsverlauf manuell angepasst (pO₂ > 30 %). Sobald die Glucosekonzentration im Bioreaktor 10 g/l unterschritt, wurde die manuelle Glucose- und L-Tyrosinzufuhr gestartet. Die L-Tyrosinzufuhr wurde beim Erreichen OD_{620nm} von 80 gestoppt.

Antischaummittel wurde bei Bedarf manuell über eine entsprechende Schlauchpumpe zugeführt. Die Fermentation wurde nach 30 h beendet. Abbildung 23 zeigt ein Foto des Bioreaktors. An den Reaktor ist bereits der Filtrationsumlauf montiert (vgl. Abschnitt 5.2.1).

5.2.1. ANSCHLUSS DES FILTRATIONSUMLAUFS

Zur Bereitstellung von zellfreiem Fermentationsüberstand wurde ein Filtrationsumlauf konstruiert. Unter Einsatz der in Abschnitt 5.2 beschriebenen Prozessführung sollte dieser charakterisiert werden. Der Filtrationsumlauf ist in Abbildung 24 schematisch dargestellt.

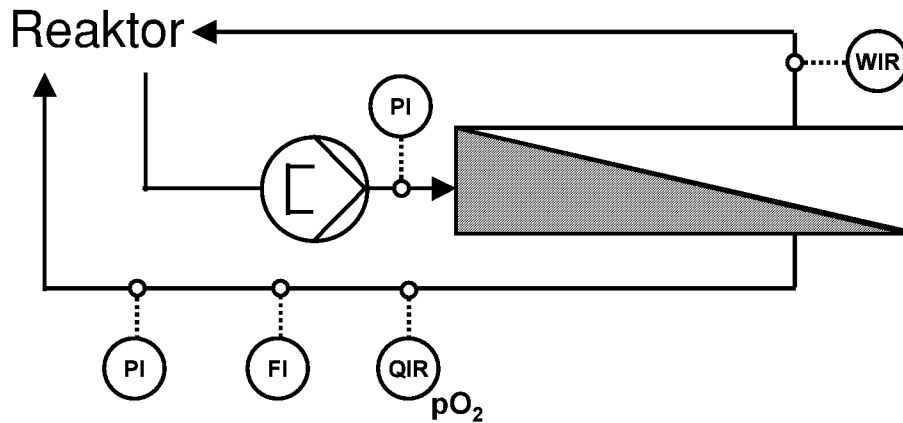


Abbildung 24: Schema des Filtrationsumlaufs (Geräteliste in Abschnitt 12.2).

Abbildung 25 zeigt ein Foto des Filtrationsumlaufs. Die Fermentationslösung wurde aus einem Seitenstutzen des Reaktors durch das Filtrationsmodul gefördert, das Retentat durch ein Septum im Reaktordeckel zurückgeführt. Hinter dem Modul sind Durchflussanzeiger, pO_2 -Elektrode und Manometer montiert. Am Bioreaktorein- und ausgang sind die Ventile erkennbar, mit denen der Transmembrandruck eingestellt werden konnte. Das Permeat wurde auf einer Waage gesammelt und der Volumenstrom über eine Dosierstrecke bilanziert. Anschließend wurde das Permeat in den Reaktor zurückgeführt.

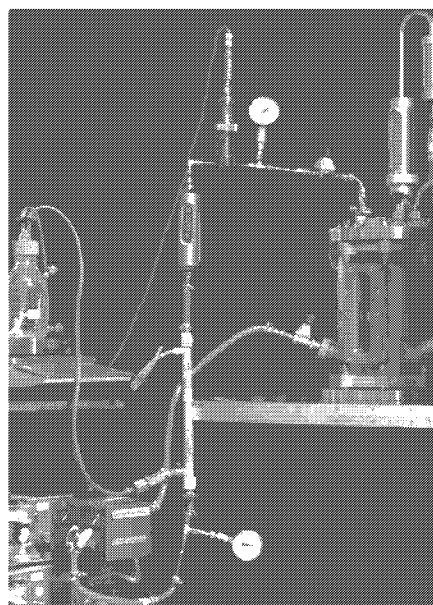


Abbildung 25: Bild des Filtrationsumlaufs.

Die Module, die für eine Permeatabtrennung zur Verfügung standen, wurden bereits in Abschnitt 4.5.1 beschrieben und von Silberbach detailliert charakterisiert [204]. Diese Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, das Hohlfaserultrafiltrationsmodul weiter zu verwenden (vgl. Abschnitt 4.5.1). Die Trenngrenze der Ultrafiltrationsmembran lag bei 500 kDa. Ultrafiltrationsmodule sind häufig nicht für die Filtration von zellhaltigen Lösungen geeignet, da die dünnen Kanäle zu schnell verstopfen [208]. Bei diesem Hohlfasermodul mit einem Kanaldurchmesser von 1,0 mm bestand jedoch keine Gefahr (*E. coli* ist durchschnittlich 0,5-2 µm groß). Aufgrund der Hydrophobizität der Membran, musste jedoch mit verstärktem Fouling, bedingt durch die erhöhte Bindungskapazität für Proteine, gerechnet werden [201].

Die erforderlichen Überströmungsraten waren geringer als bei den anderen Modulen, so dass eine vergleichsweise geringe Pumpleistung erforderlich war. Die Strömung ist bei den eingestellten Betriebszuständen immer laminar gewesen. Zudem waren die Scherraten an der Membran des ausgewählten Moduls geringer, als bei den anderen beiden Modulen (vgl. Tabelle 4 in Abschnitt 4.5.) Da keine Informationen über die Scherstressempfindlichkeit des *E. coli*-Stammes vorlagen, sollten die Zellen einem möglichst geringen Scherstress ausgesetzt werden.

Da das Hohlfasermodul nur bedingt autoklavierbar war, wurde es zunächst chemisch sterilisiert und anschließend mit Hilfe von Sterilkupplungen an den Reaktor angeschlossen (vgl. Abschnitt 4.5.2). Der Filtrationsumlauf wurde 2 h nach der Induktion der L-Phe-Produktion gestartet.

In einigen Versuchsansätzen wurde eine D₂EHPA-Kerosinmischung („Simulation“ der Reaktiv-Extraktion) mit einem Dosimaten kontinuierlich in den Permeatvolumenstrom gegeben. Die Zugabe des reinen D₂EHPA musste manuell erfolgen, da der Dosimat den Carrier, aufgrund seiner hohen Viskosität, nicht dosieren konnte.

5.3. FERMENTATION IM 7,5 L BIOREAKTOR (KONTINUIERLICHES VERFAHREN)

Zur Untersuchung zellphysiologischer Parameter (Plasmidstabilität, Enzymaktivität, Morphologie, Reaktion der Zellen auf verschiedene L-Phe-Konzentrationen und Zugabe des Carriers D₂EHPA, etc.), wurden im 7,5 l Bioreaktor kontinuierliche Fermentationen von Engfeld durchgeführt [209].

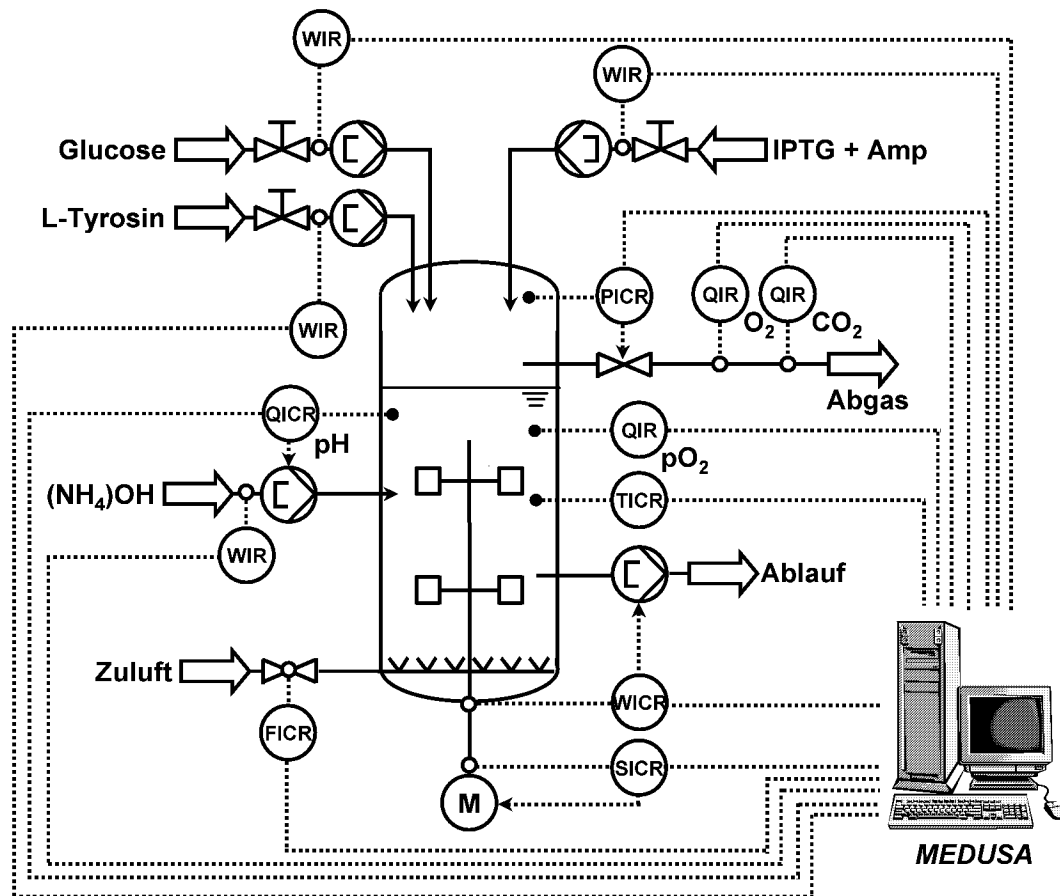


Abbildung 26: Schematischer Aufbau der kontinuierlichen Fermentation im 7,5 l Bioreaktor (Geräteliste in Abschnitt 12.2).

Abbildung 26 zeigt den schematischen Aufbau der Anlage. Das Arbeitsvolumen betrug 4,0 l. Der Reaktor war auf einer Waage gelagert, die über einen PID-Regler (in die Prozesssteuerung implementiert) und in Verbindung mit einer Schlauchpumpe das Arbeitsvolumen konstant hielt. Der pH-Wert wurde mit 25 % Ammoniakwasser auf 6,5 eingestellt. Des Weiteren wurden Temperatur (37 °C), Zuluft (2 l/min in der Batchphase; 6 l/min im kontinuierlichen Betrieb) und Reaktorinnendruck (1,3 bar) geregelt. Weiterhin wurden die Gelöstsauerstoffkonzentration und die CO₂- und O₂-Anteile im Abgas bestimmt. Über die Regelung der Rührerdrehzahl wurde ein pO₂ > 30 % sichergestellt. Alle Messsignale wurden über analoge Leitungen an ein SMP-Interface weitergegeben, dort digitalisiert und an den Prozessrechner (MEDUSA als Software) zur Datensicherung gesendet. Die Substratgefäße standen auf Waagen, um die Gewichtsabnahme, und damit den Verbrauch an Medium, zu ermitteln. Das Hauptmedium enthielt Glucose, Nährsalze und Antischaummittel. Es wurde, wie auch das pH-Korrekturmittel, über eine Schlauchpumpe in den Reaktor gefördert.

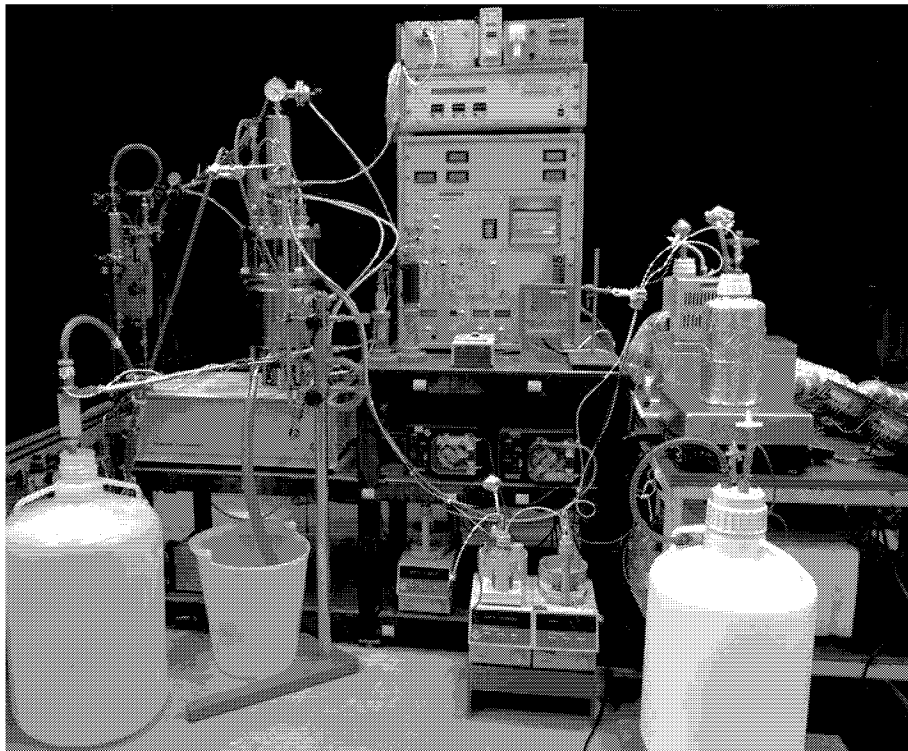


Abbildung 27: Bild des 7,5 l Bioprozesses zur kontinuierlichen Fermentation.

Die notwendige Wachstumslimitierung erfolgte über die L-Tyrosinzugabe. Die Zulauftrate wurde so eingestellt, dass die Fermentation bei Glucosesättigung betrieben werden konnte. Die Zugabe der IPTG-Ampicillinlösung erfolgte zur konstanten Expression der plasmidkodierten Gene und zum Selektionsdruck. Beide Lösungen wurden über Dosimaten zugeführt. Die IPTG-Ampicillinlösung wurde auf 2 °C gekühlt. Abbildung 27 zeigt den Gesamtaufbau der Anlage.

Die Fermentationen im kontinuierlichen Betrieb wurden bei Durchflussraten von $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ (400 ml/h) und $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ (800 ml/h) durchgeführt. Tabelle 5 fasst die Zuflussraten der drei kontinuierlich zugeführten Lösungen zusammen. Die Zugabe des pH-Korrekturmittels wurde vernachlässigt. Die Zusammensetzung der Medien ist im Anhang (Abschnitt 12.5) zusammengefasst.

Tabelle 5: Förderraten der Lösungen bei verschiedenen Durchflussraten.

<i>Lösung</i>	<i>Zufuhr (ml/h)</i>	
	($D = 0,1 \text{ h}^{-1}$)	($D = 0,2 \text{ h}^{-1}$)
• Glucose- und Nährsalze	391,1	782,2
• L-Tyrosinlösung (25 g/l)	6,5	13,0
• IPTG-Ampicillinlösung	2,4	4,8
• Ammoniakwasser	nach Bedarf	

In dem Glucosenährmedium wurden verschiedene L-Phe-Konzentrationen eingestellt (0 - 30 g/l), um in den Fliessgleichgewichtszuständen („Steady States“) den Einfluss des „Produktes“ zu untersuchen. Diese Versuche wurden bei Zufuhr der maximal löslichen Menge D₂EHPA-Kerosin (0,03 ml/l) für $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ wiederholt, um eine Aussage über die Wirkung des Carriers auf den Zellenzustand und die L-Phe-Produktbildungsrate, treffen zu können. Tabelle 6 fasst die durchgeführten Fermentationsreihen zusammen.

Tabelle 6: Untersuchte „Steady States“ im kontinuierlichen Betrieb.

Verdünnungsrate	Konzentration L-Phe [g/l]				
D = 0,2 h⁻¹ [800 ml/h]	0	5	10	20	30
D = 0,1 h⁻¹ [400 ml/h]	0	-	10	-	30
D = 0,1 h⁻¹ [400 ml/h] +D ₂ EHPA (0,03 ml/l)	0	-	10	-	30

Die einzelnen „Steady States“ sollten nach jeweils fünf Verweilzeiten eingestellt sein, d.h. nach 25 h ($D = 0,2 \text{ h}^{-1}$) bzw. 50 h ($D = 0,1 \text{ h}^{-1}$). Zwar ist zu diesem Zeitpunkt erst das hydrodynamische und nicht das biologische Gleichgewicht erreicht, jedoch war diese Vereinfachung aufgrund der Eigenschaften des *E. coli*-Stammes notwendig.

Der Ablauf eines Experimentes verlief wie folgt:

Vorkultivierung:

Siehe Abschnitt 4.2.2..

Satzweise Fermentation:

Der Bioreaktor wurde mit Leitungswasser sterilisiert (121 °C, 20 min). 2,7 l Batchmedium wurden über ein Mikrofiltrationsmodul in den Reaktor sterilfiltriert, Temperatur und pH-Wert eingestellt und pO₂-Elektrode und Abgasanalytik kalibriert (1,3 bar, 2 l/min, 900 rpm). Mit Inokulation von 300 ml Vorkultur wurde die Fermentation gestartet.

Kontinuierliche Fermentation:

Nach 10 Stunden erreichte die OD_{620nm} ungefähr 15 und die Glucosekonzentration war auf ungefähr 10 g/l gesunken. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zuläufe gestartet. Der Druck wurde auf 1,4 bar und die Rührerdrehzahl auf 1300 rpm erhöht. Bei Erreichen eines Volumens von 4,0 l startete die Gewichtsregelung automatisch. Alle Parameter, außer der Gelöstsauerstoffkonzentration, wurden bis zum Erreichen des ersten „Steady States“ auf konstante Werte geregelt.

Schematisch lässt sich der Ablauf von der Kryokultur bis zum Fliessgleichgewichtszustand wie in Abbildung 28 zusammenfassen.

Kryokultur

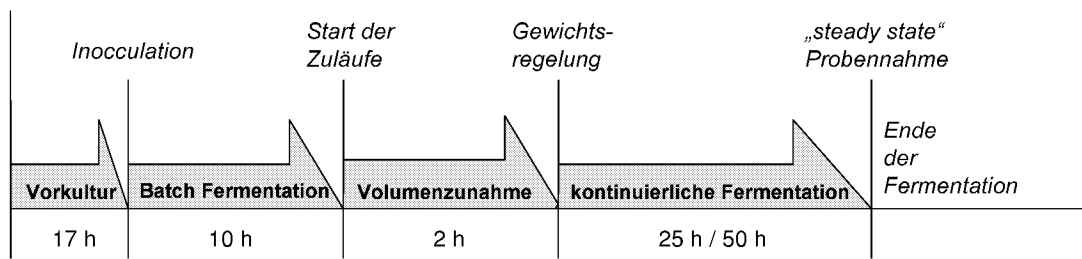


Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf einer kontinuierlichen Fermentation.

5.4. FERMENTATION IM 20 L BIOREAKTOR (ZULAUFVERFAHREN)

Zu Beginn der Arbeiten wurde eine einfache Prozessstrategie etabliert, die auf einem Fermentationsprozess der Firma DSM Biotech GmbH basierte [210]. Ein Schema dieses Prozesses ist in Abbildung 29 dargestellt.

Dieser Versuchsaufbau wurde zur Entwicklung des Fermentationsprozesses und der in den folgenden Abschnitten 5.4.2, 5.4.3 und 5.4.4 beschriebenen Regelungsstrategien verwendet. Ziel der Prozessentwicklung war es, die Fermentationsstrategie grundsätzlich beizubehalten, jedoch durch Entwicklung und Einbindung von verschiedenen Regelungsstrategien die Reproduzierbarkeit zu verbessern. Zudem sollte das Verfahren den Einsatz verschiedener genetisch veränderter *E. coli* Produktionsstämme ermöglichen, um diese unter den gleichen, definierten Fermentationsbedingungen zu charakterisieren.

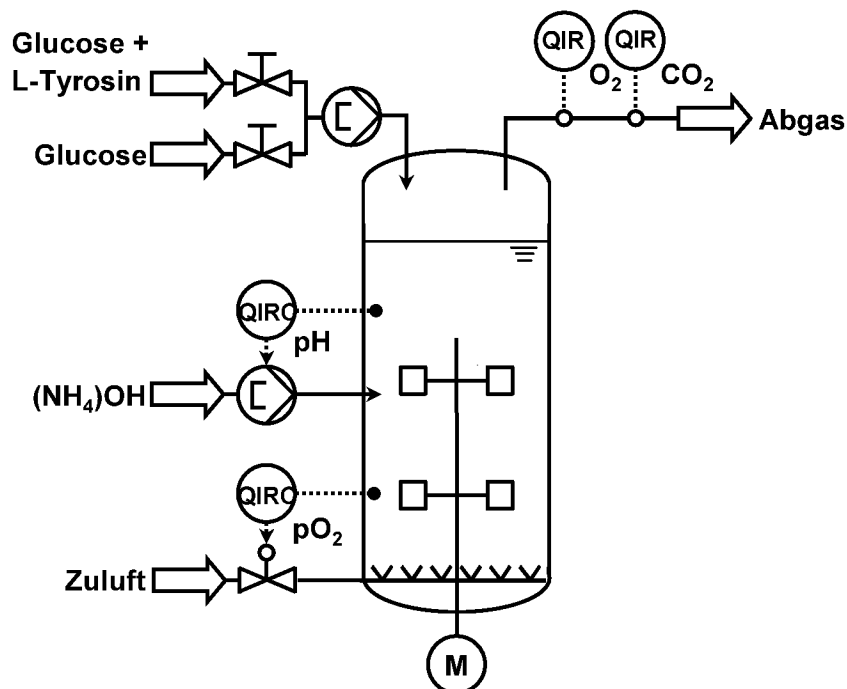


Abbildung 29: Schema des einfachen Reaktoraufbaus im 20 l Maßstab (Geräteliste in Abschnitt 12.2).

Für die Fermentation im 20 l Bioreaktor (ISF 200, Infors; Schweiz) und die spätere Maßstabsvergrößerung, musste eine umfangreiche Prozesskontrolle und Datenerfassung eingesetzt werden. Diese wird später für beide Prozessaufbauten gemeinsam beschrieben.

Vor der Sterilisation des Reaktors (121 °C, 20 min) wurde die pH-Elektrode kalibriert und alle notwendigen Verschlauchungen angebracht. Anschließend wurde in den sterilen Reaktor, über ein Mikrofiltrationsmodul, 6,75 l Fermentationsmedium sterilfiltriert. Die Batchvorlage wurde mit einer Konzentration von 110 % angesetzt, damit nach 10 %iger Inokulation der Vorkultur die Anfangskonzentration vorlag (ungenutzte Nährsalze der Vorkultur wurden vernachlässigt). Bei 37 °C und einem pH-Wert von 6,5 (25 % Ammoniakwasser) wurde die pO₂-Elektrode und Abgasanalytik mit Stickstoff zum Nullabgleich und mit Raumluft zur Einstellung der von 100 % (pO₂) bzw. 20,9 % (O₂) (CO₂ zusätzlich mit technischem Gas; 10 % CO₂) kalibriert (1000 rpm, 1,2 bar, 1 vvm).

Die Prozessperipherie umfasste folgende Komponenten: Das Ammoniakwasser stand auf einer Waage und war und einer Dosierstrecke verbunden, die ein analoges Messsignal sendete. Auch die Abgasanalytik sendete analoge Signale. Die Dosiersysteme für Glucose und L-Tyrosin bestanden aus Waage, Schlauchpumpe und Dosierstrecke und verfügten über eine serielle Schnittstelle. Antischaummittel konnte über eine Schlauchpumpe manuell zugegeben werden.

Die Fermentation wurde durch die Inokulation von 750 ml Vorkultur (OD_{620nm} ≈ 3,0) gestartet. Als Startbedingungen wurden 500 rpm, 1,2 bar und 0,33 vvm eingestellt. Alle drei Parameter wurden während der Fermentation angepasst, um einen pO₂ > 30 % sicherzustellen (Rührerdrehzahl_{max} = 1800 rpm; Zuluft_{max} = 15 l/min; Reaktorinnendruck_{max} = 1,6 bar).

Bei Erreichen einer Glucosekonzentration von ungefähr 5 g/l wurde die Zufuhr der Glucose-L-Tyrosinlösung gestartet und im weiteren Verlauf manuell abgeglichen, um eine Glucosekonzentration von 5 g/l konstant zu halten. Beim Erreichen einer optischen Dichte von 10 - 15 wurde die L-Phe-Produktion durch Zugabe von 100 µM IPTG induziert. Die L-Tyrosinhaltige Glucoselösung wurde bis zu einer optischen Dichte von ungefähr 80 zugeführt, dann wurde auf eine Glucoselösung umgeschaltet. Bis zu einer Fermentationsdauer von 50 h wurde die Zufuhr an Glucose regelmäßig angeglichen, um im Reaktor eine Konzentration von ungefähr 5 g/l konstant zu halten. Für eine kontinuierliche hohe Expressionsrate wurde nach 24 - 28 h eine zweite IPTG-Induktion (100 µM) vorgenommen.

Im Verlauf der Prozessentwicklung wurden weitere technische Komponenten in den Versuchsaufbau integriert. Abbildung 30 fasst in einem Fließbild die grundsätzlichen Veränderungen im Prozessaufbau zusammen. Im Folgenden soll beschrieben werden, welche technischen Veränderungen vorgenommen wurden.

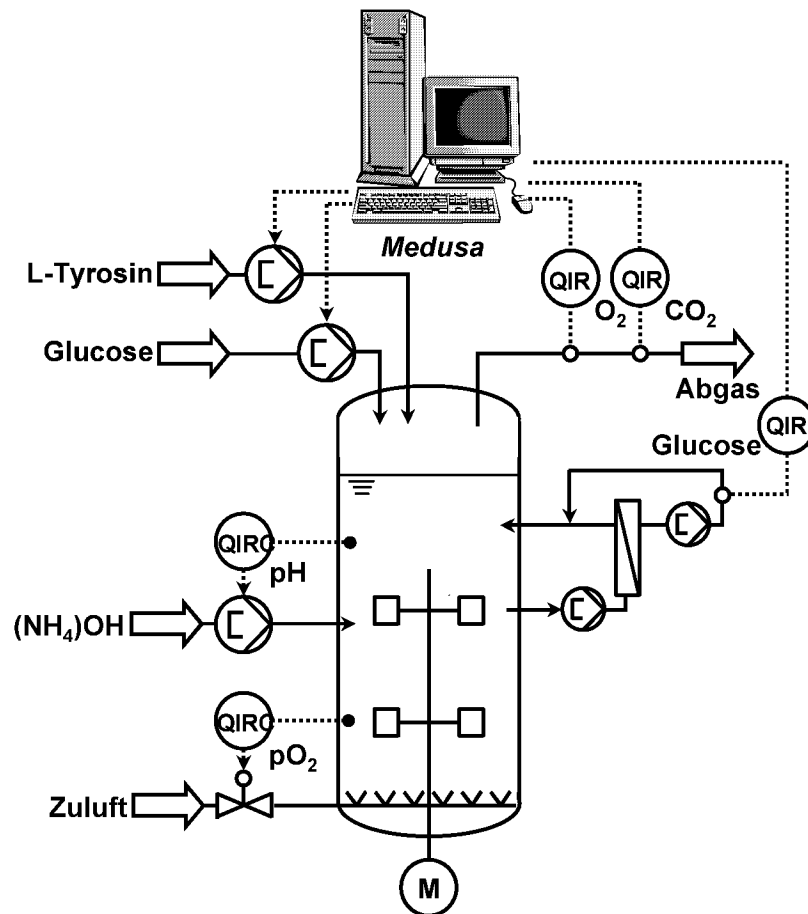


Abbildung 30: Schema des zur Standardfermentation eingesetzten Reaktoraufbaus (Geräteliste in Abschnitt 12.2).

Die zugeführten Substrate (Glucose und L-Tyrosin) wurden entkoppelt und über getrennte Systeme zugeführt. Die Glucoselösung enthielt 700 g/l. 25 g/l L-Tyrosin wurden in Form einer alkalischen Lösung (pH $\approx$ 11) zugegeben. Ein Filtrationsumlauf zur kontinuierlichen Entnahme von zellfreiem Fermentationsüberstand wurde, vor der Sterilisation des Reaktors, chemisch sterilisiert und an den Reaktor angeschlossen. Ein Analysegerät zur Bestimmung der Glucosekonzentration (vgl. Abschnitt 4.4.5) im Reaktor wurde mit der kontinuierlichen Probenahme verbunden. Beim Erreichen einer Glucosekonzentration von 5 - 7 g/l, konnte die Glucosezufuhr gestartet werden. Die Zulauftrate wurde nicht mehr manuell eingestellt, sondern über die Bestimmung der Glucosekonzentration und den Einsatz eines entsprechenden Regelkonzeptes angeglichen. Auch die L-Tyrosinzufuhr erfolgte über einen Regelungsansatz. Über einen reaktionstechnischen Zusammenhang wurde eine für Wachstum und Produktbildung optimale Zulauftrate eingestellt. Abbildung 31 zeigt ein Foto des gesamten Prozessaufbaus, wie er in der Folge für die Charakterisierung neuer *E. coli* Stämme und zur Untersuchung reaktionstechnischer Parameter eingesetzt wurde.



Abbildung 31: Bild des 20 l Bioreaktors inklusive Peripherie zur Fed-Batch-Fermentation.

5.4.1 PROZESSDATENERFASSUNG

In diesem Kapitel soll das Verfahren zur Datensicherung beschrieben werden, das bei der Fermentation im 20 l Reaktor (Abschnitt 5.4) und bei der späteren Maßstabsvergrößerung zum Einsatz kam. Die wesentlich einfachere Datenübertragung bei den anderen, beschriebenen Fermentationsprozessen, ist den jeweiligen Kapiteln zu entnehmen.

Die Datenerfassung der prozesstechnischen Parameter erfolgte bei den durchgeführten Fermentationen über einen Prozessrechner mittels der Software LabView. Alle von der Steuereinheit des Bioreaktors erfassten Daten (Temperatur, Drehzahl, Druck, Begasungsrate, pH, pO_2 , Gewicht) wurden über eine serielle Schnittstelle eingelesen. Die Regelung aller Prozessvariablen (außer Gewicht) erfolgte über PID-Regler, die in die Mess- und Regeleinheit des Bioreaktors implementiert waren. Nur die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde manuell, durch Veränderung von Drehzahl, Begasungsrate und Reaktorinnendruck, eingestellt.

Die Erfassung analoger Signale erfolgte über einen zweiten PC mittels der Software Medusa 2.0 (Forschungszentrum Jülich GmbH; IBT 2). Hier wurden die Werte externer Analysegeräte, wie die O_2 - und CO_2 -Abgaskonzentration und der analoge Waagenwert der Ammoniakwasservorlage, gespeichert, nachdem sie in einem SMP-Interface digitalisiert wurden. Des Weiteren steuerte dieser PC die Dosiersysteme für Glucose und L-Tyrosin (beide Systeme waren über serielle Schnittstellen mit dem PC verbunden), wobei Medusa die

einzustellenden Zulaufraten sendete (Sollwert) und die Dosierstrecken die gemessenen Istwerte zur Datensicherung zurückschickten.

Die im Versuch zur integrierten Produktabtrennung zusätzlich auftretenden analogen Werte der Permeatbilanzierungswaage und der pO_2 -Elektrode im Umlauf, wurden digitalisiert (SMP-Interface) und im LabView-PC gespeichert.

Ein dritter PC wurde aufgestellt, um die OLGA zu steuern und das Messsignal der Glucosemessung auszuwerten. Dieser PC, der ein OLGA-eigenes Programm betrieb, schickte das Messsignal über eine serielle Schnittstelle an den LabView-PC zur Datensicherung. Der LabView-PC wiederum sendete die Daten der Glucosemessung (Konzentration und Probenahmezeitpunkt) und die Messungen des Reaktorgewichts und der Begasungsrate, über eine serielle Schnittstelle an den Medusa-PC, da hierüber die Regler betrieben, und die Dosiersysteme gesteuert wurden. Die Stellgröße zur indirekten Regelung der L-Tyrosinzufuhr wurde vom Medusa-PC berechnet. Aus den Werten der Abgasanalytik, des Reaktorgewichts und der Begasungsrate konnte die volumetrische OUR berechnet werden. Anschließend wurde aus einem empirischen Zusammenhang die volumetrische L-Tyrosinverbrauchsrate abgeleitet und eine dementsprechende Zulauftrate eingestellt.

5.4.2. KONTINUIERLICHE PROBENAHME

Im Zusammenhang mit der in Abschnitt 5.4 beschriebenen Etablierung einer on-line betriebenen Glucoseanalytik war es notwendig, einen Filtrationsumlauf zur kontinuierlichen Bereitstellung von zellfreiem Fermentationsüberstand in den Bioreaktor zu integrieren. Als zentrale Komponente wurde ein Hohlfaserultrafiltrationsmodul mit einer aktiven Fläche von 23 cm² und einer Porenausschlussgrenze von 500 kDa eingesetzt. Das im Cross-flow Betrieb eingesetzte Modul wurde in einen, aus alkalibeständigem Schlauch konstruierten Umlauf eingepasst.

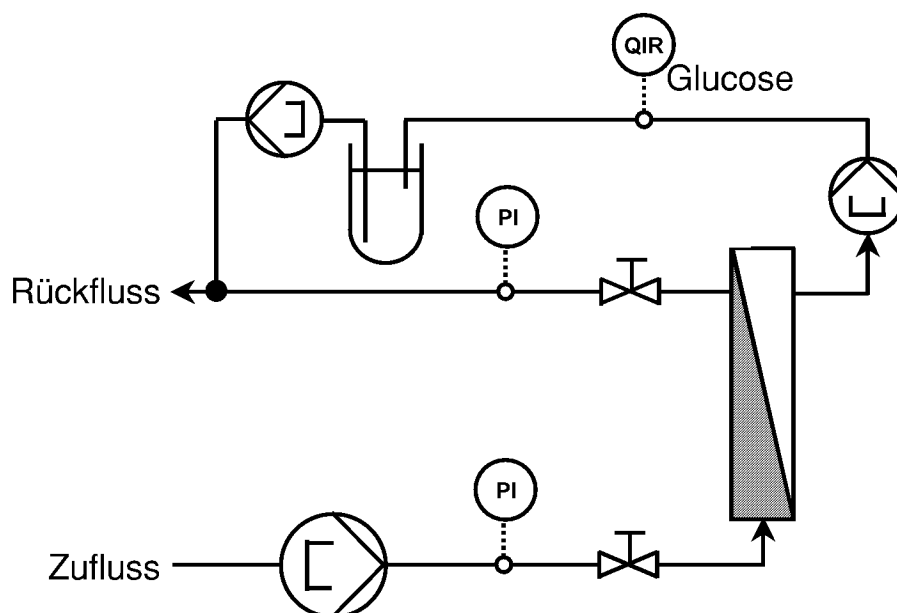


Abbildung 32: Fließbild des Umlaufs zur kontinuierlichen Probenahme (Geräteliste in Abschnitt 12.2).

Wie in Abbildung 32 schematisch dargestellt ist, wurden in den Umlauf Manometer, zur Druckkontrolle, und Membranventile, zum Austausch des Moduls, eingebaut. Der Umlauf wurde mit Animpfnadeln versehen, die an Seitenstutzen des Bioreaktors angeschlossen wurden. Der Umlauf wurde mit einer Schlauchpumpe (Förderleistung 1,6 l/min) betrieben, wodurch eine Verweilzeit von unter 2 s sichergestellt werden konnte (Innenvolumen des Filtrationsumlaufs ungefähr 20 ml). Die hohe Fördergeschwindigkeit war notwendig, um eine Sauerstofflimitierung der Zellen zu vermeiden.

Da das Filtrationsmodul nur bedingt thermisch sterilisiert werden konnte, wurde der gesamte Umlauf für mindestens 30 min mit 0,5 bis 2,0 M NaOH-Lösung (höhere Konzentration bei älteren Modulen) bei Raumtemperatur chemisch sterilisiert. Nach Anschluss des Umlaufs an die Seitenstutzen konnte der Reaktor sterilisiert werden. Nach der Sterilisation wurde das im Reaktor enthaltene H₂O durch den Umlauf gefördert, um die noch darin enthaltene Natronlauge zu verdünnen. Die verdünnte NaOH-Lösung wurde über das Probenahmeventil abgeführt.

Während der Fermentation konnten über das Ultrafiltrationsmodul 1-2 ml/min zellfreies Permeat abgetrennt werden. Über einen Seitenstutzen am Modul, wurde das Permeat von einer Schlauchpumpe durch einen Teflonschlauch ($\varnothing = 1,0$ mm), zum on-line Glucose Analyser (OLGA) gefördert. Das Gerät entnahm aus dem Permeatstrom ungefähr alle 120 s 10 μ l Probe (vor der Probenahme wurden die Schläuche mit 30 μ l Permeat gespült). Da das Lumen auf der Permeatseite inklusive des Moduls weniger als 1,5 ml umfasste, konnte bei dem erreichten Permeatvolumenstrom eine Totzeit von ungefähr einer Minute sichergestellt werden. Abbildung 33 zeigt ein Bild des Umlaufs.

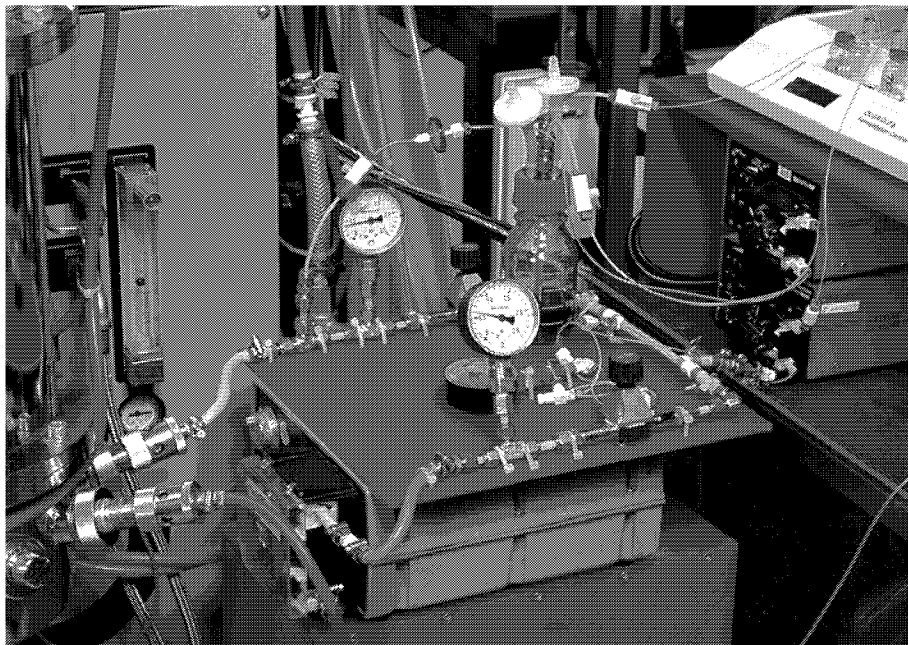


Abbildung 33: Bild des Filtrationsumlaufs zur kontinuierlichen Probenahme.

Um die Volumenreduktion im Reaktor durch die Permeatabtrennung so gering wie möglich zu halten (1 - 2 ml/min Permeatabtrennung führen zu 2,5 - 5,0 l während einer Fermentation), wurde das überschüssige Permeat an der OLGA vorbei, in eine sterilisierte Druckausgleichsflasche gefördert. Mittels einer weiteren Schlauchpumpe konnte das gesammelte Permeat anschließend wieder in den Bioreaktor zurückgeführt werden. Der Druckausgleich war notwendig, da die OLGA drucklos betrieben werden muss [211] und bei einer direkten Rückführung der Reaktorüberdruck auf das System wirken würde.

Nach Beendigung einer Fermentation wurde das gesamte Probenahmesystem vom Reaktor getrennt, für mindestens 2 h mit 0,5 bis 2,0 M NaOH bei Raumtemperatur gereinigt und anschließend mit H₂O gespült.

5.4.3. REGELUNG DER GLUCOSEKONZENTRATION

Die Messung der Glucosekonzentration erfolgte über die OLGA (vgl. Abschnitt 4.4.5), wobei eine Totzeit, von der Probenahme bis zur Auswertung der Messung, von ungefähr 120 s erreicht wurde. Die Weitergabe des Messsignals an den PC (Medusa als Software), der den Regler betrieb, ist Abschnitt 5.4.1 zu entnehmen. Die vom Regler berechnete Stellgröße (Glucosezulauf rate) wurde über eine serielle Schnittstelle an die entsprechende Dosierstrecke weitergeleitet. Von der Dosierstrecke wurde die eingestellte Istgröße wiederum zur Datensicherung zurückgesendet.

Die Regelung der Glucosezufuhr im geschlossenen Regelkreis erfolgte über ein spezifisches Reglersystem, das im Folgenden näher beschrieben werden soll.

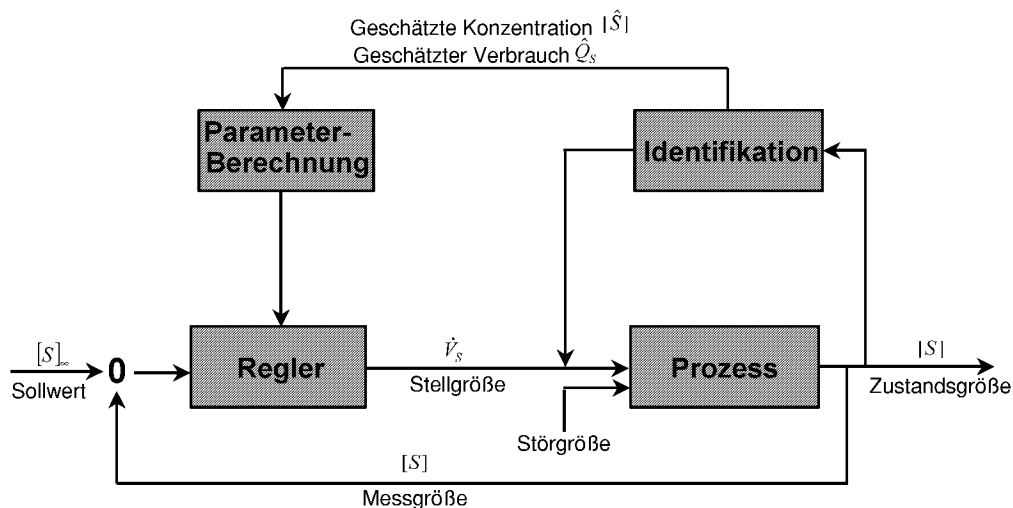


Abbildung 34: Schema des modellgestützten, adaptiven Regelkonzeptes zur Substratregelung in Prozessen [212, 213]. Basierend auf einem einfachen Prozessmodell, werden mit der totzeitbehafteten Messgröße $[S]$ (Substratkonzentration) und der Stellgröße $\dot{V}_s$ (Pumprate) die geglätteten, aktuellen Zustandsgrößen geschätzt ($\hat{[S]}$ und $\hat{Q}_s$). Mit dieser Information werden die Reglerparameter der Prozessdynamik angepasst.

Für die Regelung verrauschter, diskreter und totzeitbehafteter Zustandsgrößen bei nicht-linearem Verhalten der Regelstrecke, ist in Medusa ein modellgestütztes, parameteradaptives Regelkonzept implementiert [214]. Das Prinzip dieses Regelungskonzeptes ist in Abbildung 34 dargestellt. Es wird dabei die in der Regelungstechnik übliche Nomenklatur verwendet, die ausschließlich in diesem Abschnitt eingesetzt und nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt wird.

Die Echtzeitbestimmung der Prozessvariablen $[\hat{S}]$ und $\hat{Q}_S$, erfolgte mit einem erweiterten, semikontinuierlichen Kalman-Filter [215]. Der Kalman-Filter minimiert die Varianz des Schätzfehlers aller geschätzten Größen bei Eintreffen eines diskreten, totzeitbehafteten Analysenwertes. Die Bestimmung der Glucosekonzentration und der Glucoseverbrauchsrate zur nächsten Abtastzeit, erfolgt durch die Lösung der Differentialgleichungen des Prozessmodells (Gleichung 5-1 bis 5-3).

$$\frac{d[\hat{S}]_R}{dt} = \frac{\dot{v}_m \cdot ([S]_m - [S]_R)}{V_R} + \hat{r}_S + g_1 \quad (5-1)$$

$$\frac{d\hat{r}_S}{dt} = \hat{c} + g_2 \quad (5-2)$$

$$\frac{dc}{dt} = \hat{c} \cdot \frac{\dot{v}_m}{V_R} + g_3 \quad (5-3)$$

Die Änderung der geschätzten Substratkonzentration $[\hat{S}]$ über die Zeit in Gleichung 5-1, ergibt sich aus dem zudosierten Substratvolumen und der geschätzten Substratverbrauchsrate ($\hat{r}$). Der stochastische Anteil g_1 berücksichtigt das Messrauschen. Um die exponentielle Veränderung der Substratverbrauchsrate zu erfassen, wird die Zeitabhängigkeit der geschätzten Verbrauchsrate durch zwei weitere Differentialgleichungen (Gleichung 5-2 und 5-3) berücksichtigt, die ebenfalls stochastische Terme (g_2 und g_3) beinhalten. Die Änderung von $\hat{c}$ hängt, nach einem Vorschlag von Stephanopoulos und San [216], von der Zeitkonstante des Zulaufverfahrens ($\dot{v}_m / V_R$) ab. Die Lösung von Gleichung 5-4 macht deutlich, dass ein exponentieller Verlauf von $\hat{c}$ berücksichtigt wird.

$$\hat{c} = \exp\left(\frac{\dot{v}_m}{V_R} \cdot t\right) + const. \quad (5-4)$$

Die geschätzte Substratkonzentration und der geschätzte Substratverbrauch zur nächsten Abtastzeit, werden dem Minimal-Varianz-Regler [214] übermittelt, der daraufhin die Stellgröße verändert, um die Einhaltung des Sollwertes (Glucosekonzentration) 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:

$$F_{(t+1)} = \{s_{(t+1)}^2 + u \cdot \dot{v}_{(t)}^2\} \quad (5-5)$$

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

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

$u =$ Gewichtungsfaktor

Es ist zu beachten, dass der Regler somit nicht die aktuelle, sondern die zu erwartende Regelgrößenabweichung in das Gütekriterium einbezieht [217]. 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 an den Gleichwert angepasst, bei $u < 1$ wird eine größere Stellgrößenabweichung akzeptiert und die Regelgrößenabweichung minimiert. Für die Konfiguration des Reglers stand in Medusa eine Benutzeroberfläche zur Verfügung, die die Eingabe aller relevanten Parameter ermöglichte. Für die Regelung der Glucosekonzentration wurden folgende Parametereinstellungen vorgenommen:

Rauschanteil g_1 :	0,5 absolut	10 % relativ
Rauschanteil g_2 :	0,5 absolut	5 % relativ
Rauschanteil g_3 :	0,5 absolut	2 % relativ
Gewichtung u :	13	
Gleichwert $\dot{V}_{\infty}$:	Mittelwert der letzten 10 Stellgrößen	

5.4.4. INDIREKTE REGELUNG DER L-TYROSINZUFUHR

Die Zufuhr der Aminosäure L-Tyrosin in der Wachstumsphase, war aufgrund der L-Tyrosinauxotrophie der *E. coli* Produktionsstämme notwendig. In Verbindung mit dem Einsatz einer L-Tyrosinsensitiven DAHP-Synthase, musste jedoch eine Akkumulation an L-Tyrosin vermieden werden (siehe hierzu Abschnitt 2.1.2). Die Einführung einer Regelungsstrategie für L-Tyrosin während der exponentiellen Wachstumsphase, sollte eine optimale Versorgung der Zellen sicherstellen.

$$\text{OUR}_{\text{vol}} = \frac{\dot{V}_G^{\alpha} \left[\frac{l}{\text{min}} \right]}{V_F [l] \cdot 22,414 \left[\frac{l}{\text{mol}} \right]} \cdot \left(Y_{O_2}^{\alpha} - \frac{(1 - Y_{O_2}^{\alpha} - Y_{CO_2}^{\alpha})}{(1 - Y_{O_2}^{\omega} - Y_{CO_2}^{\omega})} \cdot Y_{O_2}^{\omega} \right) \cdot \left[\frac{\text{mol}}{(l \cdot \text{min})} \right] \quad (5-6)$$

Mit:

$Y_{O_2}^{\alpha}$: O₂-Anteil in der Zuluft (0,2093) [%]

$Y_{O_2}^{\omega}$: O₂-Anteil in der Abluft [%]

$Y_{CO_2}^{\alpha}$: CO₂-Anteil in der Zuluft (0,0003) [%]

$Y_{CO_2}^{\omega}$: CO₂-Anteil in der Abluft [%]

$\dot{V}_G^{\alpha}$: Begasungsrate

V_F : Flüssigvolumen

Ab dem Ende der Batchphase wurde die volumetrische Sauerstoffverbrauchsrate (OUR) berechnet (Gleichung 5-6). Diese von der Biomassekonzentration und -aktivität abhängige Rate, ließ sich aus den vorhandenen Messwerten der Abgasanalyse, dem Gewicht des Flüssigvolumens im Reaktor und der Begasungsrate durch den Medusa-PC, berechnen.

Der PC berechnete aus der volumetrische OUR, aufgrund des in Gleichung 5-7 beschriebenen empirischen Zusammenhangs, die volumetrische L-Tyrosinverbrauchsrate.

$$\dot{V}_{tyr} \left[\frac{g}{l \cdot h} \right] = \frac{OUR_{vol} \left[\frac{mmol}{l \cdot h} \right] - 30 \left[\frac{mmol}{l \cdot h} \right]}{m \left[\frac{mmol}{g} \right]} \quad (5-7)$$

Mit:

$\dot{V}_{tyr}$: volumetrische L-Tyrosinverbrauchsrate

m : Zulauffaktor

Der Zulauffaktor m wurde bei Standardfermentationsbedingungen auf 1 eingestellt, konnte jedoch zur Einstellung einer geringen Akkumulation ($m < 1$) bzw. strengerer Limitierung ($m > 1$) der L-Tyrosinzufuhr angepasst werden.

Abschließend wurde auf der Basis von $\dot{V}_{tyr}$ die L-Tyrosinzufuhr berechnet (Gleichung 5-8)

$$V_{tyr} \left[\frac{g}{h} \right] = \frac{\dot{V}_{tyr} \left[\frac{g}{(l \cdot h)} \right] \cdot V_F [l] \cdot \rho \left[\frac{g}{l} \right]}{c_{tyr} \left[\frac{g}{l} \right]} \quad (5-8)$$

Mit:

V_{tyr} : L-Tyrosinzulauftrate

ρ : näherungsweise Dichte der L-Tyrosinvorlage (1.000 g/l)

c_{tyr} : Konzentration der L-Tyrosinvorlage

Die Zuflussrate wurde vom Medusa-PC über eine serielle Schnittstelle an die Dosierstrecke für L-Tyrosin weitergeleitet, die dann den Sollwert an der Schlauchpumpe einstellte und den gemessenen Istwert wiederum an den Medusa-PC zur Datensicherung zurücksendete.

Während der Fermentation wurde L-Tyrosin bis zu einer OD_{620nm} von 80-90 zudosiert. Anschließend wurde das Zellwachstum limitiert und für den Erhaltungsstoffwechsel eine konstante L-Tyrosinzufuhr von 150 mg/h bzw. 20 mg/(l*h) (bezogen auf das vorgelegte Batchmedium von 7,5 l) eingestellt. Der Volumenstrom an 25 g/l L-Tyrosinlösung entsprach damit 6,0 ml/h.

5.5. FERMENTATION IM 300 L BIOREAKTOR (ZULAUFVERFAHREN)

Die Ziele dieser Fermentationsreihe lagen in der Maßstabsvergrößerung des bisherigen Prozesses und der Integration einer Aufarbeitungsstrategie mittels Reaktiv-Extraktion, die von

Maaß entwickelt wurde [218]. Innerhalb der Produktionsphase der Fermentation im Pilotmaßstab sollte zellfreies Permeat abgetrennt, und der Aufarbeitung zugeführt werden. Mit Hilfe der Reaktiv-Extraktion sollte das gebildete L-Phe selektiv aus dem Permeat extrahiert, und das L-Phe-arme Raffinat anschließend in den Bioprozess zurückgeführt werden. Produktion und Aufarbeitung sollten zu einem Hybridprozess „verschmelzen“.

Während für den Scale-up des Bioprozesses aus dem 20 l Reaktor (vgl. Abschnitt 5.4) in den Pilot-Maßstab nur die bereits entwickelte und beschriebene Prozessperipherie am 300 l Reaktor angebracht wurde, musste für die integrierte Produktabtrennung ein Umlauf zur Permeatabtrennung neu konstruiert und an den Reaktor angeschlossen werden. Anschließend konnte die Reaktiv-Extraktion, über den Umlauf, in den Gesamtprozess integriert werden.

Zur Durchführung der Fed-Batch-Fermentation wurde die erprobte Prozessperipherie vom 20 l Reaktor abmontiert und am 300 l Reaktor aufgebaut, wobei teilweise größere Schlauchpumpentypen eingesetzt wurden.

Das Anlagenschema ist Abbildung 30 zu entnehmen. Während im Labormaßstab 750 ml Vorkultur in 6,75 l vorgelegtes Fermentationsmedium inokuliert wurden, lagen jetzt 112 l Fermentationsmedium vor. Ein dem 300 l Reaktor vorgeschalteter 30 l Reaktor wurde deshalb als zweiter Vorkultivierungsschritt eingesetzt. Nach der Sterilisation wurden 11,0 l Vorkulturmedium in den Reaktor sterilfiltriert. Die zweite Vorkulturstufe wurde mit 1,0 l Zellsuspension (OD_{620nm} ungefähr 3,0) gestartet und ungefähr 6 h bis zu einer OD_{620nm} von 3,0 fermentiert. Anschließend wurde die gesamte Kultur über ein Ablassventil, und zuvor sterilisierte Leitungen, in den 300 l Reaktor überführt und die eigentliche Fermentation mit einem Anfangsvolumen von ungefähr 124 l gestartet.

Die Vorbereitung und Durchführung der Fermentation entsprach der in Abschnitt 5.4 beschriebenen Prozessführung. Da Rührerdrehzahl (1500 rpm), Begasungsrate (1 vvm) und k_{La} -Wert des 300 l Reaktors geringer waren als im 20 l Labormaßstab, musste bei bis zu 2,0 bar Druck fermentiert werden. Auf diese Weise wurde ein $pO_2 > 20 \%$ sichergestellt.

5.5.1. KONTINUIERLICHE PERMEATABTRENNUNG

Die kontinuierliche Permeatabtrennung sollte der Bereitstellung von zellfreiem Fermentationsüberstand für die selektive Produktabtrennung mittels Reaktiv-Extraktion dienen. Voruntersuchungen [204] dienten als Grundlage zur Auslegung der benötigten Filtrationsfläche des Hohlfilterfiltrationsmoduls, um einen Permeatstrom von 15-20 l/h zu gewährleisten. Es wurde eine notwendige Filtrationsfläche von ungefähr 4 m² abgeschätzt. Dementsprechend sollte für den zu konstruierenden Umlauf, ein Hohlfilterultrafiltrationsmodul mit 4,4 m² aktiver Filtrationsfläche verwendet werden (500 kDa; 1,0 mm Innendurchmesser der Hohlfasern). Der Förderstrom wurde von einer Schlauchpumpe VRI 840 der Firma Watson&Marlow erzeugt. Die Pumpe zeichnete sich neben einer stabilen Pumprate bei einem Gegendruck bis zu 3 bar, SIP- und CIP-Möglichkeit und geringen Scherraten, durch eine maximale Förderrate von 150 l/min aus. Die hohe Pumprate war

notwendig, um einer möglichen Sauerstofflimitierung der Zellen im Umlauf entgegenzuwirken. Abbildung 35 zeigt ein Foto des Hohlfasermoduls, Abbildung 36 ein Foto der verwendeten Schlauchpumpe.

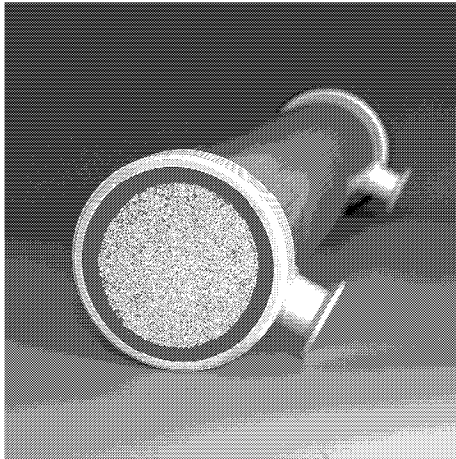


Abbildung 35: Bild des Hohlfasermoduls.

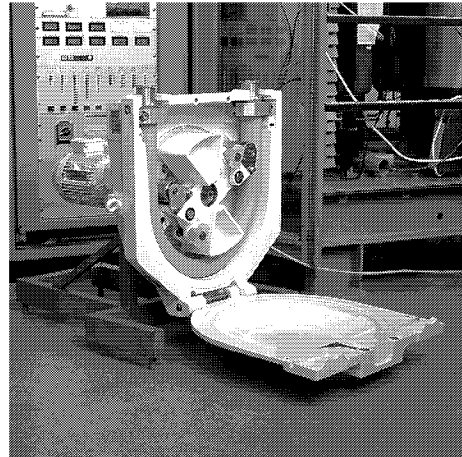


Abbildung 36: Bild der Schlauchpumpe.

Abbildung 37 zeigt ein Fließbild des Umlaufs. Alle Rohrverbindungen bestanden aus gebeiztem V2A-Stahl, hatten einen Innendurchmesser von 36 mm und waren über Tri-Clamp-Stutzen miteinander verbunden. Als 2- und 3-Wege-Hähne wurden Kugelventile (Innendurchmesser 31 mm) mit Teflondichtungen verwendet. Sie dienten der Trennung von Bioreaktor und Umlauf sowie zur Sterilisation. Da das Filtrationsmodul nur chemisch sterilisiert werden durfte, die Verbindungen zum Reaktor jedoch, zusammen mit diesem, thermisch sterilisiert werden mussten, wurde der Umlauf in Form von zwei sich überlagernden Kreisläufen konstruiert (vgl. Abbildung 37).

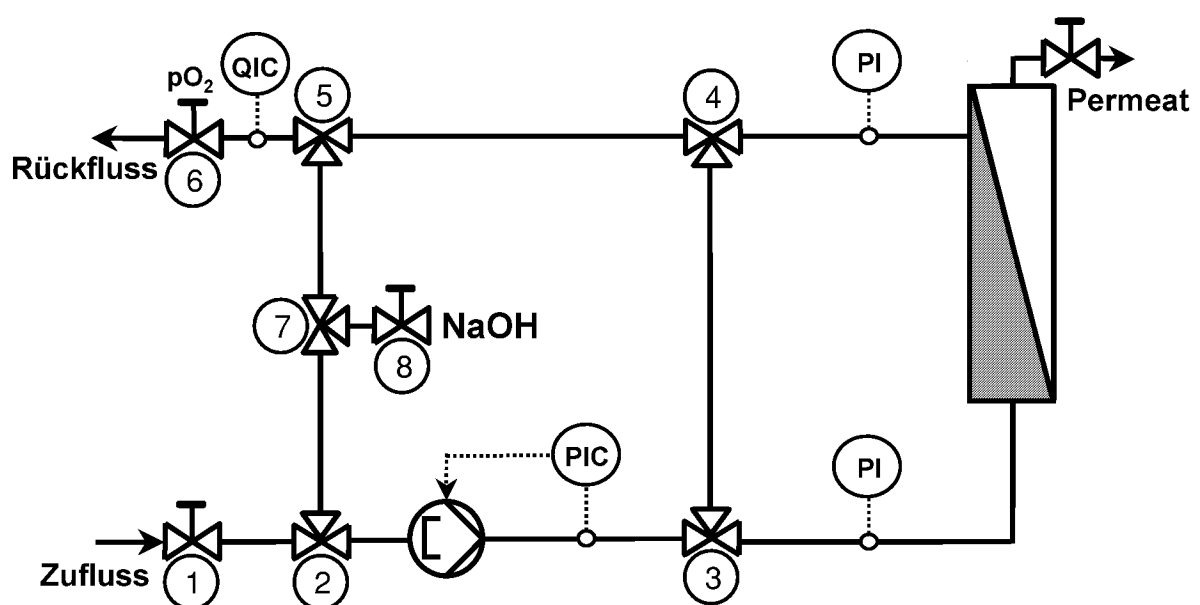


Abbildung 37: Fließbild des Filtrationsumlaufs zur Permeatabtrennung (Geräteliste in Abschnitt 12.2).

Die Sterilisation erfolgte in zwei Schritten: Zuerst wurde über ein Kugelventil (8) mit der Schlauchpumpe 2 M NaOH in den Umlauf gepumpt. Durch horizontale Einstellung der Ventile (3), (4), (7) und einer 90° Einstellung der Ventile (2) und (5) zirkulierte die Natronlauge für 2 h. Durch Umkehr der Ventile (3) und (4) in die 90° Stellung und der Ventile (2) und (5) in die horizontale Position, konnte das Hohlfasermodule vom Kreislauf abgekoppelt, und der Umlauf mit dem Reaktor verbunden werden (Ventile (1) und (6) waren nun geöffnet). Die Natronlauge wurde teilweise aus dem Umlauf in den Reaktor gepumpt und von dort über das Probenahmeventil abgelassen. Der Reaktor wurde mit Leitungswasser gefüllt, die Schlauchpumpe im Umlauf in SIP-Stellung gebracht und der Bioreaktor mit dem Umlauf autoklaviert (20 min, 121 °C). Nachdem das H₂O im Reaktor auf 50 °C abgekühlt war, wurden die Ventile (3) und (4) in die gerade Position gestellt und das natronhaltige Filtrationsmodul (Umstellung der Schlauchpumpe auf Pumpbetrieb) mit dem sterilen H₂O gespült. Der Reaktor wurde über das Ablassventil entleert und die weitere Fermentationsvorbereitung folgte der Beschreibung in Abschnitt 5.4.

Der beschriebene Umlauf, inklusive Filtrationsmodul, hatte ein Innenvolumen von ungefähr 5 l. Mit einem, während der Fermentation eingestellten Fördervolumen von 120 - 150 l/min konnte eine Verweilzeit der Zellen von ungefähr 2 s gewährleistet, und eine Sauerstofflimitierung vermieden werden. Zur Kontrolle wurde direkt vor dem Reaktoreingang eine pO₂-Elektrode in die Rohrleitung eingesetzt und die Gelöstsauerstoffkonzentration gemessen.

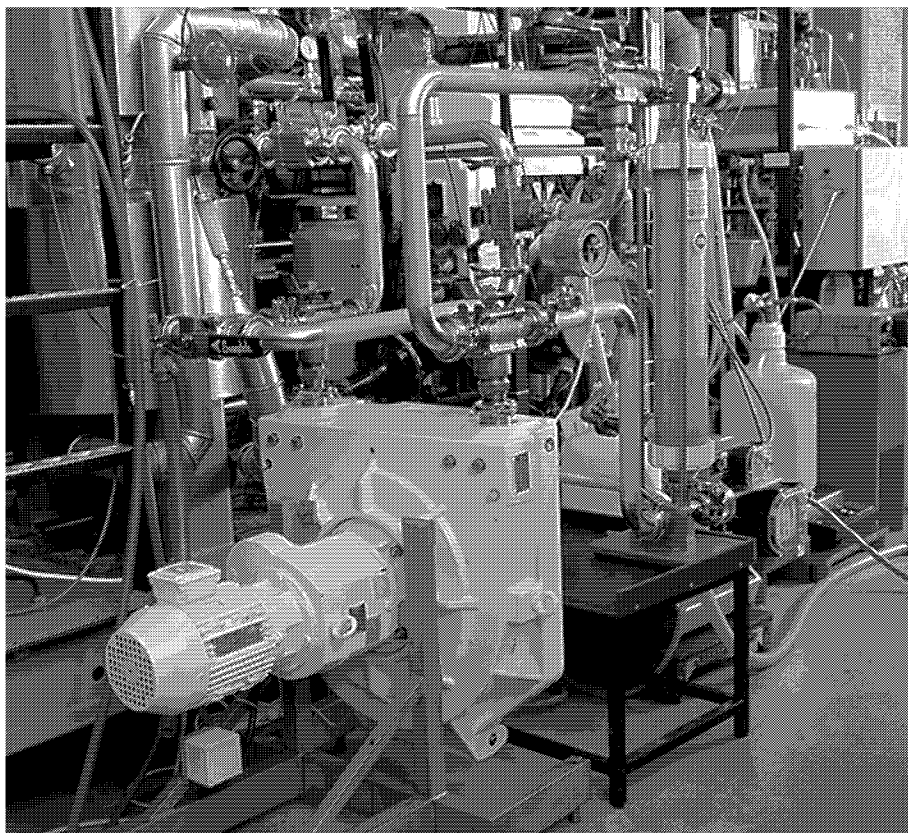


Abbildung 38: Bild des Umlaufs zur Permeatabtrennung.

Als weitere Sicherungsmaßnahme wurde zwischen Schlauchpumpe und Hohlfasermodule ein Manometer eingesetzt, das bei einem Überdruck im Umlauf von 3,0 bar die Stromversorgung der Schlauchpumpe unterbrach. So konnte ein Bersten des Umlaufs bei einer Verblockung der Filtrationsmoduls vermieden werden. Abbildung 38 zeigt ein Foto des Umlaufs mit Schlauchpumpe und Hohlfaserfiltrationsmodul.

5.5.2. INTEGRATION DER REAKTIV-EXTRAKTION

Abbildung 39 stellt schematisch dar, wie der Hybridprozess aufgebaut war. Die prinzipielle Funktionsweise der Reaktiv-Extraktion wurde bereits in Abschnitt 2.5.2 beschrieben. Der apparatetechnische Aufbau der Anlage ist den Arbeiten von Maaß zu entnehmen [218, 219].

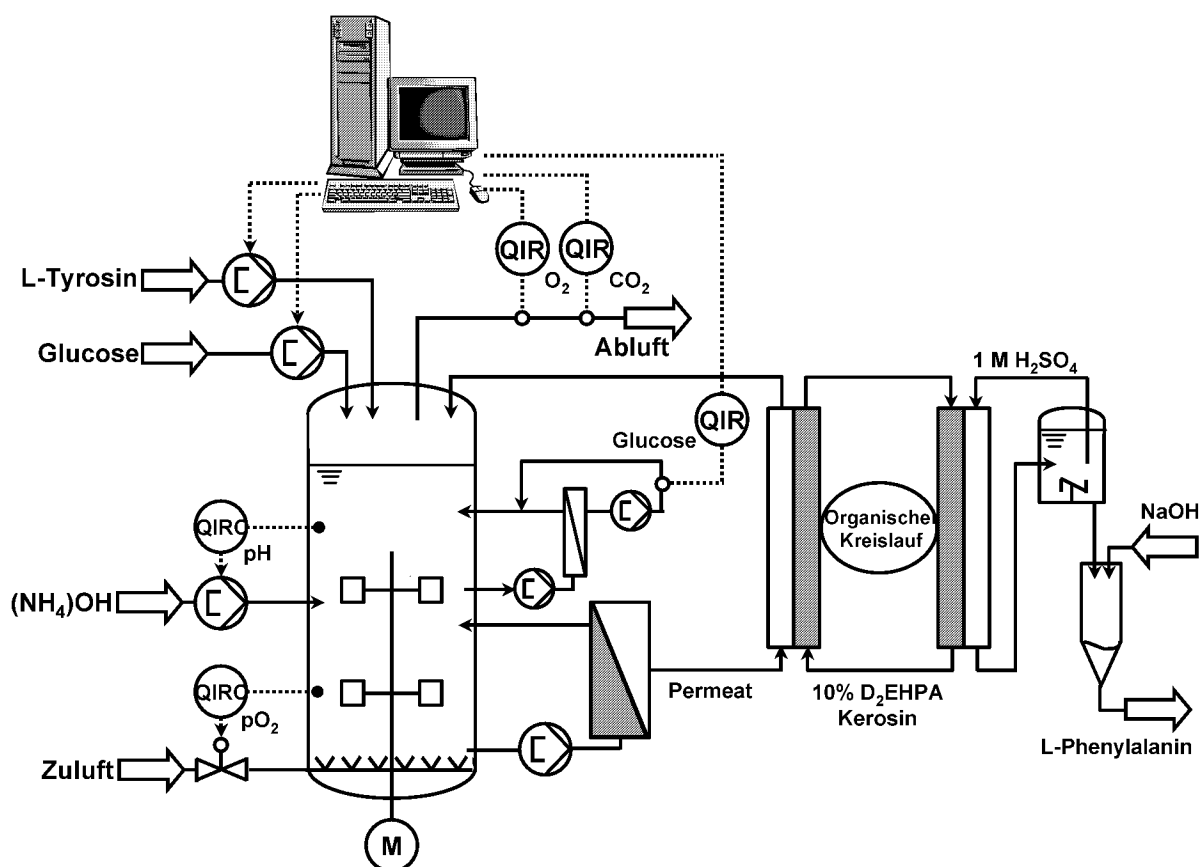


Abbildung 39: Fließbild des Hybridprozesses (Fermentation, Filtration und Reaktiv-Extraktion) (Geräteliste in Abschnitt 12.2).

Die Reaktiv-Extraktion musste mit zellfreiem Fermentationsüberstand versorgt werden. Über den Filtrationsumlauf abgetrenntes Permeat wurde drucklos in ein Gefäß auf einer Waage geleitet. Zur Bilanzierung des Permeatvolumenstroms wurde der Waagenwert, mittels einer Dosierstrecke, an einen Prozessrechner weitergeleitet (vgl. Abschnitt 5.4.1). Ein PID-Regler steuerte wiederum eine Schlauchpumpe an (analog) und hielt über die Regelung der Pumprate den Flüssigkeitsstand im Gefäß konstant.

Das Permeat wurde von der Schlauchpumpe mit einer Zulauftrate von 15 - 20 l/h in die Extraktionsanlage gefördert. Dort wurde ein Raffinatvolumen von ungefähr 5 l durch die Hohlfasern des ersten Moduls im Kreislauf gefahren. Das L-Phe-arme Permeat wurde aus der Raffinatvorlage mittels einer Füllstandssonde, die eine Schlauchpumpe ansteuerte, ohne eine weitere Sterilbarriere, wieder zurück in den Bioreaktor gefördert.

Die organische Phase, bestehend aus einer 10 %igen D₂EHPA-Kerosinmischung, zirkulierte im Mantelraum beider Module (Abbildung 39). Die Akzeptorphase (50 l einer 1 M H₂SO₄-Lösung) wurde durch die Hohlfasern des zweiten Moduls gefördert. Das dort angereicherte L-Phe wurde nach Beendigung der Fermentation, durch Titration auf den isoelektrischen Punkt, präzipitiert und anschließend filtriert und lyophilisiert [223, 224].

Abbildung 40 zeigt ein Foto der Fermentation im 300 l Maßstab mit Umlauf und Bilanzierungswaage (in der Mitte unten). Alle Schlauchverbindungen und Gefäße wurden vor dem Versuch autoklaviert.

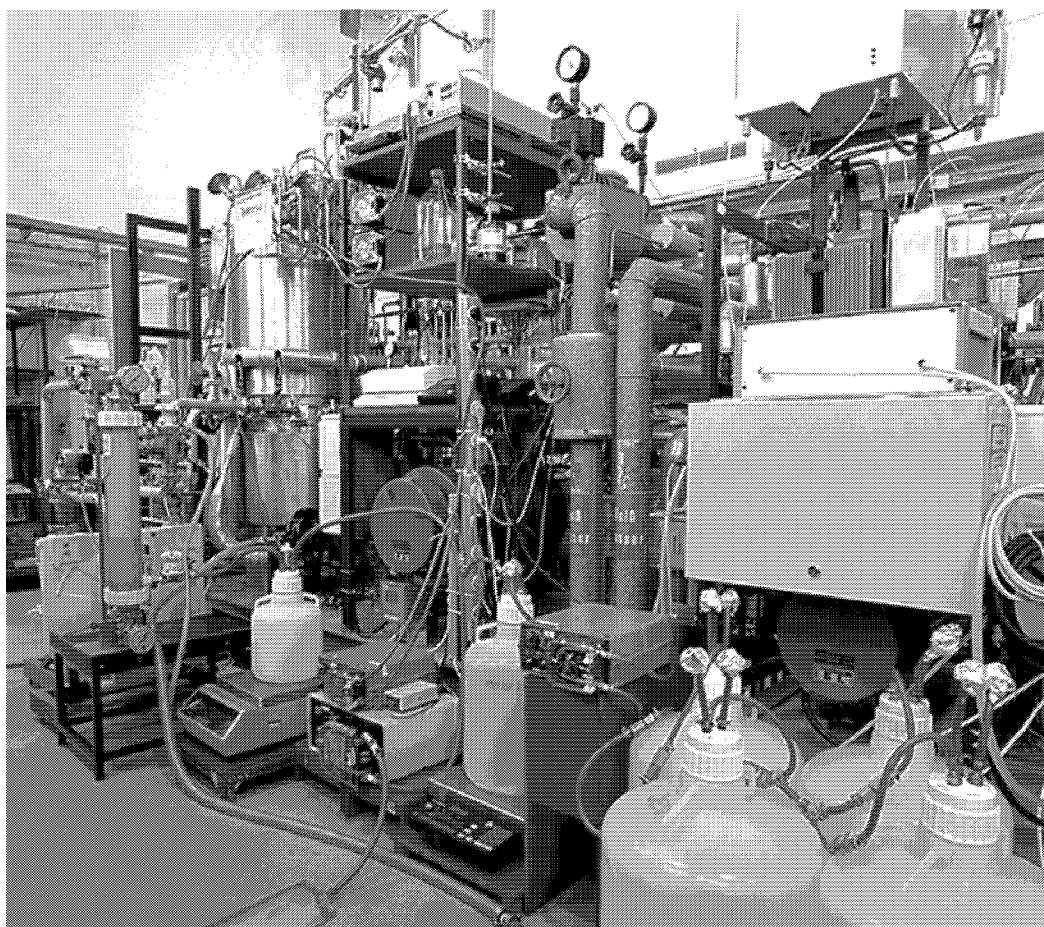


Abbildung 40: L-Phe-Fermentation im Pilotmaßstab mit angeschlossenem Umlauf.

Die Permeatabtrennung und Reaktiv-Extraktion wurde zum Ende der Wachstumsphase gestartet. Zu diesem Zeitpunkt sollten ungefähr 5 g/l L-Phe vorliegen und eine hohe Extraktionsleistung sichergestellt sein. Abbildung 41 zeigt eine detaillierte Darstellung des Hybridprozesses.

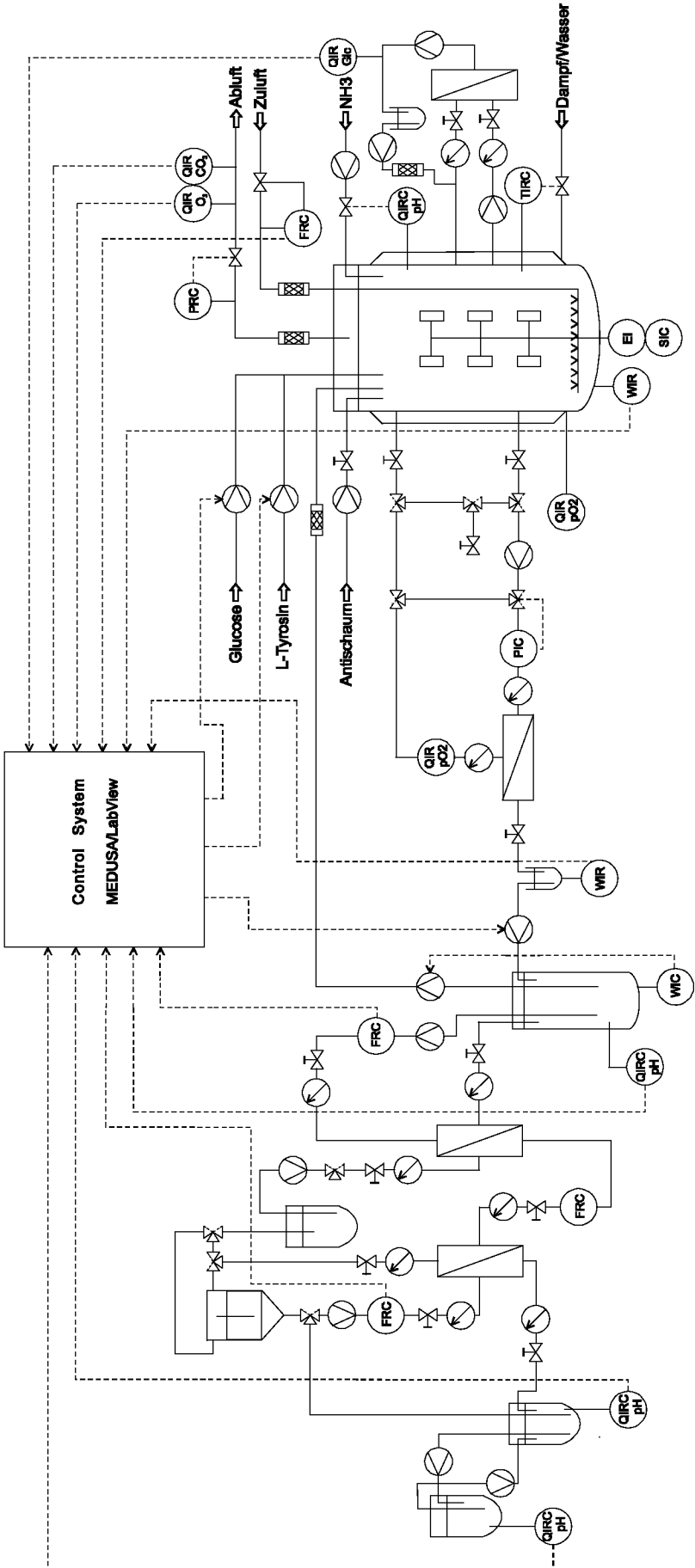


Abbildung 41: Fließbild der Pilotanlage zur L-Phe-Produktion mit integrierter Aufarbeitung.

6. ERGEBNISSE

6.1. VORUNTERSUCHUNGEN IM SCHÜTTELKOLBEN UND 20 L BIOREAKTOR

Die in diesem Kapitel zusammengefassten Ergebnisse stellen Untersuchungen zur Abschätzung einzelner Parameter dar, die sich bei der späteren Entwicklung des Produktionsprozesses entscheidend auswirken können. Die Untersuchungen wurden in verschiedenen Versuchsanordnungen durchgeführt, auf die jeweils kurz verwiesen wird.

6.1.1. AUSWAHL EINES GEEIGNETEN MEDIUMS

Als Nährmedium für *E. coli* standen drei synthetische Medien zur Auswahl (Zusammensetzung in Abschnitt 4.1.4 und Anhang 12.5). Auf komplexe Medienbestandteile sollte, aufgrund später zu erwartender technischer Schwierigkeiten in der Aufarbeitung, verzichtet werden. Das Tanaka-Medium ist ein Standardmedium, das im IBT 1 verwendet wird, bei dem Pan-Medium handelt es sich um ein Standardmedium aus dem IBT 2. Beide Medien werden vornehmlich für Schüttelkolbenexperimente verwendet. Das DSM-Medium wurde schon in der Vergangenheit zur L-Phe-Synthese mit *E. coli* eingesetzt [210]. Für dieses Medium liegen separate Vorschriften für den Vorkultur- und Hauptkulturansatz vor.

In einem Versuch sollten die drei Medien (DSM-Vorkulturmedium) hinsichtlich Wachstumsgeschwindigkeit und erreichbarer optischer Dichte von *E. coli* untersucht werden. Hierzu wurde der *E. coli* Wildtyp LJ110 in satzweisen Schüttelkolbenversuchen fermentiert. Die Ansätze wurden nach Vorschrift vorbereitet und bei 145 rpm und 37 °C fermentiert. Die Verläufe der OD_{620nm} sind in Abbildung 42 dargestellt.

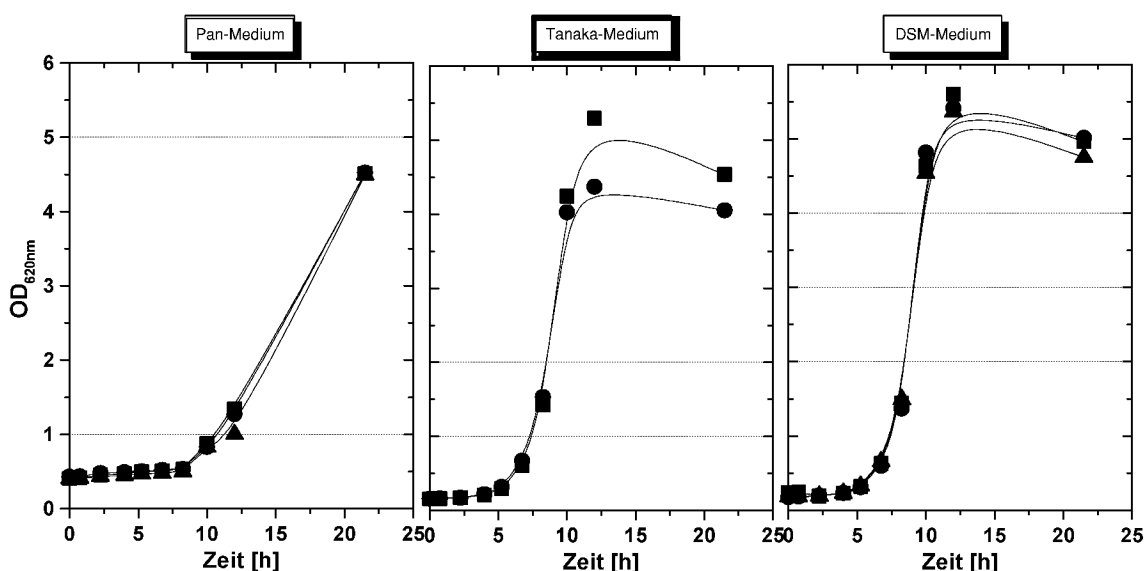


Abbildung 42: Untersuchung synthetischer Medien hinsichtlich Verlauf der optischen Dichte (ein Versuchskolben des Tanaka-Mediums musste vorzeitig abgebrochen werden).

Beim Vergleich der OD_{620nm} bei $t = 10$ h fällt auf, dass sich bei Verwendung des Pan-Mediums eine geringere Wachstumsrate einstellte, als bei den anderen Medien. Auch bei deren Vergleich zeigt sich, dass mit dem DSM-Medium eine OD_{620nm} von ungefähr 5,0, bei Einsatz des Tanaka-Mediums nur von 4,0 erreicht wurde. Hierbei sollte darauf hingewiesen werden, dass das Tanaka-Medium keinerlei Spurenelemente enthält. Dies kann sich in Bezug auf einen späteren Einsatz als Fermentationsmedium entscheidend auswirken.

6.1.2. IPTG-INDUKTION

Diese Versuchsreihe sollte der Abschätzung des Einflusses verschiedener IPTG-Konzentrationen auf Wachstum und Produktbildung dienen. Unter Verwendung von *E. coli* 4pF20 wurden satzweise Schüttelkolbenansätze durchgeführt (DSM-Vorkulturmedium), die bei Erreichen einer OD_{620nm} von 1,0 mit verschiedenen Konzentrationen an IPTG induziert wurden (vgl. Abbildung 43). Alle Ansätze wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Abbildung 43 zeigt die jeweils gemittelten Werte der optischen Dichte.

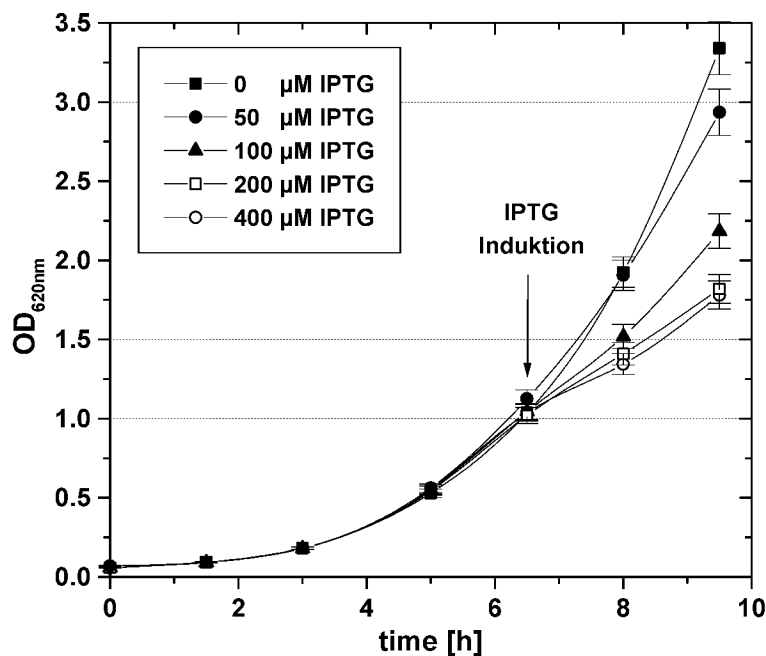


Abbildung 43: Untersuchung des Einflusses der IPTG-Konzentration. Darstellung der optischen Dichte (Fehlerbalken aus Dreifachbestimmung berechnet).

Es fällt auf, dass schon bei der geringsten, untersuchten IPTG-Konzentration von 50 μM , die OD_{620nm} ab dem Zeitpunkt der Induktion, einen flacheren Verlauf nahm. Dieser sank mit steigender Konzentration weiter ab und hatte bei 200 μM IPTG mit 1,8 (gegenüber 3,3 ohne Induktion) ein Minimum erreicht, das sich auch bei Zugabe von 400 μM nicht mehr änderte. Die in den Ansätzen erreichten Endkonzentrationen an L-Phe ($t = 9,5$ h) und die integralen, biomassebezogenen Produktselektivitäten, sind in Abbildung 44 zusammengefasst. Es ist ein

deutlicher Abfall des L-Phe-Titers mit steigender Induktorkonzentration zu erkennen, der ab einer IPTG-Konzentration von 200 μM konstant bleibt. Dabei fällt die Ähnlichkeit mit der $\text{OD}_{620\text{nm}}$ -Endkonzentration auf. Bezieht man die Produktausbeute auf die Biomasse (integrale Selektivität, Abbildung 44), so zeigt sich ein deutlich geringerer, jedoch weiterhin vorhandener, Abfall der biomassebezogenen Produktselektivität, mit steigender IPTG-Konzentration.

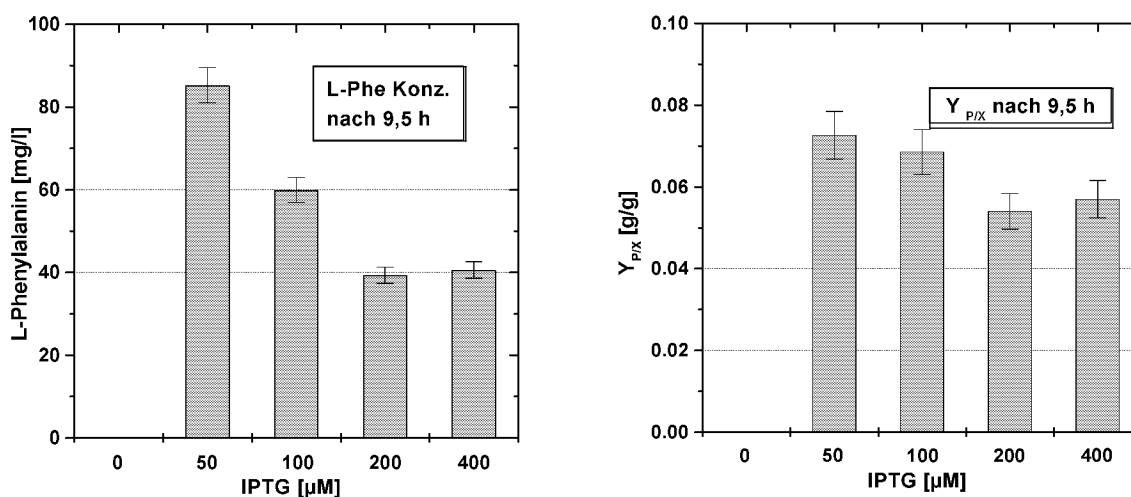


Abbildung 44: Links: Vergleich der L-Phe-Titer nach 9,5 h bei Induktion mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen. Rechts: Unter Einbezug der auf Basis der $\text{OD}_{620\text{nm}}$ berechneten Biotrockenmassekonzentration, Ermittlung der integralen, biomassebezogenen Produktselektivitäten nach 9,5 h.

6.1.3. TEMPERATUR UND pH-WERT

Unter Verwendung von *E. coli* 4pF20 sollte der Einfluss von pH-Wert und Temperatur auf den Fermentationsverlauf untersucht, und beide Parameter in einem zweidimensionalen Versuchsfeld optimiert werden. Die Parametergrenzen wurden mit 31 - 39 $^{\circ}\text{C}$ und pH 6,1 - 7,1 festgelegt. Die Variation der Parameter sollte in Abständen von 2 $^{\circ}\text{C}$ bzw. pH-Werten von 0,2 erfolgen.

Die Untersuchungen wurden in Schüttelkolben durchgeführt, die im Fed-Batch-Verfahren betrieben wurden und über eine pH-Regelung verfügten (vgl. Abschnitt 5.1). Alle Versuchsansätze erfolgten als Doppelbestimmung. Bei den dargestellten Ergebnissen handelt es sich um gemittelte Werte. Neben der $\text{OD}_{620\text{nm}}$ wurden organische Säuren, Aminosäuren und Glucose quantifiziert. In diesem Abschnitt sollen jedoch nur die signifikanten Ergebnisse in Form von Endkonzentrationen ($t = 30$ h) einiger ausgewählter Parameter gezeigt werden. Eine Berechnung von Raten ist nicht möglich, da weder Glucose- und Ammoniakzufuhr, noch das Endvolumen der Schüttelkolbenansätze bestimmt wurde. Es sind deshalb nur qualitative Aussagen möglich.

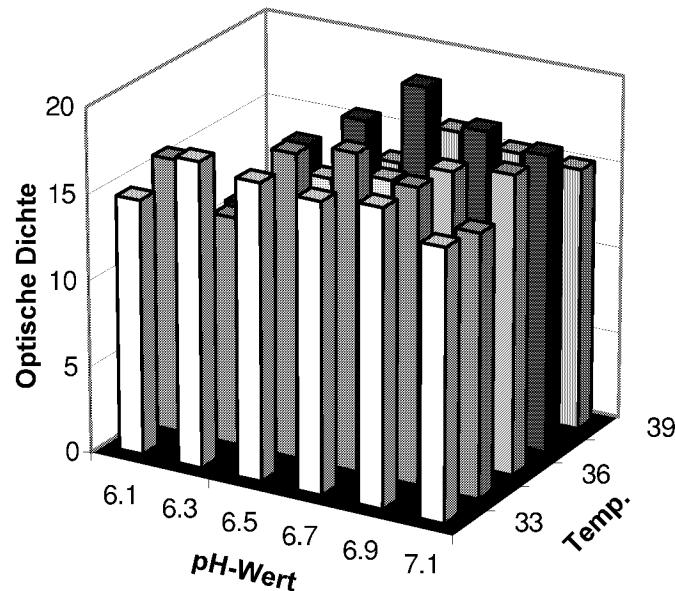


Abbildung 45: Einfluss von pH-Wert und Temperatur auf die erreichbare optische Dichte. Dargestellt sind die Endkonzentrationen nach $t \approx 30$ h.

Abbildung 45 zeigt die nach 30 h gemessene optische Dichte. Trotz Zugabe der gleichen Menge an L-Tyrosin, hatten sich bei den Versuchsansätzen unterschiedliche Biomassekonzentrationen eingestellt. Dabei fällt auf, dass die höchsten Konzentrationen bei 37 °C in einem pH-Bereich von 6,5 bis 6,9 erreicht wurden. Während bei hohen pH-Werten und niedriger Temperatur immer noch ungefähr 80 % der maximalen OD_{620nm} gemessen wurde, war ein starker Abfall der Biomassekonzentration bei geringen pH (6,1), gekoppelt mit hohen Temperaturen (39 °C), zu beobachten (50 % der maximalen OD_{620nm}).

Abbildung 46 zeigt den Einfluss von Temperatur und pH-Wert auf die Nebenproduktbildung am Beispiel von Acetat. Da die Versuche in Schüttelkolben stattfanden, in denen eine OD_{620nm} von > 2 zur Sauerstofflimitierung führte, war eine hohe Acetatproduktion zu erwarten. Deutlich fällt jedoch auf, dass die Nebenproduktbildung sowohl mit einer Erhöhung des pH-Wertes, als auch mit steigenden Temperaturen, zunahm.

Der Einfluss von pH-Wert und Temperatur auf die L-Phe-Konzentration nach 30 h, ist in Abbildung 47 dargestellt. Es zeigte sich, dass bei einer Temperatur von 33 °C der pH-Wert kaum einen Einfluss auf die Produktbildung hat. Mit steigender Temperatur führen niedrige pH-Werte von 6,1 bzw. 6,3 jedoch zu einem Einbruch der L-Phe-Bildung. In Abbildung 47 fällt zudem auf, dass bei pH 6,9 und 35 °C – 36 °C (4,1 g/l bzw. 3,8 g/l L-Phe) ein lokales Optimum in Bezug auf die L-Phe-Bildung vorhanden ist (relativer Fehler der Doppelbestimmungen < 20 %). Dieses Optimum wird durch die überdurchschnittlich hohen Konzentrationen bei pH 7,1 (35 – 36 °C) indirekt bestätigt. Die L-Phe-Konzentration bei 37 °C und pH 6,5 (Standardfermentationsbedingungen vgl. Abschnitt 5.4), lag mit 2,4 g/l wesentlich unterhalb des Optimums.

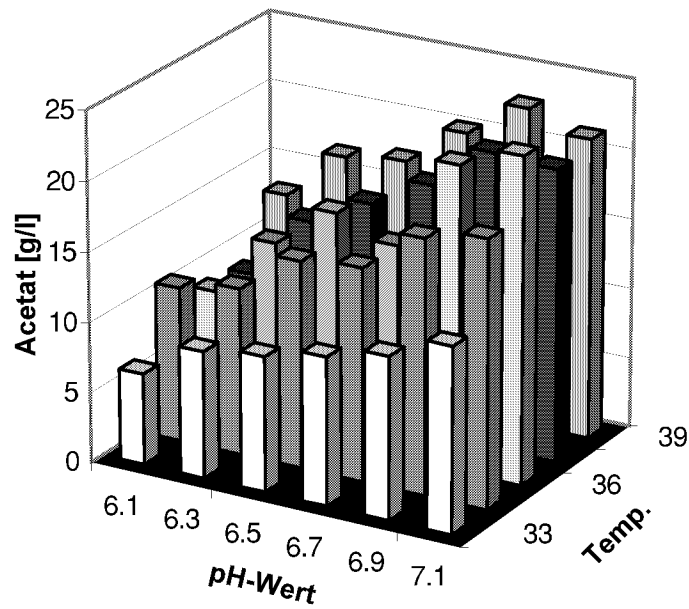


Abbildung 46: Einfluss von pH-Wert und Temperatur auf die Acetatbildung. Dargestellt sind die Endkonzentrationen nach $t \approx 30$ h.

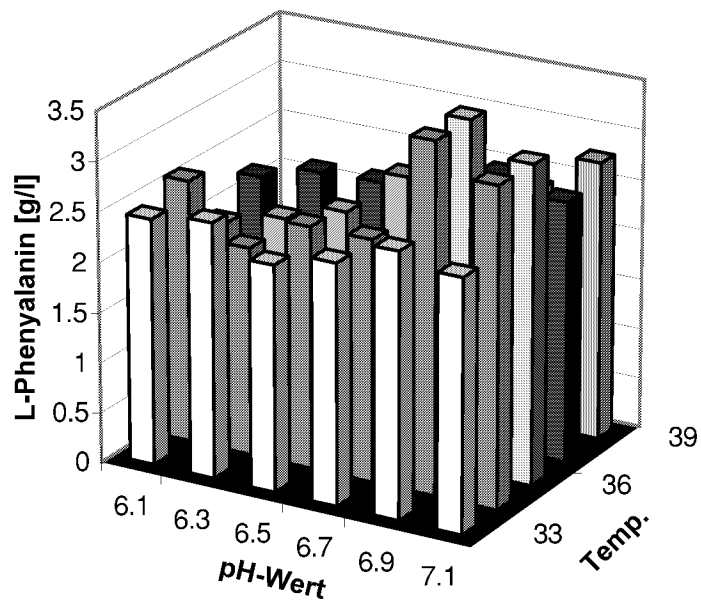


Abbildung 47: Einfluss von pH-Wert und Temperatur auf die L-Phe-Bildung. Dargestellt sind die Endkonzentrationen nach $t \approx 30$ h.

6.1.4. L-PHENYLALANINEINFLUSS AUF DIE WACHSTUMSGESCHWINDIGKEIT

In satzweisen Schüttelkolbenansätzen und Fed-Batch-Fermentationen (20 l) wurde der Einfluss der L-Phe-Konzentration auf das Wachstum des *E. coli* Wildtyps (LJ110) untersucht.

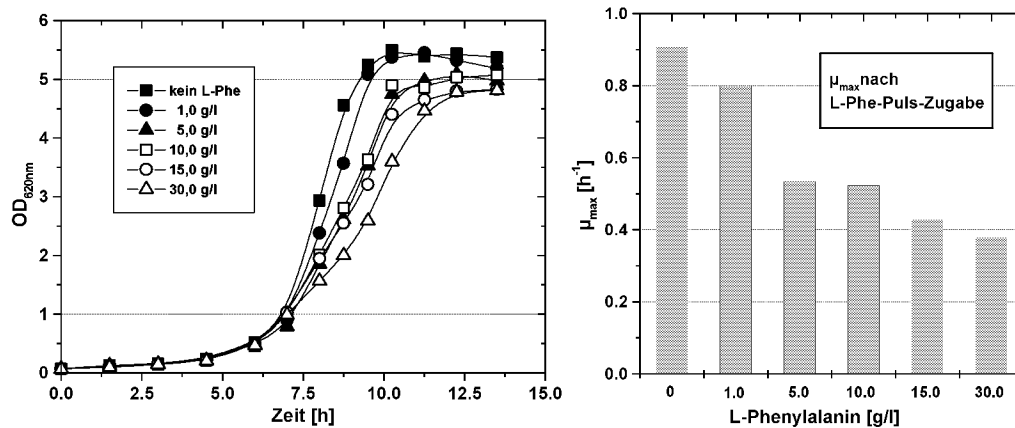


Abbildung 48: Einfluss der L-Phe-Konzentration auf das *E. coli* Wachstum. Zugabe von L-Phe bei einer OD_{620nm} von 1,0. Links: Verlauf der OD_{620nm} . Rechts: μ_{max} nach L-Phe-Zugabe.

Abbildung 48 zeigt den Verlauf der optischen Dichte in Schüttelkolbenversuchen bei Zugabe von L-Phe, als Puls bei einer OD_{620nm} von 1,0. In der rechten Abbildung ist die maximal erreichte Wachstumsgeschwindigkeit nach L-Phe-Zugabe, in Abhängigkeit von der eingestellten Konzentration, dargestellt. Es fällt auf, dass mit steigender Aminosäurekonzentration die Wachstumsrate abnimmt. Es handelt sich jedoch um keinen linearen Zusammenhang. Während μ_{max} bei Zugabe von 1,0 g/l L-Phe noch bei 0,8 h⁻¹ lag (gegenüber 0,9 h⁻¹ ohne L-Phe-Zugabe), betrug μ_{max} bei Einstellung von 10 g/l L-Phe immer noch 0,5 h⁻¹.

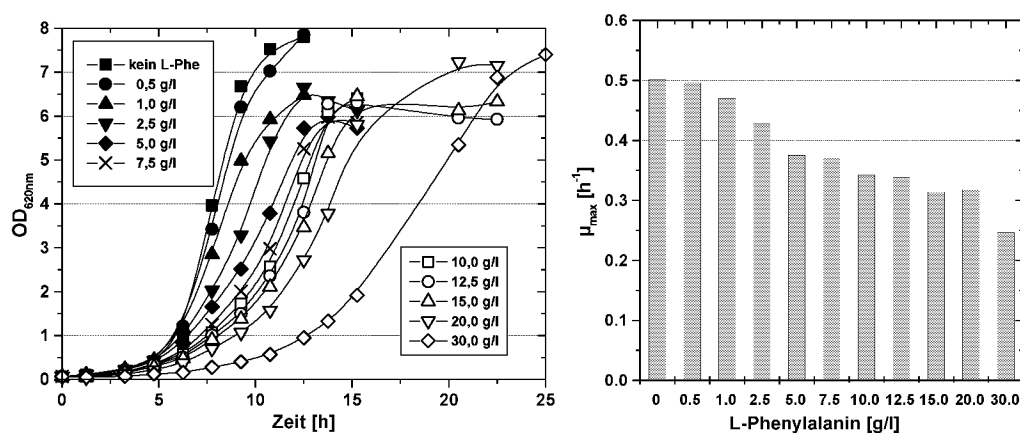


Abbildung 49: Einfluss der L-Phe-Konzentration auf das *E. coli* Wachstum. Einstellung verschiedener L-Phe-Konzentrationen vor dem Start der Versuchsreihe. Links: Verlauf der OD_{620nm} . Rechts: μ_{max} nach L-Phe-Zugabe.

Abbildung 49 zeigt den Verlauf der OD_{620nm} und μ_{max} bei Einstellung der L-Phe-Konzentration vor Fermentationsstart. Es zeigt sich, dass auch hier eine Erhöhung der L-Phe-Konzentration zu einer Herabsetzung der Wachstumsrate führte. Insgesamt liegen die erreichten Wachstumsraten unterhalb derer, der Pulsexperimente (Abbildung 48). Es ist erkennbar, dass bei Zugabe von 10 g/l L-Phe, μ_{max} ($0,3 \text{ h}^{-1}$) auf 60 %, gegenüber dem Kontrollansatz ohne L-Phe ($0,5 \text{ h}^{-1}$), herabgesetzt wurde. In den Pulsexperimenten lag das Verhältnis bei 55 %. Die Wachstumsphase wurde dadurch von 9 h auf 13 h verlängert. Zudem ist auffällig, dass in den Ansätzen ohne L-Phe und mit 0,5 g/l L-Phe, eine signifikant höhere Zelldichte gegenüber der restlichen Versuchsreihe erreicht wurde.

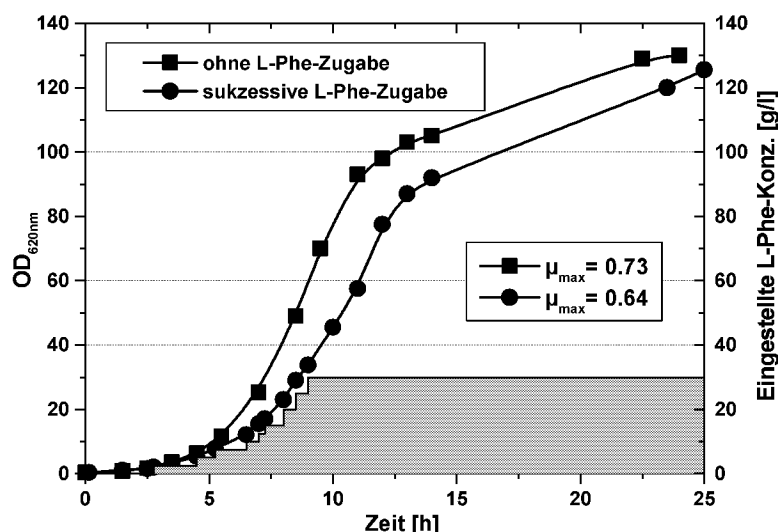


Abbildung 50: Fed-Batch Fermentation von *E. coli* LJ110 im 20 l Reaktor (DSM-Medium). Untersuchung des Einflusses der Produktakkumulation auf das Wachstum.

Der Einfluss der L-Phe-Konzentration unter Prozessbedingungen, wurde im 20 l Bioreaktor untersucht und ist in Abbildung 50 dargestellt. Durch sukzessive Erhöhung der Produktkonzentration auf 30 g/l, Messung der optischen Dichte und Vergleich der Zelldichte mit einem Kontrollansatz ohne L-Phe-Zugabe, konnte der Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit untersucht werden. Zwar ist auch hier bei L-Phe-Zugabe ein Abfall der Wachstumsrate erkennbar, jedoch wurde in dem Versuch immer noch ein μ_{max} von $0,64 \text{ h}^{-1}$ gegenüber $0,73 \text{ h}^{-1}$ im Kontrollansatz erreicht. Zudem zeigte die Messung der endgültigen Zelldichte (es erfolgte keine vorzeitige Limitierung des Wachstums durch L-Tyrosin), dass eine maximale OD_{620nm} von ungefähr 130 mit diesem Medium möglich war.

6.2. VERFAHRESENTWICKLUNG ZUR L-PHENYLALANINPRODUKTION

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse zusammengefasst, die zur Entwicklung der Fermentationsstrategie führten und der Charakterisierung des entwickelten Prozesses dienen. Im Verlauf dieser Arbeiten wurden verschiedene, gentechnisch veränderte Stämme,

verwendet. Die Ergebnisse in diesem Abschnitt werden, zum Teil unter Vernachlässigung des genetischen Hintergrunds, miteinander unter prozesstechnischen Aspekten verglichen. Eine Beschreibung der Ergebnisse hinsichtlich der Stammentwicklung, findet später statt.

6.2.1. AUSGANGSSITUATION

Der Aufbau des Bioreaktors zu Beginn der Prozessentwicklung, ist Abbildung 29 zu entnehmen. Die Fermentationsdurchführung wurde in Abschnitt 5.4 beschrieben.

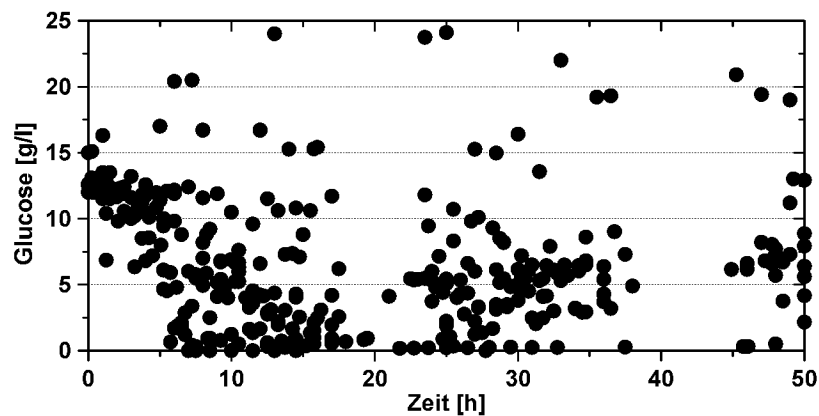


Abbildung 51: Ergebnisse der off-line Glucosebestimmungen in zehn Fermentationen (*E. coli* 4pF20).

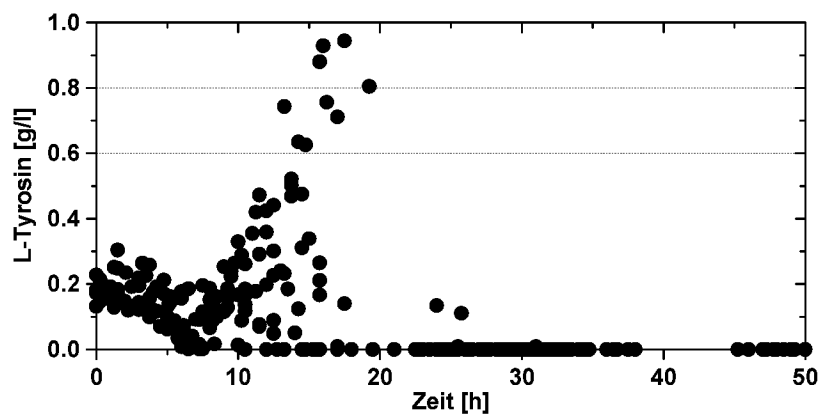


Abbildung 52: Ergebnisse der off-line L-Tyrosinbestimmungen in zehn Fermentationen (*E. coli* 4pF20).

Diese „Basis“-Prozessführung zeichnete sich durch eine Kopplung der beiden, in der Zulaufphase, zugeführten Substrate Glucose und L-Tyrosin aus. Hierbei ist zu bemerken, dass die Aminosäure größtenteils ungelöst als Suspension vorlag (Löslichkeit von L-Tyrosin bei pH 7 und 25 °C in H₂O $\approx$ 0,45 g/l). Des Weiteren erfolgte die Zugabe der Substrate manuell

und ohne Steuerungsprofil. Ein Anstieg oder Abfall der Glucosekonzentration diene als Grundlage zur Einstellung neuer Zulaufraten.

Abbildung 51 fasst die gemessenen Glucosekonzentrationen aus zehn Fermentationen zusammen, die eine Untersuchung des Fermentationsprozesses auf Reproduzierbarkeit zum Ziel hatten. Deutlich fällt auf, dass die Glucosekonzentration großen Schwankungen zwischen 0 und 25 g/l unterlag.

Auch der L-Tyrosin-Verlauf innerhalb der Wachstumsphase unterlag deutlichen Schwankungen (Abbildung 52). Da die Aminosäurezufuhr an die Glucosezugabe gekoppelt war und nicht eingestellt werden konnte, waren Unterschiede bei dieser Prozessführung unvermeidlich.

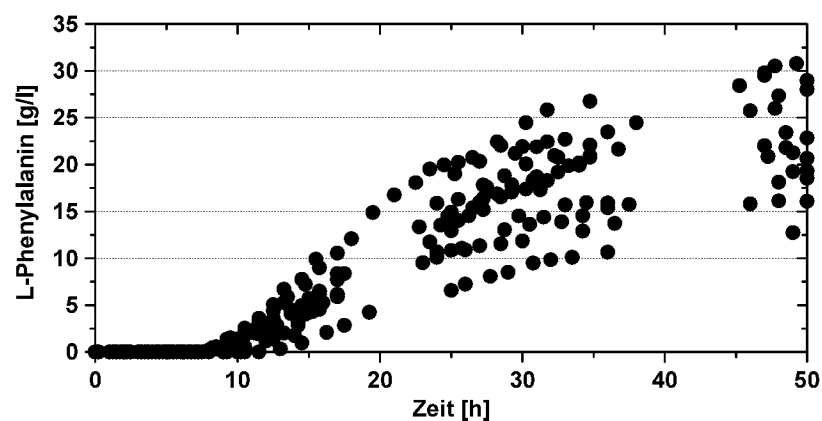


Abbildung 53: Ergebnisse der off-line L-Phe-Bestimmungen in zehn Fermentationen (*E. coli* 4pF20).

Die in den zehn durchgeführten Versuchen erreichten L-Phe-Konzentrationen sind in Abbildung 53 zusammengefasst. Zwar konnte eine maximale L-Phe-Konzentration von 30,9 g/l nach 50 h Fermentationsdauer erreicht werden, jedoch ist zu erkennen, dass dieses Ergebnis nicht reproduzierbar war. Die geringste erreichte Konzentration lag mit 12,8 g/l bei nur 40 % des maximalen Titors.

6.2.2. REGELUNG DER GLUCOSEZUFUHR

In einem ersten Schritt zur Verbesserung des Fermentationsprozesses, sollte die Glucosekonzentration in der Produktionsphase, durch Anpassung der Zulauftrate in einem geschlossenen Regelkreis, konstant gehalten werden (vgl. Abschnitt 5.4.2, 5.4.1). Als Sollwert wurde eine empirisch gewählte Glucosekonzentration von 5,0 g/l festgelegt.

Der eingesetzte Kalman-Filter wurde 90 min, der Minimal-Varianz-Regler 60 min vor dem Start der Glucosezufuhr aktiviert. Über den zu Fermentationsbeginn gestarteten Umlauf zur Probenahme (vgl. Abschnitt 5.4.2), konnten bis Versuchsende konstant 1-2 ml/min Permeat für die on-line Messung bereitgestellt werden.

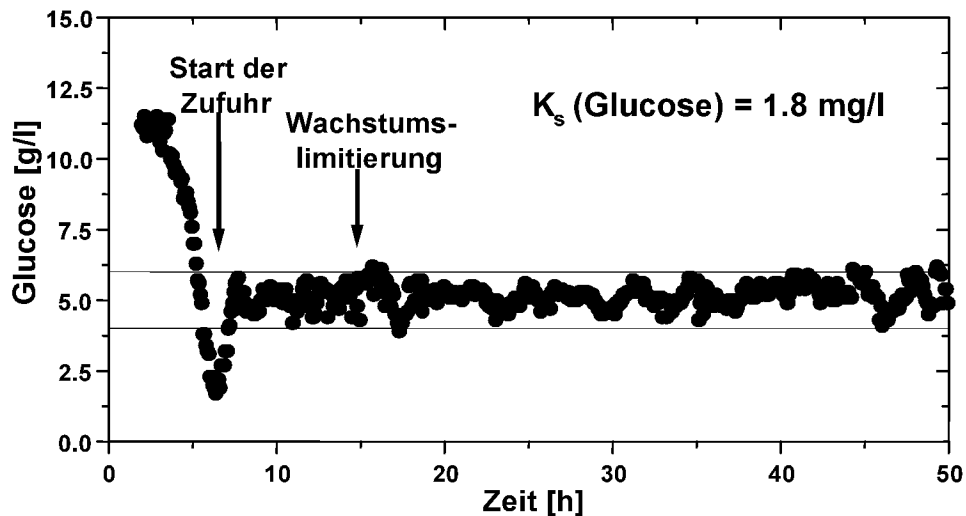


Abbildung 54: Regelung der Glucosezufuhr bei 5,0 g/l (*E. coli* 4pF26).

In Intervallen von ungefähr 180 s wurde die Glucosekonzentration durch die OLGA enzymatisch bestimmt (Totzeit $\approx$ 90 s) und über die Prozesssoftware sowie das Dosiersystem eine dem Glucoseverbrauch und der Stellgrößenabweichung entsprechende Zulauftrate eingestellt. Abbildung 54 zeigt anhand einer Fermentation beispielhaft den on-line gemessenen Glucoseverlauf. Der Sollwert von 5,0 g/l konnte, mit einer Abweichung von $\pm 1,0$ g/l, eingestellt werden. Dabei sollte beachtet werden, dass der experimentell bestimmte K_s -Wert für Glucose von *E. coli* um Größenordnungen kleiner ist und bei 1,8 mg/l (10 μ M) liegt [226].

Zur Untersuchung des Einflusses der Glucosekonzentration auf die Substratverbrauchs- und Produktbildungsrate sowie die Nebenproduktbildung, wurden Fermentationen bei Sollwertvorgaben von 0,1 g/l bzw. 30 g/l durchgeführt (on-line Daten hier nicht dargestellt). Die gemessenen Abweichungen lagen in diesen Versuchen bei $0,1 \pm 0,05$ g/l und 30 ± 4 g/l.

6.2.3. EINFLUSS DER GLUCOSEKONZENTRATION AUF DEN PROZESS

E. coli hat einen K_s -Wert für Glucose von 1,8 mg/l. Die Regelung der Glucosekonzentration bei 5,0 g/l (2.000facher Substratüberschuss) führt danach, laut Literatur [226], zum sogenannten „Glucose-Überfluss-Stoffwechsel“ und zur Bildung von Acetat (vgl. Abschnitt 2.1.1).

Es sollte untersucht werden, wie sich die Einstellung einer Glucosekonzentration von 5,0 g/l, im Vergleich zu einer Regelung näher am K_s -Wert (Einstellung von 0,1 g/l) (45facher Überschuss, und Einstellung einer noch höheren Glucosekonzentration von 30 g/l, auf die Fermentation auswirkt. Die Untersuchungen wurden von Bujnicki durchgeführt [220].

Abbildung 55 stellt den gemessenen Verlauf der Glucosekonzentration in den drei durchgeführten Fermentationen, unter Verwendung von *E. coli* 4pF69 (Abschnitt 4.2.1) und Einsatz der Standardfermentationsstrategie (Abschnitt 5.4), dar.

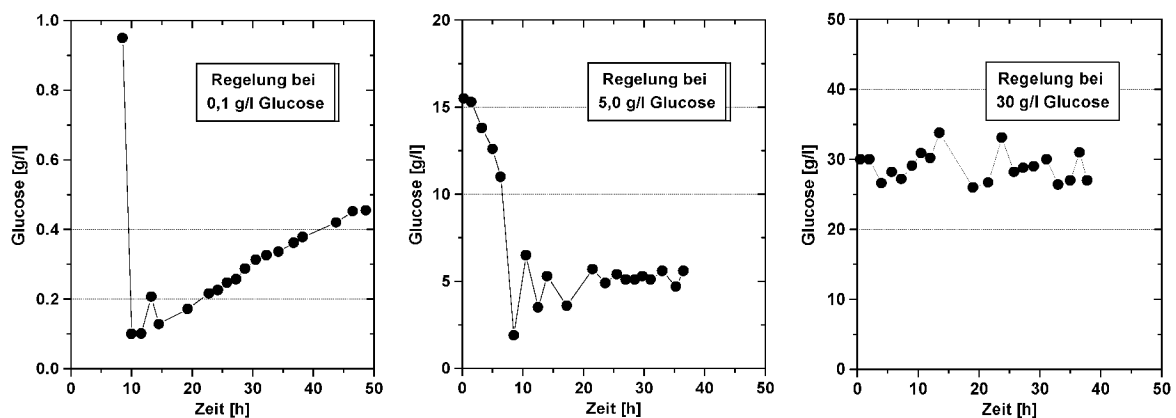


Abbildung 55: Regelung der Glucosezufuhr bei 0,1, 5,0 und 30 g/l. Angabe der off-line gemessenen Glucosekonzentrationen (*E. coli* 4pF69).

Die Ansätze bei 5,0 und 30 g/l Glucose ließen sich, im Rahmen der zu erwartenden Sollwertabweichungen, konstant einstellen. In dem bei 0,1 g/l Glucose geregelten Versuch fällt auf, dass der Istwert über den Prozessverlauf stetig zunahm. Bei den dargestellten Messwerten handelt es sich jedoch um die off-line gemessene Glucosekonzentration. Die on-line gemessenen Werte lagen im Bereich von $0,1 \pm 0,05$ g/l. Die Regelung der Glucosezufuhr verlief demnach problemlos. Eine fehlerhafte Messung der Substratkonzentration führte, trotz Rekalibrierung der OLGA nach jeweils 30 Messzyklen, jedoch zur Einstellung des hohen Istwertes.

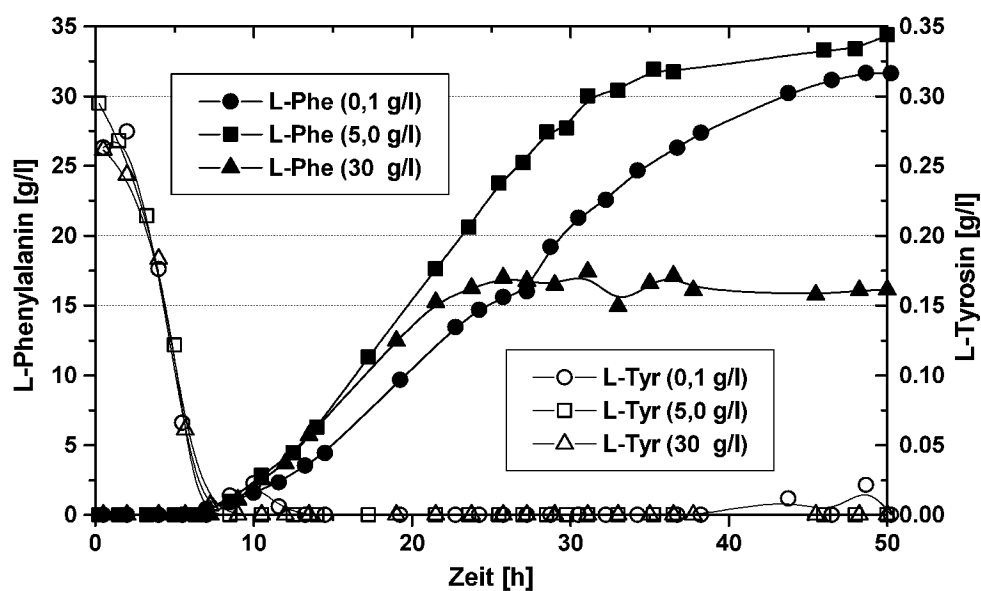


Abbildung 56: Vergleich der L-Phe- und L-Tyrosinkonzentration bei Einstellung einer Glucosekonzentration von 0,1, 5,0 und 30 g/l (*E. coli* 4pF69).

In Abbildung 56 sind die in den drei Versuchen gemessenen Konzentrationen an L-Phe und L-Tyrosin zusammengefasst. Neben den nahezu identischen Verläufen der L-Tyrosinkonzentration fällt auf, dass mit 34,8 g/l die höchste L-Phe-Konzentration bei Einstellung von 5,0 g/l Glucose erreicht wurde. Zwar konnten bei Einstellung von 0,1 g/l Glucose auch 32,0 g/l L-Phe gebildet werden, jedoch verlief die Produktbildung langsamer. Die Einstellung von 30 g/l Glucose führte nach 25 h Fermentation zu einem Einbruch der Produktbildung bei 16,8 g/l L-Phe. Die folgende Abnahme der gemessenen Konzentration ist auf die Verdünnung des gebildeten Produktes, bedingt durch den Fed-Batch-Betrieb, zurückzuführen.

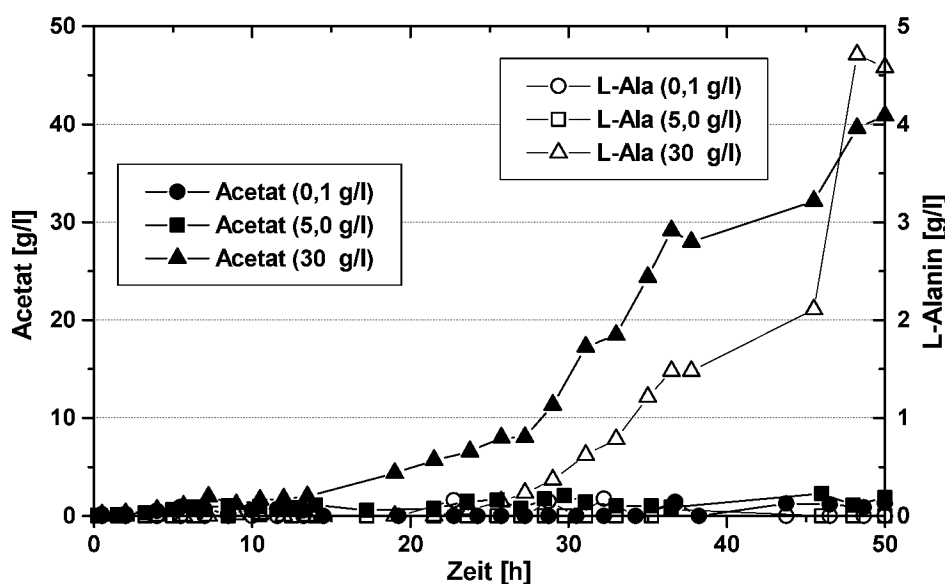


Abbildung 57: Vergleich der Acetat- und L-Alaninkonzentration bei Einstellung einer Glucosekonzentration von 0,1, 5,0 und 30 g/l (*E. coli* 4pF69).

Die Bildung der Nebenprodukte Acetat und L-Alanin ist in Abbildung 57 dargestellt. Bei Einstellung von 0,1 g/l Glucose fällt auf, dass nur innerhalb der Batchphase und am Ende der Fermentation Acetat nachgewiesen werden konnte. Auch die Konzentration an L-Alanin lag mit 0,1 g/l im Bereich der Nachweisgrenze. Bei der Fermentation mit 5,0 g/l Glucose war über die gesamte Fermentation Acetat messbar, jedoch lag auch hier die Konzentration bei nur 1-2 g/l. Die L-Alaninkonzentration lag wieder im Bereich der Nachweisgrenze. Bei Einstellung von 30 g/l Glucose fällt auf, dass schon nach 20 h über 5 g/l Acetat gebildet wurde und ab diesem Zeitpunkt die Bildung von L-Alanin zunahm. Bis zum Fermentationsende bei $t = 50$ h akkumulierten 41 g/l Acetat und 4,6 g/l L-Alanin.

Der Unterschied in den drei Ansätzen wird auch in der biomassespezifischen und volumetrischen Glucoseverbrauchsrate deutlich (Abbildung 58). Trotz höchster Verfügbarkeit war der spezifische Substratverbrauch bei Einstellung von 30 g/l Glucose am geringsten. Bei

Einstellung von 0,1 und 5,0 g/l Glucose konnte, abgesehen von der Wachstumsphase, kein signifikanter Unterschied beobachtet werden.

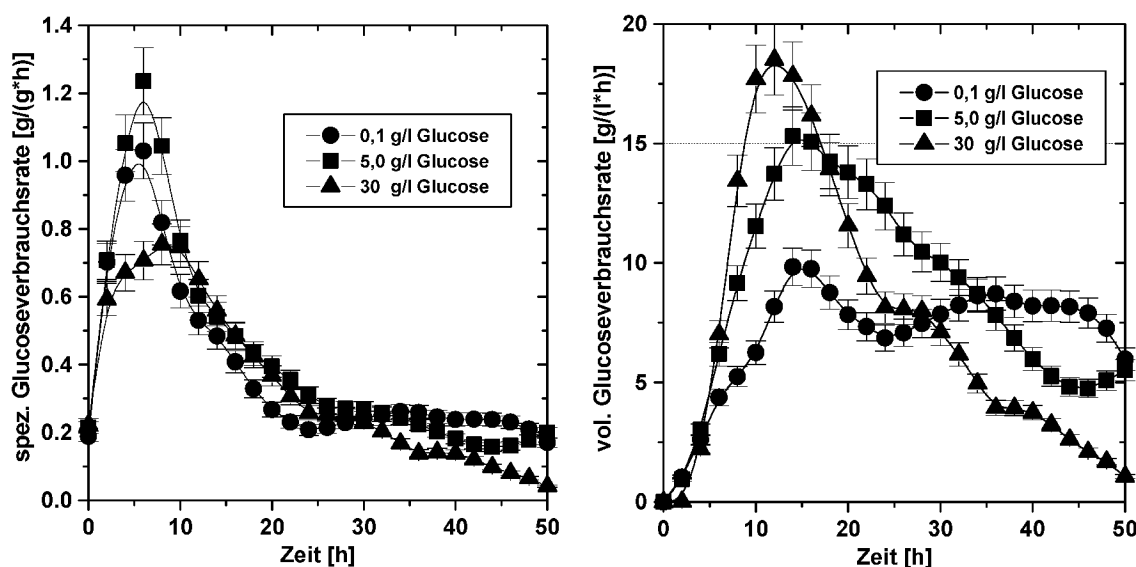


Abbildung 58: Vergleich der biomassespezifischen und volumetrischen Glucoseverbrauchsrate bei Einstellung einer Glucosekonzentration von 0,1, 5,0 und 30 g/l (*E. coli* 4pF69).

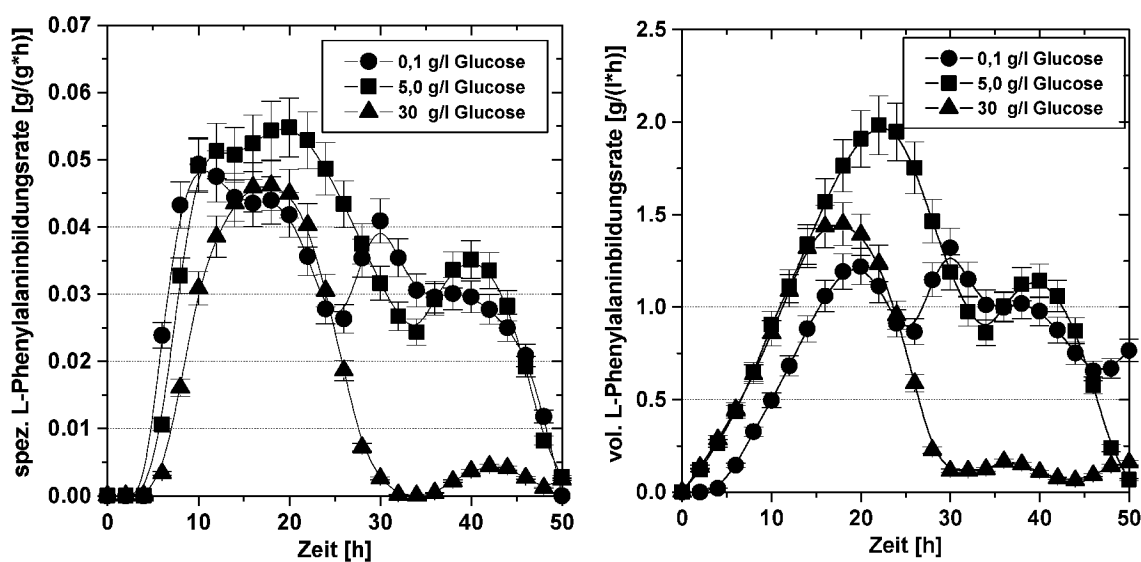


Abbildung 59: Vergleich der biomassespezifischen und volumetrischen L-Phe-Bildungsrate bei Einstellung einer Glucosekonzentration von 0,1, 5,0 und 30 g/l (*E. coli* 4pF69).

Da die Zelldichte in den Versuchen vergleichbar ist, sich jedoch die Änderung des Fermentationsvolumens, aufgrund unterschiedlicher Glucosezulaufzeiten, wesentlich unterscheidet, werden Abweichungen in den Versuchen erst bei einem Vergleich der volumetrischen Raten deutlich. Während bei Einstellung von 30 g/l, in der Zeit von 5 bis 15 h, maximale

volumetrische Verbrauchsrate von bis zu 18 g/(l*h) erreicht wurden, wurden bei Regelung auf 0,1 g/l Glucose nur 10 g/(l*h) umgesetzt. Lagen 5,0 g/l Glucose vor, stieg der Verbrauch zunächst auf 15 g/(l*h) an, fiel jedoch wieder im Verlauf der Fermentation auf 5 g/(l*h) ab. Im Gegensatz dazu verlief der Substratumsatz bei 0,1 g/l konstant zwischen 7 und 10 g/(l*h), die volumetrische Glucoseverbrauchsrate bei 30 g/l dagegen fiel auf 2 g/(l*h) ab.

Die biomassespezifischen und volumetrischen Produktbildungsrate der drei Versuche sind in Abbildung 59 zusammengefasst. Deutlich fällt auf, dass bei Einstellung von 30 g/l Glucose nach 20 h Fermentationszeit die spezifische und die volumetrische Rate schnell abfielen und nach weiteren 10 h bei annähernd 0 lagen (keine L-Phe-Bildung). Dagegen führte die Einstellung von 5,0 g/l Glucose zu einer maximalen spezifischen Produktbildungsrate von 0,055 g/(g*h) bzw. einer volumetrischen Rate von 2,0 g/(l*h). Ab $t = 25$ h sanken auch hier die Werte ab, blieben jedoch für 15 h bei 0,03 g/(g*h) bzw. 1,0 g/(l*h) annähernd konstant und fielen erst gegen Ende der Fermentation auf 0 ab. In dem Versuch bei Regelung auf 0,1 g/l Glucose, lag die maximale spezifische Rate bei 0,05 g/(g*h) und sank nur langsam über den Fermentationsverlauf auf 0,03 g/(g*h) ab. Einen ähnlichen Verlauf nahm die volumetrische L-Phe-Bildungsrate, jedoch wurde nur ein Maximum von 1,3 g/(l*h) erreicht.

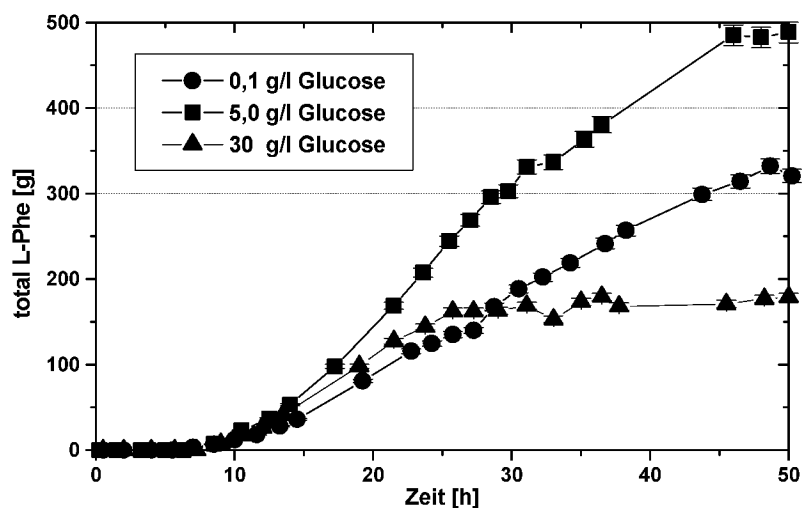


Abbildung 60: Vergleich der gebildeten L-Phe-Gesamtmenge bei Einstellung einer Glucosekonzentration von 0,1, 5,0 und 30 g/l (*E. coli* 4pF69).

Abbildung 60 zeigt den Verlauf des insgesamt gebildeten L-Phe. Deutlich ist zu erkennen, dass bei Regelung der Glucosekonzentration auf 5,0 g/l mit 500 g L-Phe (Fermentationsvolumen bei Versuchsende ungefähr 14,4 l), 150 % mehr Produkt gebildet wurde, als bei Einstellung von 30 g/l Glucose. Hier wurde ab $t = 25$ h kein L-Phe mehr produziert. In dem Versuch bei Einstellung von 0,1 g/l Glucose wurden, trotz einer erreichten Endkonzentration an L-Phe von 32,0 g/l (vgl. Abbildung 56), nur 340 g Produkt gebildet, da aufgrund geringerer Zulaufzeiten nur ein Fermentationsvolumen von 10,6 l erreicht wurde.

6.2.4. INDIREKTE REGELUNG DER L-TYROSINZUFUHR

Im Vorfeld der hier dargestellten Ergebnisse wurde von Takors et. al., unter Verwendung erster Fermentationsdaten, eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt [221]. Mittels dieser Methode sollten die wichtigsten, den Fermentationsprozess beeinflussenden Parameter, identifiziert werden. Die Analyse ergab, dass die Konzentrationen an L-Tyrosin und Acetat im Reaktor, innerhalb eines Konvergenzbereiches von 90 %, den Prozess am stärksten beeinflussen. Im Rahmen einer parallelen Auswertung der in Abschnitt 6.2.1 dargestellten zehn Fermentationen und noch zwei weiteren Versuchen, konnte ein funktionaler Zusammenhang zwischen erreichter L-Phe-Konzentration und der gemessenen L-Tyrosinkonzentration innerhalb der Wachstumsphase gefunden werden.

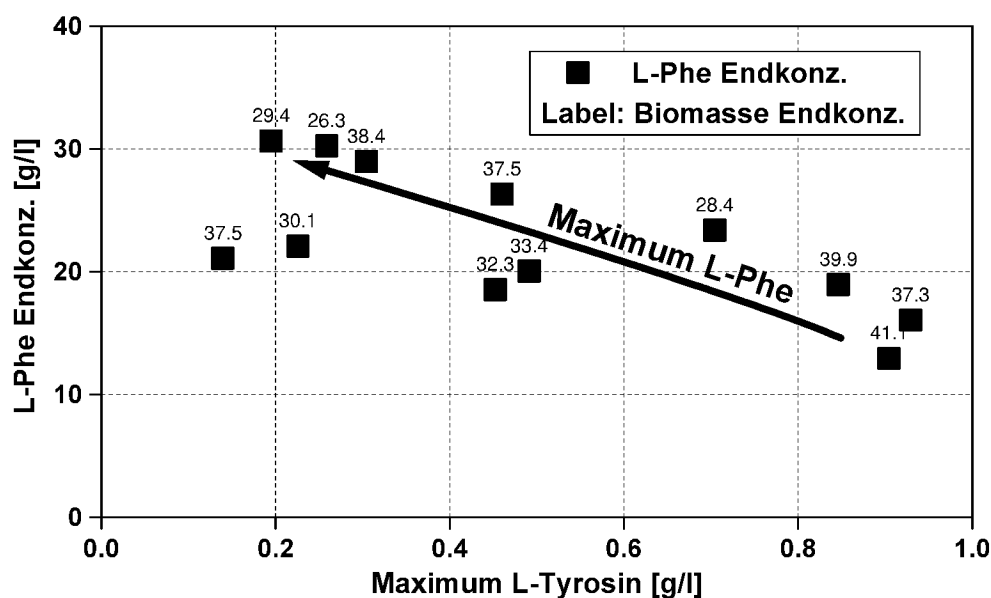


Abbildung 61: L-Phe-Titer in Abhängigkeit von der maximal auftretenden L-Tyrosinkonzentration. Dargestellt wurden zwölf Fermentationen.

Abbildung 61 zeigt, dass der L-Phe-Titer mit sinkender, maximaler L-Tyrosinkonzentration steigt. Als Label wurde zusätzlich die im jeweiligen Versuch erreichte BTM-Konzentration eingetragen. Dabei ist zu erkennen, dass die erreichte L-Phe-Endkonzentration unabhängig von der Zelldichte war. Die niedrigsten Biotrockenmassekonzentrationen führten sogar zu den höchsten L-Phe-Titern.

Die Variation der L-Tyrosinkonzentration in der Wachstumsphase ist auf die Kopplung mit der Glucosezufuhr zurückzuführen. Diese wurde während der Versuche entsprechend dem Substratverbrauch angepasst. Durch Anpassungen der Zuflussrate erfolgte auch die L-Tyrosinzufuhr mit unterschiedlichen Zulaufzeiten. Dies geschah jedoch unabhängig vom tatsächlichen L-Tyrosinverbrauch.

Zur weiteren Prozessentwicklung sollte die Aminosäurezufuhr von der Glucosezufuhr entkoppelt und durch eine Regelungsstrategie, dem jeweiligen Verbrauch entsprechend, angepasst werden. Entscheidend sollte dabei sein, jegliche Akkumulation in der Wachstumsphase zu vermeiden und die Zufuhr der stammspezifischen Wachstums- und Substratverbrauchsrate anzupassen.

Förberg et. al. [140] fasst für den Einsatz der L-Tyrosinsensitiven DAHP-Synthase zusammen, dass die L-Tyrosinkonzentration unter 36 mg/l liegen muss, um eine Inhibierung des Enzyms zu vermeiden. In dieser Arbeit sollte die L-Tyrosinkonzentration deshalb, unter Berücksichtigung eines „Sicherheitsfaktors“, 10 mg/l nicht überschreiten. Da dieser Wert im Bereich der HPLC-Nachweisgrenze liegt, war die direkte Regelung der Aminosäurekonzentration, mittels einer on-line Analyse, nicht möglich. Es musste deshalb ein indirekter Regelungsansatz gefunden werden.

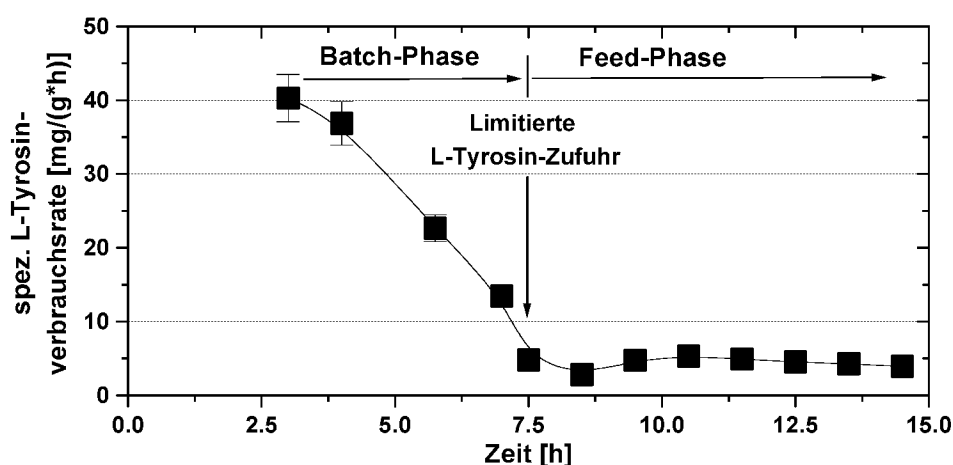


Abbildung 62: Spezifische L-Tyrosinverbrauchsrate in der Wachstumsphase. Einfluss von Überschuss und Limitierung.

Die in Abbildung 62 dargestellte spezifische L-Tyrosinverbrauchsrate zeigt, dass in der Batchphase, bei einem Überschuss an L-Tyrosin, der spezifische Verbrauch auf hohem Niveau beginnt und mit sinkender Konzentration der Aminosäure abnimmt. Vom Startpunkt der limitierten L-Tyrosinzugabe (in diesem Versuch wurde L-Tyrosin durch ein Steuerungsprofil streng limitiert zugeführt), ist der spezifische Verbrauch konstant und nur von der biomassebezogenen L-Tyrosinselektivität ($Y_{S/X}$) abhängig. Der $Y_{S/X}$ lag bei 0,028 und stimmte mit literaturbekannten Werten überein [140].

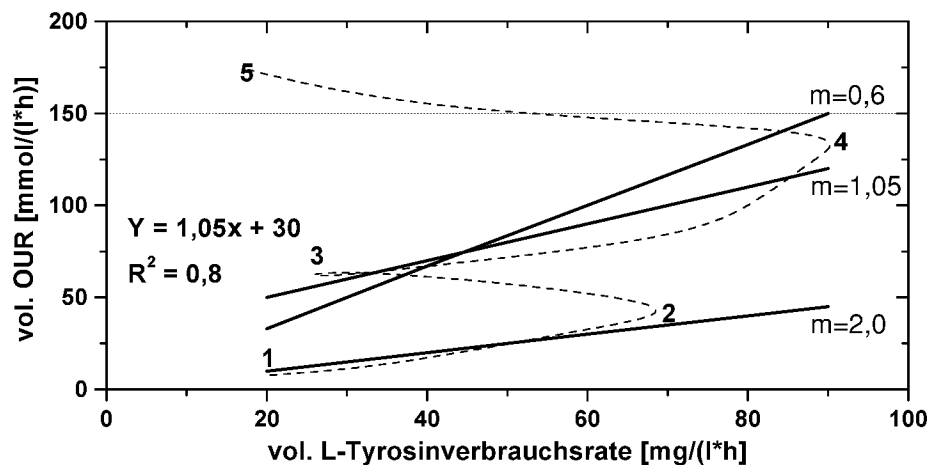


Abbildung 63: Zusammenhang von volumetrischer Sauerstoffverbrauchsrate und volumetrischer L-Tyrosinverbrauchsrate in der Wachstumsphase (1-2: Batchphase; 3-4: L-Tyrosinzulauf; 4-5: Limitierung der L-Tyrosinzufuhr (Wachstumslimitierung)). Neben dem erhaltenen funktionalen Zusammenhang mit $m = 1,05$ wurden die bei Variation des Zusammenhangs ($m = 2$ und $m = 0,6$) (vergleiche Abschnitt 6.2.5) erhaltenen Kurvenverläufe grafisch darstellt.

Die volumetrische L-Tyrosinverbrauchsrate ist von der Biomassekonzentration und von der spezifischen Wachstumsrate abhängig. Gleiches gilt für die volumetrische Sauerstoffverbrauchsrate, wenn eine konstante Gelöstsauerstoffkonzentration während der Fermentation eingestellt wird. Da beide Raten von den gleichen Parametern abhängig sind, kann ein funktionaler Zusammenhang vermutet werden. In Abbildung 63 sind die beiden volumetrischen Verbrauchsrate gegeneinander aufgetragen worden (in der Zulaufphase (3-4) der Wachstumsphase wurde bei limitierter L-Tyrosinzugabe ein pO_2 von 30-50% eingestellt). Deutlich sind drei Phasen zu unterscheiden:

Die Batchphase (1-2) hat einen niedrigeren Verlauf, als die restliche Wachstumsphase, aufgrund des höheren L-Tyrosinspezifischen $Y_{S/X}$. Mit dem Start der Produktionsphase (4-5) (ab hier wird eine minimale L-Tyrosinzulauftrate von 150 mg/h (20 mg/(l*h) bezogen auf die Batchvorlage) für den Erhaltungsstoffwechsel eingestellt), ist kein Zusammenhang zwischen den Verbrauchsrate mehr möglich. In dem Bereich der Wachstumsphase, in dem über die limitierte L-Tyrosinzufuhr die Wachstumsrate gesteuert wird (3-4), lässt sich ein funktionaler Zusammenhang zwischen volumetrischer Sauerstoff- und L-Tyrosinverbrauchsrate formulieren. Dieser ist in Abbildung 63 angegeben.

Basierend auf dieser linearen Abhängigkeit wurde ein empirischer Zusammenhang gefunden (Gleichung 5-7), mit dessen Hilfe während der Wachstumsphase die volumetrische L-Tyrosinverbrauchsrate indirekt berechnet und eine auf das Reaktorvolumen entsprechend umgerechnete Zulauftrate (Gleichung 5-8), eingestellt werden konnte (vgl. Abschnitt 5.4.4).

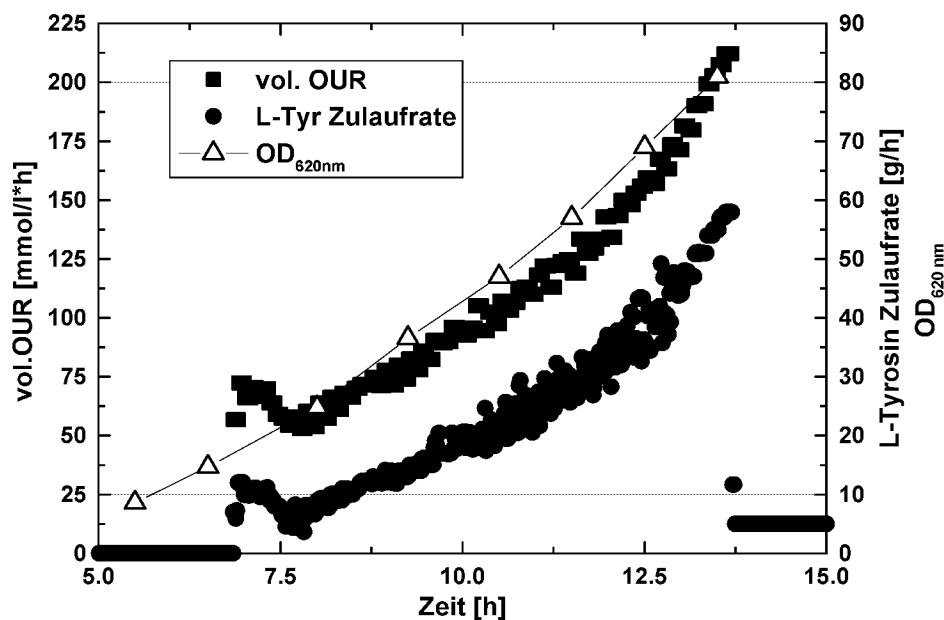


Abbildung 64: Darstellung der berechneten, volumetrischen OUR in der Wachstumsphase. Nach Korrelation mit der volumetrischen L-Tyrosinverbrauchsrate, Einstellung der L-Tyrosin Zulauftrate. Entsprechend der L-Tyrosinzufuhr erhaltener Verlauf der optischen Dichte.

In Abbildung 64 ist ein Versuch dargestellt, in dem während der Wachstumsphase, ab dem Ende der Batchphase, die volumetrische Sauerstoffverbrauchsrate vom Prozessrechner ermittelt wurde (Gleichung 5-6). Aus dieser wurde unter Verwendung des empirischen Zusammenhangs (zur Vereinfachung wurde $m = 1$ statt 1,05 eingesetzt) die volumetrische L-Tyrosinverbrauchsrate und hierauf basierend eine entsprechende L-Tyrosinzulauftrate ermittelt und vom Prozessrechner und Dosiersystem eingestellt. Abbildung 64 zeigt die berechnete volumetrische OUR und die entsprechend eingestellte Zulauftrate der 25 g/l L-Tyrosin enthaltenen Lösung. Ab dem Zeitpunkt der Wachstumslimitierung ($t = 13,5$ h) wurde für den Erhaltungsstoffwechsel eine Zulauftrate der 25 g/l L-Tyrosinlösung von 6 g/h (150 mg/h L-Tyrosin bzw. 20 mg/(l*h) bezogen auf das Batchvolumen zu Fermentationsbeginn) eingestellt. Außerdem ist der Verlauf der OD_{620nm} dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, dass die optische Dichte den gleichen Kurvenverlauf nimmt, wie die Zulauftrate der L-Tyrosinlösung. L-Tyrosin konnte während der Wachstumsphase nicht detektiert werden, d.h. die Konzentration lag unterhalb der HPLC-Nachweisgrenze von 10 mg/l.

Unter Verwendung dieses Prozessansatzes und der in Abschnitt 6.2.3 beschriebenen Glucoseregulung bei 5,0 g/l, war es möglich, reproduzierbar eine L-Phe-Konzentration von 30-32 g/l zu erreichen.

6.2.5. EINFLUSS DER L-TYROSINZUFUHR AUF DEN PROZESS

Um den Einfluss der indirekten Regelung der L-Tyrosinzufuhr zu untersuchen, sollte durch Veränderung des empirischen Zusammenhangs die Stärke der Limitierung variiert werden. Durch Erhöhung bzw. Verringerung des im Nenner stehenden Zulauffaktors m sollte eine Verringerung bzw. Erhöhung der Zulauftrate bewirkt werden. Dies wiederum sollte zu einer strengeren Limitierung bzw. leichten Akkumulation an L-Tyrosin führen. Um weiterhin vergleichbare Fermentationsbedingungen zu erhalten, wurde in jeder Fermentation die gleiche Menge an L-Tyrosinlösung (180 g) zugeführt. So konnte das Wachstum unabhängig von der Zulauftrate bei einer Biotrockenmassekonzentration von 30-35 g/l limitiert werden.

Eine strengere L-Tyrosinlimitierung führt zwangsläufig zu einer geringeren Wachstumsrate und zu einer langsamer ansteigenden, volumetrischen Sauerstoffaufnahme. Damit beeinflussen sich die Parameter gegenseitig. Abbildung 65 zeigt den Verlauf der volumetrischen OUR bei Variation des Zulauffaktors m . Bei $m = 1,0$ handelt es sich um den Standardprozess. $m = 1,5$ und $2,0$ sollten zu einer stärkeren Limitierung und zu einer langsamer ansteigenden volumetrischen OUR führen (siehe hierzu auch Abbildung 63). Abbildung 65 zeigt deutlich, dass mit steigendem m die Sauerstoffaufnahme fiel. Wie Abbildung 66 zeigt, führte der Versuch bei Einstellung von $m = 0,6$ (*E. coli* 4pF69) zu einer leichten Akkumulation an L-Tyrosin (Daten der volumetrischen OUR nicht verfügbar; Defekt der Prozessdatensicherung).

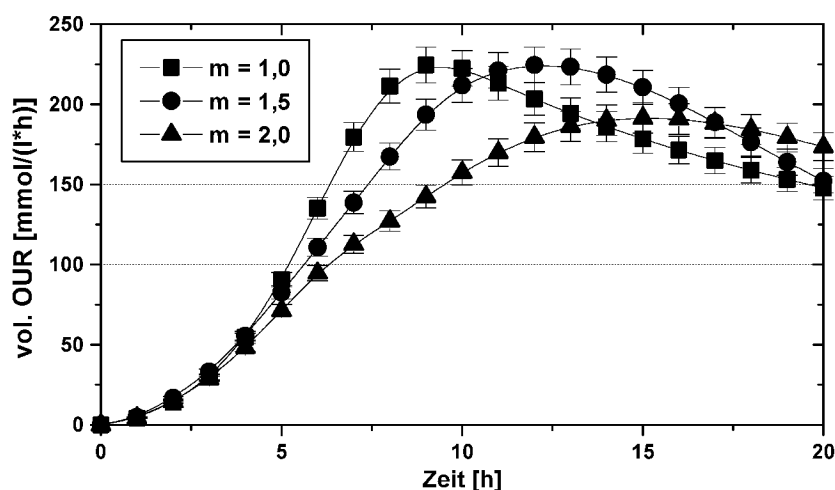


Abbildung 65: Verlauf der volumetrischen OUR bei Einstellung verschiedener L-Tyrosinzulauftraten durch Variation des Zulauffaktors m am Beispiel von *E. coli* 4pF69.

Die in Abschnitt 6.2.4. dargestellten Ergebnisse wurden unter Einsatz von *E. coli* 4pF20 erhalten. Bei diesem Stamm konnte eine Sensitivität gegenüber L-Tyrosin gezeigt werden. In den folgenden Versuchen wurde der Stamm *E. coli* 4pF26 eingesetzt, in dem zusätzlich das Gen *aroL^{wt}* überexprimiert wurde. Durch diese Veränderung sollte der reaktionslimitierende Schritt bei der Umsetzung von Shikimat zu Shikimat-3-Phosphat aufgehoben werden. Die Versuchsreihe zur Variation der L-Tyrosinzulauftrate wurde zudem mit *E. coli* 4pF69 wiederholt. Im Gegensatz zu *E. coli* 4pF26 verfügte dieser Stamm nicht über eine deregulierte

L-Tyrosinspezifische DAHP-Synthase, sondern über das L-Tyrosinsensitive *aroF^{wt}*-Gen. Diese Arbeiten wurden von Ganpo durchgeführt [222].

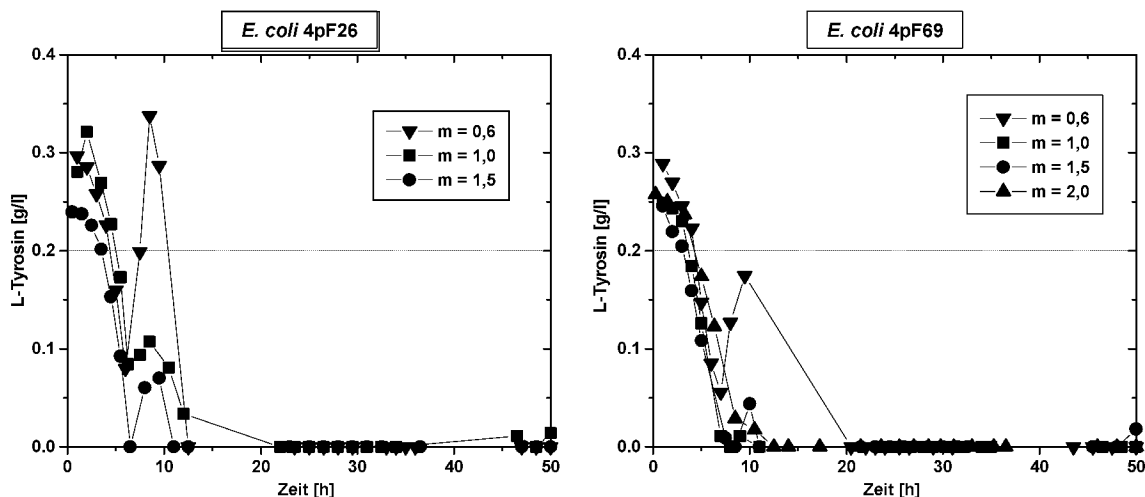


Abbildung 66: Verlauf der L-Tyrosinkonzentration bei Variation des Zulauffaktors m und Einsatz verschiedener *E. coli* Stämme.

Abbildung 66 zeigt den Verlauf der L-Tyrosinkonzentration in den durchgeführten Fermentationen bei Variation des Zulauffaktors m . Bei Verwendung von *E. coli* 4pF26 ist zu erkennen, dass mit Beginn des L-Tyrosinzulaufs, bei $m = 1,0$ und $1,5$, zwar noch eine geringe Akkumulation von bis zu 0,1 g/l auftrat, nach $t = 12$ h jedoch kein L-Tyrosin mehr nachgewiesen wurde. Die Einstellung von $m = 0,6$ führte zu einer zwischenzeitigen Akkumulation von bis zu 0,35 g/l. Noch deutlicher ist der Unterschied bei Einsatz von *E. coli* 4pF69 zu erkennen. Unter Standardbedingungen ($m = 1,0$) und bei strengerer Limitierung, war nach dem Ende der Batchphase L-Tyrosin kaum noch nachweisbar, während die Einstellung von $m = 0,6$ zu einer vergleichsweise deutlichen Akkumulation (0,18 g/l) führte.

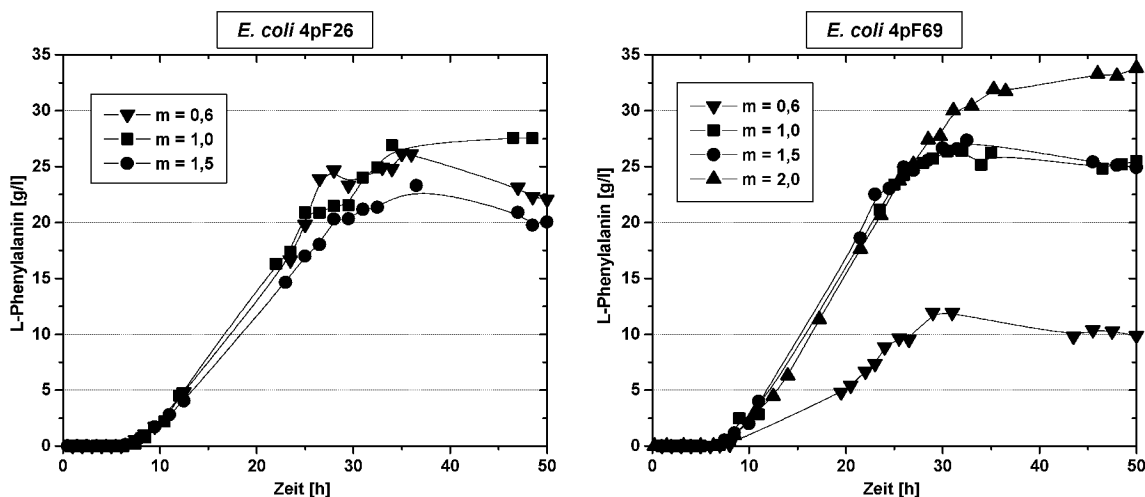


Abbildung 67: Verlauf der L-Phe-Konzentration bei Variation des Zulauffaktors m und Einsatz verschiedener *E. coli* Stämme.

Abbildung 67 zeigt den Verlauf der L-Phe-Konzentration. Bei Einsatz von *E. coli* 4pF26 zeigte sich, dass die L-Phe-Verläufe bis $t = 30$ h alle die gleiche Tendenz aufwiesen. Anschließend fiel die Konzentration bei $m = 0,6$ und $m = 1,5$ deutlich ab, während bei $m = 1,0$ die L-Phe-Konzentration mit 28 g/l stabil blieb. Der Abfall der Konzentrationen konnte hauptsächlich auf Verdünnungseffekte, bedingt durch die Fed-Batch-Prozessführung, zurückgeführt werden. Bei der Fermentation von *E. coli* 4pF69 führte die Fermentation bei $m = 1,0$ und $m = 1,5$ zu einem mit *E. coli* 4pF26 vergleichbaren Konzentrationsverlauf, jedoch kam es nach $t = 30$ h zu keiner Verdünnung des L-Phe. Bei Einstellung von $m = 0,6$ ist zu erkennen, dass mit einer maximalen L-Phe-Konzentration von 12 g/l deutlich weniger produziert wurde. Die strenge L-Tyrosinlimitierung mit $m = 2,0$ führte zum Fermentationsende zu einer maximalen L-Phe-Konzentration von 34 g/l.

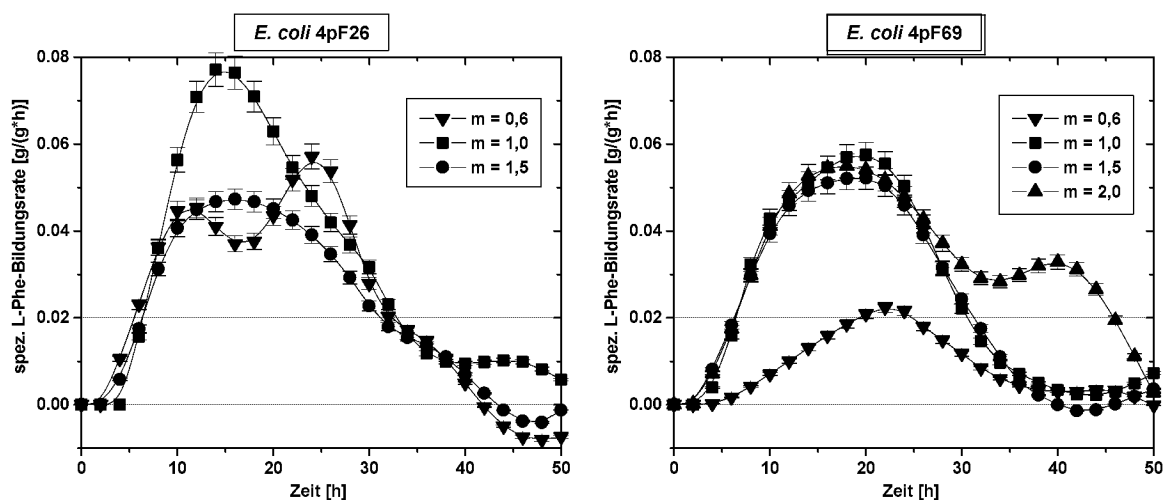


Abbildung 68: Verlauf der spezifischen L-Phe-Produktbildungsrate bei Variation des Zulauffaktors m und Einsatz verschiedener *E. coli* Stämme.

Die in Abbildung 68 dargestellte Berechnung der spezifischen L-Phe-Bildungsrate zeigt, dass bei Einsatz von *E. coli* 4pF26 mit annähernd $0,08$ g/(g*h) die höchste Produktbildungsrate erreicht wurde. Bei $m = 1,5$ und $0,6$ lag die Produktbildungsrate im Bereich von $0,05$ g/(g*h). Ein weiterer Unterschied in den Ansätzen (*E. coli* 4pF26) zeigte sich zum Ende der Fermentation. Hier konnte bei $m = 1,0$ noch eine geringe Produktbildungsrate beobachtet werden, während bei den anderen Einstellungen ein geringer „Verlust“ an L-Phe festzustellen war. Bei Einsatz von *E. coli* 4pF69 sind die Unterschiede deutlicher. Die erhöhte L-Tyrosinzufuhr führte zu einer wesentlich geringeren Produktbildungsrate (maximal $0,02$ g/(g*h)), während die Einstellungen $m = 1,0$ und $1,5$ zu vergleichbaren Raten, wie bei Einsatz von *E. coli* 4pF26, führten. Bei strengerer Limitierung ($m = 2,0$) zeigte sich, dass eine vergleichbare, maximale Produktbildungsrate von $0,06$ g/(g*h) erreicht wurde. Allerdings fiel die Produktbildung nach $t = 30$ h nicht auf annähernd 0 ab, sondern lag für weitere 15 h bei $0,03$ g/(g*h).

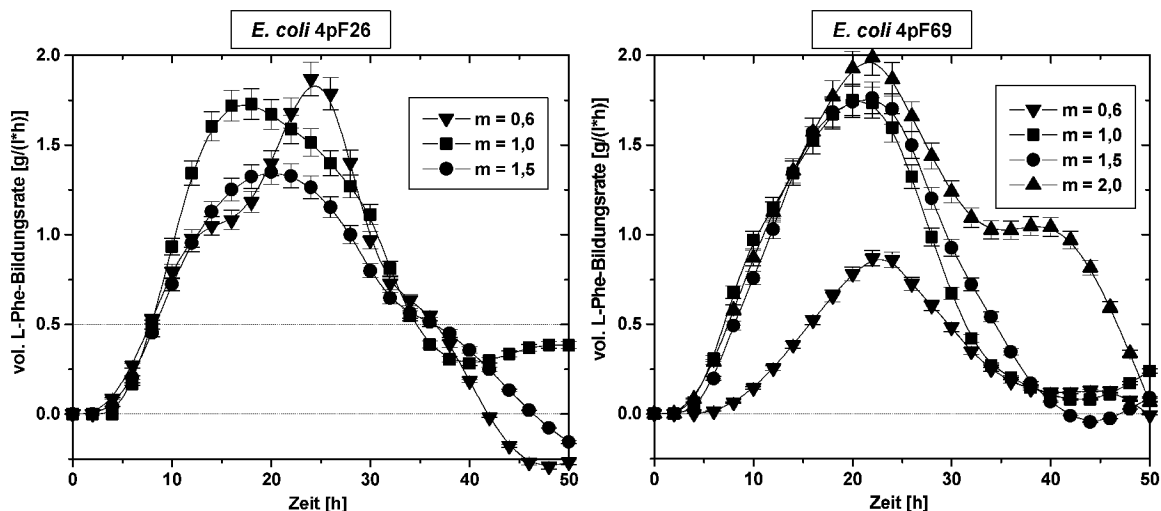


Abbildung 69: Verlauf der volumetrischen L-Phe-Produktbildungsrate bei Variation des Zulauffaktors m und Einsatz verschiedener *E. coli* Stämme.

Bei Betrachtung der volumetrischen L-Phe-Bildungsraten von *E. coli* 4pF26 in Abbildung 69, ist ein deutlicher Unterschied zu den spezifischen Raten zu erkennen. Die volumenbezogene Produktbildung bei $m = 0,6$ lag mit 1,9 g/(l·h) auf dem gleichen Niveau, wie bei Einstellung von $m = 1,0$ (1,8 g/(l·h)). Ein Vergleich der Ergebnisse bei Einsatz von *E. coli* 4pF69 zeigt, dass die volumetrischen Produktbildungsrate, im Gegensatz zu den spezifischen Raten, mit bis zu 2,0 g/(l·h) über denen von *E. coli* 4pF26 lagen (ausgenommen $m = 0,6$).

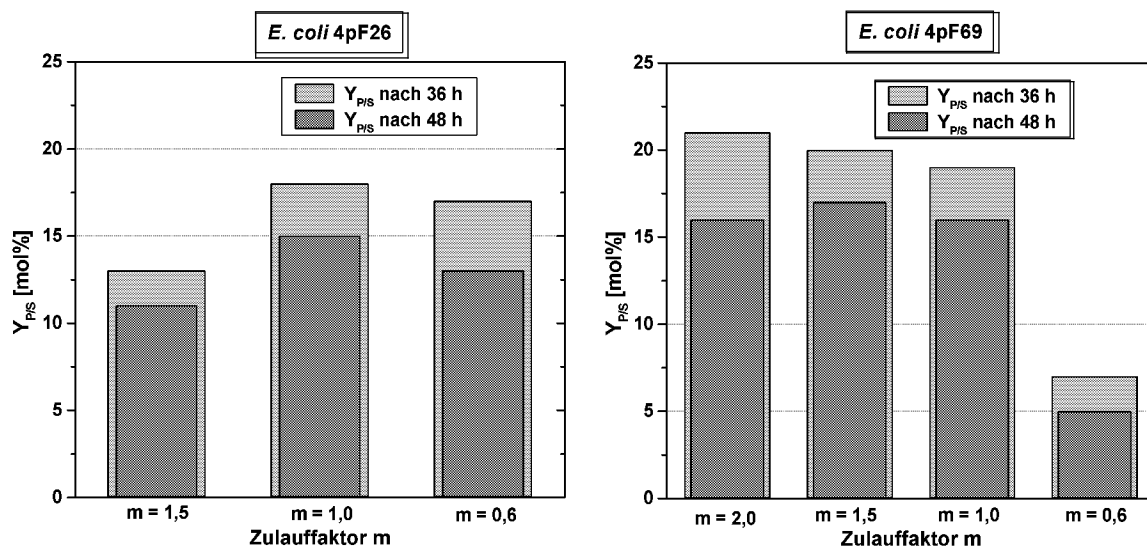


Abbildung 70: Vergleich der substratbezogenen Produktselektivitäten bei Variation des Zulauffaktors m und Einsatz verschiedener *E. coli* Stämme.

In Abbildung 70 ist zu erkennen, dass bei Einstellung eines Zulauffaktors von 1,0 bei Verwendung von *E. coli* 4pF26 nach 48 h mit 15,1 % die höchste integrale Produktselektivität

(L-Phe/Glucose) erreicht wurde. Bei $t = 36$ h konnte sogar ein $Y_{P/S}$ von ungefähr 18 %, im Gegensatz zu 13 % ($m = 0,6$) bzw. 17 % ($m = 1,5$), errechnet werden. Deutlich ist in Abbildung 70 auch der Unterschied in der Ausbeute bei *E. coli* 4pF69 zu erkennen. Unter Standardbedingungen, oder strengerer L-Tyrosinlimitierung, wurde nach 48 h ein $Y_{P/S}$ von 15,5 % bis 17 % erreicht, während bei erhöhter L-Tyrosinzufuhr die Selektivität auf nur 5 % abfiel (48 h). Zudem fällt auf, dass beim Vergleich der $Y_{P/S}$ bei $t = 36$ h unter Standardbedingungen mit *E. coli* 4pF69 18,5 % mol Glucose zu mol L-Phe umgesetzt wurde. Dieser Wert stieg mit strengerer Limitierung auf 20,8 % an. Die integrale Produktselektivität konnte somit bei Einsatz von *E. coli* 4pF69 und strenger L-Tyrosinlimitierung um 15,5 % gegenüber *E. coli* 4pF20 gesteigert werden.

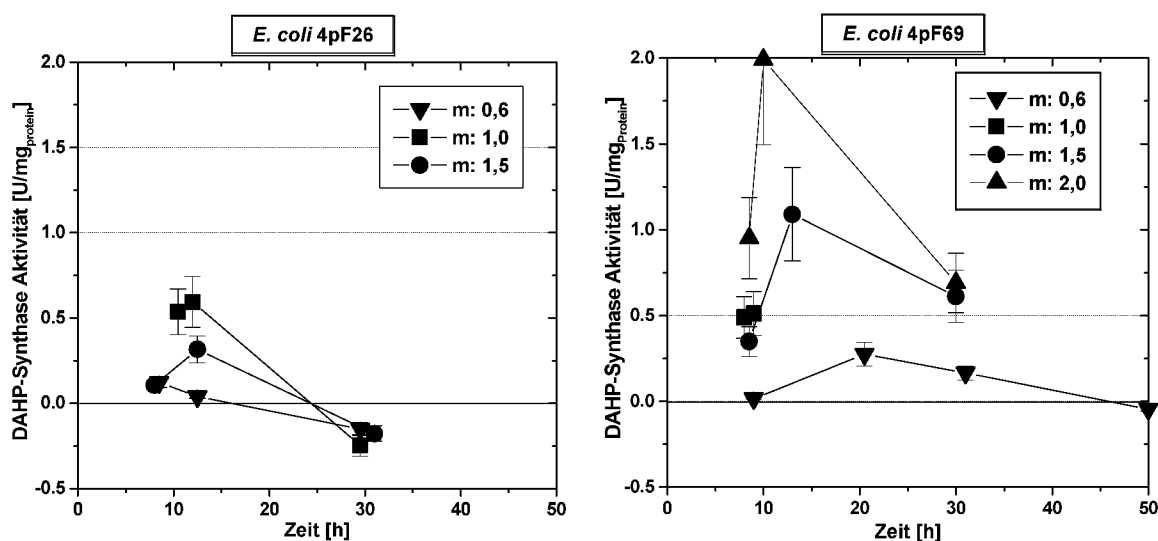


Abbildung 71: Vergleich der proteinspezifischen DAHP-Synthaseaktivität bei Variation des Zulauffaktors m und Einsatz verschiedener *E. coli* Stämme.

Abbildung 71 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung der DAHP-Synthaseaktivität. Die proteinspezifischen Aktivitäten von $aroF^{fbr}$ und $aroF^{wt}$ unterscheiden sich deutlich voneinander. Unter Standardbedingungen (Zulauffaktor 1,0) konnte bei *E. coli* 4pF26 eine maximale Enzymaktivität von 0,5 U/mg_{Protein} gemessen werden, jedoch war bei $t = 30$ h in keinem Versuchsansatz mehr Aktivität nachweisbar (die negativen Messwerte werden durch hohe relative Fehler und das Messprinzip verursacht). Bei Messung der Enzymaktivität von $aroF^{wt}$, bei Einstellung von $m = 1,0$, wurde bei $t = 10$ h eine vergleichbare Aktivität von 0,5 U/mg_{Protein} gemessen. Bei strengerer L-Tyrosinlimitierung stieg die spezifische Aktivität jedoch deutlich an und erreichte bis zu 2 U/mg_{Protein}. Zudem konnte auch noch nach 30 h Fermentationsdauer eine signifikante Enzymaktivität gemessen (0,6 U/mg_{Protein}) werden. Nur bei Einstellung einer über dem aktuellen L-Tyrosinverbrauch liegenden Zulauftrate ($m = 0,6$), wurde keine Aktivität der DAHP-Synthase mehr nachgewiesen.

6.2.6. ÜBERTRAGUNG IN DEN PILOTMAßSTAB

Die Maßstabsvergrößerung, vom 20 l Laborreaktor in die 300 l Pilotanlage, hatte zwei Ziele. Zum einen sollte untersucht werden, inwieweit der entwickelte Prozess sich auf einen größeren Maßstab übertragen lässt. Zum anderen sollte die Integration des Aufarbeitungsprozesses (vgl. Abschnitt 2.5) im halbtechnischen Maßstab erfolgen.

Die technische Umsetzung des Scale-up wurde in Abschnitt 5.5 beschrieben. Ziel war es, einen mit dem Laborprozess vergleichbaren Fermentationsverlauf zu erreichen. Für diese Versuche wurde der Basisstamm *E. coli* 4pF20 verwendet. Vor der Maßstabsvergrößerung wurden mit diesem Stamm entsprechende Versuche im 20 l Bioreaktor durchgeführt.

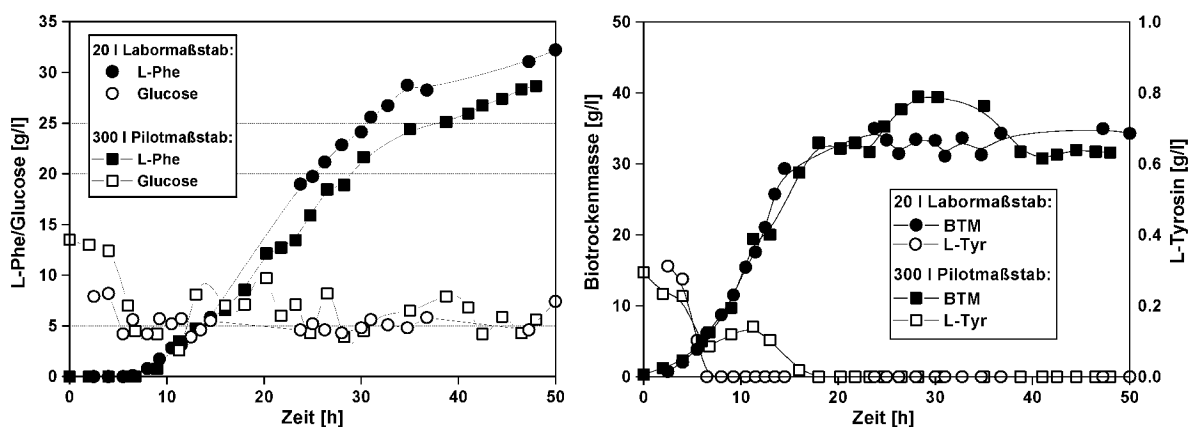


Abbildung 72: Vergleich der Fermentation im 20 l Labor- und 300 l Pilotmaßstab. Darstellung der Verläufe von L-Phe, L-Tyrosin, Glucose und Biotrockenmasse über den Versuchszeitraum, unter Verwendung von *E. coli* 4pF20.

In Abbildung 72 wurden die wichtigsten Konzentrationen zusammengefasst. Es fällt auf, dass die Verläufe von Glucose, L-Tyrosin und Biotrockenmasse im 300 l Maßstab, gegenüber dem Laborversuch, leichten Schwankungen unterlagen. Die Zunahme der L-Phe-Konzentration im 300 l Versuch erfolgte zwar langsamer als im Labormaßstab, jedoch konnten auch hier nach 48 h 28,6 g/l nachgewiesen werden. Im gleichen Zeitraum wurden im 20 l Reaktor 32,2 g/l L-Phe produziert.

Beim Vergleich der spezifischen Produktbildungsraten (Abbildung 73) ist in den ersten 12 h und ab $t = 25$ h ein identischer Kurvenverlauf festzustellen. In dem dazwischenliegenden Zeitraum ist die spezifische Produktbildung im 300 l Ansatz um $0,01 \text{ g/(g} \cdot \text{h)}$ geringer, als im 20 l Versuch. Ein ähnlicher Kurvenverlauf zeigt sich bei der Berechnung der differentiellen RZA. Auch hier liegt der berechnete Wert im Labormaßstab ($1,25 \text{ g/(l} \cdot \text{h)}$) 25 % über dem des 300 l Versuches ($1,0 \text{ g/(l} \cdot \text{h)}$). Die erreichte integrale Selektivität ist mit 15,1 % vergleichbar mit der 20 l Fermentation (16,3 %). Dasselbe gilt für die integrale RZA (20 l: $0,64 \text{ g/(l} \cdot \text{h)}$; 300 l: $0,60 \text{ g/(l} \cdot \text{h)}$).

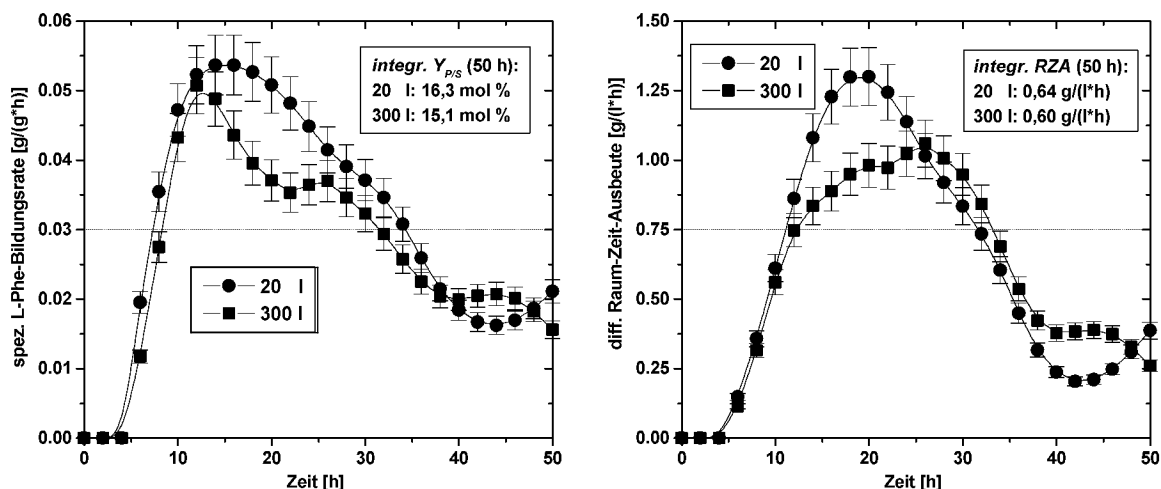


Abbildung 73: Vergleich der Fermentation im 20 l Labor- und 300 l Pilotmaßstab. Darstellung der spezifischen L-Phe-Bildungsrate und der differentiellen Raum-Zeit-Ausbeute über den Versuchszeitraum, unter Verwendung von *E. coli* 4pF20.

6.2.7. ANSATZ ZUR WEITEREN PROZESSOPTIMIERUNG

Untersucht werden sollte die Möglichkeit, mit dem bisher entwickelten Standardprozess, bei gleicher spezifischer Produktbildungsrate, eine höhere volumetrische Produktbildung bzw. eine höhere RZA und damit eine Steigerung der L-Phe-Konzentration, zu erreichen. Hierzu sollte bei unveränderten Prozessbedingungen (pH, Temperatur, pO_2) eine um 50 % höhere Biomassekonzentration eingestellt werden. Zum Erreichen dieser Konzentration wurden in der Zulaufphase der Wachstumsphase statt 180 g L-Tyrosinlösung (Standardprozess), 270 g der Lösung zugeführt. Um eine vergleichbare Versorgung mit Nährsalzen zu gewährleisten, wurden zusätzlich 50 % der in der Batchphase vorgelegten Salze, als konzentrierte Lösung, in der Wachstumsphase, ab dem Erreichen einer OD_{620nm} von 60 innerhalb von 2 h, zugeführt.

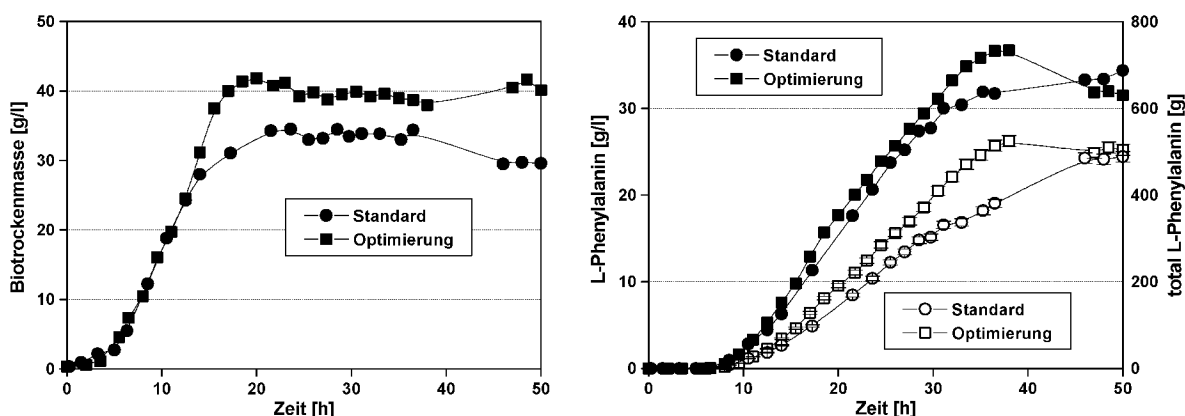


Abbildung 74: Darstellung der Biotrockenmasse- und L-Phe-Konzentration unter Standardbedingungen und Vergleich mit einem Ansatz zur Prozessoptimierung (*E. coli* 4pF69). Zudem Berechnung des Verlaufs an Gesamt-L-Phe.

Abbildung 74 zeigt den Verlauf der Biotrockenmassekonzentration in dem Ansatz zur Prozessoptimierung, verglichen mit einer Standardfermentation. Das Wachstum in den beiden Versuchen wurde bei 14 h (Standard) bzw. 18,5 h (Optimierung) L-Tyrosinlimitiert. Anschließend wurden für den Erhaltungsstoffwechsel in beiden Versuchen 150 mg/h L-Tyrosin zugeführt. Zum Zeitpunkt der Limitierung lag die Biotrockenmassekonzentration bei 28 g/l (Standard) bzw. bei 42 g/l (Optimierung). Dies ergibt eine Steigerung von 48 %. Es fällt allerdings auf, dass die Zelldichte im Standardprozess im weiteren Fermentationsverlauf noch auf 34 g/l anstieg, die Konzentration im Optimierungsansatz dagegen auf 39 g/l abfiel. Bei $t = 50$ h lag die BTM-Konzentration im Standardprozess wiederum bei 30 g/l.

Bei Betrachtung der L-Phe-Konzentration (Abbildung 74) zeigt sich, dass die Verläufe fast identisch sind. Eine Abweichung trat erst ab $t = 30$ h auf. Im Optimierungsansatz stieg die Konzentration auf 36,7 g/l an und fiel anschließend, bedingt durch die Verdünnung von bereits produziertem L-Phe, auf 31,5 g/l ab. Beim Standardprozess war hingegen ein langsamer, kontinuierlicher Anstieg der Produktkonzentration bis auf 34,8 g/l zu verzeichnen. Bei der Berechnung der absolut gebildeten L-Phe-Menge, wird der Unterschied deutlicher. Hier stieg die L-Phe-Gesamtmenge im Optimierungsansatz deutlich schneller an, als im Standardprozess, so dass nach 36,5 h 380 g (Standard) bzw. 510 g (Optimierung) L-Phe berechnet wurden. Trotzdem wurden in beiden Versuchen nach 48 h mit 480 g (Standard) bzw. 510 g (Optimierung) annähernd die gleichen Mengen an Produkt erreicht.

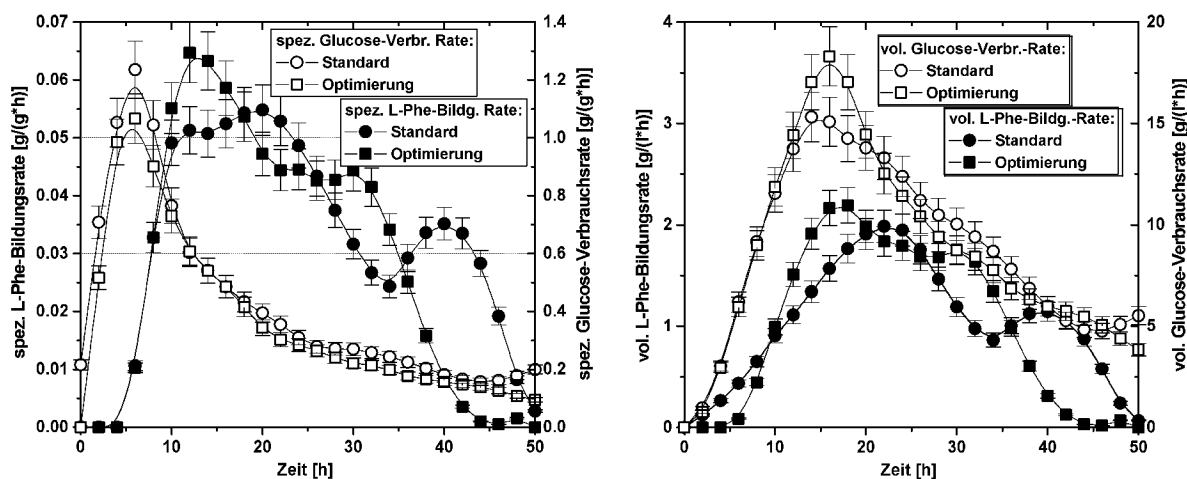


Abbildung 75: Darstellung der spezifischen Glucoseverbrauchs- und L-Phe-Bildungsraten und der volumenbezogenen Raten. Vergleich des Standardfermentationsprozesses mit einem Ansatz zur Prozessoptimierung (*E. coli* 4pF69).

In Abbildung 75 sind für den Glucoseverbrauch bzw. die L-Phe-Bildung sowohl die spezifischen, wie auch die volumetrischen Raten dargestellt. Der spezifische Glucoseverbrauch lag im Standardprozess, während der Wachstumsphase, um $0,2 \text{ g/(g*h)}$ höher als im Optimierungsansatz. Ansonsten waren die Kurvenverläufe vergleichbar. Bei der Berechnung der volumetrischen Raten lag hingegen der Glucoseverbrauch im Optimierungsansatz, mit 18 g/(l*h) , über dem des Standardprozesses (15 g/(l*h)).

Bei der Betrachtung der spezifischen und volumetrischen L-Phe-Bildungsrate fällt auf, dass zu Beginn der Produktbildung die Raten des Optimierungsansatzes 25 % über denen des Standardprozesses lagen. Anschließend kam es jedoch zu einem schnelleren Abfall der Produktbildungsraten, als im Standardprozess. Hier zeigte sich deutlich, dass insbesondere in den letzten 10 h der Fermentation im Optimierungsansatz keine L-Phe-Bildung mehr stattfand, während die Raten im Standardprozess noch bei 0,03 g/(g*h) bzw. 1,0 g/(l*h) lagen.

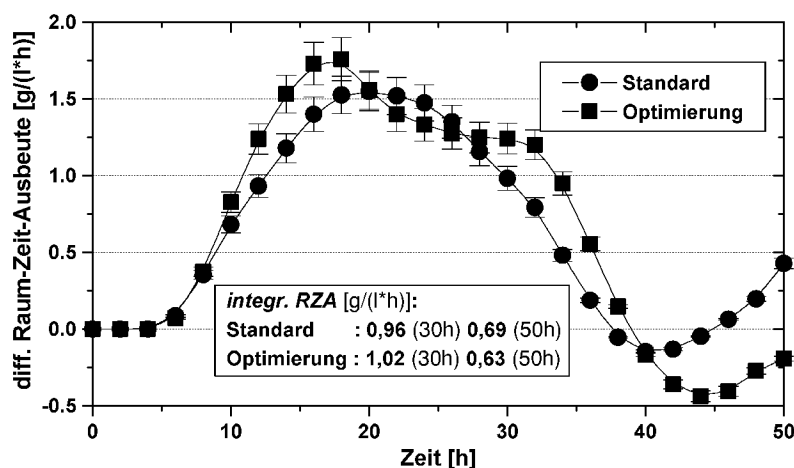


Abbildung 76: Darstellung der differentiellen Raum-Zeit-Ausbeute. Vergleich des Standardfermentationsprozesses mit einem Ansatz zur Prozessoptimierung (*E. coli* 4pF69).

Der unterschiedliche Verlauf der Produktbildung wird insbesondere bei Berechnung der differentiellen RZA sichtbar (Abbildung 76). Hier zeigte sich, dass im Optimierungsansatz zu Beginn der Produktionsphase, mit einer differentiellen RZA von bis 1,77 g/(l*h), signifikant höhere Werte, als im Standardprozess erreicht wurden. Die integrale RZA lag nach 30 h Fermentation mit 1,02 g/(l*h) auch 10 % über der des Standardprozesses (0,96 g/(l*h)). Zum Ende der Fermentation fiel die differentielle RZA im Optimierungsansatz jedoch ab. Bedingt durch die Verdünnung von bereits gebildetem L-Phe, sank die integrale RZA zum Fermentationsende auf 0,63 g/(l*h) ab und lag sogar unter der Standardfermentation mit 0,69 g/(l*h).

6.2.8. EINFLUSS VON D₂EHPA AUF DEN FERMENTATIONSVERLAUF

Zur Untersuchung des Einflusses der D₂EHPA-Zugabe auf den Fermentationsprozess, wurde in Kerosin gelöstes D₂EHPA in den Permeatvolumenstrom dosiert. Im Falle der integrierten Aufarbeitung kann ein Teil der organischen in die wässrige Phase übertreten und somit in die Fermentation gelangen. Experimente zeigten [218], dass mit einem Eintrag von 0,25 g der D₂EHPA-Kerosin Mischung (10 %ig) pro Liter Permeatvolumenstrom gerechnet werden muss. Bei einem Permeatvolumenstrom von 0,51 l/h im Gleichgewicht gelangen demnach in 20 h 2,55 g des Carriers, bzw. 3,2 ml einer 10%igen Lösung aus D₂EHPA-Kerosin, in den Permeatvolumenstrom.

Die 30 h betriebenen Fermentationen zur Untersuchung des Einflusses von D₂EHPA und Kerosin auf Zellwachstum und Produktbildung, wurden in einem 7,5 l Bioreaktor von Silberbach bearbeitet [204]. Die Fermentation wurden unter Zuschaltung des Filtrationsumlaufs durchgeführt (vgl. Abschnitt 5.2.1). Zur Untersuchung des D₂EHPA Einflusses wurde der Versuch wiederholt, jedoch entsprechend Abschnitt 5.2. eine 10 %ige Lösung von D₂EHPA in Kerosin während der Fermentation über den Filtrationsumlauf zugeführt. In beiden Fermentationen wurde nach 7 h die Produktion induziert. Der Filtrationsumlauf wurde nach 10 h gestartet.

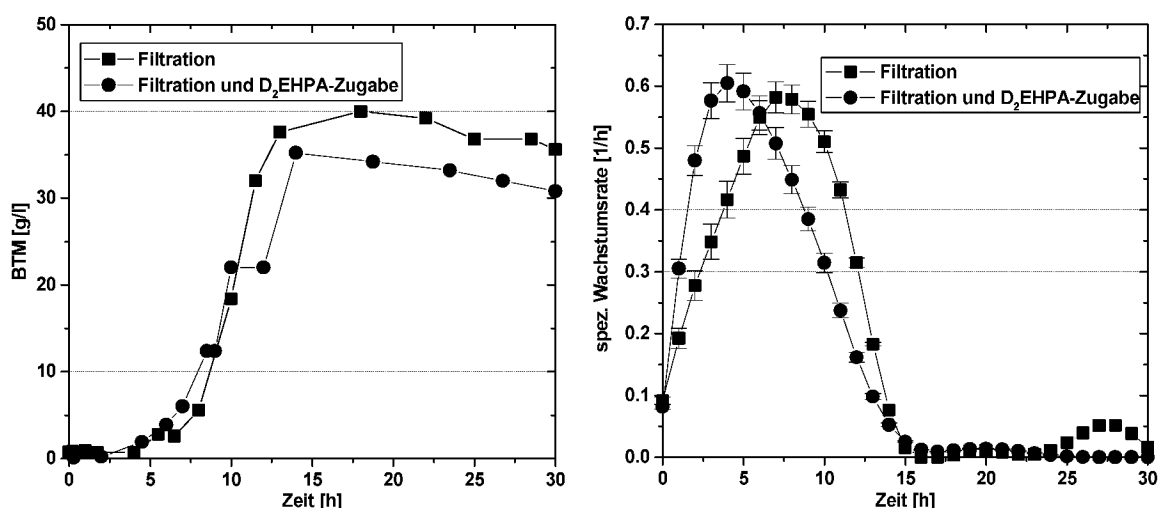


Abbildung 77: Vergleich der Biotrockenmassekonzentration und der spezifischen Wachstumsrate bei einer Fermentation mit und ohne Zugabe eines D₂EHPA-Kerosin-Gemisches. Verwendung eines 7,5 l Bioreaktors mit Filtrationsumlauf. Manuelle Zugabe von Glucose und L-Tyrosin (*E. coli* 4pF20).

Abbildung 77 zeigt, dass die Biotrockenmassekonzentrationen und spezifischen Wachstumsraten in den ersten 10 h vergleichbar waren (der verzögerte Anstieg von μ im Filtrationsversuch stand in Verbindung mit einer geringeren Anfangszellichte und einer verlängerten lag-Phase). Es fällt jedoch auf, dass in dem Versuch mit Zugabe von D₂EHPA-Kerosin, eine um 5,0 g/l verringerte maximale Biotrockenmassekonzentration erreicht wurde.

Während die BTM und spezifische Wachstumsrate sich bei Zugabe von D₂EHPA-Kerosin unwesentlich veränderten, zeigt Abbildung 78 einen deutlichen Einfluss auf Produktbildung und erreichte L-Phe-Konzentration. Bis $t = 13$ h nahmen die spezifische L-Phe-Bildungsrate und -Konzentration den gleichen Verlauf. Anschließend sank in der Fermentation mit Filtrationsumlauf die Produktbildungsrate innerhalb von 5 h von 0,03 g/(g*h) auf 0,01 g/(g*h) ab. Die Produktbildung im Versuch mit D₂EHPA-Kerosin-Zugabe, stieg jedoch weiter auf 0,04 g/(g*h) an und fiel erst nach 23 h Fermentationsdauer wieder unter einen Wert von 0,03 g/(g*h) ab. Dieser deutliche Unterschied führte zu einer L-Phe-Endkonzentration von 7,6 g/l in der Fermentation mit Filtrationsumlauf; im Gegensatz zu 14,7 g/l bei Zugabe von D₂EHPA-Kerosin. Das ist eine Steigerung von 93 %.

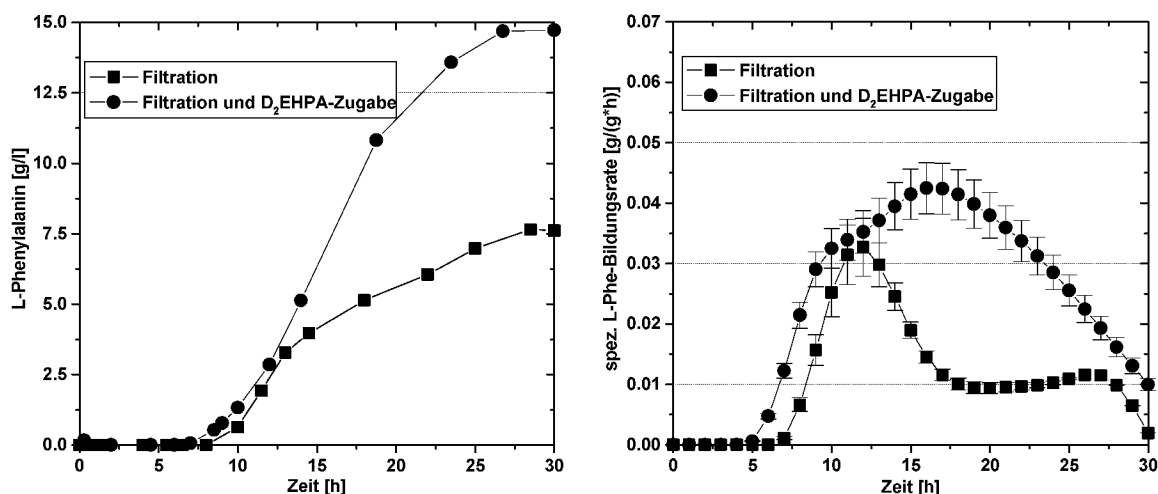


Abbildung 78: Vergleich der L-Phe-Konzentration und der spezifischen L-Phe-Bildungsrate bei einer Fermentation mit und ohne Zugabe eines D₂EHPA-Kerosin-Gemisches. Verwendung eines 7,5 l Bioreaktors mit Filtrationsumlauf. Manuelle Zugabe von Glucose und L-Tyrosin (*E. coli* 4pF20).

Zudem sank der Substratverbrauchsrate in der Fermentation mit D₂EHPA-Kerosin-Zugabe um 20 %. Dies führte zu deutlichen Unterschieden in Bezug auf die integrale, substratspezifische Produktselektivität $Y_{P/S}$ und die integrale Raum-Zeit-Ausbeute. Die molare, integrale $Y_{P/S}$ erhöhte sich von 3,5 % auf 8,9 %, die gewichtsbezogene, integrale RZA von 0,25 g/(l*h) auf 0,49 g/(l*h), bei Zugabe von D₂EHPA-Kerosin.

Eine detaillierte Untersuchung des Einflusses von D₂EHPA findet sich in den Arbeiten von Silberbach [204].

6.3. AUSWIRKUNG DES PRODUKTES AUF DAS BIOLOGISCHE SYSTEM

Um den Einfluss der Produktbildung und der Produktakkumulation reaktionstechnisch zu untersuchen, sollten kontinuierliche Fermentationen durchgeführt werden. Durch Einstellung verschiedener L-Phe-Konzentrationen im Zulaufmedium, sollte unter anderem der Einfluss auf die Produktbildungsrate, Nebenproduktbildung oder Substratselektivität untersucht werden. Des Weiteren sollte die intrazelluläre L-Phe-Konzentration bestimmt werden, die DAHP-Synthaseaktivität und der morphologische Zustand der Zellen durch REM-Aufnahmen sichtbar gemacht werden. Da es sich bei dem eingesetzten Stamm um einen plasmidkodierten L-Phe-Produzenten handelte, wurden zudem Plasmidstabilitätstests durchgeführt. Die Versuche wurden bei verschiedenen L-Phe-Konzentrationen und Durchflussraten von 0,1 und 0,2 h⁻¹ durchgeführt und zudem für $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ einzelne „Steady-states“, unter D₂EHPA-Kerosin-Zugabe wiederholt, um dessen Einfluss zu untersuchen.

Da sich zeigte, dass der eingesetzte Stamm *E. coli* 4pF26 sehr instabil war und das Plasmid schnell verlor (siehe hierzu Abbildung 79 in Abschnitt 6.3.1.), konnten keine eindeutigen, funktionalen Zusammenhänge zwischen zugeführter, und im Reaktor gemessener L-Phe-

Konzentration und gebildeter Nebenprodukte gefunden werden. Eine reaktionstechnische Untersuchung des Einflusses von L-Phe und D₂EHPA-Kerosin war deshalb nicht möglich. Der später verfügbare, chromosomal integrierte Stamm *E. coli* 18 konnte über 300 h kontinuierlich fermentiert werden. Allerdings konnte nur eine volumetrische Produktbildungsrate von 0,02-0,1 g/(l*h) erreicht werden (zum Vergleich *E. coli* 4pF26: 0,5 g/(l*h)), wodurch auch hier kein Vergleich mit den zur Verfügung stehenden Produktionsstämmen möglich war.

In dem folgenden Abschnitt werden deshalb nur Ergebnisse gezeigt, die eine qualitative Aussage über den Zustand der Zellen zulassen. Diese Arbeiten wurden von Engfeld durchgeführt [209].

6.3.1. KONTINUIERLICHE FERMENTATION VON *E. COLI* 4pF26

Die kontinuierlichen Fermentationen wurden mit einem *E. coli* Stamm durchgeführt, der das Plasmid pF26 enthält. Es wurden deshalb für die eingestellten „Steady-States“ Plasmidstabilitätstests durchgeführt.

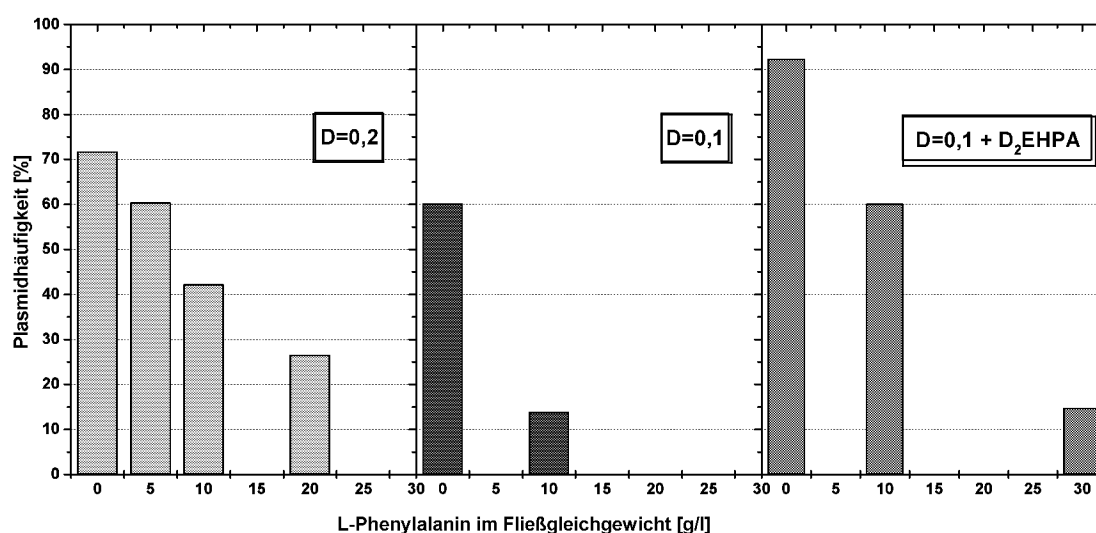


Abbildung 79: Ermittelte prozentuale Plasmidhäufigkeit in Abhängigkeit von der extern zugeführten L-Phe-Konzentration bei verschiedenen Durchflussraten und D₂EHPA-Kerosin-Zugabe (*E. coli* 4pF26).

Abbildung 79 zeigt die prozentuale Plasmidhäufigkeit, d.h. den Anteil an Zellen, die noch über das Plasmid verfügen. Deutlich fällt auf, dass bei Erreichen des „Steady-States“ (nach fünf Verweilzeiten) die Zellen in keinem Ansatz mehr vollständig über das Plasmid verfügten. Zu erkennen war, dass die Plasmidstabilität mit sinkender Durchflussrate ($D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ und 0 g/l L-Phe: 70 %; $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ und 0 g/l L-Phe: 60 %) und steigender L-Phe-Konzentration ($D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ und 0 g/l L-Phe: 70 %; $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ und 20 g/l L-Phe: 25 %) abnahm. Die Zugabe von

D₂EHPA-Kerosin führte zu einer Erhöhung der Plasmidhäufigkeit ($D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ und 0 g/l L-Phe: 60 %; $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ + D₂EHPA und 0 g/l L-Phe: 90 %).

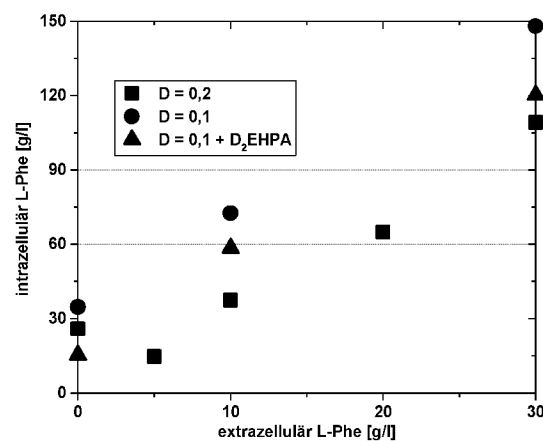


Abbildung 80: Darstellung der intrazellulär gemessenen L-Phe-Konzentration in Abhängigkeit von der extern eingestellten L-Phe-Konzentration bei verschiedenen Durchflussraten und D₂EHPA-Kerosin-Zugabe (*E. coli* 4pF26).

Bei jedem eingestellten „Steady-State“ wurde der mittlere Zelldurchmesser und das Zellvolumen bestimmt. Auf diesen Messungen basierend, sollte die intrazelluläre L-Phe-Konzentration berechnet werden. Da zur Bestimmung der L-Phe-Konzentration jedoch ein Zellpellet verwendet wurde, geht das zwischen den Zellen vorhandene, extrazelluläre L-Phe, sowie Ablagerungen auf den Zellen, mit in die Berechnung ein. Die in Abbildung 80 berechnete maximale, intrazelluläre L-Phe-Konzentration ergab 150 g/l . Da die Berechnung der Konzentration jedoch einen sehr hohen, systematischen Fehler beinhaltet, ist dieser Wert, in Bezug auf die ermittelte Konzentration, nicht richtig. Dennoch ergaben Mehrfachmessungen einen relativen Fehler von unter 10 % und erlauben durchaus die Abschätzung von Tendenzen, wie die Entwicklungen der berechneten Konzentrationen in Abhängigkeit von der extrazellulär eingestellten Produktkonzentration in Abbildung 80 zeigen.

Es fällt auf, dass mit steigender extrazellulärer L-Phe-Konzentration die intrazelluläre Konzentration überproportional zunahm. So stieg die gemessene Konzentration für $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ von 23 % (keine zusätzliche L-Phe-Zufuhr über das Medium) auf 100 % an (bei 30 g/l vorgelegtem L-Phe im Medium). Zudem ist zu erkennen, dass bei Einstellung von $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ die gemessene L-Phe-Konzentration höher war, als bei Einstellung von $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$. Die Zugabe von D₂EHPA-Kerosin führte zu einer geringen Abnahme der intrazellulären Konzentration.

Für jeden eingestellten „Steady-State“ wurde die Aktivität der DAHP-Synthase bestimmt. Es konnte jedoch bei keiner Einstellung eine Aktivität festgestellt werden (Daten nicht grafisch dargestellt) (siehe hierzu auch Abschnitt 6.2.5 Abbildung 71).

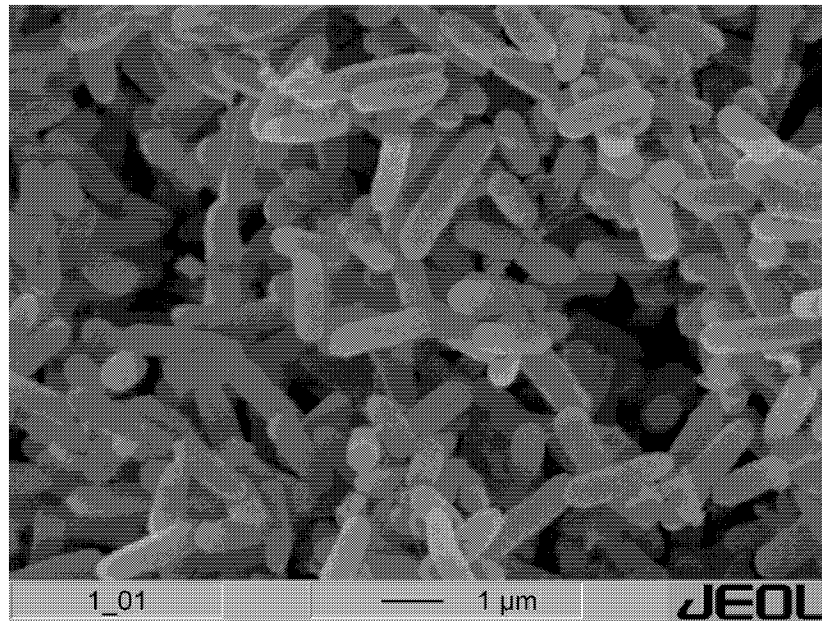


Abbildung 81: REM-Aufnahme von *E. coli* 4pF26 ($D = 0,2$; L-Phe-Vorlage = 5 g/l).

Zur Untersuchung des morphologischen Zustands der Zellen wurden REM-Aufnahmen von verschiedenen „Steady-States“ durchgeführt. Zusätzliche Aufnahmen wurden in Abschnitt 12.8 zusammengefasst.

Abbildung 81 zeigt ein Bild von einer *E. coli*-Kultur, bei der 5,0 g/l L-Phe im Zulauf eingestellt wurden. Die Zellen hatten, verglichen mit anderen Aufnahmen [167], eine normale Größe und Form. Bei den vereinzelt Ablagerungen auf den Zellen handelte es sich wahrscheinlich um Nährsalze oder L-Phe, das während der Präparation der Zellen auskristallisiert ist.

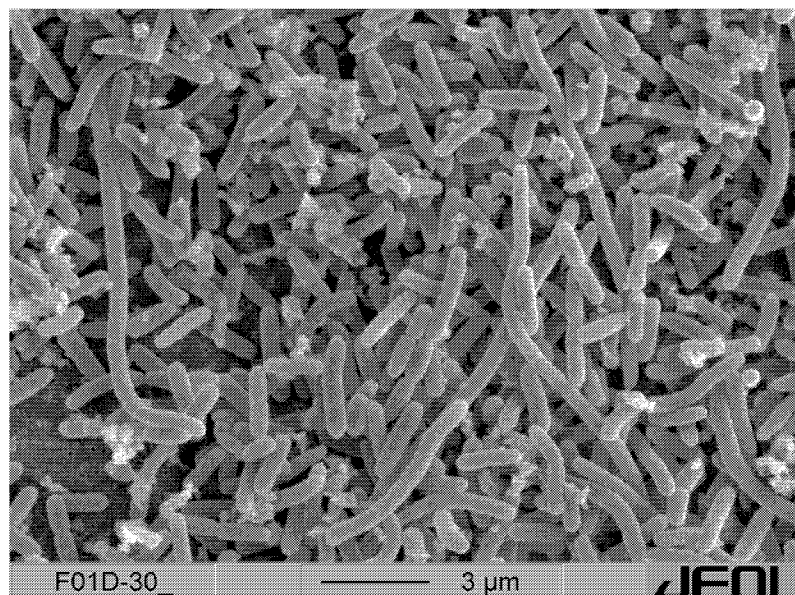


Abbildung 82: REM-Aufnahme von *E. coli* 4pF26 ($D = 0,1$; L-Phe-Vorlage = 30 g/l).

In Abbildung 82 ist eine REM-Aufnahme von einem „Steady-State“ zu sehen, in der eine Konzentration 30 g/l L-Phe im Zulauf eingestellt wurde. Deutlich zu erkennen sind die unphysiologisch langen Zellen. Zudem sind viele Zellen wesentlich dicker und gekrümmt. Zu beachten ist bei dieser Aufnahme der größere Maßstab.

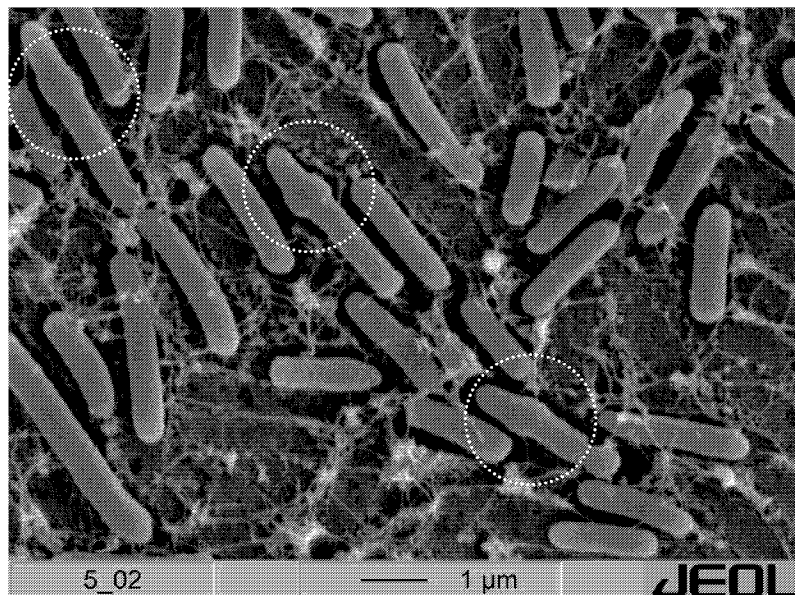


Abbildung 83: REM-Aufnahme von *E. coli* 4pF26 ($D = 0,2$; L-Phe-Vorlage = 30 g/l).

Eine weitere Aufnahme bei 30 g/l zugeführtem L-Phe ist in Abbildung 83 zu sehen. Auch hier sind verlängerte und unphysiologisch geformte Zellen zu erkennen. Zusätzlich fällt auf, dass in einigen Zellen partielle Verdickungen auftraten (siehe Markierung).

Arbeiten von Ganpo [222] zeigten, dass es sich bei diesen Einschlüssen um inclusion bodies handelte (Durchführung von SDS-PAGE-Gelen mit/ohne vorherige Behandlung des Zellhomogenisates mit SDS zur Solubilisierung ungelöster Proteine). Jossek [167] konnte die ungelösten Proteine als DAHP-Synthase, kodiert von dem gentechnisch modifizierten *aroF^{fbr}*, identifizieren (2D-SDS-PAGE und MALDI-TOF-MS).

6.4. FERMENTATIONSTECHNIK IN DER STAMMENTWICKLUNG

In diesem Abschnitt sollen die Ergebnisse zusammengefasst werden, die durch die Fermentation verschiedener, gentechnisch veränderter Stämme erhalten wurden. Die hier beschriebenen Versuche fanden alle im 20 l Bioreaktor unter gleichen Prozessbedingungen und unter Einsatz der entwickelten Regelungsstrategien statt (vgl. Abschnitt 5.4., 5.4.1.). Ein späterer Vergleich der Ergebnisse der dargestellten Fermentationen ist deshalb möglich und wird in Abschnitt 8.6. erfolgen.

6.4.1. AUSGANGSSITUATION

Die Randbedingungen sollten für alle Versuche zur Charakterisierung neuer Stämme gleich gehalten werden. Die Glucosezufuhr wurde bei einer Konzentration von 5,0 g/l geregelt. Die indirekte Regelung der L-Tyrosinzufuhr, auf Basis der Berechnung der volumetrischen Sauerstoffverbrauchsrate, fand unter Verwendung eines Zulauffaktors m von 1,0 statt. Die L-Tyrosinzufuhr wurde bei Messung einer OD_{620nm} von 10 bis 15 gestartet. Mit Erreichen einer optischen Dichte von 80 bis 90 wurde die geregelte Zufuhr gestoppt und das Zellwachstum limitiert. Ab dem Ende der Wachstumsphase wurde eine minimale Zulauftrate von 150 mg/h L-Tyrosinlösung (20 mg/(l*h) bezogen auf das Ausgangsvolumen der Batchphase) für den Erhaltungsstoffwechsel zugeführt. Für die Charakterisierung der Stämme *E. coli* 4pF69, 4pF79, 4pF79pF63 und 4pF81 wurde ein Zulauffaktor m von 2,0 eingestellt, da die hier eingesetzte DAHP-Synthase sensitiv gegenüber L-Tyrosin war und eine stärkere Limitierung notwendig wurde. Da die Wachstumsrate, Sauerstoffverbrauchs- und Kohlendioxidbildungsrate ebenso wie Biotrockenmasse-, Glucose- und L-Tyrosinkonzentration für alle Stämme vergleichbar waren (auf Abweichungen wird in den Abschnitten gesondert hingewiesen), werden diese reaktionstechnischen Größen in diesem Abschnitt beispielhaft für den ersten Produktionsstamm *E. coli* 4pF20 dargestellt.

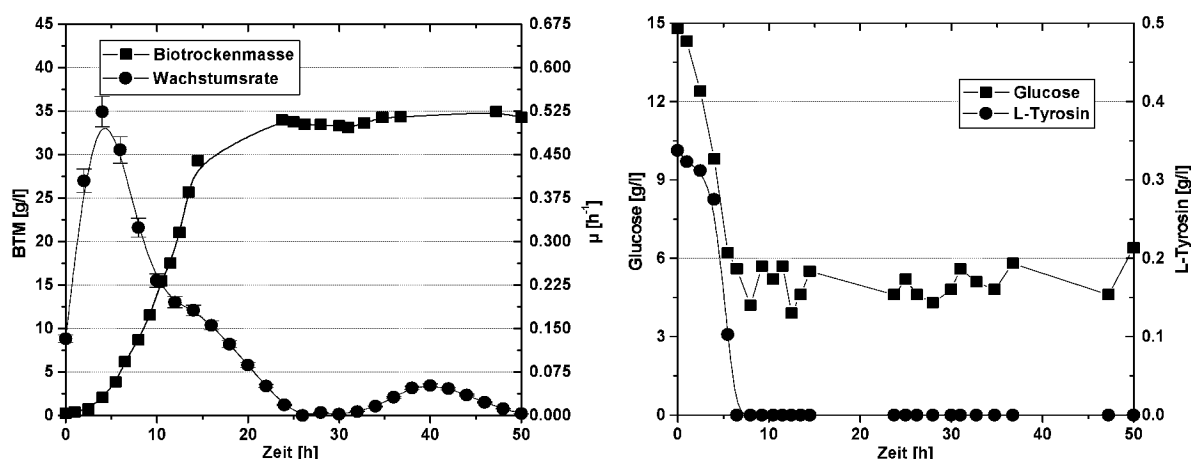


Abbildung 84: Konzentrationsverlauf von Biotrockenmasse, Glucose und L-Tyrosin unter Standardprozessbedingungen. Zudem Berechnung der spezifischen Wachstumsrate (*E. coli* 4pF20).

In Abbildung 84 ist links der Verlauf der Biotrockenmassekonzentration und der spezifischen Wachstumsrate dargestellt. Es zeigte sich, dass die höchsten Wachstumsraten von bis zu $0,5 \text{ h}^{-1}$ in der Batchphase auftraten. Zu Beginn der Zulaufphase ($t = 7 \text{ h}$) sank die Wachstumsrate bedingt durch die limitierte L-Tyrosinzufuhr und die steigende BTM-Konzentration. Ab einer BTM von ungefähr 30 g/l ($\text{OD}_{620\text{nm}}$ von 80-90) wurde das Wachstum limitiert. Trotzdem nahm die BTM bis auf $34 - 35 \text{ g/l}$ zu und blieb dann auf konstantem Niveau. Der in Abbildung 84 rechts dargestellte Verlauf der Glucosekonzentration zeigt, dass innerhalb der Zulaufphase die Glucosekonzentration zwar leichten Schwankungen unterlag, jedoch durch Anpassung der Zuflussrate eine Konzentration von $4,0-6,0 \text{ g/l}$ konstant gehalten wurde. Bei der dargestellten L-Tyrosinkonzentration fällt auf, dass nach Abschluss der Batchphase trotz Zulauf, kein L-Tyrosin mehr nachweisbar war (Nachweisgrenze bei 10 mg/l).

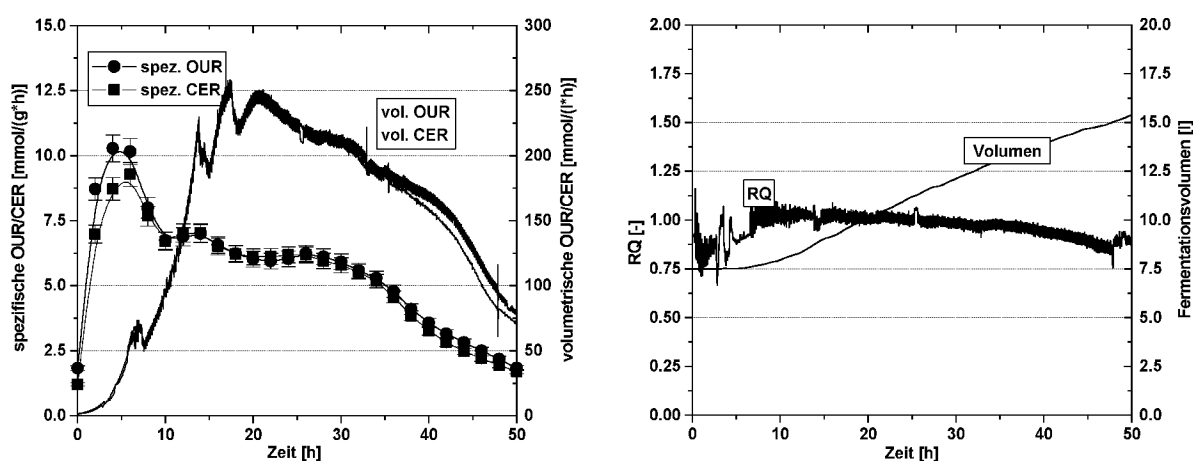


Abbildung 85: Berechnung der spezifischen und volumetrischen Sauerstoffverbrauchs- und Kohlendioxidbildungsrate sowie des Respirationsquotienten (RQ) unter Standardprozessbedingungen. Zudem Verlauf des Fermentationsvolumens im Fed-Batch-Betrieb (*E. coli* 4pF20).

Abbildung 85 zeigt deutlich, dass in der Zulaufphase, trotz der limitierten Aminosäurezufuhr, die volumetrische OUR und CER einen exponentiellen Verlauf nahmen und die spezifische OUR und CER konstant blieben (nach $t = 7 \text{ h}$). Während die spezifische OUR und CER über 25 h konstant waren und erst nach 30 h Fermentationszeit sanken, fiel die volumetrische OUR und CER schon nach 20 h leicht ab. Ab 40 h ist ein deutlicher Abfall erkennbar.

Der RQ lag während der Hauptfermentationsphase immer bei $1,0$. Die Schwankungen zu Beginn der Fermentation sind auf Messschwankungen der Abgasanalytik, verursacht durch geringe Abgasströme, zurückzuführen. Zum Ende der Fermentation sank der RQ auf < 1 . In diesem Zeitraum stieg auch die Nebenproduktbildung an. Die rauschbedingten Schwingungen, die schon in der Berechnung der volumetrischen OUR auftraten, sind auch beim RQ zu erkennen.

Abschließend ist in Abbildung 85 der Verlauf des Reaktorvolumens beispielhaft dargestellt. Das Arbeitsvolumen lag in der Batchphase immer bei $7,5 \text{ l}$. Durch Zufuhr der L-Tyrosin-

lösung, pH-Korrekturmittel (durchschnittlich 800 g Ammoniakwasser) und insbesondere Glucoselösung, stieg das Volumen auf 13 l bis 16 l an.

6.4.2. FERMENTATION VON *E. COLI* 4pF20

Mit *E. coli* 4pF20 erfolgte die Entwicklung des Fermentationsprozesses. Die hier dargestellte Fermentation zeigt die experimentellen Daten, die bei Einsatz des endgültigen Prozesses erhalten wurden, damit ein Vergleich mit den anderen Stämmen möglich ist.

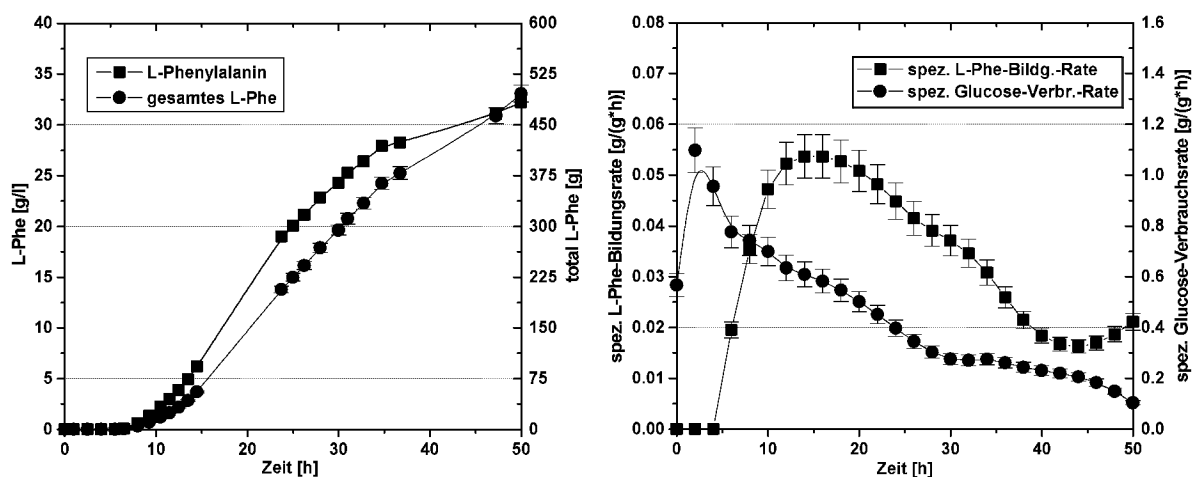


Abbildung 86: Verlauf der L-Phe-Konzentration sowie der gebildeten L-Phe-Gesamtmenge. Berechnung der spezifischen Glucoseverbrauchs- und L-Phe-Bildungsrate unter Standardprozessbedingungen (*E. coli* 4pF20).

Der in Abbildung 86 dargestellte Verlauf der L-Phe-Konzentration zeigt eine stetige Zunahme. Nach 30 h lagen 24,2 g/l L-Phe vor; nach 50 h 32,2 g/l. Insgesamt wurden 496 g L-Phe produziert. Die Darstellung der spezifischen L-Phe-Bildungsrate zeigt, dass bei 16 h das Produktbildungsmaximum mit 0,055 g/(g*h) erreicht wurde. Die spezifische Produktbildungsrate lag zum Ende bei 0,02 g/(g*h). Die spezifische Glucoseverbrauchsrate hatte ihr Maximum in der frühen Batchphase (1,1 g/(g*h)). In der Wachstumsphase bis 16 h betrug der Verbrauch 0,6 - 0,8 g/(g*h) und fiel anschließend bis Fermentationsende annähernd linear auf 0,2 g/(g*h) ab.

Die differentielle, substratbezogene Produktselektivität in Abbildung 87, erreichte ein Maximum von 18,1 % bei 32 h. In der Wachstumsphase und frühen Produktionsphase wurde eine differentielle $Y_{P/S}$ von 12 - 16 % erreicht. Auf diesen Anteil fiel die differentielle $Y_{P/S}$ bis $t = 50$ h wieder ab. Entsprechend der differentiellen $Y_{P/S}$ stieg auch die integrale $Y_{P/S}$ auf 15 - 16 %, blieb anschließend aufgrund der sinkenden Produktbildungs- sowie Substratverbrauchsrate annähernd konstant und erreichte zum Ende der Fermentation 16,2 %.

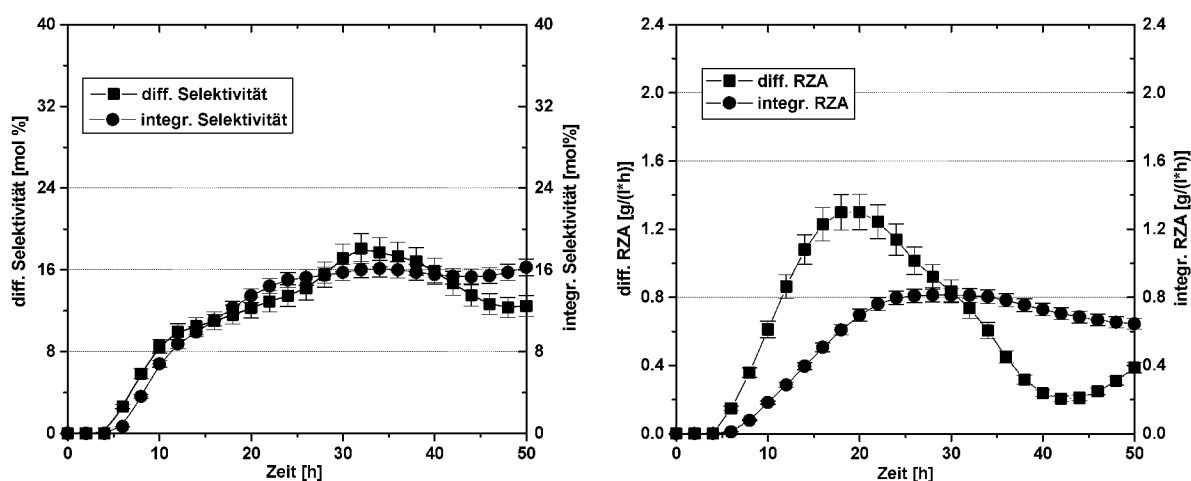


Abbildung 87: Berechnung der differentiellen und integrativen, molaren, substratbezogenen Produktselektivität sowie der differentiellen und integrativen, gewichtsbezogenen Raum-Zeit-Ausbeute unter Standardprozessbedingungen (*E. coli* 4pF20).

Deutlicher zu erkennen ist die Hauptproduktionsphase bei Betrachtung der differentiellen RZA. Das Maximum der Produktbildung wurde nach 20 h mit 1,30 g/(l*h) erreicht. Anschließend fiel die differentielle RZA, dem vorherigen Anstieg entsprechend, wieder ab. Die integrale RZA erreichte nach 24 h mit 0,8 g/(l*h) den höchsten Wert. Erst nach 12 h Fermentation sank die integrale RZA wieder ab.

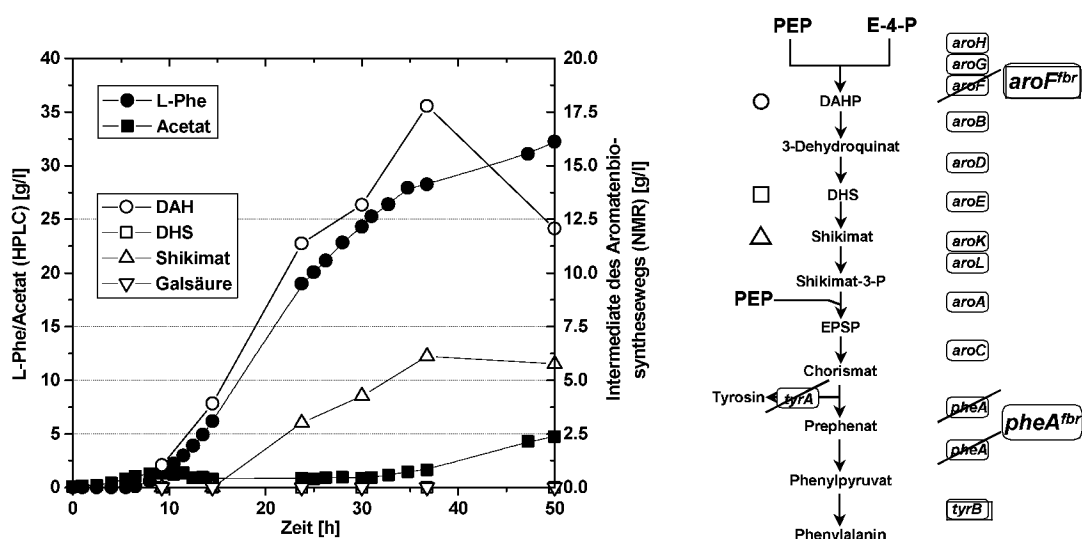


Abbildung 88: Links: Konzentrationsverläufe von L-Phe und Acetat (HPLC) sowie der Intermediate der Aromatenbiosynthese (NMR). Rechts: Aromatenbiosynthesebaum mit den kodierenden Genen und Darstellung der gentechnischen Veränderungen (*E. coli* 4pF20).

Abbildung 88 zeigt den Konzentrationsverlauf der wichtigsten Nebenprodukte. Deutlich zu erkennen ist die geringe Acetatbildung. Nach 36 h Fermentation betrug die Konzentration nur 1,6 g/l. Dafür fällt die intensive Akkumulation an Intermediaten der Aromatenbiosynthese

auf. Nach 24 h wurden neben 18,9 g/l L-Phe 11,3 g/l DAH (dephosphoryliertes erstes Intermediat des Syntheseweges) und 3,0 g/l Shikimat (4. Intermediat), mittels NMR, im Fermentationsüberstand nachgewiesen. Das Maximum wurde nach 37 h erreicht. Zu diesem Zeitpunkt wurden neben 28,2 g/l L-Phe 17,8 g/l DAH und 6,1 g/l Shikimat gemessen.

In den Stamm *E. coli* 4pF20 wurden zwei Gene kloniert (siehe hierzu Tabelle 3 in Abschnitt 4.2.1). Abbildung 88 zeigt rechts, anhand eines Schemas der Aromatenbiosynthese, an welcher Stelle sich die überexprimierten Enzyme befinden.

6.4.3. FERMENTATION VON *E. COLI* 4pF26

Bei *E. coli* 4pF26 wurde in das Plasmid pF20 zusätzlich das Gen der Shikimatkinase II (*aroL^{wt}*) kloniert. Die dargestellte Fermentation verlief unter Standardprozessbedingungen.

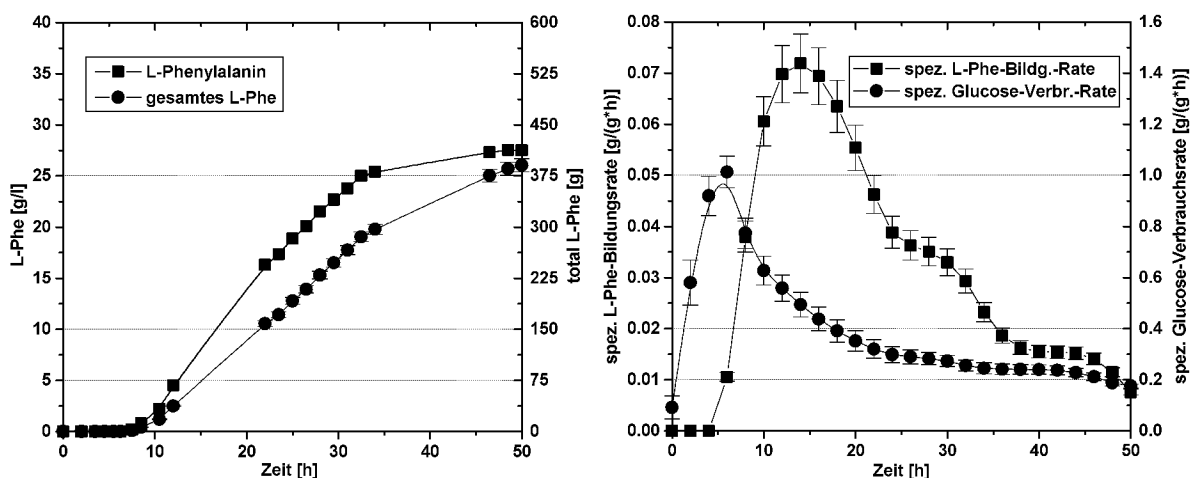


Abbildung 89: Verlauf der L-Phe-Konzentration sowie der gebildeten L-Phe-Gesamtmenge. Berechnung der spezifischen Glucoseverbrauchs- und L-Phe-Bildungsrate unter Standardprozessbedingungen (*E. coli* 4pF26).

Abbildung 89 zeigt, dass die L-Phe-Konzentration bis $t = 32$ h Fermentation auf 25,0 g/l konstant anstieg. In den letzten 16 h verlief die Konzentrationszunahme deutlich langsamer, sodass nach 50 h 27,5 g/l nachweisbar waren. Wie die Zunahme an insgesamt gebildeten L-Phe zeigt, wurde bis Fermentationsende Produkt gebildet. So wurden nach 50 h 390 g L-Phe errechnet. Der spezifische Glucoseverbrauch zeigt, dass während der Batchphase mit 1,0 g/(g*h) der höchste Verbrauch messbar war. Danach sank der spezifische Verbrauch stetig ab und erreichte nach 50 h mit 0,2 g/(g*h) das Minimum. Die spezifische L-Phe-Bildungsrate stieg nach Induktion der Produktbildung ($t = 7$ h) sehr schnell an, und erreichte schon nach 5 h ($t = 12$ h) ein Maximum von 0,07 g/(g*h). Anschließend fiel die spezifische Produktbildung ab ($t = 30$ h; 0,026 g/(g*h)) und lag zum Fermentationsende bei 0,01 g/(g*h).

Auch die in Abbildung 90 dargestellte differentielle $Y_{P/S}$ zeigt in den ersten 16 h einen schnellen Anstieg und erreicht zum Zeitpunkt der Wachstumslimitierung ein Maximum von

19,4 %. Danach fiel die substratbezogene Produktselektivität langsam ab, erreichte nach 30 h 14,5 % und lag zum Fermentationsende bei nur noch 5 %.

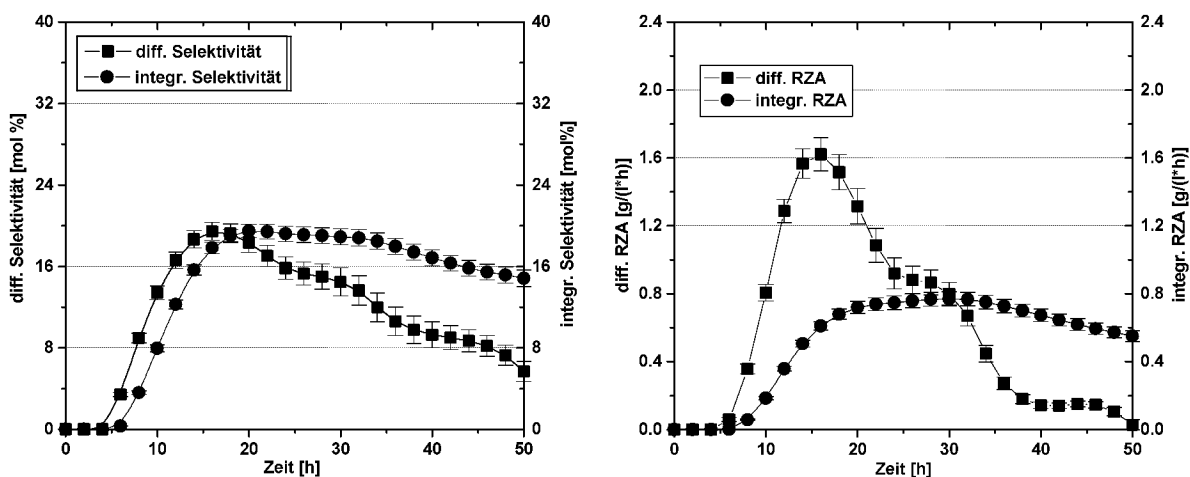


Abbildung 90: Berechnung der differentiellen und integrativen, molaren, substratbezogenen Produktselektivität sowie der differentiellen und integrativen, gewichtsbezogenen Raum-Zeit-Ausbeute unter Standardprozessbedingungen (*E. coli* 4pF26).

Die integrale $Y_{P/S}$ erreichte nach 20 h eine Selektivität von 19,2 %. Nach 30 h Fermentation sank der Wert auf 18,8 % ab, und fiel dann aufgrund der weiter sinkenden differentiellen $Y_{P/S}$ auf 14,5 % ab. Der Zusammenbruch der Produktbildung zeigt sich noch deutlicher in der differentiellen RZA. Nachdem der Wert nach 16 h Fermentation 1,6 g/(l*h) erreichte, fiel die differentielle RZA und blieb ab $t = 40$ h bei nur 0,14 g/(l*h) konstant. Die integrale RZA erreichte nach 16 h 0,61 g/(l*h), nach 30 h ein Maximum von 0,77 g/(l*h), fiel dann jedoch ab und lag nach 50 h bei 0,55 g/(l*h).

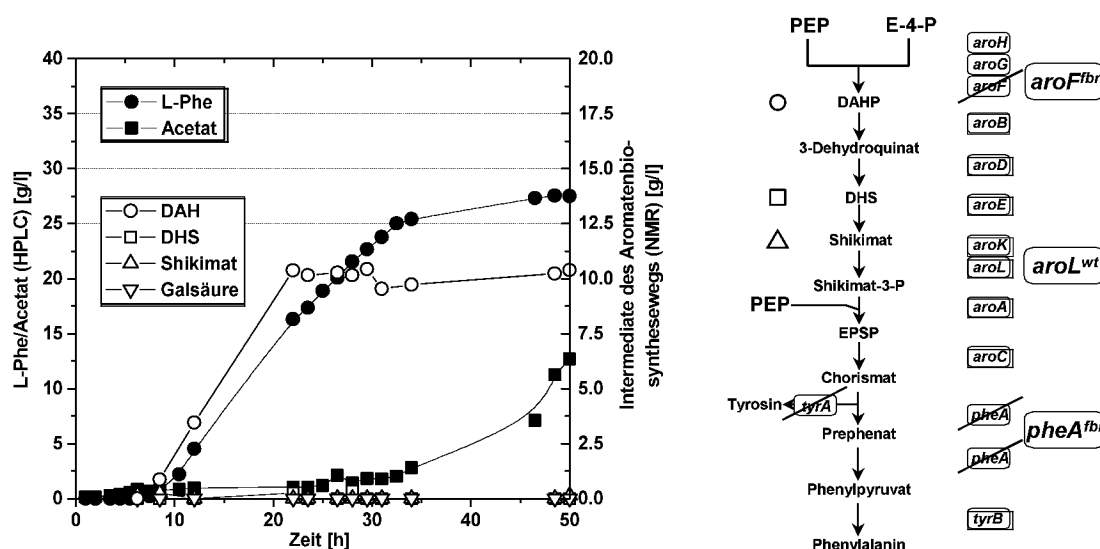


Abbildung 91: Links: Konzentrationsverläufe von L-Phe und Acetat (HPLC) sowie der Intermediate der Aromatenbiosynthese (NMR). Rechts: Aromatenbiosynthesebaum mit den kodierenden Genen und Darstellung der gentechnischen Veränderungen (*E. coli* 4pF26).

In Abbildung 91 sind die Konzentrationsverläufe der wichtigsten Nebenprodukte zusammengefasst. Die Acetatbildung stieg bis 32 h langsam auf 2,0 g/l an. Während die Produktbildung und damit der Anstieg der L-Phe-Konzentration abnahm, stieg die Acetatkonzentration ab diesem Zeitpunkt schnell an und erreichte nach 50 h ein Wert von 12,7 g/l. Die Messung der Intermediatkonzentrationen zeigt, dass Shikimat kaum noch akkumulierte und nach 50 h nur 0,14 g/l gemessen wurden. Die volumetrische DAH-Bildungsrate erreichte zu Beginn der Produktionsphase annähernd die L-Phe-Bildungsrate. Nach 22 h konnten 10,3 g/l DAH und 16,3 g/l L-Phe gemessen werden. Danach erfolgte keine weitere DAH-Akkumulation im Fermentationsüberstand.

In den Stamm *E. coli* 4pF20 wurden drei Gene kloniert (siehe hierzu Tabelle 3 in Abschnitt 4.2.1). Abbildung 91 zeigt rechts, anhand eines Schemas der Aromatenbiosynthese, an welcher Stelle sich die überexprimierten Enzyme befinden.

6.4.4. FERMENTATION VON *E. COLI* 4pF69

Das Plasmid von *E. coli* 4pF69 basiert auf pF26, jedoch wurde das L-Tyrosinresistente Gen *aroF^{br}* gegen das Wildtyp-Gen *aroF^{wt}* ausgetauscht. Im Verlauf der weiteren Prozessentwicklung (vgl. Abschnitt 6.2.5) wurde der Zulauffaktor m von 1,0 auf 2,0 erhöht. Zudem wurde in diesem Versuch mit einer 20 % höheren Biotrockenmassekonzentration fermentiert. Abgesehen hiervon verlief die Fermentation unter Standardprozessbedingungen.

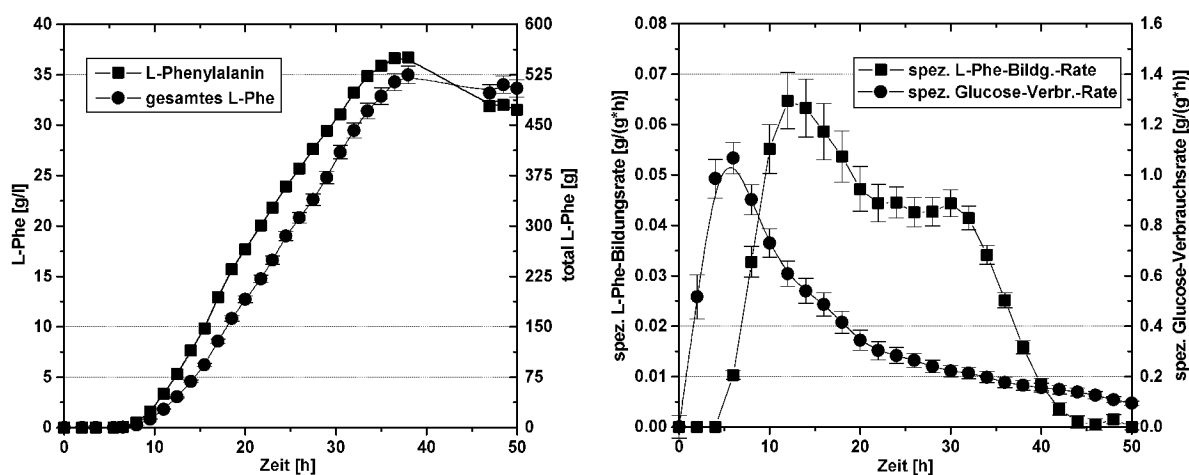


Abbildung 92: Verlauf der L-Phe-Konzentration sowie der gebildeten L-Phe-Gesamtmenge. Berechnung der spezifischen Glucoseverbrauchs- und L-Phe-Bildungsrate unter Standardprozessbedingungen (*E. coli* 4pF69).

Bei Betrachtung der L-Phe-Konzentration in Abbildung 92 fällt der sehr gleichmäßige Anstieg der L-Phe-Konzentration auf. Nach 30 h wurde bereits eine Konzentration von 30,8 g/l und eine L-Phe-Gesamtmenge von ungefähr 400 g erreicht. Die maximale L-Phe-Konzentration lag nach 38 h bei 36,7 g/l (524 g L-Phe). Anschließend sank die Konzentration bis Fermentationsende auf 31,5 g/l und 504 g L-Phe-Gesamtmenge ab.

Das Maximum der spezifischen Glucoseverbrauchsrate lag bei 6 h mit 1,1 g/(g*h). Danach fiel der Verbrauch kontinuierlich ab und erreichte nach 50 h 0,1 g/(g*h). Die spezifische L-Phe-Bildungsrate stieg in dieser Fermentation sehr schnell an. Nach 12 h wurden 0,065 g/(g*h) gebildet. Anschließend sank die Produktbildung ab, blieb jedoch bis $t = 32$ h mit 0,04 g/(g*h) auf hohem Niveau konstant. Nach einem weiteren Rückgang der L-Phe-Produktion gegen 0 wurde in den letzten 6 h der Fermentation kein L-Phe mehr gebildet.

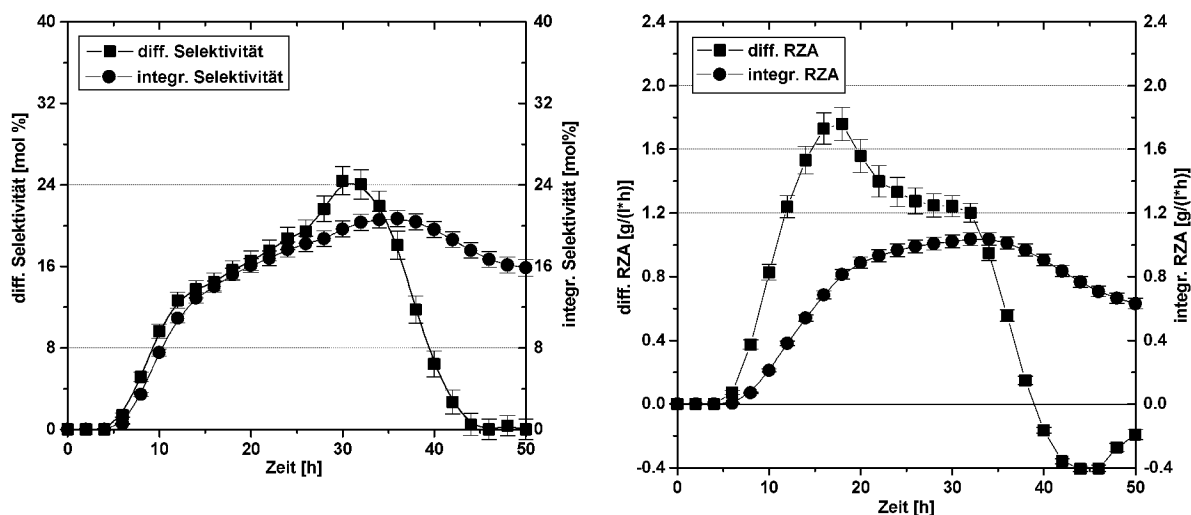


Abbildung 93: Berechnung der differentiellen und integrativen, molaren, substratbezogenen Produktselektivität sowie der differentiellen und integrativen, gewichtsbezogenen Raum-Zeit-Ausbeute unter Standardprozessbedingungen (*E. coli* 4pF69).

Die differentielle $Y_{P/S}$ stieg schnell an. Abbildung 93 zeigt eine Selektivität von 15,6 % nach 18 h. Danach war eine langsamere, jedoch stetig steigende differentielle $Y_{P/S}$ erkennbar. Das Maximum wurde in diesem Versuch mit 24,4 % erst nach 30 h erreicht. In den folgenden 12 h fiel der Wert schnell ab. Ab $t = 44$ h erfolgte keine L-Phe-Produktion mehr. Das späte Maximum in der differentiellen $Y_{P/S}$ wird auch in der integralen Selektivität deutlich. Nach 18 h wurden 15,1 % erreicht, nach 36 h konnte jedoch eine integrale Selektivität von 20,7 % verzeichnet werden. Zum Fermentationsende sank diese wieder auf 15,8 % ab.

Am deutlichsten wird der Einbruch in der Produktbildung bei Betrachtung der differentiellen RZA. Nachdem eine maximale differentielle RZA von 1,8 g/(l*h) erreicht ($t = 18$ h), und bis 32 h ein Niveau von über 1,2 g/(l*h) konstant gehalten wurde, fiel mit der Produktbildung auch die differentielle RZA auf 0 ab. Bedingt durch die Verdünnung des bereits vorhandenen L-Phe, errechneten sich für die differentielle RZA negative Werte.

Die integrale RZA lag nach 16 h bei 0,68 g/(l*h) und erreichte nach 30 h ein Maximum von 1,0 g/(l*h). Dieses Niveau konnte insgesamt 10 h gehalten werden. Durch den Einbruch in der Produktbildung sank die integrale RZA jedoch wieder auf 0,63 g/(l*h) ab ($t = 50$ h).

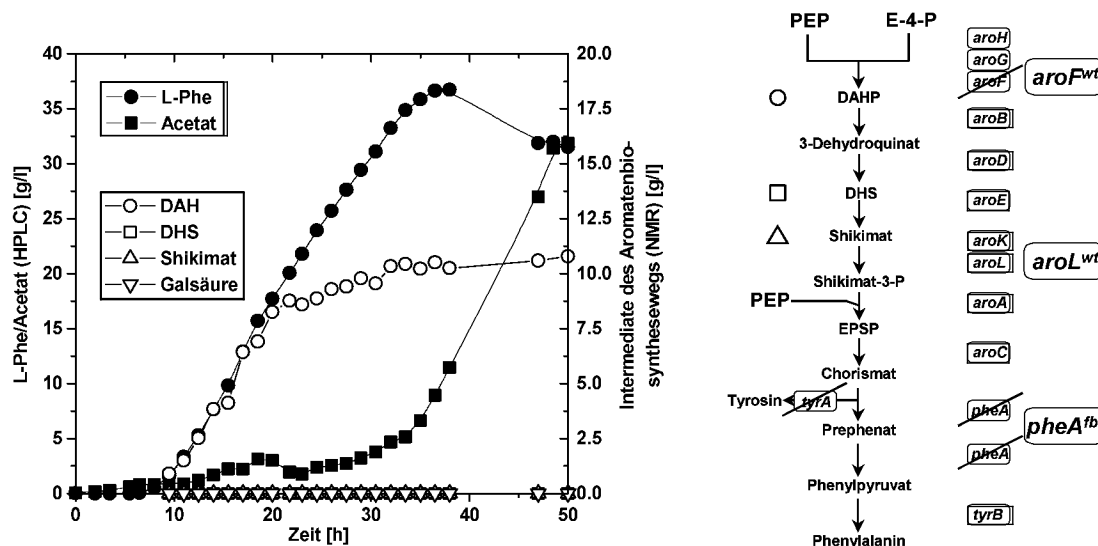


Abbildung 94: Links: Konzentrationsverläufe von L-Phe und Acetat (HPLC) sowie der Intermediate der Aromatenbiosynthese (NMR). Rechts: Aromatenbiosynthesebaum mit den kodierenden Genen und Darstellung der gentechnischen Veränderungen (*E. coli* 4pF69).

Bei den in Abbildung 94 dargestellten Konzentrationsverläufen fällt deutlich auf, dass Acetat sehr früh gebildet wurde. Schon nach 30,5 h waren 3,8 g/l Acetat nachweisbar. Mit sinkender Produktbildung nahm die Acetatkonzentration fast einen exponentiellen Verlauf und erreichte nach 50 h 31,8 g/l. Die L-Phe-Konzentration lag bei 31,5 g/l. Die Analyse der Intermediate der Aromatenbiosynthese zeigt, dass nach 20 h 8,2 g/l DAH gebildet wurden. Diese Konzentration stieg bis Versuchsende noch auf 10,8 g/l an.

In den Stamm *E. coli* 4pF69 wurden drei Gene kloniert (siehe hierzu Tabelle 3 in Abschnitt 4.2.1). Abbildung 94 zeigt rechts, anhand eines Schemas der Aromatenbiosynthese, an welcher Stelle sich die überexprimierten Enzyme befinden.

6.4.5. FERMENTATION VON *E. COLI* 4pF79

Das Plasmid von *E. coli* 4pF79 basiert auf pF69, jedoch wurde das Gen für die Shikimatkinase II (*aroL^{wt}*) gegen das Gen der 3-Dehydroquinate synthase (*aroB^{wt}*) ausgetauscht. Der Zulauffaktor in der L-Tyrosinregulation wurde von 1,0 auf 2,0 erhöht. Davon abgesehen verlief die Fermentation unter Standardprozessbedingungen.

Bei dem in Abbildung 95 dargestellten Verlauf der L-Phe-Konzentration fällt auf, dass schon nach 25 h 30,4 g/l L-Phe produziert wurden. Die maximale L-Phe-Konzentration von 35,2 g/l wurde nach 32,5 h erreicht. Anschließend nahm die L-Phe-Konzentration, bedingt durch die Verdünnung der konstant bleibenden L-Phe-Gesamtmenge von 455 g, bis zum Fermentationsende auf 32,6 g/l ab. Der Verlauf der spezifischen Glucoseverbrauchsrate zeigt, dass zu Fermentationsbeginn ein Maximum von 0,9 g/(g*h) erreicht wurde, dass stetig abnahm und nach 50 h bei 0,1 g/(g*h) lag. Erkennbar ist jedoch, dass die Abnahme des

Glucoseverbrauchs, gegenüber anderen Stämmen, um 4 h verzögert war. Dadurch lag die spezifische Verbrauchsrate bis ungefähr 25 h um $0,1 \text{ g/(g}\cdot\text{h)}$ höher.

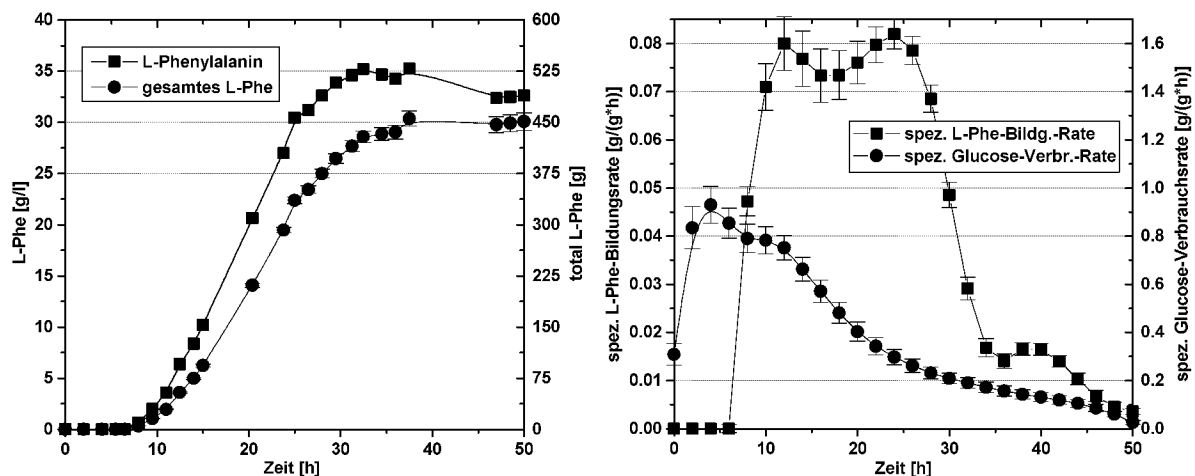


Abbildung 95: Verlauf der L-Phe-Konzentration sowie der gebildeten L-Phe-Gesamtmenge. Berechnung der spezifischen Glucoseverbrauchs- und L-Phe-Bildungsrate unter Standardprozessbedingungen (*E. coli* 4pF79).

Bei Betrachtung der spezifischen L-Phe-Bildungsrate fällt deutlich der schnelle Anstieg auf. 4 h nach Induktion erreichte die Produktbildung einen Wert von $0,071 \text{ g/(g}\cdot\text{h)}$. Die spezifische Bildungsrate stieg anschließend sogar auf $0,082 \text{ g/(g}\cdot\text{h)}$ an. Dieses Niveau wurde für 18 h gehalten. Danach kam es zu einem schnellen Abfall der Produktbildung. Zum Fermentationsende sank die spezifische Produktbildung auf $0,01$ bis $0,005 \text{ g/(g}\cdot\text{h)}$.

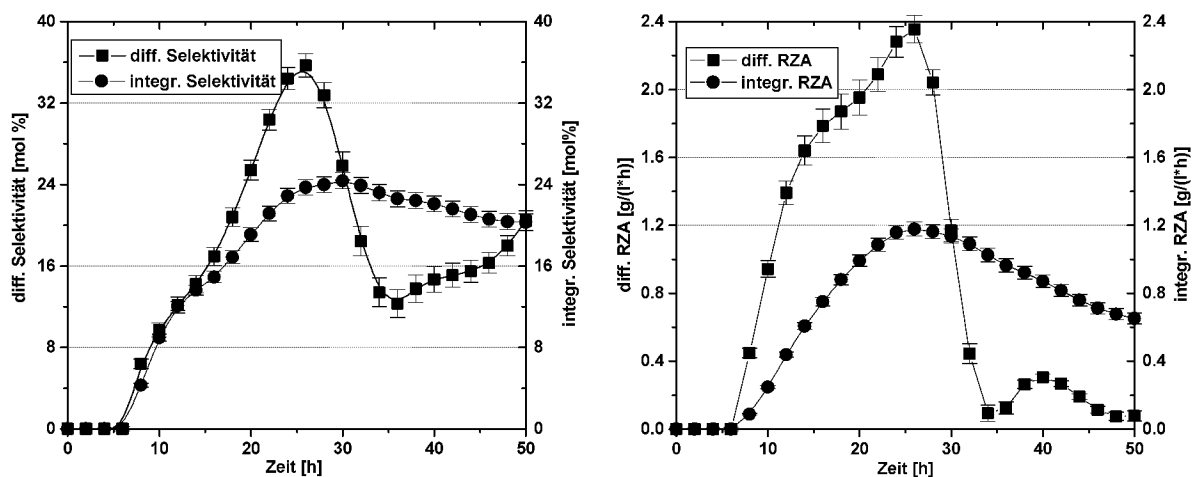


Abbildung 96: Berechnung der differentiellen und integrativen, molaren, substratbezogenen Produktselektivität sowie der differentiellen und integrativen, gewichtsbezogenen Raum-Zeit-Ausbeute unter Standardprozessbedingungen (*E. coli* 4pF79).

In Abbildung 96 fällt der lange, konstante Anstieg der differentiellen Selektivität auf. Nach 16 h wurde bereits eine molare Produktselektivität von 17,0 % erreicht. Das Maximum lag nach 26 h bei 35,7 %. Anschließend sank die differentielle $Y_{P/S}$ auf 12,3 % ab ($t = 36$ h), stieg jedoch zum Fermentationsende wieder auf 20,4 % an. Die hohe differentielle $Y_{P/S}$ führte nach 30 h zu einem Maximum der integralen Selektivität von 24,4 %. Bedingt durch den Einbruch in der Produktbildung, sank jedoch auch dieser Wert wieder auf 20,3 % ab ($t = 50$ h).

Wie in Abbildung 96 zu erkennen ist, stieg auch die differentielle RZA schnell an und erreichte nach 14 h bereits 1,64 g/(l*h). Die maximale differentielle RZA lag nach 26 h bei 2,35 g/(l*h). Der Einbruch in der Produktbildung führte in den folgenden 8 h zu einem Abfall auf nahezu 0. Zwar stieg die differentielle RZA wieder an, blieb jedoch unter 0,4 g/(l*h). Die integrale RZA nahm vom Induktionszeitpunkt an stetig zu, lag nach 16 h Fermentation bei 0,75 g/(l*h) und erreichte nach 26 h ein Maximum von 1,18 g/(l*h). Insgesamt konnte in diesem Versuch für über 10 h eine integrale RZA von $> 1,0$ g/(l*h) gehalten werden. Zum Fermentationsende sank der Wert jedoch auf 0,65 g/(l*h) ab.

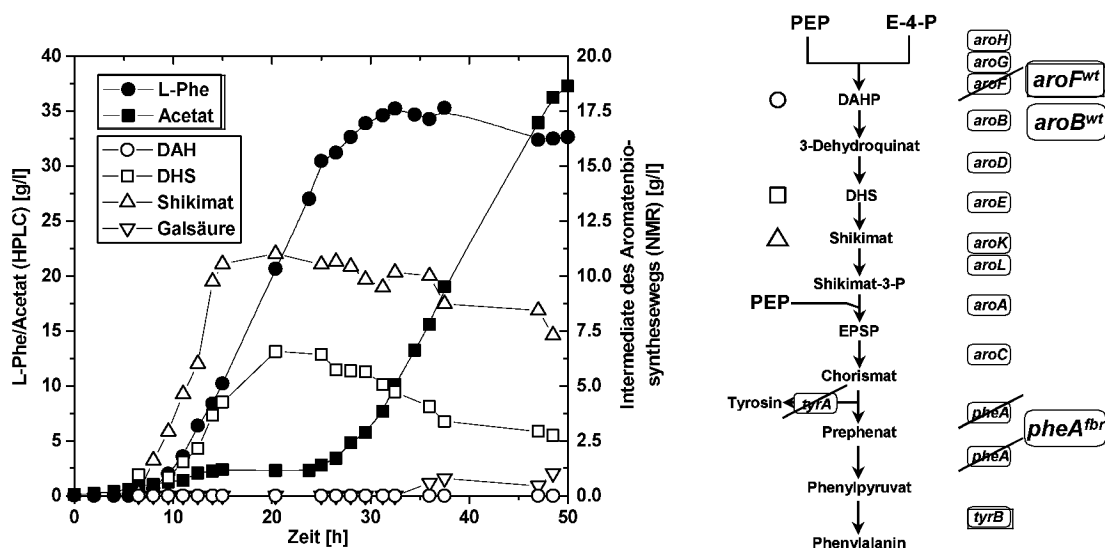


Abbildung 97: Links: Konzentrationsverläufe von L-Phe und Acetat (HPLC) sowie der Intermediate der Aromatenbiosynthese (NMR). Rechts: Aromatenbiosynthesebaum mit den kodierenden Genen und Darstellung der gentechnischen Veränderungen (*E. coli* 4pF79).

Abbildung 97 zeigt, dass bis zum Erreichen einer L-Phe-Konzentration von 27,0 g/l nach 24 h 2,3 g/l Acetat gebildet wurden. Mit Abnahme der Produktbildung stieg die Acetatkonzentration im Reaktor an und lag nach 30 h über 5,0 g/l. Bis Fermentationsende akkumulierten 37,2 g/l Acetat (L-Phe-Konzentration 32,6 g/l).

Bei Betrachtung der Vorläufermetabolite der L-Phe-Synthese fällt auf, dass über den gesamten Fermentationszeitraum kein DAH nachzuweisen war. Stattdessen war eine deutliche Zunahme der Shikimat- und DHS-Konzentration erkennbar. Nach 15 h Fermentationszeit lag die Shikimatkonzentration bei 10,5 g/l, die von DHS bei 4,3 g/l. Im gleichen Zeitraum wurden 10,2 g/l L-Phe produziert. Nach 20 h wurden sogar 6,3 g/l DHS gemessen. Ab diesem Zeitpunkt nahmen die Metabolitkonzentrationen wieder ab und lagen

zum Fermentationsende bei 7,3 g/l (Shikimat) bzw. 2,7 g/l (DHS). In der letzten Phase der Fermentation akkumulierte zusätzlich Galsäure bis zu einer Konzentration von 1,0 g/l.

In den Stamm *E. coli* 4pF79 wurden drei Gene kloniert (siehe hierzu Tabelle 3 in Abschnitt 4.2.1). Abbildung 97 zeigt rechts, anhand eines Schemas der Aromatenbiosynthese, an welcher Stelle sich die überexprimierten Enzyme befinden.

6.4.6. FERMENTATION VON *E. COLI* 4pF79pF63

In den Stamm *E. coli* 4pF79 wurde zu dem bereits vorhandenen Plasmid pF79 das Plasmid pF63 transformiert. In dieses war das Gen für die Shikimatkinase II (*aroL^{wt}*) kloniert. Der Zulauffaktor in der L-Tyrosinregelung wurde von 1,0 auf 2,0 erhöht. Abgesehen hiervon verlief die Fermentation unter Standardprozessbedingungen.

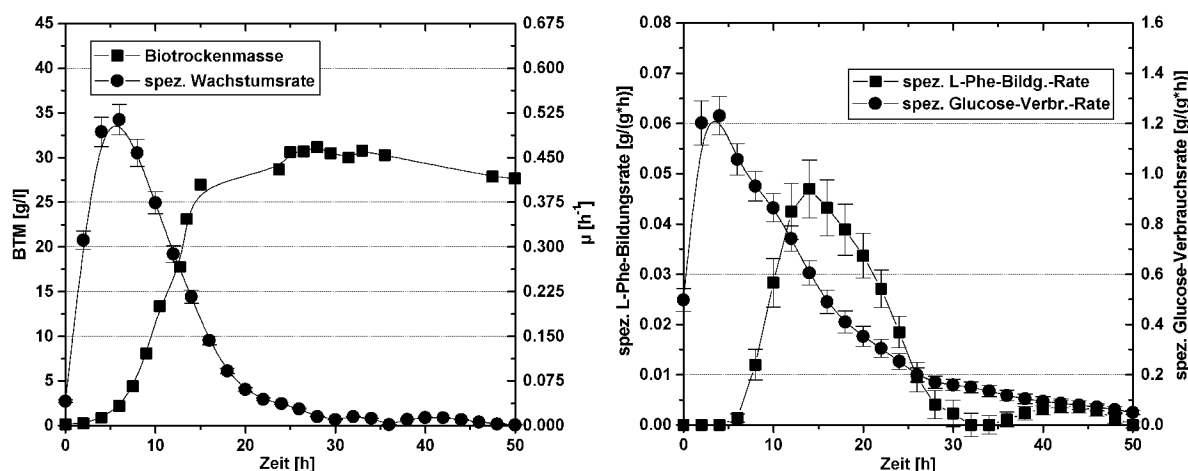


Abbildung 98: Verlauf der Biotrockenmassekonzentration sowie Berechnung der Wachstumsrate und der spezifischen Glucoseverbrauchs- und L-Phe-Bildungsrate unter Standardprozessbedingungen (*E. coli* 4pF79pF63).

Abbildung 98 zeigt die Biotrockenmassekonzentration. Der in dieser Fermentation gemessene Verlauf und die spezifische Wachstumsrate waren mit den zuvor beschriebenen Versuchen vergleichbar, jedoch lag die Endkonzentration 5 g/l unterhalb der sonst erreichten BTM. Die spezifische Glucoseverbrauchsrate stieg hingegen auf 1,2 g/(g*h) an und lag bis zu einer Fermentationszeit von 25 h um 0,1 - 0,2 g/(g*h) über dem spezifischen Substratverbrauch vergleichbarer Fermentationen. Die spezifische L-Phe-Bildungsrate erreichte nach 14 h ein Maximum mit 0,047 g/(g*h), fiel anschließend jedoch schnell ab und lag ab $t = 30$ h bei annähernd 0.

Abbildung 99 zeigt weitere Veränderungen im Fermentationsverlauf. Aufgrund der signifikant höheren spezifischen Glucoseverbrauchs- und geringeren Produktbildungsrate, wurde jedoch auf eine weitere quantitative Charakterisierung dieses Stammes verzichtet.

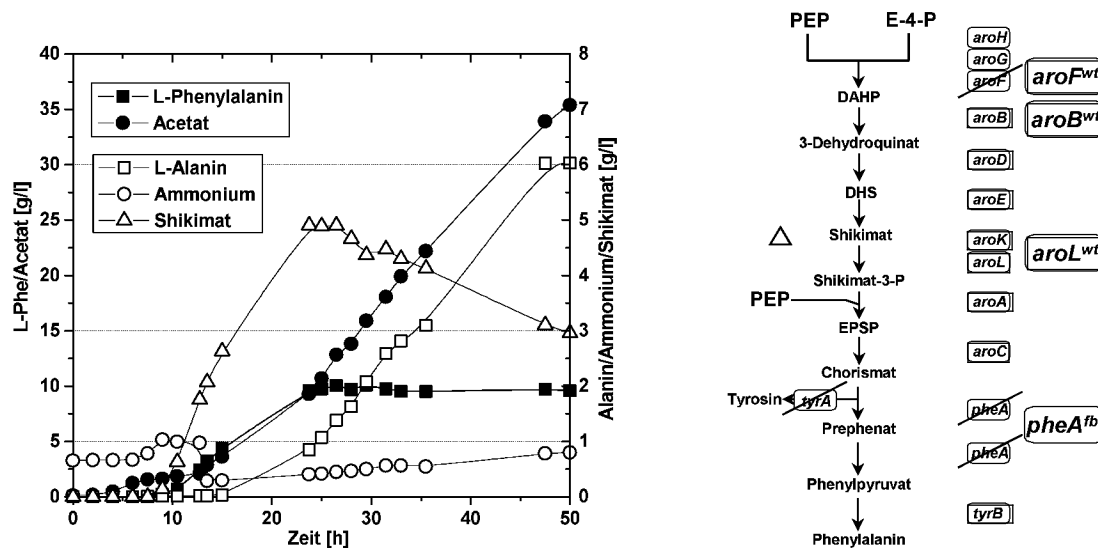


Abbildung 99: Links: Konzentrationsverläufe von L-Phe und Acetat (HPLC) sowie der Intermediate der Aromatenbiosynthese (NMR). Rechts: Aromatenbiosynthesebaum mit den kodierenden Genen und Darstellung der gentechnischen Veränderungen (*E. coli* 4pF79pF63).

Deutlich fällt auf, dass die Konzentration an L-Phe sehr langsam anstieg. Nach 15 h wurden 4,4 g/l, nach 24 h 9,6 g/l L-Phe gemessen. Ab diesem Zeitpunkt blieb die Produktkonzentration konstant. In den ersten 24 h der Fermentation wurde neben L-Phe jedoch 4,9 g/l Shikimat gebildet. Die Konzentration des Intermediats sank bis Fermentationsende wieder auf 3,0 g/l ab. Zudem wurde in diesem Versuch ab Induktionsbeginn signifikant mehr Acetat gebildet. Nach 15 h betrug die Konzentration bereits 3,6 g/l, nach 24 h 9,3 g/l. Im Gegensatz zum L-Phe stieg die Acetatkonzentration bis Fermentationsende weiter an und erreichte 35,4 g/l. Neben Acetat traten in diesem Versuch sehr hohe Konzentrationen an L-Alanin und Ammonium auf. Nach 24 h konnten im Fermentationsüberstand 0,84 g/l L-Alanin und 0,4 g/l Ammonium nachgewiesen werden. Beide Konzentrationen stiegen weiter an und erreichten nach 50 h 6,03 g/l (L-Alanin) bzw. 0,8 g/l (Ammonium).

In den Stamm *E. coli* 4pF79pF63 wurden vier Gene auf zwei Plasmiden kloniert (siehe hierzu Tabelle 3 in Abschnitt 4.2.1). Abbildung 99 zeigt rechts, anhand eines Schemas der Aromatenbiosynthese, an welcher Stelle sich die überexprimierten Enzyme befinden (*aroL^{wt}* lag auf dem zweiten Plasmid).

6.4.7. FERMENTATION VON *E. COLI* 4pF81

Bei *E. coli* 4pF81 wurde in das Plasmid pF69 zusätzlich das Gen für die 3-Dehydroquinsatsynthese (*aroB^{wt}*) kloniert. Der Zulauffaktor in der L-Tyrosinregulation wurde von 1,0 auf 2,0 erhöht. Die eingestellte Biotrockenmassekonzentration lag mit 28 g/l bis 30 g/l ungefähr 15 % niedriger als unter Normalbedingungen. Davon abgesehen verlief die Fermentation unter Standardprozessbedingungen. Die Arbeiten wurden von Bujnicki durchgeführt [220]. Aus technischen Gründen war es nicht möglich, die Fermentation

vollständig auszuwerten. Die angegebenen Konzentrationen und dargestellten Berechnungen basieren deshalb ausschließlich auf NMR-Daten.

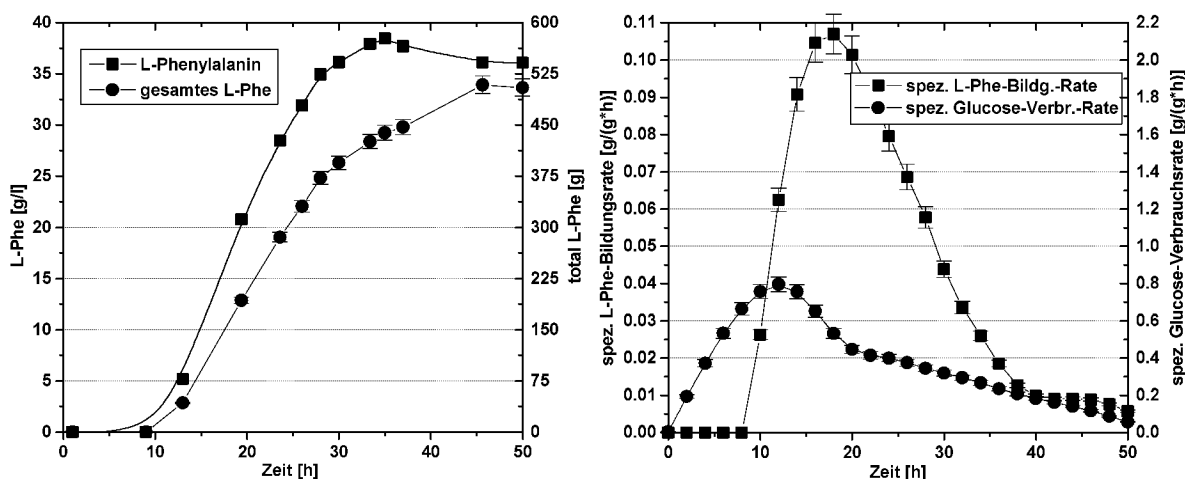


Abbildung 100: Verlauf der L-Phe-Konzentration sowie der gebildeten L-Phe-Gesamtmenge. Berechnung der spezifischen Glucoseverbrauchs- und L-Phe-Bildungsrate (veränderte Skalierung) unter Standardprozessbedingungen (*E. coli* 4pF81).

Die in Abbildung 100 dargestellte L-Phe-Konzentration zeigt, dass schon nach 25 h eine Produktkonzentration von 30 g/l überschritten wird. Nach 35 h Fermentationsdauer wurde eine L-Phe-Konzentration von 38,5 g/l gemessen, die bis $t = 50$ h wieder auf 36,1 g/l verdünnt wurde. Die gebildete L-Phe-Gesamtmenge erreichte über 500 g. Die spezifische Glucoseverbrauchsrate nimmt bei *E. coli* 4pF81, mit einem Maximum von 0,8 g/(g*h) einen Verlauf, der mit den anderen Stämmen vergleichbar ist. Die im Vergleich zu den anderen Fermentationen geringere Biotrockenmassekonzentration führt, bei vergleichbaren volumetrischen Produktbildungsrate, zu einem Anstieg der spezifischen Produktbildung. Mit annähernd 0,11 g/(g*h) bei $t = 18$ h (veränderte Skalierung in Abbildung 100) liegt die Rate höher als in jedem anderen Versuch. Es fällt jedoch auf, dass die Produktbildung, nach dem Erreichen des Maximums, sofort wieder abfällt und nach insgesamt 36 h unter einen Wert von 0,02 g/(g*h) absinkt.

Bei Betrachtung der Produktselektivität (Abbildung 101) fällt auf, dass die differentielle $Y_{P/S}$, im Vergleich zu anderen Versuchen, nur langsam abfällt und nicht 0 erreicht. Das Maximum liegt nach 20 h bei 27,8 %. Auch in diesem Versuch sinkt die integrale Produktselektivität nach dem Erreichen des Maximums von 25,7 % ($t = 24$ h) (veränderte Skalierung in Abbildung 101) in der zweiten Fermentationshälfte ab. In diesem Zeitraum ist der Substratverbrauch jedoch nur gering, wodurch sich nach 50 h immer noch eine integrale $Y_{P/S}$ von 22,7 % ergibt.

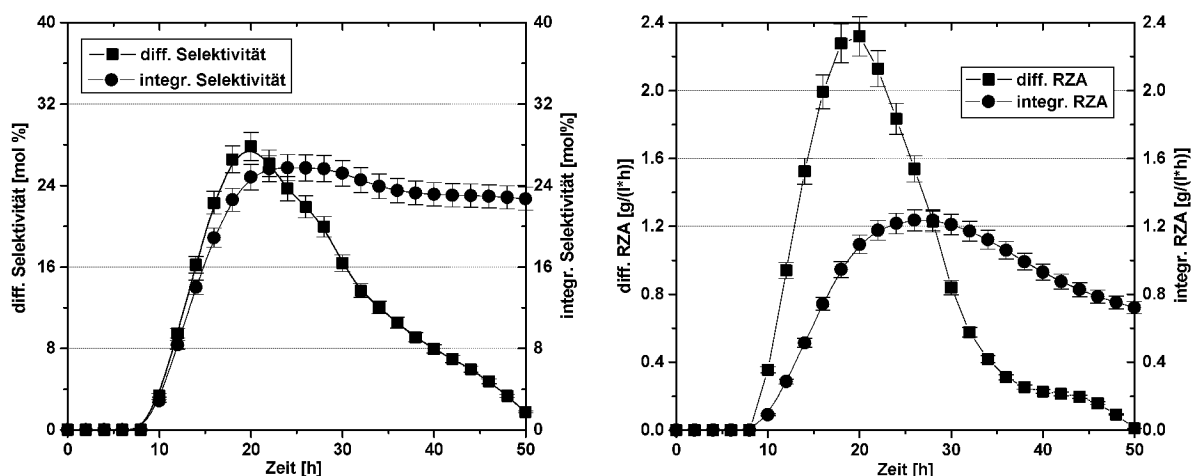


Abbildung 101: Berechnung der differentiellen und integrativen, molaren, substratbezogenen Produktselektivität sowie der differentiellen und integrativen, gewichtsbezogenen Raum-Zeit-Ausbeute (veränderte Skalierung) unter Standardprozessbedingungen (*E. coli* 4pF81).

Eine Zweiteilung der Produktionsphase zeigt sich auch im Verlauf der differentiellen RZA. Zwar wird schon nach 20 h eine differentielle RZA von 2,32 g/(l*h) erreicht, jedoch fällt dieser Wert bis Fermentationsende auf annähernd 0 ab. Die integrale RZA steigt nach ungefähr 24 h Fermentationszeit auf einen Wert von 1,2 g/(l*h) an und bleibt für 12 h auf diesem hohen Niveau konstant (veränderte Skalierung in Abbildung 101). Insgesamt konnte für über 16 h eine integrale RZA von > 1,0 g/(l*h) aufrechterhalten werden. Der Abfall der Produktbildung führt jedoch in den letzten 12 h der Fermentation zu einem Absinken der integralen RZA auf 0,72 g/(g*l).

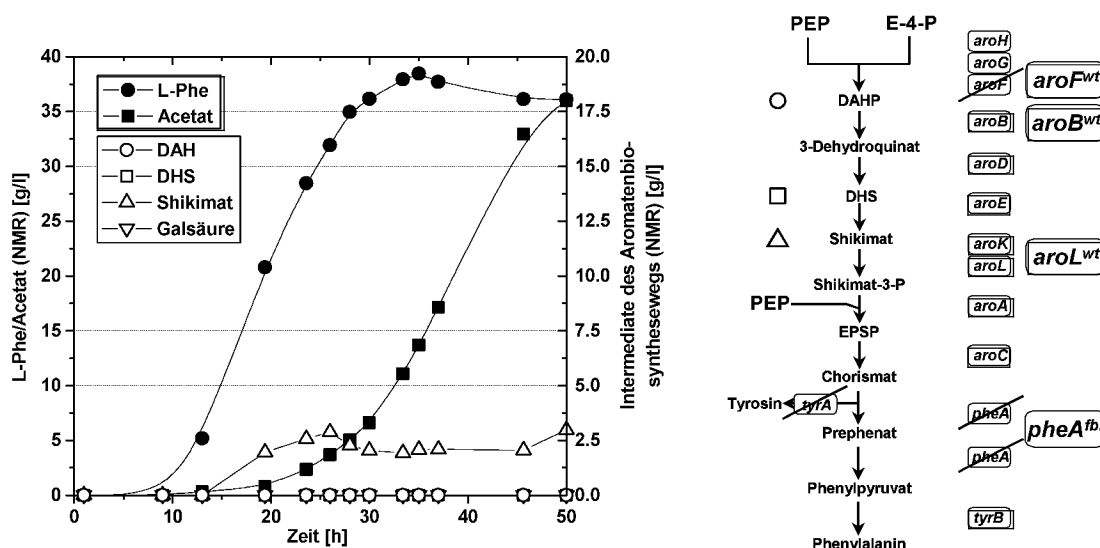


Abbildung 102: Links: Konzentrationsverläufe von L-Phe und Acetat (NMR) sowie der Intermediate der Aromatenbiosynthese (NMR). Rechts: Aromatenbiosynthesebaum mit den kodierenden Genen und Darstellung der gentechnischen Veränderungen (*E. coli* 4pF81).

Bei den in Abbildung 102 gezeigten Konzentrationsverläufen handelt es sich ausschließlich um NMR-Messungen. Es fällt auf, dass schon nach weniger als 25 h eine L-Phe-Konzentration von über 30 g/l erreicht wurde. Zu diesem Zeitpunkt lag die Acetatkonzentration bei ungefähr 2,5 g/l und stieg von diesem Moment exponentiell an. Die L-Phe-Konzentration nahm nun langsamer zu und erreichte nach 35 h 38,5 g/l. Zum Ende der Fermentation lag die Produktkonzentration mit 36,1 g/l auf dem gleichen Niveau wie die Acetatkonzentration (36,0 g/l). Die Analyse der Intermediate zeigt, dass weder DAH noch DHS über den Fermentationsverlauf nachweisbar waren. Lediglich geringe Konzentrationen an Shikimat (2 bis 3 g/l) akkumulierten in der Zeit von 15 h bis 25 h und wurden bis zum Fermentationsende nicht wieder verbraucht.

In den Stamm *E. coli* 4pF81 wurden vier Gene kloniert (siehe hierzu Tabelle 3 in Abschnitt 4.2.1). Abbildung 102 zeigt rechts, anhand eines Schemas der Aromatenbiosynthese, an welcher Stelle sich die überexprimierten Enzyme befinden.

6.4.8. FERMENTATION VON *E. COLI* 18

Der Stamm *E. coli* 18 war mit *E. coli* 4pF26 identisch, jedoch lagen die überexprimierten Gene nicht auf einem Plasmid, sondern chromosomal integriert, vor. Der Zulauffaktor in der L-Tyrosinregelung wurde von 1,0 auf 2,0 erhöht. Abgesehen hiervon verlief die Fermentation unter Standardprozessbedingungen.

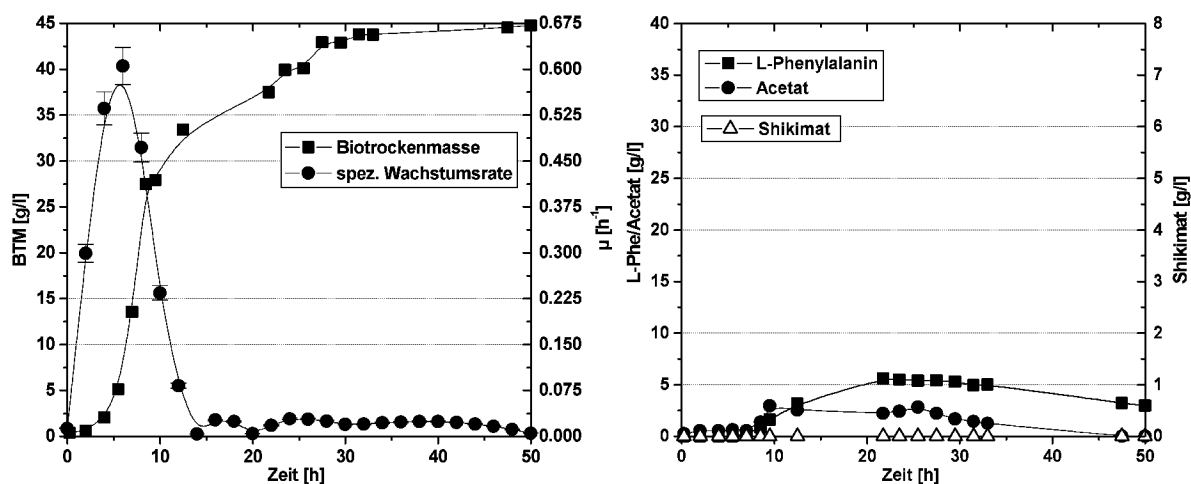


Abbildung 103: Konzentrationsverläufe von Biotrockenmasse, L-Phe, Acetat und Shikimat sowie Berechnung der Wachstumsrate unter Standardprozessbedingungen (*E. coli* 18).

Bei der in Abbildung 103 dargestellten spezifischen Wachstumsrate fällt auf, dass der Kurvenverlauf, mit einem Maximum von $0,6 \text{ h}^{-1}$, im Vergleich zu anderen Versuchen, insgesamt höhere Raten aufwies. Nach nur 12,5 h konnte bereits eine Biotrockenmassekonzentration von 33,4 g/l gemessen werden. Trotz L-Tyrosinlimitierung stieg das BTM, bei nur geringen Wachstumsraten, weiter an und erreichte nach 29,5 h 42,9 g/l. Zum Versuchsende wurden 44,7 g/l Biotrockenmasse gemessen.

Wie Abbildung 103 rechts zeigt, wurde während der Fermentation wenig Acetat gebildet. Die maximale Konzentration wurde mit 2,9 g/l nach 9,5 h erreicht. Bei Fermentationsende war Acetat nicht nachweisbar. Es wurde jedoch nur eine maximale L-Phe-Konzentration von 5,6 g/l ($t = 22$ h) mit diesem Stamm erreicht. Zum Ende wurden nur 3,0 g/l nachgewiesen. Aus diesem Grund wird auf eine quantitative Analyse dieses Stammes verzichtet.

6.5. INTEGRATION DER AUFARBEITUNG

Die Integration der Aufarbeitung in den Fermentationsprozess hatte zum Ziel, L-Phe kontinuierlich und selektiv abzutrennen, um dadurch eine Produktakkumulation zu vermeiden [223, 224].

Die Demonstration der integrierten Aufarbeitung sollte im Pilotmaßstab erfolgen. Hierfür wurden Fermentationen im 300 l Bioreaktor (200 l Arbeitsvolumen) durchgeführt (vgl. Abschnitt 5.5.). Die Ergebnisse eines Versuches in diesem Maßstab unter Standardprozessbedingungen wurden in Abschnitt 6.2.6. zusammengefasst.

Zur Bereitstellung von Permeat für die Reaktiv-Extraktion, wurde ein Hohlfaserultrafiltrationsmodul mit einer Trenngrenze von 500 kDa über einen Umlauf (vgl. Abschnitt 5.5.1.) in den Fermentationsprozess integriert. Die Fläche dieser Membran betrug 4,4 m² und sollte, ab dem Ende der Wachstumsphase, einen Mindestpermeatstrom von 15 l/h zur Verfügung stellen.

Zur Untersuchung des Einflusses der Biomasserückhaltung wurde eine Fermentation mit Biomasserückhaltung, jedoch ohne Produktabtrennung, durchgeführt. In diesem Versuch wurde das Permeat aus der Ultrafiltration direkt in den Bioreaktor zurückgeführt. Es sollte keine Konzentrations- bzw. Volumenänderung im Prozess auftreten (Ergebnisse in Abschnitt 6.5.2.).

Im zweiten Versuch wurde das Permeat aus der Biomasserückhaltung in die Anlage zur Reaktiv-Extraktion überführt. Dort wurde L-Phe selektiv abgetrennt und das produktarme Permeat direkt in den Bioreaktor zurückgefördert. In der Anlage zur L-Phe-Abtrennung wurde das Produkt, nach der Extraktion in die organische Phase, direkt in eine wässrige Akzeptorphase (Extrakt) rückextrahiert. Aufgrund des, im Vergleich zum Arbeitsvolumen des Bioreaktor, kleineren Volumens des Extraktes von 50 l, wurde das L-Phe dort aufkonzentriert [218] (Ergebnisse in Abschnitt 6.5.3).

Bevor diese Versuche durchgeführt werden konnten, wurde unter anderem die Filtrationsleistung eines Hohlfaserultrafiltrationsmoduls im kleineren Maßstab bestimmt. Diese Versuche dienten der Auslegung eines geeigneten Moduls zur Permeatabtrennung im Pilotmaßstab. Zudem wurde in diesen Versuchen der Einfluss der Filtration auf Wachstum und Produktbildung untersucht (Ergebnisse in Abschnitt 6.5.1).

6.5.1. VERFAHRENTWICKLUNG ZUR PERMEATABTRENNUNG

Für die Auslegung eines geeigneten Filtrationsmoduls zur Permeatabtrennung, waren Voruntersuchungen notwendig. In diesen Arbeiten wurde das in Abschnitt 4.5.1. beschriebene Hohlfaserultrafiltrationsmodul, inklusive der Schlauchpumpe 504 U, im 7,5 l Bioreaktor eingesetzt. Zur Auslegung eines Moduls für den Pilotmaßstab war es wichtig, den notwendigen Förderstrom (Vermeidung von Fouling und Verblockung), den einzustellenden Transmembrandruck und die effektive Filtrationsleistung zu ermitteln. Zudem sollte untersucht werden, welchen Einfluss der Filtrationsumlauf auf den Prozessverlauf nimmt.

Die für 30 h durchgeführten Fermentationen zur Charakterisierung des Hohlfasermoduls und zur Untersuchung des Einflusses des Umlaufs, wurden in einem 7,5 l Bioreaktor von Silberbach durchgeführt [204]. Als Referenzfermentation wurde ein Versuch ohne Umlauf durchgeführt. In den Fermentationen wurde nach 7 h die Produktion induziert. Der Filtrationsumlauf wurde nach 10 h gestartet.

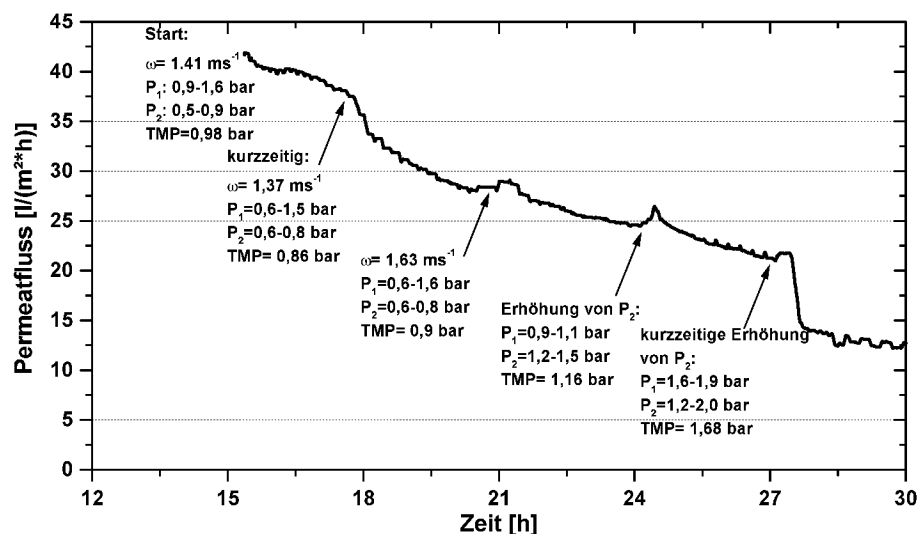


Abbildung 104: Verlauf des Permeatflusses während einer Testfermentationen mit dem Pumpenmodell 604 U/R. P_1 : Druck am Moduleingang, P_2 : Druck am Modulausgang.

Abbildung 104 zeigt den erreichten Permeatvolumenstrom in einer Testfermentation mit angeschlossenem Filtrationsumlauf (Volumen des Umlaufs 0,12 l; Verweilzeit 1,9 s). In diesem Versuch wurde, abweichend von den weiteren Fermentationen, die Pumpe 604 U/R eingesetzt. Zu erkennen ist, dass bei Einstellung eines $TMP < 0,9$ bar, sofort der Permeatfluss abnahm. Eine sofortige Erhöhung des TMP (nicht eingezeichnet) konnte den Permeatfluss nicht wieder steigern. Die Pumpe 604 U/R erzeugte eine starke Pulsation. Bei maximaler Pumpleistung betrug die Druckdifferenz am Moduleingang bis zu 1,3 bar, gegenüber 0,4 bar beim Pumpenmodell 503 U. Dadurch wurden Material und Mikroorganismen stärker belastet. Die Erhöhungen des Transmembrandrucks bewirkten, durch einen erhöhten Zulaufvolumen-

strom, eine Verringerung der Konzentrationsgrenzschicht, doch wurde durch den gesteigerten Druck die Konvektion erhöht. Letztlich stellte sich der alte Zustand wieder ein.

Einer Erhöhung des TMP auf 1,675 bar (in Abbildung 104 nach 27 h), folgte sofort die Abnahme des Permeatflusses. Die Druckerhöhung führte, durch eine Verstärkung des konvektiven Transports, zu einer Vergrößerung der Grenzschichtdicke auf der Membran. Der TMP wurde sofort wieder gesenkt (nicht eingezeichnet), der Permeatvolumenstrom blieb jedoch auf niedrigem Niveau, da die Komponenten des Zulaufs, durch den erhöhten Druck, verstärkt in die Poren der Membran gedrückt wurden. Durch die folgende Senkung des TMP konnten sie nicht wieder herausgelöst werden. Erst in den letzten zwei Stunden dieser Testfermentation wurde ein Gleichgewichtszustand im Modul erreicht. Vorher nahm der Permeatfluss nahezu linear mit der Zeit ab.

In einer weiteren Testfermentation stellte sich der Permeatvolumenstrom mit der Pumpe 603 U/R nach 13 h wieder auf einen Wert von 12 l/(m²*h) ein, wobei Pumpleistung und Transmembrandruck nicht verändert wurden. Dieser Wert konnte mit dem Modell 504 U schon nach 8 Stunden realisiert werden (Abbildung 105). Dieses Modell wurde deshalb für alle weiteren Versuche eingesetzt.

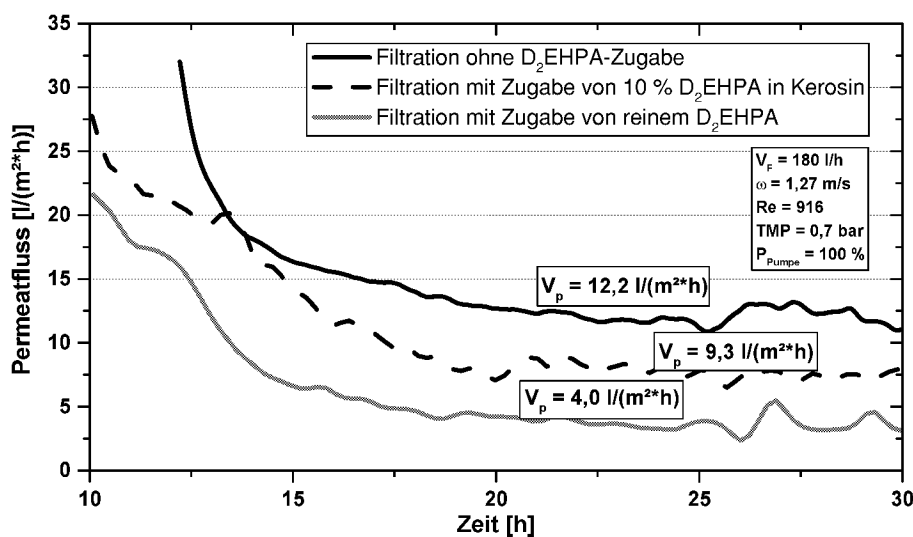


Abbildung 105: Permeatfluss in verschiedenen Fermentationen mit Biomasserückhaltung und Einsatz des Pumpenmodells 504 U. Während der Filtration Zugabe von D₂EHPA bzw. von D₂EHPA-Kerosin.

Kerosin und D₂EHPA können sich an die Polysulfonmembran anlagern, wodurch der Permeatfluss gesenkt werden kann. Abbildung 105 zeigt drei Fermentationen mit Filtrationsumlauf. Neben der Vergleichsfermentation, wurde in einem Ansatz reines D₂EHPA, im anderen eine 10 %ige D₂EHPA-Kerosinlösung zugegeben. Deutlich ist eine Abnahme der Filtrationsleistung und dementsprechend des Permeatflusses erkennbar. Im Vergleich zu einem Permeatvolumenstrom von 12,2 l/(m²*h), ohne Zugabe des Carriers,

wurden bei Zufuhr des reinen D₂EHPA nur noch 4,0 l/(m²*h), erreicht. Zur Abschätzung der Filtrationsleistung für die später folgende Fermentation, unter Einbindung der Aufarbeitung, war jedoch die Zugabe der 10 %igen D₂EHPA-Kerosinmischung entscheidend, da es im Hybridprozess immer zu einem Eintrag des Gemisches aus Carrier und Lösungsmittel kommt. In diesem Versuch konnte ein stabiler Permeatfluss von 9,3 l/(m²*h) gemessen werden.

Eine detaillierte Beschreibung des Einflusses von D₂EHPA und Kerosin auf die Filtrationsleistung, sowie die verfahrenstechnische Auslegung und Reinigung des Moduls, findet sich in den Arbeiten von Silberbach [204].

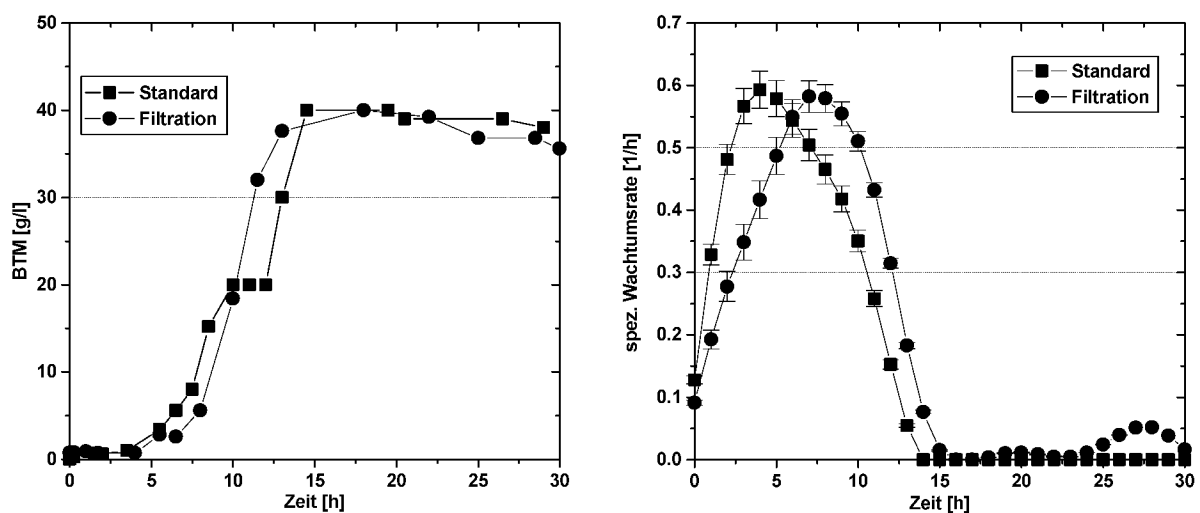


Abbildung 106: Vergleich der Biotrockenmassekonzentration und der spezifischen Wachstumsrate bei einer Fermentation mit und ohne Zuschaltung des Filtrationsumlaufs. Verwendung eines 7,5 l Bioreaktors und manuelle Zugabe von Glucose und L-Tyrosin (*E. coli* 4pF20).

Der Einfluss einer 10 %igen D₂EHPA-Kerosinzufuhr auf den Fermentationsverlauf wurde bereits in Abschnitt 6.2.8 dargestellt. An dieser Stelle sollen nur die Auswirkungen des Filtrationsumlaufs auf die Fermentation beschrieben werden. Abbildung 106 zeigt den Verlauf der Biotrockenmassekonzentration und der spezifischen Wachstumsrate bei einer Standardfermentation im 7,5 l Reaktor mit und ohne Zuschaltung des Filtrationsumlaufs. Die Verläufe der Zustandsgrößen unterschieden sich in den Versuchen nicht (der verzögerte Anstieg von μ im Filtrationsversuch stand in Verbindung mit einer geringeren Anfangszell-dichte und einer verlängerten lag-Phase). Ein Einfluss der Filtration auf die Biomasse war nicht erkennbar.

In Abbildung 107 ist die L-Phe-Konzentration und die spezifische Produktbildungsrate dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, dass die L-Phe-Konzentration, in dem Versuch mit zugeschaltetem Filtrationsumlauf, langsamer zunahm und mit einer Endkonzentration von 7,6 g/l deutlich unterhalb der Vergleichsfermentation lag (11,0 g/l) (in beiden Fermentationen wurde die Glucose- und L-Tyrosinzufuhr manuell gesteuert). Der Vergleich der spezifischen Produktbildungsrate zeigt, dass in der Basisfermentation ein Maximum von 0,05 g/(g*h)

erreicht wurde, während das Maximum im Versuch mit Filtration bei 0,03 g/(g*h) lag. Die integrale, molare Produktselektivität sank von 5,0 % auf 3,5 %, die integrale Raum-Zeit-Ausbeute von 0,37 g/(l*h) auf 0,25 g/(l*h). Die Permeatabtrennung führte damit zu einer wesentlichen Abnahme der L-Phe-Produktion.

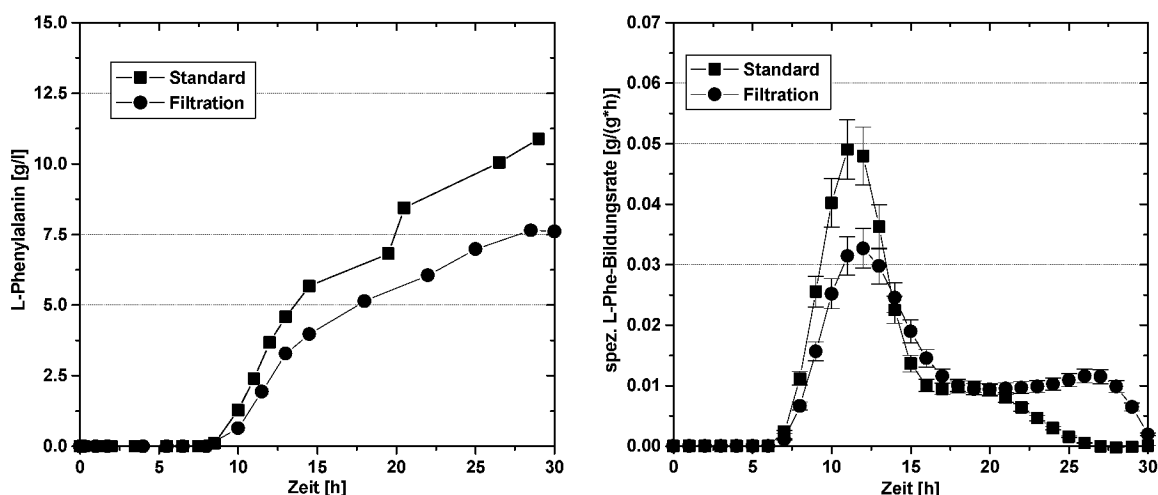


Abbildung 107: Vergleich der L-Phe-Konzentration und der spezifischen Produktbildungsrate bei einer Fermentation mit und ohne Zuschaltung des Filtrationsumlaufs. Verwendung eines 7,5 l Bioreaktors und manuelle Zugabe von Glucose und L-Tyrosin (*E. coli* 4pF20).

6.5.2. INTEGRATION DER FILTRATION IM PILOTMAßSTAB

Es sollte der Einfluss des konstruierten Umlaufs und der Permeatabtrennung auf den Fermentationsverlauf im Pilotmaßstab untersucht werden. Die Durchführung der Fermentation wurde in Abschnitt 5.5. und 5.5.1. beschrieben. Die Versuche wurden mit *E. coli* 4pF20 durchgeführt.

Die Fermentation wurde nach Vorschrift vorbereitet und gestartet. Nach 16 h wurde, mit Ende der Wachstumsphase, der Filtrationsumlauf mit einem Fördervolumen von 150 l/min gestartet. Das abgetrennte Permeatvolumen wurde über eine Bilanzierungswaage quantifiziert und von dort direkt in den Bioreaktor zurückgeführt. Über die am Ende des Umlaufs eingebaute pO₂-Elektrode, wurde die Gelöstsauerstoffkonzentration gemessen. Da zu Beginn der Filtration die Wachstumsphase bereits abgeschlossen war, konnte im Reaktor eine Gelöstsauerstoffkonzentration > 40 % aufrecht erhalten werden. Der gemessene pO₂ im Umlauf lag ungefähr 15 % niedriger und konnte demnach immer > 25 % gehalten werden.

Abbildung 108 zeigt die Konzentrationsverläufe der wichtigsten Edukte und Produkte. Die Glucosezufuhr wurde ab dem Ende der Batchphase auf 5,0 g/l geregelt. Durch technisch bedingte Probleme traten zwar Konzentrationsschwankungen auf, jedoch war weder eine Glucoselimitierung, noch eine Akkumulation über 8,0 g/l zu verzeichnen. Die L-

Tyrosinzufuhr erfolgte entsprechend den Vorgaben. Innerhalb der Wachstumsphase (nach Ende der Batchphase) konnte kein L-Tyrosin nachgewiesen werden. Die gemessene Biotrockenmassekonzentration lag zu Beginn der Produktionsphase im Vergleich zu anderen Versuchen mit 40 g/l etwas höher, sank jedoch wieder bis $t = 20$ h auf 33 g/l ab.

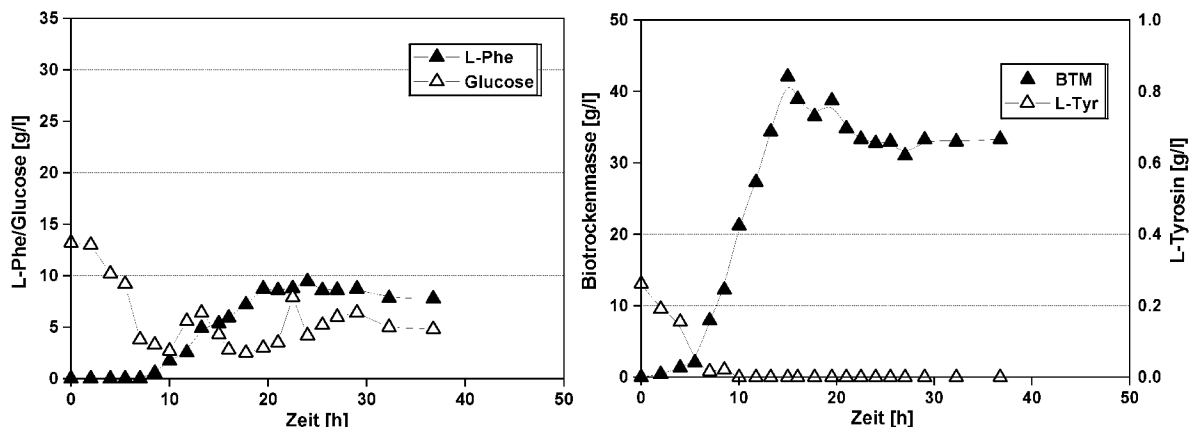


Abbildung 108: Verlauf der L-Phe-, L-Tyrosin-, Glucose- und Biotrockenmassekonzentration im 300 l Bioreaktor mit Permeatabtrennung (*E. coli* 4pF20). Start des Filtrationsumlaufs nach 16 h.

Die L-Phe-Produktion wurde nach 8 h induziert. Nach 15 h Fermentationsdauer wurden 5,4 g/l des Produktes nachgewiesen. Es fällt auf, dass die L-Phe-Konzentration mit dem Start des Umlaufs nach 16 h langsamer zunahm. Nach 21 h Fermentation war ein Wert von 8,6 g/l erreicht, der nicht mehr zunahm. Ab 24 h sank die Produktkonzentration ab und lag nach 37 h bei 7,7 g/l. Zu diesem Zeitpunkt musste der Versuch aufgrund von technischen Problemen im Filtrationsumlauf abgebrochen werden.

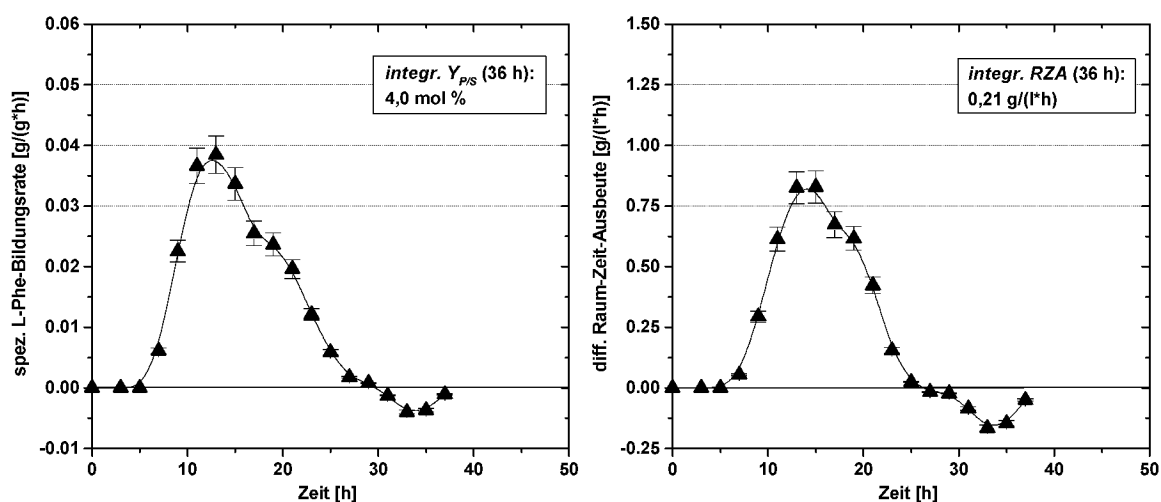


Abbildung 109: Verlauf der spezifischen L-Phe-Bildungsrate und der differentiellen Raum-Zeit-Ausbeute im 300 l Bioreaktor mit Permeatabtrennung (*E. coli* 4pF20). Start des Filtrationsumlaufs nach 16 h.

Die Trennleistung der Ultrafiltrationsmembran erreichte zwischen 16 h und 26 h 30 - 40 l/h. Ab 26 h sank der Permeatstrom ab und näherte sich nach 36 h einer Förderrate von 17 l/h an.

Bei der in Abbildung 109 dargestellten spezifischen Produktbildungsrate ist deutlich zu erkennen, dass die Rate nach der Induktion schnell anstieg und nach 13 h einen Wert von 0,038 g/(g*h) erreichte. Mit Zuschaltung des Filtrationsumlaufs sank die spezifischen L-Phe-Bildungsrate wieder ab. Ab einer Fermentationsdauer von 27 h wurde kein L-Phe mehr gebildet. Einen vergleichbaren Verlauf nimmt auch die differentielle Raum-Zeit-Ausbeute. Nach 13 h wurde eine maximale differentielle RZA von 0,86 g/(l*h) erreicht, die anschließend abfiel und nach insgesamt 25 h bei 0 lag.

Bedingt durch die geringe L-Phe-Bildung, wurde in diesem Versuch nach 36 h eine integrale, molare Selektivität von 4 % und eine integrale RZA von 0,21 g/(l*h) erreicht.

6.5.3. INTEGRATION DER REAKTIV-EXTRAKTION IM PILOTMAßSTAB

Die Fermentation und der Umlauf wurde wie in Abschnitt 6.5.2 vorbereitet und gestartet. Ab $t = 15$ h wurde mit Ende der Wachstumsphase der Filtrationsumlauf in Betrieb genommen, das Permeat zur Reaktiv-Extraktion gefördert und dort das L-Phe extrahiert. Die produktarme Raffinatphase wurde anschließend wieder, ohne eine weitere Sterilbarriere, in den Fermentationsprozess zurückgeführt. Während der gesamten Fermentation konnte im Filtrationsumlauf ein $pO_2 > 20$ % eingestellt werden.

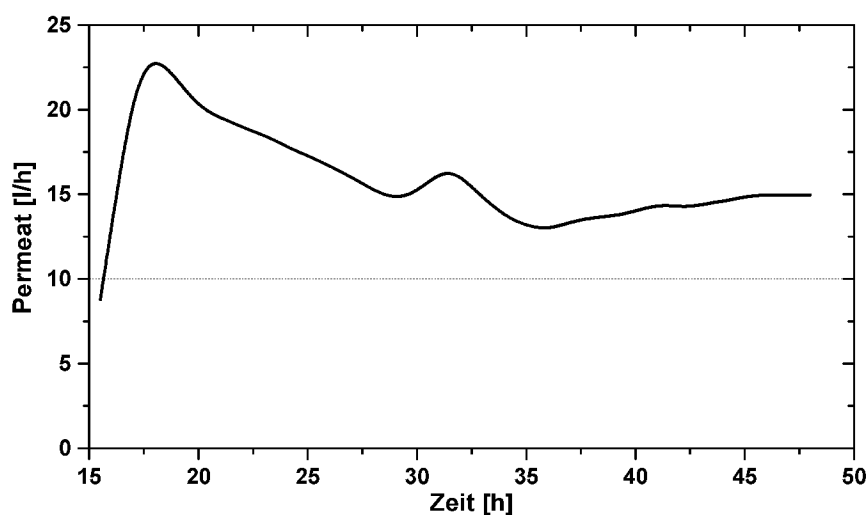


Abbildung 110: Aus dem Produktionsprozess abgetrennter Permeatvolumenstrom, der der Reaktiv-Extraktion zugeführt wurde.

Abbildung 110 zeigt den Permeatvolumenstrom an, der aus dem Bioreaktor abgetrennt wurde. Bei einer Förderrate von 120-150 l/min Fermentationsbrühe durch den Umlauf, stieg der Permeatvolumenstrom zu Beginn auf 22 l/h an, fiel dann jedoch zwischen $t = 20$ h und 30 h

auf 15 l/h ab. In den folgenden 20 h stellte sich ein annähernd konstanter Permeatvolumenstrom von 15 l/h ein.

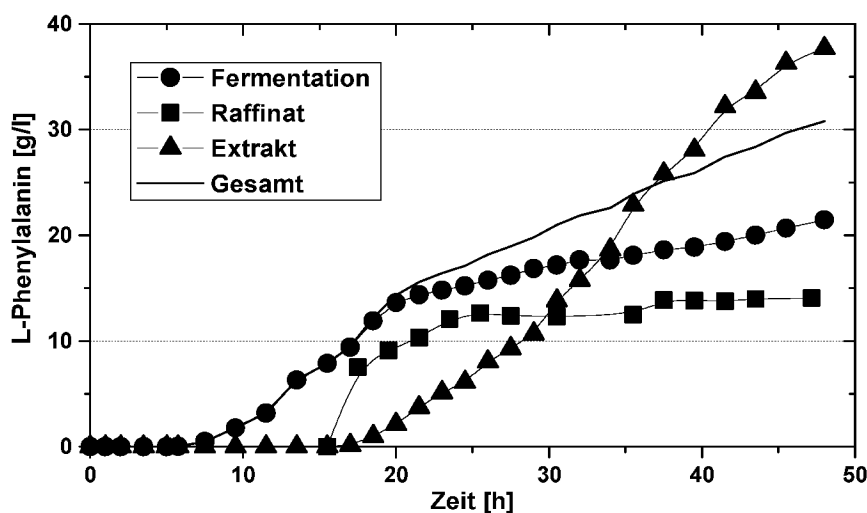


Abbildung 111: Verlauf der L-Phe-Konzentration im Bioreaktor, im extrahierten Permeat (Raffinat) und in der Akzeptorphase (Extrakt) des Hybridprozesses im 300 l Pilotmaßstab und Einsatz von *E. coli* 4pF20 (Daten der Aufarbeitung von Maaß [218]). Start des Filtrationsumlaufs nach 15 h. Die durchgezogene Linie gibt die theoretische L-Phe-Konzentration im Reaktor, bei Rückrechnung des extrahierten Anteils, wieder.

In Abbildung 111 sind die L-Phe-Konzentrationsverläufe in den Phasen der Reaktiv-Extraktion und im Bioreaktor zusammengefasst. Zu Beginn der Extraktion lag die L-Phe-Konzentration bereits bei 7,8 g/l. Mit dem Zuschalten der Extraktion wurde nach 15 h zusätzlich die Produkt-Konzentration im Raffinat (Permeat in der Reaktiv-Extraktion) und im Extrakt (schwefelsaure Akzeptorphase) gemessen. In der Raffinatphase stellte sich nach 7 h ein Gleichgewicht von 13 g/l ein. Im gleichen Zeitraum nahm der Anstieg der L-Phe-Konzentration im Reaktor langsam ab und erreichte bei $t = 26$ h 15,7 g/l. In der Akzeptorphase, in der das extrahierte L-Phe aufkonzentriert wurde, konnten zu diesem Zeitpunkt 8,2 g/l L-Phe nachgewiesen werden.

Im weiteren Prozessverlauf stieg die L-Phe-Konzentration langsam an und erreichte nach 48 h 21,5 g/l. Die Konzentration der Raffinatphase änderte sich kaum (14,1 g/l). In der Akzeptorphase wurde das extrahierte L-Phe auf 37,7 g/l aufkonzentriert. Die Konzentration im Extrakt lag damit annähernd doppelt so hoch wie im Bioreaktor (eine weitergehende detaillierte Analyse der Daten der Reaktiv-Extraktion ist den Arbeiten von Maaß zu entnehmen [218]).

Die in Abbildung 111 dargestellte durchgezogene Linie zeigt den theoretischen Verlauf der L-Phe-Konzentration im Reaktor, wenn keine Extraktion stattgefunden hätte. Die L-Phe-Konzentration steigt schneller an und erreicht zum Fermentationsende 30,8 g/l.

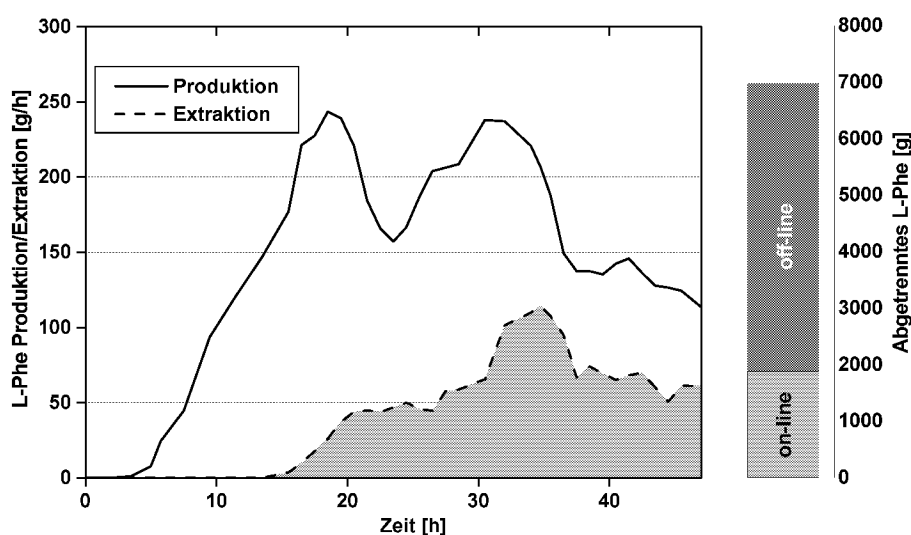


Abbildung 112: Links: Auf den Bioreaktor bezogene L-Phe-Produktion im Vergleich zur Extraktionsleistung der kontinuierlichen Aufarbeitung. Grau unterlegt ist das während der Fermentation extrahierte L-Phe. Rechts: Im Pilotmaßstab produzierte L-Phe-Gesamtmenge und die Anteile an on-line und off-line abgetrenntem Produkt.

Abbildung 112 zeigt die auf das Reaktorvolumen bezogene L-Phe-Bildungsrate und die auf die 50 l Akzeptorphase bezogene Extraktionsrate. Deutlich fällt der schnelle Anstieg der Produktbildung auf, der zu Beginn der Aufarbeitung 240 g/h L-Phe erreichte. Zwar fiel mit Beginn der L-Phe-Extraktion die Produktbildung ab, stieg anschließend jedoch wieder auf 240 g/h an. Zum Fermentationsende fiel die L-Phe-Produktion wieder auf 130 - 150 g/h ab. Die Extraktionsrate erreichte kurz ein Maximum von 110 g/h, blieb im Mittel jedoch stabil bei 70 g/h.

Durch die Integration der Fläche unterhalb der Produktionskurve, wurde die gesamte, gebildete L-Phe-Menge berechnet. In dieser Fermentation wurden 6,98 kg L-Phe produziert. Die grau unterlegte Fläche fasst den Anteil an kontinuierlich extrahiertem L-Phe zusammen. Mittels der Reaktiv-Extraktion konnten insgesamt 1,89 kg extrahiert werden (rechter Balken). Das Restliche in diesem Versuch gebildete L-Phe wurde zum Abschluss der Fermentation aufgereinigt. Hierzu wurden die Zellen abfiltriert (Ultrafiltration), das Produkt präzipitiert (Titration des Permeates auf den isoelektrischen Punkt von L-Phe) und nach erneuter Filtration, lyophilisiert. Das so erhaltene L-Phe hatte eine Reinheit > 98 %. Eine Analyse des aufgereinigten L-Phe ergab einen Anteil an organischen Verunreinigungen von unter 40 mg/kg (vgl. Abschnitt 12.6.).

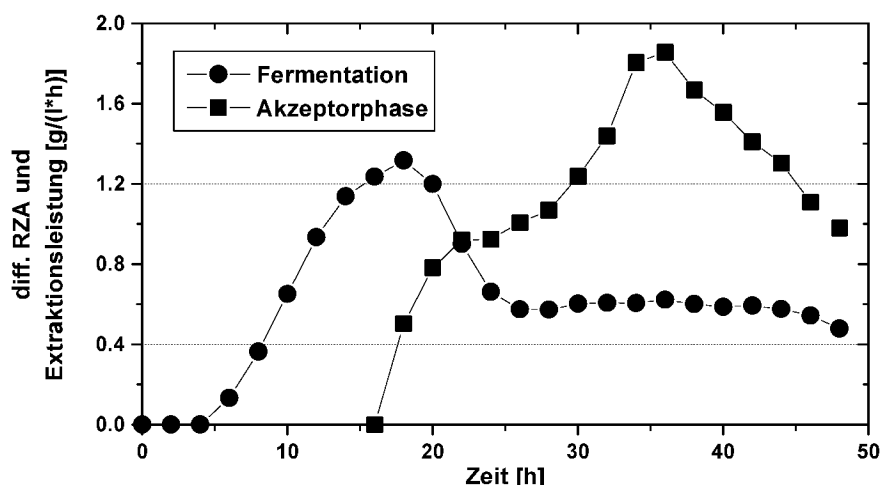


Abbildung 113: Vergleich der differentiellen Raum-Zeit-Ausbeute (Bioreaktor) mit der differentiellen Extraktionsleistung (Reaktiv-Extraktion) in dem Hybridprozess (300 l). (*E. coli* 4pF20). Start des Filtrationsumlaufs nach 15 h.

Im Gegensatz zur reaktorbezogenen Produktbildungsrate und Extraktionsleistung (Abbildung 112) sind in Abbildung 113 die volumenbezogenen Raten dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, dass die diff. RZA nach einer Fermentationszeit von 16-18 h ein Maximum von 1,3 g/(l*h) erreicht. Mit der Zuschaltung der Reaktiv-Extraktion fällt die diff. RZA innerhalb weniger Stunden auf 0,6 g/(l*h) ab und bleibt bis zum Fermentationsabbruch ungefähr konstant. In dieser Zeit steigt die volumenbezogene Extraktionsleistung der Reaktiv-Extraktion auf bis zu 1,8 g/(l*h) an, fällt jedoch zum Versucheende wieder auf ungefähr 1,0 g/(l*h) ab.

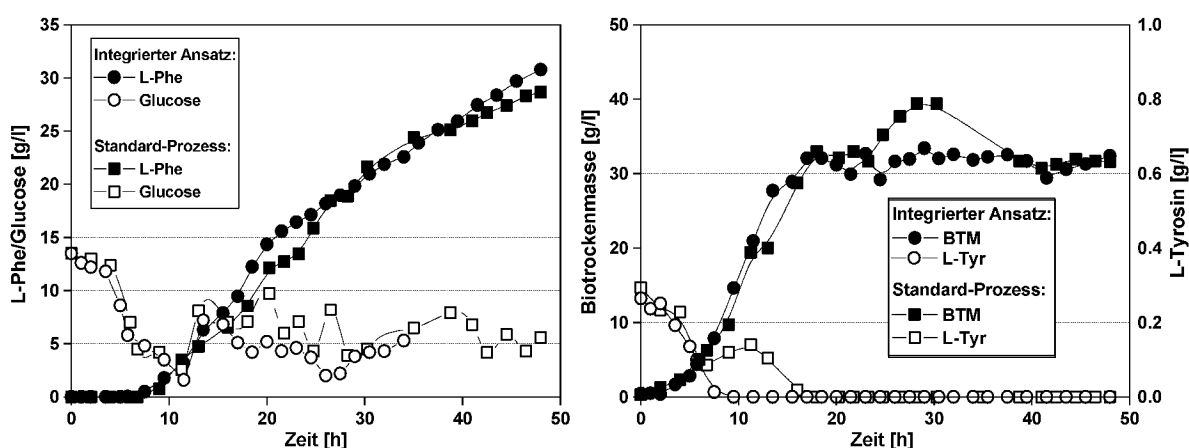


Abbildung 114: Vergleich der L-Phe-, L-Tyrosin-, Glucose- und Biotrockenmasseverläufe der Standardfermentation mit dem Hybridprozess (300 l) (*E. coli* 4pF20). Start des Filtrationsumlaufs nach 15 h.

In Abbildung 114 und den folgenden Grafiken werden die Ergebnisse des Hybridprozesses mit der in Abschnitt 6.2.6. beschriebenen Fermentation im 300 l Maßstab verglichen und nicht mit der Fermentation bei Zuschaltung des Umlaufs. Schließlich war das Ziel dieser Versuchsreihe nicht die Untersuchung der Auswirkungen der Permeatabtrennung. Es sollte untersucht werden, ob eine Verknüpfung von Produktion und Aufarbeitung möglich ist und durch die Vermeidung bzw. Minderung der Produktakkumulation, die Produktselektivität verbessert werden kann.

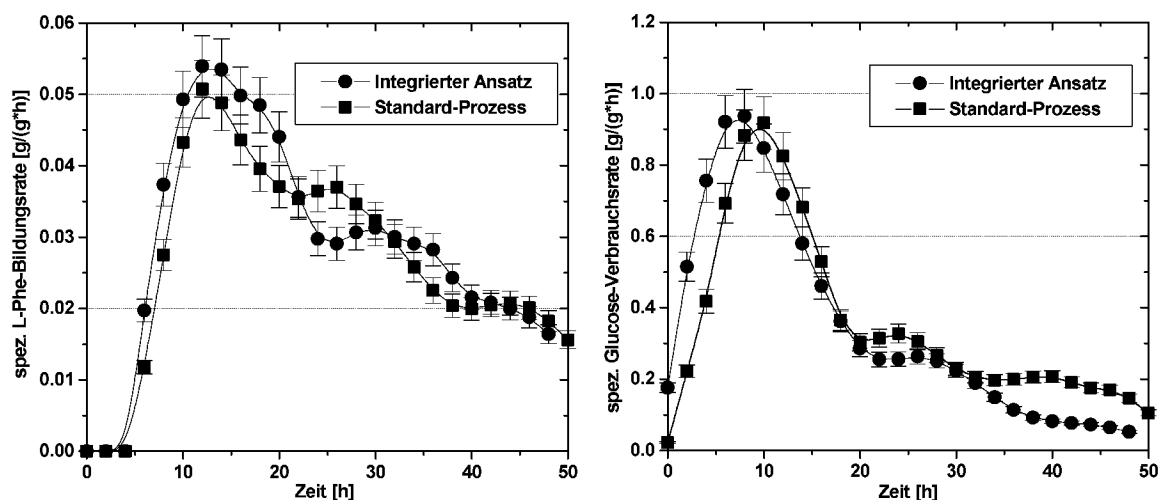


Abbildung 115: Vergleich der spezifischen L-Phe-Bildungsrate und der spezifischen Glucoseverbrauchsrate der Standardfermentation mit dem Hybridprozess (300 l) (*E. coli* 4pF20). Start des Filtrationsumlaufs nach 15 h.

Wie Abbildung 114 zeigt, unterlagen die Konzentrationen von Biotrockenmasse, Glucose und L-Tyrosin zwar leichten Schwankungen, jedoch waren die Konzentrationen beider Fermentationen, über den gesamten Zeitraum, miteinander vergleichbar. Deutlich zu erkennen ist, dass die L-Phe-Konzentration (beim integrierten Ansatz wurde der theoretische Verlauf unter Einbeziehung des abgetrennten L-Phe aufgetragen und im Folgenden als Berechnungsgrundlage verwendet) in beiden Fermentationen einen fast identischen Verlauf nahm. Mit 30,7 g/l wurde nach 48 h im Hybridprozess eine etwas höhere L-Phe-Konzentration erreicht (Standardprozess: 28,6 g/l).

Der in Abbildung 115 dargestellte Verlauf der spezifischen L-Phe-Bildungs- und Glucoseverbrauchsrate zeigt, dass der Hybridprozess eine zeitliche Verzögerung von 1-2 h aufwies. In Bezug auf die Produktbildung erreichte der Standardprozess, verglichen mit dem Hybridprozess, etwas geringere spezifische L-Phe-Bildungsraten (0,005 g/(g*h)). Wie Abbildung 114 zeigt, lag die BTM-Konzentration in der Standardfermentation zeitweilig 15 % höher als im Hybridprozess. Bei einer volumetrischen Auftragung der Bildungsrate würde demnach der Standardprozess über dem Hybridprozess liegen. Bei der spezifischen Glucoseverbrauchsrate fällt auf, dass trotz vergleichbarer Produktbildung, im Standardprozess

wesentlich mehr Substrat verbraucht wurde. Auch hier führt die volumetrische Berechnung der Verbrauchsrate zu einem größeren Unterschied zwischen den Versuchen.

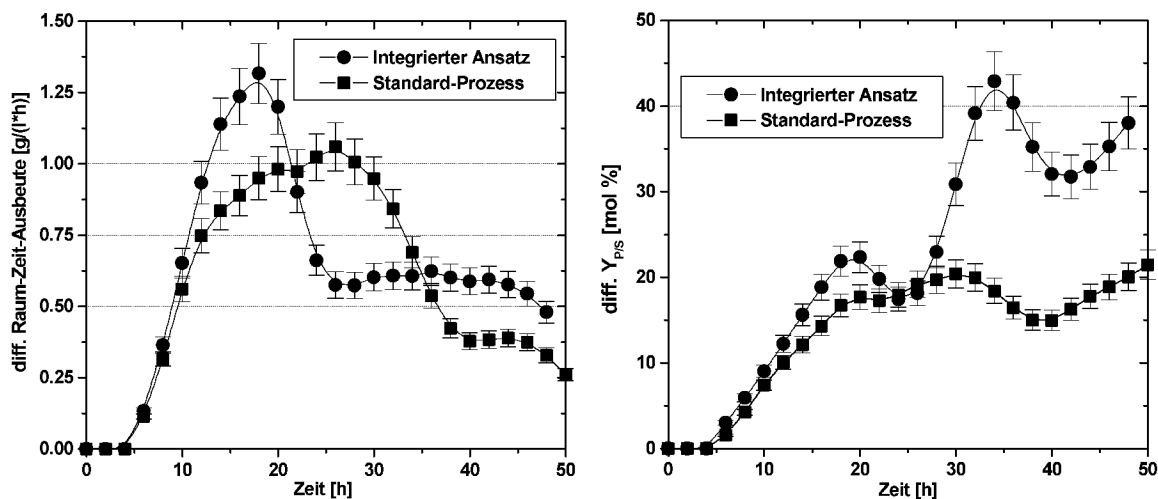


Abbildung 116: Vergleich der differentiellen Raum-Zeit-Ausbeute und der differentiellen, substratbezogenen Produktselektivität der Standardfermentation mit dem Hybridprozess (300 l) (*E. coli* 4pF20). Start des Filtrationsumlaufs nach 15 h.

In Abbildung 116 wird deutlich, dass der reaktionstechnische Verlauf der beiden Fermentationen dennoch sehr unterschiedlich ist. Die differentielle RZA stieg im Standardprozess zunächst langsam an und erreichte nach 18 h ungefähr 1,0 g/(l*h). Dieser Wert blieb für 10 h konstant und fiel dann auf 0,3 g/(l*h) ab. Beim Hybridprozess wurde hingegen ein Maximum von 1,3 g/(l*h) erreicht. 3 h nach dem Start der Reaktiv-Extraktion ($t = 18$ h) sank die differentielle RZA schnell ab und lag nach 26 h Fermentationsdauer bei 0,57 g/(l*h). Dieser Wert blieb jedoch bis zum Ende der Fermentation nahezu konstant.

Der Verlauf der differentiellen $Y_{P/S}$ kann in zwei Phasen unterteilt werden. Zwar stieg im Hybridprozess die differentielle $Y_{P/S}$ in der ersten Phase der Fermentation schneller an, als im Standardprozess ($t = 20$ h; Standard: 17,3 %; Hybrid: 22,3 %), jedoch fiel der Wert wieder auf 17,4 % (24 h) (Standardprozess 17,9 %). Von diesem Zeitpunkt an ist ein deutlicher Unterschied in den beiden Fermentationen zu erkennen. Während die differentielle, molare Produktselektivität im Standardprozess um 18 % schwankt, steigt die differentielle $Y_{P/S}$ im Hybridprozess auf 32 - 42 % an, und bleibt bis zum Ende auf diesem Niveau konstant.

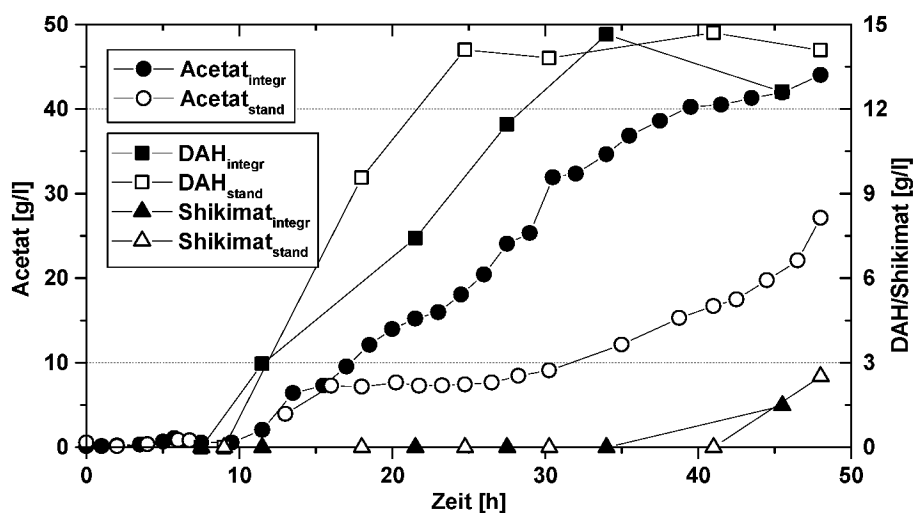


Abbildung 117: Vergleich der Konzentration der Nebenprodukte Acetat, DAH und Shikimat in der Standardfermentation mit dem Hybridprozess (300 l) (*E. coli* 4pF20). Start des Filtrationsumlaufs nach 15 h.

Abbildung 117 zeigt die Konzentrationsverläufe der wichtigsten Nebenprodukte. Deutlich fällt auf, dass sich die Acetat- und DAH-Konzentrationen in beiden Versuchen unterschieden. Während in beiden Ansätzen nach 15 h Fermentation mit 7,3 g/l bzw. 7,6 g/l gleich viel Acetat gebildet wurde, stieg mit Beginn der Aufarbeitung die Konzentration im Hybridprozess stetig an und erreichte nach 48 h 44 g/l. Im Standardprozess blieb die Konzentration hingegen bis 30 h unter 10 g/l und nahm erst anschließend auf 27,1 g/l zu. Die Konzentration an DAH nahm im Hybridprozess langsamer zu. Nach 34 h wurden 14,3 g/l nachgewiesen, im Standardprozess schon nach 25 h 14,1 g/l gemessen. Shikimat trat in beiden Fermentationen erst bei der letzten Messung auf. Die Konzentrationen von 1,5 g/l (Hybridprozess) bzw. 2,5 g/l (Standardprozess) waren gering, jedoch war auch hier die Konzentration im Hybridprozess niedriger.

7. FEHLERBETRACHTUNG

Es wurden diverse analytische Methoden zur Untersuchung des Fermentationsverlaufs und des physiologischen Zustands der Zellen eingesetzt. Zudem wurden im Zuge der Prozessentwicklung Systeme implementiert, die messfehlerbehaftet waren.

- Zur Quantifizierung von Aminosäuren, Ammonium und organischen Säuren wurde die HPLC-Technik eingesetzt. Durch geeignete Verdünnung (L-Phe 1:1000; L-Tyrosin 1:10; organische Säuren 1:100) wurden die Proben auf einen Messbereich von 10-200 $\mu\text{mol/l}$ eingestellt. In diesem Bereich lag der Fehler unter 3 %. Bei der Verdünnung der Proben wurde eine Abweichung von maximal 3 % gemessen. Die Genauigkeit der HPLC wurde ungefähr alle 15 Proben, durch eine Referenzmessung, überprüft.
- Die Quantifizierung der Intermediate der Aromatenbiosynthese erfolgte durch die NMR-Technik. Die Proben wurden unverdünnt gemessen, es trat also kein Verdünnungsfehler auf. Versuche zur Messgenauigkeit wurden von Zaja beschrieben [166] und ergaben eine mittlere Abweichung von 5 %. Die Nachweisgrenze dieser Technik lag bei 0,5 bis 1,0 g/l.
- Bei der Bestimmung der proteinspezifischen Aktivität der DAHP-Synthase trat eine mittlere Abweichung von 20 - 25 % auf, da sich mehrere Messfehler addierten. Von der Probenahme an, mussten die Zellen eisgekühlt werden, um Aktivitätsverluste zu vermeiden. Gleiches galt für den Zellaufschluss mittels Ultraschall. Des Weiteren war der Zellaufschluss abhängig von der eingesetzten Zelldichte. Die Bestimmung der Proteinkonzentration, zur späteren Berechnung der proteinspezifischen Aktivität, wurde mittels des Bradford-Tests (Rinderserum Albumin als Referenz) durchgeführt. Diese Messung unterlag Abweichungen von bis zu 10 %. Die anschließende Bestimmung der DAHP-Synthaseaktivität unterlag drei Messfehlern. Die Probenhandhabung (ständig eisgekühlt) und Zugabe der an der Umsetzung beteiligten Edukte PEP und E4P, inkl. dem Ansetzen der Lösungen, wurde mit 5 % angenommen, der nicht quantifizierbare Zerfall von E4P während der Vorbereitung und Messung (E4P ist instabil bei Raumtemperatur), wurde mit 5 % abgeschätzt und der Fehler bei der photometrischen Messung der Absorptionsabnahme von PEP mit weiteren 5 %. Doppelbestimmungen in einer Versuchsreihe ergaben einen Messfehler von 20 %. Die Abweichungen bei einem Vergleich separater Messreihen dürfte jedoch höher liegen. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb nur Enzymaktivitäten verglichen, die in einer Messreihe bestimmt wurden.
- Zur Bestimmung der relativen Abweichung bei Messung der optischen Dichte von Fermentationsproben ($\text{OD}_{620\text{nm}}$), wurden vereinzelt Dreifachbestimmungen angesetzt. Bei Einhaltung eines Messbereiches von 0,03 bis 0,3 lag der Verdünnungsfehler bei maximal 3 %.

-
- Untersuchungen zur Messgenauigkeit bei Bestimmung der Biotrockenmasse aus Fermentationsproben ergaben einen Messfehler von 3 %. Die relative Abweichung stieg jedoch in Proben, die Antischaummittel enthielten, auf bis zu 10 % an.
 - Zur Bestimmung von Zellzahl und -volumen wurde ein Gerät zur Partikeldurchflussmessung verwendet (CASY). Mehrfachmessungen, die bei jeder Probe durchgeführt wurden, ergaben eine Messwertabweichung von unter 2,5 %.
 - Für das Gerät zur semi-kontinuierlichen Bestimmung der Glucosekonzentration (OLGA), konnte durch Mehrfachmessungen einer Probe ein relativer Fehler von maximal 2 % bestimmt werden. Bei längerfristigem Einsatz der OLGA, d.h. während einer Fermentation, führte der Aktivitätsverlust des Biosensors jedoch zu einem steigenden, systematischen Fehler. Durch Rekalibrierung des Gerätes nach jeweils 30 Messzyklen (Zwei-Punkt-Kalibrierung; Doppelbestimmung) wurde dieser Fehler eliminiert.
 - Der relative Messfehler der off-line Glucosemessung (Accutrend®-Sensor) wurde mit 5 % abgeschätzt. Dabei musste ein Messbereich von 0,1 - 6,0 g/l eingehalten werden.
 - Der Messfehler der Abgasanalyse, die vor jedem Versuch kalibriert wurde, lag bei 3 %. Bei Begasungsraten von weniger als 2,5 l/min stieg die Abweichung deutlich an. Diese Messwerte wurden jedoch nicht als Grundlage für weitere Berechnungen verwendet.
 - In die rechnergestützte Abschätzung der volumetrischen Sauerstoffverbrauchsrate während der Wachstumsphase der Fermentation gingen, durch Verwendung mehrerer Prozessparameter (Begasungsrate, Flüssigvolumen, Abgasanalytik), diverse Messfehler ein. Insbesondere Schwankungen des Reaktorgewichts verursachten einen relativen Fehler von bis zu 15 %.
 - Die Genauigkeit der durch die Dosiersysteme eingestellten Zulaufraten von Glucose und L-Tyrosin, konnten durch Ablesen der Waagenwerte kontrolliert werden. Zudem wurde innerhalb der Auswertung, das auf Basis der abgelesenen Waagenwerte berechnete Volumen, mit dem durch die eingestellten Zulaufraten errechneten Volumen, verglichen. Die Abweichung der Ergebnisse betrug maximal 2 %.
 - Für die pH- und pO₂-Messung (kein Messsignal für 0 %) am Bioreaktor ergaben sich Fehler von jeweils ungefähr 2 %.
 - Für die Bestimmung des Flüssigvolumens im Reaktor wurde ein Fehler von 7 % angenommen.
 - Zur Berechnung von differentiellen und integrativen Raten, sowie Selektivitäten und zur Kohlenstoffbilanzierung, wurden die einfließenden Messwerte zuvor geglättet. Durch diese Vorgehensweise ist zwar die Aussagekraft der Ergebnisse eingeschränkt, jedoch konnten besser signifikante Tendenzen sichtbar gemacht werden. Insbesondere durch den Fed-Batch-Betrieb addieren sich viele kleine Messfehler zu einem Messrauschen, das eine Interpretation der resultierenden Daten nahezu unmöglich macht. Für alle in dieser Arbeit gezeigten differentiellen und integrativen Ergebnisse, wurde ein empirischer gewählter Fehlerbalken von 5 % angenommen. Mussten die

Messergebnisse stark geglättet werden, wurde ein relativer Fehler von 8 % bis 10 % angegeben. Die für die Kohlenstoffbilanzierung verwendeten Daten wurden nur geringfügig angeglichen. Hier wurde, da es sich zudem nur um eine integrative Berechnung handelt, ein Fehler von maximal 5 % angenommen.

Aufgrund von Fehlerfortpflanzungen insbesondere bei der Berechnung von Raten und bei der „Glättung“ der Daten ist anzunehmen, dass die tatsächlichen Fehler wesentlich höher liegen. Für grundsätzliche Aussagen wurden deshalb in der Diskussion Konzentrationsbestimmungen und integrative Berechnungen auch bevorzugt herangezogen.

8. DISKUSSION

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die „integrierte Prozessentwicklung zur Herstellung von L-Phenylalanin mit *E. coli*“. Im Mittelpunkt stand damit die Entwicklung eines Fermentationsprozesses. Dieser sollte reproduzierbar, scale-up-fähig, und für verschiedene potentielle Produktionsstämme einsetzbar sein. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass alle drei Ziele erreicht werden konnten.

Aus der Bezeichnung „integriert“ entwickelten sich zwei Bedeutungen:

Die Integration von Produktion und Aufarbeitung wurde als eine wichtige Zielsetzung bei der Entwicklung des Gesamtprozesses definiert. Durch geeignete Techniken sollten Fermentation und Reaktiv-Extraktion [218] miteinander verbunden werden. Aus dem während der Fermentation bereitgestellten, zellfreien Fermentationsüberstand, sollte simultan L-Phe selektiv abgetrennt und das produktarme Permeat in den Prozess zurückgeführt werden. In einem Demonstrationsversuch im Pilotmaßstab konnte gezeigt werden, dass ein solcher Hybridprozess möglich ist und sich positiv auf die Produktion auswirkt.

Als „integrierte Prozessentwicklung“ werden auch die Wechselwirkungen zwischen Stammentwicklung (IBT 1) und Entwicklung von Produktion und Aufarbeitung bezeichnet. Neben dem Zusammenspiel der ingenieurwissenschaftlichen Aufgabengebiete konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich Stamm- und Prozessentwicklung erfolgreich miteinander verbinden lassen.

In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Aspekte dieser Arbeit diskutiert.

8.1. VORUNTERSUCHUNGEN ZUR PROZESSENTWICKLUNG

Die in diesem Abschnitt zusammengefassten Untersuchungen hatten zum Ziel, den Einfluss wichtiger Prozessparameter abzuschätzen. Eine Optimierung dieser Parameter stand dabei nicht im Vordergrund, da davon ausgegangen werden musste, dass sich im Verlauf der Stammentwicklung ein zuvor gefundenes Optimum wieder verschieben würde.

8.1.1. MEDIENAUSWAHL

Das einzusetzende Nährmedium wurde unter folgenden Kriterien ausgewählt: Es sollte sich um ein synthetisches Medium handeln, da komplexe Medienbestandteile die Aufarbeitung wesentlich erschwert hätten, zumal diese in den Prozess integriert werden sollte. So würden z.B. auch andere aromatische Aminosäuren mittels der Reaktiv-Extraktion abgetrennt werden [225].

Die Untersuchung von drei synthetischen Medien in Bezug auf Wachstumsrate und erreichbare Zelldichte (Abschnitt 6.1.1) zeigte deutlich, dass das von der Firma DSM verwendete Medium sich am besten für die Fermentation von *E. coli* eignete. Zudem wurde das Medium schon zur L-Phe-Produktion eingesetzt, und war in seiner Zusammensetzung mit literaturbekannten Medien zur L-Phe-Produktion mit *E. coli* vergleichbar [124, 141].

Bei der Untersuchung von Wachstumsrate und maximal erreichbarer optischer Dichte im Fed-Batch-Betrieb (Abschnitt 6.1.4), konnte ein $\mu_{\max}$ von $0,7 \text{ h}^{-1}$ und eine $OD_{620\text{nm}}$ von 130 (BTM $\approx 45 \text{ g/l}$) erreicht werden. Trotz der erreichbaren Zelldichte wurde für die Entwicklung des Fermentationsprozesses und die Charakterisierung verschiedener Stämme, die Wachstumslimitierung bei einer $OD_{620\text{nm}}$ von 80 bis 100 festgelegt (BTM $\approx 30 - 35 \text{ g/l}$). Auf diese Weise sollten Nährsalzlimitierungen in der Produktionsphase vermieden und gegebenenfalls unterschiedliche Nährstoffansprüche der Stämme kompensiert werden.

8.1.2. IPTG-KONZENTRATION

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Stämmen wurde die L-Phe-Produktion durch IPTG induziert. In Voruntersuchungen (Schüttelkolben) zeigte sich, dass eine Induktion mit $50 \mu\text{M}$ IPTG (geringste untersuchte Konzentration) kaum Auswirkungen auf die Wachstumsrate hatte und die höchste L-Phe-Konzentration erreicht wurden (Abschnitt 6.1.2). Bei Induktion mit $100 \mu\text{M}$ lag 3 h nach Induktion sowohl die L-Phe-Konzentration, als auch die optische Dichte um 25 % niedriger vor. Die biomassespezifische Produktbildungsrate und die produktbezogene Biomasseselektivität $Y_{p/x}$ blieben jedoch konstant. Erst bei Einsatz höherer IPTG-Konzentrationen sanken auch diese Werte. Für die Prozessentwicklung entscheidend ist die spezifische Produktbildungsrate bzw. die erreichte Selektivität und RZA. Da die IPTG-Induktion als Pulszugabe am Ende der Batchphase erfolgen sollte, musste berücksichtigt werden, dass das Induktionsmittel während der Fermentation durch den Fed-Batch-Betrieb verdünnt wird. Es wurde deshalb eine Induktorkonzentration von $100 \mu\text{M}$ gewählt.

8.1.3. TEMPERATUR UND pH-WERT

Die in Abschnitt 6.1.3 dargestellte Untersuchung des Einflusses von pH-Wert und Temperatur auf den Fermentationsverlauf, zeigte deutlich den Einfluss dieser Parameter auf Wachstum, L-Phe-Produktion und Nebenproduktbildung. Laut Literatur liegen die für *E. coli* optimalen Wachstumsbedingungen im neutralen pH-Bereich und $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ [5]. In den eigenen Versuchen konnte die höchste optische Dichte bei $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und pH 6,7 gemessen werden.

Eine sinkende Temperatur bei neutralem pH, bzw. ein sinkender pH bei $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, hat kaum einen Einfluss auf die Zelldichte. Bei steigender Temperatur und abnehmenden pH-Wert fällt die Zelldichte jedoch schnell ab. Eine niedrige Temperatur hat nur einen geringen Einfluss auf die Zelldichte, es wird jedoch wesentlich weniger Acetat gebildet. Ebenso führt ein niedriger pH-Wert zu einer Verringerung der Acetatproduktion. Da die Versuche in Fed-Batch-Schüttelkolben bei Sauerstofflimitierung durchgeführt wurden, war eine hohe Acetatproduktion zu erwarten. Der Grund für die geringe Acetatbildung, bei niedriger Temperatur und saurem pH-Wert, ist in der niedrigen metabolen Aktivität der Zellen begründet. Die spezifische Glucoseverbrauchsrate ist so weit gesunken, dass trotz einer $OD_{620\text{nm}}$ von ungefähr 15 eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff möglich ist, und keine anaeroben Bedingungen bestehen.

Der Vergleich der erreichten L-Phe-Konzentration mit der optischen Dichte zeigt, dass hier ein Zusammenhang zu bestehen scheint. Mit sinkender Zelldichte nimmt auch die L-Phe-Konzentration ab. Bei den größten, erreichten Zelldichten wurden die höchsten Produkttiter gemessen. Die Berechnung spezifischer Raten ist aufgrund fehlender Daten zwar nicht möglich, jedoch kann eine annähernd konstante, biomassespezifische Produktbildung vermutet werden.

Zwischen der L-Phe-Konzentration und der Acetatbildung besteht hingegen kein direkter Zusammenhang. Aufgrund der Sauerstofflimitierung der Zellen (zumindest bei Temperaturen um 37 °C und pH-Werten um 6,9), war auch keine direkte Abhängigkeit zu erwarten. Jedoch wurden die höchsten L-Phe-Titer in den Versuchen erreicht, in denen bis zu 20 g/l Acetat gemessen wurden. Die hohen Acetatkonzentrationen haben sich also nicht negativ auf die L-Phe-Produktion ausgewirkt.

Aus den Versuchen in den Fed-Batch-Schüttelkolben geht hervor, dass die L-Phe-Produktion bei pH 6,9 und 35 °C ein lokales Maximum ausweist. Dieses Ergebnis wurde in einer Doppelbestimmung abgesichert und wird indirekt durch das Erreichen der zweithöchsten L-Phe-Konzentration bei pH 6,9 und 36 °C bestätigt (wiederum als Doppelbestimmung). Untersuchungen zur Aktivität der in diesen Versuchen eingesetzten DAHP-Synthase (*aroF^{abr}*) von Jossek [167] zeigten, dass die Aktivität dieses instabilen Enzyms bei Temperaturen unter 37 °C steigt und ein Maximum bei 33 °C erreicht. Da es sich bei der DAHP-Synthase um das „Schlüsselenzym“ zur L-Phe-Produktion handelt, dürfte die Verbesserung der Produktbildung bei geringerer Temperatur hierauf zurückzuführen sein. Das nicht eine Temperatur von 33 °C als Fermentationsoptimum identifiziert wurde, liegt darin begründet, dass es sich weder um eine *in vitro* Untersuchung, noch um das einzige, zelleigene Enzym mit einem Temperaturoptimum handelt.

Zum Zeitpunkt, als diese Versuche durchgeführt wurden, war der Fermentationsprozess in der heutigen Form etabliert und diente insbesondere der Charakterisierung verschiedener potentieller Produktionsstämme. Bei einer Änderung der Betriebsparameter wäre ein Vergleich der Fermentationsergebnisse nicht mehr möglich gewesen. Die Ergebnisse wurden deshalb nicht auf den Fermentationsprozess übertragen.

8.1.4. EINFLUSS VON L-PHENYLALANIN AUF DAS WACHSTUM

In satzweisen Schüttelkolbenversuchen und Fed-Batch-Fermentationen wurde unter Verwendung des *E. coli* Wildtyps der Einfluss verschiedener L-Phe-Konzentrationen auf das Wachstum untersucht (Abschnitt 6.1.4). Die Zugabe von L-Phe in Form eines Pulses, bei einer OD_{620nm} von 1,0 (Schüttelkolben), führte mit steigender Konzentration zu einer Verringerung der Wachstumsrate. Bei Einstellung verschiedener L-Phe-Konzentrationen vor Beginn der Fermentation, vergrößerte sich der negative Einfluss noch zusätzlich. So verlängerte sich die Wachstumsphase bis zum Erreichen einer OD_{620nm} von 7,0 von 10 h (ohne L-Phe) auf ungefähr 25 h (30 g/l L-Phe). Die Ergebnisse wiesen auf eine eindeutige

Inhibierung des Wachstums, bei unphysiologisch hohen L-Phe-Konzentrationen, hin. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass die DAHP-Synthase durch die Aminosäure inhibiert wird. Dieser Effekt muss nicht auf das L-Phe-spezifische Enzym beschränkt sein, sondern kann sich auch auf die L-Tryptophanspezifische DAHP-Synthase auswirken. Eine eingeschränkte L-Tryptophansynthese würde zu einer Limitierung des Wachstums führen.

Innerhalb des Fermentationsprozesses wird jedoch die L-Phe-Produktion erst ab einer OD_{620nm} von 12 - 15 induziert und auch dann steigt die Konzentration nur langsam an. Um einen solchen Fermentationsverlauf zu simulieren, wurde in einer Fed-Batch-Fermentation (*E. coli* Wildtyp), durch Zugabe von L-Phe-Pulsen, die Konzentration sukzessive auf 30 g/l erhöht, wobei auch hier die Zugabe wesentlich über einer maximal möglichen L-Phe-Produktbildungsrate lag. Im Vergleich zu einer Fermentation ohne L-Phe-Zugabe, kam es zu einem geringen Abfall der maximalen Wachstumsrate von $0,7\text{ h}^{-1}$ auf $0,6\text{ h}^{-1}$. Nach 14 h wurde eine OD_{620nm} von ungefähr 90, im Vergleich zu 105 (ohne L-Phe), erreicht.

Damit wurde gezeigt, dass sich der wachstumslimitierende Einfluss von L-Phe hauptsächlich auf die lag-Phase und frühe Wachstumsphase der Zellen beschränkt, und sich *E. coli* bei sukzessivem Anstieg der L-Phe-Konzentration den Bedingungen anpasst. Der Abfall der maximalen Wachstumsrate bei einer Fed-Batch-Fermentation führt letztendlich zu einer um ein bis zwei Stunden verlängerten Wachstumsphase. Bei einer Gesamtfermentationsdauer von 50 h ist, aus Sicht der Prozessentwicklung, dieser negative Einfluss unbedeutend.

Eine Untersuchung des Einflusses von L-Phe fand nur in Bezug auf das Zellwachstum statt. Der Einfluss der Aminosäure auf die Produktbildung blieb hiermit ungeklärt und sollte Gegenstand weitererführender Untersuchungen sein.

8.2. VERFAHRESENTWICKLUNG ZUR L-PHENYLALANINPRODUKTION

Der Prozessentwicklung lag ein Verfahren zugrunde, das für einen *E. coli* L-Phe-Produzenten etabliert und ansatzweise optimiert worden war [210]. Diese Fermentationsstrategie wurde grundsätzlich übernommen, d.h. Medienzusammensetzung, Prozessparameter und Vorgehensweise (Vorkultur, Induktion, Fermentationsdauer, etc.) wurden beibehalten. Notwendig waren hingegen Veränderungen in der Zulaufstrategie. In den Produktionsprozess wurde Glucose und die für das Wachstum essentielle Aminosäure L-Tyrosin als Suspension zugeführt. Die Zulauftrate wurde über ein vorgegebenes Profil manuell gesteuert.

8.2.1. REGELUNG DER GLUCOSEZUFUHR

Um eine vergleichbare Substratversorgung bei jeder Fermentation und für jeden Stamm sicherzustellen, sollte Glucose über einen geschlossenen Regelkreis zugeführt werden. Über eine kontinuierliche Messung der Glucosekonzentration im Reaktor sollte die Zulauftrate dem Substratverbrauch angepasst, und eine Glucosekonzentration von 5,0 g/l konstant gehalten werden. Die Konzentration von 5,0 g/l war ein empirisch gewählter Wert. Ziel war es,

Limitierungen, die zu einer verringerten Produktbildung führen können, sowie Akkumulationen (erhöhte Acetatbildung), zu vermeiden.

Zur kontinuierlichen Glucosemessung wurde die auf SIA-Technik beruhende OLGA eingesetzt. Mit diesem System konnte in Intervallen von 3 min die Glucosekonzentration bestimmt werden. Da die Glucose-Istwerte messfehlerbehaftet waren, eine Totzeit von 90 s aufwies und bei einem Messintervall von 3 min verhältnismäßig wenig Daten für ein Reglerkonzept zur Verfügung standen, wurde ein System aus Kalmanfilter und Minimalvarianzregler eingesetzt, um die Zulauftrate anzupassen. Wie Abbildung 54 zeigt, konnte mit dieser Regelungsstrategie die Glucosekonzentration, ab dem Ende der Batchphase, auf $5,0 \pm 1,0$ g/l konstant gehalten werden.

Eine Reglerabweichung von 20 % ist im Verhältnis hoch und würde sich durch eine Feineinstellung des Reglers verringern lassen [214, 217]. Die gesamte Fermentation findet jedoch bei hoher Substratsättigung statt, da der K_S -Wert für Glucose bei ungefähr $10 \mu\text{M}$ ($\approx 1,8$ mg/l) liegt. Eine Abweichung des Istwertes um 20 % sollte deshalb, bei einer Sollwertvorgabe von 5,0 g/l, keinen Einfluss auf die Substratversorgung haben.

8.2.2. EINFLUSS DER GLUCOSEKONZENTRATION

Die Einstellung einer Glucosekonzentration oberhalb des K_S -Wertes von $10 \mu\text{M}$ führt bei einem *E. coli* Wildtyp, zum so genannten bakteriellen Crabtreeeffekt oder „Glucose-Überschuss-Stoffwechsel“ und zur Bildung von Acetat [5, 111]. Acetat führt ab einer Konzentration von ungefähr 5,0 g/l, durch Entkopplung der Atmungskette, zu einer Herabsetzung der Atmungsaktivität [118, 120]. Dadurch wird die Acetatbildung wiederum verstärkt, wodurch im weiteren Verlauf toxische Konzentrationen erreicht werden können. In der Literatur beschriebene Verfahren zur L-Phe-Produktion wurden deshalb bisher bei limitierter Glucosezufuhr, zum Beispiel durch eine indirekte Regelung über den $p\text{O}_2$, durchgeführt [29, 65]. In einem weiterentwickelten Verfahren wurde unter Einbeziehung der volumetrischen Sauerstoffverbrauchsrate, eine modellgestützte Regelungsstrategie entworfen [111, 112, 114].

In der vorliegenden Arbeit wurde als Hypothese formuliert, dass eine Glucoselimitierung zwar zu einer Verringerung der Nebenproduktbildung führt, jedoch dabei nicht die maximal mögliche Produktbildung erreicht werden kann. Deshalb wurde in der entwickelten Fermentation eine empirisch festgelegte Glucosekonzentration von 5,0 g/l eingestellt. In einer Versuchsreihe sollte untersucht werden, inwieweit sich der Fermentationsverlauf bei Einstellung einer niedrigeren, bzw. höheren Substratkonzentration verändert. Hierzu wurden mit *E. coli* 4pF69 drei Fermentationen bei 0,1, 5,0 und 30 g/l durchgeführt (Ergebnisse siehe Abschnitt 6.2.3). Diese Versuche sollten nicht der Optimierung, sondern nur der Untersuchung des Einflusses der Glucosekonzentration auf Produktbildung und Nebenprodukte dienen.

Es zeigte sich, dass bei 0,1 g/l Glucose kaum Acetat gebildet wurde (1,0 g/l). Bei Einstellung von 5,0 g/l Glucose wurden 2,0 g/l Acetat gemessen. Damit verdoppelte sich zwar die

Nebenproduktkonzentration, war aber dennoch, im Vergleich zu anderen Fermentationen, gering. Ein Glucoseüberschuss von 30,0 g/l führte zu einer Acetatakkumulation von 45 g/l. Diese hohe Acetatkonzentration bewirkte, neben einem verfrühten Absterben der Zellen, eine erhöhte Zufuhr von Ammoniakwasser (pH-Korrekturmittel) und, bedingt durch den Ammoniumüberschuss, die Bildung von 4,6 g/l L-Alanin. Unter normalen Bedingungen werden weniger als 0,2 g/l L-Alanin gebildet. Dass hohe Glucosekonzentrationen zu einer vermehrten Nebenproduktbildung führen, konnte in diesem Versuch bestätigt werden. Jedoch trat dieser Effekt nicht bei Einstellung von 5,0 g/l Glucose ein. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Substratverbrauchsrate. Zwar lag in allen drei Fermentationen ein Glucoseüberschuss vor, jedoch nimmt mit steigender Konzentration die spezifische Glucoseverbrauchsrate signifikant zu. Die aktive Glucoseaufnahme durch das PTS-System und der Stofffluss durch den FBP-Weg, sind oberhalb des K_S -Wertes abhängig von der Glucosekonzentration. Bei 30 g/l Glucose wird offenbar ein so hoher Stofffluss erreicht, dass der Abfluss von Intermediaten in die weiterführenden Stoffwechselwege limitierend wirkt und sich Zwischenprodukte anreichern. Diese Akkumulation führt zur Bildung von Acetat. Mit dem Erreichen einer Acetatkonzentration von 5,0 g/l bricht der hohe Glucoseverbrauch zusammen (Abbildung 58) und die Zellen sterben ab. Bei Einstellung von 5,0 g/l Glucose tritt diese Situation nicht auf.

Zur Synthese von 1 mol L-Phe werden 1 mol E4P und 2 mol PEP benötigt. Bei PEP handelt es sich um das zweitletzte Intermediat des FBP-Weges. In einem *E. coli*-Wildtyp führt ein Glucoseüberschuss zur Anhäufung von PEP und Pyruvat in der Zelle. Diese Metabolite werden in Form von Acetat aus der Zelle ausgeschieden. Bei einem L-Phe-Produzenten tritt, bedingt durch den hohen PEP-Verbrauch, eine Akkumulation nicht, oder zumindest nur vermindert, auf. Die Einstellung von 5,0 g/l Glucose führt zwar zu einem „Glucose-Überschuss-Stoffwechsel“, allerdings ist der Verbrauch von PEP durch die L-Phe-Synthese so hoch, dass eine Nebenproduktbildung vermieden wird. Der bei 30 g/l Glucose weiter angestiegene Stofffluss durch den FBP-Weg kann hingegen nicht mehr kompensiert werden. Das wird auch in den spezifischen Produktbildungsrate deutlich. Zu Beginn der Fermentation verlaufen die Raten der L-Phe-Bildung bei 30 g/l und 5,0 g/l identisch. Erst bei Erreichen einer Acetatkonzentration von ungefähr 5 g/l sinkt die L-Phe-Bildungsrate bei Einstellung von 30 g/l auf fast 0 ab, und die erreichte L-Phe-Konzentration von 16,8 g/l bleibt konstant.

In diesem Zusammenhang gibt es auch einen signifikanten Unterschied zu der bei 0,1 g/l Glucose geregelten Fermentation. Zwar konnten in diesem Versuch 32,0 g/l L-Phe produziert werden (im Vergleich zu 34,8 g/l bei 5,0 g/l Glucose), jedoch lag die L-Phe-Gesamtproduktion mit 340 g wesentlich unter der bei 5,0 g/l Glucose geregelten Fermentation (500 g L-Phe). Die niedrigere Glucoseverbrauchsrate führte zu einer geringeren Substratzufuhr. Dadurch bedingt, stieg das Reaktorvolumen langsamer an und führte, bei gleicher Produktkonzentration, zu einer kleineren L-Phe-Gesamtmenge. Der durch den niedrigeren Substratüberschuss bedingte, geringere Glucoseverbrauch hatte zudem eine um

bis zu 25 % gesunkene volumetrische L-Phe-Bildungsrate zur Folge. Offensichtlich führte die niedrigere Glucosekonzentration zu einem kleineren Stofffluss durch den FBP-Weg. Dadurch wurde weniger PEP gebildet und die Aromatenbiosynthese war letztendlich substratlimitiert. Auch die integrale Selektivität lag bei 0,1 g/l Glucose mit einem Maximum von 18,7 % (mol/mol) unter dem Versuch bei Einstellung von 5,0 g/l Glucose (20,1 %). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das Verhältnis von π/σ , in Bezug auf L-Phe, in der Produktionsphase zwar konstant geblieben ist, jedoch der Substratanteil, der für den Erhaltungsstoffwechsel verbraucht wird, im Verhältnis zugenommen hat.

In dieser Versuchsreihe konnte deutlich gezeigt werden, dass ein Glucoseüberschuss zur Verbesserung der L-Phe-Produktion führt. Um das Potential des gentechnisch modifizierten Aromatenbiosyntheseweges auszuschöpfen, ist es sinnvoll, einen „Glucose-Überschuss-Stoffwechsel“ zu erzeugen. Offenbar kann für die L-Phe-Produktion nur so ausreichend Substrat bereitgestellt werden. Es wurde auch gezeigt, dass die Glucoseaufnahmerate mit steigender Substratkonzentration zunimmt. Bei dem glucosespezifischen PTS-System in *E. coli* handelt es sich um ein aktives Aufnahmesystem über die Zellmembran, das unabhängig von der Höhe des Substratüberschusses sein sollte. Neben diesem System, das als EII^{Gluc} bezeichnet wird, muss jedoch ein zweiter Enzymkomplex beachtet werden, der nicht glucosespezifisch ist [226, 227]. Die Spezifität des Enzymkomplexes EII^{Gluc} liegt im Bereich von μM (K_S -Wert = 10 μM) und transportiert, bei geringer Substratverfügbarkeit, Glucose in die Zelle. Die Aufnahmekapazität dieses glucosespezifischen PTS-Systems ist jedoch stark begrenzt. Der zweite Komplex EII^{Man} (Man: mannosenspezifisch) ist nicht glucosespezifisch und hat einen K_S -Wert im Bereich von mM. Er wird also erst bei vergleichsweise hohen Glucosekonzentrationen aktiv. Dieses System zeichnet sich jedoch durch wesentlich höhere Aufnahmeraten aus und verursacht den „Glucose-Überschuss-Stoffwechsel“. Abhängig von der Substratverfügbarkeit kann sich ein Gleichgewicht zwischen den beiden Aktivitäten des PTS-Systems einstellen, das mit steigender Glucosekonzentration und zunehmender Aktivität des zweiten Enzymkomplexes, zu höheren Aufnahmeraten führt [226, 227].

In den durchgeführten Fermentationen wurde durch die Veränderung der Gleichgewichts zunächst, aufgrund eines steigenden Stoffflusses durch den FBP-Weg, eine Verbesserung der Produktbildung erreicht. Die Einstellung von 30 g/l Glucose führte jedoch zu einem Gleichgewicht, bei dem der Stofffluss den PEP-Verbrauch überstieg, und, dadurch bedingt, zur Bildung von Acetat führte. Dieser Zustand kann jedoch durch die Regelung der Glucosekonzentration vermieden werden.

Ein Substratüberschuss ist für die optimale L-Phe-Produktion mit *E. coli* notwendig, jedoch führen zu hohe Glucosekonzentrationen zu vermehrter Nebenproduktbildung. Die formulierte Arbeitshypothese konnte demnach bestätigt werden. Ob die für die Standardfermentation gewählte Glucosekonzentration von 5,0 g/l optimal ist, oder eine weitere Anpassung der Regelung zu besseren Ergebnissen führt, ist offen, war aber auch nicht die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit. Für die weitere Prozessentwicklung [191] wird, bei Einsatz von pts^-

Stämmen, die Regelung der Glucosekonzentration noch mehr an Bedeutung gewinnen. Durch den Austausch des PTS-Systems EII^{Gluc} gegen den Glucosefacilitator (*glf*) aus *Zymomonas mobilis* wird Glucose diffusiv über einen Konzentrationsgradienten aufgenommen. Dadurch wird der extrazellulär eingestellten Substratkonzentration eine Schlüsselrolle zukommen. Da bei diesem Stamm notwendigerweise ein Substratüberschuss im mM-Bereich eingestellt werden muss, wird es schwer fallen, zwischen der Substrataufnahme durch den Glucosefacilitator und dem PTS-System EII^{Man} zu unterscheiden.

8.2.3. REGELUNG DER L-TYROSINZUFUHR

Die zu Beginn der Prozessentwicklung eingesetzte Fermentationsstrategie zeichnete sich durch ein Steuerungsprofil für die Glucose-L-Tyrosinsuspension aus, das für einen industriellen Produktionsstamm optimiert war [210]. Die Zulaufraten wurden, basierend auf der off-line Bestimmung der Glucosekonzentration, auf den ersten, im IBT 1 hergestellten, Stamm angepasst. Eine Anpassung des L-Tyrosinzulaufs an den aktuellen Verbrauch war nicht möglich, da dieser mit dem Zufluss der Glucose gekoppelt war. Diese Strategie führte, wie in Abschnitt 6.2.1 zusammengefasst wurde, zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen.

Die von Takors durchgeführte Hauptkomponentenanalyse [221] und von Schmidt erstellte parallele Auswertung von zwölf durchgeführten Fermentationen [228], führten zu der Hypothese, dass die variierende Konzentration an L-Tyrosin während der Wachstumsphase, für die Schwankungen in der Produktbildung verantwortlich ist (Abbildung 61). Während es bei der Fermentation mit dem Industriestamm zu keinerlei L-Tyrosinakkumulation kam, führten die veränderten Zulaufraten für Glucose jetzt zwischenzeitig zu einer Anreicherung der Aminosäure.

In dem Stamm *E. coli* 4pF20, mit dem diese Untersuchungen durchgeführt wurden, werden die Gene *aroF^{fb}* und *pheA^{fb}* überexprimiert, jedoch ist das so genannte *tyrR*-Regulon weiterhin aktiv (vgl. Abschnitt 2.1.2 und 2.1.3). Liegt L-Tyrosin im Überschuss vor, wird von diesem Gen ein Repressorprotein exprimiert, das u.a. die Expression der Shikimatkinase II, kodiert durch *aroL*, reprimiert. Dies führt zu einem reaktionslimitierenden Schritt in der Aromatenbiosynthese und zu einem Abfall der L-Phe-Produktion.

Um eine Akkumulation von L-Tyrosin zu vermeiden, wurde der Zulauf von der Glucosezufuhr entkoppelt und so langsam zugeführt (manuelle Steuerung), dass das Zellwachstum limitiert wurde und kein L-Tyrosin akkumulierte. In dieser Fermentation konnten wieder > 30 g/l L-Phe produziert werden. Um jedoch ein optimales Wachstum zu ermöglichen, musste eine automatische Anpassung der L-Tyrosinzufuhr an den aktuellen Verbrauch erfolgen. Dies war umso wichtiger, da noch weitere Stämme mit unterschiedlichen Verbrauchsdaten eingesetzt werden sollten. Hierzu wurde eine weitere Regelungsstrategie in den Prozess implementiert.

Eine direkte Regelung der L-Tyrosinkonzentration, über eine Konzentrationsbestimmung mittels on-line HPLC, war bei dieser Fermentation nicht möglich. Bei einer unverdünnten

Analyse würde das Signal für L-Tyrosin schnell von L-Phe überlagert werden. Eine Verdünnung von mindestens 1:10 ist jedoch nicht möglich, da die notwendige Sollwertvorgabe von $< 10 \text{ mg/l}$ dann im Bereich der HPLC-Nachweisgrenze liegt.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine indirekte Regelung der L-Tyrosinzufuhr über eine semikontinuierliche Berechnung der volumetrischen Sauerstoffverbrauchsrate möglich ist. Die Ergebnisse in Abschnitt 6.2.4 zeigen, dass ein empirischer Zusammenhang zwischen volumetrischer Sauerstoff- und L-Tyrosinverbrauchsrate gefunden wurde. Beide Raten sind direkt von der aktuellen Zelldichte und der spezifischen Wachstumsrate abhängig. Durch Bestimmung der volumetrischen L-Tyrosinverbrauchsrate lässt sich eine Zulauftrate berechnen, die ein optimales Wachstum ermöglicht; -dabei jedoch eine Akkumulation vermeidet. Zudem lässt sich diese Strategie auch auf andere Stämme anwenden. Sollte es zu einer wesentlich Änderung des $Y_{S/X}$ für L-Tyrosin kommen, kann der empirische Zusammenhang durch Variation des Zulauffaktors m angepasst werden.

Letztendlich stellt der Regelungsansatz ein sehr einfaches und anwenderfreundliches System dar, denn alle für die Berechnung der volumetrischen OUR notwendigen Parameter, sind bereits vorhanden gewesen. Es mussten keine empfindlichen oder wartungsintensiven Komponenten eingesetzt werden.

In Abbildung 64 wurde exemplarisch der Verlauf der volumetrischen OUR, L-Tyrosinzulauftrate und optischen Dichte dargestellt. Während der gesamten Wachstumsphase konnte kein L-Tyrosin nachgewiesen werden. Mit diesem Prozess ließen sich mit *E. coli* 4pF20 reproduzierbar $> 30 \text{ g/l}$ L-Phe produzieren. Damit konnte die Vermutung des Einflusses von L-Tyrosin auf die Produktbildung indirekt bestätigt und der prozesstechnische Lösungsansatz etabliert werden.

8.2.4. EINFLUSS DER L-TYROSINREGELUNG

Um den Einfluss der L-Tyrosinzufuhr und der eingestellten Konzentration zu untersuchen, wurden mit den Stämmen *E. coli* 4pF26 und 4pF69 zwei Versuchsreihen durchgeführt, bei denen, durch Variation des Zulauffaktors m , der Einfluss geringer Akkumulationen bzw. strengerer Limitierungen an L-Tyrosin, untersucht werden sollten.

Die Fermentationsreihe mit *E. coli* 4pF26 zeigte, dass bei Einstellung von $m = 1,0$ mit 28 g/l ungefähr 5 g/l L-Phe mehr produziert wurde, als bei Einstellung von $m = 0,6$ (geringe Akkumulation) bzw. $m = 1,5$ (strenge Limitierung). Bis $t = 30 \text{ h}$ war der Unterschied jedoch eher gering. Der Stamm *E. coli* 4pF26 unterscheidet sich im Vergleich zu *E. coli* 4pF20 dadurch, dass auf das eingesetzte Plasmid zusätzlich das Gen *aroL^{wt}* (Shikimatkinase II) kloniert wurde. Der negative Einfluss des *tyrR*-Regulons bei L-Tyrosinüberschuss (s.o.) sollte deshalb bei diesem Stamm nicht auftreten. Dass unter Standardfermentationsbedingungen trotzdem neben der höchsten L-Phe-Konzentration auch die höchste spezifische Produktbildungsrate und Selektivität erreicht wurde, kann mit der höheren Aktivität der DAHP-Synthase zusammenhängen. Enzymaktivitätsbestimmungen zeigten (Abbildung 71), dass bei $m = 1,0$ die Aktivität am höchsten war. Bei dem in *E. coli* 4pF26 verwendeten Enzym handelt

es sich um die gentechnisch veränderte, feedback-resistente Variante der L-Tyrosin-spezifischen DAHP-Synthase, die resistent gegenüber L-Tyrosin sein sollte. Dass jedoch eine verbleibende Restsensitivität besteht, ist nicht auszuschließen [167]. Untersuchungen von Takagi et. al. [141] ergaben, dass trotz Einsatzes einer feedback-resistenten DAHP-Synthase, die L-Phe-Bildungsrate bei Limitierung der L-Tyrosinzufuhr erhöht wurde.

Unabhängig von der Qualität des neuen Stammes konnte in dieser Versuchsreihe gezeigt werden, dass sich das Regelungskonzept für L-Tyrosin problemlos auf einen anderen Stamm anwenden lässt und zu vergleichbaren und reproduzierbaren Ergebnissen führt. Zudem ließ sich durch die Variation von m die Verfügbarkeit an L-Tyrosin und die biologische Aktivität der Zellen gut steuern. Wie Abbildung 66 zeigte, führte die Einstellung von $m = 0,6$ zu einer zwischenzeitlichen Akkumulation der Aminosäure. Bei $m \geq 1$ wurden die Zellen L-Tyrosinlimitiert. Dass ein Unterschied im Grad der Limitierung auftrat, zeigt der Verlauf der volumetrischen OUR deutlich (Abbildung 65). Mit steigendem m sinkt die Sauerstoffaufnahme und es verlängert sich die Wachstumsphase.

Untersuchungen von Jossek [167] und die Versuche mit *E. coli* 4pF26 zeigten, dass die Aktivität und Stabilität der gentechnisch modifizierten DAHP-Synthase gering ist. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die native DAHP-Synthase wesentlich stabiler und aktiver ist, jedoch schon durch weniger als 50 mg/l L-Tyrosin inhibiert wird. Durch die Regelung der L-Tyrosinzufuhr im limitierenden Bereich ergab sich jetzt die Möglichkeit, das L-Tyrosin regulierte Wildtypenzym *aroF^{wt}* zu exprimieren und für die L-Phe-Produktion einzusetzen.

Der neue Stamm, *E. coli* 4pF69 wurde in einer Versuchsreihe bei $m = 0,6, 1,0, 1,5$ und $2,0$ fermentiert. Damit sollte der Einfluss der L-Tyrosinkonzentration auf die DAHP-Synthaseaktivität untersucht und die Regelungsstrategie an den neuen Stamm angepasst werden. Vermutet wurde, dass eine Akkumulation an L-Tyrosin zu einem massiven Abfall der Enzymaktivität und damit der Produktbildungsrate führt, während eine strengere Limitierung der Aminosäurezufuhr eine Erhöhung der L-Phe-Bildung bewirkt. An dieser Stelle soll jedoch nur der Einfluss der Verfahrensentwicklung auf die Möglichkeit zur Fermentation des *aroF^{wt}*-Stammes, und der Einfluss von L-Tyrosin, diskutiert werden. Die sich daraus ergebenden Konsequenzen für die Stammentwicklung werden in Abschnitt 8.6 behandelt.

Bei Einstellung eines Zulauffaktors von $0,6$ zeigte sich deutlich, dass die Wildtyp-DAHP-Synthase L-Tyrosinsensitiv ist. Die Akkumulation von 170 mg/l L-Tyrosin während der Wachstumsphase führte zu einer um ungefähr 60 % herabgesetzten spezifischen L-Phe-Bildungsrate und einem Produkttiter von ungefähr 10 g/l. Die $Y_{P/S}$ erreichte nur 5 % und eine Enzymaktivität war fast nicht nachweisbar. Die Einstellung eines Zulauffaktors von $1,0$ bzw. $1,5$ führte zu Ergebnissen, die sich mit *E. coli* 4pF26 vergleichen lassen. L-Tyrosin konnte in den Fermentationen nach der Batchphase nicht mehr nachgewiesen werden und es wurden vergleichbare Produktbildungsraten und L-Phe-Konzentrationen erreicht. Im Unterschied zu *E. coli* 4pF26 wurden jedoch wesentlich höhere Enzymaktivitäten gemessen und insbesondere

in den ersten 36 h konnte eine höhere $Y_{P/S}$ von 18 - 20 % (gegenüber 17 % bei *E. coli* 4pF26) festgestellt werden.

Es lassen sich demnach zwei grundsätzliche Ergebnisse zusammenfassen. Zum einen war es auch mit diesem Stamm möglich, unter Verwendung der Standardfermentation ($m = 1,0$) die Akkumulation von L-Tyrosin zu vermeiden. Zum anderen ermöglicht die Regelungsstrategie den Einsatz der L-Tyrosinsensitiven DAHP-Synthase, die nachweislich höhere Aktivitäten und damit Produktbildungsraten erreicht.

Die zusätzlich durchgeführte Fermentation bei $m = 2,0$ zeigte, dass eine noch strengere Limitierung an L-Tyrosin zu einem weiter verbesserten Fermentationsverlauf führt. Während bei *E. coli* 4pF26 bei $m = 1,5$ die Produktbildung nicht mehr auf das Maximum anstieg, wurden jetzt nicht nur vergleichbare spezifische und volumetrische Produktbildungsraten erreicht, sondern die L-Phe-Bildung wesentlich länger auf einem hohen Niveau gehalten. Der Grund dafür liegt in der weiter angestiegenen Enzymaktivität, die auch noch nach 30 h Fermentation messbar war (im Gegensatz zu *E. coli* 4pF20). Durch die verbesserte Fermentationsführung konnte zudem die L-Phe-Konzentration (34 g/l) und die $Y_{P/S}$ (20,8 % nach 36 h) weiter gesteigert werden. Dass die Produktbildungsrate in der ersten Fermentationshälfte, trotz höherer Enzymaktivität, nicht weiter angestiegen ist, könnte mit einer limitierten Bereitstellung von PEP, trotz Glucoseüberschuss, in Verbindung stehen (s.o. Vergleich der Fermentationen bei 0,1 g/l und 5,0 g/l in Bezug auf den „Glucose-Überschuss-Stoffwechsel“).

Das entwickelte Konzept zur indirekten Regelung der L-Tyrosinzufuhr ermöglichte damit, durch die Anpassung des empirischen Zusammenhangs, eine Verbesserung der L-Tyrosinverfügbarkeit unterhalb der HPLC-Nachweisgrenze. Erst durch diesen prozesstechnischen Ansatz wurde der Einsatz der nativen DAHP-Synthase möglich. Die Einstellung einer noch strengeren L-Tyrosinlimitierung ($m > 2,0$) wurde bisher nicht untersucht.

In diesen Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass sich die indirekte Regelung der L-Tyrosinzufuhr als ein notwendiges Instrument zur Fermentation der dargestellten L-Phe-Produzenten erwiesen hat. Es konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation von L-Tyrosin vermieden werden muss. Eine Steuerung der L-Tyrosinzufuhr im limitierenden Bereich kommt jedoch nicht in Frage, da dann der Vergleich verschiedener Stämme, unter gleichen Fermentationsbedingungen, nicht möglich ist. Anhand der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass durch das Regelungskonzept eine automatische Anpassung an den spezifischen L-Tyrosinverbrauch erfolgt und die Stämme unter gleichen Bedingungen fermentiert und dadurch miteinander verglichen werden können. Noch wichtiger wird der Einsatz der indirekten Regelung bei Verwendung der Wildtyp-DAHP-Synthase. Das Wildtypgen wurde bisher nur von Förberg et. al. [140] verwendet, wobei erst ab dem Ende der Wachstumsphase, d.h. nachdem kein L-Tyrosin mehr extrazellulär vorlag, L-Phe gebildet wurde. In diesen Versuchen konnten innerhalb von 38 h ungefähr 3,0 g/l L-Phe produziert werden.

Erst durch den neuen, prozesstechnischen Ansatz war es möglich, die L-Tyrosinkonzentration im Reaktor so gering zu halten, dass das Enzym nicht mehr inhibiert wird. Der Einsatz dieses Enzyms zur L-Phe-Produktion ist in dieser Arbeit damit erstmals erfolgreich gelungen. Eine direkte Regelung der L-Tyrosinkonzentration hätte damit keinen Erfolg gehabt, da die einzustellende Konzentration von < 10 mg/l unterhalb der Nachweisgrenze der HPLC lag.

8.2.5. ANSATZ ZUR PROZESSOPTIMIERUNG

Durch Zufuhr von 50 % mehr Nährsalzen und Einstellung einer 50 % höheren Biotrockenmassekonzentration, sollte bei konstanter spezifischer Produktbildungsrate und entsprechender Steigerung der volumetrischen Bildungsrate, eine höhere L-Phe-Konzentration und Raum-Zeit-Ausbeute erreicht werden. Der Vergleich der Ergebnisse einer Standardfermentation (*E. coli* 4pF69; $m = 2,0$) mit dem Optimierungsversuch in Abschnitt 6.2.7 zeigt, dass zum Zeitpunkt der Wachstumslimitierung eine um 48 % höhere Biotrockenmassekonzentration erreicht wurde. Im weiteren Fermentationsverlauf stieg die BTM im Standardansatz jedoch an und verringerte sich im Optimierungsansatz, so dass die Differenz nach 24 h nur noch 15 % betrug. Die Zunahme der BTM konnte in verschiedenen Versuchen beobachtet werden und liegt wahrscheinlich an der Zufuhr von L-Tyrosin für den Erhaltungsstoffwechsel innerhalb der Produktionsphase. Eine geringe Zufuhr über dem eigentlichen Bedarf der Zellen, führt zu einem geringen Wachstum und zur Erhöhung der Zelldichte. Der Grund für den Abfall der Biotrockenmassekonzentration im Optimierungsansatz wurde nicht gefunden.

Trotz der unerwartet geringen Unterschiede in der BTM, konnten Veränderungen im Fermentationsverlauf beobachtet werden. So konnten im Optimierungsansatz, in der ersten Fermentationshälfte, etwas höhere spezifische Glucoseverbrauchs- und Produktbildungsraten beobachtet werden. Ein signifikanter Unterschied von bis zu 25 % trat jedoch, wie erwartet, erst bei der Berechnung der volumetrischen Raten auf. Da das Fermentationsvolumen durch den erhöhten Glucosezulauf, das größere Volumen der L-Tyrosinlösung und der extra Nährsalzzugabe schneller anstieg, ist kein Unterschied in der L-Phe-Konzentration zu erkennen. Die Berechnung der produzierten L-Phe-Gesamtmenge zeigt jedoch einen deutlich schnelleren Anstieg im Optimierungsansatz. Erst in der mittleren Fermentationsphase (insbesondere zwischen 30 h und 35 h) wird, bei vergleichbaren Zulaufzeiten, die schnellere Zunahme der L-Phe-Konzentration deutlich. Zu diesem Zeitpunkt liegt auch die integrale Raum-Zeit-Ausbeute 10 % höher als im Standardprozess und die produzierte L-Phe-Gesamtmenge mit 510 g ungefähr 35 % über der Produktion unter Standardbedingungen (380 g). Während die L-Phe-Bildung im Standardprozess auf mittlerem Niveau konstant blieb, fiel die Produktion im Optimierungsansatz in den letzten 10 h auf 0 ab. Zum Fermentationsende lag die L-Phe-Konzentration in beiden Versuchen bei 32-34 g/l. Die gebildete Gesamtmenge erreichte im Standardprozess noch 480 g, blieb im Optimierungsansatz jedoch bei 510 g konstant.

Der Optimierungsansatz zeigte deutlich, dass mit einer höheren Zelldichte zwar keine höhere L-Phe-Konzentration erreicht wird, diese sich jedoch in 25 % weniger Zeit erreichen lässt. Die höhere Biomassekonzentration führte zu einer signifikanten Erhöhung der volumetrischen Produktbildungsrate und differentiellen RZA. Dies war die Zielsetzung des Optimierungsansatzes. Bei einer L-Phe-Konzentration von 36,7 g/l kam die Produktbildung jedoch völlig zum Erliegen, während im Standardansatz erst eine Konzentration von 31,3 g/l erreicht war und L-Phe weiterhin bis zu einer vergleichbaren Endkonzentration produziert wurde.

Auf die ersten 36 h bezogen, konnte der Prozess optimiert werden. Über einen Zeitraum von 50 h betrachtet, führte der Ansatz zu keiner Verbesserung der Fermentation. Weitere Untersuchungen zeigen (Abschnitt 6.4), dass auch bei geringeren Zelldichten mit Erreichen von 30-35 g/l L-Phe die Produktbildung abbricht und es zu einer Verdünnung des bereits gebildeten L-Phe kommt. Wie im Verlauf dieses Kapitels gezeigt werden wird, scheint dieser Einbruch auf biologische und nicht fermentationstechnische Ursachen zurückzuführen sein. Der dargestellte Versuch zur Prozessoptimierung stellt weiterhin einen interessanten Ansatz dar, erscheint in Bezug auf die bisherige Stammentwicklung jedoch verfrüht.

8.3. MAßSTABSVERGRÖßERUNG

Der Scale-up des Prozesses aus dem 20 l Laborreaktor in den 300 l Pilotmaßstab sollte zeigen, ob sich das entwickelte Verfahren, inklusive der Regelungsstrategien, problemlos auf einen größeren Reaktor übertragen lässt. Für diese Versuche wurde *E. coli* 4pF20 eingesetzt.

Die Ergebnisse der im halbtechnischen Maßstab durchgeführten Fermentation wurden in Abschnitt 6.2.6 mit dem besten Versuch, der im 20 l Reaktor erreicht wurde, verglichen. Ohne eine weitere Anpassung der Prozessparameter oder Angleichung der Regelstrecken, konnte mit 28,6 g/l L-Phe eine mit dem Laborreaktor (32,2 g/l L-Phe) vergleichbare Endkonzentration erreicht werden. Weitere wichtige reaktionstechnische Parameter, wie die integrale $Y_{P/S}$ und integrale RZA, zeigten Abweichungen von weniger als 10 %. Die Berechnung spezifischer und differentieller Raten zeigte, dass die Produktbildung im 300 l Reaktor zeitweise um bis zu 25 % niedriger verlief, dafür jedoch länger auf einem hohen Niveau blieb. Dieser Effekt kann mit den Schwankungen in der Regelung der Glucose- und L-Tyrosinzufuhr zusammenhängen. Insbesondere die leichte Akkumulation der Aminosäure auf 0,1 g/l in der Wachstumsphase, kann die verlangsamte Produktbildung verursacht haben. In folgenden Arbeiten könnte durch Feineinstellung der Regler (Glucose), oder durch Erhöhung des Zulauffaktors m (L-Tyrosin), der Prozess im 300 l Bioreaktor noch verbessert werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Scale-up des Prozesses in den Pilotmaßstab möglich ist. Der Einsatz der entwickelten Regelungsstrategien für Glucose und L-Tyrosin konnte erfolgreich demonstriert werden. Die technische Relevanz des Gesamtverfahrens wurde gezeigt.

8.4. UNTERSUCHUNGEN ZUM ZELLZUSTAND

In diesem Abschnitt sollen die Ergebnisse des Einflusses von D₂EHPA-Kerosin und die Untersuchung des Zellzustands bei Einstellung verschiedener L-Phe-Konzentrationen diskutiert werden.

8.4.1. EINFLUSS VON D₂EHPA AUF DEN FERMENTATIONSVERLAUF

Die in Abschnitt 6.2.8 dargestellten Ergebnisse hatten zum Ziel, den Einfluss einer D₂EHPA-Kerosinmischung auf den Fermentationsverlauf zu untersuchen. Hierzu wurde der Fermentation soviel gelöster Carrier zugeführt, wie bei einer Integration der Reaktiv-Extraktion in den Fermentationsprozess eingetragen werden würde [218]. Dieser Versuch wurde mit einer Fermentation ohne D₂EHPA-Kerosinzugabe verglichen.

Abbildung 77 zeigt, dass sich die Verläufe von Biotrockenmasse und spezifischer Wachstumsrate nur wenig verändern. Die D₂EHPA-Kerosinzugabe hat weder toxische Auswirkungen, noch wird das Zellwachstum inhibiert. Detaillierte Untersuchungen von Silberbach [204] haben dies bestätigt. Ein wesentlicher Unterschied tritt jedoch in der spezifischen L-Phe-Bildungsrate auf. Bei Zugabe von D₂EHPA-Kerosin werden über einen längeren Zeitraum höhere Produktbildungsrate erreicht. Dadurch verdoppelte sich die L-Phe-Konzentration mit 14,7 g/l nach 30 h gegenüber 7,6 g/l in der Vergleichsfermentation. Es konnte auch ein deutlicher Anstieg in der integralen Selektivität von 3,5 % auf 8,9 % und der integralen RZA von 0,25 g/(l*h) auf 0,49 g/(l*h) berechnet werden. Die Zugabe von D₂EHPA-Kerosin hatte demnach nur positive Auswirkungen auf den Fermentationsprozess. In Bezug auf die Integration der Reaktiv-Extraktion konnte damit eindeutig gezeigt werden, dass keine negativen Auswirkungen auf den Produktionsprozess zu erwarten sind.

Von Silberbach wurden verschiedene Arbeitshypothesen aufgestellt und untersucht [204], die eine Erklärung für den positiven Einfluss von D₂EHPA-Kerosin finden sollten. Das Ergebnis der Untersuchungen erhärtete die Vermutung, dass der Carrier die Diffusion von L-Phe aus der Zelle erleichtert. Der Gradient zwischen intra- und extrazellulärer L-Phe-Konzentration wird durch die Einlagerung von D₂EHPA in die Zellmembran verringert, wodurch die intrazelluläre Produktkonzentration abnimmt, und die L-Phe-Bildung und Produktselektivität steigt. Diese Hypothese konnte jedoch nicht bewiesen werden.

In den in Abschnitt 6.2.8 dargestellten Ergebnissen zum Einfluss von D₂EHPA-Kerosin, überlagern sich zwei Effekte. Abbildung 107 in Abschnitt 6.5.1 zeigt eine Fermentation unter gleichen Prozessbedingungen, jedoch ohne Filtrationsumlauf. In diesem Versuch konnten 11,0 g/l L-Phe produziert werden (integrale $Y_{P/S}$ 5,0 %; integrale RZA 0,37 g/(l*h)). Ein Vergleich dieser Fermentation mit dem Versuch bei zugeschaltetem Umlauf (Abbildung 78), zeigt den negativen Einfluss der Filtration auf den Prozess. Der positive Effekt des D₂EHPA-Kerosin trifft mit den negativen Auswirkungen des Filtrationsumlaufs zusammen und kann diese mehr als kompensieren.

Huang et. al. berichten, dass hohe Scherraten bei *E. coli* eine Stressantwort bewirken können [229]. Die Autoren konnten zeigen, dass dieser „Scherstress“ zu einem Abfall der

Plasmidstabilität führt. Innerhalb des Filtrationsumlaufs unterliegen die Zellen einer höheren Scherrate, als unter Normalbedingungen. Da zum Zeitpunkt der Filtration kein Selektionsdruck mehr ausgeübt wird, können die Zellen das Plasmid - bedingt durch den Scherstress - verlieren ohne abzusterben. Eine solche Reaktion würde zu einer kurzen Produktionsphase führen, die mit Beginn der Filtration schnell abbricht. Ein solcher Verlauf zeigte sich in dem Filtrationsversuch und wurde bei Versuchen im 300 l Pilotmaßstab (Abbildung 108 in Abschnitt 6.5.2) noch deutlicher. Der positive Einfluss von D₂EHPA auf die Zellen kann also nicht allein durch eine verbesserte L-Phe-Diffusion erklärt werden, da die Zellen ohne vorhandenes Plasmid kein L-Phe produzieren können und somit eine geringere intrazelluläre Produktkonzentration ohne Bedeutung ist. Auch die in Abbildung 80 dargestellten Ergebnisse der intrazellulären L-Phe-Bestimmung zeigen, dass die intrazelluläre Produktkonzentration bei Zufuhr von D₂EHPA-Kerosin zwar sinkt, jedoch nicht so wesentlich, dass eine Verbesserung der Diffusion durch D₂EHPA allein für eine höhere Produktbildung entscheidend sein kann (die Messungen beinhalten zwar einen großen systematischen Fehler, können jedoch durchaus für eine Diskussion über tendenzielle Erscheinungen herangezogen werden).

Auch in Fermentationen ohne Filtrationsumlauf ist die Phase der maximalen spezifischen Produktbildung nur kurz. Bei den zuletzt eingesetzten, weiterentwickelten Stämmen ist dies insbesondere auf Wechselwirkungen in der Aromatenbiosynthese zurückzuführen (Diskussion erfolgt später), jedoch generell auch auf die Instabilität der eingesetzten Plasmide. Zum einen sinkt die Plasmidstabilität mit Abnahme von Selektionsdruck und Wachstumsrate, zum anderen führt die Zunahme an L-Phe zu einer Verringerung der Plasmidhäufigkeit. In kontinuierlichen Fermentationen (Abbildung 79 in Abschnitt 6.3.1) konnte gezeigt werden, dass die Plasmidhäufigkeit in eingestellten „Steady-States“ auf bis zu 15 % abnahm. Dass die kurze Produktionsphase in Standardfermentationen im Fed-Batch-Betrieb auch ein Problem der Plasmidstabilität sein kann, ist deshalb möglich, wurde jedoch nicht weiter untersucht. Die gleiche Versuchsreihe zur Messung der Plasmidstabilität zeigte jedoch auch, dass bei Zugabe von D₂EHPA-Kerosin die Plasmidhäufigkeit wesentlich zunimmt. Unter den gleichen Fermentationsbedingungen, die zuvor zu einem Anteil von 15 % führten, konnte bei Zugabe von D₂EHPA-Kerosin eine Plasmidhäufigkeit von 60 % gemessen werden.

Der Carrier scheint demnach, aus nicht weiter untersuchten Gründen, zu einer wesentlichen Erhöhung der Plasmidstabilität zu führen. Es ist anzunehmen, dass eine höhere Stabilität zu einer Verbesserung der Produktbildung in der mittleren und späten Produktionsphase führt. In dieser Phase würde zudem die differentielle Selektivität und zwangsläufig auch die integrale $Y_{P/S}$ zunehmen.

Der Vergleich der drei Fermentationen - unter Standardbedingungen, bei Zuschaltung der Filtration und bei zusätzlicher Zugabe von D₂EHPA-Kerosin - kann deshalb auch folgenden Zusammenhang bilden: Die „normale“ Plasmidinstabilität unter Standardbedingungen führt zu einer Abnahme der spezifischen Produktbildung in der mittleren Fermentationsphase. Dieser Effekt wird durch Zuschaltung des Filtrationsumlaufs und dem damit verbundenen Scherstress wesentlich verstärkt und führt zu einem Einbruch der Produktion. Dies wurde

durch zwei Versuche im 7,5 l und 300 l Maßstab belegt. Der schnellere Abfall der Produktbildung im 300 l Maßstab wird durch eine annähernd zweifach höhere, auf den Reaktorinhalt bezogene, Förderrate durch den Umlauf verursacht und, dass die auftretenden Druckspitzen am Filtrationsmodul wesentlich über denen im 7,5 l Reaktor lagen. Durch die Zugabe von D₂EHPA-Kerosin konnte der Plasmidverlust trotz Filtration herabgesetzt und eine vergleichbare, maximale, spezifische Produktbildungsrate erreicht werden wie im Standardversuch. Darüber hinaus führte das D₂EHPA-Kerosin zu einem höheren Anteil an Zellen, die auch in der späten Fermentationsphase Plasmide beinhalten. Dadurch wurde eine, im Vergleich zur Standardfermentation, sehr hohe spezifische Produktbildungsrate und differentielle $Y_{p/s}$ erreicht, die letztendlich zu einer höheren L-Phe-Konzentration und integralen Selektivität führte.

Die Theorie, dass D₂EHPA, durch eine Verbesserung der Plasmidstabilität, zu höheren Produktbildungsraten führt, wurde nicht experimentell bewiesen und soll deshalb nur als Hypothese verstanden werden. Die Ergebnisse aus den Versuchen zur Plasmidstabilität sind jedoch signifikant und ermöglichen die Formulierung eines funktionellen Zusammenhangs zwischen den gemachten Beobachtungen. Um eine eindeutige Aussage zu formulieren, sind weitere Untersuchungen notwendig.

8.4.2. EINFLUSS VON L-PHENYLALANIN AUF DEN ZELLZUSTAND

Der Einfluss von L-Phe auf den Zellzustand wurde in kontinuierlichen Fermentationen untersucht. Die innerhalb dieser Versuchsreihen durchgeführten Untersuchungen zur Plasmidstabilität, zeigen einen deutlichen Plasmidverlust.

Die Ursachen für den Plasmidverlust sollen hier jedoch nicht weiter behandelt werden. Eine detaillierte Diskussion ist den Arbeiten von Engfeld zu entnehmen [209]. An dieser Stelle soll jedoch die Beobachtung diskutiert werden, dass die Plasmidhäufigkeit mit zunehmender L-Phe-Konzentration abnimmt. Auf REM-Aufnahmen zum Zeitpunkt der „Steady-States“ war zu sehen, dass mit steigender L-Phe-Konzentration vermehrt inclusion bodies auftraten (Abbildung 83; [230]). Weitere Untersuchungen von Ganpo [167] und Jossek [222] haben gezeigt, dass es sich hierbei um die inaktive Form der DAHP-Synthase ($aroF^{br}$) handelt. Dass die deregulierte Form der DAHP-Synthase wenig aktiv ist, zeigte sich im Rahmen der kontinuierlichen Fermentationen auch anhand von Messungen der Enzymaktivität (vgl. Abschnitt 6.3.1). Des Weiteren traten bei hohen L-Phe-Konzentrationen in allen REM-Aufnahmen unphysiologisch lange und deformierte Zellen auf (Abbildung 82 und Abschnitt 12.8). Dies ist ein Hinweis auf den allgemein schlechten Zellzustand und lässt vermuten, dass keine normale Zellteilung möglich ist.

Zwischen der Bildung von inclusion bodies aus der deregulierten DAHP-Synthase, den nicht normal teilungsfähigen Zellen und der Plasmidinstabilität, kann ein Zusammenhang bestehen. Hohe L-Phe-Konzentrationen führen zu einer vermehrten Bildung der inaktiven Form der DAHP-Synthase, die sich als inclusion bodies ablagert. Dieser unphysiologische Zustand

kann einen negativen Einfluss auf den Zellzustand und die Teilungsfähigkeit der Zellen haben. Die langen, gekrümmten Zellen sind hierfür ein deutlicher Hinweis. Diese schlechten Bedingungen können auch die Replikation des High-Copy-Plasmids wesentlich verringern. Liegen nicht 50-100 Kopien des Plasmids, wie unter optimalen Bedingungen [51], sondern nur noch wenige vor, kann aus einer Zellteilung eine Zelle ohne Plasmid hervorgehen. Da diese Zelle kein Plasmid trägt und keine DAHP-Synthase bildet, hat sie einen wesentlichen Wachstumsvorteil und setzt sich gegen die Zellen mit Plasmid, bis zu einem bestimmten Gleichgewichtszustand, durch. Dieser ist nur deshalb möglich, da während der Fermentation kontinuierlich Ampicillin zugeführt wird und die Zellen ohne Plasmid nicht mehr resistent sind. Der Anteil der plasmidhaltigen Zellen produziert die ampicillinspaltende β -Lactamase und sekretiert sie in das Medium, wodurch die Zellen ohne Plasmid „geschützt“ werden. Ein Gleichgewicht zwischen Zellen mit und ohne Plasmid ist demnach möglich.

Einige gezeigte Ergebnisse aus kontinuierlichen Fermentationen weisen auf den beschriebenen Zusammenhang zwischen L-Phe-Konzentration, Inaktivierung der deregulierten DAHP-Synthase und Plasmidstabilität hin. Es ist jedoch nicht möglich diese Hypothese auf den Produktionsprozess anzuwenden, da Untersuchungen der Plasmidstabilität unter Fed-Batch-Bedingungen fehlen.

Weitere Untersuchungen der DAHP-Synthaseaktivität, Expressionsrate und Plasmidstabilität, insbesondere unter Produktionsbedingungen, könnten zur Ursache für den Einbruch der L-Phe-Produktion, ab einer Konzentration von 30-38 g/l, führen. Gegen den Zusammenhang zwischen inclusion bodies und Plasmidstabilität spricht jedoch, dass mit den zuletzt eingesetzten Stämmen (*E. coli* 4pF69, 4pF79 und 4pF81) schon nach 25 - 30 h Fermentation 30 g/l L-Phe erreicht wurden und die Produktbildung wiederum abfiel. Zum einen wurden in diesen Versuchen keine inclusion bodies gebildet (native DAHP-Synthase), zum anderen lag die Wachstumsrate in dieser Fermentationsphase bei 0 (ein Verlust aufgrund von Zellteilung kann in dieser Phase also ausgeschlossen werden). Aufgrund dessen, dass die Zellen „ruhten“, ist auch kein direkter Vergleich mit den Ergebnissen aus den kontinuierlichen Fermentationen möglich.

Mit Sicherheit sind andere Faktoren für den Produktionseinbruch im Fed-Batch-Betrieb bei Erreichen einer L-Phe-Konzentration von 30 g/l entscheidend. Neben dem Einbruch der DAHP-Synthaseaktivität, könnte hier auch ein Abfall in der Expressionsrate der überexprimierten Gene die Ursache sein.

8.5. INTEGRATION DER AUFARBEITUNG

Der Anschluss der Reaktiv-Extraktion an den Fermentationsprozess sollte über einen Filtrationsumlauf erfolgen, da nur zellfreier Fermentationsüberstand aufgearbeitet werden konnte. Ansonsten würden die Zellen in der Anlage einer mehrere Minuten andauernden Sauerstofflimitierung unterliegen. Zudem würden auch die in der Reaktiv-Extraktion eingesetzten Hohlfaserkontakoren verblocken [225].

In Vorversuchen wurde untersucht, welche Art von Filtrationsmodul (Ultra- oder Mikro-Filtration; Röhren- oder Hohlfasermodule) für die Permeatabtrennung geeignet ist [204]. Die Wahl fiel auf ein Hohlfaserultrafiltrationsmodul. Als wichtigste Entscheidungskriterien sind geringe Scherraten (laminare Strömung, $Re \approx 900$), geringe Verweilzeit im Modul und ein großes Oberflächen-/Volumenverhältnis zu nennen. Auch die den Umlauf antreibende Pumpe durfte nur geringe Scherraten erzeugen. Zudem mussten bei Gegendruck stabile Förderraten sichergestellt werden und die Möglichkeit zur Sterilisation gegeben sein. Es wurden deshalb für alle Versuche Schlauchpumpen eingesetzt.

In Testfermentationen im 7,5 l Bioreaktor wurde der Einfluss von Pumprate, Überströmungsgeschwindigkeit ω , Druck am Modulein- und -ausgang und Transmembrandruck untersucht. Die Ergebnisse wurden von Silberbach detailliert diskutiert [204]. Die Untersuchungen zeigten, dass nach Einstellung des Gleichgewichtszustands ein Permeatfluss von 12,2 l/(m²*h) konstant gehalten werden konnte ($\omega = 1,27$ m/s; TMP = 0,7 bar; $Re = 916$). Dieser Zustand wurde bei maximaler Pumpleistung erreicht. Ob bei weiter ansteigenden Förderraten und Überströmungsgeschwindigkeiten höhere Permeatflüsse erreicht werden, wurde nicht weiter untersucht.

Die Integration der Reaktiv-Extraktion in den Fermentationsprozess führt zu einem geringen Eintrag von D₂EHPA-Kerosin. Die Auswirkungen auf das biologische System wurden bereits in Abschnitt 8.4 diskutiert. Kerosin und D₂EHPA können sich jedoch auch an die Polysulfonmembran des Hohlfasermoduls anlagern, wodurch, ähnlich wie bei fetthaltigen Lösungen, der Permeatfluss gesenkt wird [147]. Testfermentationen zur Untersuchung des Einflusses von D₂EHPA-Kerosin auf den Permeatfluss zeigten eine Reduktion des Permeatvolumenstroms im Gleichgewichtszustand um 25 % (9,3 l/(m²*h)). Bei Zugabe von reinem D₂EHPA fiel der Permeatfluss sogar auf 4,0 l/(m²*h) ab (Abbildung 105). Bei Integration der Reaktiv-Extraktion wird jedoch niemals reines D₂EHPA in den Bioreaktor und den Filtrationsumlauf eingetragen. Da es nicht möglich war, in Voruntersuchungen den Filtrationsumlauf im halbtechnischen Maßstab zu charakterisieren und aus technischen Gründen davon ausgegangen werden musste, dass nicht die gleichen Förderraten und Transmembrandrücke eingestellt werden können, wurde für den Scale-up des Filtrationsmoduls, von den geringsten, gemessenen Permeatflüssen ausgegangen.

Für die Reaktiv-Extraktion im integrierten Ansatz sollte ein Permeatvolumen von mindestens 15 l/h sichergestellt werden [225]. Bei einem Permeatfluss von 4,0 l/(m²*h) ergab sich eine notwendige Filtrationsfläche von 3,75 m². Es wurde deshalb ein Modul verwendet, das eine aktive Oberfläche von 4,4 m² hatte. Die für die Versuche im Pilotmaßstab eingesetzte Schlauchpumpe konnte bei maximaler Drehzahl 150 l/min Fermentationssuspension fördern. Dabei wurden jedoch Druckspitzen von > 3 bar erreicht, für die weder der Pumpenschlauch, noch das Filtrationsmodul ausgelegt waren. Eine Förderrate von 120 l/min erlaubte einen stabilen Betrieb. Die sich daraus ergebende Überströmungsgeschwindigkeit betrug 1,0 m/s.

Die im halbtechnischen Maßstab eingestellten Bedingungen (TMP $\approx$ 1,5-1,9 bar; $\omega = 1,0$ m/s) lagen nicht in dem Bereich, der, in Bezug auf die Voruntersuchungen, als optimal angesehen

wurde. Der zu hohe Transmembrandruck führt zu verstärktem Fouling, insbesondere in Gegenwart von D₂EHPA-Kerosin [204]. Dennoch war es möglich, den geforderten Permeatfluss von 15 l/h sicherzustellen (Abbildung 110). Zwar wurde nur ein Volumenstrom von 3,4 l/(m²·h) erreicht, die geringe Leistung jedoch durch die Überdimensionierung des Moduls kompensiert.

Neben der Auslegung des Filtrationsmoduls wurde der Einfluss des Umlaufs auf den Fermentationsprozess untersucht. In Versuchen im 7,5 l Maßstab wurden die Auswirkungen auf Wachstum und Produktbildung, bei Zuschaltung des Umlaufs verfolgt und die Ergebnisse in Abschnitt 6.5.1 zusammengefasst. Ein Vergleich mit einer Fermentation ohne Filtration zeigt, dass keine Veränderungen in der Wachstumsgeschwindigkeit und Biomassekonzentration auftraten. Jedoch zeigte sich ein deutlicher Abfall der spezifischen Produktbildungsrate und, damit verbunden, der L-Phe-Konzentration (Abbildung 107). Bei Zuschaltung der Filtration sank die L-Phe-Endkonzentration von 11,0 g/l auf 7,6 g/l ab, die integrale, molare $Y_{P/S}$ fiel von 5,0 % auf 3,5 %. Der negative Einfluss des Filtrationsumlaufs soll an dieser Stelle nur festgestellt werden. Die möglichen Ursachen für den Einbruch in der L-Phe-Produktion wurden bereits in Abschnitt 8.4 diskutiert.

Aufgrund der beschriebenen Erkenntnisse aus dem Laborreaktor wurde auch im 300 l Maßstab, vor der Integration der Aufarbeitung, der Einfluss des Filtrationsumlaufs auf den Standardprozess abgeschätzt. Dass der Scale-up des Fermentationsprozesses erfolgreich war, zeigte unter anderem die erreichte L-Phe-Konzentration von 28,6 g/l und die integrale Selektivität von 15,1 %. Die Ergebnisse wurden in Abschnitt 8.3 diskutiert. Der Versuch mit zugeschaltetem Filtrationsumlauf verlief, bis zur Aktivierung von diesem nach einer Fermentationsdauer von 16 h (Ende der Wachstumsphase), identisch. Glucose-, L-Tyrosin- und Biomassekonzentration waren vergleichbar. Auch die L-Phe-Produktion nahm bis zu diesem Zeitpunkt den gleichen Verlauf. Mit der Aktivierung des Umlaufs brach die spezifische Produktbildungsrate jedoch ein, statt, wie unter Standardbedingungen, weiter anzusteigen. Nach 10 h zugeschalteter Filtration kam die spezifische Produktbildung zum Erliegen, die L-Phe-Konzentration erreichte maximal 9,6 g/l (Abbildung 108). Nach insgesamt 37 h musste, aus technischen Gründen, der Versuch bei einer L-Phe-Konzentration von 7,6 g/l abgebrochen werden. Abgesehen von der L-Phe-Produktion waren bis zu diesem Zeitpunkt alle Prozessparameter mit dem Standardprozess vergleichbar. Die Gelöstsauerstoffkonzentration im Umlauf konnte immer über 25 % gehalten werden und war für die Fermentationsführung ausreichend.

Wie auch schon in den Voruntersuchungen, führte die Filtration zu einem selektiven Einbruch der L-Phe-Produktion. Die Auswirkungen im 300 l Versuch waren jedoch wesentlich größer, als im 7,5 l Maßstab. Allerdings ist auch der direkte Einfluss der Filtration im Pilotreaktor größer. Die durch die Schlauchpumpe verursachten Druckspitzen erreichten bis zu 2,8 bar (7,5 l Reaktor 1,6 bar) und der Transmembrandruck lag zwischen 1,5 und 1,9 bar (7,5 l Reaktor 0,7 bar). Zudem führte die Förderrate von 120 l/min dazu, dass der gesamte Reaktorinhalt in Intervallen von 75 s bis 100 s (kontinuierliche Zunahme des

Arbeitsvolumens) durch den Umlauf geführt wurde. Im 7,5 l Reaktor lag die Verweilzeit der Zellen im Reaktor bei mindestens 120 s.

Als Ursache für den Produktionseinbruch wurde in Abschnitt 8.4 die durch Scherstress verursachte Plasmidinstabilität diskutiert. Dieses Problem hat sich im 300 l Ansatz offenbar noch verstärkt und würde, bei einem weiteren Scale-up in den m³-Maßstab, wahrscheinlich noch zunehmen. Die negativen Auswirkungen der Permeatabtrennung dürften, aus industrieller Sicht, den Einsatz dieses Verfahrens verhindern. Allerdings würde in einer großtechnischen Produktion auch ein chromosomal integrierter Stamm eingesetzt werden und die aufgezeigten Probleme gar nicht die Bedeutung erlangen. In der vorliegenden Arbeit ließen die technischen Möglichkeiten nur dieses Verfahren zu. Die Integration der Aufarbeitung ist jedoch als Machbarkeitsstudie zu verstehen und nicht als ausgereifter Prozess.

Durch die integrierte Aufarbeitung soll während einer Fermentation kontinuierlich Produkt abgetrennt werden, ohne das Fermentationsvolumen zu erneuern. Für die Produktion von L-Phe wurde der in der Aromatenbiosynthese deregulierte Stamm *E. coli* 4pF20 eingesetzt. Durch die beiden überexprimierten Gene *aroF^{fbr}* und *pheA^{fbr}* sollte eine Inhibierung der L-Phe-Produktion, bei Akkumulation des Produktes, vermieden werden. Bei *aroF^{fbr}* handelt es sich um die feedback-resistente, L-Tyrosinspezifische DAHP-Synthase. Es ist jedoch bekannt [192], dass das Enzym auch L-Phe-sensitiv ist. *In vitro* Untersuchungen der DAHP-Synthaseaktivität zeigten, dass die Aktivität schon bei Zugabe von 3 g/l L-Phe um 30 % sinkt [167]. Vergleichbare Untersuchungen von Backmann et. al. [34] zeigten eine Reduktion der Enzymaktivität um 50 % bei Vorlage von 10 g/l L-Phe. Die Integration der Aufarbeitung und die Vermeidung der L-Phe-Akkumulation ist deshalb sinnvoll.

Die Ergebnisse des integrierten Ansatzes sind in Abschnitt 6.5.3 zusammengefasst. In Bezug auf die Verfahrensentwicklung konnte gezeigt werden, dass sich die Produktion und Aufarbeitung zu einem Hybridprozess verschmelzen lassen. Die Fermentation konnte bei Standardbedingungen durchgeführt werden und der Filtrationsumlauf erreichte, nach Einstellung des Gleichgewichtszustands, einen Permeatfluss von 15 l/h. Eine Sauerstofflimitierung im Umlauf konnte vermieden werden. Die Reaktiv-Extraktion wurde mit dem Umlauf nach 15 h Fermentation stabil hochgefahren und eine Rückführung des Raffinats (produktarmes Permeat) in den Fermentationsprozess, war ohne Sterilitätsprobleme möglich. Negative Effekte durch den Eintrag organischer Substanzen konnten nicht beobachtet werden. Der Gesamtprozess wurde für insgesamt 48 h stabil betrieben und anschließend kontrolliert beendet.

Zum Prozessende wurden im Bioreaktor 21,5 g/l L-Phe nachgewiesen (Abbildung 111). Der Konzentrationsverlauf der Akzeptorphase zeigt, dass L-Phe während der Fermentation extrahiert und aufkonzentriert wurde. Am Fermentationsende wurden in der Akzeptorphase 37,7 g/l L-Phe nachgewiesen. Eine Extraktion gegen den Konzentrationsgradienten war demnach möglich. Nachuntersuchungen zeigten, dass das aufkonzentrierte L-Phe eine

Reinheit > 98 % hatte und nur < 40 mg/kg organische Verunreinigungen enthielt (detaillierter Analysebericht in Abschnitt 12.6). Dies ist als indirekter Beweis zu werten, dass die Produktabtrennung innerhalb des Hybridprozesses selektiv stattfand.

Die durchschnittliche Extraktionsleistung von 70 g/h lag im zuvor berechneten Bereich [218]. Die auf das Arbeitsvolumen im Bioreaktor bezogene L-Phe-Produktion erreichte jedoch mit 130 g/h bis 230 g/h ein Niveau, das wesentlich über der in den Voruntersuchungen abgeschätzten Produktbildung lag. Eine Akkumulation von L-Phe im Bioreaktor war deshalb nicht zu vermeiden. Da die Extraktionsleistung der Aufarbeitung durch eine Limitierung des Stoffübergangs (Reaktionslimitierung) von der organischen Phase in die Akzeptorphase verursacht wird [223, 231], könnte bei einer Wiederholung des Versuches, durch eine Erhöhung der bisher 1 M H_2SO_4 -Konzentration in der Akzeptorphase, die L-Phe-Konzentration im Produktionsprozess weiter abgesenkt werden. Abbildung 112 zeigt, dass insgesamt 7,0 kg L-Phe produziert wurden. Die on-line abgetrennte L-Phe-Menge umfasst ungefähr 1,9 kg. Demnach könnte durch eine Erhöhung der Schwefelsäurekonzentration oder durch eine Vergrößerung der Membranfläche zwischen organischer und Akzeptorphase um einen Gesamtfaktor von 4, eine L-Phe-Anreicherung vermieden werden.

Wie bereits erwähnt, wurden nach 48 h Fermentation 21,5 g/l L-Phe gemessen. Unter Einbeziehung des L-Phe in der Akzeptorphase ergibt sich eine Endkonzentration von 30,8 g/l. Dieser theoretische Wert wird in der Folge zur Beurteilung des Fermentationsverfahrens herangezogen, da nur so ein Vergleich mit anderen Ergebnissen möglich ist, in denen kein L-Phe abgetrennt wurde.

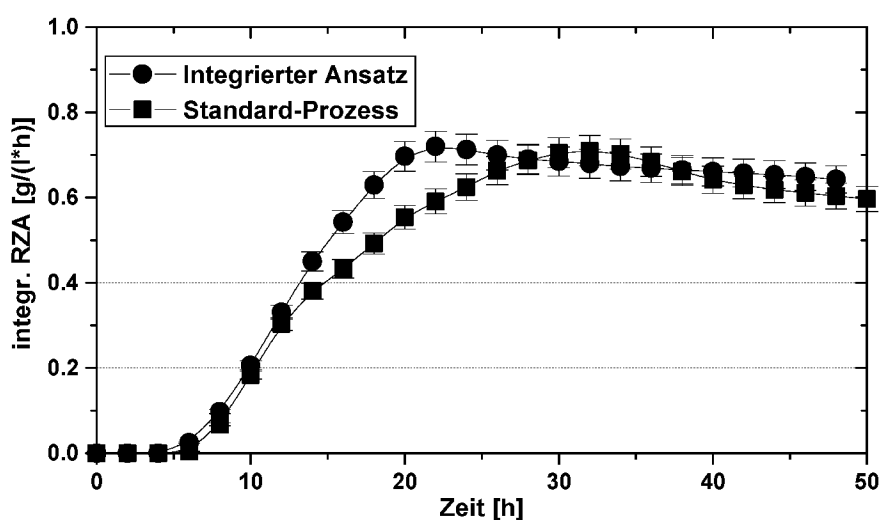


Abbildung 118: Vergleich der integralen Raum-Zeit-Ausbeute im 300 l Bioreaktor bei integrierter Produktabtrennung mit dem Standardprozess (300 l) (*E. coli* 4pF20). Start des Filtrationsumlaufs nach 15 h.

Ein Vergleich der L-Phe-Konzentration mit der 300 l Fermentation unter Standardbedingungen (vgl. Abschnitt 8.3) zeigt, dass beide Verläufe praktisch identisch sind. Die im Hybridprozess um 2,2 g/l höhere Konzentration ist nicht signifikant, insbesondere da es sich um eine errechnete Konzentration handelt. Insgesamt verlaufen die meisten Parameter in beiden Versuchen annähernd identisch, wie Glucose-, L-Tyrosin- und Biomassekonzentration und sogar die spezifischen Substratverbrauchs- und Produktbildungsraten zeigen. Während in der Fermentation, bei Zuschaltung der Filtration, die L-Phe-Produktion einbricht, hat die Kombination aus Filtration und Aufarbeitung keinen negativen Einfluss mehr.

Der Unterschied zwischen der Standardfermentation und dem Hybridprozess, wird erst bei der Berechnung der substratbezogenen Produktselektivität und Raum-Zeit-Ausbeute deutlich. Wie Abbildung 116 zeigt, nimmt die differentielle RZA im Hybridprozess deutlich schneller zu. Dies kann auf die verbesserte L-Tyrosinzufuhr zurückgeführt werden (vgl. Abschnitt 8.3). Mit dem Start der Permeatabtrennung fällt die differentielle RZA schnell ab, bleibt jedoch auf einem mittleren Wert konstant. In den letzten 12 h liegt die Rate jedoch höher, als in der Standardfermentation, in der die differentielle RZA zum Versuchsende kontinuierlich abnimmt. Trotz der großen Unterschiede hat dies kaum einen Einfluss auf die berechnete integrale RZA, wie Abbildung 118 zeigt. Zwar steigt der Wert im Hybridprozess schneller an, zu Fermentationsende liegt jedoch in beiden Versuchen eine integrale RZA von ungefähr 0,6 g/(l*h) vor.

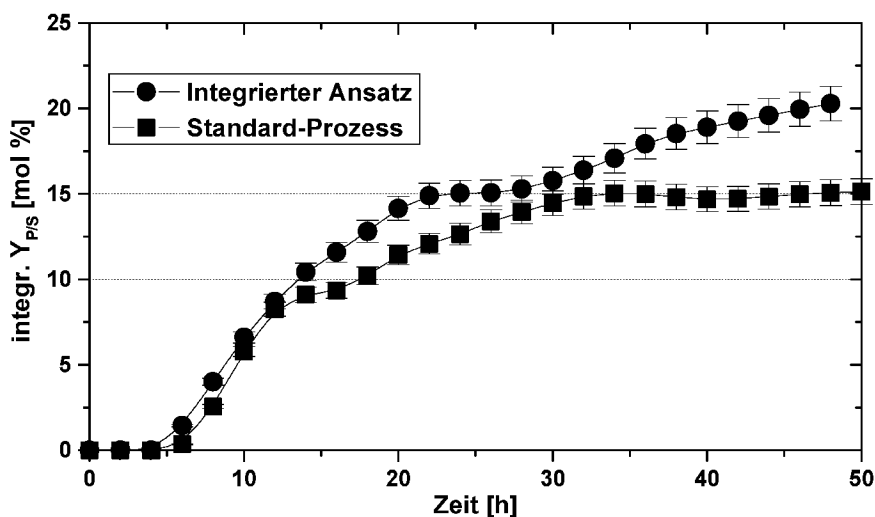


Abbildung 119: Vergleich der molaren, integralen, substratbezogenen Produktselektivität im 300 l Bioreaktor bei integrierter Produktabtrennung mit dem Standardprozess (300 l) (*E. coli* 4pF20). Start des Filtrationsumlaufs nach 15 h.

Während die differentielle RZA, aufgrund der Permeatabtrennung, abfällt, steigt die differentielle $Y_{P/S}$ auf einen Wert von 30-40 % an und bleibt bis Fermentationsende ungefähr konstant (Abbildung 116). Die Selektivität liegt im Bereich des theoretischen Maximums. In dieser Zeit treten zwei Veränderungen, gegenüber dem Standardprozess, auf. Einerseits wird D₂EHPA-Kerosin in die Fermentation eingetragen. Andererseits liegt die L-Phe-Konzentration, durch die kontinuierliche Extraktion, bei ungefähr 20 g/l, statt 30 g/l. Der sonst unter Standardbedingungen auftretende Einbruch der differentiellen $Y_{P/S}$ bei 30 g/l wird also vermieden.

In der durchgeführten Versuchsreihe konnte nicht geklärt werden, ob die D₂EHPA-Kerosinzufuhr oder die geringere L-Phe-Konzentration für die Selektivitätssteigerung verantwortlich ist. Ein Vergleich der Selektivität mit Ergebnissen aus den Voruntersuchungen (7,5 l Bioreaktor und Zugabe von D₂EHPA-Kerosin ohne L-Phe-Abtrennung) würde eine differenzierte Interpretation zulassen. Eine Berechnung von differentiellen $Y_{P/S}$ ist jedoch für diese Versuche, aufgrund des unvollständigen Datensatzes, nicht möglich.

Unabhängig von der Ursache zeigt der in Abbildung 119 dargestellte Verlauf, dass nach 48 h im Hybridprozess eine integrale $Y_{P/S}$ von 20,3 %, gegenüber 15,1 % in der Standardfermentation, erreicht wurde. In der zweiten Hälfte der Produktionsphase fand demnach eine signifikante Verbesserung der Fermentation im Hybridprozess statt. Eine so hohe Selektivität wurde mit *E. coli* 4pF20 in keiner anderen Fermentation erreicht (integrale $Y_{P/S_{max}}$ im 20 l Bioreaktor 16,3 %).

Der diskutierte Versuch ist als Demonstrationsexperiment zu verstehen, dass im Pilotmaßstab die Möglichkeit einer Verschmelzung von Fermentation und Aufarbeitung, zu einem Hybridprozess untersuchen sollte. Dieses Ziel konnte uneingeschränkt erreicht werden. Über diese Fragestellung hinaus konnte gezeigt werden, dass die Integration der Reaktiv-Extraktion zu einer Verbesserung der Fermentationsleistung, gegenüber der Standardfermentation, führt. Dies war aufgrund des völligen Zusammenbruchs der Produktbildung im Vorversuch, der durch den Filtrationsumlauf verursacht wurde, nicht zu erwarten. Sollte ein alternatives Verfahren zur Permeatabtrennung bzw. ein chromosomal integrierter Produktionsstamm zur Verfügung stehen, kann ein solcher Hybridprozess für toxische oder inhibierende Produkte, durch eine Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute bzw. der Substratselektivität, auch unter ökonomischen Aspekten eine sinnvolle Alternative darstellen (vgl. Abschnitt 10.).

8.6. STAMMENTWICKLUNG

Wie bereits in der Problemstellung dieser Arbeit formuliert wurde (Abschnitt 3.), lag der erste Schwerpunkt der Prozessentwicklung darin, einen hoch reproduzierbaren Prozess zu entwickeln. Die zweite Zielsetzung bestand darin, die Fermentation, durch den Einsatz von Regelungsstrategien, so flexibel zu erhalten, dass sich der Prozess an das spezifische Verhalten verschiedener, gentechnisch veränderter Stämme anpasst, und diese unter gleichen Prozessbedingungen charakterisiert werden können.

In diesem Kapitel sollen die erhaltenen Ergebnisse aus der Stammcharakterisierung interpretiert werden. Im ersten Abschnitt werden die L-Phe-Produzenten individuell angesprochen, um die Eigenschaften der einzelnen Stämme hervorzuheben. In diesem Zusammenhang sollen die Entscheidungskriterien aufgezeigt werden, die zur Entwicklung des nächsten Stammes geführt haben. Im zweiten Teil werden die signifikantesten Ergebnisse der besten *E. coli* Stämme einander gegenübergestellt, um den durch Gentechnik, Fermentationstechnik und Analytik erzielten Fortschritt darzustellen.

8.6.1. *E. coli* 4pF20

Der Stamm enthält ein Plasmid, auf dem die gentechnisch modifizierten, deregulierten Varianten *aroF^{fb}* und *pheA^{fb}* überexprimiert wurden (Abbildung 88). Über diese beiden Gene wird innerhalb der Aromatenbiosynthese die L-Phe-Produktion reguliert [15, 192, 193]. Bei der Überproduktion von L-Phe mit *E. coli* wurden bisher fast ausschließlich feedback-resistente Varianten dieser Enzyme eingesetzt [102, 103, 104, 105, 106, 114, 115, 141].

Die in Abschnitt 6.4.2 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass vom Zeitpunkt der Induktion bis zum Ende der Fermentation, eine stabile Produktbildung möglich war. Die spezifische Produktbildungsrate (Abbildung 86) sank zwar im Verlauf der Fermentation von 0,05 auf 0,02 g/(g*h) ab, ist im Vergleich zu anderen Stämmen jedoch eher konstant. Die gleich bleibende Produktbildung führte konsequenterweise zu einem späten Maximum der differentiellen $Y_{P/S}$, das mit 18,1 % erst nach 34 h erreicht wurde. Da der Substratverbrauch zu diesem Zeitpunkt jedoch minimal war, lag die differentielle Raum-Zeit-Ausbeute bei nur noch 0,5 g/(l*h). Die integrale $Y_{P/S}$ und RZA (Abbildung 87) zeigt, dass auch hier erst nach 30 - 35 h ein Maximum erreicht wird. Aufgrund des immer weiter abnehmenden Substratverbrauchs, bleibt die integrale $Y_{P/S}$ konstant, während die integrale RZA wieder abfällt.

Am Ende der Fermentation konnten mit diesem Stamm 32,2 g/l L-Phe produziert werden. Außer in den Arbeiten von Konstantinov et. al. [114], in denen mit *E. coli* 46 g/l erreicht wurden, übertrifft diese Konzentration alle Literaturangaben (vgl. Tabelle 7 am Kapitelende). Gleiches gilt für die erreichte integrale Raum-Zeit-Ausbeute von 0,64 g/(l*h).

Bei Fermentationsende konnten 5,0 g/l Acetat nachgewiesen werden. Bis $t = 36$ h lag die Konzentration bei weniger als 2,0 g/l. Konstantinov et. al. [113] beschreibt einen vergleichbaren Verlauf der Acetatkonzentration. Er definiert das Ansteigen der Acetatkonzentration sogar als Abbruchkriterium, da ab diesem Zeitpunkt die L-Phe-Produktion schnell abfällt. Gleiches scheint auch für den in dieser Arbeit entwickelten Prozess, unter Einsatz von *E. coli* 4pF20, zu gelten. Der Verlauf der Acetatkonzentration konnte mehrfach reproduziert werden. Die Ursache für den Anstieg zum Fermentationsende, soll später, beim Vergleich der Stämme untereinander, diskutiert werden.

Mittels der NMR [232] war es möglich, zwei Intermediate der Aromatenbiosynthese, Shikimat und DAH, nachzuweisen. DAH erreichte während der Fermentation bis zu 17,5 g/l, Shikimat 6,1 g/l. Beide Intermediate akkumulierten über den Fermentationsverlauf, da die

Aktivitäten der beiden nachfolgenden Enzyme offensichtlich reaktionslimitierend waren. Wie aus Abbildung 88 hervorgeht, handelt es sich um die 3-Dehydroquinat-Synthase (*aroB^{wt}*) und die Shikimatkinase II (*aroL^{wt}*). In verschiedenen Artikeln wird berichtet, dass *aroB^{wt}* bei einer Überexpression von *aroF* reaktionslimitierend werden kann. Akkumuliert in der Folge DAH, so wirkt das Intermediat zusätzlich noch inhibierend [39, 41]. Von *aroL^{wt}* ist bekannt, dass es bei L-Tyrosinüberschuss von *tyrR* reprimiert wird [20]. Diese Problematik besteht durch die Regelung der L-Tyrosinzufuhr nicht mehr. Bei einer Überproduktion von L-Phe kann die Enzymaktivität jedoch auch bei einer „natürlichen“ Expressionsrate reaktionslimitierend werden [196], wodurch Shikimat akkumuliert.

Das Problem der DAH-Akkumulation wird später behandelt. Zunächst sollte die Anreicherung von Shikimat, durch eine Überexpression von *aroL^{wt}*, vermieden werden.

8.6.2. *E. coli* 4pF26

In diesem Stamm wurde in das Plasmid, neben *aroF^{fb}* und *pheA^{fb}*, zusätzlich *aroL^{wt}* kloniert und überexprimiert (Abbildung 91). Die Ergebnisse in Abschnitt 6.4.3 zeigen, im Vergleich zu *E. coli* 4pF20, einen wesentlich schnelleren Anstieg der L-Phe-Konzentration (Abbildung 89). Zwar wurde mit 27,5 g/l eine geringere L-Phe-Konzentration erreicht, dennoch zeigt die spezifische Produktbildungsrate, mit einem Maximum von 0,07 g/(g*h), dass die L-Phe-Produktion gesteigert werden konnte (*E. coli* 4pF20 0,05 g/(g*h)). Die verbesserte Produktbildung wirkt sich auch auf $Y_{P/S}$ und RZA aus. Wie Abbildung 90 zeigt, konnte eine maximale, differentielle Selektivität von 19,4 % und eine differentielle RZA von 1,6 g/(l*h) erreicht werden (bei *E. coli* 4pF20 18,1 % bzw. 1,3 g/(l*h)). Der Einbruch in der Produktbildung in den letzten 18 h der Fermentation, führte jedoch zu einer integralen $Y_{P/S}$ von 14,8 % und integralen RZA von 0,55 g/(l*h). Damit lagen die Kennzahlen der Gesamtfermentation unter den mit *E. coli* 4pF20 erreichten Werten.

Aus Sicht der Prozessentwicklung gab es für das Verhalten des neuen Stammes keine eindeutige Erklärung. Die Messung der Acetatkonzentration zeigte jedoch, dass die Bildung dieses Nebenproduktes wesentlich früher als bei *E. coli* 4pF20 startete und nach 50 h bei 12,7 g/l lag. Zum Zeitpunkt der Abnahme der L-Phe-Produktion ($t = 30$ h), liegt die Acetatkonzentration bei 3 g/l und nimmt schnell zu. Hier scheint, wie schon bei *E. coli* 4pF20, ein Zusammenhang zu bestehen. Ob der Einbruch der L-Phe-Produktion zur Acetatbildung führt, oder die Acetatbildung zum Einbruch der Produktbildung, lässt sich an dieser Stelle nicht beantworten und wird in Verlauf der Stammentwicklung diskutiert.

Wie die NMR-Daten in Abbildung 91 zeigen, konnte kein Shikimat mehr nachgewiesen werden. Die Überexpression der Shikimatkinase II war demnach erfolgreich und der reaktionslimitierende Schritt konnte beseitigt werden. Der reaktionslimitierende Schritt zum 3-Dehydroquinat war noch nicht bearbeitet worden und führte dementsprechend wieder zu einer Akkumulation von DAH (10,3 g/l nach 22 h). Bevor jedoch *aroB* überexprimiert wurde, sollte die gentechnisch modifizierte DAHP-Synthase (*aroF^{fb}*) gegen das feedback-sensitive Wildtypenzym (*aroF^{wt}*) ausgewechselt werden.

REM-Aufnahmen (Abbildung 83) zeigten, dass in *E. coli* 4pF20 und 4pF26 inclusion bodies gebildet werden. Jossek [167] und Ganpo [222] konnten das inaktive Protein als DAHP-Synthase identifizieren und *in vitro* Messungen der Enzymaktivität zeigten (Abbildung 71, Diskussion der Ergebnisse in Abschnitt 8.2), dass nach 30 h Fermentation keine Aktivität mehr nachgewiesen werden konnte. Die Wildtyp-DAHP-Synthase wies hingegen in *in vitro* Analysen eine hohe Stabilität und Aktivität auf, jedoch auch eine hohe Sensitivität gegenüber L-Tyrosin (verringerte Aktivität schon bei < 50 mg/l) [167]. Durch die Regelung der L-Tyrosinzufuhr bestand jedoch die Möglichkeit, eine Konzentration von < 10 mg/l einzustellen, die damit unterhalb des K_S -Werts für L-Tyrosin (36 mg/l [140]) lag. Der prozesstechnische Ansatz ermöglicht damit den Austausch von $aroF^{fbr}$ gegen $aroF^{wt}$.

8.6.3. *E. coli* 4pF69

In diesem Stamm wurde in dem Plasmid $aroF^{fbr}$ gegen $aroF^{wt}$ ausgetauscht (Abbildung 94). Wie die Ergebnisse in Abschnitt 6.2.5 (Abbildung 67 bis Abbildung 71) zeigen und in Abschnitt 8.2 diskutiert wurden, führte der Einsatz der L-Tyrosinregelung, bei Einstellung eines Standardzulauffaktors m von 1,0, zur Produktion von ungefähr 27 g/l L-Phe nach 30 h. Die Produktkonzentration, ebenso wie die spezifische Produktbildungs- und Substratverbrauchsrate, sind mit *E. coli* 4pF26 vergleichbar. Sogar die nach ungefähr 10 h gemessene DAHP-Synthaseaktivität lag mit 0,5 U/mg_{Protein} auf dem gleichen Niveau. Eine Erhöhung der L-Tyrosinzulauftrate zeigte deutlich, wie sensitiv die DAHP-Synthase ist. Die sehr geringe Enzymaktivität führte zur Bildung von nur 12,8 g/l L-Phe.

Durch die Einstellung eines Zulauffaktors m von 2,0 konnte die L-Tyrosinzulauftrate so weit verringert werden, dass während der gesamten Zulaufphase kein L-Tyrosin mehr nachweisbar war. Bei einem weiterhin exponentiellen Wachstum konnte nach 10 h eine vierfach höhere Enzymaktivität gemessen werden, als bei Einsatz der gentechnisch modifizierten DAHP-Synthase. Auch noch nach 30 h Fermentation war eine signifikante Aktivität der nativen DAHP-Synthase von 0,7 U/mg_{Protein} nachweisbar, während das feedback-resistente Enzym keine Aktivität mehr aufwies.

Es konnte gezeigt werden, dass die Regelung der L-Tyrosinzufuhr den Einsatz von $aroF^{wt}$ ermöglichte, und mit dem Wildtypenzym eine wesentlich höhere Aktivität und Stabilität erreichbar war. Auch inclusion bodies konnten nicht mehr nachgewiesen werden [222].

Die in Abschnitt 6.4.4 dargestellten Ergebnisse zum Stammvergleich zeigen, dass bis zu einer Fermentationsdauer von 40 h die spezifische Produktbildungsrate zwischen 0,065 und 0,045 g/(g*h) lag. Es wurde keine höhere Produktbildung als mit anderen Stämmen erreicht, jedoch konnte aufgrund der höheren Enzymstabilität über einen längeren Zeitraum, die hohe Produktbildungsrate konstant gehalten. Dass nicht auch die maximale spezifische L-Phe-Bildungsrate anstieg, liegt an der 20 % höheren Biomassekonzentration, die den direkten Vergleich einschränkt, oder aber, dass trotz Glucoseüberschuss, eine Limitierung der Glucoseaufnahme bzw. PEP-Verfügbarkeit eintrat (vgl. Abschnitt 8.2). Davon unabhängig konnten mit diesem Stamm und veränderter Prozessstrategie nach 38 h 36,7 g/l L-Phe

produziert werden. Die differentielle $Y_{P/S}$ erreichte zu diesem Zeitpunkt einen Wert von 24 % und die differentielle RZA lag nach einem Maximum von 1,8 g/(l*h) immer noch bei 1,2 g/(l*h) (0,8 g/(l*h) bei *E. coli* 4pF26 und gleicher Prozesszeit). Bis zu diesem Zeitpunkt führte *E. coli* 4pF69 zu einer deutlichen Verbesserung des Gesamtprozesses und lies sich in Bezug auf die L-Phe-Konzentration sogar mit dem von Konstantinov et. al. [114] entwickelten Prozess (39 g/l L-Phe nach 38 h) vergleichen. Ab $t = 40$ h fiel die Produktbildung jedoch innerhalb weniger Stunden auf 0 ab. Die bis zu diesem Zeitpunkt gebildete L-Phe-Menge wurde, durch den Fed-Batch-Betrieb, verdünnt und lag am Fermentationsende bei 31,5 g/l. Auch die integrale $Y_{P/S}$, die nach 36 h ein Maximum von 20,7 % erreichte, fiel wieder auf 15,8 % ab. Abbildung 94 zeigt, dass mit Erreichen einer L-Phe-Konzentration von 30 g/l (30 h) die Produktbildung langsam abnimmt und vermehrt Acetat gebildet wird. Nach weiteren 6 h liegen 5 g/l Acetat vor und die L-Phe-Produktion kommt zum Erliegen. Während die Acetatkonzentration weiter ansteigt und 31,8 g/l erreicht, wird keinerlei L-Phe mehr gebildet. Auch in diesem Versuch scheint ein Zusammenhang zwischen dem Erreichen einer L-Phe-Konzentration von ungefähr 30 g/l, dem Start der Acetatbildung, und dem daraufhin folgenden Abfall der weiteren L-Phe-Produktion, vorhanden zu sein.

Bei Einsatz von *E. coli* 4pF69 zeigen die NMR-Messungen, dass eine Shikimatakkumulation zwar weiterhin vermieden wird, jedoch bis zum Ende der Fermentation 10,2 g/l DAH gebildet werden. In dem nächsten Stamm sollte deshalb zusätzlich *aroB^{wt}* (3-Dehydroquinat-Synthase) überexprimiert werden. Da es aus molekulargenetischen Gründen nicht einfach war, vier Gene in einen Vektor zu klonieren und zudem die Möglichkeit bestand, dass eine Überexpression von *aroL^{wt}* nicht mehr unbedingt notwendig war, wurde *aroB^{wt}* nicht zusätzlich überexprimiert sondern gegen *aroL^{wt}* ausgetauscht.

8.6.4. *E. COLI* 4pF79

In diesem Stamm wurde in dem Plasmid *aroL^{wt}* gegen *aroB^{wt}* ausgetauscht (Abbildung 97) und damit *aroF^{wt}*, *aroB^{wt}* und *pheA^{br}* überexprimiert. Die in Abschnitt 6.4.5 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass der reaktionslimitierte Schritt von DAH nach 3-Dehydroquinat eliminiert werden konnte. Mittels NMR [232] konnte kein DAH mehr nachgewiesen werden (Abbildung 97). Dadurch, dass die Shikimatkinase II nicht mehr überexprimiert wurde, akkumulierte bei Einsatz dieses Stammes allerdings wieder Shikimat. 8 h nach Induktion lagen bereits 10,5 g/l vor. Der reaktionslimitierende Schritt bei der Umsetzung von Shikimat zu Shikimat-3-P führte sogar zur Anreicherung von Dehydroshikimat (4,3 g/l nach 8 h), das in der Aromatenbiosynthese vor Shikimat liegt. Es kam also zu einem „Rückstau“ an Intermediaten. Im gleichen Zeitraum wurden 10,2 g/l L-Phe gebildet. Die Konzentration lag zu diesem Zeitpunkt höher, als bei jedem anderen Stamm, der bisher fermentiert wurde. Da in dieser Zeit jedoch zusätzlich insgesamt 14,8 g/l an Intermediaten akkumulierten (Molmassen sind vergleichbar), zeigt dieses Ergebnis aber auch, wie viel Potential noch in einer Weiterentwicklung des Produktionsstammes liegt.

Abgesehen von dem eindeutigen Beweis, dass *aroL*^{wt} überexprimiert werden muss, führte die Überexpression von *aroB*^{wt} zu der höchsten bisher erreichten Produktbildungsrate. Für mehr als 10 h lag die spezifische Produktbildung bei ungefähr 0,08 g/(g*h). Nach nur 25 h Fermentation wurde bereits eine L-Phe-Konzentration von 30,4 g/l erreicht. Bei *E. coli* 4pF20 stellte sich diese Konzentration erst nach 48 h ein. Die L-Phe-Konzentration stieg bis auf 35,2 g/l an, fiel dann aber bis Fermentationsende wieder auf 32,5 g/l ab. Während bei *E. coli* 4pF69 die spezifische Produktbildungsrate zunächst langsam auf 0,04 g/(g*h) abnahm und nach 10 h weiterer Produktbildung innerhalb von 8 h auf 0 absank, fiel bei *E. coli* 4pF79 innerhalb von 8 h die Produktbildung vom Maximum auf annähernd 0 ab. Im gleichen Zeitraum fiel auch die differentielle RZA von 2,4 g/(l*h) (zum Vergleich *E. coli* 4pF20: differentielle RZA_{max} bei 1,3 g/(l*h)) auf 0 ab. Die differentielle Y_{P/S} erreichte sogar 35,7 % und lag damit über dem erwarteten theoretischen Maximum (Diskussion erfolgt innerhalb des Vergleichs der Stämme untereinander). Die integrale Y_{P/S} lag nach einem Maximum von 24,4 % nach 50 h immer noch bei 20,4 % und damit höher als bei jeden anderen, publizierten Fermentationsverfahren zur L-Phe-Produktion.

Der Einsatz von *E. coli* 4pF79 kann damit, trotz der Anreicherung von Intermediaten, als erfolgreich gewertet werden. Alle wichtigen Kenndaten, in Bezug auf die L-Phe-Produktion, ließen sich in dieser Fermentation verbessern. Zudem steht nun fest, dass sich beide reaktionslimitierenden Schritte durch die Überexpression der entsprechenden Gene aufheben lassen. In dem nächsten Stamm sollte, neben den drei hier eingesetzten Genen, wieder *aroL*^{wt} überexprimiert werden, um sowohl die Anreicherung von Shikimat, als auch DAH zu vermeiden. Ob jedoch eine L-Phe-Konzentration von > 35 g/l erreicht werden kann, ist unsicher. Wie schon bei *E. coli* 4pF69, startete mit dem Erreichen einer L-Phe-Konzentration von über 30 g/l die Acetatbildung. Zu dem Zeitpunkt, als 35 g/l L-Phe erreicht wurden, lag die Acetatkonzentration wieder bei 5 g/l und stieg weiter an, während die Produktbildung abfiel. Bis zum Fermentationsende akkumulierten 37,2 g/l Acetat. Je früher eine L-Phe-Konzentration von 30 g/l erreicht wird, desto eher beginnt offenbar die Acetatbildung. Dieser Zusammenhang soll anhand eines Vergleichs aller charakterisierten L-Phe-Produzenten später diskutiert werden.

Durch eine umfangreiche Neukonstruktion des bisher verwendeten Plasmids sollten die vier Gene zusammen überexprimiert werden, bei denen gezeigt werden konnte, dass sie für die L-Phe-Produktion wichtig sind.

8.6.5. *E. COLI* 4pF81

In diesem Stamm wurde auf dem Plasmid, neben *aroF*^{wt}, *aroB*^{wt} und *pheA*^{br}, wieder *aroL*^{wt} überexprimiert (Abbildung 102). Das Plasmid enthielt damit vier Gene der Aromatenbiosynthese. Die in Abschnitt 6.4.7 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass mit diesem Stamm alle identifizierten, reaktionslimitierenden Schritte zur Synthese von L-Phe, eliminiert werden konnten. Zwar konnte noch eine geringe Anreicherung von Shikimat

gemessen werden, jedoch zeigt der Vergleich mit *E. coli* 4pF79, dass die Menge wesentlich reduziert wurde. Für den Produktionsprozess ist diese Anreicherung kaum von Bedeutung. Der Grund für die Shikimatbildung liegt wahrscheinlich in der Konstruktion des Plasmids. *aroL^{wt}* wurde als viertes Gen in den Vektor kloniert und ist am Weitesten vom Promotor entfernt. Dadurch ist die Transkriptions- und Translationsrate, im Vergleich zu den anderen Genen, am geringsten und somit die Expressionsrate niedriger. Dies kann zu einer geringen Limitierung der Reaktionsrate führen.

Die spezifische Produktbildungsrate konnte bei diesem Stamm weiter gesteigert werden. Zwar stieg die differentielle RZA nicht weiter an, jedoch lag die Biotrockenmassekonzentration ungefähr 15 % unter den Standardfermentationsbedingungen und führte deshalb zu einem Anstieg der spezifischen Rate. Eine weitere Fermentation dieses Stammes, bei einer um 30 % reduzierten BTM-Konzentration, von Rüffer [191], zeigte, dass die Steigerung der spezifischen Produktbildung reproduziert werden kann. Vermutlich wird die Produktbildung, durch die Vermeidung der Anreicherung von Intermediate, verbessert.

Mit 38,5 g/l wurde mit diesem Stamm nach 35 h die bisher höchste Produktkonzentration erreicht. Nach 25 h konnten über 30 g/l L-Phe gemessen werden. Dies ist, insbesondere in Anbetracht der geringeren BTM-Konzentration, eine eindeutige Verbesserung gegenüber dem Einsatz von *E. coli* 4pF79. Mit dem Erreichen einer Produktkonzentration von über 30 g/l nahm jedoch auch in dieser Fermentation die Produktbildung ab und die Acetatbildung stieg an. Lag die Acetatkonzentration noch bei 2,3 g/l, als 28,6 g/l L-Phe vorlagen, erreichte das Nebenprodukt 4 h später schon 5,0 g/l. Zu dieser Zeit wurden 34,9 g/l L-Phe gemessen. Während die Produktbildung weiter gegen 0 ging, stieg die Acetatkonzentration bis Fermentationsende auf 36,0 g/l an. Wie schon bei den zuvor fermentierten L-Phe-Produzenten (insbesondere *E. coli* 4pF69 und 4pF79) führte das Erreichen einer Produktkonzentration von über 30 g/l zur Bildung von Acetat und zum Einbruch der weiteren Produktion. Da in diesem Versuch kaum noch Intermediate gebildet werden, kann es sich auch nicht um die Ursache für den Produktionsabfall handeln. Andere mögliche Ursachen sollen später in Form einer stammübergreifenden Diskussion behandelt werden. Aufgrund dessen, dass die Ergebnisse von *E. coli* 4pF81 erst spät und nur teilweise vorlagen, wird dieser Stamm nur bedingt diskutiert werden.

Durch die Überexpression von vier Genen konnte mit *E. coli* 4pF81 die Produktbildungsrate sowie die integrale Produktselektivität und Raum-Zeit-Ausbeute, gegenüber *E. coli* 4pF79, gesteigert werden. Die erzielten Verbesserungen sind signifikant, jedoch insgesamt eher gering. Die Vermeidung von Intermediaten ist als essentieller Schritt auf dem Weg zur Entwicklung eines Produktionsstammes zu betrachten. Eine Steigerung des Produkttiters bzw. eine Erhöhung der RZA in der zweiten Hälfte der Fermentation, erscheint durch eine Verbesserung des Stoffflusses durch den Zentralstoffwechsel und Aromatenbiosynthese nicht erreicht werden zu können. Die Vermeidung der Intermediatbildung führte „lediglich“ zu einer Erhöhung der Produktbildungsrate, RZA und insbesondere Produktselektivität in der Zeit bis zum Erreichen von 30-38 g/l L-Phe. Die Ergebnisse zeigen, dass von den gebildeten Intermediaten keine toxischen oder inhibierenden Effekte ausgingen, die zum Abfall der L-

Phe-Produktion führten. Da die Bildung von Shikimat im letzten Stamm vermieden wurde, erscheint auch der Stofffluss von PEP in die Aromatenbiosynthese nicht reaktionslimitierend zu sein. Es fällt jedoch hier und in den vorangegangenen Fermentationen auf, dass mit einer L-Phe-Konzentration von 30-35 g/l die Acetatbildung ansteigt. Auf diesen möglichen, funktionalen Zusammenhang, soll später eingegangen werden.

8.6.6. *E. coli* 4pF79pF63 UND *E. coli* 18

Auch die in diesem Abschnitt diskutierten Ergebnisse dienen der Weiterentwicklung eines L-Phe-Produzenten. Der genetische Hintergrund dieser Stämme unterschied sich jedoch wesentlich von den anderen dargestellten *E. coli* und führte zu keiner Verbesserung des Produktionsprozesses. Es handelt sich jedoch um signifikante, reproduzierbare Beobachtungen, die deshalb kurz zusammengefasst werden sollen.

In *E. coli* 4pF79pF63 wurden zwei Plasmide transformiert. pF79 enthält *aroF^{wt}*, *pheA^{br}* und *aroB^{wt}*, auf pF63 ist *aroL^{wt}* lokalisiert. Der Stamm hat also den gleichen genetischen Hintergrund wie *E. coli* 4pF81 und bildete die Entwicklungsstufe zwischen *E. coli* pF79 und *E. coli* pF81 nur, dass die Gene auf zwei Vektoren verteilt vorlagen. Die Ergebnisse in Abschnitt 6.4.6 zeigen, dass dieser Stamm, trotz vergleichbarer Wachstumsrate und Biomassekonzentration, eine höhere spezifische Substratverbrauchsrate aufweist. Die spezifische Produktbildungsrate erreicht hingegen nicht einmal 0,05 g/(g*h) und liegt nach 30 h bei 0. Während der Fermentation wurden nach 24 h 9,6 g/l L-Phe erreicht. In der gleichen Zeit erreichte *E. coli* 4pF79 ungefähr 27 g/l L-Phe. Zudem lagen zu diesem Zeitpunkt bei *E. coli* 4pF79pF63 schon > 10 g/l Acetat vor. Die Produktbildung fiel daraufhin auf 0 ab. Zum Ende der Fermentation erreichte die Acetatkonzentration 35,4 g/l. Zwar wurden so hohe Konzentrationen auch bei anderen Stämmen gemessen, jedoch immer erst, nachdem mehr als 30 g/l L-Phe gebildet wurden. Die frühe Acetatbildung führte zudem zu einer erhöhten Zufuhr von Ammoniakwasser (pH-Korrekturmittel) und, verursacht durch die hohe Ammoniumkonzentration, zur Bildung von L-Alanin. Zum Fermentationsende lagen deshalb 6,0 g/l L-Alanin und 0,8 g/l Ammonium vor. Dies sind die höchsten Konzentrationen, die innerhalb der gesamten Stammentwicklung gemessen wurden.

Da die überexprimierten Gene die gleichen sind wie in *E. coli* 4pF81, liegt der Schluss nahe, dass die Ursache für die geringe Produkt- und hohe Nebenproduktbildung in dem Zweiplasmidsystem liegt. Andere *E. coli* Stämme die zwei Plasmide beinhalteten, führten zu vergleichbaren Ergebnissen. Ob durch die zwei Vektoren eine Phosphatlimitierung verursacht wird, der Zellstoffwechsel zu sehr belastet wird, oder aufgrund der Belastung bzw. Limitierung die Plasmide verloren gehen, wurde nicht untersucht.

E. coli 18 unterschied sich gegenüber den anderen Stämmen dahingehend, dass die überexprimierten Gene nicht auf einem Vektor, sondern chromosomal integriert vorlagen (in *E. coli* 4pF26 beinhaltete die gleichen Gene auf einem Plasmid). Damit sollte der bisherige, bei den Stämmen auftretende Plasmidverlust (Abschnitt 8.4.) vermieden, und eine stabilere Produktbildung und Raum-Zeit-Ausbeute erreicht werden.

8.6.8. GEGENÜBERSTELLUNG DER L-PHENYLALANINPRODUZENTEN

In den folgenden Abbildungen wurden keine Fehlerbalken eingetragen, da die Ergebnisse schon in anderen Zusammenhängen gezeigt wurden. Bei den hier dargestellten, weiterführenden Berechnungen handelt es sich um simulierte Werte.

Ein Vergleich der differentiellen $Y_{P/S}$ und RZA zeigt den Fortschritt in der Prozess- und Stammentwicklung, der durch fünf Generationen gentechnisch veränderter *E. coli* erreicht wurde. Die Ergebnisse aus der Fermentation zur Charakterisierung von *E. coli* 4pF81 konnten aufgrund von Schwierigkeiten und Verzögerungen bei der Stammkonstruktion nicht in die Abbildungen aufgenommen werden und können hier nur eingeschränkt diskutiert werden.

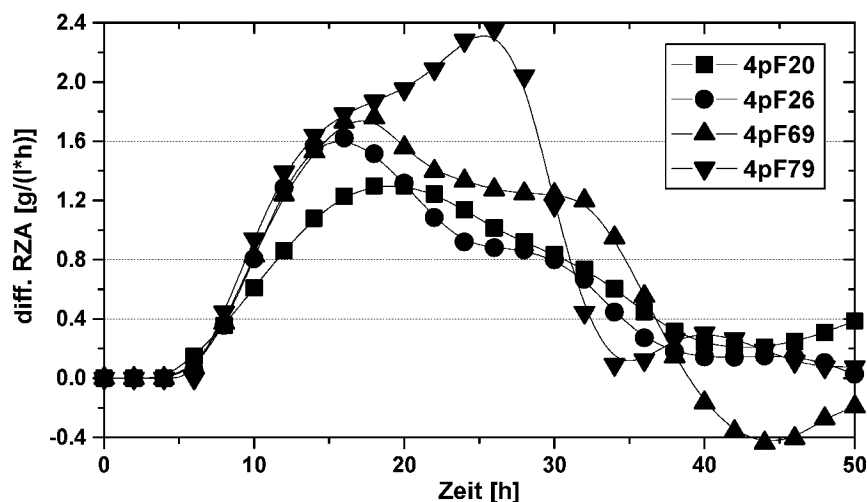


Abbildung 121: Entwicklung der differentiellen Raum-Zeit-Ausbeute bei Einsatz verschiedener potentieller Produktionsstämme (20 l Bioreaktor, Standardbedingungen).

Abbildung 121 zeigt den Verlauf der differentiellen Raum-Zeit-Ausbeute bei Einsatz von *E. coli* 4pF20, 4pF26, 4pF69 und 4pF79 unter vergleichbaren Fermentationsbedingungen (ausgenommen die Anpassung des Zulauffaktors m). Abgesehen von *E. coli* 4pF20 ist der Verlauf innerhalb der Wachstumsphase (bis $t = 16$ h) identisch. In der Hauptproduktionsphase zwischen 15 h und 35 h Fermentation wurde, durch die prozesstechnische Möglichkeit zum Austausch von $aroF^{fbr}$ gegen $aroF^{wt}$ und die zusätzliche Überexpression von $aroL^{wt}$ und $aroB^{wt}$, die differentielle RZA mit 2,4 g/(l*h) mehr als verdoppelt. Es liegen für einen Vergleich zwar keine Daten zur differentiellen RZA aus der Literatur vor, es kann jedoch ökonomische Einschätzungen der DSM-Biotech [235] als Qualitätsmerkmal herangezogen werden. Hier wurde als Zielsetzung eine integrale RZA von 1,9 g/(l*h) definiert. Abbildung 121 zeigt, dass diese Vorgabe bis zu 30 % übertroffen werden konnte, allerdings nur bei differentieller Betrachtung. Bei *E. coli* 4pF81 konnte zwischenzeitlich bei integraler Berechnung eine RZA von 1,2 g/(l*h) erzielt werden, jedoch fiel auch in diesem Versuch der Wert nach 50 h Fermentation auf 0,72 g/(l*h) ab. Die Betrachtung der differentiellen RZA in den letzten 15 h Fermentation zeigt, dass einer Verbesserung in der Hauptproduktionsphase

ein umso stärkerer Abfall in der Endphase folgt. Die bisherige Stammentwicklung hat demnach zu einer wesentlichen Beschleunigung der Produktbildung geführt. Statt in 50 h, wie zu Beginn der Stammentwicklung, kann jetzt in 25 h eine L-Phe-Konzentration von über 30 g/l erreicht werden. Es ist bisher jedoch nicht gelungen, die Produktbildung über eine L-Phe-Konzentration von 38,5 g/l hinaus, auf diesem hohen Niveau zu halten.

Letztendlich konnte mit jedem Stamm eine L-Phe-Konzentration > 30 g/l erreicht werden und die integrale RZA lag bei jeder Fermentation nach 50 h bei 0,55 g/(l*h) (*E. coli* 4pF20) bis 0,72 g/(l*h) (*E. coli* 4pF81). Die Unterschiede in der Produktbildung sind nur bei einer differentiellen Betrachtung erkennbar. Unabhängig von der Fermentationsdauer fällt die Produktbildung mit Erreichen von 30 g/l L-Phe ab. Dies kann mit einer Akkumulation bisher nicht identifizierter Intermediate zusammenhängen, die schon bei einer Konzentration von < 1 g/l (Nachweisgrenze der NMR [232]) stark inhibierend oder toxisch wirken. Solche Eigenschaften werden zum Beispiel bei EPSP vermutet [232]. Gegen die These eines L-Phe-Produktionsabfalls aufgrund toxischer Effekte spricht jedoch, dass die Zellen nach dem Erreichen von 30 g/l Produkt nicht absterben, sondern beginnen, Acetat zu produzieren (siehe folgende Diskussion). Sauerstoff- und Glucoseverbrauchsdaten bleiben zunächst konstant. Durch eine zusätzliche Überexpression der Chorismatsynthase (*aroC^{wt}*) könnte diese Problemstellung jedoch abschließend geklärt werden.

Eine andere Erklärung für den Abfall der Produktbildung kann die Inhibierung der DAHP-Synthase sein. Neidhardt et. al. [7] fasst zusammen, dass die L-Tyrosinspezifische DAHP-Synthase (*aroF*) auch durch hohe Konzentrationen an L-Phe inhibiert wird. Untersuchungen von Jossek [167] und Backman et. al. [34] kamen zu dem Ergebnis, dass das Enzym in Gegenwart von 10 g/l L-Phe bis zu 50 % inhibiert wird. Dieser Aktivitätsverlust wird bei 30 g/l L-Phe noch größer sein. Park und Rogers [106] führten mit einem L-Phe-Produzenten einen „Repeated“-Fed-Batch durch, indem sie nach jeweils 25 h ungefähr 80 % des Mediums erneuerten. Obwohl die Zellen dreimal eingesetzt wurden, konnte jedes Mal eine Endkonzentration von 20 - 22 g/l erreicht werden.

Fasst man die Ergebnisse der Stammentwicklung zusammen, so zeigt sich, dass die Fermentationsdauer zur Bildung von über 30 g/l L-Phe wesentlich verkürzt werden konnte. Zudem akkumulierten in den verschiedenen Stämmen unterschiedliche Intermediate zu verschiedenen Zeiten und in unterschiedlichen Mengen. Wäre die Akkumulation eines inhibierenden oder toxischen Intermediates für den Einbruch der Produktion verantwortlich, so müsste eine Abhängigkeit von der Zeit, oder der Bildung der anderen Intermediate, festzustellen sein. Stattdessen zeigte auch die Fermentation von *E. coli* 4pF81, dass die Produktbildung ab 30 g/l L-Phe abfällt, obwohl kein messbares Intermediat mehr akkumuliert. Auch die Reduktion der Biomassekonzentration um bis zu 30 % führte zu einer Produktendkonzentration von 30 g/l. Im Vergleich zu einer Standardfermentation mit *E. coli* 4pF81 stieg die Fermentationsdauer lediglich von 25 h auf 28 h an. Der einzige

Zusammenhang, der sich aus dieser und den anderen Fermentationen ergibt, liegt in der Bildung von 30 – 35 g/l L-Phe.

Diese Beobachtungen und publizierte, biochemische Untersuchungen der Regulation der L-Tyrosinspezifischen DAHP-Synthase, legen den Schluss nahe, dass der Abfall der Produktbildung durch eine Inhibierung der DAHP-Synthase, beim Erreichen einer L-Phe-Konzentration von über 30 g/l, verursacht wird.

Von Konstantinov et. al. [114] publizierte Daten zur L-Phe-Produktion mit *E. coli* zeigen, dass nach 50 h Fermentation 46 g/l L-Phe mit einer L-Tyrosinresistenten DAHP-Synthase erreicht werden. Zwar liegen die differentielle Raum-Zeit-Ausbeute und Produktselektivität wesentlich unter dem in dieser Arbeit entwickelten Prozess, jedoch produziert der Stamm bis Fermentationsende L-Phe. Vergleichbares gilt auch für einen, von der Firma DSM untersuchten Stamm. Einer langsameren L-Phe-Bildung folgt eine wesentlich längere Produktionsphase über 40 g/l L-Phe hinaus. Da nicht anzunehmen ist, dass die eingesetzte DAHP-Synthase feedback-resistent in Bezug auf L-Phe ist [167], muss neben der Inhibierung ein weiterführendes Problem bestehen.

Die bisher eingesetzten Stämme zeichneten sich in kontinuierlichen Fermentationen durch eine unzureichende Plasmidstabilität aus. Trifft dies auch auf die Fed-Batch-Fermentation zu und würden die Zellen schon in der Wachstumsphase das Plasmid verlieren, so würde zwar noch L-Phe produziert werden, jedoch keine Reproduktion der DAHP-Synthase mehr stattfinden. Wird die vorhandene DAHP-Synthase durch L-Phe-Konzentrationen von über 30 g/l inhibiert, dann handelt es sich um einen dynamischen Prozess, der nicht nur konzentrationsabhängig, sondern auch zeitabhängig ist. Darauf weisen die Ergebnisse mit den letzten fermentierten Stämmen hin, in denen bei steigender Produktbildungsrate mit Erreichen von 30 g/l L-Phe die Produktion zwar innerhalb weniger Stunden abfiel, in dieser Zeit jedoch, aufgrund des höheren Ausgangsniveaus, mehr L-Phe gebildet werden konnte und der L-Phe-Titer etwas weiter anstieg. Wird nun zu diesem Zeitpunkt keine DAHP-Synthase mehr gebildet, da das zu exprimierende Plasmid nicht mehr vorhanden ist, fällt die L-Phe-Produktion schnell auf 0 ab.

Bei einer weiterhin vorhandenen Expression der DAHP-Synthase, würde das Enzym zwar immer noch inhibiert werden, da es sich um eine zeitabhängige Reaktion handelt, aber nicht sofort zu 100 %. Letztendlich würde eine steigende Produktkonzentration zu einer abnehmenden Produktbildungsrate und einer sich stetig verlangsamenen Erhöhung der Produktkonzentration führen.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass als Ursache für den Produktionseinbruch eine Inhibierung der DAHP-Synthase anzunehmen ist. Wenn die weiteren Annahmen zutreffen, könnte der Abfall durch eine erhöhte Expression der eingebrachten Gene, bzw. eine höhere Stabilität des Plasmids in der zweiten Fermentationshälfte, verringert werden. Es werden jedoch weitere Untersuchungen folgen müssen, um diese These zu bestätigen. In Abschnitt 10 wurden hierzu einige Ansätze zusammengefasst. Wie im Folgenden gezeigt wird, besteht auch ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Abfall der L-Phe-Produktion und dem Anstieg der Acetatbildung. Zuvor soll jedoch stammübergreifend zusammengefasst

werden, inwieweit das Potential von *E. coli* zur Bildung von L-Phe bisher ausgeschöpft wurde.

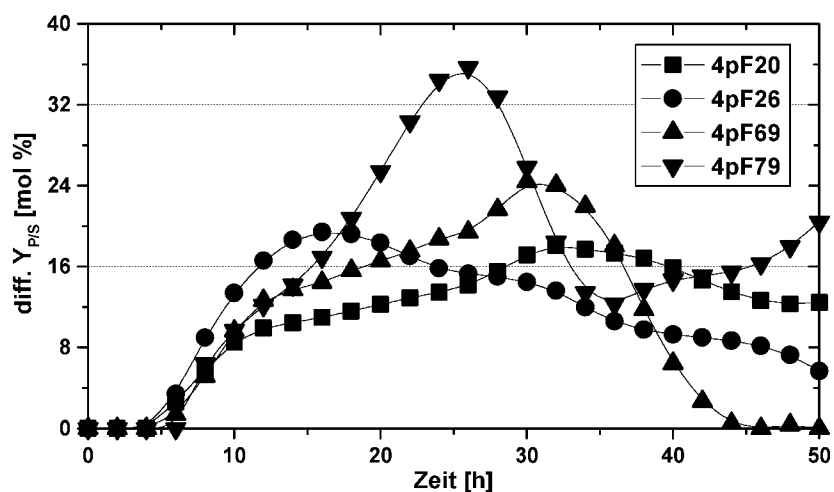


Abbildung 122: Entwicklung der differentiellen, molaren $Y_{P/S}$ bei Einsatz verschiedener potentieller Produktionsstämme (20 l Bioreaktor, Standardbedingungen).

Während die Raum-Zeit-Ausbeute einen quantitativen Vergleich der L-Phe-Produktion erlaubt, ermöglicht die in Abbildung 122 dargestellte differentielle $Y_{P/S}$ eine quantitative Bewertung der Glucoseverwertung. Es zeigt sich, dass die Weiterentwicklung des Produktionsstammes, neben einer schnelleren Produktion, auch zu einer Verbesserung der Produktselektivität geführt hat. In der Hauptproduktionsphase (15-35 h) wurde pro mol Glucose mit *E. coli* 4pF79 mehr als doppelt soviel L-Phe produziert, als mit *E. coli* 4pF20. Die Ergebnisse in Abschnitt 6.4.1 zeigen, dass sich der spezifische Glucoseverbrauch während der Stammentwicklung kaum verändert hat. Letztendlich wurde die verwertete Glucose besser in L-Phe umgesetzt.

Mit der Einstellung einer L-Phe-Konzentration von 30-35 g/l und dem Abfall der Produktbildung, fiel auch die Selektivität ab. Die weiterentwickelten Stämme produzierten in den letzten 15 h mehr CO_2 und Acetat als Produkt, während die differentielle $Y_{P/S}$ abfiel. Der veränderte Verlauf in der Produktbildung wirkt sich deshalb auch auf die integrale $Y_{P/S}$ aus (Abbildung 123). Während bei *E. coli* 4pF20, nach einer stetigen Zunahme, die integrale $Y_{P/S}$ konstant bleibt, nimmt sie bei den anderen Stämmen zum Fermentationsende wieder ab. Der Einsatz von *E. coli* 4pF79 führte zwar zu einer deutlichen Verbesserung der integralen $Y_{P/S}$ auf 20,3 % (Steigerung um 30 % gegenüber den anderen Stämmen), ein Ende der Fermentation nach 30 h hätte jedoch zu einer Produktselektivität von > 24 % geführt (*E. coli* 4pF81 erreichte nach 26 h sogar einen Wert von 25,7 %). Unabhängig davon, welcher Wert für einen Vergleich herangezogen wird, zeigt die in Tabelle 7 (am Ende der Diskussion) zusammengefasste Auswahl an publizierten L-Phe-Fermentationsprozessen, dass sowohl eine

differentielle, als auch integrale $Y_{P/S}$, in dieser Höhe, zum ersten Mal erreicht wurde. Gleiches gilt im Übrigen auch für die Raum-Zeit-Ausbeute und Produktbildungsrate.

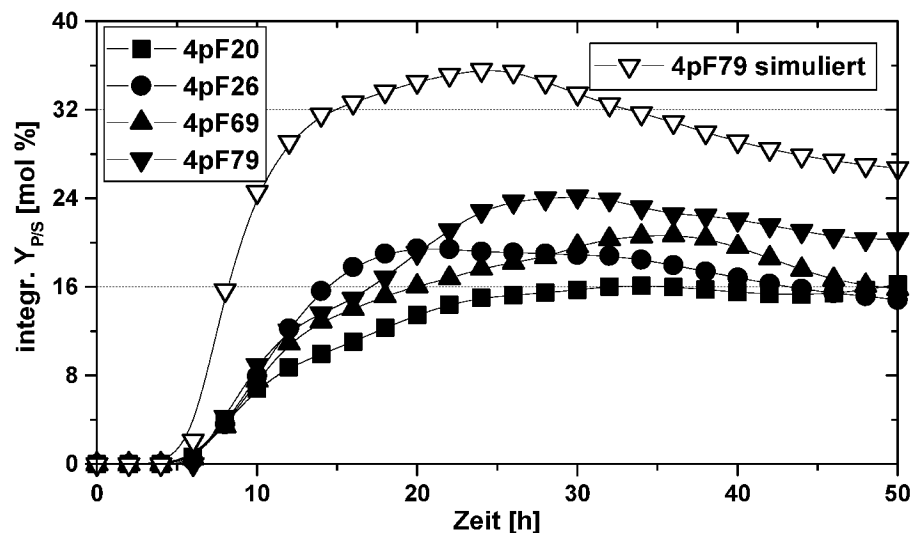


Abbildung 123: Entwicklung der integralen, molaren $Y_{P/S}$ bei Einsatz verschiedener potentieller Produktionsstämme. Für *E. coli* 4pF79 wurde zudem eine simulierte, integrale, molare $Y_{P/S}$ unter Einbeziehung der gebildeten Intermediate der Aromatenbiosynthese dargestellt (20 l Bioreaktor, Standardbedingungen).

Für *E. coli* 4pF79 zeigt Abbildung 123 beispielhaft, neben der integralen $Y_{P/S}$, auch einen simulierten Verlauf der Produktselektivität unter Einberechnung der nachgewiesenen Intermediate Shikimat und DHS. Die Berechnung geht dabei idealisierend davon aus, dass zur weiteren Umwandlung dieser C_7 -Körper jeweils noch eine äquimolare Menge PEP im EPSP-Synthase-Schritt zur Verfügung steht. In Bezug auf die Produktselektivität entsteht dadurch ein relativer Fehler von maximal 10 %. Diese Art der Darstellung soll daher nur das Potential der L-Phe-Produzenten widerspiegeln.

Abbildung 123 zeigt, dass bei einer vollständigen Umsetzung der Intermediate zu L-Phe, nach 24 h eine simulierte, integrale $Y_{P/S}$ von 35,7 % erreicht werden würde. Wie aus Abbildung 124 hervorgeht, wäre zum gleichen Zeitpunkt eine theoretische L-Phe-Konzentration von 45 g/l erreichbar. Einer ökonomischen Abschätzung zufolge [235] wäre damit ein solcher Produktionsprozess wirtschaftlich sinnvoll. Um diese theoretische Betrachtung zu verwirklichen, müssten jedoch zumindest zwei zentrale Probleme gelöst werden. Zum einen müssen alle bisher akkumulierenden Intermediate in L-Phe umgesetzt werden. Dieses Ziel ist, unter Verwendung der entwickelten Prozessstrategie mit *E. coli* 4pF81, erreicht worden. Zum anderen muss die Produktbildungsrate, auch bei einer Konzentration von über 35 g/l L-Phe, stabilisiert werden.

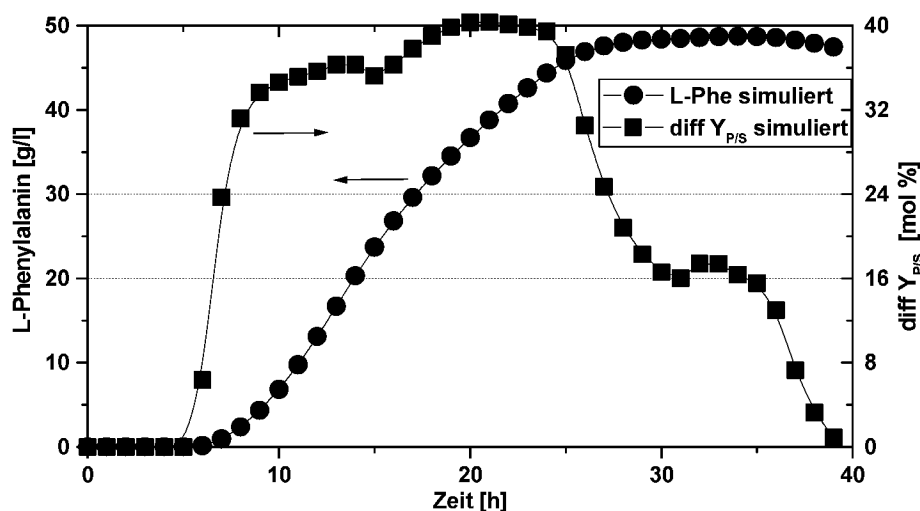


Abbildung 124: Simulierter Verlauf der L-Phe-Konzentration und der glucosebezogenen, differentiellen, molaren $Y_{P/S}$ unter Einbeziehung der gebildeten Intermediate der Aromatenbiosynthese für *E. coli* 4pF79 (verkürzte Zeitachse).

Abgesehen von der mit *E. coli* 4pF79 erreichbaren, simulierten L-Phe-Konzentration, zeigt Abbildung 124 den Verlauf der differentiellen $Y_{P/S}$, unter Einberechnung der nachgewiesenen Intermediate. Erst diese Darstellung macht deutlich, wie schnell der Kohlenstofffluss in Richtung Aromatenbiosynthese zunimmt und schon nach 3 h über 32 % erreicht hat. Zu dieser Zeit befinden sich die Zellen noch in der Wachstumsphase. Mit der Limitierung der L-Tyrosinzufuhr steigt die differentielle $Y_{P/S}$ nochmals an und erreicht bis zu 40 %.

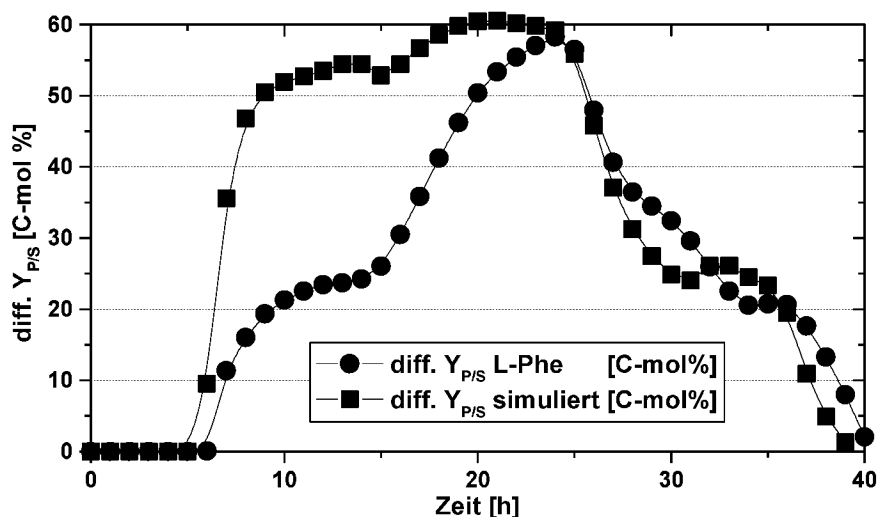


Abbildung 125: Berechnung der kohlenstoffbezogenen, differentiellen Produktselektivität. Darstellung der C-molaren $Y_{P/S}$ für L-Phe und der simulierten $Y_{P/S}$ bei Einberechnung der gebildeten Intermediate der Aromatenbiosynthese für *E. coli* 4pF79 (verkürzte Zeitachse).

Die Übereinstimmung des simulierten $Y_{P/S}$, mit dem auf Basis der gemessenen L-Phe-Produktion errechneten kohlenstoffbezogenen, differentiellen $Y_{P/S}$ bei 25 h Fermentationsdauer zeigt, dass kein Fehler in der simulierten Betrachtung vorliegt. Die bisherige Annahme, dass die glucosebezogene, molare, differentielle $Y_{P/S}$ 30 % nicht überschreitet, kann also nicht zutreffen. Basierend auf den Stoffwechseleigenschaften von *E. coli* lässt sich, unter Zuhilfenahme bestimmter stöchiometrischer Annahmen des Stoffwechselnetzwerks (Herleitung und stöchiometrische Annahmen in Abschnitt 12.7 [234]), der theoretisch maximal mögliche Kohlenstofffluss berechnen, der bei Einsatz von Glucose als C-Quelle und L-Phe als Produkt möglich ist. Diese Stoffflussanalyse hat zum Ergebnis, dass von 100 C-mol Glucose 45 C-mol in L-Phenylalanin fließen können. Die verbleibenden 55 % gehen letztendlich in Form von CO_2 verloren. Wie Abbildung 125 zeigt, erreicht die kohlenstoffbezogene, differentielle $Y_{P/S}$ schon während der Wachstumsphase einen Wert von über 50 %, obwohl in dieser Phase ein nicht berücksichtigter, zusätzlicher Kohlenstofffluss in die Biomasseproduktion führt. Nach der Limitierung des Wachstums steigt der simulierte, kohlenstoffbezogene $Y_{P/S}$ noch weiter auf bis zu 60 % an.

Die Annahme, dass die glucosebezogene, molare Produktselektivität nicht 30 % übersteigen kann, geht davon aus, dass für 1 mol Glucose, das über das PTS-System (vgl. Abschnitt 2.1.1) aufgenommen wurde, 1 mol PEP zu 1 mol Pyruvat umgewandelt wird [234]. Dieses Pyruvat kann nicht wieder in PEP „recycelt“ werden und steht der Aromatenbiosynthese nicht mehr zur Verfügung. Da jedoch, trotz des „Verlustes“ an Glucose in Form von Biomasse, eine simulierte, glucosebezogene, molare, differentielle $Y_{P/S}$ von 40 % erreicht wurde, kann diese Annahme nicht zutreffen. Wird jedoch angenommen, dass sich Pyruvat in PEP zurückverwandeln lässt [234], ergibt die Stoffflussanalyse eine glucosebezogene, molare Produktselektivität von 55 % (kohlenstoffbezogene $Y_{P/S}$ von 82,5 %). Die dritte Möglichkeit, dass bei der Glucoseaufnahme kein PEP verbraucht wird (die maximale glucosebezogene, molare Produktselektivität würde dann bei 50 % liegen), ist unwahrscheinlich, da das PTS-System nicht gegen ein diffusiv getriebenes Aufnahmesystem ausgetauscht wurde.

In *E. coli* 4pF79 muss demnach eine Umwandlung von Pyruvat zu PEP erfolgen. Verschiedene Autoren berichten (Zusammenfassung in Abschnitt 2.1.3), dass durch eine Überexpression der PEP-Synthase (*pps*) Pyruvat zu PEP umgewandelt werden kann und dieses in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden konnte. Unter normalen Kultivierungsbedingungen ist die Aktivität der PEP-Synthase jedoch gering [51]. Der durch die Aromatenbiosynthese bedingte PEP-Verbrauch, kann durch eine mögliche Limitierung der PEP-Verfügbarkeit, zu anderen Bedingungen führen, die in einer erhöhten Expression oder Aktivität der PEP-Synthase resultieren. Da keine experimentellen Beweise für diese Vermutung vorliegen, muss die Regeneration von Pyruvat als Hypothese verstanden werden. Die berechneten $Y_{P/S}$ belegen aber eindeutig, dass mehr PEP verbraucht wird, als theoretisch vorhanden sein dürfte.

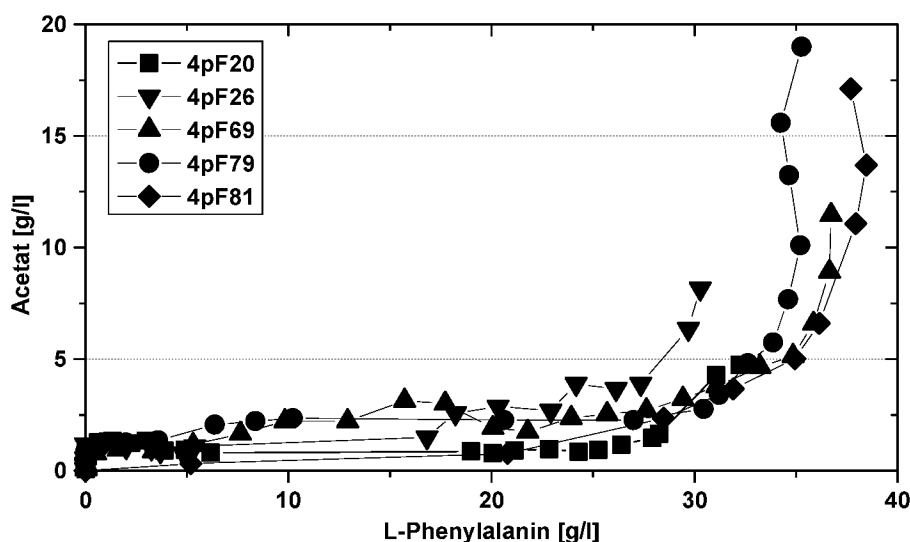


Abbildung 126: Acetatbildung in Abhängigkeit von der L-Phe-Konzentration bei Einsatz von fünf verschiedenen, potentiellen Produktionsstämmen (20 l Bioreaktor, Standardbedingungen) (verkürzte Skalierung der Ordinate).

Der in Abbildung 126 dargestellte, funktionale Zusammenhang der Konzentrationsverläufe von Acetat und L-Phe bei Einsatz der fünf besten L-Phe-Produzenten (hier mit *E. coli* 4pF81) dient dazu, eine Erklärung für die Nebenproduktbildung zu formulieren. Zur besseren Visualisierung wurde die maximal angegebene Acetatkonzentration auf 20 g/l begrenzt (die Gesamtverläufe der dargestellten Konzentrationen sind Abschnitt 8.6.1. bis 8.6.5. zu entnehmen).

Die Fermentation eines *E. coli*-Wildtyps führt bei Glucoseüberschuss, trotz ausreichender Sauerstoffversorgung, zur Bildung von Acetat. Die Ursache hierfür ist der so genannte „Glucose-Überschuss-Metabolismus“ [9, 11]. Wie schon in Abschnitt 8.2 diskutiert wurde, wird, trotz Glucoseüberschuss und erhöhtem Stofffluss durch den FBP-Weg, eine Akkumulation von Pyruvat bzw. PEP während der L-Phe-Produktion vermieden und kein Acetat gebildet.

Wie Abbildung 126 zeigt, wird dennoch von einem bestimmten Zeitpunkt an Acetat produziert. Der Beginn der Acetatbildung ist jedoch nicht abhängig von der Fermentationsdauer, sondern stammspezifisch und reproduzierbar. Wäre ein Nährsalz limitierend, oder wäre die „respiratorische Kapazität“ der Zellen erschöpft [114], so müsste die Acetatbildung, unabhängig vom verwendeten Stamm, zur gleichen Fermentationszeit einsetzen. Die Acetatbildung setzt jedoch zu sehr unterschiedlichen Zeiten ein. In Abbildung 126 ist stattdessen ein funktioneller Zusammenhang zwischen L-Phe-Konzentration und Acetatbildung erkennbar. Mit dem Erreichen einer L-Phe-Konzentration von ungefähr 30 g/l, nimmt die L-Phe-Produktion ab und die Acetatkonzentration steigt an. Wäre der Anstieg der

Acetatkonzentration die Ursache für den Abfall der Produktbildung, müsste sich dieser Zustand, unabhängig vom eingesetzten Stamm, immer zur gleichen Fermentationszeit einstellen.

Verschiedene Hinweise führten bereits zu der Vermutung, dass die hohe L-Phe-Konzentration die weitere Produktbildung inhibiert. Die hierdurch verursachte Reduktion des Stoffflusses in die Aromatenbiosynthese, kann zu einer Akkumulation von PEP bzw. Pyruvat führen und der weiterhin hohe Kohlenstofffluss durch den FBP-Weg, wiederum zur Bildung von Acetat. Mit dem Wegfall der L-Phe-Produktion würden sich die eingesetzten Stämme wie ein *E. coli*-Wildstamm verhalten und bei Glucoseüberschuss Acetat produzieren.

Das von Konstantinov et. al. [114] als Abbruchkriterium definierte Einsetzen der Acetatbildung, gilt auch hier für alle Stämme. Die Ursache liegt aber nicht in einem Abfall der „respiratorischen Kapazität“, sondern steht offensichtlich im Zusammenhang mit dem Erreichen einer signifikanten L-Phe-Konzentration von 30 g/l und der einsetzenden Inhibierung der weiteren L-Phe-Synthese. Trifft diese Hypothese zu, so könnte eine Glucosezufuhr im limitierenden Bereich, ab einer L-Phe-Konzentration von 30 g/l, zwar zu einer Vermeidung der Acetatbildung führen, jedoch nicht die L-Phe-Produktion aufrechterhalten. Es gibt jedoch sowohl prozesstechnische, als auch molekulargenetische Ansätze, um die Produktbildung aufrecht zu halten.

Der verfahrenstechnisch interessanteste Ansatz wäre die simultane Extraktion von L-Phe während der Fermentation - in Form eines Hybridprozesses - wie er in dieser Arbeit beschrieben wurde. Zunächst sollten aber einfachere Möglichkeiten, wie zum Beispiel ein „Repeated-Fed-Batch“ oder eine Fermentation, bei kontinuierlichem Austausch von zellfreiem Fermentationsüberstand (Retentostat), untersucht werden.

Aus molekulargenetischer Sicht wäre der eleganteste Ansatz die Schaffung einer L-Phe-resistenten DAHP-Synthase. Dies scheint jedoch auch der schwierigste Ansatz zu sein [51]. Da der vollständige Zusammenbruch der L-Phe-Produktion möglicherweise auch mit einer zu geringen Expressionsrate der DAHP-Synthase, bzw. der Instabilität des verwendeten Plasmids in Zusammenhang steht, könnten die bestehenden Probleme auch durch eine chromosomale Integration der Gene, oder durch den Einsatz eines anderen Expressionssystems, zumindest verringert werden.

Abschließend fasst Tabelle 7 die charakteristischen Kenndaten der erfolgreich eingesetzten L-Phe-Produzenten zusammen und stellt einen Vergleich mit den wichtigsten in der Literatur beschriebenen Prozessen zur L-Phe-Produktion, unter Verwendung von *Escherichia coli*, auf.

Tabelle 7: Vergleich charakteristischer Kenndaten der besten eingesetzten L-Phe-Produzenten. Vergleich des entwickelten Produktionsprozesses mit Literaturdaten.

<i>E. coli</i>	L-Phe _{max} [g/l]	L-Phe _{50h} [g/l]	diff. Y _{P/Smax} [mol %]	integr. Y _{P/S50h} [mol %]	diff. RZA _{max} [g/(l*h)]	integr. RZA _{50h} [g/(l*h)]
4pF20	32,2	32,2	18,1	16,2	1,30	0,64
4pF26	27,5	27,5	19,4	14,8	1,62	0,55
4pF69	36,7	31,5	24,4	15,8	1,76	0,66
4pF79	35,2	32,6	35,7	20,3	2,35	0,65
4pF81	38,5	36,1	27,8	22,7	2,32	0,72
[104] Choi 1982		10		20		0,4
[102] Hwang 1985		15		<10		0,30
[105] Sugimoto1987		18,6		12,5		0,34
[140] Förberg 1988		2,8	23	20,0		< 0,1
[106] Park 1988	22,4		11		0,72	
[114] Konstantinov1990	46		24	17,4		0,85

Insbesondere die Betrachtung der differentiellen Raten macht deutlich, welche Fortschritte durch den Einsatz des entwickelten Fermentationsverfahrens, der Eliminierung von reaktionslimitierenden Schritten in der Aromatenbiosynthese, und der Möglichkeit zur Verwendung der L-Tyrosinsensitiven DAHP-Synthase, erzielt wurden. In keinem publizierten Fermentationsprozess wurden so hohe differentielle Y_{P/S} oder RZA beschrieben. In Bezug auf eine Bewertung der gesamten Fermentationsdauer, konnte in dieser Arbeit die bisher höchste integrale Y_{P/S} nachgewiesen werden. Bei Betrachtung der integralen RZA konnte jedoch von Konstantinov et. al. [114] ein um ungefähr 15 % höheres Ergebnis erreicht werden. Ebenso wie die erzielte Endkonzentration von 46 g/l, bezieht sich dieses Resultet auf 50 h Fermentationsdauer. Mit den in dieser Arbeit zuletzt verwendeten Stämmen wurde aber ab ungefähr t = 35 h kein L-Phe mehr produziert. Zu diesem Zeitpunkt lagen maximal 38,5 g/l L-Phe vor. Zur gleichen Zeit erreichte Konstantinov et. al. eine L-Phe Konzentration von 37 g/l bei einer differentiellen Y_{P/S} von 24 % (zum Vergleich *E. coli* 4pF81 ≈ 28 %). Es ist anzunehmen, dass auch die integrale RZA mit 1,2 g/(l*h) über den publizierten Ergebnissen liegt. Die Produktionsdauer auf diesem Niveau sollte demnach noch verbessert werden. Die Geschwindigkeit und Selektivität der L-Phe-Bildung übertrifft jedoch alle bisher veröffentlichten Verfahrensansätze.

9. ZUSAMMENFASSUNG

Ein Fermentationsprozess für die Produktion von L-Phenylalanin mit *Escherichia coli* konnte bis in den 300 l Maßstab entwickelt werden. Es wurde gezeigt, dass das Verfahren reproduzierbar, scale-up-fähig und für verschiedene L-Phe-Produzenten einsetzbar ist. Durch den Einsatz der entwickelten Prozesstechnik und verschiedener, gentechnisch veränderter Stämme, konnte für den Produktionsstamm die integrale $Y_{P/S}$ von 16,2 % auf 24,4 % und die integrale RZA von 0,8 g/(l*h) auf 1,2 g/(l*h) verbessert werden. Diese Kenndaten, die die Qualität des entwickelten Prozesses beschreiben, liegen wesentlich über allen in der Literatur publizierten Ergebnissen (vgl. Tabelle 7). Die Fermentationsdauer zur Bildung von > 30 g/l L-Phe wurde von 50 h auf 25 h halbiert. Basierend auf den veröffentlichten Ergebnissen, konnte Konstantinov et. al. [114] mit 46 g/l L-Phe nach 50 h, die höchste Konzentration erreichen. Nach 35 h lag die Konzentration jedoch bei 37 g/l. Mit *E. coli* 4pF81 konnten in der gleichen Zeit 38,5 g/l gebildet werden.

Eine Integration der Aufarbeitung im Pilotmaßstab ist gelungen, und führte neben einer Herabsetzung der L-Phe-Konzentration im Bioreaktor, zu einer Erhöhung der Produktselektivität.

Prozessentwicklung:

Ein Verfahren zur L-Phe-Produktion mit *E. coli*, unter Verwendung eines synthetischen Mediums, Zufuhr von Glucose als Kohlenstoffquelle und L-Tyrosin als essentieller Aminosäure, konnte etabliert werden. Beide Substrate mussten unabhängig voneinander zugeführt werden, damit der Prozess für verschiedene L-Phe-Produzenten einsetzbar ist. Die Glucosezufuhr erfolgte durch einen geschlossenen Regelkreis mit einer modellgestützten, parameteradaptiven Regelstrategie zur Einstellung eines konstanten Sollwerts. Die Einstellung verschiedener Glucosekonzentrationen zeigte, dass ein kontrollierter Substratüberschuss für die L-Phe-Produktion vorteilhaft ist. Weiterhin wurde festgestellt, dass ein Überschuss an L-Tyrosin während der Wachstumsphase zu einem signifikanten Abfall der Produktbildung führt. Die Zulaufkonzentration von L-Tyrosin in der Wachstumsphase wurde über eine indirekte Regelungsstrategie eingestellt. Basierend auf einem empirischen Zusammenhang konnte, durch Berechnung der volumetrischen Sauerstoffverbrauchsrate, der volumetrische L-Tyrosinverbrauch ermittelt, und ein für das Wachstum optimaler L-Tyrosinzulauf eingestellt werden. Durch die Möglichkeit, im Reaktor L-Tyrosinkonzentrationen von weniger als 10 mg/l einzustellen, konnte auf den Einsatz der feedback-resistenten, L-Tyrosinspezifischen DAHP-Synthase, verzichtet und die wesentlich aktivere, native DAHP-Synthase verwendet werden. Neben der Reproduzierbarkeit von Fermentationen war es möglich, durch den Einsatz von mehr als sieben verschiedenen, potentiellen L-Phe-Produzenten zu zeigen, dass sich dieser Prozess problemlos an andere Substratverbrauchsraten anpasst und so einen Vergleich der Ergebnisse zulässt. Dieser Prozess wurde in den 300 l Maßstab übertragen.

Fermentationstechnik in der Stammentwicklung:

Die Charakterisierung neuer L-Phe-Produzenten unter Produktionsbedingungen, in enger Verknüpfung mit der Molekulargenetik und Biochemie (IBT 1) und der NMR-Technik zur Messung von Intermediaten der Aromatenbiosynthese [232], ermöglichte eine gezielte Stammverbesserung.

Die Identifikation von bis zu 6 g/l Shikimat als Nebenprodukt in der Fermentation von *E. coli* 4pF20, führte zu einer zusätzlichen Überexpression von *aroL^{wt}*. Die Fermentation des neuen Stammes *E. coli* 4pF26, Messungen der DAHP-Synthaseaktivität und REM-Aufnahmen zeigten, dass das durch *aroF^{fbr}* kodierte Enzym instabil war und inclusion bodies bildete. Durch den Austausch von *aroF^{fbr}* gegen *aroF^{wt}* und eine weitere Verfeinerung der L-Tyrosinzufuhr, konnten mit dem feedback-sensitiven Enzym vierfach höhere Aktivitäten und eine Verbesserung der Produktbildung erreicht werden. Die fermentationstechnische Charakterisierung von *E. coli* 4pF69 und off-line NMR-Analyse, führte zum Nachweis von mehr als 10 g/l DAH und konnte auf eine Limitierung der 3-Dehydroquinate-Synthaseaktivität zurückgeführt werden. In *E. coli* 4pF79 wurde deshalb *aroB^{wt}* überexprimiert. Die anschließende Fermentation zeigte, dass kein DAH mehr akkumulierte. Da in diesem Stamm *aroL^{wt}* jedoch nicht überexprimiert wurde, kam es zur Bildung von 10,5 g/l Shikimat und 4,3 g/l Dehydroshikimat. In dem letzten, charakterisierten Stamm *E. coli* 4pF81 wurden deshalb *aroF^{wt}*, *aroB^{wt}*, *aroL^{wt}* und *pheA^{fbr}* gleichzeitig überexprimiert. Die Ergebnisse zeigten, dass sich weder DAH, noch Shikimat oder Dehydroshikimat anreichern. Bei diesem Stamm konnten keine Intermediate der Aromatenbiosynthese mehr nachgewiesen werden.

Durch die Zusammenarbeit von Fermentationstechnik und Molekulargenetik konnte die Fermentationsdauer, bis zum Erreichen einer L-Phe-Konzentration von 30 g/l, von 50 h auf 25 h halbiert werden. Neben einer maximalen Produktkonzentration von 38,5 g/l konnte die maximale differentielle molare Produktselektivität von 18,1 % auf 35,7 % und die maximale differentielle Raum-Zeit-Ausbeute von 1,3 g/(l*h) auf 2,4 g/(l*h) gesteigert werden (maximale integrale $Y_{P/S}$ von 16,2 % auf 24,4 %; maximale integrale RZA von 0,8 g/(l*h) auf 1,2 g/(l*h)). Simulationen, unter Einbeziehung gebildeter Intermediate der Aromatenbiosynthese, kamen zu dem Schluss, dass sich die erreichten Produktselektivitäten nur durch eine „Regeneration“ von Pyruvat zu PEP ermöglicht werden können. Zumindest bei den zuletzt eingesetzten Stämmen muss demnach eine PEP-Synthaseaktivität vorhanden sein. Trotz Stammentwicklung kam die L-Phe-Bildung, unabhängig vom eingesetzten Stamm, reproduzierbar bei einer Konzentration von 30 - 38 g/l zum Erliegen. Beobachtungen weisen darauf hin, dass in diesem Konzentrationsbereich die DAHP-Synthase durch L-Phe inhibiert wird. Die in der zweiten Hälfte der Fermentation auftretenden hohen Acetatkonzentrationen scheinen eine direkte Folge des Produktionseinbruchs zu sein. Der bis dahin hohe Kohlenstofffluss in die Aromatenbiosynthese kommt zum Erliegen und führt als Folge des „Glucose-Überschuss-Stoffwechsels“ zur Acetatbildung.

Integration der Aufarbeitung:

Die Integration der Reaktiv-Extraktion in den Fermentationsprozess konnte im Pilotmaßstab gezeigt werden. Durch die Kopplung von Produktion und Aufarbeitung über einen Filtrationsumlauf, wurde ein neuartiger Hybridprozess geschaffen. Simultan zur Produktion konnte bei einer auf den Reaktor bezogenen Produktionsrate von maximal 230 g/h eine Extraktionsrate von bis zu 110 g/h erreicht werden. Mit diesem Verfahren wurde im kg-Maßstab L-Phe extrahiert, und bis zu einer Reinheit von über 98 % aufgereinigt. Der produktarme, zellfreie Fermentationsüberstand wurde ohne Sterilitätsprobleme in den Bioreaktor zurückgeführt. Negative Einflüsse der Aufarbeitung auf die Fermentation waren nicht zu beobachten, jedoch führte der Filtrationsumlauf zu einer wesentlichen Verringerung der Produktbildung. Durch die Verringerung der Produktakkumulation bzw. den nicht näher untersuchten, positiven Einfluss des D₂EHPA-Kerosineintrags, konnte mit 30,7 g/l eine höhere L-Phe-Konzentration erreicht werden, als in einer vergleichbaren Standardfermentation (28,6 g/l). Darüber hinaus wurde die integrale, molare Produktselektivität von 15,1 % auf 20,3 % erhöht. Für den eingesetzten Stamm *E. coli* 4pF20 ist das der höchste, bisher erreichte $Y_{P/S}$.

„Es gibt nichts Praktischeres als eine gute Theorie“

Immanuel Kant

10. AUSBLICK

Abbildung 123 in Abschnitt 8.6 zeigte, dass die bisher erreichte maximale integrale Produktselektivität von 24,4 % auf 35,7 % gesteigert wird, wenn die bereits gebildeten Intermediate der Aromatenbiosynthese in L-Phenylalanin umgewandelt werden würden. Wie aus Abbildung 124 hervorgeht, wäre zum gleichen Zeitpunkt eine theoretische L-Phe-Konzentration von 45 g/l erreichbar und die integrale RZA würde bei 1,8 g/(l*h) liegen. Da dieser Berechnung eine Fermentationsdauer von 24 h zugrunde liegt und den durch das Wachstum der Zellen verursachten „Zeit- und Glucoseverlust“ beinhaltet, würden die Kennzahlen, bei verlängerter Fermentation und weiterhin konstanter Produktbildung, sogar noch ansteigen. Diese Zahlen sollen verdeutlichen, wie viel Potential noch vorhanden ist und ausgeschöpft werden kann. Hierfür müssen zwei zentrale Probleme gelöst werden:

- Die Anreicherung von Intermediaten muss weiterhin vermieden werden und der Stofffluss ungehindert zum L-Phe führen. Mit *E. coli* 4pF81 konnte dieses Ziel bereits erreicht werden.
- Die Produktbildungsrate muss über eine L-Phe-Konzentration von 35 g/l hinaus stabilisiert werden. Basierend auf den bisherigen Ergebnisse kann angenommen werden, dass die DAHP-Synthase bei Produktkonzentrationen von über 30 g/l inhibiert wird. Dieses Problem ließe sich molekulargenetisch, durch Einwicklung einer L-Phe-feedback-resistenten DAHP-Synthase oder einer höheren stabilen Expressionsrate des bereits verwendeten Enzyms, wie auch prozesstechnisch, durch eine kontinuierliche Abtrennung von L-Phe oder den Austausch von Fermentationsüberstand, lösen.

Die Integration der Aufarbeitung hat gezeigt, dass das L-Phe selektiv aus der Fermentation abgetrennt werden kann und die Produktivität erhöht wird. Durch Einsatz eines sich weniger störend auswirkenden Verfahrens zur Permeatabtrennung und einer Anpassung der Extraktionsleistung an den Produktionsprozess, könnte eine Inhibierung der L-Phe-Produktion bei über 30 g/l vermieden und eine hohe RZA über einen Zeitraum von 50 h ermöglicht werden. Würde ein chromosomal integrierter L-Phe-Produzent zur Verfügung stehen, könnte das Filtrationsverfahren wahrscheinlich beibehalten werden. Dieser Lösungsansatz ist jedoch prozesstechnisch sehr aufwendig und als Basis für eine Prozessoptimierung oder Charakterisierung neuer Stämme, nicht praktikabel.

In der Folge sollen einige Ansätze zur Untersuchung offener Fragen, zur Stammentwicklung und zur Fermentationsoptimierung zusammengefasst werden. Neben Ansätzen zur Prozessoptimierung werden insbesondere Möglichkeiten zusammengefasst, wie sich der inhibierende Effekt durch L-Phe weiter untersuchen lässt und wie man das Problem lösen könnte.

- Die reaktionslimitierenden Schritte der 3-Dehydroquinat-Synthase und Shikimatkinase II konnten identifiziert und behoben werden. Neben der Überexpression von *aroF^{wt}*, *pheA^{fbr}*, *aroL^{wt}* und *aroB^{wt}* sollte untersucht werden, ob die Überexpression von *aroA^{wt}* und/oder *aroC^{wt}* zu einer weiteren Verbesserung des Stoffflusses, durch die Aromatenbiosynthese, führt. Verschiedene Autoren (Zusammenfassung in Abschnitt 2.1.3) berichten, dass auch diese Enzyme (EPSP-Synthase und Chorismatsynthase) reaktionslimitierend sein können. Zudem wurde berichtet, dass eine Überexpression von *tkt* (Transketolase) zu einer verbesserten Verfügbarkeit von E4P führt und sich positiv auf die L-Phe-Produktion auswirkt.
- Bisher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Abnahme der Produktbildung durch eine Plasmidinstabilität verursacht wird. Dies ist, als alleinige Ursache, unwahrscheinlich, da in diesem Fall eine Abhängigkeit von der Fermentationsdauer vorhanden sein müsste. Die parallele Untersuchung der Plasmidhäufigkeit, Enzymkonzentration und -aktivität unter Prozessbedingungen könnte jedoch klären, ob der Abfall der Produktbildung nur auf eine Inhibierung der DAHP-Synthase oder auch auf eine sinkende Expression des Enzyms zurückzuführen ist.

Die Möglichkeit einer Inhibierung der DAHP-Synthase in Verbindung mit einer nicht fortlaufenden Expression der plasmidkodierten Enzyme aufgrund des Verlusts des Plasmids innerhalb der Wachstumsphase, könnte die Ursache für den irreversiblen Produktionseinbruch sein, der bei industriell verfügbaren Stämmen nicht in dieser Form auftritt. Eine Untersuchung dieser Hypothese wäre mittels eines „Repeated-Fed-Batches“ möglich, bei der die wiederverwendeten Zellen keinem weiteren Selektionsdruck unterliegen sollten. Kam es in der ersten Fermentation zu einem Plasmidverlust, so kann im zweiten Fermentationszyklus keine L-Phe-Produktion mehr stattfinden.

In diesem Zusammenhang wäre auch die Verknüpfung der in *E. coli* 4pF81 verwendeten Genkassette mit einem industriell eingesetzten Vektor eine interessante Alternative.

Führt die Plasmidinstabilität direkt oder indirekt zum Abfall der Produktbildung, könnte das Problem auch durch die chromosomale Integration der Gene gelöst werden. Sollten in den folgenden Arbeiten mehr Gene, als wie bisher vier, überexprimiert werden, so müssen die Gene zwangsläufig in das Chromosom integriert werden. Um zu untersuchen, ob eine höhere Plasmidstabilität zu einer verbesserten Produktbildung führt, könnte während der Fermentation eines bereits vorhandenen Stammes, kontinuierlich Ampicillin zugeführt werden.

- In *in vitro* Untersuchungen sollte die DAHP-Synthaseaktivität bei einer L-Phe-Konzentration von 20, 30 und 40 g/l gemessen werden. Tritt ein Aktivitätsverlust auf, wäre das zwar noch kein eindeutiges Ergebnis, da sich die Enzymaktivität *in vivo* wesentlich unterscheiden kann, jedoch würde ein weiteres Indiz vorliegen.
- Neben dem biochemischen Ansatz der *in vitro* Bestimmung der DAHP-Synthaseaktivität, lassen sich auch fermentationstechnische Untersuchungen vornehmen, um weitere Indizien zu sammeln. Zum Beispiel könnte eine Standardfermentation

durchgeführt werden, bei der 20 g/l L-Phe im Batchmedium vorgelegt wurden. Zwar wird dadurch die Wachstumsphase um einige Stunden verlängert, dennoch würde sich eine L-Phe-Konzentration von 30 g/l wesentlich früher einstellen, als unter „normalen“ Bedingungen. Werden in dem Vorlageexperiment nicht mehr als 30 - 40 g/l L-Phe gemessen, d.h. 10 - 20 g/l produziert, und setzt die Acetatproduktion früher ein, ist die L-Phe-sensitivität der DAHP-Synthase indirekt bewiesen.

- Um die Aktivität der DAHP-Synthase weiter zu untersuchen, gibt es einen genetischen und einen prozesstechnischen Ansatz. Es könnte ein Stamm, der eine Deletion in der Aromatenbiosynthese in Richtung L-Phe aufweist, unter Standardbedingungen fermentiert werden. Wird zum Beispiel *aroB* deletiert, so müsste statt L-Phe nun DAH im Reaktor akkumulieren. Eine Inhibierung der DAHP-Synthase wäre ausgeschlossen und die Aktivität müsste auch bei höheren DAH-Konzentrationen messbar sein. Der prozesstechnische Ansatz wäre u.a. ein Repeated-Fed-Batch. Ein Stamm, zum Beispiel *E. coli* 4pF81, würde bis zum Erreichen von 30 g/l L-Phe fermentiert werden (ungefähr 25 h). Durch ein Hohlfaserfiltrationsmodul entsprechender Größe könnte innerhalb kurzer Zeit das Arbeitsvolumen, auf zum Beispiel 20 %, reduziert werden. Die im Reaktor zurückgehaltenen Zellen würden mit neuem Medium aufgefüllt und nochmals fermentiert werden. Würde wieder eine vergleichbare Produktbildungsrate erreicht werden, wäre der inhibierende Effekt von L-Phe gezeigt. Alternativ könnte während der Fermentation auch kontinuierlich zellfreier Fermentationsüberstand abgeführt und durch frisches Medium ersetzt werden (Retentostat).

Um auszuschließen, dass die zugeführten Medienbestandteile für die erneute Produktbildung verantwortlich sind, könnte zum Vergleich ein Repeated-Fed-Batch oder ein Retentostat mit vorgelegtem L-Phe durchgeführt werden.

- Wenn bewiesen wurde, dass die DAHP-Synthase L-Phe-sensitiv ist und zum Abfall der Produktion bei über 30 g/l führt, wäre die direkteste Lösung, das Enzym molekulargenetisch so zu verändern, dass es L-Phe-resistent ist. Zwar bestehen theoretisch die technischen Möglichkeiten, das Enzym mittels „Gen-Shuffling“ entsprechend zu verändern [235]. Schwierigkeiten macht jedoch die Identifikation des Enzyms durch Selektion. Auf eine L-Tyrosinresistente DAHP-Synthase (*aroF^{br}*) könnte selektiert werden, indem ein Stamm verwendet wird, bei dem die L-Phe-spezifische DAHP-Synthase deletiert wurde, d.h. eine L-Phe-Auxotrophie eingefügt wird. Würde dieser Stamm auf einem Medium wachsen, das eine hohe L-Tyrosinkonzentration beinhaltet, so muss die Prototrophie durch eine feedback-resistente L-Tyrosinspezifische DAHP-Synthase ermöglicht worden sein. Um auf eine L-Phe-resistenz zu selektieren, kann nicht zwischen Wachstum und Nichtwachstum unterschieden werden. Das Nährmedium müsste 30 g/l L-Phe enthalten und, nach einer Kultivierung der Zellen, untersucht werden, ob die L-Phe-Konzentration gestiegen ist. Eine solche Vorgehensweise wäre in Petrischalen oder Mikrotiterplatten nicht durchführbar.
- Es gibt jedoch auch prozesstechnische Möglichkeiten, bei denen die Lösung des Problems in einer Umgehung der biologischen Regulationsmechanismen besteht. Der

einfachste Ansatz wäre ein „Repeated-Fed-Batch“, in dem der Fermentationsüberstand bei 30 g/l L-Phe satzweise abfiltriert wird und die Zellen erneut fermentiert werden. Eine weiterführende Entwicklung wäre z.B. eine retentostatische Fermentation, in der, ab einer vorgewählten Produktkonzentration, die Menge an Permeat (kontinuierliche Filtration) gegen frisches Medium ausgetauscht wird, die der volumetrischen, auf den Reaktorinhalt bezogenen Produktbildungsrate, entspricht. Sollten, bedingt durch die Filtration, Einbrüche in der Produktbildung auftreten, könnte auch das Fermentationsvolumen mit Zellen gegen frisches Medium ausgetauscht werden. Diese Prozessführung würde jedoch einer kontinuierlichen Fermentation gleich kommen und, bedingt durch den plasmidhaltigen Produktionsstamm, nur für eine begrenzte Fermentationszeit funktionieren.

Der eleganteste prozesstechnische Ansatz führt zur Integration eines Aufarbeitungsverfahrens. Dass ein solcher Hybridprozess verwirklicht werden kann, wurde in dieser Arbeit bereits gezeigt. Könnte, alternativ zur Reaktiv-Extraktion, ein Verfahren etabliert werden, dass einfacher zu bedienen und robuster ist und auch schon im Labormaßstab eingesetzt werden kann, wäre dies die beste Lösung; - sicherlich prozesstechnisch jedoch wahrscheinlich auch ökonomisch.

- Wie die differentielle Produktselektivität zeigte, werden teilweise $Y_{P/S}$ von über 30 % erreicht. Diese Werte liegen über dem erwarteten, theoretischen Maximum. Bisher wurde vermutet, dass Pyruvat nicht in PEP umgewandelt werden kann, da die PEP-Synthase (*pps*) nicht oder nur gering aktiv ist. Dies scheint nicht zu stimmen, da sich eine glucosebezogene, molare Produktselektivität von über 30 % nur erreichen lässt, wenn Pyruvat zu PEP „recycelt“ wird. An dieser Stelle sollten weitere Untersuchungen ansetzen. Neben Messungen der Enzymaktivität könnte zum Beispiel, durch eine zusätzliche Überexpression der PEP-Synthase, gezielt die PEP-Verfügbarkeit gesteigert und die Produktselektivität weiter erhöht werden. Dieser Ansatz erscheint auch erfolgversprechender, als der Austausch des PTS-Systems gegen den Glucosefacilitator aus *Zymomonas mobilis*. Zum einen wird der Zentralstoffwechsel nicht so umfangreich verändert und zum anderen ist es fraglich, ob mit einem diffusiven Aufnahmesystem so hohe Stoffflüsse durch den FBP-Weg erreicht werden, wie sie für eine hohe L-Phe-Bildungsrate erforderlich erscheinen. Zielsetzung der Prozessentwicklung ist es nicht nur, eine möglichst hohe Produktkonzentration, sondern auch eine hohe Raum-Zeit-Ausbeute, zu erreichen.
- Sollte der Glucosefacilitator aus *Zymomonas mobilis* zum Einsatz kommen, wird sich die bereits gezeigte Notwendigkeit der Glucoseregulation noch vergrößern. Aufgrund des diffusiven Charakters des Glucoseaufnahmesystems, ist ein Glucoseüberschuss unbedingt notwendig. Das einzustellende Substratniveau sollte hierzu optimiert werden.
- Wie die Ergebnisse in Abschnitt 6.1.3 zeigten, kann die L-Phe-Produktion bei Einstellung von 35 °C und pH 6,9 verbessert werden. Diese Ergebnisse wurden bisher nicht auf den Fermentationsprozess umgesetzt, da ansonsten kein Vergleich der Versuchsergebnisse mehr möglich gewesen wäre. Zudem sind nicht alle Komponenten

des Batchmediums bei pH 6,9 löslich. Durch einen pH-Shift am Ende der Wachstumsphase, könnten die Einstellungen dennoch vorgenommen werden.

In diesem Zusammenhang sollte darauf hingewiesen werden, dass frühere Fermentationen mit einem L-Phe-produzierenden Industriestamm bei pH 6,95 und 33 °C durchgeführt wurden. Versuche zeigten, dass die DAHP-Synthase bei diesen Bedingungen stabiler und aktiver ist.

- Zur Vermeidung der Acetatbildung könnte, bei einer abgeschätzten L-Phe-Konzentration von 30 g/l, der Sollwert der Glucoseregulation auf 0,1 g/l herabgesetzt, oder auf eine Regelung der Glucosezufuhr über den pO_2 oder die OUR, umgestellt werden. Die Akkumulation von Acetat ließe sich dadurch einschränken. Eine Erhöhung der Produktbildung ist jedoch unwahrscheinlich.
- Die Anpassung der L-Tyrosinzulauftrate wurde bisher nur bis zu einem Zulauffaktor von $m = 2,0$ untersucht. Eine weitere Erhöhung von m könnte, neben einer verbesserten Produktbildung, zudem die maximale, innerhalb der Wachstumsphase auftretende, volumetrische Sauerstoffaufnahme (OUR) reduzieren. Dies wäre in Anbetracht der Industrierelevanz des Prozesses, bei Einsatz großer Reaktoren, wünschenswert, jedoch auch für die Fermentation in kleineren Laborreaktoren (Glasreaktoren; Reaktoren mit Rührerantrieb über eine Magnetkupplung) mit geringeren k_{La} -Werten, vorteilhaft.
- In Anbetracht der am Institut vorhandenen Analysetechniken, wäre eine Ausweitung der off-line Analytik auf eine Quantifizierung ausgewählter, intrazellulärer Metabolitkonzentrationen des Zentralstoffwechsels interessant. Als Techniken könnte dafür die MALDI-TOF-MS oder LC-MS eingesetzt werden. Aufgrund der hohen Produktbildungsrate und Produktselektivitäten der letzten eingesetzten *E. coli*-Stämme (4pF79, 4pF81), sollte insbesondere die PEP-, Pyruvat- und E4P-Verfügbarkeit untersucht werden.

11. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Behrens, B.: 10 Years of EFB. BTF Biotech Forum, 5/88-EFB Newsletter publiziert im BTF-Biotech-Forum, Hüthig Verlag, Heidelberg (1988).
- [2] Hodgson, J.: Bulk Amino Acid Fermentation: Technology and Commodity Trading. *Bio/Technology* 12 (1994) 152-155.
- [3] Sahm, H.; de Graff, A.; Moritz, B.; Petersen, S.: Quantitative Bestimmung der Stoffflüsse im Zentralstoffwechsel von *Corynebacterium glutamicum*. 19. DECHEMA-Jahrestagung, Leipzig, 13.-15.03.2001.
- [4] Frost, J.W.; Draths, K.M.: Sweetening Chemical Manufacture. *Chemistry in Britain* March (1995) 206-210.
- [5] Schlegel, H. G.: Allgemeine Mikrobiologie. Thieme Verlag, Stuttgart (1992) 7. Auflage.
- [6] Stahl, U.: Mikrobiologie und Genetik I und II. Unterlagen zur Vorlesung, Institut für Biotechnologie, Fachgebiet Genetik, Technische Universität Berlin (1995).
- [7] Neidhardt, F.C.; Curtis, R.; Ingraham, J.L.; Lin, E.C.C.; Low, K.B.; Magansnik, B.; Reznikoff, W.S.; Riley, M.; Schaechter, M.; Umberger, H.E.: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. vol 1: Cellular and Molecular Biology, Washington D.C.: ASM Press (1996).
- [8] Stryer, L.: Biochemie. Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin (1996) 4. Auflage.
- [9] Diekmann, H.; Metz, H.: Grundlagen und Praxis der Biotechnologie. Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1991)
- [10] Crueger, W.; Crueger, A.: Biotechnologie- Lehrbuch der angewandten Biotechnologie. Oldenbourg Verlag, München, Wien (1989) 3. Auflage.
- [11] Dellweg, H.: Biotechnologie-Grundlagen und Verfahren. VCH-Verlag, Weinheim (1987) 1. Auflage.
- [12] McCandliss, R.J.; Herrmann, K.M.: Iron, an essential Element for the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 4810-4813.
- [13] Morell, H.; Clark, M.J.; Knowles, P.F.; Sprinson, D.B.: The Enzymatic Synthesis of Chorismic and Prephenic Acids from 3-Enolpyruvyl-Shikimic Acid-5-Phosphate. *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 82-90.
- [14] DeFeyter, R.C.; Pittard, J.: Purification and Properties of Shikimate Kinase II in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 165 (1986) 331-333.
- [15] Pittard, J.; Gibson, F.: The Regulation of Aromatic Amino Acids and Vitamins. *Curr. Top. Cell. Regul.* 2 (1970) 29-63.

- [16] Brown, K.D.; Somerville, R.L.: Repression of Aromatic Amino Acid Biosynthesis in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 108 (1971) 386-399.
- [17] Dopheide, T.A.A.; Crewther, P.; Davidson, B.E.: Chorismate Mutase-Prephenate Dehydratase from *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* (1972) 4447-4452.
- [18] Schmit, J.C.; Artz, S.W.; Zalkin, H.: Chorismate Mutase-Prephenate Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 4019-4027.
- [19] Borg-Olivier, S.A.; Tarlinton, D.; Brown, K.D.: Defective Regulation of the Phenylalanine Biosynthetic Operon in mutants of the Phenylalanyl tRNA Synthetase Operons. *J. Bacteriol.* 169 (1987) 1949-1953.
- [20] Ely, B.; Pittard, J.: Aromatic Amino Acid Biosynthesis: Regulation of Shikimate Kinase in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 138 (1979) 933-943.
- [21] Tribe, D.E.; Camakaris, H.; Pittard, J.: Constitutive and Repressible Enzymes of the Common Pathway of Aromatic Biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: Regulation of Enzyme Synthesis at different Growth Rates. *J. Bacteriol.* 127 (1976) 1085-1097.
- [22] Ogino, T.; Garner, C.; Markley, J.L.; Herrmann, K.M.: Biosynthesis of Aromatic Compounds: ¹³C NMR Spectroscopy of whole *Escherichia coli* Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 5828-5832.
- [23] Gollub, E.G.; Zalkin, H.; Sprinson, D.B.: Correlation of Genes and Enzymes, and Studies on Regulation of the Aromatic Pathway in *Salmonella*. *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 5323-5328.
- [24] Eikmanns, B.; Sahm, H.; Sprenger, G.A.: Metabolic Design bei Bakterien: Gezielte Entwicklung von aminosäureproduzierenden Bakterien mit Hilfe der Gentechnik. *BIOSCOPE* 2 (1995) 39-45.
- [25] Eggeling, L.; Sahm, H.; de Graaf, A.A.: Quantifying and Directing Metabolite Flux: Application to Amino Acid Overproduction. In: Sahm H., Wandrey C. (Hrsg.) *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 54 (1996) 1-30.
- [26] Liao, J.C.; Hou, S.Y.; Chao, Y.P.: Pathway Analysis, Engineering, and Physiological Considerations for Redirecting Central Metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 52 (1996) 129-140.
- [27] Berry, A.: Improving Production of Aromatic Compounds in *Escherichia coli* by Metabolic Engineering. *TIBTECH* 14 (1996) 250-256.
- [28] Weiss, U.; Gilvarg, C.; Mingioli, E.S.; Davis, B.D.: Aromatic Biosynthesis. XI. The Aromatization Step in the Synthesis of Phenylalanine. *Science* 119 (1954) 774-775.

-
- [29] Frost, J.W.; Draths, K.M.: Biocatalytic Syntheses of Aromatics from D-Glucose: Renewable Microbial Sources of Aromatic Compounds. *Annu. Rev. Microbiol.* 49 (1995) 557-579.
- [30] Dell, K.A., Frost, J.W.: Identification and Removal of Impediments to Biocatalytic Synthesis of Aromatics from D-Glucose: Rate-Limiting Enzymes in the Common Pathway of Aromatic Amino Acid Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 11581-11589.
- [31] Park, N.H.; Rogers, P.L.: Kinetic Equations for L-Phenylalanine Production by a Hyperproducing Mutant of *Escherichia coli*. *Biocatalysis* 2 (1989) 79-87.
- [32] Esaki, N.; Nakamori, S.; Kurihara, T.; Furuyoshi, S.; Soda, K.: Enzymology of Amino Acid Production. In Rehm, H-J; Reed, G.; Pühler, A.; Stadler, P. (Hrsg.) *Biotechnology, Vol. 6: Products and Primary Metabolism*. 2nd Edition, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo (1996) 503-560.
- [33] Frost, J.W.; Knowles, J.R.: 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonic-Acid-7-Phosphate DAHP: Chemical Synthesis and Isolation from *E. coli* Auxotrophs. *Biochemistry* 23 (1984) 4465-4469.
- [34] Backman, K.; O'Connor, M.J.; Maruya, A.; Rudd, E.; McKay, D.; Balakrishnan, R.; Radjai, M.; Dipasquantonio, V.; Shoda, D.; Hatch, R.; Venkatasubramanian, K.: Genetic Engineering of Metabolic Pathways applied to the Production of L-Phenylalanine. *Annals New York Academy of Sciences* (1989) 16-24.
- [35] Nelms, J.; Edwards, R.M.; Warnick, J.; Fotheringham, I.: Novel Mutations in the *pheA* Gene of *Escherichia coli* K-12 which Result in Highly Feedback Inhibition-resistant Variants of Chorismate Mutase/Prephenate dehydratase. *Appl. Env. Microbiol.* 58 (1992) 2592-2598.
- [36] Yang, J.; Ganesan, S.; Sarsero, J.; Pittard, A.J.: A Genetic Analysis of various Functions of the *tyrR* Protein of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175 (1993) 1767-1776.
- [37] Wilson, T.J.; Argæet, V.P.; Howlett, G.J.; Davidson, B.E.: Evidence for two Aromatic Amino Acid-building Sites, one ATP-dependent and the other ATP-independent, in the *Escherichia coli* Regulatory Protein *tyrR*. *Mol. Microbiol.* 17 (1995) 483-492.
- [38] Lawley, B.; Pittard, A.J.: Regulation of *aroL* by *tyrR* Protein and *trp* Repressor in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 176 (1994) 6921-6930.
- [39] Frost, J.W.; Bender, J.L.; Kadonaga, J.T.; Knowles, J.R.: Dehydroquinate Synthase from *E. coli*: Purification, Cloning and Construction of Overproducers of the Enzyme. *Biochemistry* 23 (1984) 4470-4475.

- [40] Draths, K.M.; Knop, D.R.; Frost, J.W.: Shikimic Acid and Quinic Acid: Replacing Isolation from Plant Sources with Recombinant Microbial Biocatalysis. *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 1603-1604.
- [41] Li, K.; Frost, J.W.: Microbial Synthesis of 3-Dehydroshikimic Acid: A Comparative Analysis of D-Xylose, L-Arabinose, and D-Glucose Carbon Sources. *Biotechnol. Prog.* 15 (1999) 876-883.
- [42] Snell, K.D.; Draths, K.M.; Frost, J.W.: Synthetic Modification of the *Escherichia coli* Chromosome: Enhancing the Biocatalytic Conversion of Glucose into Aromatic Chemicals. *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 5605-5614.
- [43] Maiti, T.K.; Chatterjee, S.P.: Microbial Production of L-Phenylalanine: A Review. *Hindus. Antibiotics Bullet.* 32 (1990) 3-26.
- [44] Grinter, N.J.: Developing an L-Phenylalanine Process. *ChemTech.* July (1998) 33-37.
- [45] Whipp, M.J.; Pittard, A.J.: Regulation of Aromatic Amino Acid Transport Systems in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 132 (1977) 453-461.
- [46] Whipp, M.J.; Halsall, D.M.; Pittard, A.J.: Isolation and Characterization of an *Escherichia coli* K-12 Mutant Defective in Tyrosine- and Phenylalanine-specific Transport System. *J. Bacteriol.* 143 (1980) 1-7.
- [47] Pi, J.; Wookey, P.J.; Pittard, A.J.: Cloning and Sequencing of the *pheP* gene, which encodes the Phenylalanine-specific Transport System of *Escherichia coli*. *J. Bacterio.* 173 (1991) 3622-3629.
- [48] Wookey, P.J.; Pittard, A.J.; Forrest, S.M.; Davidson, B.E.: Cloning of the *tyrP* Gene and further Characterization of the Tyrosine-specific Transport System in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 160 (1984) 169-174.
- [49] Wookey, P.J.; Pittard, A.J.: DNA Sequence of the Gene (*tyrP*) encoding the Tyrosine-specific Transport System of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170 (1988) 4946-4949.
- [50] Kelle, R.; Laufer, B.; Brunzema, C.; Weuster-Botz, D.; Krämer, R.; Wandrey, C.: Reaction Engineering Analysis of L-Lysine Transport by *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. Bioeng.* 51 (1996) 40-50.
- [51] Sprenger, G.: Persönliche Mitteilungen. Institut für Biotechnologie I, Forschungszentrum Jülich (1999).
- [52] Sarsero, J.P.; Wookey, P.J.; Gollnick, P.; Yanofsky, C.; Pittard, A.J.: A new Family of integral Membrane Proteins involved in Transport of Aromatic Amino Acids in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 173 (1991) 3231-3224.
- [53] Pi, J.; Pittard, A.J.: Topology of the Phenylalanine-specific Permease of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178 (1996) 2650-2655.

-
- [54] Cosgriff, A.J.; Pittard, A.J.: A Topological Model for the General Aromatic Amino Acid Permease, *aroP*, of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179 (1997) 3317-3323.
- [55] Postma, P.W.; Lengeler, J.W.; Jacobsen, G.R.: Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase Systems of Bacteria. *Microbiol. Rev.* 57 (1993) 543-594.
- [56] Miller, J.E.; Backman, K.C.; O'Connor, M.J.; Hatch, R.T.: Production of Phenylalanine and Organic Acids by Phosphoenolpyruvate Carboxylase-deficient Mutants of *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol.* 2 (1987) 143-149.
- [57] Frost, J.W.; Lievens, J.: Prospects for Biocatalytic Synthesis of Aromatics in the 21st Century. *New. J. Chem.* 18 (1994) 341-348.
- [58] Patnaik, R.; Roof, W.D.; Young, R.F.; Liao, J.C.: Stimulation of Glucose Catabolism in *Escherichia coli* by a potential Futile Cycle. *J. Bacteriol.* 174 (1992) 7527-7532.
- [59] Patnaik, R.; Liao, J. C.: Engineering of *E. coli* Central Metabolism for Aromatic Metabolite Production with near Theoretical Yield. *Appl. Env. Microbiol.* 60 (1994) 3903-3908.
- [60] Chao, Y.P.; Liao, J.C.: Alteration of Growth Yield by Overexpression of Phosphoenolpyruvate Carboxylase and Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in *E. coli*. *Appl. Env. Microbiol.* 59 (1993) 4261-4265.
- [61] Chao, Y.P.; Lai, Z.J.; Chen, P.; Chern, J.T.: Enhanced Conversion Rate of L-Phenylalanine by coupling Reactions of Aminotransferases and Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in *Escherichia coli* K-12. *Biotechnol. Progress.* 15 (1999) 453-458.
- [62] Patnaik, R.; Spitzer, R.G.; Liao, J.C.: Pathway Engineering for Production of Aromatics in *E. coli*: Confirmation of Stoichiometric Analysis by independent Modulation of *AroG*, *TktA*, and *Pps* Activities. *Biotechnol. Bioeng.* 46 (1995) 361-370.
- [63] Ramseier, T.M.; Bledig, S.; Michotey, V.; Feghale, R.; Saier, M.H.: The Global Regulatory Protein *FruR* modulates the Direction of Carbon Flux in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 16 (1995) 1157-1169.
- [64] Fraenkel, D. G.: Glycolysis, Pentose Phosphate Pathway, and Entner-Doudoroff Pathway. In Neidhardt F. C. et. al. (Hrsg.): *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Vol 1, ASM Press, Washington, D. C. (1987) 189-198.
- [65] Flores, N.; Xiao, J.; Berry, A.; Bolivar, F.; Valle, F.: Pathway Engineering for the Production of Aromatic Compounds in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 621-624.

- [66] Chen, R.; Hatzimanikatis, V.; Yap, W.M.G.J.; Postma, P.W.; Bailey, J.E.: Metabolic Consequences of Phosphotransferase (PTS) Mutation in a Phenylalanine Producing Recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 13 (1997) 768-775.
- [67] Gosset, G.; Yong-Xiao, J.; Berry, A.A.: Direct Comparison of Approaches for increasing Carbon Flow to Aromatic Biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Indus. Microbiol.* 17 (1996) 47-52.
- [68] Snoep, J.L., Arfman, N.; Yomano, L.P.; Fliege, R.K.; Conway, T.; Ingram, L.O.: Reconstitution of Glucose Uptake and Phosphorylation in a Glucose-negative Mutant of *Escherichia coli* by using *Zymomonas mobilis* Genes encoding the Glucose Facilitator Protein and Glucosekinase. *J. Bacteriol.* 176 (1994) 2133-2135.
- [69] Weisser, P.; Krämer, R.; Sahm, H.; Sprenger, G.A.: Functional Expression of the Glucose Transporter of *Zymomonas mobilis* leads to Restoration of Glucose and Fructose Uptake in *Escherichia coli* Mutants and provides Evidence for its Facilitator Action. *J. Bacteriol.* 177 (1995) 3351-3354.
- [70] Sprenger, G.; Siewe, R.; Sahm, H.; Karutz, M.; Sonke, T.: Microbial Preparation of Substances from Metabolism/ I. Patent Application, published 1998, WO-98/18936.
- [71] Sprenger, G.; Siewe, R.; Sahm, H.; Karutz, M.; Sonke, T.: Microbial Preparation of Substances from Metabolism/ II. Patent Application, published 1998, WO-98/18937.
- [72] Chen, R.; Yap, W.M. G.J.; Postma, P.W.; Baily, J.E.: Comparative Studies of *E. coli* Strains using different Glucose Uptake Systems: Metabolism and Energetics. *Biotechnol. Bioeng.* 56 (1997) 583-590.
- [73] Sprenger, G.A.: Genetics of Pentose-Phosphate Pathway Enzymes of *Escherichia coli* K-12. *Arch. Microbiol.* 164 (1995) 324-330.
- [74] Ikeda, M.; Okamoto, K.; Katsumata, R.: Cloning of the Transketolase Gene and the Effect of its Dosage on the Aromatic Amino Acid Production in *Corynebacterium glutamicum* Appl. *Microb. Biotechnol.* 51 (1999) 201-206.
- [75] Sprenger, G.; Siewe, R.; Sahm, H.; Karutz, M.; Sonke, T.: Microbial Preparation of Substances from Metabolism/ I. Patent (announced 1998) WO9818936.
- [76] Draths, K.M.; Pompliano, D.L.; Conley, D.L.; Frost, J.W.; Berry, A.; Disbrow, G.L.; Staversky, R.J.; Lievense, J.C.: Biocatalytic Synthesis of Aromatics from D-Glucose: The Role of Transketolase. *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 3956-3962.
- [77] Krämer, M.: Untersuchung zum Einfluss erhöhter Bereitstellung von Erythrose-4-Phosphat (E4P) und Phosphoenolpyruvat auf den Kohlenstofffluss in den Aromatenbiosyntheseweg von *E. coli*. Dissertation, Universität Düsseldorf (2000).

-
- [78] Li, K.; Mikola, M.R.; Draths, K.M.; Worden, R.M.; Frost, J.W.: Fed-Batch Fermentor Synthesis of 3-Dehydroshikimic Acid using Recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 64 (1999) 61-73.
- [79] Lu, J.L.; Liao, J.C.: Metabolic Engineering and Control Analysis for Production of Aromatics: Role of Transaldolase. *Biotechnol. Bioeng.* 53 (1997) 132-138.
- [80] Ziehr, H.; Kula, M.R.; Schmidt, E.; Wandrey, C.; Klein, J.: Continuous production of L-Phenylalanine by Transamination. *Biotechnol. Bioeng.* 29 (1987) 482-487.
- [81] Hummel, W.; Schutte, H.; Schmidt, E.; Wandrey, C.; Kula, M.R.: Isolation of L-Phenylalanine Dehydrogenase from *Rhodococcus* sp. M4 and its Application for the Production of L-Phenylalanine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26 (1987) 409-416.
- [82] Hummel, W.; Schmidt, E.; Wandrey, C.; Kula, M.R.: L-Phenylalanine Dehydrogenase from *Brevibacterium* sp. for Production of L-Phenylalanine by Reductive Amination of Phenylpyruvate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25 (1986) 175-185.
- [83] Nakamichi, K.; Nabe, K.; Nishida, Y.; Tosa, T.: Production of L-Phenylalanine from Phenylpyruvate by *Paracoccus denitrificans* Containing Aminotransferase Activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30 (1989) 243-246.
- [84] Asano, Y.; Nakazawa, A.: High Yield Synthesis of L-Amino Acids by Phenylalanine Dehydrogenase from *Sporosarcina ureae*. *Agric. Biol. Chem.* 51 (1987) 2305-2306.
- [85] Then, J.; Doherty, A.; Neatherway, H.; Marquardt, H.; Deger, H.-M.; Voelskow, H.; Wöhner, G.; Präve, P.: Production of L-Phenylalanine from Phenylpyruvate using resting Cells of *Escherichia coli*. *Biotechnol. letters* 9 (1987) 680-684.
- [86] Calton, G.J.; Wood, L.L.; Opdike, M.H.; Lantz, I.I.; Hamman, J.P.: The Production of L-Phenylalanine by Polyazetidine Immobilized Microbes. *Biotechnol.* 4 (1986) 317-320.
- [87] Wood, L.L.; Calton, G.J.: Production of Phenylalanine with Immobilized Cells. US Patent (1988) US4728611.
- [88] Chao, Y.P.; Lai, Z.J.; Chen, P.; Chern, J.T.: Enhanced Conversion Rate of L-Phenylalanine by Coupling Reactions of Aminotransferases and Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in *Escherichia coli* K-12. *Biotechnol. Prog.* 15 (1999) 453-458.
- [89] Boer, L.D.; Dijkhuizen, L.: Microbial and Enzymatic Processes for L-Phenylalanine Production. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 41 (1990) 1-27.
- [90] Evans, C.T.; Bellamy, W.; Gleeson, M.; Aoki, H.; Hanna, K.; Peterson, W.; Conrad, D.; Misawa, M.: A novel, efficient Biotransformation for the Production of L-Phenylalanine. *Biotechnol.* 5 (1987) 818-823.

- [91] Bulot, E.; Cooney, C.L.: Selective Production of Phenylalanine from Phenylpyruvate using Growing Cells of *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. Letters* 7 (1985) 93-98.
- [92] McGuire, J.C.: Phenylalanine Ammonia Lyase Producing Microbial Cells. US Patent (1986) US 4,598,047.
- [93] Asano, Y.; Endo, K.; Nakazawa, A.; Hibino, Y.; Okazaki, N.; Ohmori, M.; Numao, N.; Kondo, K.: Bacillus Phenylalanine Dehydrogenase Produced in *Escherichia coli* - its Purification and Application to L-Phenylalanine Synthesis. *Agric. Biol. Chem.* 51 (1987) 2621-2623.
- [94] Schmid, A.; Dordick, J.S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Withold, B.: Industrial Biocatalysis Today and Tomorrow. *Nature* 409 (2001) 258-268.
- [95] Wang, P.M.; Yeh, C.Y.; Shu, C.H.; Liao, C.C.: A Substrate Feeding Strategy - using an Oxystat for L-Phenylalanine Fermentation by *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. Techniques* 8 (1994) 843-846.
- [96] Ikeda, M.; Ozaki, A.; Katsumata, R.: Phenylalanine Production by Metabolically Engineered *Corynebacterium glutamicum* with the *pheA* Gene of *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39 (1993) 318-323.
- [97] Masato, I.; Katsumata, R.: Metabolic Engineering to Produce Tyrosine or Phenylalanine in a Tryptophan Producing *Corynebacterium glutamicum* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 781-785.
- [98] Tsuchida, T.; Kubota, K.; Morinaga, Y.; Matsui, H.; Enei, H.; Yoshinaga, F.: Production of L-Phenylalanine by a Mutant of *Brevibacterium lactofermentum* 2256. *Agric. Biol. Chem.* 51 (1987) 2095-2101.
- [99] McEvoy, J.J.; Joyce, A.: Production of L-Phenylalanine by DL-Phenylalanine Hydroxamate-resistant *Tyr⁻* Mutants of *Bacillus subtilis*. *Mol. Cell. Biochem.* 4 (1974) 191-195.
- [100] Shiio, I.; Sugimoto, S.; Kawamura, K.: Breeding of Phenylalanine-producing *Brevibacterium flavum* Strains by removing Feedback Regulation of both the two Key Enzymes in its Biosynthesis. *Agric. Biol. Chem.* 52 (1988) 2247-2253.
- [101] Ikeda, M.; Ozaki, A.; Katsumata, R.: Phenylalanine Production by Metabolically Engineered *Corynebacterium glutamicum* with the *pheA* gene of *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39 (1993) 318-323.
- [102] Hwang, S.O.; Gil, G.H.; Cho, Y.J.; Kang, K.R.; Lee, J.H.; Bae, J.C.: The Fermentation Process for L-Phenylalanine Production using an Auxotrophic Regulatory Mutant of *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2 (1985) 108-113.

-
- [103] Gil, G.H.; Kim, S.R.; Bae, J.C.; Lee, J.H.: Pilot-scale Production of L-Phenylalanine from D-Glucose. *Enzyme Microb. Technol.* 7 (1985) 370-372.
- [104] Choi, Y.J.; Tribe, D.E.: Continuous Production of Phenylalanine using an *Escherichia coli* Regulatory Mutant. *Biotechnol. Letters* 4 (1982) 223-228.
- [105] Sugimoto, S.; Yabuta, M.; Kato, N.; Seki, T.; Yoshida, T.; Taguchi, H.: Hyperproduction of Phenylalanine by *Escherichia coli*: Application of a Temperature-controllable Expression Vector carrying the Repressor Promotor System of Bacteriophage Lambda. *J. Biotechnol.* 5 (1987) 237-253.
- [106] Park, N.H.; Rogers, P.L.: Batch and Fed-batch Culture studies on a Hyperproducing Mutant of *E. coli* for L-Phenylalanine Production. In: Aiba, S. (Ed.): Horizons of biochemical engineering, University of Tokyo Press (1988) 169-183.
- [107] Park, N.H.; Rogers, P.L.: L-Phenylalanine Production in Continuous Culture using a Hyperproducing Mutant of *Escherichia coli* K12. *Chem. Eng. Commun.* 45 (1986) 185-196.
- [108] Lee, S.B.; Won, C.H.; Park, C.; Lim, B.S.: Method for Production of L-Phenylalanine by Recombinant *E. coli*. US Patent (1991) US5,008,190.
- [109] Kim, H.Y.; Rhym, H.; Lee, D.J.; Won, C.H.; Lim, B.L.; Choi, H.G.: Method for Production of L-Phenylalanine by Recombinant *E. coli*. US Patent (1994) US5,304,475.
- [110] Lim, B.L.; Rhym, H.; Lee, J.H.; Choi, T.Y.; Hwang, E.N.; Choi, H.K.: Method for Production of L-Phenylalanine by *Escherichia coli* Mutant that is resistant to Osmotic Pressure. US Patent (1995) US5,409,830.
- [111] Konstantinov, K.B.; Kishimoto, M.; Seki, T.; Yoshida, T.: A balanced DO-stat and its Application to the Control of Acetic Acid excretion by Recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 36 (1990) 750-758.
- [112] Konstantinov, K.B.; Yoshida, T.: On-line Monitoring of Representative Structural Variables in Fed-batch Cultivation of Recombinant *Escherichia coli* for Phenylalanine Production. *J. Ferment. Bioeng.* 70 (1990) 420-426.
- [113] Konstantinov, K.B.; Nichio, N.; Yoshida, T.: Glucose Feeding Strategy accounting for the Decreasing Oxidative Capacity of Recombinant *Escherichia coli* in Fed-batch Cultivation for Phenylalanine Production. *J. Ferment. Bioeng.* 70 (1990) 253-260.
- [114] Konstantinov, K.B.; Nichio, N.; Seki, T.; Yoshida, T.: Physiologically motivated Strategies for Control of the Fed-batch Cultivation of Recombinant *Escherichia coli* for Phenylalanine Production. *J. Ferment. Bioeng.* 71(5), (1991) 350-355.

- [115] Sugimoto, S.; Kato, N.; Kitaoka, Y.; Seki, T.; Yoshida, T.; Taguchi, H.: Phenylalanine Production by Periodic Induction of Gene Expression using a Temperature-distributed dual Fermentor System. *J. Ferment. Bioeng.* 70 (1990) 376-380.
- [116] Weikert, C.; Sauer, U.; Bailey, J.E.: Increased Phenylalanine Production by Growing and Nongrowing *Escherichia coli* Strain CWML2. *Biotechnol. Prog.* 14 (1998) 420-424.
- [117] van de Walle, M.; Shiloach, J.: Proposed Mechanism of Acetate Accumulation in two Recombinant *Escherichia coli* Strains during high Density Fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 57 (1998) 71-78.
- [118] Axe, D.D.; Bailey, J.E.: Transport of Lactate and Acetate through the Energized Cytoplasmic Membrane of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 47 (1995) 8-19.
- [119] Farmer, W. R.; Liao, J. C.: Reduction of Aerobic Acetate Production by *Escherichia coli*. *Appl. Env. Microbiol.* 63 (1997) 3205-3210.
- [120] Meyer, H.-P.; Leist, C.; Fiechter, A.: Acetate Formation in Continuous Culture of *Escherichia coli* K12 D1 on Defined and Complex Media. *J. Biotechnol.* 1 (1984) 355-358.
- [121] Larsson, G.; Törnkvist, M.; Stahl Wernersson, E.; Trägårdh, C.; Noorman, H.; Enfors, S.-O.: Substrate Gradients in Bioreactors: Origin and Consequences. *Bioproc. Eng.* 14 (1996) 281-289.
- [122] Xu, B.; Jahic, M.; Blomston, G.; Enfors, S.-O.: Glucose Overflow Metabolism and Mixed-acid Fermentation in Aerobic Large Scale Fed-batch Processes with *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51 (1999) 564-571.
- [123] Xu, B.; Jahic, M.; Enfors, S.-O.: Modeling of Overflow Metabolism in Batch and Fed-batch Cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 15 (1999) 81-90.
- [124] Konstantinov, K. B.; Yoshida, T.: Physiological State Control of Fermentation Processes. *Biotechnol. Bioeng.* 33 (1988) 1145-1156.
- [125] Konstantinov, K. B.; Yoshida, T.: The Way to adequate Control of Microbial Processes passes via Real-time Knowledge-based Supervision. *J. Biotechnol.* 24 (1992) 33-51.
- [126] Luli, G.W.; Strohl, W.R.: Comparison of Growth, Acetate Production, and Acetate Inhibition of *Escherichia coli* Strains in Batch and Fed-batch Fermentations. *Appl. Env. Microbiol.* 56 (1990) 1004-1011.
- [127] Rinas, U.; Kracke-Helm, H.A.; Schügerl, K.: Glucose as a Substrate in Recombinant Strain Fermentation Technology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31 (1989) 163-167.

-
- [128] Valero, F.; Lafuente, J.; Poch, M.; Sola, C.: Biomass Estimation using On-line Glucose Monitoring by Flow Injection Analysis. Application to *Candida rugosa* Batch Growth. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 24/25 (1990) 591-602.
- [129] Kleman, G.L.; Chalmers, J.J.; Luli, G.W.; Strohl, W.: Glucose-stat, a Glucose-controlled Continuous Culture. *Appl. Env. Microbiol.* 57 (1991) 918-923.
- [130] Kleman, G.L.; Chalmers, J.J.; Luli, G.W.; Strohl, W.R.: A Predictive and Feedback Control Algorithm Maintains a constant Glucose Concentration in Fed-Batch Fermentations. *Appl. Env. Microbiol.* 57 (1991) 910-917.
- [131] Paalme, T.; Tiisma, K.; Kahru, A.; Vanatalu, K.; Vilu, R.: Glucose-limited Fed-batch Cultivation of *Escherichia coli* with Computer-controlled fixed Growth Rate. *Biotechnol. Bioeng.* 35 (1989) 312-319.
- [132] Queinnec, I.; Destruhaut, C.; Pourciel, J.B.; Goma, G.: An Effective Automated Glucose Sensor for Fermentation Monitoring and Control. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 8 (1992) 7-13.
- [133] Luli, G.W.; Schlasner, S. M.; Ordaz, D.E.; Mason, M.; Strohl, W. R.: An Automatic, On-line Glucose Analyzer for Feed-back Control of Fed-batch Growth of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Techniq.* 1 (1987) 225-230.
- [134] Mulchandani, A.; Bassi, A.S.: Principles and Applications of Biosensors for Bioprocess Monitoring and Control. *Crit. Rev. Biotechnol.* 15 (1995) 105-124.
- [135] Kelle, R.; Hermenn, T.; Weuster-Botz, D.; Eggeling, L.; Krämer, R.; Wandrey, C.: Glucose-controlled L-Isoleucine Fed-batch Production with Recombinant Strains of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 50 (1996) 123-136.
- [136] Hitzmann, B.; Broxterman, Q.; Cha, Y.L.; Sobiah, O.; Stärk, E.; Scheper, T.: The Control of Glucose Concentration during Yeast Fed-batch Cultivation using fast Measurement Complemented by an Extended Kalman Filter. *Bioproc. Eng.* 23 (2000) 337-341.
- [137] Svrcek, W.Y.; Elliott, R.F.; Zajic, J.E.: The Extended Kalman Filter applied to a Continuous Culture Model. *Biotechnol. Bioeng.* 16 (1974) 827-846
- [138] Förberg, C.; Häggström, L.: Effects of Cultural Conditions on the Production of Phenylalanine from a Plasmid-harboring *E. coli* Strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26 (1987) 136-140.
- [139] Förberg, C.; Eliason, T.; Häggström, L.: Correlation of Theoretical and Experimental Yields of Phenylalanine from Non-growing Cells of a rec *Escherichia coli* Strain. *J. Biotechnol.* 7 (1988) 319-332.
- [140] Förberg, C.; Häggström, L.: Phenylalanine Production from a rec *Escherichia coli*-strain in Fed-batch Culture. *J. Biotechnol.* 8 (1988) 291-300.

- [141] Takagi, M.; Nishio, Y.; Oh, G.; Yoshida, T.: Control of L-Phenylalanine Production by dual Feeding of Glucose and L-Tyrosine. *Biotechnol. Bioeng.* 52 (1996) 653-660.
- [142] Dunn, I.; Heinzle, E.; Ingham, J.; Prenosil, J.: Biologecal Reaction Engineering. Principles, Applications and Modelling with PC Simulation. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft (1992).
- [143] Nielsen, J.; Villadsen, J.: Bioreaction Engineering Principles. Plenum Press, New York, London (1994).
- [144] Krijgsman, J.: Solid Liquid Seperations: Filtration. Fa. Gist Brocades, Delft (1998) 3. Auflage.
- [145] Buchholz, R.: Bioverfahrenstechnik I. Unterlagen zur Vorlesung, Technische Universität Berlin (1995).
- [146] Strathmann, H; Chmiel, H.: Membranen in der Verfahrenstechnik. *CIT* 57 (1985) 581-596.
- [147] Cheryan, M.: Handbuch Ultrafiltration. Behr's Verlag, Hamburg (1990) 1. Auflage.
- [148] Donnelly, D.; Bergin, J.; Duane, T.; McNulty, N.: Application of Membrane Bioseperation Processes in the Beverage and Food Industries. In: Bioseparation and Bioprocessing, Wiley- VCH Verlag, Weinheim, New York (1998).
- [149] Lee, Y.; Clark, M. M.: Modeling of Flux Decline during Crossflow Ultrafiltration of Colloidal Suspensions. *J. Membr. Sci.* 149 (1998) 181-202.
- [150] Schlee, D.; Kleber, H.-P. (Hrsg.): Wörterbücher der Biologie-Biotechnologie. G. Fischer Verlag, Jena (1991).
- [151] Jönsson, A.-S.: Concentration Polarization and Fouling during Ultrafiltration of Colloidal Suspensions and Hydrophobic Solutes. *Separ. Sci. Technol.* 30 (1995) 301-312.
- [152] Beitz, W.; Küttner, K.-H. (Hrsg.): Dubbel- Taschenbuch für den Maschinenbau Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1991) 17. Auflage.

-
- [153] Hernandez-Pinzon, I.; Bautista, J.: Microfiltration of Streptococcal Fermentation Broths: Study of the Factors Affecting the Concentration Effects. *Biotechnol. Bioeng.* 44 (1994) 270-275.
- [154] Shimuzu, Y.; Shimodera, K.-I.; Watanabe, A.: Cross-Flow Microfiltration of Bacterial Cells. *J. Ferment. Bioeng.* 76 (1993) 493-500.
- [155] Li, S.-L.; Chou, K.-S.; Lin, J.-Y.; Yen, H.-W.; Chu, I.-M.: Study on the Microfiltration of *Escherichia coli*- Containig Fermentation Broth by a Ceramic Membrane Filter. *J. Membr. Sci.* 110 (1996) 203-210.
- [156] Agashichev, S. P.: Modeling Concentration Polarization Phenomena for Membrane Channel with Cylindrical Geometry in an Ultrafiltration Process. *Desalination* 119 (1998) 159-168.
- [157] Laborie, S.; Cabassud, C.; Durand-Bourlier, L.; Laine, J. M. : Fouling Control by Air Sparging inside Hollow Fibre Membranes- Effects on Energy Consumption. *Desalination* 118 (1998) 189-196.
- [158] Lee, C.-K.; Chang, W.-G.; Ju, Y.-H.: Air Slugs Entrapped Cross-Flow Filtration of Bacterial Suspensions. *Biotechnol. Bioeng.* 41 (1993) 525-530.
- [159] Miltner, R.; Summers, R.; Wang, J.: Effect of Backwashing. *J. Am. Water Works Asso.* 12 (1995) 64-70.
- [160] Rodemann, K.P.: Virusfiltration mit defektfreien Hohlfasermembranen. *Laborpraxis* 21 (1997).
- [161] Osenberg, M.: mündliche Mitteilungen. Schleicher und Schuell (1999).
- [162] Sellmer-Wilsberg, S.; Rodemann, K.P.: Einsatz mikroporöser Hochleistungsmembranen in der Essigfiltration. *GIT* 42 (1998) 881-883.
- [163] Gödde, A.: Separation von Insektenzellen mit Hilfe von Hohlfasermembranen. *Bioforum* 21 (1998) 783-785.
- [164] Rodemann, K.P.: Schonende Zellernte. *Laborpraxis* 23 (1999).
- [165] Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B.: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. Georg Thieme Verlag Stuttgart (1991) 4. Auflage.
- [166] Zaja, S.: Entwicklung einer analytischen Methode zur Quantifizierung ausgewählter Intermediate des Aromatenbiosyntheseweges in *Escherichia coli*. Diplomarbeit, IBT 2, Forschungszentrum Jülich (2001).
- [167] Jossek, R.: Mündliche Mitteilung. Institut für Biotechnologie 1, Forschungszentrum Jülich (2000)

- [168] Vandak, D.; Zigova, J.; Sturdik, E.; Schlosser, S.: Evaluation of Solvent and pH for Extractive Fermentation of Butyric Acid. *Proc. Biochem.* 32 (1997) 245-251.
- [169] Heath, C.A.; Belfort, G.: Synthetic Membranes in Biotechnology: Realities and Possibilities. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 47 (1992) 45-88.
- [170] Wieczorek, S.; Brauer, H.: Continuous Production of Citric Acid with Recirculation of the Fermentation Broth after Product Recovery. *Bioproc. Eng.* 18 (1998) 75-77.
- [171] Mattiasson, B.; Holst, O.: Extractive Bioconversions. Marcel Dekker, New York, Basel, Hong Kong (1991).
- [172] Martak, J.; Sabalova E.; Schlosser, S.: Toxicity of Organic Solvents used *in situ* in Fermentation of Lactic Acid by *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnol. Techniq.* 11 (1997) 71-75.
- [173] Freeman, A.; Woodley, J.M.; Lilly, M.D.: *In situ* Product Removal as a Tool for Bioprocessing. *Biotechnol.* 11 (1993) 1007-1012.
- [174] Chmiel, H.: Integrated Downstream Processing with Membranes. *Chem. Biochem. Eng.* 4 (1988) 184-191.
- [175] Maaß, D.; Kaftzik, N.; Takors, R.; Wandrey, C.: Membrangestützte Reaktiv-Extraktion zur integrierten Produktabtrennung bei der fermentativen Herstellung von Aminosäuren. *CIT* 71 (1999) 945-946.
- [176] Schlichting, E.; Halwachs, W.; Schügerl, K.: Reactive Extraction of Salicylic Acid and D/L-Phenylalanine in a Stirred Cell. *Chem. Eng. Comm.* 151 (1987) 193-205.
- [177] Abbasian, K.; Degener, W.; Schügerl, K.: Reactive Extraction of Primary and Secondary Metabolites. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 93 (1989) 967-980.
- [178] Schügerl, K.; Hänsel, R.; Schlichting, E.; Halwachs, W.: Reaktivextraktion. *VDI-Berichte* 607 (1986) 779-803.
- [179] Hänsel, R.; Halwachs, W.; Schügerl, K.: Reactive Extraction of D,L-Phenylalanine with Trioctylmethylammoniumchloride (TOMAC) as a Carrier - III. Equilibrium and Mass Transfer investigations. *Chem. Eng. Sci.* 47 (1986) 1811-1815.
- [180] Schügerl, K.: Solvent Extraction in Biotechnology. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris (1994).
- [181] Scheler, C.; Popovich, M.; Bajpai, R.: Reaktiv-Extraktion von Milchsäure aus einer Fermentationsbrühe in einem Hohlfasermembranmodul. *CIT* 69 (1997) 951-955.
- [182] Wieczorek, S.; Brauer, H.: Continuous Production of Citric Acid with Recirculation of the Fermentation Broth after Product Recovery. *Bioproc. Eng.* 18 (1998) 75-77.

-
- [183] Lukhezo, M.; Kelly, N.A.; Reuben, B.G.; Dunne L.J.; Verrall, M.S.: Reactive Solvent Extraction of Amino Acids. *Proceedings ISEC 96* (1996) 87-92.
- [184] Thien, M.P.; Hatton, T.A.; Wang, D.I.C.: Separation and Concentration of Amino Acids Using Liquid Emulsion Membranes. *Biotechnol. Bioeng.* 32 (1988) 604-615.
- [185] Scarpello, J.T.; Stuckey, D.C.: The Reactive Extraction of Phenylalanine with Aliquat 336: Buffer Co-extraction Equilibrium and Mass Transfer Kinetics. *Biotechnol. Bioeng.* 69 (2000) 469-477.
- [186] Cardoso, M.M.; Viegas, R.M.C.; Crespo, J.P.S.G.: Kinetics of Phenylalanine Extraction and Reextraction by Cationic Reversed Micelles using a Diffusion Cell. *Chem. Eng. Sci.* 55 (2000) 2835-2847.
- [187] Escalante, H.; Alonso, A.I.; Ortiz, I.; Irabien, A.: Separation of L-Phenylalanine by Nondispersive Extraction and Backextraction. Equilibrium and Kinetic Parameters. *Sep. Sci. Technol.* 33 (1998) 119-139.
- [188] Haensel, R.; Halwachs, W.; Schügerl, K.: Reactive Extraction of D,L-phenylalanine with Trioctylmethylammoniumchloride (TOMAC) as a Carrier-III. Equilibrium and Mass Transfer Investigations. *Chem. Eng. Sci.* 41 (1986) 1811-1815.
- [189] Schlichting, E.: Untersuchungen zur Reaktivextraktion von Salicylsäure und D,L-Phenylalanin in einer pulsierten Siebbodenextraktionskolonne. Dissertation, Universität Hannover (1984).
- [190] Escalante, H.; Ortiz, M.I.; Irabien, J.A.: Concentration of L-Phenylalanine by Non-dispersive Extraction in Hollow Fibre Modules. *ISEC 96*, Melbourne, Australia, (1996) 1493-1498.
- [191] Ruffer, N.: persönliche Mitteilungen. Laufende Dissertation im IBT 2, Forschungszentrum Jülich (2001).
- [192] Pittard, A.J.: Biosynthesis of the Aromatic Amino Acids. In: Neidhardt F.C. (Ed.): *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, vol. 1: Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington D. C. (1996) 458-484.
- [193] Leuchtenberger, W.: Amino acids - Technical Production and Use. In: Rehm, H.J.; Reed, G.; Pühler, A.; Stadler, P. (Ed.): *Biotechnology*, vol. 6: Products and Primary Metabolism. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo (1996) 2. Auflage, 465-502.
- [194] Buchholz, A.: Reaktionstechnische Untersuchungen zur Dynamik intrazellulärer Metabolite in glycerollimitierten *Escherichia coli* K12. Diplomarbeit, Institut für Biotechnologie 2, Forschungszentrum Jülich (1998).

- [195] Bradford, M.M.: A Rapid and sensitive Method for the Quantification of microgram Quantities of Protein utilising the Principle of Protein-dye Binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- [196] Schoner, R.; Herrmann, K.M.: 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonate-7-Phosphate Synthase: Purification, Properties, and Kinetics of the Tyrosine-sensitive Isoenzyme from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 251 (1976) 5440-5447.
- [197] Bornemann, S.; Theoclitou, M.E.; Brune, M.; Webb, M.R.; Roger, N.F.: A Secondary β Deuterium Kinetic Isotope Effect in the Chorismate Synthase Reaction. *Bioorg. Chem.* (2000).
- [198] Frost, J.W.; Draths, K.M.: Conversion of D-Glucose into Catechol: The Not-So-Common Pathway of Aromatic Biosynthesis. *Am. Chem. Soc.* (1991).
- [199] Reimer, L.M.; Conley, D.L.; Pompliano, D.L.; Frost, J.W.: Construction of an Enzyme-Targeted Organophosphonate using Immobilized Enzyme an Whole Cell Synthesis. *Am. Chem. Soc.* (1985).
- [200] Schuhmann, W.; Wohlschläger, H.; Huber, J.; Schmidt, H.L.; Stadler, H.: Development of an Extremely Flexible Automatic Analyzer with Integrated Biosensors for On-line Control of Fermentation Processes. *Anal. Chim. Acta.* 315 (1995) 113-122.
- [201] Stratton, J.; Meagher, M.: Effect of Membrane Pore Size and Chemistry on the Crossflow Filtration of *E. coli* and *S. cerevisiae*: Simultaneous Evaluation of Different Membranes Using a Versatile Flat- Sheet Membrane Module. *Bioseparation* 4 (1994) 255-262.
- [202] Huang, J.; Dhulster, P.; Thomas, D.; Barbotin, N.: Agitation Rate Effects on Plasmid Stability in Immobilized and Free- Cell Continous Cultures of Recombinant *E. coli*. *Enzym. Microb. Technol.* 12 (1990) 933-939.
- [203] Belo, I; Mota, M.: Batch and Fed- Batch Cultures of *E. coli* TB1 at Different Oxygen Transfer Rates. *Bioproc. Eng.* 18 (1998) 451-455.
- [204] Silberbach, K.: Reaktionstechnische Untersuchungen zur Verweilzeitentkopplung bei Fermentationen mit *E. coli*. Diplomarbeit, IBT 2, Forschungszentrum Jülich (1999).
- [205] Schleicher und Schuell AG, Dassel: Produktinformation zu Hohlfaser-Ultrafiltrationsmodulen (1999).
- [206] Altenbach-Rehm, J.; Weuster-Botz, D.; Drescher, T.; Wandrey, C.: Fed-batch-Schüttelkolbentechnik - Werkzeug für die biotechnologische Prozessentwicklung. *CIT* 68 (1996) 1432-1436.

-
- [207] Altenbach-Rehm, J.: Entwicklung und Einsatz einer miniaturisierten parallelen Versuchstechnik für die Bioprozessentwicklung. Dissertation, Universität Karlsruhe (1999).
- [208] Rautenbach, R.: Membranverfahren- Grundlagen der Modul- und Anlagenauslegung. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, (1997).
- [209] Engfeld, A.: Reaktionstechnische und zellphysiologische Untersuchung L-Phenylalanin produzierender, rekombinanter *E. coli* Stämme in kontinuierlicher Fermentation. Diplomarbeit, IBT 2, Forschungszentrum Jülich (2001).
- [210] Karutz, M.: persönliche Mitteilungen. DSM Biotech GmbH, Technologiezentrum Jülich (1998).
- [211] Produktinformation zur OLGA GL2b. IBA GmbH, Göttingen, Deutschland (1999).
- [212] Weuster-Botz, D.; Paschold, H.; Striegel, B.; Kula, M.; Wandrey, C.: Continuous Computer Controlled Production of Formate Dehydrogenase (FDH) and Isolation on a Pilot Scale. *Chem. Eng. Technol.* 17 (1994) 131-137.
- [213] Weuster-Botz, D.; Karutz, M.; Jokusch, B.; Schärtges, D.; Wandrey, C.: Integrated Development of Fermentation and Downstream Processing for L-Isoleucine Production with *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46 (1996) 209-219.
- [214] Striegel, B.: Entwurf und Implementierung von Regelungskonzepten für biotechnische Prozesse. Dissertation, RWTH Aachen (1993).
- [215] Wiechert, W.: Interaktive Datenanalyse bei biotechnischen Prozessdaten. Dissertation, Universität Bonn (1991).
- [216] Stephanopoulos, G.; San, K.: Studies on on-line bioreactor identification. I. Theory. *Biotechnol. Bioeng.* 26 (1984) 1176-1188.
- [217] Bastin, G.; Dochain, D.: On-line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors. Elsevier, Amsterdam (1990).
- [218] Maaß, D.: Prozeßentwicklung zur simultanen Produktabtrennung von L-Phenylalanin. Dissertation, Technische Universität Berlin (2000).
- [219] Maaß, D.; Paschold, H.; Takors, R.; Weuster-Botz, D.; Wandrey, C.: Verfahren zur Abtrennung organischer Substanzen aus einem wässrigen Gemisch. Patent (announced 2000) DE19919490.44.
- [220] Bujnicki, R.: laufende Diplomarbeit. IBT 2, Forschungszentrum Jülich (2001).
- [221] Takors, R.; Gerigk, M.; Paschold, H.; Wandrey, C.: Principal Component Analysis for Microbial L-Phenylalanin Production. *Bioproc. Biosys. Eng. (in print)* (2001).

- [222] Ganpo-Nkwenkwa, E.: Influence of the L-Tyrosine Availability on Growth and L-Phenylalanine Production in Fed-batch Culture using Recombinant *E. coli* Strains. Master-Thesis. IBT 2, Forschungszentrum Jülich (2001).
- [223] Maaß, D.; Gerigk, M.; Silberbach, K.; Takors, R.: Integrated L-Phenylalanine Extraction in Fermentation: From Lab to Technical Scale. *Bioproc. Biosys. Eng.* (submitted) (2001).
- [224] Gerigk, M.; Maaß, D.; Kreutzer, A.; Sprenger, G.; Wubbolts, M.; Takors, R.: Pilot Scale Fed-batch L-Phenylalanine Production using Recombinant *E. coli* and Fully Integrated Reactive Extraction. *Bioproc. Biosys. Eng.* (submitted) (2001).
- [225] Maass, D.: mündliche Mitteilungen. Institut für Biotechnologie 2, Forschungszentrum Jülich (1998).
- [226] Lengeler, J.W.; Postma, P.W.: Global Regulatory Networks and Signal Transduction Pathways. In: Lengeler, J.W.; Drews, G.; Schlegel, H.G. (Ed.): *Biology of the Prokaryotes*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany (1999) 491-523.
- [227] Postma, P.W.; Lengeler, J.W.; Jacobsen, G.R.: Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase Systems of Bacteria. *Microbiol. Rev.* 57 (1993) 543-594.
- [228] Schmidt, K.: mündliche Mitteilungen. Institut für Biotechnologie 2, Forschungszentrum Jülich (1999).
- [229] Huang, J.; Dhulster, P.; Thomas, D.; Barbotin, J.-B.: Agitation Rate Effects on Plasmid Stability in immobilized and free-cell Continuous Cultures of Recombinant *E. coli*. *Enzyme Microb. Technol.* 12 (1990) 933-939.
- [230] Engfeld, A.: mündliche Mitteilungen. Institut für Biotechnologie 2, Forschungszentrum Jülich (2000).
- [231] Takors, R.: mündliche Mitteilungen Institut für Biotechnologie 2, Forschungszentrum Jülich (2001).
- [232] Schmitz, M.: laufende Dissertation. Institut für Biotechnologie 2, Forschungszentrum Jülich (2000).
- [233] Kreutzer, A.: mündliche Mitteilungen. Institut für Biotechnologie 2, Forschungszentrum Jülich (2001).
- [234] Schmidt, K.: Mikrobielle Aromatenbiosynthese auf Zuckerbasis. Jahresbericht, Institut für Biotechnologie 2, Forschungszentrum Jülich (1998).
- [235] Wubbolts, M.: persönliche Mitteilungen. DSM Biotech GmbH, Technologiezentrum Jülich (2001).

12. ANHANG

12.1. CHEMIKALIENLISTE

Chemikalie	Firma
Aceton	Merck
25 % Ammoniakwasser	Merck
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18 \text{H}_2\text{O}$	Merck
Agar-Agar Pulver	Difco
Ammoniumsulfat	Merck
Ampicillin	Merck
Antischaum S 289	Sigma
Bacto Trypton [®]	Difco
1,3-Bis(tris(hydroxymethyl)-methyl-amino)propan (BTP)	Biomol
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck
CASYTON	SchärfeSystem
$\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	Merck
Coomassie Brilliant Blue	BioRad
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	Merck
D_2EHPA	Fluka
Ethanol _{tech.}	Merck
Ethanol _{abs.}	Merck
Erythrose-4-Phosphat	Merck
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	Merck
Glucosemonohydrat	Roquette Italia S.P.A.
Glutardialdehyd 25 % _{aq.}	Sigma-Aldrich
Glycerin	Merck
H_3BO_3	Merck
HClO_4	Merck
H_3PO_4 85% _{aq.}	Merck
Hefeextrakt	Merck
IPTG	Roth
Isopropanol	Merck
K_2CO_3	Merck
K_2HPO_4	Merck
KH_2PO_4	Merck
Kerosin	Fluka
L-Phenylalanin	Merck
L-Tyrosin	Merck
Mercaptoethanol	Merck
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	Merck
$\text{MnSO}_4 \cdot 1 \text{H}_2\text{O}$	Merck
Na-Citrat	Merck
NaCl	Merck
NaH_2PO_4	Merck
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Merck
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck
NaOH	Merck
$\text{NiSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	Merck
Ortho-Phtaldialdehyd	Merck
Pepton	Merck
Phosphoenolpyruvat (PEP)	Merck
Rinderserumalbumin, Fraktion V	Merck
Salzsäure konz.	Merck
Tween 20	Merck
Vitamin B ₁ (Thiamin*HCl)	Merck
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	Merck

12.2. GERÄTELISTE

Fermentation in Schüttelkolben (Abschnitt 5.1):

Schüttelkolbenanlage		
Schüttelkolbeninkubator	3033	GLF
Substratdosierung und Messdatenerfassung	Fed-Batch Pro	Dasgip mbH

Fermentation im Zulaufverfahren 7,5 l (Abschnitt 5.2):

Bioreaktor und Peripherie		
Bioreaktor	L 1523	Bioengineering
Brooks	5850 I	Brooks Instruments B.V.
Dosiertechnik	YFC 01Z	Sartorius AG
Pumpenschläuche	Marprene	Watson Marlow
Pumpen	U101;U501	Watson Marlow
Sauerstoffelektrode	12 mm OxyProbe	Broadley James
Abgasanalytik	Binos 100 2M	Fisher-Rosemount
pH-Elektrode	F-615-B130-DH	Broadley James
Waagen	IP 65	Sartorius AG
Waagen	Excellence	Sartorius AG
A/D Wandler	SMP Interface	Siemens
Messdatenerfassung	Medusa	Forschungszentrum Jülich GmbH; IBT 2
Permeatabtrennung	UFP- 500- 4A	Schleicher&Schüll
Pumpen	504 U	Watson Marlow
Durchflussanzeiger	VKG-8	Kobold
Dosimat	665	Metrohm

Kontinuierliche Fermentation (Abschnitt 5.3):

Bioreaktor und Peripherie		
A/D Wandler	SMP Interface	Siemens
Abgasanalytik	Binos100 2M	Fisher-Rosemount
Dosiertechnik	YFC 01Z	Sartorius AG
Dosimaten	665	Metrohm
Bioreaktor	LPF CF3000	Chemap, (Kessel: B.Braun Biotech Int.)
Kryostat	KT90W	HAAKE Fison
Messdatenerfassung	MEDUSA	Forschungszentrum Jülich GmbH; IBT2
pH-Elektrode	F-615-B130-DH	Broadley James
Pumpen	U101;U501;U/R603	Watson Marlow
Pumpenschläuche	Mapren	Watson Marlow
Sauerstoffelektrode	12 mm OxyProbe	Broadley James
Messwertverstärker pO ₂	O ₂ 4100	Mettler-Toledo
Waagen	IP 65	Sartorius AG
Waage	3807 MP	Sartorius AG
Zuluftdosierung	5830i	Brooks Instruments B.V.

Fermentation im Zulaufverfahren 20 l (Abschnitt 5.4):

Bioreaktor und Peripherie		
A/D Wandler	SMP Interface	Siemens
Abgasanalytik	Binos100 2M	Fisher-Rosemount
Dosiertechnik	YFC 01Z	Sartorius AG
Probenahme	UFP-500-E-1	Schleicher&Schüll

Glucoseanalytik	OLGA GL2b	IBA GmbH
Bioreaktor	ISF 200	Infors
Messdatensicherung	LabView	National Instruments
Prozesskontrolle	MEDUSA	Forschungszentrum Jülich GmbH; IBT2
pH-Elektrode	F-615-B130-DH	Broadley James
Pumpen	U101;U501;U504	Watson Marlow
Pumpenschläuche	Mapren	Watson Marlow
Sauerstoffelektrode	12 mm OxyProbe	Broadley James
Waagen	IP 65	Sartorius AG
Waage	3807 MP	Sartorius AG
Zuluftdosierung	5851 E	Brooks Instruments B.V.

Fermentation im Zulaufverfahren 300 l und Permeatabtrennung (Abschnitt 5.5):

Bioreaktor und Peripherie		
A/D Wandler	SMP Interface	Siemens
Abgasanalytik	Binos100 2M	Fisher-Rosemount
Dosiertechnik	YFC 01Z	Sartorius AG
Probenahme	UFP-500-E-1	Schleicher&Schüll
Glucoseanalytik	OLGA GL2b	IBA GmbH
Bioreaktor (300 l)	-	Chemap AG
Bioreaktor (30 l)	-	Chemap AG
Messdatensicherung	LabView	National Instruments
Prozesskontrolle	MEDUSA	Forschungszentrum Jülich GmbH; IBT2
pH-Elektrode	F-615-B130-DH	Broadley James
Pumpen	U101; U501; U504; U/R603	Watson Marlow
Pumpenschläuche	Mapren	Watson Marlow
Sauerstoffelektrode	12 mm OxyProbe	Broadley James
Messwertverstärker pO ₂	O ₂ 4100	Mettler-Toledo
Waagen	IP 65	Sartorius AG
Waage	TT	Kern
Permeatabtrennung	UFP-500-E-65	Schleicher&Schüll
Pumpe im Umlauf	VRI840	Watson Marlow
Schlauchmaterial	STA-PURE	Watson Marlow
Pumpe Bilanzwaage	U/R603	Watson Marlow
Waage	3807 MP	Sartorius AG
Ventile im Umlauf	diverses	Swagelok GmbH
Konstruktion des Umlaufs	diverses	Neumo GmbH
Manometer	24013 ND	Wika GmbH

Analytik		
Glucosemessung	Accutrend Sensor®	Roche Diagnostics
Trockenschrank	-	Memmert GmbH
Spritzenfilter	0,2 µm	Schleicher&Schüll
Photometer	UV 160	Shimadzu
Cellcounter	CASY® 1 Modell TT	Schärfe System
Photometer (Enzymaktivität)	DU 640	Beckmann
Ultraschallsonde	-	Dr. Hielscher GmbH
Zentrifuge	Diverse	Beckmann; Haereus
Rasterelektronenmikroskop	JSM-6300F	JEOL

Goldbedampfungsgerät	MED 020	Bal-Tek
Kontrollgerät (Oberflächen)	MCS 010	Bal-Tek
kritischer-Punkt-Trockner	CPD 030	Bal-Tek
NMR	AMX 300	Bruker Physik AG
Vakuumzentrifuge(NMR)	Speed Vac Concentrator	Backofer
Schüttelkolbeninkubator	3033	GLF
Platteninkubator	-	Memmert
Lyophilisation (DSP)	Lyovac GT 20	Lebold-Heraeus

12.3. ¹H-NMR-GERÄTEPARAMETER

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

Technische Daten:

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

¹H-NMR-Daten der Intermediate:

Substanz	¹ H-NMR-Daten (D ₂ O)	Signal zur Quantifizierung
Chorismat	δ 5,5 (s, 2H), δ 5,95 (s, 1H), δ 6,05 (s, 1H), δ 6,25 (s, 1H), δ 6,35 (s, 1H), δ 6,95 (s, 1H)	nicht detektiert
DAH	δ 1,83 (dd, J=12, 12 Hz, 1 H), δ 2,28 (dd, J=5,8 Hz, 1H), δ 3,43 (dd, J=10, 10 Hz, 1H), δ 3,79 – 3,86 (m, 3H), δ 3,94 – 3,99 (m, 1H)	δ 1,83 (dd, J=12, 12 Hz, 1 H), δ 2,28 (dd, J=5,8 Hz, 1H),
DHQ	δ 2,3 (m, 2H), δ 2,53 (d, 14,2 Hz, 0,4H), δ 3,9 (dd, J=13,2, 5,8 Hz)	nicht detektiert
DHS	δ 2,6 (ddd, J=18,3 ; 10,0 ; 3,2 Hz, 1H), δ 3,03 (dd, J=18,3; 5,3 Hz, 1H), δ 3,93 (dd, J=10, 5,3 Hz, 1H), δ 6,35 (d, J=3,2 Hz, 1H)	δ 3,93 (dd, J=10, 5,3 Hz, 1H), δ 6,35 (d, J=3,2 Hz, 1H)
EPSP	δ 2,18 (dd, J=17,8; 7,8 Hz, 1H), δ 3,02 (dd, J=17,8; 4,4 Hz, 1H) δ 4,46 (dd, J=7,8; 4,4 Hz, 1H) δ 4,73 (d, J=2,6 Hz, 1H), δ 5,22 (d, J=2,6 Hz, 1H), δ 6,52 (breites s, 1H)	nicht detektiert
Galsäure	δ 7,1 (s, 1H)	δ 7,1 (s, 1H)
L-Phenylalanin	δ 3,1 (dd, J=7,0; 6,0 Hz, 1H), δ 3,23 (dd, J= 10,0; 5,0 Hz, 1H), δ 3,95 (dd, J=5,0; 6,0 Hz, 1H), δ 7,45 (m, Aromatenresonanz, 5 H)	δ 3,1 (dd, J=7,0; 6,0 Hz, 1H), δ 3,23 (dd, J= 10,0; 5,0 Hz, 1H)
Phenylpyruvat	δ 6,45 (s, 2H), δ 7,45 (m, Aromatenresonanz 5H)	δ 6,45 (s, 2H)
Prephenat	δ 3,1 (s, 2H), δ 4,55 (s, 1H), δ 5,92 (s, 1H), δ 5,98 (s, 1H), δ 6,02 (s, 1H), δ 6,1 (s, 1H)	δ 5,92 (s, 1H), δ 5,98 (s, 1H), δ 6,02 (s, 1H), δ 6,1 (s, 1H)
S3P	δ 2,19 (dd, J=6,2; 18,4 Hz, 1H), δ 2,69 (dd, J= 4,9;	nicht detektiert

	18,1 Hz, 1H), δ 3,84 (dd, J= 4,0; 8,1 Hz, 1H), δ 6,55 (t, J=1,8 Hz, 4H)	
Shikimat	δ 2,2 (ddd, J=18,0 ; 6,6; 2 Hz, 1H), δ 2,75 (dd, J=18, 5,3Hz, 1H), δ 4,03 (dd, J=6,6, 5,3 Hz, 1H), δ 4,4 (d, J=4,0 Hz, 1H), δ 6,7 (dd, J= 4,0; 1,6 Hz, 1H)	δ 2,75 (dd, J=18, 5,3Hz, 1H), δ 4,4 (d, J=4,0 Hz, 1H),

12.4. HPLC-GERÄTEPARAMETER

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

Geräteparameter HPLC für Aminosäuren (Abschnitt 4.3.5):

Stationäre Phase:	Lichrospher 100 RP 18-5 EC
Säule	125 × 4 mm
Eluent A	Phosphatpuffer (10 mM, pH 7,2)
	0,5 % Tetrahydrofuran
Eluent B	50 % Phosphatpuffer (10 mM, pH 7,2)
	35 % Methanol
	15 % Acetonitril
Gradient	0 min 80 % B
	7 min 90 % B
	8,5 min 100 % B
	11 min 100 % B
	12 min 80 % B
Fluss	0,9 ml min ⁻¹
Probenvolumen	5 µl
Vorsäulenderivatisierung	90 s
Ofentemperatur	40 °C
Detektor	Fluoreszenzdetektor RF-535
Wellenlänge Excitation	330 nm
Wellenlänge Emission	450 nm

HPLC für organische Säuren		
HPLC Säule	Aminex HPX-87H	Sycam BioRad
UV-Detektor	S3300	Sycam

Geräteparameter HPLC für organische Säuren (Abschnitt 4.3.5):

Stationäre Phase	Aminex-HPX-87H
Säule	300 × 7,8 mm
Eluent	0,2 N H ₂ SO ₄ (isokratisch)
Fluss	0,5 ml min ⁻¹
Probenvolumen	100 µl
Ofentemperatur	40 °C
Detektor	UV- Detektor
Wellenlänge Excitation	215 nm

12.5. ZUSÄTZLICHE NÄHRMEDIEN

Weitere zur L-Phenylalanin Produktion untersuchte Nährmedien (Abschnitt 6.1)

Panmedium:

KH ₂ PO ₄	13,0	g/l
K ₂ HPO ₄	10,0	g/l
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	6,0	g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0	g/l
NH ₄ Cl	0,2	g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,0	g/l

Salze werden vereinigt, mit 832 ml H₂O bidest. versetzt, ein pH-Wert von 7.4 eingestellt (NaOH) und die Lösung autoklaviert. Spurenelemente, Thiamin und Glucose werden danach steril zugeben. Da die Spurenelemente sehr sauer sind verschiebt sich der pH-Wert von 7.4 auf 6.8.

Spurenelementelösung (250x):

FeSO ₄ x 7 H ₂ O	40,0	g/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	40,0	g/l
MnSO ₄ x H ₂ O	10,0	g/l
AlCl ₃ x 6 H ₂ O	10,0	g/l
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	7,32	g/l
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	2,0	g/l
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	2,0	g/l
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	1,0	g/l
H ₃ BO ₃	0,5	g/l

Um die Salze zu lösen muss in 5 N HCl angesetzt werden. Anschließend wird die Lösung autoklaviert. Vor Inokulation der Schüttelkolben wird die Spurenelementelösung mit einer Endkonzentration von 4,0 ml/l zugegeben, da die Salze bei dem sich einstellenden pH-Wert von 6.8 teilweise ausfallen.

Glucose-Lösung:

Glucosemonohydrat	220	g/l	(sterilisiert)
-------------------	-----	-----	----------------

Thiaminlösung:

Thiamin	7,5	g/l	(sterilfiltriert)
---------	-----	-----	-------------------

Tanakamedium:

Lösung A (10x):

NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	53,13	g/l	
K ₂ HPO ₄	115,0	g/l	
(NH ₄) ₂ SO ₄	26,4	g/l	(die Salze in 1,0 l H ₂ O bidest. lösen und autoklavieren)

Lösung B (100x):

MgSO ₄ x 7 H ₂ O	7,4	g/l	
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	147,0	mg/l	
ZnCl ₂	13,5	mg/l	
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	28,0	mg/l	
HCl (konz.)	1,0	ml/l	(die Salze in 1,0 l H ₂ O bidest. lösen und autoklavieren)

Für 1,0 l Medium werden zusammengeführt:

Lösung A	100	ml	
Lösung B	10	ml	
H ₂ O bidest. (steril)	865	ml	(Thiamin und Glucose werden danach steril zugeben)

Glucoselösung:

Glucosemonohydrat	220	g/l	(sterilisiert)
-------------------	-----	-----	----------------

Thiamin-Lösung:

Thiamin	7,5	g/l	(sterilfiltriert)
---------	-----	-----	-------------------

Medien für die kontinuierliche Fermentation (Abschnitt 5.3)

Fermentationsmedium für die Batchphase:

MgSO ₄ * 7 H ₂ O	3,0 g/l
KH ₂ PO ₄	3,0 g/l
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,015 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0 g/l
NaCl	1,0 g/l
FeSO ₄ * 7 H ₂ O/Natriumcitrat	0,1125 g/l
Spurenelementlösung	1,5 ml/l
L-Tyrosin	0,4 g/l
Ampicillin	0,1 g/l
Vitamin B ₁ (Thiamin * HCl)	0,075 g/l
Glucose	25 g/l

Die Substanzen wurden in H₂O bidest. gelöst und in den Reaktor sterilfiltriert. Mit der pH-Regelung wurde ein pH-Wert von 6,5 eingestellt.

Hauptzulauf (Glucose- und Nährlösung):

MgSO ₄ * 7 H ₂ O	3,0 g/l
KH ₂ PO ₄	3,0 g/l
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,015 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0 g/l
NaCl	1,0 g/l
FeSO ₄ * 7 H ₂ O/Natriumcitrat	0,1125 g/l
Spurenelementlösung	1,5 ml/l
Vitamin B ₁ (Thiamin * HCl)	0,075 g/l
Glucose	82,5 g/l
Antischaum Sigma 289	0,7 ml/l
L-Phenylalanin (je nach Versuch)	0 – 30 g/l
D ₂ EHPA/Kerosin 1:1 (je nach Versuch)	0,03 ml/l

Alle Substanzen außer Thiamin, D₂EHPA, MgSO₄ * 7 H₂O und Glucose wurden in H₂O bidest. gelöst. Glucose und MgSO₄ * 7 H₂O wurden getrennt in H₂O bidest. gelöst und autoklaviert. Nach der Sterilisation wurden beide Lösungen steril vereinigt. Thiamin und D₂EHPA wurden in das abgekühlte Medium sterilfiltriert.

L-Tyrosinzulauf:

L-Tyrosin	25 g/l
Ammoniaklösung 25% _{aq.}	200 ml/l

Das L-Tyrosin und die Ammoniaklösung wurden in H₂O bidest. gelöst. Aufgrund des hohen pH-Wertes von 11-12 war die Lösung autosteril.

IPTG-/Ampicillingemisch:

Ampicillin 25 g/l

IPTG 2,1 g/l

Die Substanzen wurden in H₂O bidest. gelöst und bei –18 °C gelagert. Bei Bedarf wurde die Lösung in eine auf 2 °C gekühlte Vorratsflasche sterilfiltriert.

12.6. PRÜFBEREICHT ZUR UNTERSUCHUNG VON L-PHENYLALANIN

Chemisches Laboratorium Dr. Weßling GmbH
Labor Bochum



Am Umweltpark 1
44793 Bochum
HRB 2720 AG Steinfurt
Telefon 0234/6897-0
Telefax 0234/6897-202

Chemisches Laboratorium Dr. Weßling GmbH · Am Umweltpark 1 · 44793 Bochum

Prüfbericht Nr.:0B2563/slt

Datum : 20.07.00

Probebezeichnung : 0B2563-01 L-Phenylalanin

GC-MS Übersichtsanalyse

1. Methodisches

Die auf dem Ausdruck des Chromatogramms angegebene Menge der Probe wurde mit 10 ml Pentan und Natriumsulfat wasserfrei zur Entfernung von Restwasser versetzt und im Ultraschallbad für 30 Minuten extrahiert. Ein Aliquot des so erhaltenen Extrakt wurde anschließend gaschromatographisch unter folgenden Meßbedingungen analysiert :

Kapillarsäule Hewlett-Packard ULTRA 2, Länge 25 m, ID 0,20 mm, FD 0,33 µm
Trärgas : Helium 5.0, 80 kPa Kopfdruck
automatische Injektion, 2 µl splitless
Temperaturprogramm : 40°C (2 min), 10°C/min bis 325°C (9,5 min)
Massenselektiver Detektor HP 5989A Engine
Massenbereich : 35 - 500 amu

Die Identifizierung erfolgte anhand der Retentionszeiten und durch computerunterstützten Vergleich der aufgenommenen Massenspektren mit Bibliotheksspektren. Folgende Bibliotheken stehen für den Vergleich zur Verfügung :

WILEY.I, Spektrensammlung org. Verbindungen (ca. 130000 Eintragungen)
NBS54K.I, Spektrensammlung org. Verbindungen (ca. 54000 Eintragungen)
hpest.I, Spektrensammlung von Pestiziden und Metaboliten (ca. 350 Eintragungen)

Erfaßt werden alle von Pentan extrahierbaren, mittel bis schwerflüchtigen Verbindungen, die sich unzersetzt verdampfen lassen. Im folgenden sind die wichtigsten Verbindungsklassen aufgeführt:

leichtflüchtige Aromaten (BTX)
polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)
polychlorierte Biphenyle (PCB)
Phthalate
aliphatische Kohlenwasserstoffe mit Kohlenstoffkettenlängen von 7 bis etwa 35 C-Atomen
mittelflüchtige chlorierte Kohlenwasserstoffe (Trichlorethen, Tetrachlorethen)
chlorierte Aromaten (Chlorbenzole, Chlortoluole)

Die Erfassungsgrenze ist substanzabhängig. Sie liegt für die meisten bekannten Umweltschadstoffe bei etwa 0,1 bis 1 mg/kg je Einzelkomponente.

Chemisches Laboratorium Dr. Weßling GmbH
Labor Bochum



Am Umweltpark 1
44793 Bochum
HRB 2720 AG Steinfurt
Telefon 02 34/6897-0
Telefax 02 34/6897-2 02

Chemisches Laboratorium Dr. Weßling GmbH - Am Umweltpark 1 - 44793 Bochum

Prüfbericht Nr.:0B2563/slt

Datum : 20.07.00

Probebezeichnung : 0B2563-01 L-Phenylalanin

2. Ergebnisse

Die im Chromatogramm zu sehenden Signale werden durch 2,3-Butandiol, polare Aromaten stickstoffhaltige Verbindungen und Dioctylphthalat (DEHP,DOP) verursacht. In der folgenden Tabelle sind die identifizierten Verbindungen und ihre Konzentrationen aufgeführt.

Verbindungen:	0B2563-01 in mg/kg
2,3-Butandiol	2 – 20
Benzaldehyd	0,1 – 1
Phenylethanol	0,1 – 1
Phenylacetaldehyd	0,1 – 1
Dimethylpyrazin	0,1 – 1
Trimethylpyrazin	0,5 – 5
Tetramethylpyrazin	1 – 10
Trimethylpropylpyrazin	0,1 – 1
2-Benzyl-3,5,6-trimethylpyrazin	0,1 – 1
weitere stickstoffhaltige Verbindung	0,1 – 1
Dioctylphthalat (DEHP,DOP)	0,5 - 5

Der Probe ist ein Interner Standard (ISTD) zur Qualitätsabsicherung zugesetzt worden.

R. Jordan
Roland Jordan

Chemisches Laboratorium Dr. Weßling GmbH
Labor Bochum



Am Umweltpark 1
44793 Bochum
HRB 2720 AG Steinfurt
Telefon 0234/6897-0
Telefax 0234/6897-202

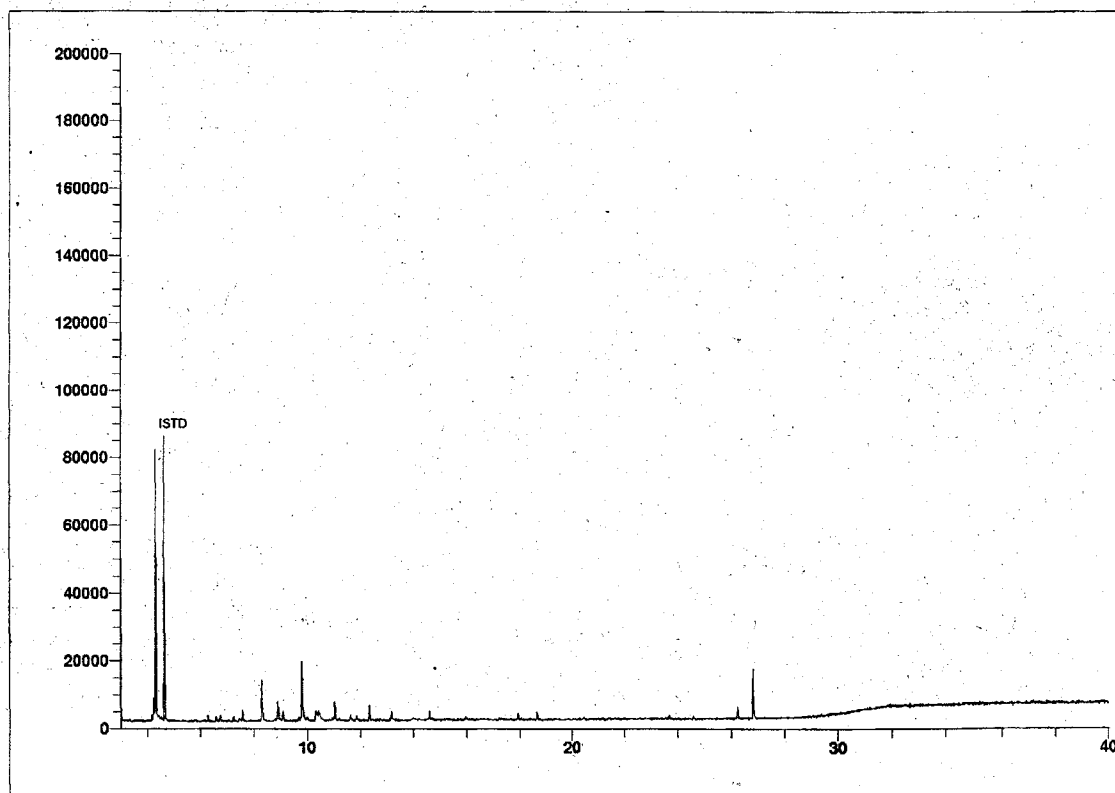
Chemisches Laboratorium Dr. Weßling GmbH - Am Umweltpark 1 - 44793 Bochum

Data file: /chem/hpl/datascan/0B2563-01.d
File type: GC / MS DATA FILE

Name Info:
Misc Info:
Operator : wel

Date : Mon Jul 17 00 04:04:26 AM
Instrument: HP5989
Inlet : GC

Sequence index : 1
Als bottle num : 13
Replicate num : 1



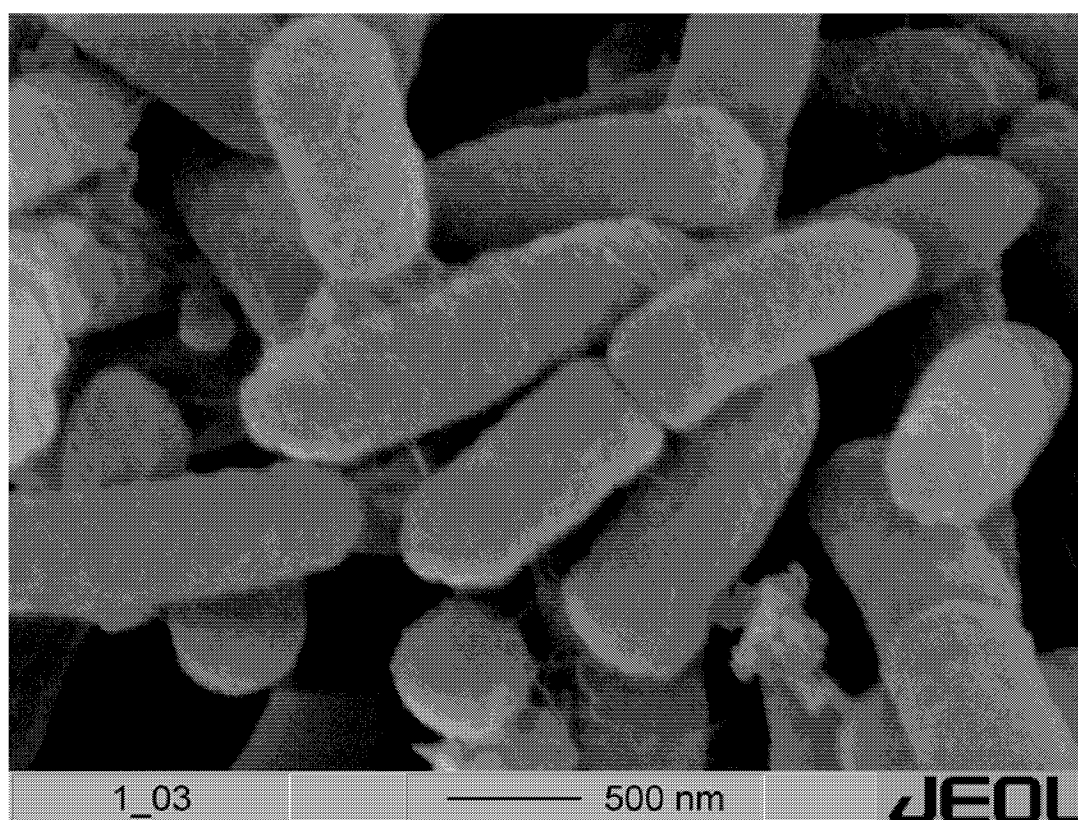
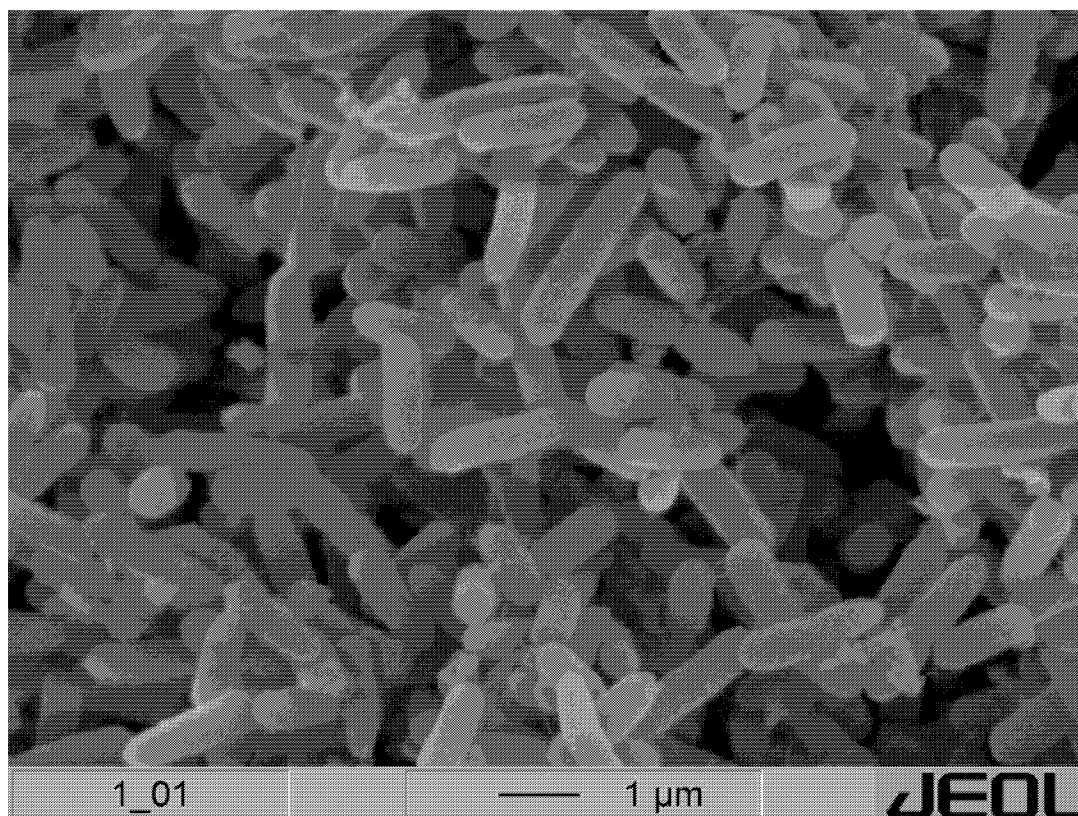
Labornummer: 0B2563-01
Bezeichnung: L-Phenylalanin

Extraktion: 2.22g + 10ml Pentan

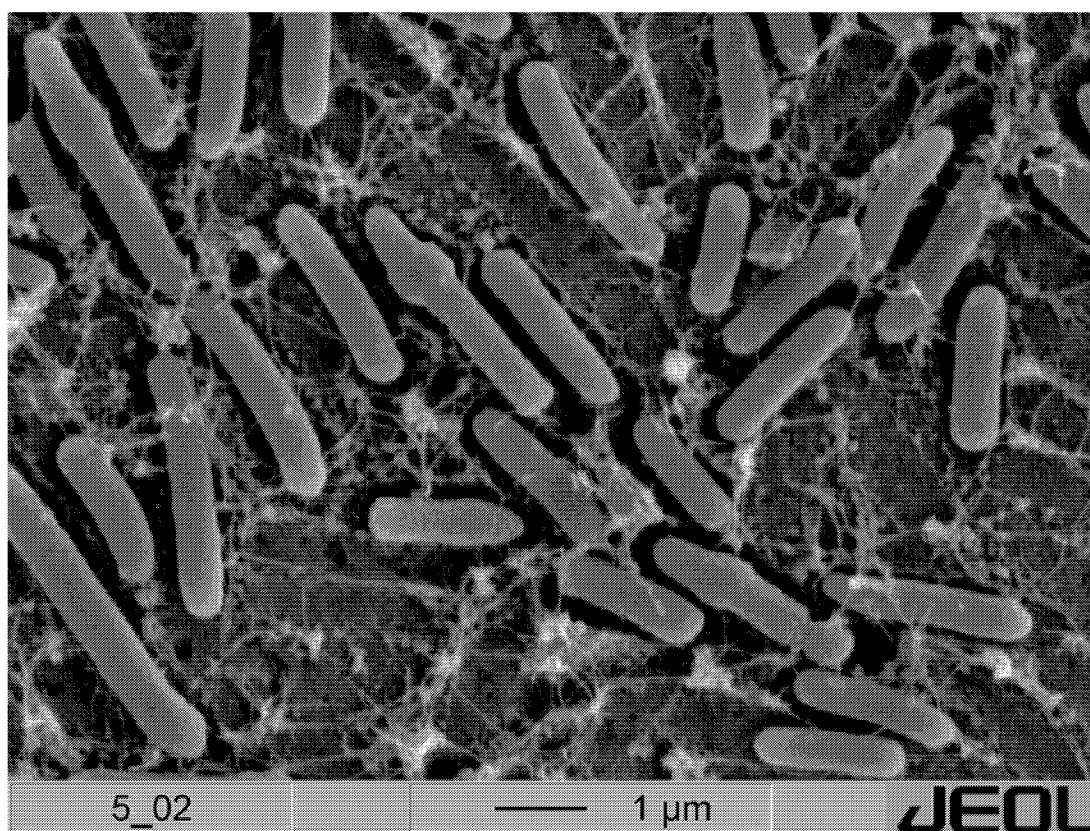
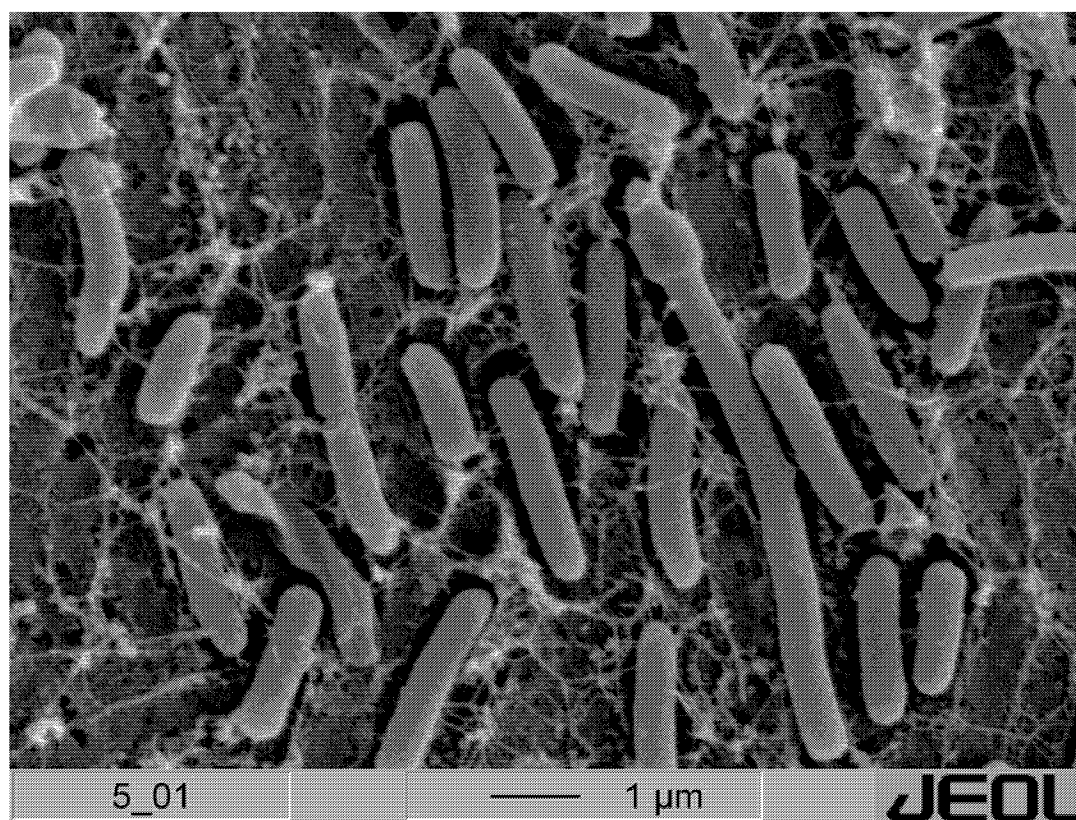
12.8. REM-AUFNAHMEN

Durchflussrate $D = 0,2$:

5,0 g/l L-Phe:

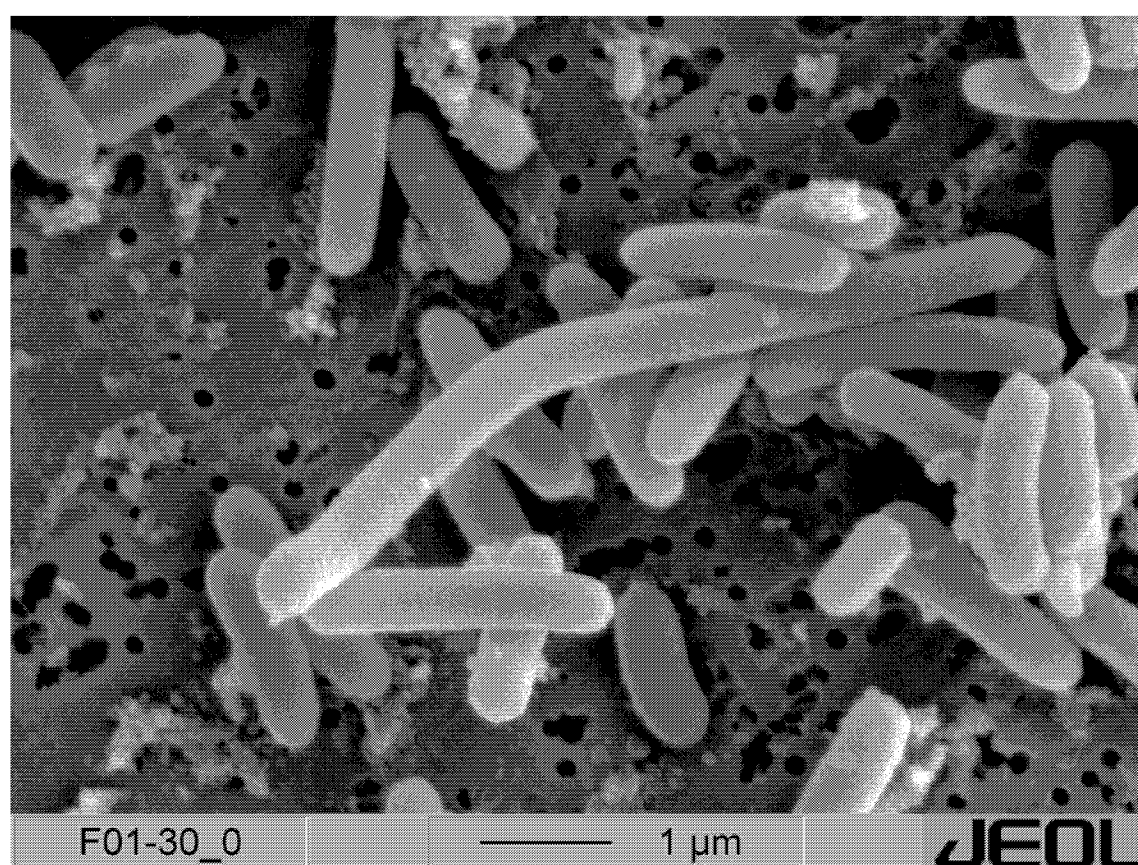
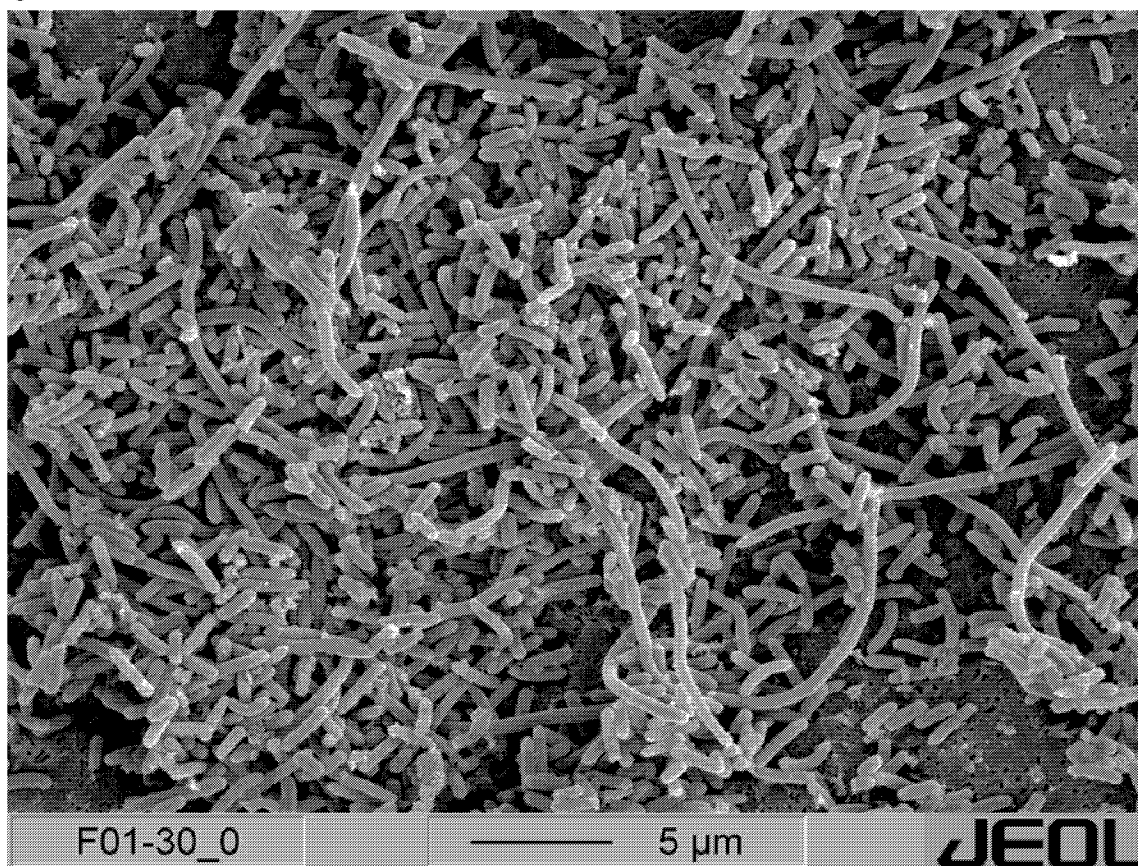


30 g/l L-Phe:



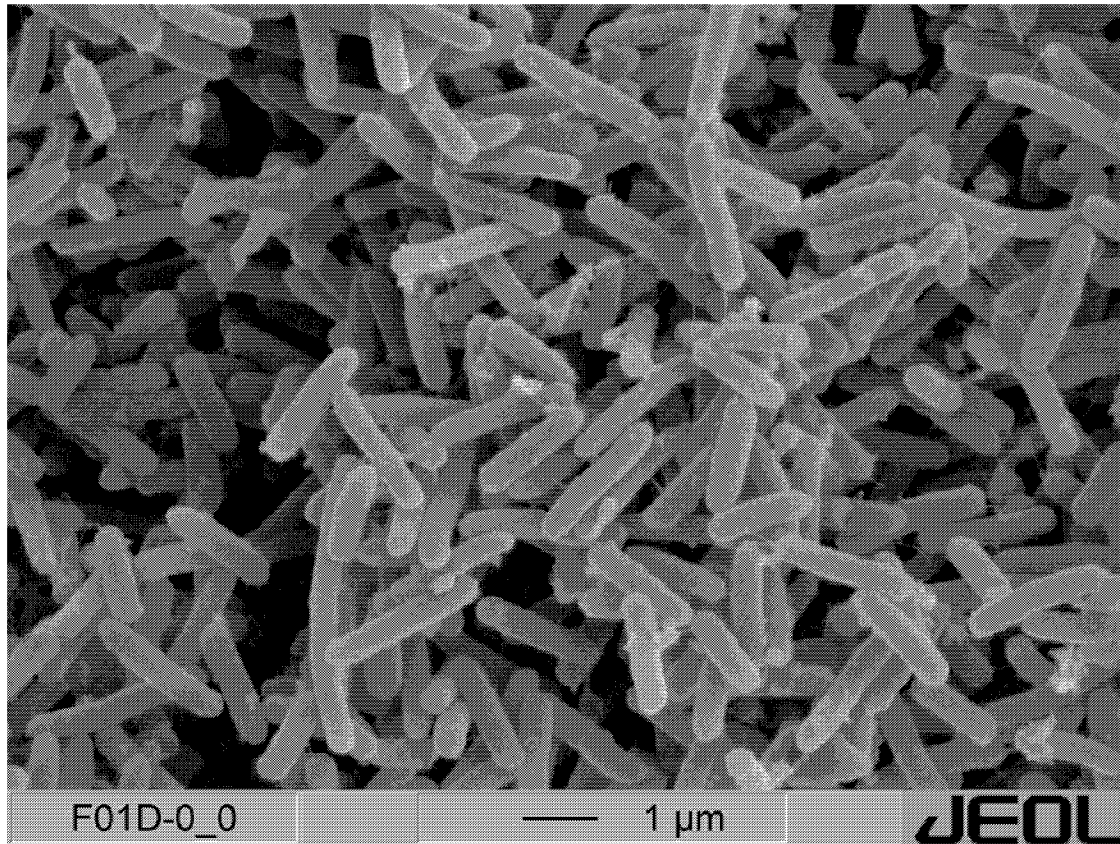
Durchflussrate $D = 0,1$:

30 g/l L-Phe:

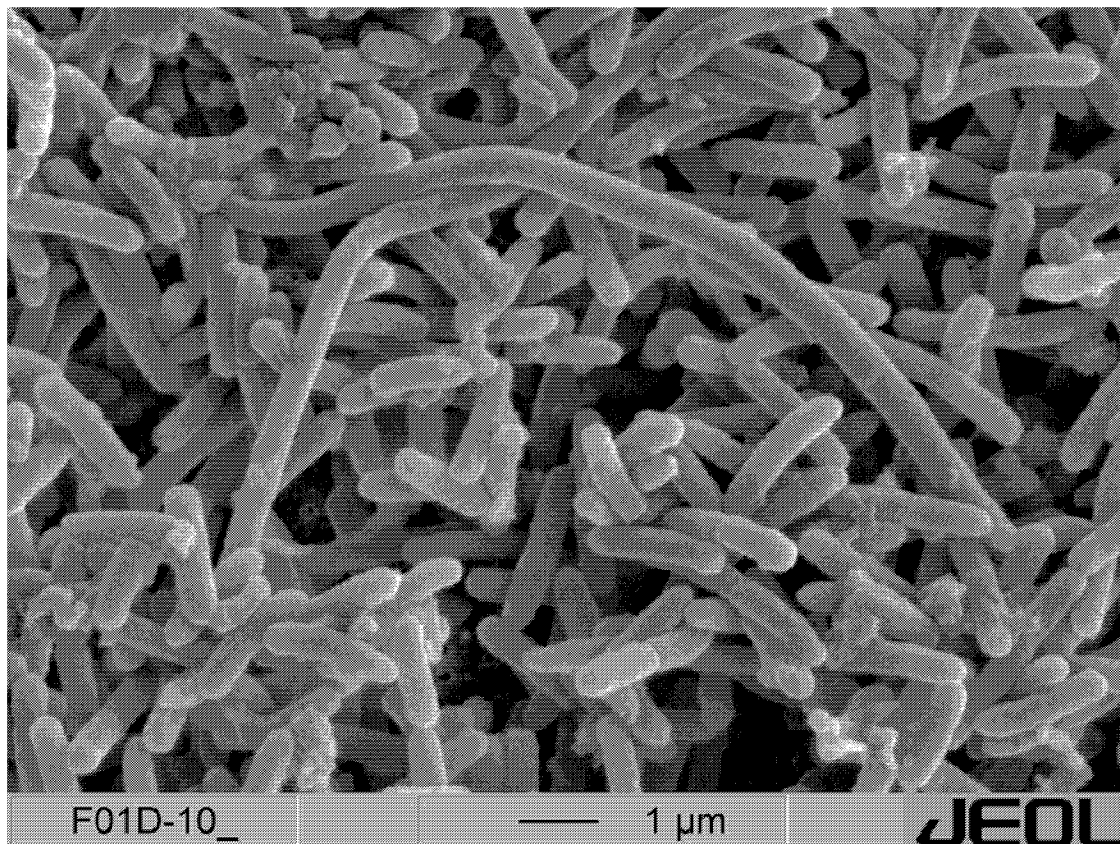


Durchflussrate $D = 0,1 + \text{DEHPA/Kerosin}$:

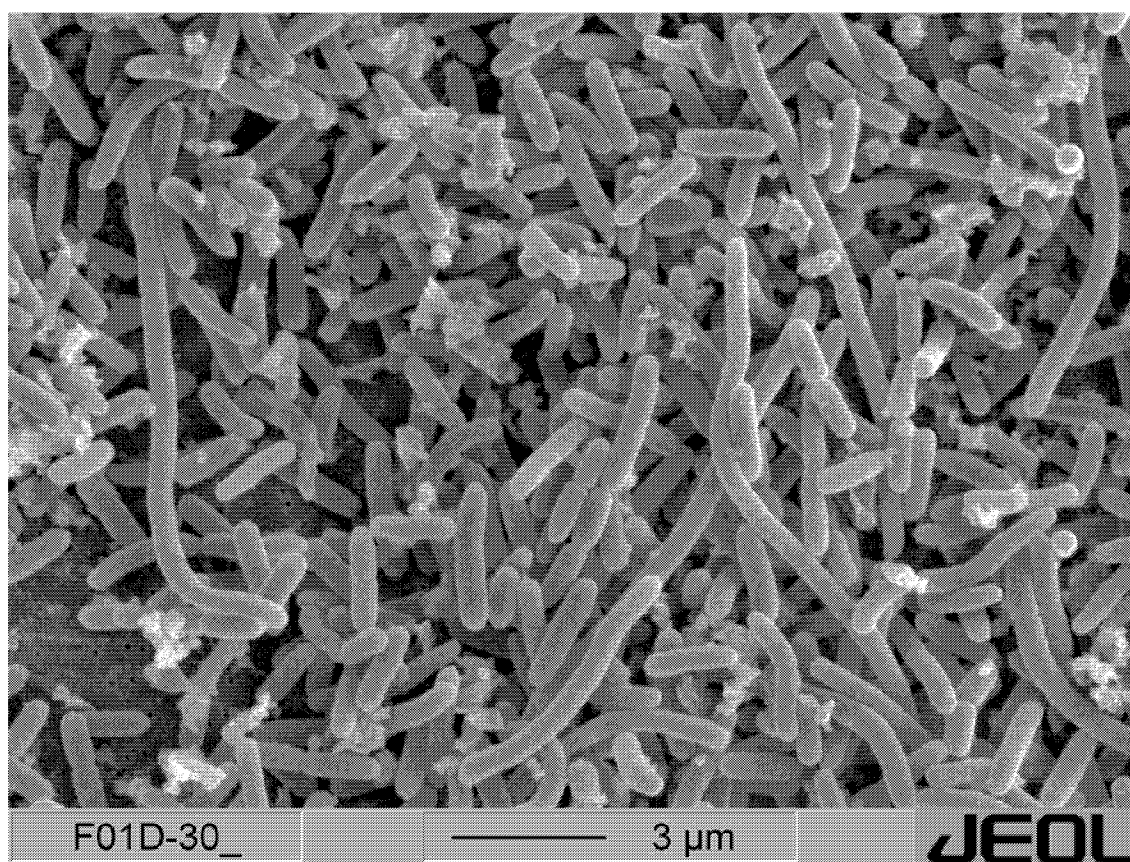
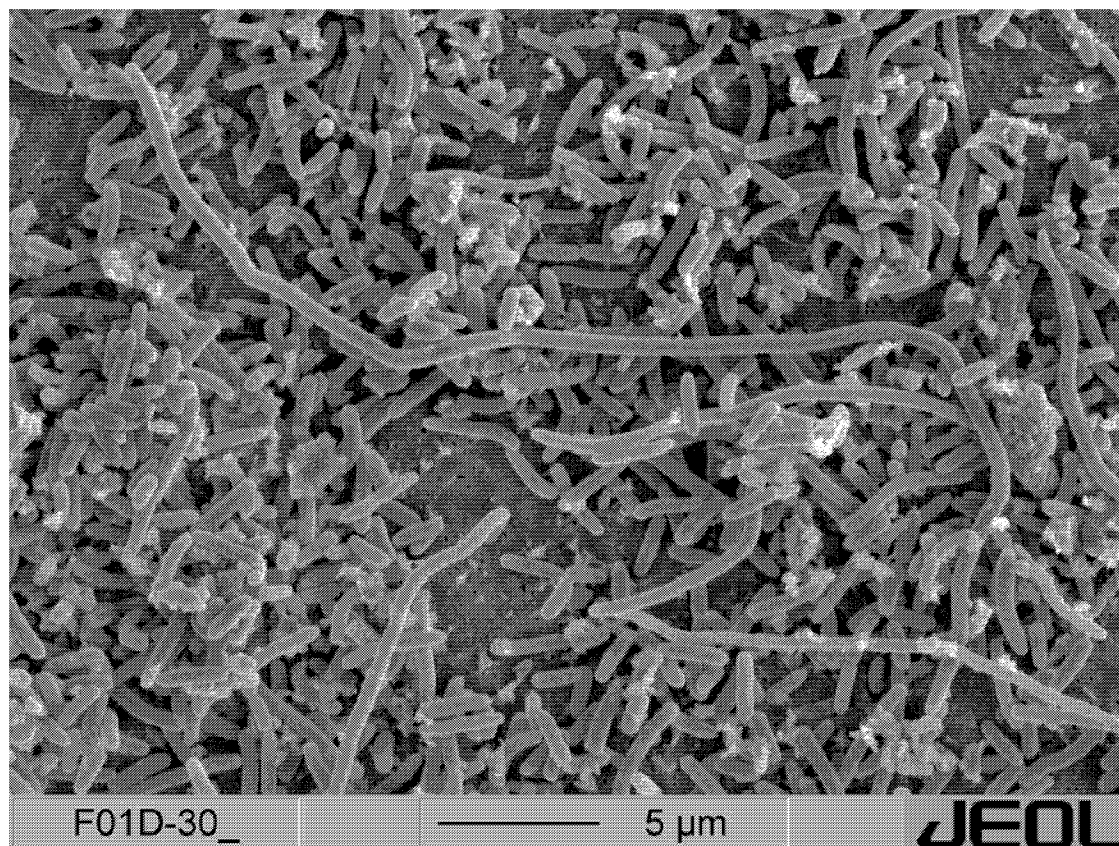
0 g/l L-Phe:



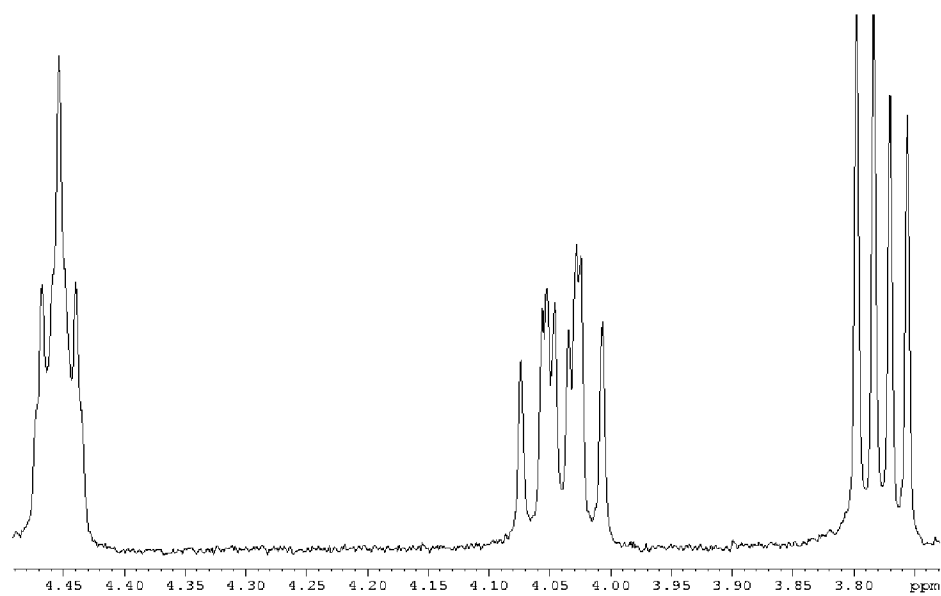
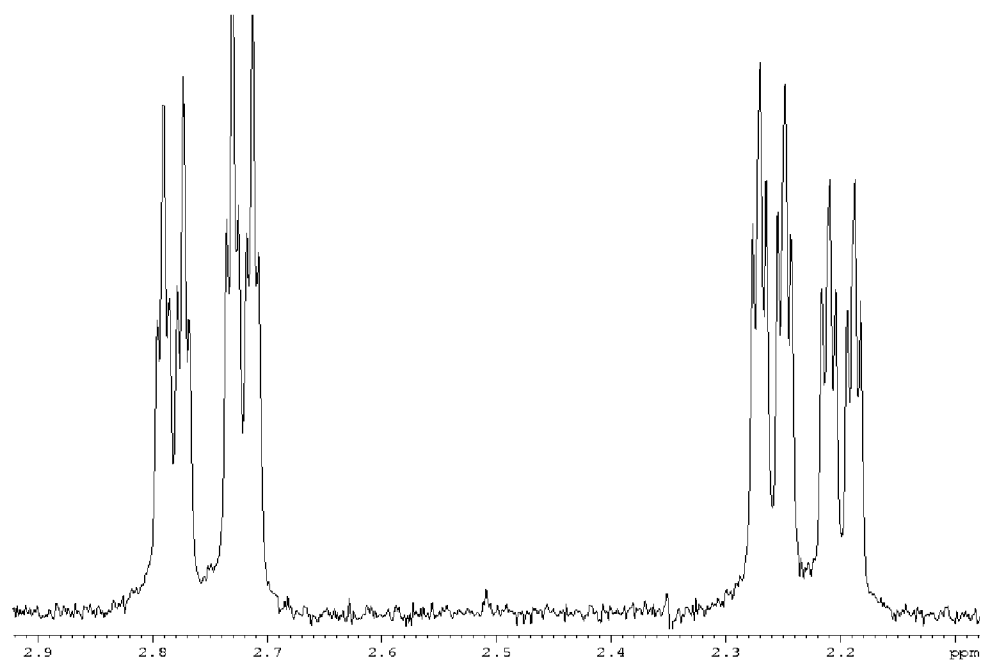
10 g/l L-Phe:



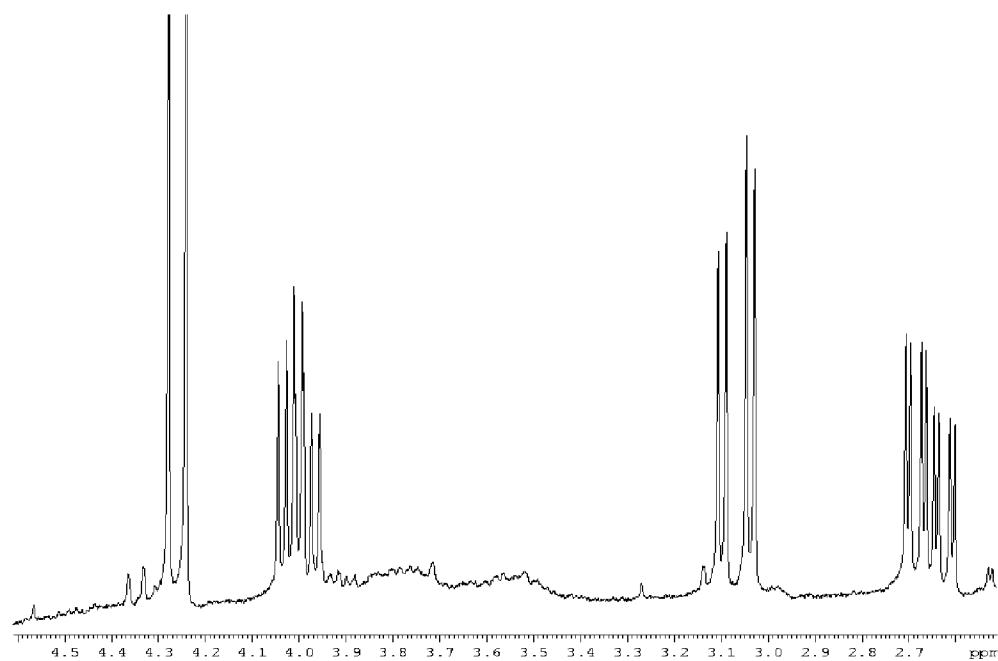
30 g/l L-Phe:



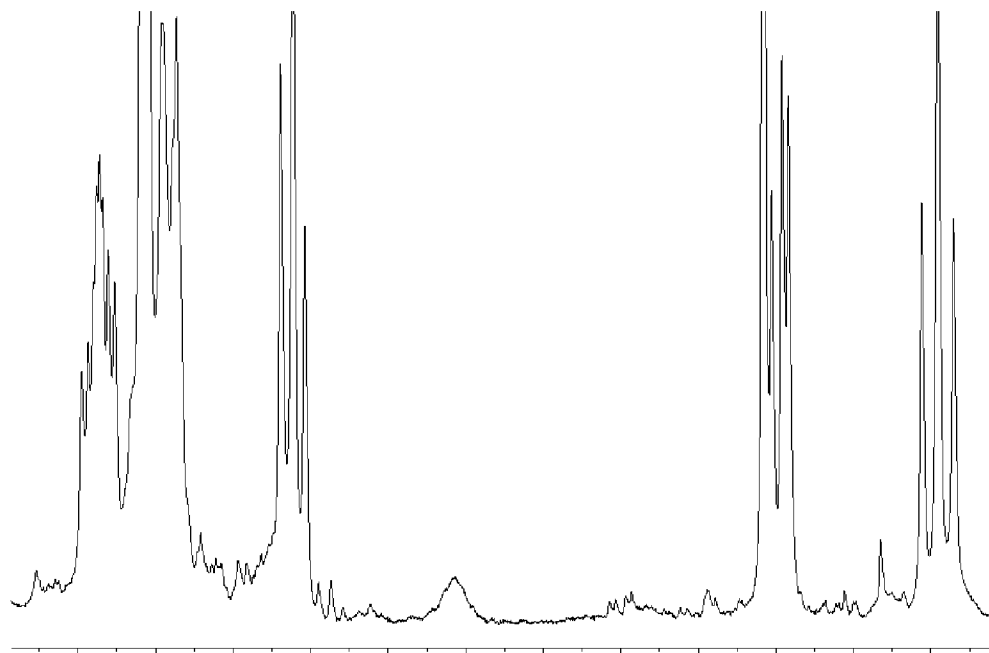
12.9. ^1H -NMR-SPEKTREN



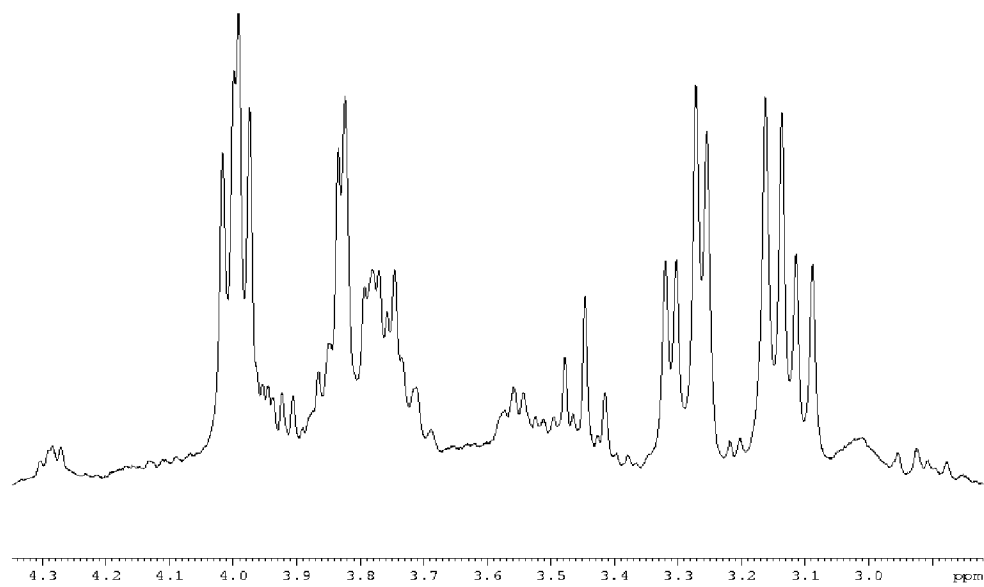
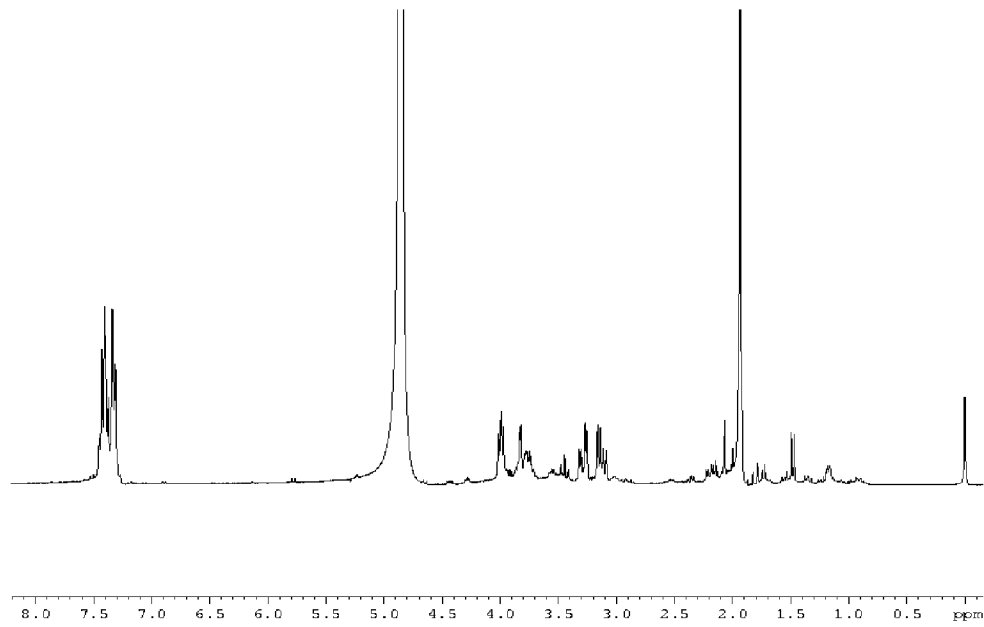
^1H -NMR-Spektrum der Shikimatstandardlösung.



^1H -NMR-Spektrum einer Fermentationsprobe eines *E. coli* DHS-Produzenten.



^1H -NMR-Spektrum einer Fermentationsprobe eines *E. coli* DAH-Produzenten.



^1H -NMR-Spektrum der L-Phe-Fermentationsprobe von *E. coli* 4pF69.

Danksagung:

Herrn Prof. Dr. Rainer Buchholz möchte ich für die Übernahme des Hauptreferats und für die Betreuung der Arbeit - aus der Ferne - danken.

Herrn Prof. Dr. Christian Wandrey danke ich für die Übernahme des Koreferats und für die laufende Betreuung der Arbeit am Forschungszentrum Jülich. Die Gewährleistung einer hervorragenden Ausstattung und die Schaffung eines interdisziplinären Umfelds, hat zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen. Seine stets offene Diskussionsbereitschaft, sein großes Engagement und sein Einsatz für diese Arbeit, haben die letzten drei Jahre zu etwas Besonderem gemacht.

Herrn Prof. Dr. H. Görisch danke ich für den Vorsitz im Promotionsausschuss.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr.-Ing. Ralf Takors. Als Leiter der Fermentationsgruppe war er in guten wie in schlechten Zeiten stets für eine Diskussion zu haben. Insbesondere möchte ich ihm für seine Unterstützung und die kritische Durchsicht dieser Arbeit danken.

Meinen Diplomanden Herrn Dipl.-Ing. Euloge Ganpo, Herrn Dipl.-Chem. Arnt Engfeld, Herrn Dipl.-Ing. Robert Bujnicki und meiner Praktikantin Frau Sandra Kielmann danke ich für ihr Engagement und die gute Zusammenarbeit. Durch sie wurde der Fermentationsalltag mit viel Spaß und Abwechslung bereichert. Sie alle haben einen wesentlichen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet.

Herrn Dr.-Ing. Dietrich Maaß danke ich für die sehr erfolgreiche Zusammenarbeit in den Tagen und Nächten während der Entstehung des Hybridprozesses. In diesen Versuchen wurden nicht nur zwei Prozesse miteinander verknüpft.

Herrn Dipl.-Chem Marco Schmitz und Frau Dipl.-Ing. Silvia Zaja möchte ich sehr für die Möglichkeit danken, einen tieferen Einblick in die Fermentationsproben erhalten zu haben. Die von ihnen etablierte NMR-Analytik lieferte einen wesentlichen Beitrag zur erfolgreichen, zielgerichteten Entwicklung neuer Produktionsstämme.

Mein ganz besonderer Dank gilt allen „Fermlingen“ der Fermentationsgruppe. Die gegenseitige Unterstützung und die Diskussionen unter Leidensgenossen waren für das Gelingen der Arbeit unverzichtbar. Neben schon genannten Kollegen möchte ich insbesondere Dipl.-Ing. Evelyn Wolfram, Dipl.-Math. Jochen Hurlbaus, Dr.-Ing. Karsten Schmidt, Dipl.-Biotechnol. Nicole Rüffer, Dipl.-Chem. Arne Buchholz, Dipl.-Ing. Andrea Kreutzer und Dipl.-Ing. Matthias Pump danken.

Der gesamten Fermentationsgruppe am IBT 2, den mechanischen und elektronischen Werkstätten, möchte ich für die ausgezeichnete Unterstützung und Arbeitsatmosphäre danken. Mein besonderer Dank gilt: Frau Heidi Haase-Reiff für die HPLC-Analyse unzähliger Proben, Herrn Dipl.-Ing. Hans-Jürgen Brandt als „technischen Sachverständigen“ in Sachen Fermentationstechnik, Herrn Horst Kiehl, Herrn Dipl.-Ing. Andreas Frantz und Herrn Jürgen Paulzen, für die Unterstützung in allen Fragen der Prozesssteuerung und -datenerfassung, sowie den immerwährenden Computerproblemen. Herrn Hubert Ruhrig und Herrn Hein Milz meinen Dank, ohne deren Engagement hätte der Hybridprozess nicht fertig gestellt werden können.

Danken möchte ich der DSM-Biotech und der Stammentwicklung im IBT 1 für die hervorragende Zusammenarbeit innerhalb des „Fame-Projekts“. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Marcel Wubbolts, Herrn Dr. Georg Sprenger, Herrn Dr. Johannes Bongaerts, Herrn Dr. Marko Krämer, Herrn Dr. Ralf Jossek und Frau Ulrike Degner. Erst durch die interdisziplinäre Zusammensetzung des Teams wurde die Arbeit so interessant und die Entwicklung neuer Produktionsstämme in Form eines „closed-cloning-loop“ möglich.

Abschließend möchte ich meinen Eltern danken. Ihre Erfahrungen beim Einschätzen der aktuellen „Lage“, ihre Zuversicht, dass auf schlechte Zeiten gute Zeiten folgen werden und ihre immerwährende Unterstützung bis zum Ende meiner Ausbildung, waren für mich eine große Hilfe.

