

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

**Reaktionstechnische Analyse  
rekombinanter Mikroorganismen zur  
Herstellung von Hydroxyisobuttersäure**

**Torben Höfel**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktor-Ingenieurs  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Hartmut Spliethoff  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz  
2. Jun.-Prof. Dr.-Ing. Ezequiel Franco-Lara,  
Technische Universität Braunschweig

Die Dissertation wurde am 06.07.2011 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 21.09.2011  
angenommen.



# Vorwort

Die vorliegende Dissertation entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz.

Diese Arbeit haben viele Personen auf unterschiedliche Art und Weise unterstützt und an dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken!

Bei Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz für seine hervorragende Unterstützung. Mit der vertrauensvollen Einräumung von Freiheiten, der Unterstützung bei der Gestaltung des Projektrahmens sowie vielen nützlichen Vorschlägen und Anregungen während unserer freundlichen Gespräche leistete er einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit.

Beim Coreferenten Prof. Dr.-Ing. Ezequiel Franco-Lara (Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Technische Universität Braunschweig) und bei dem Prüfungsvorsitzenden Prof. Dr.-Ing. Hartmut Spliethoff (Lehrstuhl für Energiesysteme, Technische Universität München) für die Übernahme der jeweiligen Aufgabe.

Bei Dr. Achim Marx, Anja Thiessenhusen, Eva Wittmann, Dr. Frank Erhardt, Gerlind Grimberg, Jasmin Gielen, Juraj Obuch, Dr. Li Li Li, Liv Reinecke, Dr. Nicolas Rudinger, Dr. Steffen Schaffer sowie Dr. Thomas Haas (Evonik Degussa GmbH, Creavis Technologies & Innovation, Marl) für die konstruktive und offene Zusammenarbeit sowie die vielen fachlichen und organisatorischen Unterstützungen.

Bei Dr. Martin Haslbeck (Lehrstuhl Biotechnologie, Technische Universität München) für die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung von immunochemischen Nachweismethoden.

Bei allen (ehemaligen) Kollegen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik – Dr. Andrea Vester, Benjamin Smejkal, Bernd Anselment, Boqiao Sun, Christoph Bendig, Dr. Clara Delhomme, Dr. Danielle Dennewald, Dr. Dariusch Hekmat, Dirk Hebel, Dr. Dominik Maslak, Eva-Maria Gross, Dr. Gabi Gebhardt, Georg Faust, Georg Kojro, Dr. Hannes Link, Harald Krispin, Irma Einsle, Dr. Kathrin Hölsch, Markus Amann, Martin Demler, Dr. Michael Braun, Dr. Michael Finke, Michael Hofinger, Michael Schmidt, Michael Weiner, Nils Janzen, Norbert Werth, Peter Riedlberger, Dr. Ralf Hortsch, Dr. Stefan Bräutigam, Stefanie Brüning, Dr. Tanja Kurzrock und Yilei Fu – für die wunderbare Zusammenarbeit.

Bei Harald Krispin für die hervorragende und kollegiale Zusammenarbeit im Rahmen des übergeordneten Forschungsprojektes.

Bei Dr. Danielle Dennewald und Georg Faust für das gründliche und kritische Korrekturlesen meiner Dissertation.

Bei Christina Pfaffinger, Georg Faust, Markus Jeschek und Yilei Fu für die ausgezeichnete Unterstützung im Rahmen von studentischen Arbeiten.

Hans-Hermann und Jutta, Henning sowie Christina danke ich von ganzem Herzen für ihren Rückhalt und ihre vollste Unterstützung.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>THEORETISCHE GRUNDLAGEN .....</b>	<b>5</b>
3.1	Mikroorganismen zur Produktion von Bulk-Chemikalien aus Zucker .....	5
3.1.1	<i>Escherichia coli</i> .....	6
3.1.2	<i>Cupriavidus necator</i> .....	9
3.2	Bernsteinsäure als Bioprodukt .....	12
3.2.1	Ansätze zur biotechnologischen Bernsteinsäureproduktion .....	14
3.2.2	Biotechnologische Produktion von Bernsteinsäure mit gentechnisch veränderten <i>Escherichia coli</i> .....	16
3.3	Hydroxyisobuttersäuren als Bioprodukt .....	22
3.3.1	Biotechnologische Produktion von 2-Hydroxyisobuttersäure mit rekombinanten <i>Cupriavidus necator</i> H16 .....	24
3.3.2	Biotechnologische Produktion von 3-Hydroxyisobuttersäure mit rekombinanten <i>Escherichia coli</i> .....	26
3.3.3	Weitere Ansätze .....	28
3.4	Grundlagen der Bioprozessführung .....	29
3.4.1	Mikrobielles Wachstum .....	29
3.4.2	Bilanzierung von idealen Rührkesselreaktoren .....	32
3.4.3	Reale Rührkesselreaktoren im Labor- und Industriemaßstab .....	35
3.4.4	Parallele Kultivierungstechniken .....	36
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>41</b>
4.1	Mikroorganismen, Stammkulturherstellung, Vektoren und gentechnische Arbeiten .....	41
4.1.1	<i>Cupriavidus necator</i> .....	41
4.1.2	<i>Escherichia coli</i> .....	41
4.1.3	Stammhaltung .....	44
4.1.4	Chemisch kompetente Zellen und Transformation .....	44
4.1.5	Nachweis der erfolgreichen Transformation durch PCR .....	45
4.2	Parallele Kultivierungen im Millilitermaßstab .....	46

4.2.1	Prozesskontrolle und -automatisierung .....	47
4.2.2	Parallele pH und pO <sub>2</sub> Messung sowie Regelung des pH .....	48
4.2.3	Kalibrierung der Sensoren.....	49
4.2.4	Inbetriebnahme .....	51
4.3	Kultivierung von <i>Cupriavidus necator</i> .....	52
4.3.1	Medien .....	52
4.3.2	Schüttelkolbenkulturen .....	52
4.3.3	Kultivierung in Milliliter Rührkesselreaktoren.....	52
4.3.4	Kultivierung im Litermaßstab.....	53
4.4	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	54
4.4.1	Medien .....	54
4.4.2	Schüttelkolbenkulturen .....	54
4.4.3	Kultivierung in Milliliter Rührkesselreaktoren.....	55
4.4.4	Kultivierung in anaeroben Flaschen .....	56
4.4.5	Kultivierung im Litermaßstab.....	56
4.5	Analysemethoden .....	58
4.5.1	Bestimmung der Zellkonzentration.....	58
4.5.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....	59
4.5.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ...	60
4.5.4	Enzymatische Aktivitätsbestimmungen .....	60
4.5.5	Abschätzung von Ausbeute sowie Produktivität.....	63
<b>5</b>	<b>THEORETISCHE BETRACHTUNGEN ZUR PRODUKTAUSBEUTE BEI <i>ESCHERICHIA COLI</i>.....</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>PRODUKTION VON 2-HYDROXYISOBUTTERSÄURE MIT GENTECHNISCH VERÄNDERTEN <i>CUPRIAVIDUS NECATOR</i> H16.....</b>	<b>71</b>
6.1	Kultivierungen in verschiedenen Reaktoren.....	71
6.2	Reaktionstechnische Untersuchungen zur Identifizierung von wichtigen Prozessvariablen.....	73
6.3	Übertragung der Erkenntnisse in den Litermaßstab.....	81
<b>7</b>	<b>PRODUKTION VON BERNSTEINSÄURE MIT GENTECHNISCH VERÄNDERTEN <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....</b>	<b>87</b>
7.1	Charakterisierung und Optimierung der Bernsteinsäureproduktion aus Glucose.....	87

7.1.1	Parallele Kultivierungen in verschiedenen Reaktoren .....	87
7.1.2	Bernsteinsäureproduktion mit unterschiedlich modifizierten <i>Escherichia coli</i> .....	89
7.1.3	Identifizierung von wichtigen Prozessvariablen.....	92
7.1.4	Reaktionstechnische Untersuchungen zur Bernsteinsäureproduktion im Satz- und Zulaufverfahren.....	104
7.2	Bernsteinsäureproduktion mit Saccharose verwertenden <i>Escherichia coli</i> .....	123
7.2.1	Wachstumsverhalten mit Saccharose als Substrat .....	123
7.2.2	Erhöhte Aktivität anaplerotischer Reaktionen durch Überexpression..	126
7.2.3	Bernsteinsäureproduktion mit Saccharose verwertenden <i>Escherichia coli</i> .....	130
7.2.4	Reaktionstechnische Untersuchungen im Zulaufverfahren .....	139
<b>8</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>149</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>155</b>
<b>10</b>	<b>SYMBOL- UND ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>173</b>
<b>11</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>179</b>
11.1	<i>Escherichia coli</i> zur Produktion von Bernsteinsäure .....	179
11.2	Medien, Puffer und Lösungen .....	182
11.2.1	Medien .....	182
11.2.2	Puffer und Lösungen.....	186
11.2.3	Enzyme, Standards und Kits .....	187
11.3	Spezielle Laborgeräte .....	188





# 1 Einleitung

Steigende Preise für Energie, fossile Rohstoffe sowie Entsorgung wecken zunehmend das Interesse konventionelle chemische Prozesse durch nachhaltige Verfahren auf Basis nachwachsender Rohstoffe zu ersetzen (Vogel 2008). Eine Alternative bietet beispielsweise die Herstellung chemischer Produkte mit geeigneten Mikroorganismen. Biotechnologische Herangehensweisen für die Produktion von Feinchemikalien, Polymerbausteinen aber auch Plattformchemikalien könnten in Zukunft sowohl aus ökonomischer als auch ökologischer Sicht bessere Konzepte anbieten (Willke und Vorlop 2004). Weniger Produktionsschritte sind möglich, der Verbrauch von endlichen Ressourcen könnte reduziert, Nebenproduktbildung verringert und innovative Produkte mit ganz neuen Eigenschaften erzeugt werden.

In einigen Industriezweigen, wie beispielsweise bei der Herstellung von Enzymen, pharmazeutischen Wirkstoffen sowie anderen Produkten mit hoher Wertschöpfung werden biotechnologische Produktionsverfahren bereits seit längerem eingesetzt. Insbesondere bei der Produktion von Proteinen hat sich die Nutzung dieser trotz hoher Entwicklungs- und Betriebskosten durchgesetzt, da die Isolierung aus natürlichen Quellen in der Regel noch kostspieliger ist. Bei der Synthese von komplexen Molekülen, wie beispielsweise Vitaminen oder Hormonen, wurden ebenfalls bereits viele konventionelle chemische Verfahren komplett oder zumindest teilweise durch die Anwendung von Biotransformationen ersetzt.

Die Erzeugung von organischen Grund- und Feinchemikalien mit vergleichbar geringer Wertschöpfung mit biotechnologischen Verfahren, die häufig als „industrielle“ oder „weiße“ Biotechnologie bezeichnet wird, steht in gewisser Weise in Konkurrenz zu konventionellen chemischen Verfahren. Auch in diesem Zweig bereits etablierte biotechnologische Verfahren wie zum Beispiel für die Produktion von L-Lysin (Pfefferle *et al.* 2003), Zitronensäure (Soccol *et al.* 2006) oder L-Ascorbinsäure (Hancock und Viola 2002) zeigen, dass die industrielle Biotechnologie zunehmend an Bedeutung gewinnt. Steigende Kosten für die Beschaffung von fossilen Rohstoffen durch abnehmende Fördermengen (Kircher und Haas 2011) sowie ein wachsender Wettbewerb mit anderen verbrauchenden Industriezweigen werden diese Entwicklung ebenfalls fördern.

Gewisse Chemikalien mit einem bisher vergleichbar geringen Marktvolumen könnten durch eine kostengünstigere biotechnologische Erzeugung in Zukunft sogar als neue Bausteine für ein gesamtes Produktionsnetzwerk der chemischen Industrie in Erwägung gezogen werden (Sauer *et al.* 2008), wodurch die konventionelle Wertschöpfungskette der chemischen Industrie durch nachhaltigere Produktionsverfahren ersetzt oder ergänzt würde, wie in Abbildung 1-1 skizziert ist.

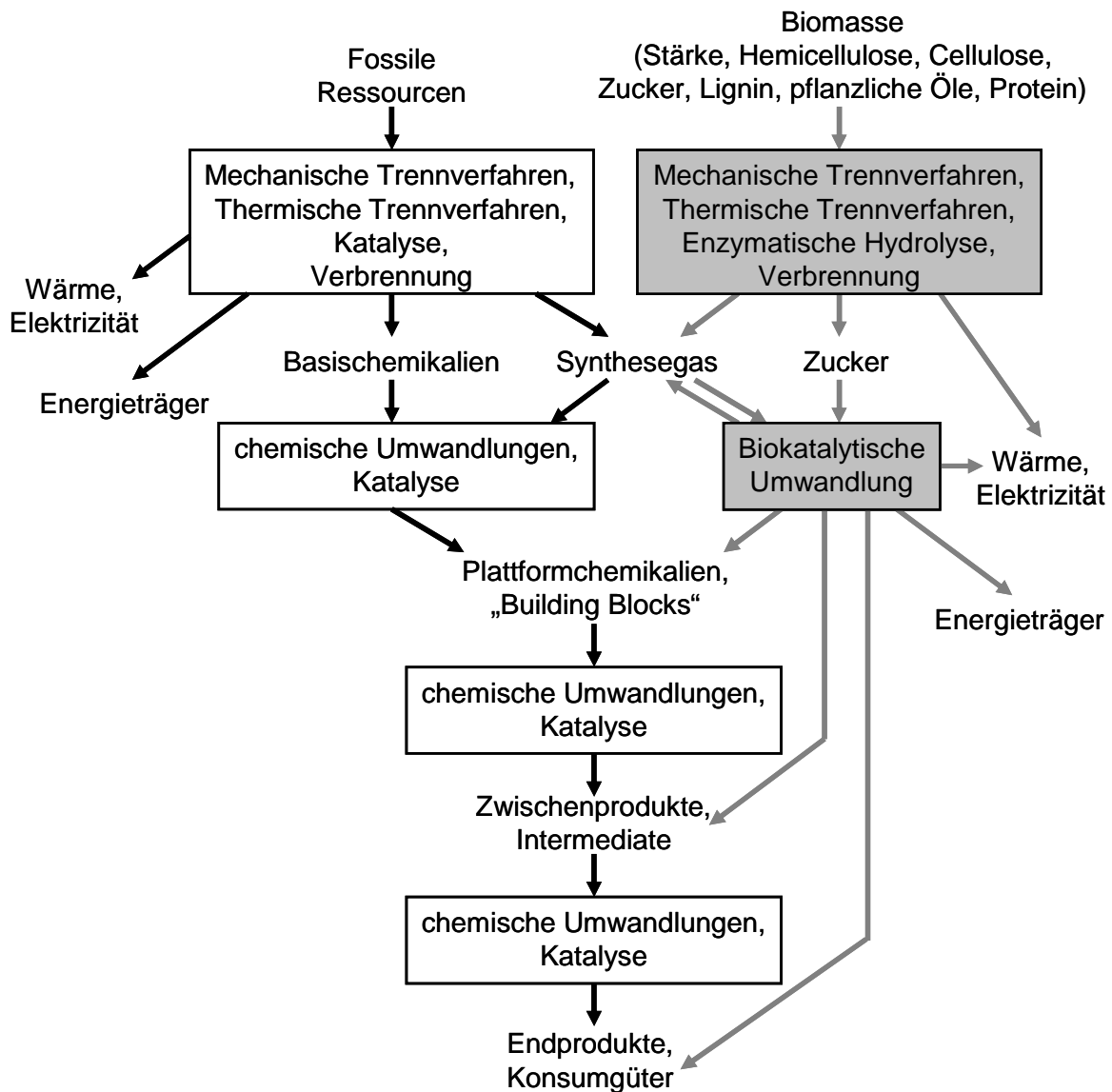


Abbildung 1-1: Abstrahiert dargestellte Wertschöpfungskette der konventionellen chemischen Industrie und eine biobasierte Industrie als Alternative beziehungsweise Integration (grau dargestellt).

Das wahrscheinlich bekannteste Beispiel für eine Plattformchemikalie aus nachwachsenden Rohstoffen ist Bernsteinsäure (McKinlay *et al.* 2007), dessen biotechnologische Produktionsverfahren kurz vor der Kommerzialisierung stehen (Challener 2009). Mehrere andere Chemikalien werden jedoch außerdem in Betracht gezogen (Werpy und Petersen 2004). Ein weiteres Beispiel wäre die biotechnologische Produktion von Hydroxyisobuttersäuren zur weiteren Verarbeitung zu Methylmethacrylat und anderen Produktion (Rohwerder und Müller 2010). Dieser Ansatz steht ebenfalls bereits im Interessenfokus der chemischen Industrie (Kircher und Haas 2011).

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Im Gegensatz zu anderen organischen Chemikalien, die als aussichtsreiche Kandidaten für biotechnologisch herstellbare Plattformchemikalien eingestuft werden (Werpy und Petersen 2004), findet die biotechnologische Produktion von Hydroxyisobuttersäuren derzeit noch vergleichsweise wenig Beachtung in der Forschung. Dennoch gewinnen diese Verbindungen und deren biotechnologische Produktion aufgrund zahlreicher denkbarer Einsatzmöglichkeiten zur chemischen Weiterverarbeitung insbesondere zu dem bedeutenden Zwischenprodukt Methylmethacrylat zunehmend an Bedeutung.

Verglichen zu Stoffwechselprodukten wie Bernsteinsäure oder Aminosäuren stellen sowohl 2-Hydroxyisobuttersäure als auch 3-Hydroxyisobuttersäure keine typischen Metabolite von Mikroorganismen dar und folglich sind die denkbaren Methoden der biotechnologischen Herstellung dieser Stoffe begrenzt. Eine Möglichkeit zur Produktion von 2-Hydroxyisobuttersäure aus Zucker mit einem biokatalytischen Verfahren in ganzen Zellen wurde in einer unlängst publizierten Arbeit skizziert (Rohwerder und Müller 2010). Die Beschreibungen von weiteren möglichen Produktionsverfahren sind in diversen Patentanmeldungen hinterlegt (Marx *et al.* 2007; Müller und Rohwerder 2007; Burk *et al.* 2009; Reinecke *et al.* 2009). In den genannten Veröffentlichungen wird überwiegend die grundsätzliche Machbarkeit skizziert. Dabei wird auf die Wahl geeigneter Mikroorganismen sowie deren gentechnische Veränderungen fokussiert, um mit diesen stoffwechsoptimierten Mikroorganismen Hydroxyisobuttersäuren produzieren zu können.

Es ist jedoch völlig offen, ob und in welchem Ausmaß die Potentiale dieser Mikroorganismen tatsächlich in einem Kultivierungsverfahren technisch umgesetzt werden können. Zielsetzung dieser Arbeit ist daher die reaktionstechnische Untersuchung und Charakterisierung der Stoffwechseleinstellungen von entsprechend gentechnisch veränderten Mikroorganismen.

Die Herstellung von **2-Hydroxyisobuttersäure** mit gentechnisch veränderten *Cupriavidus necator* kann unter Nutzung des Stoffwechsels dieses Bakteriums zur Produktion von Polyhydroxybuttersäure (PHB) erfolgen, indem die PHB Synthese ausgeschaltet und der zellinterne Vorläufermetabolit von PHB unter Verwendung eines rekombinanten Enzyms zum Produkt 2-Hydroxyisobuttersäure umgesetzt wird (Reinecke *et al.* 2009; Rohwerder und Müller 2010).

Folgende Arbeitsschritte waren daher mit entsprechend modifizierten *Cupriavidus necator* Stämmen geplant:

- Vergleichende reaktionstechnische Analyse zur Produktion von 2-Hydroxyisobuttersäure in parallel betriebenen Rührkesselreaktoren unter technischen Bedingungen.
- Reaktionstechnische Charakterisierung des am besten geeigneten *Cupriavidus necator* Stammes zur 2-Hydroxyisobuttersäure Herstellung im Zulaufverfahren.

Die Produktion von **3-Hydroxyisobuttersäure** mit gentechnisch veränderten *Escherichia coli* (*E. coli*) kann auf Basis des im Citratzyklus gebildeten Vorläufermetabolites Succinat erfolgen. Vorzugsweise können hierzu Ausgangsstämme zum Einsatz kommen, die zur Produktion von Bernsteinsäure unter anaeroben Bedingungen optimiert sind. Durch die rekombinante Expressionen mehrerer Enzyme sowie weitere gentechnische Veränderungen kann Succinat in mehreren Schritten zu 3-Hydroxyisobuttersäure umgewandelt werden (Marx *et al.* 2007; Burk *et al.* 2009). Dieser Ansatz eignet sich besonders für die Entwicklung und Charakterisierung eines technischen Prozesses, da *E. coli* ein weit verbreiteter und ausführlich charakterisierter Plattformorganismus ist. Darüber hinaus ist die Aufnahme und Verwertung des verfügbaren und kostengünstigen Zuckers Saccharose in *E. coli* durch weitere gentechnische Veränderungen möglich (Lee *et al.* 2010), wodurch die Wirtschaftlichkeit eines Prozesses zur Herstellung von 3-Hydroxyisobuttersäure verbessert werden kann.

Eine zentrale Rolle für einen Bioprozess zur Produktion von 3-Hydroxyisobuttersäure mit gentechnisch veränderten *E. coli* spielt somit die effektive Produktion des Vorläufermetaboliten Bernsteinsäure, vorzugsweise ausgehend von einem kostengünstigen Substrat wie zum Beispiel Saccharose. In dieser Arbeit sollte daher als Basis für die mikrobielle Produktion von 3-Hydroxyisobuttersäure die Entwicklung sowie Charakterisierung eines Kultivierungsverfahrens zur Produktion von Bernsteinsäure mit gentechnisch veränderten *E. coli* Stämmen erfolgen. Folgende Arbeitsschritte waren hierzu geplant:

- Reaktionstechnische Charakterisierung eines gentechnisch veränderten *E. coli* Stammes zur Produktion von Bernsteinsäure aus Glucose in parallelen Rührkesselreaktoren unter technischen Bedingungen.
- Reaktionstechnische Charakterisierung von rekombinanten Saccharose verwertenden *E. coli* Stämmen zur Bernsteinsäureproduktion, basierend auf dem zuvor charakterisierten Kultivierungsverfahren für Glucose verwertende *E. coli*.

### 3 Theoretische Grundlagen

#### 3.1 Mikroorganismen zur Produktion von Bulk-Chemikalien aus Zucker

Neben der Produktion von Spezial- und Feinchemikalien sowie Proteinen werden biotechnologische Verfahren bereits ebenfalls zur Produktion von sogenannten Bulk-Produkten mit einem vergleichbar hohen Produktionsvolumen von mehr als 10 000 t a<sup>-1</sup> eingesetzt. Tabelle 3-1 zeigt einige dieser Bulk-Chemikalien sowie deren Weltjahresproduktion und Weltmarktpreis im Jahre 2005 (Flaschel und Sell 2005).

Tabelle 3-1: Auswahl an mit biotechnologischen Verfahren hergestellte Bulk-Chemikalien sowie Weltjahresproduktion und Weltmarktpreis nach (Flaschel und Sell 2005).

Produkt	Weltjahresproduktion, t a <sup>-1</sup>	Weltmarktpreis, € kg <sup>-1</sup>
L-Glutaminsäure	1 500 000	1,2
Zitronensäure	1 000 000	0,8
L-Lysin	700 000	2,0
Milchsäure	150 000	1,8
Gluconsäure	100 000	1,5
L-Ascorbinsäure	80 000	8,0

Eine weitere Gruppe an Bulk-Chemikalien, die mit biotechnischen Verfahren hergestellt werden könnten, stellen sogenannte (potentielle) Plattformchemikalien oder „Building Blocks“ dar (vergleiche Abbildung 1-1), welche zu einer großen Anzahl an chemischen Produkten weiterverarbeitet werden könnten. Vom U.S. Department of Energy wurden die in Tabelle 3-2 aufgelisteten Substanzen als die ökologisch und ökonomisch attraktivsten biobasierten Plattformchemikalien eingestuft (Werpy und Petersen 2004). Einige dieser Chemikalien wie beispielsweise L-Glutaminsäure werden bereits biotechnisch hergestellt, jedoch noch unwesentlich im größeren Syntheseverbund genutzt.

Das in dieser Arbeit betrachtete Vorläufermetabolit Bernsteinsäure zählt zu den in Tabelle 3-2 aufgelisteten Substanzen. Eine andere im Rahmen dieser Arbeit betrachtete Chemikaliengruppe stellen die Hydroxyisobuttersäuren dar, welche unter anderem zu dem bedeutenden Zwischenprodukt Methylmethacrylat weiterverarbeitet werden könnten und daher ebenso zunehmend an Beachtung gewinnen (Rohwerder und Müller 2010; Kircher und Haas 2011).

Tabelle 3-2: Kandidaten für Plattformchemikalien aus Zucker mittels biotechnischer Verfahren (Werpy und Petersen 2004).

C <sub>3</sub>	Glycerin, 3-Hydroxypropionsäure
C <sub>4</sub>	Bernsteinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure, Asparaginsäure, 3-Hydroxybutyrolacton
C <sub>5</sub>	L-Glutaminsäure, Itaconsäure, Lävulinsäure, Xylit/Arabitol
C <sub>6</sub>	2,5-Furandicarbonsäure, Gluconsäure, Sorbit

Im Jahre 2005 wurde die Anzahl an verschiedenen industriellen biotechnischen Prozessen auf grob 130 geschätzt unter Verwendung von 100 verschiedenen Mikroorganismen (Flaschel und Sell 2005). Einige dieser Organismen sind bereits eingehend charakterisiert und es besteht langjährige Erfahrung im Umgang mit diesen. Diese Mikroorganismen wie beispielsweise *Escherichia coli* (*E. coli*, Yu *et al.* 2011), *Corynebacterium glutamicum* (Nešvera und Pátek 2011) oder *Saccharomyces cerevisiae* (Abbott *et al.* 2009) beziehungsweise gentechnisch veränderte Variationen dieser werden daher häufig bevorzugt für einen neuen Prozess in Betracht gezogen. Die Eigenschaften zweier in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen sollen im Folgenden vorgestellt werden.

### 3.1.1 *Escherichia coli*

*E. coli* ist ein stäbchenförmiges, gramnegatives, peritrich begeißeltes Bakterium, das im menschlichen und tierischen Darm vorkommt und zu der Familie der Enterobacteriaceae gezählt wird (Welch 2006). Es wurde 1885 entdeckt und später nach seinem Entdecker Theodor Escherich benannt. Die Bakterien haben ungefähr einen Durchmesser von 0,5 µm und sind 1 - 3 µm lang.

Aufgrund seiner weiten Verbreitung im Rahmen der Forschung in der Mikrobiologie beziehungsweise Biotechnologie sowie als Produktionsstamm in der industriellen Biotechnologie war *E. coli* K-12 einer der ersten Organismen, dessen Genom vollständig sequenziert wurde (Blattner *et al.* 1997). Mit rund 4300 potentiell für Proteine kodierenden Sequenzen ist *E. coli* vergleichsweise einfach aufgebaut.

Die meisten *E. coli* Stämme sind innerhalb eines ausgedehnten Temperaturbereiches zwischen 15 - 48 °C sowie eines pH-Bereiches zwischen 5,5 - 8 zum Wachstum fähig mit einem Optimum bei 37 - 42 °C sowie neutralem pH (Welch 2006). Das Bakterium ist fakultativ anaerob und kann folglich sowohl durch Atmung, als auch durch gemischte Säuregärung unter Produktion von CO<sub>2</sub> Energie gewinnen. Die bevorzugte Kohlenstoffquelle sind Zucker wie Glucose.

Abbildung 3-1 gibt eine Übersicht über den Zentralstoffwechsel von *E. coli* mit Glucose als Kohlenstoffquelle. Glucose wird üblicherweise mit einem Phosphotransferasesystem (PTS) aufgenommen, welches Glucose zu Glucose-6-phosphat unter gleichzeitiger Konversion von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat umwandelt. Es existieren jedoch verschiedene Mechanismen der Glucoseaufnahme in *E. coli*, von denen einer zusätzlich in Abbildung 3-1 skizziert ist (Jahreis *et al.* 2008). Anschließend erfolgt die übliche Form der Glykolyse über den sogenannten „Embden-Meyerhof-Parnas“ Weg (Romano und Conway 1996) unter Produktion von zwei Pyruvat.

Unter aeroben Bedingungen wird Pyruvat in der üblichen Darstellung unter Abspaltung von  $\text{CO}_2$  zu Acetyl-CoA umgewandelt („oxidative Decarboxylierung“) und anschließend im sogenannten Citratzyklus zu  $\text{CO}_2$  und Wasser zur Bereitstellung von Energie in Form von ATP und NADH oxidiert (Michal 1999). Der Citratzyklus verläuft dabei in der in Abbildung 3-1 gezeigten Darstellung im Uhrzeigersinn. NADH wird anschließend in der Atmungskette oxidiert zur weiteren Bereitstellung von ATP.

Unter anaeroben Bedingungen sind einige in Abbildung 3-1 dargestellte Reaktionen inaktiv und NADH kann nicht in der Atmungskette oxidiert werden. Sofern keine anderen anorganischen Elektronenakzeptoren vorhanden sind, erfolgt eine charakteristische gemischte Säuregärung mit den Produkten Acetat, Ethanol, Lactat und Formiat (beziehungsweise  $\text{CO}_2$ ) und geringen Konzentrationen an Bernsteinsäure. Die Bilanz des Reduktionsäquivalents  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  muss dabei immer ausgeglichen sein, damit die Glykolyse fortschreiten kann (Clark 1989).

Anstatt über Acetyl-CoA können Intermediate des Citratzyklus (beziehungsweise des reduktiven Teils unter anaeroben Bedingungen) auch über andere Reaktionen bereitgestellt werden, wie beispielsweise unter Nutzung der Enzyme Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (*pck*), Phosphoenolpyruvatcarboxylase (*ppc*) oder der NAD-abhängigen decarboxylierenden Malatdehydrogenase (*maeA*) und der NADP-abhängigen decarboxylierenden Malatdehydrogenase (*maeB*) (Zhang *et al.* 2009). Derartige Stoffwechselwege zur Bereitstellung von Intermediaten des Citratzyklus werden auch als anaplerotische Reaktionen (griechisch: „Auffüllen“) bezeichnet.

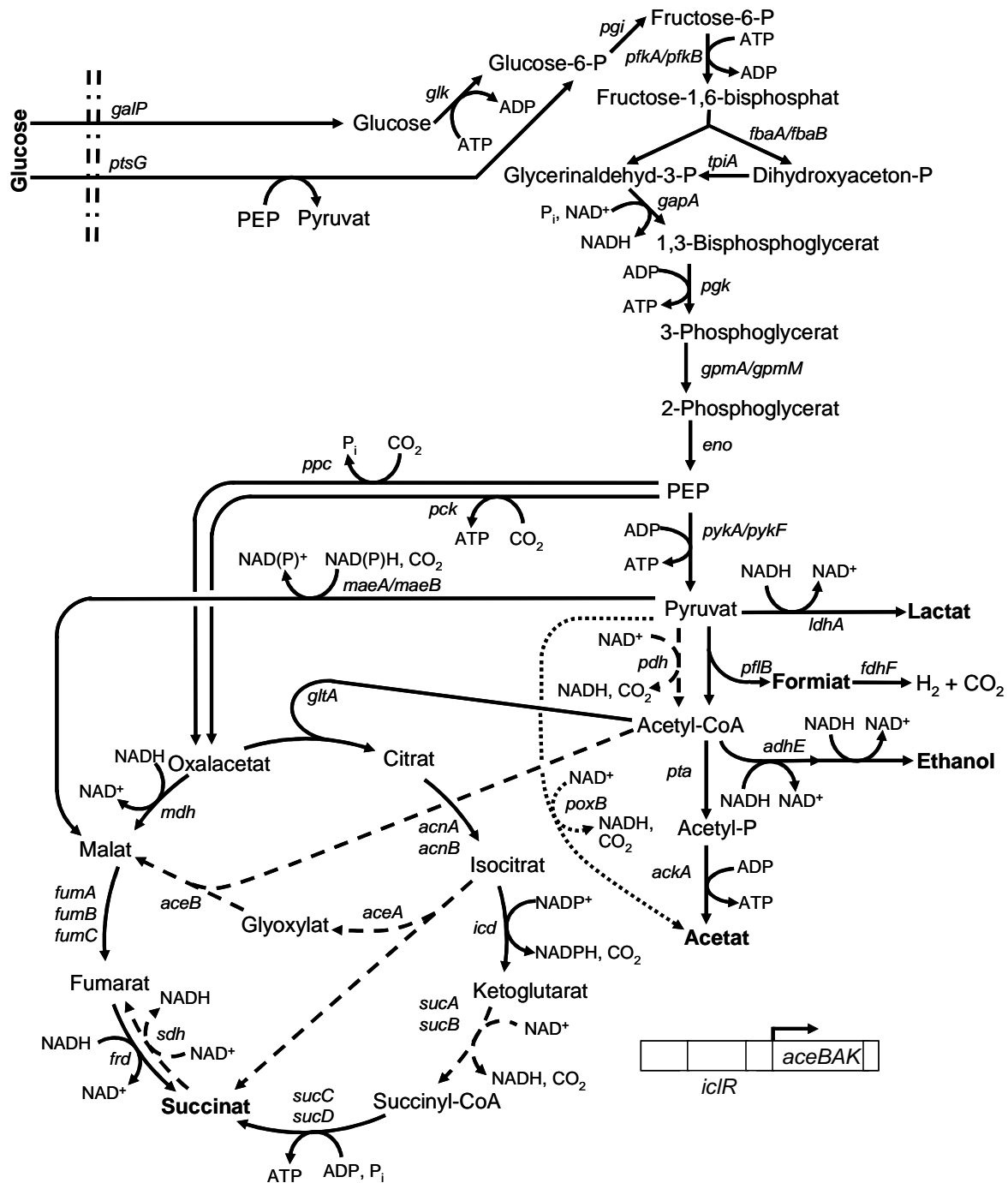


Abbildung 3-1: Zentralstoffwechsel von *E. coli* adaptiert und erweitert nach (Jantama et al. 2008). Einige Reaktionen laufen typischerweise nur unter aeroben (gestrichelte Pfeile) beziehungsweise mikroaeroben (gepunktete Pfeile) Bedingungen ab. Das Substrat sowie die Produkte der gemischten Säuregärung sind fett dargestellt. Bei reversiblen Reaktionen ist die Indikation der Reaktionsrichtung willkürlich und erfolgte vorzugsweise in Richtung des Produktes Succinat. Von NAD beziehungsweise NADP abweichende Reduktionsäquivalente sind vereinfacht als NAD dargestellt. Die Darstellung der Reaktionen ist nicht stöchiometrisch. Die Gene, welche für die an den Reaktionen hauptsächlich beteiligten Enzyme kodieren, sind kursiv dargestellt mit der Nomenklatur nach <http://www.ecocyc.org/>. Abweichende Nomenklaturen/Besonderheiten: *frd*: Fumarat-Reduktase, *galP*: Galactose MFS (Major-Facilitator-Superfamilie) Transporter zur Glucoseaufnahme, *iclR*: Repressor des *aceBAK* Operons („Glyoxylatzyklus“), *pdh*: Pyruvatdehydrogenase-Komplex, *sdh*: Succinat-Dehydrogenase.



### 3.1.2 *Cupriavidus necator*

*Cupriavidus necator* ist ein stäbchenförmiges, gramnegatives, peritrich begeißeltes Bodenbakterium, das zu der Familie der Burkholderiaceae gezählt wird. Eine ebenso gängige Bezeichnung ist heutzutage *Ralstonia eutropha* (Pohlmann *et al.* 2006; Raberg *et al.* 2008; Fricke *et al.* 2009; Reinecke und Steinbüchel 2009) und frühere Namen schließen *Wautersia eutropha* und *Alcaligenes eutrophus* (Vandamme und Coenye 2004) sowie *Hydrogenomonas eutropha* ein (Wilde 1962). Im Folgenden wird die Bezeichnung *Cupriavidus necator* verwendet. Abhängig von den Kultivierungsbedingungen variiert die Begeißelung der Bakterien (Raberg *et al.* 2008) und unter bestimmten limitierenden Wachstumsbedingungen wird das Biopolymer Polyhydroxybuttersäure (PHB) als Speicherstoff synthetisiert (Pohlmann *et al.* 2006; Reinecke und Steinbüchel 2009). Zwei Morphologien von *Cupriavidus necator* sind in Abbildung 3-2 dargestellt.

Der Stamm *Cupriavidus necator* H16 wurde vor ungefähr 50 Jahren in der Nähe von Göttingen isoliert (Schlegel *et al.* 1961b; Wilde 1962) und ist einer der am besten charakterisierten Organismen seiner Gattung (Reinecke und Steinbüchel 2009) mit einem bereits vollständig sequenzierten Genom (Pohlmann *et al.* 2006), das rund 6100 potentiell für Proteine kodierende Sequenzen umfasst. Die Gene sind auf zwei Chromosomen und einem Megaplasmid (pHG1) angeordnet. Im Folgenden wird dieser Stamm näher beschreiben.

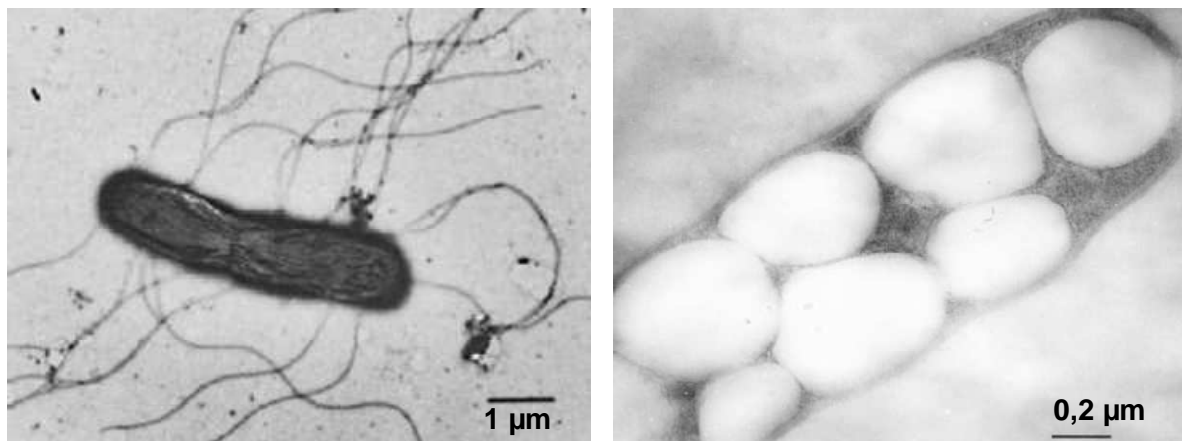


Abbildung 3-2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Cupriavidus necator*. Links: begeißelter Zustand (Aragno *et al.* 1977). Rechts: zellinterne PHB Akkumulation (Pötter *et al.* 2002).

*Cupriavidus necator* H16 ist in der Lage, sämtliche essentiellen Kofaktoren abgesehen von Coenzym B<sub>12</sub> aus einfachen Kohlenstoffverbindungen beziehungsweise Salzen zu synthetisieren. Daher ist die Kultivierung in vergleichsweise einfachen Medien möglich (Kim *et al.* 1994). Cobalamin beziehungsweise dessen Vorstufen können aufgenommen und verwertet

werden. *Cupriavidus necator* H16 ist zudem in der Lage Coenzym B<sub>12</sub> abhängige Reaktionen zu umgehen (Pohlmann *et al.* 2006).

Neben der Möglichkeit zur heterotrophen Atmung ist *Cupriavidus necator* H16 ein fakultativ chemolithoautotropher, fakultativ nitratatmender Mikroorganismus (Tiemeyer 2007; Reinecke und Steinbüchel 2009). Die Chemolithoautotrophie ermöglicht *Cupriavidus necator* H16 beispielsweise den Energiegewinn durch Oxidation von Wasserstoff und Reduktion von Sauerstoff sowie die Fixierung von CO<sub>2</sub> über den Calvin-Benson-Bassham Zyklus für die Synthese aller für das Zellwachstum benötigten organischen Bausteine. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von Knallgasbakterien (Schlegel *et al.* 1961a). Auf diese speziellen Formen des Metabolismus wird hier nicht weiter eingegangen.

Optimalerweise wird *Cupriavidus necator* bei Temperaturen um 30 - 32 °C und einem pH zwischen 6,5 - 7 kultiviert (Schlegel *et al.* 1961a; König und Schlegel 1968; Vollbrecht und Schlegel 1978; Friedrich *et al.* 1981).

### **Heterotrophes Wachstum sowie Bildung von PHB**

Heterotroph kann *Cupriavidus necator* H16 Zucker wie beispielsweise Fructose sowie Glucosäure und eine Vielzahl anderer organischer Säuren für das Wachstum nutzen (Friedrich *et al.* 1981; Reinecke und Steinbüchel 2009). Der „Embden-Meyerhof-Parnas“ Weg, beispielsweise zur Verwertung von Glucose, sowie der oxidative Pentosephosphatweg können ohne weitere gentechnische Veränderungen nicht genutzt werden aufgrund der Abwesenheit von Phosphofruktokinase beziehungsweise 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (Pohlmann *et al.* 2006). Die Verwertung von Fructose erfolgt über den sogenannten „Entner-Doudoroff“ Weg mit der Produktion von Pyruvat als Resultat, das unter Konversion zu Acetyl-CoA sowie der weiteren Verwertung im Citratzyklus oxidiert wird. Im mineralischen Salzmedium wurden mit Fructose als Kohlenstoff- und Energiequelle Wachstumsraten um 0,31 h<sup>-1</sup> (König und Schlegel 1968) beziehungsweise 0,33 h<sup>-1</sup> (Friedrich *et al.* 1981) erreicht.

Eine weitere besondere Eigenschaft von *Cupriavidus necator* ist die bereits erwähnte Fähigkeit zur Produktion von Biopolymeren als Speicherstoff, hauptsächlich Polyhydroxybuttersäure (PHB, vergleiche Abbildung 3-2 rechts). Dies geschieht, wenn die Kohlenstoffquelle im Überfluss zur Verfügung steht, aber die Zufuhr von Acetyl-CoA in den Citratzyklus und somit das Wachstum durch das Fehlen anderer Nährstoffe gehemmt ist. In der Praxis kann die Limitierung beispielsweise durch Stickstoff, Phosphor, Magnesium, Schwefel oder Sauerstoff erfolgen (Khanna und Srivastava 2005; Verlinden *et al.* 2007). Die Speicherung von PHB hilft *Cupriavidus necator* unter schwankenden Sauerstoff- bzw. Nährstoffkonzentrationen zu überleben. PHB kann unter gewissen Bedingungen bis zu einer

Konzentration von 90 % der Biotrockenmasse in einigen Organismen akkumulieren (Steinbüchel und Lütke-Eversloh 2003).

Der detaillierte Mechanismus der PHB Produktion in *Cupriavidus necator* H16 wurde bereits ausführlich untersucht (Pohlmann *et al.* 2006; Reinecke und Steinbüchel 2009). Vereinfacht dargestellt kann die Produktion von PHB in drei Schritte unterteilt werden (vergleiche Abbildung 3-3). Zwei Moleküle Acetyl-CoA, die nicht in den Citratzyklus eintreten können, werden durch die  $\beta$ -Ketothiolase (*phaA*) unter Freierwerden eines Coenzym A zu Acetoacetyl-CoA kondensiert. Die NADPH abhängige Acetoacetyl-CoA Reduktase (*phaB*) katalysiert die Reduktion zu (R)-3-Hydroxybutyryl-CoA. Dieses wird schließlich durch die PHB-Synthase (*phaC1*) unter Freierwerden des zweiten Coenzym A an eine wachsende PHB Kette angehängt.

Die mikrobielle Produktion von PHB sowie weiterer Homo- und Copolymere aus der Klasse der Polyhydroxyalkanoate zur industriellen Nutzung als Biopolymer ist seit geraumer Zeit Gegenstand vieler Forschungsarbeiten (Lee 1996; Khanna und Srivastava 2005; Verlinden *et al.* 2007; Lu *et al.* 2009a; Chanprateep 2010; Keshavarz und Roy 2010). Die Polymere sind in der Regel biologisch leicht abbaubar (Tokiwa und Ugwu 2007) und somit als umweltfreundliche und biokompatible Thermoplasten einzustufen. Abhängig vom verwendeten Organismus und den Kultivierungsbedingungen (insbesondere des verwendeten Substrates) können Polyhydroxyalkanoate mit unterschiedlichen Eigenschaften und Applikationsmöglichkeiten erzeugt werden.

Die biotechnologische Produktion von PHB mit *Cupriavidus necator* erfolgt typischerweise in zwei Phasen. Zunächst werden ausreichend hohe Zelldichten in einer unlimitierten Wachstumsphase bereitgestellt. Eine zweite durch einen Nährstoff limitierte Phase dient zur Produktion des Biopolymers. Sofern Wachstum und Produktion in einer Kultivierungsstufe erfolgen, beginnt die Produktionsphase bei Versiegen eines Medienbestandteils (zumeist Stickstoff oder Phosphor). Mit Glucose verwertenden Mutanten von *Cupriavidus necator* H16 ("*Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599", Kim *et al.* 1994) wurden im Labor bei optimierten Kultivierungen bereits sehr hohe PHB Konzentrationen von bis zu  $180 \text{ g L}^{-1}$  mit Produktivitäten von  $3,75 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erreicht (Ryu *et al.* 1999).

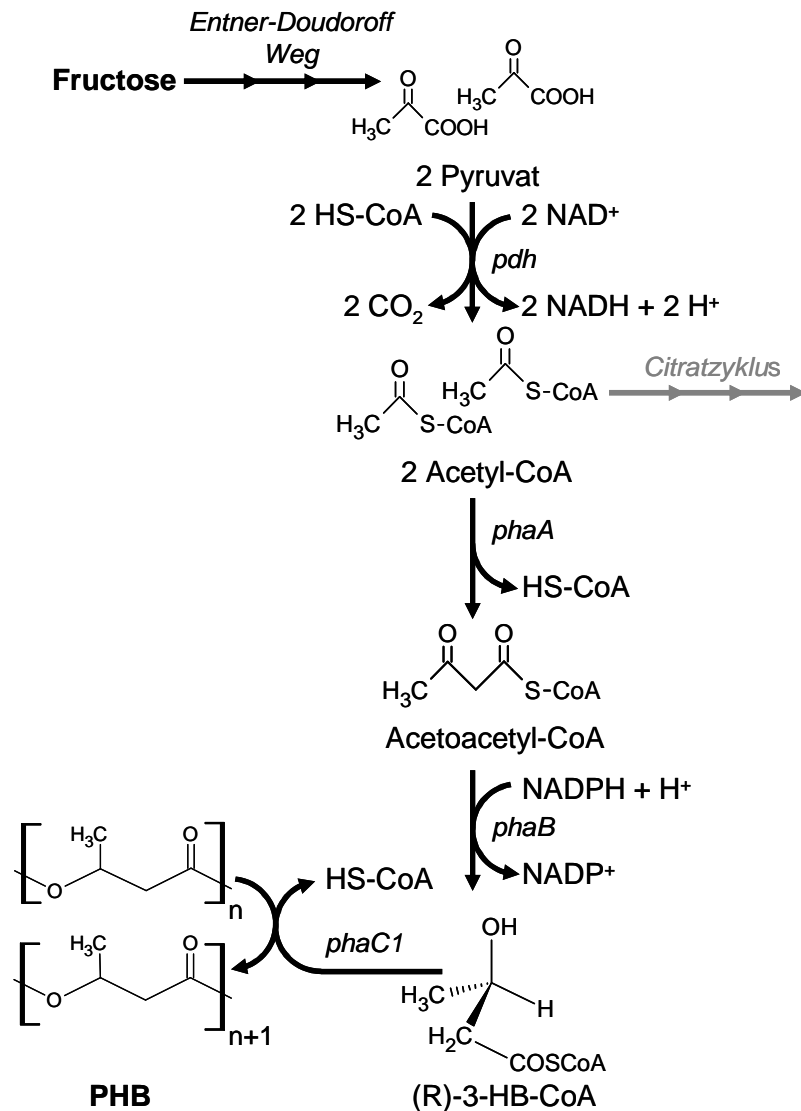


Abbildung 3-3: PHB Produktion in *Cupriavidus necator* H16. Fructose wird über den „Entner-Doudoroff“ Weg zu zwei Molekülen Pyruvat umgewandelt, die mittels Pyruvatdehydrogenase (*pdh*) zu zwei Molekülen Acetyl-CoA umgeformt werden. Sofern die Verwertung von Acetyl-CoA im Citratzyklus nicht erfolgt, werden zwei Moleküle durch die  $\beta$ -Ketothiolase (*phaA*) zu Acetoacetyl-CoA kondensiert. Die Acetoacetyl-CoA Reduktase (*phaB*) katalysiert die Reduktion zu (R)-3-Hydroxybutyryl-CoA ((R)-3-HB-CoA), welches schließlich durch die PHB-Synthase (*phaC1*) zu PHB polymerisiert wird.

### 3.2 Bernsteinsäure als Bioprodukt

Bernsteinsäure ist eine aliphatische Dicarbonsäure, die in Form ihres Salzes als Intermediat im Citratzyklus und somit im natürlichen Stoffwechsel einer Vielzahl von Organismen vorkommt. Namensgebend für die Bernsteinsäure ist das Vorkommen in gewissen fossilen Harzen (umgangssprachlich Bernstein).

Tabelle 3-3: Eigenschaften und Bezeichnungen für Bernsteinsäure (Cornils und Lappe 2010)

Molekulargewicht	118,08 g mol <sup>-1</sup>
Summenformel	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>
Dichte	1,57 g cm <sup>-3</sup> (25 °C)
Schmelzpunkt	188 °C
Siedepunkt	235 °C
Löslichkeit in Wasser	58 g kg <sup>-1</sup> (20 °C)
pK <sub>s</sub>	pK <sub>S1</sub> = 4,21; pK <sub>S2</sub> = 5,64
Chemical Abstracts Service (CAS)	110-15-6
PubChem Compound Identification (CID) <sup>1</sup>	1110
IUPAC Name	butanedioic acid
Synonyme (Englisch) <sup>1</sup>	succinic acid amber acid

Die industrielle Produktion von Bernsteinsäure für die kommerzielle Anwendung erfolgte bisher größtenteils auf Basis von fossilen Rohstoffen mittels chemischer Katalyse über die Hydrierung von Maleinsäureanhydrid (Zeikus *et al.* 1999; Cukalovic und Stevens 2008). Der dadurch entstehende relativ hohe Preis (5,90-8,80 US-\$ kg<sup>-1</sup>, Zeikus *et al.* 1999) begrenzt jedoch die Einsatzmöglichkeiten von Bernsteinsäure. Bisher war daher die weltweite Produktion mit 20000 bis 30000 t a<sup>-1</sup> (10 % jährliche Steigerung, Cukalovic und Stevens 2008) relativ gering. Vier hauptsächliche Märkte bestehen derzeit für Bernsteinsäure (Zeikus *et al.* 1999). Erstens kommt es als Tensid, Detergenz, Streckmittel sowie Schaumbildner zum Einsatz. Zweitens wird es als Chelator beziehungsweise Korrosionsinhibitor verwendet. Drittens findet es in der Lebensmittelindustrie Verwendung als ansäuerndes Mittel, Aromastoff sowie Antimikrobiotikum. Der vierte Markt ist die Produktion von gesundheitsbezogenen Produkten wie Pharmazeutika, Antibiotika und Vitamine. Insgesamt liegt der Marktwert der genannten Einsatzgebiete von Bernsteinsäure als Spezialchemikalie bei 400 Millionen US-\$ a<sup>-1</sup>.

Vom U.S. Department of Energy wurde Bernsteinsäure als einer der attraktivsten Kandidaten für Plattformchemikalien auf Basis von nachwachsenden Rohstoffen eingestuft (siehe Tabelle 3-2). Das Marktpotential von günstig produzierter Bernsteinsäure aus nachwachsenden Rohstoffen sowie biotechnologische Produktionsverfahren in der Entwicklung wurden bereits in diversen Übersichtsartikeln zusammengefasst (Zeikus *et al.* 1999; Willke und Vorlop 2004; Song und Lee 2006; McKinlay *et al.* 2007; Cukalovic und Stevens 2008; Sauer *et*

<sup>1</sup> Quelle: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, abgerufen am 20.05.2011.

al. 2008). Neben der Entkopplung des Marktes von fossilen Rohstoffen ist der biotechnologische Prozess zur Bernsteinsäureproduktion aufgrund der Möglichkeit zur CO<sub>2</sub> Fixierung für die Industrie von besonderem Interesse.

Insbesondere der Ersatz der auf fossilen Rohstoffen basierenden Plattformchemikalie Maleinsäureanhydrid durch biotechnologisch produzierte Bernsteinsäure könnte das Marktpotential dieser deutlich steigern, sofern der Produktionspreis genügend verringert werden kann. Ein Produktionsvolumen von bis zu 270 Millionen t a<sup>-1</sup> sowie ein Marktwert von bis zu 15 Milliarden US-\$ a<sup>-1</sup> werden erwartet (Zeikus *et al.* 1999). Hierbei wird ein Produktionspreis von deutlich unter einem US-\$ kg<sup>-1</sup> angestrebt. Eine geringe Menge Bernsteinsäure wird bereits für die Lebensmittelindustrie durch biotechnologische Verfahren produziert. Mehrere Pilot- beziehungsweise Demonstrationsanlagen für die Erzeugung größerer Mengen Bernsteinsäure aus nachwachsenden Rohstoffen für zahlreichere Anwendungen wurden bereits in Betrieb genommen beziehungsweise stehen kurz vor Inbetriebnahme (Challener 2009; McCoy 2009; Cornils und Lappe 2010).

### 3.2.1 Ansätze zur biotechnologischen Bernsteinsäureproduktion

Zur biotechnologischen Erzeugung von Bernsteinsäure kommen grundsätzlich zwei Strategien zum Einsatz. Die Produktion kann entweder durch natürliche selektierte Mikroorganismen oder durch gentechnisch veränderte Plattformorganismen erfolgen. Eine Vielzahl an Studien zur reaktionstechnischen Charakterisierung des Bernsteinsäurebildungsprozesses mit diversen Mikroorganismen wurde bereits durchgeführt, die in einigen Übersichtsartikeln gegenübergestellt sind (Song und Lee 2006; McKinlay *et al.* 2007; Jantama *et al.* 2008). Im Folgenden wird eine Auswahl vielversprechender Ansätze näher vorgestellt.

#### Natürliche Bernsteinsäureproduzenten

Natürliche aus dem Rumen von Wiederkäuern isolierte Bernsteinsäureproduzenten wie *Actinobacillus succinogenes* (Guettler *et al.* 1999), *Basfia succiniciproducens* (Kuhnert *et al.* 2010) und *Mannheimia succiniciproducens* (Lee *et al.* 2002a) wurden hinsichtlich ihrer Eignung zur industriellen Bernsteinsäureproduktion bereits intensiv untersucht. Ein weiterer aus dem Verdauungssystem von Säugetieren isolierter Bernsteinsäureproduzent ist *Anaerobispirillum succiniciproducens* (Samuelov *et al.* 1991). Anders als bei beispielsweise *E. coli* wird Bernsteinsäure durch diese Organismen unter anaeroben Bedingungen als Hauptgärprodukt in hoher Konzentration gebildet. Bernsteinsäure wird hauptsächlich über den reduktiven Arm des Citratzyklus gebildet, dessen Intermediate ähnlich wie bei *E. coli* über

verschiedene Reaktionen bereitgestellt werden können (Song und Lee 2006). Überwiegend wird die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase als entscheidendes Enzym für die Speisung des reduktiven Citratzyklus genannt (Zeikus *et al.* 1999; Song und Lee 2006).

Mit einem Abkömmling von *Actinobacillus succinogenes* wurden hohe Produktkonzentrationen von bis zu  $106 \text{ g L}^{-1}$  Bernsteinsäure und Produktivitäten bis zu  $2,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erreicht (Guettler *et al.* 1996). Mit *Anaerobiospirillum succiniciproducens* wurden beispielsweise hohe Ausbeuten von bis zu  $0,99 \text{ g g}^{-1}$  ( $1,01 \text{ molC molC}^{-1}$ ) erreicht (Nghiem *et al.* 1997).

Die Verwendung dieser Mikroorganismen für die Erzeugung von Bernsteinsäure ist mit einigen Schwierigkeiten verbunden (Song und Lee 2006; McKinlay *et al.* 2007). Für die Kultivierung werden zum Teil teure Medienbestandteile benötigt, die Bakterien sind häufig pH sensitiv und Nebenproduktbildung kann nur schwer vermieden werden. Zurzeit gibt es noch wenig Erfahrung hinsichtlich der gentechnischen Veränderung dieser Organismen und der Metabolismus sowie das Genom sind noch vergleichsweise wenig untersucht. Auch die Erfahrungen hinsichtlich großtechnischer Nutzung sind sehr begrenzt und die zum Teil starke Unverträglichkeit gegenüber Sauerstoff erschwert die Handhabung zudem. Bei einigen Organismen kann darüber hinaus eine Pathogenität nicht ausgeschlossen werden.

### **Bernsteinsäureproduktion durch Mutanten und gentechnisch veränderte Mikroorganismen**

In einem zweiten Ansatz zur biotechnologischen Bernsteinsäureproduktion werden in der Weißen Biotechnologie etablierte Plattformorganismen verwendet, deren natürliche Bernsteinsäurebildung gering ist. Der Stoffwechsel dieser Bakterien wird durch gentechnische Methoden so verändert, dass die Produktion von Bernsteinsäure verstärkt stattfindet.

Neben gerichteten und ungerichteten Mutationen können die verwendeten gentechnischen Methoden zur Erhöhung der Bernsteinsäureproduktion in drei Kategorien eingeteilt werden (Song und Lee 2006): Die Inaktivierung von Reaktionen, welche die Bernsteinsäurebildung verringern, die Verstärkung von enzymatischen Reaktionen, welche für die Bernsteinsäurebildung förderlich sind sowie das Einfügen rekombinanter Gene zur Ermöglichung weiterer Reaktionen für die Verbesserung der Bernsteinsäureproduktion.

*E. coli* ist der am häufigsten verwendete Mikroorganismus in der Forschung zur Produktion von Bernsteinsäure und wird in Kapitel 3.2.2 gesondert betrachtet.

*Corynebacterium glutamicum* ist ein fakultativ anaerobes, grampositives Bakterium, das zur großtechnischen Produktion von Glutamat und Lysin sowie anderen Aminosäuren eingesetzt wird (Pfefferle *et al.* 2003). Es existiert umfangreiches Wissen über den Stoffwechsel sowie das Genom dieses Bakteriums und Werkzeuge zur gentechnischen Veränderung sind be-

kannt und verfügbar (Wendisch *et al.* 2006; Nešvera und Pátek 2011). Diese Aspekte machen *Corynebacterium glutamicum* auch zu einem potentiellen Kandidaten für die Produktion von Bernsteinsäure. Unter anaeroben Bedingungen kann *Corynebacterium glutamicum* Glucose zu der organischen Säure Lactat als Hauptprodukt sowie geringen Mengen an Bernsteinsäure und Acetat umsetzen (Inui *et al.* 2004). Durch die Inaktivierung der Lactatdehydrogenase sowie einer Überexpression der Pyruvatcarboxylase konnten bis zu  $146 \text{ g L}^{-1}$  Bernsteinsäure produziert werden (Okino *et al.* 2008). Dies ist eine der höchsten erzielten Bernsteinsäurekonzentrationen in einem biotechnologischen Prozess. Die Zellen wurden nach einer aeroben Kultivierung geerntet und anschließend mit hoher Zellkonzentration in pH geregelten gerührten Flaschen kultiviert. Reaktionstechnische Daten im Rührkesselreaktor sind noch nicht verfügbar.

Ein weiterer Kandidat zur Produktion von Bernsteinsäure ist die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dieser Organismus wird bereits in einer Vielzahl industrieller Prozesse im Rahmen der Lebensmittelbranche oder für die Produktion von Primärmetaboliten eingesetzt (Abbott *et al.* 2009). *Saccharomyces cerevisiae* ist ein robuster Produktionsorganismus und zeichnet sich insbesondere durch eine hohe Osmo- und Säuretoleranz aus. Durch diese Eigenschaft kann die Verwendung von Titrationsmittel zur pH Regelung beispielsweise verringert werden. Eine Produktion bei niedrigem pH ist ebenso denkbar, wodurch das Kontaminationsrisiko minimiert wird und die gebildete Säure zum größeren Teil undissoziiert vorliegt, was eine leichtere und kostengünstigere Aufarbeitung fördert. Über die Bernsteinsäureproduktion mit *Saccharomyces cerevisiae* wird bereits seit einiger Zeit geforscht (Arikawa *et al.* 1999; Abbott *et al.* 2009). Detaillierte Untersuchungen zur Bernsteinsäurebildung mit gentechnisch veränderten *Saccharomyces cerevisiae* sind Gegenstand aktueller Arbeiten (Gebhardt 2010; Raab *et al.* 2010; Lang *et al.* 2011).

### **3.2.2 Biotechnologische Produktion von Bernsteinsäure mit gentechnisch veränderten *Escherichia coli***

*E. coli* bietet gegenüber anderen Organismen für die Verwendung als Biokatalysator eine Reihe von Vorteilen (Yu *et al.* 2011). Seit über dreißig Jahren werden gentechnische Methoden für diesen Mikroorganismus entwickelt. Dementsprechend ist das vermutlich umfangreichste Wissen über das Genom sowie den Metabolismus für dieses Bakterium verfügbar. Viele Antibiotika können als Selektionsmarker verwendet werden und *E. coli* weist ein schnelles Wachstum auf einfachen Medien auf. Verschiedene  $C_5$ - und  $C_6$ -Zucker können verwertet werden und die Toleranz gegenüber organischen Säuren ist zufriedenstellend hoch. Bernsteinsäure ist ein natürliches Produkt der gemischten Säuregärung von *E. coli* un-



ter anaeroben Bedingungen mit jedoch relativ geringen Mengen beziehungsweise Ausbeuten (vergleiche Abbildung 3-1, Clark 1989).

Zahlreiche Strategien der gentechnischen Veränderung von *E. coli* wurden bereits hinsichtlich ihrer Eignung zur Verbesserung der Bernsteinsäureproduktion untersucht (Song und Lee 2006; McKinlay *et al.* 2007; Jantama *et al.* 2008; Yu *et al.* 2011). Eine Möglichkeit ist die aerobe Produktion von Bernsteinsäure mit gentechnisch veränderten *E. coli* (Lin *et al.* 2005a), bei der bis zu 58,3 g L<sup>-1</sup> Bernsteinsäure erzeugt werden konnte.

Weitaus häufiger wird die anaerobe Bernsteinsäureproduktion mit gentechnisch veränderten *E. coli* untersucht. Eine Auswahl der zu diesem Zwecke durchgeführten gentechnischen Veränderungen ist in Abbildung 3-4 dargestellt. Zur Verbesserung der Bernsteinsäureproduktion werden zum einen verschiedene Gene inaktiviert. Durch die Inaktivierungen wird beispielsweise die Produktion unerwünschter Nebenprodukte wie Lactat ( $\Delta ldhA/\Delta mgsA$ ), Ethanol ( $\Delta adhE$ ) oder Acetat ( $\Delta ack-pta/\Delta poxB$ ) unterbunden. Andere Inaktivierungen sollen die Produktion weiter fördern, wie beispielsweise die des Isocitrat Lyase Repressors ( $\Delta iclR$ ), der Pyruvat-Formiat Lyase ( $\Delta pflAB/\Delta pflB$ ), des Formiat Transporters ( $\Delta focA$ ) sowie der Formiat Dehydrogenase ( $\Delta fdhF$ ). Häufig erfolgt zudem die Inaktivierung der glucosespezifischen Permease des Phosphotransferasesystems ( $\Delta ptsG$ ), wodurch eine höhere Verfügbarkeit des Intermediates Phosphoenolpyruvat (PEP), ein ausgeglichener Metabolismus und eine verringerte Acetatproduktion erwartet (Kang *et al.* 2010) sowie die Induktion von Expressionen mit Lactose anstatt Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ermöglicht wird (Wang *et al.* 2010). Zum anderen erfolgt die Überexpression bereits vorhandener Gene zur Förderung von Reaktionen, welche die Bernsteinsäurebildung begünstigen. Häufig untersuchte Überexpressionen sind die der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (*pck*), der Phosphoenolpyruvatcarboxylase (*ppc*) oder der decarboxylierenden Malatdehydrogenasen (*maeA/maeB*), wodurch Bernsteinsäure vorzugsweise unter Fixierung von CO<sub>2</sub> erfolgt (Zhang *et al.* 2009). Die Überexpression der Malat Dehydrogenase (*mdh*) zur Verstärkung der Reaktion von Oxalacetat zu Malat wird ebenfalls angewendet. Als dritte Methode erfolgt die heterologe Expression von Enzymen, welche die Bernsteinsäurebildung begünstigen. Neben den bereits oben genannten Enzymen, die auch aus anderen Organismen stammen können, erfolgt häufig die Expression einer Pyruvatcarboxylase (*pyc*). Auch die heterologe Expression einer Citrat Synthase (*citZ*) ist beschrieben (Sanchez *et al.* 2005b).

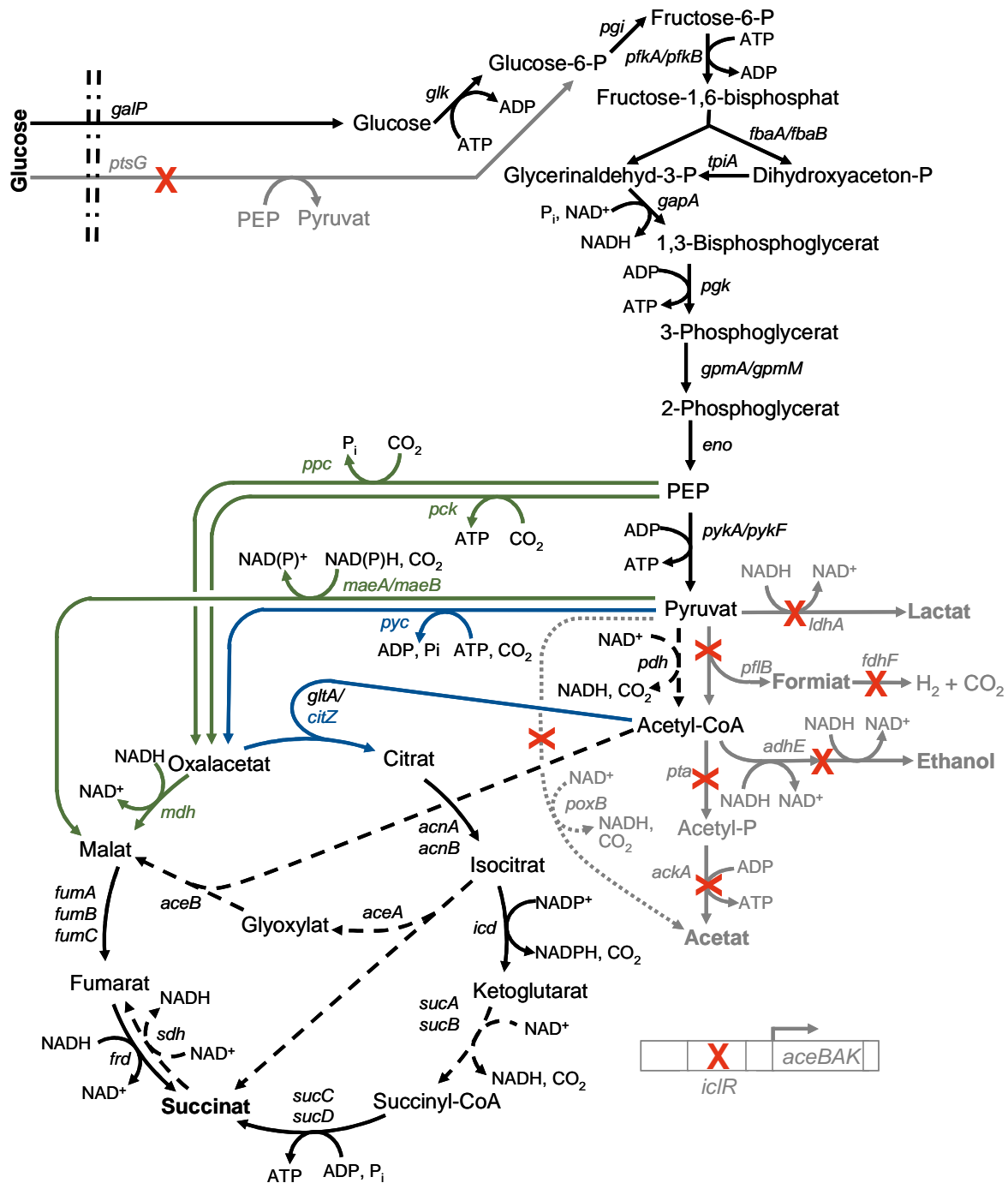


Abbildung 3-4: Mögliche gentechnischer Veränderungen zur Verbesserung der Bernsteinsäureproduktion in *E. coli* (siehe Abbildung 3-1 für weitere Erläuterungen zu der Darstellung). Homologe Überexpressionen sind grün, heterologe Expressionen blau und inaktivierte Stoffwechselwege grau und rot durchkreuzt dargestellt. In der Regel werden nur eine Auswahl der verschiedenen Strategien simultan eingesetzt (siehe weitere Erläuterungen im Text). Anstatt der dargestellten homologen Überexpressionen können alternativ auch heterologe Überexpressionen der entsprechenden Enzyme zum Einsatz kommen. Weitere im Text erläuterte Strategien, die nicht dargestellt sind: Inaktivierung der Methylglyoxalsynthase (*mgsA*) zur weiteren Verringerung der Lactatbildung sowie Inaktivierung des Formiat Transporters (*focA*).

Ein sehr leistungsfähiger und häufig charakterisierter Bernsteinsäureproduzent ist *E. coli* AFP111 mit Inaktivierungen in *ptsG*, *pflAB* sowie *ldhA* (Ma *et al.* 2010). Mit diesem Stamm konnte unter Verwendung eines definierten Mediums 101,2 g L<sup>-1</sup> Bernsteinsäure produziert werden mit einer integralen volumetrischen Produktivität von 1,89 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> und einer Ausbeute von 1,09 molC molC<sup>-1</sup> (Jiang *et al.* 2010). Mittels *E. coli* SD121 mit Inaktivierungen in *ldhA*, *pflB* und *ptsG* sowie einer heterologen Expression einer Phosphoenolpyruvatcarboxylase aus *Cyanobacterium anabaena* konnten sogar 116,2 g L<sup>-1</sup> Bernsteinsäure erzeugt werden mit einer Produktivität von 1,55 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> und einer Ausbeute von 1,15 molC molC<sup>-1</sup> (Wang *et al.* 2011a). Ein weiterer interessanter Ansatz ist die „Metabolische Evolution“ von *E. coli* C resultierend in den Stämmen *E. coli* KJ060 ( $\Delta ldhA$ ,  $\Delta adhE$ ,  $\Delta ackA$ ,  $\Delta focA$ ,  $\Delta pflB$ ) und *E. coli* KJ073 ( $\Delta ldhA$ ,  $\Delta adhE$ ,  $\Delta ackA$ ,  $\Delta focA$ ,  $\Delta pflB$ ,  $\Delta mgsA$ ,  $\Delta poxB$ ). Mit den beiden Stämmen wurden Bernsteinsäurekonzentration von bis zu 87 g L<sup>-1</sup> beziehungsweise 79 g L<sup>-1</sup> erreicht (Jantama *et al.* 2008). Zusammenfassend wurden Konzentrationen über 60 g L<sup>-1</sup> in der Regel nur erreicht, wenn Stämme mit Inaktivierungen der Pyruvat-Formiat Lyase ( $\Delta pflA$  beziehungsweise  $\Delta pflAB$ ) sowie der Lactatdehydrogenase ( $\Delta ldhA$ ) verwendet wurden. Dieser Genotyp scheint ein wesentlicher Faktor in der Erhöhung der Produktionsleistung zu sein. Zudem erscheint die Inaktivierung des PTS für die Aufnahme von Glucose ( $\Delta ptsG$ ) sehr vorteilhaft.

In anderen Studien werden maximale Ausbeuten angestrebt. Mit den auf *E. coli* K12 MG1655 basierenden Stämmen SBS550MG (pHL413) sowie SBS990MG (pHL413) mit Inaktivierungen in *adhE*, *ldhA*, *iclR* (nur SBS550MG) und *ack-pta* sowie einer Überexpression einer Pyruvatcarboxylase aus *Lactococcus lactis* wurden Ausbeuten von 1,07 molC molC<sup>-1</sup> sowie 1,13 molC molC<sup>-1</sup> erreicht (Sanchez *et al.* 2006).

Zur Überwindung geringer Wachstumsgeschwindigkeiten sowie möglicher vorteilhafter Effekte auf die anaerobe Bernsteinsäureproduktion erfolgt die Kultivierung häufig in einem zweiphasigen Prozess mit einer aeroben Wachstumsphase und einer anaeroben Produktbildungsphase (Vemuri *et al.* 2002a; Vemuri *et al.* 2002b; Jiang *et al.* 2010; Wang *et al.* 2011a).

### **Substrate für die Produktion von Bernsteinsäure**

In den meisten Studien hinsichtlich der Bernsteinsäureproduktion mit gentechnisch veränderten *E. coli* kommt das Substrat Glucose zum Einsatz. Nur einige Arbeiten haben bisher die Verwendung anderer Substrate untersucht. Neben der Verwendung von komplexen Substraten zur Realisierung eines wirtschaftlichen Prozesses für die Produktion eines Synthesebausteines können auch alternative definierte Substrate in Betracht gezogen werden, die gegenüber Glucose verschiedene Vorteile haben können. Substrate mit einer geringeren Oxidationsstufe können sich beispielsweise durch höhere NADH Verfügbarkeit

vorteilhaft auswirken (Dharmadi *et al.* 2006) oder die Art der Aufnahme des Zuckers kann positive beziehungsweise negative Folgen auf die Produktbildung haben (Lin *et al.* 2005b). Nicht zuletzt kann es wirtschaftlich von großem Vorteil sein, wenn das Substrat eine hohe Verfügbarkeit aufweist oder in nachwachsenden Rohstoffen enthalten ist, die möglicherweise in Zukunft für biotechnologische Verfahren nutzbar gemacht werden können. Die Bereitstellung gewisser Intermediate der Bernsteinsäuresynthese insbesondere während der Biomassebildungsphase kann regulatorische Auswirkungen in bestimmten Stämmen von *E. coli* haben und die anschließende Bernsteinsäurebildung aus Glucose verbessern (Wu *et al.* 2009). Tabelle 3-4 gibt einen Überblick über relevante Eigenschaften einiger Substrate.

Tabelle 3-4: Eigenschaften einiger zur Biomasseherstellung oder Produktbildung verwendeten Substrate im Rahmen der Bernsteinsäureproduktion mit *E. coli*

Substrat	Eigenschaften	Quellen
Glucose	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oxidationsstufe: 0</li> <li>• Produktion von 2 mol NADH pro mol Glucose in der Glykolyse</li> <li>• Aufnahme über PTS resultiert in Verbrauch von PEP</li> </ul>	(Hong und Lee 2002; Berrios-Rivera <i>et al.</i> 2003; Lin <i>et al.</i> 2005b; Andersson <i>et al.</i> 2007)
Sorbit	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oxidationsstufe: -1</li> <li>• Erhöhte NADH Verfügbarkeit durch Produktion von 3 mol NADH pro mol Sorbit</li> <li>• Aufnahme über PTS resultiert in Verbrauch von PEP</li> </ul>	(Hong und Lee 2002; Berrios-Rivera <i>et al.</i> 2003; Lin <i>et al.</i> 2005b)
Xylose	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oxidationsstufe: 0</li> <li>• Aufnahme durch eine ATP abhängige Permease (ohne Verbrauch von PEP)</li> <li>• Hauptbestandteil von Lignocellulose (mit Glucose)</li> </ul>	(Lin <i>et al.</i> 2005b; Andersson <i>et al.</i> 2007)
Gluconsäure	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oxidationsstufe: +1</li> <li>• Geringere NADH Verfügbarkeit</li> </ul>	(Hong und Lee 2002; Berrios-Rivera <i>et al.</i> 2003)
Fructose	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bestandteil von Saccharose (mit Glucose)</li> </ul>	(Andersson <i>et al.</i> 2007)
Glycerin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oxidationsstufe: -2</li> <li>• Erhöhte NADH Verfügbarkeit</li> <li>• Nebenprodukt bei der Herstellung von Biodiesel</li> </ul>	(Dharmadi <i>et al.</i> 2006; Yazdani und Gonzalez 2007; Yazdani und Gonzalez 2008; Blankchien <i>et al.</i> 2010)
Pyruvat	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intermediat der Bernsteinsäuresynthese</li> </ul>	(Wu <i>et al.</i> 2009)
Malat	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intermediat der Bernsteinsäuresynthese</li> </ul>	(Wu <i>et al.</i> 2009)

Aufgrund seines hohen Vorkommens in der Natur, der bereits etablierten intensiven industriellen Verwertung, der hohen Energieausbeute pro Hektar verglichen zu anderen Zuckern und anderen Vorteilen ist insbesondere die Nutzung des Disaccharides Saccharose als primäre Kohlenstoffquelle für die Produktion von Bernsteinsäure und anderen Bioprodukten wünschenswert (Lee *et al.* 2010; Wang *et al.* 2011b). Während andere Bernsteinsäureproduzenten wie beispielsweise *Anaerobiospirillum succiniciproducens* oder *Actinobacillus succinogenes* dazu in der Lage sind Saccharose zu verwerten (Song und Lee 2006), können die weit verbreiteten und industriell genutzten Stämme von *E. coli* zum größten Teil Saccharose nicht als Kohlenstoffquelle nutzen (Lee *et al.* 2010). In nur wenigen Studien wurde die Saccharoseverwertung in zur Bernsteinsäureproduktion konstruierten Stämmen untersucht (Andersson *et al.* 2007). In einer Studie erfolgte die Bernsteinsäureproduktion in einem *E. coli* Stamm, der ohne gentechnische Veränderungen bereits Saccharose verwerten konnte (Isar *et al.* 2006a). Kürzlich wurde in einer weiteren Studie die Möglichkeit der Saccharoseverwertung zur Bernsteinsäureproduktion in rekombinanten *E. coli* Stämmen gezeigt, die einigen in dieser Arbeit verwendeten Stämmen sehr ähneln (Wang *et al.* 2011b).

Um die Vorteile der Saccharoseverwertung auf verschiedene Labor- und Produktionsstämme zu übertragen, wurden bereits verschiedene gentechnische Ansätze verfolgt. Im Hinblick auf den stöchiometrischen Verbrauch von PEP sowie ATP während der Aufnahme und Verwertung von Saccharose können unterschiedliche Aufnahmemechanismen in drei Kategorien eingeteilt werden (siehe Abbildung 3-5, Lee *et al.* 2010). Neben der Einführung von heterologen Hydrolasen, die in der Lage sind Saccharose im extrazellulären Raum zu spalten und so die Aufnahme der Einfachzucker Glucose und Fructose zu ermöglichen (Lee *et al.* 2010), ist die heterologe Expression eines saccharosespezifischen Phosphotransferasesystems, beispielsweise aus *Salmonella typhimurium*, ein verbreiteter Ansatz (Schmid *et al.* 1982; Hardesty *et al.* 1987; Schmid *et al.* 1988). Die Saccharose Verwertung wird durch mehrere Enzyme katalysiert, deren Gene in einem Operon (*scr*) organisiert sind. Ein spezifisches Porin (*scrY*) erlaubt den diffusiven Transport des Zweifachzuckers durch die äußere Zellmembran gramnegativer Bakterien. Infolgedessen katalysiert das membrangebundene, saccharosespezifische EII<sup>scr</sup> Protein (*scrA*) des PTS die PEP-abhängige Phosphorylierung der Saccharose. Es folgt eine Spaltung in Fructose und Glucose-6-phosphat mittels einer Saccharose-6-phosphat Invertase (*scrB*) sowie eine Phosphorylierung des Spaltprodukts Fructose mittels einer Fructosekinase (*scrK*). Die beiden phosphorylierten Hexosen können nun über den zellinternen Stoffwechsel verarbeitet werden. Das *scr* Operon enthält ebenfalls einen Repressor (*scrR*). Als dritte Möglichkeit kann Saccharose zunächst erst aufgenommen und anschließend intrazellulär gespalten werden. Dieser Mechanismus kommt beispielsweise unter der Verwendung des *csc* Operon aus *E. coli* EC3132 zum Einsatz (Bockmann *et al.* 1992; Jahreis *et al.* 2002). Das Operon umfasst die Gene für einen Saccharose/H<sup>+</sup> Sympor-

ter (*cscB*), eine Saccharose Invertase (*cscA*), eine Fructosekinase (*cscK*) sowie einen Repressor (*cscR*).

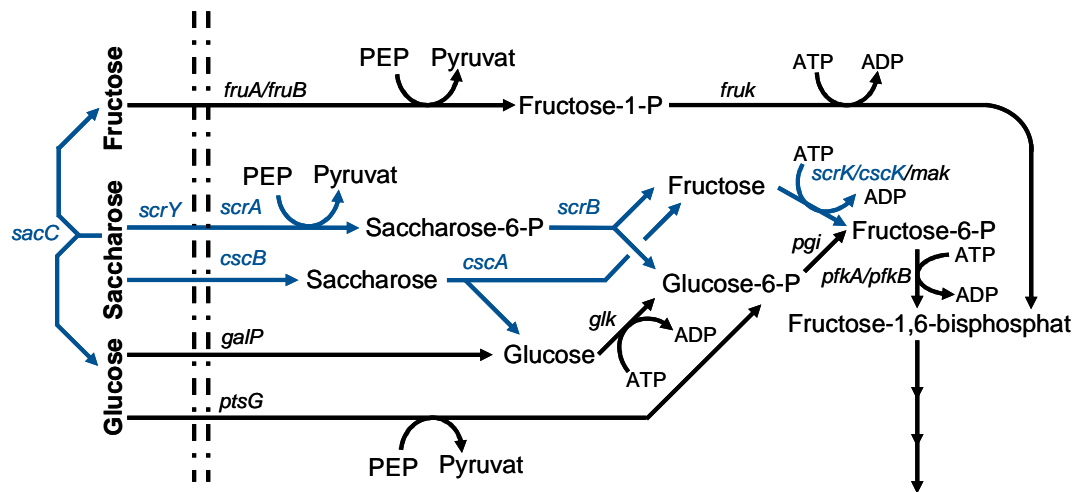


Abbildung 3-5: Verschiedene Möglichkeiten der Saccharoseaufnahme und -verwertung in rekombinanten *E. coli* K12 (Lee *et al.* 2010). Saccharose könnte entweder extrazellulär gespalten werden, beispielsweise durch die Überexpression der Saccharose-6-phosphat Hydrolase aus *Mannheimia succiniciproducens* (*sacC*). Alternativ könnte die Aufnahme über ein PTS erfolgen, beispielsweise durch Integration des *scr* Operons aus *Salmonella typhimurium*. Drittens ist die Aufnahme und anschließende intrazelluläre Spaltung von Saccharose denkbar, die beispielsweise durch die Integration des *csc* Operons aus *E. coli* EC3132 ermöglicht werden könnte (siehe weitere Erläuterungen im Text). Das Intermediat Fructose-1,6-bisphosphat kann über den zellinternen Stoffwechsel weiterverarbeitet werden (nicht dargestellt).

### 3.3 Hydroxyisobuttersäuren als Bioprodukt

Sowohl 2-Hydroxyisobuttersäure als auch 3-Hydroxyisobuttersäure (siehe Tabelle 3-5) werden momentan als Feinchemikalien eingesetzt und nehmen einen relativ geringen Marktanteil ein (Ryu und Kim 1998; León *et al.* 2001; Rohwerder und Müller 2010). Beide Substanzen kommen im Stoffwechsel von Mikroorganismen vor. Während 3-Hydroxyisobutyrat eine Rolle im Katabolismus der natürlichen Aminosäure L-Valin spielt und in verschiedenen Bakterien sowie Hefen und Säugetieren vorkommt (Lokanath *et al.* 2005), entsteht 2-Hydroxyisobuttersäure in gewissen Mikroorganismen als Intermediat beim biologischen Abbau von Methyl-Tertiärbutylether (Steffan *et al.* 1997). Verglichen zu anderen organischen Chemikalien, die als aussichtsreiche Kandidaten für Plattformchemikalien aus Zucker mittels biotechnischer Verfahren eingestuft werden, finden Hydroxyisobuttersäuren derzeit jedoch vergleichsweise wenig Beachtung in der Forschung, was auf fehlende Möglichkeiten der biotechnologischen Produktion zurückzuführen sei (Rohwerder und Müller 2010). Dennoch gewinnen diese Verbindungen und deren biotechnologische Produktion aufgrund zahlreicher denkbarer Möglichkeiten zur Weiterverarbeitung insbesondere zu dem

bedeutenden Zwischenprodukt Methacrylsäure zunehmend an Beachtung. Das Prinzip der Konversion zu Methacrylsäure ist in Abbildung 3-6 skizziert.

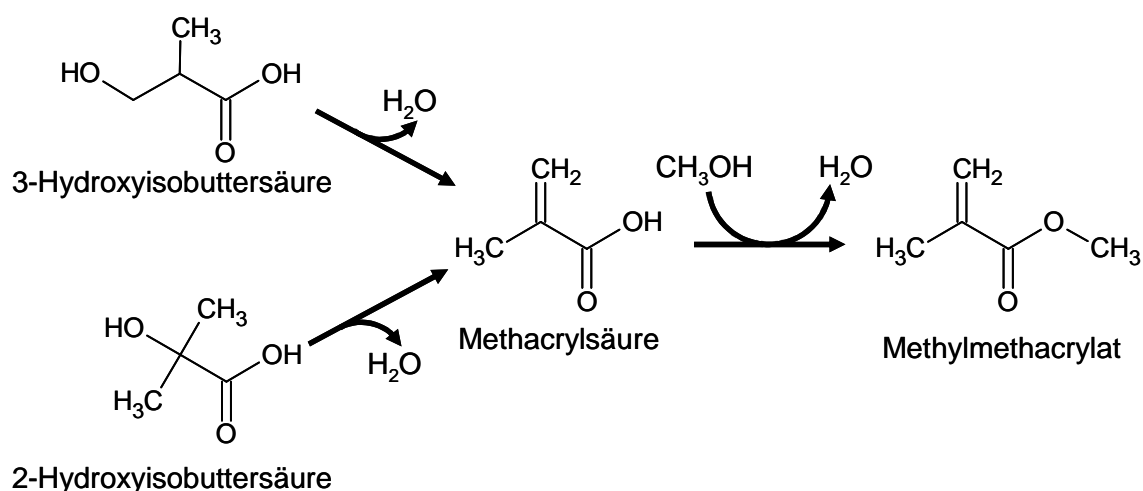


Abbildung 3-6: Erzeugung von Methylmethacrylat aus Hydroxyisobuttersäuren. Zunächst erfolgt die Konversion zu Methacrylsäure über eine katalysierte Dehydratisierungsreaktion. Im zweiten Schritt wird durch eine Veresterung mit Methanol das Methylmethacrylat gebildet.

Tabelle 3-5: Eigenschaften und Bezeichnungen für 2-Hydroxyisobuttersäure und 3-Hydroxyisobuttersäure<sup>2</sup>

Produkt	2-Hydroxyisobuttersäure	3-Hydroxyisobuttersäure
Molekulargewicht	104,1 g mol <sup>-1</sup>	
Summenformel	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	
Chemical Abstracts Service (CAS)	594-61-6	2068-83-9
PubChem Compound Identification (CID)	11671	87
IUPAC Name	2-hydroxy-2-methylpropanoic acid	3-hydroxy-2-methylpropanoic acid
Synonyme (Englisch)	2-Methylactic acid 2-Hydroxyisobutyric acid Acetonic acid	3-Hydroxyisobutyric acid 3-Hydroxyisobutyrate

<sup>2</sup> Quelle: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, abgerufen am 20.05.2011.

Über eine katalysierte Dehydratisierungsreaktion können 2-Hydroxyisobuttersäure sowie 3-Hydroxyisobuttersäure zu Methacrylsäure umgewandelt werden (Volker und Pichler 1972; Shima *et al.* 1993; Chauhan *et al.* 2003; Marx *et al.* 2007; Müller und Rohwerder 2007; Reinecke *et al.* 2009). Im zweiten Schritt erfolgt die Bildung von Methylmethacrylat durch Veresterung mit Methanol. Methacrylsäure bzw. das Folgeprodukt Methylmethacrylat sind bedeutende Synthesechemikalien, die insbesondere für die Erzeugung von Polymethylmethacrylat verwendet werden. Polymethylmethacrylat ist ein glasähnlicher, thermoplastischer Kunststoff, der umgangssprachlich als Acrylglas oder Plexiglas® bezeichnet wird und aufgrund seiner vielseitigen Eigenschaften wiederum Anwendung in zahlreichen Industrie- und Konsumzweigen findet.

Der aktuelle Verbrauch von Methylmethacrylat kann mit ungefähr 2,5 Millionen t a<sup>-1</sup> abgeschätzt werden und steigt tendenziell (Nexant 2006). Der Marktpreis liegt bei 1800-2000 € t<sup>-1</sup> (ICIS-pricing 2010). Methylmethacrylat wird in über 30 Fabriken weltweit produziert, in denen mindestens fünf unterschiedliche Produktionsverfahren kommerziell eingesetzt werden (Bauer 2000; Nexant 2006). Insbesondere kommt derzeit das sogenannte ACH-Verfahren zum Einsatz. Hierbei wird Methylmethacrylat aus Acetoncyanhydrin hergestellt, welches zunächst mit Schwefelsäure zur Reaktion gebracht wird, um das resultierende Säureamid anschließend durch Veresterung zu Methylmethacrylat umzuwandeln.

Insbesondere bei dem ACH-Verfahren entstehen unerwünschte Nebenprodukte beziehungsweise Abfallstoffe. Alle für die Produktion von Methylmethacrylat derzeit eingesetzten Verfahren benötigen zudem Ausgangsstoffe, die in der Regel auf fossilen Ressourcen basieren. Ein mikrobielles Produktionsverfahren für Hydroxyisobuttersäuren und die anschließende Konversion zu Methylmethacrylat könnte hier Abhilfe schaffen, da nachwachsende Rohstoffe als Ausgangsstoffe für die Produktherstellung in Frage kommen und somit auf Produktionsverfahren ausgehend von fossilen Ressourcen mit unerwünschten Nebenprodukten verzichtet werden kann.

Zwei Ansätze zur biotechnischen Produktion von Hydroxyisobuttersäure werden im Folgenden näher erläutert sowie weitere prinzipielle Möglichkeiten der biokatalytischen Konversion aufgezeigt.

### **3.3.1 Biotechnologische Produktion von 2-Hydroxyisobuttersäure mit rekombinanten *Cupriavidus necator* H16**

Um 2-Hydroxyisobuttersäure biotechnologisch herzustellen, wurden Teile des PHB Stoffwechsels von *Cupriavidus necator* und die Funktion einer neu entdeckten Mutase kombiniert, wie in Abbildung 3-7 gezeigt ist.



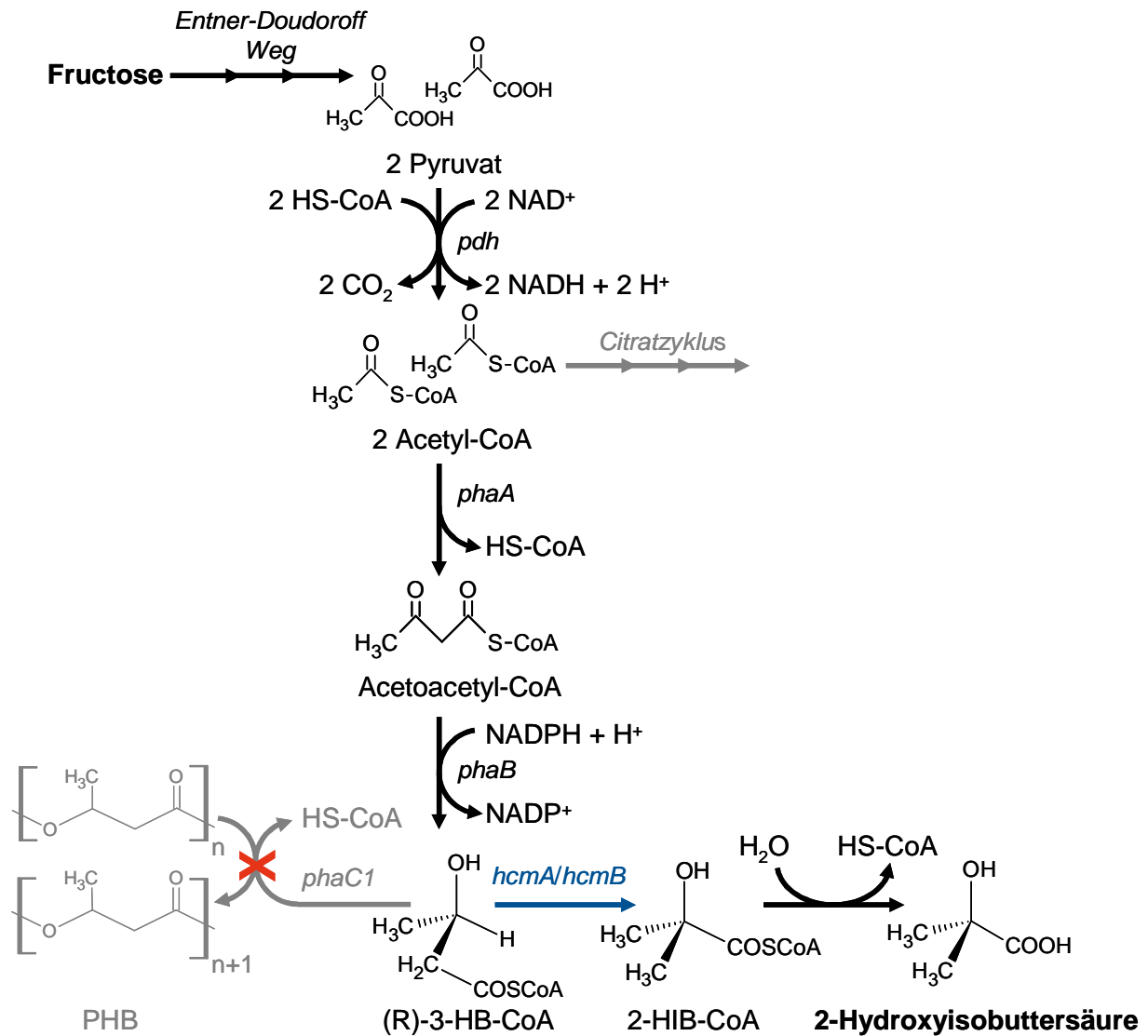


Abbildung 3-7: Produktion von 2-Hydroxyisobuttersäure in gentechnisch veränderten *Cupriavidus necator* H16 (vergleiche Abbildung 3-3). Durch Inaktivierung der PHB-Synthase (*phaC1*) erfolgt keine Polymerisierung von (R)-3-Hydroxybutyryl-CoA ((R)-3-HB-CoA) zu PHB. Mittels einer Coenzym B<sub>12</sub> abhängigen 2-Hydroxyisobutyryl-CoA Mutase (*hcmA/hcmB*) wird (R)-3-HB-CoA zu 2-Hydroxyisobutyryl-CoA (2-HIB-CoA) umgeformt, aus dem schließlich durch eine unspezifische Abspaltung von Coenzym A das Produkt 2-Hydroxyisobuttersäure entsteht.

Als Wirtsorganismus wird eine Mutante von *Cupriavidus necator* H16 verwendet, die wegen einer Inaktivierung der PHB-Synthase das Monomer (R)-3-Hydroxybutyryl-CoA nicht zu PHB polymerisieren kann. Durch eine neu identifizierte 2-Hydroxyisobutyryl-CoA Mutase aus *Aquicola tertiarycarbonis* (Rohwerder *et al.* 2006; Lechner *et al.* 2007), welche in *Cupriavidus necator* H16 integriert wird, kann (R)-3-Hydroxybutyryl-CoA zu 2-Hydroxyisobutyryl-CoA umgeformt werden. Schließlich wird durch Hydrolyse von 2-Hydroxyisobutyryl-CoA das Produkt 2-Hydroxyisobuttersäure gebildet (Müller und Rohwerder 2007; Reinecke *et al.* 2009; Hoefel *et al.* 2010; Rohwerder und Müller 2010). Durch den Verlust von 2 Molekülen CO<sub>2</sub> pro

Molekül Fructose kann auf diesem Wege 2-Hydroxyisobuttersäure mit einer theoretischen Ausbeute von  $0,67 \text{ molC molC}^{-1}$  erzeugt werden.

Ähnlich wie bei der Produktion von PHB könnte folglich die Bildung von 2-Hydroxyisobuttersäure in den gentechnisch veränderten *Cupriavidus necator* H16 Stämmen durch geeignete Kultivierungsmethoden, die in Kapitel 3.1.2 erläutert sind, begünstigt werden.

### 3.3.2 Biotechnologische Produktion von 3-Hydroxyisobuttersäure mit rekombinanten *Escherichia coli*

Es existieren einige Patentanmeldungen, die einen künstlichen Stoffwechselweg ausgehend von Succinat beziehungsweise Succinyl-CoA vorschlagen, in dem mittels katalytischer Aktivität verschiedener heterologer und homologer Enzyme die Bildung von 3-Hydroxyisobuttersäure realisiert werden soll (Marx *et al.* 2007; Burk *et al.* 2009). Ein darauf basierender möglicher Weg von Succinat zu 3-Hydroxyisobuttersäure ist in Abbildung 3-8 skizziert.

Ausgehend von Succinat kann mit Hilfe einer Überexpression der in *E. coli* natürlich exprimierten Succinyl-CoA Synthetase, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit besteht (*sucC/sucD*), die Bildung von Succinyl-CoA begünstigt werden. Durch ein weiteres homologes Enzym wird Succinyl-CoA zu (2R)-Methylmalonyl-CoA umgesetzt. Für die Förderung dieser Reaktion kann die dafür benötigte Coenzym  $B_{12}$  abhängige Methylmalonyl-CoA Mutase (*sbm*) und YgfD (*ygfD*, in Abbildung 3-8 nicht dargestellt), ein weiteres Protein aus dem Operon der Mutase von *E. coli*, ebenfalls überexprimiert werden. Die exakte Funktion von YgfD ist nicht bekannt, es scheint jedoch *in vivo* mit der Methylmalonyl-CoA Mutase zu interagieren und besitzt GTPase-Aktivität (Froese *et al.* 2009). Die Reaktion von Methylmalonyl-CoA zu Propanyl-CoA kann durch die Inaktivierung des Gens *ygfG*, welches für eine Methylmalonyl-CoA Decarboxylase kodiert (Haller *et al.* 2000), unterbunden werden. Mittels einer heterologen Expression der Methylmalonyl-CoA Epimerase aus *Propionibacterium freudenreichii* (Dayem *et al.* 2002) kann die Umwandlung von (2R)-Methylmalonyl-CoA zu (2S)-Methylmalonyl-CoA erfolgen. Der hier beschriebene Stoffwechselweg von Succinat zu (2S)-Methylmalonyl-CoA findet im Wesentlichen auch im Rahmen der biotechnischen Produktion von Propansäure mit Propionibakterien Anwendung (Rogers *et al.* 2006).

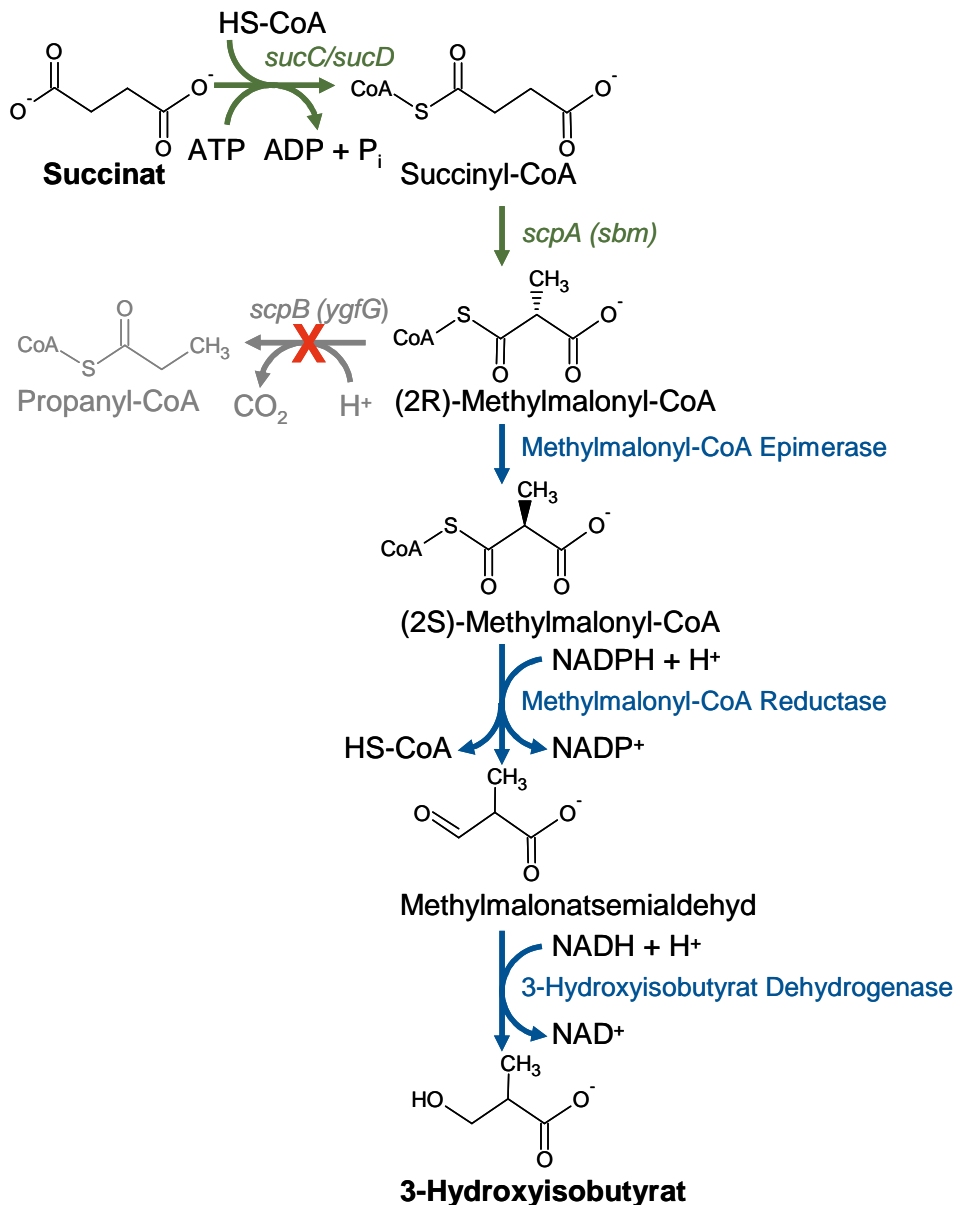


Abbildung 3-8: Künstlicher Syntheseweg zur Bildung von 3-Hydroxyisobutyrat aus Succinat in *E. coli*. Durch homologe Überexpressionen (in grün dargestellt) der Succinyl-CoA Synthetase (*sucC/sucD*) sowie der Coenzym B<sub>12</sub> abhängigen Methylmalonyl-CoA Mutase (*sbm*) sollen die Reaktionen zu dem Intermediat (2R)-Methylmalonyl-CoA begünstigt werden. Eine Inaktivierung der Methylmalonyl-CoA Decarboxylase (*ygfG*) soll eine Reaktion von (2R)-Methylmalonyl-CoA zu Propionyl-CoA verhindern. Weitere heterologe Expressionen (in blau dargestellt) einer Methylmalonyl-CoA Epimerase, einer Methylmalonyl-CoA Reduktase sowie einer 3-Hydroxyisobutyrat-Dehydrogenase sollen die Umsetzung von (2R)-Methylmalonyl-CoA zu 3-Hydroxyisobutyrat ermöglichen.

Für die anschließende Reaktion von (2S)-Methylmalonyl-CoA zu Methylmalonatsemialdehyd könnte eine Malonyl-CoA Reduktase aus *Sulfolobus tokodaii* zum Einsatz kommen, die in ihrer eigentlichen Funktion die Reduktion von Malonyl-CoA zu Malonatsemialdehyd katalysiert (Alber *et al.* 2006). Dieses Enzym kann jedoch auch (2S)-Methylmalonyl-CoA zu

Methylmalonatsemialdehyd umsetzen (Marx *et al.* 2007) und durch Einführung verschiedener Mutationen kann die Aktivität hinsichtlich dieser Umsetzung zudem verbessert werden (resultierend in eine „Methylmalonyl-CoA Reduktase“, Daten nicht veröffentlicht). Schließlich erfolgt ausgehend von Methylmalonatsemialdehyd der letzte Reaktionsschritt des synthetischen Stoffwechselweges zu 3-Hydroxyisobutyrat, der durch eine 3-Hydroxyisobutyrat Dehydrogenase aus *Thermus thermophilus* katalysiert werden kann (Lokanath *et al.* 2003; Lokanath *et al.* 2005).

Eine vielversprechende Herangehensweise wäre die Verwirklichung dieses Stoffwechselweges in zur Bernsteinsäureproduktion optimierten *E. coli* Stämmen, da bei einer hohen Bildungsrate des Intermediates Succinat auch eine höhere 3-Hydroxyisobuttersäure Produktion erwartet werden könnte. Die theoretische Ausbeute für die Produktion von 3-Hydroxyisobuttersäure mit diesem Weg liegt durch Möglichkeiten der CO<sub>2</sub>-Fixierung vermutlich höher als bei der Produktion von 2-Hydroxyisobuttersäure mit dem in Kapitel 3.3.1 vorgestellten Verfahren. Genauere Abschätzungen werden in Kapitel 5 vorgestellt. Allerdings sind bei der hier vorgestellten Route deutlich mehr gentechnische Veränderungen vorzunehmen.

### 3.3.3 Weitere Ansätze

Einige Arbeiten umfassen Untersuchungen der mikrobiellen Bildung von 3-Hydroxyisobuttersäure durch Wildtypstämme diverser Mikroorganismen. Mit *Pseudomonas putida* wurde 3-Hydroxyisobuttersäure aus Isobuttersäure produziert (Goodhue und Schaeffer 1971). Zudem ist die Produktion von 3-Hydroxyisobuttersäure aus 2-Methyl-1,3-Propandiol mit Stämmen von *Acetobacter* und *Gluconobacter* beschrieben (Ohta *et al.* 1982; León *et al.* 2001). Es handelt sich bei diesen Arbeiten jedoch eher um Biotransformationen. Als Ausgangsstoffe werden keine Zucker, sondern verschiedene auf petrochemischer Basis hergestellte C<sub>4</sub>-Körper verwendet.

Zusammenfassend betrachtet gibt es derzeit keine weiteren Publikationen in Fachzeitschriften, die realisierte Produktionsverfahren für Hydroxyisobuttersäuren aus nachwachsenden Rohstoffen beziehungsweise Zuckern darstellen, sondern die Beschreibung von möglichen Produktionsverfahren reduziert sich auf diverse Patentanmeldungen (Marx *et al.* 2007; Müller und Rohwerder 2007; Burk *et al.* 2009; Reinecke *et al.* 2009).

## 3.4 Grundlagen der Bioprozessführung

Im Folgenden soll auf grundlegende Massenbilanzen und Prozessmodelle für die Beschreibung des mikrobiellen Wachstums in idealen Reaktoren sowie auf die Eigenschaften der verwendeten realen Reaktoren eingegangen werden. Die verwendeten mathematischen Beschreibungen sind vorwiegend nach (Chmiel 2006) dargestellt.

### 3.4.1 Mikrobielles Wachstum

Das Zellwachstum wird als erste Approximation mit einem unstrukturierten, unsegregierten Modell beschrieben, das heißt, man unterscheidet nicht zwischen verschiedenen Individuen in der Zellpopulation (unsegregiert) und es werden keine Substrukturen beispielsweise der Zellen selbst berücksichtigt (unstrukturiert). Die Wachstumsgeschwindigkeit  $r_x$  ( $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), sprich die Änderung der Zellkonzentration  $c_x$  ( $\text{g L}^{-1}$ ) mit der Zeit  $t$  (h), wird als eine Funktion der Konzentration der Zellen selbst und einem Faktor, der spezifischen Wachstumsrate  $\mu$  ( $\text{h}^{-1}$ ), beschrieben (Gleichung 3-1).

$$\frac{dc_x}{dt} = r_x = \mu \cdot c_x \quad \text{Gleichung 3-1}$$

Sofern die Wachstumsrate unter nicht limitierenden Bedingungen konstant ist, kann Gleichung 3-1 integriert werden und es ergibt sich das in Gleichung 3-2 dargestellte exponentielle Wachstumsverhalten mit  $c_{x,0}$  als Zellkonzentration zum Zeitpunkt  $t = 0$ .

$$c_x = c_{x,0} \cdot e^{\mu \cdot t} \quad \text{Gleichung 3-2}$$

Häufig ist die Annahme unlimitierter Bedingungen jedoch unzulässig. Das Zellwachstum kann beispielsweise zusätzlich von einer limitierenden Substratkonzentration  $c_s$  ( $\text{g L}^{-1}$ ) abhängen. Diese Abhängigkeit wird häufig formalkinetisch durch eine Präzisierung der Wachstumsrate  $\mu$  mit einer einfachen Sättigungsfunktion dargestellt (Gleichung 3-3).

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_s}{c_s + K_s} \quad \text{Gleichung 3-3}$$

Die einfache Integration resultierend in Gleichung 3-2 ist somit nicht mehr möglich. Die Konstante  $K_s$  ( $\text{g L}^{-1}$ ) entspricht dem Wert der Substratkonzentration, bei der die Wachstumsrate halb so groß wie die maximale Wachstumsrate ist.

Entsprechend der Wachstumsgeschwindigkeit  $r_X$  können die Substrataufnahmerate  $r_S$  sowie die Produktbildungsrate  $r_P$  durch Gleichung 3-4 und Gleichung 3-5 beschreiben werden mit den beiden spezifischen Raten  $q_S$  und  $q_P$  ( $g_{\text{Substrat/Produkt}} g^{-1} h^{-1}$ ).

$$\frac{dc_S}{dt} = r_S = q_S \cdot c_X \quad \text{Gleichung 3-4}$$

$$\frac{dc_P}{dt} = r_P = q_P \cdot c_X \quad \text{Gleichung 3-5}$$

Besonders im Rahmen der industriellen Biotechnologie bei der mikrobiellen Erzeugung von Produkten mit vergleichsweise geringer Wertschöpfung kann die Ausbeute ( $g g^{-1}$  oder auch  $mol mol^{-1}$  beziehungsweise  $molC molC^{-1}$ ) eines Zielproduktes eine wesentliche Rolle für die Bewertung eines Prozesses hinsichtlich seiner Wirtschaftlichkeit spielen. Diese kann als die Masse (oder Menge) an gebildetem Produkt bezogen auf den Verbrauch des primären Substrates (meist Kohlenstoffquelle) betrachtet und sowohl für Biomasse ( $Y_{X/S}$ ) als auch Metabolite ( $Y_{P/S}$ ) als Produkte definiert werden (entsprechend Gleichung 3-6 und Gleichung 3-7).

$$Y_{X/S} = \frac{dc_X}{dc_S} = \frac{r_X}{r_S} = \frac{\mu}{q_S} \quad \text{Gleichung 3-6}$$

$$Y_{P/S} = \frac{dc_P}{dc_S} = \frac{r_P}{r_S} = \frac{q_P}{q_S} \quad \text{Gleichung 3-7}$$

Die spezifische Substrataufnahme  $q_S$  kann weiterhin als Summe des für die Biomassebildung ( $q_{S,\mu}$ ), die Produktbildung ( $q_{S,P}$ ) sowie den Erhaltungsstoffwechsel ( $m_S, g g^{-1} h^{-1}$ ) benötigten Substrates beschrieben werden (Gleichung 3-8).

$$q_S = q_{S,\mu} + q_{S,P} + m_S \quad \text{Gleichung 3-8}$$

Unter Verwendung von Gleichung 3-6 und Gleichung 3-7 ergibt sich für die Beschreibung von  $q_S$  die Gleichung 3-9.

$$q_S = \frac{\mu}{Y_{X/S}} + \frac{q_P}{Y_{P/S}} + m_S \quad \text{Gleichung 3-9}$$

Neben der Kohlenstoffquelle spielt im Rahmen von Bioprozessen häufig das Substrat Sauerstoff eine wesentliche Rolle. Zur Vermeidung einer Limitation sollte die Sauerstofftransferrate

OTR („oxygen transfer rate“, mol m<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup>) genügend hoch sein. Da die Sauerstofftransferate maßgeblich durch den flüssigkeitsseitigen Konzentrationsgradienten in der Grenzschicht an der Phasengrenzfläche zwischen Gasblase und Flüssigkeit ((c<sub>O<sub>2</sub>,l</sub><sup>\*</sup> - c<sub>O<sub>2</sub>,l</sub>), mol m<sup>-3</sup>) bestimmt ist, kann diese mittels des volumenbezogenen Sauerstofftransportkoeffizienten k<sub>L</sub>a (s<sup>-1</sup>) und Gleichung 3-10 beschrieben werden. In der Praxis wird die Sauerstofftransferate in einem Rührkesselreaktor häufig durch Erhöhung der Rührerdrehzahl und der damit verbunden feineren Dispergierung der Gasblasen und einem demzufolge steigendem k<sub>L</sub>a verbessert.

$$\text{OTR} = k_L a \cdot (c_{\text{O}_2,l}^* - c_{\text{O}_2,l}) \quad \text{Gleichung 3-10}$$

Die volumetrische Sauerstoffaufnahme OUR („oxygen uptake rate“, mol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) ist definiert als die pro Volumeneinheit durch die enthaltenen Zellen aufgenommene Menge an gelöstem Sauerstoff. Sie kann analog zu Gleichung 3-1 mittels der spezifischen Sauerstoffaufnahme q<sub>O<sub>2</sub></sub> (mol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) und Gleichung 3-11 beschrieben werden.

$$\text{OUR} = q_{\text{O}_2} \cdot c_X \quad \text{Gleichung 3-11}$$

Mit der spezifischen Sauerstoffaufnahme q<sub>O<sub>2</sub></sub> und der spezifischen CO<sub>2</sub> Bildungsrate q<sub>CO<sub>2</sub></sub> kann der sogenannte Respiratorische Quotient (RQ, mol<sub>CO<sub>2</sub></sub> mol<sub>O<sub>2</sub></sub><sup>-1</sup>) bestimmt werden, mittels dessen Aussagen über den metabolischen Zustand der Zellpopulation getroffen werden können (Gleichung 3-12).

$$\text{RQ} = \frac{q_{\text{CO}_2}}{q_{\text{O}_2}} \quad \text{Gleichung 3-12}$$

In der Praxis lässt sich der RQ mit Gleichung 3-13 bestimmen.

$$\text{RQ} = \frac{\rho_{\text{CO}_2} M_{\text{O}_2} (\psi_{\text{CO}_2,t} - \psi_{\text{CO}_2,0})}{\rho_{\text{O}_2} M_{\text{CO}_2} (\psi_{\text{O}_2,0} - \psi_{\text{O}_2,t})} \quad \text{Gleichung 3-13}$$

ρ<sub>CO<sub>2</sub></sub> Dichte von CO<sub>2</sub> (hier: 1,963 g L<sup>-1</sup>)

ρ<sub>O<sub>2</sub></sub> Dichte von O<sub>2</sub> (hier: 1,429 g L<sup>-1</sup>)

M<sub>CO<sub>2</sub></sub> Molare Masse von CO<sub>2</sub> (hier: 44 g mol<sup>-1</sup>)

M<sub>O<sub>2</sub></sub> Molare Masse von O<sub>2</sub> (hier: 32 g mol<sup>-1</sup>)

ψ<sub>CO<sub>2</sub></sub> Volumenanteil von CO<sub>2</sub> im Abgas (zum Zeitpunkt 0 und t, %)

ψ<sub>O<sub>2</sub></sub> Volumenanteil von O<sub>2</sub> im Abgas (zum Zeitpunkt 0 und t, %)

### 3.4.2 Bilanzierung von idealen Rührkesselreaktoren

Für die Durchführung von reaktionstechnischen Prozessen in fluiden oder gasförmigen Phasen kommen verschiedene Reaktortypen mit unterschiedlichen Eigenschaften zum Einsatz (Fogler 2005). Der am häufigsten angewandte Reaktortyp im Rahmen der Bioverfahrenstechnik ist der Rührkesselreaktor (Weuster-Botz 2006). Unter einem idealen Rührkesselreaktor wird ein isotroper Reaktor verstanden, das heißt, er ist in Bezug auf alle Komponenten ideal durchmischt und die physikalischen Eigenschaften der Reaktionsmischung sowie die Reaktionsgeschwindigkeiten sind räumlich konstant. Die einzelnen Stoffe im Reaktor können mit Gleichung 3-14 bilanziert werden.

$$\frac{d(V_R \cdot c_i)}{dt} = \dot{V}_{\text{ein}} \cdot c_{i,\text{ein}} - \dot{V}_{\text{aus}} \cdot c_i + r_i \cdot V_R \quad \text{Gleichung 3-14}$$

$V_R$             Reaktorvolumen, L

$\dot{V}_{\text{ein}}, \dot{V}_{\text{aus}}$     Zulauf- sowie Ablaufvolumenstrom, L h<sup>-1</sup>

$c_{i,\text{ein}}, c_i$         Konzentration der Komponente i im Zulauf sowie im Reaktor/Ablauf, g L<sup>-1</sup>

$r_i$                 Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i, g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>

Man unterscheidet prinzipiell zwischen drei verschiedenen grundlegenden Betriebsweisen von Bioreaktoren: Dem Satzverfahren (Batch), dem Zulaufverfahren (Fed-Batch) und dem kontinuierlichen Betrieb. Das Satz- und Zulaufverfahren sollen im Folgenden näher erläutert werden.

#### Satzverfahren

Beim Satzverfahren handelt es sich in Bezug auf die Flüssigkeitsphase um ein geschlossenes System, bei dem keine Flüssigkeitsströme zu- oder abgeführt werden. Demzufolge spricht man in der Praxis bei einer Kultivierung ohne Zufuhr von Substrat und Abfuhr von Kultivierungslösung trotz der Zu- und Abfuhr von Gasströmen von einem Satzverfahren. Die Zugabe von geringen Mengen Säure oder Base zur pH Regelung bleibt in dem Zusammenhang ebenfalls häufig unberücksichtigt. Die in Gleichung 3-14 angegebene Bilanz vereinfacht sich somit zu Gleichung 3-15.

$$\frac{dc_i}{dt} = r_i \quad \text{Gleichung 3-15}$$



Bei Betrachtung der Zellkonzentration als Komponente  $c_x$  lassen sich in der Regel verschiedene Phasen im Satzbetrieb beobachten, die in Abbildung 3-9 skizziert sind.

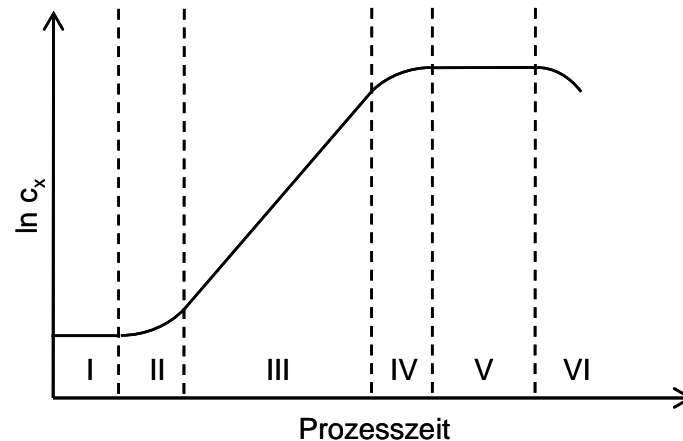


Abbildung 3-9: Typischer Verlauf der Zellkonzentration  $c_x$  (logarithmisch aufgetragen) während einer Satzkultivierung: Verzögerungsphase (I), Übergangsphase 1 (II), exponentielle Phase (III), Übergangsphase 2 (IV), stationäre Phase (V) und Absterbephase (VI).

Zunächst passen sich die Zellen der neuen Umgebung an und wachsen langsam oder gar nicht (I). Das Wachstum beschleunigt sich allmählich (II) bis hin zu einer exponentiellen Zunahme der Zellen durch eine konstante spezifische Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  (III). Aufgrund von Limitation eines Substrates oder Inhibierung durch die Akkumulation von Stoffwechselprodukten verzögert sich früher oder später das Wachstum (IV) und die Zellkonzentration erreicht einen stationären Zustand, in dem die Zunahme der Zellen dem Absterben der Zellen gleicht (V). Anschließend erfolgt die Absterbephase (VI)

Die exponentielle Phase (III) lässt sich mit der algebraischen Gleichung 3-2 beschreiben. Durch Einsetzen von Gleichung 3-3 in Gleichung 3-1 kann Phase III und IV sowie näherungsweise Phase V in Form einer Differentialgleichung beschrieben werden.

### Zulaufverfahren

Bioreaktoren mit Zulauf sind hinsichtlich ihrer Flüssigphase keine geschlossenen Systeme. Die Prozesse werden in der Regel mit einer relativ geringen Konzentration an Substraten gestartet und durch den Zulauf werden weitere Substrate zugeführt und somit je nach eingestelltem Volumenstrom die metabolische Aktivität der Zellen gesteuert. So kann beispielsweise die Wachstumsrate begrenzt und ein Überflussmetabolismus vermieden werden. Eine solche Limitation kann sich ebenfalls positiv auf die Bildung eines Produkts und die durch den Prozess erzielte Ausbeute auswirken. Aus diesem Grund finden Zulaufverfahren

weite Verbreitung in der industriellen Biotechnologie. Gleichung 3-14 kann für Zulaufverfahren (ohne Ablauf) zu Gleichung 3-16 beziehungsweise Gleichung 3-17 vereinfacht werden.

$$\frac{d(V_R \cdot c_i)}{dt} = V_R \frac{dc_i}{dt} + c_i \frac{dV_R}{dt} = \dot{V}_{\text{ein}} \cdot c_{i,\text{ein}} + r_i \cdot V_R \quad \text{Gleichung 3-16}$$

$$\frac{dc_i}{dt} = \frac{\dot{V}_{\text{ein}}}{V_R} (c_{i,\text{ein}} - c_i) + r_i \quad \text{Gleichung 3-17}$$

Aus Gleichung 3-17 lassen sich Gleichung 3-18 und Gleichung 3-19 für die Zellkonzentration sowie die Substratkonzentration ableiten.

$$\frac{dc_X}{dt} = \frac{\dot{V}_{\text{ein}}}{V_R} c_X + \mu \cdot c_X \quad \text{Gleichung 3-18}$$

$$\frac{dc_S}{dt} = \frac{\dot{V}_{\text{ein}}}{V_R} (c_{S,\text{ein}} - c_S) + q_S \cdot c_X \quad \text{Gleichung 3-19}$$

Unter der Annahme, dass das Reaktionsvolumen durch den Zulauf unwesentlich steigt sowie die Biomassekonzentration nicht nennenswert verdünnt wird und die Substratkonzentration sich nicht ändert, kann aus Gleichung 3-18 und Gleichung 3-19 ein von der Zeit allein abhängiges Zulaufprofil berechnet werden, das eine näherungsweise konstante Wachstumsrate ermöglicht (Gleichung 3-20).

$$\dot{V}_{\text{ein}} = \frac{V_{R,0} \cdot c_{X,0}}{(c_{S,\text{ein}} - c_S)} \cdot \left( \frac{\mu}{Y_{X/S}} + m_S \right) \cdot e^{\mu \cdot t} \quad \text{Gleichung 3-20}$$

In der Praxis hat sich bewährt, eine Wachstumsrate  $\mu_{\text{set}}$  mit dem Zulauf einzustellen, die deutlich geringer ist als die maximale Wachstumsrate. Die Substratkonzentration im Medium ist dabei praktisch Null. Trotz Ungenauigkeiten bei der Bestimmung von Konstanten in Gleichung 3-20 lässt sich eine robuste und gut reproduzierbare Prozessführung erreichen (Jenzsch *et al.* 2006). Es entsteht dabei ein sich selbst einstellendes System, dass ab einem gewissen Zeitpunkt immer dieselbe Konzentration und den selben physiologischen Zustand der enthaltenen Zellen erzielt. Dadurch lassen sich hohe Zelldichten erreichen und dabei Probleme wie eine frühe Sauerstofflimitation oder die Bildung unerwünschter Nebenprodukte minimieren. Unter Vernachlässigung des Erhaltungsstoffwechsels lässt sich Gleichung 3-20 somit weiter vereinfachen zu Gleichung 3-21.

$$\dot{V}_{\text{ein}} = \frac{V_{R,0} \cdot C_{X,0} \cdot \mu_{\text{set}}}{C_{S,\text{ein}} \cdot Y_{X/S}} \cdot e^{\mu_{\text{set}} \cdot t}$$

Gleichung 3-21

### 3.4.3 Reale Rührkesselreaktoren im Labor- und Industriemaßstab

Rührkesselreaktoren in der Bioverfahrenstechnik sind in der Regel zylindrische Behälter aus Glas oder Edelstahl mit einem üblichen Höhe zu Durchmesser Verhältnis von 3:1. Die Behälter sind mit einer rotierenden Welle versehen, welche von oben oder unten mittels einer Wellendichtung in den Kessel eingeführt ist. Die Rührwelle ist je nach Einsatzbereich mit unterschiedlichen Rührertypen ausgestattet. Für die Kultivierung von prokaryotischen Zellen werden in der Regel drei 6-Blattscheibenrührer verwendet. Der Gaseintrag kann durch Einleitung von steriler Luft (oder anderer Gase) über einen Gasverteiler direkt unterhalb des Rührorgans und anschließender Dispersion der Gasblasen durch die Rotation der Rührer erfolgen. Die Reaktoren sind üblicherweise mit Strömungsbrechern versehen zur Verbesserung der Durchmischung. Mittels Wärmetauscher beziehungsweise eines Doppelmantels und einem Temperatursensor kann die Temperatur des Reaktors geregelt werden. Weitere wichtige Regelgrößen im Rahmen der Bioverfahrenstechnik sind der pH und die gelöste Sauerstoffkonzentration ( $pO_2$ ). Diese beiden Prozessvariablen werden häufig mittels Prozess Elektroden gemessen. Der pH kann durch die automatische Zufuhr von sauren oder basischen Salzlösungen geregelt werden und der  $pO_2$  mittels Variation der Rührerdrehzahl und einem demzufolge sich verändernden  $k_L a$ , wie in Kapitel 3.4.2 erläutert. Durch eine angeschlossene Abluftanalytik können Daten über die Konzentration von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid sowie anderen Komponenten im Abgas zur Ermittlung von Informationen über den metabolischen Zustand der Zellpopulation genutzt werden.

Neben dem Satzverfahren ist eine häufig angewendete Betriebsmethode für Rührkesselreaktoren das in Kapitel 3.4.2 erläuterte Zulaufverfahren, mit dem hohe Zelldichten ( $> 100 \text{ g L}^{-1}$ ) und gute Produktivitäten erreicht sowie unerwünschte Nebenproduktbildung vermieden werden können (Weuster-Botz *et al.* 2007).

Das oben beschriebene Design eines Rührkesselreaktors kann abhängig vom Verwendungszweck in vielen Formen variieren, insbesondere im großtechnischen Maßstab. Zudem gibt es noch eine Vielzahl grundsätzlich anderer Bauweisen von Bioreaktoren, die hier nicht näher erläutert werden (Chmiel 2006).

Das Verhalten realer Rührkesselreaktoren kann insbesondere im größeren Maßstab von dem in Kapitel 3.4.2 beschriebenen idealen Rührkesselreaktor abweichen. Die örtliche Unabhängigkeit von Prozessvariablen wie beispielsweise die Stoffkonzentration oder der Druck sind nicht immer gegeben (Fogler 2005).

### 3.4.4 Parallele Kultivierungstechniken

Die Optimierung von Prozessbedingungen ist ein wesentlicher Bestandteil bei der Entwicklung von kommerziellen Bioprozessen. Neben der hohen Anzahl an Prozessvariablen wie zum Beispiel diverse Medienkomponenten kann der Einfluss verschiedener Prozessvariablen von anderen Variablen selbst in Form einer Interaktion abhängen. Dies stellt die Methode der Untersuchung von einer Variablen nach der anderen bei Konstanthalten aller anderen Variablen in Frage und ließe die Möglichkeiten der zu untersuchenden Prozesszustände ins Unermessliche steigen (Weuster-Botz 2000). Selbst eine Auswahl an Prozesszuständen basierend auf statistischer Versuchsplanung lässt sich nur unter hohem Zeit- und Kostenaufwand in üblichen Reaktoren im größeren Maßstab bewerkstelligen.

Aus diesem Grunde haben sich im Rahmen der Bioverfahrenstechnik diverse parallele Kultivierungstechniken in kleinen Reaktoren etabliert, von denen einige hier erläutert werden sollen.

#### Schüttelkolben und weitere parallele Kultivierungssysteme

Schüttelkolben sind die am weitesten verbreiteten parallelen Reaktoren im Rahmen der Bioverfahrenstechnik insbesondere zur Durchführung von Satzverfahren und zeichnen sich durch ihre einfache Handhabung, die kostengünstige Anschaffung und die Möglichkeit der simultanen Inkubation und Durchmischung von mehreren Dutzend Ansätzen innerhalb eines Schüttelinkubators aus (Weuster-Botz 2000). Die Ausführung des Schüttelkolbens (Arbeitsvolumen, Geometrie, Material) sowie die Betriebsweise (Temperatur, Schüttelfrequenz, Füllvolumen, Art der Verschlusskappe) wird abhängig von der Fragestellung variiert (Betts und Baganz 2006).

Es gibt zwar bereits Charakterisierungen der verfahrenstechnischen Eigenschaften von Schüttelkolben (Maier *et al.* 2004; Weuster-Botz 2006), jedoch kommt es aufgrund prozesstechnischer Einschränkungen wie einem geringen Sauerstoffeintrag durch die Oberflächenbegasung, der fehlenden Möglichkeit zur Gestaltung eines Zulaufprozesses sowie der Messung und Regelung des pH oder der Notwendigkeit einer manuellen Probenahme zu Schwierigkeiten bei der Übertragung der unkontrollierten Satzexperimente in kontrollierte Zulaufverfahren größeren Maßstabs (Hortsch und Weuster-Botz 2010a).

Aus diesem Grund wurden parallele Systeme entwickelt, im Rahmen derer beispielsweise die Regelung des pH oder die Möglichkeit eines Zulaufs in das System des herkömmlichen Schüttelkolbens integriert wurde (Weuster-Botz *et al.* 2001; Betts und Baganz 2006). Die Parallelisierung solcher Systeme mit mehr als 16 Reaktoreinheiten gestaltet sich jedoch schwierig (Weuster-Botz *et al.* 2007).

Es existieren eine Vielzahl an anderen nicht gerührten Reaktoren im Milliliter- und Mikrolitermaßstab (Kumar *et al.* 2004; Betts und Baganz 2006; Fernandes und Cabral 2006; Schapper *et al.* 2009) wie beispielsweise modifizierte Mikrotiterplatten oder miniaturisierte Blasensäulen. Die Systeme zeichnen sich durch verschiedenste Entwicklungsstufen bezüglich der Regelungs- und Automatisierungsmöglichkeit aus. Häufig wird ein kleineres Reaktionsvolumen mit einer verminderten Übertragbarkeit in größere Maßstäbe erkauft. Nicht immer sind die entsprechenden Reaktoren jedoch dafür vorgesehen, die Ergebnisse direkt in größere Maßstäbe übertragen zu können.

### Miniaturisierte Rührkesselreaktoren

Verschiedene Systeme miniaturisierter Rührkesselreaktoren wurden entwickelt, die tendenziell eine verbesserte Übertragbarkeit der evaluierten Prozessbedingungen in größere Maßstäbe ermöglichen (Hortsch und Weuster-Botz 2010a).

Hinsichtlich Automatisierung und Parallelisierung ist nach (Micheletti und Lye 2006) eines der fortgeschrittensten Systeme das in (Puskeiler und Weuster-Botz 2004; Puskeiler *et al.* 2005a; Puskeiler *et al.* 2005b; Weuster-Botz *et al.* 2005) beschriebene parallele Rührkesselreaktorsystem, welches bereits im Rahmen mehrerer Studien verwendet beziehungsweise weiterentwickelt wurde (Knorr *et al.* 2007; Kusterer *et al.* 2008; Vester *et al.* 2009; Hortsch *et al.* 2010; Hortsch und Weuster-Botz 2010b; Hortsch *et al.* 2011; Hortsch und Weuster-Botz 2011). Hinsichtlich der Möglichkeit zur Maßstabsvergrößerung wurden die Milliliter Rührkesselreaktoren ebenfalls bereits charakterisiert (Hortsch und Weuster-Botz 2010b). Dieses System wurde auch in dieser Arbeit verwendet und soll daher an dieser Stelle näher erläutert werden.

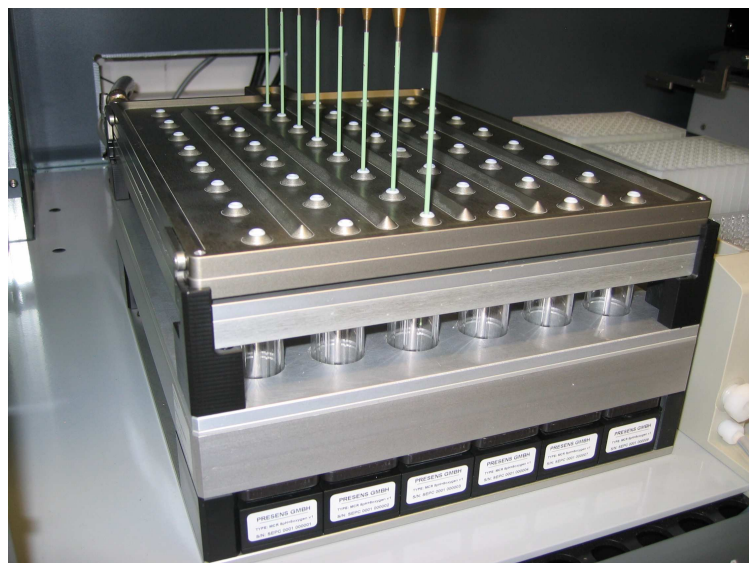


Abbildung 3-10: 48 parallele Milliliter Rührkesselreaktoren nach (Kusterer *et al.* 2008).

Bis zu 48 Einweg-Reaktoren aus Polystyrol mit einem Nutzvolumen von 8 - 15 mL, die am Boden mit optischen chemischen Sensoren für pH und  $pO_2$  versehen sind, können in einem Bioreaktorblock parallel betrieben werden (Abbildung 3-10). Über die Reaktoren wird eine autoklavierbare Sterilgasabdeckung positioniert, die mit 48 auf Hohlachsen gelagerten Rührorganen versehen ist, welche über ein zentrales magnetisch-induktives Antriebssystem innerhalb des Reaktorblocks in eine Drehbewegung versetzt werden können ( $500 - 3000 \text{ U min}^{-1}$ ). Durch genügend hohe Rotation der speziell entworfenen Rührorgane ( $\sim 1800 \text{ U min}^{-1}$ ) wird über die Hohlachse steriles Gas vom Kopfraum in die Medien eingebracht. Durch diese Form der Gasinduktion können  $k_{La} > 0,4 \text{ s}^{-1}$  und somit vergleichbare beziehungsweise höhere Werte wie für Rührkesselreaktoren im Labor- und Industriemaßstab erreicht werden (Puskeiler *et al.* 2005a). Die Kopfräume aller Reaktoren werden integral über die Sterilgasabdeckung mit steriler Luft oder anderen Gasen versorgt, welches über die Öffnungen für Probenahme wieder austritt und so Kontaminationen über die Öffnungen vermeidet. Der Bioreaktorblock ist mit zwei Wärmetauschern versehen, mit Hilfe deren die Temperatur im Flüssigkeitsraum der Reaktoren geregelt und die Verdampfung im Kopfraum reduziert werden können. Des Weiteren ist der Bioreaktorblock mit einem System zur Rührerausfallerkennung versehen. Die an den Reaktorböden immobilisierten chemischen Sensoren für die Messung von pH und  $pO_2$  können mittels optosensorischer Einheiten, die unter den Reaktoren positioniert sind, mit einem Lichtblitz bei spezifischer Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt werden. Das Abklingverhalten des Fluoreszenzsignals steht in Beziehung zum jeweiligen Analyten beziehungsweise dessen Konzentration. Mittels einer Einbindung in einen Laborautomaten (vergleiche Abbildung 3-10 und Abbildung 4-2) und die Verwendung einer Prozessleitsoftware kann das System beispielsweise hinsichtlich Datenaufzeichnung, Probenahme, pH Kontrolle sowie intermittierender Substratzufuhr automatisiert werden.

### **Messung von pH und $pO_2$ in miniaturisierten Rührkesselreaktoren**

Anstatt von Prozesselektroden kommen in den hier verwendeten miniaturisierten Rührkesselreaktoren die bereits erwähnten nicht invasiven optischen Messverfahren für die Bestimmung des  $pO_2$  und des pH zum Einsatz, die im Folgenden näher erläutert werden.

Die  $pO_2$ -Messung beruht auf unterschiedliche Abklingzeiten eines Luminophores abhängig von der Sauerstoffkonzentration. Ein Luminophor aus dem  $pO_2$ -Sensor wird durch einen Lichtpuls (505 nm) angeregt und das emittierte Fluoreszenzsignal (580 nm) gemessen. Die Abklingzeit des emittierten Lichtsignals variiert dabei abhängig von der Sauerstoffkonzentration. Mittels einer Phasenmodulation wird die Abklingzeit in eine Phasenverschiebung umgerechnet. Bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen entstehen starke Phasenverschie-

bungen. Je höher der  $pO_2$  in der Kultivierungslösung ist, desto stärker wird die Phasenverschiebung verringert (siehe Abbildung 3-11). Diese Phasenverschiebung wird mit einer Referenz, die durch die Messung eines LED-Pulses durch den Detektor generiert wird, abgeglichen. Auf diese Weise kann die Sauerstoffkonzentration für jeden Reaktor mehrmals pro Minute bestimmt und aufgezeichnet werden (Weuster-Botz *et al.* 2005).

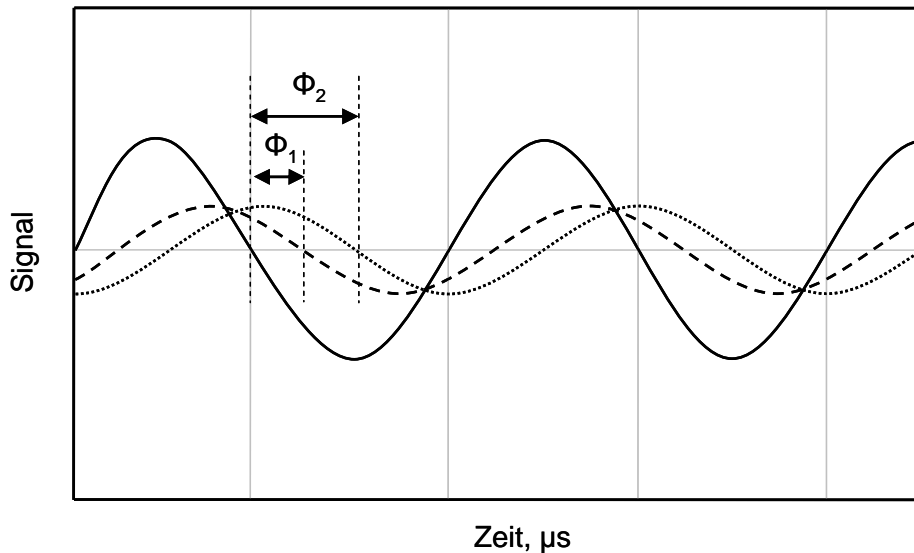


Abbildung 3-11: Prinzip der  $pO_2$ -Messung durch die Erfassung der Phasenverschiebung (Weuster-Botz *et al.* 2005). Niedrige  $pO_2$  führen zu starken ( $\Phi_2$ , gepunktete Linie), hohe  $pO_2$  zu geringen Phasenverschiebungen ( $\Phi_1$ , gestrichelte Linie) im Vergleich zum Referenzsignal (durchgezogene Linie).

Die Messung des pH-Wertes wird nach der Methode des „Dual-Lifetime-Referencing“ (DLR) durchgeführt (Kocincová 2007; Kusterer 2007). Bei diesem Verfahren sind zwei verschiedene Luminophore in die entsprechenden Sensoren eingelassen. Das eigentliche pH-sensitive Luminophor hat eine kurze Abklingzeit während das nicht-sensitive Referenz-Luminophor eine wesentlich längere Abklingzeit und folglich praktisch keine Abhängigkeit vom pH aufweist. Da beide Luminophore stark überlappende Absorptions- und Emissionsspektren haben, können sie bei einer Wellenlänge gemeinsam angeregt und das überlappende Fluoreszenzsignal bei einer anderen Wellenlänge ausgelesen werden. Das gemessene Antwortsignal hängt vom Verhältnis des variablen Indikator- und des konstanten Referenzsignals ab. Abhängig von der Amplitude des Indikatorsignals verändert sich somit die Phasenverschiebung des Gesamtsignals, wie in Abbildung 3-12 skizziert ist. Anhand der zeitlich aufgelösten Phasenverschiebungen kann somit eine Korrelation zum pH-Wert erstellt werden, die einen sigmoidalen Verlauf hat.

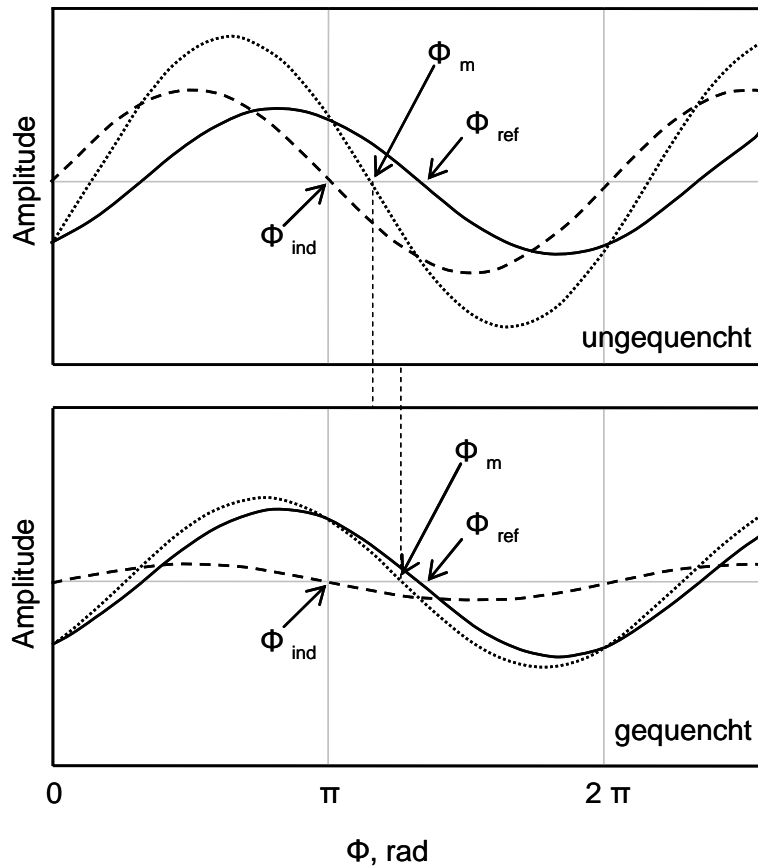


Abbildung 3-12: Prinzip der pH-Messung nach der Dual-Lifetime-Referencing (DLR) Methode. Das variable Indikatorsignal ( $\Phi_{\text{ind}}$ , gestrichelte Linie) und das konstante Referenzsignal ( $\Phi_{\text{ref}}$ , durchgezogene Linie) produzieren mittels Superposition das eigentliche Messsignal ( $\Phi_{\text{m}}$ , gepunktete Linie). Die Abbildung zeigt ein Beispiel für einen ungequenchten (hohe Amplitude von  $\Phi_{\text{ind}}$ ) und einen durch den Analyten gequenchten Zustand (geringe Amplitude von  $\Phi_{\text{ind}}$ ).



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Mikroorganismen, Stammkulturherstellung, Vektoren und gentechnische Arbeiten

#### 4.1.1 *Cupriavidus necator*

*Cupriavidus necator* H16 PHB-4 (DSM 541; Schlegel *et al.* 1970) und *Cupriavidus necator* H16  $\Delta phaC1$  (Peplinski *et al.* 2010) wurden vom Kooperationspartner Evonik Degussa (Marl) bereitgestellt. Beide Mikroorganismen tragen den Vektor pBBR1MCS-2::meaBhcmA-hcmB (im Folgenden pBBR1MCS-2::HCM genannt). Das Plasmid basiert auf dem „broad-host-range“ Vektor pBBR1MCS mit einer Kanamycin Resistenz (Kovach *et al.* 1995) und beinhaltet die Gene *hcmA* und *hcmB* von *Aquicola tertiarycarbonis* (auch als *icmA* und *icmB* bezeichnet; Rohwerder *et al.* 2006; Reinecke *et al.* 2009), welche für die beiden Untereinheiten der 2-Hydroxyisobutyryl-CoA Mutase kodieren. Des Weiteren enthält der Vektor ein Gen für eine zu einem MeaB-Protein homologe Proteinsequenz (Korotkova und Lidstrom 2004), durch dessen Expression die 2-Hydroxyisobuttersäure Produktion verbessert wird (Reinecke *et al.* 2011). Die Expression von *meaB* und *hcmA* erfolgt in Form eines Fusionsproteins. Die Gene sind über die Schnittstellen NsiI/Spel und Spel/SacI in die Plasmide kloniert.

#### 4.1.2 *Escherichia coli*

Im Laufe dieses Projekts wurden unterschiedliche gentechnisch veränderte *E. coli* Stämme basierend auf dem Basisstamm *Escherichia coli* K-12 MG1655 ( $F^- \lambda^-$ ) konstruiert und charakterisiert. Die gentechnischen Methoden umfassten die Deletion einzelner Gene, die stabile (chromosomale) Integration von rekombinanten Genen sowie die Überexpression verschiedener Gene mittels eines Plasmides. Die in dieser Arbeit verwendeten prinzipiellen Strategien zur Saccharoseaufnahme sowie die verfolgten Ansätze zur Verbesserung der Bernsteinsäureproduktion in gentechnisch veränderten *E. coli* Stämmen sind in Abbildung 4-1 zusammengefasst.

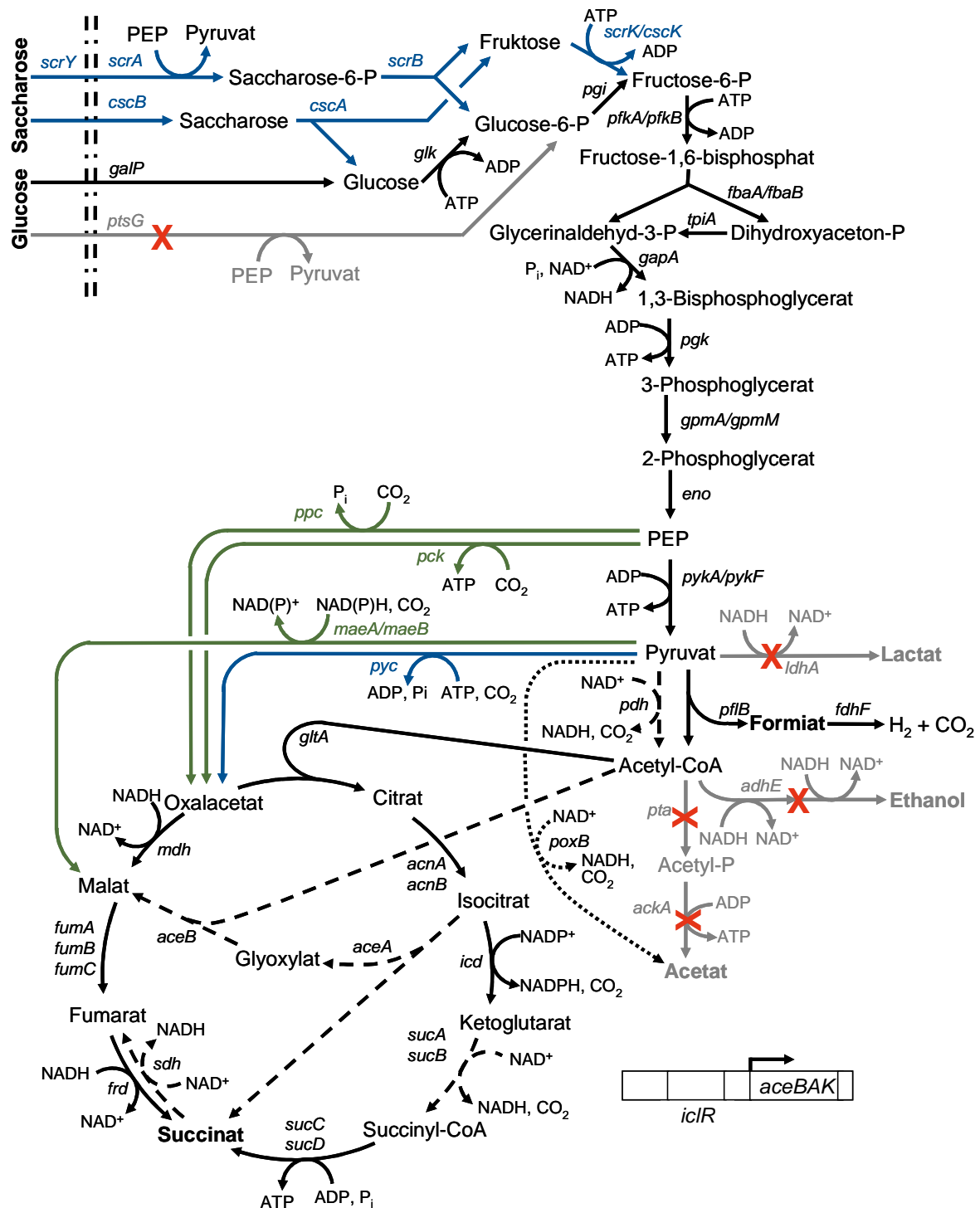


Abbildung 4-1: Gentechnische Veränderungen im Rahmen dieses Projektes zur Erzeugung von Saccharose verwertenden *E. coli* Stämmen zur Bernsteinsäureproduktion (siehe Abbildung 3-1 für Erläuterungen zu der Darstellung). Homologe Überexpressionen sind grün, heterologe Expressionen blau und inaktivierte Stoffwechselwege grau dargestellt. Gendeletionen sollen die Produktion von Lactat ( $\Delta ldhA$ ), Ethanol ( $\Delta adhE$ ) sowie Acetat ( $\Delta ack-pta$ ) minimieren. Anaplerotische Reaktionen sollen durch homologe Überexpressionen (*pck*, *ppc*, *maeA* oder *maeB*) oder die heterologe Überexpression einer Pyruvatcarboxylase (*pyc*) verstärkt werden. Die Integration eines Saccharoseaufnahme- und Verwertungsoperons (*scrY*, *scrA*, *scrB* und *scrK* oder *cscA*, *cscB* und *cscK*) soll die Verwendung des Zweifachzuckers ermöglichen (siehe Text für Details). Durch Inaktivierung von *ptsG* ist die Glucoseaufnahme und Verwertung beeinflusst.

Die vom Kooperationspartner Evonik Degussa durchgeführten Deletionen sowie die stabilen Integrationen verschiedener Gene führten zu gentechnisch veränderten *E. coli* Stämmen, die als Wirtsorganismen für die Transformation verschiedener Plasmide dienten und unter Angabe der im Text verwendeten Kurzbezeichnung in Tabelle 11-1 (Anhang) zusammengefasst sind. Die Eigenschaften der Wirtsorganismen sollen hier kurz erläutert werden.

Als *E. coli* (wt) wird der verwendete Basisstamm *Escherichia coli* K-12 MG1655 bezeichnet, ein ausführlich charakterisierter und häufig eingesetzter Organismus für die Herstellung von Produkten aus nachwachsenden Rohstoffen (Lee *et al.* 2010).

In *E. coli*  $\Delta 3$  sind die Gene für die Lactatdehydrogenase (*ldhA*), die Alkoholdehydrogenase (*adhE*) sowie die Acetatkinase und Phosphotransacetylase (*ack-pta*) durch Deletionsmutationen ausgeschaltet.

*E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  hat neben den oben genannten drei Deletionen zusätzlich eine Inaktivierung der Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase (*ygfG*, in Abbildung 4-1 nicht dargestellt). Ein Gen für das glucosespezifische Phosphotransferasesystem (*ptsG*) wurde per Insertion durch ein Saccharose Operon (*scr*) zur Verwertung des Zweifachzuckers ersetzt. Das Operon umfasst die Gene für ein saccharosespezifisches Phosphotransferasesystem (*scrA*), eine Saccharose-6-phosphat Invertase (*scrB*), eine Saccharose Permease (*scrY*) sowie eine Fructosekinase (*scrK*) aus *Salmonella typhimurium* (Schmid *et al.* 1982; Hardesty *et al.* 1987; Schmid *et al.* 1988). Die stabile Integration des Saccharose Aufnahme- und Verwertungsoperons erfolgte ohne Repressor (*scrR*).

Die Transformation der Wirtsorganismen wurde entweder von dem Kooperationspartner Evonik Degussa durchgeführt oder erfolgte im Rahmen dieser Arbeit wie im Folgenden beschrieben. Alle transformierten Organismen und deren in der Arbeit verwendeten Kurzbezeichnungen sind in Tabelle 11-2 aufgelistet. Die verwendeten Vektoren mit den entsprechenden kodierten Proteinen sind in Tabelle 11-3 zusammengefasst. Unabhängig von der Quelle wurde jeder transformierte *E. coli* mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf das Vorhandensein der entsprechenden Plasmide überprüft.

Einige *E. coli* Stämme wurden je mit einem Plasmid transformiert, das jeweils ein Gen für ein Enzym zur Verwirklichung oder Verbesserung einer anaplerotischen CO<sub>2</sub>-fixierenden Reaktion trägt. Eine höhere Produktivität sowie Ausbeute für Bernsteinsäure wird durch diese Überexpressionen angestrebt. Die homologen Enzyme Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (*pck*), Phosphoenolpyruvatcarboxylase (*ppc*), zwei verschiedene decarboxylierende Malatdehydrogenasen (*maeA*, *maeB*) sowie drei heterologe Pyruvatcarboxylasen wurden im Rahmen dieser Studie untersucht. Die Pyruvatcarboxylasen stammten aus *Corynebacterium glutamicum* (Peters-Wendisch *et al.* 1997; Peters-Wendisch *et al.* 1998), *Lactococcus lactis* (Sanchez *et al.* 2006) sowie *Rhizobium etli* (Jitrapakdee und Wallace 1999; Maurice *et al.*

2007; Jitrapakdee *et al.* 2008). Für die Expression dieser Gene wurde der Vektor pEC-XC99E verwendet. Das Plasmid ist ein *E. coli* - *Corynebacterium glutamicum* Shuttle-Vektor mit einer Größe von 6956 bp (GenBank Nummer: AY219682) und basiert auf dem „medium copy number“ Plasmid pGA1 (Kirchner und Tauch 2003). Darauf dem Plasmid enthaltene *trc* Promoter ähnelt dem *tac* Promoter und kann mit IPTG induziert werden (Brosius *et al.* 1985; Terpe 2006). Der Vektor vermittelt eine Chloramphenicol Resistenz.

Neben der stabilen Integration eines Saccharose Aufnahme- und Verwertungsoperons wurde in einigen Stämmen die Saccharoseverwertung durch Transformation eines Plasmides mit den entsprechenden Genen ermöglicht. Zwei unterschiedliche Systeme zur Saccharoseaufnahme standen zur Verfügung. Neben dem bereits oben beschriebenen *scr* Operon aus *Salmonella typhimurium* (ohne Repressor) kam das *csc* Operon aus *E. coli* EC3132 zum Einsatz (Bockmann *et al.* 1992; Jahreis *et al.* 2002). Das Operon umfasst die Gene für einen Saccharose/H<sup>+</sup> Symporter (*cscB*), eine Saccharose Invertase (*cscA*) sowie eine Fructosekinase (*cscK*). Die Konstruktion dieses Vektors erfolgte ebenfalls ohne Repressor (*cscR*). Der pCOLADuet-1-Vektor wurde für die Expression der beiden Operons verwendet, welcher eine Kanamycin Resistenz vermittelt.

### 4.1.3 Stammhaltung

Zur Herstellung von Stammkulturen für *Cupriavidus necator* sowie *E. coli* wurden 50 mL LB-Medium in einem 500 mL Schüttelkolben mit einer Kolonie des jeweiligen Stammes von einer LB-Agarplatte oder mit 50  $\mu$ L einer früheren Stammkultur beimpft und über Nacht (15 h) im Schüttelinkubator kultiviert (37 °C, 250 U min<sup>-1</sup>). Ein Volumen von 40 mL dieser Kultur wurde zu 10 mL einer sterilen Glycerin/Wasser Mischung (0,8 g<sub>Glycerin</sub> g<sub>Lösung</sub><sup>-1</sup>) gegeben. Die Suspension wurde in sterilen Eppendorf Reaktionsgefäßen aliquotiert und anschließend als Stammkultur bei -80 °C gelagert.

### 4.1.4 Chemisch kompetente Zellen und Transformation

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen von *E. coli* wurden 100 mL LB-Medium in einem 500 mL Schüttelkolben mit 5 % (v/v) einer Übernachtskultur des jeweiligen Stammes beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,6 im Schüttelinkubator kultiviert (37 °C, 250 U min<sup>-1</sup>). Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (3220 g, 4 °C, 10 min) vom Medium getrennt, in 40 mL eisgekühltem TFB1-Puffer resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneutem Separieren durch Zentrifugation (3220 g, 4 °C, 10 min) wurden die Zellen in 4 mL TFB2-Puffer resuspendiert und für weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert.

Schließlich wurden die chemisch kompetenten Zellen in sterilen Eppendorf Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

Für die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurde  $1\text{ }\mu\text{L}$  der vom Kooperationspartner bereitgestellten Plasmid Lösung zu  $50\text{ }\mu\text{L}$  der frisch aufgetauten kompetenten Zellen gegeben. Die Lösung wurde kurz durchmischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein kurzer Hitzeschock durchgeführt ( $42\text{ °C}$ , 90 s). Nach einer Zugabe von  $600\text{ }\mu\text{L}$  sterilem LB-Medium wurde die Lösung 45-60 min inkubiert ( $37\text{ °C}$ ,  $200\text{ U min}^{-1}$ ). Es folgte ein Ausstrich von  $100\text{ }\mu\text{L}$  der Kultur auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ( $50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Die übrig bleibende Zellsuspension wurde durch kurze Zentrifugation ( $800\text{ g}$ , 1 min) und anschließendem Verwerfen des Überstands bis auf etwa  $100\text{ }\mu\text{L}$  sowie dem Resuspendieren der Zellen in der verbleibenden Flüssigkeit aufkonzentriert. Es erfolgte ein weiterer Ausstrich auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum. Beide LB-Agarplatten wurden nach 25 stündiger Inkubation für die Wahl einer geeigneten transformierten Kolonie in Betracht gezogen.

Die Co-Transformation mittels zweier Plasmide erfolgte nach einem leicht modifizierten Protokoll. Es wurden je  $2\text{ }\mu\text{L}$  der Plasmid Lösungen zu  $50\text{ }\mu\text{L}$  der frisch aufgetauten kompetenten Zellen gegeben. Die LB-Agarplatten wurden mit einer geringeren Konzentration beider Selektionsantibiotika hergestellt (je  $15\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

#### **4.1.5 Nachweis der erfolgreichen Transformation durch PCR**

Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde ein Teil einer Kolonie (beziehungsweise alternativ  $5\text{ }\mu\text{L}$  Stammkultur) aufgenommen und in  $50\text{ }\mu\text{L}$  sterilem demineralisiertem Wasser suspendiert. Zur Freisetzung zellulärer DNA wurde der resultierende Ansatz für 5 Minuten bei  $95\text{ °C}$  aufgeschlossen und die Zellbruchstücke in einer Zentrifuge ( $15000\text{ g}$ , 5 min) sedimentiert. Vom Überstand wurden  $2\text{ }\mu\text{L}$  als DNA-Template in der durchgeführten PCR eingesetzt.

Die einzelnen Komponenten der PCR sind in Tabelle 4-1 angegeben. Die Durchführung erfolgte nach dem in Tabelle 4-2 angegebenen Protokoll. Alle verwendeten spezifischen Oligonukleotide (Primer) sind im Anhang angegeben.

Tabelle 4-1: Zusammensetzung der PCR-Ansätze.

Komponente	Konzentration	Volumen, $\mu\text{L}$
ThermoPol Reaktionspuffer	10x	2,0
Primer I (fwd)	10 $\mu\text{M}$	1,0
Primer II (rev)	10 $\mu\text{M}$	1,0
dNTP-Mix	10 mM	0,4
Demineralisiertes Wasser	-	13,4
DNA-Template	-	2,0
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	5 U $\mu\text{L}^{-1}$	0,2

Tabelle 4-2: Verwendetes PCR-Protokoll.

Schritt	Bedingungen	Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C, 2 min	1x
Denaturierung	94 °C, 30 s	37x
Primerhybridisierung	55-57 °C, 2 min	
Elongation	72 °C, 45-75 s	
Finale Elongation	72 °C, 10 min	1x

Um die Größe der enthaltenen Amplifikate zu überprüfen, wurden die PCR-Produkte (20  $\mu\text{L}$ ) mit 5  $\mu\text{L}$  Ladepuffer versetzt und auf Agarosegele (1-1,5% Agarose, 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Ethidiumbromid) geladen. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde zudem 1  $\mu\text{g}$  eines DNA-Standards aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte bei 120 V für 75-120 Minuten in TEA Puffer.

## 4.2 Parallele Kultivierungen im Millilitermaßstab

Die parallele Kultivierung im Millilitermaßstab erfolgte in einem am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik entwickelten 48-fach Parallelbioreaktorsystem (siehe Abbildung 3-10 in Kapitel 3.4.4). Der grundsätzliche Aufbau und die Funktionsweise werden im Folgenden erläutert. Die spezifischen Einstellungen und Vorgehensweisen für die Kultivierungen von *Cupriavidus necator* sowie *E. coli* werden in Kapitel 4.3 sowie Kapitel 4.4 beschrieben.

Die Automatisierung der Bioprozesse erfolgte mit einem Laborroboter und dem in Abbildung 4-2 dargestellten experimentellen Aufbau.

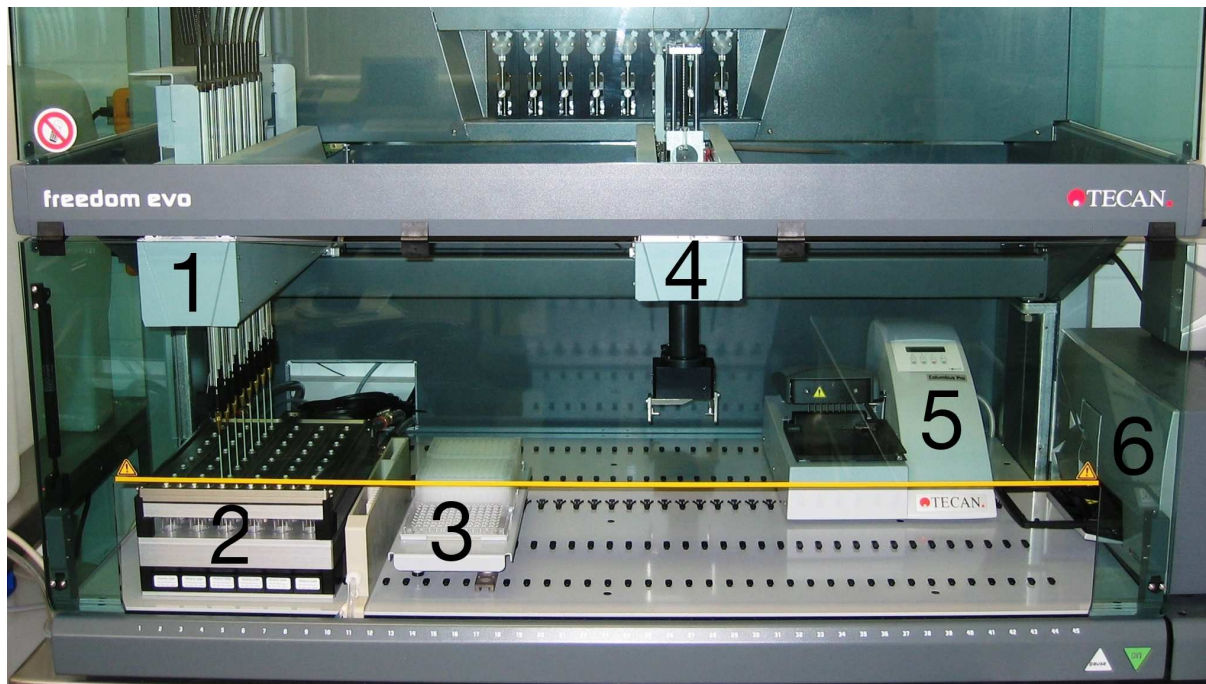


Abbildung 4-2: Experimenteller Aufbau des Parallelbioreaktors nach (Hortsch und Weuster-Botz 2010a): Pipettierarm (1), Bioreaktorblock (2), Träger für Vorlagengefäße und Mikrotiterplatten (3), Roboterarm zum Transport von Mikrotiterplatten (4), Waschstation für Mikrotiterplatten (5) und Photometer für Mikrotiterplatten (6).

#### 4.2.1 Prozesskontrolle und -automatisierung

Der Laborroboter und Peripheriegeräte wurden mit mehreren Programmen gesteuert (Abbildung 4-3). Die Prozessleitung und Kontrolle, beispielsweise die Verwaltung der Rührerneustarts oder die pH Regelung, erfolgte mit dem Programm Fedbatch-XP. Für die direkte Steuerung des Laborroboters wurde das Programm Gemini, welches über die Schnittstelle FBXServer von Fedbatch-XP angesteuert wird, verwendet.

Gemini erhält entweder regelmäßige Aufträge in Form von vordefinierten Skripten (zum Beispiel zyklische Probenahmen) oder bekommt unregelmäßige Aufträge je nach Bedarf durch das ständige Erneuern und Beauftragen einer „Worklist“ (zum Beispiel Zudosierung von Substraten). Mit Hilfe des Pipettierarms mit acht Pipettiernadeln und dem Roboterarm zum Transport von Mikrotiterplatten ermöglicht das System die individuelle Substratzufuhr (eingestelltes Mindestvolumen: 10  $\mu$ L) und Beprobung aller 48 Reaktoren.

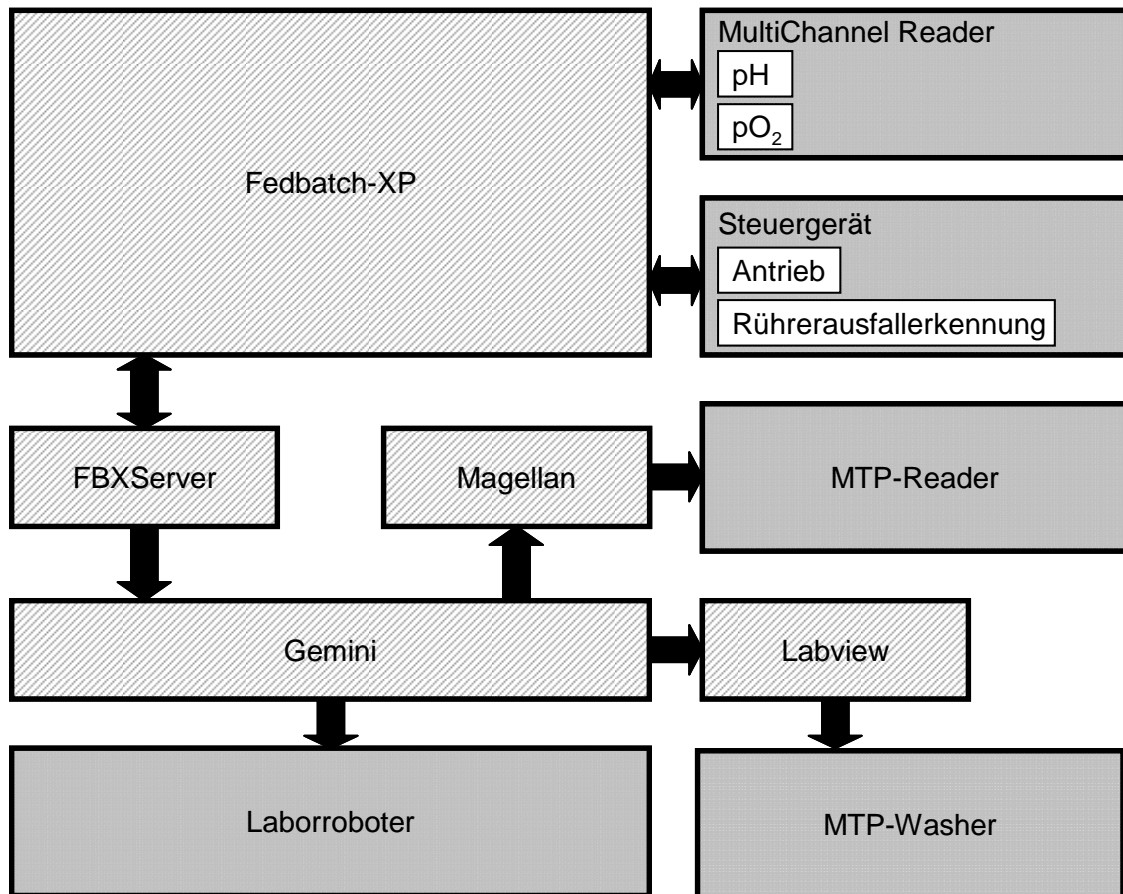


Abbildung 4-3: Prozessleitsystem der Milliliter Rührkesselreaktoren. Roboter und Peripheriegeräte (▢) werden durch mehrere Softwares (▣) gesteuert beziehungsweise geregelt. Siehe Text für Details.

Die Zelldichte konnte automatisch „at-line“ in Mikrotiterplatten durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) verfolgt werden. Hierfür wurden je 40  $\mu\text{L}$  Zellsuspension aus den Reaktoren entnommen und 20  $\mu\text{L}$  dieser Proben mit 180  $\mu\text{L}$  Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) verdünnt. Die optische Dichte wurde mit einem Photometer für Mikrotiterplatten und einer passenden Software (Magellan) ermittelt. Mikrotiterplatten wurden mit Hilfe einer Waschstation gereinigt und während des Prozesses wieder verwendet. Durch Regression mit einem Polynom zweiten Grades konnte die ermittelte  $OD_{600}$  in Mikrotiterplatten in resultierende Biotrockenmassekonzentrationen überführt werden (als Vergleich zum Litermaßstab).

#### 4.2.2 Parallele pH und pO<sub>2</sub> Messung sowie Regelung des pH

Mit Hilfe von sechs optosensorischen Einheiten wurde der pH und pO<sub>2</sub> aller 48 Reaktoren individuell gemessen. Die optosensorischen Einheiten verfügen jeweils über acht zur Fluoreszenz anregenden Lichtquellen und acht Detektoren für die pH Messung und



entsprechend acht zur Fluoreszenz anregenden Lichtquellen und acht Detektoren für die pO<sub>2</sub> Messung.

Die Kontrolle des pH unter Verwendung von Fedbatch-XP erfolgte über die Dauer des Projektes mit unterschiedlichen Einstellungen des Reglers. Beste Ergebnisse wurden mit den in Tabelle 4-3 angegebenen Parametern erzielt. Ein Toleranzband („Deadband“) verursachte starke Schwingungen in der Regelgröße und wurde deshalb auf Null reduziert. Der differentielle Term T<sub>d</sub> des Reglers könnte unvorhersehbare Auswirkungen haben aufgrund des sprunghaften Verlaufs des pH durch die intermittierende Zugabe des Korrekturmittels und wurde deshalb ebenfalls auf Null gesetzt. Eine Erläuterung der verschiedenen Einstellungsmöglichkeiten des Reglers ist an anderer Stelle erläutert (Kusterer 2007).

Tabelle 4-3: Parameter des Reglers zur pH Regelung in Fedbatch-XP. Die Zugabe der Korrekturmittel erfolgte intermittierend mit Volumina von mindestens 10 µL.

P, % pH <sup>-1</sup>	100
Deadband, pH	0
T <sub>i</sub> , s	4000
T <sub>d</sub> , s	0
AntiWindUp	5
DOutMax, µL h <sup>-1</sup>	500
ROutMax, µL h <sup>-1</sup>	500

Für jede neue Charge Einweg-Reaktoren erfolgte eine Kalibrierung der pO<sub>2</sub> und pH Sensoren.

### 4.2.3 Kalibrierung der Sensoren

Die Kalibrierung der Sauerstoffsensoren erfolgte durch eine Zweipunktbestimmung im verwendeten Medium bei Betriebstemperatur. Der pO<sub>2</sub> (% Sauerstoffsättigung) wird durch die Software Fedbatch-XP über eine empirische Gleichung (von der sogenannten Stern-Volmer-Gleichung abgeleitet) mit dem Messsignal Φ korreliert:

$$pO_2 = 100 \cdot \frac{1 - \frac{\tan(\phi)}{\tan(\phi_0)}}{K_{SV} \cdot \left( \frac{\tan(\phi)}{\tan(\phi_0)} - 0,11 \right)} \quad K_{SV} = \frac{1 - \frac{\tan(\phi_{100})}{\tan(\phi_0)}}{\left( \frac{\tan(\phi_{100})}{\tan(\phi_0)} - 0,11 \right)} \quad \text{Gleichung 4-1}$$

Die Koeffizienten  $\Phi_0$  und  $\Phi_{100}$  (Einheit: Radiant, rad oder Grad, °) in Gleichung 4-1 wurden unter sauerstofffreien beziehungsweise sauerstoffgesättigten Bedingungen bestimmt. Sauerstofffreie Bedingungen wurden durch eine Begasung mit  $4,8 \text{ L min}^{-1}$  Stickstoff und einer Rührerdrehzahl von  $2800 \text{ U min}^{-1}$  realisiert. Sauerstoffgesättigte Bedingungen wurden durch eine Begasung mit  $4,8 \text{ L min}^{-1}$  Luft und einer Rührerdrehzahl von  $2800 \text{ U min}^{-1}$  erreicht. Für beide Betriebszustände wurde eine Zeitspanne von 30 min für das Erreichen eines konstanten Messsignals vorgesehen. Der Mittelwert aus der Bestimmung in mehreren Reaktoren wurde für die Ermittlung von  $\Phi_0$  und  $\Phi_{100}$  verwendet.

Abbildung 4-4 zeigt ein Beispiel für eine Bestimmung des  $pO_2$  nach Kalibrierung mit den Werten 22 für  $\Phi_{100}$  und 50 für  $\Phi_0$ . Zur Überprüfung wurde die Sauerstoffkonzentration im Medium durch Reduktion des Sauerstoffgehaltes in der Gasphase von 20,95 % auf 0 % mit einer Gasmischstation variiert. Mittels Gleichung 4-2 kann jedem gemessenen  $\Phi$  ein realer Wert der Sauerstoffkonzentration im Medium zugeordnet werden:

$$pO_2 = C_{O_2, \text{Gasphase}} \cdot \frac{100}{20,95} \quad \text{Gleichung 4-2}$$

Aus Abbildung 4-4 wird deutlich, dass die Bestimmung der Sauerstoffkonzentration durch Fedbatch-XP mittels Gleichung 4-1 hinreichend genau mit der realen Sauerstoffkonzentration übereinstimmt.

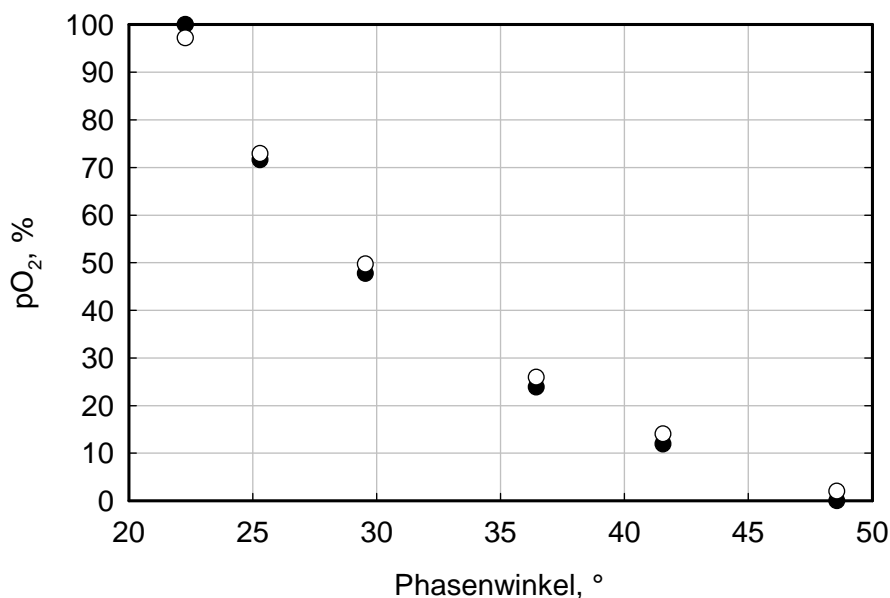


Abbildung 4-4: Sauerstoffkonzentration ( $pO_2$ ) im Medium als Funktion des gemessenen Phasenwinkels  $\Phi$  durch Berechnung mit Gleichung 4-1 (○) sowie durch Berechnung über die reale Konzentration in der Gasphase mit Gleichung 4-2 (●).

Der Zusammenhang zwischen dem gemessenen Phasenwinkel  $\Phi$  und dem resultierenden pH zeigt einen sigmoidalen Verlauf, der mit einer sogenannten Boltzmann-Funktion approximiert wird.

$$\phi = \frac{\phi_{\min} - \phi_{\max}}{1 + \exp\left(\frac{\text{pH} - \text{pH}_0}{\text{dpH}}\right)} + \phi_{\max} \quad \text{Gleichung 4-3}$$

Die Bestimmung der vier Koeffizienten  $\Phi_{\min}$ ,  $\Phi_{\max}$ ,  $\text{pH}_0$  und  $\text{dpH}$  erfolgte durch Messung des Phasenwinkels  $\Phi$  bei mindestens acht unterschiedlichen pH zwischen pH 5 und pH 8 im verwendeten Medium bei Betriebstemperatur. Unterschiedliche pH wurden mit NaOH und  $\text{H}_2\text{SO}_4$  eingestellt.

Die Rührkesselreaktoren wurden unter experimentellen Bedingungen betrieben und nach dem Erreichen eines konstanten Messsignals (30 - 90 min) wurden die entsprechenden Werte für  $\Phi$  notiert. Der reale pH wurde anschließend mit einer Laborelektrode erneut genau bestimmt. Ein Tabellenkalkulationsprogramm wurde verwendet um Gleichung 4-3 durch Variation von  $\Phi_{\min}$ ,  $\Phi_{\max}$ ,  $\text{pH}_0$  und  $\text{dpH}$  den ermittelten Wertepaaren ( $\Phi$ , pH) mittels der Methode der kleinsten Quadrate anzupassen.

#### 4.2.4 Inbetriebnahme

Vor Inbetriebnahme wurden die Reaktoren unter der Sterilbank aus der Sterilverpackung entfernt, in den Bioreaktorblock gesteckt und mit Medium befüllt. Anschließend erfolgte gegebenenfalls bereits die Inokulation durch Zugabe der Zellsuspension. Die autoklavierte Sterilgasabdeckung wurde auf den Bioreaktorblock gesetzt und befestigt. Für die Inbetriebnahme wurde der Bioreaktorblock auf den vorgesehenen Platz beim Pipettierroboter gesetzt und mit allen notwendigen Anschlüssen versehen (Kreislauf für Temperierung und Kopfraumkühlung, Antrieb, Gaszufuhr, Rührerausfallerkennung). Eine kontinuierliche Gaszufuhr im Kopfraum und der damit zusammenhängende Abluftstrom durch die Probenahmeöffnungen der Sterilgasabdeckung vermieden Kontaminationen. Alternativ erfolgte die Inokulation nach Inbetriebnahme mit Hilfe einer Pipette durch die Öffnungen der Sterilgasabdeckung.

## 4.3 Kultivierung von *Cupriavidus necator*

### 4.3.1 Medien

Für die Kultivierung in Schüttelkolben wurde das in Tabelle 11-6 (siehe Anhang) angegebene Vorkulturmedium verwendet. Für die Kultivierung in Milliliter Rührkesselreaktoren sowie im Rührkesselreaktor im Litermaßstab kamen verschiedene Medien zum Einsatz, die in Tabelle 11-7 (siehe Anhang) zusammengefasst sind.

Kombinierte Konzentrate der Spurenelemente ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  und  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ) und Vitamine (Biotin, Thiaminhydrochlorid, Calciumpantothenat und Nicotinsäure) sowie konzentrierte Lösungen von Vitamin  $\text{B}_{12}$  und Kanamycinsulfat wurden durch Filtration sterilisiert. Alle anderen definierten Medienbestandteile wurden einzeln als Konzentrate durch Hitze sterilisiert. Sämtliche Bestandteile wurden anschließend aseptisch mit den sterilisierten Komplexbestandteilen vereint.

### 4.3.2 Schüttelkolbenkulturen

Kultivierungen im Schüttelkolben wurden für die Inokulation der Milliliter Rührkesselreaktoren und des Rührkesselreaktors im Litermaßstab verwendet. Zellen aus der Stammkultur wurden auf LB-Agarplatten ausgestrichen und für 72 h bei 30 °C inkubiert. Mit Hilfe einer Pipettenspitze wurde eine Kolonie vom Agar geerntet und 200 mL Vorkulturmedium in 1 L Schüttelkolben mit dieser Biomasse beimpft. Die Inkubation der Schüttelkolben erfolgte 26 - 30 h bei 30 °C und  $200 \text{ U min}^{-1}$ .

### 4.3.3 Kultivierung in Milliliter Rührkesselreaktoren

Das in Kapitel 4.2 beschriebene System zum Betrieb von Milliliter Rührkesselreaktoren wurde verwendet. Die grundsätzliche Vorgehensweise zur Inbetriebnahme der Milliliter Rührkesselreaktoren ist ebenfalls in Kapitel 4.2 beschrieben.

Für die Untersuchung des Wachstums in Milliliter Rührkesselreaktoren (Kapitel 6.1) erfolgte die Inokulation durch Zugabe von 1 mL Vorkultur zu 10 mL Medium. Der pH wurde mit 0,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und 1 M NaOH auf 6,8 geregelt (sofern nicht anders angegeben) und die Reaktortemperatur auf 30 °C sowie der Kreislauf für den Kondensator auf 4 °C eingestellt. Wasser wurde in angepassten Mengen intermittierend zugeführt zum Ausgleich der Verdunstung.

Der Kopfraum aller 48 Reaktoren wurde mit insgesamt  $2,4 \text{ L min}^{-1}$  steriler Luft begast und die Rührer mit einer Drehzahl von  $2800 \text{ U min}^{-1}$  betrieben.

Für die Untersuchung der Produktionsphase in Milliliter Rührkesselreaktoren (Kapitel 6.2) erfolgte zunächst eine Biomasseproduktion in bis zu zehn Schüttelkolbenkulturen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4500 g, 20 min) vom Medium getrennt, in einem angemessenen Volumen PBS gewaschen, ein weiteres Mal sedimentiert (4500 g, 10 min) und erneut in PBS zu Zellkonzentrationen um  $100 \text{ g L}^{-1}$  resuspendiert. Jeder Reaktor wurde mit 10 mL Medium befüllt und mit 1 mL der konzentrierten Zellsuspension inokuliert, so dass die Versuche mit Zelldichten von  $8 - 12 \text{ g L}^{-1}$  gestartet wurden. Anders als oben angegeben erfolgte die Regelung des pH mit  $0,25 \text{ M H}_2\text{SO}_4$  sowie die Luftzufuhr mit  $1,2 \text{ L min}^{-1}$ . Alle anderen Einstellungen (pH Regelung, Temperatur, Rührerdrehzahl) erfolgten wie für die Untersuchung der Wachstumsphase angegeben. Sofern in den Ergebnissen angegeben, erfolgte eine intermittierende Substratzufuhr von  $500 \text{ g L}^{-1}$  Fructoselösung mit einem minimalen Zugabevolumen von  $10 \mu\text{L}$ .

#### 4.3.4 Kultivierung im Litermaßstab

Die Mikroorganismen wurden in einem  $7,5 \text{ L}$  Rührkesselreaktor mit einem Startvolumen von  $2 \text{ L}$  kultiviert. Der Reaktor war mit Sonden zur Messung von pH,  $\text{pO}_2$  und Temperatur ausgestattet. Die Temperatur wurde auf  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  und der pH auf  $6,8$  geregelt. Die Regelung des pH erfolgte mit  $1 \text{ M}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  und  $5 \text{ M}$   $\text{NaOH}$  beziehungsweise  $12,5 \%$   $\text{NH}_4\text{OH}$  (abhängig von der Betriebsweise wie im Folgenden erläutert). Der  $\text{pO}_2$  wurde mit der Variation der Rührerdrehzahl ( $400 - 1200 \text{ U min}^{-1}$ ) bzw. des Luftvolumenstroms ( $2 - 8 \text{ L min}^{-1}$ ) auf  $>30 \%$  geregelt. Antischaum wurde bei Bedarf intermittierend manuell zugeführt („Delamex 180“, Bussetti & Co GmbH, Wien). Mit Hilfe einer Schlauchpumpe und einer Pumpenkennlinie konnten definierte Zulaufraten für Fructose ( $500 \text{ g L}^{-1}$ ) eingestellt werden.

Zwei verschiedene im Folgenden erläuterte Verfahren wurden zur Untersuchung der Produktbildung im Litermaßstab gegenübergestellt.

Zweistufiges Verfahren: Ein anfängliches Volumen von  $2 \text{ L}$  Medium wurde mit  $200 \text{ mL}$  Vorkultur beimpft. Biomasse wurde im Satz- und anschließendem Zulaufverfahren produziert (pH Regelung mit  $\text{NH}_4\text{OH}$ ). Die Biomasse wurde geerntet, wie für die Kultivierung in Milliliter Rührkesselreaktoren beschreiben vom Medium getrennt sowie gewaschen und in  $2 \text{ L}$  Produktionsmedium (ohne definierte Stickstoffquelle) resuspendiert. Das inokulierte Medium wurde zu einem Gesamtvolumen von  $2,2 \text{ L}$  mit demineralisiertem Wasser aufgefüllt. In der zweiten Kultivierungsstufe erfolgte die pH Regelung mit  $\text{NaOH}$ . Diese Prozedur war äquivalent zu dem aussichtsreichsten Experiment in Milliliter Rührkesselreaktoren.

Einstufiges Verfahren: Die Inokulation und Biomasseproduktion erfolgte wie für das zweistufige Verfahren beschrieben. Die Produktion von 2-Hydroxyisobuttersäure wurde durch das Versiegen der Stickstoffquelle eingeleitet. Die pH Kontrolle erfolgte deshalb während des gesamten Prozesses mit NaOH.

## 4.4 Kultivierung von *Escherichia coli*

### 4.4.1 Medien

LB-Medium sowie die in Tabelle 11-8 (siehe Anhang) aufgelisteten Medien wurden für die Kultivierung von *E. coli* verwendet. Der Verwendungszweck der jeweiligen Medien ist in den Kapiteln 4.4.2-4.4.5 präzisiert.

Zur Herstellung der in Tabelle 11-8 aufgelisteten Medien wurden Grundlösungen mit allen hitzestabilen Komponenten angesetzt, mit NaOH auf einen pH von 7 eingestellt und durch Hitze sterilisiert. Die Zugabe der Zucker Saccharose und Glucose erfolgte steril in Form von getrennt autoklavierten Lösungen. Die Spurenelementlösung, MEM Vitaminlösung, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, Biotin, IPTG sowie Antibiotika wurden in konzentrierten Stammlösungen angesetzt, durch Filtration sterilisiert (insofern nicht steril bezogen) und anschließend aseptisch zugegeben, so dass das Volumen auf das geplante Endvolumen anstieg.

### 4.4.2 Schüttelkolbenkulturen

LB-Medium (mit 50 mg L<sup>-1</sup> Antibiotikum, sofern notwendig), das modifizierte mit MOPS gepufferte M9 Medium und das definierte Medium (Tabelle 11-8) wurden zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens in Schüttelkolbenkulturen verwendet (Kapitel 7.2.1). Es wurden entweder 50 mL Medium in 500 mL Schüttelkolben vorgelegt oder 100 mL in 1000 mL Schüttelkolben. Die Zugabe von IPTG erfolgte wie in den Ergebnissen angegeben. Die Kulturen wurden mit 1 ‰ (v/v) einer Stammkultur inokuliert und die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 250 U min<sup>-1</sup>.

Zur Bereitstellung von Biomasse für die Untersuchung von Enzymaktivitäten und Expression sowie zur weiteren anaeroben Kultivierung in Milliliter Rührkesselreaktoren kamen zwei unterschiedliche Verfahren zum Einsatz. Wenn im Rahmen des Experimentes nur Stämme genutzt wurden, die nicht mehr als ein Plasmid tragen, wurde ein einstufiges Kultivierungsverfahren in Schüttelkolben angewendet. Dazu wurden 100 mL modifiziertes M9 Medium mit MOPS und 0,5 mM IPTG in 1 L Schüttelkolben mit 100 µL einer Stammkultur des entsprechenden Stammes beimpft und bei 37 °C und 250 U min<sup>-1</sup> in einem Schüttelinkubator für 21

h kultiviert. Aufgrund unterschiedlich langer Verzögerungsphasen sowie leicht unterschiedlichen Wachstumsraten der einzelnen Stämme unter induzierten Bedingungen wurden im Rahmen der Stammcharakterisierung der Saccharose verwertenden *E. coli* Stämmen zum Teil unterschiedliche Volumina (100 - 800  $\mu\text{L}$ ) für die Inokulation der Schüttelkolbenkulturen zur Biomasseherstellung gewählt, damit nach 21 h ähnliche Zelldichten in allen Kulturen erreicht wurden.

Im Rahmen von Experimenten, bei denen auch Stämme untersucht wurden, die zwei Plasmide tragen, erfolgte die Biomasseproduktion in einer zweistufigen Vorkultur. Dazu wurde 50 mL modifiziertes mit MOPS gepuffertes M9 Medium ohne IPTG mit 50  $\mu\text{L}$  einer Stammkultur des entsprechenden Stammes beimpft und bei 37 °C und 250  $\text{U min}^{-1}$  in einem Schüttelinkubator über Nacht kultiviert. Am Folgetag wurden 20 mL der sich in der stationären Phase des Wachstums befindlichen Kultur in 80 mL frisches M9 Medium mit MOPS überimpft und für zwei Stunden bei reduzierter Temperatur und Schüttelfrequenz inkubiert (30 °C, 200  $\text{U min}^{-1}$ ). Daraufhin folgte eine Induktionsphase (6 Stunden, 30 °C, 200  $\text{U min}^{-1}$ ), die durch Zugabe von 1 mM IPTG eingeleitet wurde.

Die Herstellung der Vorkultur in Schüttelkolben für die weitere Kultivierung im Litermaßstab ist in Kapitel 4.4.5 erläutert.

#### 4.4.3 Kultivierung in Milliliter Rührkesselreaktoren

Das in Kapitel 4.2 beschriebene System zum Betrieb von Milliliter Rührkesselreaktoren wurde verwendet. Die grundsätzliche Vorgehensweise zur Inbetriebnahme der Milliliter Rührkesselreaktoren ist ebenfalls in Kapitel 4.2 beschrieben.

Biomasse wurde entsprechend Kapitel 4.4.2 hergestellt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4500 g, 10 min) vom Medium getrennt, in einem angemessenen Volumen PBS gewaschen, ein weiteres Mal vom Medium separiert (4500 g, 10 min) und in komplexem M9 Medium resuspendiert zu Zellkonzentrationen von etwa 30 bis 60  $\text{g L}^{-1}$ . Sofern ein zweistufiges Verfahren für die Biomasseproduktion in Schüttelkolben angewendet wurde, entfiel der Waschschrift. Je 1 mL dieser konzentrierten Kultur wurde anschließend zu 9 mL komplexem M9 Medium in Milliliter Rührkesselreaktoren gegeben (resultierend in Zellkonzentration zwischen 3 bis 6  $\text{g L}^{-1}$ ).

Der pH wurde mit 5 M NaOH auf 6,8 geregelt (sofern nicht anders angegeben) und die Reaktortemperatur auf 37 °C sowie der Kondensator auf 4-18 °C eingestellt. Wasser wurde in angemessenen Mengen intermittierend zum Ausgleich der Verdunstung zugeführt (50  $\mu\text{L h}^{-1}$  bei einer Kondensatortemperatur von 18 °C). Der Kopfraum aller 48 Reaktoren wurde mit insgesamt 1,2  $\text{L min}^{-1}$   $\text{CO}_2$  begast und die Rührer mit einer Drehzahl von 2800  $\text{U min}^{-1}$  be-

trieben (sofern nicht anders in den Ergebnissen angegeben), wodurch der  $pO_2$  auf einen Wert unterhalb der Nachweisgrenze der angewendeten Messtechnik fiel. Die Begasung der Medien wurde bereits mindestens 1 h vor Inokulation begonnen. Da sich durch die  $CO_2$ -Begasung der pH des Mediums stark verringerte, wurden zu Beginn des Versuches größere Mengen 5 M NaOH zugegeben ( $\sim 180 \mu\text{L}$ ), um den pH wieder auf 6,8 zu korrigieren. Ebenfalls wurden zu Beginn je Reaktor  $2 \mu\text{L}$  eines Antischaummittels („Delamex 180“, Bussetti & Co GmbH, Wien) zugegeben. Sofern in den Ergebnissen angegeben, erfolgte eine intermittierende Zufuhr von Substrat (Glucose oder Saccharose,  $500 \text{ g L}^{-1}$ ). Das minimale Zugabevolumen betrug  $10 \mu\text{L}$ .

#### 4.4.4 Kultivierung in anaeroben Flaschen

Als Vergleich zur Prozesscharakterisierung in Milliliter Rührkesselreaktoren wurden ebenfalls Satzversuche in anaeroben Flaschen durchgeführt. Die Vorbereitung der Biomasse erfolgte wie in Kapitel 4.4.3 beschrieben. Flaschen mit einem Volumen von 100 mL wurden mit 45 mL komplexem mit MOPS gepuffertem M9 Medium befüllt, versiegelt und mindestens 1 h über eine Kanüle submers mit  $0,4 \text{ L min}^{-1} CO_2$  begast. Zusätzlich zur  $CO_2$ -Begasung erfolgte bei einigen Ansätzen die Zugabe von  $10 \text{ g L}^{-1} NaHCO_3$  (im Medium gelöst) beziehungsweise  $50 \text{ g L}^{-1} CaCO_3$  (als feste Phase in Flaschen steril vorgelegt). Durch Zugabe von 5 mL konzentrierter Zellsuspension wurden die Medien inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  in einem Schüttelinkubator ( $140 \text{ U min}^{-1}$ ). Proben wurden aseptisch mit Spritzen entnommen.

Vergleichbare Bedingungen in Milliliter Rührkesselreaktoren wurden erzeugt, indem ebenfalls  $10 \text{ g L}^{-1} NaHCO_3$  (im Medium gelöst) oder  $50 \text{ g L}^{-1} CaCO_3$  (als feste Phase in Reaktoren steril vorgelegt) zugegeben wurden. Anders als in Kapitel 4.4.3 beschrieben, wurden in diesem Falle die Milliliter Rührkesselreaktoren nur ungefähr 1 h lang vor der Inokulation mit einer Rührerdrehzahl von  $2800 \text{ U min}^{-1}$  und einem Volumenstrom von  $1,2 \text{ L min}^{-1}$  mit  $CO_2$  begast. Anschließend wurden anaerobe Bedingungen aufrecht erhalten bei einer Begasung von  $0,48 \text{ L min}^{-1} CO_2$  sowie einer Rührerdrehzahl von  $1200 \text{ U min}^{-1}$  (ohne Gasinduktion).

#### 4.4.5 Kultivierung im Litermaßstab

Für Glucose verwertende *E. coli* Stämme erfolgte die Vorkultur in 100 mL LB-Medium in einem 1000 mL Schüttelkolben mit den entsprechenden Antibiotika ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) und einer Inkubationszeit von ungefähr 15 h. Die Vorkultur wurde mit  $400 \mu\text{L}$  einer entsprechenden Stammkultur inokuliert. Für Saccharose verwertende *E. coli* Stämme erfolgte die Vorkultur in definiertem Medium (Tabelle 11-8) mit einer Inkubationszeit von 25-30 h und ansonsten wie



für Glucose verwertende *E. coli* Stämme beschrieben. Zur Reduzierung der Inkubationszeit wurde das Inokulationsvolumen der Vorkultur zum Teil auf 800  $\mu\text{L}$  erhöht.

Im Rahmen der reaktionstechnischen Untersuchungen zur Bernsteinsäureproduktion mit *E. coli* im Litermaßstab kamen verschiedene Verfahren zum Einsatz, deren Kultivierungsbedingungen jeweils in den Ergebnissen präzisiert sind. Die Mikroorganismen wurden in einem 7,5 L Rührkesselreaktor mit einem Startvolumen von 2 L kultiviert. Der Reaktor war mit Sonden zur Messung von pH,  $p\text{O}_2$  und Temperatur ausgestattet. Die Temperatur wurde auf 37  $^\circ\text{C}$  und der pH auf 7 geregelt. Antischaum wurde bei Bedarf intermittierend manuell zugeführt („Delamex 180“, Bussetti & Co GmbH, Wien). Die Verfahren lassen sich in zwei Entwicklungsstufen einteilen:

Kultivierung ohne einem exponentiellen Zulaufverfahren zur Biomasseproduktion: Der Reaktor wurde mit 2 L komplexem M9 Medium (Tabelle 11-8) befüllt und mit 100 mL Vorkultur inokuliert. Die Konzentration des Substrates lag bei 20 oder 40  $\text{g L}^{-1}$ , wie in den Ergebnissen jeweils angegeben. Der  $p\text{O}_2$  wurde mittels Variation der Rührerdrehzahl über 30 % gehalten oder die Rührerdrehzahl wurde bei 500  $\text{U min}^{-1}$  konstant gehalten (wie in den Ergebnissen angegeben). Der Reaktor wurde während der aeroben Phase mit 2  $\text{L min}^{-1}$  steriler Luft begast und der pH wurde mit 5 M NaOH geregelt. Für die anaerobe Bernsteinsäureproduktion wurde der Reaktor mit 0,2 - 0,5  $\text{L min}^{-1}$   $\text{CO}_2$  bei einer Rührerdrehzahl von 200 - 600  $\text{U min}^{-1}$  begast. Die anaerobe Bernsteinsäureproduktion erfolgte entweder direkt im Anschluss der aeroben Kultur oder nach Ernte der Biomasse und Resuspendieren in 2 L frischem komplexen M9 Medium, wie in Kapitel 4.4.3 für die Bereitstellung von Zellen zur Kultivierung in Milliliter Rührkesselreaktoren beschreiben.

Kultivierung mit einem exponentiellen Zulaufverfahren zur Biomasseproduktion: Der Reaktor wurde mit 2 L definiertem Medium (Tabelle 11-8) befüllt und mit 100 mL Vorkultur inokuliert. Die Kultivierung erfolgte anschließend in vier Phasen. Zunächst wurden die Zellen in einer Satzphase (I) bis zum Verbrauch der im Medium enthaltenen 5  $\text{g L}^{-1}$  Substrat kultiviert. Anschließend vermehrten sich die Zellen mit einer konstanten Wachstumsrate kleiner  $\mu_{\text{max}}$  ( $\mu \approx 0,15 \text{ h}^{-1}$ ) mittels eines exponentiellen Zulaufprofils (II). Die Berechnung des Zulaufes erfolgte nach Gleichung 3-21. In einer kurzen Übergangsphase (III) wurden die Zellen durch Verringerung der Rührerdrehzahl und des Luftvolumenstroms einer Sauerstofflimitation ausgesetzt. Die Abschätzung des Respiratorischen Quotienten (RQ) in Phase II und III erfolgte mittels Gleichung 3-13. In der anaeroben Phase (IV) begann die eigentliche Produktbildung unter Zufuhr von 0,5  $\text{L min}^{-1}$   $\text{CO}_2$ . Der pH wurde in den ersten drei Phasen mit 12,5 %  $\text{NH}_4\text{OH}$  und in der anaeroben Phase mit 5 M NaOH geregelt. Die Zugabe von Substrat in den letzten beiden Phasen erfolgte entweder in Form eines Pulses oder mit einer konstanten

Rate, wie in den Ergebnissen jeweils angegeben. Tabelle 4-4 gibt eine Übersicht über die verwendeten Kultivierungsbedingungen während der vier Phasen.

Tabelle 4-4: Verschiedene Phasen der Kultivierung im Litermaßstab.

Phase	Gasversorgung	Substrat (-zulauf)	Beendigungs-kriterium
Satzphase (I)	Aerob, $pO_2 > 30\%$ bei $400 - 1200 \text{ U min}^{-1}$ , $2 \text{ L min}^{-1}$ Luft	$5 \text{ g L}^{-1}$ zu Beginn	Zuckerverbrauch, $pO_2$ -Anstieg
Zulaufphase (II)	aerob, $pO_2 > 30\%$ bei $400 - 1200 \text{ U min}^{-1}$ , $2 - 8 \text{ L min}^{-1}$ Luft, $RQ \sim 1 \text{ mol}_{CO_2} \text{ mol}_{O_2}^{-1}$	exponentieller Zulauf ( $\mu \sim 0,15 \text{ h}^{-1}$ )	Biotrockenmasse-konzentration $16 - 19 \text{ g L}^{-1}$
Übergangs-phase (III)	„mikroaerob“, $pO_2 \sim 0\%$ und $RQ \sim 0,6 - 0,8 \text{ mol}_{CO_2} \text{ mol}_{O_2}^{-1}$ bei $400 - 1000 \text{ U min}^{-1}$ , $2 \text{ L min}^{-1}$ Luft	Wie in den Ergebnissen erläutert	2 h
Produktions-phase (IV)	anaerob, $pO_2 = 0\%$ bei $1000 \text{ U min}^{-1}$ , $0,5 \text{ L min}^{-1} CO_2$	Wie in den Ergebnissen erläutert	

## 4.5 Analysemethoden

### 4.5.1 Bestimmung der Zellkonzentration

Die Zelldichte wurde durch die Bestimmung der optischen Dichte bei  $600 \text{ nm}$  ( $OD_{600}$ ) in angemessen verdünnten Zellsuspensionen abgeschätzt. Die Suspensionen wurden mit PBS verdünnt und die  $OD_{600}$  wurde gegen PBS bestimmt. Die Absorption des Mediums selbst wurde von der ermittelten optischen Dichte subtrahiert.

Im Litermaßstab wurden die Biotrockenmassekonzentrationen jeder Probe gravimetrisch bestimmt. Hierzu wurden  $2 \text{ mL}$  Eppendorfgefäße vorgetrocknet. Für jeden Messpunkt wurden im Doppelansatz je  $2 \text{ mL}$  Kultur in die Eppendorfgefäße gegeben, die Zellen durch Zentrifugation ( $15000 \text{ g}$ ,  $10 \text{ min}$ ) vom Überstand getrennt und der Überstand für weitere Analysen kühl gelagert. Die Gefäße mit den Zellpellets wurden bis zur Gewichtskonstanz getrocknet ( $80 \text{ }^\circ\text{C}$ , mindestens  $48 \text{ h}$ ) und erneut gewogen. Die Gewichts-differenz entsprach der Gesamttrockenmasse in  $2 \text{ mL}$  Volumen. Zur Bestimmung der Biotrockenmasse wurde die Trockenmasse des Mediums von den Trockenmassen jeder Probe subtrahiert.

Zur Umrechnung der  $OD_{600}$  in die Biotrockenmasse wurden näherungsweise die Faktoren  $0,5$  für *Cupriavidus necator* beziehungsweise  $0,45$  für *E. coli* angewendet, die zuvor experimen-

tell bestimmt wurden. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass der Umrechnungsfaktor bei unterschiedlichen Stämmen sowie Kultivierungsbedingungen geringfügig variieren kann.

Die Bestimmung der Zellkonzentration in Milliliter Rührkesselreaktoren ist in Kapitel 4.2.1 beschrieben.

#### 4.5.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die von den Zellen getrennten Überstände einer Probe wurden gefiltert (0,2  $\mu\text{m}$ ), gegebenenfalls angemessen verdünnt und für die HPLC Analytik zur Bestimmung von organischen Säuren und Zuckern verwendet.

Die Konzentrationen der Substanzen Fructose und 2-Hydroxyisobuttersäure wurden im Rahmen der Experimente mit *Cupriavidus necator* bestimmt. Hierbei kamen zwei äquivalente Verfahren Einsatz:

- Reversed-Phase-Säule TSKgel ODS-100V als stationäre Phase, 2 mL L<sup>-1</sup> Ameisensäure als mobile Phase, 0,6 mL min<sup>-1</sup> Flussrate, 40 °C, 10  $\mu\text{L}$  Injektionsvolumen
- Aminex HPX-87H Säule 300 x 7,8 mm als stationäre Phase, 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> als mobile Phase, 0,7 mL min<sup>-1</sup> Flussrate, 50 °C, 20  $\mu\text{L}$  Injektionsvolumen

Die getrennten Substanzen wurden mittels Brechungsindex detektiert und die Signale mit Hilfe von Proben bekannter Konzentration interpretiert. Die Ergebnisse beider Trennverfahren waren zufriedenstellend deckungsgleich und die Analyse konnte mit einer Detektionsgrenze von 0,05 g L<sup>-1</sup> für 2-Hydroxyisobuttersäure erfolgen. Für die 2-Hydroxyisobuttersäure Analytik wurde das erst genannte Trennverfahren jedoch bevorzugt, da die Trennung von anderen Substanzen tendenziell schärfer war.

Zur Bestimmung der Konzentrationen von Glucose, Bernsteinsäure, Lactat, Formiat, Acetat, Ethanol und Pyruvat wurde das oben erläuterte Verfahren mit der Aminex HPX-87H Säule sowie die Detektion mittels Brechungsindex verwendet. Sofern auch Saccharose als Substrat verwendet wurde, erfolgte die Trennung für alle organischen Säuren ebenfalls wie bereits erläutert. Die Zucker Saccharose, Glucose und Fructose wurden in einer zweiten Routine bei einer reduzierten Temperatur von 40 °C zur Verringerung der sauren Hydrolyse der Saccharose getrennt. Die Messung wurde für Pyruvat mit einem UV-Detektor (210 nm) und für alle anderen Komponenten mittels Brechungsindex durchgeführt. Dabei wurde für die Fructosebestimmung aufgrund einer Signalüberschneidung im Brechungsindex Detektor die äquivalente Fläche von Pyruvat, die mittels der UV-Detektion unter Vernachlässigung des Fructosesignals bestimmt wurde, abgezogen.

### 4.5.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinexpression in verschiedenen Stämmen von *E. coli* wurde mit SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) visuell analysiert. Die Gele bestanden aus einem dreiprozentigen Sammelgel und einem zehnprozentigem Trenngel (Laemmli 1970). Die Zusammensetzungen der Gele sowie der verwendeten Puffer befinden sich im Anhang.

Ungefähr 1 mL Glasperlen ( $\varnothing$  0.5 mm) wurden in 1,5 mL Eppendorfgefäße vorgelegt und 1 mL einer Zellsuspensionen ( $OD_{600} \approx 6$ ) wurde hinzugegeben. Der Aufschluss erfolgte in einer Schwingmühle für 3 min bei  $30 \text{ s}^{-1}$ . Die Zellextrakte wurden mit Laemmli-Puffer (5x) versetzt und vor dem Auftragen für 5 Minuten bei  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert, um die enthaltenen Proteine zu denaturieren. Die Gele wurden mit 15 - 30  $\mu\text{L}$  Probenvolumen pro Tasche beladen und die Auftrennung der enthaltenen Proteine erfolgte anschließend im elektrischen Feld bei 30 mA pro Gel für 50 - 60 Minuten. Anschließend wurden die Gele mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt. Für die Abschätzung der Molekülgröße wurde ein Protein Standard verwendet.

### 4.5.4 Enzymatische Aktivitätsbestimmungen

Aktivitäten der Enzyme Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, Phosphoenolpyruvatcarboxylase, decarboxylierende Malatdehydrogenase sowie Pyruvatcarboxylase wurden im Rahmen der reaktionstechnischen Charakterisierung der Bernsteinsäureproduktion in *E. coli* analysiert.

Da für (Peters-Wendisch *et al.* 1997) und mehrere andere Arbeitsgruppen keine verlässliche Messung der Pyruvatcarboxylase aus *Corynebacterium glutamicum* in zellfreien Extrakten möglich war, erfolgten im Rahmen dieser Arbeit alle Aktivitätsmessungen in Gegenwart von permeabilisierten Zellen, wie von (Osman *et al.* 1987) sowie (Blankschien *et al.* 2010) beschrieben.

Die zu untersuchenden Zellsuspensionen wurden analog zu dem in Kapitel 4.4.2 beschriebenen Vorkulturprotokoll hergestellt. Ein geeigneter Anteil der Zellsuspension wurde durch Zentrifugation vom Medium getrennt, so dass das Resuspendieren der Zellen in 1 mL eine  $OD_{600}$  von 25 ergeben würde. Nach einem Waschschrift mit 100 mM Tris-HCl ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 8) und erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 200  $\mu\text{L}$  PBS resuspendiert. Die Permeabilisierung erfolgte durch Zugabe von 15  $\mu\text{L}$  Chloroform und anschließendem Mixen mit einem Vortexer für 15 Sekunden. Um die Reaktion zu stoppen wurde daraufhin 800  $\mu\text{L}$  eisgekühltes PBS hinzugefügt, gemischt und die Suspension bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten nur mit frisch permeabilisierten Zellen.

Die Bestimmung der Aktivitäten erfolgte photometrisch mit den im Folgenden erläuterten Methoden und die Aktivitäten wurden auf die Biotrockenmassekonzentration bezogen, die mit Hilfe der übrig gebliebenen Suspension der permeabilisierten Zellen analog zu Kapitel 4.5.1 bestimmt wurde. Die spezifische Aktivität quantifiziert die Menge an umgesetztem Substrat pro Milligramm Biotrockenmasse und Minute ( $\mu\text{mol mg}_{\text{BTM}}^{-1} \text{min}^{-1}$  beziehungsweise  $\text{U mg}_{\text{BTM}}^{-1}$ ). Die sonst übliche Darstellung der spezifischen Aktivität bezogen auf die Gesamtproteinkonzentration wurde hier nicht als sinnvoll erachtet, da mit permeabilisierten Zellen gearbeitet wurde. Näherungsweise kann ein Proteingehalt von  $0,5 \text{ g g}^{-1}$  angenommen werden (Blankschien *et al.* 2010).

Die Berechnung der spezifischen Aktivität wurde mit Gleichung 4-4 durchgeführt. Die in Gleichung 4-4 verwendete Extinktionsänderung entspricht der Differenz aus der Extinktionsänderung einer Messung mit dem jeweiligen primären Substrat sowie der Extinktionsänderung einer Messung ohne das Substrat.

$$EA_x = \frac{V_T \cdot \left| \frac{dA}{dt} \right|}{\varepsilon \cdot l \cdot V_{Pr} \cdot \text{BTM}} \quad \text{Gleichung 4-4}$$

$EA_x$  spezifische Aktivität,  $\mu\text{mol mg}_{\text{BTM}}^{-1} \text{min}^{-1}$

$\left| \frac{dA}{dt} \right|$  Betrag der Extinktionsänderung,  $\text{min}^{-1}$

$V_T$  Gesamtvolumen (hier:  $1000 \mu\text{L}$ )

$V_{Pr}$  Probenvolumen (hier:  $50 \mu\text{L}$ )

$\varepsilon$  Molarer Extinktionskoeffizient,  $\text{L mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$

$l$  Weglänge in der Küvette (hier:  $1 \text{ cm}$ )

$\text{BTM}$  Biotrockenmasse der verwendeten permeabilisierten Zellen,  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$

### Pyruvatcarboxylase Aktivität

Die Pyruvatcarboxylase katalysiert die Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat unter Verwendung von ATP und  $\text{CO}_2$  (beziehungsweise  $\text{HCO}_3^-$ ) als Co-Substrate sowie unter Bildung von ADP und Phosphat ( $\text{P}_i$ ).

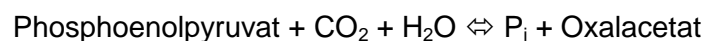


Eine Citrat Synthase gekoppelte Aktivitätsbestimmung nach (Payne und Morris 1969) wurde verwendet. Aus Pyruvat wird mittels der Pyruvatcarboxylase Oxalacetat gebildet. Die im Überfluss zugegebene Citrat Synthase katalysiert die Citratbildung aus Acetyl-CoA und Oxalacetat. Das freiwerdende CoA reagiert stöchiometrisch mit zugesetztem 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) unter Bildung eines Produktes, dass bei einer Wellenlänge von 412 nm quantifiziert werden kann. Der molare Extinktionskoeffizient des Reaktionsproduktes wurde mit einem Wert von  $14,15 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  angenommen (Riener *et al.* 2002).

Für die Messung der enzymatischen Aktivität bei Raumtemperatur wurde folgender Reaktionsansatz in einem Gesamtvolumen von 1000  $\mu\text{L}$  demineralisiertem Wasser in einer Küvette hergestellt: 90 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 mM Acetyl-CoA Natriumsalz, 5 mM Pyruvat Natriumsalz, 5 mM ATP Natriumsalz, 0,25 mM DTNB und  $5 \text{ U mL}^{-1}$  Citrat Synthase. Um die Reaktion zu starten wurde zuletzt 50  $\mu\text{L}$  Zellsuspension hinzugefügt und der gesamte Ansatz mit einer Pipette durchmischt.

### Phosphoenolpyruvatcarboxylase Aktivität

Phosphoenolpyruvatcarboxylase katalysiert die die Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat zu Oxalacetat mit  $\text{CO}_2$  (beziehungsweise  $\text{HCO}_3^-$ ) als Co-Substrat.

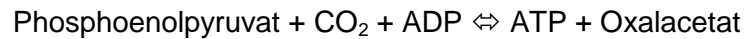


Die Extinktionsverminderung bei 340 nm in einer mit Malatdehydrogenase gekoppelten Aktivitätsbestimmung kann für die Quantifizierung von der Phosphoenolpyruvatcarboxylase Aktivität verwendet werden (Canovas und Kornberg 1966; Wohl und Markus 1972; Kim *et al.* 2004). Oxalacetat wird aus Phosphoenolpyruvat mittels Phosphoenolpyruvatcarboxylase produziert. In der Gegenwart von Malatdehydrogenase im Überfluss wird Oxalacetat zu Malat reduziert und NADH wird zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert, wodurch eine Extinktionsverminderung bei 340 nm stattfindet. Der molare Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm wurde mit einem Wert von  $6,22 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  angenommen (Kim *et al.* 2004).

Für die Messung der enzymatischen Aktivität bei Raumtemperatur wurde folgender Reaktionsansatz in einem Gesamtvolumen von 1000  $\mu\text{L}$  demineralisiertem Wasser in einer Küvette hergestellt: 100 mM Tris-HCl (pH 8.5), 16 mM  $\text{MgCl}_2$ , 35 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0,25 mM NADH, 5 mM Phosphoenolpyruvat Kaliumsalz und  $4 \text{ U mL}^{-1}$  Malatdehydrogenase. Um die Reaktion zu starten wurde zuletzt 50  $\mu\text{L}$  Zellsuspension hinzugefügt und der gesamte Ansatz mit einer Pipette durchmischt.

### Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase Aktivität

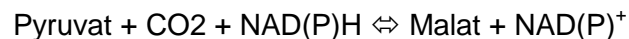
Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase katalysiert ähnlich wie Phosphoenolpyruvatcarboxylase die Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat zu Oxalacetat, jedoch unter der Bildung von ATP.



Die Bestimmung der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase Aktivität wurde demzufolge analog zu der Bestimmung der Phosphoenolpyruvatcarboxylase Aktivität gestaltet. Der Reaktionsansatz enthielt zusätzlich 1 mM Dithiothreitol and 10 mM ADP Natriumsalz.

### Decarboxylierende Malatdehydrogenase Aktivität

Die Decarboxylierende Malatdehydrogenase katalysiert die Reaktion von Pyruvat zu Malat unter Fixierung von CO<sub>2</sub> beziehungsweise umgekehrt. *E. coli* verfügt über eine NAD-abhängige Decarboxylierende Malatdehydrogenase (MaeA) sowie eine NADP-abhängige Decarboxylierende Malatdehydrogenase (MaeB).



Eine direkte Quantifizierung der Aktivität nach (Spina *et al.* 1970) wurde angewendet. Der molare Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm wurde analog zu NADH mit einem Wert von 6,22 L mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> angenommen.

Für die Messung der enzymatischen Aktivität bei Raumtemperatur wurde folgender Reaktionsansatz in einem Gesamtvolumen von 1000 µL demineralisiertem Wasser in einer Küvette hergestellt: 100 mM Tris-HCl (pH 7.4); 100 mM KCl; 10 mM L-Äpfelsäure, 1 mM MnCl<sub>2</sub> und 1 mM NAD<sup>+</sup> oder NADP<sup>+</sup> (abhängig von dem untersuchten Enzym).

#### 4.5.5 Abschätzung von Ausbeute sowie Produktivität

Unter der volumetrischen Produktivität wurde im Rahmen dieser Arbeit der Quotient aus der Produktkonzentration und der verstrichenen Zeit der Produktionsphase verstanden. Volumenänderungen werden somit vernachlässigt. Für einen industriellen Prozess ist jedoch die Konzentration relevant, die in einer bestimmten Zeit erreicht wird und daher ist die hier verwendete Definition der volumetrischen Produktivität anwendungsbezogen. Sie wird daher als anwendungsbezogene integrale volumetrische Produktivität  $Q_p^*$  bezeichnet.

Im Litermaßstab wurde die spezifische Produktivität integral berechnet unter Berücksichtigung der Volumeneffekte durch Betrachtung der Gesamtmasse  $M$  (g) von Zellen und Produkt (Gleichung 4-5 resultierend aus Gleichung 3-5).

$$q_P = \frac{1}{M_X} \frac{dM_P}{dt} \quad \text{Gleichung 4-5}$$

Da beobachtet wurde, dass während der Produktionsphase im Litermaßstab die Zellmasse konstant bleibt, kann die Berechnung der spezifischen integralen Produktivität  $q_P^*$  mit der aus Gleichung 4-5 resultierenden Gleichung 4-6 volumenunabhängig berechnet werden.

$$q_P^* = \frac{1}{c_X(t_2)} \frac{c_P(t_2) - c_P(t_1) \frac{c_X(t_2)}{c_X(t_1)}}{t_2 - t_1} \quad \text{Gleichung 4-6}$$

Mit:

$$c_X(t_1) \cdot V(t_1) = c_X(t_2) \cdot V(t_2)$$

Aufgrund fehlender Daten über Zellkonzentration zu den Proben wurde die spezifische Produktivität in Milliliter Rührkesselreaktoren als der Quotient aus der Produktkonzentration und der verstrichenen Zeit der Produktionsphase sowie der Zellkonzentration zu Beginn des Experiments definiert.

Für die Bestimmung der integralen Ausbeute im Litermaßstab wurde das Volumen gravimetrisch abgeschätzt und mit Hilfe der gemessenen Konzentrationen eine Massenbilanz zu den unterschiedlichen Zeitpunkten erstellt. Die Abschätzung des Volumens in Milliliter Rührkesselreaktoren erfolgte durch das Bilanzieren aller (durch Fedbatch-XP aufgezeichneten) zugegebenen und entnommenen Volumina seit Beginn des Experimentes. Die Ausbeuten sind in Kapitel 7 zur besseren Vergleichbarkeit der Produkte sowie Substrate auf die Kohlenstoffatome bezogen ( $\text{molC molC}^{-1}$ ). Bei der Verwendung von Saccharose als Substrat wurde gebildete Glucose sowie Fructose ebenfalls als noch vorhandenes Substrat definiert. Diese Anschauungsweise ist mit Hilfe von Subscripten bei der Darstellung von Ausbeuten deutlich gemacht (zum Beispiel:  $Y_{P(\text{Suc})/S(\text{Scr,Glc,Fro})}^*$  als integrale Bernsteinsäureausbeute ausgehend von dem Substrat Saccharose sowie dessen Spaltprodukte Glucose und Fructose).

Alle Kennwerte beziehen sich auf die Produktionsphase. Die verstrichene Zeit sowie das verbrauchte Substrat während der Biomassebildungsphasen blieben unberücksichtigt.



## 5 Theoretische Betrachtungen zur Produktausbeute bei *Escherichia coli*

Zur Bewertung eines neuen möglichen Syntheseweges für die Produktion eines Bioproduktes ist es hilfreich, Informationen über die maximale Ausbeute zu kennen, die durch ein gegebenes Stoffwechselnetzwerk realisierbar ist. Diese im Folgenden genannte „maximale geschätzte *in silico* Ausbeute“ kann als die Menge an Produkt definiert werden, die durch ein gegebenes Stoffwechselnetzwerk bezogen auf ein Mol eines Substrates erzeugt werden kann (Hong *et al.* 2003). Die Berechnung dieser maximalen geschätzten *in silico* Ausbeute stellt ein einfaches Anwendungsbeispiel der Flussbilanzanalyse (Flux balance analysis, FBA) dar. Die einzelnen Schritte für eine Flussbilanzanalyse können wie folgt gegliedert werden (Raman und Chandra 2009):

- Definition/Abstraktion des betrachteten Systems/Stoffwechselnetzwerkes
- Mathematische Darstellung der Reaktionen sowie der Stoffe in einem Gleichungssystem und Erstellung einer Massenbilanz im stationären Zustand
- Festlegung von biologisch relevanten Randbedingung (beispielsweise maximale sowie minimale Grenzen der unbekanntesten Stoffflüsse/Reaktionen)
- Festlegung eines Optimierungsziels
- Berechnung einer (von vielen) optimalen Lösung mit einem Lineargleichungslöser

In dem hier beschriebenen Anwendungsfall kommt es nicht auf die präzise Bestimmung bestimmter intrazellulärer Flüsse an, sondern allein auf das Ergebnis des Optimierungsziels (hier: Optimierung der Produktbildung ausgehend von einer mehr oder weniger willkürlich gewählten Aufnahme rate des Substrates). Zudem ist noch zu erwähnen, dass diese Betrachtungsweise ohne reale Messwerte durchgeführt wird und keine Aussage darüber getroffen werden kann, wie realistisch das Erreichen dieser maximalen geschätzten *in silico* Ausbeute ist. Mehrere Arbeitsgruppen haben im Rahmen der Bernsteinsäureproduktion bereits Analysen dieser Art durchgeführt (Lee *et al.* 2002b; Hong *et al.* 2003; Cox *et al.* 2006; Wang *et al.* 2006).

Für die beschriebenen Schritte der Flussbilanzanalyse stehen eine Vielzahl an Programmen von unterschiedlichen Herstellern und Arbeitsgruppen zur Verfügung. Zwei unterschiedliche Programmkombinationen wurden hier verwendet. Matlab (Version 7.8.0.347 (R2009a), Mathworks) diente als Schnittstelle zur Verwendung sämtlicher Programme.

Zunächst wurde für die Berechnung der Bernsteinsäureausbeute das metabolische Modell iJR904 GSM/GPR verwendet, welches 931 Reaktionen und 625 Metabolite resultierend aus dem gesamten Genom von *E.coli* K 12 MG1655 berücksichtigt (Reed *et al.* 2003). Für die Analyse dieses Netzwerkes wurde die „Constrain-based reconstruction and analysis (COBRA) toolbox“ (Version 2.0, [http://systemsbiology.ucsd.edu/Downloads/Cobra\\_Toolbox](http://systemsbiology.ucsd.edu/Downloads/Cobra_Toolbox)) verwendet, welche bereits die „SBML Toolbox“ (Version 3.1.2, <http://sbml.org/Software/SBMLToolbox>) zum Einlesen von Modellen im SBML Format sowie einen Lineargleichungslöser durch das „GLPK“ Programmpaket (GNU Linear Programming Kit, [www.gnu.org/software/glpk](http://www.gnu.org/software/glpk)) beinhaltet.

Die Randbedingungen des Modells bezüglich Reversibilität der Reaktionen wurden beibehalten. Gegebenenfalls voreingestellte untere positive Grenzen für Reaktionsraten, wie zum Beispiel „ATP maintenance requirement“ (ATPM), wurden auf Null reduziert. Die Aufnahme sämtlicher als Primärkohlenstoffquelle dienenden Substanzen bis auf Glucose wurde auf Null und die Glucoseaufnahme auf  $1 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  gesetzt. Das Optimierungsziel wurde von Maximierung der Biomassebildung zu Maximierung des Bernsteinsäureexports (EX\_succ(e)) geändert. Detaillierte Beschreibungen zur Installation und Verwendung der COBRA Toolbox in Verbindung mit Matlab sind in (Becker *et al.* 2007) gegeben.

Das Ergebnis der Berechnung mittels des genomweiten Modells wurde mit einem selbst erstellten Netzwerk verglichen, welches nur wenige Reaktionen im Zentralstoffwechsel berücksichtigt, die im Wesentlichen in Abbildung 3-1 dargestellt sind (im Folgenden „Zentralstoffwechsel“ genannt). Das Programm CellNetAnalyzer (Version 9.7, [www.mpi-magdeburg.mpg.de/projects/cna/cna.html](http://www.mpi-magdeburg.mpg.de/projects/cna/cna.html)) zur strukturellen und funktionellen Analyse zellulärer Netzwerke wurde für die Erstellung des Modells verwendet (Klamt *et al.* 2007). Mit der Option „Flux optimization“ und dem in Matlab integrierten Lineargleichungslöser „linprog“ wurde der maximale Bernsteinsäureexport ausgehend von einer Glucoseaufnahme von  $1 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  berechnet. Eine gemeinsame Bilanz der Redoxäquivalente NADH/NADPH sowie eine Netto-Produktion von ATP wurde vorausgesetzt. Für die Betrachtung weiterer Fallbeispiele, die im Rahmen der hier verwendeten gentechnischen Veränderungen sowie Prozessbedingungen für die Verbesserung der Bernsteinsäureproduktion interessant sein könnten, wurde ebenfalls das vereinfachte Modell verwendet. Ähnliche Ergebnisse diesbezüglich wurden bereits von anderen Gruppen publiziert (Cox *et al.* 2006; Wang *et al.* 2006). Analoge Betrachtungen wurden anschließend für die Produktion von 3-Hydroxyisobuttersäure vorgenommen.

Die Berechnung der maximalen geschätzten *in silico* Ausbeuten erfolgte ausgehend von Glucose als Substrat und nicht ausgehend von Saccharose. Für die stöchiometrische Bilanz spielt es eine Rolle, ob der Zucker mittels PTS aufgenommen und phosphoryliert oder durch

einen nicht phosphorylierenden Transporter aufgenommen wird. Mögliche Auswirkungen auf die maximale geschätzte *in silico* Ausbeute können auf unterschiedliche Aufnahmemechanismen für Saccharose übertragen werden.

Tabelle 5-1: Maximale geschätzte *in silico* Ausbeute von Bernsteinsäure ausgehend von Glucose als Substrat abhängig von verschiedenen Rahmenbedingungen. Das Modell für den Zentralstoffwechsel von *E. coli* ist in Abbildung 3-1 dargestellt.

Modell	iJR904	Zentralstoffwechsel	Zentralstoffwechsel	Zentralstoffwechsel	Zentralstoffwechsel
inaktivierte Reaktionen	-	-	<i>sucA/sucB, pdh</i>	<i>sucA/sucB, pdh, aceA</i>	<i>sucA/sucB, pdh, glk, pyc, maeA/maeB</i>
Maximale Ausbeute (mol mol <sup>-1</sup> )	1,714	1,714	1,6	1	1,5

Tabelle 5-1 zeigt die maximale geschätzte *in silico* Ausbeute von Bernsteinsäure ausgehend von Glucose als Substrat abhängig von verschiedenen Rahmenbedingungen. Bei Verwendung des umfangreichen stöchiometrischen Modells iJR904 GSM/GPR wird eine maximale Ausbeute von 1,714 mol mol<sup>-1</sup> Bernsteinsäure berechnet. Bei der Verwendung des gleichen stöchiometrischen Modells sowie äquivalenten mathematischen Werkzeugen wurde diese Ausbeute bereits von einer anderen Arbeitsgruppe berechnet (Wang *et al.* 2006). Andere Arbeitsgruppen kommen bei vereinfachten Betrachtungsweisen zu dem gleichen Ergebnis (Vemuri *et al.* 2002a; Cox *et al.* 2006). Mit dem hier erstellten vereinfachten Modell wird ebenfalls eine Ausbeute von 1,714 mol mol<sup>-1</sup> berechnet.

Schätzt man die Ausbeute lediglich durch das Mengenverhältnis der Kohlenstoffatome in Substrat und Produkt ab, wäre die Kohlenstofffixierung vernachlässigt und die Ausbeute wäre mit 1,5 mol mol<sup>-1</sup> deutlich unterschätzt. Andererseits würde durch die Annahme, dass die Umsetzung vollständig mittels CO<sub>2</sub>-fixierender Reaktionen stattfindet, die Ausbeute mit 2 mol mol<sup>-1</sup> deutlich überschätzt. Die hier verwendete Methode berücksichtigt andere durch das Stoffwechselnetzwerk gegebene Beschränkungen, wie beispielsweise die Bilanz der Redoxäquivalente, und erzeugt somit ein realistischeres Bild. Dabei ist es zunächst nicht relevant, ob ein umfangreiches stöchiometrisches Modell verwendet wurde oder ein vereinfachtes.

Bei der Verwendung eines einfachen Modells verringert sich die maximale geschätzte *in silico* Ausbeute, wenn weitere Beschränkungen berücksichtigt werden. Es ergibt sich beispielsweise eine Ausbeute von 1,6 mol mol<sup>-1</sup>, wenn Reaktionen nicht in die Berechnung

einbezogen sind, die während einer anaeroben Betriebsweise als inaktiv angenommen werden (*sucA/sucB* und *pdh* inaktiv). Weiterhin ist typischerweise der sogenannte „Glyoxylat Bypass“ unter anaeroben Bedingungen nicht aktiv. Dies würde die Ausbeute auf 1 mol mol<sup>-1</sup> reduzieren (*sucA/sucB*, *pdh* und *aceA* inaktiv). Allerdings ist zu erwähnen, dass der Glyoxylat Bypass sowie die Pyruvatdehydrogenase unter speziellen Betriebsbedingungen (zum Beispiel aerobes Wachstum und anschließende anaerobe Produktion) eine Aktivität beibehalten kann (Sanchez *et al.* 2006; Wang *et al.* 2011a) oder dass die Ausbeute aufgrund im vereinfachten Modell nicht berücksichtigter Reaktionen höher liegt. Diese beiden Fallbeispiele wurden auch bereits von einer anderen Arbeitsgruppe betrachtet (Cox *et al.* 2006).

Die beschriebenen Betrachtungsweisen zeigen, dass die notwendige Bilanz der Redoxäquivalente bei unterschiedlichen Bedingungen zu unterschiedlichen maximalen geschätzten *in silico* Ausbeuten führen kann. Ein drittes Fallbeispiel zeigt noch einen weiteren Aspekt auf, der durch das Stoffwechselnetzwerk mit der maximalen geschätzten *in silico* Ausbeute zusammenhängt. Wenn man einen anaeroben Prozess betrachtet (*sucA/sucB* und *pdh* inaktiv) mit einem Stamm, durch den Pyruvat über CO<sub>2</sub>-fixierende Reaktionen nur unzureichend in den TCA Zyklus eingebracht werden kann (*pyc* und *maeA/maeB* inaktiv) sowie zudem die Aufnahme des Zuckers nur über ein PTS erfolgt (*glk* inaktiv), so liegt die maximale geschätzte *in silico* Ausbeute bei 1,5 mol mol<sup>-1</sup>. Eine Inaktivierung des PTS kann eine Verbesserung der Bernsteinsäureproduktion verursachen und es gibt viele Spekulationen über regulatorische Ursachen in diesem Zusammenhang (Chatterjee *et al.* 2001). Die hier durchgeführte Betrachtungsweise lässt zudem schließen, dass eine Zuckeraufnahme mit PTS unter speziellen Bedingungen allein aus stöchiometrischen Gründen unvorteilhaft sein könnte, da die intrazelluläre Konzentration des Intermediates PEP möglicherweise unerwünscht reduziert wird. Ähnliche Überlegungen wurden kürzlich für die Lysinproduktion mit *Corynebacterium glutamicum* publiziert (Ikeda *et al.* 2011). In (Lee *et al.* 2010) wird dagegen argumentiert, dass ein Saccharose Verwertungssystem, in dem der Zucker extrazellulär gespalten wird und die Monomere anschließend über PTS aufgenommen werden, vorteilhaft sein könnte, da der Pyruvat Pool erhöht wird. Für einen Bernsteinsäureproduzenten, der Pyruvat schlechter in den TCA Zyklus einbringen kann als PEP, wäre dieser Effekt aber gerade nicht wünschenswert. Andere Saccharose Aufnahmesysteme, die weniger abhängig von der Reaktion PEP zu Pyruvat sind, wie zum Beispiel das *scr* oder *csc* Operon, könnten in diesem Fall vorteilhafter sein.

Tabelle 5-2: Maximale geschätzte *in silico* Ausbeute von 3-Hydroxyisobuttersäure ausgehend von Glucose als Substrat abhängig von verschiedenen Rahmenbedingungen. Das Modell für den Zentralstoffwechsel von *E. coli* ist in Abbildung 3-1 dargestellt. Die Modifizierungen der Modelle für die Produktion von 3-Hydroxyisobuttersäure sind im Text erläutert.

Modell	iJR904	Zentral- stoffwechsel	Zentral- stoffwechsel	Zentral- stoffwechsel	Zentral- stoffwechsel
inaktivierte Reaktionen	-	-	<i>sucA/sucB</i> , <i>pdh</i>	<i>sucA/sucB</i> , <i>pdh</i> , <i>aceA</i>	<i>frd</i>
Maximale Ausbeute (mol mol <sup>-1</sup> )	1,333	1,333	1,143	0,5	1

Tabelle 5-2 zeigt die maximale geschätzte *in silico* Ausbeute von 3-Hydroxyisobuttersäure ausgehend von Glucose als Substrat abhängig von verschiedenen Rahmenbedingungen. Hierfür wurde eine Reaktion, die Succinyl-CoA unter Verbrauch von 2 NAD(P)H zu 3-Hydroxyisobuttersäure umwandelt (vergleiche Abbildung 3-8), in die Modelle eingefügt und das Optimierungsziel zu Maximierung der 3-Hydroxyisobuttersäure Produktion geändert. Aufgrund des höheren Bedarfs an Redoxäquivalenten für dieses Produkt sinkt die maximale geschätzte *in silico* Ausbeute auf 1,33 mol mol<sup>-1</sup> (0,89 molC molC<sup>-1</sup>). Es ist folglich keine Netto CO<sub>2</sub> Fixierung möglich, jedoch liegt diese maximale geschätzte *in silico* Ausbeute dennoch etwas höher als die maximale 2-Hydroxyisobuttersäure Ausbeute ausgehend von Fructose bei Verwendung des Stoffwechselweges zur PHB Produktion in *Cupriavidus necator* (0,67 molC molC<sup>-1</sup>). Analog zu den Überlegungen bezüglich der Bernsteinsäureproduktion sinkt die maximale geschätzte *in silico* Ausbeute bei Berücksichtigung anderer Beschränkungen (*sucA/sucB* und *pdh* inaktiv oder *sucA/sucB*, *pdh* und *aceA* inaktiv). Eine weitere Überlegung stellt ein Fallbeispiel dar, in dem 3-Hydroxyisobuttersäure unter aeroben Bedingungen produziert werden würde (*frd* inaktiv).



## 6 Produktion von 2-Hydroxyisobuttersäure mit gentechnisch veränderten *Cupriavidus necator* H16

Zielsetzung ist die reaktionstechnische Untersuchung der Produktion von 2-Hydroxyisobuttersäure mit gentechnisch veränderten *Cupriavidus necator* H16. Die Ergebnisse sind in diesem Kapitel dargestellt.

### 6.1 Kultivierungen in verschiedenen Reaktoren

Das Wachstum von *Cupriavidus necator* H16 in Milliliter Rührkesselreaktoren sowie im 2 L Rührkesselreaktor wurde miteinander verglichen. Tabelle 6-1 skizziert die Unterschiede ausgewählter untersuchter Medien. Die zu den Medien beobachteten Wachstumskinetiken sind in Abbildung 6-1 und Abbildung 6-2 dargestellt.

Tabelle 6-1: Stickstoffhaltige Medienbestandteile der untersuchten Medien und die geschätzte Stickstoffkonzentration. Die genauen Medienzusammensetzungen des komplexen und definierten Mediums sind in Tabelle 11-7 aufgelistet.

	Stickstoffhaltige Medienbestandteile	Stickstoffkonzentration (g L <sup>-1</sup> )
komplexes Medium A	3 g L <sup>-1</sup> Hefeextrakt (~10,5 % N) 10 g L <sup>-1</sup> 50% Maisquellwasser (~ 0,5 · 7,4 % N) 5 g L <sup>-1</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,7
komplexes Medium B	3 g L <sup>-1</sup> Hefeextrakt (~10,5 % N) 10 g L <sup>-1</sup> 50% Maisquellwasser (~ 0,5 · 7,4 % N) 8 g L <sup>-1</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,4
definiertes Medium	8 g L <sup>-1</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,7

In Abbildung 6-1 lässt sich erkennen, dass die Kultivierung im komplexen Medium B zu den höchsten Zelldichten in Milliliter Rührkesselreaktoren führte. Die maximale Zelldichte im komplexen Medium B war ungefähr um den Anteil höher, um den das Medium an Stickstoff gegenüber den anderen beiden untersuchten Medien reicher ist. Im definierten Medium war erwartungsgemäß eine etwas geringere Wachstumsrate zu beobachten.

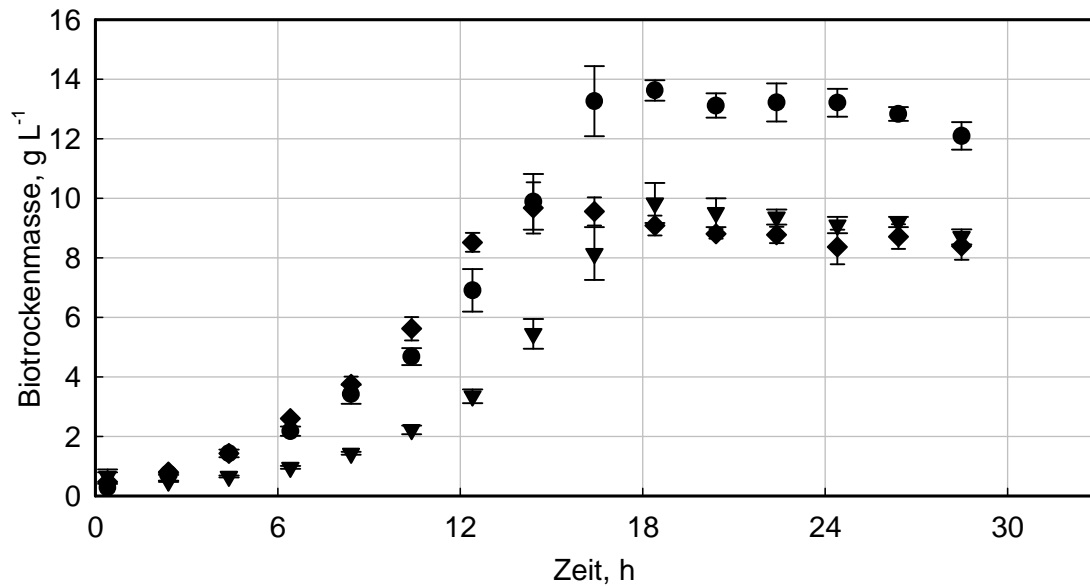


Abbildung 6-1: Wachstumskinetiken von *Cupriavidus necator* H16 PHB-4 pBBR1MCS-2::HCM in Milliliter Rührkesselreaktoren im Satzverfahren (30 °C, pH 6,8, 2800 U min<sup>-1</sup>, 50 mL min<sup>-1</sup> Luft) mit verschiedenen Medien (vergleiche Tabelle 6-1): Das komplexe Medium A mit 1,7 g L<sup>-1</sup> Stickstoff (◆), das komplexe Medium B mit 2,4 g L<sup>-1</sup> Stickstoff (●) sowie ein definiertes Medium mit 1,7 g L<sup>-1</sup> Stickstoff (▼) wurden verwendet. Fehlerbalken geben die Standardabweichung von sechs parallel durchgeführten Kultivierungen an.

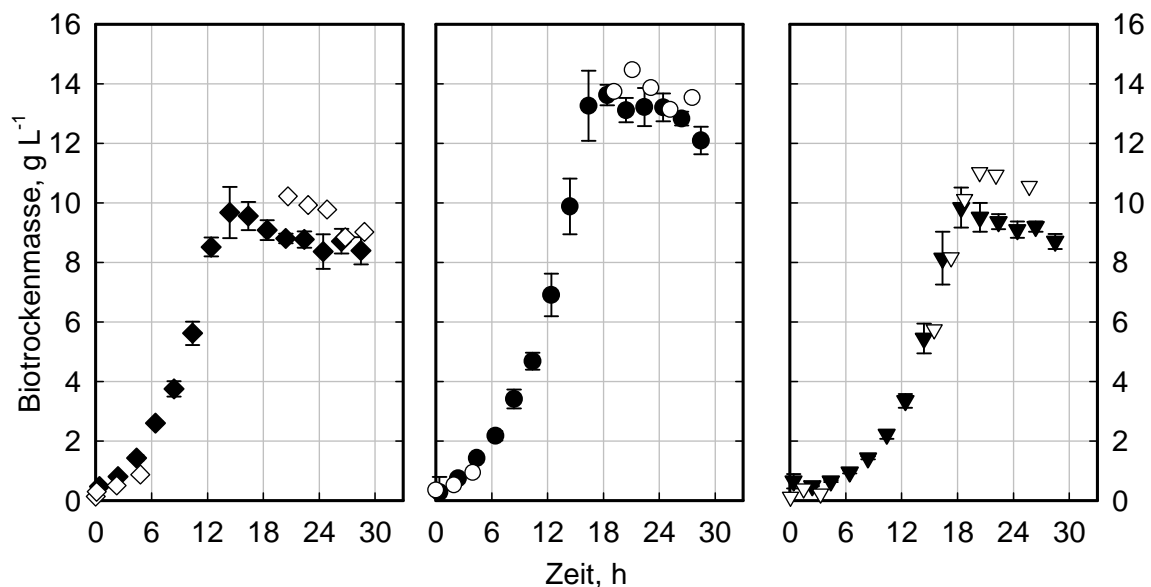


Abbildung 6-2: Vergleich der Wachstumskinetiken von *Cupriavidus necator* H16 PHB-4 pBBR1MCS-2::HCM in Milliliter Rührkesselreaktoren (schwarze Symbole) sowie im Labor Rührkesselreaktor (weiße Symbole). Das komplexe Medium A mit 1,7 g L<sup>-1</sup> Stickstoff (links), das komplexe Medium B mit 2,4 g L<sup>-1</sup> Stickstoff (Mitte) sowie ein definiertes Medium mit 1,7 g L<sup>-1</sup> Stickstoff (rechts) wurden verwendet (vergleiche Tabelle 6-1 und Abbildung 6-1). Fehlerbalken geben die Standardabweichung von sechs parallel durchgeführten Kultivierungen an.



Abbildung 6-2 zeigt das Zellwachstum mit den drei Medien im Milliliter- und Litermaßstab im Vergleich. Es ist jeweils eine gute Übereinstimmung im Wachstum in den beiden Reaktionssystemen während des Beginns der exponentiellen Wachstumsphasen sowie während der stationären Phasen zu beobachten. Da die Versuche im Litermaßstab auf 72 h angelegt waren und Proben manuell genommen wurden, sind wenige Daten der exponentiellen Wachstumsphase vorhanden. Aufgrund von mehreren Datenpunkten während der exponentiellen Wachstumsphase im Litermaßstab konnten für das definierte Medium klarere Übereinstimmungen beobachtet werden.

### Diskussion

Die Medien waren so erstellt, dass früher oder später eine Beschränkung des Wachstums aufgrund einer Stickstofflimitation erwartet wurde. Demzufolge waren die unterschiedlichen maximalen Zelldichten abhängig von der Stickstoffkonzentration in den verschiedenen Medien ein schlüssiges Ergebnis.

Aus den gezeigten Daten lässt sich schließen, dass das Wachstum *Cupriavidus necator* H16 in Milliliter Rührkesselreaktoren sowie im 2 L Rührkesselreaktor vergleichbar gestaltet werden kann. Es wird demzufolge angenommen, dass die Ergebnisse reaktionstechnischer Untersuchungen hinsichtlich der 2-Hydroxyisobuttersäure Bildung ebenso in den beiden Kultivierungssystemen vergleichbar sind.

## 6.2 Reaktionstechnische Untersuchungen zur Identifizierung von wichtigen Prozessvariablen

Für die Produktion von 2-Hydroxyisobuttersäure in rekombinanten *Cupriavidus necator* H16 Stämmen sind im Rahmen des in dieser Arbeit verwendeten Ansatzes enzymatische Reaktionen notwendig, die auch am PHB Stoffwechsel dieser Bakterien beteiligt sind. Die Produktion von PHB ist bei nicht limitierten Bedingungen inhibiert und wird nur aktiviert, wenn die Verstoffwechslung von Acetyl-CoA im Zitronensäurezyklus durch die Abwesenheit bestimmter Nährstoffe wie beispielsweise Stickstoff oder Phosphor nicht möglich ist. Daher wurde angenommen, dass auch die Produktion von 2-Hydroxyisobuttersäure eine Abhängigkeit von diesen beiden Medienbestandteilen aufweist. Folglich wurde zunächst die 2-Hydroxyisobuttersäure Produktion verschiedener *Cupriavidus necator* H16 Stämme abhängig von den Konzentrationen der Ammonium- und Phosphatquelle untersucht.

Abbildung 6-3 zeigt die 2-Hydroxyisobuttersäure Konzentration nach 48 h Kultivierung in einem pH geregelten Satzexperiment in Milliliter Rührkesselreaktoren abhängig von

unterschiedlichen *Cupriavidus necator* H16 Stämmen sowie den Konzentrationen der definierten Stickstoff- und Phosphatquelle.

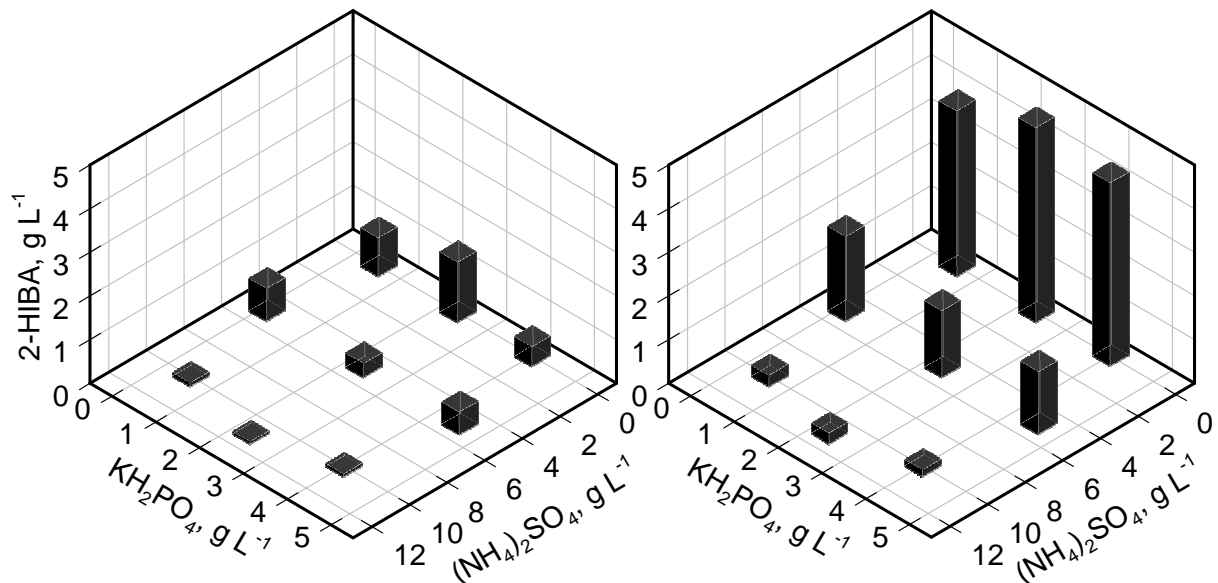


Abbildung 6-3: 2-Hydroxyisobuttersäure Konzentration im Überstand nach 48 h Kultivierung von *Cupriavidus necator* H16  $\Delta phaC1$  pBBR1MCS-2::HCM (links) und *Cupriavidus necator* H16 PHB-4 pBBR1MCS-2::HCM (rechts) in Milliliter Rührkesselreaktoren abhängig von verschiedenen Konzentrationen der Salze  $KH_2PO_4$  sowie  $(NH_4)_2SO_4$  im Medium (30 °C, pH 6,8, 2800 U min<sup>-1</sup>, 25 mL min<sup>-1</sup> Luft,  $c_{X,0} \sim 8$  g L<sup>-1</sup>).

Wie in Abbildung 6-3 gezeigt ist, wurden nach einer 48-stündigen Kultivierung von *Cupriavidus necator* H16  $\Delta phaC1$  pBBR1MCS-2::HCM in unterschiedlichen Medien geringe 2-Hydroxyisobuttersäure Konzentrationen in der Größenordnung von 0,1 bis 1,4 g L<sup>-1</sup> ermittelt. Bei der Kultivierung von *Cupriavidus necator* H16 PHB-4 pBBR1MCS-2::HCM unter vergleichbaren Bedingungen wurden zum Teil höhere Konzentrationen bis zu 4,5 g L<sup>-1</sup> gemessen. Es ist eine deutliche Abhängigkeit der Produktion von der verwendeten Ammoniumsalzkonzentration zu erkennen. Die extrazelluläre 2-Hydroxyisobuttersäure Konzentration nach 48 h war höher, sofern geringere  $(NH_4)_2SO_4$  Konzentrationen verwendet wurden. Mit dem in Abbildung 6-3 dargestellten Parallelexperiment konnte keine eindeutige Abhängigkeit der 2-Hydroxyisobuttersäure Produktion von der Phosphatsalzkonzentration festgestellt werden.

Eine weitere Bedingung für eine effektive Produktion von 2-Hydroxyisobuttersäure stellte die Konstruktionsweise des Vektors mit dem Hilfsprotein MeaB dar. Die Transformation anderer Vektoren ohne MeaB führte zu einer deutlich niedrigeren Produktbildung (Daten nicht gezeigt).

In den folgenden Versuchen wurde *Cupriavidus necator* H16 PHB-4 pBBR1MCS-2::HCM, welcher die besten Eigenschaften in Bezug auf die 2-Hydroxyisobuttersäure Produktion aufwies, weiter charakterisiert. Da sich außerdem eine Stickstofflimitierung während der Produktionsphase als vorteilhaft erwies (vergleiche Abbildung 6-3), wurden zunächst weitere Versuche ohne  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  im Produktionsmedium durchgeführt. Abbildung 6-4 zeigt die 2-Hydroxyisobuttersäure Konzentration nach 48 h Kultivierung in einem Parallelexperiment in Milliliter Rührkesselreaktoren abhängig von verschiedenen Sollwerten des kontrollierten pH, einer intermittierenden Zugabe von Fructose während des Versuches und der Variation der Zelldichte zu Beginn des Versuches.

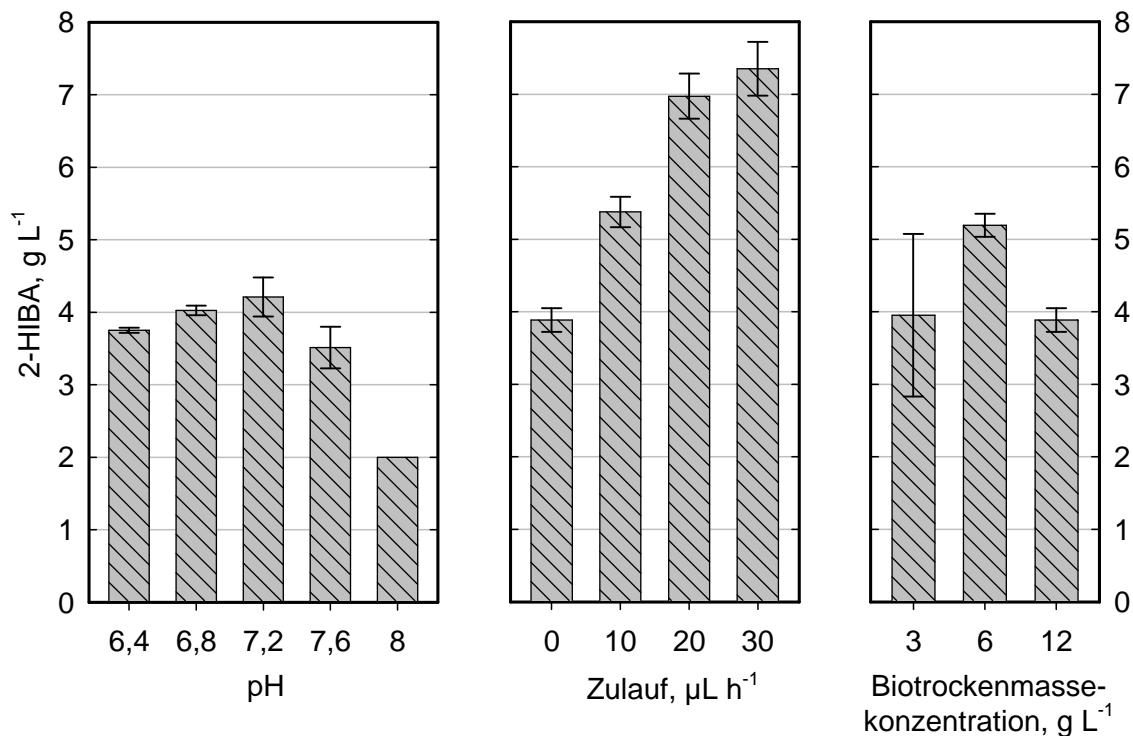


Abbildung 6-4: 2-Hydroxyisobuttersäure Konzentration im Überstand nach 48 h Kultivierung von *Cupriavidus necator* H16 PHB-4 pBBR1MCS-2::HCM in Milliliter Rührkesselreaktoren (30 °C, 2800 U min<sup>-1</sup>, 25 mL min<sup>-1</sup> Luft) abhängig von verschiedenen Prozessvariablen. Links: Satzkultivierungen wurden mit einseitiger pH Regelung (1 M NaOH) bei unterschiedlichen Sollwerten durchgeführt ( $c_{X,0} \sim 12 \text{ g L}^{-1}$ ). Mitte: Fructose (500 g L<sup>-1</sup>) wurde mit unterschiedlichen Raten ab 8 h nach Inokulation zugeführt (pH 6,8, beidseitige Regelung,  $c_{X,0} \sim 12 \text{ g L}^{-1}$ ). Rechts: Unterschiedliche Zellkonzentrationen zu Beginn des Versuches wurden im Satzverfahren untersucht (pH 6,8, beidseitige Regelung). Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei parallel durchgeführten Kultivierungen an.

Die Variation verschiedener Sollwerte des pH zeigte, dass die Produktion von 2-Hydroxyisobuttersäure im Bereich pH 6,4 - pH 7,2 nur leichte Unterschiede aufwies mit

Produktkonzentrationen zwischen  $3,8$  und  $4,2 \text{ g L}^{-1}$  (Abbildung 6-4 links) sowie dem Maximum bei pH 7,2. Keine pH Regelung resultierte bei einem anfänglichen pH von 6,8 in einer vergleichbar geringen Produktkonzentration von  $2,6 \text{ g L}^{-1}$  (Ergebnisse nicht gezeigt). Ein hoher Sollwert (hier pH 8) hatte ebenfalls eine geringe Produktkonzentration von  $2 \text{ g L}^{-1}$  nach 48 h zur Folge.

In Abbildung 6-5 ist beispielhaft ein typischer Verlauf des beidseitig geregelten pH (Sollwert 6,8) für ein Satzverfahren dargestellt.

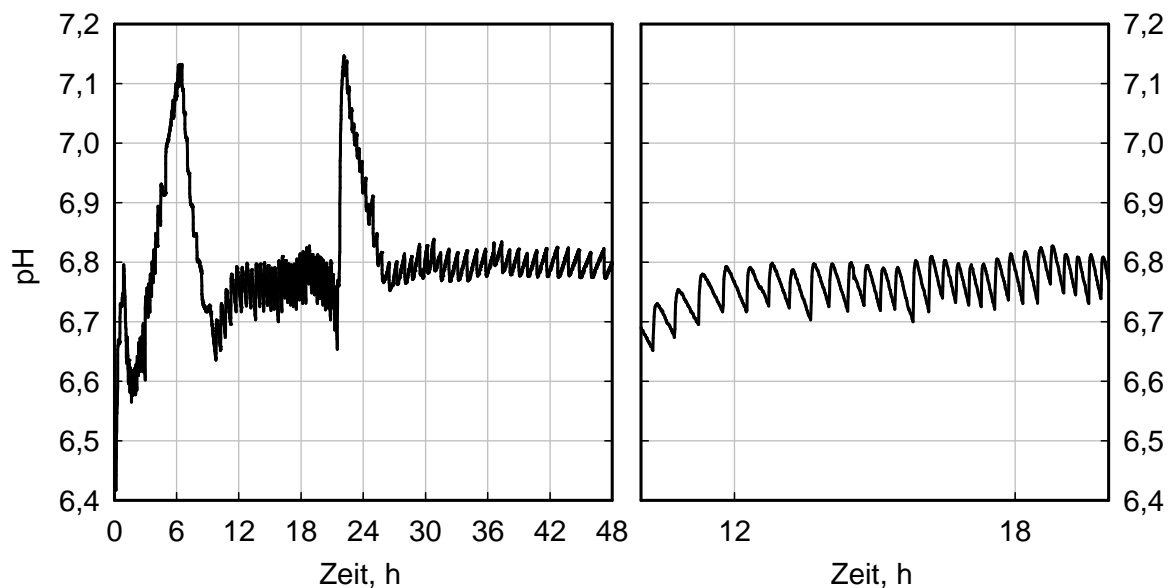


Abbildung 6-5: Verlauf des pH während einer Kultivierung von *Cupriavidus necator* H16 PHB-4 pBBR1MCS-2::HCM in Milliliter Rührkesselreaktoren unter Satzbedingungen (vergleiche Abbildung 6-4, pH 6,8,  $c_{x,0} \sim 12 \text{ g L}^{-1}$ ). Links ist der gesamte Verlauf dargestellt und rechts ein Ausschnitt zwischen 10 und 20 h.

Während der überwiegenden Prozesszeit lagen die Abweichungen in der Regel deutlich unter  $\pm 0,2$  pH. Zu Beginn des Prozesses (0 - 10 h) kam es zeitweise zu höheren Abweichungen. Der weitere Prozessverlauf war durch eine kontinuierliche Ansäuerung der Kultivierungslösung charakterisiert, die regelmäßig durch eine intermittierende Zufuhr von Base ausgeglichen wurde (Abbildung 6-6 rechts). Die Säurebildung kann in dieser Prozesszeit mit der Bildung von 2-Hydroxyisobuttersäure assoziiert werden. Ein Sprung des pH zu der Prozesszeit  $t = 22$  h in Richtung eines höheren pH signalisierte das Versiegen der Kohlenstoffquelle bei Anwendung eines Satzverfahrens. Nach einer durch die Trägheit des Reglers verursachten kurzen Verzögerung wurde intermittierend Säure zugeführt, die zusätzlich die im weiteren Prozessverlauf beobachtete Basenbildung ausglich.

Durch eine weitere Zufuhr von Fructose konnte die 2-Hydroxyisobuttersäure Bildung nach 48 h deutlich gesteigert werden, wie in Abbildung 6-4 (Mitte) gezeigt ist. Mit einer Zulauftrate

von  $30 \mu\text{L h}^{-1}$  einer  $500 \text{ g L}^{-1}$  Fructoselösung beginnend bei 8 h nach Prozessstart konnte eine 2-Hydroxyisobuttersäure Konzentration von  $7,4 \text{ g L}^{-1}$  nach 48 h erreicht werden. Es ließ sich beobachten, dass sich die 2-Hydroxyisobuttersäure Bildung innerhalb von 48 h mit steigender Zulauftrate einem Maximum näherte.

In den gemessenen Daten des pH und  $p\text{O}_2$  ließen sich unterschiedlichen Kultivierungsverläufe bei Satz- und Zulaufverfahren erkennen, wie in Abbildung 6-6 gezeigt ist.

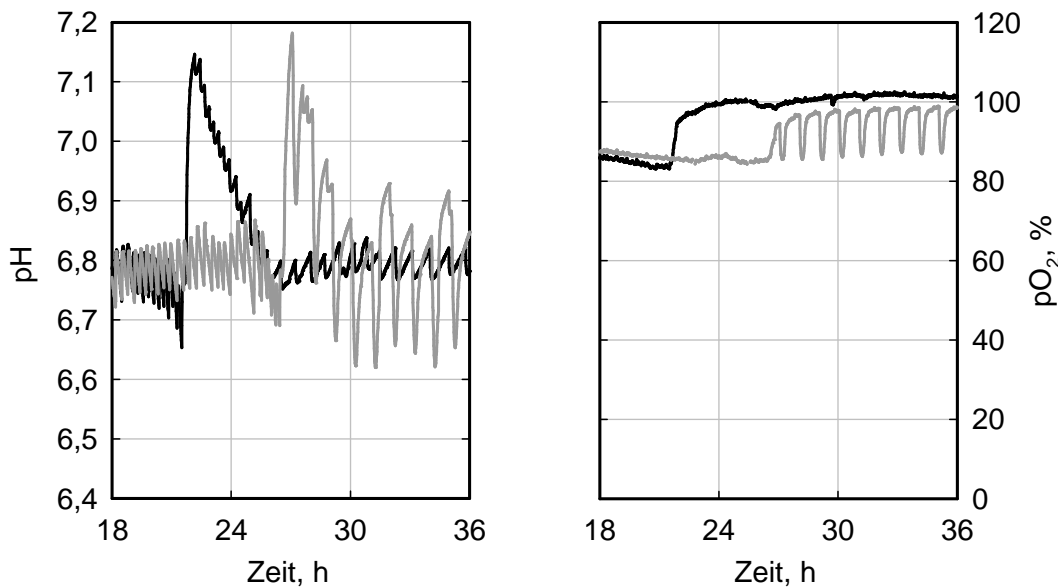


Abbildung 6-6: Verlauf des pH sowie des  $p\text{O}_2$  zwischen 18 und 36 h während einer Kultivierung von *Cupriavidus necator* H16 PHB-4 pBBR1MCS-2::HCM in Milliliter Rührkesselreaktoren (vergleiche Abbildung 6-4, pH 6,8,  $c_{\text{X},0} \sim 12 \text{ g L}^{-1}$ ). Ein Experiment unter Satzbedingungen (—) sowie eines unter Zulaufbedingungen (—) sind dargestellt. Unter Zulaufbedingungen wurde  $10 \mu\text{L h}^{-1}$  Fructose ( $500 \text{ g L}^{-1}$ ) ab 8 h nach Prozessstart intermittierend zugeführt.

In Abbildung 6-5 und Abbildung 6-6 ist bei 22 h der charakteristische Sprung im pH zu erkennen, der auf das Ende der 2-Hydroxyisobuttersäure Produktion unter Satzbedingungen hindeutet. Verglichen zu Zulaufbedingungen mit einer Zufuhr von  $10 \mu\text{L h}^{-1}$  einer  $500 \text{ g L}^{-1}$  Fructoselösung beginnend bei 8 h nach Prozessstart (Abbildung 6-6) war dieser Sprung erst nach 26,7 h erkennbar. Einhergehend mit der stündlichen intermittierenden Zufuhr von  $10 \mu\text{L}$  Fructoselösung ließen sich auch weitere charakteristische Sprünge im pH erkennen. Im  $p\text{O}_2$  äußerte sich das Versiegen der Kohlenstoffquelle in einem Sprung von 85 % auf 100 %. Auch hier war dieser Sprung in Übereinstimmung mit den pH Messungen im Falle des Satzverfahrens deutlich früher. Im Falle des Zulaufverfahrens ließ sich zudem erneuter Sauerstoffverbrauch bei intermittierender Zufuhr von Substrat feststellen.

Abbildung 6-4 (rechts) zeigt den Einfluss verschiedener Zelldichten zu Beginn des Versuches. Höhere Zelldichten führten im Satzverfahren nicht zwingend zu einer höheren

2-Hydroxyisobuttersäure Bildung. Im dargestellten Experiment war unter Satzbedingungen ein Maximum bei  $c_{x,0} = 6 \text{ g L}^{-1}$  zu erkennen. In Abbildung 6-7 ist beispielhaft die Fructose- und 2-Hydroxyisobuttersäure Konzentration zu verschiedenen Zeitpunkten in Reaktoren mit einer Zellkonzentration von  $c_{x,0} = 12 \text{ g L}^{-1}$  sowie  $c_{x,0} = 6 \text{ g L}^{-1}$  dargestellt.

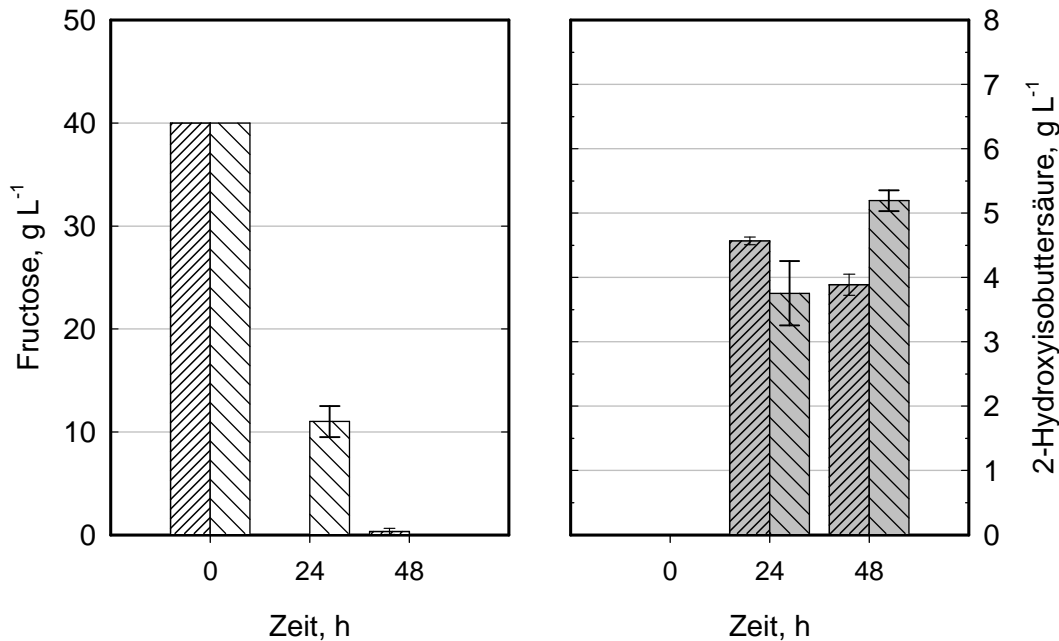


Abbildung 6-7: Fructose- und 2-Hydroxyisobuttersäure Konzentration im Überstand zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei einer Kultivierung von *Cupriavidus necator* H16 PHB-4 pBBR1MCS-2::HCM in Milliliter Rührkesselreaktoren unter Satzbedingungen abhängig von zwei verschiedenen Zellkonzentrationen (vergleiche Abbildung 6-4, pH 6,8). Die Fructose- (▨) und 2-Hydroxyisobuttersäure Konzentrationen (▩) bei einer Biotrockenmassekonzentration von  $12 \text{ g L}^{-1}$  zu Beginn des Versuches sowie die Fructose- (▧) und 2-Hydroxyisobuttersäure Konzentrationen (▦) bei einer Biotrockenmassekonzentration von  $6 \text{ g L}^{-1}$  sind dargestellt. Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei parallel durchgeführten Kultivierungen an.

Mit einer Zellkonzentration von  $c_{x,0} = 12 \text{ g L}^{-1}$  wurde nach 24 h um den Faktor 1,2 mehr Produkt produziert im Vergleich zur geringeren Zellkonzentration ( $4,6 \text{ g L}^{-1}$  gegenüber  $3,8 \text{ g L}^{-1}$ ). Jedoch war bei der höheren Zellkonzentration bereits nach 24 h der gesamte Zucker verbraucht. Unter Vernachlässigung der Volumeneffekte war der Zuckerverbrauch um den Faktor 1,4 höher. Bei der höheren Zellkonzentration war bereits nach 24 h der gesamte Zucker verbraucht. Nach 48 h verringerte sich die 2-Hydroxyisobuttersäure Konzentration bei der höheren Zellkonzentration sogar geringfügig. Bei der geringeren Zellkonzentration wurde nach 48 h hingegen eine höhere Produktkonzentration als nach 24 h erzielt, welche die 2-Hydroxyisobuttersäure Konzentration bei der höheren Zellkonzentration überschritt ( $5,2 \text{ g L}^{-1}$  gegenüber  $3,9 \text{ g L}^{-1}$ ).

## Diskussion

Beide in Abbildung 6-3 dargestellten Stämme tragen das Plasmid pBBR1MCS-2::HCM, welches die Gene für die zur Umsetzung von (R)-3-Hydroxybutyryl-CoA zu 2-Hydroxyisobutyryl-CoA benötigte 2-Hydroxyisobutyryl-CoA Mutase in *Cupriavidus necator* H16 einbringt. *Cupriavidus necator* H16 PHB-4 pBBR1MCS-2::HCM produzierte unter den experimentellen Bedingungen bei geringen Stickstoffkonzentrationen deutlich mehr 2-Hydroxyisobuttersäure als *Cupriavidus necator* H16  $\Delta$ phaC1 pBBR1MCS-2::HCM. Dieses Ergebnis überrascht, da durch das Einbringen des gleichen Vektors mit den Genen für die 2-Hydroxyisobutyryl-CoA Mutase eine vergleichbare Aktivität des Enzyms erwartet werden könnte und auch berichtet wurde, dass sich beide Stämme im Bezug auf die Unfähigkeit zur PHB Akkumulation identisch verhalten (Peplinski *et al.* 2010). Die Bereitstellung des Intermediates (R)-3-Hydroxybutyryl-CoA zur weiteren Umsetzung zu 2-Hydroxyisobutyryl-CoA könnte allerdings einen Aspekt darstellen, der in den beiden Stämmen unterschiedlich verläuft. Eine frühere Arbeit berichtet unter den in der Studie verwendeten experimentellen Bedingungen deutlich geringere Aktivitäten der  $\beta$ -Ketothiolase (PhaA) sowie der Acetoacetyl-CoA Reduktase (PhaB) in *Cupriavidus necator* H16 PHB-4 verglichen zum Wildtyp *Cupriavidus necator* H16 (Schubert *et al.* 1988). Da es sich beim Stamm *Cupriavidus necator* H16  $\Delta$ phaC1 im Gegensatz zu der chemischen Mutante *Cupriavidus necator* H16 PHB-4 um einen Deletionsstamm handelt, in dem ausschließlich das Gen *phaC1* inaktiviert wurde, hätte erwartet werden können, dass in diesem Stamm die Aktivitäten von PhaA und PhaB verglichen zum Wildtyp nicht nennenswert verringert werden. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass *Cupriavidus necator* H16  $\Delta$ phaC1 pBBR1MCS-2::HCM möglicherweise besser dazu in der Lage ist, 2-Hydroxyisobuttersäure zu produzieren. Jedoch wurden die Aktivitäten von PhaA und PhaB in *Cupriavidus necator* H16  $\Delta$ phaC1 bisher unter keinen Bedingungen ermittelt und es ist auch nicht auszuschließen, dass andere unbekannte Beeinflussungen des PHB Stoffwechsels in *Cupriavidus necator* H16 PHB-4 einen positiven Effekt auf die 2-Hydroxyisobuttersäure Bildung aufweisen, da dieser Stamm bisher nicht komplett charakterisiert wurde (Peplinski *et al.* 2010).

Die in Abbildung 6-3 dargestellten Ergebnisse zeigen außerdem, dass eine 2-Hydroxyisobuttersäure Produktion am effizientesten unter Stickstofflimitierung stattfindet. Auf Basis von Messungen der Ammoniumkonzentrationen während des Experiments (Daten nicht gezeigt) wird vermutet, dass die Produktion von 2-Hydroxyisobuttersäure nur bei sehr geringen Stickstoffkonzentrationen beginnt. Eine geringere 2-Hydroxyisobuttersäure Produktion bei höheren Ammoniumsalzkonzentrationen ist somit dadurch zu erklären, dass in den ersten Stunden des Versuches zunächst der Stickstoff metabolisiert wurde und anschließend weniger Zeit für die Produktion zur Verfügung stand. Im Gegensatz zur Stickstoffkonzentration konnte keine klare Abhängigkeit der 2-Hydroxyisobuttersäure Produktion zur

Phosphatsalzkonzentration beobachtet werden. Da die Zellen vor der Inokulation in PBS resuspendiert und auch komplexe Medienbestandteile verwendet wurden, ist es denkbar, dass sich während des gesamten Versuches unter keinen Bedingungen die erforderliche Phosphatlimitierung einstellte.

Die drei untersuchten Variablen pH Sollwert, Zulauftrate sowie Zellkonzentration zeigen, dass die 2-Hydroxyisobuttersäure Produktion durch Änderung der verfahrenstechnischen Prozessbedingungen deutlich beeinflusst werden kann (vergleiche Abbildung 6-4).

Ein pH zwischen pH 6,8 und pH 7,2 scheint für die Produktion optimal zu sein und es lässt sich schließen, dass sich moderate pH Schwankungen nur wenig auf die Produktbildung auswirken. Keine pH Regelung ist nachteilig für den Prozess aufgrund der Ansäuerung durch die Produktbildung. Ein hoher Sollwert (hier pH 8) erwies sich ebenfalls als ungünstig. Hierbei wirkt sich nicht nur der hohe pH direkt nachteilig auf den Prozess aus, sondern es ist noch anzumerken, dass der pH höchstwahrscheinlich unzureichend kontrolliert wurde, da bei pH 8 die verwendete Messtechnik nur noch ungenau funktioniert (obere Messbereichsgrenze). Im neutralen Bereich war eine Regelung des pH überwiegend mit geringen Abweichungen vom Sollwert ( $\pm 0,2$  pH) trotz Verwendung verhältnismäßig schwach gepufferter Medien möglich (vergleiche Abbildung 6-5). Zu Beginn des Prozesses (0 - 1 h) kam es zeitweise zu höheren Abweichungen, da die Sensoren bei Inbetriebnahme zunächst eine deutliche Verschiebung in Richtung niedrigerer pH aufweisen. Im anschließenden Verlauf (1 - 10 h) waren weiterhin Abweichungen zu beobachten, die vermutlich durch Stoffwechselumstellungen sowie einer Schwingung, die durch suboptimale Reglereinstellungen verursacht wurde, zu begründen sind. Außerdem war ein Sprung in Richtung eines höheren pH im späteren Prozessverlauf (hier:  $t = 22$  h) zu beobachten, der das Versiegen der Kohlenstoffquelle bei Anwendung eines Satzverfahrens und somit die Einstellung der Produktbildung signalisiert.

Messungen der Fructosekonzentrationen nach 24 h sowie die Charakteristiken des pH Verlaufs zeigen, dass die Kohlenstoffquelle unter vorteilhaften Produktionsbedingungen im Satzverfahren bereits vor Prozessende zur Neige ging. Folglich konnte die Produktion von 2-Hydroxyisobuttersäure durch die Applikation eines intermittierenden Zulaufs erhöht werden. Da sich die 2-Hydroxyisobuttersäure Bildung nach 48 h mit steigender Zulauftrate einem Maximum nähert, kann angenommen werden, dass eine weitere Erhöhung der Zulauftrate ohne andere Veränderungen in den Prozessbedingungen zu keiner nennenswerten Produktionsverbesserung führt.

Bei den drei Variablen pH Sollwert, Zulauftrate sowie Zellkonzentration ist bereits eine Abhängigkeit untereinander zu erwarten. Ein nachteiliger Effekt einer zu hohen Zellkonzentration auf die 2-Hydroxyisobuttersäure Produktion konnte hier nur im Satzverfah-



ren beobachtet werden (vergleiche Abbildung 6-4). Da bei einer höheren Zellkonzentration von  $c_{x,0} = 12 \text{ g L}^{-1}$  im Satzverfahren beispielsweise nach 24 h bereits der gesamte Zucker verbraucht war, verringerte sich sogar in den folgenden 24 h die 2-Hydroxyisobuttersäure Konzentration aufgrund von Verdünnungseffekten durch zu hoch eingeschätzten Verdünnungsausgleich sowie weiterer Zugabe von Korrekturmittel. In einer simultanen Optimierung der Prozessvariablen mit Hilfe einer statistischen oder stochastischen Versuchsplanung würden sich höhere Zelldichten vermutlich positiv auf die 2-Hydroxyisobuttersäure Konzentration auswirken, da durch ausreichende Substratversorgung beispielsweise eine frühzeitige Limitierung vermieden werden könnte. Naheliegend wäre auch die simultane Optimierung zweier Prozessgrößen, wie beispielsweise die Endkonzentration von 2-Hydroxyisobuttersäure nach 48 h sowie die Produktausbeute. In diesem Fall wäre es wiederum zu prüfen, ob höhere Zelldichten ausschließlich zu besseren Ergebnissen führen.

Für das Erreichen einer höheren Produktkonzentration ( $\gg 1 \text{ g L}^{-1}$ ) waren mehrere ausschlaggebende Prozessvariablen von Relevanz. Zum einen war die Wahl eines geeigneten Wirtsorganismus offensichtlich von großer Bedeutung sowie die Art und Weise, wie der Expressionsvektor konstruiert wurde (Daten nicht gezeigt). Zum anderen hatten Kultivierungsbedingungen wie die Einstellung der Stickstofflimitation einen großen Einfluss auf die Produktbildung. Nur durch die richtige Kombination der Prozessvariablen konnte ein gutes Ergebnis erzielt werden, was eine höhere Anzahl an Experimenten voraussetzte, die mit dem Parallelbioreaktorsystem zeiteffizient durchgeführt werden konnten. In dieser Phase der Entwicklung wurden Suchmethoden in Verbindung mit begründeten Vermutungen angewendet. Für weitere Optimierungen wären methodische Herangehensweisen hilfreich, wie zum Beispiel die Erstellung von experimentellen Plänen mittels statischer oder stochastischer Methoden (Weuster-Botz 2000; Link und Weuster-Botz 2006), metabolische Analysen (Link und Weuster-Botz 2007; Link *et al.* 2010) für die Identifizierung limitierender enzymatischer Schritte sowie andere modellgestützte Prozessoptimierungen.

### 6.3 Übertragung der Erkenntnisse in den Litermaßstab

Zwei in Kapitel 4.3.4 beschriebene Prozessvarianten wurden zunächst im Hinblick auf die Biomasse- und Produktbildung mit dem Stamm *Cupriavidus necator* H16 PHB-4 pBBR1MCS-2::HCM im Litermaßstab miteinander verglichen. Die Produktion von 2-Hydroxyisobuttersäure wurde durch das Aufbrauchen der vorgelegten Stickstoffkomponenten im Medium oder durch das Ernten und Resuspendieren der Bakterien in einem frischen Medium ohne Stickstoffquelle ausgelöst. Abbildung 6-8 zeigt ein Ergebnis für einen zweistufigen Prozess. Da bei den bisher dargestellten Ergebnissen im Millilitermaßstab nur die

Produktbildung untersucht wurde und die Biomasse zuvor in Schüttelkolben erzeugt wurde, stellt der zweistufige Prozess im Litermaßstab eine Betriebsweise dar, die dem experimentellen Vorgehen im Millilitermaßstab am nächsten kommt.

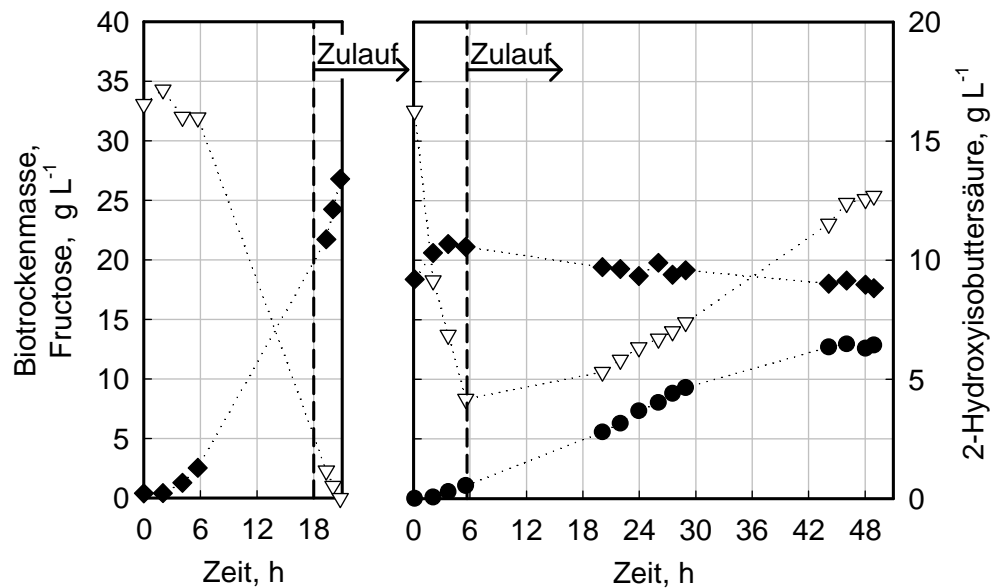


Abbildung 6-8: Verlauf der Fructose- ( $\nabla$ ), Biotrockenmasse- ( $\blacklozenge$ ), und 2-Hydroxyisobuttersäurekonzentration ( $\bullet$ ) im Zulaufverfahren mit *Cupriavidus necator* H16 PHB-4 pBBR1MCS-2::HCM: Wachstum und darauf folgende Produktion in einer zweiten Kultivierung. Während der Zellanzucht wurden  $500 \text{ g L}^{-1}$  Fructose ab 18 h mit einer Rate von  $31,1 \text{ mL h}^{-1}$  und ab 19,6 h mit einer Rate von  $40 \text{ mL h}^{-1}$  bis zum Ende der Kultivierung zugeführt. Während der Produktbildung wurde der Zulauf ab 5,7 h mit einer Rate von  $5,2 \text{ mL h}^{-1}$  gestartet.

In dem zweistufigen Prozess aus Abbildung 6-8 wurde nach 21 h eine Zelldichte von  $26,8 \text{ g L}^{-1}$  erreicht. Die extrazelluläre 2-Hydroxyisobuttersäurekonzentration war unterhalb der Nachweisgrenze. Die Biomasse wurde geerntet und ein Teil dessen in ein neues Medium ohne definierte Stickstoffquelle überführt. Die Produktionsphase wurde äquivalent zu dem Versuchsaufbau mit dem besten Resultat in Milliliter Rührkesselreaktoren gestaltet. Es ist zu beobachten, dass die Produktion von 2-Hydroxyisobuttersäure nicht unmittelbar nach Beginn der zweiten Phase einsetzt. Die vergleichbar hohe Fructoseaufnahme zu Beginn sowie die leichte Biomassezunahme von 18,4 auf  $21,4 \text{ g L}^{-1}$  deuten darauf hin, dass durch die Verwendung von Komplexbestandteilen im Produktionsmedium zunächst keine limitierenden Bedingungen vorlagen und der Stoffwechsel für die Biomassebildung noch intakt war. Durch die Zufuhr einer  $500 \text{ g L}^{-1}$  Fructoselösung nach 5,7 h mit einer Rate von  $5,2 \text{ mL h}^{-1}$  wurde die anfangs hohe Fructoseaufnahme überkompensiert und es war im weiteren Verlauf des Prozesses eine Zunahme der Fructosekonzentration zu beobachten.

Zwei Stunden nach Beginn der zweiten Phase konnten 2-Hydroxyisobuttersäurekonzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze gemessen werden. Im weiteren Verlauf des Prozesses

wurde 2-Hydroxyisobuttersäure zunächst mit einer näherungsweise konstanten Produktivität von  $0,15 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erzeugt. Die Produktbildung verringerte sich jedoch deutlich im späteren Verlauf des Prozesses und kam nach 44 h anscheinend komplett zum Erliegen. Nach insgesamt 49 h wurde eine 2-Hydroxyisobuttersäure Konzentration von  $6,4 \text{ g L}^{-1}$  gemessen.

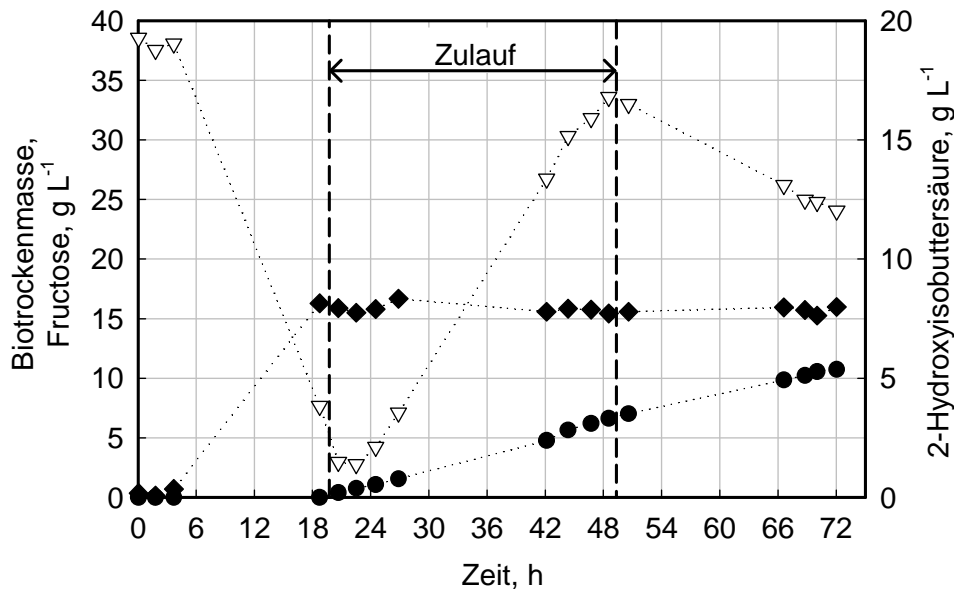


Abbildung 6-9: Verlauf der Fructose- (▽), Biotrockenmasse- (◆), und 2-Hydroxyisobuttersäure Konzentration (●) im Zulaufverfahren mit *Cupriavidus necator* H16 PHB-4 pBBR1MCS-2::HCM: Wachstums- und Produktionsphase in einer Kultivierung kombiniert. Zwischen 19,7 h und 49,3 h wurde  $500 \text{ g L}^{-1}$  Fructose mit Zulaufraten zwischen  $6,6$  und  $8,6 \text{ L h}^{-1}$  zugeführt.

Abbildung 6-9 zeigt ein typisches Ergebnis für die Produktion von 2-Hydroxyisobuttersäure in einem einstufigen Prozess. Nach 19 h wurde eine Zelldichte von  $16,3 \text{ g L}^{-1}$  erreicht. Innerhalb dieser Zeit konnte keine 2-Hydroxyisobuttersäure extrazellulär nachgewiesen werden. Messungen der Stickstoffkonzentration (Daten nicht gezeigt) legen nahe, dass nach 19 h das Zellwachstum aufgrund von Stickstofflimitierung endete. Die Produktion von 2-Hydroxyisobuttersäure erfolgte anschließend bis zum Ende des Experiments mit einer annähernd linearen Produktivität von  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  bis hin zu einer Konzentration von  $5,4 \text{ g L}^{-1}$  nach 72,1 h. Zur Vermeidung einer Primärsubstratlimitation wurde nach 20 h Fructose ( $500 \text{ g L}^{-1}$ ) mit einer Rate zwischen  $6,6$  bis  $8,6 \text{ mL h}^{-1}$  zugeführt. Kurz nach Eintreten der stationären Phase sowie dem damit einhergehenden Beginn der 2-Hydroxyisobuttersäure Produktion war die Fructoseaufnahme zunächst noch vergleichsweise hoch. Die Zufuhr von Fructose überkompensierte jedoch die mit der Zeit geringer werdende Fructoseaufnahme, was zu einem erneuten Anstieg der Fructosekonzentration führte, bis der Zulauf nach 49 h abgebrochen wurde. Die Fructosekonzentration verringerte sich erneut mit relativ niedriger Rate bis zum Ende des Prozesses.

In einer weiteren Kultivierung wurde die 2-Hydroxyisobuttersäure Produktion in einem einstufigen Verfahren in einem definierten Medium untersucht. Das Verfahren war analog zu dem in Abbildung 6-9 dargestellten Versuch. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6-10 dargestellt.

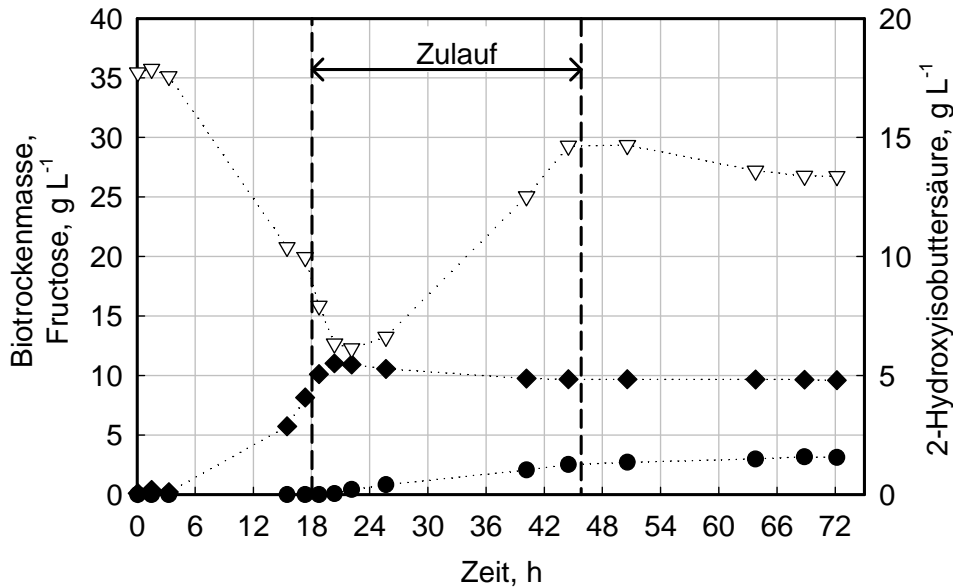


Abbildung 6-10: Verlauf der Fructose- (▽), Biotrockenmasse- (◆), und 2-Hydroxyisobuttersäure Konzentration (●) im Zulaufverfahren mit *Cupriavidus necator* H16 PHB-4 pBBR1MCS-2::HCM: 2-Hydroxyisobuttersäure Produktion mit einem definierten Medium (Wachstums- und Produktionsphase in einer Kultivierung kombiniert). Zwischen 18 h und 45,8 h wurde  $500 \text{ g L}^{-1}$  Fructose mit einer Zulauftrate von  $5,3 \text{ L h}^{-1}$  zugeführt.

Nach 20,4 h wurde eine Zelldichte von  $11 \text{ g L}^{-1}$  erreicht. Es trat anschließend eine Stickstofflimitation ein, wodurch die Zellmasse nicht weiter zunahm. Zwischen 18 h und 45,8 h wurden  $500 \text{ g L}^{-1}$  Fructose mit Zulaufraten zwischen  $5,3$  und  $5,4 \text{ L h}^{-1}$  zugeführt zur Vermeidung einer Primärsubstratlimitation. Insgesamt wurde in diesem Versuch nur wenig 2-Hydroxyisobuttersäure produziert mit einer maximalen Konzentration von  $1,6 \text{ g L}^{-1}$ . Zudem wurde die Produktbildung im späteren Verlauf der Kultivierung erneut merklich verzögert. Produktbildung trat nur zwischen 20 h und 46 h nach Kultivierungsstart auf. Aufgrund der nahezu gleich bleibenden Fructosekonzentration nach Abstellen des Zulaufs kann geschlossen werden, dass der Kohlenstoff nicht weiter umgesetzt wurde.

## Diskussion

Zusammenfassend konnte mit den Versuchen im Litermaßstab gezeigt werden, dass die im Millilitermaßstab gewonnenen Erkenntnisse erfolgreich in den größeren Maßstab übertragen werden konnten. Die maximale Produktkonzentration von  $6,4 \text{ g L}^{-1}$  im zweistufigen Verfahren mit einem komplexen Medium entspricht nicht exakt der maximal erreichten Produktkonzent-

ration von  $7,4 \text{ g L}^{-1}$ , die nach einer vergleichbaren Zeit im Millilitermaßstab erreicht wurde. Zudem konnte 2-Hydroxyisobuttersäure bis zu einer Konzentration von  $5,4 \text{ g L}^{-1}$  in einem einstufigen Verfahren erzeugt werden. Die etwas geringere Produktkonzentration im einstufigen Verfahren kann hauptsächlich mit der geringeren Zellkonzentration begründet werden, die zu Beginn der Produktionsphase vorlag. Für beide Prozesse kann während der Zeitspanne, in der die 2-Hydroxyisobuttersäure Konzentration linear ansteigt, eine spezifische Produktivität von  $0,005 - 0,006 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  abgeschätzt werden. Aufgrund der höheren Stickstoffkonzentration zu Beginn im einstufigen Verfahren wuchsen die Zellen vergleichsweise langsamer. Ein Zulaufverfahren, in dem neben der Kohlenstoffquelle zudem die Stickstoffquelle zeitweise zugeführt wird, könnte den gesamten Prozess noch weiter verbessern. Im einstufigen Verfahren wurde im Gegensatz zum zweistufigen Verfahren keine Verringerung der Produktbildung gegen Ende des Prozesses beobachtet. Weitere Untersuchungen wären nötig um zu klären, welche Einflussfaktoren zu einer Verringerung der Produktbildung führen könnten. Vermutlich spielen andere noch nicht identifizierte Medienkomponenten eine Rolle, die im Verlauf des Prozesses verbraucht werden und somit zu einer zunehmend geringer werdenden Produktivität führen, wie es in dem Versuch mit dem definierten Medium beobachtet (vergleiche Abbildung 6-10). Das Produkt selbst hingegen könnte einen hemmenden Effekt auf die Produktbildung haben.

Allgemein betrachtet bieten beide Prozessvarianten Vor- sowie Nachteile im Hinblick auf die industrielle Anwendung. In einem zweistufigen Verfahren würden voraussichtlich in der Produktionsphase weniger Medienkomponenten benötigt, wodurch eine einfachere und kostengünstigere Aufreinigung erreicht werden könnte. Die Prozesskontrolle könnte zudem einfacher sein, da Wachstums- und Produktbildungsphase voneinander entkoppelt sind. Andererseits haben weniger Prozessstufen einen direkten positiven Einfluss auf die Fixkosten des Prozesses. Aus dieser Sicht wäre ein einstufiges Verfahren zu bevorzugen.

Für ein neues potentiell Intermediat der chemischen Industrie wie beispielsweise Bernsteinsäure werden diverse Voraussetzungen angegeben, die für eine wirtschaftliche Produktion erfüllt sein müssen. Verschiedene Veröffentlichungen schätzen die Produktivität mit  $1,8 - 5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , die Endkonzentration mit  $80 - 150 \text{ g L}^{-1}$  sowie die Ausbeute mit  $0,88 \text{ g g}^{-1}$  als minimal zu erreichende Ziele ab (McKinlay *et al.* 2007; Yu *et al.* 2011). Obwohl die Leistung des Prozesses zur Produktion von 2-Hydroxyisobuttersäure mittels *Cupriavidus necator* diese Ziele noch nicht erreicht, kann dieser durchaus mit anderen Prozessen für die Produktion sehr ähnlicher organischer Säuren in einer frühen Entwicklungsstufe verglichen werden. Für die Produktion von (R)-3-Hydroxybuttersäure sowie (S)-3-Hydroxybuttersäure wurden bisher beispielsweise ähnliche Produktivitäten erreicht. Die höchsten Konzentrationen in einem geregelten reaktionstechnischen Ansatz für diese beiden Produkte betragen  $12$  (Liu *et al.* 2007) beziehungsweise  $10,3 \text{ g L}^{-1}$  (Lee *et al.* 2008).

Insgesamt bietet die Produktion von 2-Hydroxyisobuttersäure mit *Cupriavidus necator* sowohl Chancen als auch Grenzen. Einerseits wurde der genutzte PHB Stoffwechselweg schon intensiv untersucht. *Cupriavidus necator* H16 ist ein Modellorganismus zur Herstellung von PHB und gentechnische Methoden sowie Erfahrung im Umgang mit diesem Mikroorganismus sind verfügbar. Mit Glucose verwertenden Mutanten von *Cupriavidus necator* H16 ("*Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599", Kim *et al.* 1994) wurden im Labor bei optimierten Kultivierungen bereits sehr hohe PHB Konzentrationen von bis zu  $180 \text{ g L}^{-1}$  mit Produktivitäten von  $3,75 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erreicht (Ryu *et al.* 1999). Hierbei waren keine weiteren gentechnischen Veränderungen notwendig. Die PHB Synthese ist nicht wachstumsassoziiert und wird durch verfahrenstechnische Bedingungen, sprich einer Nährstofflimitation, „induziert“ (Khanna und Srivastava 2005). Der Stoffwechselweg ist somit äußerst effektiv und leicht kontrollierbar. Die 2-Hydroxyisobuttersäure Produktion wird in diesem Projekt durch nur eine weitere gentechnische Veränderung einer zur PHB Bildung unfähigen *Cupriavidus necator* H16 Mutante erreicht. Die bereits erörterte verringerte Aktivität von PhaA und PhaB in *Cupriavidus necator* H16 PHB-4 (Schubert *et al.* 1988), die möglicherweise zu einer geringeren Bereitstellung von (R)-3-hydroxybutyryl-CoA führt, ist ein unerwünschter Nebeneffekt dieser Veränderung. Möglicherweise sind andere Wirtsorganismen noch besser geeignet für die Produktion von 2-Hydroxyisobuttersäure, obwohl sich eine Mutante mit einer präzisen Deletion von *phaC1* hier sogar als schlechter herausstellte. Insgesamt lässt sich aber annehmen, dass abgesehen von der einen gentechnischen Veränderung und einem möglicherweise toxischen oder inhibierenden Effekt des Produktes einer hohen Produktivität beziehungsweise Produktkonzentration nichts entgegensteht. Zudem sind viele *Cupriavidus necator* H16 Stämme auch ohne PHB Bildung in einfachen Salzmedien bis zu hohen Zelldichten kultivierbar (Kim *et al.* 1994).

Andererseits stellt die durch  $\text{CO}_2$  Bildung verursachte geringe theoretische Ausbeute bezogen auf die Kohlenstoffmoleküle ( $0,67 \text{ molC molC}^{-1}$ ) die Wirtschaftlichkeit des Prozesses in Frage. Ob eine geringe Ausbeute jedoch ein Ausschlusskriterium für einen Prozess darstellt, kann zur gegenwärtigen Zeit nicht abschließend bewertet werden. Beispielsweise durch Integration eines Prozesses in einen größeren Anlagenverbund und die Ermöglichung der Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen der sogenannten zweiten Generation, die in Zukunft voraussichtlich günstiger und leichter verfügbar werden, ist die isoliert betrachtete Ausbeute des einzelnen Prozesses in ganzheitlicher Betrachtung der Wirtschaftlichkeit möglicherweise von geringerer Relevanz.

## 7 Produktion von Bernsteinsäure mit gentechnisch veränderten *Escherichia coli*

Das folgende Kapitel stellt die durchgeführten reaktionstechnischen Charakterisierungen von Prozessen zur Bildung des Vorläufermetabolites Bernsteinsäure mit gentechnisch veränderten *E. coli* Stämmen als Basis für die mikrobielle Herstellung von 3-Hydroxyisobuttersäure dar.

### 7.1 Charakterisierung und Optimierung der Bernsteinsäureproduktion aus Glucose

#### 7.1.1 Parallele Kultivierungen in verschiedenen Reaktoren

Für die anaerobe Kultivierung von *E. coli* zur Bernsteinsäureproduktion im Parallelansatz könnten geschüttelte Flaschen sowie Milliliter Rührkesselreaktoren zum Einsatz kommen. Abbildung 7-1 stellt Ergebnisse von anaeroben Kultivierungen in geschüttelten Flaschen und Milliliter Rührkesselreaktoren unter vergleichbaren Bedingungen gegenüber.

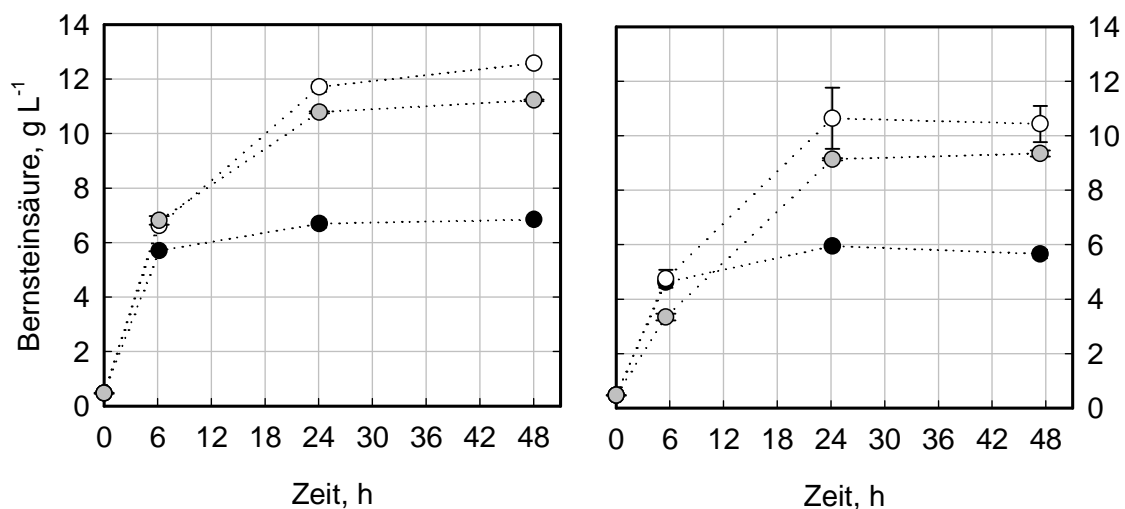


Abbildung 7-1: Bernsteinsäureproduktion mit *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg in geschüttelten Flaschen (links) und Milliliter Rührkesselreaktoren (rechts) in komplexem M9 Medium mit MOPS und 0,5 mM IPTG (37 °C, pH<sub>0</sub> = 6,3 - 6,7 (abhängig von der Darreichungsform des Co-Substrates, ohne Kontrolle), c<sub>X,0</sub> ~ 6,5 g L<sup>-1</sup>). Die Versorgung mit CO<sub>2</sub> erfolgte in beiden Kultivierungssystemen diskontinuierlich vor Inokulation wie in Kapitel 4.4.4 beschrieben. Reaktoren beziehungsweise geschüttelte Flaschen wurden entweder ausschließlich durch Begasung vor Inokulation mit CO<sub>2</sub> versorgt (●) oder durch Begasung vor Inokulation sowie die Zugabe von 10 g L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> (○) beziehungsweise 50 g L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub> (○). Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei parallel durchgeführten Kultivierungen an.

In geschüttelten Flaschen wurde eine maximale Bernsteinsäurekonzentration von  $12,6 \text{ g L}^{-1}$  nach 48 h erreicht bei zusätzlicher Zugabe von  $50 \text{ g L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ . Insgesamt ist ein Sättigungsverlauf der Bernsteinsäurekonzentration in allen Ansätzen erkennbar. Abhängig von der Darreichungsform des Co-Substrates  $\text{CO}_2$  wurden unterschiedlich hohe Konzentrationen an Bernsteinsäure gemessen. Qualitativ ist der Verlauf der Bernsteinsäurekonzentrationen in Milliliter Rührkesselreaktoren mit den Daten aus den geschüttelten Flaschen vergleichbar. Tendenziell wurden in Milliliter Rührkesselreaktoren leicht geringere Konzentrationen erreicht und die Produktion von Bernsteinsäure kam bereits nach 24 h zum Erliegen mit einer maximalen Konzentration von  $10,6 \text{ g L}^{-1}$ .

## Diskussion

Zur Untersuchung der Bernsteinsäurebildung unter anaeroben Bedingungen mit *E. coli* werden die Zellen häufig zunächst in Schüttelkolben aerob kultiviert und anschließend in geschlossene Flaschen für die anaerobe Produktionsphase überführt (Vemuri *et al.* 2002a; Wu *et al.* 2009; Wang *et al.* 2010). Die anaerobe Kultivierung in Flaschen ist arbeitsaufwendig und nur bedingt parallelisierbar. Prinzipiell sind auch Milliliter Rührkesselreaktoren für die anaerobe Kultivierung einsetzbar, wie in Abbildung 7-1 gezeigt ist. Insbesondere die anaerobe Kultivierung von fakultativ anaeroben *E. coli* ist in Milliliter Rührkesselreaktoren durch die Begasung des Kopfraumes mit  $\text{CO}_2$  oder  $\text{N}_2$  leicht realisierbar. Bei einem fakultativ anaeroben Organismus muss beispielsweise nicht darauf geachtet werden, dass dieser während der Inokulationsprozedur nicht mit Sauerstoff in Kontakt kommt. Dieser Aspekt erleichtert die experimentelle Vorgehensweise erheblich.

Aus Abbildung 7-1 kann zudem geschlossen werden, dass die Ergebnisse aus den anaeroben Flaschen und den Milliliter Rührkesselreaktoren vergleichbar sind. Die Produktkonzentrationen in Milliliter Rührkesselreaktoren waren vermutlich deshalb etwas geringer, weil Co-Substrat über die Gasphase verloren gehen konnte. Bei den geschlossenen Flaschen ist dies nicht der Fall. Die durch den Stoffwechsel gebildeten zusätzlichen Gase erzeugten zudem einen Überdruck, der die  $\text{CO}_2$  Löslichkeit verbesserte. Die Produktkonzentrationen verringerten sich in Milliliter Rührkesselreaktoren nach 48 h sogar geringfügig, vermutlich verursacht durch einen etwas zu hoch eingestellten Verdunstungsausgleich. Prinzipiell sind Milliliter Rührkesselreaktoren folglich für die Untersuchung der anaeroben Produktionsphase von *E. coli*  $\Delta 3 \text{ pyc\_Cg}$  geeignet.

Der Sättigungsverlauf der Bernsteinsäurekonzentrationen ist in diesem Experiment auf die Anwendung eines Satzverfahrens sowohl in Bezug auf das Substrat Glucose als auch das Co-Substrat  $\text{CO}_2$  zurückzuführen. Bei höherer Co-Substratversorgung wurden tendenziell höhere Bernsteinsäurekonzentrationen erreicht. Die unterschiedliche Pufferung durch die



Darreichungsformen des Co-Substrates spielte zudem eine Rolle, da der pH in diesem Experiment nicht geregelt wurde.

Die häufig angewendete Methode der Zugabe von schlecht löslichen Carbonaten wie  $MgCO_3$  oder das hier verwendete  $CaCO_3$  dient zwei Zwecken (Blankschien *et al.* 2010): Zum Einen soll eine ausreichende Versorgung des Co-Substrates  $CO_2$  gewährleistet werden und zum Anderen wird eine hohe Pufferwirkung erreicht. Jedoch sind die Prozessgrößen pH und  $CO_2$ -Transport dennoch über kurz oder lang instationär und zudem wird dem System eine weitere (feste) Phase beigefügt. Beide erläuterte Zwecke werden bei der Anwendung von Milliliter Rührkesselreaktoren überflüssig, da bei einer 48fachen parallelen Kultivierung eine pH Regelung sowie eine kontinuierliche Versorgung von  $CO_2$  durch Submersbegasung möglich ist. Diese in Milliliter Rührkesselreaktoren realisierbaren Prozessbedingungen liegen näher an Prozessbedingungen im größeren Maßstab. Demzufolge wurden Milliliter Rührkesselreaktoren den geschüttelten Flaschen für die Untersuchung der anaeroben Produktionsphase von *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg vorgezogen. In allen folgenden Versuchen wurden Milliliter Rührkesselreaktoren mit Submersbegasung betrieben ( $2800 \text{ U min}^{-1}$  sowie  $1,2 \text{ L min}^{-1}$   $CO_2$  Kopfraumbegasung). Eine Begasung mit Stickstoff und geringeren  $CO_2$  Anteilen wäre vermutlich ebenso denkbar, jedoch könnte die Bereitstellung des Co-Substrates als Folge dessen ein limitierender Schritt werden. Die Begasung mit reinem  $CO_2$  stellt das Co-Substrat dagegen im Überschuss bereit.

### 7.1.2 Bernsteinsäureproduktion mit unterschiedlich modifizierten *Escherichia coli*

Zur Verbesserung der anaeroben Bernsteinsäureproduktion wurden in *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg Stoffwechselwege zur Produktion der Nebenprodukte Lactat, Acetat und Ethanol durch die Inaktivierung von *ldhA*, *adhE* sowie *ack-pta* blockiert. Des Weiteren sollte die Überexpression einer Pyruvatcarboxylase aus *Corynebacterium glutamicum* einen höheren Fluss in Richtung des reduktiven Citratzyklus fördern. Für eine erste Bewertung der verschiedenen gentechnischen Veränderungen wurde *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg mit *E. coli*  $\Delta 3$  (ohne Überexpression der Pyruvatcarboxylase) sowie *E. coli* K-12 MG1655 (Wildtyp) in einer anaeroben Kultivierung in Milliliter Rührkesselreaktoren verglichen.

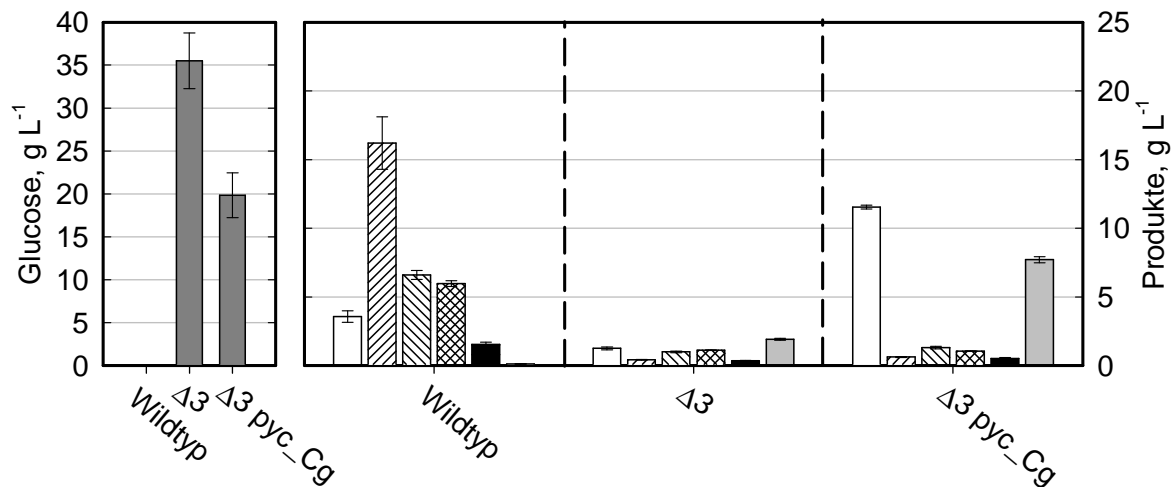


Abbildung 7-2: Verbleibende Glucosekonzentrationen (■) sowie die Konzentrationen der Produkte Bernsteinsäure (□), Lactat (▨), Formiat (▩), Acetat (▧), Ethanol (■) und Pyruvat (▤) nach 24 h anaerober Kultivierung von *E. coli* (Wildtyp), *E. coli* Δ3 sowie *E. coli* Δ3 pyc\_Cg in Milliliter Rührkesselreaktoren in komplexem M9 Medium mit 0,5 mM IPTG (37 °C, pH 6,8, 2800 U min<sup>-1</sup>, 25 mL min<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub>, c<sub>X,0</sub> ~ 4 g L<sup>-1</sup>). Nach 6,2 h anaerober Kultivierung wurde den Milliliter Rührkesselreaktoren Glucose (500 g L<sup>-1</sup>) mit einer Rate von 30 μL h<sup>-1</sup> zugegeben. Fehlerbalken geben die Standardabweichung von vier parallel durchgeführten Kultivierungen an.

Abbildung 7-5 zeigt die verbleibende Glucosekonzentrationen sowie Produktkonzentrationen nach 24 h anaerober Kultivierung von *E. coli* (Wildtyp), *E. coli* Δ3 sowie *E. coli* Δ3 pyc\_Cg in Milliliter Rührkesselreaktoren. In der Kultivierung des Wildtyps wurde die vorgelegte Glucose (20 g L<sup>-1</sup>) sowie das zugefügte Substrat in 24 h vollständig verbraucht. In der Kultivierung von *E. coli* Δ3 konnte eine vergleichbar hohe Konzentration von 35,5 g L<sup>-1</sup> Glucose nach 24 h festgestellt werden. Mit einer verbleibenden Glucosekonzentration von 19,9 g L<sup>-1</sup> war der Glucoseverbrauch von *E. coli* Δ3 pyc\_Cg geringer als im Falle vom Wildtyp. Das Produktspektrum des Wildtyps entspricht dem einer gemischten Säuregärung mit dem Hauptprodukt Lactat (16,2 g L<sup>-1</sup>), höheren Konzentrationen an Formiat (6,6 g L<sup>-1</sup>) und Acetat (6 g L<sup>-1</sup>), sowie geringeren Konzentrationen an Bernsteinsäure (3,6 g L<sup>-1</sup>) und Ethanol (1,6 g L<sup>-1</sup>) nach 24 h. Bei der Kultivierung von *E. coli* Δ3 konnte nur eine sehr geringe Produktbildung beobachtet werden mit Konzentrationen unter 2 g L<sup>-1</sup> im Falle aller analysierten Substanzen. Eine deutlich erhöhte Bernsteinsäurebildung (11,5 g L<sup>-1</sup>) konnte bei der Kultivierung von *E. coli* Δ3 pyc\_Cg nach 24 h festgestellt werden. Es kam zudem zu einer Akkumulation des für die gemischte Säuregärung ungewöhnlichen Produktes Pyruvat (7,7 g L<sup>-1</sup>). Andere analysierte Substanzen wurden vergleichbar mit der Kultivierung von *E. coli* Δ3 in geringen Konzentrationen gemessen.

## Diskussion

Mit *E. coli* K-12 MG1655 wurde trotz eines hohen Substratverbrauches vergleichbar wenig Bernsteinsäure gebildet. Dieses Ergebnis ist typisch für eine gemischte Säuregärung durch *E. coli*, bei der die Hauptprodukte in der Regel Acetat, Ethanol, Lactat und Formiat sind und nur geringe Konzentrationen an Bernsteinsäure auftreten (Clark 1989). In der hier gewählten Darstellungsweise (Massenkonzentrationen) erscheinen die Bildung von Ethanol gering und die von Lactat vergleichbar hoch. Bei der Betrachtung der molaren Konzentrationen ergibt sich jedoch ein anderes Verhältnis, bei dem die Bernsteinsäurekonzentration deutlich am geringsten ist (Daten nicht gezeigt). Das genaue Verhältnis der Produktbildungen kann stark vom Stamm und den Wachstumsbedingungen abhängen (Blackwood *et al.* 1956; Chatterjee *et al.* 2001). In diesem Experiment war das Verhältnis der Produktbildungen zueinander zudem über die Zeit nicht konstant (Daten nicht gezeigt). Eine geringe Ethanolkonzentration kann durch Verdunstung aufgrund der kontinuierlichen Begasung erklärt werden.

Die Inaktivierung von *ldhA*, *adhE* sowie *ack-pta* in *E. coli*  $\Delta 3$  hatte verglichen mit dem Wildtyp einen sehr geringen Glucoseverbrauch zur Folge. Es konnte keine nennenswerte Bildung sämtlicher analysierter Produkte inklusive Bernsteinsäure festgestellt werden. Prinzipiell kann die Durchführung gentechnischer Veränderungen unerwartete sowie unerwünschte Folgen haben wie die hier beobachtete deutliche Reduzierung der Glucoseaufnahme. *E. coli* NZN111, eine Mutante von *E. coli* W1485 mit Inaktivierungen von *pfIB* sowie *ldhA* kann unter anaeroben Bedingungen ebenso wenig wie *E. coli*  $\Delta 3$  die Nebenprodukte Acetat, Ethanol, und Lactat bilden. Für *E. coli* NZN111 wird berichtet, dass unter anaeroben Bedingungen Glucose nur geringfügig oder gar nicht für das Wachstum beziehungsweise die Bernsteinsäureproduktion umgesetzt werden kann (Donnelly *et al.* 1998; Chatterjee *et al.* 2001; Vemuri *et al.* 2002a; Wu *et al.* 2009). Nur mit weiteren gentechnischen Veränderungen (Chatterjee *et al.* 2001; Hong und Lee 2002) oder speziellen Wachstumsbedingungen (Wu *et al.* 2009) wird eine deutlich verbesserte Bernsteinsäurebildung erreicht. Allein eine Inaktivierung von *ack-pta* in *E. coli* MG1655 kann bereits zu einer deutlichen Reduzierung der Wachstumsrate sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen führen (Diaz-Ricci *et al.* 1991; Dedhia *et al.* 1994).

Eine Ursache der geringen Glucoseverwertung mit *E. coli*  $\Delta 3$  ist vermutlich eine unter den gewählten experimentellen Bedingungen eingeschränkte Möglichkeit der Speisung des Citratzyklus. Da *E. coli*  $\Delta 3$  aufgrund der Deletionen von *ldhA* und *adhE* unter anaeroben Bedingungen in der Möglichkeit zur Oxidation von NADH eingeschränkt ist, könnte ein Mangel an NAD<sup>+</sup> und damit eine verringerte glykolytische Aktivität für die deutlich langsamere Verwertung von Glucose und die dadurch resultierende geringe Produktbildung verantwortlich sein. Diese Annahme wird durch die Tatsache untermauert, dass eine Überexpression

der Pyruvatcarboxylase aus *Corynebacterium glutamicum* in *E. coli*  $\Delta 3$  *pyc\_Cg* schließlich zu einer deutlich erhöhten Bernsteinsäurebildung führt. Eine hohe Aktivität der Pyruvatcarboxylase bedeutet eine stärkere Speisung des Citratzyklus durch die Bereitstellung von Oxalacetat. Bei dessen folgender Umwandlung zu Succinat unter anaeroben Bedingungen werden pro Mol Succinat zwei Mol  $\text{NAD}^+$  gebildet. Diese Regeneration des Reduktionsäquivalents kann ohne eine Überexpression der Pyruvatcarboxylase scheinbar nur in geringerem Ausmaß stattfinden. Die Überexpression von Enzymen für andere anaplerotische Reaktionen kann zu einer ähnlichen Verbesserung der Bernsteinsäurebildung führen, was bereits in zahlreichen Studien gezeigt wurde (vergleiche Kapitel 3.2.2).

Die bei *E. coli*  $\Delta 3$  *pyc\_Cg* durchgeführten gentechnischen Veränderungen hatten wie geplant eine Verbesserung der Bernsteinsäureproduktion zur Folge. Die Bildung der Nebenprodukte Lactat, Acetat und Ethanol wurde wie erwartet durch Inaktivierung von *ldhA*, *adhE* sowie *ack-pta* minimiert. Allerdings werden geringe Konzentrationen dieser Säuren trotz entsprechender Knockouts in zahlreichen Publikationen erwähnt (Donnelly *et al.* 1998; Sanchez *et al.* 2005b). Lactat kann beispielsweise ebenfalls über eine Reaktionskette gebildet werden, bei der die Methylglyoxal Synthase (*mgsA*) beteiligt ist und Pyruvat könnte über die Pyruvatoxidase (*poxB*) zu Acetat umgesetzt werden (Jantama *et al.* 2008).

Neben der Bernsteinsäurebildung kam es in dem in Abbildung 7-2 gezeigten Versuch im Fall von *E. coli*  $\Delta 3$  *pyc\_Cg* zudem zu einer unerwünschten Pyruvatakkumulation. Bei der gemischten Säuregärung mit *E. coli* wird dieses Produkt typischerweise nicht erwähnt, jedoch berichten zahlreiche Studien im Zusammenhang der anaeroben Kultivierung gentechnisch veränderter *E. coli* ebenfalls von einer Pyruvatbildung (Diaz-Ricci *et al.* 1991; Vemuri *et al.* 2002b; Martinez *et al.* 2010).

### 7.1.3 Identifizierung von wichtigen Prozessvariablen

#### Anfangsbiomassekonzentration

Abbildung 7-3 zeigt die reaktionstechnische Charakterisierung einer anaeroben Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 3$  *pyc\_Cg* in Milliliter Rührkesselreaktoren abhängig von verschiedenen Biotrockenmassekonzentrationen zu Beginn des Versuches.

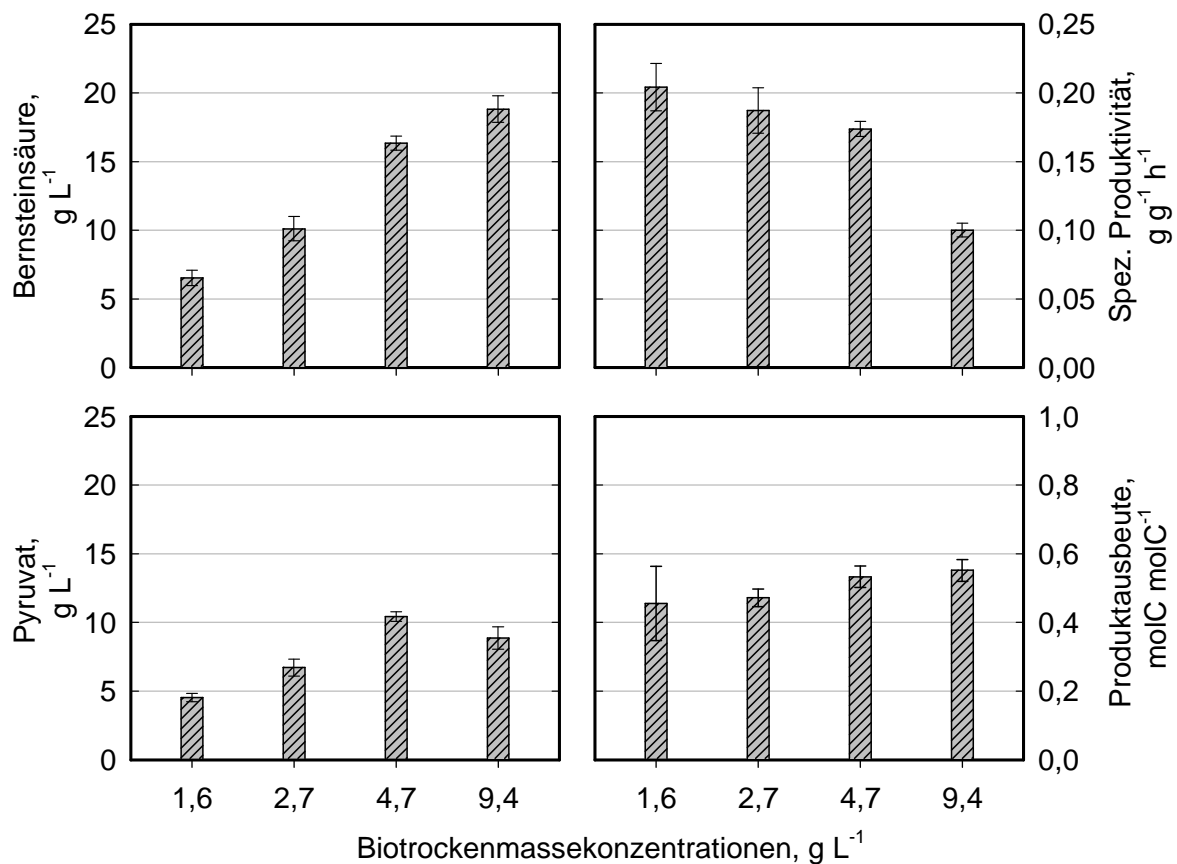


Abbildung 7-3: Bernsteinsäureproduktion mit *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg in Milliliter Rührkesselreaktoren in komplexem M9 Medium mit 0,5 mM IPTG (37 °C, pH 7, 2800 U min<sup>-1</sup>, 25 mL min<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub>) abhängig von verschiedenen Biotrockenmassekonzentrationen zu Beginn des Versuches. Die Bernsteinsäurekonzentration, die Pyruvatkonzentration, die spezifische Produktivität sowie die Produktausbeute nach 20 h Kultivierung sind dargestellt. Nach 8 h anaerober Kultivierung wurde den Milliliter Rührkesselreaktoren Glucose (500 g L<sup>-1</sup>) mit einer Rate von 30  $\mu$ L h<sup>-1</sup> zugegeben. Fehlerbalken geben die Standardabweichung von vier parallel durchgeführten Kultivierungen an.

Die Bernsteinsäurekonzentration nach 20 h stieg erwartungsgemäß mit zunehmender Animpfzellichte bis 18,8 g L<sup>-1</sup> bei einer Biotrockenmassekonzentration von 9,4 g L<sup>-1</sup>. Bei einer geringen Biotrockenmassekonzentration von 1,6 g L<sup>-1</sup> war die spezifische Produktivität mit 0,2 g g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> am höchsten. Die spezifische Produktivität nahm zunächst mit steigender Biotrockenmassekonzentration nur geringfügig ab. Bei der höchsten Biotrockenmassekonzentration war jedoch eine deutliche Verringerung der spezifischen Produktivität auf 0,1 g g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> zu erkennen. Die Pyruvatkonzentration nach 20 h stieg ebenfalls mit zunehmender Biotrockenmassekonzentration zunächst stetig an. Nur bei der höchsten Biotrockenmassekonzentration ist dieser Anstieg nicht mehr erkennbar. Die Produktausbeuten lagen mit 0,45 - 0,55 molC molC<sup>-1</sup> für jede Biotrockenmassekonzentration in einer

vergleichbaren Größenordnung. Nur eine geringe Steigerung der Produktausbeute mit zunehmender Biotrockenmassekonzentration ist zu erkennen.

## Diskussion

Die Akkumulation von Nebenprodukten oder das Versiegen von Medienkomponenten können beispielsweise dazu führen, dass die spezifische Produktivität mit zunehmender Zellkonzentration im Verlauf des Prozesses sinkt. Bei einer Biotrockenmassekonzentration von 1,6 - 4,7 g L<sup>-1</sup> konnte jedoch keine signifikante Verringerung der spezifischen Produktivität innerhalb von 20 h bei den untersuchten Bedingungen festgestellt werden. Anhand des Titrationsprofils des Korrekturmittels (Daten nicht gezeigt) für eine Biotrockenmassekonzentration von 9,4 g L<sup>-1</sup> konnte festgestellt werden, dass bei den vorliegenden Bedingungen nach 20 h bereits die gesamte Glucose verbraucht wurde, was vermutlich eine wesentliche Ursache für die deutlich geringere spezifische Produktivität darstellt. Vermutlich wäre die spezifische Produktivität ohne Glucoselimitation nicht so stark beeinträchtigt worden. Die Bildung von Pyruvat stieg analog zur Bernsteinsäurebildung bis hin zu einer Biotrockenmassekonzentration von 4,7 g L<sup>-1</sup> stetig an. Es ist anzunehmen, dass bei einer Biotrockenmassekonzentration von 9,4 g L<sup>-1</sup> Pyruvat wieder zur Bernsteinsäureproduktion aufgenommen wurde, wodurch auch eine leicht höhere Produktausbeute zu erklären ist.

Für die Gestaltung weiterer Versuche ist es hilfreich abschätzen zu können, ab welcher Biomassekonzentration die spezifische Produktivität nach einer gegebenen Zeit unter anfänglich gewählten Referenzbedingungen sinkt. Dies war bei dem in Abbildung 7-3 gezeigten Experiment bei Biomassekonzentrationen über 4,2 g L<sup>-1</sup> der Fall. Für folgende Versuche wurde daher eine Biotrockenmassekonzentration zu Beginn des Versuches von 3 - 4 g L<sup>-1</sup> als sinnvoll erachtet. Diese Zellkonzentration reicht voraussichtlich aus um signifikante Unterschiede in der Bernsteinsäurekonzentration abhängig von den untersuchten Prozessvariablen zu erkennen. Bei höheren Zellkonzentrationen könnte sich ein zum Probenahmezeitpunkt bereits eintretender Sättigungsverlauf der Bernsteinsäurekonzentration nachteilig auf die Auswertung der Experimente auswirken. Zur Verhinderung einer Limitierung des Substrates Glucose wurde zudem abhängig von der untersuchten Prozessvariable die Startzeit des intermittierenden Zulaufs nach Ermessen variiert. Wenn es für eine Verbesserung der Interpretationsfähigkeit der einzelnen Versuche sinnvoll erschien, wurden zudem mehrere Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht (in der Regel nach 6 h, 24 h und 48 h).

### Vorkultivierung in Schüttelkolben

Für Kultivierungen in Milliliter Rührkesselreaktoren sollte im Rahmen dieser Arbeit überwiegend ein standardisiertes Verfahren für die Biomassebildung zum Einsatz kommen, um zunächst die Änderung von Prozessvariablen der anaeroben Phase charakterisieren zu können. Welchen Effekt ein alternatives Verfahren zur Biomassebildung in Schüttelkolben auf die Bernsteinsäureproduktion mit *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg haben kann, ist in Abbildung 7-4 dargestellt.

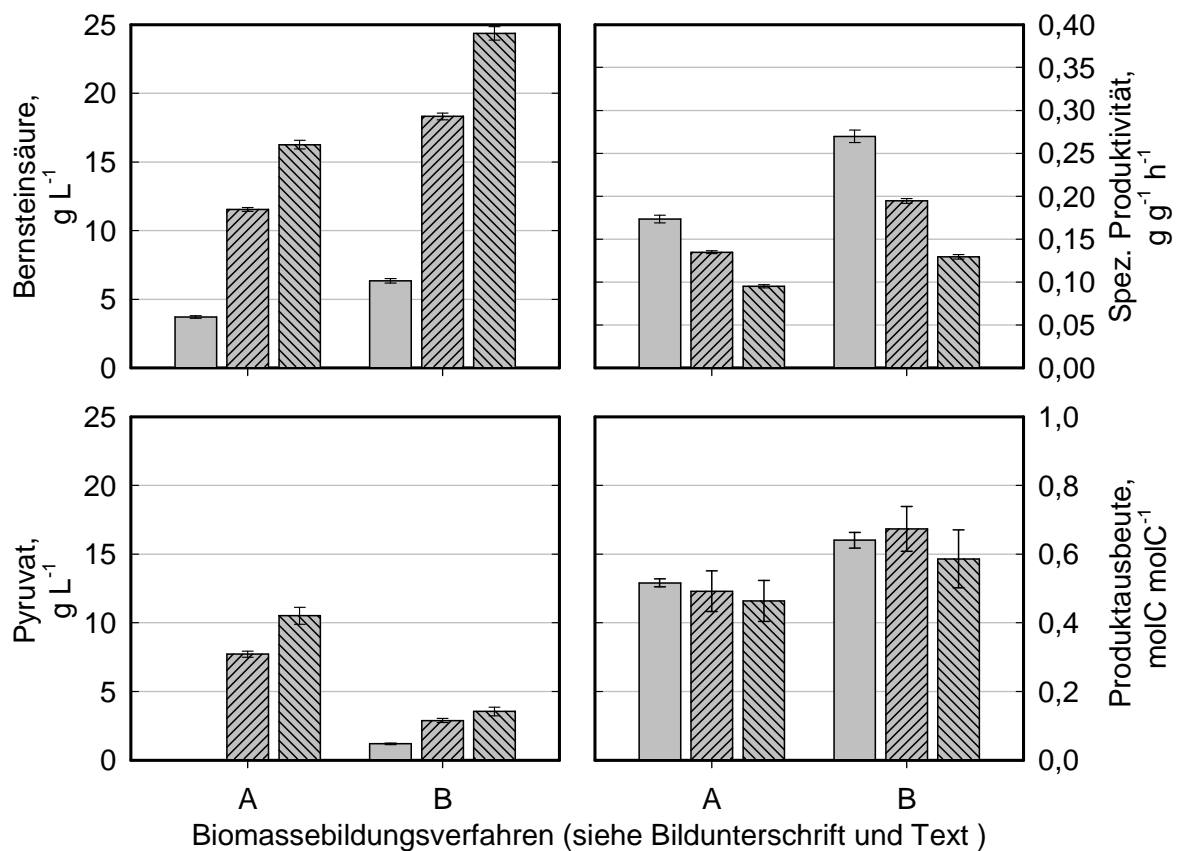


Abbildung 7-4: Bernsteinsäureproduktion mit *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg in Milliliter Rührkesselreaktoren in komplexem M9 Medium mit 0,5 mM IPTG (37 °C, pH 6,8, 2800 U min<sup>-1</sup>, 25 mL min<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub>, c<sub>X,0</sub> ~ 3,7 g L<sup>-1</sup>) abhängig von zwei verschiedenen Biomassebildungsverfahren. Die Zellen wurden zuvor entweder wie in Kapitel 4.4.2 beschrieben kultiviert (A) oder mit einem alternativen Verfahren wie im Text erläutert (B). Die Bernsteinsäurekonzentrationen, die Pyruvatkonzentration, die spezifischen Produktivitäten sowie die Produktausbeuten nach 6 h (□), 24 h (▨) und 48 h (▩) Versuchszeit sind dargestellt. Nach 6,2 h anaerober Kultivierung wurde den Milliliter Rührkesselreaktoren Glucose (500 g L<sup>-1</sup>) mit einer Rate von 30  $\mu$ L h<sup>-1</sup> zugegeben. Fehlerbalken geben die Standardabweichung von vier parallel durchgeführten Kultivierungen an.

Für den Fall A wurde *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg in einem einstufigen Verfahren 21 h lang im komplexen mit MOPS gepufferten M9 Medium und einer Induktion mit 0,5 mM IPTG kultiviert, wie in

Kapitel 4.4.2 beschrieben. Im alternativen Fall B wurden die Zellen zunächst 15 h lang in komplexem mit MOPS gepuffertem M9 Medium ohne Zugabe von IPTG kultiviert. Anschließend wurden die Zellen im Verhältnis 1:1 mit frischem Medium verdünnt und die Induktion erfolgte mit 0,5 mM IPTG. Die Zellen wurden für weitere 3 h kultiviert. Dieses Verfahren ähnelte dem in Kapitel 4.4.2 beschriebenen Biomassebildungsverfahren für *E. coli* Stämme, die zwei Plasmide tragen. Die Zellernte beider Kultivierungen sowie die Inokulation der Milliliter Rührkesselreaktoren erfolgte gleichzeitig wie in Kapitel 4.4.3 beschrieben.

Im Falle des einstufigen Verfahrens zur Biomassebildung wurde nach 48 h eine Bernsteinsäurekonzentration von 16,3 g L<sup>-1</sup> erzeugt. Bei Nutzung des alternativen Verfahrens lag die Bernsteinsäurekonzentration nach 48 h mit 24,4 g L<sup>-1</sup> deutlich höher. Entsprechendes ist bei den spezifischen Produktivitäten zu beobachten, die sich zwar mit der Zeit verringerten, bei Nutzung des alternativen Verfahrens jedoch vergleichsweise deutlich höher lagen. Die Reduzierung der spezifischen Produktivität mit der Zeit war beim alternativen Verfahren zur Biomassebildung stärker. Im Falle des einstufigen Verfahrens zur Biomassebildung wurden Pyruvatkonzentrationen bis zu 10,5 g L<sup>-1</sup> beobachtet, während bei Nutzung des alternativen Verfahrens die Pyruvatkonzentration mit 3,6 g L<sup>-1</sup> nach 48 h deutlich niedriger lag. Die Produktausbeuten verhielten sich zeitlich invariant mit Werten um 0,46 - 0,52 molC molC<sup>-1</sup> für das einstufige Verfahren zur Biomassebildung und 0,59 - 0,67 molC molC<sup>-1</sup> für das alternative Verfahren.

## Diskussion

Mehrere Studien zeigen, dass in zweistufigen Kultivierungsprozessen zur Produktion von Bernsteinsäure mit *E. coli* insbesondere unterschiedliche Prozessvariablen aus der vorangehenden aeroben Wachstumsphase die Bernsteinsäurebildung in der darauffolgenden anaeroben Phase beeinflussen (Vemuri *et al.* 2002b; Wu *et al.* 2009; Jiang *et al.* 2010; Martinez *et al.* 2010). In diesem Experiment wurden zwei unterschiedliche Verfahren zur Biomasseherstellung und Induktion im Schüttelkolben gegenübergestellt. Das alternative Verfahren (Fall B) stellte sich gegenüber dem in Kapitel 4.4.3 beschrieben und in dieser Arbeit überwiegend genutzten Verfahren als besser hinsichtlich der Bernsteinsäurebildung heraus. Verschiedene Effekte könnten diese Beobachtung verursacht haben. Da im Falle des einstufigen Verfahrens vergleichbar hohe Mengen an Pyruvat gebildet wurden, könnte eine ungünstige Expression der Pyruvatcarboxylase eine Ursache für die vergleichbar geringe Bernsteinsäurebildung gewesen sein. Eine Bestimmung der Pyruvatcarboxylase Aktivität in den jeweiligen Zellen am Ende des Versuches (Daten nicht gezeigt) ergab jedoch, dass diese bei den einstufig kultivierten Zellen sogar geringfügig höher lag. Die Aktivität des re-



kombinanten Enzyms allein scheint folglich nicht die Ursache der unterschiedlichen reaktionstechnischen Eigenschaften sein.

Verglichen zu dem einstufigen Verfahren wurde unter Verwendung des zweistufigen Verfahrens zur Biomasseherstellung und Induktion in Schüttelkolben auch geringfügig mehr Glucose während der anschließenden Produktbildungsphase aufgenommen (Daten nicht gezeigt). Die höhere Ausbeute und eine geringere Akkumulation des Intermediates Pyruvat zeigen jedoch, dass zudem ein effektiverer Umsatz des Substrates zu Bernsteinsäure erfolgte. Als Ursache dafür ist der physiologische Zustand der Zellen insgesamt durch die Bedingungen am Ende der Schüttelkolbenkultivierung anzunehmen. Neben der Speisung des Citratzyklus durch die Umwandlung von Pyruvat zu Oxalacetat mittels Pyruvatcarboxylase ist beispielsweise eine Isocitrat Lyase (*aceA*) Aktivität für eine optimale Bernsteinsäureproduktion erforderlich (Cox *et al.* 2006; Sanchez *et al.* 2006). Normalerweise ist Isocitrat Lyase unter anaeroben Bedingungen aufgrund des Repressors *icIR* inaktiv. Bei vorangehender aerober Kultivierung kann unter günstigen Bedingungen jedoch eine Aktivität beibehalten werden (Vemuri *et al.* 2002b; Sanchez *et al.* 2006; Wang *et al.* 2011a).

Aus dem Experiment lässt sich schließen, dass die Durchführungsweise der Schüttelkolbenkultivierungen zur Biomassebildung einen entscheidenden Einfluss auf die anschließende Bernsteinsäurebildung haben kann. Obwohl sich bei vergleichender Betrachtung das einstufige Kultivierungsverfahren als weniger geeignet für eine optimale Bernsteinsäurebildung herausstellte, wurde dieses zur Reduzierung des experimentellen Aufwandes für folgende Versuche angewendet. Ein weiteres Experiment (Daten nicht gezeigt) identifizierte bei Verwendung des einstufigen Kultivierungsverfahrens eine Kultivierungszeit von 21 h als optimal für die anschließende Bernsteinsäurebildung mit *E. coli*  $\Delta 3$  *pyc\_Cg*. Kürzere oder längere Kultivierungszeiten führten zu deutlich schlechteren spezifischen Produktivitäten. Dieser weitere Aspekt deutet darauf hin, dass die quantitative Vergleichbarkeit von Daten verschiedener Experimente beeinträchtigt sein könnte, da geringe Variation der vorangehenden Biomassebildung im Schüttelkolben bereits deutliche Auswirkungen auf die anschließende Bernsteinsäurebildung haben könnten. Folglich wurden bei Kultivierungen in Milliliter Rührkesselreaktoren ausschließlich Daten aus einem Parallelexperiment quantitativ miteinander verglichen.

### **pH im Medium**

Milliliter Rührkesselreaktoren wurden im Rahmen dieses Projektes verwendet, um die Bernsteinsäureproduktion mit *E. coli*  $\Delta 3$  *pyc\_Cg* abhängig von verschiedenen pH-Sollwerten unter prozessrelevanten Bedingungen zu bestimmen.

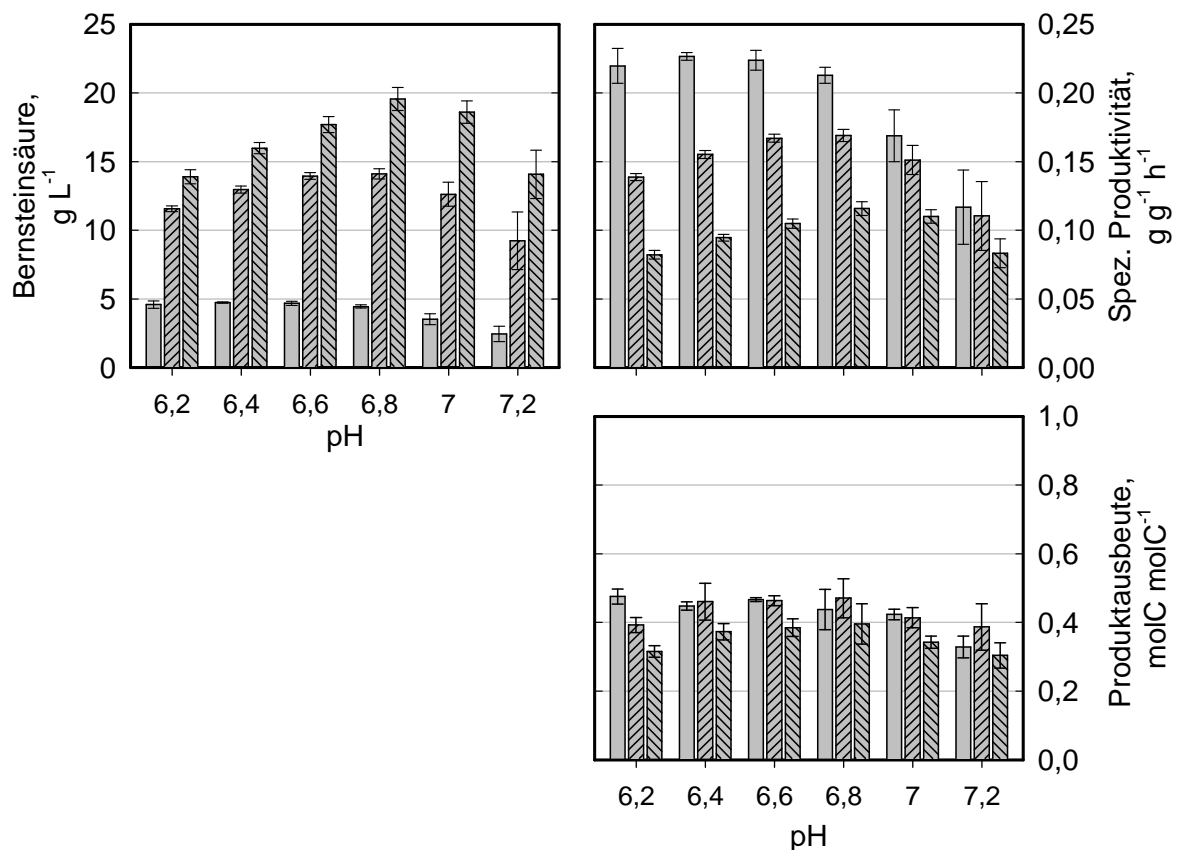


Abbildung 7-5: Bernsteinsäureproduktion mit *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg in Milliliter Rührkesselreaktoren in komplexem M9 Medium mit 0,5 mM IPTG (37 °C, 2800 U min<sup>-1</sup>, 25 mL min<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub>,  $c_{X,0} \sim 3,5$  g L<sup>-1</sup>) abhängig von verschiedenen geregelten pH. Die Bernsteinsäurekonzentrationen, die spezifischen Produktivitäten sowie die Produktausbeuten nach 6 h (□), 23,9 h (▨) und 48,4 h (▩) Versuchszeit sind dargestellt. Nach 11,9 h anaerober Kultivierung wurde den Milliliter Rührkesselreaktoren Glucose (500 g L<sup>-1</sup>) mit einer Rate von 30  $\mu$ L h<sup>-1</sup> zugegeben. Fehlerbalken geben die Standardabweichung von vier parallel durchgeführten Kultivierungen an.

Abbildung 7-5 zeigt die Bernsteinsäurekonzentrationen, die spezifischen Produktivitäten sowie die Produktausbeuten zu verschiedenen Prozesszeiten einer anaeroben Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg in Milliliter Rührkesselreaktoren abhängig vom eingestellten pH Sollwert. Mit zunehmender Prozesszeit waren größere Unterschiede in der Bernsteinsäureproduktion zu erkennen. Während sich die Bernsteinsäurekonzentrationen und spezifischen Produktivitäten nach 6 h Prozesszeit bei einem geregelten pH zwischen 6,2 und 6,8 noch ähnelten, war nach 48 h Prozesszeit eine maximale Bernsteinsäurekonzentration beziehungsweise spezifische Produktivität bei pH 6,8 zu beobachten. Schon nach 6 h Prozesszeit waren die spezifischen Produktivitäten und Bernsteinsäurekonzentrationen bei Sollwerten über pH 6,8 deutlich geringer. Die Produktausbeuten lagen unabhängig vom pH und der Prozesszeit in einer ähnlichen Größenordnung. Bei einem hohen pH von 7,2 schienen die Produktausbeu-

ten tendenziell zu jeder Prozesszeit etwas geringer zu sein, während bei einem sehr niedrigen pH von 6,2 die Produktausbeute zu Beginn des Prozesses noch vergleichbar hoch war und anschließend abzunehmen schien.

## Diskussion

Bei der Produktion von organischen Säuren mit Mikroorganismen kann der pH des Mediums und dessen Regelung einen entschiedenen Einfluss auf die Effizienz des Prozesses haben, nicht zuletzt, weil durch den pH der Anteil an freien Säuren bestimmt wird, die einen starken Einfluss auf den Stoffwechsel des Mikroorganismus haben können (Russell und Diez-Gonzalez 1997; Demler und Weuster-Botz 2011). Im Rahmen der Bernsteinsäureproduktion wurde der Einfluss des pH in mehreren Studien für *E. coli* (Agarwal *et al.* 2006; Lu *et al.* 2009c) sowie für andere Mikroorganismen (Samuelov *et al.* 1991; Van der Werf *et al.* 1997; Isar *et al.* 2006b) bereits untersucht.

Es konnte ein pH Optimum für die Bernsteinsäureproduktion ermittelt werden, welches mit pH 6,8 in einem Bereich liegt, der für das Wachstum von *E. coli* ebenfalls optimal ist. Als Ursache für das Beobachten eines pH Optimums können mehrere vom pH beeinflusste Mechanismen in Betracht gezogen werden, die zum Teil eine zueinander gegenläufige Wirkung auf die Bernsteinsäurebildung haben könnten. Da der zellinterne pH von *E. coli* (7,0 - 8,0) keine signifikanten Änderungen abhängig vom äußeren pH aufweist (Olsen *et al.* 2002), könnte ein zu geringer pH des Mediums beispielsweise zu einem starken pH Gradienten führen, der belastend auf den Stoffwechsel wirkt. Eine hohe Zugabe an Korrekturmittel aufgrund eines hohen pH Sollwertes führt wiederum zu einer hohen Ionenstärke, welche die Bernsteinsäureproduktion negativ beeinflussen könnte (Lu *et al.* 2009c). Die Verfügbarkeit des Co-Substrates CO<sub>2</sub> ist im Rahmen des hier zur Anwendung gebrachten Prozesses ebenfalls stark vom pH beeinflusst. Der Transport und die Bereitstellung von CO<sub>2</sub> für anaplerotische CO<sub>2</sub> fixierende Reaktionen im Rahmen der anaeroben Bernsteinsäureproduktion wurde bereits in einigen Studien untersucht und modelliert (Song *et al.* 2007; Lu *et al.* 2009b; Xi *et al.* 2011). Die Gesamtkonzentration von CO<sub>2</sub> und Hydrogencarbonat im Medium steigt mit dem pH stark an (Xi *et al.* 2011), was eine CO<sub>2</sub> Fixierung tendenziell begünstigen würde. Die Aktivitäten der CO<sub>2</sub> fixierenden Enzyme sind jedoch wiederum gegebenenfalls bei einem niedrigeren pH deutlich höher (Samuelov *et al.* 1991).

In einer Studie über die anaerobe Bernsteinsäurebildung mit *E. coli* AFP111 wurde ein optimaler pH von 6,4 identifiziert (Lu *et al.* 2009c). In der hier durchgeführten Studie erschienen niedrigere pH Werte zunächst auch geeignet. Erst im späteren Verlauf des Prozesses verbesserte sich die Bernsteinsäurebildung bei pH Werten um 6,8.

Sofern sich die Zielgröße (Bernsteinsäurekonzentration) stärker abhängig vom pH (pH 7,0 - pH 7,2) änderte, nahm ebenfalls die Reproduzierbarkeit der Daten ab, was durch höhere Standardabweichungen in Abbildung 7-5 zu erkennen ist. Dies kann mit einer leicht fehlerbehafteten Einstellung des pH Sollwertes durch die angewendete Messtechnik in den Milliliter Rührkesselreaktoren begründet werden. Für weitere Versuche in Milliliter Rührkesselreaktoren wurde der optimale pH von 6,8 als Sollwert verwendet.

### Bernsteinsäureproduktion mit verschiedenen Substraten

Die Bernsteinsäureproduktion mit *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg in Milliliter Rührkesselreaktoren wurde unter Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen sowohl in der aeroben Biomassebildungsphase als auch in der anaeroben Produktionsphase untersucht. Tabelle 3-4 in Kapitel 3.2.2 gibt einen Überblick über relevante Eigenschaften aller verwendeten Substrate.

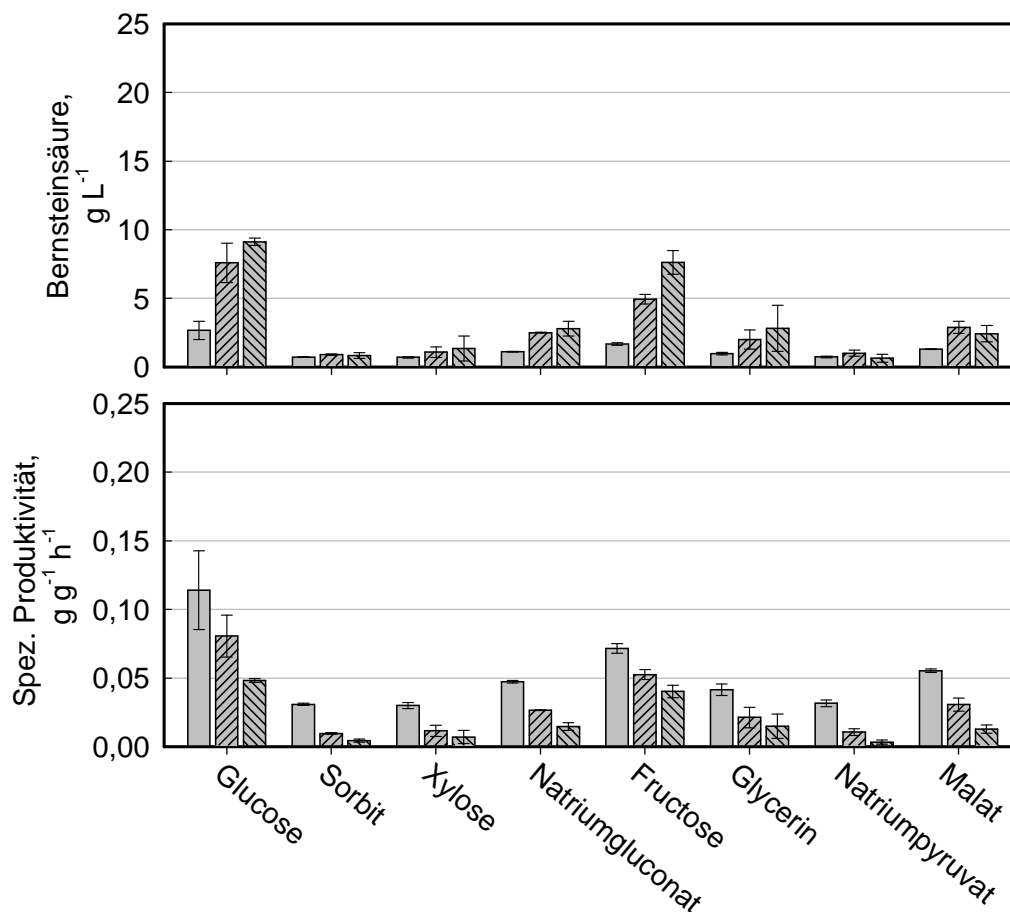


Abbildung 7-6: Bernsteinsäureproduktion mit *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg in Milliliter Rührkesselreaktoren im komplexen M9 Medium mit 0,5 mM IPTG (37 °C, pH 6,8, 2800 U min<sup>-1</sup>, 25 mL min<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub>, c<sub>X,0</sub> ~ 3,9 g L<sup>-1</sup>) unter Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen in der Produktionsphase. Die Bernsteinsäurekonzentrationen und die spezifischen Produktivitäten nach 6 h (□), 24,3 h (▨) und 48,8 h (▩) Versuchszeit sind dargestellt. Das Experiment erfolgte im Satzverfahren mit einer Konzentration von 0,67 mol C L<sup>-1</sup> Substrat (entsprechend 20 g L<sup>-1</sup> Glucose). Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei parallel durchgeführten Kultivierungen an.

Abbildung 7-6 zeigt die Bernsteinsäureproduktion mit *E. coli*  $\Delta 3$  *pyc\_Cg* in Milliliter Rührkesselreaktoren unter Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen in der anaeroben Produktionsphase zu verschiedenen Prozesszeiten. Unter Verwendung von Glucose als Substrat konnte im Satzverfahren  $9,1 \text{ g L}^{-1}$  Bernsteinsäure nach 48,8 h erzeugt werden. Die Verwendung von Fructose resultierte in einer Bernsteinsäurekonzentration von  $7,6 \text{ g L}^{-1}$ . Mit keinem anderen untersuchten Substrat wurde eine Bernsteinsäurekonzentration über  $3 \text{ g L}^{-1}$  erzeugt.

In einem weiteren Experiment wurde die Bernsteinsäureproduktion abhängig von verschiedenen Kohlenstoffquellen in der vorangegangenen Biomassebildungsphase untersucht. *E. coli*  $\Delta 3$  *pyc\_Cg* wurde unter Einsatz verschiedener Substrate in Schüttelkolben für 21 h kultiviert. Die Zellen wurden wie in Kapitel 4.4.3 beschrieben geerntet und anschließend unter anaeroben Bedingungen in Milliliter Rührkesselreaktoren mit Glucose als Substrat kultiviert. Der Verlauf des Wachstums war für alle verwendeten Substrate bis auf Glycerin vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Unter Verwendung von Glycerin wurde eine geringfügig höhere Zelldichte erreicht. Die Bernsteinsäurekonzentrationen, die spezifischen Produktivitäten sowie die Produktausbeuten nach verschiedenen Prozesszeiten der anaeroben Produktionsphase sind in Abbildung 7-7 dargestellt.

Nach 48,4 h Prozesszeit wurden unter Verwendung von Glucose, Glycerin, Pyruvat sowie Malat in der Wachstumsphase vergleichbare Produktkonzentrationen zwischen  $17,2$  und  $19,4 \text{ g L}^{-1}$  erreicht. Demzufolge waren die spezifischen Produktivitäten nach 48,4 h Prozesszeit ebenfalls vergleichbar. Unter Einsatz von Gluconsäure als Substrat in der Wachstumsphase wurde eine deutlich schlechtere spezifische Produktivität mit  $0,058 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  verglichen zu  $0,106 - 0,118 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erzielt. Es konnten unter Verwendung von den Intermediaten der Bernsteinsäuresynthese Malat und Pyruvat vergleichbar hohe Produktausbeuten bis zu  $0,89 - 0,92 \text{ molC molC}^{-1}$  nach 24 h Prozesszeit erreicht werden. Die Produktausbeuten der anaeroben Bernsteinsäurebildung mit Glucose bei Wachstum auf den anderen drei Substraten lag deutlich niedriger um  $0,7 \text{ molC molC}^{-1}$  (Glycerin) beziehungsweise  $0,53 - 0,57 \text{ molC molC}^{-1}$  (Gluconsäure, Glucose) nach 24 h Prozesszeit.

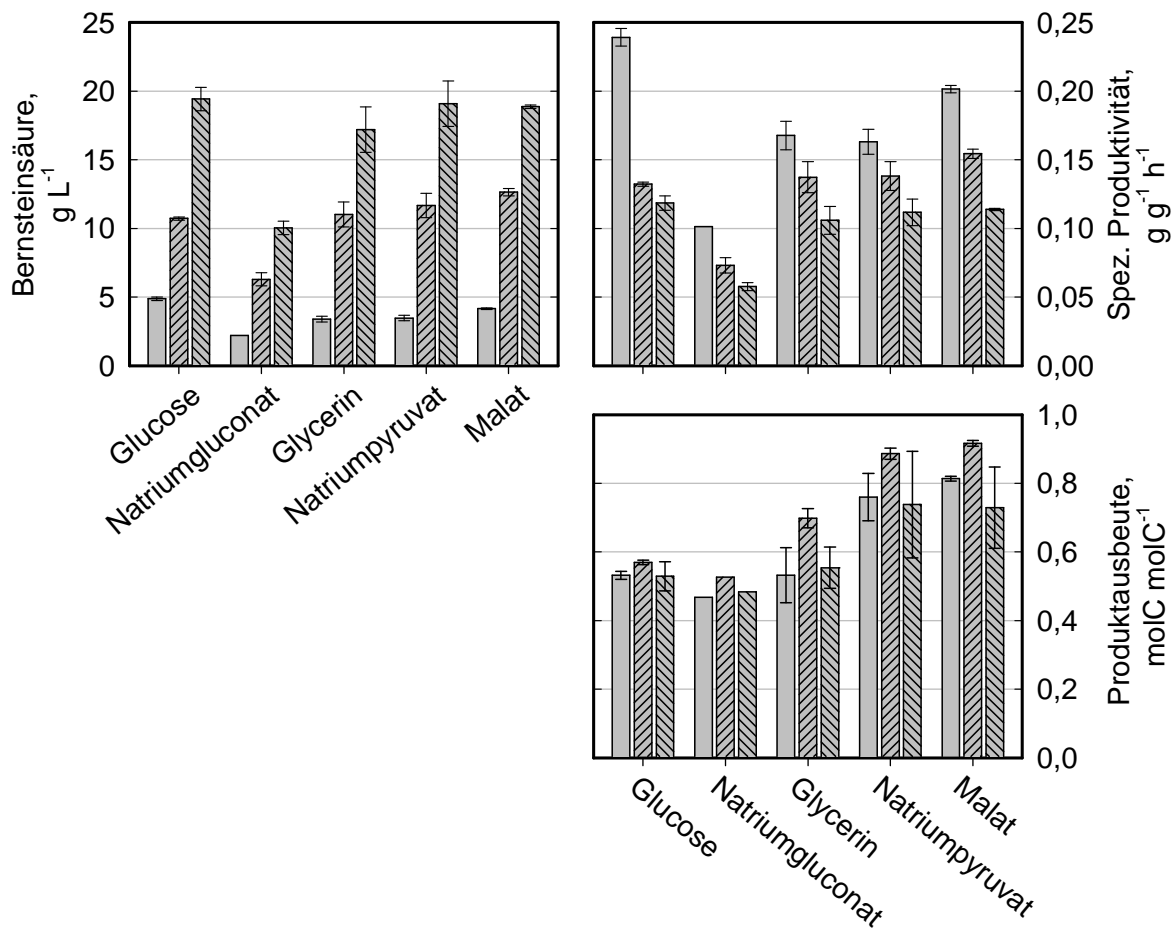


Abbildung 7-7: Bernsteinsäureproduktion mit *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg in Milliliter Rührkesselreaktoren in komplexem M9 Medium mit 0,5 mM IPTG (37 °C, pH 6,8, 2800 U min<sup>-1</sup>, 25 mL min<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub>, c<sub>X,0</sub> ~ 3,5 g L<sup>-1</sup>) abhängig von verschiedenen Kohlenstoffquellen in der vorangegangenen Biomassebildungsphase. Die Bernsteinsäurekonzentrationen, die spezifischen Produktivitäten sowie die Produktausbeuten nach 6 h (□), 24 h (▨) und 48,4 h (▩) Versuchszeit sind dargestellt. Die Biomassebildung erfolgte unter Verwendung von jeweils 0,67 molC L<sup>-1</sup> Glucose, Gluconsäure oder Glycerin (entsprechend 20 g L<sup>-1</sup> Glucose) beziehungsweise 0,17 molC L<sup>-1</sup> Pyruvat oder Malat (entsprechend 5 g L<sup>-1</sup> Glucose). Nach 24 h anaerober Kultivierung wurde den Milliliter Rührkesselreaktoren Glucose (500 g L<sup>-1</sup>) mit einer Rate von 30  $\mu$ L h<sup>-1</sup> zugegeben. Fehlerbalken geben die Standardabweichung von vier parallel durchgeführten Kultivierungen an.

## Diskussion

Unter Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen in der anaeroben Produktionsphase (siehe Abbildung 7-6) wurden verglichen zu dem Substraten Glucose sowie Fructose mit allen anderen untersuchten Substraten nur sehr geringe Bernsteinsäurekonzentration erzeugt. Da dieser Versuch im Satzverfahren stattfand, ist die Ursache entweder eine sehr geringe Produktausbeute beziehungsweise Produktivität oder eine komplette Blockierung der Verwertung des entsprechenden Substrates unter den hier verwendeten experimentellen

Bedingungen. Die Gendelektionen in *ldhA*, *adhE* sowie *ack-pta* in *E. coli*  $\Delta 3$  *pyc\_Cg* könnten zur Folge haben, dass ein anderes Verhältnis für den Kofaktorbedarf die Nutzbarkeit anderer Substrate einschränkt. Für die Fermentation von Xylose wird beispielsweise mehr ATP aufgrund eines anderen Transportmechanismus benötigt. Eine Inaktivierung in *ack-pta* kann die anaerobe Verwertung von Xylose in *E. coli* blockieren, da kein ATP durch die Acetatbildung gewonnen werden kann (Hasona *et al.* 2004). Neben den in Tabelle 3-4 genannten Eigenschaften spielen andere Einflussgrößen ebenfalls eine Rolle. Für die Fermentation von Glycerin mit *E. coli* sind beispielsweise gegebenenfalls spezielle verfahrenstechnische Bedingungen notwendig (Dharmadi *et al.* 2006; Durnin *et al.* 2009).

Die Umsetzung von Fructose zu Bernsteinsäure war nur unwesentlich weniger effektiv im Vergleich zu Glucose. Dieses Resultat motiviert dazu, Saccharose als Substrat für die Bernsteinsäureproduktion in Erwägung zu ziehen. Ohne weitere gentechnische Veränderungen ist *E. coli* K 12 allerdings nicht in der Lage, Saccharose zu verwerten (Lee *et al.* 2010).

Der Einsatz unterschiedlicher Substrate während der Biomassebildung kann ebenfalls eine Auswirkung auf die anschließende anaerobe Bernsteinsäurebildung haben. Aerobes Zellwachstum mit Glycerin, Pyruvat oder Malat kann zu erhöhten Aktivitäten von Enzymen führen, welche die Bernsteinsäureproduktion begünstigen (Wu *et al.* 2009). Die Verwendung von Gluconsäure und Glycerin kann zudem deutlich erhöhte Aktivitäten von Enzymen des Citratzyklus bewirken (Peng und Shimizu 2003). In dem hier durchgeführten Experiment (siehe Abbildung 7-7) führte jedoch kein untersuchtes Substrat zu Produktkonzentrationen, welche die Bernsteinsäurebildung unter Verwendung von Glucose in der vorangegangenen Biomassebildungsphase übersteigen. In den meisten untersuchten Fällen lag die Bernsteinsäurebildung in einer vergleichbaren Größenordnung. Nur im Falle von Biomassebildung mit Gluconsäure erfolgte in der anschließenden Produktionsphase eine deutlich geringere Bernsteinsäurebildung. Bei Betrachtung der Produktausbeuten sind jedoch wie beschrieben deutliche Unterschiede erkennbar.

Aus dem gezeigten Experiment lässt sich schließen, dass die Verwendung unterschiedlicher Substrate in der Wachstumsphase den physiologischen Zustand von *E. coli*  $\Delta 3$  *pyc\_Cg* stark beeinflussen kann, was ein unterschiedliches Verhalten in Bezug auf die Bernsteinsäureproduktion in der anschließenden anaeroben Phase haben kann. Allerdings konnte hier kein Substrat für die Wachstumsphase identifiziert werden, welches hinsichtlich der Bernsteinsäureproduktion zu einem besseren Ergebnis führt als das Substrat Glucose. In einer Studie von (Wu *et al.* 2007) hatte beispielsweise die Zufuhr von Acetat während der aeroben Kultivierung von *E. coli* NZN111 eine verbesserte Bernsteinsäureproduktion in einer anschließenden anaeroben Phase unter Verwendung von Glucose zur Folge. Die reaktionstechnische Cha-

rakterisierung der Biomassebildungsphase sollte demzufolge gegenüber der eigentlichen Produktionsphase nicht unterschätzt werden.

#### 7.1.4 Reaktionstechnische Untersuchungen zur Bernsteinsäureproduktion im Satz- und Zulaufverfahren

Ziel der im folgenden Kapitel dargestellten Untersuchungen war das Entwickeln eines Bioprozesses zur Bernsteinsäureproduktion mit *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg im Litermaßstab.

##### Bernsteinsäureproduktion mit geringen Zelldichten

Ein häufig angewandtes Prinzip zur Bernsteinsäureproduktion mit *E. coli* ist die Unterteilung der Kultivierung in eine aerobe Biomassebildungsphase und eine anaerobe Produktbildungsphase (siehe Kapitel 3.2.1). Dieses Konzept wurde auch für die Bernsteinsäureproduktion mit *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg im 2 L Rührkesselreaktor vorgesehen. Erste reaktionstechnische Eigenschaften einer solchen Kultivierung in einem zweistufigen Verfahren sind in Abbildung 7-8 dargestellt.

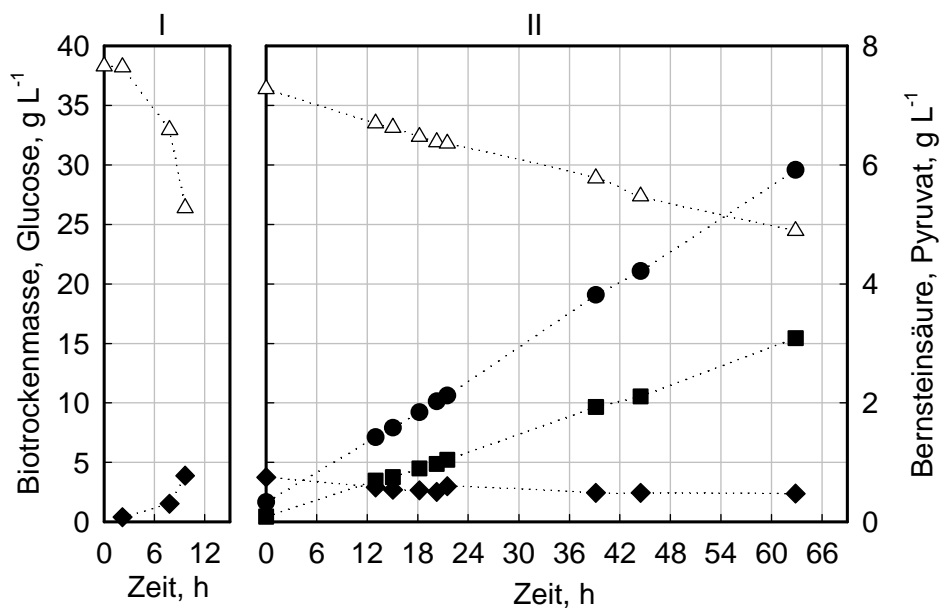


Abbildung 7-8: Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg im Litermaßstab in zwei Stufen: Verlauf der Glucose- ( $\Delta$ ), Biotrockenmasse- ( $\blacklozenge$ ), Bernsteinsäure- ( $\bullet$ ) und Pyruvatkonzentration ( $\blacksquare$ ). Zunächst wurden die Zellen in einer Satzphase (I) in komplexem M9 Medium mit 0,5 mM IPTG kultiviert. Die Zellen wurden anschließend vom Medium getrennt und in frisches komplexes M9 Medium mit IPTG resuspendiert für die zweite Phase (II) unter Produktionsbedingungen (37 °C, pH 7, 200 U min<sup>-1</sup>, 0,2 L min<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub>).



*E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg zeigte ein exponentielles Wachstum in der Satzphase und erreichte eine Zelldichte von  $3,9 \text{ g L}^{-1}$  nach 9,7 h. Es wurden  $13,6 \text{ g L}^{-1}$  Glucose verbraucht. Vergleichbare Kultivierungen (Ergebnisse nicht gezeigt) ergaben, dass mit *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg auch bei einer länger andauernden Satzphase Zelldichten erreicht wurden, die deutlich unter  $10 \text{ g L}^{-1}$  lagen. In dem hier gezeigten Experiment wurden die Zellen aus Zeitgründen bereits bei einer Zelldichte von  $3,9 \text{ g L}^{-1}$  geerntet.

Tabelle 7-1: Bernsteinsäurekonzentration  $c_{\text{Suc}}$ , anwendungsbezogene integrale volumetrische Produktivität  $Q_P^*$ , integrale spezifische Produktivität  $q_p^*$ , sowie integrale Ausbeute  $Y_{\text{P(Suc)/S(Glc)}}^*$  zu ausgewählten Zeitpunkten nach Beginn der Produktionsphase der Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg im Litermaßstab (vergleiche Abbildung 7-8).

	13 h	21,5 h	44,5 h	62,9 h
$c_{\text{Suc}}, \text{ g L}^{-1}$	1,4	2,1	4,2	5,9
$Q_P^*, \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	0,08	0,08	0,09	0,09
$q_p^*, \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$	0,031	0,029	0,037	0,038
$Y_{\text{P(Suc)/S(Glc)}}^*, \text{ molC molC}^{-1}$	0,41	0,31	0,34	0,38

Während der anaeroben Phase in der zweiten Stufe wurde Bernsteinsäure mit näherungsweise konstanten Produktivitäten um  $0,08 - 0,09 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  beziehungsweise  $0,031 - 0,038 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erzeugt, wie aus Tabelle 7-1 zu entnehmen ist. Eine maximale Bernsteinsäurekonzentration von  $5,9 \text{ g L}^{-1}$  konnte nach 62,9 h erreicht werden. Die Produktausbeute war mit  $0,38 \text{ molC molC}^{-1}$  gegen Ende des Prozesses vergleichsweise niedrig. Es war zudem eine Pyruvatproduktion bis hin zu einer Konzentration um  $3,1 \text{ g L}^{-1}$  nach 62,9 h zu beobachten. Andere analysierte organische Säuren wurden in Konzentrationen unter  $1 \text{ g L}^{-1}$  erzeugt (Daten nicht gezeigt).

Mögliche Einflüsse der aeroben Biomassebildungsphase auf die anschließende Produktbildungsphase wurden in einem weiteren in Abbildung 7-9 dargestellten Experiment näher untersucht.

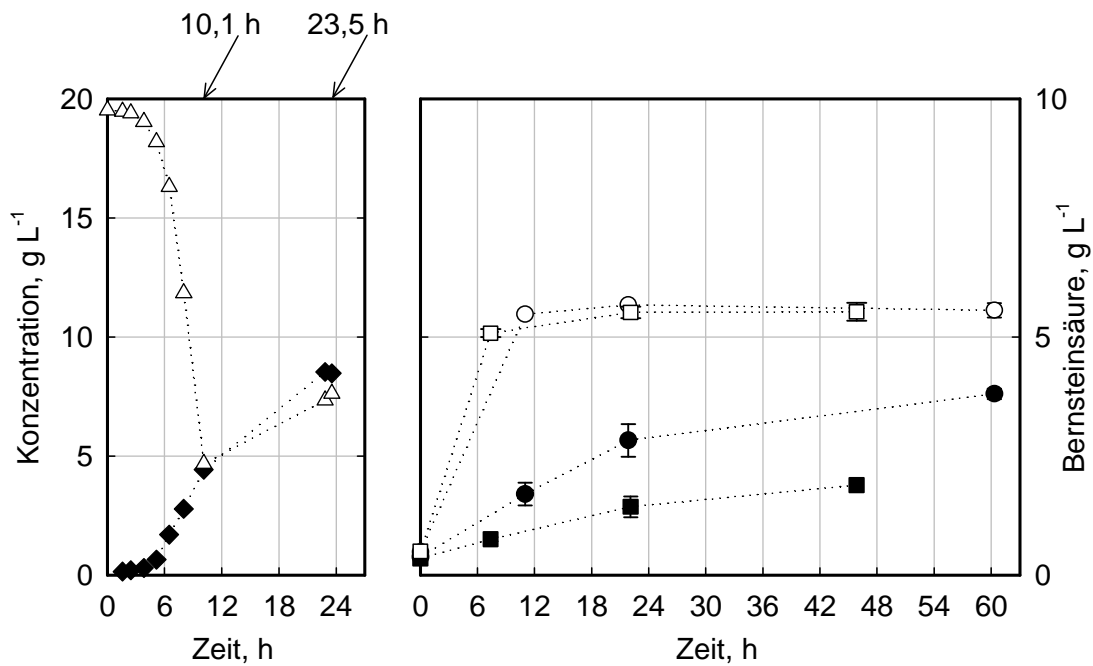


Abbildung 7-9: Aerobe Biomassebildung von *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg im Litermaßstab im Satz- und anschließenden Zulaufverfahren (links): Glucose- ( $\Delta$ ) und Biotrockenmassekonzentration ( $\blacklozenge$ ). Die Zellen wurden in komplexem M9 Medium mit 0,5 mM IPTG kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde nach 10,1 h aus dem Reaktor entnommen. Die weitere Kultivierung erfolgte unter Zulaufbedingungen mit einer konstanten Rate von 14,1 mL h<sup>-1</sup> (500 g L<sup>-1</sup> Glucose). Nach 23,6 h wurde eine weitere Probe aus dem Reaktor entnommen. Die Bernsteinsäurebildung (rechts) der nach 10,1 h ( $\bullet$ ) beziehungsweise 23,5 h ( $\blacksquare$ ) geernteten Zellen erfolgte in Milliliter Rührkesselreaktoren in komplexem M9 Medium mit MOPS und 0,5 mM IPTG (37 °C, pH<sub>0</sub> = 6,6-6,8 (ohne Kontrolle), 2800 U min<sup>-1</sup>, 25 mL min<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub>, c<sub>X,0</sub> ~ 4 g L<sup>-1</sup>). Zeitgleich zum anaeroben Kultivierungsstart der Zellen aus dem Litermaßstab wurden jeweils Medien mit Zellen aus Schüttelkolben beimpft, die zuvor wie in Kapitel 4.4.2 beschrieben kultiviert wurden (O, □). Nach 24 h anaeroben Kultivierung wurde den Milliliter Rührkesselreaktoren Glucose (500 g L<sup>-1</sup>) mit einer Rate von 30 μL h<sup>-1</sup> zugegeben. Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei parallel durchgeführten Kultivierungen an.

Aus Abbildung 7-9 ist ersichtlich, dass sich die Bernsteinsäureproduktion mit *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg in Milliliter Rührkesselreaktoren abhängig von unterschiedlichen Biomassebildungsverfahren deutlich unterscheidet. Sofern die Zellen aus einer Kultivierung in Schüttelkolben mit dem in Kapitel 4.4.2 beschriebenen Verfahren stammten, wurde während der anschließenden anaeroben Kultivierung in den ersten Stunden Bernsteinsäure mit einer vergleichbar hohen Rate gebildet. Da in dem gezeigten Experiment keine pH Kontrolle angewandt wurde, kam es bei 5,5 g L<sup>-1</sup> Bernsteinsäure zu einem Stopp der Produktbildung. Obwohl die beiden dargestellten Kultivierungen der Zellen aus den Schüttelkolben nicht zeitgleich starteten, ist ein sehr ähnlicher zeitlicher Verlauf der Bernsteinsäurebildung zu beobachten. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da die beiden Kultivierungen gleich gestaltet wurden und

nur als Referenz für die beiden Probenahmezeitpunkte für die Zellen aus der Kultivierung im Litermaßstab dienen.

Die Zellen aus der Kultivierung im Litermaßstab zeigten nicht nur eine wesentlich niedrigere Produktbildungsrate verglichen zu den Zellen aus den Schüttelkolbenkultivierungen, sondern abhängig von der Erntezeit aus dem Rührkesselreaktor im Litermaßstab verlief die Produktbildung zudem deutlich unterschiedlich. Die niedrigere Produktbildungsrate wurde bei den Zellen beobachtet, die später aus dem Rührkesselreaktor im Litermaßstab geerntet wurden.

Eine Ursache des in Abbildung 7-9 gezeigten Unterschiedes hinsichtlich der anaeroben Bernsteinsäurebildung von Zellen aus unterschiedlichen Kultivierungssystemen kann eine unterschiedliche Sauerstoffversorgung während der Biomassebildungsphase sein. Für eine erste Charakterisierung der Bernsteinsäureproduktion abhängig von der Sauerstoffversorgung wurde *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg bei konstanter Rührerdrehzahl im Litermaßstab kultiviert. Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und in Milliliter Rührkesselreaktoren unter anaeroben Bedingungen kultiviert (vergleiche Abbildung 7-10).

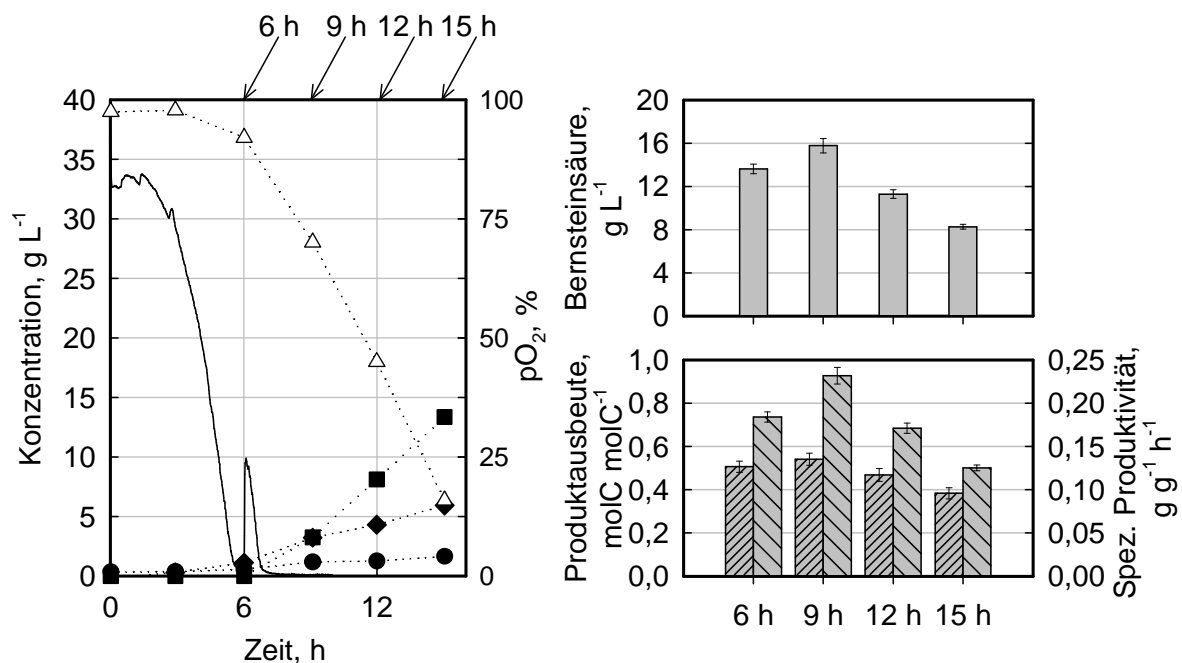


Abbildung 7-10: Aerobe Biomassebildung von *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg im Litermaßstab im Satzverfahren mit konstanter Rührerdrehzahl (links): Verlauf der Glucose- ( $\Delta$ ), Biotrockenmasse- ( $\blacklozenge$ ), Bernsteinsäure- ( $\bullet$ ) und Pyruvatkonzentration ( $\blacksquare$ ) sowie des  $pO_2$  (—). Die Zellen wurden in komplexem M9 Medium mit 0,5 mM IPTG bei konstanter Rührerdrehzahl ( $500 \text{ U min}^{-1}$ ) kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde jeweils nach 6, 9, 12 und 15 h entnommen. Die Bernsteinsäurebildung erfolgte in Milliliter Rührkesselreaktoren in komplexem M9 Medium mit 0,5 mM IPTG ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 7,  $2800 \text{ U min}^{-1}$ ,  $25 \text{ mL min}^{-1} \text{ CO}_2$ ,  $c_{X,0} \sim 3,5 \text{ g L}^{-1}$ ). Rechts dargestellt sind die Bernsteinsäurekonzentrationen ( $\square$ ), die Produktausbeuten ( $\text{hatched}$ ) sowie die spezifischen Produktivitäten ( $\text{hatched}$ ) nach jeweils 20 h Kultivierung. Nach 12 h anaerober Kultivierung wurde den Milliliter Rührkesselreaktoren Glucose ( $500 \text{ g L}^{-1}$ ) mit einer Rate von  $30 \text{ } \mu\text{L h}^{-1}$  zugegeben. Fehlerbalken geben die Standardabweichung von vier parallel durchgeführten Kultivierungen an.

In den ersten sechs Stunden war eine geringe Biomassebildung und Substrataufnahme zu beobachten, die auf den üblichen Mechanismus des beginnenden exponentiellen Wachstums hindeutet. Dieses Verhalten ist mit den Beobachtungen aus Abbildung 7-8 vergleichbar. Der  $pO_2$  wurde während der aeroben Phase nicht geregelt und erreichte nach rund 5,5 h die untere Nachweisgrenze. Die Biomassebildung ließ sich anschließend erwartungsgemäß nicht mehr mit einem exponentiellen Verhalten beschreiben. Zudem war insbesondere die Bildung von Bernsteinsäure sowie Pyruvat zu beobachten mit Konzentrationen von  $1,3 \text{ g L}^{-1}$  beziehungsweise  $8,1 \text{ g L}^{-1}$  nach bereits 12 h.

In der anschließenden anaeroben Produktbildungsphase zeigt sich eine starke Abhängigkeit der spezifischen Produktivität von der Länge der aeroben Kultivierung beziehungsweise der Länge der sauerstoffarmen Bedingungen. Zellen, die schon nach 6 h geerntet wurden (bei Eintreten der Sauerstofflimitation), zeigten in der anschließenden anaeroben Phase eine relativ hohe Produktivität von  $0,184 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  auf. Aufgrund der Zellernte und dem Volumenverlust kam es zunächst zu einem erneuten Anstieg des  $pO_2$  im Litermaßstab. Eine längerfristige Sauerstofflimitation führte zunächst zu einer weiteren Produktivitätserhöhung (Zellernte nach 9 h) bis hin zu  $0,232 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Bei noch längerer Kultivierung unter sauerstoffarmen Bedingungen (Zellernte nach 12 h und 15 h) verringerte sich wiederum die Produktivität während der anschließenden anaeroben Phase auf  $0,171 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  beziehungsweise  $0,125 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Zellen, die nach 9 h geerntet wurden, hatten nach 20 h anaerober Kultivierung bereits die vorgelegten  $20 \text{ g L}^{-1}$  sowie die zusätzlich zugeführte Glucose verbraucht (Daten nicht gezeigt). Auch die Produktausbeute zeigt einen ähnlichen Trend, wie für die Produktivität beschrieben ist. Ein Maximum von  $0,54 \text{ molC molC}^{-1}$  konnte bei den nach 9 h geernteten Zellen beobachtet werden.

Das in Abbildung 7-8 dargestellte experimentelle Verfahren wurde anschließend im Hinblick auf die neu gewonnenen Erkenntnisse bezüglich des positiven Einflusses einer Sauerstofflimitation variiert. Die aerobe Biomassebildungsphase erfolgte nun bei konstanter Rührerdrehzahl, was zu einer Sauerstofflimitation 5 - 6 h nach Prozessstart führen sollte. Ein typisches Ergebnis mit dem veränderten Verfahren ist in Abbildung 7-11 dargestellt. Es wurde eine aerobe Kultivierungszeit von 12 h gewählt, die über dem identifizierten Optimum von 9 h liegt (vergleiche Abbildung 7-10), da es zunächst das Ziel war, einen Effekt der Sauerstofflimitation zu identifizieren. Gegenüber dem in Abbildung 7-8 dargestellten Experiment wurden zudem die anaeroben Kultivierungsbedingungen im Hinblick auf Substratkonzentration und Zulauf sowie die Rührerdrehzahl angepasst.

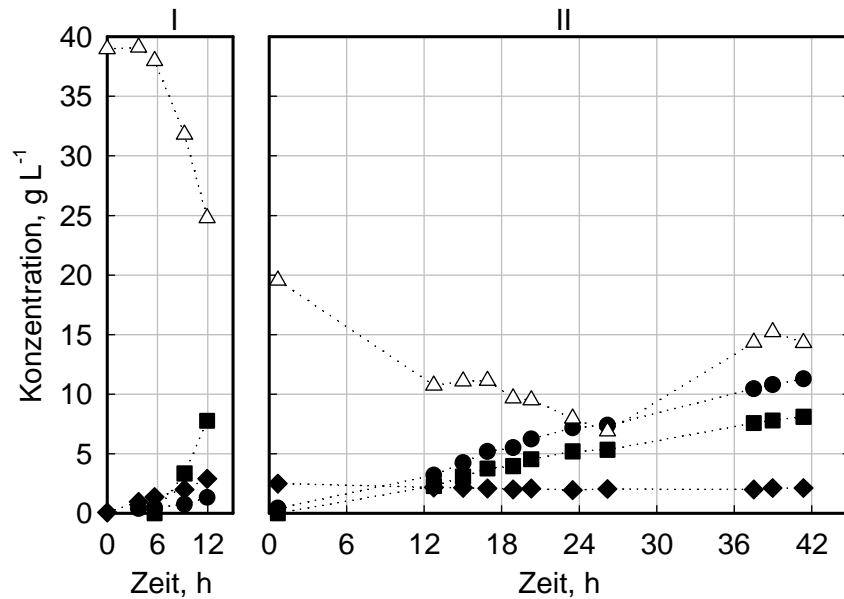


Abbildung 7-11: Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg im Litermaßstab in zwei Stufen: Verlauf der Glucose- ( $\Delta$ ), Biotrockenmasse- ( $\blacklozenge$ ), Bernsteinsäure- ( $\bullet$ ) und Pyruvatkonzentration ( $\blacksquare$ ). Zunächst wurden die Zellen in einer Satzphase (I) in komplexem M9 Medium mit 0,5 mM IPTG bei konstanter Rührerdrehzahl ( $500 \text{ U min}^{-1}$ ) kultiviert. Der  $pO_2$  wurde während der aeroben Phase nicht geregelt und verlief nach ca. 5,5 h gegen 0 % (vergleiche Abbildung 7-10). Die Zellen wurden anschließend vom Medium getrennt und in frischem komplexem M9 Medium mit 0,5 mM IPTG resuspendiert für die zweite Phase (II) unter Produktionsbedingungen ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 7,  $600 \text{ U min}^{-1}$ ,  $0,2 \text{ L min}^{-1} \text{ CO}_2$ ). In der anaeroben Phase wurde zwischen 26,1 h und 39 h Glucose ( $500 \text{ g L}^{-1}$ ) mit einer Rate von  $4,3 \text{ mL h}^{-1}$  zugeführt.

In der aeroben Biomassebildungsphase wurde nach 12 h eine Biomassekonzentration von  $2,9 \text{ g L}^{-1}$  erzeugt. Es wurden zudem Konzentrationen von  $1,3 \text{ g L}^{-1}$  Bernsteinsäure und  $7,8 \text{ g L}^{-1}$  Pyruvat gemessen. Diese Beobachtungen sind mit dem in Abbildung 7-10 dargestellten Experiment vergleichbar.

Tabelle 7-2: Bernsteinsäurekonzentration  $c_{\text{Suc}}$ , anwendungsbezogene integrale volumetrische Produktivität  $Q_P^*$ , integrale spezifische Produktivität  $q_P^*$ , sowie integrale Ausbeute  $Y_{P(\text{Suc})/S(\text{Glc})}^*$  zu ausgewählten Zeitpunkten nach Beginn der Produktionsphase der Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg im Litermaßstab (vergleiche Abbildung 7-11).

	12,8 h	23,5 h	41,4 h
$c_{\text{Suc}}, \text{ g L}^{-1}$	3,2	7,2	11,3
$Q_P^*, \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	0,23	0,3	0,27
$q_P^*, \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$	0,11	0,156	0,128
$Y_{P(\text{Suc})/S(\text{Glc})}^*, \text{ molC molC}^{-1}$	0,34	0,58	0,61

In der Produktionsphase wurde Bernsteinsäure mit einer näherungsweise konstanten Produktivität erzeugt (vergleiche Abbildung 7-11 und Tabelle 7-2). Die Konzentration sowie die Produktivität lagen gegen Ende des Prozesses nach 41,4 h bei  $11,3 \text{ g L}^{-1}$  beziehungsweise  $0,27 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Die spezifische Produktivität lag zu jedem betrachteten Berechnungszeitpunkt deutlich über  $0,1 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und stieg zeitweise auf bis zu  $0,156 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Pyruvat wurde zudem näherungsweise mit einer konstanten Rate erzeugt bis zu einer Konzentration von  $8,1 \text{ g L}^{-1}$  gegen Ende des Prozesses. Andere analysierte organische Säuren wurden in Konzentrationen um  $1 \text{ g L}^{-1}$  oder geringer gebildet (Daten nicht gezeigt).

Zur Vereinfachung der Prozessführung sollte anschließend untersucht werden, ob die beiden Prozessphasen auch in einer Kultivierungsstufe ohne Medienwechsel zusammengefasst werden können.

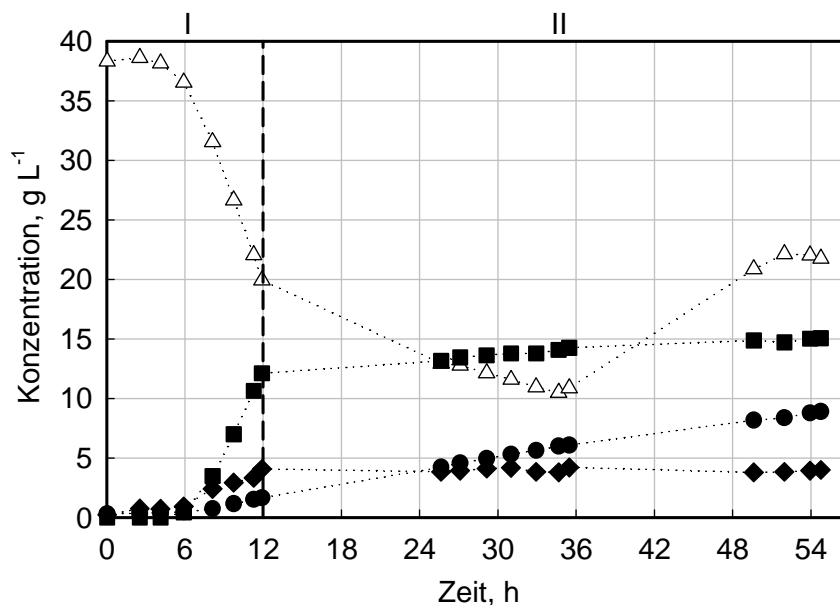


Abbildung 7-12: Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg im Litermaßstab in zwei Phasen: Verlauf der Glucose- ( $\Delta$ ), Biotrockenmasse- ( $\blacklozenge$ ), Bernsteinsäure- ( $\bullet$ ) und Pyruvatkonzentration ( $\blacksquare$ ). Zunächst wurden die Zellen in einer Satzphase (I) in komplexem M9 Medium mit  $0,5 \text{ mM}$  IPTG bei konstanter Rührerdrehzahl ( $500 \text{ U min}^{-1}$ ) kultiviert. Der  $\text{pO}_2$  wurde während der aeroben Phase nicht geregelt und verlief nach ca. 5 h gegen 0 % (vergleiche Abbildung 7-10). Nach 12 h erfolgte die zweite Phase (II) unter Produktionsbedingungen ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 7$ ,  $600 \text{ U min}^{-1}$ ,  $0,2 \text{ L min}^{-1} \text{ CO}_2$ ). In der anaeroben Phase wurde zwischen  $34,7 \text{ h}$  und  $52 \text{ h}$  Glucose ( $500 \text{ g L}^{-1}$ ) mit einer Rate von  $4 \text{ mL h}^{-1}$  zugeführt.

In der aeroben Biomassebildungsphase lag nach  $11,9 \text{ h}$  eine Biomassekonzentration von  $4,1 \text{ g L}^{-1}$  vor. Es wurden zudem Konzentrationen von  $1,7 \text{ g L}^{-1}$  Bernsteinsäure und  $12,1 \text{ g L}^{-1}$  Pyruvat gemessen.

Tabelle 7-3: Bernsteinsäurekonzentration  $c_{\text{Suc}}$ , anwendungsbezogene integrale volumetrische Produktivität  $Q_P^*$ , integrale spezifische Produktivität  $q_p^*$ , sowie integrale Ausbeute  $Y_{\text{P(Suc)/S(Glc)}}^*$  zu ausgewählten Zeitpunkten nach Beginn der Produktionsphase der Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg im Litermaßstab (vergleiche Abbildung 7-12).

	13,7 h	23,5 h	42,8 h
$c_{\text{Suc}}, \text{g L}^{-1}$	4,2	6,1	8,9
$Q_P^*, \text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$	0,19	0,19	0,17
$q_p^*, \text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$	0,051	0,044	0,042
$Y_{\text{P(Suc)/S(Glc)}}^*, \text{molC molC}^{-1}$	0,44	0,45	0,49

In der Produktbildungsphase wurde Bernsteinsäure mit einer annähernd konstanten Produktivität erzeugt (vergleiche Abbildung 7-12 und Tabelle 7-3). Die Konzentration sowie Produktivität lag gegen Ende des Prozesses nach 42,8 h bei  $8,9 \text{ g L}^{-1}$  beziehungsweise  $0,17 \text{ g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ . Die spezifische Produktivität gegen Ende des Prozesses war mit  $0,042 \text{ g g}^{-1} \text{h}^{-1}$  gegenüber dem in Abbildung 7-8 dargestellten Experiment ohne Sauerstofflimitation in der Wachstumsphase nur geringfügig höher und die Produktausbeute des Prozesses war mit  $0,49 \text{ molC molC}^{-1}$  besser als im Experiment ohne Sauerstofflimitation, jedoch niedriger als im zweistufigen Verfahren. Während der anaeroben Phase stieg die Pyruvatkonzentration von  $12,1 \text{ g L}^{-1}$  auf  $15,1 \text{ g L}^{-1}$  an. Im Vergleich zum zweistufigen Verfahren war die Pyruvatproduktion folglich geringer. Andere gemessene organische Säuren wurden in Konzentrationen um  $1 \text{ g L}^{-1}$  oder geringer erzeugt (Daten nicht gezeigt).

## Diskussion

*E. coli* SBS550MG (pHL413), ein auf *E. coli* K12 MG1655 basierender Stamm mit Inaktivierungen in *adhE*, *ldhA*, *iclR* und *ack-pta* sowie einer Überexpression der Pyruvatcarboxylase aus *Lactococcus lactis* (Sanchez *et al.* 2005b) ist mit dem hier verwendeten *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg bis auf die Inaktivierung von *iclR*, den Ursprung der Pyruvatcarboxylase und dem verwendeten Vektor zur Expression nahezu identisch. Zudem wurde gezeigt, dass ohne die Inaktivierung von *iclR* die Bernsteinsäureproduktion nicht unbedingt negativ beeinflusst wird (Sanchez *et al.* 2005b; Sanchez *et al.* 2006). Die Eigenschaften von *E. coli* SBS550MG (pHL413) sowie *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg sollten im Hinblick auf ihren genetischen Hintergrund demzufolge vergleichbar sein. In einer Kultivierung im Litermaßstab wurde mit *E. coli* SBS550MG (pHL413) eine Konzentration von  $40 \text{ g L}^{-1}$  Bernsteinsäure erzeugt mit einer Produktivität von ca.  $0,42 \text{ g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ , einer spezifischen Produktivität von  $0,075 \text{ g g}^{-1} \text{h}^{-1}$  und einer Produktausbeute von  $1 \text{ molC molC}^{-1}$ . Zu Beginn konnte sogar eine höhere volumetrische und spezifische Produktivität sowie Produktausbeute von bis zu  $1,18 \text{ g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ,  $0,211 \text{ g g}^{-1} \text{h}^{-1}$  so-

wie  $1,01 \text{ molC molC}^{-1}$  erreicht werden (Sanchez *et al.* 2005b). Diese Ziele sollten zunächst mit *E. coli*  $\Delta 3 \text{ pyc\_Cg}$  ebenfalls erreicht werden.

Wie in mehreren anderen Arbeiten (Vemuri *et al.* 2002a; Vemuri *et al.* 2002b; Jiang *et al.* 2010; Wang *et al.* 2011a) wurde auch hier ein Kultivierungsverfahren gewählt, das in eine aerobe Wachstumsphase und eine anaeroben Produktbildungsphase unterteilt ist. In (Sanchez *et al.* 2005b) wurde allerdings im Litermaßstab ausschließlich die Produktionsphase untersucht. Der Reaktor wurde mit einer hohen Zelldichte beimpft und von Beginn an anaerob betrieben. Die Zellen wurden zuvor in Schüttelkolben kultiviert. Für die Anwendung in einem industriellen Prozess wurde diese Verfahrensweise nicht als sinnvoll erachtet. Beide Prozessschritte wurden in einem Reaktionsgefäß im Litermaßstab durchgeführt (vergleiche Abbildung 7-8). Die erreichten Produktkonzentrationen, Produktivitäten und Ausbeuten waren jedoch in einem ersten Experiment (siehe Tabelle 7-1) verglichen zu oben angegebenen Daten aus (Sanchez *et al.* 2005b) deutlich schlechter.

Zunächst sollten mögliche Ursachen der geringen spezifischen Produktivität näher untersucht werden. Hierbei war es unklar, ob die Ursache bei ungünstig gewählten Kultivierungsbedingungen während der anaeroben Phase im Litermaßstab lag, oder ob der bereitgestellte Biokatalysator aus der Wachstumsphase bereits ungünstige Eigenschaften aufwies. Zur Prüfung der letzteren Annahme wurde die Bernsteinsäurebildung von *E. coli*  $\Delta 3 \text{ pyc\_Cg}$  abhängig von unterschiedlichen Biomassebildungsverfahren unter vergleichbaren Bedingungen in Milliliter Rührkesselreaktoren untersucht (vergleiche Abbildung 7-9). Aus den gezeigten Daten kann geschlossen werden, dass ein wesentlicher Grund für eine geringe spezifische Produktivität im Litermaßstab das Herstellungsverfahren des Biokatalysators war. Zellen aus aeroben Schüttelkolbenkulturen stellten in dem gezeigten Experiment einen deutlich besseren Biokatalysator für die anaerobe Bernsteinsäureproduktion dar als Zellen aus aeroben Kultivierungen im 2 L Rührkesselreaktor, was vermutlich einen wesentlichen Grund für die deutlich besseren reaktionstechnischen Daten hinsichtlich der anaeroben Bernsteinsäureproduktion mit *E. coli* SBS550MG (pHL413) aus (Sanchez *et al.* 2005b) darstellt.

Ein unterschiedliches physiologisches Verhalten der Zellen aus Schüttelkolben und Rührkesselreaktor ist wenig überraschend, da sich diese beiden Reaktionssysteme grundsätzlich unterscheiden (Büchs 2001). Im Rahmen dieses Projektes stellte sich nun die Frage, welche Prozesseigenschaften in Schüttelkolben ausschlaggebend für eine verbesserte Bernsteinsäureproduktion der Zellen waren. Die Analyse von organischen Säuren in Überständen aus Schüttelkolbenkultivierungen, die nach Kapitel 4.4.2 durchgeführt wurden, ergab gegen Ende der Kultivierungen Bernsteinsäure in Konzentrationen um  $1,3 \text{ g L}^{-1}$  und Essigsäure in Konzentrationen um  $3 \text{ g L}^{-1}$  (Daten nicht gezeigt). Zunächst ist eine Essigsäurebildung in *E. coli*



$\Delta 3$  pyc\_Cg überraschend, da der *ack-pta* Weg zur Produktion von Essigsäure inaktiviert ist. Jedoch ist die Bildung von Essigsäure zudem über *poxB* möglich (De Mey *et al.* 2007; Jantama *et al.* 2008). Neben dem Auftreten eines Überflussmetabolismus könnte die hier beobachtete Metabolitbildung auch durch eine Sauerstofflimitierung zustande gekommen sein (Xu *et al.* 1999a; De Mey *et al.* 2007), die während einer Schüttelkolbenkultivierung bei höheren Zelldichten häufig auftritt (Büchs 2001). Der Übergang von aeroben zu anaeroben Bedingungen kann die Genexpression und somit den Metabolismus von *E. coli* deutlich beeinflussen, insbesondere mittels der globalen Regulatoren FNR und ArcA (Salmon *et al.* 2003; Salmon *et al.* 2005). Es wurde bereits gezeigt, dass mikroaerobe Bedingungen einen starken regulatorischen Einfluss auf den Stoffwechsel von *E. coli* haben (Peng und Shimizu 2003; Partridge *et al.* 2007). Folglich wurde vermutet, dass Sauerstoff limitierende Bedingungen in der Wachstumsphase die Bernsteinsäurebildung in der anschließenden Produktionsphase begünstigen könnten.

Diese Annahme konnte auch in einem Versuch bestätigt werden, in dem gezeigt wurde, dass die Bernsteinsäureproduktion von *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg deutlich gesteigert werden kann, wenn diese während einer aeroben Kultivierung im Rührkesselreaktor durch das Konstanthalten der Rührerdrehzahl einer Sauerstofflimitation ausgesetzt wurden (vergleiche Abbildung 7-10). Durch die geänderten Bedingungen in der aeroben Phase konnte in einer anschließenden anaeroben Produktbildungsphase in Milliliter Rührkesselreaktoren eine spezifische Produktivität von bis zu  $0,232 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erreicht werden. Da die Zellen während der 20 h anaeroben Kultivierung bereits die vorgelegten  $20 \text{ g L}^{-1}$  sowie die zusätzlich zugeführte Glucose verbraucht hatten, ist anzunehmen, dass die Bernsteinsäurekonzentration beziehungsweise die spezifische Produktivität ohne Glucoselimitation sogar noch höher gewesen wäre.

Erwartungsgemäß konnte ebenso im 2 L Rührkesselreaktor eine deutlich bessere Bernsteinsäureproduktion unter anaeroben Bedingungen erreicht werden, sofern die Zellen zuvor einer Sauerstofflimitation ausgesetzt waren, wie in Abbildung 7-11 und Tabelle 7-2 dargestellt ist. Verglichen zu dem Experiment ohne Sauerstofflimitation in der Wachstumsphase (vergleiche Abbildung 7-8 und Tabelle 7-1) ist eine deutliche Steigerung der Bernsteinsäurebildung festzustellen. Die spezifische Produktivität konnte mit dem veränderten Verfahren um mehr als das Doppelte erhöht werden. Die Produktausbeute gegen Ende des Prozesses wurde mit  $0,61 \text{ molC molC}^{-1}$  ebenfalls deutlich erhöht. Gegenüber dem in Abbildung 7-8 dargestellten Experiment wurden zwar auch die anaeroben Kultivierungsbedingungen angepasst, aber in Verbindung mit dem in Abbildung 7-10 dargestellten Experiment kann die verbesserte Bernsteinsäureproduktion klar mit der vorangehenden Sauerstofflimitation in der Biomassebildungsphase in Verbindung gebracht werden. Aus dem in Abbildung 7-9 dargestellten Experiment wird jedoch zudem deutlich, dass bei ausreichender Sauerstoffversorgung offensichtlich auch andere Einflussgrößen den physiologischen Zu-

stand der Zellen aus dem Rührkesselreaktor im Litermaßstab und somit die anschließende Eignung zur anaeroben Bernsteinsäureproduktion bestimmen. Mehrere Studien zeigen verschiedene reaktionstechnische Aspekte in der voran geschalteten Wachstumsphase auf, die einen entscheidenden Einfluss auf die anschließende Produktion besitzen, wie zum Beispiel die Wachstumsrate (Jiang *et al.* 2010), die Verwendung von Co-Substraten (Wu *et al.* 2009) oder ganz allgemein Durchführungskriterien einer Kultivierung (Vemuri *et al.* 2002a; Vemuri *et al.* 2002b). Förderliche mikroaerobe Bedingungen wurden bisher beispielsweise im Rahmen der Bernsteinsäureproduktion mit *E. coli* unter Nutzung von Glycerin als Substrat gezeigt (Durnin *et al.* 2009).

Eine verfahrenstechnische Vereinfachung stellt die Durchführung beider Kultivierungsphasen in einem Prozessschritt dar, wie in Abbildung 7-12 und Tabelle 7-3 gezeigt ist. Erwartungsgemäß konnten im Vergleich zu den vorher durchgeführten Versuchen mit Sauerstofflimitierung (Abbildung 7-10 und Abbildung 7-11) qualitativ ähnliche Beobachtungen für die aerobe Biomassebildungsphase gemacht werden. Nach gleicher Zeit kam es jedoch zu einer höheren Bildung von Biomasse sowie Metaboliten, was vermutlich durch eine kürzere Verzögerungsphase oder eine höhere Zelldichte im Inokulum zu Beginn des Prozesses zu erklären ist. Dies wurde auch in einer früheren Verringerung des  $pO_2$  deutlich (Daten nicht gezeigt). Gegenüber dem zweistufigen Prozess zeigte der einstufige Prozess nachteilige Charakteristiken im Hinblick auf die anaerobe Bernsteinsäureproduktion auf. Die spezifische Produktivität war im einstufigen Prozess wesentlich geringer als im zweistufigen Prozess, jedoch noch immer höher als im zweistufigen Prozess ohne Sauerstofflimitierung in der aeroben Wachstumsphase. Zum einen können eine zu hohe Pyruvatakkumulation und andere Nebenprodukte aus der aeroben Phase für eine anschließende geringere Bernsteinsäureproduktion verantwortlich gewesen sein. Die Pyruvatproduktion während der anaeroben Phase war im Vergleich zum zweistufigen Verfahren zwar geringer, jedoch lag bereits aus der aeroben Phase des einstufigen Verfahrens eine relativ hohe Konzentration vor. Möglicherweise reagiert der Stoffwechsel jedoch auch äußerst sensibel auf die Zeitspanne der Sauerstoff limitierenden Phase und/oder das Verhältnis aus Zelldichte beziehungsweise Sauerstoffbedarf zu Sauerstoffbereitstellung. Diese Aspekte waren in beiden gezeigten Kultivierungen möglicherweise leicht unterschiedlich. Dennoch konnte im einstufigen Prozess mit Sauerstofflimitation in der Wachstumsphase eine höhere Bernsteinsäurebildung erzielt werden als im zweistufigen Prozess ohne Sauerstofflimitation in der Wachstumsphase.

Alle bisher gezeigten Verfahren weisen den Nachteil auf, dass in der aeroben Biomassebildungsphase nicht genügend Biomasse erzeugt werden kann. Ein typisches Problem bei der Kultivierung von *E. coli* unter Satzbedingungen bei hohen Glucosekonzentration ist der sogenannte Überflussmetabolismus (Xu *et al.* 1999a; Xu *et al.* 1999b; Lara *et al.* 2008), der zu

einer Akkumulation von Nebenprodukten wie Acetat führen kann, wodurch unter anderem das weitere Wachstum der Mikroorganismen beeinträchtigt wird (Veit *et al.* 2007). Obwohl in dem hier untersuchten Stamm *E. coli*  $\Delta 3$  *pyc\_Cg* der bevorzugte Weg für die Acetatproduktion inaktiviert ist, könnten ähnliche Effekte beziehungsweise andere Nebenprodukte dazu führen, dass das exponentielle Wachstum im Satzverfahren bei schon relativ geringen Zelldichten verhindert wird. Für eine weitere Erhöhung der volumetrischen Produktivität sollte ein Verfahren mit einem exponentiellen Zulaufprofil zur Erhöhung der Biomassekonzentration in der Wachstumsphase angewendet werden. Das in Kapitel 4.4.5 beschriebene Verfahren erlaubt eine robuste Kontrolle des Wachstumsprozesses mit reproduzierbaren Ergebnissen (Jenzsch *et al.* 2006).

### **Exponentielles Zulaufverfahren zur Biomasseproduktion**

Zur erneuten Quantifizierung des Effektes einer Sauerstofflimitation sollten die Zellen nach Erreichen einer genügend hohen Biomassenkonzentration unterschiedlich lange unter sauerstoffarmen Bedingungen kultiviert werden. Die reaktionstechnischen Eigenschaften dieser Zellen im Hinblick auf die Bernsteinsäureproduktion wurden anschließend unter vergleichbaren Bedingungen in Milliliter Rührkesselreaktoren charakterisiert. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 7-13 zusammengefasst.

Innerhalb von 10,2 h wurden die 5 g L<sup>-1</sup> Glucose verbraucht (Phase I). Ein plötzlicher Anstieg im pO<sub>2</sub> (Daten nicht gezeigt) leitete die exponentielle Zulaufphase (II) ein. An den späteren Probenahmen lässt sich erkennen, dass die Glucosekonzentration wie geplant minimal war. Der Verlauf der Zellkonzentration lässt annehmen, dass in der Zulaufphase das Wachstum tatsächlich mit der vorgegebenen Wachstumsrate von 0,15 h<sup>-1</sup> stattfand. Nach insgesamt 25,1 h wurden 15 g L<sup>-1</sup> Biomasse produziert. Durch Reduktion der Rührerdrehzahl von 1200 auf 900 U min<sup>-1</sup> reduzierte sich die Sauerstoffkonzentration im Medium bis unter die Nachweisgrenze der verwendeten Messtechnik (Daten nicht gezeigt) und es wurde somit eine Sauerstofflimitation erzwungen. Ab Beginn der Limitationsphase wurden im Abstand von 2 h insgesamt 4 Proben aus dem Rührkesselreaktor entnommen für die anschließende anaerobe Kultivierung in Milliliter Rührkesselreaktoren. Zwei Stunden vor der letzten Probe wurde die Rührerdrehzahl nochmals weiter reduziert. Abbildung 7-14 skizziert den beschriebenen Verlauf der Rührerdrehzahl sowie den resultierenden RQ.

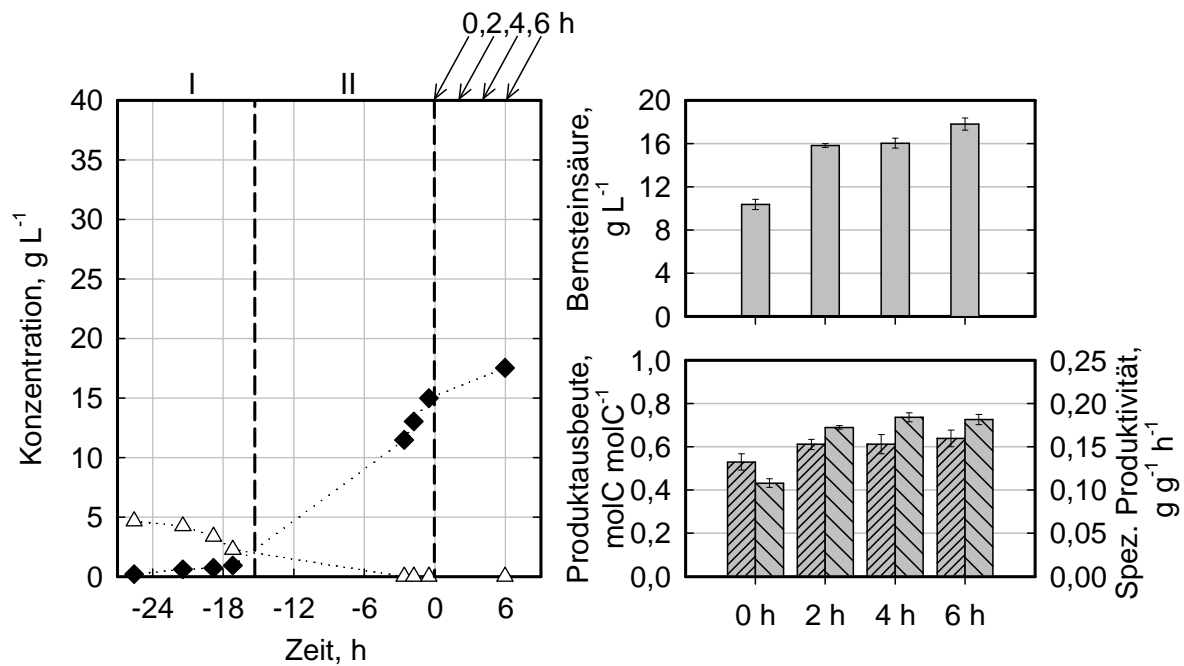


Abbildung 7-13: Aerobe Biomassebildung von *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg im Litermaßstab (links): Verlauf der Glucose- ( $\Delta$ ) und Biotrockenmassekonzentration ( $\blacklozenge$ ). Die Zellen wurden in definiertem Medium mit 0,5 mM IPTG zunächst im Satzverfahren (I) und anschließend mit einem exponentiellen Zulaufprofil (II) kultiviert. Nach Beendigung der exponentiellen Zulaufphase erfolgte eine Kultivierung unter Sauerstoff limitierenden Bedingungen durch Verringerung der Rührerdrehzahl auf zunächst  $900 \text{ U min}^{-1}$  (0 h) und anschließend  $700 \text{ U min}^{-1}$  (4 h). Die Zulauftrate für Glucose ( $500 \text{ g L}^{-1}$ ) von  $30,3 \text{ mL h}^{-1}$  aus Phase II wurde beibehalten. Ein Teil der Zellen wurde jeweils nach 0, 2, 4 und 6 h entnommen. Die Bernsteinsäurebildung erfolgte in Milliliter Rührkesselreaktoren in komplexem M9 Medium mit 0,5 mM IPTG ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 6,8,  $2800 \text{ U min}^{-1}$ ,  $25 \text{ mL min}^{-1} \text{ CO}_2$ ,  $c_{X,0} \sim 4,5 \text{ g L}^{-1}$ ). Rechts dargestellt sind die Bernsteinsäurekonzentrationen ( $\square$ ), die Produktausbeuten ( $\text{hatched}$ ) sowie die spezifischen Produktivitäten ( $\text{cross-hatched}$ ) nach jeweils 20 h Kultivierung. Nach 12 h anaerober Kultivierung wurde den Milliliter Rührkesselreaktoren Glucose ( $500 \text{ g L}^{-1}$ ) mit einer Rate von  $30 \text{ } \mu\text{L h}^{-1}$  zugegeben. Fehlerbalken geben die Standardabweichung von fünf parallel durchgeführten Kultivierungen an.

Zellen, die direkt nach der exponentiellen Zulaufphase aus dem Rührkesselreaktor entnommen wurden, haben in Milliliter Rührkesselreaktoren anschließend nach 20 h  $10,4 \text{ g L}^{-1}$  Bernsteinsäure erzeugt. Bei einer andauernden Limitationsphase von 2 h beziehungsweise 4 h wurden anschließend  $15,8$  sowie  $16 \text{ g L}^{-1}$  Bernsteinsäure erzeugt. Bei einer noch längeren Limitationsphase und einer weiteren Verstärkung der Limitation durch weitere Verringerung der Rührerdrehzahl wurde eine noch höhere Bernsteinsäurekonzentration von  $17,8 \text{ g L}^{-1}$  erzeugt. Eine ähnliche Verhältnismäßigkeit lässt sich in den berechneten Daten zur spezifischen Produktivität erkennen. Ohne Sauerstofflimitation wurde eine vergleichbar geringe Produktivität von  $0,11 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erreicht. Sofern die Zellen zuvor sauerstoffarmen Bedingungen ausgesetzt waren, konnten spezifische Produktivitäten zwischen  $0,172$  und  $0,184 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  unabhängig von der Länge der Sauerstofflimitation erzielt werden. Die Pyru-

vatkonzentrationen nach 20 h anaerober Kultivierung lagen ohne vorherige Sauerstofflimitation bei  $4,8 \text{ g L}^{-1}$  und bei vorangehender Sauerstofflimitation bei  $6,1 - 6,5 \text{ g L}^{-1}$ . Die Konzentration anderer gemessener organischer Säuren lag bei  $1 \text{ g L}^{-1}$  oder geringer (Daten nicht gezeigt). Die Produktausbeute verbesserte sich mit vorangehender Sauerstofflimitation ebenfalls von  $0,53 \text{ mol C mol C}^{-1}$  (ohne Sauerstofflimitation) auf  $0,61 - 0,64 \text{ mol C mol C}^{-1}$  (mit Sauerstofflimitation).

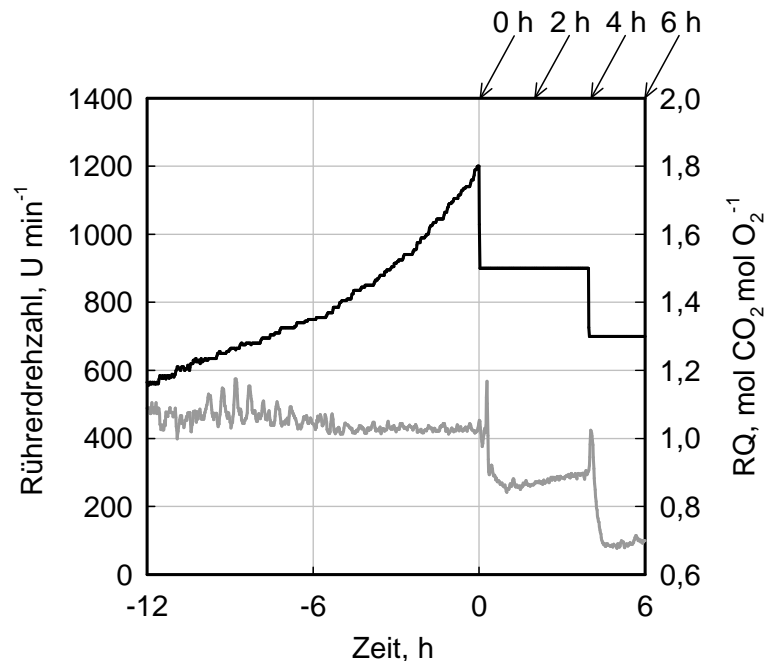


Abbildung 7-14: Verlauf von Rührerdrehzahl (—) und RQ (---) während der Biomasseerzeugung und Sauerstofflimitationsphase. Der Zeitpunkt  $t = 0 \text{ h}$  bezeichnet die erste Probenahme für die Kultivierung in Milliliter Rührkesselreaktoren (vergleiche Abbildung 7-13) und den Beginn der Limitationsphase.

Auf Basis der bisherigen Ergebnisse wurde ein Prozess erarbeitet, in dem eine hohe spezifische Produktivität bei höheren Zelldichten erreicht werden sollte. Die Zellproduktion erfolgte in einem Satz- und anschließendem Zulaufverfahren mit einem exponentiellen Zulaufprofil (vergleichbar zu dem Experiment in Abbildung 7-13). Für eine Erhöhung der spezifischen Produktivität der Zellen in der anschließenden Produktionsphase wurde eine Übergangsphase eingeführt, in der die Zellen für 2 h einer Sauerstofflimitation ausgesetzt wurden. Die Intensität der Sauerstofflimitation beziehungsweise die resultierende Stoffwechseländerung wurde indirekt mit Hilfe des RQ quantifiziert, der zwischen  $0,6 - 0,8 \text{ mol}_{\text{CO}_2} \text{ mol}_{\text{O}_2}^{-1}$  liegen sollte. Abbildung 7-15 zeigt beispielhaft das Ergebnis einer Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 3 \text{ pyc\_Cg}$  mit diesem Verfahren.

*E. coli*  $\Delta 3 \text{ pyc\_Cg}$  verbrauchte zunächst in einer 10,2 h andauernden Satzphase  $5 \text{ g L}^{-1}$  Glucose. In der anschließenden Zulaufphase wuchsen die Zellen mit einer durch das

exponentielle Zulaufprofil vorgegebenen Wachstumsrate von  $0,15 \text{ h}^{-1}$ . Nach 25,9 h wurden  $18,2 \text{ g L}^{-1}$  Biomasse produziert. Durch Reduktion der Rührerdrehzahl von 1200 auf  $1000 \text{ U min}^{-1}$  sowie des Luftvolumenstroms von  $4,5$  auf  $2 \text{ L min}^{-1}$  (entspricht einer Reduktion von 2,25 auf 1 vvm) reduzierte sich die Sauerstoffkonzentration im Medium bis unter die Nachweisgrenze der verwendeten Messtechnik und die Zellen wurden somit einer Sauerstofflimitierung ausgesetzt. Glucose wurde in dieser Phase zweimal in Form eines Pulses bis zu einer Konzentration von ca.  $20 \text{ g L}^{-1}$  hinzu gegeben zur Vermeidung einer Primärsubstratlimitation. Der RQ verringerte sich in dieser Zeit von  $1,05 \pm 0,05 \text{ mol}_{\text{CO}_2} \text{ mol}_{\text{O}_2}^{-1}$  auf einen Wert um  $0,6 \pm 0,05 \text{ mol}_{\text{CO}_2} \text{ mol}_{\text{O}_2}^{-1}$ . Auch in dieser Phase kam es noch zu einer geringfügigen Biomassenzunahme trotz Verdünnung durch Substratzugabe. Zu Beginn der Produktionsphase konnte bereits  $10,4 \text{ g L}^{-1}$  Pyruvat nachgewiesen werden. Es kam in dieser Phase zunächst nur zu einer geringen Bernsteinsäureproduktion.

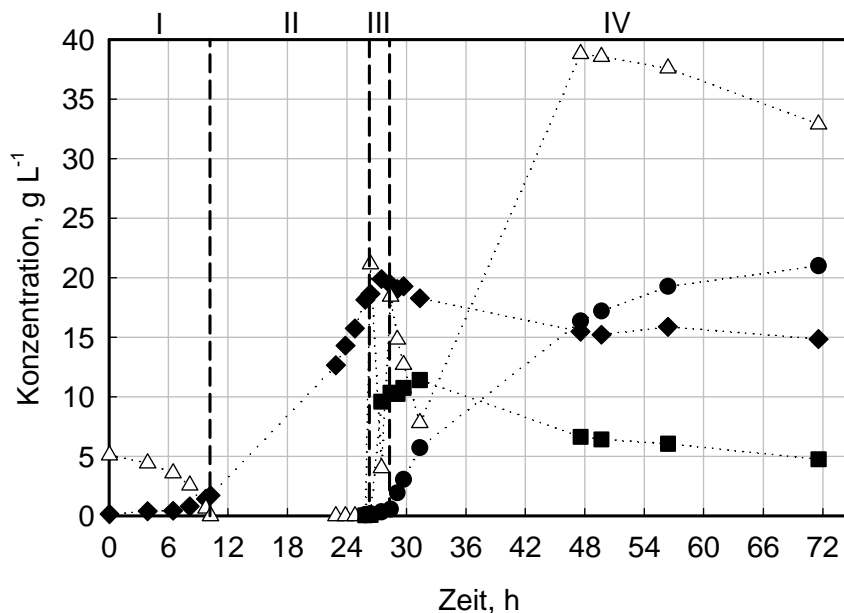


Abbildung 7-15: Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg im Litermaßstab in vier verschiedenen Phasen: Verlauf der Glucose- ( $\Delta$ ), Biotrockenmasse- ( $\blacklozenge$ ), Bernsteinsäure- ( $\bullet$ ) und Pyruvatkonzentration ( $\blacksquare$ ). Zunächst wurden die Zellen in einer Satzphase (I) in definiertem Medium mit  $0,5 \text{ mM IPTG}$  kultiviert. Anschließend vermehrten sich die Zellen mit einer konstanten Rate um  $0,15 \text{ h}^{-1}$  mittels eines exponentiellen Zulaufprofils (II). Die Substratkonzentration war dabei limitierend. In einer kurzen Übergangsphase (III) wurden die Zellen durch Verringerung der Rührerdrehzahl und des Luftvolumenstroms einer Sauerstofflimitierung ausgesetzt. Glucose wurde zu Beginn und am Ende dieser Phase in Form eines Pulses bis zu einer Konzentration von ca.  $20 \text{ g L}^{-1}$  hinzu gegeben. In der anaeroben Phase (IV) erfolgte die eigentliche Produktbildung ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 7$ ,  $1000 \text{ U min}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ L min}^{-1} \text{ CO}_2$ ). Glucose ( $500 \text{ g L}^{-1}$ ) wurde zwischen  $31,9 \text{ h}$  und  $47,6 \text{ h}$  erneut mit einer Rate von  $17,3 \text{ mL h}^{-1}$  zugeführt.

Tabelle 7-4 zeigt die reaktionstechnischen Daten zu ausgewählten Zeitpunkten der anaeroben Kultivierung mit *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg im Litermaßstab. Bernsteinsäure wurde zunächst mit

einer Produktivität von  $1,76 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  beziehungsweise  $0,097 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erzeugt. Mit der Zeit verringerten sich die Produktivitäten auf  $0,47 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  sowie  $0,032 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Nach 43,3 h wurden  $21 \text{ g L}^{-1}$  Bernsteinsäure erzeugt. Die integrale Produktausbeute gegen Ende des Prozesses lag bei  $0,8 \text{ molC molC}^{-1}$ . Die Pyruvatkonzentration verringerte sich während der anaeroben Phase von anfänglich  $10,4 \text{ g L}^{-1}$  zu einer Konzentration von  $4,8 \text{ g L}^{-1}$ . Neben Pyruvat und Bernsteinsäure wurden zudem  $1,7 \text{ g L}^{-1}$  Acetat und  $4,4 \text{ g L}^{-1}$  Formiat gemessen. Andere quantifizierte organische Säuren wurden in Konzentrationen kleiner  $1 \text{ g L}^{-1}$  erzeugt (Daten hier nicht gezeigt).

Tabelle 7-4: Bernsteinsäurekonzentration  $c_{\text{Suc}}$ , anwendungsbezogene integrale volumetrische Produktivität  $Q_P^*$ , integrale spezifische Produktivität  $q_p^*$ , sowie integrale Ausbeute  $Y_{\text{P(Suc)/S(Glc)}}^*$  zu ausgewählten Zeitpunkten nach Beginn der Produktionsphase der Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 3 \text{ pyc\_Cg}$  im Litermaßstab (vergleiche Abbildung 7-17).

	3,1 h	21,4 h	43,3 h
$c_{\text{Suc}}, \text{ g L}^{-1}$	5,7	17,2	21
$Q_P^*, \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	1,76	0,78	0,47
$q_p^*, \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$	0,097	0,052	0,032
$Y_{\text{P(Suc)/S(Glc)}}^*, \text{ molC molC}^{-1}$	0,54	0,82	0,8

## Diskussion

In dem in Abbildung 7-10 dargestellten Experiment wurden die Zellen im Satzverfahren bei einer konstanten Rührerdrehzahl kultiviert, bis sich von selbst eine Sauerstofflimitation einstellte. Während dieser Limitation war die Zunahme der Zellen im Verhältnis zu den vorhandenen Zellen vergleichsweise höher, wodurch sich die Sauerstoffversorgung der einzelnen Zellen noch verschlechterte. Dies äußerte sich in einem zeitlich veränderlichen RQ während der Limitationsphase (Daten nicht gezeigt). In dem in Abbildung 7-13 dargestellten Versuch wurde eine Sauerstofflimitation jedoch durch Verringerung der Rührerdrehzahl aktiv erzwungen. Aufgrund einer vergleichsweise geringen Änderung der Zellkonzentration im Verhältnis zur vorhandenen Zellkonzentration stellte sich in den ersten zwei Stunden der Limitation ein näherungsweise konstanter RQ ein (vergleiche Abbildung 7-14). Auch nach weiteren zwei Stunden blieb der RQ näherungsweise konstant um  $0,9 \text{ mol}_{\text{CO}_2} \text{ mol}_{\text{O}_2}^{-1}$ . Folglich haben sich die Zellen, die nach 2 beziehungsweise 4 h geerntet wurden, ähnlich in der darauf folgenden Produktionsphase verhalten und nahezu identische Mengen an Glucose verbraucht und Pyruvat beziehungsweise Bernsteinsäure gebildet. Im weiteren Verlauf wurde die Sauerstofflimitation durch weitere Verringerung der Rührerdrehzahl nochmals verstärkt. Auch hier stellte sich ein konstanter RQ um  $0,7 \text{ mol}_{\text{CO}_2} \text{ mol}_{\text{O}_2}^{-1}$  ein. Die spezifische

Produktivität der Zellen erhöhte sich in diesem Versuchsansatz zwar nicht weiter, es konnten jedoch gegenüber den Erntezeitpunkten „2 h“ und „4 h“ Unterschiede festgestellt werden. Anhand des Titrationsprofils des Korrekturmittels (Daten nicht gezeigt) für die Zellen, die nach 6 h andauernder Limitationsphase geerntet wurden, ließ sich erkennen, dass die  $20 \text{ g L}^{-1}$  Glucose bereits etwa eine Stunde vor Start des Zulaufs (12 h) aufgebracht war. Eine noch schlechtere Sauerstoffversorgung hatte somit eine noch höhere Glucoseaufnahme während des Beginns der anaeroben Phase zur Folge.

Es ist zu vermuten, dass auch eine kurze Dauer der Sauerstofflimitation ausreichend sein könnte um anschließend Bernsteinsäure effektiv zu produzieren, da sich nach ca. 1 h bereits ein annähernd konstanter RQ einstellt. Diese Dauer wird zudem vermutlich zu einem großen Teil durch die Trägheit der Messung des RQ im verwendeten Versuchsaufbau bestimmt und weniger durch die Dauer der Stoffwechsellumstellung. Der RQ könnte als indirekter Hinweis auf die Eignung der Zellen zur Bernsteinsäureproduktion dienen. Im vorliegenden Experiment gab es Hinweise, dass ein RQ zwischen  $0,6 - 0,8 \text{ mol}_{\text{CO}_2} \text{ mol}_{\text{O}_2}^{-1}$  verursacht durch eine Sauerstofflimitation vorteilhaft für den Prozess sein könnte.

Gegenüber allen anderen bisher gezeigten Prozessen zeigt die reaktionstechnische Analyse des in Abbildung 7-15 dargestellten Prozesses in nahezu jeder Hinsicht die besten Daten im Hinblick auf die Bernsteinsäureproduktion. Verglichen zu dem zweistufigen Prozess, in dem die Zellen im Satzverfahren gewachsen sind (Abbildung 7-11) konnte die Bernsteinsäurekonzentration nahezu um den Faktor 2 erhöht werden. Die volumetrische Produktivität zu Beginn des Prozesses wurde nahezu um den Faktor 6 erhöht, die spezifische Produktivität lag trotz Verwendung höherer Zelldichten in der gleichen Größenordnung und die Produktausbeute lag um den Faktor 1,3 höher. In dieser Kultivierung im Litermaßstab wurde ein neuer Effekt beobachtet, der sich bisher nur bei den Kultivierungen in Milliliter Rührkesselreaktoren zeigte: Die Produktivität nahm im Verlauf des Prozesses deutlich ab und stagnierte ab Erreichen einer Bernsteinsäurekonzentration um ca.  $20 - 25 \text{ g L}^{-1}$ .

Die Inaktivierung der fermentativen Stoffwechselwege für die Produktion von Lactat (*ldhA*), Ethanol (*adhE*) and Acetat (*ack-pta*) hatte auch in dem hier gezeigten Prozess im Litermaßstab erwartungsgemäß eine geringe Bildung dieser Nebenprodukte zur Folge. Die Bildung von Formiat wurde im Gegensatz dazu nicht unterbunden. Da aufgrund der reinen  $\text{CO}_2$  Begasung die Bildung beziehungsweise der Verbrauch von  $\text{CO}_2$  nicht quantifiziert werden konnte, wurde auf eine Berechnung der Kohlenstoffbilanz für die Produktbildungsphase generell verzichtet.

Mit *E. coli* kann bis zu  $116,2 \text{ g L}^{-1}$  Bernsteinsäure erzeugt werden mit einer Produktivität von  $1,55 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und einer Produktausbeute von  $1,15 \text{ molC molC}^{-1}$  (Wang *et al.* 2011a). In einem anderen Bernsteinsäureproduktionsprozess mit *E. coli* AFP111 wurde unter Verwendung



eines definierten Mediums 101,2 g L<sup>-1</sup> Bernsteinsäure produziert mit einer integralen volumetrischen Produktivität von 1,89 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> und einer Produktausbeute von 1,09 molC molC<sup>-1</sup> (Jiang *et al.* 2010). Eine maximale spezifische Produktivität von 0,227 g g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> wurde erreicht. Insbesondere zu Beginn des hier gezeigten Prozesses mit *E. coli* Δ3 pyc\_Cg (Abbildung 7-15) lagen die volumetrischen Produktivitäten in einer Größenordnung, die mit bereits publizierten Prozessen zur Bernsteinsäurebildung mit *E. coli* vergleichbar sind. Die bisher maximal erreichte Bernsteinsäurekonzentration von 116,2 g L<sup>-1</sup> (Wang *et al.* 2011a) liegt aber deutlich über den hier erreichten Bernsteinsäurekonzentrationen. Die verwendeten Stämme weisen jedoch im Vergleich zu *E. coli* Δ3 pyc\_Cg deutliche Unterschiede auf.

Aufgrund der bereits diskutierten Ähnlichkeit ist *E. coli* Δ3 pyc\_Cg besser mit *E. coli* SBS550MG (pHL413) zu vergleichen. Einige reaktionstechnische Daten sind im Vergleich in Tabelle 7-5 dargestellt.

Tabelle 7-5: Bernsteinsäurekonzentration  $c_{\text{Suc}}$ , maximale volumetrische Produktivität  $Q_P^*$ , maximale spezifische Produktivität  $q_P^*$ , sowie integrale Ausbeute  $Y_{P(\text{Suc})/S(\text{Glc})}^*$  des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Prozesses (vergleiche Abbildung 7-15) sowie eines Prozesses mit einem vergleichbaren Stamm (Sanchez *et al.* 2005b).

	Abbildung 7-15	(Sanchez <i>et al.</i> 2005b)
$c_{\text{Suc}}, \text{ g L}^{-1}$	21	40
$Q_P^* (\text{maximal}), \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	1,76	1,18
$q_P^* (\text{maximal}), \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$	0,097	0,211
$Y_{P(\text{Suc})/S(\text{Glc})}^*, \text{ molC molC}^{-1}$	0,8	1

Aufgrund der Verwendung höherer Zelldichten konnte in dieser Arbeit eine höhere volumetrische Produktivität zu Beginn des Prozesses erreicht werden. Andere reaktionstechnische Daten erscheinen denen von (Sanchez *et al.* 2005b) unterlegen. Jedoch erfolgte in (Sanchez *et al.* 2005b) ausschließlich die Produktionsphase in einem Rührkesselreaktor. Die Zellen wurden zuvor in Schüttelkolben kultiviert. Für die Anwendung in einem industriellen Prozess erscheint diese Verfahrensweise nicht sinnvoll. Die Kultivierung geringer Zelldichten könnte die spezifische Produktivität begünstigt haben und die Produktausbeute könnte durch die Verwendung eines komplexen Mediums erhöht worden sein. Bei günstigeren Bedingungen wurden im Rahmen dieses Projektes beispielsweise spezifische Produktivitäten bis zu 0,232 g g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> erreicht (vergleiche Abbildung 7-10). Die Endkonzentration von ca. 40 g L<sup>-1</sup> Bernsteinsäure wurde in (Sanchez *et al.* 2005b) nach ca. 95 h erreicht. Diese Zeitspanne ist mehr als doppelt so lang wie die in Abbildung 7-15 untersuchte Produktionsphase.

In einer ausführlichen Studie mit *E. coli* SBS550MG (pHL413), die zeitgleich zu den hier gezeigten Arbeiten publiziert wurde, konnte mittels Analyse von Genexpressionsprofilen, Metabolitkonzentrationen sowie metabolischen Flüssen ebenfalls ein deutlicher Einfluss der Begasung in der aeroben Phase auf die anschließende anaerobe Bernsteinsäureproduktion festgestellt werden (Martinez *et al.* 2010). Hierbei wurde ein sehr ähnlicher experimenteller Versuchsaufbau für die aerobe Wachstumsphase verwendet wie hier in Abbildung 7-10 dargestellt. Die verbesserte Bernsteinsäureproduktion wurde insbesondere mit einer erhöhten Expression von *pflAB* sowie einer erhöhten Aktivität des Glyoxylat Bypasses in Verbindung gebracht. Zudem wurde bei einer geringen *pflAB* Expression, die durch bessere Sauerstoffversorgung in der Wachstumsphase verursacht wurde, eine hohe Pyruvatakkumulation in der anaeroben Phase festgestellt. Gegenüber dem in (Martinez *et al.* 2010) verwendeten Kultivierungsverfahren hat das hier erarbeitete Verfahren mehrere Vorteile: Ein definiertes Medium kommt zum Einsatz, es werden deutlich höhere Zelldichten durch Anwendung eines exponentiell gestalteten Zulaufverfahrens vor der anaeroben Phase erreicht und die Sauerstofflimitation wird aktiv eingestellt und nicht durch den Verlauf der Kultivierung ungeregelt erzeugt.

In dem in Abbildung 7-15 dargestellten Experiment kam es während der Übergangsphase ebenfalls zu einer extrem hohen Bildungsrate von  $8,6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  Pyruvat. Diese hohe Bildungsrate zeigt zum Einen, dass *E. coli*  $\Delta 3$  *pyc\_Cg* unter bestimmten verfahrenstechnischen Bedingungen immerhin in der Lage ist, hohe Bildungsraten für die Produktion des Intermediates Pyruvat zu erzielen. Zum anderen ließe sich vermuten, dass Reaktionsschritte von Pyruvat hin zu Bernsteinsäure limitierend auf die Bernsteinsäureproduktion wirken. Neben der Verbesserung der rekombinanten Expression der Pyruvatcarboxylase durch Verwendung eines anderen Vektors sowie der Optimierung der Induktion könnte möglicherweise eine Erhöhung der *pflAB* Expression durch weitere Charakterisierung der mikroaeroben Bedingungen zu einer Verbesserung der Bernsteinsäureproduktion führen.

In anderen Studien wird eine effektive anaerobe Produktion durch *E. coli* auch ohne eine Sauerstoff limitierte Übergangsphase verwirklicht (Vemuri *et al.* 2002b; Jantama *et al.* 2008; Jiang *et al.* 2010; Wang *et al.* 2011a). Konzentrationen über  $60 \text{ g L}^{-1}$  wurden in der Regel nur erreicht, wenn Stämme mit Inaktivierungen der Pyruvat-Formiat Lyase ( $\Delta pflA$  beziehungsweise  $\Delta pflAB$ ) sowie der Lactatdehydrogenase ( $\Delta dhA$ ) verwendet wurden. Dieser Genotyp scheint ein wesentlicher Faktor in der Erhöhung der Produktionsleistung zu sein. Zudem erscheint die Inaktivierung des PTS für die Aufnahme von Glucose ( $\Delta ptsG$ ), die ebenfalls in fast allen oben angegebenen Arbeiten bis auf (Jantama *et al.* 2008) erfolgte, einen deutlich positiven Effekt auf die Bernsteinsäurebildung zu haben (Chatterjee *et al.* 2001). Kürzlich wurde beispielsweise auch für die Lysinproduktion mit *Corynebacterium glutamicum* gezeigt,

dass die Inaktivierung des PTS zur Aufnahme und Verwertung von Glucose verbesserte Produktionseigenschaften zur Folge haben kann (Ikeda *et al.* 2011).

Mikroaerobe Bedingungen bewirken beispielsweise eine Reaktion der globalen Regulatoren FNR sowie ArcA (Alexeeva *et al.* 2003; Partridge *et al.* 2007). Neben einem Einfluss auf viele im Rahmen der Bernsteinsäureproduktion beteiligten Reaktionen (Partridge *et al.* 2007) hat ArcA auch einen direkten regulatorischen Einfluss auf *ptsG* (Jeong *et al.* 2004). Es ließe sich vermuten, dass die hier verwendete Verfahrensweise unter zeitweise mikroaeroben Bedingungen ähnlich vorteilhafte Bedingungen für die Bernsteinsäureproduktion erzeugen wie die Inaktivierung von *ptsG*.

## 7.2 Bernsteinsäureproduktion mit Saccharose verwertenden *Escherichia coli*

### 7.2.1 Wachstumsverhalten mit Saccharose als Substrat

Ausgewählte Stämme wurden zunächst in Hinsicht auf das Wachstumsverhalten mit Saccharose als Substrat im Schüttelkolben untersucht.

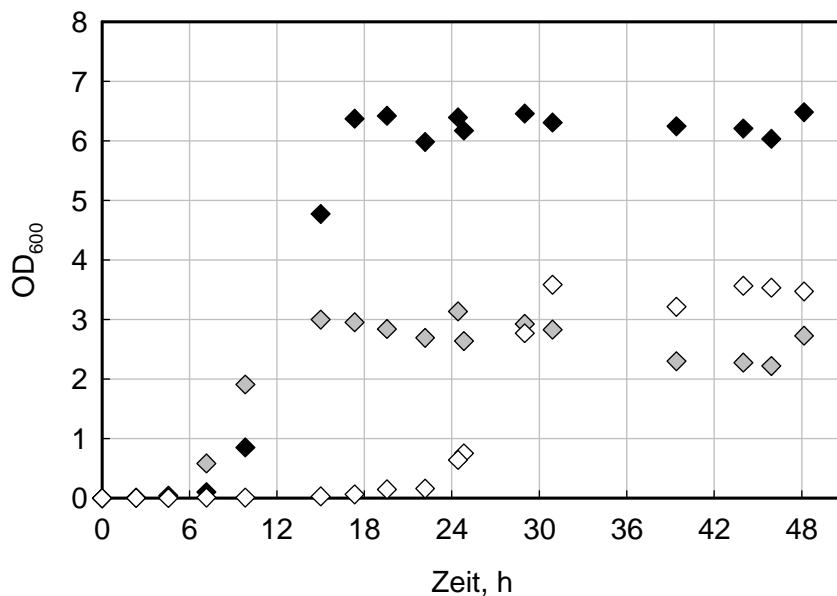


Abbildung 7-16: Schüttelkolbenkultivierungen von *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr pyc\_Cg$  in LB-Medium (◇), mit MOPS gepuffertem komplexem M9 Medium (◆) und definiertem Medium (◇). Die Datenpunkte zweier identisch behandelten Kulturen wurden in einem Verlauf zusammengefasst. Dem komplexen und definierten Medium wurde  $20 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose als Substrat zugegeben. Die Zellen wurden nicht induziert.

Abbildung 7-16 zeigt die Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr pyc\_Cg$  in drei unterschiedlichen Medien. Im LB-Medium wurde ohne signifikante Verzögerungsphase eine Zelldichte von  $OD_{600} = 3$  nach 15 h erreicht. Im komplexen mit MOPS gepufferten M9 Medium konnte eine höhere Zelldichte mit einer  $OD_{600}$  zwischen 6 und 7 nach 17 h erzeugt werden. Im definierten Medium wurde vergleichbar zum LB-Medium nur eine  $OD_{600}$  von 3 - 4 nach 33 h erreicht, obwohl dies die gleiche Substratkonzentration wie im komplexen M9 Medium enthält. Zudem war im definierten Medium eine Verzögerungsphase zu Beginn der Kultivierung zu beobachten. Erst nach 18 - 20 h war ein deutliches Wachstum zu messen. Das Wachstum von *E. coli*  $\Delta 3 pyc\_Cg$  in LB-Medium (Daten nicht gezeigt) ist mit den hier diskutierten Daten für *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr pyc\_Cg$  vergleichbar.

Weitere in Abbildung 7-17 dargestellte Schüttelkolbenkultivierungen wurden durchgeführt um das Wachstumsverhalten verschiedener Saccharose verwertender Stämme im Vergleich mit *E. coli*  $\Delta 3 pyc\_Cg$  im komplexen MOPS gepufferten M9 Medium zu untersuchen.

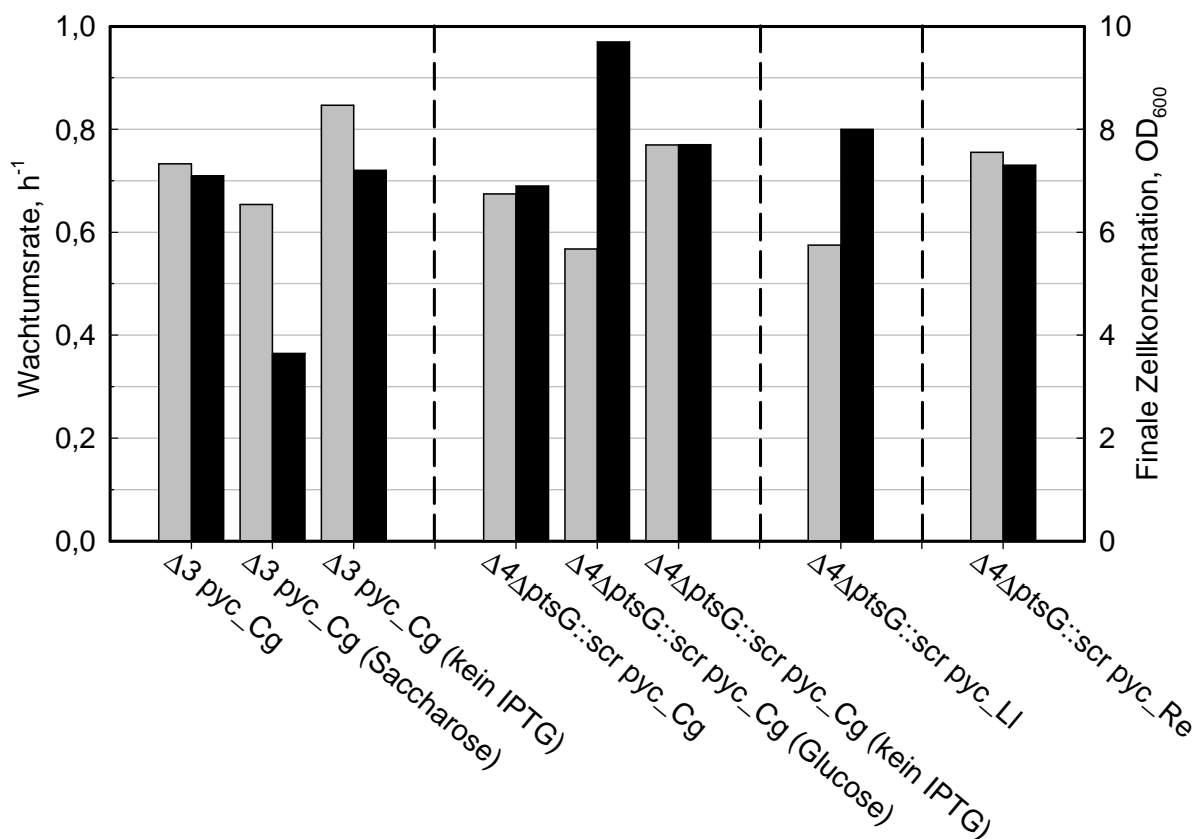


Abbildung 7-17: Schüttelkolbenkultivierungen verschiedener Saccharose verwertender Stämme im Vergleich mit *E. coli*  $\Delta 3 pyc\_Cg$  im komplexen MOPS gepufferten M9 Medium. Die Wachstumsraten (□) und maximal erreichten Zelldichten (■) nach 25,5 h sind dargestellt. Den Medien wurde  $20 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose oder  $20 \text{ g L}^{-1}$  Glucose als Substrat zugegeben. Wenn nicht anders angegeben, wurde das für den Stamm entsprechende Substrat verwendet. Saccharose wurde vor Zugabe steril filtriert anstatt durch Hitze sterilisiert. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zellen mit  $0,5 \text{ mM}$  IPTG von Beginn an induziert.

Unter Verwendung von Saccharose als Substrat bei den Saccharose verwertenden Stämmen sowie Glucose bei *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg wurden unter Induktionsbedingungen Wachstumsraten in einer ähnlichen Größenordnung beobachtet ( $0,67 - 0,76 \text{ h}^{-1}$ ). Lediglich *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr pyc\_LI}$  hatte mit  $0,57 \text{ h}^{-1}$  eine deutlich geringere Wachstumsrate.

Ohne Induktion konnten bei *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg sowie *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr pyc\_Cg}$  höhere Wachstumsraten unter den untersuchten Bedingungen beobachtet werden ( $0,85 \text{ h}^{-1}$  anstatt  $0,73 \text{ h}^{-1}$  für *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg sowie  $0,77 \text{ h}^{-1}$  anstatt  $0,67 \text{ h}^{-1}$  für *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr pyc\_Cg}$ ). Die Wachstumsrate von *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr pyc\_Re}$  ( $0,76 \text{ h}^{-1}$ ) war unter Induktionsbedingungen mit der Wachstumsrate von *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr pyc\_Cg}$  ohne Induktion ( $0,77 \text{ h}^{-1}$ ) nahezu identisch.

Abbildung 7-17 zeigt zudem, dass bei *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg mit Saccharose als Substrat sowie *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr pyc\_Cg}$  mit Glucose als Substrat Wachstum zu beobachten war. In beiden Fällen war die Wachstumsrate jeweils leicht reduziert. *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg erreichte jedoch eine deutlich geringere Zelldichte von  $\text{OD}_{600} = 3,7$  im Vergleich zu einer  $\text{OD}_{600}$  von  $7,15 - 8,25$  bei fast allen anderen Kultivierungen. Außerdem konnten am Ende der Kultivierung noch über  $19 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose im Medium nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Bei der Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr pyc\_Cg}$  mit Glucose als Substrat wurde dem entgegengesetzt eine deutlich höhere maximale Zelldichte von  $\text{OD}_{600} = 9,7$  erreicht im Vergleich zu allen anderen Kultivierungen.

## Diskussion

Die höhere Zelldichte im komplexen MOPS gepufferten M9 Medium verglichen zu dem LB-Medium konnte vermutlich durch das zusätzliche Substrat Saccharose erreicht werden (vergleiche Abbildung 7-16). Trotzdem das definierte Medium die gleiche Saccharosekonzentration wie das komplexe M9 Medium enthielt, wurde eine geringere Zelldichte erreicht. Neben der Abwesenheit komplexer Substrate ist die geringere Zelldichte mit einer schnelleren Abnahme des pH zu erklären, da im Gegensatz zum MOPS gepufferten M9 Medium das definierte Medium nur schwach gepuffert ist. In dem definiertem Medium wurde zudem eine starke Verzögerungszeit beobachtet, bis *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr pyc\_Cg}$  mit Saccharose wächst. Die Komplexbestandteile in den anderen beiden Medien haben offensichtlich eine deutlich kürzere Verzögerungszeit begünstigt.

Es lässt sich schließen, dass die stabile Integration des Saccharose Operons *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr pyc\_Cg}$  dazu ermöglicht, Saccharose als einzige Kohlenstoffquelle für das Wachstum zu nutzen.

Die in Abbildung 7-17 dargestellten Wachstumsversuche zeigen, dass ohne Zugabe von IPTG die Wachstumsrate tendenziell höher war. Wie auch Untersuchungen mittels SDS Gelelektrophorese vermuten ließen (Daten nicht gezeigt), kann die verringerte Wachstumsrate mit einer Expression der Proteine erklärt werden. Die vergleichbar hohe Wachstumsrate von *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  pyc\_Re ist mit dem Befund vom SDS Gel zusammenpassend, welcher zeigte, dass die Pyruvatcarboxylase von *Rhizobium etli* kaum exprimiert wird. Verglichen zu allen anderen untersuchten Stämmen mit den entsprechenden Substraten wies *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  pyc\_LI die geringste Wachstumsrate auf, was möglicherweise auf eine vergleichbar höhere Expression unter Induktionsbedingungen hinweist.

*E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg wies zwar ein Wachstum mit Saccharose als Substrat auf, jedoch wurden nur die Komplexbestandteile im Medium verwendet. Saccharose konnte erwartungsgemäß für das Wachstum nicht genutzt werden.

Die hohe maximale Zelldichte bei der Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  pyc\_Cg mit Glucose als Substrat war ein zunächst unerwartetes Ergebnis. Aufgrund anderer verfügbarer Transportmechanismen für Glucose neben dem inaktivierten PTS (Jahreis *et al.* 2008) konnte *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  pyc\_Cg jedoch weiterhin Glucose aufnehmen und verwerten, beispielsweise durch Verwendung der Galactose Permease sowie Glukokinase (Picon *et al.* 2005; Lara *et al.* 2008). Eine reduzierte Wachstumsrate ist in diesem Zusammenhang bekannt. Vermutlich reduziert die langsamere Glucoseaufnahme den sogenannten Überflusmetabolismus in *E. coli* und dadurch die Nebenproduktbildung, die das Wachstum im späteren Verlauf der Kultivierung inhibieren kann (Picon *et al.* 2005; Lara *et al.* 2008), wodurch eine höhere maximale Zelldichte unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen ermöglicht wurde.

## 7.2.2 Erhöhte Aktivität anaplerotischer Reaktionen durch Überexpression

Neben dem Einfügen eines Operons zur Saccharoseaufnahme und -verwertung wurden die untersuchten Stämme mit je einem Plasmid transformiert, welches jeweils ein Gen für ein Enzym zur Erhöhung einer anaplerotischen CO<sub>2</sub> fixierenden Reaktion trug (siehe Kapitel 4.1.2).

Zunächst muss gewährleistet sein, dass die Überexpressionen auch eine deutlich erhöhte Rate der entsprechenden Reaktion bewirken. Hierfür wurden die Aktivitäten der anaplerotischen enzymatischen Reaktion in mit den entsprechenden Plasmiden transformierten *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  gemessen, wie in Kapitel 4.5.4 beschrieben. Die Zellen wurden vorher in komplexem mit MOPS gepuffertem M9 Medium mit 0,5 mM IPTG wie in Kapitel 4.4.2 dargestellt

kultiviert. Die Aktivitäten sind auf die Biotrockenmasse bezogen, da für die Aktivitätsbestimmungen stets permeabilisierte Zellen verwendet wurden.

Abbildung 7-18 zeigt die Aktivitäten verschiedener heterologer Pyruvatcarboxylasen in transformierten *E. coli*. Die Aktivitäten der Pyruvatcarboxylasen aus *Corynebacterium glutamicum* sowie *Lactococcus lactis* liegen unabhängig vom verwendeten Wirtsorganismus im ähnlichen Größenbereich zwischen 0,1 - 0,12 U  $\text{mg}_{\text{BTM}}^{-1}$ . Insbesondere für die Pyruvatcarboxylase aus *Corynebacterium glutamicum* konnte nur bei der Verwendung von permeabilisierten Zellen wie in Kapitel 4.5.4 beschrieben erhöhte Aktivitäten gemessen werden (Daten für aufgeschlossene Zellen nicht gezeigt). Für die Pyruvatcarboxylase aus *Rhizobium etli* war nahezu keine Aktivität messbar.

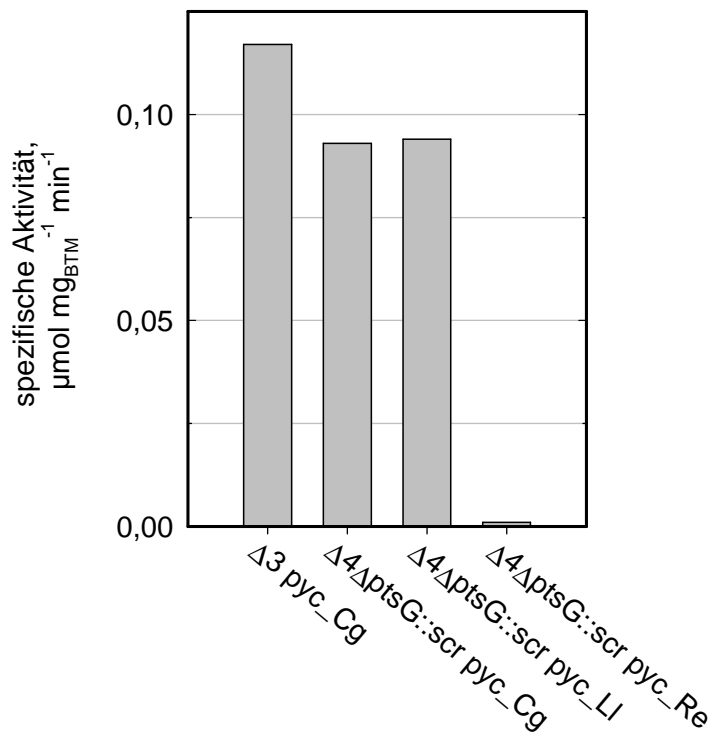


Abbildung 7-18: Spezifische Aktivitäten verschiedener Pyruvatcarboxylasen in transformierten *E. coli*  $\Delta 4 \Delta \text{ptsG}::\text{scr}$  sowie der Pyruvatcarboxylase aus *Corynebacterium glutamicum* in *E. coli*  $\Delta 3 \text{ pyc\_Cg}$  im Vergleich. Wie in Kapitel 4.5.4 beschrieben erfolgte die Aktivitätsmessung bei Raumtemperatur in permeabilisierten Zellen und ist auf die Biotrockenmasse bezogen.

Abbildung 7-19 zeigt die Aktivität der homologen Enzyme Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (Pck), Phosphoenolpyruvatcarboxylase (Ppc) sowie der NAD-abhängigen decarboxylierenden Malatdehydrogenase (MaeA) und der NADP-abhängigen decarboxylierenden Malatdehydrogenase (MaeB) in verschiedenen transformierten *E. coli*. In dem nicht transformierten Stamm sind geringe Aktivitäten für alle vier Enzyme messbar, da die Enzyme

auch natürlich in *E. coli* vorkommen. In den anderen Stämmen konnte für alle überexprimierten Enzyme eine deutlich erhöhte Aktivität festgestellt werden. Es wurden auch eine vermeintlich erhöhte Ppc Aktivität in *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  pck sowie eine Pck Aktivität in *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  ppc gemessen. Eine vermeintlich erhöhte Aktivität von MaeB war zudem in *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  maeA messbar.

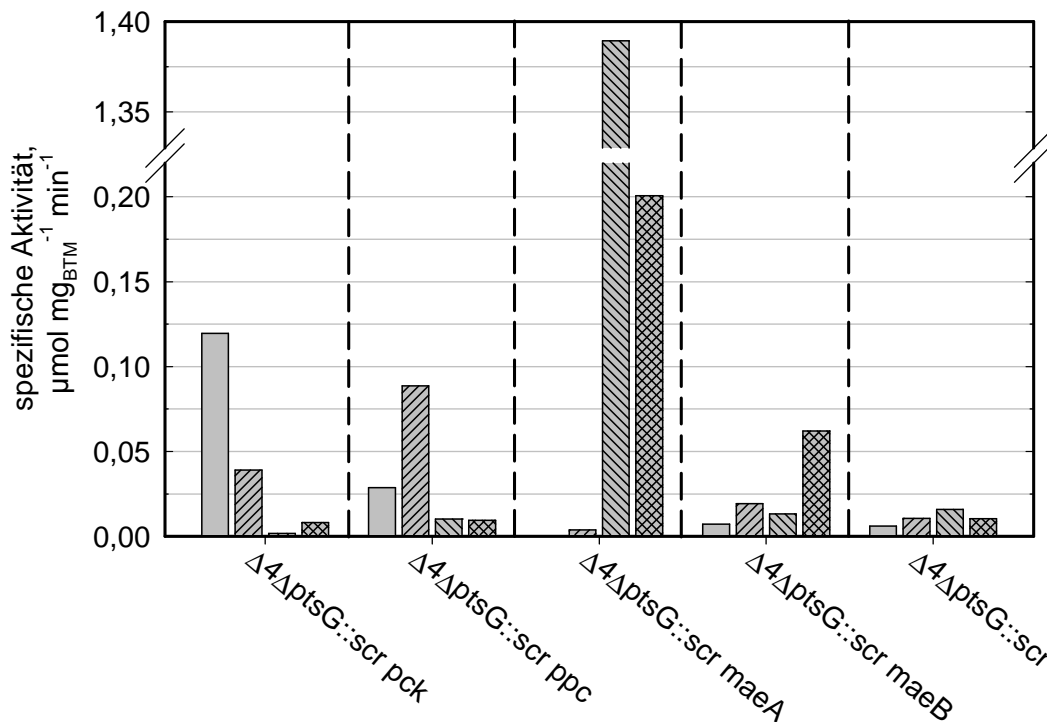


Abbildung 7-19: Spezifische Aktivitäten in transformierten *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  Stämmen bestimmt mit verschiedenen Aktivitätstests. Die Aktivitäten der homologen Enzyme Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (Pck, □), Phosphoenolpyruvatcarboxylase (Ppc, ▨) sowie der NAD-abhängigen decarboxylierenden Malatdehydrogenase (MaeA, ▩) und der NADP-abhängigen decarboxylierenden Malatdehydrogenase (MaeB, ▧) wurden bestimmt. Wie in Kapitel 4.5.4 beschrieben erfolgte die Aktivitätsmessung bei Raumtemperatur in permeabilisierten Zellen und ist auf die Biotrockenmasse bezogen.

## Diskussion

Studien zur Bernsteinsäureproduktion mit *E. coli* und heterologer Überexpression der Pyruvatcarboxylase aus *Lactococcus lactis* haben beispielsweise Aktivitäten von  $0,05 \text{ U mg}_{\text{Protein}}^{-1}$  (Blankschien *et al.* 2010) und  $0,06 \text{ U mg}_{\text{Protein}}^{-1}$  (Sanchez *et al.* 2006) berichtet. Die hier bestimmten Aktivitäten der Pyruvatcarboxylasen aus *Corynebacterium glutamicum* sowie *Lactococcus lactis* liegen somit etwas höher (vergleiche Abbildung 7-18), wenn näherungsweise ein Proteingehalt von  $0,5 \text{ g g}^{-1}$  angenommen wird (Blankschien *et al.* 2010). Für die Aktivität der Pyruvatcarboxylase aus *Rhizobium etli* in rekombinanten *E. coli* wurden unter



bestimmten Bedingungen sogar deutlich höhere Werte von bis zu  $0,81 \text{ U mg}_{\text{Protein}}^{-1}$  berichtet (Vemuri *et al.* 2002a). Trotz Nachweis der korrekten Transformation (Ergebnis nicht gezeigt) konnte hier keine Aktivität der rekombinanten Pyruvatcarboxylase aus *Rhizobium etli* beobachtet werden. Untersuchungen der Proteine mittels SDS Gelelektrophorese deuteten auf eine unzureichende Proteinmenge hin (Ergebnisse nicht gezeigt). Es bleibt unklar, aus welchem Grund die Pyruvatcarboxylase aus *Rhizobium etli* vergleichsweise schlecht exprimiert wurde.

Für die Pyruvatcarboxylase aus *Corynebacterium glutamicum* war bereits bekannt, dass die Aktivitätsmessung durch viele Aufschlussmethoden empfindlich beeinträchtigt wird (Peters-Wendisch *et al.* 1997). Daher wurden in dieser Arbeit sämtliche Aktivitätsbestimmungen in permeabilisierten Zellen durchgeführt.

Hinsichtlich der Aktivitätsbestimmung der homologen Enzyme zeigen alle Stämme die jeweils höchste Aktivität bei dem zur Überexpression zugehörigem Aktivitätstest (vergleiche Abbildung 7-19). Das Ergebnis ist insofern erwartungsgemäß und bestätigt jeweils die vorhandene Überexpression. Da sich die Aktivitätsbestimmungen für Ppc und Pck jedoch kaum unterscheiden und daher wenig selektiv sind, wurden auch eine vermeintlich erhöhte Ppc Aktivität in *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr pck}$  sowie eine Pck Aktivität in *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr ppc}$  gemessen. Auch die Bestimmung der Aktivitäten von MaeA/MaeB unterscheiden sich methodisch nur in der Zugabe vom Co-Substrat  $\text{NAD}^+$  beziehungsweise  $\text{NADP}^+$  und daher war auch eine vermeintlich erhöhte Aktivität von MaeB in *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr maeA}$  messbar.

Die Überexpression von Ppc resultierte beispielsweise in Aktivitätsmessungen von  $0,29 \text{ U mg}_{\text{Protein}}^{-1}$  (Blankschien *et al.* 2010) oder  $12,3 \text{ U mg}_{\text{Protein}}^{-1}$  (Millard *et al.* 1996). Die hier gemessene Aktivität von  $0,09 \text{ U mg}_{\text{BTM}}^{-1}$  liegt folglich in einer ähnlichen Größenordnung wie bei (Blankschien *et al.* 2010).

Resultierende Aktivitäten von Pck durch Überexpression wurden beispielsweise mit  $0,03 \text{ U mg}_{\text{Protein}}^{-1}$  (Blankschien *et al.* 2010),  $15,1 \text{ U mg}_{\text{Protein}}^{-1}$  (Millard *et al.* 1996) sowie  $0,2 \text{ U mg}_{\text{Protein}}^{-1}$  (Kim *et al.* 2004) quantifiziert. Die hier gemessene Aktivität von Pck mit  $0,12 \text{ U mg}_{\text{BTM}}^{-1}$  liegt somit in einer vergleichsweise mittleren Größenordnung.

Die hier gemessenen Aktivitäten von MaeA mit  $1,39 \text{ U mg}_{\text{BTM}}^{-1}$  und von MaeB mit  $0,06 \text{ U mg}_{\text{BTM}}^{-1}$  liegen im Vergleich zu (Blankschien *et al.* 2010) mit  $0,013 \text{ U mg}_{\text{Protein}}^{-1}$  und  $0,014 \text{ U mg}_{\text{Protein}}^{-1}$  deutlich höher. Insbesondere die extrem hohe Aktivität von MaeA war ein überraschendes Ergebnis. Untersuchungen der Proteine mittels SDS Gelelektrophorese deuteten auf eine sehr hohe Expression von MaeA hin (Ergebnisse nicht gezeigt). Aus welchem Grund MaeA im Vergleich zu den anderen Enzymen mit dem gleichen Vektor wesentlich besser überexprimiert werden konnte, ist unklar.

Abgesehen von der Pyruvatcarboxylase aus *Rhizobium etli* führte zusammenfassend die Überexpression eines Enzyms zur Verwirklichung oder Verbesserung einer anaplerotischen Reaktion in jedem Fall zu einer Erhöhung der entsprechenden Aktivität. Hier wurden fast ausschließlich die Aktivitäten in transformierten *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  bestimmt. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden auch andere *E. coli* Wirtsorganismen mit den entsprechenden Plasmiden transformiert und reaktionstechnisch charakterisiert. Es kann angenommen werden, dass bei der Transformation des gleichen Plasmides auch eine enzymatische Aktivität in einer vergleichbaren Größenordnung vorliegt, unabhängig von den in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Wirtsorganismen, da diese alle den gleichen Ursprung haben (*E. coli* K-12 MG1655). Der Vergleich mit der Literatur zeigt, dass die Aktivität der exprimierten Enzyme abhängig von der Studie stark variieren kann. Neben unterschiedlichen Ursprüngen der Enzyme sowie unterschiedlichen Expressionsvektoren kann nicht zuletzt das experimentelle Verfahren der Aktivitätsbestimmung (zum Beispiel die Aufschlussmethode) als Ursache genannt werden. Aus den absolut bestimmten Aktivitäten können somit nur bedingt Schlüsse und Vergleiche gezogen werden.

### 7.2.3 Bernsteinsäureproduktion mit Saccharose verwertenden *Escherichia coli*

Verschiedene *E. coli* Stämme wurden konstruiert, die Saccharose aufnehmen und verwerten sowie möglichst effektiv zu Bernsteinsäure umsetzen sollten. Als Wirtsorganismen dienten entweder *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  mit einer stabilen Integration des Saccharose Aufnahme- und Verwertungsoperons *scr* (ohne Repressor) aus *Salmonella typhimurium* oder der Wildtyp *E. coli* K12 MG1655 mit einer Transformation des Plasmides pCOLADuet-1::csc, welches das Saccharose Aufnahme- und Verwertungsoperon *csc* (ohne Repressor) aus *E. coli* EC3132 trägt. Diese Organismen wurden weiterhin mit verschiedenen Plasmiden transformiert, durch welche die Expression jeweils eines Enzyms zur Förderung einer anaplerotischen Reaktion erfolgt. In mehreren aufeinanderfolgenden Experimenten wurden alle Stämme charakterisiert. *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  pyc\_Cg beziehungsweise der Glucoseverwerter *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg dienten dabei als Referenzstamm.

#### ***E. coli* mit Überexpression verschiedener Pyruvatcarboxylasen**

Da der überwiegende Teil der Prozessetablierung und Entwicklung für die Bernsteinsäureproduktion mit dem Glucoseverwerter *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg erfolgte (mit einer heterologen Expression einer Pyruvatcarboxylase), wurde zunächst die Expression von unterschiedlichen Pyruvatcarboxylasen in Saccharose verwertenden *E. coli* verwirklicht. Die Ergebnisse der re-

aktionstechnischen Analyse in Milliliter Rührkesselreaktoren sind in Abbildung 7-20 dargestellt.

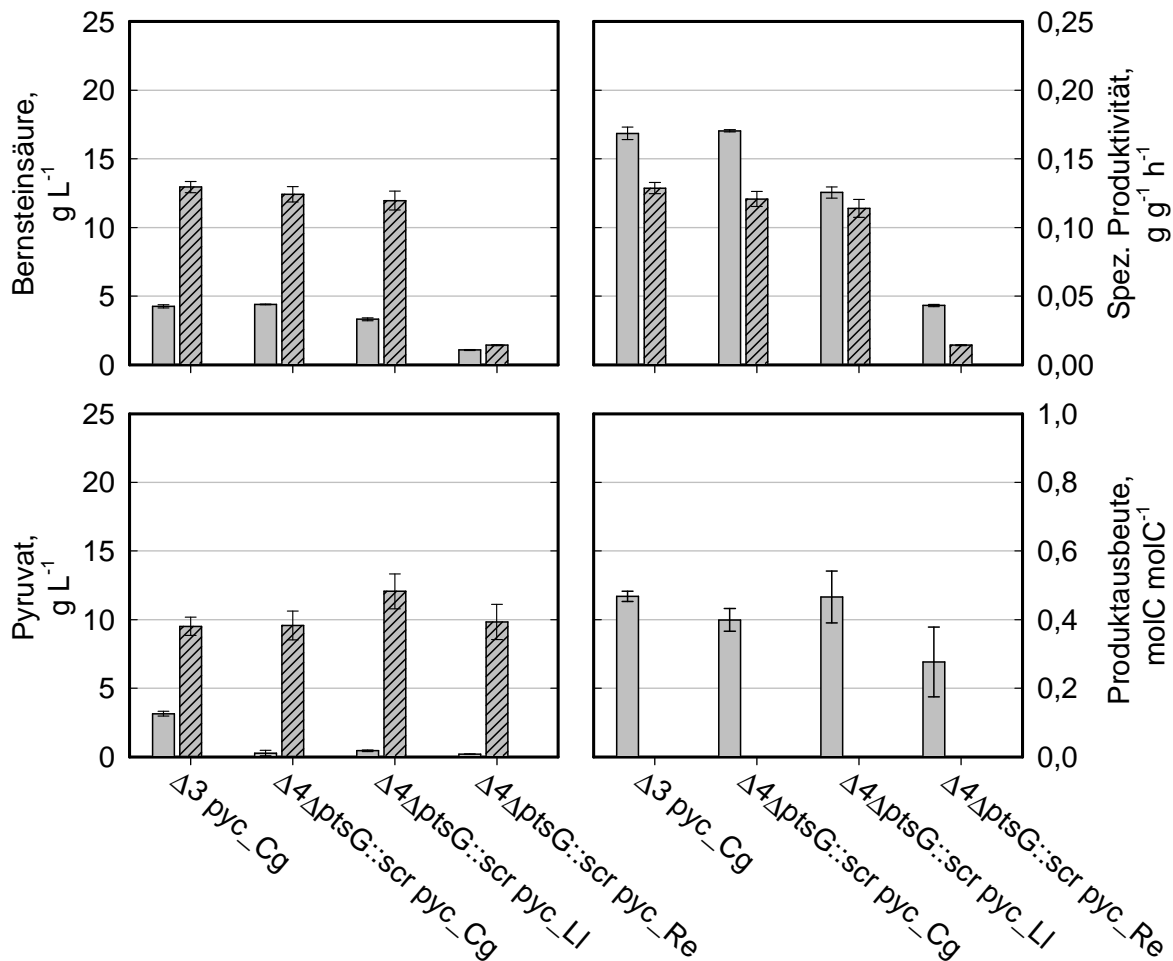


Abbildung 7-20: Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg, *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  pyc\_Cg, *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  pyc\_LI sowie *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  pyc\_Re in Milliliter Rührkesselreaktoren in komplexem M9 Medium mit 0,5 mM IPTG (37 °C, pH 6,8, 2800 U min<sup>-1</sup>, 25 mL min<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub>, c<sub>X,0</sub> ~ 4,3 g L<sup>-1</sup>). Die Bernsteinsäurekonzentrationen, die Pyruvatkonzentrationen sowie die spezifischen Produktivitäten nach 6 h (□) und 23,8 h (▨) Versuchszeit sind dargestellt. Die Produktausbeuten wurden auf Basis der Daten nach 6 h Versuchszeit ermittelt. Nach 8 h anaerober Kultivierung wurde den Milliliter Rührkesselreaktoren Substrat (Glucose beziehungsweise Saccharose, 500 g L<sup>-1</sup>) mit einer Rate von 30  $\mu$ L h<sup>-1</sup> zugegeben. Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei parallel durchgeführten Kultivierungen an.

Durch die Expression der Pyruvatcarboxylase aus *Corynebacterium glutamicum* sowie aus *Lactococcus lactis* wurden vergleichbar hohe Bernsteinsäurekonzentrationen von bis zu 13 g L<sup>-1</sup> erreicht. Dabei ist es unerheblich, ob der Glucoseverwerter *E. coli*  $\Delta 3$  oder der Saccharoseverwerter *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  als Wirtsorganismus kultiviert wurden. In beiden

Fällen wurde das jeweilige Substrat zu ähnlichen Produktkonzentrationen umgesetzt. Die Produktausbeuten von *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg, *E. coli*  $\Delta 4\Delta$ ptsG::scr pyc\_Cg sowie *E. coli*  $\Delta 4\Delta$ ptsG::scr pyc\_LI lagen in einer vergleichbaren Größenordnung. Mit *E. coli*  $\Delta 4\Delta$ ptsG::scr pyc\_Re wurde mit nur  $1,4 \text{ g L}^{-1}$  vergleichbar wenig Bernsteinsäure in 24 h produziert. Versuchsdaten aus vergleichbar gestalteten Experimenten im Millilitermaßstab zeigen, dass in etwa die gleiche Produktkonzentration mit *E. coli*  $\Delta 4\Delta$ ptsG::scr ohne weitere gentechnische Veränderungen erzeugt wurde. Bei allen untersuchten Stämmen war in dem gezeigten Experiment zudem eine hohe Pyruvatproduktion zu beobachten mit Konzentrationen von  $9,1 - 12,5 \text{ g L}^{-1}$  nach 24 h.

## Diskussion

Die Aufnahme und Verwertung des neuen Substrates Saccharose scheint kein Schritt zu sein, der die Bernsteinsäureproduktion negativ beeinflusst, was durch den Vergleich von *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg sowie *E. coli*  $\Delta 4\Delta$ ptsG::scr pyc\_Cg gezeigt wurde.

Im Rahmen der Bernsteinsäureproduktion mit rekombinanten *E. coli* wird die heterologe Überexpression von Pyruvatcarboxylasen aus *Rhizobium etli* (Gokarn *et al.* 1998; Vemuri *et al.* 2002a; Vemuri *et al.* 2002b) sowie *Lactococcus lactis* (Lin *et al.* 2004; Sanchez *et al.* 2005a; Sanchez *et al.* 2005b; Sanchez *et al.* 2006; Blankschien *et al.* 2010) häufig zur Verbesserung der Produktivität und Ausbeute angewendet. Die Verwendung der Pyruvatcarboxylase aus *Corynebacterium glutamicum* im Rahmen der Bernsteinsäureproduktion mit rekombinanten *E. coli* ist anscheinend weniger verbreitet, führte im Rahmen dieser Studie jedoch zu Ergebnissen, die mit der Überexpression der Pyruvatcarboxylase aus *Lactococcus lactis* vergleichbar sind.

Die Überexpression der Pyruvatcarboxylase aus *Rhizobium etli* hatte in dieser Studie keine verbesserte Bernsteinsäureproduktion zur Folge. Die Beobachtung deckt sich mit den Daten aus Kapitel 7.2.1 sowie Kapitel 7.2.2, die nahelegen, dass trotz erfolgreicher Transformation die Pyruvatcarboxylase aus *Rhizobium etli* kaum exprimiert wird.

## ***E. coli* mit Amplifikation anderer anaplerotischer Reaktionen**

Prinzipiell ist eine Verbesserung der Bernsteinsäureproduktion und Produktausbeute in *E. coli* durch die Amplifikation der durch Ppc, Pck, MaeA und MaeB katalysierten Reaktionen zur Fixierung von CO<sub>2</sub> sowie Einschleusung der Intermediate PEP und Pyruvat in den Citratzyklus möglich (Zhang *et al.* 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Strategien in Saccharose verwertenden Stämmen von *E. coli* untersucht. Die Ergebnisse reaktionstechnischer Charakterisierungen dieser Stämme sind in Abbildung 7-21 dargestellt.

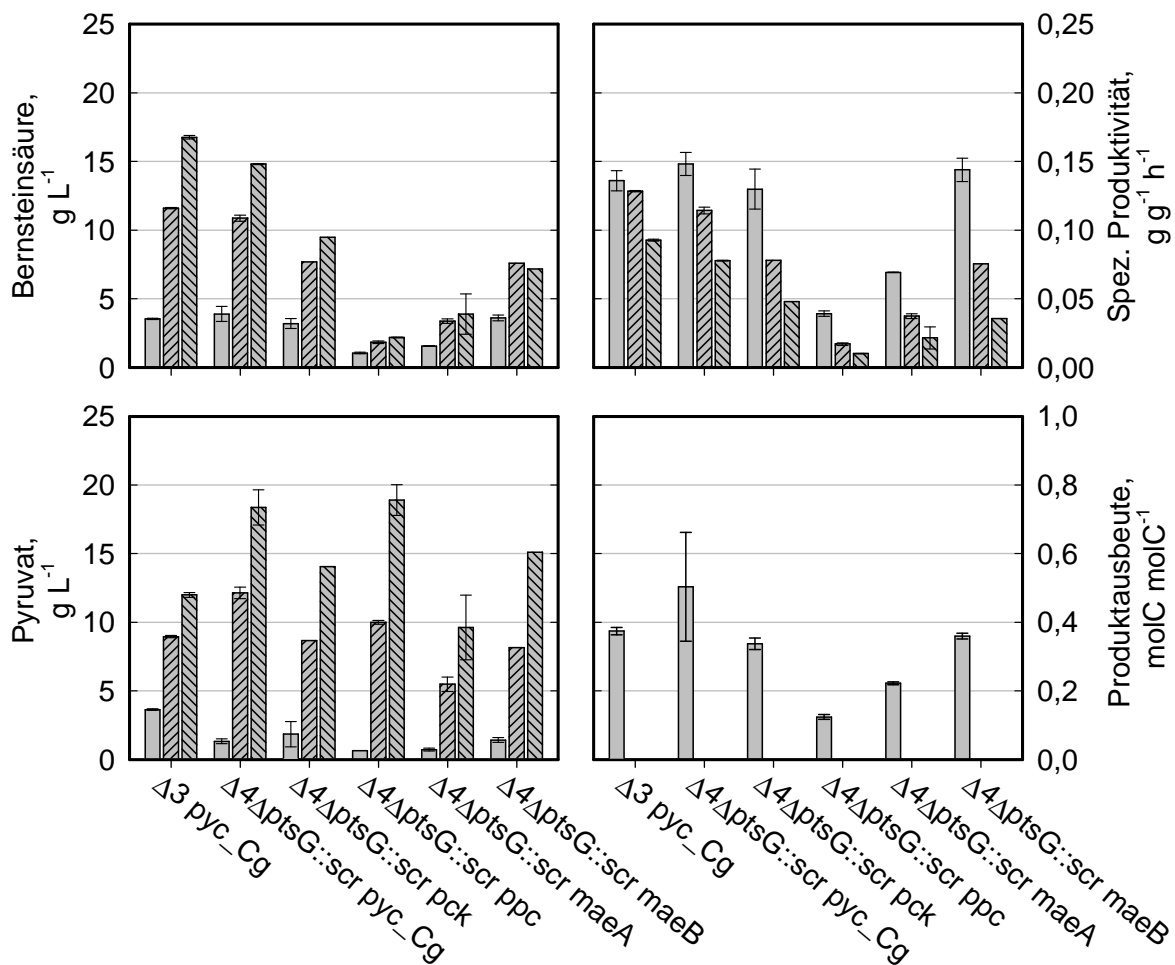


Abbildung 7-21: Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg, *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  pyc\_Cg, *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  pck, *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  ppc, *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  maeA sowie *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  maeB in Milliliter Rührkesselreaktoren in komplexem M9 Medium mit 0,5 mM IPTG (37 °C, pH 6,8, 2800 U min<sup>-1</sup>, 25 mL min<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub>, c<sub>X,0</sub> ~ 4,1 g L<sup>-1</sup>). Die Bernsteinsäurekonzentrationen, die Pyruvatkonzentrationen sowie die spezifischen Produktivitäten nach 6 h (□), 24 h (▨) und 48 h (▩) Versuchszeit sind dargestellt. Die Produktausbeuten wurden auf Basis der Daten nach 6 h Versuchszeit ermittelt. Nach 6 h anaerober Kultivierung wurde den Milliliter Rührkesselreaktoren Substrat (Glucose beziehungsweise Saccharose, 500 g L<sup>-1</sup>) mit einer Rate von 30  $\mu$ L h<sup>-1</sup> zugegeben. Fehlerbalken geben die Standardabweichung von parallel durchgeführten Kultivierungen an.

Abbildung 7-21 zeigt, dass im Vergleich zur Überexpression der Pyruvatcarboxylase aus *Corynebacterium glutamicum* keine Überexpression von homologen carboxylierenden Enzymen zu besseren Ergebnissen führte. *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  pck schnitt unter den neu betrachteten Stämmen mit einer Endkonzentration von 9,5 g L<sup>-1</sup> Bernsteinsäure nach 48 h verglichen zu 14,81 g L<sup>-1</sup> im Falle von *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  pyc\_Cg noch am besten ab. Die Überexpression von Ppc schien zu keinen Unterschieden in der reaktionstechnischen Charakterisierung verglichen zum nicht transformierten Wirt zu führen. Bei dem Vergleich der beiden decarbo-

xylierende Malatdehydrogenasen MaeA und MaeB stellte sich heraus, dass die Überexpression von MaeB in einer höheren Bernsteinsäurekonzentration von  $7,2 \text{ g L}^{-1}$  nach 48 resultierte. Mit  $3,9 \text{ g L}^{-1}$  nach 48 h Kultivierung hatte die Überexpression von MaeA nur einen geringen positiven Einfluss auf die Bernsteinsäurebildung. Vergleichbar zu den Ergebnissen aus Abbildung 7-20 wurden neben Bernsteinsäure hohe Konzentrationen an Pyruvat gebildet.

## Diskussion

Durch die homologen Überexpressionen konnten im Falle aller vier Enzyme deutlich erhöhte Aktivitäten der entsprechenden Reaktionen festgestellt werden (vergleiche Kapitel 7.2.2). Es kann daraus geschlossen werden, dass unter den untersuchten Bedingungen die Überexpression von Pck sowie MaeB einen positiven Effekt auf die Bernsteinsäureproduktion hat, während der Effekt im Falle von MaeA trotz deutlich erhöhter Aktivität gering ist und im Falle von Ppc kaum erkennbar ist. Insbesondere am Beispiel von MaeA, in dessen Fall eine sehr hohe Aktivität gemessen wurde (vergleiche Kapitel 7.2.2), lässt sich feststellen, dass die Aktivität allein keine Aussage darüber liefert, welcher Einfluss auf die Bernsteinsäurebildung zu erwarten ist. Neben der Tatsache, dass die entsprechenden Reaktionsraten durch Überexpression prinzipiell erhöht werden, spielen andere Effekte eine Rolle. Für die decarboxylierenden Malatdehydrogenasen könnte es sich negativ auswirken, dass die Bildung von Pyruvat gegenüber Malat kinetisch favorisiert ist (Hong *et al.* 2003; Song und Lee 2006; Bologna *et al.* 2007). In einer anderen Studie wurden jedoch bereits positive Effekte der Überexpression der NAD-abhängigen decarboxylierenden Malatdehydrogenase (MaeA) auf die Bernsteinsäurebildung beschrieben (Stols und Donnelly 1997).

Sofern nur die Energiebilanz betrachtet wird, könnte Pck gegenüber Ppc durch die Produktion von einem Mol ATP pro Mol umgesetztes PEP den beobachteten vorteilhaften Effekt erzeugt haben. In (Millard *et al.* 1996) wurde im Gegensatz zu dieser Studie jedoch ein vorteilhafter Effekt der Überexpression der Ppc und kein Effekt bei der Überexpression der Pck festgestellt. Es wurde allerdings ein *E. coli* ohne vergleichbare Gendelektionen wie in dem hier untersuchten Stamm *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr}$  verwendet (Chao und Liao 1993). In (Zhang *et al.* 2009) wurde beispielsweise wiederum ein *E. coli* durch metabolische Evolution entwickelt, in dem Pck überwiegend für die Carboxylierung von PEP und in der damit im Zusammenhang stehenden Verbesserung der Bernsteinsäureproduktion verwendet wird. Eine weitere Arbeit zeigt zudem den positiven von Pck aus *Actinobacillus succinogenes* auf die Bernsteinsäureproduktion in *E. coli* mit einer Deletion in *ppc* und weist zusätzlich auf die Signifikanz der verwendeten experimentellen und verfahrenstechnischen Bedingungen hin (Kim *et al.* 2004).

Aufgrund unterschiedlich langer Verzögerungsphasen sowie leicht unterschiedlichen Wachstumsraten der einzelnen Stämme unter induzierten Bedingungen wurden zum Teil unterschiedliche Volumina (100 - 800 µL) für die Inokulation der Schüttelkolbenkulturen zur Biomasseherstellung gewählt. Diese Prozedur sollte gewährleisten, dass nach 21 h alle Kulturen eine Zellkonzentration in einer ähnlichen Größenordnung erreichten und sich somit in Hinblick auf die verfahrenstechnischen Bedingungen in einem ähnlichen Zustand befanden. Es war nicht auszuschließen, dass diese Prozedur einen negativen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Experimente hatte, da Unterschiede in der Zelldichte sowie Kultivierungszeit während der Zellherstellung im Schüttelkolben bei der Untersuchung eines einzigen Stammes bereits einen großen Einfluss zeigten (vergleiche Kapitel 7.1.3). Die hier dargestellten Ergebnisse konnten jedoch sequentiell qualitativ reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).

### **Expression eines alternativen Saccharose Operons sowie eines Enzyms zur Ermöglichung einer anaplerotischen Reaktion im Wildtyp *E.coli* MG1655**

Die Aufnahme und Verwertung von Saccharose mit *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  mit einer stabilen Integration des Saccharose Aufnahme- und Verwertungsoperons *scr* (ohne Repressor) aus *Salmonella typhimurium* sowie die Eignung verschiedener auf diesen Organismus basierender Stämme zur Bernsteinsäureproduktion wurde in den vorangehenden Abschnitten untersucht und diskutiert. Prinzipiell ist die Verwertung von Saccharose auch über andere Mechanismen möglich (Lee *et al.* 2010), von denen ein Weiterer hier untersucht werden sollte. Zu diesem Zwecke wurde *E.coli* K12 MG1655 mit dem Plasmid pCOLADuet-1::csc transformiert, welches das Saccharose Aufnahme- und Verwertungsoperon *csc* (ohne Repressor) aus *E. coli* EC3132 trägt (Bockmann *et al.* 1992; Jahreis *et al.* 2002).

Neben der Transformation von pCOLADuet-1::csc in *E.coli* K12 MG1655 wurde der Organismus mit jeweils einem weiteren Plasmid transformiert, welches ein Enzym zur Förderung einer anaplerotischen Reaktion trägt. Die unterschiedlichen Stämme wurden im Folgenden in Milliliter Rührkesselreaktoren charakterisiert und miteinander verglichen.

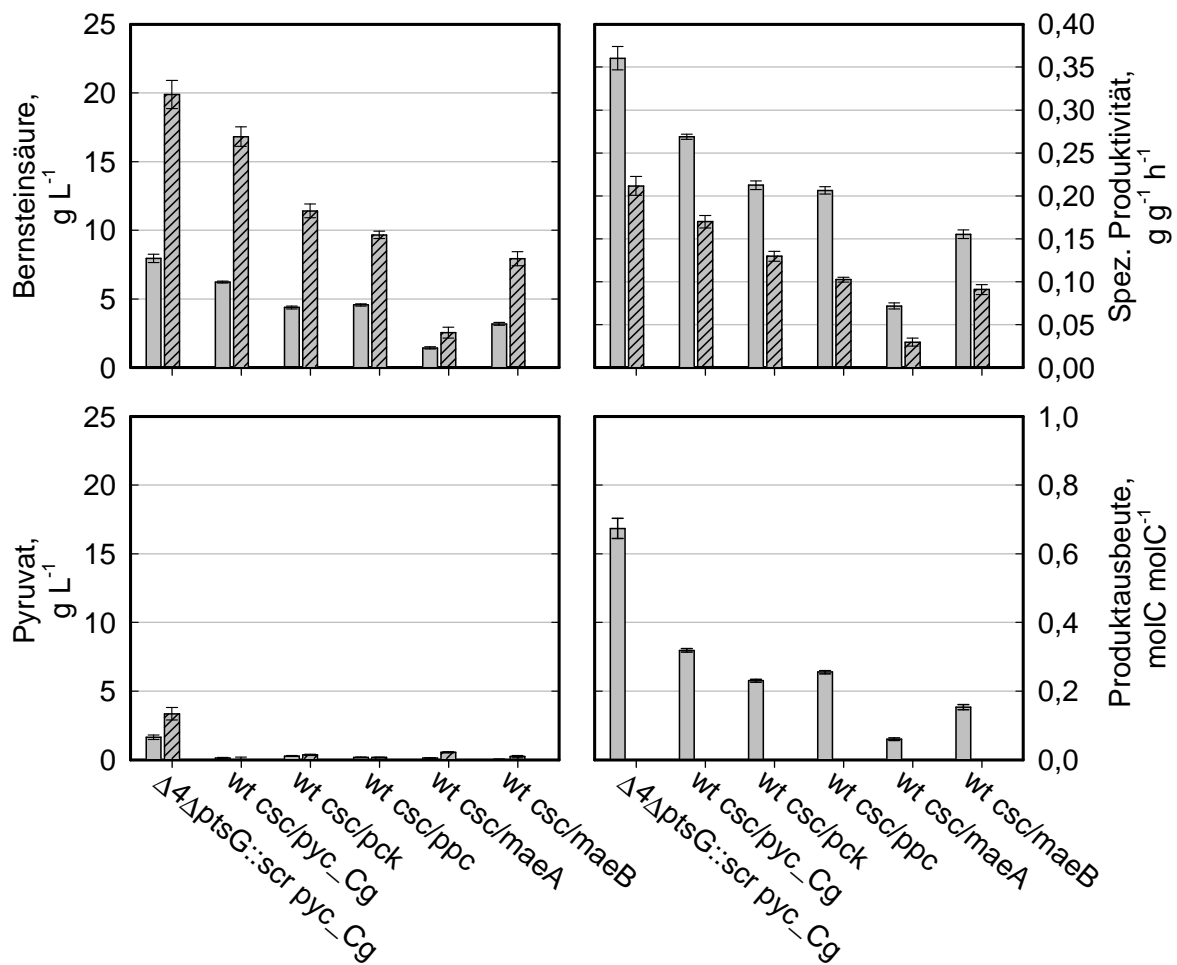


Abbildung 7-22: Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  pyc\_Cg, *E. coli* wt csc/pyc\_Cg, *E. coli* wt csc/pck, *E. coli* wt csc/ppc, *E. coli* wt csc/maeA sowie *E. coli* wt csc/maeB in Milliliter Rührkesselreaktoren in komplexem M9 Medium mit 0,5 mM IPTG (37 °C, pH 6,8, 2800 U min<sup>-1</sup>, 25 mL min<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub>, c<sub>X,0</sub> ~ 3,9 g L<sup>-1</sup>). Die Bernsteinsäurekonzentrationen, die Pyruvatkonzentrationen sowie die spezifischen Produktivitäten nach 5,7 h (□) und 24,2 h (▨) Versuchszeit sind dargestellt. Die Produktausbeuten wurden auf Basis der Daten nach 5,7 h Versuchszeit ermittelt. Nach 6,3 h anaerober Kultivierung wurde den Milliliter Rührkesselreaktoren Substrat (Saccharose, 500 g L<sup>-1</sup>) mit einer Rate von 30  $\mu$ L h<sup>-1</sup> zugegeben. Fehlerbalken geben die Standardabweichung von vier parallel durchgeführten Kultivierungen an.

In Abbildung 7-22 ist *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  pyc\_Cg mit den Stämmen verglichen, die durch das csc Operon in die Lage versetzt wurden, Saccharose zu verwerten. Die Ergebnisse decken sich zum Teil mit den bisherigen Daten. Verglichen zu den anderen doppelt transformierten Stämmen führte die Überexpression der Pyruvatcarboxylase aus *Corynebacterium glutamicum* zu der höchsten Bernsteinsäurekonzentration mit 16,8 g L<sup>-1</sup> nach 24 h. Qualitativ deckend mit den Ergebnissen aus Abbildung 7-21 führen die Überexpressionen von Pck sowie MaeB zu vergleichbar mittelmäßigen Bernsteinsäurekonzentration von 11,4 und 7,9 g L<sup>-1</sup> nach 24 h. Die Überexpression von MaeA hatte keinen deutlich positiven Ein-



fluss mit  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  nach 24 h anaerober Kultivierung. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus Abbildung 7-21 wurde mit *E. coli* wt csc/ppc durch die Überexpression von Ppc eine vergleichbar hohe Bernsteinsäurekonzentration von  $9,7 \text{ g L}^{-1}$  nach 24 h erreicht.

Der Vergleich von *E. coli* wt csc/pyc\_C mit *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr pyc\_Cg}$  zeigt, dass in beiden Fällen relativ hohe Mengen Bernsteinsäure gebildet wurden. Die Bernsteinsäurekonzentration war im Falle von *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr pyc\_Cg}$  nach 24 h mit  $19,9 \text{ g L}^{-1}$  noch deutlich höher verglichen zu  $16,8 \text{ g L}^{-1}$  im Falle von *E. coli* wt csc/pyc\_C. Die Produktausbeute unter Verwendung von *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr pyc\_Cg}$  war mit  $0,67 \text{ molC molC}^{-1}$  ebenfalls verglichen zu *E. coli* wt csc/pyc\_C ( $0,32 \text{ molC molC}^{-1}$ ) sowie allen anderen in diesem Experiment verwendeten Stämmen relativ hoch.

Zu einem besseren Vergleich der beiden Saccharoseaufnahme- und Verwertungssysteme wurde der Stamm *E. coli* wt scr/maeA mit dem Plasmid pCOLADuet-1::scr konstruiert, welches das scr Operon (ohne Repressor) aus *Salmonella typhimurium* trägt. Da die Überexpression von MaeA zu keiner nennenswerten Bernsteinsäureproduktion führte, war der Vergleich der beiden Saccharoseaufnahme- und Verwertungssysteme im Hinblick auf die Eignung zur Bernsteinsäureproduktion direkt nicht möglich. Anhand der Messungen der Saccharosekonzentration nach 6 h Produktionsphase (Daten nicht gezeigt) konnte allerdings festgestellt werden, dass sowohl *E. coli* wt scr/maeA als auch *E. coli* wt csc/maeA vergleichbare Mengen Saccharose aufgenommen und verwertet haben.

## Diskussion

Die mit dem csc Operon transformierten *E. coli* weisen aus gentechnischer Sicht neben der Art der Saccharoseverwertung gegenüber *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr}$  weitere deutliche Unterschiede auf. Zum einen wurde das csc Operon nicht stabil integriert sondern durch Transformation eines Plasmides in den Organismus eingebracht. Weiterhin wurden die Gene *ack-pta*, *adhE*, *ldhA* sowie *ygfG*, welche für Enzyme kodieren, die auf der Syntheseroute zu Bernsteinsäure sowie 3-Hydroxyisobuttersäure unerwünschte Nebenreaktionen verursachen, nicht inaktiviert. Zudem wurde *ptsG*, welches für das Glucose-spezifische PTS kodiert, nicht inaktiviert.

In Kombination mit dem genetischen Hintergrund des Stammes *E. coli* wt csc/ppc hatte die Überexpression von Ppc im Gegensatz zu *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr ppc}$  einen deutlich positiven Effekt auf die Bernsteinsäureproduktion. Dieser beobachtete positive Effekt deckt sich mit den Daten aus (Millard *et al.* 1996). In diesem Zusammenhang kann nur spekuliert werden, warum im Stamm *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr ppc}$  kein positiver Effekt auf die Bernsteinsäureproduktion beobachtet werden konnte. Durch die Inaktivierung der Nebenreaktionen zur Bildung von Lactat, Acetat und Ethanol in *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr ppc}$  könnte es möglicherweise zu Li-

mitationen in der Bereitstellung von Kofaktoren kommen, welche für den Ablauf der durch Ppc katalysierten Reaktion sowie die Folgereaktionen benötigt werden. Immerhin hat die Überexpression von Pck, durch dessen katalysierte Reaktion im Gegensatz zu Ppc 1 Mol ATP gebildet wird, in *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  pck einen positiven Effekt auf die Bernsteinsäureproduktion. In *E. coli* wt csc/ppc kann ATP allerdings auch durch Nebenreaktionen wie der Bildung von Acetat gewonnen werden, wodurch die durch Ppc katalysierte Reaktion, die kein ATP bildet, möglicherweise keinen Nachteil bietet.

Die höhere Bernsteinsäureproduktion von *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  pyc\_Cg verglichen zu *E. coli* wt csc/pyc\_C lässt sich vermutlich weniger mit der unterschiedlichen Art der Saccharoseaufnahme erklären als mit der Tatsache, dass bei *E. coli* wt csc/pyc\_C ein Großteil des bereitgestellten Substrates in Nebenprodukte umgewandelt wurde. Die Bildung hoher Konzentrationen an Nebenprodukten hatte bei den Stämmen ohne Inaktivierung unerwünschter Nebenreaktionen zudem eine sehr geringe Produktausbeute verglichen zu *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  pyc\_Cg zur Folge.

Verglichen zu den Ergebnissen aus Abbildung 7-21 wurde mit *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  pyc\_Cg im Experiment, dessen Ergebnisse in Abbildung 7-22 dargestellt sind, deutlich mehr Bernsteinsäure nach 24 h erzeugt ( $19,9 \text{ g L}^{-1}$  anstatt  $10,9 \text{ g L}^{-1}$ ). Gleichzeitig konnte eine deutlich geringere Pyruvatbildung beobachtet werden. Die Biomasseherstellung mit einem zweistufigen Verfahren im Schüttelkolben im letzten Versuch führte vermutlich zu einer deutlich erhöhten Bernsteinsäurebildung verglichen zu den bisher dargestellten Versuchen. Dieser Aspekt wurde bereits in Kapitel 7.1.3 diskutiert. Auch andere bereits diskutierte Einflüsse aus der Biomasseherstellung können einen starken Einfluss auf die sequentielle Reproduzierbarkeit der quantitativen Daten haben. Der qualitative Vergleich sämtlicher Ergebnisse aus jeweils einem Versuch bleibt jedoch von der zum Teil unvoreilhaften sequentiellen Reproduzierbarkeit unberührt.

Zusammenfassend betrachtet können auf Basis der gezeigten Datenlage das *scr* Operon und das *csc* Operon als gleichermaßen geeignet bewertet werden für die Aufnahme und Verwertung von Saccharose zur Bildung von Bernsteinsäure. Für einen noch besseren Vergleich wäre die Konstruktion des Stammes *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::csc$  pyc\_Cg mit einer stabilen Integration des *csc* Operons wünschenswert, bei dem im Bezug auf die Saccharoseaufnahme und Bernsteinsäurebildung identische reaktionstechnische Eigenschaften erwartet werden wie bei *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  pyc\_Cg. Es ist noch zu erwähnen, dass die hier verfolgte Strategie der stabilen Integration des *scr* Operons mit gleichzeitiger Inaktivierung von *ptsG* nicht nur zum Ziel hat, die Glucoseaufnahme zu ersetzen. Die Inaktivierung von *ptsG* kann auch einen starken regulatorischen Einfluss auf den fermentativen Metabolismus von *E. coli*

haben und gegebenenfalls zu einer erhöhten Bernsteinsäureproduktion führen (Chatterjee *et al.* 2001).

#### 7.2.4 Reaktionstechnische Untersuchungen im Zulaufverfahren

Ausgewählte Stämme wurden im Litermaßstab mit dem im Kapitel 7.1.4 erarbeiteten Verfahren charakterisiert.

Abbildung 7-23 zeigt eine Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr pyc\_LI$  in vier Phasen. *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr pyc\_LI$  verbrauchte zunächst in einer 9,4 h andauernden Satzphase die vorgelegten 5 g L<sup>-1</sup> Saccharose. In einer anschließenden Zulaufphase wuchsen die Zellen mit einer Wachstumsrate von 0,15 h<sup>-1</sup>, die durch das exponentielle Zulaufprofil vorgegeben wurde. Nach insgesamt 24 h wurden 17 g L<sup>-1</sup> Biomasse produziert. Durch Reduktion der Rührerdrehzahl von 1130 auf 700 U min<sup>-1</sup> reduzierte sich die Sauerstoffkonzentration im Medium bis unter die Nachweisgrenze der verwendeten Messtechnik und es wurde somit eine Sauerstofflimitation erzwungen. Anders als bei dem in Abbildung 7-15 dargestellten Experiment mit *E. coli*  $\Delta 3 pyc\_Cg$  wurde zu dieser Zeit die Zulauftrate von 27 mL h<sup>-1</sup> (500 g L<sup>-1</sup> Saccharose) aus der exponentiellen Zulaufphase beibehalten, anstatt Substrat als Puls zuzugeben. Der RQ veränderte sich in der 2 h andauernden Übergangsphase von 1 mol<sub>CO2</sub> mol<sub>O2</sub><sup>-1</sup> hin zu 0,8 mol<sub>CO2</sub> mol<sub>O2</sub><sup>-1</sup> (Daten nicht gezeigt). Anschließend erfolgte die anaerobe Produktionsphase mit den in Abbildung 7-23 beschriebenen Substratzugaben und anderen verfahrenstechnischen Bedingungen. Zu Beginn der Produktionsphase konnte bereits 4,9 g L<sup>-1</sup> Pyruvat nachgewiesen werden.

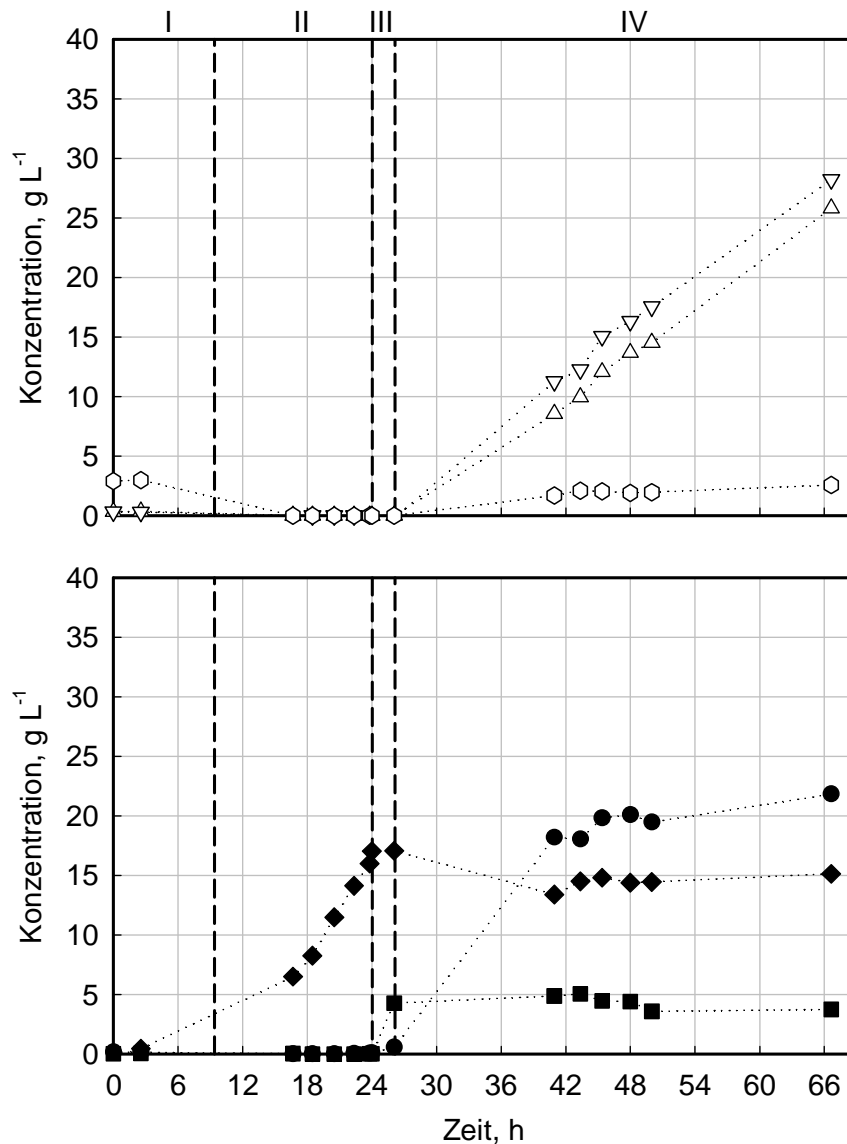


Abbildung 7-23: Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$   $pyc_{LI}$  im Litermaßstab in vier verschiedenen Phasen: Verlauf der Glucose- ( $\Delta$ ), Fructose- ( $\nabla$ ), Saccharose- ( $\circ$ ), Biotrockenmasse- ( $\blacklozenge$ ), Bernsteinsäure- ( $\bullet$ ) und Pyruvatkonzentration ( $\blacksquare$ ). Zunächst wurden die Zellen in einer Satzphase (I) in definiertem Medium mit 0,5 mM IPTG kultiviert. Anschließend vermehrten sich die Zellen mit einer moderaten konstanten Rate mittels eines exponentiellen Zulaufprofils (II). Die Zuckerkonzentrationen waren dabei minimal. In einer kurzen Übergangsphase (III) wurden die Zellen durch Verringerung der Rührerdrehzahl und des Luftvolumenstroms einer Sauerstofflimitation ausgesetzt. Die Zulauftrate für Saccharose aus Phase II wurde in dieser Phase beibehalten. Kurz vor der anaeroben Phase (IV) wurde Saccharose in Form eines Pulses bis zu einer Konzentration von ca. 20 g L<sup>-1</sup> hinzu gegeben. In der anaeroben Phase erfolgte die eigentliche Produktbildung (37 °C, pH 7, 1000 U min<sup>-1</sup>, 0,5 L min<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub>). Zur Vermeidung einer Primärs substratlimitation wurde zudem Saccharose (500 g L<sup>-1</sup>) mit einer Rate von 11,15 mL h<sup>-1</sup> zugeführt.

Tabelle 7-6 zeigt die reaktionstechnischen Daten zu ausgewählten Zeitpunkten der Kultivierung mit *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$   $pyc_{LI}$  im Litermaßstab. Der Verlauf der Bernsteinsäureproduktion ähnelt der Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 3$   $pyc_{Cg}$  (vergleiche Tabelle

7-4). Sich mit der Zeit stark verringernde Produktivitäten und eine mit der Zeit schwächer zunehmende Bernsteinsäurekonzentration bis hin zu  $21,8 \text{ g L}^{-1}$  sind zu beobachten. Die volumetrischen sowie spezifischen Produktivitäten von *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr pyc\_LI}$  und *E. coli*  $\Delta 3 \text{ pyc\_Cg}$  gegen Ende der Prozesse (40,5 h beziehungsweise 43,2 h Produktionsphase) liegen in einer sehr ähnlichen Größenordnung von  $0,52 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  beziehungsweise  $0,47 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  sowie  $0,035 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  beziehungsweise  $0,032 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Auch die Produktausbeuten liegen in einer vergleichbaren Größenordnung um  $0,73\text{-}0,81 \text{ molC molC}^{-1}$ . Durch den Saccharose Zulauf konnte eine Primärsubstratlimitierung vermieden werden. Jedoch kam es nicht zu einer Akkumulation von Saccharose im Verlauf des Prozesses, sondern die Konzentrationen der Spaltprodukte Glucose sowie Fructose stiegen an.

Tabelle 7-6: Bernsteinsäurekonzentration  $c_{\text{Suc}}$ , anwendungsbezogene integrale volumetrische Produktivität  $Q_P^*$ , integrale spezifische Produktivität  $q_p^*$ , sowie integrale Ausbeute  $Y_{\text{P(Suc)}/\text{S(Scr,Glc,Frc)}}^*$  zu ausgewählten Zeitpunkten nach Beginn der Produktionsphase der Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr pyc\_LI}$  im Litermaßstab (vergleiche Abbildung 7-23).

	14,8 h	23,8 h	40,5 h
$c_{\text{Suc}}, \text{ g L}^{-1}$	18,2	19,5	21,8
$Q_P^*, \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	1,19	0,79	0,52
$q_p^*, \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$	0,089	0,055	0,035
$Y_{\text{P(Suc)}/\text{S(Scr,Glc,Frc)}}^*, \text{ molC molC}^{-1}$	0,73	0,72	0,73

In Abbildung 7-24 ist eine Kultivierung des Stammes *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr maeB}$  mit dem in Kapitel 7.1.4 etablierten Verfahren dargestellt. Der Organismus hat in einer 8,7 h andauernden Satzphase die  $5 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose verbraucht. In der anschließenden Zulaufphase erfolgte wie geplant das Wachstum unter substratlimitierten Bedingungen mit einer konstanten Wachstumsrate. Nach 24,1 h wurde  $18 \text{ g L}^{-1}$  Biomasse produziert. Durch Reduktion der Rührerdrehzahl von  $1180$  auf  $700 \text{ U min}^{-1}$  reduzierte sich die Sauerstoffkonzentration im Medium bis unter die Nachweisgrenze der verwendeten Messtechnik und es wurde somit eine Sauerstofflimitation erzwungen. Der RQ veränderte sich in der 2 h andauernden Übergangsphase von  $1 \text{ mol}_{\text{CO}_2} \text{ mol}_{\text{O}_2}^{-1}$  hin zu  $0,7 \text{ mol}_{\text{CO}_2} \text{ mol}_{\text{O}_2}^{-1}$ . Während der Übergangsphase wurde die Zulauftrate von  $30 \text{ mL h}^{-1}$  ( $500 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose) aus der exponentiellen Zulaufphase beibehalten. Anschließend erfolgte die anaerobe Produktionsphase mit den in Abbildung 7-24 beschriebenen Substratzugaben und verfahrenstechnischen Bedingungen. Vergleichbar zu dem in Abbildung 7-23 Experiment konnte zu Beginn der Produktionsphase bereits  $4,4 \text{ g L}^{-1}$  Pyruvat nachgewiesen werden.

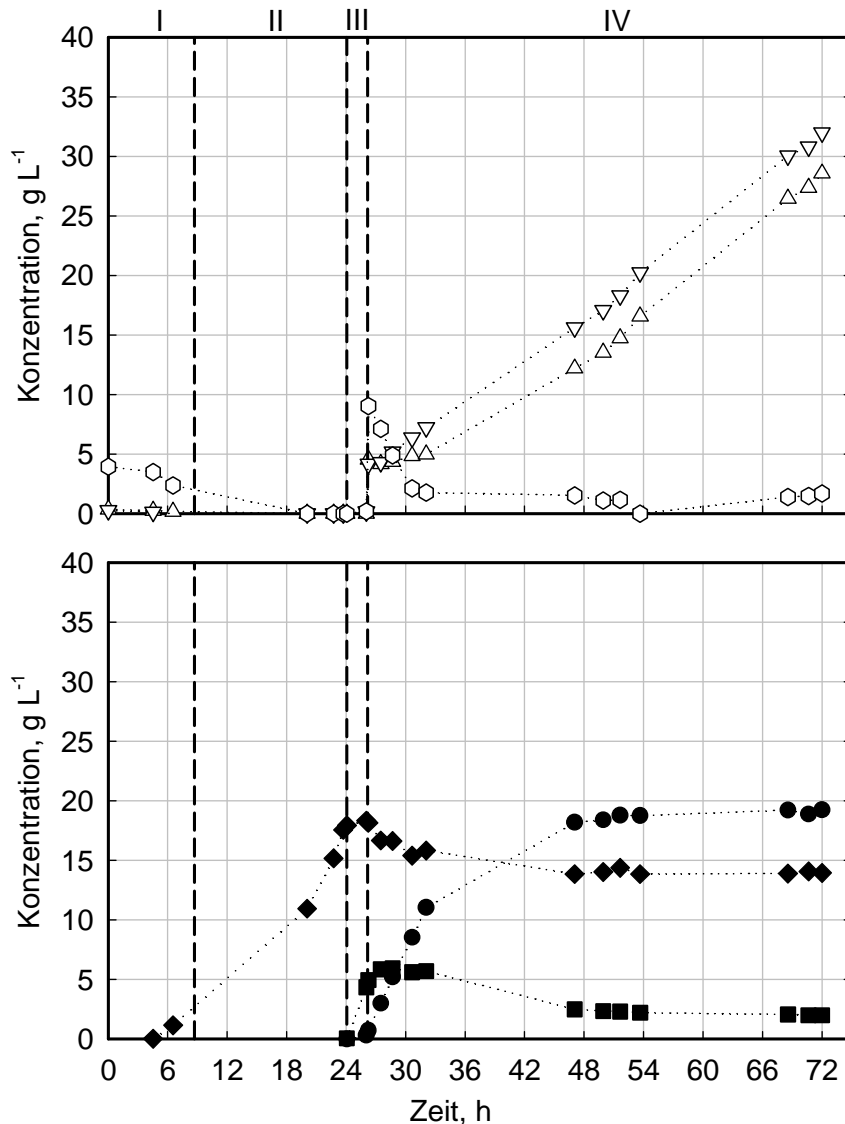


Abbildung 7-24: Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 4 \Delta ptsG::scr maeB$  im Litermaßstab in vier verschiedenen Phasen: Verlauf der Glucose- ( $\Delta$ ), Fructose- ( $\nabla$ ), Saccharose- ( $\circ$ ), Biotrockenmasse- ( $\blacklozenge$ ), Bernsteinsäure- ( $\bullet$ ) und Pyruvatkonzentration ( $\blacksquare$ ). Zunächst wurden die Zellen in einer Satzphase (I) in definiertem Medium mit 0,5 mM IPTG kultiviert. Anschließend vermehrten sich die Zellen mit einer moderaten konstanten Rate mittels eines exponentiellen Zulaufprofils (II). Die Zuckerkonzentrationen waren dabei limitierend. In einer kurzen Übergangsphase (III) wurden die Zellen durch Verringerung der Rührerdrehzahl und des Luftvolumenstroms einer Sauerstofflimitation ausgesetzt. Die Zulaufrate für Saccharose aus Phase II wurde in dieser Phase beibehalten. Kurz vor der anaeroben Phase (IV) wurde Saccharose in Form eines Pulses bis zu einer Konzentration von ca. 20 g L<sup>-1</sup> hinzu gegeben. In der anaeroben Phase erfolgte die eigentliche Produktbildung (37 °C, pH 7, 1000 U min<sup>-1</sup>, 0,5 L min<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub>). Zur Vermeidung einer Primärsubstratlimitation wurde zudem Saccharose (500 g L<sup>-1</sup>) mit einer Rate von 9,6 mL h<sup>-1</sup> zugeführt.

In Tabelle 7-7 sind die reaktionstechnischen Daten zu ausgewählten Zeitpunkten der Kultivierung mit *E. coli*  $\Delta 4 \Delta ptsG::scr maeB$  im Litermaßstab dargestellt. Der Verlauf der

Bernsteinsäureproduktion ähnelt den zuvor diskutierten Kultivierungen von *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg (vergleiche Tabelle 7-4) sowie *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  pyc\_LI (vergleiche Tabelle 7-6). Im Vergleich zu den anderen beiden Kultivierungen waren die Bernsteinsäurekonzentration mit  $19,2 \text{ g L}^{-1}$  sowie die volumetrische und spezifische Produktivität mit  $0,41 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  beziehungsweise  $0,03 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  nur minimal geringer. Die Produktausbeute am Ende des Prozesses lag mit  $0,86 \text{ molC molC}^{-1}$  ebenfalls in einer mit den bereits diskutierten Kultivierungen vergleichbaren Größenordnung.

Tabelle 7-7: Bernsteinsäurekonzentration  $c_{\text{Suc}}$ , anwendungsbezogene integrale volumetrische Produktivität  $Q_P^*$ , integrale spezifische Produktivität  $q_p^*$ , sowie integrale Ausbeute  $Y_{P(\text{Suc})/S(\text{Scr},\text{Glc},\text{Frc})}^*$  zu ausgewählten Zeitpunkten nach Beginn der Produktionsphase der Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  maeB im Litermaßstab (vergleiche Abbildung 7-24).

	6 h	23,9 h	46 h
$c_{\text{Suc}}, \text{ g L}^{-1}$	11	18,4	19,2
$Q_P^*, \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	1,78	0,76	0,41
$q_p^*, \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$	0,113	0,054	0,03
$Y_{P(\text{Suc})/S(\text{Scr},\text{Glc},\text{Frc})}^*, \text{ molC molC}^{-1}$	0,74	0,79	0,86

Vergleichbar mit dem Ergebnis aus Abbildung 7-23 stiegen auch bei der Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  maeB die Konzentrationen der beiden Zucker Glucose sowie Fructose im Verlauf der Produktionsphase stark an. Durch eine höhere Anzahl an Probenahmen kurz nach Beginn der Produktionsphase in diesem Experiment lassen sich Schlüsse in Bezug auf das Abbauverhalten von Saccharose ziehen. Bereits 0,2 h nach Beginn der Produktionsphase war eine Mischung der Zucker Saccharose ( $9 \text{ g L}^{-1}$ ), Glucose ( $4,5 \text{ g L}^{-1}$ ) sowie Fructose ( $4,1 \text{ g L}^{-1}$ ) zu beobachten. Die Summe der Zuckerkonzentrationen liegt nahe der Größenordnung der kurz zuvor zugegebenen Saccharose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) in Form eines Pulses. Aufgrund der thermischen Sterilisation liegt diese bereits teilweise in gespaltener Form vor. Jedoch konnte im weiteren Verlauf der Produktionsphase ein sehr schneller Saccharoseabbau beobachtet werden und nach 6 h wurden nur noch  $1,8 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose gemessen. Nur ein Teil der Saccharose wurde dabei zu organischen Säuren umgewandelt. Ein anderer Teil konnte wie beschrieben in Form von Glucose und Fructose im Medium nachgewiesen werden.

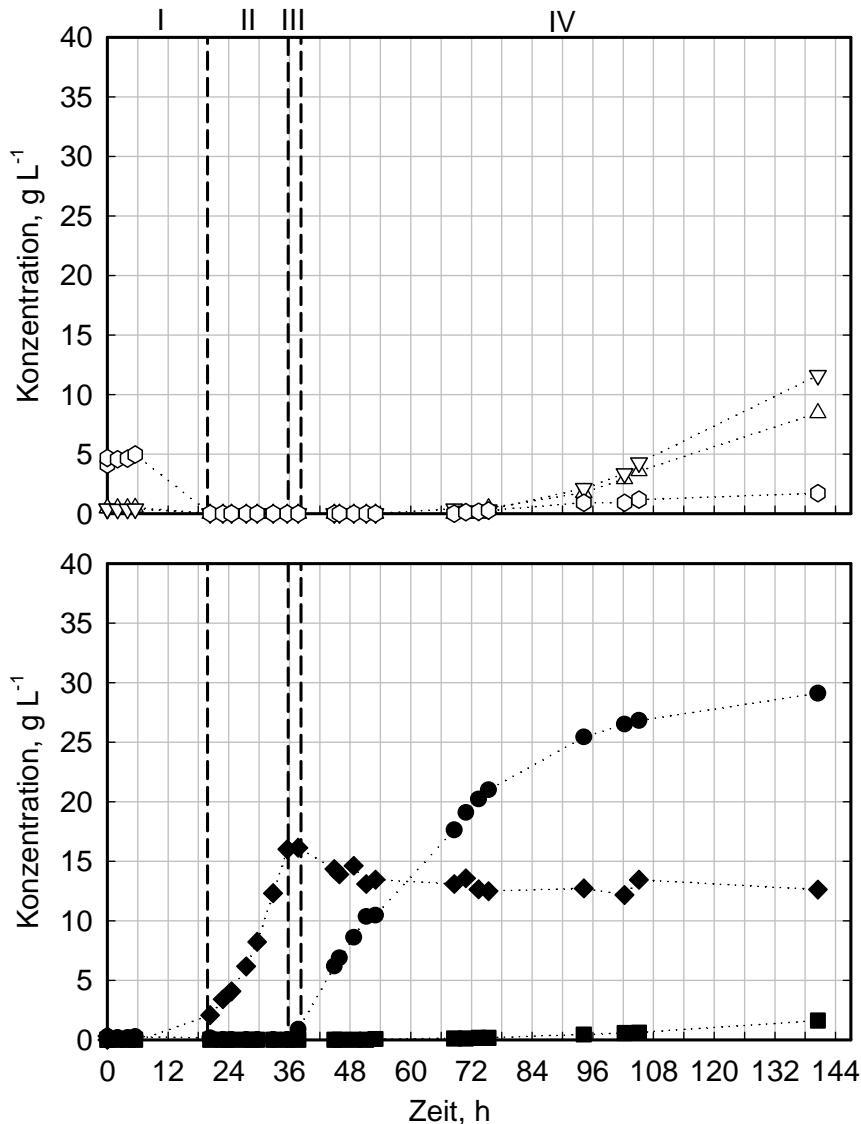


Abbildung 7-25: Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  *pyc\_Cg* im Litermaßstab in vier verschiedenen Phasen: Verlauf der Glucose- ( $\Delta$ ), Fructose- ( $\nabla$ ), Saccharose- ( $\circ$ ), Biotrockenmasse- ( $\blacklozenge$ ), Bernsteinsäure- ( $\bullet$ ) und Pyruvatkonzentration ( $\blacksquare$ ). Zunächst wurden die Zellen in einer Satzphase (I) in definiertem Medium mit 0,5 mM IPTG kultiviert. Anschließend vermehrten sich die Zellen mit einer moderaten konstanten Rate mittels eines exponentiellen Zulaufprofils (II). Die Zuckerkonzentrationen waren dabei minimal. In einer kurzen Übergangsphase (III) wurden die Zellen durch Verringerung der Rührerdrehzahl und des Luftvolumenstroms einer Sauerstofflimitation ausgesetzt. Die Zulauftrate für Saccharose ( $500 \text{ g L}^{-1}$ ) wurde ab diesem Zeitpunkt auf eine Rate von  $3,5 \text{ mL h}^{-1}$  reduziert und bis zum Ende des Versuches beibehalten. In der anaeroben Phase (IV) erfolgte die eigentliche Produktbildung ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 7,  $1000 \text{ U min}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ L min}^{-1} \text{ CO}_2$ ).

Abbildung 7-25 zeigt eine weitere Kultivierung mit dem in Kapitel 7.1.4 etablierten Verfahren im Litermaßstab mit dem Stamm *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  *pyc\_Cg*. Nach einer ungewöhnlich langen Verzögerungsphase wurden die vorgelegten  $5 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose nach 19,8 h aufgebraucht. Die anschließende Zulaufphase erfolgte wie geplant mit einer Wachstumsrate, die durch das exponentielle Zulaufprofil vorgegeben wurde. Nach insgesamt 37,8 h wurde



16 g L<sup>-1</sup> Biomasse produziert. Durch Reduktion der Rührerdrehzahl reduzierte sich anschließend die Sauerstoffkonzentration im Medium bis unter die Nachweisgrenze der verwendeten Messtechnik und es wurde somit eine Sauerstofflimitation erzwungen. In diesem Experiment wurde gegenüber den bisher gezeigten Versuchen (vergleiche Abbildung 7-15, Abbildung 7-23 und Abbildung 7-24) erneut eine verfahrenstechnische Änderung vorgenommen: Die Zulauftrate für Saccharose (500 g L<sup>-1</sup>) wurde ab Beginn der Übergangsphase auf eine limitierende Rate von 3,5 mL h<sup>-1</sup> reduziert und bis zum Ende des Versuches beibehalten. Nach der 2 h andauernden Übergangsphase erfolgte die anaerobe Produktionsphase mit den in Abbildung 7-25 beschriebenen verfahrenstechnischen Bedingungen.

Tabelle 7-8: Bernsteinsäurekonzentration  $c_{\text{SUC}}$ , anwendungsbezogene integrale volumetrische Produktivität  $Q_P^*$ , integrale spezifische Produktivität  $q_p^*$ , sowie integrale Ausbeute  $Y_{\text{P(Suc)}/\text{S(Scr,Glc,Frc)}}^*$  zu ausgewählten Zeitpunkten nach Beginn der Produktionsphase der Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr pyc\_Cg}$  im Litermaßstab (vergleiche Abbildung 7-25).

	8,2 h	15,3 h	30,9 h	64,5 h	102,7 h
$c_{\text{SUC}}, \text{g L}^{-1}$	6,9	10,4	17,6	26,5	29,1
$Q_P^*, \text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$	0,74	0,63	0,54	0,4	0,27
$q_p^*, \text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$	0,054	0,047	0,042	0,033	0,022
$Y_{\text{P(Suc)}/\text{S(Scr,Glc,Frc)}}^*, \text{molC molC}^{-1}$	0,96	0,85	0,79	0,78	0,75

Die abweichende Strategie der Substratzugabe bereits zu Beginn der Übergangsphase hatte zur Folge, dass zunächst keine extrazelluläre Akkumulation von Pyruvat zu beobachten war. Dadurch wurden zu Beginn der Produktionsphase sehr hohe Produktausbeuten bis zu 0,96 molC molC<sup>-1</sup> erreicht, wie aus Tabelle 7-8 zu sehen ist. Zudem hatte die niedrig eingestellte Substratzugabe zur Folge, dass zu Beginn keine Saccharose sowie Glucose und Fructose im Medium festzustellen war. Andererseits ist aus Tabelle 7-8 ersichtlich, dass sich die Produktivitäten wie in den vorherigen Versuchen mit der Zeit verringern. Zudem lässt sich im weiteren Verlauf der Produktionsphase eine Akkumulation von Pyruvat, Saccharose, Glucose und Fructose beobachten. Auch die integrale Produktausbeute verringerte sich und lag am Ende des Prozesses in einer Größenordnung, die mit den bisherigen Experimenten vergleichbar ist. Nach 102,7 h Produktionsphase konnte 29,1 g L<sup>-1</sup> Bernsteinsäure produziert werden und es wurde nur 1,6 g L<sup>-1</sup> Pyruvat gebildet.

Tabelle 7-9 stellt zusammenfassend die Endkonzentrationen aller analysierten Produkte der anaeroben Kultivierungen im Litermaßstab gegenüber. Während der Kultivierung der Stämme *E. coli*  $\Delta 3 \text{ pyc\_Cg}$ , *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr pyc\_LI}$  sowie *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr maeB}$  wurden vergleichbare Produkt- und Nebenproduktkonzentrationen erreicht. Lediglich die Konzentra-

tion von Acetat und Pyruvat war bei der Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  maeB deutlich geringer. Bei der Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  pyc\_Cg, die unter signifikant anderen Prozessbedingungen erfolgte, wurden höhere Produkt- und geringere Nebenproduktkonzentrationen erzeugt.

Tabelle 7-9: Endkonzentrationen aller analysierten Produkte der anaeroben Kultivierungen im Litermaßstab (vergleiche Abbildung 7-15, Abbildung 7-23, Abbildung 7-24 und Abbildung 7-25).

Stamm	Bernsteinsäure, g L <sup>-1</sup>	Lactat, g L <sup>-1</sup>	Formiat, g L <sup>-1</sup>	Acetat, g L <sup>-1</sup>	Ethanol, g L <sup>-1</sup>	Pyruvat, g L <sup>-1</sup>
$\Delta 3$ pyc_Cg	21	0,9	4,4	1,7	0,3	4,8
$\Delta 4\Delta ptsG::scr$ pyc_LI	21,8	0,7	4,1	1,8	0,3	3,7
$\Delta 4\Delta ptsG::scr$ maeB	19,2	0,6	4,7	0	0	2
$\Delta 4\Delta ptsG::scr$ pyc_Cg <sup>a</sup>	29,1	0	2,8	1,2	0	1,6

a) Die Kultivierung in der anaeroben Phase erfolgte unter substratlimitierten Bedingungen

## Diskussion

Verglichen zu *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg (vergleiche Abbildung 7-15) wurde bei der Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  pyc\_LI im Litermaßstab (vergleiche Abbildung 7-23) deutlich weniger Pyruvat während der Übergangsphase produziert, was wahrscheinlich mit dem unterschiedlichen Verfahren der Substratzugabe während dieser Phase zusammenhängt. Im Falle von *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg wurde bereits während der Übergangsphase Substrat in Form eines Pulses zugegeben, was zu zeitweise höheren Substratkonzentrationen führte und vermutlich die Pyruvatakkumulation begünstigte. Aus den vergleichbaren reaktionstechnischen Eigenschaften beider Stämme während der Produktbildungsphase kann geschlossen werden, dass die Überexpression der alternativen Pyruvatcarboxylase aus *Lactococcus lactis* sowie die gentechnischen Veränderungen zur Verwertung des alternativen Substrates Saccharose keine nachteiligen Wirkungen zeigen. Dieser Schluss konnte bereits aus den vorangehenden Kultivierungen in Milliliter Rührkesselreaktoren gezogen werden (vergleiche Kapitel 7.2.3).

Die reaktionstechnischen Daten von *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  maeB im Litermaßstab (vergleiche Abbildung 7-24) entsprechen auf dem ersten Blick nicht den Erwartungen, da sich dieser Stamm im Vergleich zu *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  pyc\_LI als deutlich unterlegen in Milliliter Rührkesselreaktoren herausgestellt hatte (vergleiche Kapitel 7.2.3). Jedoch lässt sich annehmen, dass bei dem im Litermaßstab entwickelten Prozess zum Teil andere Einflussgrößen die Bernsteinsäureproduktion bestimmen als im hier angewandten Prozess in Milliliter Rührkes-

selreaktoren. Im Litermaßstab wurde ein definiertes Medium verwendet. Der gesamte Prozess (Biomassebildung und Produktion) wurde untersucht und der physiologische Zustand der Zellen wurde in einer Übergangsphase unter Sauerstofflimitation kontrolliert vor der Produktionsphase verändert. Zudem erfolgte die Produktbildung bei vergleichbar hohen Zelldichten um  $16 - 20 \text{ g L}^{-1}$ . Im Millilitermaßstab erfolgte die Produktbildung in einem komplexen Medium mit Zelldichten zwischen  $3 - 5 \text{ g L}^{-1}$ . Die Biomassebildung erfolgte in Schüttelkolben, in denen die Prozesskontrolle gewisse Grenzen hat und der physiologische Zustand der Zellen bei Ernte wurde nur indirekt und weniger kontrolliert durch die Variation der Kultivierungszeit bzw. Menge des Inokulums beeinflusst. Die Kultivierung in Milliliter-Rührkesselreaktoren hatte zum Ziel, eine Vielzahl an Stämmen unter zwar kontrollierten, aber doch einfach gehaltenen Bedingungen zu vergleichen. Die verfolgte Strategie der Stammuntersuchung in Milliliter-Rührkesselreaktoren und der Prozesscharakterisierung im Litermaßstab hatte somit keine direkte Übertragbarkeit zum Ziel. Vielmehr konnte die Auswahl der Stämme für eine Charakterisierung im Litermaßstab mit den vorangehenden Kultivierungen im Millilitermaßstab erfolgreich auf einige vielversprechende Kandidaten reduziert werden.

Die in Abbildung 7-23 und Abbildung 7-24 gezeigte Akkumulation der Zucker Glucose und Fructose während der Produktbildungsphase war ein zunächst überraschendes Ergebnis, da angenommen wird, dass *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr}$  durch die stabile Integration des *scr* Operons Saccharose mittels eines spezifischen PTS aufnimmt und gleichzeitig zu Saccharose-6-phosphat umwandelt mit anschließender Hydrolyse zu Fructose und Glucose-6-phosphat (Schmid *et al.* 1982; Wang *et al.* 2001).

Da die stabile Integration dieses Operons ohne Repressor erfolgte und in dieser Form noch nicht charakterisiert ist, können wenig Aussagen über die Regulierung der Saccharoseaufnahme in *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr}$  getroffen werden. Es kann spekuliert werden, dass Saccharose unregelt mit einer hohen Rate aufgenommen wird und aufgrund hoher intrazellulärer Konzentrationen von Glucose-6-phosphat und Fructose eine Dephosphorylierung von Glucose-6-phosphat sowie ein Export der beiden Zucker erfolgt. Es gibt Hinweise, dass *E. coli* Glucose und andere Zucker unter bestimmten Bedingungen exportiert, insbesondere wenn Intermediate wie Glucosephosphate in höheren intrazellulären Konzentrationen vorliegen (Huber und Hurlburt 1984; Liu *et al.* 1999; Sun und Vanderpool 2011). Denkbar ist auch, dass die Saccharose bereits extrazellulär gespalten wird, wie für ein anderes System in (Lee *et al.* 2010) beschrieben. Daher wurde der Saccharoseabbau mit *E. coli*  $\Delta 4\Delta\text{ptsG}::\text{scr}$  methodisch analog zu (Lee *et al.* 2010) untersucht. Die Zellen für den Versuch wurden wie in Kapitel 4.4.2 beschrieben in Schüttelkolben hergestellt. Es konnte zunächst kein extrazellulärer Saccharoseabbau beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). In den Experimenten im Litermaßstab wurde jedoch festgestellt, dass die Überstände der Proben insbesondere zu

Beginn der Produktionsphase schwierig zu filtern sind, was darauf hindeutet, dass ein Teil der Zellen lysiert vorliegen. Da Saccharose-6-phosphat Hydrolase kodiert durch *scrB* auch die Hydrolyse von Saccharose katalysiert (Schmid *et al.* 1982), könnte es sein, dass unter den speziellen Bedingungen im Litermaßstab Saccharose-6-phosphat Hydrolase zu einem Teil auch extrazellulär vorliegt und somit auch ein Saccharoseabbau stattfindet.

In der in Abbildung 7-25 dargestellten Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  *pyc\_Cg* wurde die höchste Bernsteinsäurekonzentration im Litermaßstab erreicht. Jedoch handelte es sich in diesem Experiment auch um die mit Abstand längste Kultivierungszeit. Aufgrund der substratlimitierten Bedingungen in der Produktbildungsphase war zudem erwartungsgemäß die maximale volumetrische Produktivität vergleichbar gering. Da im späteren Verlauf immer noch eine deutliche Steigerung der Produktkonzentration zu beobachten war, lässt sich vermuten, dass ein gering eingestellter Zulauf einen positiven Effekt auf die Bernsteinsäureproduktion haben kann, da auch die Akkumulation von Nebenprodukten in fast allen Fällen reduziert wurde (vergleiche Tabelle 7-9).

Es lässt sich schlussfolgern, dass nach erster Betrachtung sowohl *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  *pyc\_Cg* als auch *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  *pyc\_LI* sowie *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  *maeB* trotz leichter Variation der verfahrenstechnischen Bedingungen ähnliche reaktionstechnische Eigenschaften in Bezug auf die Bernsteinsäureproduktion unter den untersuchten experimentellen Bedingungen aufweisen. Sofern die Prozessvariablen identifiziert werden können, welche eine Steigerung der Produktkonzentration über  $30 \text{ g L}^{-1}$  hinaus im Litermaßstab verhindern, könnten Stämme mit der Überexpression der Pyruvatcarboxylasen möglicherweise noch bessere reaktionstechnische Eigenschaften aufweisen als der Mikroorganismus mit einer Überexpression von MaeB, da unter anderen untersuchten Bedingungen in Milliliter Rührkesselreaktoren *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  *maeB* schlechter im Vergleich zu *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  *pyc\_Cg* sowie *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  *pyc\_LI* abschnitt. Anhand des in Abbildung 7-25 dargestellten Ergebnisses lässt sich vermuten, dass für eine weitere Prozessoptimierung im Litermaßstab die Konzentration des Substrats sowie die Art und Weise der Substratzugabe während der verschiedenen Kultivierungsphasen eine wesentliche Rolle spielen könnte.

## 8 Zusammenfassung und Ausblick

Methylmethacrylat stellt ein bedeutendes Zwischenprodukt der chemischen Industrie mit einer tendenziell steigenden Nachfrage dar und wird insbesondere für die Produktion von Polymethylmethacrylat (Plexiglas) verwendet. Derzeit kommen eine Reihe verschiedener industrieller Verfahren zum Einsatz, bei denen für die Produktion von Methylmethacrylat stets fossile Ressourcen als Ausgangstoffe eingesetzt werden. Prinzipiell ist jedoch auch eine Produktion von Methylmethacrylat auf Basis nachwachsender Rohstoffe unter Verwendung biokatalytischer Verfahren in ganzen Zellen möglich. Zwei unterschiedliche mikrobielle Ansätze sollten im Rahmen dieser Arbeit reaktionstechnisch untersucht werden. Die in Betracht gezogenen Substrate, verwendeten Biokatalysatoren sowie die wichtigsten Intermediate im Metabolismus und chemischen Zwischenprodukte sind in Abbildung 8-1 abstrahiert dargestellt.

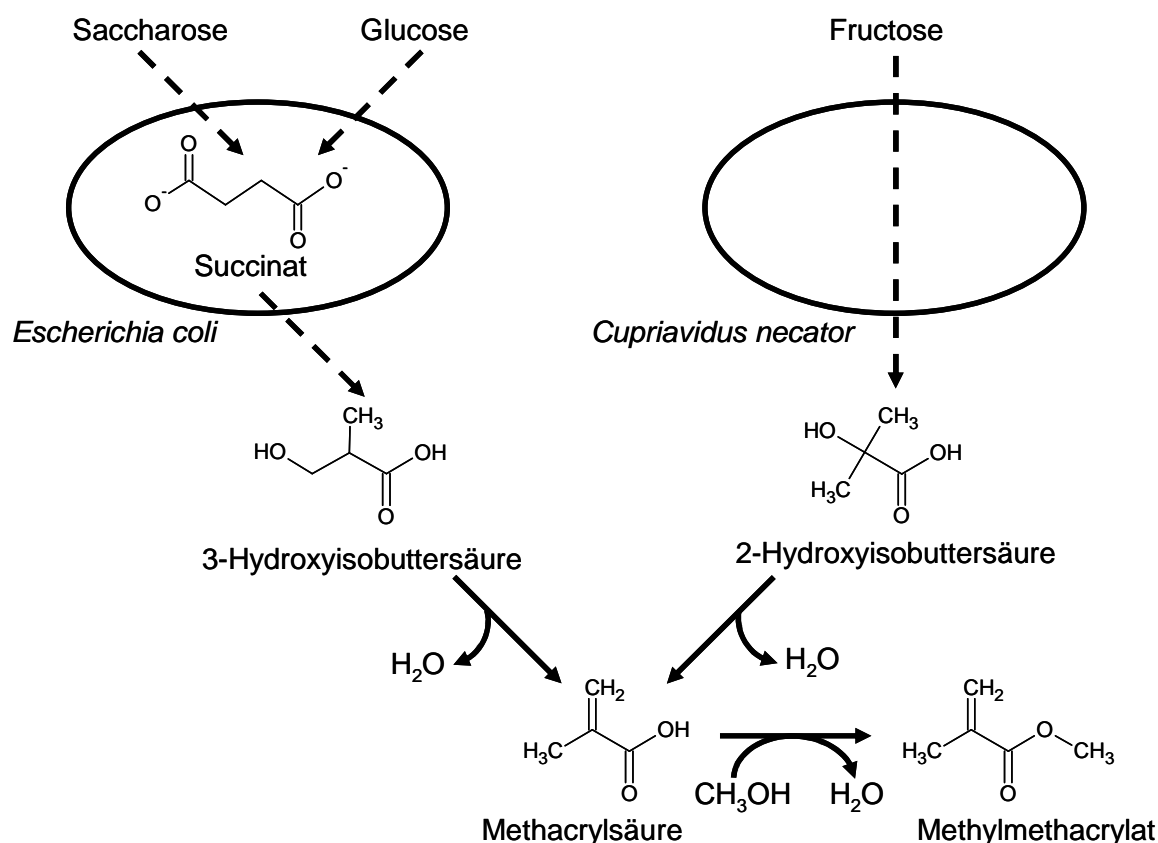


Abbildung 8-1: Methylmethacrylat wird derzeit in unterschiedlichen Verfahren mittels chemischer Synthesen auf Basis fossiler Ressourcen hergestellt, häufig über das Zwischenprodukt Methacrylsäure. Prinzipiell ist auch die Verwendung von Hydroxyisobuttersäuren für die chemische Synthese von Methacrylsäure möglich. Die kosteneffiziente und nachhaltige Bereitstellung von Hydroxyisobuttersäuren könnte über biokatalytische Verfahren (gestrichelte Pfeile) in ganzen Zellen auf Basis von nachwachsenden Rohstoffen wie zum Beispiel Zuckern erfolgen.

## Reaktionstechnische Charakterisierung von *Cupriavidus necator* zur Produktion von 2-Hydroxyisobuttersäure

Eine Möglichkeit ist die Herstellung von 2-Hydroxyisobuttersäure mit gentechnisch veränderten *Cupriavidus necator* unter Nutzung des Stoffwechsels zur Produktion von Polyhydroxybuttersäure (PHB), bei der Stämme zur Anwendung kommen, die aufgrund einer inaktiven PHB-Synthase nicht zur Akkumulation des Biopolymers in der Lage sind. Der Vorläufermetabolit von PHB kann unter Verwendung einer rekombinanten Mutase zu 2-Hydroxyisobutyryl-CoA umgewandelt und schließlich 2-Hydroxyisobuttersäure durch Hydrolyse gebildet werden (Reinecke *et al.* 2009; Rohwerder und Müller 2010).

Hierzu wurde die Produktion von 2-Hydroxyisobuttersäure mit entsprechend gentechnisch veränderten *Cupriavidus necator* H16 unter Zuhilfenahme von 48 parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab ( $V = 11 \text{ mL}$ ) reaktionstechnisch charakterisiert. Verschiedene Prozessvariablen wie Medienzusammensetzungen, Nährstofflimitationen, Zulaufzeiten des Kohlenstoffs und pH wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf die Prozessleistung verschiedener rekombinanter Stämme untersucht. Dabei konnte eine maximale Produktkonzentration von  $7,4 \text{ g L}^{-1}$  nach 48 h erzielt werden.

Am Beispiel von Abbildung 8-2 wird deutlich, dass für eine Produktbildung mit Konzentrationen deutlich über  $1 \text{ g L}^{-1}$  eine geeignete Kombination wichtiger Prozessvariablen nötig ist.

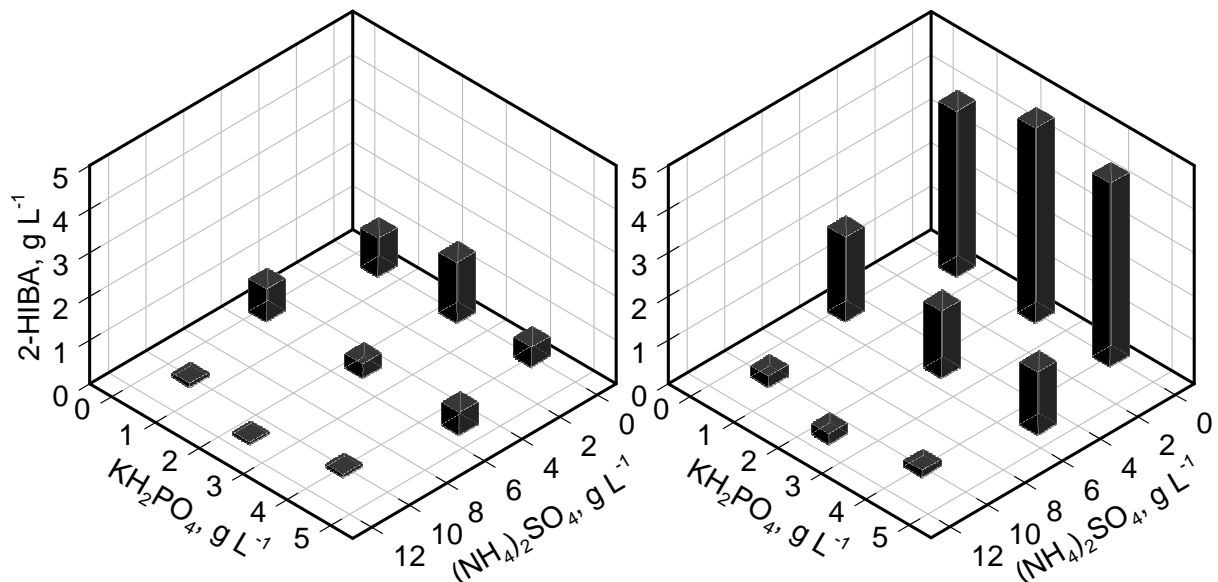


Abbildung 8-2: 2-Hydroxyisobuttersäure Konzentration im Überstand nach 48 h Kultivierung von *Cupriavidus necator* H16  $\Delta phaC1$  pBBR1MCS-2::HCM (links) und *Cupriavidus necator* H16 PHB-4 pBBR1MCS-2::HCM (rechts) in Milliliter Rührkesselreaktoren abhängig von verschiedenen Konzentrationen der Salze  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sowie  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  im Medium.

Zum einen war die Wahl eines geeigneten Wirtsorganismus offensichtlich von großer Bedeutung sowie die Art und Weise, wie der Expressionsvektor konstruiert wurde. Zum anderen hatten Kultivierungsbedingungen wie die Einstellung der Stickstofflimitation einen großen Einfluss auf die Produktbildung. Nur durch die richtige Kombination der Prozessvariablen konnte eine gute 2-Hydroxyisobuttersäure Bildung erzielt werden.

Die in Milliliter Rührkesselreaktoren gewonnenen Erkenntnisse konnten erfolgreich in einen Prozess im Laborrührkesselreaktor ( $V = 2 \text{ L}$ ) übertragen werden. Zwei Prozessvarianten, ein zweistufiger sowie ein einstufiger Prozess, wurden miteinander verglichen. Im zweistufigen Prozess konnte nach 48 h Kultivierung eine 2-Hydroxyisobuttersäure Konzentration von  $6,4 \text{ g L}^{-1}$  erreicht werden. Vor- und Nachteile der beiden Prozessvarianten wurden erörtert. Es wurde zudem beobachtet, dass noch nicht identifizierte Medienkomponenten aus den komplexen Medienbestandteilen einen positiven Einfluss auf die Produktbildung besitzen.

2-Hydroxyisobuttersäure konnte damit erstmals durch einen biotechnologischen Prozess ausgehend von Fructose mit Produktkonzentrationen von bis zu  $7,4 \text{ g L}^{-1}$  erzeugt werden.

### **Reaktionstechnische Charakterisierung von *Escherichia coli* zur Produktion von Bernsteinsäure als Vorläufermetabolit von 3-Hydroxyisobuttersäure**

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit war die reaktionstechnische Analyse von *Escherichia coli* (*E. coli*) zur Produktion von Bernsteinsäure, das als Vorläufermetabolit für die Erzeugung von 3-Hydroxyisobuttersäure dienen kann (Marx *et al.* 2007; Burk *et al.* 2009).

Es konnte gezeigt werden, dass mit einer maximalen geschätzten *in silico* Ausbeute von  $0,89 \text{ molC molC}^{-1}$  (Substrat: Glucose oder Saccharose) die Produktion von 3-Hydroxyisobuttersäure mit gentechnisch veränderten *E. coli* eine möglicherweise vorteilhafte Alternative gegenüber dem Prozess zur Produktion von 2-Hydroxyisobuttersäure mit *Cupriavidus necator* darstellt. Mit *Cupriavidus necator* ist aufgrund des Verlustes von  $\text{CO}_2$  bei der Produktbildung nur eine maximale Ausbeute von  $0,66 \text{ molC molC}^{-1}$  (Substrat: Fructose) möglich.

Zunächst wurde die Bernsteinsäurebildung des Glucose verwertenden Stammes *E. coli* K-12 MG1655  $\Delta ldhA \Delta adhE \Delta ack-pta$  pEC-XC99E::pyc\_Cg (*E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg) mit Inaktivierungen von Stoffwechselwegen zur Produktion der Nebenprodukte Lactat, Ethanol und Acetat sowie der Überexpression einer Pyruvatcarboxylase aus *Corynebacterium glutamicum* zur Förderung des Flusses in Richtung des reduktiven Citratzyklus reaktionstechnisch charakterisiert. Hierzu erfolgte die Kultivierung von *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg unter anaeroben Bedingungen in Milliliter Rührkesselreaktoren ( $V = 10 \text{ mL}$ ) durch Begasung des Kopfraumes mit  $\text{CO}_2$  zur Untersuchung der Produktbildungsphase. Produkt- und Nebenproduktbildung sowie die Pro-

zessvariablen Biomassekonzentration, Art und Weise der Biomasseherstellung, pH und Substratwahl wurden untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Produktbildung in der anaeroben Phase in Milliliter Rührkesselreaktoren eine Abhängigkeit von Variationen in der zuvor durchgeführten Biomassebildung in Schüttelkolben aufweist. Ein geregelter pH von 6,8 stellte sich als vorteilhaft für die Bernsteinsäurebildung sowohl hinsichtlich maximal erreichbarer Konzentration als auch spezifischer Produktivität sowie Ausbeute heraus. Die Untersuchung verschiedener Substrate für die Biomassebildung sowie Produktbildung ergab, dass die Verwendung von Glucose sowohl für die Biomassebildungsphase als auch die Bernsteinsäureproduktion gegenüber den anderen untersuchten Substraten zu bevorzugen ist. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die Umsetzung von Fructose zu Bernsteinsäure nur unwesentlich weniger effektiv im Vergleich zu Glucose ist. Dieses Resultat motiviert dazu, die Aufnahme und Verwertung von Saccharose als Substrat für die Bernsteinsäureproduktion in rekombinanten *E. coli* zu ermöglichen. Die Verwendung von den Intermediaten der Bernsteinsäuresynthese Malat und Pyruvat als Substrate in der Biomassebildungsphase resultierte in einer vergleichbar hohen Ausbeute in der anschließenden Produktionsphase. Dieser Aspekt ist ein weiteres Beispiel dafür, wie die Variation von Prozessvariablen in der Biomassebildungsphase eine Verbesserung der Bernsteinsäurebildung in der Produktbildungsphase zur Folge haben kann.

Es wurde im Folgenden ein Kultivierungsverfahren für die Bernsteinsäureproduktion mit *E. coli*  $\Delta 3$  *pyc\_Cg* im 2 L Rührkesselreaktor weiterentwickelt. Unter Verwendung eines definierten Mediums wurden die Zellen zunächst in einer Satzphase (I) und anschließend mittels eines exponentiellen Zulaufprofils (II) kultiviert. In einer kurzen Übergangsphase (III) wurden die Zellen durch die Reduzierung der Rührerdrehzahl einer Sauerstofflimitation ausgesetzt und in einer anaeroben Phase (IV) erfolgte die eigentliche Produktbildung unter  $\text{CO}_2$  Begasung. Nach 43,3 h Produktionsphase konnten  $21 \text{ g L}^{-1}$  Bernsteinsäure mit einer Ausbeute von  $0,8 \text{ molC molC}^{-1}$  produziert und zu Beginn des Prozesses maximale Produktivitäten von bis zu  $1,76 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  sowie  $0,097 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erreicht werden. Bei Erreichen höherer Produktkonzentrationen verringerte sich jedoch die Produktivität. Es wurde festgestellt, dass der physiologische Zustand der verwendeten *E. coli* durch die Sauerstofflimitation kurz vor der Produktionsphase vorteilhaft in Bezug auf die nachfolgende Bernsteinsäureproduktion verändert werden kann. Die Auswirkung der Sauerstofflimitation wurde mit Hilfe des respiratorischen Quotienten (RQ) indirekt quantifiziert. Die Rührerdrehzahl und der damit zusammenhängende Sauerstofftransfer wurden in der Übergangsphase derart reduziert, dass sich der RQ von ursprünglich  $1 \text{ mol}_{\text{CO}_2} \text{ mol}_{\text{O}_2}^{-1}$  auf vorzugsweise  $0,6 - 0,8 \text{ mol}_{\text{CO}_2} \text{ mol}_{\text{O}_2}^{-1}$  verringerte.



Auf Basis der mit *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg gewonnenen Erkenntnisse erfolgte die reaktionstechnische Charakterisierung neuer Stämme zur Bernsteinsäureproduktion, die das Substrat Saccharose verwerten können. Die Saccharoseaufnahme und -verwertung sollte entweder durch die Integration des *scr* Operons aus *Salmonella typhimurium* oder des *csc* Operons aus *E. coli* EC3132 ermöglicht werden. Die Organismen wurden weiterhin jeweils mit einem Plasmid transformiert, durch welche jeweils die Expression eines Enzyms zur Förderung einer anaplerotischen Reaktion erfolgt.

Die rekombinanten *E. coli* Stämme wurden hinsichtlich Wachstumsverhalten, Aktivität entscheidender enzymatischer Reaktionen sowie Produktbildung in Milliliter Rührkesselreaktoren charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass durch beide Saccharoseaufnahme- und Verwertungssysteme der Zweifachzucker vergleichbar zu dem Substrat Glucose effektiv zu Bernsteinsäure umgesetzt werden kann. Der zu *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg analoge Saccharoseverwerter *E. coli*  $\Delta 4\Delta$ ptsG::*scr* pyc\_Cg wies die besten reaktionstechnischen Eigenschaften im Vergleich zu diversen anderen Stämmen in Milliliter Rührkesselreaktoren auf, wie in Abbildung 8-3 zusammengefasst gezeigt ist.

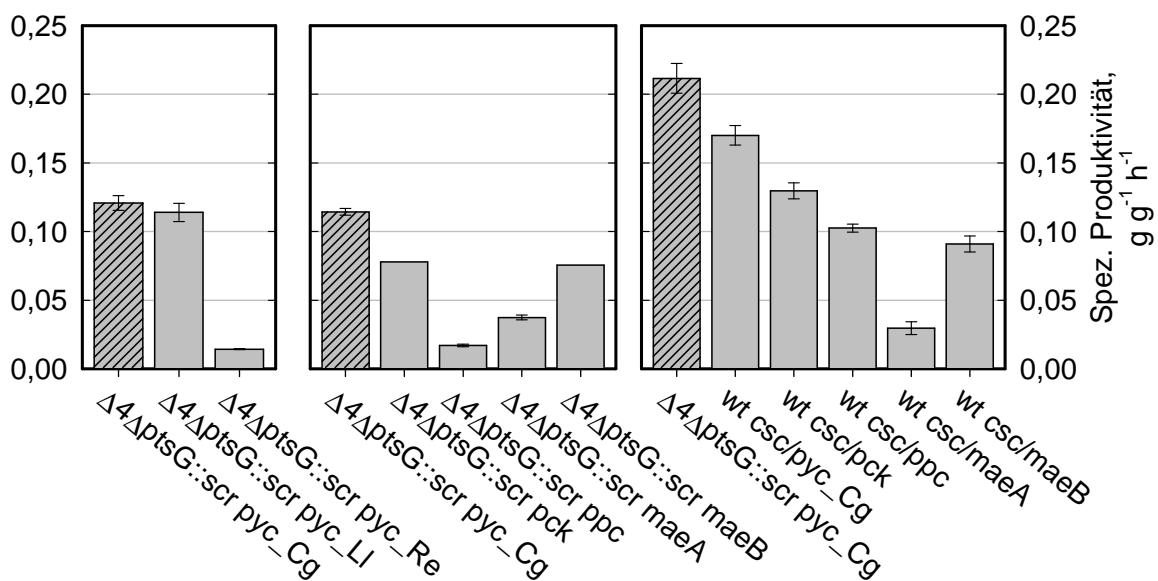


Abbildung 8-3: Spezifische Produktivität nach 24 h anaerober Kultivierung verschiedener Saccharose verwertender *E. coli* in Milliliter Rührkesselreaktoren. Unter Verwendung unterschiedlicher Prozessbedingungen während der einzelnen Versuche (links, Mitte, rechts) stellte sich der als Referenzstamm gewählte *E. coli*  $\Delta 4\Delta$ ptsG::*scr* pyc\_Cg (▨) gegenüber allen anderen jeweils untersuchten Stämmen (▢) als am leistungsfähigsten heraus.

Abschließend wurden ausgewählte Stämme im 2 L Rührkesselreaktor charakterisiert. Bei ähnlich gestalteten Prozessbedingungen waren die reaktionstechnischen Eigenschaften hin-

sichtlich maximaler Produktkonzentration, Produktivität und Ausbeute aller untersuchten Stämme mit denen von *E. coli*  $\Delta 3$  pyc\_Cg vergleichbar. Durch eine limitierende Zufuhr von Saccharose während der Produktionsphase sowie eines deutlich längeren Betriebs konnte mit *E. coli*  $\Delta 4\Delta ptsG::scr$  pyc\_Cg eine anfängliche Ausbeute von bis zu  $0,96 \text{ molC molC}^{-1}$  (nach 8,2 h Produktionsphase) sowie eine maximale Bernsteinsäurekonzentration von bis zu  $29,1 \text{ g L}^{-1}$  nach 102,7 h erreicht werden.

### **Ausblick**

Durch weitere gentechnische Arbeiten sowie reaktionstechnische Anpassungen der beiden untersuchten Prozesse für die Produktion von Hydroxyisobuttersäuren könnten noch weitere Prozessverbesserungen erzielt werden. Eventuell könnten alternative methodische Herangehensweisen hierzu hilfreich sein, wie zum Beispiel statistische und/oder stochastische Optimierungen von Reaktionsbedingungen (Weuster-Botz 2000; Link und Weuster-Botz 2006), metabolische Stoffwechselanalysen (Link und Weuster-Botz 2007; Link *et al.* 2010) für die Identifizierung limitierender enzymatischer Schritte unter Prozessbedingungen sowie andere modellgestützte Prozessoptimierungen. Die in dieser Arbeit verwendeten Milliliter Rührkesselreaktoren könnten in diesem Zusammenhang weiter sinnvoll eingesetzt werden.

Darüber hinaus könnten noch weitere alternative Syntheserouten für die Produktion von Hydroxyisobuttersäuren beziehungsweise Methylmethacrylat in Betracht gezogen werden (Burk *et al.* 2009; Haas 2011).

## 9 Literaturverzeichnis

- Abbott, D. A., Zelle, R. M., Pronk, J. T. und van Maris, A. J. A. (2009). "Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of carboxylic acids: current status and challenges." *Fems Yeast Research* **9**(8): 1123-1136.
- Agarwal, L., Isar, J., Meghwanshi, G. K. und Saxena, R. K. (2006). "A cost effective fermentative production of succinic acid from cane molasses and corn steep liquor by *Escherichia coli*." *Journal of Applied Microbiology* **100**(6): 1348-1354.
- Alber, B., Olinger, M., Rieder, A., Kockelkorn, D., Jobst, B., Hugler, M. und Fuchs, G. (2006). "Malonyl-coenzyme A reductase in the modified 3-hydroxypropionate cycle for autotrophic carbon fixation in archaeal *Metallosphaera* and *Sulfolobus* spp." *Journal of Bacteriology* **188**(24): 8551-8559.
- Alexeeva, S., Hellingwerf, K. J. und de Mattos, M. J. T. (2003). "Requirement of ArcA for redox regulation in *Escherichia coli* under microaerobic but not anaerobic or aerobic conditions." *Journal of Bacteriology* **185**(1): 204-209.
- Andersson, C., Hodge, D., Berglund, K. A. und Rova, U. (2007). "Effect of different carbon sources on the production of succinic acid using metabolically engineered *Escherichia coli*." *Biotechnology Progress* **23**(2): 381-388.
- Aragno, M., Walthermauruschat, A., Mayer, F. und Schlegel, H. G. (1977). "Micromorphology of gram-negative hydrogen bacteria - 1. Cell morphology and flagellation." *Archives of Microbiology* **114**(2): 93-100.
- Arikawa, Y., Kuroyanagi, T., Shimosaka, M., Muratsubaki, H., Enomoto, K., Kodaira, R. und Okazaki, M. (1999). "Effect of gene disruptions of the TCA cycle on production of succinic acid in *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Bioscience and Bioengineering* **87**(1): 28-36.
- Bauer, W. (2000). "Methacrylic Acid and Derivatives" in "Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry." Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Becker, S. A., Feist, A. M., Mo, M. L., Hannum, G., Palsson, B. O. und Herrgard, M. J. (2007). "Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox." *Nature Protocols* **2**(3): 727-738.
- Berrios-Rivera, S. J., San, K. Y. und Bennett, G. N. (2003). "The effect of carbon sources and lactate dehydrogenase deletion on 1,2-propanediol production in *Escherichia coli*." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **30**(1): 34-40.
- Betts, J. I. und Baganz, F. (2006). "Miniature bioreactors: current practices and future opportunities." *Microbial Cell Factories* **5**.
- Blackwood, A. C., Neish, A. C. und Ledingham, G. A. (1956). "Dissimilation of glucose at controlled pH values by pigmented and non-pigmented strains of *Escherichia coli*." *Journal of Bacteriology* **72**(4): 497-499.
- Blankschien, M. D., Clomburg, J. und Gonzalez, R. (2010). "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of succinate from glycerol." *Metabolic Engineering* **12**(5): 409-419.

- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., ColladoVides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. und Shao, Y. (1997). "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12." *Science* **277**(5331): 1453-1462.
- Bockmann, J., Heuel, H. und Lengeler, J. W. (1992). "Characterization of a chromosomally encoded, non-PTS metabolic pathway for sucrose utilization in *Escherichia coli* EC3132." *Molecular & General Genetics* **235**(1): 22-32.
- Bologna, F. P., Andreo, C. S. und Drincovich, M. F. (2007). "*Escherichia coli* malic enzymes: Two isoforms with substantial differences in kinetic properties, metabolic regulation, and structure." *Journal of Bacteriology* **189**(16): 5937-5946.
- Brosius, J., Erfle, M. und Storella, J. (1985). "Spacing of the -10 and -35 regions in the *tac* promoter - Effect on its invivo activity." *Journal of Biological Chemistry* **260**(6): 3539-3541.
- Büchs, J. (2001). "Introduction to advantages and problems of shaken cultures." *Biochemical Engineering Journal* **7**(2): 91-98.
- Burk, M. J., Burgard, A. P., Osterhout, R. E. und Pharkya, P. (2009). "Microorganisms for the production of methacrylic acid." Patent. WO/2009/135074.
- Canovas, J. L. und Kornberg, H. L. (1966). "Properties and regulation of phosphopyruvate carboxylase activity in *Escherichia coli*." *Proceedings of the Royal Society Series B-Biological Sciences* **165**(999): 189-205.
- Challener, C. (2009). "Sugar never tasted so sweet - Some microbial routes to succinic acid may be near to commercialisation." *Speciality Chemicals Magazine* **29**(5): 42-44.
- Chanprateep, S. (2010). "Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates." *Journal of Bioscience and Bioengineering* **110**(6): 621-632.
- Chao, Y. P. und Liao, J. C. (1993). "Alteration of growth yield by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Escherichia coli*." *Applied and Environmental Microbiology* **59**(12): 4261-4265.
- Chatterjee, R., Millard, C. S., Champion, K., Clark, D. P. und Donnelly, M. I. (2001). "Mutation of the *ptsC* gene results in increased production of succinate in fermentation of glucose by *Escherichia coli*." *Applied and Environmental Microbiology* **67**(1): 148-154.
- Chauhan, S., Dicosimo, R., Fallon, R., Gavagan, J., Manzer, L. E. und Payne, M. S. (2003). "Method for producing 2-hydroxyisobutyric acid and methacrylic acid from acetone cyanohydrin " Patent. United States Patent 6582943.
- Chmiel, H. (2006). "Bioprozesstechnik, 2. neubearbeitete Auflage." München, Spektrum Akademischer Verlag.
- Clark, D. P. (1989). "The fermentation pathways of *Escherichia coli*." *Fems Microbiology Reviews* **63**(3): 223-234.
- Cornils, B. und Lappe, P. (2010). "Dicarboxylic acids, aliphatic" in "Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry." Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

- Cox, S. J., Levanon, S. S., Sanchez, A., Lin, H., Peercy, B., Bennett, G. N. und San, K. Y. (2006). "Development of a metabolic network design and optimization framework incorporating implementation constraints: A succinate production case study." *Metabolic Engineering* **8**(1): 46-57.
- Cukalovic, A. und Stevens, C. V. (2008). "Feasibility of production methods for succinic acid derivatives: a marriage of renewable resources and chemical technology." *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* **2**(6): 505-529.
- Dayem, L. C., Carney, J. R., Santi, D. V., Pfeifer, B. A., Khosla, C. und Kealey, J. T. (2002). "Metabolic engineering of a methylmalonyl-CoA mutase-epimerase pathway for complex polyketide biosynthesis in *Escherichia coli*." *Biochemistry* **41**(16): 5193-5201.
- De Mey, M., De Maeseneire, S., Soetaert, W. und Vandamme, E. (2007). "Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **34**(11): 689-700.
- Dedhia, N. N., Hottiger, T. und Bailey, J. E. (1994). "Overproduction of glycogen in *Escherichia coli* blocked in the acetate pathway Improves cell growth." *Biotechnology and Bioengineering* **44**(1): 132-139.
- Demler, M. und Weuster-Botz, D. (2011). "Reaction engineering analysis of hydrogenotrophic production of acetic acid by *Acetobacterium woodii*." *Biotechnology and Bioengineering* **108**(2): 470-474.
- Dharmadi, Y., Murarka, A. und Gonzalez, R. (2006). "Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: A new platform for metabolic engineering." *Biotechnology and Bioengineering* **94**(5): 821-829.
- Diaz-Ricci, J. C., Regan, L. und Bailey, J. E. (1991). "Effect of alteration of the acetic acid synthesis pathway on the fermentation pattern of *Escherichia coli*." *Biotechnology and Bioengineering* **38**(11): 1318-1324.
- Donnelly, M. I., Millard, C. S., Clark, D. P., Chen, M. J. und Rathke, J. W. (1998). "A novel fermentation pathway in an *Escherichia coli* mutant producing succinic acid, acetic acid, and ethanol." *Applied Biochemistry and Biotechnology* **70-72**: 187-198.
- Durnin, G., Clomburg, J., Yeates, Z., Alvarez, P. J. J., Zygorakis, K., Campbell, P. und Gonzalez, R. (2009). "Understanding and harnessing the microaerobic metabolism of glycerol in *Escherichia coli*." *Biotechnology and Bioengineering* **103**(1): 148-161.
- Fernandes, P. und Cabral, J. M. S. (2006). "Microlitre/millilitre shaken bioreactors in fermentative and biotransformation processes - a review." *Biocatalysis and Biotransformation* **24**(4): 237-252.
- Flaschel, E. und Sell, D. (2005). "Charme und Chancen der Weißen Biotechnologie." *Chemie Ingenieur Technik* **77**(9): 1298-1312.
- Fogler, H. S. (2005). "Elements of chemical reaction engineering, 4<sup>th</sup> edition." Upper Saddle River, Prentice Hall.
- Fricke, W. F., Kusian, B. und Bowien, B. (2009). "The genome organization of *Ralstonia eutropha* strain H16 and related species of the *Burkholderiaceae*." *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **16**(1-2): 124-135.

- Friedrich, C. G., Friedrich, B. und Bowien, B. (1981). "Formation of enzymes of autotrophic metabolism during heterotrophic growth of *Alcaligenes eutrophus*." *Journal of General Microbiology* **122**: 69-78.
- Froese, D. S., Dobson, C. M., White, A. P., Wu, X., Padovani, D., Banerjee, R., Haller, T., Gerlt, J. A., Surette, M. G. und Gravel, R. A. (2009). "Sleeping beauty mutase (*sbm*) is expressed and interacts with *ygfd* in *Escherichia coli*." *Microbiological Research* **164**(1): 1-8.
- Gebhardt, G. (2010). "Reaktionstechnische Untersuchungen von rekombinanten *Saccharomyces cerevisiae* zur Bernsteinsäureherstellung." Dissertation. Technische Universität München. Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik.
- Gokarn, R. R., Eiteman, M. A. und Altman, E. (1998). "Expression of pyruvate carboxylase enhances succinate production in *Escherichia coli* without affecting glucose uptake." *Biotechnology Letters* **20**(8): 795-798.
- Goodhue, C. T. und Schaeffer, J. R. (1971). "Preparation of L(+)  $\beta$ -hydroxyisobutyric acid by bacterial oxidation of isobutyric acid." *Biotechnology and Bioengineering* **13**(2): 203-214.
- Guettler, M. V., Jain, M. K. und Rumler, D. (1996). "Method for making succinic acid, bacterial variants for use in the process, and methods for obtaining variants." Patent. United States Patent 5573931.
- Guettler, M. V., Rumler, D. und Jain, M. K. (1999). "*Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen." *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 207-216.
- Haas, T. (2011). "Biotechnological utilization of CO<sub>2</sub> as feedstock." Forum Life Science, Technische Universität München, Garching.
- Haller, T., Buckel, T., Rétey, J. und Gerlt, J. A. (2000). "Discovering new enzymes and metabolic pathways: Conversion of succinate to propionate by *Escherichia coli*." *Biochemistry* **39**(16): 4622-4629.
- Hancock, R. D. und Viola, R. (2002). "Biotechnological approaches for L-ascorbic acid production." *Trends in Biotechnology* **20**(7): 299-305.
- Hardesty, C., Colon, G., Ferran, C. und Dirienzo, J. M. (1987). "Deletion analysis of sucrose metabolic genes from a *Salmonella* plasmid cloned in *Escherichia coli* K12." *Plasmid* **18**(2): 142-155.
- Hasona, A., Kim, Y., Healy, F. G., Ingram, L. O. und Shanmugam, K. T. (2004). "Pyruvate formate lyase and acetate kinase are essential for anaerobic growth of *Escherichia coli* on xylose." *Journal of Bacteriology* **186**(22): 7593-7600.
- Hoefel, T., Wittmann, E., Reinecke, L. und Weuster-Botz, D. (2010). "Reaction engineering studies for the production of 2-hydroxyisobutyric acid with recombinant *Cupriavidus necator* H 16." *Applied Microbiology and Biotechnology* **88**(2): 477-484.
- Hong, S. H. und Lee, S. Y. (2002). "Importance of redox balance on the production of succinic acid by metabolically engineered *Escherichia coli*." *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**(3): 286-290.

- Hong, S. H., Moon, S. Y. und Lee, S. Y. (2003). "Prediction of maximum yields of metabolites and optimal pathways for their production by metabolic flux analysis." *Journal of Microbiology and Biotechnology* **13**(4): 571-577.
- Hortsch, R., Krispin, H. und Weuster-Botz, D. (2011). "Process performance of parallel bioreactors for batch cultivation of *Streptomyces tendae*." *Bioprocess and Biosystems Engineering* **34**(3): 297-304.
- Hortsch, R., Stratmann, A. und Weuster-Botz, D. (2010). "New milliliter-scale stirred tank bioreactors for the cultivation of mycelium forming microorganisms." *Biotechnology and Bioengineering* **106**(3): 443-451.
- Hortsch, R. und Weuster-Botz, D. (2010a). "Milliliter-scale stirred tank reactors for the cultivation of microorganisms" in "Advances in Applied Microbiology, Vol 73." San Diego, Elsevier Academic Press Inc. **73**: 61-82.
- Hortsch, R. und Weuster-Botz, D. (2010b). "Power consumption and maximum energy dissipation in a milliliter-scale bioreactor." *Biotechnology Progress* **26**(2): 595-599.
- Hortsch, R. und Weuster-Botz, D. (2011). "Growth and recombinant protein expression with *Escherichia coli* in different batch cultivation media." *Applied Microbiology and Biotechnology* **90**(1): 69-76.
- Huber, R. E. und Hurlburt, K. L. (1984). "*Escherichia coli* growth on lactose requires cycling of beta-galactosidase products into the medium." *Canadian Journal of Microbiology* **30**(3): 411-415.
- ICIS-pricing. (2010). "ICIS pricing - Sample Report - Methyl Methacrylate (Europe)." [http://www.icispricing.com/il\\_shared/Samples/SubPage102.asp](http://www.icispricing.com/il_shared/Samples/SubPage102.asp). Abgerufen am 20.05.2011.
- Ikeda, M., Mizuno, Y., Awane, S.-i., Hayashi, M., Mitsuhashi, S. und Takeno, S. (2011). "Identification and application of a different glucose uptake system that functions as an alternative to the phosphotransferase system in *Corynebacterium glutamicum*." *Applied Microbiology and Biotechnology* **90**(4): 1443-1451.
- Inui, M., Murakami, S., Okino, S., Kawaguchi, H., Vertes, A. A. und Yukawa, H. (2004). "Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions." *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **7**(4): 182-196.
- Isar, J., Agarwal, L., Saran, S. und Saxena, R. K. (2006a). "A statistical method for enhancing the production of succinic acid from *Escherichia coli* under anaerobic conditions." *Bioresource Technology* **97**(13): 1443-1448.
- Isar, J., Agarwal, L., Saran, S. und Saxena, R. K. (2006b). "Succinic acid production from *Bacteroides fragilis*: Process optimization and scale up in a bioreactor." *Anaerobe* **12**(5-6): 231-237.
- Jahreis, K., Bentler, L., Bockmann, J., Hans, S., Meyer, A., Siepelmeyer, J. und Lengeler, J. W. (2002). "Adaptation of sucrose metabolism in the *Escherichia coli* wild-type strain EC3132." *Journal of Bacteriology* **184**(19): 5307-5316.
- Jahreis, K., Pimentel-Schmitt, E. F., Bruckner, R. und Titgemeyer, F. (2008). "Ins and outs of glucose transport systems in eubacteria." *Fems Microbiology Reviews* **32**(6): 891-907.

- Jantama, K., Haupt, M. J., Svoronos, S. A., Zhang, X. L., Moore, J. C., Shanmugam, K. T. und Ingram, L. O. (2008). "Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate." *Biotechnology and Bioengineering* **99**(5): 1140-1153.
- Jenzsch, M., Gnoth, S., Beck, M., Kleinschmidt, M., Simutis, R. und Lubbert, A. (2006). "Open-loop control of the biomass concentration within the growth phase of recombinant protein production processes." *Journal of Biotechnology* **127**(1): 84-94.
- Jeong, J. Y., Kim, Y. J., Cho, N. W., Shin, D. W., Nam, T. W., Ryu, S. und Seok, Y. J. (2004). "Expression of *ptsG* encoding the major glucose transporter is regulated by ArcA in *Escherichia coli*." *Journal of Biological Chemistry* **279**(37): 38513-38518.
- Jiang, M., Liu, S. W., Ma, J. F., Chen, K. Q., Yu, L., Yue, F. F., Xu, B. und Wei, P. (2010). "Effect of growth phase feeding strategies on succinate production by metabolically engineered *Escherichia coli*." *Applied and Environmental Microbiology* **76**(4): 1298-1300.
- Jitrapakdee, S., St Maurice, M., Rayment, I., Cleland, W. W., Wallace, J. C. und Attwood, P. V. (2008). "Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase." *Biochemical Journal* **413**: 369-387.
- Jitrapakdee, S. und Wallace, J. C. (1999). "Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase." *Biochemical Journal* **340**: 1-16.
- Kang, Z., Gao, C. J., Wang, Q. A., Liu, H. M. und Qi, Q. S. (2010). "A novel strategy for succinate and polyhydroxybutyrate co-production in *Escherichia coli*." *Bioresource Technology* **101**(19): 7675-7678.
- Keshavarz, T. und Roy, I. (2010). "Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda." *Current Opinion in Microbiology* **13**(3): 321-326.
- Khanna, S. und Srivastava, A. K. (2005). "Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates." *Process Biochemistry* **40**(2): 607-619.
- Kim, B. S., Lee, S. C., Lee, S. Y., Chang, H. N., Chang, Y. K. und Woo, S. I. (1994). "Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control." *Biotechnology and Bioengineering* **43**(9): 892-898.
- Kim, P., Laivenieks, M., Vieille, C. und Zeikus, J. G. (2004). "Effect of overexpression of *Actinobacillus succinogenes* phosphoenolpyruvate carboxykinase on succinate production in *Escherichia coli*." *Applied and Environmental Microbiology* **70**(2): 1238-1241.
- Kircher, M. und Haas, T. (2011). "Auf dem Weg in die Bio-Ökonomie - Biotechnologie erschließt neue Kohlenstoffquellen und verbessert CO<sub>2</sub>-Bilanz, Teil 1." *CHEmanager*(6): 4.
- Kirchner, O. und Tauch, A. (2003). "Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*." *Journal of Biotechnology* **104**(1-3): 287-299.
- Klamt, S., Saez-Rodriguez, J. und Gilles, E. D. (2007). "Structural and functional analysis of cellular networks with CellNetAnalyzer." *Bmc Systems Biology* **1**.



- Knorr, B., Schlieker, H., Hohmann, H. P. und Weuster-Botz, D. (2007). "Scale-down and parallel operation of the riboflavin production process with *Bacillus subtilis*." *Biochemical Engineering Journal* **33**(3): 263-274.
- Kocincová, A. S. (2007). "New pH sensitive sensormaterials. Luminescent fiber-optic dual sensors for non-invasive and simultaneous measurement of pH and pO<sub>2</sub> (dissolved oxygen) in biological systems." Dissertation. Universität Regensburg. Fakultät Chemie und Pharmazie.
- König, C. und Schlegel, H. G. (1968). "Langfristiges organotrophes Wachstum von *Hydrogenomonas* H 16 im Chemostaten." *Archives of Microbiology* **62**(1): 41-55.
- Korotkova, N. und Lidstrom, M. E. (2004). "MeaB is a component of the methylmalonyl-CoA mutase complex required for protection of the enzyme from inactivation." *Journal of Biological Chemistry* **279**(14): 13652-13658.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M. und Peterson, K. M. (1995). "4 new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes." *Gene* **166**(1): 175-176.
- Kuhnert, P., Scholten, E., Haefner, S., Mayor, D. und Frey, J. (2010). "*Basfia succiniciproducens* gen. nov., sp nov., a new member of the family *Pasteurellaceae* isolated from bovine rumen." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**: 44-50.
- Kumar, S., Wittmann, C. und Heinzle, E. (2004). "Minibioreactors." *Biotechnology Letters* **26**(1): 1-10.
- Kusterer, A. (2007). "Reaktionstechnische Optimierung von Parallelreaktoren für kontrollierte Bioprozesse." Dissertation. Technische Universität München. Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik.
- Kusterer, A., Krause, C., Kaufmann, K., Arnold, M. und Weuster-Botz, D. (2008). "Fully automated single-use stirred-tank bioreactors for parallel microbial cultivations." *Bioprocess and Biosystems Engineering* **31**(3): 207-215.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lang, C., Veen, M., Böttner, M. und Raab, A. M. (2011). "Microorganism for the production of succinic acid." Patent. United States Patent Application 2011/0129885.
- Lara, A. R., Caspeta, L., Gosset, G., Bolivar, F. und Ramirez, O. T. (2008). "Utility of an *Escherichia coli* strain engineered in the substrate uptake system for improved culture performance at high glucose and cell concentrations: An alternative to fed-batch cultures." *Biotechnology and Bioengineering* **99**(4): 893-901.
- Lechner, U., Brodkorb, D., Geyer, R., Hause, G., Hartig, C., Auling, G., Fayolle-Guichard, F., Piveteau, P., Müller, R. H. und Rohwerder, T. (2007). "*Aquicola tertiaricarbonis* gen. nov., sp nov., a tertiary butyl moiety-degrading bacterium." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**: 1295-1303.

- Lee, J. W., Choi, S., Park, J. H., Vickers, C. E., Nielsen, L. K. und Lee, S. Y. (2010). "Development of sucrose-utilizing *Escherichia coli* K-12 strain by cloning beta-fructofuranosidases and its application for l-threonine production." *Applied Microbiology and Biotechnology* **88**(4): 905-913.
- Lee, P. C., Lee, S. Y., Hong, S. H. und Chang, H. N. (2002a). "Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen." *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**(5): 663-668.
- Lee, S. H., Park, S. J., Lee, S. Y. und Hong, S. H. (2008). "Biosynthesis of enantiopure (S)-3-hydroxybutyric acid in metabolically engineered *Escherichia coli*." *Applied Microbiology and Biotechnology* **79**(4): 633-641.
- Lee, S. Y. (1996). "Bacterial polyhydroxyalkanoates." *Biotechnology and Bioengineering* **49**(1): 1-14.
- Lee, S. Y., Hong, S. H. und Moon, S. Y. (2002b). "In silico metabolic pathway analysis and design: succinic acid production by metabolically engineered *Escherichia coli* as an example." *Genome Informatics* **13**: 214-223.
- León, R., Prazeres, D. M. F., Fernandes, P., Molinari, F. und Cabral, J. M. S. (2001). "A multiphasic hollow fiber reactor for the whole-cell bioconversion of 2-methyl-1,3-propanediol to (R)- $\beta$ -hydroxyisobutyric acid." *Biotechnology Progress* **17**(3): 468-473.
- Lin, H., Bennett, G. N. und San, K.-Y. (2005a). "Fed-batch culture of a metabolically engineered *Escherichia coli* strain designed for high-level succinate production and yield under aerobic conditions." *Biotechnology and Bioengineering* **90**(6): 775-779.
- Lin, H., Bennett, G. N. und San, K. Y. (2005b). "Effect of carbon sources differing in oxidation state and transport route on succinate production in metabolically engineered *Escherichia coli*." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **32**(3): 87-93.
- Lin, H., Vadali, R. V., Bennett, G. N. und San, K. Y. (2004). "Increasing the acetyl-CoA pool in the presence of overexpressed phosphoenolpyruvate carboxylase or pyruvate carboxylase enhances succinate production in *Escherichia coli*." *Biotechnology Progress* **20**(5): 1599-1604.
- Link, H., Anselment, B. und Weuster-Botz, D. (2010). "Rapid media transition: An experimental approach for steady state analysis of metabolic pathways." *Biotechnology Progress* **26**(1): 1-10.
- Link, H. und Weuster-Botz, D. (2006). "Genetic algorithm for multi-objective experimental optimization." *Bioprocess and Biosystems Engineering* **29**(5-6): 385-390.
- Link, H. und Weuster-Botz, D. (2007). "Steady-state analysis of metabolic pathways: Comparing the double modulation method and the lin-log approach." *Metabolic Engineering* **9**(5-6): 433-441.
- Liu, J. Y., Miller, P. F., Gosink, M. und Olson, E. R. (1999). "The identification of a new family of sugar efflux pumps in *Escherichia coli*." *Molecular Microbiology* **31**(6): 1845-1851.
- Liu, Q., Ouyang, S. P., Chung, A., Wu, Q. und Chen, G. Q. (2007). "Microbial production of R-3-hydroxybutyric acid by recombinant *E. coli* harboring genes of *phbA*, *phbB*, and *tesB*." *Applied Microbiology and Biotechnology* **76**(4): 811-818.

- Lokanath, N. K., Ohshima, N., Takio, K., Shiromizu, I., Kuroishi, C., Okazaki, N., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., Miyano, M. und Kunishima, N. (2005). "Crystal structure of novel NADP-dependent 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB8." *Journal of Molecular Biology* **352**(4): 905-917.
- Lokanath, N. K., Shiromizu, I., Nodake, Y., Sugahara, M., Yokoyama, S., Kuramitsu, S., Miyano, M. und Kunishima, N. (2003). "Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of NADP-dependent 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB8." *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **59**: 2294-2296.
- Lu, J. N., Tappel, R. C. und Nomura, C. T. (2009a). "Mini-review: Biosynthesis of poly(hydroxyalkanoates)." *Polymer Reviews* **49**(3): 226-248.
- Lu, S. Y., Eiteman, M. A. und Altman, E. (2009b). "Effect of CO<sub>2</sub> on succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations." *Journal of Biotechnology* **143**(3): 213-223.
- Lu, S. Y., Eiteman, M. A. und Altman, E. (2009c). "pH and base counterion affect succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **36**(8): 1101-1109.
- Ma, J. F., Jiang, M., Chen, K. Q., Xu, B., Liu, S. W., Wei, P. und Ying, H. J. (2010). "Succinic acid production with metabolically engineered *E. coli* recovered from two-stage fermentation." *Biotechnology Letters* **32**(10): 1413-1418.
- Maier, U., Losen, M. und Büchs, J. (2004). "Advances in understanding and modeling the gas-liquid mass transfer in shake flasks." *Biochemical Engineering Journal* **17**(3): 155-167.
- Martinez, I., Bennett, G. N. und San, K. Y. (2010). "Metabolic impact of the level of aeration during cell growth on anaerobic succinate production by an engineered *Escherichia coli* strain." *Metabolic Engineering* **12**(6): 499-509.
- Marx, A., Pötter, M., Buchholz, S., May, A., Siegert, H., Alber, B., Fuchs, G. und Eggeling, L. (2007). "Microbiological production of 3-hydroxyisobutyric acid." Patent. WO/2007/141208.
- Maurice, M. S., Reinhardt, L., Surinya, K. H., Attwood, P. V., Wallace, J. C., Cleland, W. W. und Rayment, I. (2007). "Domain architecture of pyruvate carboxylase, a biotin-dependent multifunctional enzyme." *Science* **317**(5841): 1076-1079.
- McCoy, M. (2009). "Big plans for succinic acid." *Chemical & Engineering News* **87**(50): 23-25.
- McKinlay, J. B., Vieille, C. und Zeikus, J. G. (2007). "Prospects for a bio-based succinate industry." *Applied Microbiology and Biotechnology* **76**(4): 727-740.
- Michal, G. (1999). "Biochemical pathways: Biochemie-Atlas." Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Micheletti, M. und Lye, G. J. (2006). "Microscale bioprocess optimisation." *Current Opinion in Biotechnology* **17**(6): 611-618.

- Millard, C. S., Chao, Y. P., Liao, J. C. und Donnelly, M. I. (1996). "Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Escherichia coli*." *Applied and Environmental Microbiology* **62**(5): 1808-1810.
- Müller, R. H. und Rohwerder, T. (2007). "Method for the enzymatic production of 2-hydroxy-2-methyl carboxylic acids." Patent. WO/2007/110394.
- Nešvera, J. und Pátek, M. (2011). "Tools for genetic manipulations in *Corynebacterium glutamicum* and their applications." *Applied Microbiology and Biotechnology* **90**(5): 1641-1654.
- Nexant. (2006). "PERP Program – Methyl Methacrylate. New Report Alert." [http://www.chemsystems.com/reports/search/docs/abstracts/0405-2\\_abs.pdf](http://www.chemsystems.com/reports/search/docs/abstracts/0405-2_abs.pdf). Abgerufen am 20.05.2011.
- Nghiem, N., Davison, B., Suttle, B. und Richardson, G. (1997). "Production of succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*." *Applied Biochemistry and Biotechnology* **63-65**(1): 565-576.
- Ohta, H., Tetsukawa, H. und Noto, N. (1982). "Enantiotopically selective oxidation of  $\alpha,\omega$ -diols with the enzyme systems of microorganisms." *Journal of Organic Chemistry* **47**(12): 2400-2404.
- Okino, S., Noburyu, R., Suda, M., Jojima, T., Inui, M. und Yukawa, H. (2008). "An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain." *Applied Microbiology and Biotechnology* **81**(3): 459-464.
- Olsen, K. N., Budde, B. B., Siegumfeldt, H., Reching, K. B., Jakobsen, M. und Ingmer, H. (2002). "Noninvasive measurement of bacterial intracellular pH on a single-cell level with green fluorescent protein and fluorescence ratio imaging microscopy." *Applied and Environmental Microbiology* **68**(8): 4145-4147.
- Osman, Y. A., Conway, T., Bonetti, S. J. und Ingram, L. O. (1987). "Glycolytic flux in *Zymomonas mobilis*: Enzyme and metabolite levels during batch fermentation." *Journal of Bacteriology* **169**(8): 3726-3736.
- Partridge, J. D., Sanguinetti, G., Dibden, D. P., Roberts, R. E., Poole, R. K. und Green, J. (2007). "Transition of *Escherichia coli* from aerobic to micro-aerobic conditions involves fast and slow reacting regulatory components." *Journal of Biological Chemistry* **282**(15): 11230-11237.
- Payne, J. und Morris, J. G. (1969). "Pyruvate carboxylase in *Rhodopseudomonas spheroides*." *Journal of General Microbiology* **59**: 97-101.
- Peng, L. und Shimizu, K. (2003). "Global metabolic regulation analysis for *Escherichia coli* K12 based on protein expression by 2-dimensional electrophoresis and enzyme activity measurement." *Applied Microbiology and Biotechnology* **61**(2): 163-178.
- Peplinski, K., Ehrenreich, A., Doring, C., Bomeke, M., Reinecke, F., Hutmacher, C. und Steinbüchel, A. (2010). "Genome-wide transcriptome analyses of the 'Knallgas' bacterium *Ralstonia eutropha* H16 with regard to polyhydroxyalkanoate metabolism." *Microbiology-Sgm* **156**: 2136-2152.
- Peters-Wendisch, P. G., Kreutzer, C., Kalinowski, J., Patek, M., Sahm, H. und Eikmanns, B. J. (1998). "Pyruvate carboxylase from *Corynebacterium glutamicum*: characterization, expression and inactivation of the *pyc* gene." *Microbiology-Sgm* **144**: 915-927.

- Peters-Wendisch, P. G., Wendisch, V. F., Paul, S., Eikmanns, B. J. und Sahm, H. (1997). "Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in *Corynebacterium glutamicum*." *Microbiology-Sgm* **143**: 1095-1103.
- Pfefferle, W., Möckel, B., Bathe, B. und Marx, A. (2003). "Biotechnological manufacture of lysine" in "Microbial production of L-amino acids." Heidelberg, Springer-Verlag. **79**: 59-112.
- Picon, A., de Mattos, M. J. T. und Postma, P. W. (2005). "Reducing the glucose uptake rate in *Escherichia coli* affects growth rate but not protein production." *Biotechnology and Bioengineering* **90**(2): 191-200.
- Pohlmann, A., Fricke, W. F., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Cramm, R., Eitinger, T., Ewering, C., Potter, M., Schwartz, E., Strittmatter, A., Voss, I., Gottschalk, G., Steinbuchel, A., Friedrich, B. und Bowien, B. (2006). "Genome sequence of the bio-plastic-producing "Knallgas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16." *Nature Biotechnology* **24**(10): 1257-1262.
- Pötter, M., Madkour, M. H., Mayer, F. und Steinbüchel, A. (2002). "Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16." *Microbiology-Sgm* **148**: 2413-2426.
- Puskeiler, R., Kaufmann, K. und Weuster-Botz, D. (2005a). "Development, parallelization, and automation of a gas-inducing milliliter-scale bioreactor for high-throughput bioprocess design (HTBD)." *Biotechnology and Bioengineering* **89**(5): 512-523.
- Puskeiler, R., Kusterer, A., John, G. T. und Weuster-Botz, D. (2005b). "Miniature bioreactors for automated high-throughput bioprocess design (HTBD): reproducibility of parallel fed-batch cultivations with *Escherichia coli*." *Biotechnology and Applied Biochemistry* **42**: 227-235.
- Puskeiler, R. und Weuster-Botz, D. (2004). "Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab: Kultivierung von *Escherichia coli*." *Chemie Ingenieur Technik* **76**(12): 1865-1869.
- Raab, A. M., Gebhardt, G., Bolotina, N., Weuster-Botz, D. und Lang, C. (2010). "Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the biotechnological production of succinic acid." *Metabolic Engineering* **12**(6): 518-525.
- Raberg, M., Reinecke, F., Reichelt, R., MalkuS, U., König, S., Potter, M., Fricke, W. F., Pohlmann, A., Voigt, B., Hecker, M., Friedrich, B., Bowien, B. und Steinbuchel, A. (2008). "*Ralstonia eutropha* H16 flagellation changes according to nutrient supply and state of poly(3-hydroxybutyrate) accumulation." *Applied and Environmental Microbiology* **74**(14): 4477-4490.
- Raman, K. und Chandra, N. (2009). "Flux balance analysis of biological systems: applications and challenges." *Briefings in Bioinformatics* **10**(4): 435-449.
- Reed, J. L., Vo, T. D., Schilling, C. H. und Palsson, B. O. (2003). "An expanded genome-scale model of *Escherichia coli* K-12 (iJR904 GSM/GPR)." *Genome Biology* **4**(9).
- Reinecke, F. und Steinbüchel, A. (2009). "*Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers." *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **16**(1-2): 91-108.

- Reinecke, L., Schaffer, S., Köhler, T., Thiessenhusen, A., Marx, A. und Buchhaupt, M. (2011). "Verwendung eines zu einem MeaB-Protein homologen Proteins zur Erhöhung der enzymatischen Aktivität einer 3-Hydroxycarbonsäure-CoA-Mutase." Patent. DE 10 2009 046 623.
- Reinecke, L., Schaffer, S., Marx, A., Pötter, M. und Haas, T. (2009). "Recombinant cell producing 2-hydroxyisobutyric acid." Patent. WO/2009/156214.
- Riener, C. K., Kada, G. und Gruber, H. J. (2002). "Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **373**(4-5): 266-276.
- Rogers, P., Chen, J. S. und Zidwick, M. J. (2006). "Organic acid and solvent production part II: Propionic and butyric acids and ethanol" in "The Prokaryotes." M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer and E. Stackebrandt. Heidelberg, Springer. **1**: 611-671.
- Rohwerder, T., Breuer, U., Benndorf, D., Lechner, U. und Müller, R. H. (2006). "The alkyl tert-butyl ether intermediate 2-hydroxyisobutyrate is degraded via a novel cobalamin-dependent mutase pathway." *Applied and Environmental Microbiology* **72**(6): 4128-4135.
- Rohwerder, T. und Müller, R. H. (2010). "Biosynthesis of 2-hydroxyisobutyric acid (2-HIBA) from renewable carbon." *Microbial Cell Factories* **9**.
- Romano, A. H. und Conway, T. (1996). "Evolution of carbohydrate metabolic pathways." *Research in Microbiology* **147**(6-7): 448-455.
- Russell, J. B. und Diez-Gonzalez, F. (1997). "The effects of fermentation acids on bacterial growth" in "Advances in Microbial Physiology, Vol 39." London, Academic Press Ltd. **39**: 205-234.
- Ryu, H. W., Cho, K. S., Kim, B. S., Chang, Y. K., Chang, H. N. und Shim, H. J. (1999). "Mass production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch cultures of *Ralstonia eutropha* with nitrogen and phosphate limitation." *Journal of Microbiology and Biotechnology* **9**(6): 751-756.
- Ryu, S. U. und Kim, Y. G. (1998). "A synthetic study for optically active 3-hydroxy-2-methylpropanoic acid derivatives via chemical asymmetric decarboxylation." *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **4**(1): 50-57.
- Salmon, K., Hung, S. P., Mekjian, K., Baldi, P., Hatfield, G. W. und Gunsalus, R. P. (2003). "Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12 - The effects of oxygen availability and FNR." *Journal of Biological Chemistry* **278**(32): 29837-29855.
- Salmon, K. A., Hung, S., Steffen, N. R., Krupp, R., Baldi, P., Hatfield, G. W. und Gunsalus, R. P. (2005). "Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12 - Effects of oxygen availability and ArcA." *Journal of Biological Chemistry* **280**(15): 15084-15096.
- Sambrook, J. (2001). "Molecular cloning: A laboratory manual, 3<sup>rd</sup> edition." Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samuelov, N. S., Lamed, R., Lowe, S. und Zeikus, J. G. (1991). "Influence of CO<sub>2</sub>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> levels and pH on growth, succinate production, and enzyme activities of *Anaerobiospirillum succiniciproducens*." *Applied and Environmental Microbiology* **57**(10): 3013-3019.

- Sanchez, A. M., Bennett, G. N. und San, K. Y. (2005a). "Efficient succinic acid production from glucose through overexpression of pyruvate carboxylase in an *Escherichia coli* alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase mutant." *Biotechnology Progress* **21**(2): 358-365.
- Sanchez, A. M., Bennett, G. N. und San, K. Y. (2005b). "Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity." *Metabolic Engineering* **7**(3): 229-239.
- Sanchez, A. M., Bennett, G. N. und San, K. Y. (2006). "Batch culture characterization and metabolic flux analysis of succinate-producing *Escherichia coli* strains." *Metabolic Engineering* **8**(3): 209-226.
- Sauer, M., Porro, D., Mattanovich, D. und Branduardi, P. (2008). "Microbial production of organic acids: expanding the markets." *Trends in Biotechnology* **26**(2): 100-108.
- Schapper, D., Alam, M., Szita, N., Lantz, A. E. und Gernaey, K. V. (2009). "Application of microbioreactors in fermentation process development: a review." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **395**(3): 679-695.
- Schlegel, H. G., Kaltwasser, H. und Gottschalk, G. (1961a). "Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen." *Archives of Microbiology* **38**(3): 209-222.
- Schlegel, H. G., Lafferty, R. und Krauss, I. (1970). "The isolation of mutants not accumulating poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid." *Archives of Microbiology* **71**(3): 283-294.
- Schlegel, H. G., Vonbartheld, R. und Gottschalk, G. (1961b). "Formation and utilization of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by Knallgas bacteria (*Hydrogenomonas*)." *Nature* **191**(478): 463-465.
- Schmid, K., Ebner, R., Altenbuchner, J., Schmitt, R. und Lengeler, J. W. (1988). "Plasmid-mediated sucrose metabolism in *Escherichia coli* K12: mapping of the *scr* genes of pUR400." *Molecular Microbiology* **2**(1): 1-8.
- Schmid, K., Schupfner, M. und Schmitt, R. (1982). "Plasmid-mediated uptake and metabolism of sucrose by *Escherichia coli* K-12." *Journal of Bacteriology* **151**(1): 68-76.
- Schubert, P., Steinbüchel, A. und Schlegel, H. G. (1988). "Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*." *Journal of Bacteriology* **170**(12): 5837-5847.
- Shima, Y., Abe, T. und Higuchi, H. (1993). "Process for producing methacrylic acid." Patent. United States Patent 5225594.
- Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P. S., Rodrigues, C. und Pandey, A. (2006). "New perspectives for citric acid production and application." *Food Technology and Biotechnology* **44**(2): 141-149.
- Song, H. und Lee, S. Y. (2006). "Production of succinic acid by bacterial fermentation." *Enzyme and Microbial Technology* **39**(3): 352-361.
- Song, H. H., Lee, J. W., Choi, S., You, J. K., Hong, W. H. und Lee, S. Y. (2007). "Effects of dissolved CO<sub>2</sub> levels on the growth of *Mannheimia succiniciproducens* and succinic acid production." *Biotechnology and Bioengineering* **98**(6): 1296-1304.

- Spina, J., Bright, H. J. und Rosenbloom, J. (1970). "Purification and properties of L-malic enzyme from *Escherichia coli*." *Biochemistry* **9**(19): 3794-3801.
- Steffan, R. J., McClay, K., Vainberg, S., Condee, C. W. und Zhang, D. L. (1997). "Biodegradation of the gasoline oxygenates methyl *tert*-butyl ether, ethyl *tert*-butyl ether, and *tert*-amyl methyl ether by propane-oxidizing bacteria." *Applied and Environmental Microbiology* **63**(11): 4216-4222.
- Steinbüchel, A. und Lütke-Eversloh, T. (2003). "Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms." *Biochemical Engineering Journal* **16**(2): 81-96.
- Stols, L. und Donnelly, M. I. (1997). "Production of succinic acid through overexpression of NAD(+)-dependent malic enzyme in an *Escherichia coli* mutant." *Applied and Environmental Microbiology* **63**(7): 2695-2701.
- Sun, Y. und Vanderpool, C. K. (2011). "Regulation and function of *Escherichia coli* sugar efflux transporter A (SetA) during glucose-phosphate stress." *Journal of Bacteriology* **193**(1): 143-153.
- Terpe, K. (2006). "Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems." *Applied Microbiology and Biotechnology* **72**(2): 211-222.
- Tiemeyer, A. K. (2007). "Reaktionstechnische Untersuchungen zur chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator*." Dissertation. Technische Universität München. Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik.
- Tokiwa, Y. und Ugwu, C. U. (2007). "Biotechnological production of (R)-3-hydroxybutyric acid monomer." *Journal of Biotechnology* **132**(3): 264-272.
- Van der Werf, M. J., Guettler, M. V., Jain, M. K. und Zeikus, J. G. (1997). "Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus* sp. 130Z." *Archives of Microbiology* **167**(6): 332-342.
- Vandamme, P. und Coenye, T. (2004). "Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 2285-2289.
- Veit, A., Polen, T. und Wendisch, V. F. (2007). "Global gene expression analysis of glucose overflow metabolism in *Escherichia coli* and reduction of aerobic acetate formation." *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**(2): 406-421.
- Vemuri, G. N., Eiteman, M. A. und Altman, E. (2002a). "Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*." *Applied and Environmental Microbiology* **68**(4): 1715-1727.
- Vemuri, G. N., Eiteman, M. A. und Altman, E. (2002b). "Succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations depends on the time of transition from aerobic to anaerobic conditions." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **28**(6): 325-332.
- Verlinden, R. A. J., Hill, D. J., Kenward, M. A., Williams, C. D. und Radecka, I. (2007). "Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates." *Journal of Applied Microbiology* **102**(6): 1437-1449.



- Vester, A., Hans, M., Hohmann, H. P. und Weuster-Botz, D. (2009). "Discrimination of riboflavin producing *Bacillus subtilis* strains based on their fed-batch process performances on a millilitre scale." *Applied Microbiology and Biotechnology* **84**(1): 71-76.
- Vogel, G. H. (2008). "Change in raw material base in the chemical industry." *Chemical Engineering & Technology* **31**(5): 730-735.
- Volker, T. und Pichler, E. (1972). "Preparation of methacrylic acid " Patent. United States Patent 3666805.
- Vollbrecht, D. und Schlegel, H. G. (1978). "Excretion of metabolites by hydrogen bacteria - 2. Influences of aeration, pH, temperature, and age of cells." *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **6**(2): 157-166.
- Wang, D., Li, Q. A., Mao, Y., Xing, J. M. und Su, Z. G. (2010). "High-level succinic acid production and yield by lactose-induced expression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *ptsG* mutant *Escherichia coli*." *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**(6): 2025-2035.
- Wang, D., Li, Q. A., Song, Z. Y., Zhou, W., Su, Z. G. und Xing, J. M. (2011a). "High cell density fermentation via a metabolically engineered *Escherichia coli* for the enhanced production of succinic acid." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **86**(4): 512-518.
- Wang, J., Gilles, E. D., Lengeler, J. W. und Jahreis, K. (2001). "Modeling of inducer exclusion and catabolite repression based on a PTS-dependent sucrose and non-PTS-dependent glycerol transport systems in *Escherichia coli* K-12 and its experimental verification." *Journal of Biotechnology* **92**(2): 133-158.
- Wang, J., Zhu, J., Bennett, G. N. und San, K.-Y. (2011b). "Succinate production from different carbon sources under anaerobic conditions by metabolic engineered *Escherichia coli* strains." *Metabolic Engineering* **13**(3): 328-335.
- Wang, Q. Z., Chen, X., Yang, Y. D. und Zhao, X. M. (2006). "Genome-scale in silico aided metabolic analysis and flux comparisons of *Escherichia coli* to improve succinate production." *Applied Microbiology and Biotechnology* **73**(4): 887-894.
- Welch, R. A. (2006). "The Genus *Escherichia*" in "The Prokaryotes." M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer and E. Stackebrandt. Heidelberg, Springer. **6**: 60-71.
- Wendisch, V. F., Bott, M. und Eikmanns, B. J. (2006). "Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids." *Current Opinion in Microbiology* **9**(3): 268-274.
- Werpy, T. und Petersen, G. (2004). "Top value added chemicals from biomass." <http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/35523.pdf>. Abgerufen am 20.05.2011.
- Weuster-Botz, D. (2000). "Experimental design for fermentation media development: Statistical design or global random search?" *Journal of Bioscience and Bioengineering* **90**(5): 473-483.
- Weuster-Botz, D. (2006). "Mikro-Bioverfahrenstechnik." *Chemie Ingenieur Technik* **78**(3): 256-260.

- Weuster-Botz, D., Altenbach-Rehm, J. und Arnold, M. (2001). "Parallel substrate feeding and pH-control in shaking-flasks." *Biochemical Engineering Journal* **7**(2): 163-170.
- Weuster-Botz, D., Hekmat, D., Puskeiler, R. und Franco-Lara, E. (2007). "Enabling technologies: Fermentation and downstream processing" in "White biotechnology." Heidelberg, Springer-Verlag. **105**: 205-247.
- Weuster-Botz, D., Puskeiler, R., Kusterer, A., Kaufmann, K., John, G. T. und Arnold, M. (2005). "Methods and milliliter scale devices for high-throughput bioprocess design." *Bioprocess and Biosystems Engineering* **28**(2): 109-119.
- Wilde, E. (1962). "Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von *Hydrogenomonas*." *Archives of Microbiology* **43**(2): 109-137.
- Willke, T. und Vorlop, K. D. (2004). "Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry." *Applied Microbiology and Biotechnology* **66**(2): 131-142.
- Wohl, R. C. und Markus, G. (1972). "Phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli*: Purification and some properties." *Journal of Biological Chemistry* **247**(18): 5785-5792.
- Wu, H., Li, Z. M., Zhou, L., Xie, J. L. und Ye, Q. (2009). "Enhanced anaerobic succinic acid production by *Escherichia coli* NZN111 aerobically grown on gluconeogenic carbon sources." *Enzyme and Microbial Technology* **44**(3): 165-169.
- Wu, H., Li, Z. M., Zhou, L. und Ye, Q. (2007). "Improved succinic acid production in the anaerobic culture of an *Escherichia coli* *pflB* *ldhA* double mutant as a result of enhanced anaerobic activities in the preceding aerobic culture." *Applied and Environmental Microbiology* **73**(24): 7837-7843.
- Xi, Y.-l., Chen, K.-q., Li, J., Fang, X.-j., Zheng, X.-y., Sui, S.-s., Jiang, M. und Wei, P. (2011). "Optimization of culture conditions in CO<sub>2</sub> fixation for succinic acid production using *Actinobacillus succinogenes*." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. DOI: 10.1007/s10295-011-0952-5.
- Xu, B., Jahic, M., Blomsten, G. und Enfors, S. O. (1999a). "Glucose overflow metabolism and mixed-acid fermentation in aerobic large-scale fed-batch processes with *Escherichia coli*." *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**(5): 564-571.
- Xu, B., Jahic, M. und Enfors, S. O. (1999b). "Modeling of overflow metabolism in batch and fed-batch cultures of *Escherichia coli*." *Biotechnology Progress* **15**(1): 81-90.
- Yazdani, S. S. und Gonzalez, R. (2007). "Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry." *Current Opinion in Biotechnology* **18**(3): 213-219.
- Yazdani, S. S. und Gonzalez, R. (2008). "Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products." *Metabolic Engineering* **10**(6): 340-351.
- Yu, C., Cao, Y. J., Zou, H. B. und Xian, M. (2011). "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biotechnological production of high-value organic acids and alcohols." *Applied Microbiology and Biotechnology* **89**(3): 573-583.

- 
- Zeikus, J. G., Jain, M. K. und Elankovan, P. (1999). "Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products." *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**(5): 545-552.
- Zhang, X. L., Jantama, K., Moore, J. C., Jarboe, L. R., Shanmugam, K. T. und Ingram, L. O. (2009). "Metabolic evolution of energy-conserving pathways for succinate production in *Escherichia coli*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(48): 20180-20185.



## 10 Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

$\epsilon$	Molarer Extinktionskoeffizient, L mmol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
$\mu$	spezifische Wachstumsrate, h <sup>-1</sup>
$\rho$	Dichte, g L <sup>-1</sup>
$\Phi$	Phase/Phasenverschiebung
$\Phi_0/\Phi_{100}$	Zu bestimmende Koeffizienten (pO <sub>2</sub> -Sensor Kalibrierung)
$\Phi_{\min}/\Phi_{\max}/\text{pH}_0/\text{dpH}$	Zu bestimmende Koeffizienten (pH-Sensor Kalibrierung)
$\Psi$	Volumenanteil, %
2-HIB-CoA	2-Hydroxyisobutyryl-CoA
(R)-3-HB-CoA	(R)-3-Hydroxybutyryl-CoA
A	Extinktion
ACH-Verfahren	Acetoncyanhydrin-Verfahren
<i>ack-pta</i>	Acetatkinase und Phosphotransacetylase (Gen)
<i>adhE</i>	Alkoholdehydrogenase (Gen)
ADP, ATP	Adenosindiphosphat, Adenosintriphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ArcA	Globaler Regulator
bp	Basenpaar(e)
BTM	Biotrockenmassekonzentration, g L <sup>-1</sup>
c	Konzentration, g L <sup>-1</sup> /mol L <sup>-1</sup>
CAS	Chemical Abstracts Service
CID	PubChem Compound Identification
<i>citZ</i>	Citrat Synthase (Gen)
Cm <sup>R</sup>	Chloramphenicolresistenz
CoA	Coenzym A
<i>csc</i>	Saccharose Operon mit den Genen <i>cscA</i> , <i>cscB</i> und <i>cscK</i>

<i>cscA</i>	Saccharose Invertase (Gen)
<i>cscB</i>	Saccharose/H <sup>+</sup> Symporter (Gen)
<i>cscK</i>	Fructosekinase (Gen)
<i>cscR</i>	Repressor des <i>csc</i> Operons (Gen)
DLR	“Dual-Lifetime-Referencing”
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP-Mix	Mischung aus Desoxynukleotiden (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
DTNB	5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure
EA <sub>x</sub>	Spezifische Aktivität, $\mu\text{mol mg}_{\text{BTM}}^{-1} \text{min}^{-1} / \text{U mg}_{\text{BTM}}^{-1}$
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
F <sup>-</sup> λ <sup>-</sup>	ohne F-Plasmid, ohne λ-Prophage
<i>fdhF</i>	Formiat Dehydrogenase (Gen)
FNR	Globaler Regulator
<i>focA</i>	Formiat Transporter (Gen)
<i>frd</i>	Fumarat-Reduktase (mehrere Gene)
<i>galP</i>	Galactose MFS Transporter (Gen)
GTPase	Guaninnukleotid-bindendes Protein
<i>hcmA</i>	Untereinheit der 2-Hydroxyisobutyryl-CoA Mutase (Gen)
<i>hcmB</i>	Untereinheit der 2-Hydroxyisobutyryl-CoA Mutase (Gen)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
<i>iclR</i>	Repressor des <i>aceBAK</i> Operons (Gen) / der Isocitrat Lyase
<i>icmA</i>	Untereinheit der 2-Hydroxyisobutyryl-CoA Mutase (Gen)
<i>icmB</i>	Untereinheit der 2-Hydroxyisobutyryl-CoA Mutase (Gen)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Km <sup>R</sup>	Kanamycinresistenz
K <sub>S</sub>	Halbsättigungskonstante, g L <sup>-1</sup>
<i>k<sub>L</sub>a</i>	Volumenbezogener Sauerstofftransportkoeffizient, s <sup>-1</sup>

---

I	Weglänge in einer Küvette, cm
LB-Medium	“Lysogeny broth” Medium
<i>ldhA</i>	Lactatdehydrogenase (Gen)
LED	Lichtemittierende Diode
M	Molekulargewicht, g mol <sup>-1</sup>
<i>maeA</i> , MaeA	NAD-abhängige Decarboxylierende Malatdehydrogenase (Gen, Protein)
<i>maeB</i> , MaeB	NADP-abhängige Decarboxylierende Malatdehydrogenase (Gen, Protein)
MCS	Polylinker, “Multiple Cloning Site”
<i>mdh</i>	Malat Dehydrogenase (Gen)
MeaB	Hilfsprotein zur Verbesserung der 2-Hydroxyisobutyryl-CoA Mutase Aktivität
MFS	Major-Facilitator-Superfamilie
<i>mgsA</i>	Methylglyoxalsynthase (Gen)
molC	Mol Kohlenstoff
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
$m_s$	spezifische Substrataufnahmerate für den Erhaltungsstoffwechsel, g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
NAD <sup>+</sup> , NADH, NAD	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidiert, reduziert, allgemein)
NADP <sup>+</sup> , NADPH, NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidiert, reduziert, allgemein)
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
OTR	Sauerstoffeintragsrate [mol m <sup>-3</sup> s <sup>-1</sup> ]
OUR	Sauerstoffaufnahmerate [mol m <sup>-3</sup> s <sup>-1</sup> ]
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
<i>pck</i> , Pck	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (Gen, Protein)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>pdh</i>	Pyruvatdehydrogenase-Komplex (mehrere Gene)

PEP	Phosphoenolpyruvat
<i>pflB/pflAB</i>	Pyruvat-Formiat Lyase (Gen)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
<i>phaA</i> , PhaA	β-Ketothiolase (Gen, Protein)
<i>phaB</i> , PhaB	Acetoacetyl-CoA Reduktase (Gen, Protein)
<i>phaC1</i> , PhaC1	PHB-Synthase (Gen, Protein)
PHB	Polyhydroxybuttersäure
P	Phosphat
P <sub>i</sub>	Anorganisches Phosphat
pK <sub>s</sub>	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
pO <sub>2</sub>	Gelöstsauerstoffkonzentration, %
<i>poxB</i>	Pyruvatoxidase (Gen)
<i>ppc</i> , Ppc	Phosphoenolpyruvatcarboxylase (Gen, Protein)
PTS	Phosphotransferasesystem
<i>ptsG</i>	Glucosespezifische Permease des Phosphotransferasesystems (Gen)
<i>pyc</i>	Pyruvatcarboxylase (Gen)
Q	volumetrische Bildungsrate, g L h <sup>-1</sup>
<i>q</i>	spezifische Aufnahme-/Bildungsrate, g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> /mol mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
<i>r</i>	Reaktionsgeschwindigkeit, g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> /mol L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
RQ	Respiratorischer Quotient, mol <sub>CO2</sub> mol <sub>O2</sub> <sup>-1</sup>
<i>sbm</i>	Methylmalonyl-CoA Mutase (Gen)
<i>scr</i>	Saccharose Operon mit den Genen <i>scrA</i> , <i>scrB</i> , <i>scrK</i> und <i>scrY</i>
<i>scrA</i>	Saccharosespezifisches Phosphotransferasesystem (Gen)
<i>scrB</i>	Saccharose-6-phosphat Invertase (Gen)
<i>scrK</i>	Fructosekinase (Gen)
<i>scrR</i>	Repressor des <i>scr</i> Operons (Gen)
<i>scrY</i>	Saccharose Permease (Gen)



<i>scpA</i>	Methylmalonyl-CoA Mutase (Gen)
<i>scpB</i>	Methylmalonyl-CoA Decarboxylase (Gen)
<i>sdh</i>	Succinat-Dehydrogenase (mehrere Gene)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>sucC</i>	$\beta$ -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase (Gen)
<i>sucD</i>	$\alpha$ -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase (Gen)
t	Zeit, s/min/h
Taq-DNA-Polymerase	DNA-abhängige DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid
UV	Ultraviolette Strahlung
$\dot{V}$	Volumenstrom, L h <sup>-1</sup>
V	Volumen
vvm	Belüftungsvolumenstrom pro Volumen Kultivierungsbrühe
<i>ygfD</i>	YgfD-Protein, genaue Funktion unbekannt (Gen)
<i>ygfG</i>	Methylmalonyl-CoA Decarboxylase (Gen)
Y	Ausbeute

### Allgemein verwendete Indizes

*	integral oder „Phasengrenze“ (bei Konzentrationsgradienten in einer Phasengrenzfläche)
0	Zeitpunkt t = 0
600	600 nm
aus	ausgehend
BTM	Biotrockenmasse
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid

ein	eingehend
Frc	Fructose
Glc	Glucose
i	Komponente i
ind	Indikator
l	flüssig
m	Superposition
max	maximal
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
P	Produkt
Pr	Probe
R	Reaktor
ref	Referenz
T	gesamt, total
S	Substrat
Scr	Saccharose
set	eingestellt
Suc	Bernsteinsäure
X	Biomasse

## 11 Anhang

### 11.1 *Escherichia coli* zur Produktion von Bernsteinsäure

Tabelle 11-1: Zusammenstellung der verwendeten Wirtsorganismen für die Bernsteinsäureproduktion. Die verwendeten Kurzbezeichnungen sowie der jeweilige Genotyp sind aufgelistet.

Kurzbezeichnung	Genotyp
<i>E. coli</i> (wt)	<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655
<i>E. coli</i> $\Delta 3$	<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655 $\Delta IdhA \Delta adhE \Delta ack-pta$
<i>E. coli</i> $\Delta 4\Delta ptsG::scr$	<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655 $\Delta IdhA \Delta adhE \Delta ack-pta \Delta ygfG \Delta ptsG::Scr$ Operon

Tabelle 11-2: Zusammenstellung der transformierten Organismen für die Bernsteinsäureproduktion. Die verwendeten Kurzbezeichnungen, die enthaltenen Vektoren (vergleiche. Tabelle 11-3), sowie das entsprechende Substrat sind aufgelistet.

Kurzbezeichnung	Vektoren	Substrat
<i>E. coli</i> $\Delta 3$ pyc_Cg	pEC-XC99E::pyc_Cg	Glucose
<i>E. coli</i> $\Delta 4\Delta ptsG::scr$ pyc_Cg	pEC-XC99E::pyc_Cg	Saccharose
<i>E. coli</i> $\Delta 4\Delta ptsG::scr$ pyc_LI	pEC-XC99E::pyc_LI	Saccharose
<i>E. coli</i> $\Delta 4\Delta ptsG::scr$ pyc_Re	pEC-XC99E::pyc_Re	Saccharose
<i>E. coli</i> $\Delta 4\Delta ptsG::scr$ pck	pEC-XC99E::pck	Saccharose
<i>E. coli</i> $\Delta 4\Delta ptsG::scr$ ppc	pEC-XC99E::ppc	Saccharose
<i>E. coli</i> $\Delta 4\Delta ptsG::scr$ maeA	pEC-XC99E::maeA	Saccharose
<i>E. coli</i> $\Delta 4\Delta ptsG::scr$ maeB	pEC-XC99E::maeB	Saccharose
<i>E. coli</i> wt csc/pck	pCOLADuet-1::csc, pEC-XC99E::pck	Saccharose
<i>E. coli</i> wt csc/ppc	pCOLADuet-1::csc, pEC-XC99E::ppc	Saccharose
<i>E. coli</i> wt csc/maeA	pCOLADuet-1::csc, pEC-XC99E::maeA	Saccharose
<i>E. coli</i> wt csc/maeB	pCOLADuet-1::csc, pEC-XC99E::maeB	Saccharose
<i>E. coli</i> wt csc/pyc_Cg	pCOLADuet-1::csc, pEC-XC99E::Pyc_Cg	Saccharose
<i>E. coli</i> wt scr/maeA	pCOLADuet-1::scr, pEC-XC99E::maeA	Saccharose

Tabelle 11-3: Zusammenstellung der verwendeten Plasmide. Die Bezeichnung, die kodierten Proteine, die Promotoren und die vermittelte Resistenz sowie der zugrunde liegende Klonierungsvektor und die für die Klonierung verwendeten Schnittstellen sind angegeben. Cm<sup>R</sup>/Km<sup>R</sup>: Resistenz gegen Chloramphenicol/Kanamycin zur Selektion.

Vektorbezeichnung	Attribute	Ursprungsvektor	Schnittstellen
pEC-XC99E::pyc_Cg	Pyruvatcarboxylase ( <i>Corynebacterium glutamicum</i> 13032), <i>trc</i> -Promoter, Cm <sup>R</sup>	pEC-XC99E	SacI/SbfI
pEC-XC99E::pyc_Ll	Pyruvatcarboxylase ( <i>Lactococcus lactis</i> ), <i>trc</i> -Promoter, Cm <sup>R</sup>	pEC-XC99E	SacI/PstI
pEC-XC99E::pyc_Re	Pyruvatcarboxylase ( <i>Rhizobium etli</i> ), <i>trc</i> -Promoter, Cm <sup>R</sup>	pEC-XC99E	SacI/PstI
pEC-XC99E::pck	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase ( <i>E. coli</i> K-12 MG1655), <i>trc</i> -Promoter, Cm <sup>R</sup>	pEC-XC99E	BamHI/SbfI
pEC-XC99E::ppc	Phosphoenolpyruvatcarboxylase ( <i>E. coli</i> K-12 MG1655), <i>trc</i> -Promoter, Cm <sup>R</sup>	pEC-XC99E	SacI/SbfI
pEC-XC99E::maeA	NAD-abhängige decarboxylierende Malatdehydrogenase ("Malatenzym", <i>E. coli</i> K-12 MG1655), <i>trc</i> -Promoter, Cm <sup>R</sup>	pEC-XC99E	SacI/SbfI
pEC-XC99E::maeB	NADP-abhängige decarboxylierende Malatdehydrogenase ("Malatenzym", <i>E. coli</i> K-12 MG1655), <i>trc</i> -Promoter, Cm <sup>R</sup>	pEC-XC99E	SacI/SbfI
pCOLADuet-1::csc	Saccharose Aufnahme- und Verwertungsoperon ohne Repressor („ <i>csc</i> Operon“, <i>E. coli</i> EC3132), Km <sup>R</sup>	pCOLADuet-1	NdeI/XhoI
pCOLADuet-1::scr	Saccharose Aufnahme- und Verwertungsoperon ohne Repressor („ <i>scr</i> Operon“, <i>Salmonella typhimurium</i> ), Km <sup>R</sup>	pCOLADuet-1	NcoI/NotI

Tabelle 11-4: Verwendete Oligonukleotide (Hersteller: Metabion GmbH)

Bezeichnung	Sequenz	Erwartete Fragmentgröße
Oligonukleotide für <i>pyc</i> Plasmide		
<i>pyc_C.glutamicum_l</i>	TTC TGA CCT CGA GCC GTA CT	193
<i>pyc_C.glutamicum_l</i>	AAC GGC TGC GTA GTT GTC TT	
<i>pyc_R.etli_l</i>	CGT GGT ATG CGT GTT ATT CG	241
<i>pyc_R.etli_l</i>	TCT GAT TAC GAC GCT GAA CG	
<i>pyc_L.lactis_l</i>	TAA CGT GAT CGC CAA TGA AA	214
<i>pyc_L.lactis_l</i>	CAG AAT GTT TTT GGC GGT TT	
Oligonukleotide für <i>ppc</i> , <i>pck</i> , <i>maeA</i> und <i>maeB</i> Plasmide		
<i>pck_l</i>	ATT CTC GAT CCG CGT AAC AC	193
<i>ppc_l</i>	GCC GTG GAT TGC AGA GTC TA	230
<i>maeA_l</i>	CAC CGA TGA GAT GCT GAT GT	296
<i>maeB_l</i>	AGC TCG GAA GGT GTG ACT GT	184
<i>pr_r</i> <sup>a</sup>	CTT CTC TCA TCC GCC AAA AC	
Oligonukleotide für <i>scr</i> und <i>csc</i> Plasmide		
<i>scr_for</i>	GCG GGC GAA GGA TAA CGA CGA G	279
<i>scr_rev</i>	GCC GGG GCA ACA GAC CAG TTT	
<i>csc_for</i>	GGC GCG AGG TGA AAA TGG GGA	347
<i>csc_rev</i>	CGA CCG CAT CCC CTA AAA CCC A	

a) Das Oligonukleotid *pr\_r* ist spezifisch für alle in dieser Kategorie aufgelisteten Plasmide.

## 11.2 Medien, Puffer und Lösungen

### 11.2.1 Medien

Tabelle 11-5: LB-Medium („lysogeny broth“, Konzentrationen in  $\text{g L}^{-1}$ ). Die Zugabe von Agar erfolgte für die Fertigung von LB-Agarplatten

Hefeextrakt	5
Pepton aus Casein	10
NaCl	5
Agar	14

Tabelle 11-6: Für die Kultivierung von *Cupriavidus necator* verwendetes Vorkulturmedium (Konzentrationen in  $\text{g L}^{-1}$ ).

Fructose	15
Hefeextrakt	10
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	3,6
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,5
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,006
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,02
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,0003
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,02
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,001
Kanamycinsulfat	0,3

Tabelle 11-7: Für die Kultivierung von *Cupriavidus necator* verwendete Medienvariationen (Konzentrationen in g L<sup>-1</sup>). Die Medien sind entsprechend den Kultivierungen in Kapitel 6.3 aufgelistet. Für die Wachstumsversuche im Milliliter- und Litermaßstab (Kapitel 6.1) sowie die Prozesscharakterisierung in Milliliter Rührkesselreaktoren (Kapitel 6.2) sind die Fußnoten zu beachten

Komponente	zweistufige Kultivierung		einstufige Kultivierung	
	Stufe 1	Stufe 2 <sup>a</sup>	komplexes Medium <sup>b</sup>	definiertes Medium
Fructose	40	40	40	40
Hefeextrakt	10	3	10	
Maisquellwasser (50 %)		5	0	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4	2	4	4
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,7	5	0,7	0,7
NaCl	0,1	0,1	0,1	0,1
Fe(III)-citrate	0,05	0,05	0,05	0,05
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5		8	8
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,0003	0,0003	0,0003	0,0003
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,02	0,02	0,02	0,02
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,001	0,001	0,001	0,001
Biotin	0,001	0,001	0,001	0,001
Thiaminhydrochlorid	0,001	0,001	0,001	0,001
Calciumpantothenat	0,001	0,001	0,001	0,001
Nicotinsäure	0,02	0,02	0,02	0,02
Vitamin B <sub>12</sub>		0,06	0,06	0,06
Kanamycinsulfat	0,3	0,3	0,3	0,3

a) Dieses Medium entspricht dem in Kapitel 6.2 verwendeten Medium für die Prozesscharakterisierung in Milliliter Rührkesselreaktoren. Bei einigen Experimenten wurde 0,3 mg L<sup>-1</sup> CoCl · 6 H<sub>2</sub>O zugegeben, was keinen Einfluss zeigte. Zudem wurde bei der in Abbildung 6-3 gezeigten Stammuntersuchung die Konzentration von MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O auf 0,7 g L<sup>-1</sup> reduziert sowie die Konzentrationen von (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> wie in den Ergebnissen gezeigt variiert. Im Falle von 0 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde 10 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O zugegeben.

b) Bei den in Kapitel 6.1 gezeigten vergleichenden Wachstumsversuchen wurde das komplexe Medium durch Konzentrationsänderungen von Hefeextrakt, Maisquellwasser und (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> im Milliliter- sowie Litermaßstab entsprechend Tabelle 6-1 modifiziert.

Tabelle 11-8: Zusammensetzung des modifizierten M9-Mediums (abgeleitet von (Sambrook 2001)) und des definierten Mediums für die Kultivierung von *E. coli*.

Komponente	Modifiziertes M9-Medium	Definiertes Medium
Saccharose/Glucose <sup>a</sup>	20-40 g L <sup>-1</sup>	5 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	10 g L <sup>-1</sup>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,8 g L <sup>-1</sup>	
NaCl	0,5 g L <sup>-1</sup>	
NH <sub>4</sub> Cl	1 g L <sup>-1</sup>	0,2 g L <sup>-1</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		2 g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g L <sup>-1</sup>	3,25 g L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		2,5 g L <sup>-1</sup>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O		1,7 g L <sup>-1</sup>
MOPS <sup>b</sup>	0-42 g L <sup>-1</sup>	
MgSO <sub>4</sub>	0,25 g L <sup>-1</sup>	1 g L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub>	0,1 mM	
Spurenelementlösung		2 mL L <sup>-1</sup>
MEM Vitaminlösung	10 mL L <sup>-1</sup>	10 mL L <sup>-1</sup>
Biotin	0,2 mg L <sup>-1</sup>	0,2 mg L <sup>-1</sup>
IPTG <sup>c</sup>	0-1 mM	0,5 mM
Chloramphenicol/Kanamycin <sup>d</sup>	25-50 mg L <sup>-1</sup>	50 mg L <sup>-1</sup>

a) Sofern nicht in den Ergebnissen anders angegeben, betrug die Substratkonzentration im modifizierten M9-Medium 20 g L<sup>-1</sup>.

b) Die Zugabe von MOPS im modifizierten M9-Medium erfolgte stets in Schüttelkolbenkulturen und in Experimenten, bei denen keine pH Kontrolle erfolgte (Die Zugabe von MOPS ist entsprechend in den Ergebnissen gekennzeichnet).

c) Sofern nicht anders angegeben, betrug die IPTG Konzentration 0,5 mM.

d) Antibiotika wurden nur bei vorhandener Resistenz zugegeben (25 mg L<sup>-1</sup> bei der Verwendung von zwei Antibiotika sowie 50 mg L<sup>-1</sup> bei der Verwendung eines Antibiotikums).



Tabelle 11-9: Spurenelementlösung des definierten Mediums für die Kultivierung von *E. coli*. (Konzentrationen in g L<sup>-1</sup>).

CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	5
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,25
CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,125
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1,25
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,875
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,0625
AlCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1,25
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,25
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	9,15

Tabelle 11-10: Zusammensetzung der MEM Vitaminlösung (Konzentrationen in g L<sup>-1</sup>, Vertrieb: Sigma-Aldrich).

Cholinchlorid	0,1
Folsäure	0,1
Myo-Inositol	0,2
Niacinamid	0,1
Calciumpantothenat	0,1
Pyridoxalhydrochlorid	0,1
Riboflavin	0,01
Thiaminhydrochlorid	0,1
NaCl	8
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2
KCl	0,2

### 11.2.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 11-11: Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, pH 7,4, Konzentrationen in g L<sup>-1</sup>).

NaCl	8
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24
KCl	0,2

Tabelle 11-12: Puffer für chemisch kompetente Zellen (TFB1 und TFB2).

Komponente	TFB1	TFB2
Kaliumacetat	30 mM	
RbCl	100 mM	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM	1 mM
MnCl <sub>2</sub>	50 mM	
Glycerin	30 % (v/v)	15 % (v/v)
MOPS		10 mM
pH (HAc bzw. NaOH)	5,8	6,5

Tabelle 11-13: TAE-Puffer (10x) für Agarose-Gelelektrophorese

Komponente	Konzentration
Tris-HCl (pH 8)	400 mM
EDTA	10 mM
Essigsäure 100 %	1,14 % (v/v)

Tabelle 11-14: Lämmli-Puffer (5x) für SDS-Gelelektrophorese.

Komponente	Konzentration
Tris-HCl pH 6,8	300 mM
Glycerin	50 % (v/v)
SDS	10 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	6 % (v/v)
Bromphenolblau	0,05 % (w/v)

Tabelle 11-15: Polyacrylamidgele für SDS-Gelelektrophorese.

Komponente	Sammelgel 3 %	Trenngel 10 %
Acrylamid, 40 % (w/v)	0,625 mL	2,5 mL
Sammelgelpuffer (2x)	2,5 mL	-
Trenngelpuffer (4x)	-	2,5 mL
Demin. H <sub>2</sub> O	1,875 mL	5,0 mL
APS, 10 % (w/v)	100 µL	100 µL
TEMED	10 µL	10 µL

Tabelle 11-16: Sammel- und Trenngelpuffer für SDS-Gelelektrophorese.

Komponente	Sammelgelpuffer (2x)	Trenngelpuffer (4x)
Tris-HCl	1,5 M, pH 8,8	250 mM pH 6,8
SDS	0,8 % (w/v)	0,4 % (w/v)

### 11.2.3 Enzyme, Standards und Kits

Tabelle 11-17: Verwendete Enzyme.

Enzym	Hersteller/Vertrieb
Taq-DNA-Polymerase (mit ThermoPol-Puffer und dNTPs)	New England Biolabs GmbH
Citrat Synthase (Schweineherz)	Sigma-Aldrich
Malatdehydrogenase (Hühnerbrust)	Sigma-Aldrich

Tabelle 11-18: DNA- und Proteinstandards.

Standard	Hersteller/Vertrieb
100 bp DNA-Leiter, extended	Carl Roth
Roti®-Mark Protein Standard	Carl Roth

## 11.3 Spezielle Laborgeräte

Tabelle 11-19: Paralleles Milliliter-Bioreaktorsystem.

Komponente	Hersteller/Vertrieb
Bioreaktorblock bioREACTOR	2mag, München
Rührer Kontrolleinheit	2mag, München
Gasmischstation MX4/1	DASGIP AG, Jülich
MULTIstar 400 W	Fryka Kältetechnik GmbH, Esslingen
Heizbad Gefäß Haake W15 mit Thermostat Haake C 10	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Pipettierroboter Freedom EVO	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Mikrotiterplatten Photometer infinite M200	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Mikrotiterplatten Waschstation Columbus Pro	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Sensorlesegeräte MCR 8pH 8oxygen v1	PreSens GmbH, Regensburg
Polystyrol Mini-Reaktoren HTBD	PreSens GmbH, Regensburg
150 L Vorratsbehälter und Abwasserbehälter	Schubert Kunststoff GmbH, München
Software	
Fedbatch-XP v.1.0.248	DASGIP AG, Jülich
FBXServer	DASGIP AG, Jülich
Gemini v.4.2.17.304	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Magellan v.6.1	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
LabVIEW	National Instruments, München

Tabelle 11-20: Rührkesselreaktorsystem im Litermaßstab.

Komponente	Hersteller/Vertrieb
Kontrolleinheit „Labfors 2“ mit Analogbox und Mas- sendurchflussregler für Gasversorgung	Infors, Einsbach
Reaktorgefäß mit Glasdoppelmantel zur Temperierung (Totalvolumen 7,5 L), Schikanenkorb mit drei Strö- mungsbrechern, drei 6-Blattscheibenrührern, mechanischer Gleitringdichtung, Obenantrieb, Abluft- kühler sowie Begasung über ein Begasungsrohr	Infors, Einsbach
pH-Prozesselektrode	Mettler-Toledo, Giessen
pO <sub>2</sub> - Prozesselektrode	Mettler-Toledo, Giessen
Abgasanalytik Easy Line	ABB, Frankfurt
Reaktorwaage QC35EDE-S	Sartorius, Göttingen
Peristaltische Pumpe BVP Standard mit Pumpenkopf Masterflex Easy-Load I	Ismatech Laboratoriumstechnik, Wertheim-Mondfeld
Waage für Zulauf/Korrekturmittel Scout Pro	Ohaus
Steuerungssoftware Iris-NT v.5.02.708.0997	Infors, Einsbach

Tabelle 11-21: HPLC-System.

Komponente	Hersteller/Vertrieb
Autosampler Midas Cool	Spark, Emmen
Manager Smartline 5000	Knauer, Berlin
Ofen Jet Stream	Knauer, Berlin
Pumpe Smartline 1000	Knauer, Berlin
RI-Detektor Smartline 2300	Knauer, Berlin
UV/VIS-Detektor LC 295	Perkin Elmer, Rodgau
Software Chromgate v.3.1	Knauer, Berlin
Vorsäule Micro-Guard Cation H Cartidge	Bio-Rad, München
Aminex HPX-87 H (300 x 7.8 mm)	Bio-Rad, München
TSKgel ODS-100V	Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart