

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

TUM School of Engineering and Design

**Reaktionstechnische Untersuchungen zur Reduktion
von D-Galakturonsäure zu L-Galaktonat
mit rekombinanten *Saccharomyces cerevisiae***

Jacqueline M. H. Wagner

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Engineering and Design der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Petra Mela

Prüfer*innen der Dissertation: 1. Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
2. Prof. Dr. Johan Philipp Benz

Die Dissertation wurde am 12.07.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Engineering and Design am 30.11.2021 angenommen.

“Auch aus Steinen, die dir in den Weg gelegt werden, kannst du etwas Schönes bauen.”

Erich Kästner

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München (TUM) unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz. Zu dieser Arbeit haben viele Personen auf unterschiedliche Weise beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle herzlichst bedanken möchte.

Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz danke ich für die Möglichkeit, ein sehr aktuelles, anwendungsorientiertes und interdisziplinäres Thema bearbeiten zu dürfen. Ihre ausgezeichnete Betreuung, stets konstruktive Kritik und die mir eingeräumten Freiräume zur Bearbeitung des Themas habe ich sehr zu schätzen gewusst. Herzlichen Dank dafür!

Vielen Dank an Philipp Benz sowie Petra Mela für die Übernahme der jeweiligen Aufgaben als Korreferent sowie als Prüfungsvorsitzende.

Auch bei den Projektpartnern des "PRO-SUGAR"-Projekts, Dr. Mislav Oreb und Simon Harth (Institut für Molekulare Biowissenschaften, Goethe-Universität Frankfurt a. M.) sowie Kevin Schmitz und Prof. Philipp Benz (Professur für Pilzbiotechnologie in der Holzwissenschaft, TUM) möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit im Projekt, den stets offenen Wissensaustausch und die Diskussionen bedanken.

Besonderer Dank gilt Dominik Schäfer, meinem Projektpartner am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik und Bürokollegen, nicht nur für die ausgezeichnete Zusammenarbeit im Projekt, sondern auch für das hervorragende Arbeitsklima(gerät) im Büro und im Labor und deine immerwährende Motivation.

Jana, Lukas, Christina, Lorenz und Melanie möchte ich für die vielseitige Unterstützung im Labor danken.

Vielen Dank an Anton, Anna und Mama für die gründliche und kritische Korrektur dieser Arbeit.

Ich möchte natürlich auch allen (ehemaligen) Festangestellten - Ellen, Marlene, Patrick, Markus, Norbert - für die Hilfe bei bürokratischen und sonstigen Problemen danken und die immer wieder sehr kurzweiligen Pläuschchen.

Mein ganz besonderer Dank geht an alle früheren und jetzigen Kollegen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik für den Zusammenhalt, die gegenseitige Unterstützung und

vor allem für eure Freundschaft. Ihr habt für mich die Zeit am Lehrstuhl unvergesslich gemacht und mich immer wieder motiviert, weiter zu machen!

Vielen Dank an meine Studienfreundinnen Isi, Katha und Tami, mit denen ich das lange Auf und Ab seit Beginn des Studiums bis zur Promotion gemeinsam durchgestanden habe. Danke für eure Freundschaft.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Freund für die Geduld, den bedingungslosen Rückhalt und die entgegengebrachte Unterstützung während der vergangenen Jahre bedanken. Danke, dass ihr immer für mich da seid!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Problemstellung und Zielsetzung	3
3	Theoretischer Hintergrund	9
3.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
3.1.1	Biologische Grundlagen	10
3.1.2	Zentraler Kohlenstoffwechsel	12
3.1.3	Biotechnologische Anwendung von <i>S. cerevisiae</i>	20
3.2	Überblick und Zusammensetzung agroindustrieller Reststoffe	22
3.2.1	Hydrolyse agroindustrieller Reststoffe	23
3.2.2	Zusammensetzung pektinreicher Reststoffe	24
3.3	Biokatalytische Prozesse	28
3.3.1	Biotransformation mit isolierten Enzymen	28
3.3.2	Biotransformation mit Ganzzellbiokatalysatoren	30
3.3.3	<i>S. cerevisiae</i> als Biokatalysator zur Reduktion von D-GalA	32
4	Material und Methoden	35
4.1	Stamm und Stammhaltung	35
4.1.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stämme	35
4.1.2	Reaktionsmedien	42
4.1.3	Stammhaltung	44
4.2	Kultivierung und Biotransformation mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
4.2.1	Vorkulturherstellung	44
4.2.2	Satzverfahren in Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab	44
4.2.3	Satzverfahren in Rührkesselreaktoren im Liter-Maßstab	46
4.2.4	Kohlenstoffbilanz	52
4.3	Analytische Methoden	53
4.3.1	Bestimmung der Zellkonzentration	53
4.3.2	Bestimmung von Substrat- und Produktkonzentrationen	55
4.3.3	Bestimmung der Enzymaktivität in Zellysat	56
5	Ergebnisse und Diskussion	59
5.1	Charakterisierung des Basisstamms	59
5.2	Biotransformationen mit Glukose als Co-Substrat	62
5.2.1	Vergleich unterschiedlicher Stämme	62

5.2.2	Effekt von D-GalA auf das Wachstum	76
5.3	Biotransformation mit Sorbitol als Co-Substrat	80
5.3.1	Vergleich unterschiedlicher Stämme	80
5.3.2	Biotransformationen bei unterschiedlichem pH	86
5.3.3	Biotransformation mit unterschiedlichen Sorbitolkonzentrationen	88
5.3.4	Nachdosierung von Sorbitol	92
5.3.5	Variation der Medienzusammensetzung	95
5.3.6	Zusammenführung der Ergebnisse	99
5.4	Biotransformationen mit Hydrolysat aus Zuckerrübenschnitzeln	103
5.4.1	Voruntersuchungen mit Glukose und Sorbitol als Co-Substrate	103
5.4.2	Untersuchungen zu Inhibierung von Hydrolysatbestandteilen	106
5.4.3	Biotransformation mit geklärtem Zuckerrübenschnitzelhydrolysat	109
5.4.4	Biotransformation mit ungeklärtem Zuckerrübenschnitzelhydrolysat	112
6	Zusammenfassung	119
7	Ausblick	125
8	Literaturverzeichnis	127
	Abbildungsverzeichnis	149
	Tabellenverzeichnis	153
9	Anhang	159
9.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	159
9.2	Geräte	162
9.3	Medien, Puffer und Medienzusätze	165
9.4	Datenanhänge	170

1 Einleitung

Die wirtschaftliche Nutzung fossiler Rohstoffe im 21. Jahrhundert wird zunehmend in Frage gestellt durch globale Herausforderungen wie Klimawandel, zunehmende Umweltbelastung und die Verknappung endlicher Ressourcen (Baral und Malins 2014, Turley et al. 2013). Die Nutzung nachwachsender Rohstoffe beispielsweise für die Herstellung von Biokraftstoffen aus Raps steht allerdings flächennutzungsmäßig in direkter Konkurrenz zur Nahrungsmittel produzierenden Industrie. Hinsichtlich der Sicherung der Welternährung kann deswegen die Biomasse "erster Generation" nicht die Lösung für eine nachhaltige, biobasierte Bioökonomie sein (Singhania et al. 2017). Pflanzliche Reststoffe, welche in großen Mengen in der Landwirtschaft und der Lebensmittel verarbeitenden Industrie anfallen, könnten diese Lücke schließen. Mit der Verwertung von Agrarreststoffen ist eine Wertschöpfung ohne Konkurrenz zum Lebensmittelsektor möglich. Einige pflanzliche Reststoffe, wie beispielsweise Stroh, werden bereits als Biomasse der "zweiten Generation" in Bioraffinerien durch mikrobielle Umsetzung zu biobasierten Produkten genutzt (Pandiyan et al. 2019). Besonders in Hinblick auf die Komplexität von Pflanzenreststoffen, welche unterschiedliche vernetzte und funktionalisierte Zuckerpolymer darstellen, kann der gezielte Einsatz von Enzymen ähnlich hohe Ausbeuten an Zuckermonomeren erzielen wie herkömmliche hydrolytischen Verfahren (Singhania et al. 2017). Die freigesetzten Zucker können anschließend in weiteren Prozessen mit Mikroorganismen umgesetzt werden, um nachhaltig und mit ökologischem Mehrwert Plattformchemikalien (Ethanol, organische Säuren) oder bereits unterschiedliche Produkte - Feinchemikalien, Biopolymere oder Biokraftstoffe - zu produzieren (Straathof et al. 2002, Woodley 2019). Damit eine zur herkömmlichen industriellen Synthese konkurrenzfähige biotechnologische Produktion entsteht, ist es von zentraler Bedeutung, effiziente Produktionsstämme zu entwickeln, welche vorhandene Zucker mit hoher Produktausbeute metabolisieren. Für eine gesamtwirtschaftliche Betrachtung müssen zusätzlich effiziente Produktreinigungsverfahren entwickelt werden, da hier der größte Anteil der Kosten biotechnologischer Prozesse entsteht (Straathof 2011).

2 Problemstellung und Zielsetzung

Agrarreststoffe können zur Produktion hochwertiger Produkte mit Mikroorganismen genutzt werden, was Prozesse ressourcenschonend, umweltfreundlich und damit nachhaltig macht (Martins et al. 2021). Pektinreiche Reststoffe, wie beispielsweise Zuckerrübenschnitzel, zeichnen sich durch einen geringeren Lignin-Gehalt im Vergleich zu anderen Reststoffen aus und können deswegen deutlich besser durch Mikroorganismen genutzt werden (Martins et al. 2020). Pektin kommt hauptsächlich in Pflanzenzellwänden vor und ist ein komplexes Polysaccharid (Xiao et al. 2013), dessen Rückgrat zu 70 % aus 1,4-glykosidisch verlinkten D-Galakturonsäureeinheiten besteht (Mohnen 2008, Schmitz et al. 2019). Durch unterschiedliche Vorbehandlung pektinreicher Reststoffe entstehen Hydrolysate, welche vor allem D-Galakturonsäure (D-GalA) und andere Zucker wie beispielsweise Glukose und Arabinose enthalten (Leijdekkers et al. 2013).

Ein großes Problem bei der Verwendung von Hydrolysaten ist jedoch, dass deren Zusammensetzung stark von den verwendeten Agrarreststoffen und Vorbehandlungs- und Hydrolysebedingungen abhängt (Martins et al. 2020). Vor allem wachstumshemmende Verbindungen, beispielsweise schwache Säuren wie D-GalA oder Acetat, Furanderivate und phenolische Verbindungen, können mikrobielles Wachstum und Produktausbeuten beeinflussen (Da Silva und Chandel 2012, Günan Yücel und Aksu 2015, Jeong et al. 2021, Vendruscolo et al. 2008). Auch wenn die Toxizität der einzelnen Verbindungen für die Organismen nur gering ist, können sie in Kombination additiv oder sogar synergistisch negativ wirken (Teixeira et al. 2011). Um eine Nutzung von hydrolysierten pektinreichen Reststoffen zu ermöglichen, müssen deswegen Inhibitoren in Hydrolysaten identifiziert und reduziert werden.

Schimmelpilze bauen nativ Pektine und die darin enthaltenen Zucker ab. L-Galaktonat (L-GalOA) ist das erste Stoffwechselprodukt des D-GalA-Katabolismus. Dieser erste Schritt ist eine Reduktion von D-GalA, bei der Elektronen auf einen Cofaktor (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat), NAD(P)H) übertragen werden, um L-GalOA zu bilden. Die ähnlichen chemischen Eigenschaften zur bereits industriell genutzten Gluconsäure (E 574) machen L-GalOA zu einem interessanten Zielprodukt. In der Lebensmittelindustrie kann L-GalOA als künstlicher Säureregulator oder als Calciumsalz ähnlich zu Calciumgluconat (E578) als Stabilisator verwendet werden (Kuivanen et al. 2012). Die spontane Hydrolyse von L-GalOA im Säuern führt außerdem zum Entstehen von Galaktono-1,4-lakton (GgL) (Kuivanen et al. 2012). Die laktonisierte Form ist dem in-

dustriell bereits genutzten Glucono- γ -Lakton (E575) chemisch ähnlich. Dieses hat seinen Einsatzbereich in der Lebensmittelindustrie, beispielsweise als Backtriebmittel, wo es erst unter Wärmezufuhr, also während des Backvorgangs, mit Natriumhydrogencarbonat zum Natriumlactatgluconat und Kohlenstoffdioxid reagiert (OECD 2004). GgL ist zudem ein Vorläufermolekül im L-Ascorbinsäure-Anabolismus (Csiba et al. 1993), womit sich eine weitere potentielle Anwendung von GgL eröffnet. Hinsichtlich der industriellen Anwendung der Produkte ist eine vollständige Umsetzung von D-GalA zu L-GalOA und GgL anzustreben, um die kostenintensive Trennung von D-GalA und L-GalOA zu vermeiden, welche sich durch sehr ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften ergibt (Kuivanen et al. 2014).

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*) gilt als mikrobielles Arbeitspferd der Bioindustrie (Hong und Nielsen 2012, Nielsen und Arneborg 2007) und übertrifft Schimmelpilze in mehrerlei Hinsicht. *S. cerevisiae* ist nicht nur einfacher genetisch manipulierbar, auch hohe Wachstumsraten und folglich kürzere Prozesszeiten senken Betriebskosten industrieller Bioprozesse. Gleichzeitig minimiert die Bildung von wiederverwertbarem Ethanol das Risiko möglicher Kontaminationen durch andere Mikroben (van Maris et al. 2006). Die Toleranz von *S. cerevisiae* gegenüber schwachen Säuren ist vor allem in Hinblick auf die Nutzung von Hydrolysaten interessant. Die Mehrzahl der bisherigen Studien zur Nutzung von D-GalA mit rekombinanten *S. cerevisiae* verfolgten nicht die Umsetzung von D-GalA zu L-GalOA, sondern entweder eine ganzheitliche Verwertung von Zuckern aus Pektinhydrolysaten (Jeong et al. 2020) oder die Bildung unterschiedlicher Produkte wie Ethanol oder Schleimsäure (Biz et al. 2016, van Maris et al. 2006, Protzko et al. 2018). Benz et al. (2014) zeigte in Schüttelkolbenexperimenten, dass mit der heterologen Expression eines D-GalA-Transporters aus *Neurospora crassa* (*N. crassa*) (GAT-1) und einer D-GalA-Reduktase aus *Aspergillus niger* (*A. niger*) (GAAA) in *S. cerevisiae* eine Umsetzung von D-GalA zu L-GalOA grundsätzlich möglich ist. Die Umsetzung war jedoch nicht vollständig, zeigte geringe finale Produktkonzentrationen und die Regenerierung des Cofaktors wurde als Flaschenhals der Reduktion identifiziert (Benz et al. 2014).

Substrat und reduzierter Cofaktor werden bei der Reduktion von D-GalA in einem stöchiometrischen Verhältnis umgesetzt. Eine stöchiometrische Zugabe von Cofaktoren zu Bioprozessen ist jedoch unökonomisch, da diese teuer sind. Daher werden hier üblicherweise verschiedene Methoden zur Cofaktor-Regenerierung eingesetzt. Neben der (elektro)chemischen Regenerierung (Holtmann und Kochius 2014, Wang et al. 2017) ist

die Enzym-gekoppelte Regenerierung weit verbreitet. Je nach Anwendungsfall können *in vitro* Systeme mit oder ohne immobilisierte Enzyme (Chen et al. 2020, Liu und Wang 2007, Mordhorst und Andexer 2020) und Ganzzellbiokatalysatoren angewendet werden (Bräutigam et al. 2009, Castiglione et al. 2017, Lin und Tao 2017). Ein einfacher Ansatz bei Ganzzellbiotransformationen ist die Nutzung von Reduktionsäquivalenten aus dem Zentralstoffwechsel.

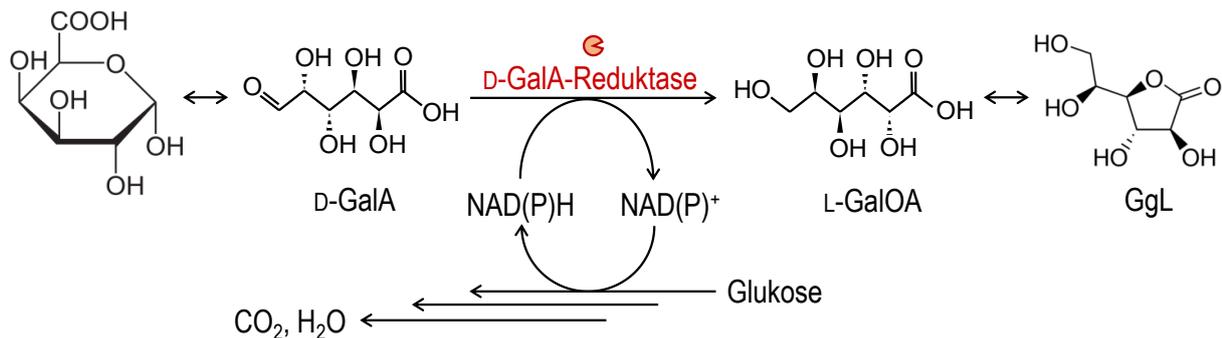


Abbildung 2.1: Cofaktor-Regenerierung für die Reduktion von D-GalA zu L-GalOA über den Zentralstoffwechsel von *S. cerevisiae* mit Glukose als Co-Substrat. Glukose wird über mehrere Schritte in der Glykolyse zu CO₂ und Wasser oxidiert. Die Reduktion von D-GalA erfolgt unter Verbrauch eines NAD(P)H durch die D-GalA-Reduktase zu L-GalOA, welches spontan oder im Sauren zu GgL umgewandelt wird.

Im Hinblick auf in Zuckerrübenschnitzelhydrolysaten vorkommende Zucker eignet sich Glukose als Co-Substrat, womit die Reduktion von D-GalA an den zentralen Kohlenstoffwechsel in Hefe gekoppelt werden kann, wenn zusätzlich Enzyme zur Reduktion von D-GalA in *S. cerevisiae* heterolog exprimiert werden (Abbildung 2.1). Hierfür kann die D-GalA-Reduktase aus *Aspergillus niger* (*A. niger*), AnGar1, verwendet werden (Kuivainen et al. 2016).

Neben der Nutzung eines Co-Substrats zur Cofaktor-Bereitstellung kann auch auf molekularbiologischer Ebene die Cofaktorverfügbarkeit in Ganzzellbiokatalysatoren erhöht werden. Schlüsselenzyme in Nebenstoffwechselwegen können beispielsweise ausgeschaltet werden, um eine Akkumulation von Cofaktoren in der Zelle zu erreichen (Chen et al. 2014, Liu et al. 2018). Auch eine Modifizierung des die Reaktion katalysierenden Enzyms zur Änderung der Cofaktorspezifität oder die gezielte Überexpression des

2 Problemstellung und Zielsetzung

Enzyme können zur Verbesserung von heterologen Reaktionen in Ganzzellbiokatalysatoren führen (Chen et al. 2014, Lin und Tao 2017, Wachtmeister und Rother 2016).

Häufig ist jedoch die Regenerierungskapazität des zentralen Stoffwechsels nicht ausreichend, um eine stöchiometrische Umsetzung von Substrat und Cofaktor zu gewährleisten (Liu et al. 2018).

Ein alternativer Ansatz ist die simultane Expression von Enzymen zur Regenerierung von Cofaktoren im Ganzzellbiokatalysator. Oxidoreduktasen wie beispielsweise Sorbitol-Dehydrogenasen eignen sich zur Regenerierung von Cofaktoren mit Sorbitol als Substrat (Chambers et al. 1978, Gauer et al. 2014). Diese nutzen entweder NAD^+ oder NADP^+ für die Oxidation von Sorbitol zu Fruktose (Abbildung 2.2) (Gauer et al. 2014, Napora et al. 2013). Der Vorteil ist, dass, anders als beim glykolytischen Abbau von Glukose als Co-Substrat, mit Sorbitol ein zusätzliches Molekül NAD(P)H im Vergleich zur Glykolyse generiert wird (Chambers et al. 1978, Sarthy et al. 1994). Nachteilig ist hingegen, dass ein zusätzliches Co-Substrat zugegeben werden muss.

S. cerevisiae besitzt zwar native, NAD^+ -verbrauchende SDH (Sarthy et al. 1994), diese vermitteln aber erst nach langer Verzögerungsphase Wachstum mit Sorbitol (Jordan et al. 2016). Eine Überexpression der nativen SDH Sor2 zusammen mit dem nativen Sorbitol-Transporter Hxt13 in *S. cerevisiae* ermöglichte gutes Wachstum von *S. cerevisiae* mit Sorbitol als einzige Kohlenstoffquelle (Jordan et al. 2016).

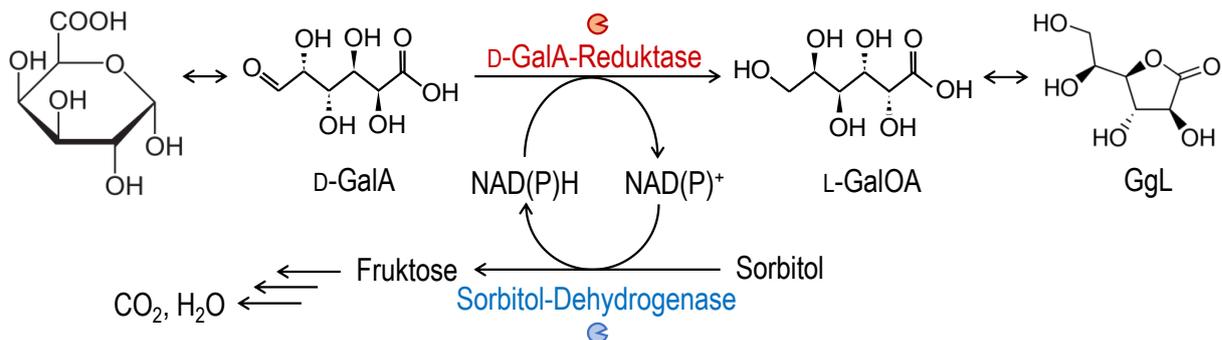


Abbildung 2.2: Cofaktor-Regenerierung für die Reduktion von D-GalA zu L-GalOA über eine Sorbitol-Dehydrogenase als Regenerierungsenzym mit Sorbitol als Co-Substrat. Sorbitol wird unter Bildung eines NAD(P)H zu Fruktose oxidiert, welches glykolytisch zu CO_2 und Wasser abgebaut wird. Damit wird ein zusätzliches Cofaktor-Molekül im Vergleich zur Glykolyse generiert (Sarthy et al. 1994). Die Reduktion von D-GalA erfolgt unter Verbrauch eines NAD(P)H durch die D-GalA-Reduktase zu L-GalOA.

Zur Umsetzung beider Strategien, Cofaktor-Regenerierung über den Zentralstoffwechsel (Abbildung 2.1) und der Cofaktor-Regenerierung mit Sorbitol durch Expression einer SDH (Abbildung 2.2), werden unterschiedliche rekombinante *S. cerevisiae* Stämme vom Kooperationspartner (Goethe-Universität Frankfurt, Institut für Molekulare Biowissenschaften) verfügbar gemacht.

Unklar ist, in wie weit und in welchem Ausmaß diese Stämme geeignet sind, D-GalA in Zuckerrübenschnitzelhydrolysat effizient zu L-GalOA in einem skalierbaren biokatalytischen Verfahren umzusetzen.

Zur vergleichenden Charakterisierung der verschiedenen *S. cerevisiae* Stämme ist es daher zunächst sinnvoll, Satzprozesse mit definiertem Medium in vollständig kontrollierten Rührkesselreaktoren durchzuführen und Prozessbedingungen zu identifizieren, die eine möglichst vollständige Umsetzung von D-GalA in L-GalOA mit hoher Ausbeute in möglichst kurzer Prozesszeit ermöglichen.

Sobald ein hierzu geeignetes Biotransformationssystem charakterisiert und identifiziert ist, erfolgt die Übertragung auf die Nutzung von Zuckerrübenschnitzelhydrolysat.

Bereitgestellte Hydrolysate und darin enthaltene Zuckerrübenschnitzel sind thermisch vorbehandelt (Schäfer et al. 2020) und können durch unterschiedliche Hydrolysebedingungen Wachstumsinhibitoren für *S. cerevisiae* enthalten. Für die Nutzung von Zuckerrübenschnitzelhydrolysaten müssen deswegen zunächst inhibierende Komponenten für *S. cerevisiae* in bereitgestellten geklärten Hydrolysaten identifiziert werden.

Die Klärung von bereitgestellten Hydrolysaten erscheint zunächst notwendig, um Schimmelpilzbiomasse und residuale Feststoffe aus dem Hydrolysat zu entfernen, bevor die Reduktion von D-GalA mit rekombinanten Hefen stattfindet. Im Sinne einer Prozessvereinfachung durch Vermeidung von einzelnen Prozessschritten, wäre es aber auch abschließend von Interesse zu klären, ob die Nutzung von ungeklärtem Hydrolysat zur Reduktion von D-GalA zu L-GalOA mit rekombinanten Hefen prinzipiell möglich wäre.

3 Theoretischer Hintergrund

Dieses Kapitel gibt einen allgemeinen Überblick über die Verwertung von Agrarreststoffen und die Hefe *S. cerevisiae* sowie ihren zentralen Kohlen- und Energiestoffwechsel. Dabei wird ausführlicher auf die Verwendung von *S. cerevisiae* als Ganzzellbiokatalysator in der biotechnologischen Industrie eingegangen, speziell mit Fokus auf ihren Einsatz zur Produktion von L-GalOA und GgL aus pektinreichen Reststoffen.

3.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Hefen wurden schon früh in der Menschheitsgeschichte bei der Lebensmittelzubereitung verwendet. So gibt es Belege der alten Sumerer und Babylonier, die schon um 6000 vor Christus Bier mit Hefe brauten (Damerow 2011) oder aus dem alten Ägypten, wo Hefe beim Brotbacken verwendet wurde. Doch erst im siebzehnten Jahrhundert konnte Hefen dank Antonie Van Leeuwenhoek auch tatsächlich unter dem Mikroskop beobachtet werden. Den Namen "Saccharomyces" hat die bekannteste Hefe dem Deutschen Theodore Schwann zu verdanken, der ihre Bezeichnung als "Zuckerpilz" 1837 ins Lateinische übersetzte (Branduardi und Porro 2012). Über die Jahre erlangte *S. cerevisiae* große Bedeutung als experimenteller Organismus in der Wissenschaft, da der Eukaryot ein ideales System zur Erforschung von Zellarchitektur, Zellmechanismen und Stoffwechselwegen darstellt (Bergmeyer und Buchner 2012). Im April 1996 wurde dann das erste Mal die komplette genomische Sequenz eines Eukaryoten, nämlich *S. cerevisiae*, veröffentlicht (Goffeau et al. 1996). Die Entschlüsselung des Genoms ebnete den Weg für Forschung in den unterschiedlichsten Feldern, angefangen von humanmedizinischen bis hin zu wirtschaftlichen Fragestellungen (Botstein und Fink 2011). Die stetig wachsende "Saccharomyces Genome Database" (SGD) bietet mittlerweile eine Sammlung an wissenschaftlichen Informationen zu jedem bisher untersuchten Gen in *S. cerevisiae* und das Wissen über Gene, die anhand von *S. cerevisiae* Deletionsmutanten untersucht wurden, kann auch auf menschliche Krankheitsbilder übertragen werden (Branduardi und Porro 2012, Scherens und Goffeau 2004). Auch für industrielle Zwecke ist *S. cerevisiae* ein integraler Bestandteil der Forschung (Botstein und Fink 2011, Jouhten et al. 2016, Nandy und Srivastava 2018, Porro und Branduardi 2017, Żyłańczyk-duda et al. 2017). Neben der Bioethanolproduktion können durch "metabolic engineering" auch eine Vielzahl weiterer Produkte mit *S. cerevisiae* hergestellt werden (Edwards und Doran-Peterson 2012, Lin und Tanaka 2006, Mohd Azhar et al. 2017). Dabei ist *S. cerevisiae* oftmals der präferierte Organismus für die industrielle

Anwendung aufgrund seiner leichten genomische Manipulierbarkeit, hoher Stress- und Substrattoleranz und schnellen Wachstums (Çakar et al. 2012, Hong und Nielsen 2012, Sherman 1991). Über 2500 unterschiedliche Hefearten wurden bis 2005 beschrieben (Mohd Azhar et al. 2017), *S. cerevisiae* ist dabei die am besten erforschte (Flores et al. 2000).

3.1.1 Biologische Grundlagen

S. cerevisiae ist ein einzelliger Eukaryot, der sich durch Sprossung fortpflanzt (Bergmeyer und Buchner 2012). Als Eukaryot besitzt *S. cerevisiae* eine Zellwand, die das Zytoplasma und darin befindliche Kompartimente und Organellen umschließt. Zu diesen abgetrennten Reaktionsräumen zählen neben dem Golgi-Apparat, dem Endoplasmatischen Reticulum und den Peroxisomen auch die Mitochondrien. Hier findet neben der oxidativen Phosphorylierung zur aeroben Energiegewinnung auch die Oxidation von Pyruvat zu unterschiedlichen Intermediaten im Citratzyklus statt (Ratledge 1991). Im Gegensatz zu Prokaryoten sind die genetischen Informationen der Zelle als Chromosomen im Zellkern gespeichert (Dickinson und Schweizer 2004). Hefezellen können diploid (doppelter Chromosomensatz) oder haploid (einfacher Chromosomensatz) vorliegen. Die in dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae* Stämme CEN.PK2-1C und EBY.VW4000 sind beides haploide Stämme (Entian und Kötter 2007) und teilen sich mitotisch. Die Mutterzelle bildet dabei eine Ausstülpung oder Knospe (Cullen und Sprague 2002), welche als Tochterzelle zu einer ähnlichen Größe wie die Mutterzelle heranwächst (Abbildung 3.1).

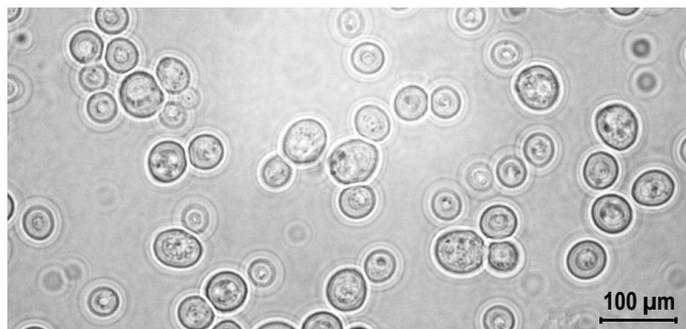


Abbildung 3.1: Lichtmikroskopische Aufnahme sprossender Hefezellen bei 100-facher Vergrößerung.

Nach mitotischer Zellteilung kommt es zur Abschnürung der Tochterzelle und damit Teilung der Hefezelle. Dabei kann es bereits vor der kompletten Zellteilung zur weiteren Sprossung von Mutter- und Tochterzelle kommen (Feldmann 2012). Diese Form der

asexuellen Zellteilung resultiert bei optimalen Wachstumsbedingungen in exponentiellem Wachstum. Für *S. cerevisiae* im Satzverfahren unter nicht limitierenden, jedoch begrenzten Nährstoffbedingungen (aber auch allgemeingültig für Mikroorganismen) ergibt sich eine typische Wachstumskurve (Weuster-Botz und Takors 2018). Auf eine Adaptionsphase der Zellen an die vorherrschenden Bedingungen (Verzögerungsphase, I) folgt die Übergangsphase (II) mit steigender Wachstumsrate, mit anschließender exponentieller Wachstumsphase (III). Bei unlimitierenden Bedingungen wachsen die Zellen mit einer maximalen spezifischen Wachstumsrate μ_{\max} . Die Wachstumsrate μ ist definiert als:

$$\mu = \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_X}{dt} \quad (3.1)$$

- μ spezifische Wachstumsrate, h^{-1}
- c_X Biomassekonzentration, $g L^{-1}$
- t Zeit, h

Bei unlimitiertem Wachstum mit μ_{\max} sowie unter der Annahme eines ideal durchmischten Rührkesselreaktors kann Gleichung 3.1 integriert werden:

$$c_X = c_X^0 \cdot e^{\mu_{\max} \cdot t} \quad (3.2)$$

- c_X^0 initiale Biomassekonzentration, $g L^{-1}$

Sobald eine Limitierung eines Medienbestandteils auftritt, stagniert das Wachstum (Substratlimitierungsphase, IV) bis es letztendlich zu einem Ausgleich von absterbenden und noch wachsenden Zellen kommt, bei der aber keine Biomassezunahme beobachtet werden kann (stationäre Phase, V). In der Absterbephase (VI) überwiegt dann die Absterberate der Zellen (Abbildung 3.2).

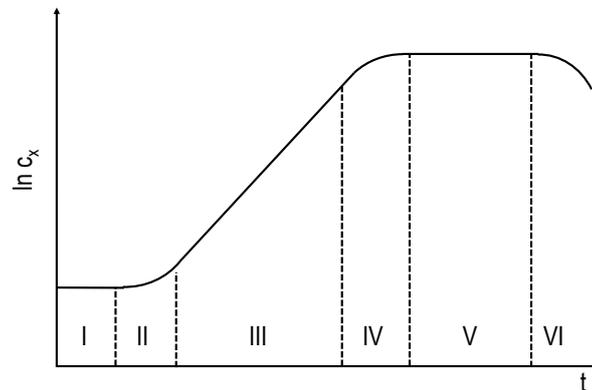


Abbildung 3.2: Wachstumskurve von Mikroorganismen im Satzverfahren in nicht limitierenden, begrenzten Nährstoffbedingungen. I: Adaptions- oder Verzögerungsphase, II: Übergangsphase, III: exponentielle Wachstumsphase, IV: Substratlimitierungsphase, V: stationäre Phase, VI: Absterbephase; Abbildung adaptiert aus Weuster-Botz und Takors (2018)

Für biotechnologische Satzprozesse in Rührkesselreaktoren können in Bezug auf Edukt (E), Substrat (S), Biomasse (X) und Produkt (P) die Ausbeutekoeffizienten (Selektivitäten) bestimmt werden. Der Ausbeutekoeffizient $Y_{X/S,\mu}$ entspricht der gebildeten Biotrockenmasse pro umgesetztter Masse an limitierendem, ausschließlich zum Wachstum verbrauchtem Substrat (g g^{-1}).

$$Y_{X/S,\mu} = \frac{dc_X}{dc_S} \quad (3.3)$$

Desweiteren kann zu jedem Prozesszeitpunkt im Satzverfahren die Produktselektivität $Y_{P/E}$ (gebildete Menge an Produkt (P) pro umgesetzttem Edukt (E), g g^{-1}) und, bei Co-Substraten (Co-S), der Co-substratspezifische Ausbeutekoeffizient $Y_{P/Co-S}$ (g g^{-1}) bestimmt werden.

$$Y_{P/E} = \frac{dc_P}{dc_E} \quad (3.4)$$

$$Y_{P/Co-S} = \frac{dc_P}{dc_{Co-S}} \quad (3.5)$$

3.1.2 Zentraler Kohlenstoffwechsel

S. cerevisiae ist in der Lage, unterschiedliche Kohlenstoffquellen wie Zucker, Polyole, Alkohole, organische Säuren oder Aminosäuren zum Wachstum zu nutzen, wobei

Zucker präferiert werden (Flores et al. 2000). Die Verstoffwechslung der Zucker kann dabei sowohl aerob als auch anaerob geschehen (Feldmann 2012). Eine Vielzahl an regulatorischen Mechanismen spielt in der Verwertung von Kohlenstoffquellen eine Rolle und wurde bereits ausreichend diskutiert mit Schwerpunkt auf Kohlenstoffquellen (Barnett 1976, Feldmann 2012, Rodrigues et al. 2006), anaeroben/aeroben Stoffwechsel (De Deken 1966, Otterstedt et al. 2004) und auf gen-regulatorischer Ebene in Hefe (Fiechter und Seghezzi 1992, Gancedo 1992). Deswegen soll im Folgenden nur noch auf die für diese Arbeit relevanten Aspekte der Stoffwechselwege und des Energiemetabolismus, sowie der Redoxfaktorverfügbarkeit in *S. cerevisiae* näher eingegangen werden.

Als fakultativ anaerober Organismus kann *S. cerevisiae* sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen wachsen. Besonders die Sauerstoffverfügbarkeit und die Zuckerkonzentration bzw. -konzentration im Medium sind ausschlaggebend dafür, ob fermentatives oder respiratorisches Wachstum stattfindet. Glukose ist dabei das präferierte Substrat von *S. cerevisiae* zur Energieproduktion und der Abbau zu Pyruvat verläuft über die Glykolyse. Pyruvat stellt dann den Gabelpunkt für Fermentation und Respiration dar. Als Respiration wird der Katabolismus organischer Stoffe zur Bildung von Adenintriphosphat (ATP) bezeichnet (Barnett 1976). Unter nicht-reprimierten, sauerstoffgesättigten Bedingungen wird Pyruvat zu Acetyl-CoA unter Abspaltung eines CO₂ umgewandelt und in den Mitochondrien über den Citratzyklus weiter abgebaut. Hier entstehen neben CO₂ auch Reduktionsäquivalente in Form von Nikotinamidadenindinukleotid (NADH) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH₂). Die Nettogleichung der aeroben Dissimilation liefert dabei rechnerisch aus einem Molekül Glukose insgesamt 36 ATP-Moleküle, wobei die meiste Energie in der Atmungskette über hintereinandergeschaltete Multienzymkomplexe generiert wird. Verduyn et al. (1991) korrigiert die theoretische Energieausbeute durch experimentell unterstützte Berechnungen, welche unter anderem auch ATP verbrauchende Transportmechanismen mit einbeziehen, zu verbleibenden 16 mol ATP mol⁻¹ Glukose. Liegen hingegen reprimierende Substratkonzentrationen vor oder ist der Sauerstoff limitierend, findet fermentativer Stoffwechsel in *S. cerevisiae* statt. Ausgehend von Pyruvat wird dieses durch Decarboxylierung zu Acetaldehyd und anschließend, unter Verbrauch eines NADH, zu Ethanol reduziert. Die Energiebilanz ist hierbei mit 2 ATP pro Molekül Glukose deutlich schlechter, da den Enzymen der Atmungskette der molekulare Sauerstoff fehlt (Dijken und Scheffers 1986).

3 Theoretischer Hintergrund

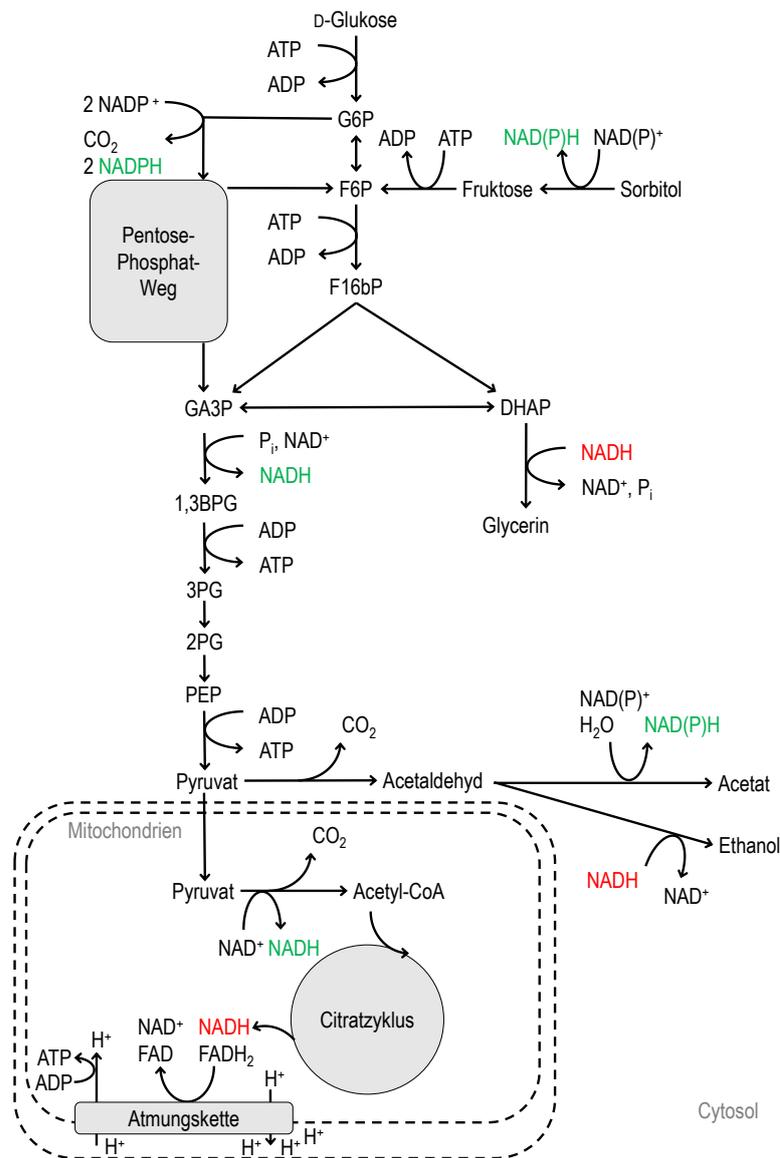


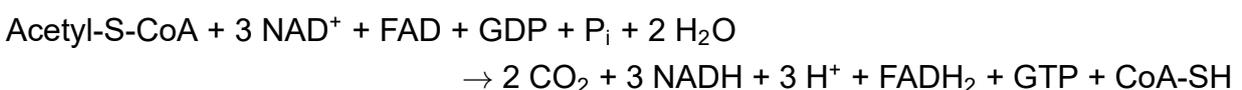
Abbildung 3.3: Zentraler Kohlenstoffmetabolismus von *S. cerevisiae* nach Flores et al. (2000) und Pronk et al. (1996). Glukose wird über die Glykolyse zu Pyruvat abgebaut. Ab Glukose-6-phosphat (G6P) können über den Pentose-Phosphat-Weg zwei NADPH generiert werden. Sorbitol fließt über Fruktose in die Glykolyse. Pyruvat kann über die alkoholische Gärung zu Ethanol umgewandelt werden oder, durch Decarboxylierung zu Acetyl-CoA in den Mitochondrien, im Citratzyklus zur NADH- und FADH₂-Bildung und über die oxidative Phosphorylierung in der Atmungskette zur Energiebildung (ATP-Aufbau) genutzt werden (schematische Darstellung). Reaktionen, bei denen für die Reduktion von D-GalA nötige Co-Faktoren generiert werden, sind grün dargestellt, Co-Faktoren verbrauchende Reaktionen rot.

Respiration

Die aerobe Dissimilation kann in drei große Schritte gegliedert werden (Compagno et al. 2014). Bevor die in die Zelle importierte Glukose in den ersten Schritt, die Glykolyse, eintritt, wird sie zu Glukose-6-phosphat (G6P) phosphoryliert. Bei diesem Intermediat zweigen auch andere Kohlenstoffquellen wie Maltose, Galaktose oder Laktose in die Glykolyse (Flores et al. 2000). Diese werden alle weiter über den Embden-Meyerhof-Weg abgebaut. G6P wird zu Fruktose-6-phosphat (F6P) isomerisiert. Der Zuckeralkohol Sorbitol wird über eine Cofaktor-verbrauchende Sorbitol-Dehydrogenase zu *kefo*-D-Fruktose oxidiert (Sarthy et al. 1994). Fruktose zweigt nach spontaner Umwandlung zu β -D-Fruktofuranose sowie Phosphorylierung als β -D-Fruktofuranose-6-Phosphat (F6P) in die Glykolyse. Der Sorbitol-Abbauweg generiert im Vergleich zu Glukose pro Molekül Sorbitol ein zusätzliches Reduktionsfaktormolekül (Abbildung 3.3). Unter Verbrauch eines ATPs wird F6P zu Fruktose-1,6-bisphosphat (F1,6bP) umgewandelt. Die Spaltung ergibt jeweils ein Molekül Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GA-3-P), die ineinander überführbar sind. GA-3-P wird dann unter NAD^+ -Verbrauch zu 1,3-Bisphosphoglycerat (1,3BPG) umgewandelt. Die Dephosphorylierung mit Generierung eines ATPs ergibt 3-Phosphoglycerat (3PG) und durch Isomerisierung 2-Phosphoglycerat (2PG) und anschließend Phosphoenolpyruvat (PEP). Durch Dephosphorylierung entstehen ATP und Pyruvat (Abbildung 3.3). Die Nettogleichung für die Glykolyse ergibt sich als:



Den zweiten Schritt der aeroben Dissimilation in *S. cerevisiae* stellt der in den Mitochondrien ablaufende Citratzyklus (bzw. Tricarbonsäurezyklus (TCA)) dar. Nach dem Import von Pyruvat in die Mitochondrien wird dieses durch die Pyruvat-Decarboxylase unter Abspaltung von CO_2 und Verbrauch eines NAD^+ an das Coenzym A (CoA) gebunden, wodurch ein Acetyl-CoA entsteht. Im Citratzyklus wird dieses über acht unterschiedliche Zwischenstufen zu Oxalacetat umgewandelt, welches dann wieder als Substrat für den ersten Schritt des Citratzyklus zur Verfügung steht. Damit kann folgende Nettogleichung für den Citratzyklus aufgestellt werden:



Im dritten Schritt, der Atmungskette, werden schließlich die an NADH und FADH₂ gebundenen Elektronen über eine aus mehreren Proteinkomplexen bestehende Elektronentransportkette auf molekularen Sauerstoff übertragen. Wie der Citratzyklus findet dieser Schritt in den Mitochondrien statt. Bei den hier nacheinander ablaufenden Redoxreaktionen von NADH und FADH₂ mit Atmungskettenproteinen wird die frei werdende Energie zum Aufbau einer Potentialdifferenz durch Protonenimport in die Mitochondrien genutzt. Mithilfe dieses chemiosmotischen Potentials phosphoryliert die mitochondriale ATP-Synthase ADP zu ATP, was zum Aufbau von insgesamt 25 ATP führt (Abbildung 3.3). Die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien generiert damit deutlich mehr Energie, als die Glykolyse bis Pyruvat.

Regulatorische Mechanismen des Zentralstoffwechsels

Obwohl *S. cerevisiae* eine Vielzahl unterschiedlicher Kohlenstoffquellen nutzen kann, ist Glukose das präferierte Substrat (Barnett 1976, Flores et al. 2000). Je nach Glukoselevel im Medium variiert die transkriptionelle Antwort des Mikroorganismus (Compagno et al. 2014). Beispielsweise werden hoch affine Hxt-Transporter nur exprimiert, wenn die extrazelluläre Glukosekonzentration niedrig ist, während diese Gene bei hohen Glukosekonzentrationen reprimiert und nur niedrig affine Transporter transkribiert werden (Sabina und Johnston 2009). Zusätzlich führen weitere Signalkaskaden in *S. cerevisiae* zu einer Hochregulation spezifischer Gene der Glykolyse (Otterstedt et al. 2004) bzw. zur Hemmung der Transkription von Genen anderer kataboler Stoffwechselwege (Gancedo 1992). Betroffen hiervon sind beispielsweise Enzyme der Glukoneogenese, des Glyoxylat-Zyklus, des Citratzyklus und der Atmungskette (Duntze et al. 1969, Kayikci und Nielsen 2015, Schüller und Entian 1997). Neben dieser sogenannten Katabolitrepression kann auch eine Katabolitinaktivierung von Enzymen stattfinden. Durch eine durch Glukose induzierte Signalkaskade werden Schlüsselenzyme aus beispielsweise der Glukoneogenese zuerst durch Phosphorylierung "markiert" und anschließend proteolytisch abgebaut (Duntze et al. 1969, Gancedo 1992, 1998). Im Gesamtstoffwechsel von *S. cerevisiae* betrachtet ist die Regulation des zentralen Kohlenstoffwechsels ein komplexes Zusammenspiel aus repressiven und induzierenden Signalkaskaden, welche ideal auf die jeweils verfügbare Kohlenstoffquelle angepasst werden (Compagno et al. 2014, Kayikci und Nielsen 2015).

Crabtree-Effekt

Obwohl die Respiration die höchste Energieausbeute pro Molekül Glukose hat, zeigt *S. cerevisiae* unter aeroben Bedingungen und einem Substratüberschuss respiro-fermentatives Verhalten. Für *S. cerevisiae* ist bereits für Glukosekonzentrationen ab 150 mg L^{-1} eine Inhibierung der Respiration beschrieben, die zur Bildung fermentativer Nebenprodukte führt (De Deken 1966, Pfeiffer und Morley 2014, Verduyn et al. 1984). Dieser sogenannte "Crabtree-Effekt" wurde zuerst von Herbert Grace Crabtree 1929 in Tumorzellen beschrieben und in späteren Jahren auch für die unzureichende respirative Kapazität der wachsenden Hefezellen zum Pyruvatabbau verwendet (Crabtree 1929, Fiechter und Seghezzi 1992, Sonnleitner und Käppeli 1986). Der "Crabtree-Effekt" führt zum typisch diauxischen Wachstum von *S. cerevisiae* bei hohen Glukosekonzentrationen. Auf eine schnelle Wachstumsphase mit geringem Biomasseaufbau aber hoher Ethanolproduktion als fermentatives Nebenprodukt folgt eine langsame Verstoffwechselung des akkumulierten Ethanols bei gleichzeitig gesteigerter Biomassebildung (De Deken 1966, Lemoigne et al. 1954). Der evolutionäre Hintergrund dieser metabolischen Anpassung liegt in der Toxizität von Ethanol für andere Mikroorganismen (Compagno et al. 2014). Nimmt man reife Früchte mit hohem Zuckeranteil als Beispiel, konkurrieren unterschiedliche Mikroorganismen um die freien Zucker. Die erhöhte Ethanolproduktionsfähigkeit und -toleranz, sowie die fakultative Anaerobie von *S. cerevisiae* ermöglichen der Hefe die Durchsetzung und Besetzung der Nische. Wie auch bei regulatorischen Mechanismen zum bevorzugten Glukoseabbau sind die unterschiedlichen Signaltransduktionswege, um respiratorisches Wachstum zu inhibieren, höchst komplex und noch nicht vollständig verstanden (Postma et al. 1989, Pronk et al. 1996, Westergaard et al. 2007).

Fermentation

Tritt bei der Kultivierung von *S. cerevisiae* eine Sauerstofflimitation auf, wird ab Pyruvat die alkoholische Gärung zur Energiegewinnung genutzt (Compagno et al. 2014). Durch die schnelle und effiziente Umstellung des Organismus auf anaerobe Verhältnisse kann *S. cerevisiae* über die Reduzierung von Pyruvat zu Ethanol die glykolytische ATP-Generierung aufrechterhalten, und somit teilweise die nicht mehr stattfindende Energiegewinnung durch respiratorischen Abbau von Pyruvat kompensieren. Respiration kann nicht stattfinden, da durch die Sauerstofflimitierung der in der Atmungskette als Elektronenakzeptor fungierende molekulare Sauerstoff nicht zur Verfügung steht. Gleichzeitig kann aber durch alkoholische Gärung das in der Glykolyse bis Pyruvat verbrauchte NAD^+

regeneriert werden. Im ersten Schritt der alkoholischen Gärung wird Pyruvat über die zytosolische Pyruvat-Decarboxylase unter Abspaltung eines CO_2 zu Acetaldehyd umgewandelt. Acetyldehyd wird dann unter Verbrauch eines NADH zu Ethanol reduziert. Diesen Schritt katalysieren in *S. cerevisiae* insgesamt fünf unterschiedliche Enzyme (Adh1-5p), wobei Adh2p eher die Rückreaktion von Ethanol zu Acetaldehyd katalysiert (Thomson et al. 2005). Neben Ethanol kann Pyruvat über den sogenannten "Pyruvat-Dehydrogenase-Bypass" zur Generierung von zytoplasmatischem Acetyl-CoA genutzt werden. Dafür wird Pyruvat NADP^+ -abhängig zu Acetat reduziert und anschließend über die Acetyl-CoA-Synthetase in Acetyl-CoA umgewandelt (Compagno et al. 2014). Auch andere fermentative Stoffwechselwege zur Bildung von beispielsweise Glycerin oder Acetat helfen, die Redoxbalance innerhalb der Zelle und Kompartimente aufrechtzuerhalten (Jouhten und Penttilä 2014).

Redoxstoffwechsel

NADH und NADPH haben unterschiedliche Funktionen im Metabolismus von *S. cerevisiae*. Während NADPH vornehmlich in assimilatorischen, also Biomoleküle aufbauenden Reaktionen Verwendung findet, wird NADH überwiegend während des Wachstums von *S. cerevisiae* in dissimilatorischen, also abbauenden Reaktionswegen genutzt (Dijken und Scheffers 1986, Lagunas 1986, Verho et al. 2003). Diese Trennung ist nicht strikt, da auch die Stoffwechselwege nicht strikt assimilatorisch oder dissimilatorisch ablaufen. Beispielsweise stellen Intermediate der Glykolyse, also des Glukosekatabolismus gleichzeitig Bausteine für die Biosynthese komplexer Makromoleküle (Aminosäuren, Nukleinsäuren, Fettsäuren) dar (Feldmann 2012). Der Redox-Metabolismus ist dabei eine komplexe Verknüpfung unterschiedlicher Stoffwechselwege, wie dem Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus. Seine Regulierung ist dementsprechend an die Verfügbarkeit unterschiedlicher Substrate geknüpft (Bakker et al. 2001). Gleichzeitig kommt durch die Kompartimentierung in Hefezellen mit für Co-Faktoren impermeablen Membranen eine zusätzliche Komplexität der Verfügbarkeit von Redoxfaktoren für bestimmte Reaktionen hinzu (Dijken und Scheffers 1986).

Während des aeroben Wachstums auf Glukose wird hauptsächlich NADH über die Glykolyse erzeugt und NAD^+ durch zytosolische NADH-Dehydrogenasen regeneriert. Da NADH nicht membrangängig ist, besitzt *S. cerevisiae* auch noch zwei mitochondriale NADH-Dehydrogenasen für die in den Mitochondrien an der Elektronentransportkette ablaufenden Oxidationen von NADH (Hou et al. 2009). Die hier ablaufende oxidative Phosphorylierung generiert pro Mol NADH drei Mol ATP durch Phosphorylierung von

ADP. Zusätzlich entsteht NAD^+ , welches wieder in der Glykolyse eingesetzt werden kann. Bei der aeroben Dissimilation von Glukose entstehen pro Mol Glukose insgesamt 10 Mol NADH: zwei Mol in der Glykolyse, zwei Mol bei der Pyruvatdecarboxylierung und insgesamt sechs Mol im Citratzyklus (Bakker et al. 2001). Bei Glukoseüberschuss oder Anaerobie tritt durch den "Crabtree-Effekt" respiro-fermentatives bzw. fermentatives Verhalten von *S. cerevisiae* auf und zytosolisches NADH kann nicht über die Atmungskette oxidiert werden. Deswegen kommt es zur alkoholischen Gärung, da hier die Reduktion von Pyruvat zu Ethanol NADH verbraucht, um weiterhin NAD^+ für glykolytische Schritte zur Verfügung stellen zu können (Bakker et al. 2001). Entsprechend schlechter ist die NADH-Bilanz: insgesamt entstehen pro Mol Glukose nur 2 Mol NADH. Für die Aufrechterhaltung der Redoxbalance unter anaeroben Bedingungen spielt auch die Glycerinbildung eine große Rolle. Während die Ethanolbildung die Reoxidation des bei der Bildung von GA-3-P gebildeten NADH sichert, wird die Bildung von Glycerin durch den NADH-Überschuss bei der Biomassebildung angetrieben (Dijken und Scheffers 1986).

NADPH wird zytosolisch vornehmlich über den oxidativen Teil des Pentose-Phosphat-Wegs gebildet, bei dem G6P zu Ribulose-5-Phosphat umgewandelt wird (Hou et al. 2009). Hierbei können pro Glukosemolekül zwei Mol NADPH gebildet werden (Abbildung 3.3). In den Mitochondrien entsteht NADPH während des Citratzyklus durch eine Isocitrat-Dehydrogenase. Andere (potentiell) NADPH-produzierende Reaktionen sind beispielsweise die NADP^+ -abhängige Acetaldehyd-Dehydrogenase während aeroben Wachstums (Bruinenberg et al. 1983). Auch NADH-Kinasen im Zytosol und den Mitochondrien können ATP-abhängig NADH zu NADPH phosphorylieren. Diese Reaktion ist aber aufgrund von fehlenden Transhydrogenasen in *S. cerevisiae* unidirektional. NADPH fungiert als Reduktionsmittel bei der Fettsäure- und Aminosäure-Biosynthese sowie bei der Biomassebildung (Bruinenberg et al. 1983).

Grob vereinfacht kann man den Redox-Metabolismus in *S. cerevisiae* folgendermaßen zusammenfassen: NAD^+/NADH ist das hauptsächlich genutzte Co-Faktor-Paar der Glykolyse und Atmungskette, während $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ das hauptsächlich genutzte Co-Faktor-Paar der Biosynthese von Makromolekülen ist.

3.1.3 Biotechnologische Anwendung von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae sind bekannt für ihre vornehmliche reduzierende Aktivität bei der Ganzzellbiokatalyse (Katz et al. 2003, Schaefer et al. 2013) und werden im Lebensmittelsektor vor allem fermentativ zur Alkoholherstellung in der Getränkeindustrie, zum Aufbau organischer Säuren und in der Backindustrie verwendet (Porro und Branduardi 2017, Steensels et al. 2014). Gleichzeitig werden mit Hefen auch eine Vielzahl an biotechnologisch relevanten Enzymen wie Lipasen, Dehydrogenasen oder Invertasen hergestellt (Nandy und Srivastava 2018). Hefen finden darüber hinaus auch in der Synthese von Feinchemikalien (Hong und Nielsen 2012) und sogenannten aktiven pharmazeutischen Wirkstoffen (*active pharmaceutical ingredients*, API) Verwendung (Pscheidt und Glieder 2008), nicht nur aufgrund ihrer Fähigkeit, chirale Bausteine und enantiomerenreine Moleküle zu synthetisieren (Goldberg et al. 2007). Hinzu kommt, dass besonders *S. cerevisiae*, wie in Abschnitt 3.1 ausführlich beschrieben, aufgrund des langjährigen Einsatzes als Modellorganismus eine große Bedeutung für unterschiedliche Forschungsbereiche hat.

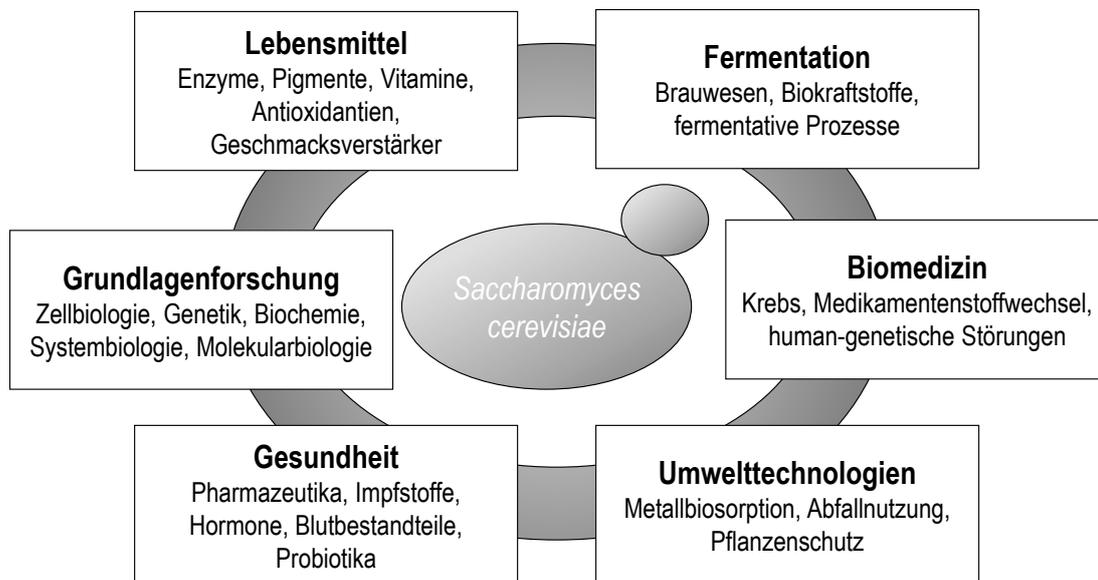


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung von Beispielen des Einsatzes von *S. cerevisiae* in der Biotechnologie nach Branduardi und Porro (2012).

Der industrielle Einsatz von *S. cerevisiae* ist insgesamt sehr vielfältig (Borodina und Nielsen 2014, Nandy und Srivastava 2018, Parapouli et al. 2020). Als nativer Ethanol-Produzent fällt *S. cerevisiae* natürlicherweise die Rolle als "Bioraffinerie" zu (Dmytruk

et al. 2017), wobei *S. cerevisiae* der primäre Bioethanolproduzent ist (Lin und Tanaka 2006). Hiermit ist die Produktion von Bioethanol aus Rohstoffen der ersten Generation, wie beispielsweise Stärke aus Getreide oder Mais, gemeint (Favaro et al. 2019). Die Entwicklung nachhaltiger Prozesse zur Produktion alternativer Kraftstoffe aus erneuerbaren Rohstoffen ist besonders aus Sicht schwindender fossiler Energieträger und zum Schutze des Klimas wichtig (de Jong et al. 2012). Die steigende Nachfrage an Biokraftstoffen der ersten Generation führt jedoch zu einer direkten Konkurrenz zwischen Lebensmittel- und Kraftstoffproduktion, denn in beiden Prozessen wird das gleiche Ausgangsmaterial verwendet (Passoth 2014). Mit der Erschließung neuer Rohstoffe zur Produktion von Bioethanol der zweiten Generation oder andere wertschöpfender Moleküle kann dieser Missstand gelöst werden (Nevoigt 2008). Hierbei spielt vor allem Lignocellulose eine Rolle, aber auch andere komplexe pflanzliche Polymere haben das Interesse der Industrie geweckt (Martins et al. 2021, 2020). Nicht zuletzt durch die große Robustheit gegenüber Inhibitoren in Pflanzenhydrolysaten ist *S. cerevisiae* der geeignete Organismus, um bei der Hydrolyse freigesetzte Zucker zu nutzen (Żymańczyk-duda et al. 2017). Auch wenn *S. cerevisiae* nativ nicht alle Zucker aus Pflanzenreststoffen nutzen kann, wurden eine Reihe neuer gentechnischer veränderter Stämme entwickelt, die die Zucker verstoffwechseln können (Martins et al. 2020).

Tabelle 3.1: Übersicht unterschiedlicher mit *S. cerevisiae* hergestellter Produkte aus Borodina und Nielsen (2014).

Produkt	jährliche Produktion	Hersteller	Anwendung
Lactat	180 kt	Natureworks LLC	Lebensmittelindustrie
Isobutanol	68 mio L	GEVO	Kraftstoff, Lösemittel
Bernsteinsäure	17 kt	BioAmber	Geschmacksverstärker
Ethylen	200 kt	Braskem	Pflanzenschutzmittel
Farnesen	40-50 mio L	Amyris	Treibstoff (Flugzeug)
Vanillin	n. a.	Evolve	Aromastoff

Bei der Entwicklung rekombinanter *S. cerevisiae* Stämme wird gerne auf auxotrophe Marker zurückgegriffen (Entian und Kötter 2007). Ist ein Organismus auxotroph für eine Substanz, so kann er diesen zum Wachstum essentiellen Stoff nicht selbstständig synthetisieren. Aminosäuren sind beliebte auxotrophe Marker, die in der Grundlagen-

forschung als Selektionskriterium, ähnlich zu Antibiotikaresistenzen, verwendet werden. Durch vektorielle oder chromosomale Transformation des fehlenden Gens als Teil einer zu transformierenden Genkassette kann die Auxotrophie komplementiert werden und gleichzeitig die Transformation der Kassette in den Organismus überprüft werden. Auxotrophe Marker können aber bei der Entwicklung von Stämmen für den industriellen Einsatz problematisch werden (Pronk 2002). Für viele Prozesse, in denen Vollmedium verwendet wird, mag vielleicht keine Limitation der Hefe durch die Auxotrophien auftreten, da das Medium genügend Nährstoffe enthält und die Biomasse- und Produktbildung somit nicht beeinflusst wird (Paciello et al. 2014). Andere Studien zeigten jedoch, dass zu viele auxotrophe Marker in *S. cerevisiae* oftmals in reduziertem Wachstum, reduzierter Proteinproduktion und genetischer Stabilität resultierte (Hahn-Hägerdal et al. 2005). Auch die Übertragbarkeit von im Labormaßstab mit auxotrophen Stämmen gewonnenen Erkenntnissen auf für den industriellen Maßstab veränderte, günstigere Medienkompositionen ist nicht unbedingt gegeben (Hahn-Hägerdal et al. 2005). Deswegen sollte bei der finalen Stammentwicklung für die Industrie auf prototrophe Stämme zurückgegriffen werden.

3.2 Überblick und Zusammensetzung agroindustrieller Reststoffe

Agroindustrielle Reststoffe rücken immer mehr in den Fokus der biotechnologischen Entwicklung und Forschung, da sie das Potential haben, als erneuerbare Quellen von Kohlenstoff, Stickstoff und anderen Nährstoffen für mikrobielles Wachstum und Metabolitenproduktion genutzt zu werden (Cherubini 2010, Dahiya et al. 2018, Liu et al. 2016, Martins et al. 2020). Zusätzlich sind landwirtschaftliche Reststoffe und Rückstände der Agrar- und Lebensmittelindustrie potenzielle Ausgangsstoffe für die Produktion von Biokraftstoffen und anderen relevanten Bioprodukten (Schmitz et al. 2019). Je nach Herkunft unterscheiden sich die Reststoffe sehr stark in ihrer Zusammensetzung. Hohe Zuckerkonzentrationen sind beispielsweise in Zuckerrohr oder Obst zu finden, während Weizen, Mais, oder Reis stärkehaltig sind (Vandamme 2009). Andere Substrate wie Holz, Stroh und Gräser sind lignozellulosehaltig, während Zuckerrüben oder Zitrusfrüchte einen hohen Pektingehalt haben (Micard et al. 1996, Zema et al. 2018). Zellulosehaltige landwirtschaftliche Abfälle sind von großem Interesse für die Biokonversion durch Mikroorganismen, da der β -1,4-glykosidisch verknüpfte Grundbaustein des Zellulosepolymers die vielfältig einsetzbare Glukose ist. Die meisten dieser landwirtschaftlichen Reststoffe enthalten ca. 40 % Zellulose, 30 % Hemizellulosen und 25 % Lignin

(Singh nee' Nigam und Pandey 2009). Lignin ist dabei als Biopolymer schwer zugänglich für Mikroorganismen, da es deutlich komplexer und heterogener aufgebaut ist als (Hemi-)Zellulose (Janusz et al. 2017, Wang et al. 2019). Zur Nutzung agroindustrieller Reststoffe wird Lignin zuerst von Zellulose und Hemizellulose abgetrennt, letztere Polymere werden dann über mehrere Schritte in ihre Zuckermonomere umgewandelt (Singh nee' Nigam und Pandey 2009). Es gibt allerdings auch landwirtschaftliche Abfallströme mit wenig Ligningehalt wie beispielsweise Zuckerrüben (Berlowska et al. 2018). Diese enthalten nur 3 - 4 % Lignin (Trockenmasse) und zu je einem Drittel der Trockenmasse Pektin, Hemizellulose und Zellulose, was diese Reststoffe gerade für die Nutzung durch Mikroorganismen interessant macht (Berlowska et al. 2018).

3.2.1 Hydrolyse agroindustrieller Reststoffe

Zur Verfügbarmachung von Zucker aus agroindustriellen Abfallströmen sind spezielle Vorbehandlungsschritte Voraussetzung, um das Zellwandmaterial in fermentierbare Monosaccharide abzubauen. Neben mechanischen und (thermo-)physikalischen Vorbehandlungen werden auch chemische und enzymatische Methoden zur Depolymerisierung komplexer pflanzlicher Heteropolymere genutzt (Singh nee' Nigam und Pandey 2009). Die Vorbehandlung muss jedoch stark genug sein, um die Netzwerke aus Zellulose, Hemizellulose und Lignin zerstören zu können (Kühnel et al. 2011). Je stärker die Vorbehandlung ist, desto höher ist das Risiko der Bildung nicht vergärbare und für Mikroorganismen toxischer Produkte wie Furfural oder Hydroxymethylfurfural (HMF) (Palmqvist und Hahn-Hägerdal 2000). Gleichzeitig können auch schwache Säuren (wie z. B. Essigsäure) aus der Depolymerisierung von Hemizellulose und teilweise aus der Deacetylierung von Pektin freigesetzt werden (Favaro et al. 2019, Kühnel et al. 2011). Diese wirken sich als starker Inhibitor negativ auf das mikrobielle Wachstum sowie die Lebensfähigkeit und Fermentationseffizienz aus (Jönsson und Martín 2016). Schwache Säuren beeinträchtigen die Funktion von Membranproteinen und beeinflussen die Durchlässigkeit von Zellmembranen (Favaro et al. 2019). Auch Nährstofftransport und Energietransduktion sind beeinträchtigt, denn schwache Säuren senken nach ihrem Import den intrazellulären pH-Wert durch Protonenakkumulation (Dunlop 2011). Mikroorganismen, wie beispielsweise Hefen, können dem durch membranständige ATPase entgegen wirken (Holyoak et al. 1996). Das wiederum senkt den intrazellulären ATP-Gehalt und führt zu reduziertem Wachstum. Darüber hinaus akkumulieren Säureanionen innerhalb der Zellen, was toxisch wirken und wesentliche Stoffwechselfunktionen beeinträchtigen kann (Favaro et al. 2019).

Die saure Hydrolyse ist im Allgemeinen die am häufigsten angewandte Methode der chemischen Hydrolyse für die Vergärung von lignocellulosehaltiger Biomasse (Berlowka et al. 2018). Dabei wird durch die Verwendung konzentrierter Säurelösungen, wie beispielsweise Schwefelsäure, Hemizellulose und teilweise Zellulose hydrolysiert. Neben der Bildung toxischer Inhibitoren ist die Rückgewinnung der Säure und ihre korrodierende Wirkung auf Prozessanlagen problematisch. Weitere potentiell kritische Inhibitoren für Mikroorganismen in Hydrolysaten sind Schwermetalle und Pestizide, welche durch geochemische Kreisläufe, intensive Landwirtschaft, Abfallbehandlung und -entsorgung oder Transport in die Reststoffe gelangen (Martins et al. 2020).

Die enzymatische Hydrolyse stellt eine mildere Alternative zur Verzuckerung von Agrarreststoffen dar (Lin und Tanaka 2006). Die hauptsächlich dafür verwendeten Enzyme sind Zellulasen (Endozellulasen, Exozellulasen und β -Glucosidasen), die synergetisch zusammenwirken und Zellulose vollständig zu Glukose hydrolysieren (Singhania et al. 2017). Auch für die anderen pflanzlichen Polymere gibt es abbauende Enzyme, wie beispielsweise Xylanasen, Pektinasen und Ligninasen. Es gibt mehrere Mikroorganismen, insbesondere filamentöse Pilze, die hydrolytische Enzyme für den Abbau von pflanzlichen Reststoffen sekretieren (Palmqvist und Hahn-Hägerdal 2000). Diese werden bereits für den industriellen Einsatz kommerziell mit Hilfe von hauptsächlich *A. niger* und *T. reesei* produziert (Singhania et al. 2017). Problematisch wird bei der enzymatischen Hydrolyse die Inhibierung der abbauenden Enzyme durch die freigesetzten Zuckermomere, wie es beispielsweise bei Zellulasen der Fall ist (Jönsson und Martín 2016). Das Problem der Produktinhibierung wird zum Teil durch Co-Fermentation mit Mikroorganismen gelöst (Singh nee' Nigam und Pandey 2009). Das erfordert allerdings, dass Bedingungen für die enzymatische Hydrolyse und Fermentation in Bezug auf pH-Wert und Temperatur kompatibel sind (Lin und Tanaka 2006). Auch der Einsatz puffernder Substanzen für die enzymatische Hydrolyse kann ein Problem für die weitere Nutzung der Hydrolysate durch Mikroorganismen darstellen, wenn hier schwache Säuren zur pH-Wert-Einstellung verwendet werden (Lin und Tanaka 2006).

3.2.2 Zusammensetzung pektinreicher Reststoffe

Pektinreiche Reststoffe sind interessante Ausgangsstoffe für mikrobielle Fermentationen, da sie einen deutlich geringeren Ligninanteil haben als andere pflanzliche Abfallströme. Agroindustrielle Reststoffe mit hohem Pektingehalt fallen als Nebenprodukte bei

3.2 Überblick und Zusammensetzung agroindustrieller Reststoffe

der Zuckerrübenverarbeitung und bei der Apfel- und Orangensaftproduktion an. Diese Abfallstoffe werden derzeit hauptsächlich als Tierfutter verwendet und haben eine geringe wirtschaftliche Bedeutung (Ángel Siles López et al. 2010). Derzeit sind Weiterverarbeitungskosten relativ hoch, da sie getrocknet und pelletiert werden müssen, um Fäulnis zu verhindern (Richard und Hilditch 2009). Pektin besteht aus unterschiedlichen Subtypen, welche sich im Grad und Art der Substitutionen des Poly- α -1,4-D-Galakturonsäure-Rückgrats unterscheiden (Schmitz et al. 2019). Methyl- und Acetylveresterung kennzeichnen den hauptsächlich vorhandenen Subtypen, das Homogalacturonan (Mohnen 2008). Weitere Subtypen sind das Rhamnogalacturonan I aus alternierenden L-Rhamnose- und D-GalA-Monomeren mit oligomeren Arabinan- und Galaktose-Seitenketten sowie das Xylogalacturonan und das Rhamnogalacturonan II, welche auch komplex substituiert sind (Schmitz et al. 2019).

Hydrolysierte pektinreiche Reststoffe enthalten deswegen eine Vielzahl an unterschiedlichen Zuckermonomeren (Martins et al. 2020, Yang et al. 2020). D-GalA ist dabei mengenmäßig mit 21,1 % der Trockensubstanz von Zuckerrübenschnitzeln am häufigsten vertreten (Micard et al. 1996). Speziell Zuckerrübenschnitzel enthalten außerdem noch Xylose, Arabinose, Galaktose, sowie eine größere Menge an Glukose (Micard et al. 1996), welche jedoch nur bedingt als Kohlenstoffquelle für *S. cerevisiae* geeignet sind (Martins et al. 2020). Glukose wird vermutlich hauptsächlich aus der in Zuckerrübenschnitzel enthaltenen Zellulose gelöst. Trotz dieser vielversprechenden Vorteile

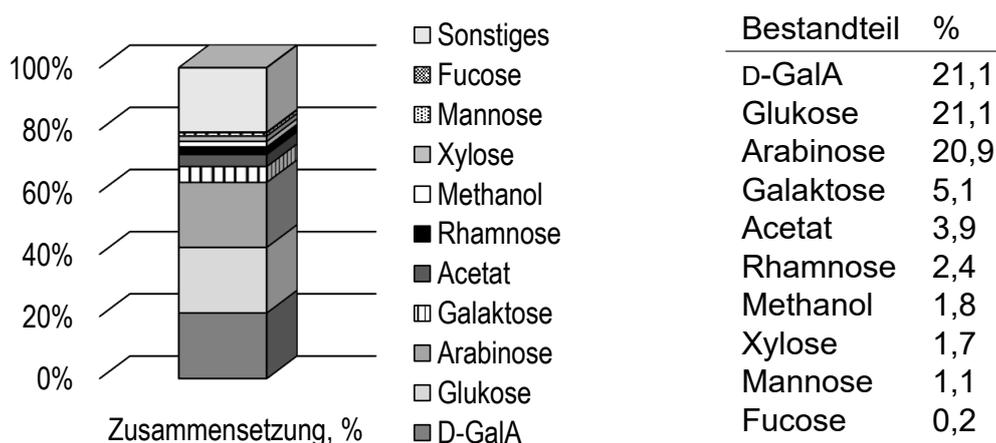


Abbildung 3.5: Zuckerrübenschnitzelzusammensetzung (Trockensubstanz) nach Micard et al. (1996).

ist die Fermentation von pektinreichen landwirtschaftlichen Abfällen noch nicht etabliert (Schmitz et al. 2019). Die Depolymerisation des α -1,4-verknüpften D-GalA-Rückgrats führt zu hohen Konzentrationen von D-GalA-Monomeren im Hydrolysat (Richard und Hilditch 2009). Der niedrige pK_S von D-GalA von ca. 3,5 führt zu Hydrolysaten mit sehr saurem pH (Richard und Hilditch 2009). Einerseits ist dieses saure Milieu vorteilhaft für die Fermenterhygiene, da es die Wachstumsbedingungen für kontaminierende Mikroorganismen einschränkt. Gleichzeitig begrenzt es die Anzahl physiologisch lebensfähiger Produktionswirte (Abbott et al. 2009).

D-GalA Metabolismus in Mikroorganismen

Sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten existieren Stoffwechselwege, die es erlauben, D-GalA abzubauen (Richard und Hilditch 2009). *S. cerevisiae* Wildtypen sind nicht in der Lage, D-GalA zu verstoffwechseln (van Maris et al. 2006).

In *Escherichia coli* (*E. coli*) kann D-GalA durch Isomerisierung und weitere vier enzymatische Schritte über D-Tagaturonat, D-Altronat, 2-Keto-3-deoxy-gluconat und 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconat zu Glycerinaldehyd-3-phosphat (GA-3-P) und Pyruvat metabolisiert werden (Huisjes et al. 2012). Ein weiterer, oxidativer Weg existiert in *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) und *Pseudomonaden*. Hier entsteht im ersten Schritt unter Verbrauch eines NAD^+ meso-Galactarsäure (Schleimsäure), welche dann über weitere enzymatische Schritte zu 2-Ketoglutarensäure umgewandelt wird (Boer et al. 2010).

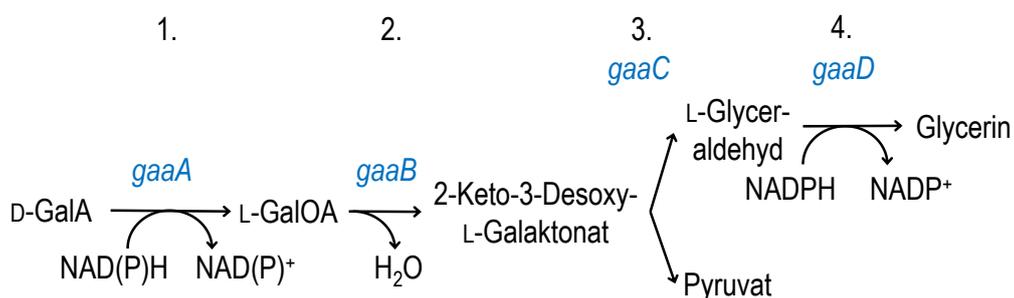


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung des D-GalA-Katabolismus in *A. niger*. Insgesamt vier Enzyme sind am Abbau von D-GalA beteiligt. Der erste Schritt erfolgt über eine D-GalA-Reduktase (GAAA, EC 1.1.1.365), gefolgt von einer Galactonat-Dehydratase (GAAB, EC 4.2.1.146), einer 2-Keto-3-Desoxy-L-Galactonat-Aldolase (GAAC, EC 4.1.2.54) und einer L-Glycerinaldehyd-Reduktase (GAAD, EC 1.1.1.372).

Filamentöse Pilze, wie beispielsweise *A. niger* oder *T. reseei*, können D-GalA nativ als einzige Kohlenstoffquelle verwenden (Martens-Uzunova und Schaap 2008). Genomische Vergleichsanalysen zeigten, dass dieser D-GalA-abbauende Stoffwechselweg in Pilzen der Gruppe *Pezizomycotina*, die die Pflanzenzellwände degradieren, hoch konserviert ist.

Insgesamt vier enzymatische Schritte des D-GalA-Katabolismus wurden identifiziert (Abbildung 3.6). Zuerst wird D-GalA unter Verbrauch eines NAD(P)Hs zu L-GalOA reduziert. Das zugehörige Enzym, Gar1, wurde zuerst in *Hypocrea jecorina* identifiziert (Kuorelahti et al. 2005). Diese Reduktase (TrGar1) ist NADPH-spezifisch und phylogenetisch ähnlich zu anderen Enzymen in *Cryptococcus diffluens*, *Rhodospodium toruloides* und *A. niger* (Matsubara et al. 2016, Protzko et al. 2019). Auch diese Enzyme reduzieren D-GalA vornehmlich NADPH-abhängig. Ein weiteres in *A. niger* vorkommendes Enzym, das den Schritt von D-GalA zu L-GalOA katalysiert, wurde AnGaaA annotiert. Erstaunlicherweise besteht bei diesem Enzym keine Sequenzverwandtschaft mit Gar1-Reduktasen (Martens-Uzunova und Schaap 2008) und das Enzym kann, im Gegensatz zu Gar1, mit einer 50-fach reduzierten katalytischen Effizienz auch NADH als Co-Faktor nutzen. Im zweiten Schritt des D-GalA-Abbaus in Pilzen wird L-GalOA unter Abspaltung eines Wassermoleküls zu 2-Keto-3-Desoxy-L-Galaktonat umgewandelt. Dieser durch eine Dehydratase katalysierte Schritt ist irreversibel (Kuorelahti et al. 2006).

Nachfolgend findet die Aufspaltung zu L-Glyceraldehyd und Pyruvat statt (Hilditch et al. 2007). Pyruvat wird weiter in unterschiedlichen Stoffwechselwegen, wie beispielsweise dem Citratzyklus, verstoffwechselt, während L-Glyceraldehyd über einen weiteren, NADPH-verbrauchenden Schritt in Glycerin umgewandelt wird. Auch dieser Schritt ist irreversibel.

Der Import von D-GalA in Pilzen erfolgt mithilfe unterschiedlicher Transporter. In *Neurospora crassa* wurde ein Transporter identifiziert, welcher bei heterologer Expression in *S. cerevisiae* die Aufnahme von D-GalA aus dem Medium ermöglicht (Benz et al. 2014). In *A. niger* existiert ein homologer Transporter (AnGAT) zu dem in *Neurospora crassa* (Sloothaak et al. 2014). Dessen kinetische Eigenschaften wurde in Studien von Protzko et al. (2018) mit einem v_{\max} von $12,1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ Protein und einem K_M von $340 \text{ }\mu\text{M}$ angegeben.

3.3 Biokatalytische Prozesse

Biokatalytische Prozesse können in Biotransformationen (Umwandlung mit Ganzzellbiokatalysatoren) und Enzymkatalyse (Umwandlung mit zellfreien Extrakten oder isolierten Enzymen) unterschieden werden. (Straathof et al. 2002). Der Einsatz von Enzymen ermöglicht dabei eine äußerst chemo-, regio-, und stereoselektive Reaktion bei gleichzeitig hohen Produktausbeuten, ohne von aufwendiger Schutzgruppenchemie Gebrauch machen zu müssen (Castiglione 2018). Beide Formen der Biokatalyse haben Vor- und Nachteile. Ganzzellbiokatalysatoren sind günstiger in der Herstellung und stabiler als gereinigte Enzyme. Zusätzlich ist es nicht zwingend notwendig, Co-Faktoren zu supplementieren und es können auch mehrstufige, komplexe Reaktionen ablaufen (Forti et al. 2015). Gereinigte freie oder immobilisierte Enzyme sind dagegen bei Ein-Schritt-Reaktionen in wässriger oder organischer Phase von Vorteil, denn unerwünschte und unbekannte Nebenreaktionen treten bei der *in vitro* Katalyse nicht auf (Robinson 2015). Die industrielle Bedeutung biokatalytischer Prozesse wächst stetig. Während Straathof et al. (2002) 2002 noch 134 industriell eingesetzte biokatalytische Prozesse aufzählt, sind es 2019 bereits mehrere hundert (Woodley 2019).

3.3.1 Biotransformation mit isolierten Enzymen

In den Anfängen der industriellen enzymatischen Biokatalyse wurden oft Co-Faktor-unabhängige Hydrolasen verwendet (Truppo 2017). Das Aufkommen Co-Faktor-abhängiger Enzyme mit nützlichen Eigenschaften für unterschiedliche Synthesen, wie Keto-Reduktasen und Transaminasen, führte zur Entwicklung von Co-Faktor-Regenerierungssystemen (Wichmann und Vasic-Racki 2005) und erweiterte das Repertoire der biokatalytischen Chemie zu hydrolytischen, reduzierenden, transaminierenden, oxidierenden und halogenierenden Reaktionen (Hagen 2006), ohne auf klassische chemische Synthese zurückgreifen zu müssen (Sheldon et al. 2020). Das Einsatzspektrum von Enzymen in industriellen Prozessen ist heutzutage sehr groß (Tabelle 3.2) und lässt sich durch "enzyme engineering" sogar noch deutlich erweitern und verbessern (Sheldon und Woodley 2018). Auch die Verbesserung der Langzeitlagerfähigkeit und -stabilität gereinigter Enzyme sowie deren Robustheit gegenüber organischen Lösemitteln und Immobilisierung an Oberflächen führt zu einer Vergrößerung des Einsatzspektrums (Abdelraheem et al. 2019).

Tabelle 3.2: Einsatzspektrum von Enzymen in industriellen Prozessen für verschiedenste Anwendungen nach Robinson (2015).

Enzyme	Reaktion	aus Organismus	Anwendung
Säure-Proteasen	Proteinverdau	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Klyveromyces lactis</i>	Milchkoagulation in der Käseverarbeitung
Aminoacylase	Hydrolyse acylisierter L-Aminosäuren	<i>Bacillus</i> Spezies	L-Aminosäuren Produktion
Glukose-Isomerase	Glukose-Konversion	<i>Streptomyces</i> Spezies	Glukose Produktion
Urokinase	Plasminogen-Aktivierung	Mensch	Entfernung von Fibrinklumpen im Blut
Glukose-Oxidase	Oxidation	<i>Aspergillus niger</i>	Glukosedetektion im Blut
Luciferase	Biolumineszenz	marine Bakterien	Biolumineszenz-Assays
DNA Polymerasen	DNA Synthese	<i>Thermus aquaticus</i>	DNA Amplifikation in der Polymerasekettenreaktion

Die Verwendung immobilisierter Enzyme gegenüber isolierten Enzymen hat den Vorteil, dass der Katalysator wiederverwendet werden kann und somit die Kosten des Prozesses gesenkt werden. Auch die Anwendung kontinuierlicher Verfahren mit verbesserter Produktabtrennung ist durch die Immobilisierung möglich (Sheldon und Woodley 2018). Gleichzeitig können bei dieser Methode Stofftransportlimitierungen und unter Umständen veränderte Enzymeigenschaften auftreten. Auch die Kosten der Immobilisierung stehen dem Nutzen gegenüber (Castiglione 2018).

Ob immobilisiert oder nicht, Enzyme bieten in industriellen Prozessen große Vorteile durch ihre (chemische) Selektivität ohne Nebenproduktbildung, einfache Produktabtrennung und Wiederverwendbarkeit. Nachteile ergeben sich erst bei Multienzymsynthesen und Reaktionskaskaden, sowie durch die aufwendige Reinigung und Immobilisierung der Enzyme (Robinson 2015).

3.3.2 Biotransformation mit Ganzzellbiokatalysatoren

Die Ganzzellbiokatalyse mit Wildtypen oder genetisch modifizierten Organismen stellt die kostengünstigste Katalyse dar, denn die Kosten sind im Gegensatz zu isolierten Enzymen bis zu zehnfach geringer (Wachtmeister und Rother 2016). Besonders kostensenkend ist, dass keine Produktion und Reinigung entsprechender Enzyme zur Biokatalyse nötig ist (Goldberg et al. 2007). Außerdem kann der Ganzzellbiokatalysator durch einfache genetische Modifikationen auch nicht-native Reaktionen katalysieren (Lin und Tao 2017) und die intrazelluläre Regeneration von Co-Faktoren senkt die Kosten weiter, da ein externes Supplementieren nicht notwendig ist. Gleichzeitig bewirken Ganzzellbiokatalysatoren eine räumliche Trennung der Reaktion zum umgebenden Medium und schützen katalysierende Enzyme vor harschen Reaktionsbedingungen (Polakovič et al. 2017). Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von Zellen als Katalysatoren ist, dass diese auch unkonventionelle Substrate wie beispielsweise Lignocellulose oder Abwässer verwenden können (Sheldon und Woodley 2018). Durch das komplexe metabolische Netzwerk eines Mikroorganismus kann es allerdings auch zu unerwünschten Nebenreaktionen kommen (Goldberg et al. 2007). Andere natürlich in der Zelle vorkommende Enzyme könnten ebenfalls das Substrat oder das Produkt verwerten und damit die gewünschte Reaktion nicht priorisiert ablaufen oder die Selektivität für das Zielprodukt herabgesetzt werden (Lin und Tao 2017). Das führt nicht nur zu einer reduzierten Produktausbeute, auch die nachfolgende Produktreinigung kann durch Nebenprodukte erschwert werden (Sheldon und Woodley 2018). Die Nebenproduktbildung kann durch die Verwendung ruhender Zellen minimiert werden. Diese sind metabolisch in-

aktive Biokatalysatoren, welche das Edukt ausschließlich zur Produktbildung und nicht zum Wachstum nutzen (Castiglione 2018). Neben einer zeitlichen und sogar räumlichen Trennung von Biokatalysatorbildung und Produktbildung ist das Biotransformationsmedium auch weniger komplex, da für ruhende Zellen weniger Medienbestandteile notwendig sind (Sheldon und Woodley 2018). Jedoch kann gerade für Reaktionskaskaden, die auf verschiedene Co-Faktoren und ein redoxausgeglichenes Reaktionssystem angewiesen sind, eine wachstumsgekoppelte Biotransformation von Vorteil sein (Lin und Tao 2017).

Die Übertragung von Reduktionsäquivalenten zwischen zwei Redoxsystemen wird von einer Untergruppe der Oxidoreduktase katalysiert, den sogenannten Dehydrogenasen und Reduktasen. Bei der Oxidation von Alkoholen zu Ketonen und Aldehyden bzw. der Rückreaktion wird dabei ein Hydridion durch das entsprechende Enzym mithilfe eines Nicotinamidadeninindinukleotid(phosphat) (NAD(P) bzw. NAD(P)H) transferiert (Nakamura et al. 2003). Der Cofaktor wird dabei oxidiert und steht nicht mehr für weitere Reduktionen zur Verfügung.

In der wachstumsgekoppelten Ganzzellbiokatalyse kann die zellinterne Cofaktor-Regenerierung entweder in einem Substrat-gekoppelten oder auf einem Enzym-gekoppelten Ansatz ablaufen (Kroutil et al. 2004). Beim Substrat-gekoppelten Ansatz wird das gleiche Enzym, welches die Hauptreaktion katalysiert, auch genutzt, um den Cofaktor zu regenerieren (Wichmann und Vasic-Racki 2005). Dabei wird ein weiteres Co-Substrat in ein entsprechendes Co-Produkt umgewandelt (Abbildung 3.7, A).

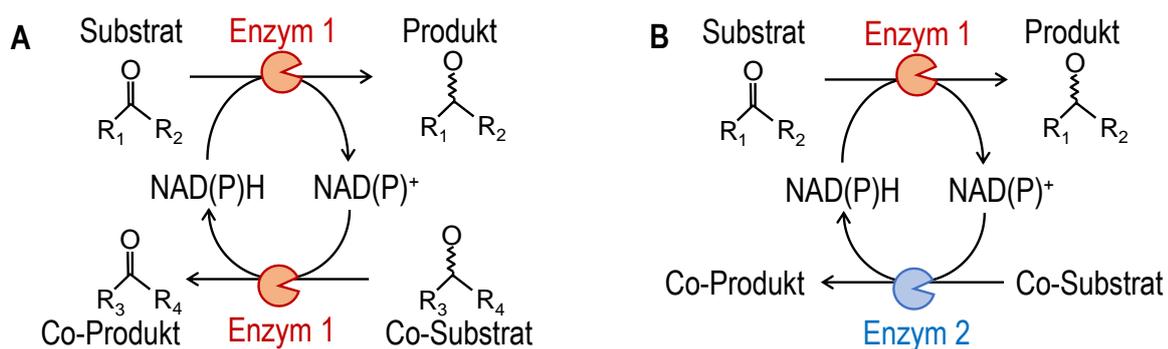


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung eines Substrat-gekoppelten (A) und Enzym-gekoppelten (B) Ansatz der Cofaktor-Regenerierung.

Für die Substrat-gekoppelte Cofaktor-Regenerierung wird die Zugabe eines möglichst kostengünstigen Co-Substrates angestrebt. Isopropanol wird mit Oxidoreduktasen häu-

fig verwendet und die Reduktionsreaktion des Ketons mit der Oxidationsreaktion des Alkohols gekoppelt (Wichmann und Vasic-Racki 2005). Ein Nachteil ist jedoch, dass je nach Reaktionsgleichgewicht zur Überwindung thermodynamischer Limitierungen hohe Konzentrationen an Co-Substrat zugegeben werden müssen (Faber 2011).

Der Enzym-gekoppelte Ansatz verwendet dagegen ein anderes Enzym als das die Hauptreaktion katalysierende Enzym für die Regenerierung des Cofaktors (Abbildung 3.7, B). Enzyme, bei der Enzym-gekoppelten Cofaktor-Regenerierung Anwendung finden, sind beispielsweise Formiat-Dehydrogenasen, Glukose-Dehydrogenasen oder Glukose-6-phosphat-Dehydrogenasen (Van Der Donk und Zhao 2003). Auch Sorbitol-Dehydrogenasen wurden bereits zur Regenerierung von Cofaktoren verwendet (Chambers et al. 1978, Gauer et al. 2014). Je nach SDH kann entweder NADH oder NADPH regeneriert werden. *S. cerevisiae* besitzt beispielsweise nativ NAD⁺-abhängige SDH (Sor1 und Sor2) (Sarthy et al. 1994), welche allerdings erst nach langer Adaptionsphase auf Sorbitol Aktivität zeigen (Jordan et al. 2016). Andere in Hefen vorkommende SDH ist die YISdr aus *Yarrowia lipolytica* (*Y. lipolytica*), welche die Oxidation von Sorbitol durch Reduzierung von NADP⁺ zu NADPH katalysiert.

3.3.3 *S. cerevisiae* als Biokatalysator zur Reduktion von D-GalA

Die effiziente Verwertung der in Hydrolysaten vorkommenden Zuckermonomermischungen durch Hefen ist für deren biotechnologische Verwertung essentiell (Martins et al. 2020). Hydrolysate aus pektinreichen Reststoffen enthalten überwiegend die Neutralzucker Arabinose, Glukose und Galaktose sowie D-GalA (Micard et al. 1996) und Hefestämme sollten in der Lage sein, die vorhandenen Zucker schnell und effizient zu katabolisieren. Problematisch ist in Hefen die Katabolitrepession, welche die effiziente Verwertung multipler Kohlenstoffsubstrate in biotechnologischen Prozessen limitiert (Kayikci und Nielsen 2015). Tatsächlich hemmt Glukose die Aufnahme anderer Zucker, was auch bereits für die Aufnahme von D-GalA gezeigt wurde (Huisjes et al. 2012, Protzko et al. 2018, Souffriau et al. 2012). Zwar gibt es keinen Transporter für D-GalA in Hefe, basale Aufnahme wurde jedoch in *S. cerevisiae* bei niedrigem pH festgestellt, nicht jedoch, wenn Glukose im Medium präsent war (Matsubara et al. 2016, Souffriau et al. 2012). Durch die Expression eines D-GalA-Transporter in *S. cerevisiae* konnte nicht nur der inhibierende Effekt von Glukose auf den D-GalA-Transport umgangen werden, auch

eine verbesserte Aufnahme wurde beobachtet (Benz et al. 2014, Jeong et al. 2020).

Die Nutzung von D-GalA aus pektinreichen Reststoffen war in bisherigen Studien nur in Kombination mit Co-Substraten, die die benötigten Co-Faktoren NAD(P)H regenerieren, möglich, allerdings stand der Biomasseaufbau oder die Produktion von Ethanol und anderen Molekülen im Fokus der Forschung (Biz et al. 2016, van Maris et al. 2006, Matsubara et al. 2016, Protzko et al. 2018). Es gab bereits Bemühungen, filamentöse Pilze für die Reduktion von D-GalA zu L-GalOA zu nutzen. Die verwendeten *A. niger* Deletionsmutanten konnten bis zu $8,7 \text{ g L}^{-1}$ D-GalA in 144 h produzieren, aber die Umsetzung von D-GalA zu L-GalOA war nicht stöchiometrisch und es wurden weitere unbekannte Abbaureaktionen für L-GalOA in *A. niger* vermutet (Kuivanen et al. 2012).

Eine Studie von Benz et al. (2014) adressierte die Reduktion von D-GalA zu L-GalOA in rekombinanten *S. cerevisiae*. In Schüttelkolbenexperimenten konnte gezeigt werden, dass mit der heterologen Expression eines D-GalA-Transporters aus *Neurospora crassa* (*N. crassa*) (GAT-1) und einer D-GalA-Reduktase aus *Aspergillus niger* (*A. niger*) (GAAA) in *S. cerevisiae* eine Umsetzung von D-GalA zu L-GalOA grundsätzlich möglich ist. Allerdings war auch hier die Umsetzung von D-GalA nicht vollständig und Produktkonzentrationen waren niedrig (Benz et al. 2014).

Um die Reduktion von D-GalA zu L-GalOA in rekombinanten *S. cerevisiae* zu erreichen kann eine der unter Abschnitt 3.2.2 beschriebenen D-GalA-Reduktasen heterolog exprimiert werden. Als vorteilhaft hat sich zusätzlich die Expression eines D-GalA-Transporters, wie in Abschnitt 3.2.2 vorgestellt, erwiesen (Benz et al. 2014, Jeong et al. 2020).

Die erste Strategie beinhaltet die Cofaktor-Regenerierung über den Zentralstoffwechsel und beispielsweise Glukose als Co-Substrat. Die Regeneration von Reduktionsäquivalenten erfolgt über den zentralen Kohlenstoffwechsel (Abschnitt 3.1.2) und kann durch unterschiedliche molekularbiologische Modifikationen verbessert werden (Liu et al. 2018). Eine Ausschaltung zentraler Enzyme von Nebenstoffwechselwegen, wie beispielsweise der alkoholischen Gärung, führt zur intrazellulären Akkumulation von Cofaktoren (Chen et al. 2014). Auch die Verwendung stark aktiver Promoter vor den heterologen Genen, die Erhöhung des Cofaktorspektrums des katalysierenden Enzyms durch "enzyme engineering" oder eine Überexpression der transformierten Gene durch Multicopy-Plasmide stellen Möglichkeiten zur Verbesserung heterologer Reaktionen in Ganzzellbiokatalysatoren dar (Chen et al. 2020, Lin und Tao 2017, Liu et al. 2018).

Ebenso kann die Cofaktor-Regenerierung durch ein Regenerierungsenzym und ein Co-Substrat können für die Reduktion von D-GalA als Strategie verfolgt werden (Castiglio-

ne 2018). Oxidoreduktasen wie beispielsweise Sorbitol-Dehydrogenasen eignen sich hierfür, da diese unter Verbrauch von NAD^+ oder NADP^+ Sorbitol zu Fruktose oxidieren (Gauer et al. 2014, Napora et al. 2013) und damit, anders als beim glykolytischen Abbau von Glukose als Co-Substrat, mit Sorbitol ein zusätzliches Molekül NAD(P)H im Vergleich zur Glykolyse generieren (Chambers et al. 1978, Sarthy et al. 1994).

4 Material und Methoden

Im Folgenden werden alle in dieser Arbeit verwendeten Methoden beschrieben. Alle Verbrauchsmaterialien und Chemikalien, sowie verwendete Geräte sind im Anhang gelistet (Kapitel 9).

4.1 Stamm und Stammmhaltung

Zur L-GalOA Herstellung wurden unterschiedliche rekombinante *S. cerevisiae* Stämme verwendet. Diese wurden vom Kooperationspartner am Institut für Molekulare Biowissenschaften der Goethe-Universität Frankfurt von Dr. Mislav Oreb bereitgestellt. Im Folgenden werden die rekombinanten *S. cerevisiae* Stämme detaillierter vorgestellt.

4.1.1 *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

Zur Bereitstellung des Biokatalysators für die Biotransformation von D-GalA in *S. cerevisiae* wurden rekombinante Stämme mit unterschiedlichem parentalen Hintergrund erstellt. Der Stamm CEN.PK2-1C stellt dabei den übergeordneten Parentalstamm dar, aus dem sich der Stamm EBY.VW4000 ableitet (Wieczorke et al. 1999). Die CEN.PK Stämme entstanden als interdisziplinäres Projekt, um einen Stamm zu entwickeln, der unterschiedliche Kriterien gut erfüllt: hohe Wachstumsraten unter unterschiedlichen Prozessbedingungen (Medium, anaerobe/aerob, Satz-, Zulauf- und kontinuierliche Prozesse), hohe Sporulationsraten, hohe Sporulationsvitalität, hohe Transformationseffizienz und gute Ein-Zell-Bildung (Entian und Kötter 2007). Daraus entstand der haploide Stamm CEN.PK2-1C, welcher kein Wildtyp *S. cerevisiae* Stamm ist, denn er trägt genetische Modifikationen. Durch das SUC2-Gen kann Saccharose, durch das MAL2-8c-Gen Maltose verstoffwechselt werden. Die eingeführten Auxotrophien für Histidin, Leucin, Tryptophan und Uracil wurden im CEN.PK2 durch korrespondierende Wildtyp-Gene ausgetauscht, sind aber im CEN.PK2-1C noch vorhanden (Entian und Kötter 2007). Beim davon abgeleitete Stamm EBY.VW4000 wurden sukzessive 18 Gene der Hexose-Transporterfamilien in *S. cerevisiae* deletiert. Mit zusätzlichen Deletionen konnten das Wachstum dieses Stammes auf Hexosen fast vollständig abgeschaltet werden (Wieczorke et al. 1999).

Alle rekombinanten *S. cerevisiae* Stämme hatten entweder den *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C oder den *S. cerevisiae* EBY.VW4000 als parentalen Hintergrund. Die Gensequenzen der im Folgenden beschriebenen Enzyme und Transporter wurden genomisch als Gen-

kassette entweder im URA3- oder im LEU2-Lokus integriert, um die genetische Stabilität über lange Prozesszeiten zu erhalten (Ryan et al. 2014). Die Gene lagen dabei hinter unterschiedlichen konstitutiv exprimierten Promotoren. Die Genkassette beinhaltete außerdem einen Geneticin-Selektionsmarker (G418) (Harth et al. 2020). Die entsprechenden Genotypen der rekombinanten *S. cerevisiae* Stämme sind in Tabelle 4.1 zu finden.

Zum Transport der D-GalA ins Zytoplasma wurde der Transporter AnGAT aus *A. niger* gewählt, denn obwohl basale Aufnahme von D-GalA in *S. cerevisiae* bei niedrigem pH festgestellt wurde, war die Aufnahmegeschwindigkeit niedrig (Matsubara et al. 2016, Souffriau et al. 2012). Gleichzeitig konnte eine Inhibition der Aufnahme von D-GalA festgestellt werden, wenn Glukose im Medium präsent war (Protzko et al. 2018, Souffriau et al. 2012). Studien zeigten, dass die Expression eines D-GalA-Transporters aus *Neurospora crassa* eine deutlich schnellere Aufnahme von D-GalA und ohne inhibierenden Effekt von Glukose erzielte (Benz et al. 2014, Jeong et al. 2020).

Deswegen wurde der in *A. niger* existierende und zu dem in *N. crassa* homologe Transporter AnGAT für die rekombinanten *S. cerevisiae* Stämme verwendet. Dessen kinetische Eigenschaften wurde in Studien von Protzko et al. (2018) mit einem v_{\max} von $12,1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ Protein und einem K_M von $340 \text{ }\mu\text{M}$ angegeben. Die für *S. cerevisiae* codon-optimierte Gensequenz des Transporters wurde in alle untersuchten rekombinanten *S. cerevisiae* Stämme genomisch hinter den CCW12-Promoter integriert. Zur Reduktion von D-GalA wurde außerdem eine D-GalA-Reduktase aus *A. niger* verwendet, die AnGar1. Diese kann vornehmlich NADPH-gekoppelt die Umsetzung von D-GalA zu L-GalOA katalysieren. Auch diese für *S. cerevisiae* codon-optimierte Gensequenz der AnGar1 wurde hinter einen konstitutiven Promoter (PGK1) gesetzt und genomisch in rekombinante *S. cerevisiae* Stämme integriert.

Kopplung der L-GalOA Produktion an unterschiedliche Co-Substrate

Die Reduktion von D-GalA wurde an unterschiedliche Co-Substrate gekoppelt und entsprechende Gene in *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C bzw. *S. cerevisiae* EBY.VW4000 eingebracht.

Die Kopplung der Reduktion von D-GalA sollte zunächst an den Zentralstoffwechsel von *S. cerevisiae* erfolgen. Zur Nutzung von Glukose als Co-Substrat wurden die beiden erforderlichen Gene, also die D-GalA-Reduktase AnGar1 und der D-GalA-Transporter

AnGAT wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben in *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C genomisch integriert. Daraus resultierte der Stamm SiHY027.

Für die Nutzung von Sorbitol als Co-Substrat zur Biotransformation von D-GalA wurden ausgehend vom Stamm *S. cerevisiae* EBY.VW4000, einem Abkömmling von *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C, rekombinante *S. cerevisiae* Stämme entwickelt. Der Stamm *S. cerevisiae* EBY.VW4000 wurde als auxotropher Basisstamm gewählt, da er durch die Deletion von Genen der Hexosetransporterfamilie nicht in der Lage ist, Hexosen als Kohlenstoffquelle zu nutzen (Wieczorke et al. 1999).

Wie unter Abschnitt 3.3.2 beschrieben eignet sich der Zuckeralkohol Sorbitol besonders gut für die Regeneration von Reduktionsäquivalenten, da Sorbitol über einen enzymatischen, oxidativen Schritt in *S. cerevisiae* in Fruktose umwandelt wird, welches in die Glykolyse fließt. Mithilfe von Sorbitol-Dehydrogenasen (SDH) wird pro Sorbitol-Molekül ein Reduktionsfaktor generiert (Abbildung 3.3). Je nach SDH kann das entweder NADH oder NADPH sein und somit die Reduktion von D-GalA ausbalancieren.

S. cerevisiae besitzt nativ NAD⁺-abhängige SDHs (SOR) (Sarthy et al. 1994), welche allerdings erst nach langer Adaptionsphase auf Sorbitol geringe Aktivität zeigen (Jordan et al. 2016). Die SDH YISdr aus *Yarrowia lipolytica* (*Y. lipolytica*) katalysiert hingegen die Oxidation von Sorbitol durch Reduzierung von NADP⁺ zu NADPH. Codon-optimierte Gensequenzen der nativen SDH SOR2 oder der YISdr aus *Y. lipolytica* wurden hinter den konstitutiven Promoter TEF2 kloniert und genomisch in rekombinante *S. cerevisiae* Stämme integriert.

Zusätzlich wurde für eine verbesserte Aufnahme des Co-Substrats Sorbitol der native Hxt13-Transporter hinter den konstitutiven Promoter TDH3 integriert. Der K_M des Transporter liegt bei $20,4 \pm 2,4$ mM und ist damit hochaffin für Sorbitol. Der v_{max} liegt bei $4,8 \pm 0,2$ nmol min⁻¹ mg⁻¹ Biotrockenmasse (Jordan et al. 2016).

Für eine NADPH-gekoppelte Produktbildung wurde die NADP⁺-abhängige SDH YISdr aus *Y. lipolytica* verwendet und mit der Wildtyp-D-GalA-Reduktase AnGar1 aus *A. niger* kombiniert. Das NADH/NAD⁺-ausgeglichene Reaktionssystem wurde durch Überexpression der nativen SDH SOR2 erreicht, während mutierte Varianten der AnGar1 für die NADH-abhängige Reduktion von D-GalA verwendet werden (siehe nachfolgenden Abschnitt 4.1.1).

Ortsspezifische Mutagenese von D-GalA-Reduktasen

Die Motivation für den spezifischen Austausch von Aminosäuren in AnGar1 war vor allem die Kopplung der Reduktion von D-GalA an die Glykolyse, um eine Zugabe von nötigen Co-Substraten wie Sorbitol zu umgehen. Obwohl mit AnGaaA ein Enzyme mit NADH-Aktivität existiert, war die katalytische Effizienz um ein Vielfaches reduziert im Vergleich zur AnGar1 (Martens-Uzunova und Schaap 2008). Da es für die AnGar1 noch keine publizierten Strukturmodelle gibt, wurde für den gezielten Austausch von Aminosäuren in der Co-Faktor-Bindetasche von AnGar1 auf Strukturmodelle sequenzverwandter Enzymen zurückgegriffen.

Als Vorlage zur Erstellung des Homologiemodells für AnGar1 diente die NADPH-abhängige Aldehyd-Reduktase AKR1A1 aus *Sus scrofa* (PDB ID 1HQT) mit einer Sequenzübereinstimmung von 37 %. Deren publizierte Kristallstruktur enthält zusätzlich auch den Co-Faktor, womit Vorhersagen zu potentiell mit NADPH interagierenden Aminosäurereste im aktiven Zentrum von AnGar1 getroffen werden konnten (Abbildung 4.1). Zwei positiv geladene Aminosäuren in der Sequenz von AnGar1, Lysin (K261) und Arginin (R267), wurden für die ortsspezifische Mutagenese ausgewählt, um die Co-Faktor-Akzeptanz für NADPH zu erniedrigen und gleichzeitig für NADH zu erhöhen. Für Lysin wurde ein Austausch zu Methionin verfolgt, da dieses einen ähnlich langen Aminosäurerest besitzt, nicht aber die positive Ladung. Hieraus resultierte die D-GalA-Reduktase Einfachmutante AnGar1*. Für die D-GalA-Reduktase Doppelmutante AnGar1** wurde zusätzlich zur ersten Mutation auch Arginin aufgrund einer ähnlichen Überlegung zur Länge des Aminosäurerests zu Leucin ausgetauscht. Alle rekombinanten *S. cerevisiae* Stämme wurden vom Kooperationspartner bereitgestellt.

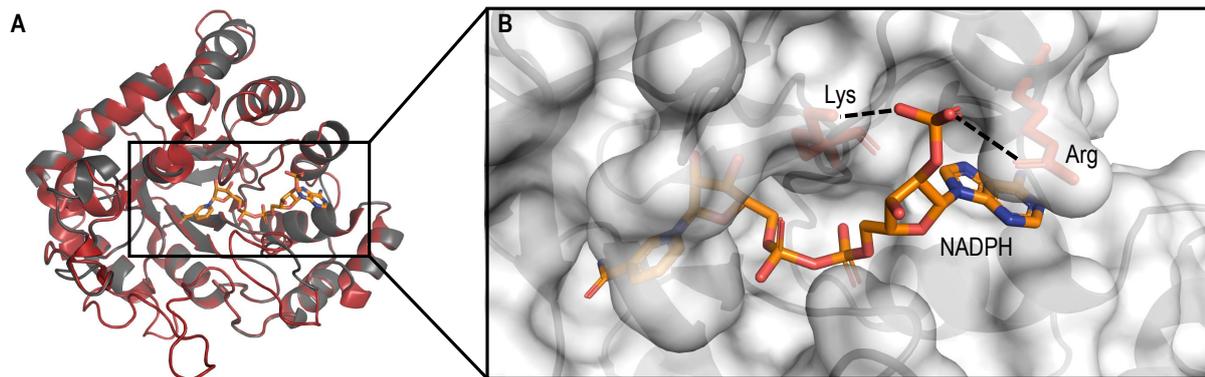


Abbildung 4.1: Strukturhomologiemodell von AnGar1 mit Co-Faktor NADPH. Das Homologiemodell von AnGar1 (grau) wurde auf Grundlage der Kristallstruktur von AKR1A1 (rot, PDB ID 1HQT) mit Co-Faktor in der Bindetasche erstellt (A). Die elektrostatischen Interaktionen der positiv geladenen Aminosäurereste Lysin (Lys) und Arginin (Arg) in der Co-Faktorbindetasche mit der negativ geladenen Phosphatgruppe des NADPHs wurden durch spezifischen Austausch aufgehoben (B).

Somit konnte ein NADH/NAD⁺-ausgeglichenes Reaktionssystem durch Kombination der nativen SDH SOR2 mit mutierten Varianten der AnGar1 (AnGar1* und AnGar1**) für die NADH-abhängige Reduktion von D-GalA erreicht werden. Die daraus resultierenden Stämme waren SiHY030 (AnGar1*) und SiHY032 (AnGar1**).

Die Stämme SiHY040 (AnGar1*) und SiHY041 (AnGar1**) trugen die mutierten Gensequenzen der AnGar1, jedoch nicht die Gene für den Hxt13-Transporter und die SDH SOR2 und konnten mit Glukose als Co-Substrat NADH-abhängig reduzieren.

Ansätze zur Erhöhung der NADH-Verfügbarkeit

Die NADH-gekoppelte Reduktion von D-GalA ohne Zusatz von Co-Substraten zum Generieren eines NADH-Überschusses steht immer in Konkurrenz zu glykolytisch gekoppelten Reaktionen. Zur Erhöhung der Verfügbarkeit von NADH in *S. cerevisiae* für die Reduktion von D-GalA wurde zusätzlich der Ansatz verfolgt, NADH-verbrauchende Reaktionen zu unterbinden. Besonders die Bildung von Ethanol, entweder als Resultat des Crabtree-Effekts oder aufgrund unzureichender Sauerstoffversorgung in Kultivierungen, verbraucht NADH (De Deken 1966). Die Deletion der aktivsten Alkohol-Dehydrogenase (ADH) in *S. cerevisiae*, Adh1, führt theoretisch zu einer Akkumulation von NADH im Cytosol, welches damit den NADH-verbrauchenden D-GalA-Reduktasen zur Verfügung steht. Deswegen wurden für das Vorhaben rekombinante *S. cerevisiae*-Stämme bereitgestellt, die eine Deletion der Adh1 tragen. In Verbindung mit mutierten, NADH-ab-

hängigen D-GalA-Reduktasen kann so in der Theorie ein Redox-Faktor-ausgeglichenes Reaktionssystem entstehen. Die hieraus resultierenden Stämme waren SiHY036 (AnGar1*) und SiHY037 (AnGar1**)

Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die Genotypen aller vom Kooperationspartner am Institut für Molekulare Biowissenschaften der Goethe-Universität Frankfurt unter der Leitung von Dr. Mislav Oreb konstruierten Stämme.

Mehrfachintegration von D-GalA-Reduktasen

In allen in diesem Vorhaben verwendeten rekombinanten *S. cerevisiae*-Stämme wurden Gene als Genkassetten chromosomal integriert. Das ist vor allem mit der höheren genetischen Stabilität gegenüber plasmidischer Integration über den Prozessverlauf zu argumentieren (Ryan et al. 2014). Im Gegensatz dazu wurden beim Kooperationspartner Multy-Copy-Plasmide verwendet. Obwohl höhere Zelldichten in Bioreaktoren im Vergleich zu Schüttelkolben erzielt werden können (Weuster-Botz und Takors 2018), ist die theoretisch exprimierte Anzahl an D-GalA-Reduktasen in *S. cerevisiae* mit genomisch integrierter Kasette deutlich niedriger. Um die Anzahl an exprimierbaren Genen zu erhöhen wurde deswegen eine weitere Kopie des D-GalA-Reduktase-Gens hinter den gleichfalls konstitutiv exprimierten TDH3 Promoter kloniert und somit die Anzahl an Genen verdoppelt. Die hieraus resultierenden Stämme waren SiHY058 (AnGar1*) und SiHY059 (AnGar1**).

Tabelle 4.1: Verwendete rekombinante *S. cerevisiae* Stämme zur L-GalOA Produktion mit chromosomaler Integration der entsprechenden Gene. *ura3/leu2* sind die Loci, in die die Genkassette integriert wurde. Flankierende Sequenzen sind mit p (Promotor) und t (Terminator) gekennzeichnet. AnGATA = D-GalA-Transporter, AnGAR1 = D-GalA-Reduktase ([] = Aminosäureaustausch), HXT13 = Sorbitol-Transporter, YISdr/SOR2 = Sorbitol-Dehydrogenase, KanMX = Resistenzmarker.

Kurzbezeichnung	Parentalstamm	Beschreibung
CEN.PK2-1C	-	Parentalstamm
EBY.VW4000	CEN.PK2-1C	auxotropher Multideletionsstamm
SiHY001	EBY.VW4000	Δ ura3::pCCW12-AnGATA-tPGK1-pPGK1-AnGAR1-tENO1-pTDH3-HXT13-tSSA1-pTEF2-YISDR-tADH1-pAgTEF-KanMX-tAgTEF
SiHY027	CEN.PK2-1C	Δ ura3::pCCW12-AnGATA-pPGK1-AnGAR1-pTDH3-HXT13-pTEF2-SOR2-KanMX-tAgTEF
SiHY030	CEN.PK2-1C	Δ ura3::pCCW12-AnGATA-pPGK1-AnGAR1[R267L]-pTDH3-HXT13-pTEF2-SOR2-KanMX-tAgTEF
SiHY032	CEN.PK2-1C	Δ ura3::pCCW12-AnGATA-pPGK1-AnGAR1[K261M,R267L]-pTDH3-HXT13-pTEF2-SOR2-KanMX-tAgTEF
SiHY036	CEN.PK2-1C	Δ adh1 Δ ura3::pCCW12-AnGATA-pPGK1-AnGAR1[R267L]-pTDH3-HXT13-pTEF2-SOR2-KanMX-tAgTEF
SiHY037	CEN.PK2-1C	Δ adh1 Δ ura3::pCCW12-AnGATA-pPGK1-AnGAR1[K261M, R267L]-pTDH3-HXT13-pTEF2-SOR2-KanMX-tAgTEF
SiHY040	CEN.PK2-1C	Δ ura3::pCCW12-AnGATA-pPGK1-AnGAR1[R267L]-KanMX-tAgTEF
SiHY041	CEN.PK2-1C	Δ ura3::pCCW12-AnGATA-pPGK1-AnGAR1[K261M,R267L]-KanMX-tAgTEF
SiHY058	CEN.PK2-1C	Δ ura3::pCCW12-AnGATA-pPGK1-AnGAR1[R267L]-KanMX-tAgTEF Δ leu2::pTDH3-AnGar1[R267L]-tENO1-CloNAT
SiHY059	CEN.PK2-1C	Δ ura3::pCCW12-AnGATA-pPGK1-AnGAR1[K261M,R267L]-KanMX-tAgTEF Δ leu2::pTDH3-AnGar1[K261M,R267L]-tENO1-CloNAT

4.1.2 Reaktionsmedien

Medium auf Hefeextrakt-Pepton-Basis

In wenigen Experimenten wurde, wenn im Ergebnisteil angemerkt, Medium aus Hefeextrakt und Pepton verwendet. Pro Liter Medium wurden 10 g Hefeextrakt und 20 g Pepton eingewogen und VE-Wasser bis zu einem Volumen von 900 mL zugegeben. Dieses Grundmedium wurde für 20 min bei 121°C autoklaviert. Je nach Kohlenstoffquelle und Endkonzentration der Kohlenstoffquelle im Medium wurden 100 mL einer sterilen Stammlösung der Kohlenstoffquelle steril zum Medium zugegeben.

Synthetisches Komplettmedium für Vorkultur und Stammhaltung

Die Vorkulturherstellung und Stammhaltung der rekombinanten *S. cerevisiae* Stämme erfolgte in synthetischem Komplettmedium (SC-Medium). Die Grundlage bildet hierbei das Trockenkulturmedium (YNB) von BD Difco™ auf Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfate (Tabelle 4.2). Zur Herstellung von einem Liter Medium wurden das Trockenkulturmedium und Ammoniumsulfat wie angegeben eingewogen und mit vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) auf 800 mL aufgefüllt. Der pH wurde mit 3 M KOH auf 6,4 eingestellt. Das Medium wurde bei 121 °C für 20 min sterilisiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde dem Medium 50 mL separat hergestellte, steril filtrierte (0,22 µm) D-GalA Stammlösung (100 g L⁻¹) und 100 mL 50x Aminosäuremix (Tabelle 9.7) nach Bruder et al. (2016) sowie je nach Kohlenstoffquelle 50 mL der jeweiligen Stammlösung (200 g L⁻¹) steril zugegeben.

Tabelle 4.2: Zusammensetzung des synthetischen Komplettmediums (SC-Medium) für Vorkulturen und zur Stammhaltung. Die genaue Zusammensetzung des YNB ist in Tabelle 9.8, die des 50 x Aminosäure-Mix in Tabelle 9.7 zu finden.

Komponente		Konzentration, g L ⁻¹
YNB		1,7
(NH ₄) ₂ SO ₄		10
Medienbestandteil	sterile Zugabe für 1 L	Endkonzentration
50 x Aminosäure-Mix	100 mL	
D-GalA (100 g L ⁻¹)	50 mL	5 g L ⁻¹
Kohlenstoffquelle (200 g L ⁻¹)	50 mL	10 g L ⁻¹

Reaktionsmedien zur Kultivierung von *S. cerevisiae* im Rührkesselreaktor

Zur Biotransformation von *S. cerevisiae* in Rührkesselreaktoren im Satzprozess wurde, wenn im Ergebnisteil nicht anders angemerkt, das gleiche Reaktionsmedium wie für die Vorkulturherstellung verwendet (Tabelle 4.2).

Reaktionsmedium mit geklärtem Zuckerrübenschnitzelhydrolysat

Zuckerrübenschnitzelhydrolysat wurde von Dominik Schäfer mithilfe von Pektinasen aus *A. niger* hergestellt (Schäfer et al. 2020). Dazu wurden extrahierte, vorgetrocknete und vorgemahlene Zuckerrübenschnitzel mit einer Partikelgröße unter 1 mm verwendet (Südzucker AG, Obrigheim, Germany). Für die Hydrolyse des komplexen Substrats wurden 70 g L^{-1} Zuckerrübenschnitzel in 100 mM Kaliumcitrat-Puffer für 20 min bei 121°C autoklaviert. Anschließend wurden sterilfiltrierte Überstände aus *A. niger* Kultivierungen zur Pektinaseproduktion entsprechend 57 U Polygarakturonase pro g Zuckerrübenschnitzel zugegeben, genauso $34 \mu\text{g mL}^{-1}$ Kanamycin. Die Hydrolyse erfolgte als Satzprozess mit einem Reaktionsvolumen von 5 L im Rührkesselreaktor (Labfors 3, Infors HT, Bottmingen, Schweiz) bei pH 4,5, 30°C und unter ständigem Mischen mit Hilfe von zwei "Elefantenohrrührer" (65 mm im Durchmesser, Infors HT, Bottmingen, Schweiz) bei 700 min^{-1} für 169 Stunden. Das Hydrolysat wurde geerntet, indem Festbestandteile durch Zentrifugation (60 min bei 3260 Relative Zentrifugalbeschleunigung (RZB)) und mehrstufige sterile Filtration ($2,5 \mu\text{m}$, $0,45 \mu\text{m}$ und $0,22 \mu\text{m}$) abgetrennt wurden. Die vorhandenen Zucker im Hydrolysat wurden mittels HPLC bestimmt. Für Biotransformationen mit Hydrolysat als Komplexbestandteil wurde das Medium aus separat hergestellten, sterilen Stammlösungen der einzelnen Komponenten wie in Tabelle 4.3 angegeben gemischt.

Tabelle 4.3: Zusammensetzung der Reaktionsmedien im Rührkesselreaktor.

Komponente	Konzentration Stammlösung	Anteil, % (v/v)
YNB	17 g L^{-1}	10
Aminosäure-Mix	50 x	10
Hydrolysat	-	70
Sorbitol	200 g L^{-1}	10

4.1.3 Stammhaltung

S. cerevisiae Stämme wurden längerfristig als Glyceringefrierkulturen bei -80 °C gelagert. Hierfür wurden die Stämme als Einzelkolonie von Agarplatten gepickt und in 1000 mL Schüttelkolben mit 100 mL Füllvolumen SC-Medium (Tabelle 4.2) für 48 h bei 30 °C, 180 rpm und 5 cm Exzentrizität inkubiert. Zwischen einer OD₆₀₀ von 1 - 1,4 wurde die Zellkultur mit einer sterilen 50 % (v/v) Glycerinlösung versetzt und in Sicherheitsverschlussreaktionsgefäßen zu je 750 µL aliquotiert. Die Aliquots wurden bei -80 °C eingefroren.

4.2 Kultivierung und Biotransformation mit *Saccharomyces cerevisiae*

4.2.1 Vorkulturherstellung

Vorkulturen für Satzverfahren im Rührkesselreaktor wurden in 1000 mL Schüttelkolben ohne Schikanen angezogen. Dafür wurden sterilisierte Schüttelkolben steril mit 100 mL sterilem SC-Medium mit entsprechender Kohlenstoffquelle befüllt. Die Kolben wurden mit 500 µL einer frisch aufgetauten Glyceringefrierkultur inokuliert und für 72 h bei 30 °C, 180 rpm und 5 cm Exzentrizität inkubiert. Die Kulturen wurden mikroskopisch auf Kontamination untersucht und die OD₆₀₀ gemessen. Basierend auf dem Messwert wurde das zu entnehmende Volumen berechnet, um mit einer OD₆₀₀ von 0,4 ($\hat{=}$ 0,25 g Biotrockenmasse (BTM)) den Rührkesselreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 1,2 L oder 0,6 L zu inokulieren. Die Kultur wurde in sterilen Reaktionsgefäßen für 10 min bei 1972 RZB und 10 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit einem gleichen Volumen an steriler Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal durchgeführt. Das Zellpellet wurde anschließend zur Inokulation in einem möglichst kleinen Volumen an SC-Medium (ca. 10 mL) resuspendiert und in eine sterile Spritze mit steriler Kanüle aufgezogen.

4.2.2 Satzverfahren in Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab

Parallele Versuche ohne pH-Regelung wurden mit miniaturisierten Bioreaktoren (bio-REACTOR48, 2mag AG, München, Deutschland) durchgeführt, welche in ein Laborrobotersystem mit Pipettierfunktion (MICROLAB STAR™LetM, Hamilton Bonaduz AG, Schweiz) eingebettet waren (Abbildung 4.2). Der Bioreaktorblock kann mit bis zu 48 mi-

niaturisierten Bioreaktoren mit einem Reaktionsvolumen von 8-12 mL aus Polystyrol bestückt werden. In Verwendung waren in allen Versuchen sterile Einwegbioreaktoren mit Schikanen (BZ1002, 2mag AG, München, Deutschland), an deren inneren Boden fluorometrische Sensoren für gelösten Sauerstoff (PST3-HG, PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland) und pH (LG1, PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland) angebracht waren. Sowohl pH als auch Gelöstsauerstoff konnten während des Prozesses über Sensorriegel unterhalb der Reaktoren mithilfe der Dual-Lifetime-Referencing (DLR) Methode gemessen werden (Janzen et al. 2015, Kusterer et al. 2008). Die Sauerstoffversorgung und Durchmischung des Mediums wurde über gasinduzierende Rührer mit Hohlachse gewährleistet, welche elektromagnetisch angetrieben wurden. Der Reaktorraum des bioREACTOR48 wurde über ein Thermostat temperiert, während ein davon unabhängiger Kühlkreislauf den Kopfraum auf 20°C kühlte. Gleichzeitig wurde die Zuluft in den Bioreaktoren bei Raumtemperatur mit sterilem VE-Wasser gesättigt, um die Verdunstung zu minimieren. Die Zuluft wurde über eine Sterilgasabdeckung in die Reaktoren geleitet, an der die Rührorgane auf Steckachsen befestigt waren. Die Abdeckung verfügte außerdem über Öffnungen, durch die Prozessgas entweichen und Proben genommen werden konnte. Die Probennahme erfolgte mithilfe des ansteuerbaren Pipettierarms des Laborroboters in eine bereitgestellte Mikrotiterplatte (MTP) für die offline-Messung der OD₆₀₀.

Für Versuche mit dem bioREACTOR48 wurde die Sterilgasabdeckung mitsamt Rührern für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Die Öffnungen der Sterilgasabdeckung waren dabei mit einem Streifen Autoklavierband überklebt. Der Reaktorblock wurde unter der Sterilwerkbank mit den entsprechenden sterilen Einwegbioreaktoren spaltenweise von hinten nach vorne bestückt. Auch die Befüllung der einzelnen Reaktoren erfolgte spaltenweise, wobei zur Vermeidung von Kontaminationen eine sterile Alufolie zur Abdeckung der anderen Reaktoren mitgeführt wurde. Die Inokulation jedes Reaktors erfolgte zum Schluss und die Sterilgasabdeckung wurde auf den Block gesetzt. Der zusammengebaute Bioreaktorblock wurde anschließend von der Sterilwerkbank in die Laborroboterumgebung transferiert und an Zuluft, vortemperierte Wasserbäder und das Steuermodul der Magnetrührer angeschlossen. Das Autoklavierband wurde nach Anschalten der Begasung von den Öffnungen entfernt. Die Aufzeichnung von Daten und Steuerung der Magnetrührer erfolgte über die Software bioREACTOR 48 (v2.0.5.18077, 2mag AG). Versuche wurden bei 30°C Blocktemperatur, einer Rührerdrehgeschwindigkeit von 2000 min⁻¹ und einer Begasung von 0,1 L min⁻¹ Reaktor⁻¹ durchgeführt. In regelmäßigen Abständen wurden mithilfe des Pipettierarms 200 µL Probevolumen zur Bestimmung der

OD₆₀₀ und zur Substrat- und Produktanalytik genommen. Die Pipettenspitzen wurden nach jeder Nutzung mit Ethanol gespült, um Kreuzkontamination zu vermeiden.

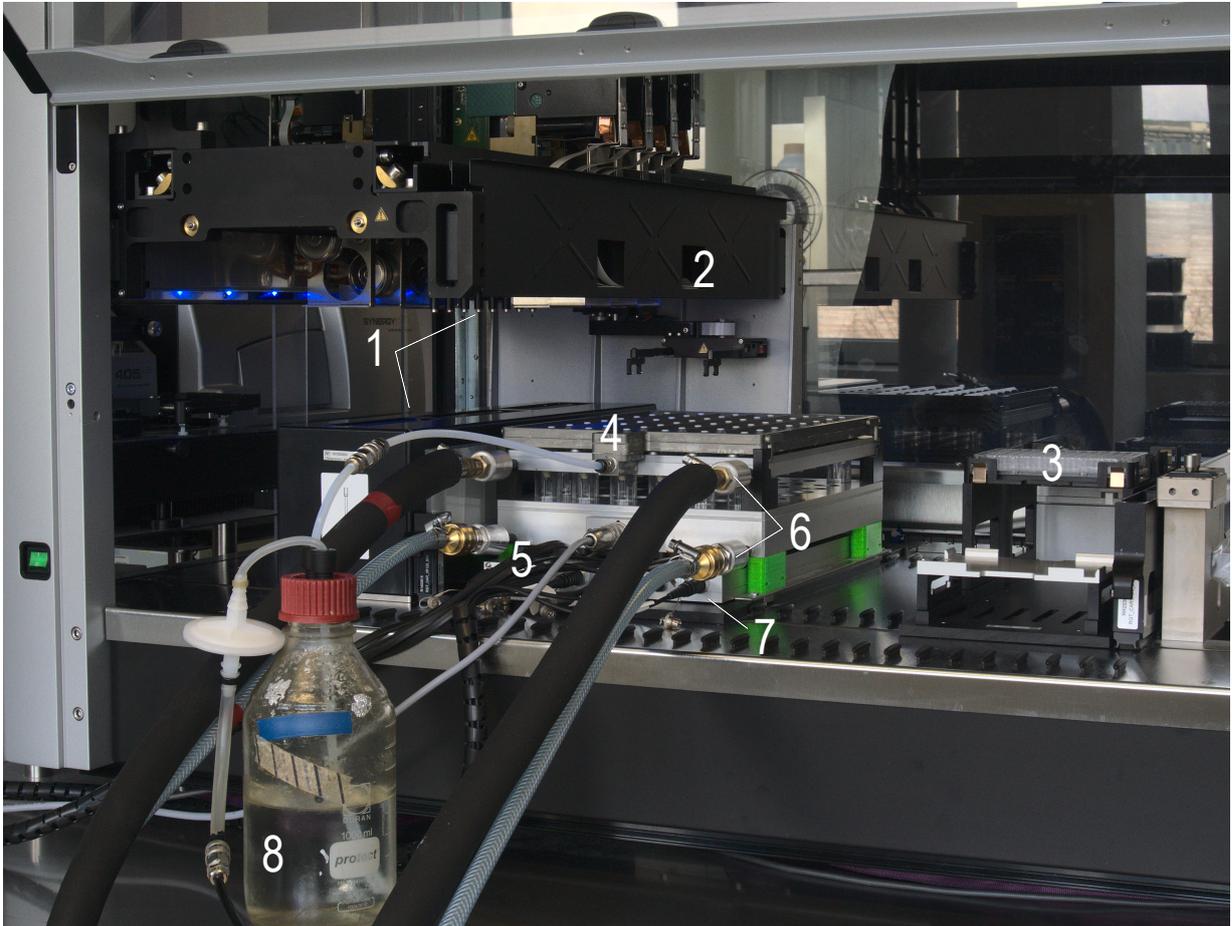


Abbildung 4.2: Versuchsstand für Experimente in miniaturisierten Rührkesselreaktoren. Der Bioreaktorblock (bioREACTOR 48, 2mag) (4) ist in einen Laborroboter integriert. Dieser verfügt über einen Pipettierarm mit Pipettenspitzenwaschstation (1) und einen Greifarm (2) für Mikrotiterplatten (3). Der Bioreaktorblock wird über zwei Kühlkreisläufe temperiert (6) und über sterile, angefeuchtete Luft begast (8). Die Sensorriegel (7) sind unterhalb der Reaktoren angebracht und die Steuerung der Rührer sowie die Datenübertragung erfolgt über extern angeschlossene Module (5).

4.2.3 Satzverfahren in Rührkesselreaktoren im Liter-Maßstab

Zwei unterschiedliche Bioreaktorsysteme im Liter-Maßstab kamen in dieser Arbeit zur Anwendung.

Satzverfahren im parallelen Rührkesselreaktor im Labormaßstab

Aerobe Kultivierungen von *S. cerevisiae* wurden im vierfach parallelen Bioreaktorsystem (DASGIP®BioBlock, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) durchgeführt (Abbildung 4.3). Dieses ermöglicht die parallele Durchführung von bis zu vier Kultivierungen in kontrollierten Rührkesselreaktoren im Litermaßstab. Diese Rührkesselreaktoren waren mit Sonden für pH und gelösten Sauerstoff und einem Temperaturfühler ausgestattet. Im Deckel der Reaktoren waren außerdem Anschlüsse für die Zugabe von Titrimitteln (0,5 M H₂SO₄ und 1 M KOH), ein Probenahmerohr, ein Begasungsrohr mit Sterilfilter, sowie ein Abgaskondensator mit Sterilfilter angebracht. Die Zugabe von Stellmitteln erfolgte automatisiert über Mikrodosierpumpen. Der Anteil an CO₂ und O₂ im Abgas wurde über eine angeschlossene Abgasanalytik gemessen (Easy Line, ABB, Zürich, Schweiz). Zur Durchmischung des Mediums und zur Dispersion der eingeleiteten Luft waren zwei 6-Blatt-Scheibenrührer im Abstand von 2,5 cm am unteren Ende der Rührwelle angebracht, welche wiederum über einen auf dem Reaktordeckel aufgesetzten Elektromotor angetrieben werden konnten. Die individuelle Steuerung des Prozesses und der Peripheriegeräte erfolgte über die Prozessleitsoftware DASGIP Control.

Zur Vorbereitung des parallelen Bioreaktorsystems wurden die Reaktoren komplett aufgebaut und mit 600 mL VE-Wasser befüllt. Vor dem Autoklavieren bei 121 °C für 21 min wurde die pH-Sonde kalibriert (Zwei-Punkt-Kalibrierung bei pH 4 und pH 7). Die Sterilisation der Zulaufleitungen wurde durch sequentielles Spülen der Leitungen mit 70 % (v/v) Ethanol, sterilem VE-Wasser, 2 M NaOH und abschließend erneut sterilem VE-Wasser erreicht. Nach Sterilisation und Abkühlen der Glasrührkesselreaktoren wurden diese unter der Sterilwerkbank entleert und mit entsprechendem sterilem Medium (600 mL) befüllt. Die Reaktoren wurden anschließend an ihre Position in der Station gestellt und angeschlossen. Kultivierungen wurden bei konstant 30 °C, pH 5, 0,5 Volumen Luft pro Volumen Kulturmedium pro Minute (vvm) und einer Startrührerdrehzahl von 200 min⁻¹ durchgeführt. Vor Inokulation wurde der pO₂-Sensor zweipunktkalibriert, wobei 100 % Luftsättigung der Begasung mit Druckluft und 0 % Luftsättigung der Begasung mit Stickstoff entsprach. Gleichzeitig wurde die Abgasanalytik kalibriert (O₂: 0 % bei Begasung mit Stickstoff, 20,95 % bei Begasung mit Druckluft; CO₂: 0 % bei Begasung mit Stickstoff, oberer Referenzwert mit interner Kalibrierzelle). Das Inokulum in steriler Spitze mit steriler Kanüle wurde über den Seitenarm des Reaktors mit Septum zugegeben. Zur aeroben Kultivierung während des Prozesses wurde die Rührergeschwindigkeit automatisch um 50 min⁻¹ erhöht, sobald der Sauerstoffpartialdruck unter 30 % fiel.

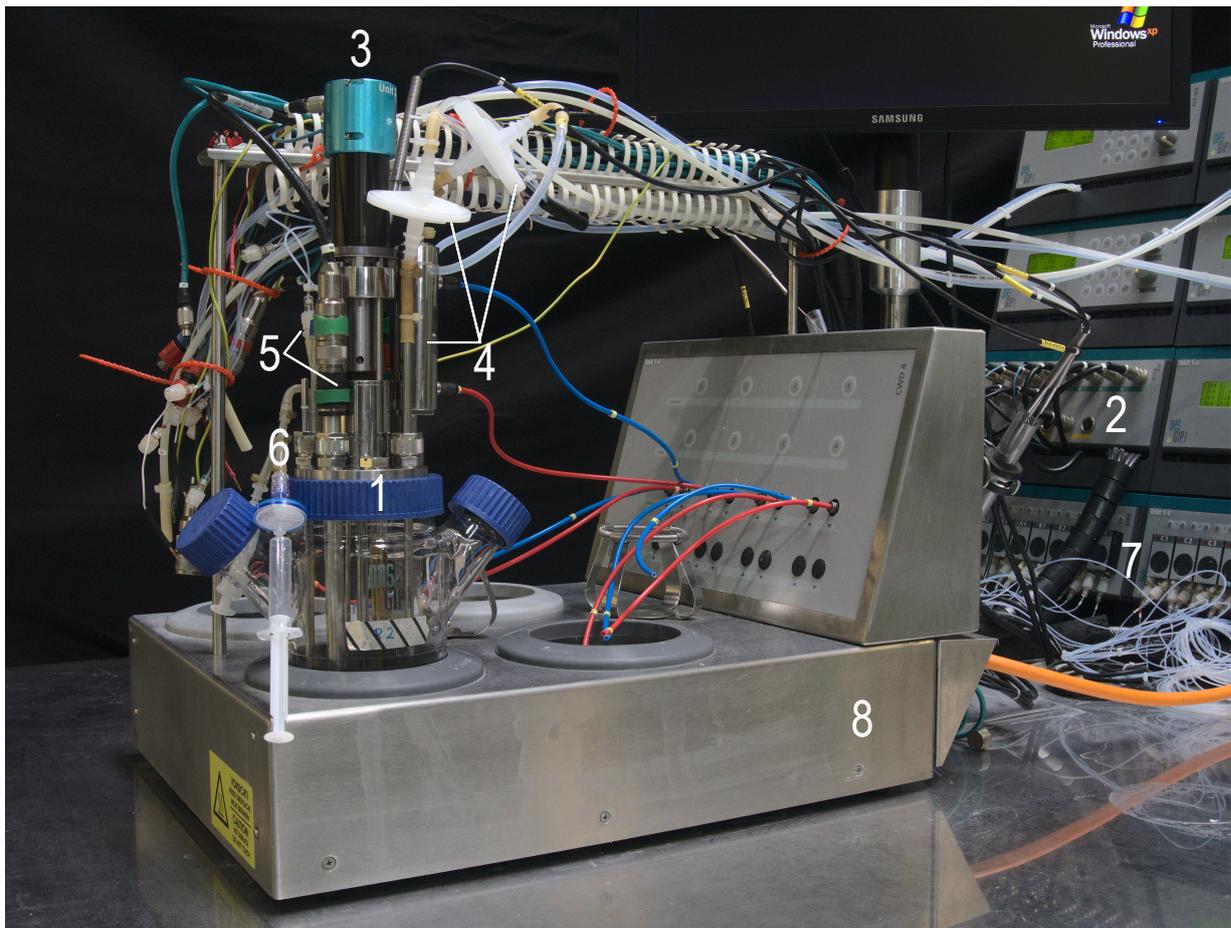


Abbildung 4.3: Versuchsstand für Experimente im parallelen Bioreaktorsystem. Bis zu vier baugleiche Rührkesselreaktoren (1) können betrieben werden. Diese sind mit pH- und pO_2 -Sensoren (5), sowie einem Temperaturfühler und einem Probennahmesystem (6) ausgestattet. Der Antrieb der Rührwelle erfolgt über einen Motor (3). Sterile Luft wird über ein Begasungsrohr eingeleitet und die Abluft über einen Abgaskühler gekühlt (4). Der Reaktor wird über ein Modul temperiert (8) und die Zudosierung von Stellmitteln erfolgte über Pumpen (7). Alle Daten werden über ein angeschlossenes Modul aufgezeichnet, was gleichzeitig auch zur Regelung dient (2).

Satzverfahren im Rührkesselreaktor im Litermaßstab

Ähnlich zu Kultivierungen im parallelen Bioreaktorsystem war der doppelwandige 3,6 L Glasrührkesselreaktor (Labfors 2, Infors HT, Bottmingen, Schweiz) mit Sonden zur Messung des pH und des Gelöstsauerstoff, sowie einem Temperaturfühler ausgestattet (Abbildung 4.4). Auch bei diesem Reaktortyp befanden sich im Deckel Gewinde für Zulaufstutzen für Stellmittel, Begasungsrohr, Probenahmerohr, Abgaskondensator und Sept-

um. Die Rührwelle, auf der im Abstand von 3,5 cm zum unteren Ende zwei 6-Blatt-Scheibenrührer angebracht waren, wurde über einen Elektromotor angetrieben, der auf den Rührermitnehmer auf dem Reaktordeckel gesetzt wurde. Eine weitere Durchmischung des Mediums wurde durch Strömungsbrecher im Reaktor erreicht. Die Messung von O₂ und CO₂ im Abgas erfolgte über eine externe Analytikeinheit (Easy Line, ABB, Zürich, Schweiz). Vor dem Sterilisieren des Reaktors (121 °C für 21 min) wurde dieser mit 1,5 L VE-Wasser befüllt und die pH-Sonde zweipunktkalibriert (pH 4 und pH 7). Außerdem wurde der Doppelmantel mit VE-Wasser gefüllt und der Reaktor auf Dichtheit überprüft. Das Medium wurde in einer autoklavierten Mediumflasche mit Zulaufschlauch separat vorgemischt. Nach der Sterilisation des Reaktors wurde das VE-Wasser im Reaktor über das Probenahmerohr heraus- und das sterile Medium (1,2 L) aus der Mediumflasche hineingepumpt. Prozessparameter für Satzverfahren waren auch hier konstant 30 °C, pH 5, 0,5 vvm und einer Startrührerdrehzahl von 200 min⁻¹. Die Zweipunktkalibrierung (0 % und 100 %) der pO₂-Sonde erfolgte vor Inokulation bei Prozessbedingungen durch Begasung mit Stickstoff und Druckluft. Die Abgasanalytik wurde ebenfalls zweipunktkalibriert (O₂: 0 % bei Begasung mit Stickstoff, 20,95 % bei Begasung mit Druckluft; CO₂: 0 % bei Begasung mit Stickstoff, oberer Referenzwert mit interner Kalibrierzelle). Die Inokulation erfolgte über das im Reaktordeckel befindliche Septum. Als Prozessleitsystem wurde die Software IRIS 5 (Infors HT, Bottmingen, Schweiz) verwendet. Auch hier kam eine Regelung der Rührerdrehzahl zur aeroben Kultivierung während des Prozesses zum Einsatz. Die Rührergeschwindigkeit wurde dabei um 100 min⁻¹ bis zu einem Maximum von 800 min⁻¹ erhöht, sobald der Sauerstoffpartialdruck unter 30 % Luftsättigung fiel.

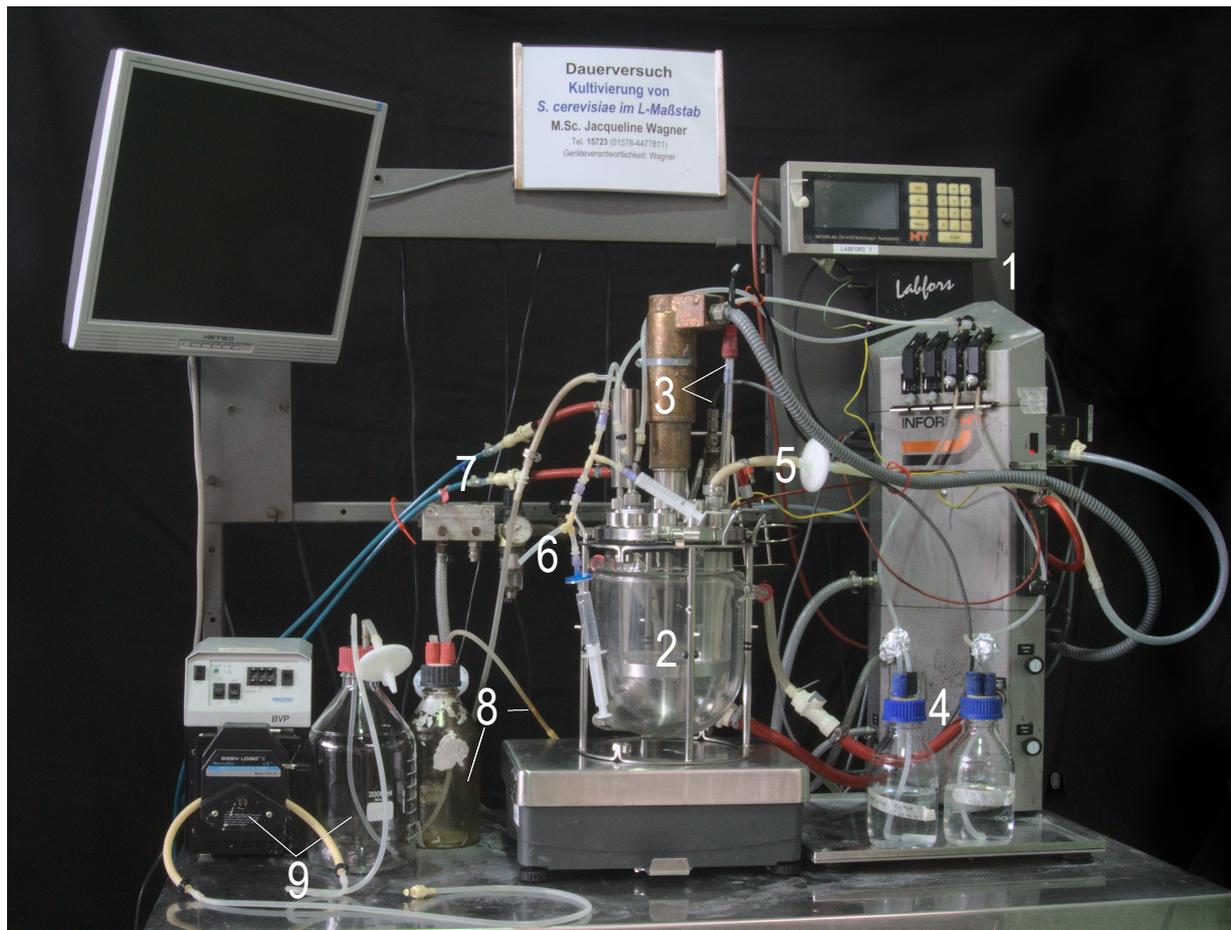


Abbildung 4.4: Für Experimente im Liter-Maßstab wurde ein doppelwandiger Rührkesselreaktor (2) verwendet. Dieser ist mit pH- und pO_2 -Sensoren (3), sowie einem Temperaturfühler und einem Probenahmesystem (6) ausgestattet. Der Antrieb der Rührwelle erfolgt über einen Motor (3). Sterile Luft wird über ein Begasungsrohr eingeleitet (5) und die Abluft über einen Abgaskühler gekühlt (7) und in eine Abluffflasche geleitet (8). Die Zudosierung von Stellmitteln (4) erfolgt über Pumpen, welche an der Steuereinheit des Reaktors (1) angeschlossen sind. Hierüber erfolgt auch die Aufzeichnung von online Prozessdaten und die Regelung des Prozesses. Medien werden über eine externe Pumpe und sterile Mediumflasche (9) vor Prozessbeginn in den Reaktor gepumpt.

Satzverfahren mit ungeklärtem Zuckerrübenschnitzelhydrolysat

Ungeklärtes Zuckerrübenschnitzelhydrolysat wurde von Dominik Schäfer bereitgestellt. Zuerst wurde *A. niger* zur Pektinaseherstellung auf Zuckerrübenschnitzeln in einem Reaktionsvolumen von 3,8 L kultiviert (Schäfer et al. 2020). Anschließend wurde die Temperatur im Reaktor auf 50°C erhöht, die Begasung ausgestellt und frische, getrocknete

Zuckerrübenschnitzel zum Reaktionsansatz gegeben. Dadurch wurde zum einen der filamentöse Pilz abgetötet und gleichzeitig die Hydrolyse der frisch zugegebenen Zuckerrübenschnitzel mit Pektinasen eingeleitet.

Für die Biotransformation der herausgelösten D-GalA mit *S. cerevisiae* SiHY001 wurde die Temperatur wieder auf 30°C gesenkt, der pH auf 5 geregelt und die Begasung auf 0,5 vvm gestellt. Die Rührerdrehzahl wurde auf 600 min⁻¹ gestellt. Die im ungeklärten Hydrolysat enthaltenen Metabolite wurden mittels HPLC bestimmt. Für die Inokulation des Reaktors wurden zuerst 60 mL einer sterilen 500 g L⁻¹ Sorbitollösung, 100 mL des sterilen 50 x Aminosäuremixes (Tabelle 9.7) und 100 mL eines sterilen zehnfach konzentrierten SC-Mediums (Tabelle 4.2) gemischt. Die Vorkultur wurde wie unter Abschnitt 4.2.1 beschrieben vorbereitet um den Rührkesselreaktor mit einer BTM von 0,25 g L⁻¹ inokulieren zu können. Das Zellpellet wurde im vorbereiteten Inokulationsmedium resuspendiert und das Inokulum zum Start der Biotransformation in den Rührkesselreaktor gegeben.

Verdunstung von Ethanol

S. cerevisiae ist bekannt für die Bildung von Ethanol, selbst unter aeroben Bedingungen. Bei hohen initialen Konzentration von Glukose oder glykolytisch aktiven Kohlenstoffquellen kommt es durch den Crabtree-Effekt zur Ethanolbildung. Ethanol verdunstet besonders in aktiv begasten Systemen und um die Ethanolverdunstung zu quantifizieren, kann die Verdunstungsrate des Systems bestimmt werden (Gleichung 4.1).

$$\frac{dc_{\text{EtOH}}}{dt} = k \cdot c_{\text{EtOH}} \quad (4.1)$$

k Ethanolverdunstungskonstante, h⁻¹

c_{EtOH} Ethanolkonzentration im Reaktionssystem, g L⁻¹

Auch wenn durch die Abgaskühlung von Rührkesselreaktoren die Verdunstungsrate von Ethanol reduziert werden kann, indem hier Ethanol kondensiert und in den Reaktor zurück fließt, ist keine vollständige Ethanol-Rückführung möglich und die lokale Ethanolkonzentration aus dem Kondensat im Abgaskühler ist sogar erhöht und begünstigt die Verdunstung weiter (Duboc und Von Stockar 1998). Um die Verdunstung in den eingesetzten Kultivierungssystemen im Liter-Maßstab zu quantifizieren, wurde Ethanol im Reaktionstionsmedium (SC-Medium) vorgelegt und der Prozess ohne Inokulation unter

Standardbedingungen gestartet. Die Ethanolkonzentration im Medium wurde in regelmäßigen Abständen mittels HPLC gemessen und die Verdunstungsrate ermittelt (Abbildung 4.5). Die Verdunstung von Ethanol im Rührkesselreaktor ist eine Funktion von Begasungsrate und Reaktorvolumen (Löser et al. 2005). In allen Kultivierungen wurde die Begasungsrate konstant bei 0,5 vvm gehalten. Die Änderung des Reaktorvolumens wurde bei allen Kultivierungen in Rührkesselreaktoren über die Prozesszeit dokumentiert, hier konnte, bis auf Prozesse mit manueller Zugabe von Medienkomponenten, keine große Volumenänderung über 10 % des Initialvolumens festgestellt werden. Die ermittelten Ethanolverdunstungsraten beliefen sich mit 1,2 L Reaktionsmedium im Labor-Rührkesselreaktor (Labfors 2, Infors HT, Bottmingen, Schweiz) auf $0,08 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und mit 0,6 L Reaktionsmedium im Labor-Rührkesselreaktor (DASGIP®BioBlock, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) auf $0,12 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. In Biotransformation, in denen mehr als 3 g L^{-1} Ethanol gebildet wurde, wurde die Verdunstungsrate bei Kohlenstoffbilanzierungen berücksichtigt um diese zu mindestens 90 % zu schließen.

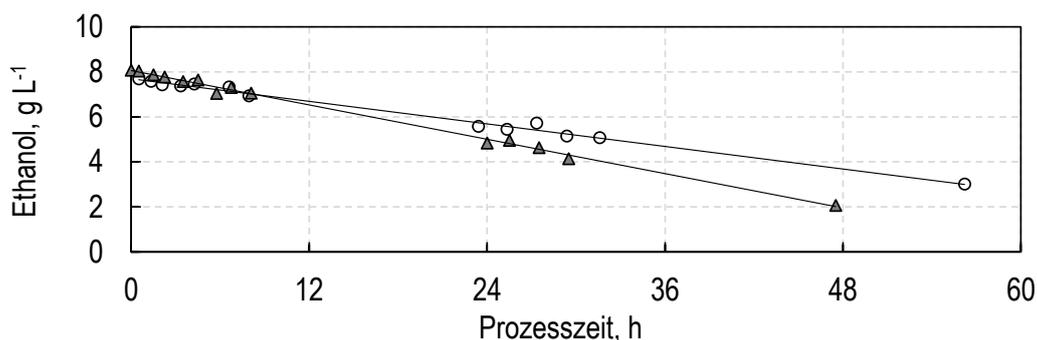


Abbildung 4.5: Ermittelte Ethanolverdunstungsraten bei Prozessen in unterschiedlichen Rührkesselreaktoren im Liter-Maßstab mit 1,2 L (\circ) und 0,6 L Reaktorvolumen (\triangle).

4.2.4 Kohlenstoffbilanz

Kohlenstoffbilanzierungen von Kultivierungen im Laborrührkesselreaktor wurden bei allen definierten Medien durchgeführt. In mikrobiellen Satzprozessen wandeln Mikroorganismen den initial zugeführten Kohlenstoff der Substrate in Biomasse, CO_2 und Produkte um. Sofern alle Substrate und Produkte gemessen werden, kann zu jedem Probenahmezeitpunkt eine Kohlenstoffbilanz über die Stoffmenge der aufgenommenen Substrate

$m_{Ei,j}$ und der gebildeten Produkte $m_{Pi,j}$ formuliert werden.

$$1 = \frac{\sum m_{Pi,j}}{\sum m_{Ei,j}} \quad (4.2)$$

$m_{Pi,j}$ Kohlenstoffmenge j der gebildeten Produkte P_i , mol_C L⁻¹

$m_{Ei,j}$ Kohlenstoffmenge j der gebildeten Produkte P_i , mol_C L⁻¹

Zur Berechnung der bis zu jedem Probenahmezeitpunkt emittierten Menge an CO₂ im Abgas wurde die Kohlenstoffdioxidbildungsrate mithilfe eines MatLab-Skripts über die Prozesszeit integriert (siehe Abschnitt 9.4 für den Code). Die in MatLab implementierte Trapezfunktion wurde als numerische Annäherung des Integrals verwendet. Für die Biotrockenmasse wurde als Summenformel C_{0,71}O_{0,23}N_{0,06} angenommen (Villadsen et al. 2011) und der Verlust durch Probenahme bzw. bei Zugaben von weiteren Kohlenstoffquellen zum Rührkesselreaktor berücksichtigt. Die Bilanzen konnten in allen Kultivierungen mit definiertem Medium im Laborreaktor zu mindestens 90 % geschlossen werden. Es werden beispielhaft Kohlenstoffbilanzen zu ausgewählten Kultivierungen im Anhang dokumentiert (Abschnitt 9.4).

4.3 Analytische Methoden

4.3.1 Bestimmung der Zellkonzentration

Zellkonzentrationen wurden entweder als optische Dichte (OD) oder Biotrockenmasse (BTM) bestimmt.

Messung der Biotrockenmasse

Die Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) erfolgte gravimetrisch. Dafür wurden 2 mL Reaktionsgefäße bis zur Gewichtskonstanz für mindestens 24 h bei 80 °C im Trockenschrank getrocknet. Nach Abkühlen wurden das Gewicht der Reaktionsgefäße mithilfe einer Feinwaage bestimmt. Über die Prozesszeit wurden Proben im Dreifachansatz zu je 2 mL in die ausgewogenen Reaktionsgefäße pipettiert und für 10 min bei 20000 RZB zentrifugiert und der Überstand verworfen oder für Substrat- und Produktkonzentrationsbestimmungen verwendet. Das Zellpellet wurde für mindestens 24 h bei 80 °C im

Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach dem Abkühlen wurde der Gewichtsunterschied gravimetrisch mithilfe einer Feinwaage bestimmt und nach Gleichung 4.3 berechnet.

$$c_x = \frac{m_{\text{voll}} - m_{\text{leer}}}{V} \quad (4.3)$$

m_{voll} Masse des Reaktionsgefäßes mit Zellen nach Trocknung, g

m_{leer} Masse des leeren Reaktionsgefäßes nach Trocknung, g

V Volumen der Zellsuspension, L

Messung der optischen Dichte

Die optische Dichte (OD_{600}) wurden bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Für das Einzelstrahlphotospektrometer (Genesys 10S UV–VIS, Thermo Scientific, Neuss, Deutschland) wurden Proben in 10 mm Küvetten gemessen. Der Linearitätsbereich des Photospektrometers erstreckte sich bis 0,4 und Proben oberhalb dieses Wertes wurden mit PBS verdünnt. Als Referenz diente PBS.

Messungen mit dem MTP-Photospektrometer (Multiscan™FC, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in MTPs bei 600 nm wurden zur besseren Vergleichbarkeit mit Werten des Einzelstrahlphotospektrometers korreliert ($R^2=0,9998$). Dafür wurden 20 unterschiedliche Verdünnungen einer Zellsuspension sowohl im Einzelstrahlphotospektrometer (OD_{600}) als auch im MTP-Photospektrometer vermessen ($OD_{600, \text{MTP}}$). Die Daten wurde mittels eines Polynoms zweiter Ordnung korreliert, wobei x der gemessenen $OD_{600, \text{MTP}}$ im MTP-Photospektrometer entspricht (Gleichung 4.4).

$$OD_{600} = -3,6522x^2 + 3,975x + 0,0032 \quad (4.4)$$

Die Umrechnung der gemessenen optischen Dichte in die Konzentration der Biotrockenmasse (BTM) erfolgte mithilfe eines experimentell bestimmten Korrelationsfaktor f_x (g L^{-1}) über Gleichung 4.5. Der Korrelationsfaktor f_x lag bei $0,61 \text{ g L}^{-1}$.

$$c_X = OD_{600} \cdot f_X \quad (4.5)$$

c_X Konzentration der Biotrockenmasse, $g_{BTM} L^{-1}$

f_X Korrelationsfaktor, $g_{BTM} L^{-1}$

4.3.2 Bestimmung von Substrat- und Produktkonzentrationen

Die Messung von Substrat- und Produktkonzentrationen (Glukose, Sorbitol, D-Galakturonsäure, L-Galactono-1,4-lakton, Citrat, Acetat, Glycerin, Ethanol, Formiat und Pyruvat) erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Dafür wurden Überstände von Prozessproben nach Zentrifugation (10 min bei 20000 RZB) filtriert (0,22 μ m Spritzenvorsatzfilter, Chromafil RC-20/15 MS, Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Dürren, Deutschland). Proben wurden bis zur Vermessung bei -20 °C gelagert. Für die Messung wurden Rollrandflaschen verwendet, die mit einer Bördelkappe verschlossen wurden. Für kleinere Volumina (150 μ L) wurden Microeinsätze für die Rollrandflaschen verwendet. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe eines Agilent 1100 Systems (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) oder Shimadzu Prominence-i LC-2030C Plus (Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Japan) mit Brechungsindex-Detektor (*refractive index detector*) (RI-Detektor) (Agilent 1200, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA or Shimadzu RID-20A, Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Japan) bzw. UV-Detektor bei 210 nm (Shimadzu Prominence-i LC-2030C Plus, Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Japan integriert). Mittels einer Standardverdünnungsreihe konnten Peakflächen der Standardsubstanzen zu ihren entsprechenden Konzentrationen linear korreliert und somit die Konzentrationen der Prozessproben ermittelt werden. Als Integrationssoftware wurde jeweils die systemeigene Software verwendet (ChemStation, Agilent Technologies Inc, Santa Clara, USA und LabSolutions Version 5.98, Shimadzu Corporation, Japan). Die Trennung der Substanzen erfolgte im isokratischen Betrieb mittels einer Aminex[®]-HPX-87H Trennsäule (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, USA) bei einer Säulentemperatur von 60 °C und einem Fluss von 0,5 mL min⁻¹. Als Laufmittel wurde 5 mM partikel-filtrierte Schwefelsäure verwendet.

4.3.3 Bestimmung der Enzymaktivität in Zelllysat

Die Enzymaktivität der D-GalA-Reduktase wurde mit Zelllysat der entsprechenden Stämme mithilfe einer abgewandelten Methode nach Biz et al. (2016) und Çağlayan und Wilson (2014) bestimmt. Diese beruht auf der Messung der Abnahme der Absorption von NADH bzw. NADPH bei der enzymatischen Reduktion von D-GalA. Die *S. cerevisiae* Stämme mit entsprechenden Genen für D-GalA-Reduktasen (Tabelle 4.1) wurden, wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben, bis zu einer OD_{600} von 1,4 angezogen und 300 mL der Kultur bei 3000 RZB, 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen des Zellpellets mit PBS (10 mL, 3000 RZB, 4 °C für 10 min) wurde das Zellpellet in Lysepuffer (Tabelle 9.12) resuspendiert. Pro 100 mL Kultur wurde 1 mL Lysepuffer verwendet. Das resuspendierte Zellpellet wurde in 2 mL Reaktionsgefäße aufgeteilt und eine anteilig gleiche Menge an Glasperlen (1-3 mm) zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte in drei Zyklen, unterteilt in einen 2 minütigen Zellaufschluss bei einer Schüttelfrequenz von 25 s^{-1} in der Retsch und anschließendem Kühlen auf Eis für 3 min. Anschließend wurden Glasperlen und Zelltrümmer bei 20000 RZB, 4 °C für 10 min abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß transferiert, und, soweit noch nicht geklärt, erneut abzentrifugiert.

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte im in Mikrotiterplatten. Als Kontrollen dienten zum einen eine Probe ohne Substrat (D-GalA) zur Detektion von Hintergrundaktivität im Zelllysat mit den Co-Faktoren NADH und NADPH sowie eine Probe ohne Co-Faktor, um die Hintergrundaktivität des Zelllysats aufzuzeichnen. Als Negativkontrolle diente zusätzlich ein Ansatz ohne Probe. Unterschiedliche Konzentrationen an Co-Faktoren wurden zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt und die Abnahme der Absorption von NAD(P)H bei 340 nm im Fünffachansatz gemessen. Das Reaktionsvolumen betrug bei Ansätzen unter 1000 mM Co-Faktor 200 μL . Bei Ansätzen mit Konzentrationen über 1000 mM wurde das Volumen auf 150 μL reduziert. Das limitierende Substrat der Reaktionsansätze war in allen Fällen der Co-Faktor, welcher für jede Aktivitätsmessung frisch angesetzt wurde. PBS wurde zuerst vorgelegt, anschließend erfolgte die Zugabe des Co-Faktors entsprechend der Konzentration im Reaktionsansatz. Mit Zugabe der Probe (20 μL) zum Ansatz wurde die MTP für 3 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von D-GalA (50 mM im Ansatz) und kurzer Durchmischung gestartet und die Kinetik für 15 min bei 340 nm gemessen (Multiscan™FC, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

$$v_X = \frac{\Delta c_{\text{NAD(P)H}} \cdot V_R}{\Delta t \cdot V_P \cdot c_X} = \frac{\Delta A_{340\text{nm}} \cdot V_R \cdot 10^6}{\Delta t \cdot \epsilon_{\text{NAD(P)H}} \cdot d \cdot V_P \cdot c_X} \quad (4.6)$$

v_X	spezifische Enzymaktivität, U mg ⁻¹
$\frac{\Delta c_{\text{NAD(P)H}} \Delta t}{\Delta t}$	Änderung der Co-Substratkonzentration über die Zeit, μM min ⁻¹
V_R	Gesamtvolumen der Reaktion, L
V_P	Volumen der zugegebenen Probe, L
c_X	eingesetzte Biotrockenmassekonzentration, g L ⁻¹
$\frac{A_{340\text{nm}}}{\Delta t}$	Änderung der Absorption bei 340 nm über die Zeit, min ⁻¹
$\epsilon_{\text{NAD(P)H}}$	molarer Extinktionskoeffizient von NAD(P)H bei 340 nm, L mol ⁻¹ cm ⁻¹
d	Schichtdicke der Probe, cm

Die Einheit der Enzymaktivität, ein Unit (U), beschreibt die Reduktion von 1 μmol Co-Substrat pro Minute. Die Bestimmung der Enzymaktivität aus Zelllysate erfolgte aus Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der Reduktion. Dazu wurde aus den insgesamt 150 Datenpunkten der Kinetikmessung (15 min) mithilfe der Software MATLABR2017b (9.3) die maximale Steigung der linearen Regression über 20-100 Datenpunkte ermittelt. Regressionen mit einem Bestimmtheitsmaß R^2 kleiner 0,98 fanden dabei keine Berücksichtigung.

5 Ergebnisse und Diskussion¹

5.1 Charakterisierung des Basisstamms

Zur Bereitstellung des Biokatalysators für die Biotransformation von D-GalA in *S. cerevisiae* wurden rekombinante Stämme mit unterschiedlichem parentalen Hintergrund vom Kooperationspartner hergestellt. Der Stamm *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C stellt dabei den übergeordneten Parentalstamm dar, aus dem sich der Stamm *S. cerevisiae* EBY.VW4000 ableitet (Wieczorke et al. 1999). Im *S. cerevisiae* EBY.VW4000 wurden sukzessive 18 Gene der Hexose-Transporterfamilien deletiert und mit zusätzlichen Deletionen das Wachstum dieses Stammes auf Hexosen fast vollständig abgeschaltet. Da die Parentalstämme *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C und *S. cerevisiae* EBY.VW4000 nicht oder erst nach langer Adaptionsphase Sorbitol langsam verstoffwechseln, wurde Fruktose als Kohlenstoffquelle gewählt, da diese das erste Zwischenprodukt des Sorbitolabbaus darstellt. In den später verwendeten rekombinanten *S. cerevisiae* Stämmen waren unterschiedliche Sorbitoldehydrogenasen exprimiert, welche Sorbitol zu Fruktose oxidieren. Neben der Kohlenstoffquelle (Glukose bzw. Fruktose) wurde auch das Medium (Hefeextrakt-Pepton-Medium (YEP, *yeast extract peptone*) bzw. synthetisches Komplettmedium (SC, *synthetic complete*)) verglichen (Abschnitt 4.1.2).

¹Teile der Ergebnisse sind publiziert in:

Wagner J., Schäfer D., von den Eichen N., Haimerl C., Harth S., Oreb M., Benz J. P., Weuster-Botz D. (2021) D-galacturonic acid reduction by *S. cerevisiae* for L-galactonate production from extracted sugar beet press pulp hydrolysate. *Appl Microbiol Biotechnol* **105**: 5795–5807.

Harth S., Wagner J., Sens T., Choe J., Benz J. P., Weuster-Botz D., Oreb M. (2020) Engineering cofactor supply and NADH-dependent D-galacturonic acid reductases for redox-balanced production of L-galactonate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep* **10**:19021.

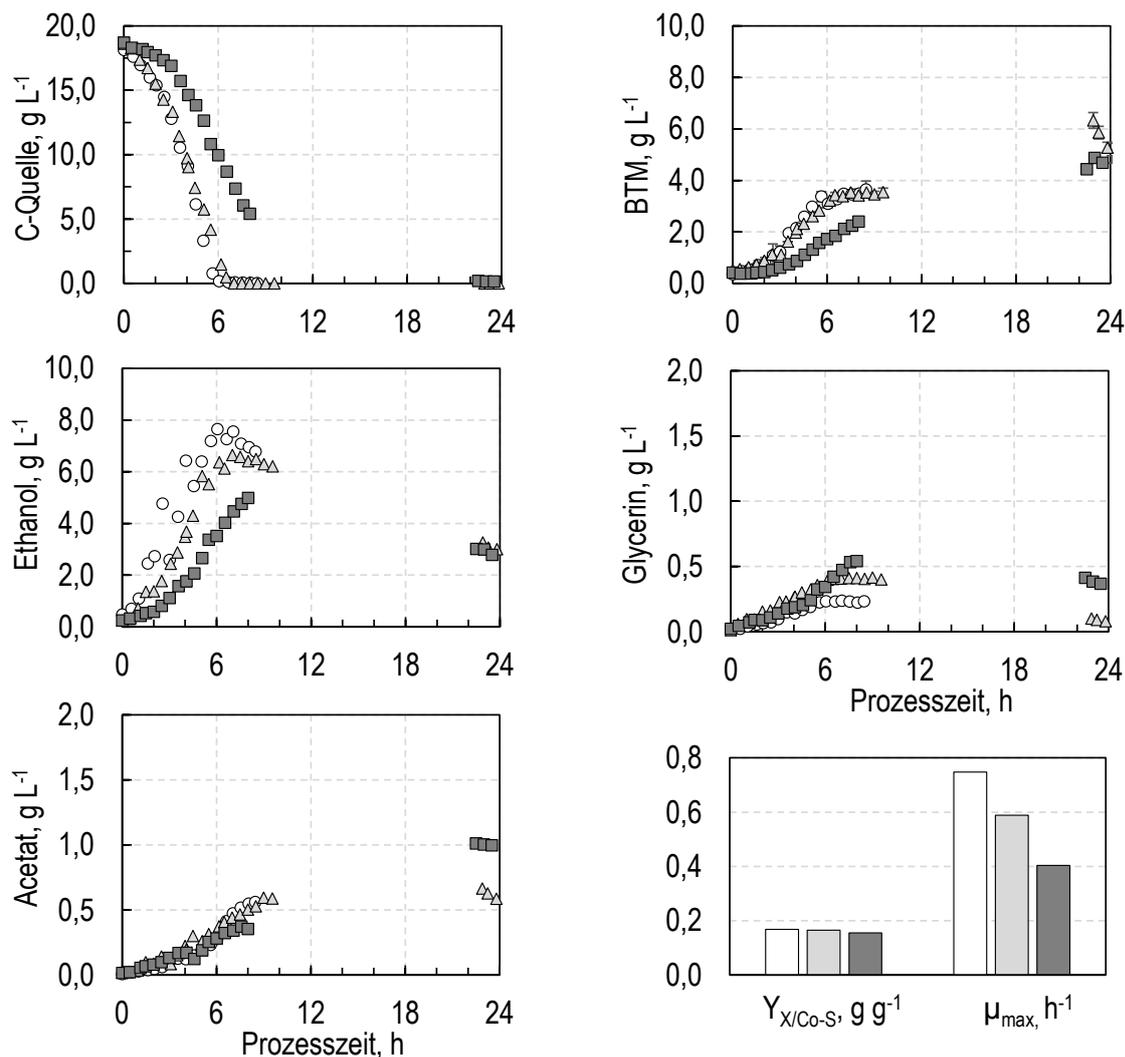


Abbildung 5.1: Vergleichende Satzkultivierung des parentalen *S. cerevisiae* Stamms CEN.PK2-1C mit Glukose in HEP-Medium (○) und SC-Medium (△) und mit Fruktose (■) in SC-Medium. Kultivierungen wurden mit 2 % (w/v) Kohlenstoffquelle (C-Quelle) in kontrollierten Rührkesselbioreaktoren durchgeführt ($T=30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5$, $F_{\text{Luft}} = 0,5 \text{ vvm}$, $V_R = 1,2 \text{ bzw. } 0,6 \text{ L}$, $N_{\text{Start}}=200 \text{ min}^{-1}$). Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von C-Quelle, Biotrockenmasse, Ethanol, Glycerin und Acetat über die Prozesszeit.

Das Wachstum mit YEP-Medium war besser als mit definiertem SC-Medium. Die maximale Wachstumsrate mit Glukose bis zu einer Prozesszeit von sechs Stunden war in YEP-Medium mit $0,75 \text{ h}^{-1}$ um 25 % höher als in SC-Medium ($0,6 \text{ h}^{-1}$). Dafür lag der Ausbeutekoeffizient $Y_{X/Co-S}$ um 15 % niedriger mit YEP-Medium als mit SC-Medium ($0,17 \text{ g BTM g}^{-1}$ Glukose bzw. $0,20 \text{ g BTM g}^{-1}$ Glukose, Abbildung 5.1). Die Biotrockenmassekonzentration nach Glukoseverbrauch war ähnlich ($3,65 \text{ g L}^{-1}$ bzw. $3,54 \text{ g L}^{-1}$), genau-

so die höchste gemessene Ethanolkonzentration ($7,65 \text{ g L}^{-1}$ bzw. $6,65 \text{ g L}^{-1}$). Acetat ($0,56 \text{ g L}^{-1}$ bzw. $0,67 \text{ g L}^{-1}$) und Glycerin ($0,24 \text{ g L}^{-1}$ bzw. $0,41 \text{ g L}^{-1}$) wurden bis acht Stunden Prozesszeit in geringen Konzentrationen gebildet (Abbildung 5.1). Insgesamt konnten keine großen Unterschiede des Wachstums von *S. cerevisiae* CEN-PK2-1C in YEP-Medium und SC-Medium festgestellt werden. Hingegen war das Wachstum mit Fruktose leicht verzögert und auch die maximale Wachstumsrate war mit $0,4 \text{ h}^{-1}$ niedriger als mit Glukose (Abbildung 5.1). Ansonsten glich der Verlauf der gebildeten Sekundärmetabolite dem der auf Glukose in SC-Medium gebildeten (Abbildung 5.1). Hier wurden leicht höhere Konzentrationen an Acetat ($1,01 \text{ g L}^{-1}$) und Glycerin ($0,54 \text{ g L}^{-1}$) bis acht Stunden Prozesszeit gemessen. Die Konzentration von Ethanol lag nach acht Stunden Prozesszeit bei $4,99 \text{ g L}^{-1}$ (Abbildung 5.1).

Diskussion

Der Parentalstamm *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C zeigt sowohl mit YEP als auch mit SC-Medium vergleichbare Wachstumsraten wie in der Literatur angegeben (Bérangère et al. 2012, Weuster-Botz und Takors 2018). Auch der Ausbeutekoeffizient $Y_{X/Co-S}$ war vergleichbar mit Literaturdaten von Satzprozessen (Paciello et al. 2014) und lag mit $0,17 \text{ g BTM g}^{-1}$ Glukose in YEP-Medium etwas höher als in SC-Medium ($0,16 \text{ g BTM g}^{-1}$ Glukose bzw. Fruktose). Die etwas langsamere Verstoffwechslung von Fruktose gegenüber Glukose wurde besonders bei Hefen zur Weinherstellung festgestellt (Tronchoni et al. 2009). Die Verzögerung des Wachstums mit Fruktose wurde den unterschiedlichen Kinetiken der Hexokinasen, also den Glukose und Fruktose phosphorylierenden Enzymen, zugeschrieben (Berthels et al. 2004).

Aufnahme und inhibierende Wirkung des Edukts

Um zu überprüfen, ob der Parentalstamm *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C in der Lage ist, bei alleiniger Zurverfügungstellung von D-GalA ohne andere C-Quellen diese aufzunehmen und zu verstoffwechseln, wurden Satzprozesse in SC-Medium mit $0,5 \text{ \% (w/v)}$ D-GalA in kontrollierten Rührkesselreaktoren bei pH 5 durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Es wurde weder eine Abnahme von D-GalA beobachtet noch Wachstum des Stammes. Das bedeutet einerseits, dass der parentale Stamm und folglich die von ihm abgeleiteten Stämme nicht in der Lage sind, auf den Medienbestandteilen des SC-Mediums zu wachsen. Gleichzeitig kann der Parentalstamm *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C D-GalA nicht über passive Transportmechanismen bei pH 5 aufnehmen.

5.2 Biotransformationen mit Glukose als Co-Substrat

5.2.1 Vergleich unterschiedlicher Stämme

Es wurden insgesamt sieben unterschiedliche rekombinante *S. cerevisiae* hinsichtlich ihrer Biotransformation von D-GalA zu L-GalOA mit Glukose in Satzprozessen im Rührkesselreaktor verglichen (siehe Tabelle 4.1 für eine Übersicht für die Genotypen der Stämme). Für die Biotransformation mit Glukose wurden die Stämme SiHY027, SiHY040 und SiHY041 bereitgestellt, welche D-GalA mithilfe einer D-GalA-Reduktase ohne bzw. mit einer oder zwei Mutationen gekoppelt an NADPH- bzw. (mit Mutationen) NADH reduzieren sollten. Außerdem wurden Stämme mit *adh1*-Deletion (SiHY036 und SiHY037) und Mehrfachintegration der mutierten D-GalA-Reduktasen (SiHY057 und SiHY058) untersucht.

Biotransformation mit NADPH-abhängigen Reduktasen

Eine Kopplung der Biotransformation von D-GalA zu L-GalOA über glykolytische Stoffwechselwege setzt die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten für die Reduktion des Edukts mit D-GalA-Reduktasen voraus. Der *S. cerevisiae* Stamm SiHY027 verfügt über die D-GalA-Reduktase AnGar1 aus *A. niger*, welche NADPH-abhängig die Reaktion katalysiert. Gleichzeitig ist dieser Stamm aufgrund seines parentalen Hintergrunds in der Lage, Hexosen, wie beispielsweise Glukose, zu importieren und zu verstoffwechseln. Mit der Integration des Gens für einen D-GalA-Transporter aus *A. niger* (AnGAT) kann der Stamm außerdem D-GalA importieren.

Der *S. cerevisiae* Stamm SiHY027 wurde in Satzprozessen in kontrollierten Rührkesselreaktionen in synthetischem Komplettmedium (SC-Medium) mit 0,6 % (w/v) Glukose und 0,5 % (w/v) D-GalA bei 30°C und pH 5 kultiviert.

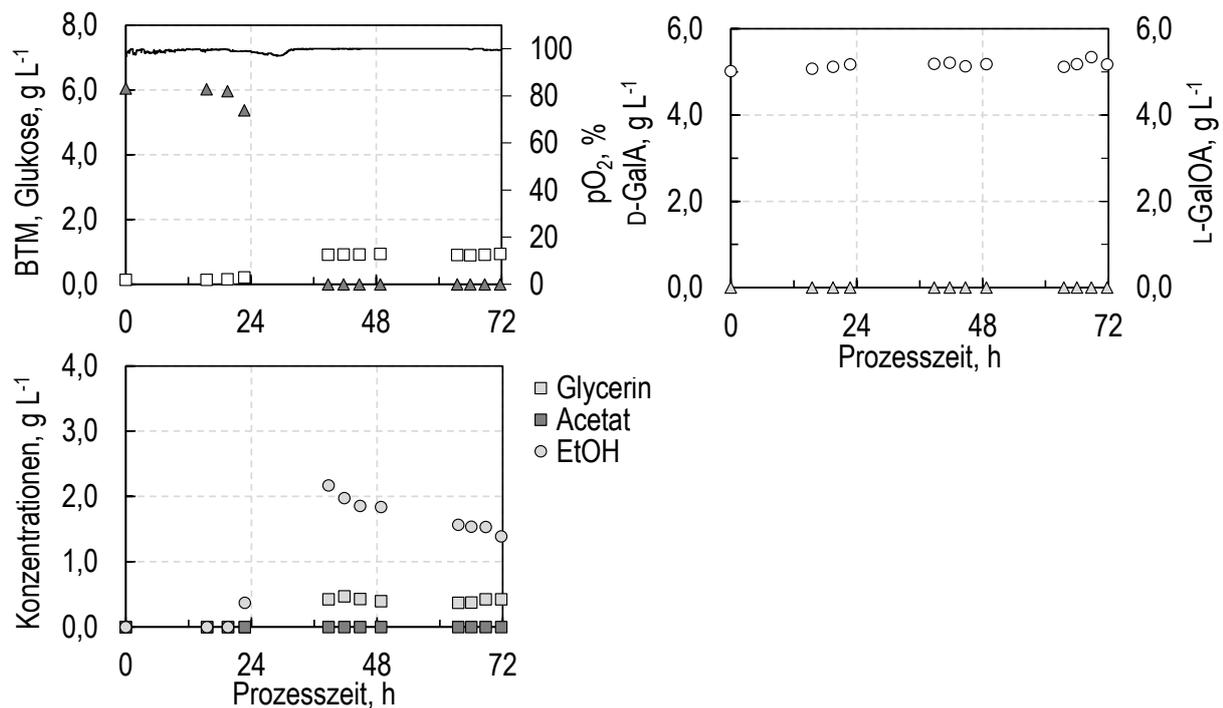


Abbildung 5.2: Satzkultivierung des rekombinanten *S. cerevisiae* Stammes SiHY027 mit 0,6 % (w/v) Glukose und 0,5 % (w/v) D-GalA in SC-Medium im kontrollierten Rührkesselbioreaktor ($T=30^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5$, $F_{\text{Luft}} = 0,5 \text{ vvm}$, $V_R = 1,2 \text{ L}$, $N_{\text{Start}}=200 \text{ min}^{-1}$). Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Glukose (\blacktriangle), Biotrockenmasse (\square) und Gelöstsauerstoff im Medium (—) sowie von D-GalA (\circ), L-GalOA (\triangle) und der Sekundärmetabolite Ethanol (\odot), Glycerin (\blacksquare) und Acetat (\blacksquare) über die Prozesszeit.

Es konnte keine Zunahme der BTM innerhalb der ersten 20 h Prozesszeit beobachtet werden. Erst ab 23 h Prozesszeit sanken die Glukosekonzentration und die Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium (Abbildung 5.2). Nach 39 h Prozesszeit war die Kohlenstoffquelle verbraucht und es konnten fermentative Nebenprodukte im Medium gemessen werden. Für Ethanol wurden bei 39 h Prozesszeit Konzentrationen von $2,17 \text{ g L}^{-1}$ gemessen, welche bis zum Prozessende bei 72 h auf einen Wert von $1,4 \text{ g L}^{-1}$ sanken (Abbildung 5.2). Auch Glycerin akkumulierte bis Prozessende nach 72 h zu einer Konzentration von $0,47 \text{ g L}^{-1}$ im Medium. Im Gegensatz zu Ethanol wurde Glycerin nicht wieder verstoffwechselt. Die Biomassebildung fand überwiegend zwischen 22 h - 36 h Prozesszeit statt bis zu einer finalen Konzentration von $0,94 \text{ g L}^{-1}$. Der Ausbeutekoeffizient $Y_{X/\text{Co-S}}$ lag bei $0,13 \text{ g BTM g}^{-1} \text{ Glukose}$ und ist um 58 % niedriger als mit dem Wildtypstamm *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C ($0,25 \text{ g BTM g}^{-1} \text{ Glukose}$, Abschnitt 5.1). Über den gesamten Prozessverlauf konnte keine Bildung des Produkts L-GalOA verzeichnet werden. Auch eine Aufnahme von D-GalA durch die rekombinanten Hefezellen wurde

nicht beobachtet. Analytisch ergab sich die Problematik, dass Glukose und L-GalOA eine ähnliche Retentionszeit mit der verwendeten HPLC-Säule (Aminex HPX-87H, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) und Methode hatten (Abschnitt 4.3.2). Das führte zu einer Überlagerung der Signale im Brechungsindex-Detektor, wenn beide Stoffe im Medium vorlagen. Anders als Glukose absorbiert L-GalOA jedoch bei 210 nm, weswegen für Satzprozesse mit Glukose der UV-Detektor der HPLC zur Bestimmung der L-GalOA-Konzentration verwendet wurde. Die Kohlenstoffbilanz des Satzprozesses konnte bei allen Probenahmezeitpunkten zu mindestens 90 % geschlossen werden (Abbildung 5.3).

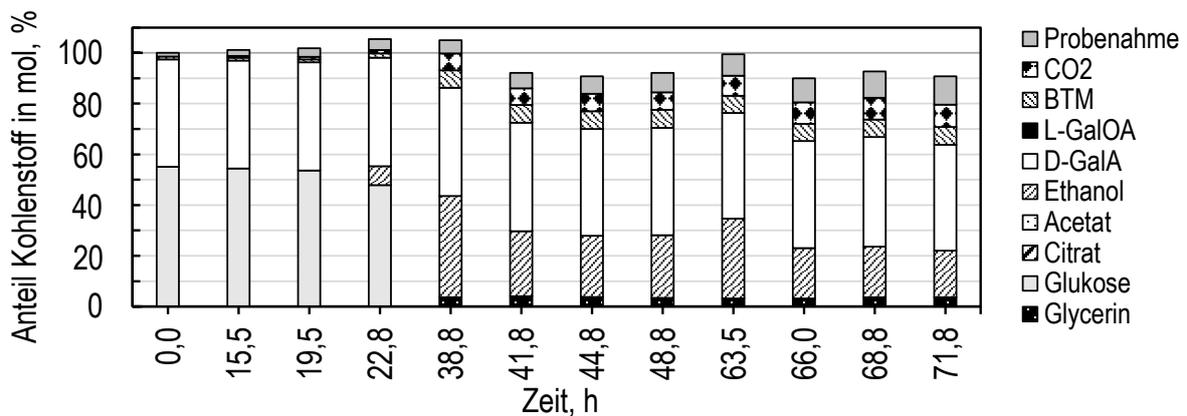


Abbildung 5.3: Kohlenstoffbilanz der einzelnen Probenahmezeitpunkte der Satzkultivierung von *S. cerevisiae* SiHY027 mit 0,6 % (w/v) Glukose und 0,5 % (w/v) D-GalA in SC-Medium im kontrollierten Rührkesselbioreaktor. Die Balken stellen die Anteile an Gesamtkohlenstoff dar, die im Prozessverlauf zu den gegebenen Probenahme-Zeitpunkten in Form der jeweiligen Komponenten vorlagen. Die Bilanz konnte zu jedem Zeitpunkt zu über 90 % geschlossen werden.

Diskussion

Das Wachstum des rekombinanten *S. cerevisiae* Stammes SiHY027 mit Glukose war deutlich verzögert im Vergleich zum Parentalstamm. Mit D-GalA im Medium setzte Wachstum erst nach 20 h Prozesszeit ein. Verzögerungsphasen zu Beginn von Satzprozessen können die unterschiedlichsten Ursachen haben (Hamill et al. 2020, Vermeersch et al. 2019), wobei die Expression der nicht-nativen Gene für die D-GalA-Reduktase und den AnGat Transporter eine Rolle spielen könnte, da sie die metabolische Last durch die zusätzliche Proteinbiosynthese dieser Proteine erhöht. Gleichzeitig ist für schwache Säuren, wozu auch D-GalA zählt, bekannt, dass sie zu einer verlängerten Verzögerungsphase bei *S. cerevisiae* führen (Guo und Olsson 2016).

Dass kein Biotransformationsprodukt gebildet wurde hat allerdings andere Gründe. Die Reduktase AnGar1 aus *A. niger* ist, ähnlich ihrem homologen Enzym TrGar1 aus *T. reesei*, vermutlich nicht in der Lage, D-GalA in einer NADH-abhängigen Reaktion zu reduzieren (Harth et al. 2020, Martens-Uzunova und Schaap 2008). Dies lassen auch die hier gezeigten Ergebnisse des Satzprozesses mit rekombinanten *S. cerevisiae* Si-HY027 mit genomisch integrierter NADPH-abhängiger D-GalA-Reduktase AnGar1 vermuten. Über die gesamte Prozesszeit konnte keine Produktion von L-GalOA beobachtet werden. NADH scheint nicht als Co-Faktor für die AnGar1 fungieren zu können, denn überschüssiges NADH aus der Glykolyse wurde nicht zur Produktbildung verwendet, sondern floss in Stoffwechselwege zur Ethanol- und Glycerinbildung (Abbildung 5.2). Während NADH vornehmlich in katabolen Stoffwechselwegen wie beispielsweise der Glykolyse Verwendung findet, spielt NADPH eine größere Rolle im anabolen Metabolismus (Dijken und Scheffers 1986). NADPH-verbrauchende Reaktionen im Zytoplasma sind die Lipidsynthese (Botham und Ratledge 1979) und Aminosäuresynthese (Bruinenberg et al. 1983), welche bei Zellwachstum das verfügbare NADPH im Zytoplasma reduzieren. Hefe ist es möglich, NADPH im Pentose Phosphat Weg (PPP) zu generieren, in dem je nach Kultivierungsbedingungen bis zu 65 % aller Kohlenstoffe der aufgenommenen Glukose abgebaut werden (Botham und Ratledge 1979). Der Co-Faktor wird aber größtenteils für native, assimilatorische Reaktion des Zellwachstums verwendet. Die NADPH-abhängige Reduktion von D-GalA ist deswegen nur möglich, wenn eine zusätzliche, NADPH regenerierende Reaktion stattfindet, beispielsweise bei der Oxidation eines Co-Substrats.

Die mengenmäßig am häufigsten in Zuckerrübenschnitzelhydrolysat vorkommenden Zucker, die *S. cerevisiae* abbauen kann, werden über die Glykolyse abgebaut und stellen als Co-Faktor nur NADH zur Verfügung. Mit AnGaaA aus *A. niger* existiert zwar eine NADH-akzeptierende D-GalA-Reduktase. Deren katalytische Effizienz ist allerdings um ein 50-faches niedriger als das NADPH-abhängige Enzym AnGar1 (Martens-Uzunova und Schaap 2008). Um die L-GalOA-Produktion an die Glykolyse zu koppeln wurde deswegen vom Kooperationspartnern versucht, durch gezielte Mutation einzelner Aminosäuren im katalytischen Zentrum des Enzyms die Co-Faktor-Akzeptanz zu NADH zu verschieben.

Biotransformation mit mutierten D-GalA-Reduktasen

Der gezielte Austausch von Aminosäuren in der Co-Faktor-Bindetasche des Enzyms sollte die Akzeptanz zu NADH verschieben und damit die Kopplung der Reduktion von

D-GalA an die Glykolyse ermöglichen. Daraus resultierten zwei unterschiedliche Enzyme auf Basis der AnGar1 aus *A. niger*. In der AnGar1*-Mutante wurde Lysin an Stelle 261 in der Aminosäuresequenz zu Methionin ausgetauscht (K261M). Die Doppelmutante AnGar1** trug zusätzlich zu dieser Mutation noch eine weitere an Stelle 267 der Aminosäuresequenz, bei der Arginin zu Leucin ausgetauscht war (R267L) (Abschnitt 4.1.1). Die rekombinanten *S. cerevisiae* Stämme SiHY040 (AnGar1*) und SiHY041 (AnGar1**) wurden in Satzprozessen mit 1 % (w/v) Glukose und 0,5 % (w/v) D-GalA sowie bei pH 5 und 30 °C hinsichtlich ihrer an die Glykolyse gekoppelten Biotransformation von D-GalA miteinander verglichen (Abbildung 5.4).

Mit initialen 10 g L⁻¹ Glukose konnten in beiden Satzprozessen ähnliche Biomassekonzentrationen nach fast 72 h von 2,0 g L⁻¹ (AnGar1*) und 1,7 g L⁻¹ (AnGar1**) erzielt werden. Das entspricht einem Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/Co-S}$ von 0,14 g BTM g⁻¹ Glukose bzw. 0,09 g BTM g⁻¹ Glukose. Es konnte eine leichte Verzögerung des Wachstums beim Stamm mit der Reduktase-Einfachmutante um ca. 6 h beobachtet werden, die der Stamm mit Reduktase-Doppelmutante nicht zeigte (Abbildung 5.4). In beiden Satzprozessen wurden über die gesamte Prozesszeit Sekundärmetabolite gebildet, die bis zum Prozessende zum Teil auch wieder verbraucht wurden (Abbildung 5.4). Die maximalen gemessenen Konzentrationen der Sekundärmetabolite lagen bei beiden Stämmen mit Reduktase-Varianten ähnlich hoch. Ethanol akkumulierte mit *S. cerevisiae* SiHY40 nach 46 h auf eine Konzentration von 1,76 g L⁻¹ (AnGar1*) und mit *S. cerevisiae* SiHY041 auf 2,85 g L⁻¹ (AnGar1**) nach 28 h Prozesszeit. Der Verlauf von Glycerin und Acetat ähnelt sich in beiden Satzprozessen und maximale gemessene Konzentrationen von Glycerin lagen bei 0,72 g L⁻¹ nach 46 h Prozesszeit (AnGar1*) bzw. 0,74 g L⁻¹ nach 30 h Prozesszeit (AnGar1**) und von Acetat bei 0,48 g L⁻¹ nach 30 h Prozesszeit (AnGar1*) bzw. 0,57 g L⁻¹ nach 28 h Prozesszeit (AnGar1**).

5.2 Biotransformationen mit Glukose als Co-Substrat

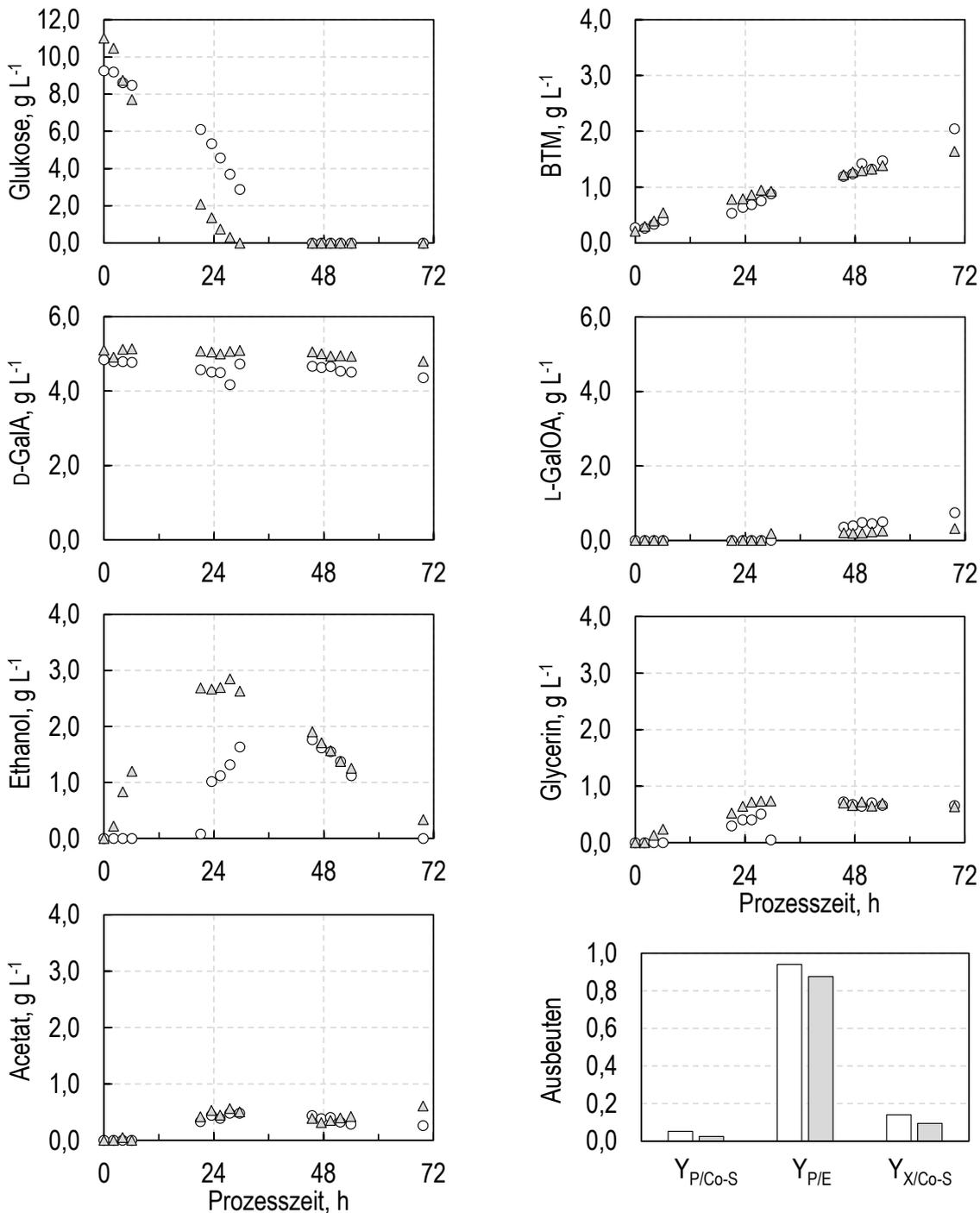


Abbildung 5.4: Vergleichende Satzkultivierung der rekombinanten *S. cerevisiae* Stämme SiHY040 (○) und SiHY041 (△) mit 1 % (w/v) Glukose und 0,5 % (w/v) D-GalA in SC-Medium im kontrollierten Rührkesselbioreaktor ($T=30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5$, $F_{\text{Luft}} = 0,5 \text{ vvm}$, $V_{\text{R}} = 0,6 \text{ L}$, $N_{\text{Start}}=200 \text{ min}^{-1}$). Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Glukose, Biotrockenmasse, sowie von D-GalA, L-GalOA, Ethanol, Glycerin und Acetat über die Prozesszeit. Berechnete Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/Co-S}$ (mol mol^{-1}), $Y_{P/E}$ (mol mol^{-1}) und $Y_{X/Co-S}$ (g g^{-1}).

Unterschiedlich waren hingegen die maximalen Produktkonzentrationen in den Satzprozessen. Mit dem *S. cerevisiae* Stamm mit Einfachmutante der D-GalA-Reduktase konnten mit $0,73 \text{ g L}^{-1}$ nach 72 h Prozesszeit um 215 % mehr L-GalOA gebildet werden, als mit dem *S. cerevisiae* Stamm mit Doppelmutante ($0,34 \text{ g L}^{-1}$ nach 72 h Prozesszeit). Interessanterweise ist die Bildung des Produkts erst nach Verbrauch von Glukose ab ca. 48 h Prozesszeit zu beobachten (Abbildung 5.4). Mit der langsamen Verstoffwechslung von hauptsächlich Ethanol fand in beiden Prozessen erst hier die Biotransformation von D-GalA statt. Der daraus berechnete Ausbeutekoeffizient $Y_{P/Co-S}$ lag bei $0,05 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1} \text{ EtOH}$ (AnGar1*) und $0,02 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1} \text{ EtOH}$ (AnGar1**). Die Selektivität $Y_{P/E}$ lag im Satzprozess mit *S. cerevisiae* SiHY040 (AnGar1*) bei $0,94 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1} \text{ D-GalA}$, während sie im Satzprozess mit *S. cerevisiae* SiHY041 (AnGar1**) bei $0,88 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1} \text{ D-GalA}$ lag. Sowohl im Satzprozess mit *S. cerevisiae* SiHY040 (AnGar1*) als auch mit *S. cerevisiae* SiHY040 (AnGar1**) konnte die Kohlenstoffbilanz zu mindestens 90 % zu jedem Probenahmezeitpunkt geschlossen werden (siehe Abbildung 9.1 und Abbildung 9.2 im Anhang für Abbildungen).

Diskussion

Die Kopplung der Reduktion von D-GalA an die Glykolyse konnte mit mutierten D-GalA-Reduktasen realisiert werden. Im Gegensatz zur Wildtyp-Reduktase (Abschnitt 5.2.1) ermöglichte der Austausch spezifischer Aminosäuren im katalytischen Zentrum der AnGar1 die Produktion von L-GalOA mit Glukose als Co-Substrat. Die Mutation K261M vermittelt dabei eine Akzeptanz von NADH als Co-Faktor und ist dadurch NADPH-unabhängig in der Lage, D-GalA zu reduzieren. Der Austausch einer weiteren Aminosäure im katalytischen Zentrum (R267L) führt zu keiner Verbesserung der enzymatischen Aktivität in NADH-gekoppelten Stoffwechselwegen, was anhand niedrigerer finaler Produktkonzentrationen festgestellt werden konnte. Insgesamt konnten nur 15 % (AnGar1*) bzw. 7 % (AnGar1**) der eingesetzten D-GalA zum Produkt umgewandelt werden, wobei der Stamm mit Reduktase-Doppelmutante bei gleichen Bedingungen nur halb soviel Produkt wie der mit Reduktase-Einfachmutante bildete. Aus strukturebiologischer Sicht kann nicht abschließend festgestellt werden, was die verringerte Produktbildung mit der Reduktase-Doppelmutante verursachte. In der Reduktase-Einfachmutante ist durch den noch vorhandenen Arginin-Rest an Stelle 267 der Aminosäuresequenz die Co-Faktor-Bindetasche noch ausgeprägter als bei Austausch dieses Restes in der Reduktase-Doppelmutante (siehe Homologiemodell Abbildung 4.1). Die daraus resultierende schlechtere Stabilisierung des Co-Faktors im katalytischen Zentrum des Enzyms könnte für die verminderte Aktivität verantwortlich sein.

Generell wird überschüssiges NADH aus glykolytischen Stoffwechselwegen nicht zur Biotransformation von D-GalA verwendet, sondern in Stoffwechselwegen des Ethanol- und Glycerinaufbaus reoxidiert (Gancedo et al. 1968). Obwohl die initiale Glukosekonzentration mit 10 g L^{-1} nicht hoch ist, tritt trotzdem durch den Crabtree-Effekt induziertes fermentatives Verhalten von *S. cerevisiae* auf. Zusätzlich fand keine direkt an die Glykolyse gekoppelte Produktbildung statt, vielmehr wurde L-GalOA erst nach vollständigem Verbrauch von Glukose gebildet. Die Verstoffwechslung von Ethanol zu Acetaldehyd generiert NADH (Rodrigues et al. 2006), welches wiederum für die Reduktion von D-GalA verwendet werden kann. Diese Reaktion ist vermutlich auch hauptsächlich für die Produktbildung verantwortlich. Acetaldehyd wird dann über weitere Schritte über Acetyl-CoA in den Citratzyklus eingeschleust (Feldmann 2012). Ein weiterer Grund für die niedrige Produktbildung ist auch, dass für die ein Molekül NADH verbrauchende Hinreaktion von D-GalA zu L-GalOA keine Rückreaktion eingebracht wurde, welche ein zusätzliches NADH generiert. Die Gesamtreaktion der Reduktion ist netto für *S. cerevisiae* ein Verlust von NADH und deswegen vermutlich nicht favorisiert. Für eine effiziente Biotransformation müsste folglich ein Überschuss an NADH generiert werden. Trotzdem war, anders als mit der Wildtyp Reduktase, durch den gezielten Austausch von Aminosäuren die NADH-gekoppelte Reduktion von D-GalA möglich, was die Grundlage für die NADH-Kopplung der Reaktion darstellt.

Biotransformation mit *adh1*-Deletionsstämmen

In Satzprozessen mit rekombinanten *S. cerevisiae* Stämmen, die die Gene für NADH-nutzende Reduktasen trugen, wurde durch fermentatives Verhalten der Stämme (Crabtree-Effekt) Ethanol gebildet. Die diese Reaktion katalysierenden Alkoholdehydrogenasen verbrauchen bei der Reduktion von Acetaldehyd ein NADH zur Bildung von Ethanol (De Smidt et al. 2008). Um die Verfügbarkeit von NADH für die Reduktion von D-GalA zu erhöhen, wurden deswegen Stämme vom Kooperationspartner bereitgestellt, welche die hauptsächlich aktive Alkoholdehydrogenase ADH1 deletiert hatten. Diese rekombinanten *S. cerevisiae* Stämme trugen außerdem die Gene für die Einfach- (SiHY036) bzw. Doppelmutante (SiHY037) der D-GalA-Reduktase, was eine NADH-gekoppelte Biotransformation erlaubt. In Satzprozessen in Rührkesselreaktoren wurde die Biotransformation dieser Stämme mit dem Ausgangsstamm *S. cerevisiae* SiHY040 verglichen (Abschnitt 5.2.1). Die Kultivierungen wurden mit 1 % (w/v) Glukose und 0,5 % (w/v) D-GalA in SC-Medium bei einer Temperatur von $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und einem pH von 5 durchgeführt.

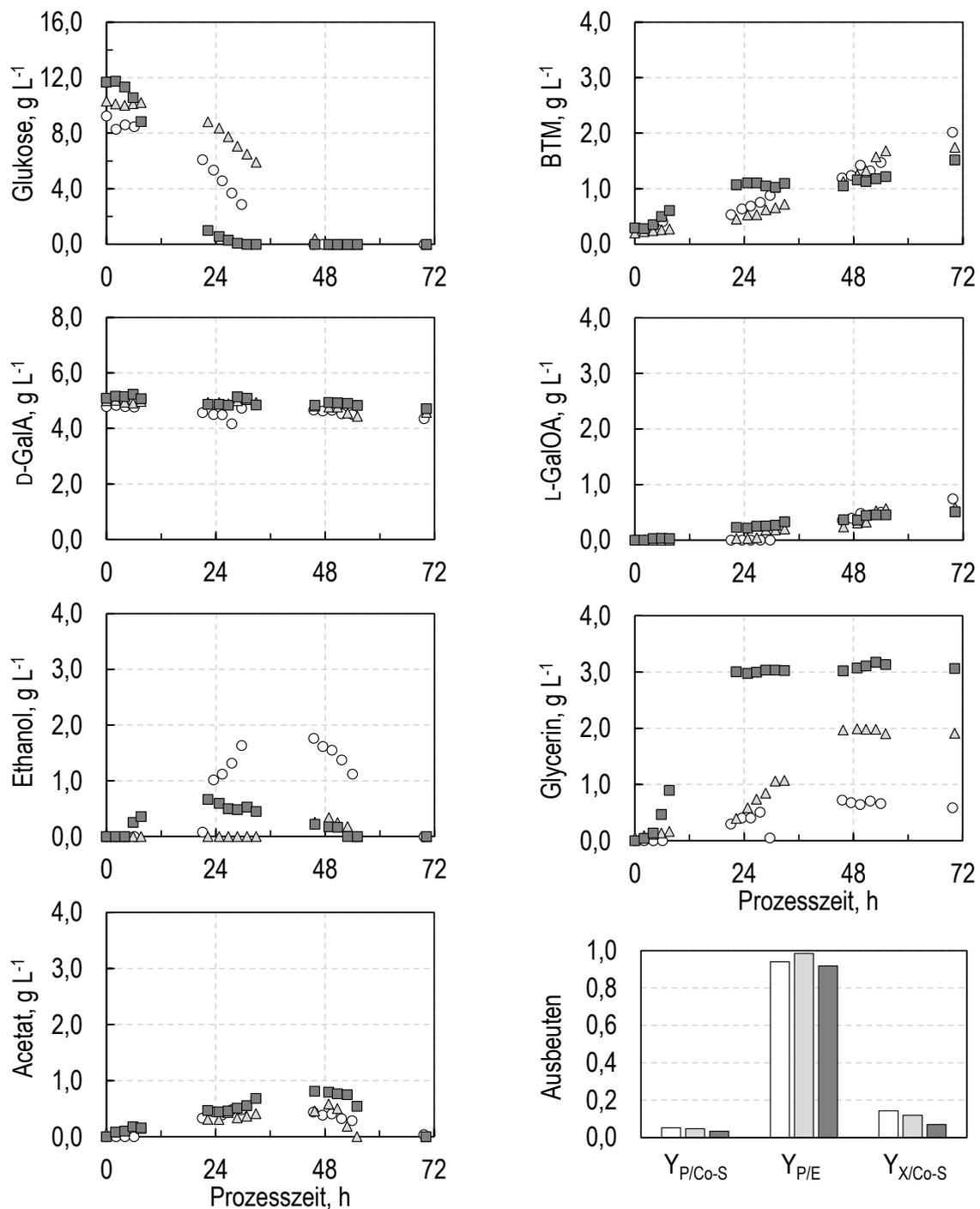


Abbildung 5.5: Satzkultivierung der rekombinanten *S. cerevisiae* $\Delta adh1$ -Stämme SiHY036 (Δ) und SiHY037 (\blacksquare) im Vergleich zum Ausgangsstamm SiHY040 (\circ) mit 1 % (w/v) Glukose und 0,5 % (w/v) D-GalA in SC-Medium im kontrollierten Rührkesselbioreaktor ($T=30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5$, $F_{\text{Luft}} = 0,5 \text{ vvm}$, $V_R = 0,6 \text{ L}$, $N_{\text{Start}} = 200 \text{ min}^{-1}$). Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Glukose, Biotrockenmasse, sowie von D-GalA, L-GalOA, Ethanol, Glycerin und Acetat über die Prozesszeit. Berechnete Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/Co-S}$ (mol mol⁻¹), $Y_{P/E}$ (mol mol⁻¹) und $Y_{X/Co-S}$ (g g⁻¹).

Die Begasungsrate wurde konstant bei 0,5 vvm gehalten, während die Rührerdrehzahl um je 50 min^{-1} erhöht wurde, wenn die Sauerstoffsättigung unter 30 % im Medium fiel, um aerobes Wachstum der Hefezellen zu gewährleisten.

Wie auch beim Ausgangsstamm *S. cerevisiae* SiHY040 trat mit dem $\Delta adh1$ -Stamm mit integrierter Reduktase-Einfachmutante eine Verzögerung des Wachstums auf und es kam erst nach 24 h Prozesszeit zu einer Zunahme der Biomasse. Der Verlauf der Biotrockenmassekonzentration ähnelte dem des Ausgangsstammes *S. cerevisiae* SiHY040, es wurden finale Konzentrationen von $1,75 \text{ g L}^{-1}$ BTM nach 72 h Prozesszeit erreicht (Abbildung 5.5). Im Gegensatz dazu war die finale Biomassekonzentration des $\Delta adh1$ -Stammes mit Reduktase-Doppelmutante etwas niedriger ($1,52 \text{ g L}^{-1}$). Gleichzeitig zeigte dieser Stamm mit Glukose keine Wachstumsverzögerung, bereits nach 4 h Prozesszeit konnte Wachstum beobachtet werden (Abbildung 5.5). Insgesamt waren finale Produktkonzentrationen nach 72 h Prozesszeit bei beiden Stämmen nicht höher als beim Ausgangsstamm *S. cerevisiae* SiHY040. Es konnten maximal $0,58 \text{ g L}^{-1}$ L-GalOA (AnGar1*) bzw. $0,51 \text{ g L}^{-1}$ (AnGar1**) produziert werden ($0,73 \text{ g L}^{-1}$ mit *S. cerevisiae* SiHY040). Dafür waren maximal gemessene Nebenproduktkonzentrationen höher als mit dem Ausgangsstamm.

Besonders Glycerin akkumulierte mit *S. cerevisiae* SiHY036 bis zu einer Prozesszeit von 72 h zu $1,99 \text{ g L}^{-1}$ (2,75-fach höher), bzw. mit *S. cerevisiae* SiHY037 bis zu einer Prozesszeit von 72 h zu $3,18 \text{ g L}^{-1}$ (4,4-fach höher) im Vergleich zu $0,72 \text{ g L}^{-1}$ nach 72 h Prozesszeit mit *S. cerevisiae* SiHY040 (Abbildung 5.5). Auch die gebildete Menge an Acetat war mit den $\Delta adh1$ -Mutanten leicht erhöht ($0,58 \text{ g L}^{-1}$ mit *S. cerevisiae* SiHY036 nach 49 h Prozesszeit bzw. $0,80 \text{ g L}^{-1}$ mit *S. cerevisiae* SiHY037 nach 49 h Prozesszeit im Vergleich zu $0,48 \text{ g L}^{-1}$ mit *S. cerevisiae* SiHY040 nach 30 h Prozesszeit). Lediglich die Ethanolkonzentration mit $\Delta adh1$ -Mutanten war deutlich reduziert im Vergleich zum Ausgangsstamm *S. cerevisiae* SiHY040 (Abbildung 5.5). Hier konnten nur maximale Konzentrationen von $0,34 \text{ g L}^{-1}$ (*S. cerevisiae* SiHY036 nach 49 h Prozesszeit) bzw. $0,67 \text{ g L}^{-1}$ (*S. cerevisiae* SiHY037 nach 23 h Prozesszeit) gemessen werden. Die Selektivität $Y_{P/E}$ lag bei allen drei verglichenen *S. cerevisiae* Stämmen über 90 % (*S. cerevisiae* SiHY040: $0,94 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1}$ D-GalA, *S. cerevisiae* SiHY036: $0,98 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1}$ D-GalA und *S. cerevisiae* SiHY037: $0,92 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1}$ D-GalA, Abbildung 5.5). Der Ausbeutekoeffizient $Y_{X/Co-S}$ unterschied sich leicht zwischen den Stämmen. Während *S. cerevisiae* SiHY040 einen Wert von $0,16 \text{ g BTM g}^{-1}$ Glukose erzielte, waren es mit *S. cerevisiae* SiHY036 nur noch $0,12 \text{ g BTM g}^{-1}$ Glukose und mit *S. cerevisiae* SiHY037 $0,07 \text{ g BTM g}^{-1}$ Glukose. Der Ausbeutekoeffizient $Y_{P/Co-S}$ war

hingegen bei allen drei *S. cerevisiae* Stämmen kleiner als $0,05 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1} \text{ Glukose}$ (Abbildung 5.5). Sowohl im Satzprozess mit *S. cerevisiae* SiHY036 als auch mit *S. cerevisiae* SiHY037 konnte die Kohlenstoffbilanz zu mindestens 90 % geschlossen werden (siehe Abbildung 9.3 und Abbildung 9.4 im Anhang für Abbildungen).

Diskussion

Die Strategie, die Verfügbarkeit von NADH für die Reduktion von D-GalA durch die Deletion der Alkoholdehydrogenase ADH1 zu erhöhen, war nur teilweise erfolgreich. Grundsätzlich konnte eine Reduzierung der Ethanolproduktion im Vergleich zum Ausgangsstamm erzielt werden (Abbildung 5.5). Wie auch in anderen Studien bereits gezeigt, führte die alleinige Ausschaltung der ADH1 aber nicht zu einem vollständigen Stopp der Ethanolproduktion (Ida et al. 2012). Grund ist vermutlich, dass *S. cerevisiae* eine Vielzahl von ADH-Isozymen besitzt (Drewke et al. 1990). Diese erfüllen unterschiedliche "Aufgabenbereiche" bezüglich des Ethanolstoffwechsels, so ist beispielsweise ADH1 hauptsächlich für die Oxidation von Acetaldehyd zu Ethanol verantwortlich (Leskovac et al. 2002), während ADH2 die Rückreaktion, also die Reduktion von während des aeroben Wachstums gebildetem Ethanol katalysiert (De Smidt et al. 2008). Trotzdem konnte in mehreren Studien beobachtet werden, dass eine vollständige Unterdrückung der Ethanolproduktion durch Deletion von mindestens sechs ADHs möglich ist (Drewke et al. 1990, Ida et al. 2012).

Vermutlich kam es durch die Hochregulierung isozymer *adh*-Gene zur Ethanolproduktion in Satzprozessen mit $\Delta adh1$ -Stämmen (Ida et al. 2012). Theoretisch resultiert aus der geringeren Ethanolbildung ein NADH-Überschuss. Trotzdem fand keine erhöhte Reduktion von D-GalA mit mutierten D-GalA-Reduktasen statt und die biomasse- und substratspezifischen Produktausbeuten mit den $\Delta adh1$ -Stämmen waren in etwa vergleichbar mit denen des Ausgangsstamms ohne Deletion. Das überschüssige NADH in Δadh -Stämmen floss vermehrt in die Glycerinbildung, es wurden 2,75 - 4,4-fach höhere Konzentrationen an Glycerin im Vergleich zum Ausgangsstamm gemessen. Die etwas reduzierten substratspezifischen Biomasseausbeuten mit den Δadh -Stämmen lassen sich gut mit der deutlich erhöhten Akkumulation von Glycerin erklären. Dieses wurde nicht wieder verstoffwechselt und die gebundenen Kohlenstoffe nicht für die Biomassebildung verwendet. Eine erhöhte Glycerinbildung mit *adh*-Deletionsstämmen bestätigen mehrere Studien (De Smidt et al. 2008, Drewke et al. 1990, Ida et al. 2012). Dieses Phänomen wird dem geblockten fermentativen Stoffwechselweg ab Acetaldehyd zugeschrieben, da Acetaldehyd dadurch nicht mehr zur Reoxidation von NADH

verwendet werden kann (Gancedo et al. 1968). Damit werden andere Stoffwechselwege zur NAD⁺-Generierung angesprochen. Die Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) zu Glycerin-3-Phosphat (G3P) durch die Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase liefert ein NADH und, nach Dephosphorylierung von G3P, Glycerin (Drewke et al. 1990). Die dem NAD(H)-Haushalt zugrundeliegenden Stoffwechselwege sind evolutionär gesehen eine optimale Anpassung an Umweltbedingungen von *S. cerevisiae* (Dickinson und Schweizer 2004) und die nicht-native, NADH-konsumierende Reduktion von D-GalA ist deswegen im Redox-Haushalt benachteiligt. Um der Produktbildung durch D-GalA-Reduktasen einen Vorteil gegenüber nativen Reaktionen zu verschaffen, können die transformierten Gene überexprimiert werden, indem zum Beispiel die transformierte Kopienzahl erhöht wird.

Biotransformation mit mehrfach integrierten D-GalA-Reduktasen

In allen in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten *S. cerevisiae* Stämmen waren die Gene für die D-GalA-Reduktion genomisch hinter glykolytisch aktivierten Promotoren integriert, hauptsächlich, um eine genetische Stabilität über die langen Prozesszeiten zu erhalten. Um die Produktivität der Hefestämme zu erhöhen, wurden auf Basis der *S. cerevisiae* Stämme SiHY040 und SiHY041 weitere Rekombinanten vom Kooperationspartner bereitgestellt, welche eine zusätzlich Kopie des Gens der jeweiligen D-GalA-Reduktasemutante trugen (SiHY058 bzw. SiHY059). Theoretisch war somit die Expression doppelt so vieler Reduktasen möglich.

Es wurden aerobe Satzprozesse in SC-Medium mit 1 % (w/v) Glukose und 0,5 % (w/v) D-GalA bei pH 5 und 30°C durchgeführt und mit dem Ausgangsstamm SiHY040 verglichen (Abbildung 5.6). Hinsichtlich der final erreichten Biomassekonzentrationen unterschieden sich die Prozesse der Stämme mit doppelt integrierter Reduktase-Einfach- (1,83 g L⁻¹) und Reduktase-Doppelmutante (2,00 g L⁻¹) um 8,5 % bzw. nicht vom Ausgangsstamm *S. cerevisiae* SiHY040 (2,00 g L⁻¹, Abbildung 5.6). Mit dem Stamm, der die Reduktase-Doppelmutante exprimiert, konnte keine ausgeprägte Wachstumsverzögerung festgestellt werden, bereits ab einer Prozesszeit von 2 h konnte eine Zunahme der Biomasse beobachtet werden. Anders verhielt sich der Stamm mit Reduktase-Einfachmutante. Hier wurde erst nach 22 h Wachstum beobachtet, ähnlich dem Referenzstamm *S. cerevisiae* SiHY040 (Abbildung 5.6). Auch die Verläufe der gebildeten Sekundärmetaboliten über die Prozesszeit waren nahezu identisch zwischen dem Referenzstamm *S. cerevisiae* SiHY040 und dem mit doppelt integrierter Reduktase-Einfachmutante (*S. cerevisiae* SiHY058).

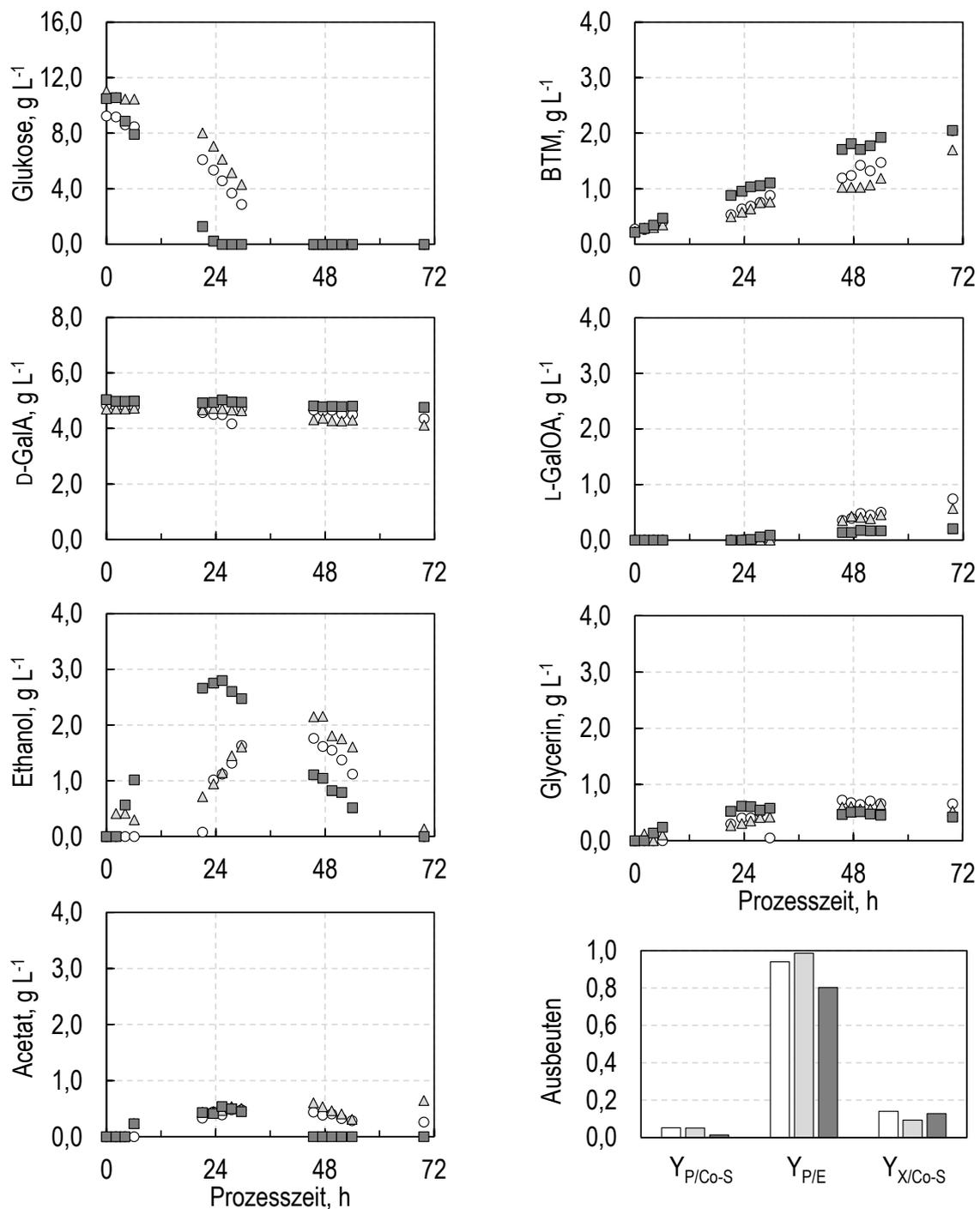


Abbildung 5.6: Satzkultivierung der rekombinanten *S. cerevisiae* Stämme SiHY058 (Δ) und SiHY059 (\blacksquare) mit doppelt integrierter D-GalA-Reduktase im Vergleich zum Ausgangsstamm *S. cerevisiae* SiHY040 (\circ) mit 1 % (w/v) Glukose und 0,5 % (w/v) D-GalA in SC-Medium im kontrollierten Rührkesselbioreaktor ($T=30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5$, $F_{\text{Luft}} = 0,5 \text{ vvm}$, $V_{\text{R}} = 0,6 \text{ L}$, $N_{\text{Start}}=200 \text{ min}^{-1}$). Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Glukose, Biotrockenmasse, sowie von D-GalA, L-GalOA, Ethanol, Glycerin und Acetat über die Prozesszeit. Berechnete Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/Co-S}$ (mol mol^{-1}), $Y_{P/E}$ (mol mol^{-1}) und $Y_{X/Co-S}$ (g g^{-1}).

Die maximal gemessenen Konzentrationen von Glycerin ($0,61 \text{ g L}^{-1}$ nach 48 h Prozesszeit bzw. $0,72 \text{ g L}^{-1}$ nach 30 h Prozesszeit), Ethanol ($2,16 \text{ g L}^{-1}$ nach 48 h Prozesszeit bzw. $1,76 \text{ g L}^{-1}$ nach 48 h Prozesszeit) und Acetat ($0,65 \text{ g L}^{-1}$ nach 70 h Prozesszeit bzw. $0,48 \text{ g L}^{-1}$ nach 48 h Prozesszeit) unterschieden sich kaum bei *S. cerevisiae* SiHY058 bzw. *S. cerevisiae* SiHY040. Der rekombinante Stamm mit doppelt integrierter Reduktase-Doppelmutante zeigte hingegen eine um die Wachstumsverzögerung der anderen Stämme (20 h) nach vorne verschobene Bildung von fermentativen Nebenprodukten. Die Konzentrationen lagen bei $0,61 \text{ g L}^{-1}$ Glycerin (26 h Prozesszeit), $0,54 \text{ g L}^{-1}$ Acetat (26 h Prozesszeit) und $2,80 \text{ g L}^{-1}$ Ethanol (26 h Prozesszeit). Es wurde etwas mehr Ethanol gebildet als mit den Vergleichsstämmen. Acetat und Ethanol wurden bis zum Ende der Prozesszeit wieder verstoffwechselt und trugen zu einem leichten Anstieg der Biomassekonzentration bei (Abbildung 5.6). Insgesamt konnten keine höheren Produktkonzentrationen mit den Stämmen mit doppelt integrierter D-GalA-Reduktase festgestellt werden. Finale Produktkonzentrationen nach 72 h Prozesszeit waren sogar etwas niedriger als die des Referenzstamms ($0,59 \text{ g L}^{-1}$ mit *S. cerevisiae* SiHY058 bzw. $0,20 \text{ g L}^{-1}$ mit *S. cerevisiae* SiHY059 im Vergleich zu $0,73 \text{ g L}^{-1}$ mit *S. cerevisiae* SiHY040). Der Ausbeutekoeffizient $Y_{P/Co-S}$ lag bei *S. cerevisiae* SiHY058 und dessen Referenzstamm *S. cerevisiae* SiHY040 bei $0,05 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1}$ Glukose, während *S. cerevisiae* SiHY059 nur $0,01 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1}$ Glukose lieferte (Abbildung 5.6). Im Gegensatz dazu lag der Ausbeutekoeffizient $Y_{X/Co-S}$ bei allen Stämmen ähnlich hoch ($0,09 \text{ g BTM g}^{-1}$ Glukose bzw. $0,13 \text{ g BTM g}^{-1}$ Glukose). Die Selektivität $Y_{P/E}$ lag bei den *S. cerevisiae* Stämmen mit Einfachmutante der Reduktase bei $0,94 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1}$ D-GalA (*S. cerevisiae* SiHY040) bzw. $0,99 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1}$ D-GalA (*S. cerevisiae* SiHY058). Für *S. cerevisiae* SiHY059 konnte nur eine Selektivität $Y_{P/E}$ von $0,80 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1}$ D-GalA berechnet werden. Sowohl im Satzprozess mit *S. cerevisiae* SiHY058 als auch mit *S. cerevisiae* SiHY059 konnte die Kohlenstoffbilanz zu mindestens 90 % geschlossen werden (siehe Abbildung 9.5 und Abbildung 9.6 im Anhang für Abbildungen).

Diskussion

Für die industrielle Anwendung von *S. cerevisiae* ist es von Vorteil, entsprechende nicht-native Gene genomisch zu integrieren, da Multicopy-Plasmide bis heute noch nicht hinreichend stabil für großskalige Anwendungen sind (Caunt et al. 1988, Hohnholz et al. 2017). Aufgrund dessen wurde für die Verbesserung der Produktion von L-GalOA mit rekombinanten *S. cerevisiae* die Genkassette mit dem D-GalA-Reduktase-Gen mehrfach in das Genom des Stammes integriert, um theoretisch eine höhere Kopienzahl des

Enzyms zu erreichen. Die daraus resultierenden rekombinanten *S. cerevisiae* Stämme zeigten allerdings keine verbesserte Produktion von L-GalOA. Der Prozessverlauf war nahezu identisch zum Ausgangsstamm mit nur einem Reduktase-Gen (Abschnitt 5.2.1). Die finalen Produktkonzentrationen unterschieden sich nur gering und es konnte nicht mehr als 12 % (*S. cerevisiae* SiHY058) bzw. 4 % (*S. cerevisiae* SiHY059) der eingesetzten D-GalA umgesetzt werden. Auch wenn die Selektivität des Stammes *S. cerevisiae* SiHY059 niedriger war als mit den beiden Vergleichsstämmen, zeigten alle bisherigen Biotransformationen, dass D-GalA stöchiometrisch zu L-GalOA umgesetzt wird und nicht weiter von der Hefe verstoffwechselt wird. Da die Multicopy-Plasmid-Stämme des Kooperationspartners nicht vorlagen, konnte nicht überprüft werden, ob eine Erhöhung der Produktbildung durch deutlich erhöhte Enzym-Kopienzahlen im Rührkesselreaktor erzielt werden kann. Deswegen wurde für weitere Versuche weiterhin der Ausgangsstamm *S. cerevisiae* SiHY040 bzw. *S. cerevisiae* SiHY041 verwendet.

5.2.2 Effekt von D-GalA auf das Wachstum

In allen Satzprozessen mit Glukose und dem rekombinanten *S. cerevisiae* Stamm, welcher das Gen für die (mutierte) D-GalA-Reduktase integriert hatte, wurde eine Wachstumsverzögerung festgestellt. Um zu untersuchen, ob die Verzögerung aufgrund einer Inhibierung von *S. cerevisiae* durch das Edukt D-GalA verursacht wird, wurden zwei Satzprozesse mit dem rekombinanten *S. cerevisiae* Stamm SiHY040 in SC-Medium mit 1 % (w/v) Glukose in Rührkesselreaktoren durchgeführt. Zum einen Prozess wurde zusätzlich 0,5 % (w/v) D-GalA zugegeben.

5.2 Biotransformationen mit Glukose als Co-Substrat

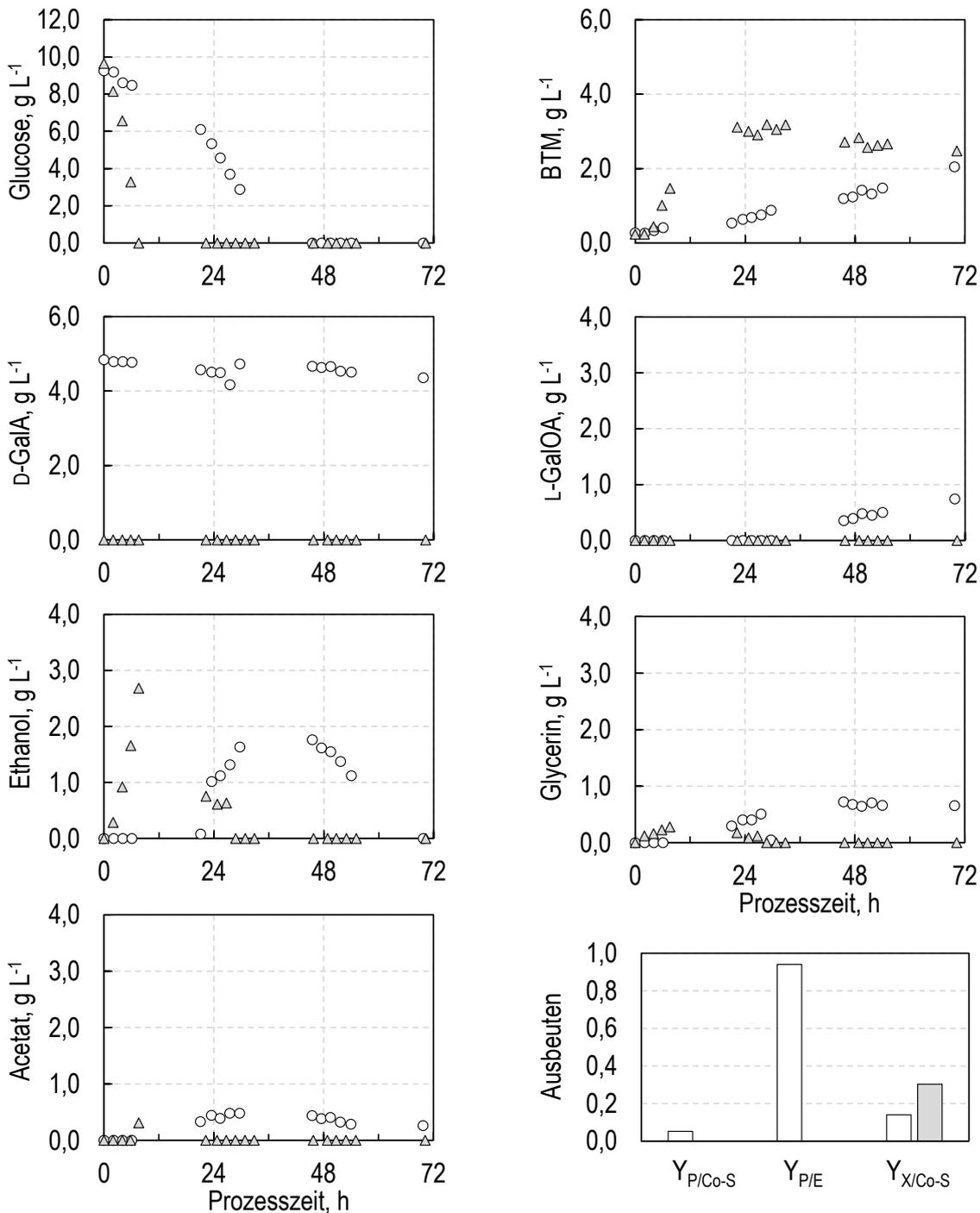


Abbildung 5.7: Vergleichende Satzkultivierung des rekombinanten *S. cerevisiae* Stammes SiHY040 mit (○) und ohne (△) 0,5 % (w/v) D-GalA mit 1 % (w/v) Glukose in SC-Medium im kontrollierten Rührkesselbioreaktor ($T=30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5$, $F_{\text{Luft}} = 0,5 \text{ vvm}$, $V_{\text{R}} = 0,6 \text{ L}$, $N_{\text{Start}}=200 \text{ min}^{-1}$). Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Glukose, Biotrockenmasse, sowie von D-GalA, L-GalOA, Ethanol, Glycerin und Acetat über die Prozesszeit. Berechnete Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/Co-S}$ (mol mol^{-1}), $Y_{P/E}$ (mol mol^{-1}) und $Y_{X/Co-S}$ (g g^{-1}).

In beiden Prozessen wurden ähnliche finale Biomassekonzentrationen von $2,93 \text{ g L}^{-1}$ (mit D-GalA) und $2,47 \text{ g L}^{-1}$ (ohne D-GalA) erzielt. Allerdings war das Wachstum im Satzprozess mit D-GalA verzögert und eine Zunahme der Biomasse konnte erst nach über 20 h beobachtet werden (Abbildung 5.7). Im Gegensatz dazu war keine Verzögerungsphase im Satzprozess ohne D-GalA zu beobachten. Der Ausbeutekoeffizient $Y_{X/Co-S}$ lag in Prozessen mit D-GalA bei $0,30 \text{ g BTM g}^{-1}$ Glukose im Vergleich zu $0,22 \text{ g BTM g}^{-1}$ Glukose ohne D-GalA im Medium. In beiden Prozessen wurde Ethanol gebildet bis zu Konzentrationen von $2,95 \text{ g L}^{-1}$ ohne D-GalA nach 46 h Prozesszeit und $2,68 \text{ g L}^{-1}$ mit D-GalA nach 46 h Prozesszeit. Auch hier war die Bildung zeitverzögert um ca. 20 h, was der Verzögerungsphase des Prozesses mit D-GalA entspricht (Abbildung 5.7). Neben Ethanol wurde in beiden Prozessen auch Glycerin und Acetat als fermentative Nebenprodukte gebildet (Abbildung 5.7). Während im Satzprozess ohne D-GalA sich bereits nach 24 h kaum noch Sekundärmetabolite im Medium befanden, akkumulierte Glycerin bis Prozessende im Satzprozess mit D-GalA auf $0,69 \text{ g L}^{-1}$. Acetat und Ethanol wurden bis 48 h Prozesszeit wieder verbraucht. Gleichzeitig wurde L-GalOA wachstumsgekoppelt ab ca. 20 h Prozesszeit mit *S. cerevisiae* SiHY040 gebildet bis zu einer finalen Konzentration von $0,62 \text{ g L}^{-1}$ nach 72 h Prozesszeit. In beiden Satzprozessen konnte die Kohlenstoffbilanz zu mindestens 90 % geschlossen werden (siehe Abbildung 9.1 und Abbildung 9.7 im Anhang für Abbildungen).

Diskussion

Die Nutzung von D-GalA in vielen bisherigen Studien erfolgte ohne D-GalA-Transporter (Matsubara et al. 2016, Souffriau et al. 2012). Die Aufnahme von D-GalA war zumeist langsam und bei saurem pH zu beobachten. Außerdem wurde in Präsenz von Glukose oder Fruktose keine D-GalA transportiert. Mit der Expression des D-GalA-Transporters Gat1 konnte eine verbesserte Aufnahme (Benz et al. 2014) und zusätzlich der inhibierende Effekt von Hexosen auf den Transport von D-GalA umgangen werden.

Trotzdem war Wachstum mit D-GalA als einziger Kohlenstoffquelle in *S. cerevisiae* Stämmen, die unterschiedlich heterologe Enzyme des L-GalOA-Katabolismus exprimierten, oder in Verbindung mit Co-Substraten langsam (Jeong et al. 2020, Protzko et al. 2018). Auch mit dem rekombinanten *S. cerevisiae* Stamm SiHY040 konnte eine Verzögerung des Wachstums bei Zugabe von D-GalA zum Medium festgestellt werden (Abbildung 5.7). Die Wachstumsverzögerung durch D-GalA hat mehrere mögliche Ursachen. Zum einen wirkt D-GalA als schwache Säure, welche nach Import ins Zytoplasma durch den leicht höheren intrazellulären pH deprotoniert wird (Kotyk 1963, Souffriau et al. 2012). Damit

kommt es zu einer Ansäuerung des Inneren der Zelle und zur Störung der pH-Homöostase. Durch ATP-verbrauchende Protonenpumpen kann der intrazelluläre pH zwar bei ca. pH 6 gehalten werden (Orij et al. 2009, Valli et al. 2005), das verbraucht jedoch Energie und verzögert somit das Wachstum (Orij et al. 2011). Gleichzeitig müssen die für die Reduktion von D-GalA notwendigen Enzyme exprimiert werden und verbrauchen, bei Verfügbarkeit von D-GalA, NADH aus glykolytischen Stoffwechselwegen. Zusätzlich ist beim Import von D-GalA ein H⁺-Symporter aktiv, welcher wiederum den Energiebedarf der Hefezelle vergrößert (Benz et al. 2014). Zusammengefasst verzögern diese Faktoren das Wachstum in Präsenz von D-GalA. Hinsichtlich des Produkts kann keine Inhibierung festgestellt werden. Zu Beginn des Satzprozesses, bei dem die Wachstumsverzögerung auftrat, lag noch kein Produkt im Medium vor und Produktbildung erfolgte wachstumsgekoppelt (Abbildung 5.7).

5.3 Biotransformation mit Sorbitol als Co-Substrat

Als weiterer Ansatz wurde eine Kopplung der Reduktion von D-GalA an zusätzliche NADPH oder NADH-generierende Reaktionen verfolgt. Mit Sorbitol als Co-Substrat lässt sich durch Integration der Sorbitol-Dehydrogenase aus *Y. lipolytica* YISdr oder der nativen SOR2 von *S. cerevisiae* bei der Oxidation von Sorbitol zu Fruktose ein zusätzliches NADPH bzw. NADH generieren, bevor Fruktose in der Glykolyse abgebaut wird. In Kombination mit der Wildtyp Reduktase AnGar1 oder den NADH-verwendenden Reduktase-Mutanten stellt das somit eine redox-ausgeglichene Reaktionskette dar, da mit Hin- und Rückreaktion der Co-Faktorbedarf für die Biotransformation abgedeckt wird und das Wachstum der Zellen nominell durch Metabolisierung von Fruktose erfolgt. Die rekombinanten *S. cerevisiae* Stämme trugen entsprechend der Co-Faktornutzung entweder die Gene für YISdr und AnGar1 oder Sor2 und AnGar1*/AnGar1** genomisch integriert und die entsprechenden *S. cerevisiae* Stämmen SiHY001 (AnGar1), SiHY030 (AnGar1*) und SiHY032 (AnGar1**) wurden vom Kooperationspartner bereitgestellt.

5.3.1 Vergleich unterschiedlicher Stämme

Die drei rekombinanten *S. cerevisiae* Stämme SiHY001, SiHY030 und SiHY032 wurden in vergleichenden Satzprozessen in SC-Medium mit 1 % (w/v) Sorbitol und 0,5 % (w/v) D-GalA in Rührkesselreaktoren kultiviert.

In allen Prozessen fand eine Verzögerung des Wachstums um ca. 12 h statt, bevor eine Zunahme der Biomasse erfolgte (Abbildung 5.8). Ab ca. 36 h Prozesszeit stagnierte das Wachstum und es kam nur noch zu einem langsamen Aufbau der Biomasse bei allen drei Stämmen. Nach 72 h Prozesszeit erreichten alle Stämme eine ähnliche finale Biomassekonzentration von ca. 4 g L⁻¹ (Tabelle 5.1). Dazu korrelierend wurde während der ersten 48 h Prozesszeit über die Hälfte des eingesetzten Sorbitols umgesetzt, aber nicht vollständig bis zum Ende des Prozesses verbraucht (Abbildung 5.8). Finale verbleibende Sorbitolkonzentrationen nach 72 h Prozesszeit waren 1,06 g L⁻¹ mit *S. cerevisiae* SiHY001 (AnGar1), 2,99 g L⁻¹ mit *S. cerevisiae* SiHY030 (AnGar1*) und 1,90 g L⁻¹ mit *S. cerevisiae* SiHY032 (AnGar1**). Über die gesamte Prozesszeit konnte bei keinem der *S. cerevisiae* Stämme eine signifikante Bildung von fermentativen Nebenprodukten wie Ethanol, Glycerin oder Acetat beobachtet werden.

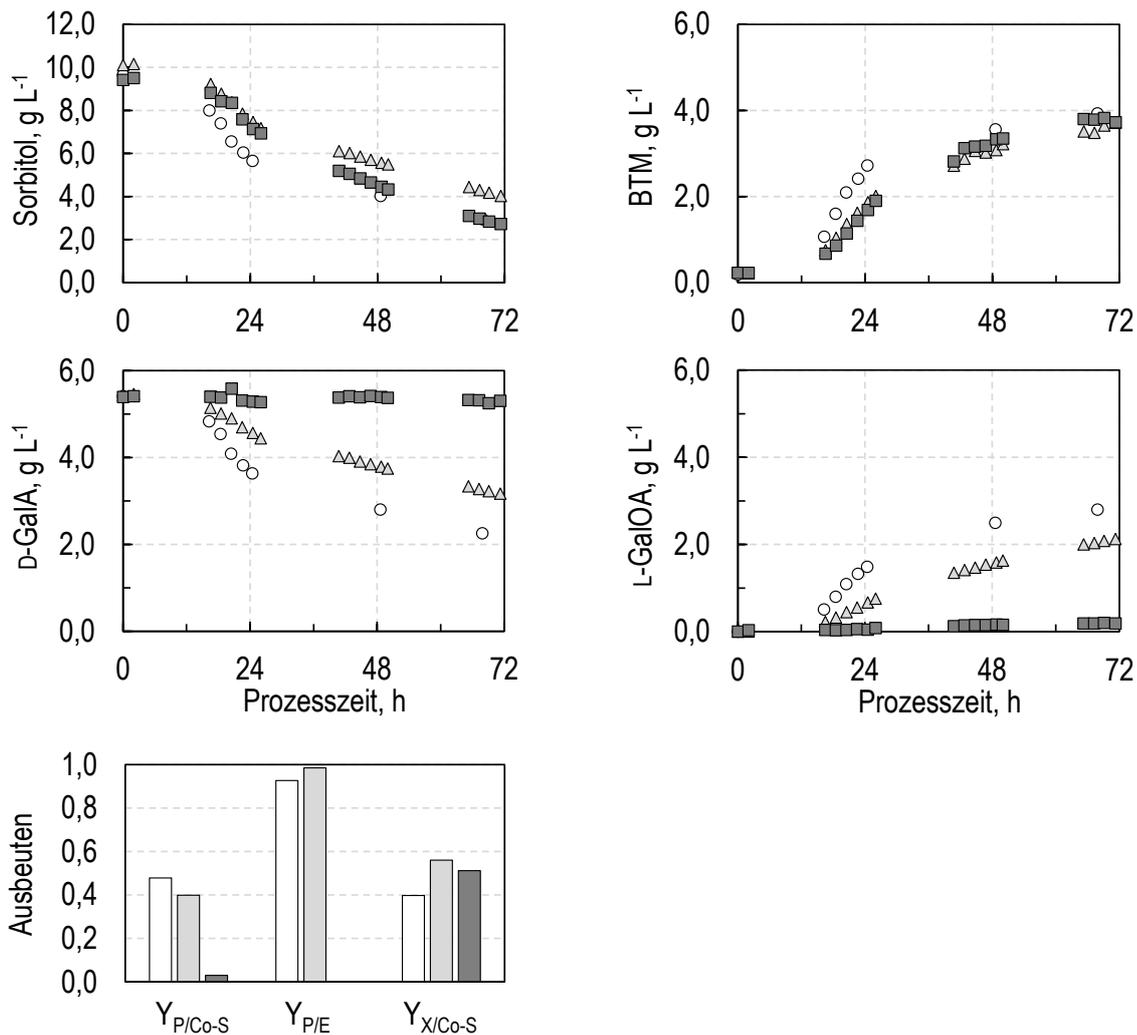


Abbildung 5.8: Vergleichende Satzkultivierung der rekombinanten *S. cerevisiae* Stämme SiHY001 (○), SiHY030 (△) und SiHY032 (■) mit 1 % (w/v) Sorbitol und 0,5 % (w/v) D-GalA in SC-Medium im kontrollierten Rührkesselbioreaktor ($T=30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5$, $F_{\text{Luft}} = 0,5 \text{ vvm}$, $V_R = 0,6 \text{ L}$, $N_{\text{Start}}=200 \text{ min}^{-1}$). Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Glukose, Biotrockenmasse, sowie von D-GalA, L-GalOA, Ethanol, Glycerin und Acetat über die Prozesszeit. Berechnete Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/Co-S}$ (mol mol^{-1}), $Y_{P/E}$ (mol mol^{-1}) und $Y_{X/Co-S}$ (g g^{-1}).

Nur mit dem rekombinanten *S. cerevisiae* Stamm SiHY001 wurden $0,18 \text{ g L}^{-1}$ Acetat innerhalb der ersten 24 h gebildet, die aber im Prozessverlauf wieder verbraucht wurden. Deutliche Unterschiede gab es bei der Produktbildung. Der Stamm, welcher die Wildtyp Reduktase trug, konnte bis Prozessende nach fast 72 h $3,58 \text{ g L}^{-1}$ L-GalOA bilden. Das entspricht 66 % Umsatz der eingesetzten D-GalA-Menge. Der Stamm mit Einfachmutan-

te kam hingegen nur auf finale Produktkonzentrationen von 2,45 g L⁻¹ (45 % Umsatz), der mit Doppelmutante auf lediglich 0,22 g L⁻¹ L-GalOA (4 % Umsatz). Die berechneten Ausbeutekoeffizienten spiegeln diesen Trend wieder (Tabelle 5.1). Die Biotransformation in *S. cerevisiae* SiHY001 und *S. cerevisiae* SiHY030 konnte fast ausschließlich während des Wachstums der *S. cerevisiae* Stämme beobachtet werden.

Tabelle 5.1: Berechnete Ausbeutekoeffizienten von *S. cerevisiae* SiHY001, *S. cerevisiae* SiHY030 und *S. cerevisiae* SiHY032 in Satzprozessen mit SC-Medium, 1 % (w/v) Sorbitol und 0,5 % (w/v) D-GalA ($Y_{P/Co-S}$, $Y_{P/E}$ (mol mol⁻¹) und $Y_{X/Co-S}$, g g⁻¹). Der Ausbeutekoeffizient $Y_{P/E}$ von *S. cerevisiae* SiHY032 wurde aufgrund des geringen Bestimmtheitsmaßes R^2 von 0,12 nicht berücksichtigt.

	$Y_{P/Co-S}$, mol mol ⁻¹	$Y_{P/E}$, mol mol ⁻¹	$Y_{X/Co-S}$, g g ⁻¹
SiHY001	0,48	0,93	0,40
SiHY030	0,40	0,98	0,56
SiHY032	0,05	-	0,51

Der Ausbeutekoeffizient $Y_{P/Co-S}$ war umso niedriger, je mehr Mutationen die Reduktase trug. $Y_{P/Co-S}$ lag bei *S. cerevisiae* SiHY001 bei 0,48 mol L-GalOA mol⁻¹ Sorbitol, während in Satzprozessen mit *S. cerevisiae* Stämmen mit den AnGar1-Mutanten nur noch 0,40 mol L-GalOA mol⁻¹ Sorbitol (AnGar1*) und 0,03 mol L-GalOA mol⁻¹ Sorbitol erzielt wurden. Der Ausbeutekoeffizient $Y_{X/Co-S}$ lag hingegen bei allen drei *S. cerevisiae* Stämmen ähnlich hoch bei 0,5 g BTM g⁻¹ Sorbitol (AnGar1: 0,4 g BTM g⁻¹ Sorbitol, AnGar1*: 0,56 g BTM g⁻¹ Sorbitol, AnGar1**: 0,51 g BTM g⁻¹ Sorbitol). Gleiches galt für die Selektivität $Y_{P/E}$ der Reaktion, die bei *S. cerevisiae* SiHY001 und *S. cerevisiae* SiHY030 nahezu stöchiometrisch bei 0,93 mol L-GalOA mol⁻¹ D-GalA und 0,98 mol L-GalOA mol⁻¹ D-GalA lag (Tabelle 5.1). In allen drei Satzprozessen konnte die Kohlenstoffbilanz zu mindestens 90 % geschlossen und somit ausgeschlossen werden, dass das Produkt L-GalOA über unbekannte Stoffwechselwege in Hefe abgebaut wird (Abbildung 5.9).

Diskussion

Die beste Biotransformationsfähigkeit konnte mit dem Stamm, welcher die Reduktase AnGar1 hatte, festgestellt werden. Nach 72 h wurde bei Standardprozessbedingungen 66 % der eingesetzten D-GalA umgesetzt.

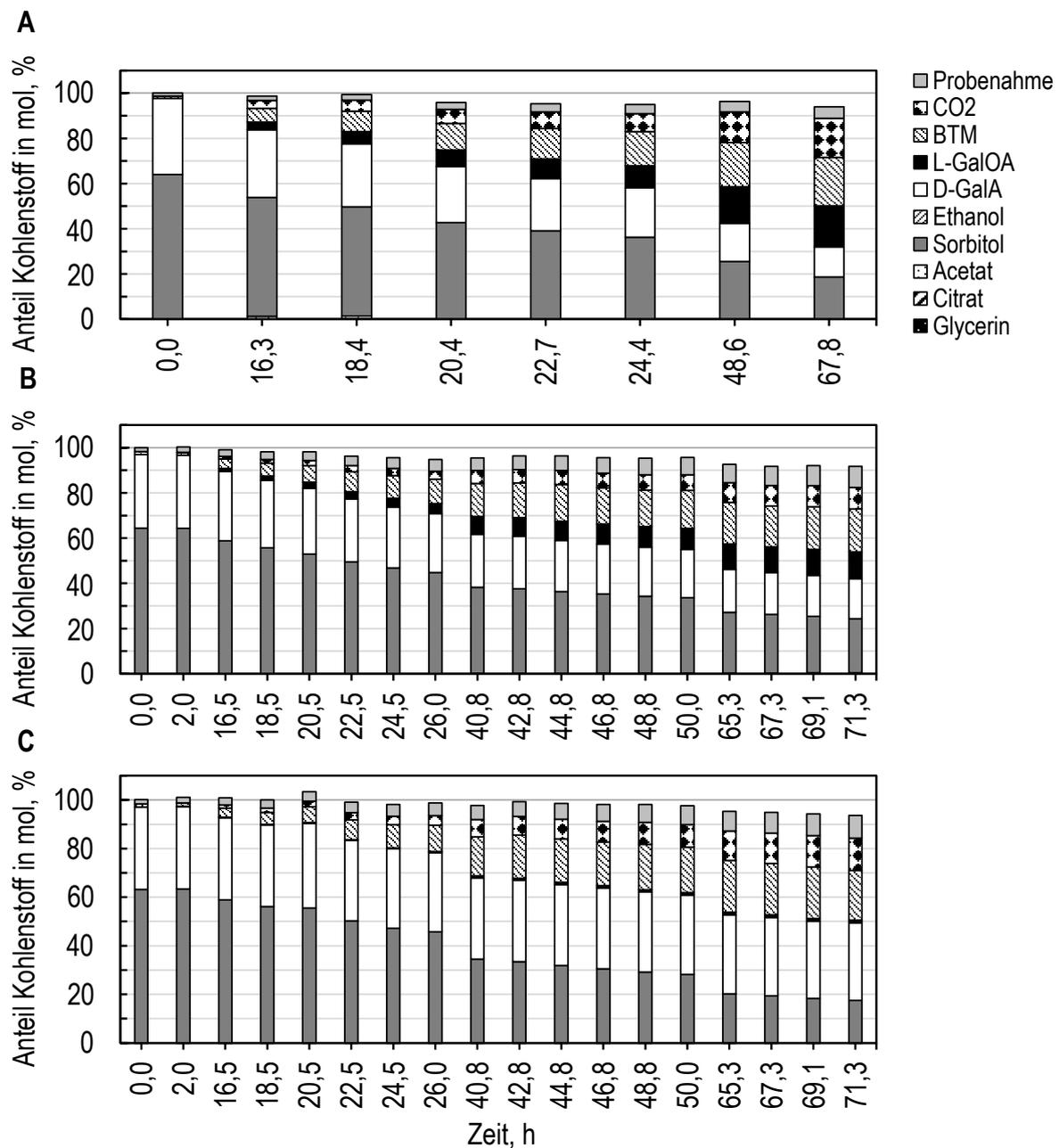
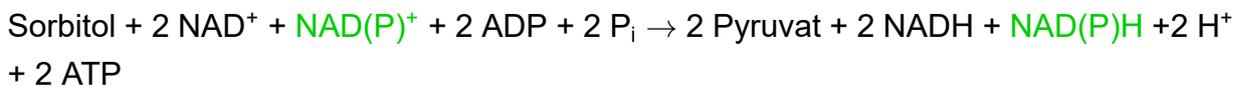


Abbildung 5.9: Kohlenstoffbilanz der einzelnen Probenahmezeitpunkte der Satzkultivierung von *S. cerevisiae* SiHY001 (A), *S. cerevisiae* SiHY030 (B) und *S. cerevisiae* SiHY0032 (C) mit 1 % (w/v) Sorbitol und 0,5 % (w/v) D-GalA in SC-Medium im kontrollierten Rührkesselbioreaktor. Die Balken stellen die Anteile an Gesamtkohlenstoff dar, die im Prozessverlauf zu den gegebenen Probenahme-Zeitpunkten in Form der jeweiligen Komponenten vorlagen. Die Bilanz konnte zu jedem Zeitpunkt zu über 90 % geschlossen werden.

Damit fand zwar keine vollständige Biotransformation von D-GalA bis Prozessende statt, allerdings ist die finale Produktkonzentration die höchste gemessene im Vergleich zu allen bisherigen Satzprozessen mit Glukose.

Wenn man sich die Nettoreaktion der Glykolyse bis Pyruvat unter aeroben Bedingungen anschaut, ergeben sich folgende Gleichungen aus einem Molekül Glukose oder Fruktose bzw. Sorbitol:



Die Strategie, einen "Überschuss" an reduzierendem Co-Faktor durch die durch YISdr bzw. SOR2-katalysierte Oxidation von Sorbitol zu Fruktose zu erreichen, war erfolgreich. Das zusätzlich gewonnene NAD(P)H dieser Reaktion konnte für die Reduktion von D-GalA durch die Reduktase genutzt werden, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Besonders für die NADPH-gekoppelte Reduktion mit der AnGar1 konnte mit Sorbitol Produkt gebildet werden, was in Satzprozessen mit Glukose nicht möglich war (Abschnitt 5.2.1).

Mit steigender Anzahl an Mutationen der Reduktase sank allerdings die Produktausbeute in Satzprozessen (Abbildung 5.8). Mit der AnGar1* war die maximal erreichte Produktkonzentration von 2,45 g L⁻¹ trotzdem um das 3,4-fache höher als in Satzprozessen mit Glukose (0,73 g L⁻¹ L-GalOA, Abschnitt 5.2.1). Auch das kann auf die Einführung der zusätzlich NADH-generierenden Reaktion von Sorbitol zu Fruktose mit der Sor2 zurückgeführt werden. Die deutlich geringere Ausbeute mit der Doppelmutante ist hauptsächlich durch die deutlich verminderte Aktivität der Reduktase mit zwei Mutationen zu erklären. Diese konnte in Enzymaktivitätsassays wie unter Abschnitt 4.3.3 methodisch beschrieben bestätigt werden und deckt sich mit Ergebnissen von Harth et al. (2020). In der Studie konnte eine 10-fach niedrigere Aktivität von AnGar1 mit NADH im Vergleich zu NADPH beobachtet werden. Der spezifische Austausch von Aminosäuren in der Co-Faktor-Bindetasche der AnGar1 führte allerdings nicht, wie erhofft, zu einer deutlichen Verbesserung der Aktivität mit NADH. Die Mutationen resultierten in einer reduzierten Aktivität mit NADPH, vermutlich, da die in der Bindetasche stabilisierenden elektrostati-

schen Wechselwirkungen von geladenen Aminosäureresten mit dem Co-Faktor NADPH nicht mehr vorhanden waren. Ein Aktivitätsverlust ist nicht unüblich bei Enzymen, deren Molekularstruktur verändert wurde (Yazmin und Saab-Rinco 2013), denn katalytische Zentren gehören zu den am höchsten konservierten Strukturen in Proteinen (Schwede 2013) und Veränderungen der Aminosäuresequenz können drastische Auswirkungen auf die Enzymaktivität haben (Toscano et al. 2007, Wagner und Benkovic 1990). Harth et al. (2020) konnte in seiner Studie außerdem zeigen, dass die Wildtyp Reduktase durch NADP^+ inhibiert wird und letztendlich deutlich reduzierte Aktivität mit NADH in Präsenz von NADP^+ zeigt. Auf der anderen Seite zeigten die Mutanten mit steigendem Mutationsgrad eine höhere Insensitivität gegenüber NADP^+ (Harth et al. 2020) und somit keine Inhibition ihrer Reduktaseaktivität. Die Reduktion von D-GalA mit NADH ist zwar grundsätzlich möglich mit den mutierten Reduktasen. Die niedrigeren Enzymaktivitäten und daraus resultierenden niedrigen L-GalOA-Konzentrationen im Vergleich zu einer NADPH-abhängigen Reduktion machen allerdings ein NADPH-ausgeglichenes Reaktionssystem attraktiver für die L-GalOA-Produktion.

Gleichzeitig konnte eine vom Wachstum der Hefezellen abhängende Produktbildung beobachtet werden. Versuche mit ruhenden Zellen von *S. cerevisiae* SiHY001 (Daten nicht gezeigt) bestätigten, dass die Biotransformation wachstumsgekoppelt ablief, da über eine Prozesszeit von 48 h keine L-GalOA mit ruhenden Zellen gebildet wurde. Nachdem die besten Ergebnisse mit der Wildtyp Reduktase mit Sorbitol erzielt werden konnten, wurde in weiteren Versuchen nur noch der rekombinante *S. cerevisiae* Stamm SiHY001 verwendet. Ein großer Nachteil des an dieses Polyol gekoppelten Reaktionssystems ist, dass Sorbitol nicht oder nur in sehr geringen Mengen in pektinreichen Reststoffen vorkommt (Edwards und Doran-Peterson 2012, Schmitz et al. 2019). Die Verwendung von in Hydrolysaten vorkommenden Zuckern wäre deswegen deutlich vorteilhafter. Da aber für deren Verstoffwechslung NADPH verbraucht wird, würde eine Metabolisierung um den zur Produktbildung nötigen Co-Faktor konkurrieren (Barnett 1976). Zusätzlich ist Sorbitol ein deutlich teureres Substrat als Glukose (Zhang et al. 2013) und wird als Plattformchemikalie in unterschiedlichen Industrien verwendet (Marques et al. 2016, Silveira und Jonas 2002). Die Ausbeute an L-GalOA müsste entsprechen höher liegen, um die Kosten für den Einsatz von Sorbitol zu decken.

5.3.2 Biotransformationen bei unterschiedlichem pH

Hydrolysate aus pektinreichen Reststoffen weisen durch die mengenmäßig am meisten darin enthaltene D-GalA ($pK_S = 3,24$) einen sauren pH auf. Auch unterschiedliche Hydrolysebedingungen, beispielsweise mit Pektinase, bedingen einen sauren pH zwischen pH 3 und pH 4. Da *S. cerevisiae* für seine hohe pH-Toleranz im Säuren bekannt ist, wurden Satzprozesse mit dem besten rekombinanten *S. cerevisiae* Stamm SiHY001 bei verschiedenen pHs im Bereich pH 3 bis pH 5 in Rührkesselreaktoren untersucht und miteinander verglichen.

Bei allen pH konnten ähnliche finale Biomassekonzentrationen festgestellt werden (Abbildung 5.10). Lediglich die Biomassebildung pro Gramm Substrat Sorbitol, also der Ausbeutekoeffizient $Y_{X/Co-S}$ war bei pH 3 mit $0,41 \pm 0,01$ g BTM g^{-1} Sorbitol niedriger als bei allen anderen untersuchten pH-Werten (Abbildung 5.10). Auch wurden, unabhängig vom pH, wenige oder keine Sekundärmetabolite wie Glycerin, Acetat oder Ethanol gebildet (Daten nicht gezeigt). Finale L-GalOA-Konzentrationen zeigten dagegen große Unterschiede. In Satzprozessen mit pH 3 konnten nur $1,19 \pm 0,241$ g L^{-1} L-GalOA gebildet werden, während in Prozessen bei pH 5 bis zu $4,22 \pm 0,62$ g L^{-1} produziert wurden. In allen Prozessen konnte reproduzierbar eine nahezu vollständige stöchiometrische Umsetzung mit einer Selektivität $Y_{P/E}$ von $0,88 \pm 0,04$ mol L-GalOA mol^{-1} D-GalA bis $0,95 \pm 0,07$ mol L-GalOA mol^{-1} D-GalA beobachtet werden, was auf keine weitere Metabolisierung des Produkts hinweist.

Die schlechtere Biotransformation bei einem pH unter 5 spiegelt sich auch im Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/Co-S}$ wieder. Je niedriger der pH, desto niedriger ist der Koeffizient (Tabelle 5.2).

Tabelle 5.2: Berechnete Ausbeutekoeffizienten von *S. cerevisiae* SiHY001 bei unterschiedlichen pH in Satzprozessen mit SC-Medium, 1 % (w/v) Sorbitol und 0,5 % (w/v) D-GalA ($Y_{P/Co-S}$, $Y_{P/E}$ (mol mol^{-1}) und $Y_{X/Co-S}$, (g g^{-1})).

	$Y_{P/Co-S}$, mol mol^{-1}	$Y_{P/E}$, mol mol^{-1}	$Y_{X/Co-S}$, g g^{-1}
pH 3	$0,14 \pm 0,01$	$0,95 \pm 0,07$	$0,41 \pm 0,01$
pH 3,5	$0,19 \pm 0,02$	$0,91 \pm 0,03$	$0,57 \pm 0,05$
pH 4	$0,24 \pm 0,00$	$0,91 \pm 0,05$	$0,54 \pm 0,13$
pH 4,5	$0,36 \pm 0,04$	$0,95 \pm 0,02$	$0,59 \pm 0,12$
pH 5	$0,47 \pm 0,01$	$0,88 \pm 0,04$	$0,60 \pm 0,05$

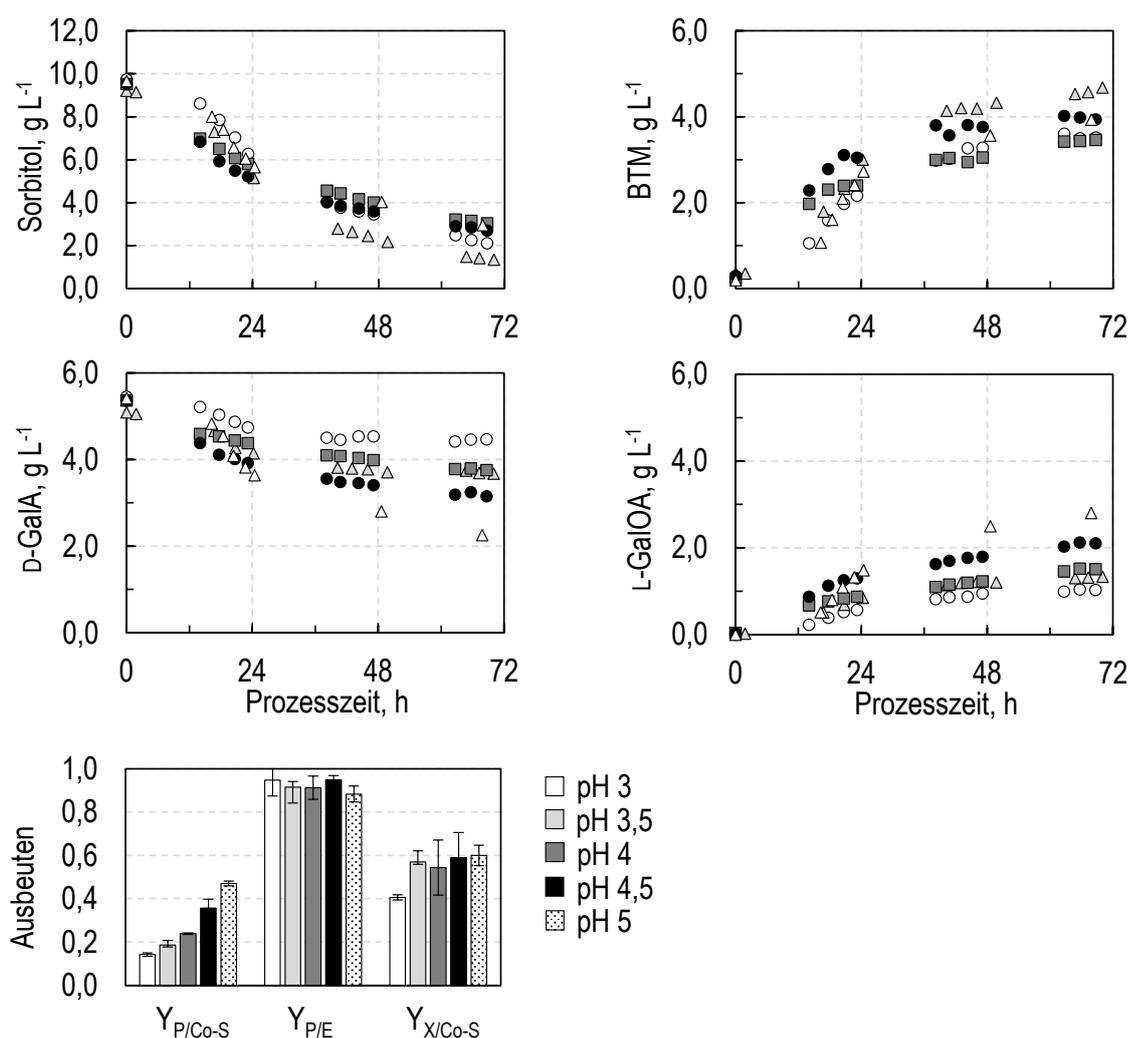


Abbildung 5.10: Vergleichende Satzkultivierung des rekombinanten *S. cerevisiae* Stamms SiHY001 bei unterschiedlichen pH-Werten mit 1 % (w/v) Sorbitol und 0,5 % (w/v) D-GalA in SC-Medium im kontrollierten Rührkeselbioreaktor ($T=30^{\circ}\text{C}$, $F_{\text{Luft}} = 0,5 \text{ vvm}$, $V_{\text{R}} = 0,6 \text{ L}$, $N_{\text{Start}}=200 \text{ min}^{-1}$). Fünf unterschiedliche pH Werte wurden untersucht (pH 3: ○, pH 3,5: △, pH 4: ■, pH 4,5: ●, pH 5: ◻). Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Glukose, Biotrockenmasse, sowie von D-GalA, L-GalOA, Ethanol, Glycerin und Acetat über die Prozesszeit. Berechnete Ausbeutekoeffizienten $Y_{\text{P/Co-S}}$ (mol mol^{-1}), $Y_{\text{P/E}}$ (mol mol^{-1}) und $Y_{\text{X/Co-S}}$ (g g^{-1}).

Wachstum von Hefezellen wurde bis 72 h Prozesszeit beobachtet, genauso Produktion von L-GalOA, welche wachstumsgekoppelt stattfand. Die Kohlenstoffbilanz der Satzprozesse konnte bei allen Probenahmezeitpunkten zu mindestens 90 % geschlossen werden (siehe Abbildungen in Abschnitt 9.4 im Anhang).

Diskussion

Für die enzymatische Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln mit Pektinasen von *A. niger* wurde ein Optimum bei pH 4,5 definiert (Schäfer et al. 2020). *S. cerevisiae* ist bekannt für seine hohe Toleranz gegenüber niedrigen pH (Narendranath und Power 2005). Carmelo et al. (1996) bestätigt gleichbleibende Wachstumsraten von *S. cerevisiae* für einen pH-Bereich von pH 3,5 - 5,0 und *S. cerevisiae* SiHY001 erreichte in Satzprozessen, unabhängig vom pH, ähnliche finale Biotrockenmassekonzentrationen (Abbildung 5.10). Trotzdem konnten in Abhängigkeit vom pH die höchste Produktkonzentration an L-GalOA von $4,22 \pm 0,62 \text{ g L}^{-1}$ und der höchste Ausbeutekoeffizient $Y_{P/Co-S}$ von $0,47 \pm 0,01 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1}$ Sorbitol bei pH 5 bis Prozessende erzielt werden.

Dass die Biotransformation bei pH 5 begünstigt wird, kann mit D-GalA als mittelstarker Säure erklärt werden. D-GalA hat einen pK_S von 3,24 und liegt bei pH 3 als Säure, also undissoziiert vor. Ein höherer pH bewirkt die Dissoziation in das Säureanion. Wird D-GalA bei niedrigem pH über den AnGAT Transporter ins Cytoplasma importiert, dissoziiert die Säure durch den höheren cytoplasmatischen pH und es kommt zur Ansäuerung des Cytoplasmas (Souffriau et al. 2012). Bei pH 5 ist der physiologische pH des Cytoplasmas der Hefezelle näher dem des Mediums (Orij et al. 2009, Valli et al. 2005). Damit sind intrazelluläre Mechanismen der pH-Regulation reduziert (Orij et al. 2011) und der Import von D-GalA über den AnGAT Transporter wird begünstigt (Benz et al. 2014). Inwieweit hier der pH einen direkten Einfluss auf den Import durch den Transporter hat, kann nicht gesagt werden. Alle Studien, welche eine verbesserte Aufnahme von D-GalA mit AnGAT oder Homologen beschreiben, wurden in Schüttelkolben ohne pH-Kontrolle durchgeführt (Benz et al. 2014, Biz et al. 2016, Jeong et al. 2020). Die Expression des D-GalA-Transporters AnGAT führte jedoch in allen Fällen zu einer deutlichen Verbesserung der Aufnahme von D-GalA. Zwar wurde auch ein passiver Transport von D-GalA im Säuern beschrieben (Souffriau et al. 2012), das konnte hier jedoch nicht beobachtet werden. Vielmehr war die Produktbildung bei pH 3 am schlechtesten (Tabelle 5.2). Deswegen wurde für weitere Parameterstudien ein pH von 5 ausgewählt.

5.3.3 Biotransformation mit unterschiedlichen Sorbitolkonzentrationen

Um Limitierungen durch das Co-Substrat Sorbitol zu vermeiden, wurden Satzprozesse in Rührkesselreaktoren mit unterschiedlicher initialer Sorbitolkonzentration mit dem

S. cerevisiae Stamm SiHY001 durchgeführt (Abbildung 5.11). Vorherige Satzprozesse wurden mit 1 % (w/v) Sorbitol gestartet und die Umsetzung von D-GalA über 72 h Prozesszeit war nicht vollständig, sondern es verblieben ca. 30 % der eingesetzten D-GalA im Medium (Abschnitt 5.3.1). Deswegen wurde die initiale Sorbitolkonzentration verdoppelt (2 % (w/v)), vervierfacht (4 % (w/v)) und verzehnfacht (10 % (w/v)). Satzprozesse wurden in SC-Medium mit gleicher initialer D-GalA-Konzentration gestartet (0,5 % (w/v)) und bei pH 5 und 30 °C betrieben.

In allen Satzprozessen war das Wachstum um ca. 12 h verzögert. Die finale Biomassekonzentration bei Prozessende betrug mit 1 % (w/v) Sorbitol $4,63 \pm 0,73 \text{ g L}^{-1}$ (72 h), mit 2 % (w/v) $4,66 \text{ g L}^{-1}$ (95 h), 4 % (w/v) $7,75 \text{ g L}^{-1}$ (94 h) und mit 10 % (w/v) $7,63 \text{ g L}^{-1}$ (82 h) (Abbildung 5.11). Da angenommen wurde, dass mit 10 % (w/v) Sorbitol deutlich mehr Biokatalysator gebildet werden konnte und somit das Edukt D-GalA limitieren könnte, wurden nach 24 h weitere 5 g L^{-1} D-GalA zum Medium gegeben (Abbildung 5.11, ---). Bis zum Prozessende konnte beim Satzprozess mit 1 % (w/v) Sorbitol $67 \pm 10 \%$, bei 2 % (w/v) Sorbitol 64 %, bei 4 % (w/v) Sorbitol 100 % und bei 10 % (w/v) Sorbitol 54 % der eingesetzten D-GalA umgesetzt werden. Nur bei 4 % (w/v) Sorbitol konnte eine vollständige Biotransformation von D-GalA zu L-GalOA nach 49 h Prozesszeit beobachtet werden (Abbildung 5.11).

In allen Prozessen wurde bis zum Ende der Prozesszeit kein vollständiger Verbrauch von Sorbitol beobachtet. In Satzprozessen mit 1 % (w/v) Sorbitol wurden $84 \pm 11 \%$ des eingesetzten Sorbitols durch die rekombinanten *S. cerevisiae* verbraucht, mit 2 % (w/v) Sorbitol waren es 79 %, mit 4 % (w/v) Sorbitol 96 % und mit 10 % (w/v) 47 % (Abbildung 5.11).

Tabelle 5.3: Berechnete Ausbeutekoeffizienten von *S. cerevisiae* SiHY001 bei unterschiedlichen Sorbitolkonzentrationen in Satzprozessen mit SC-Medium und 0,5 % (w/v) D-GalA ($Y_{P/Co-S}$, $Y_{P/E}$ (mol mol⁻¹) und $Y_{X/Co-S}$, g g⁻¹).

	$Y_{P/Co-S}$, mol mol ⁻¹	$Y_{P/E}$, mol mol ⁻¹	$Y_{X/Co-S}$, g g ⁻¹
1 %	$0,48 \pm 0,01$	$0,88 \pm 0,03$	$0,56 \pm 0,09$
2 %	0,25	0,88	0,27
4 %	$0,19 \pm 0,07$	$0,91 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,04$
10 %	0,13	0,94	0,17

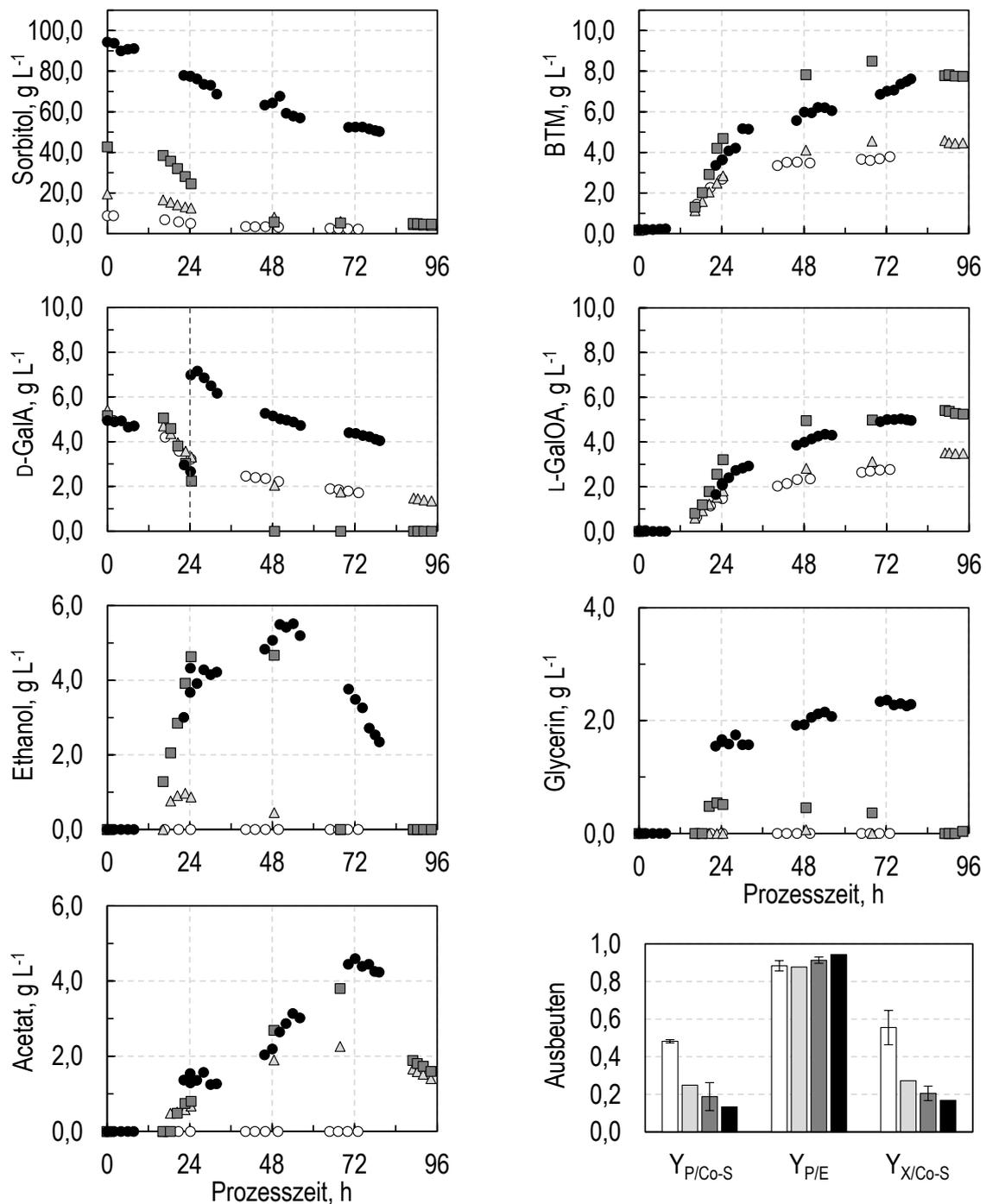


Abbildung 5.11: Vergleichende Satzkultivierung des rekombinanten *S. cerevisiae* Stamms SiHY001 bei unterschiedlichen Co-Substratkonzentrationen mit 0,5 % (w/v) D-GalA in SC-Medium im kontrollierten Rührkesselbioreaktor ($T=30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5$, $F_{\text{Luft}} = 0,5 \text{ vvm}$, $V_{\text{R}} = 0,6 \text{ L}$ bzw. $1,2 \text{ L}$ (10 % (w/v)), $N_{\text{Start}}=200 \text{ min}^{-1}$). Vier unterschiedliche Sorbitolkonzentrationen wurden untersucht (1 % (w/v): \circ , 2 % (w/v): \triangle , 4 % (w/v): \blacksquare , 10 % (w/v): \bullet). Im Satzprozess mit 10 % (w/v) Sorbitol wurde nach 24 h Prozesszeit weitere 0,5 % (w/v) D-GalA zugegeben (---). Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Glukose, Biotrockenmasse, sowie von D-GalA, L-GalOA, Ethanol, Glycerin und Acetat über die Prozesszeit. Berechnete Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/Co-S}$ (mol mol^{-1}), $Y_{P/E}$ (mol mol^{-1}) und $Y_{X/Co-S}$ (g g^{-1}).

Zusätzlich sank der Ausbeutekoeffizient $Y_{P/Co-S}$ von $0,48 \pm 0,01$ mol L-GalOA mol⁻¹ Sorbitol mit 1 % (w/v) Sorbitol auf $0,26$ mol L-GalOA mol⁻¹ Sorbitol (2 % (w/v)), $0,24$ mol L-GalOA mol⁻¹ Sorbitol (4 % (w/v)) und $0,19$ mol L-GalOA mol⁻¹ Sorbitol (10 % (w/v)). Gleichzeitig wurden deutlich mehr Sekundärmetabolite gebildet (Abbildung 5.11), wobei eine höhere initiale Sorbitolkonzentration die Bildung begünstigte. Bei 10 % (w/v) Sorbitol wurden die höchsten Konzentrationen von Glycerin ($2,29$ g L⁻¹ nach 79 h Prozesszeit), Acetat ($4,60$ g L⁻¹ nach 72 h Prozesszeit) und Ethanol ($5,49$ g L⁻¹ nach 50 h Prozesszeit) gemessen. Nur bei 1 % (w/v) Sorbitol wurde kaum Bildung von Sekundärmetaboliten verzeichnet. Die Kohlenstoffbilanz der Satzprozesse konnten bei allen Probenahmezeitpunkten zu mindestens 90 % geschlossen werden (siehe Abbildungen in Abschnitt 9.4 im Anhang).

Diskussion

Für eine vollständige Umsetzung von D-GalA in Satzprozessen müssen hohe initiale Sorbitolkonzentrationen eingesetzt werden. Für *S. cerevisiae* ist für hohe Konzentrationen von Kohlenstoffquellen, beispielsweise für Glukose, eine Inhibierung der Respiration beschrieben, die zur Bildung fermentativer Nebenprodukte führt (De Deken 1966, Pfeiffer und Morley 2014). Der sogenannte "Crabtree-Effekt", der respiro-fermentatives Verhalten von *S. cerevisiae* induziert, tritt bereits bei Konzentrationen von 150 mg L⁻¹ Glukose auf (Verduyn et al. 1984).

Zwar ist in der Literatur kein vergleichbarer Effekt für Sorbitol als Kohlenstoffquelle von *S. cerevisiae* beschrieben. Durch die Sorbitol abbauenden Wege kann jedoch der Crabtree-Effekt induziert werden. Sorbitol wird durch die Sorbitoldehydrogenase zu Fruktose oxidiert, welche wiederum nach Phosphorylierung als Fruktose-6-phosphat in die Glykolyse eintritt. Lemus et al. (2018) beschreibt, dass phosphorylierte Hexosen des glykolytischen Stoffwechsels die Inhibition der Respiration verstärken und somit zu fermentativem Verhalten von *S. cerevisiae* führt. Die Respiration ist der energieeffizienteste Stoffwechselweg, da hier bis zu achtmal mehr ATP im Vergleich zu anaeroben Stoffwechselwegen generiert werden können (Pfeiffer und Morley 2014). Sonnleitner und Käppeli (1986) beschreiben, dass ab bestimmten Glukosekonzentrationen oxidoreduktives Wachstum stattfindet, da durch unregulierte Glukoseaufnahme die respiratorische Kapazität der Hefezelle überstiegen wird. Das hängt vor allem mit der limitierten Re-Oxidation von zytosolischem NADH zusammen. Mitochondrielle Membranen sind impermeabel für zytoplasmatisches NADH und eine ungenügende Aktivität des Transportsystems und mitochondrieller membranständiger NADH Dehydrogenasen führt zur

Hochregulierung NAD^+ generierender Alkoholdehydrogenasen (Porro et al. 2003). Somit kann der Energiebedarf, wenn auch nicht so effizient wie unter oxidativen Bedingungen, durch respiro-fermentatives Verhalten gedeckt werden (Hagman und Piškur 2015) und das gebildete Ethanol wird gleichzeitig zu Sorbitol wieder verstoffwechselt. Dieses typisch diauxische Wachstum konnte vor allem bei Prozessen mit 4 % (w/v) und 10 % (w/v) Sorbitol beobachtet werden (Abbildung 5.11). Obwohl noch Sorbitol im Medium vorhanden war, wurde von den Hefezellen zuerst Ethanol abgebaut, vermutlich auch, um zu hohe (inhibierenden) Konzentrationen des Sekundärmetaboliten zu vermeiden (Sousa et al. 2012).

5.3.4 Nachdosierung von Sorbitol

Hohe initiale Sorbitolkonzentrationen von über 10 g L^{-1} führten in Satzprozessen zur Bildung von Sekundärmetaboliten (Abschnitt 4.1.1). Zur Reduktion der Produktion von Sekundärmetaboliten aufgrund zu hoher initialer Sorbitolkonzentrationen wurde die Nachdosierung von Sorbitol untersucht. Initial lagen 10 g L^{-1} im Satzprozess vor und alle 24 h wurden weitere 10 g L^{-1} Sorbitol zum Medium gegeben (Abbildung 5.12). Diese Konzentration wurde gewählt, da in vorherigen Satzprozessen nach 24 h ca. die Hälfte des eingesetzten Sorbitols bereits aufgebraucht und die im Medium vorliegende Konzentration damit unterhalb des K_M des Hxt13-Transporters für einen effizienten Import von Sorbitol lag. Insgesamt wurden so 30 g L^{-1} Sorbitol dem Satzprozess intermittierend zugeführt.

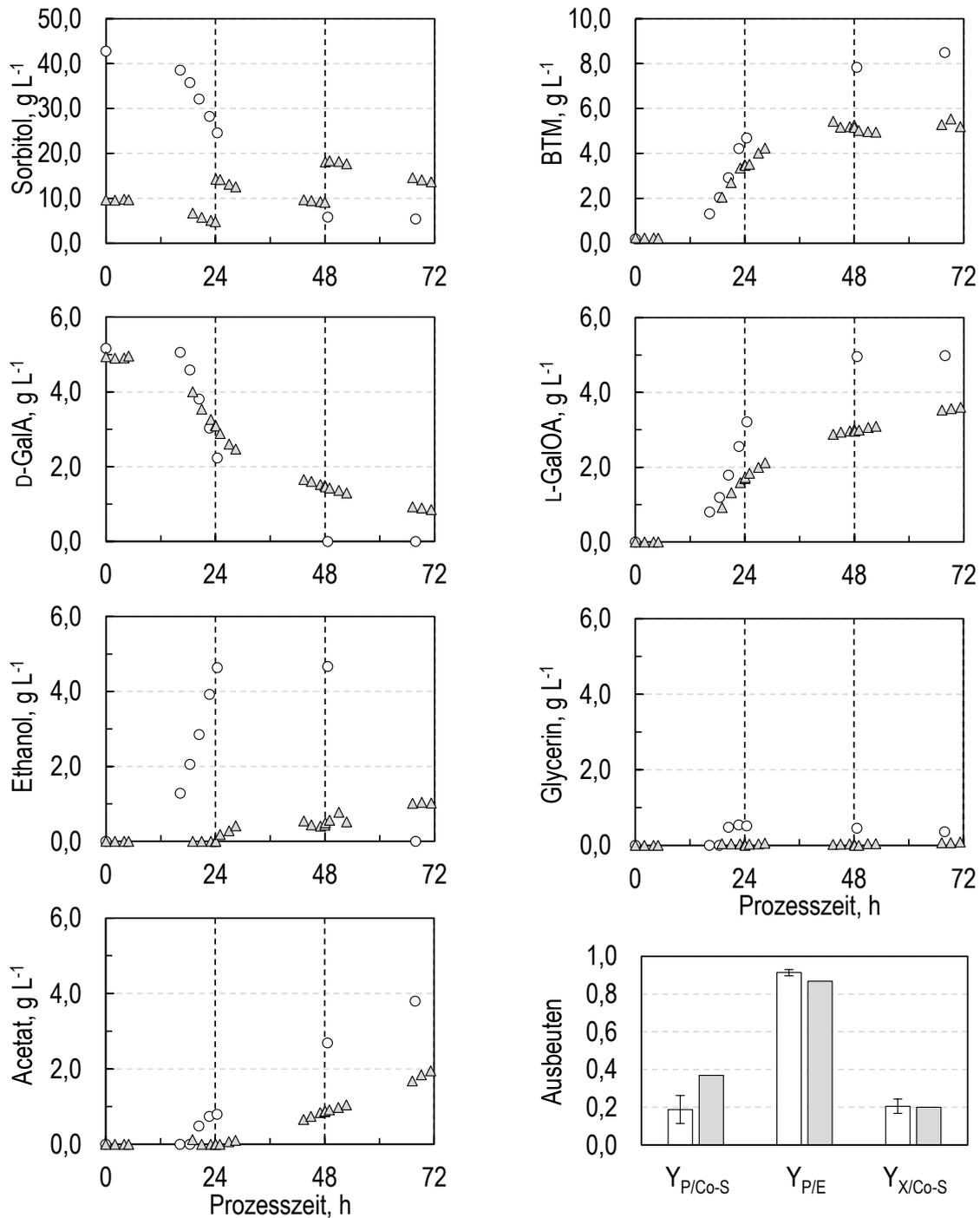


Abbildung 5.12: Vergleichende Satzkultivierung des rekombinanten *S. cerevisiae* Stamms SiHY001 mit 4 % (w/v) Sorbitol und 0,5 % (w/v) D-GalA als Referenzprozess (○) bzw. mit intermittierender Sorbitol-Zugabe (△) in kontrollierten Rührkesselbioreaktoren ($T=30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5$, $F_{\text{Luft}} = 0,5 \text{ vvm}$, $V_R = 0,6 \text{ L}$, $N_{\text{Start}}=200 \text{ min}^{-1}$). Die Zugabe von Sorbitol alle 24 h ist gestrichelt dargestellt. Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Glukose, Biotrockenmasse, sowie von D-GalA, L-GalOA, Ethanol, Glycerin und Acetat über die Prozesszeit. Berechnete Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/Co-S}$ (mol mol^{-1}), $Y_{P/E}$ (mol mol^{-1}) und $Y_{X/Co-S}$ (g g^{-1}).

Im Vergleich zum Satzprozess mit 4 % (w/v) Sorbitol wurden deutlich weniger fermentative Nebenprodukte gebildet (Abbildung 5.12). Beispielsweise war nach 24 h Prozesszeit keine Ethanolbildung im Satzprozess mit Nachdosierung von Sorbitol zu beobachten, während im Satzprozess hier bereits $4,67 \text{ g L}^{-1}$ Ethanol vorlagen, genauso höhere Konzentrationen von Glycerin ($0,51 \text{ g L}^{-1}$) und Acetat ($0,80 \text{ g L}^{-1}$). Im weiteren Verlauf mit intermittierender Zugabe von Sorbitol akkumulierten Acetat ($1,95 \text{ g L}^{-1}$) und Ethanol ($1,22 \text{ g L}^{-1}$), blieben aber weiterhin unter den höchsten gemessenen Konzentrationen des Satzprozesses mit 4 % (w/v) Sorbitol (Abbildung 5.12). Trotz hoher Co-Substratkonzentration im Satzprozess mit intermittierender Sorbitolzugabe wurde die initial eingesetzte D-GalA nicht vollständig umgesetzt, vielmehr sank die Umsetzungsgeschwindigkeit gegen Ende des Satzprozesses (Abbildung 5.12). Auch das Wachstum der Hefezellen stagnierte bereits nach 42 h und trotz weiterem Verbrauch von Sorbitol konnte keine Zunahme in der Biomassekonzentration beobachtet werden (Abbildung 5.12).

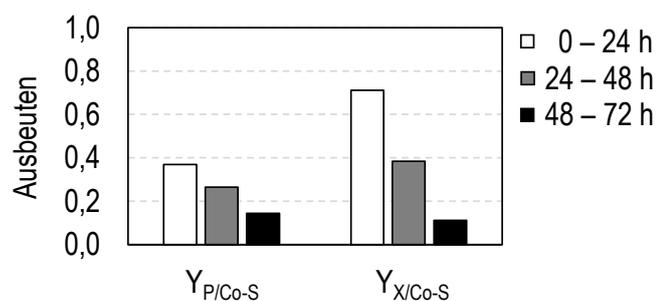


Abbildung 5.13: Berechnete Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/Co-S}$ (mol mol^{-1}) und $Y_{X/Co-S}$ (g g^{-1}) des Satzprozesses mit *S. cerevisiae* SiHY001 mit intermittierender Sorbitolzugabe. Die Ausbeutekoeffizienten beziehen sich auf die jeweils angegebene Prozesszeit: 0 - 24 h vor Sorbitolzugabe, 24 - 48 h nach erster Sorbitolzugabe, 48 - 72 h nach zweiter Sorbitolzugabe.

Der Ausbeutekoeffizient $Y_{P/Co-S}$ unterschied sich deutlich zwischen den einzelnen Sorbitolzugaben und auch im Vergleich zu dem Satzprozess mit 4 % (w/v) Sorbitol. Während dieser vor der ersten Sorbitolzugabe noch ähnlich hoch wie in Satzprozessen mit 1 % (w/v) Sorbitol lag ($0,37 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1}$ Sorbitol im Vergleich zu $0,48 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1}$ Sorbitol), sank er mit jeder Zugabe, bis zu einem Wert von $0,14 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1}$ Sorbitol. Dieser war sogar niedriger als mit 4 % (w/v) Sorbitol ($0,19 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1}$ Sorbitol) (Abbildung 5.13). Die Kohlenstoffbilanz des Satzprozesses mit intermittierender Sorbitolzugabe konnte bei allen Probenahmezeitpunkten zu mindestens 90 % geschlossen werden (siehe Abbildungen in Abschnitt 9.4 im Anhang).

Diskussion

Insgesamt konnte durch die angepasste Prozessstrategie eine deutliche Reduktion an fermentativen Nebenprodukten mit *S. cerevisiae* erzielt werden. Durch die niedrigere initiale Sorbitolkonzentration wurde innerhalb der ersten 24 h Prozesszeit kein Ethanol gebildet, und auch im weiteren Prozessverlauf wurde deutlich weniger Ethanol gebildet als im Referenzprozess, solange die Sorbitolkonzentration niedriger als 10 g L^{-1} war. Sorbitol akkumulierte im Verlauf des Prozesses im Medium auf bis zu 18 g L^{-1} , was dann wiederum zu einer Bildung von Sekundärmetaboliten führte (Abbildung 5.12). Trotzdem konnte nach 42 h eine Stagnation des Wachstums festgestellt werden, was aber nicht auf eine Substratlimitierung zurückgeführt werden kann. Zu diesem Zeitpunkt lagen noch knapp 10 g L^{-1} Sorbitol vor, was in vorherigen Satzprozessen ausreichend war für Biomasseaufbau. Zwar ist bekannt, dass der Hxt13-Transporter langsamere Kinetiken bei niedrigeren Sorbitolkonzentrationen aufweist (Jordan et al. 2016) und damit ein entsprechend langsamerer Transport von Sorbitol in die Zelle stattfindet. Nach 42 h lag die Sorbitolkonzentration jedoch weit über den die Transportgeschwindigkeit beeinflussenden Konzentrationen. Die Limitierung des Wachstums ist viel eher in der Medienzusammensetzung zu suchen, da hier durch Verwendung eines Minimalmediums essentielle Medienkomponenten limitierend wirken können.

5.3.5 Variation der Medienzusammensetzung

In vorherigen Satzprozessen mit 10 % (w/v) Sorbitol und 1 % (w/v) D-GalA konnte das Edukt nicht vollständig umgesetzt werden (Abschnitt 5.3.3). Um die limitierende Medienkomponente zu identifizieren wurde deswegen die Medienkomposition des SC-Mediums angepasst.

Das SC-Medium besteht zum einen aus der kommerziell erhältlichen Hefe-Stickstoffbasis (YNB, Tabelle 9.8), welche zusätzlich zu Salzkomponenten auch Vitamine und Spurenelemente beinhaltet. In allen Versuchen dieser Arbeit wurde die gleiche Charge des YNB verwendet. Außerdem wird dem Medium ein Aminosäuremix zugegeben (Tabelle 9.7), der vor allem auxotrophe Aminosäuren supplementieren soll. Folglich wurde die Menge an YNB bzw. des Aminosäuremixes variiert und Unterschiede in den Satzprozessen analysiert.

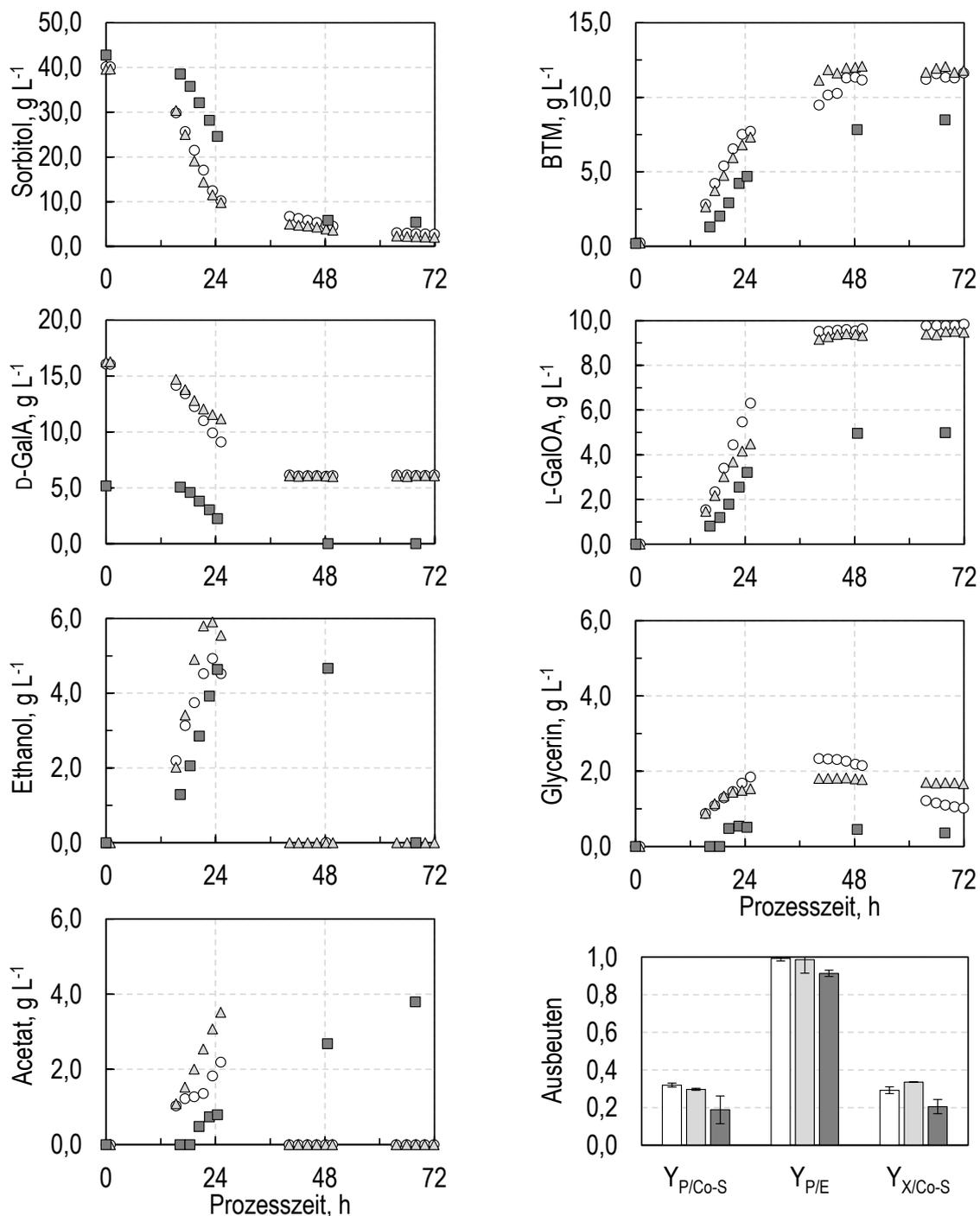


Abbildung 5.14: Vergleichende Satzkultivierung des rekombinanten *S. cerevisiae* Stamms SiHY001 bei unterschiedlichen Medienzusammensetzungen mit 4 % (w/v) Sorbitol und 1,5 % (w/v) D-GalA in kontrollierten Rührkesselbioreaktoren ($T=30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5$, $F_{\text{Luft}} = 0,5 \text{ vvm}$, $V_R = 1,2 \text{ bzw. } 0,6 \text{ L}$, $N_{\text{Start}}=200 \text{ min}^{-1}$). Zwei unterschiedliche Medienzusammensetzungen wurden untersucht: 10x SC und 5x Aminosäuremix (\circ) sowie 10x SC und 10x Aminosäuremix (\triangle). Der Referenzprozess ist 1x SC und 5x Aminosäuremix (\blacksquare). Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Glukose, Biotrockenmasse, sowie von D-GalA, L-GalOA, Ethanol, Glycerin und Acetat über die Prozesszeit. Berechnete Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/Co-S}$ (mol mol^{-1}), $Y_{P/E}$ (mol mol^{-1}) und $Y_{X/Co-S}$ (g g^{-1}).

Eine Erhöhung des Aminosäuremixes auf die doppelte Konzentration zu Standardsatzprozessen (10 x AAmix) führte zu keinem signifikant unterschiedlichen Prozessverlauf (Daten nicht gezeigt). Anders verhielt es sich mit der Hefe-Stickstoffbasis YNB. Mit zehnfach erhöhter Konzentration an YNB wurde eine deutliche erhöhte finale Biomassekonzentration erzielt ($11,14 \pm 0,69 \text{ g L}^{-1}$ im Vergleich zu $7,98 \text{ g L}^{-1}$ mit 1 x YNB) (Abbildung 5.14). Dies resultierte nicht nur in einem erhöhten Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/Co-S}$ von $0,32 \pm 0,01 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1}$ Sorbitol (im Vergleich $0,14 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1}$ Sorbitol), sondern führt auch zu einem höheren Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/Co-S}$ von $0,29 \pm 0,02 \text{ g BTM g}^{-1}$ Sorbitol (im Vergleich $0,18 \text{ g BTM g}^{-1}$ Sorbitol). Wie auch in vorherigen Versuchen mit hoher initialer Sorbitolkonzentration war auch in Prozessen mit erhöhtem Anteil an YNB eine Produktion von Sekundärmetaboliten wie Glycerin, Acetat und Ethanol innerhalb der ersten 24 h zu beobachten. Höchste gemessene Konzentrationen waren für Glycerin $2,38 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$, für Acetat $2,27 \pm 0,10 \text{ g L}^{-1}$ und für Ethanol $4,63 \pm 0,43 \text{ g L}^{-1}$. Sowohl Acetat als auch Ethanol wurden im Prozessverlauf wieder verstoffwechselt, während Glycerin am Prozessende noch mit $0,78 \text{ g L}^{-1}$ im Medium vorlag (Abbildung 5.14). Im Vergleich zum Satzprozess mit zehnfach erhöhter Konzentration an YNB brachte die zusätzliche Erhöhung des Aminosäuremixes auf die doppelte Konzentration zu Standardsatzprozessen (10 x AAmix) keine Verbesserung (Abbildung 5.14) und Ausbeutekoeffizienten waren ähnlich zum Satzprozess mit 10 x YNB ($Y_{P/Co-S}$ von $0,30 \pm 0,01 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1}$ Sorbitol und $Y_{X/Co-S}$ von $0,34 \pm 0,00 \text{ g BTM g}^{-1}$ Sorbitol). Obwohl eine deutliche Verbesserung des Wachstums von *S. cerevisiae* mit zehnfach erhöhtem YNB zu verzeichnen war, konnte die initial eingesetzte D-GalA (15 g L^{-1}) nicht vollständig umgesetzt werden. Nach 48 h waren erst 61 % (entspricht $9,9 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$ L-GalOA) D-GalA umgewandelt und auch hier wurde wieder eine Stagnation des Wachstums beobachtet (Abbildung 5.14). Die verbliebenen $7,8 \text{ g L}^{-1}$ Sorbitol wurden bis zum Ende des Prozesses nach 72 h fast aufgebraucht. Die Selektivitäten $Y_{P/E}$ lagen bei $0,99 \pm 0,01 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1}$ D-GalA (10 x YNB, 5 x AAmix) und $0,99 \pm 0,07 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1}$ D-GalA (10 x YNB, 10 x AAmix). Die Kohlenstoffbilanzen der Satzprozesse konnten bei allen Probenahmezeitpunkten zu mindestens 90 % geschlossen werden (siehe Abbildungen in Abschnitt 9.4 im Anhang).

Diskussion

In allen bisherigen Prozessen wurde die höchste Produktbildung während der exponentiellen Wachstumsphase verzeichnet. Deswegen ist es wünschenswert, diese zu verlängern. Da der verwendete *S. cerevisiae* Stamm Auxotrophien besitzt, war ein erster Schritt die Erhöhung der Aminosäurekonzentrationen im Medium, um eine mögliche

Limitierung zu verhindern (Pronk 2002). Dies führte nicht zu einer höheren Biomassebildung oder verbesserten Biotransformation von D-GalA. Die Erhöhung von Vitaminen, Salzen und Spurenelementen um das Zehnfache resultierte hingegen in einer deutlich erhöhten Biomassekonzentration und dementsprechend höheren Produktkonzentrationen nach 48 h. Da YNB unterschiedlichste Bestandteile beinhaltet, konnte die genaue Ursache für das verbesserte Wachstum nicht identifiziert werden, aber die Beobachtung deckt sich mit anderen Studien, bei denen eine Verbesserung der Biomassebildung festgestellt wurde, sobald alle Konzentrationen des SC-Mediums erhöht wurden (Roberts et al. 2020). Trotzdem stoppte in Satzprozessen mit veränderter Medienkomposition das Wachstum wiederum nach 48 h aus unbekanntem Gründen. Was ausgeschlossen werden kann ist, dass die Auxotrophien des Stammes die Ursache für die Stagnation des Wachstums sind, denn es konnte keine Verbesserung des Wachstums bei Erhöhung der Aminosäurekonzentration im Vergleich zum Standardprozess festgestellt werden.

In allen vorherigen Satzprozessen mit Sorbitol konnte nur bei höheren Sorbitolkonzentrationen (10 % (w/v)) die Bildung von mehr als 1 g L^{-1} Glycerin beobachtet werden. Die doppelt so hohen gebildeten Konzentrationen in Satzprozessen mit veränderter Medienkomposition können nicht allein auf den Crabtree-Effekt zurückzuführen sein (Nevoigt und Stahl 1997). Vermutlich spielt auch die Medienkomposition selbst eine Rolle. Die salzigen Komponenten im Medium (NaCl , CaCl_2 , MgSO_4 und KH_2PO_4) akkumulieren in 10-fach SC-Medium auf 0,142 M. Obwohl die Konzentration der salzigen Bestandteile nicht so hoch ist, wie die in Hefen "milden osmotischen Stress" auslösenden Konzentrationen von 0,4 M NaCl (Babazadeh et al. 2017), könnten sie dennoch hoch genug sein, um die Glycerinproduktion als Stressantwort zu induzieren (Nevoigt und Stahl 1997). Trotzdem ist eine vollständige Umsetzung von D-GalA immer noch nicht möglich aufgrund von unbekanntem beeinflussenden Faktoren, die zu einem Wachstumsstopp in *S. cerevisiae* führen. Gründe für eine Stagnation des Wachstums sind aber vielfältig und betreffen mitunter den Kohlenstoffwechsel, aber auch Stickstoff- und Phosphatverfügbarkeit und -darreichungsform (Boer et al. 2010). Aber auch Limitierung durch andere Supplemente können auftreten, wie es beispielsweise für Ergosterol beschrieben ist (Duc et al. 2017, Haukeli und Lie 1971). Dieses ist Bestandteil der Zellwand und wird für das Wachstum von Hefen benötigt (Jordá und Puig 2020, Shang et al. 2006). Nichtsdestotrotz konnte schon allein durch die Erhöhung der Vitamine und Spurenelemente der gesamte Prozess hinsichtlich Biomasse- und Produktbildung erheblich verbessert werden.

5.3.6 Zusammenführung der Ergebnisse

Alle in vorherigen Experimenten untersuchten Einflussgrößen wurden abschließend kombiniert, um zu prüfen, ob synergistische Effekte im Satzprozess auftreten. Für die biokatalytische Umsetzung der D-GalA wurde der rekombinante *S. cerevisiae* Stamm Si-HY001 verwendet und im Rührkesselreaktor mit verbesserter Medienzusammensetzung (10xSC) bei pH 5 und 30°C mit initialen 1 % (w/v) Sorbitol und 1,2 % (w/v) D-GalA kultiviert. Alle 24 h Prozesszeit wurden ca. 10 g L⁻¹ Sorbitol zusammen mit 10xSC-Mediumszusätzen, sowie nach 48 h zusätzlich 5 g L⁻¹ D-GalA zum Prozess gegeben. Durch die Nachdosierung sollte einerseits zu hohe Bildung von fermentativen Nebenprodukten, zum anderen Limitierungen der Zellen durch Kohlenstoffquelle und Medienbestandteile wie Vitamine bzw. Spurenelemente vermieden werden. Die zusätzliche D-GalA-Zugabe nach 48 h sollte außerdem eine Eduktlimitierung der Biotransformation verhindern.

Wie auch in vorherigen Prozessen war das Wachstum der Hefezellen um ca. 8 h verzögert (Abbildung 5.15). Nach Zugaben von Sorbitol konnte kontinuierliches Wachstum festgestellt werden. Die Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/Co-S}$ nach Sorbitolzugabe waren allerdings deutlich niedriger als zu Beginn des Prozesses. Mit 0,34 g BTM g⁻¹ Sorbitol (erste Sorbitolzugabe) und 0,37 g BTM g⁻¹ Sorbitol (zweite Sorbitolzugabe) lagen sie um fast 50 % niedriger als in den ersten 24 h Prozesszeit (0,68 g BTM g⁻¹ Sorbitol). Gleiches galt für den Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/Co-S}$. Auch dieser war zu Beginn des Prozesses mit 0,40 mol L-GalOA mol⁻¹ Sorbitol fast doppelt so hoch wie in den folgenden Prozessabschnitten mit 0,26 mol L-GalOA mol⁻¹ Sorbitol (erste Sorbitolzugabe) und 0,21 mol L-GalOA mol⁻¹ Sorbitol (zweite Sorbitolzugabe) (Tabelle 5.4).

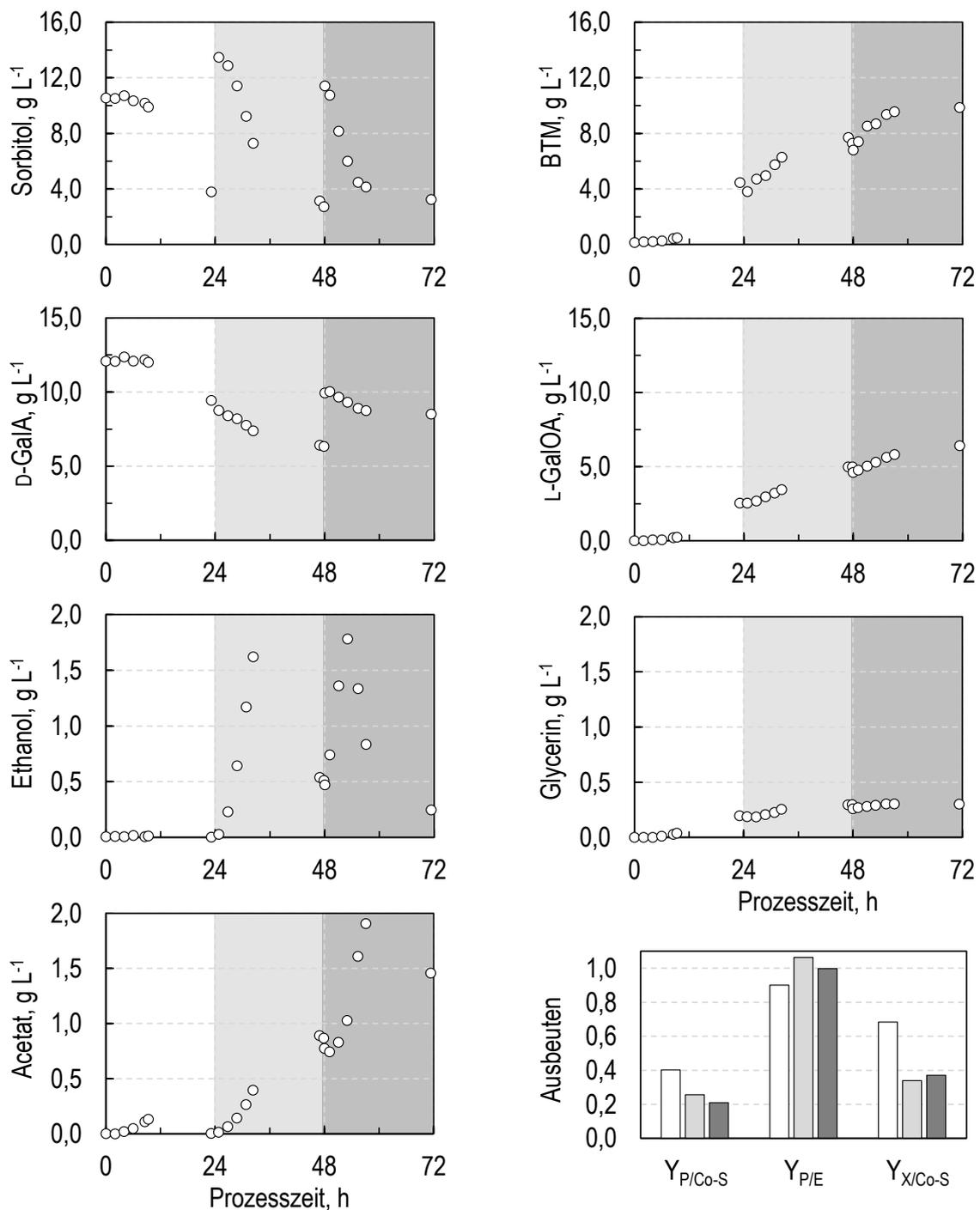


Abbildung 5.15: Satzprozess mit Kombination von Einflussgrößen für die Biotransformation von D-GalA mit *S. cerevisiae* SiHY001 im kontrollierten Rührkesselreaktor ($T=30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5$, $F_{\text{Luft}} = 0,5 \text{ vvm}$, $V_{\text{R}} = 1,2 \text{ L}$, $N_{\text{Start}}=200 \text{ min}^{-1}$). Insgesamt erfolgten zwei Mediumszugaben, welche in hellgrau und grau hinterlegt sind. Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Glukose, Bio-trockenmasse, sowie von D-GalA, L-GalOA, Ethanol, Glycerin und Acetat über die Prozesszeit. Berechnete Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/Co-S}$ (mol mol^{-1}), $Y_{P/E}$ (mol mol^{-1}) und $Y_{X/Co-S}$ (g g^{-1}).

Tabelle 5.4: Berechnete Ausbeutekoeffizienten von *S. cerevisiae* SiHY001 bei unterschiedlichen Einflussgrößen in Satzprozessen mit SC-Medium ($Y_{P/Co-S}$, $Y_{P/E}$ (mol mol^{-1}) und $Y_{X/Co-S}$ (g g^{-1})).

	$Y_{P/Co-S}$, mol mol^{-1}	$Y_{P/E}$, mol mol^{-1}	$Y_{X/Co-S}$, g g^{-1}
initial	0,40	0,90	0,68
erste Sorbitolzugabe	0,26	1,06	0,34
zweite Sorbitolzugabe	0,21	1,00	0,37

Trotzdem konnte eine finale Produktkonzentration von $6,41 \text{ g L}^{-1}$ nach 72 h Prozesszeit gemessen werden (Abbildung 5.15), was einer Raum-Zeit-Ausbeute von $0,09 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und Umsetzung von 41 % der eingesetzten D-GalA entspricht. In allen drei Phasen des Prozesses konnte zusätzlich Nebenproduktbildung beobachtet werden, allerdings nie mehr als 2 g L^{-1} . Ethanol wurde innerhalb der 24-Stundenabschnitte wieder fast vollständig verstoffwechselt, während Acetat und Glycerin sukzessive über die Prozesszeit akkumulierten (Abbildung 5.15). Höchste Konzentrationen von $0,3 \text{ g L}^{-1}$ Glycerin und $1,78 \text{ g L}^{-1}$ Acetat wurden nach der zweiten Sorbitolzugabe gemessen. Die Kohlenstoffbilanz des Satzprozesses mit intermittierender Zugabe konnte bei allen Probenahmezeitpunkten zu mindestens 90 % geschlossen werden (Abbildung 5.16)

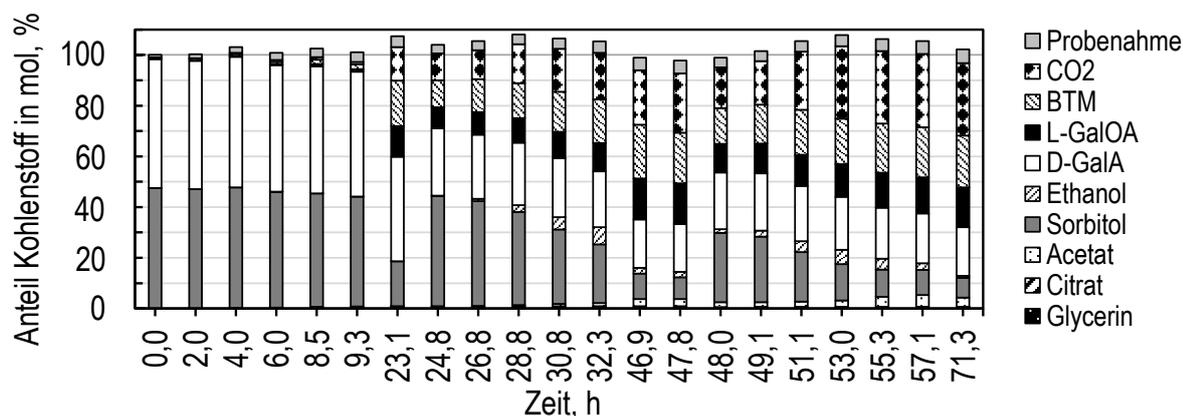


Abbildung 5.16: Kohlenstoffbilanz der einzelnen Probenahmezeitpunkte der Satzkultivierung von *S. cerevisiae* SiHY001 mit intermittierender Sorbitol- und D-GalA-Zugabe mit einer Kombination von Ergebnissen im kontrollierten Rührkesselbioreaktor. Die Balken stellen die Anteile an Gesamtkohlenstoff dar, die im Prozessverlauf zu den gegebenen Probenahmezeitpunkten in Form der jeweiligen Komponenten vorlagen. Die Bilanz konnte zu über 90 % geschlossen werden.

Diskussion

Die in vorherigen Experimenten ermittelten, positiv auf die Biotransformationsfähigkeit des rekombinanten *S. cerevisiae* Stammes wirkenden Einflussgrößen, führten auch in Kombination zu einer Verbesserung des Prozesses im Vergleich zum ursprünglichen Standardprozess (Abschnitt 5.3.1). Die Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/Co-S}$ und $Y_{X/Co-S}$ waren durch die zusätzliche Nachdosierung der Spurenelemente und Vitamine des Bestandteils YNB etwas höher als im vorherigen Satzprozess mit intermittierender Sorbitolzugabe (Abschnitt 5.3.4). Wie auch in diesem Satzprozess konnte eine deutlich verringerte Nebenproduktbildung erzielt werden im Vergleich zu vorherigen Prozessen mit hoher initialer Sorbitolkonzentration. Trotz Metabolisierung der fermentativen Nebenprodukte Ethanol und Acetat kommt es vor allem bei Acetat zu einer Akkumulation zum Prozessende. Ein Lösungsansatz für dieses Problem wäre, die von der vorliegenden Sorbitolkonzentration abhängige Nebenproduktbildung durch Etablierung eines Zulaufverfahrens zu minimieren (Weuster-Botz und Takors 2018, Kapitel 3).

5.4 Biotransformationen mit Hydrolysat aus Zuckerrübenschnitzeln

5.4.1 Voruntersuchungen mit Glukose und Sorbitol als Co-Substrate

Bereitgestelltes Hydrolysat aus Zuckerrübenschnitzeln enthielt neben geringen Mengen an Xylose, Mannose, Galaktose auch Arabinose, größere Menge an Glukose und D-GalA. Xylose, Mannose und Galaktose konnten mit der Analytik nicht getrennt werden, beliefen sich aber in Summe auf $5,1 \text{ g L}^{-1}$. D-GalA war mit $7,2 \text{ g L}^{-1}$ nach Arabinose (13 g L^{-1}) und Glukose ($13,5 \text{ g L}^{-1}$) der dritthäufigste Zucker im bereitgestellten Zuckerrübenschnitzelhydrolysat.

S. cerevisiae kann keine Arabinose verstoffwechseln. Sinnvoll ist aber zunächst die im Hydrolysat befindliche Glukose von der Hefe zur Biomassebildung nutzen zu lassen, bevor die Umwandlung von D-GalA zu L-GalOA mit Sorbitol erfolgt. Diese Prozessführung wurde zunächst mit dem rekombinanten *S. cerevisiae* Stamm SiHY027 im Rührkesselreaktor als Satzprozess mit 0,6 % (w/v) Glukose, 0,5 % (w/v) Sorbitol und 0,5 % (w/v) D-GalA in SC-Medium untersucht (Abbildung 5.17).

Nach anfänglicher Verzögerungsphase war die eingesetzte Glukose bereits nach 36 h vollständig verbraucht und diente zum Aufbau von insgesamt $0,94 \text{ g L}^{-1}$ Biokatalysator. Bis 30 h Prozesszeit stieg auch die Konzentration an CO_2 im Abgas stark an bis auf einen maximalen Wert von 0,35 % (Abbildung 5.17, gestrichelte Linie). Gleichzeitig sank die Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium. In den ersten 48 h Prozesszeit wurden außerdem $2,2 \text{ g L}^{-1}$ Ethanol und $0,47 \text{ g L}^{-1}$ Glycerin produziert. Bereits ab 36 h Prozesszeit sank die Konzentration an Ethanol auf $1,4 \text{ g L}^{-1}$ nach 72 h Prozesszeit. Ab 30 h Prozesszeit sank die Konzentration an CO_2 im Abgas stark ab und bis 72 h Prozesszeit konnte auch kein weiterer Aufbau von Biomasse beobachtet werden. Erst ab 110 h Prozesszeit konnte wieder Stoffwechselaktivität durch steigende Konzentrationen an CO_2 im Abgas und sinkende Gelöstsauerstoffkonzentration beobachtet werden (Abbildung 5.17).

5 Ergebnisse und Diskussion

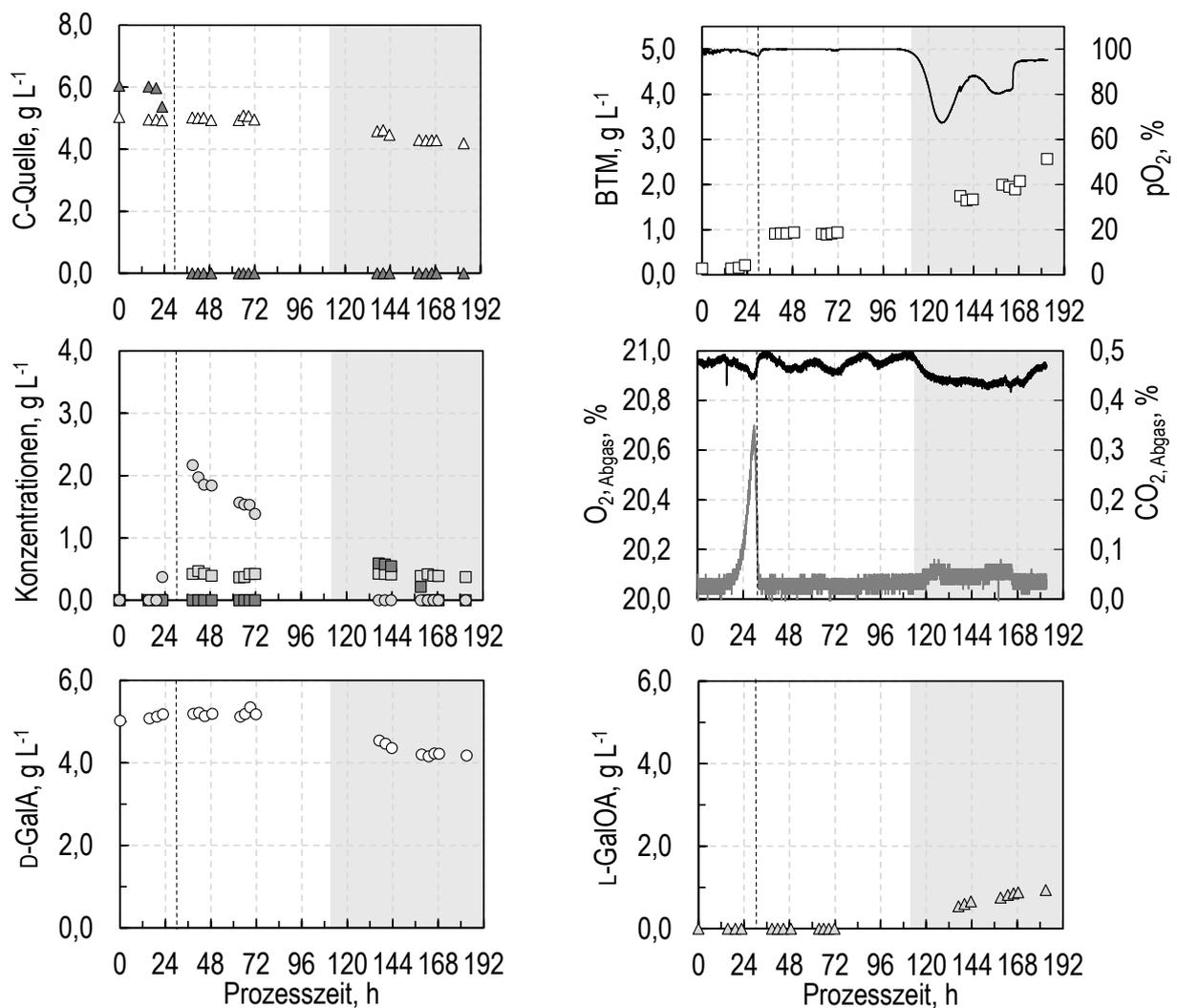


Abbildung 5.17: Satzkultivierung des rekombinanten *S. cerevisiae* Stammes SiHY027 auf 0,6 % (w/v) Glukose, 0,5 % (w/v) Sorbitol und 0,5 % (w/v) D-GalA in SC-Medium im kontrollierten Rührkesselbioreaktor ($T=30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5$, $F_{\text{Luft}} = 0,5 \text{ vvm}$, $V_{\text{R}} = 1,2 \text{ L}$, $N_{\text{Start}} = 200 \text{ min}^{-1}$). Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Glukose (\blacktriangle), Sorbitol (\triangle), Biotrockenmasse (\square), D-GalA (\circ), L-GalOA (\triangle), Ethanol (\circ), Glycerin (\square) und Acetat (\blacksquare), sowie des Gelöstsauerstoff (—) und der Konzentrationen von O_2 (schwarz) und CO_2 (grau) im Abgas über die Prozesszeit. Nach 30 h Prozesszeit wurde die höchste CO_2 -Konzentration im Abgas gemessen (---). Ab 110 h Prozesszeit sank die Gelöstsauerstoff- und O_2 -Konzentration im Abgas und die CO_2 -Konzentration im Abgas stieg an (grau hinterlegt).

Auch die Biotrockenmasse lag bei 140 h Prozesszeit bei $1,65 \text{ g L}^{-1}$ und es konnte Wachstum weiter steigender Biomasse im Medium beobachtet werden (Abbildung 5.17). Ebenso sank die Sorbitolkonzentration im Medium mit Wachstum der Hefezellen (Abbil-

dung 5.17). Bei Wachstum mit Sorbitol wurde auch L-GalOA gebildet. Bis Prozessende konnten finale Konzentrationen von $0,93 \text{ g L}^{-1}$ L-GalOA produziert werden, was 19 % Umsatz der eingesetzten D-GalA entspricht. Der berechnete Ausbeutekoeffizient $Y_{P/Co-S}$ lag bei $1,24 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1}$ Sorbitol. Mit Sorbitol konnte keine Bildung von Ethanol beobachtet werden, es wurden aber geringe Mengen an Acetat gebildet ($0,59 \text{ g L}^{-1}$ nach 140 h Prozesszeit). Dieses wurde bis zum Prozessende bei 183 h wieder verbraucht. Die Glycerinkonzentration lag bis Prozessende nach 183 h bei $0,43 \text{ g L}^{-1}$. Der Ausbeutekoeffizient $Y_{X/Co-S}$ lag mit $1,6 \text{ g BTM g}^{-1}$ Sorbitol um mehr als das zehnfache höher als mit Glukose ($0,13 \text{ g BTM g}^{-1}$ Glukose). Die Kohlenstoffbilanz des Satzprozesses konnte bei allen Probenahmezeitpunkten zu mindestens 90 % geschlossen werden (Abbildung 5.18)

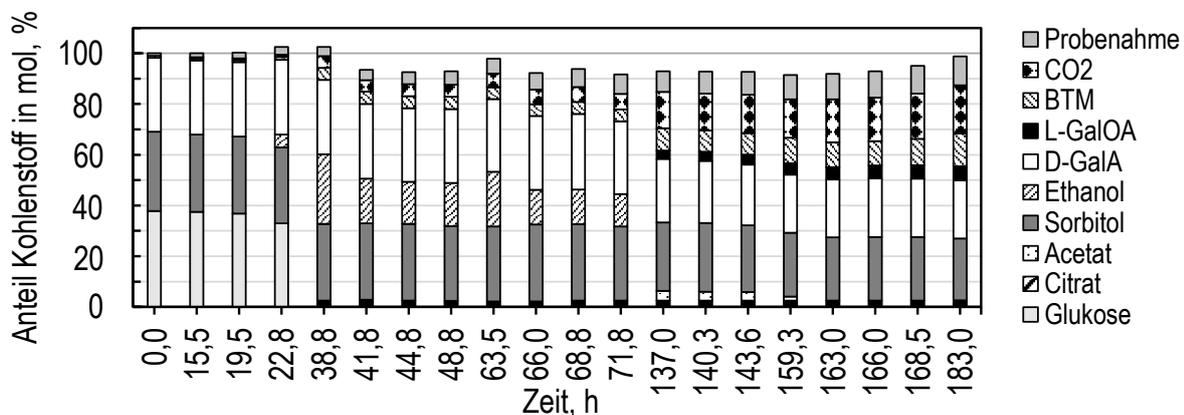


Abbildung 5.18: Kohlenstoffbilanz der einzelnen Probenahmezeitpunkte der Satzkultivierung von *S. cerevisiae* SiHY027 mit 0,6 % (w/v) Glukose, 0,5 % (w/v) Sorbitol und 0,5 % (w/v) D-GalA im kontrollierten Rührkesselbioreaktor. Die Balken stellen die Anteile an Gesamtkohlenstoff dar, die im Prozessverlauf zu den gegebenen Probenahme-Zeitpunkten in Form der jeweiligen Komponenten vorlagen. Die Bilanz konnte zu über 90 % geschlossen werden.

Diskussion

Wie erwartet wurde Glukose auch von *S. cerevisiae* als favorisierte Kohlenstoffquelle (Abbildung 5.17) und zum Biomasseaufbau genutzt (Barnett 1976, Flores et al. 2000). Wie auch in vorherigen Experimenten war eine Verzögerungsphase im Wachstum zu erkennen, die durch die im Medium vorhandene D-GalA bedingt wurde (Abschnitt 5.2.2). Nach 30 h fand wenig Stoffwechselaktivität von *S. cerevisiae* bis 110 h Prozesszeit statt, erkennbar an niedrigen CO_2 -Konzentrationen im Abgas und eine Gelöstsauerstoffkon-

zentration im Medium von fast 100 %. Gleichzeitig wurde Ethanol langsam abgebaut, was in der Literatur als diauxisches Wachstum der Hefezellen beschrieben ist (De Deken 1966, Lemoigne et al. 1954). Erst danach erfolgt Wachstum der Hefezellen mit Sorbitol (Abbildung 5.17).

Zwar exprimiert der rekombinante *S. cerevisiae* Stamm sowohl den Sorbitol-Transporter Hxt13 als auch die Sorbitoldehydrogenase YISdr mit glykolytisch aktiven Promotern, die Verstoffwechslung von Sorbitol als Substrat war jedoch langsam und wurde schon in anderen Studien beobachtet (Jordan et al. 2016). Es ist bekannt, dass der Wechsel bei *S. cerevisiae* von der präferierten Kohlenstoffquelle Glukose zu einer weniger präferierten, wie beispielsweise Galaktose, langsam ist (Perez-Samper et al. 2018). Hierbei spielen physiologische und molekulare Anpassung wie die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege und transkriptionelle Veränderungen zur Hochregulierung von Proteinen eine Rolle (Hamill et al. 2020). Auch die Repression des respiratorischen Metabolismus durch Glukose, kurz der Crabtree-Effekt, könnte eine Ursache für die langsame Verstoffwechslung von Sorbitol in *S. cerevisiae* sein. Denn Transkriptom-Analysen in *S. cerevisiae* zeigten, dass für eine effiziente Beendigung der Glukose-induzierten Verzögerungsphase die Aktivierung von Genen des respirativen Stoffwechselwegs nötig ist (Vermeersch et al. 2019).

5.4.2 Untersuchungen zu Inhibierung von Hydrolysatbestandteilen

Zunächst stand ein Hydrolysat mit 100 mM Natriumacetatpuffer zur Verfügung. Allerdings zeigte ein erster Vorversuch mit diesem Hydrolysat in Schüttelkolben kein bis kaum Wachstum von rekombinanten *S. cerevisiae* und keine Biotransformation von D-GalA. Da Essigsäure ein bekannter Inhibitor für *S. cerevisiae* ist, wurde in parallelen miniaturisierten Rührkesselreaktoren zum einen überprüft, ob und ab welcher Konzentration von Essigsäure eine Inhibition des Wachstums erfolgte. Außerdem wurden unterschiedliche Pufferbestandteile hinsichtlich ihrer inhibierenden Wirkung auf *S. cerevisiae* untersucht.

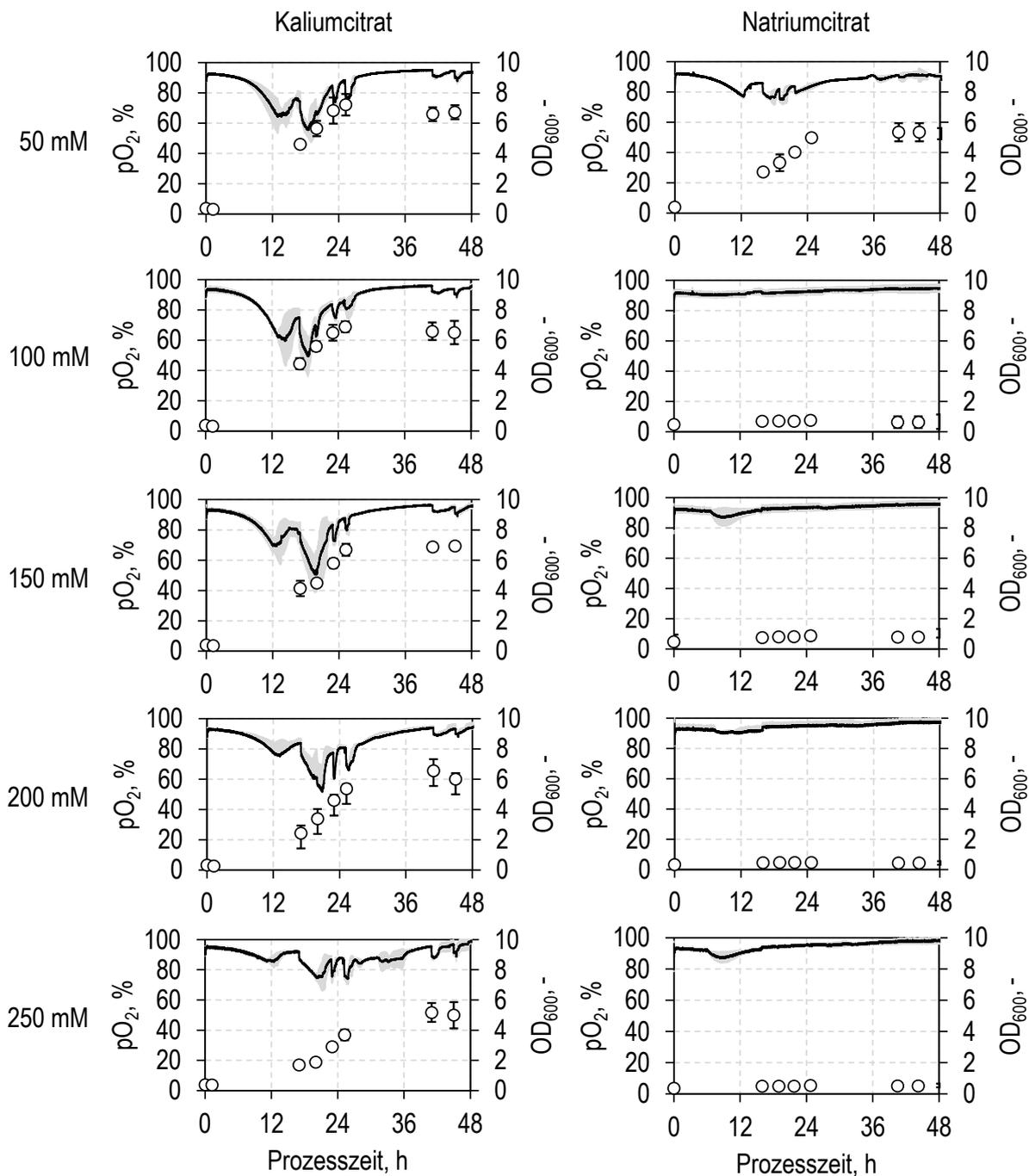


Abbildung 5.19: Vergleichende Satzkultivierung des rekombinanten *S. cerevisiae* Stamms SiHY001 mit unterschiedlichen Konzentrationen von Kaliumcitrat und Natriumcitrat in SC-Medium mit 1 % (w/v) Sorbitol in kontrollierten miniaturisierten Rührkesselbioreaktoren ($T_{\text{Block}}=30^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{Kopfraum}}=20^{\circ}\text{C}$, pH 5, $F_{\text{Luft}} = 0,1 \text{ L min}^{-1} \text{ Reaktor}^{-1}$, $V_{\text{R}}= 10 \text{ mL}$, $N=2000 \text{ min}^{-1}$). Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von optischer Dichte OD_{600} (\circ) und Gelöstsauerstoff. Standardabweichungen von drei Experimenten sind in grau (pO_2) bzw. schwarz (BTM) dargestellt.

5 Ergebnisse und Diskussion

Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen an Natriumacetat, -citrat, Kaliumacetat und -citrat zwischen 50 - 250 mM in miniaturisierten Rührkesselreaktoren eingesetzt. Die Satzprozesse wurden mit *S. cerevisiae* SiHY001 mit 1 % (w/v) Sorbitol 0,5 % (w/v) D-GalA bei pH 5 in SC-Medium durchgeführt. In allen Versuchen mit Acetat als Pufferbestandteil konnte kein Wachstum beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Citrat hatte keinen Einfluss auf das Wachstum von *S. cerevisiae*, vielmehr wurden ab Konzentrationen von 200 mM Kaliumcitrat etwas höhere Wachstumsraten zwischen 17 - 25 h Prozesszeit festgestellt (Abbildung 5.20). Die erreichten OD₆₀₀-Werte nach 48 h Prozesszeit waren mit allen Kaliumcitratkonzentrationen ähnlich hoch (Abbildung 5.19). Auch der Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration ähnelte sich in allen Satzprozessen mit Kaliumcitrat (Abbildung 5.19). Mit Natrium als weiterem Pufferbestandteil konnte bereits ab 100 mM deutlich schlechteres Wachstum im Vergleich zu 50 mM Natriumcitrat bzw. allen anderen Kaliumcitratkonzentrationen beobachtet werden (Abbildung 5.19). Auch die erreichten OD₆₀₀-Werte waren niedrig und es wurde bis 48 h Prozesszeit kaum Veränderung der Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium festgestellt.

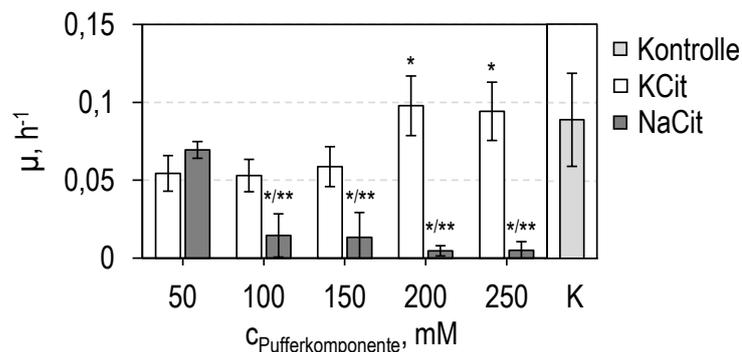


Abbildung 5.20: Einfluss von Pufferbestandteilen des Hydrolysats auf das Wachstum von *S. cerevisiae* zwischen 17 - 25 h Prozesszeit. KCit = Kaliumcitrat, NaCit = Natriumcitrat. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle K (**) bzw. 50 mM Pufferkomponente (*) wurden mit einem Student-t-Test für zwei unabhängige Stichproben mit einem Signifikanz-Niveau von 5 % festgestellt.

Diskussion

Um den pH bei der Hydrolyse von Agrarreststoffen mit Pektinasen konstant zu halten, werden Puffer eingesetzt (Kashyap et al. 2001).

Zur Verfügung stehendes Hydrolysat aus Zuckerrübenschnitzeln zur enzymatischen

Freisetzung von D-GalA war mit 100 mM Natriumacetat gepuffert (Schäfer et al. 2020) und die hohe Acetatkonzentration führte zur Inhibition des Wachstums von rekombinanten *S. cerevisiae*. Grund dafür ist, dass Essigsäure intrazellulär akkumuliert und inhibierend wirkt, was letztendlich zu reduziertem Zellwachstum und Wachstumsstopp führt (Mira et al. 2010, Sousa et al. 2012). Die Akkumulation ist eine Folge der Diffusion von Essigsäure über die Zytoplasmamembran bei pH 5, denn der höhere intrazelluläre pH im Vergleich zum Medium bewirkt die Dissoziation in Acetat und H_3O^+ (Pampulha und Loureiro-Dias 1989).

Im Gegensatz dazu hat Zitronensäure bzw. Citrat keinen Einfluss auf das Wachstum bei pH 5. Zwar kann Citrat bei höheren pHs wachstumsinhibierend sein, da es als Chelator Kationen bindet (Nielsen und Arneborg 2007). Dieser Effekt wurde allerdings nicht bei den hier untersuchten Prozessbedingungen festgestellt (Abbildung 5.20). Natrium scheint hingegen einen negativen Effekt auf das Wachstum von *S. cerevisiae* zu haben. Bereits ab Konzentration von 100 mM sind deutlich niedrigere Wachstumsraten zu beobachten. Dieser Effekt wird durch hohe extrazelluläre Konzentrationen an Natriumionen verursacht, die die osmotische Regulation der Zelle stören und durch den für *S. cerevisiae* resultierenden Stress das Wachstum beeinflussen (Ariño et al. 2010, Hohmann 2002). Für weitere Prozesse mit Hydrolysat wurde deswegen Kaliumcitrat als Puffer für die Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln gewählt.

5.4.3 Biotransformation mit geklärtem Zuckerrübenschnitzelhydrolysat

Nachdem Kaliumcitrat als geeigneter Puffer für die Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln identifiziert wurde, wurden Biotransformationen mit 100 mM KaCit-gepufferten hydrolysierten Zuckerrübenschnitzeln und dem rekombinanten *S. cerevisiae* Stamm Si-HY001 in Rührkesselreaktoren durchgeführt.

Die initialen Zuckerkonzentrationen im SC-Reaktionsmedium mit Hydrolysat (Tabelle 4.3) wurden mittels HPLC bestimmt (Abbildung 5.21). Zusätzlich zu den im Hydrolysat befindlichen $5,0 \text{ g L}^{-1}$ D-GalA, $9,4 \text{ g L}^{-1}$ Glukose, $13,9 \text{ g L}^{-1}$ Arabinose und $3,2 \text{ g L}^{-1}$ Xylose/Mannose/Galaktose wurde 40 g L^{-1} Sorbitol eingesetzt.

Satzprozesse mit Hydrolysat und 4 % (w/v) Sorbitol unterschieden sich wenig von Satzprozessen mit Minimalmedium (Abschnitt 5.3.3). Auch mit Hydrolysat wurde eine Wachs-

tumsverzögerung von fast 12 h beobachtet. Es wurden finale Biomassekonzentrationen von $7,9 \text{ g L}^{-1}$ nach 48 h erreicht und danach kein signifikantes Wachstum mit den verbliebenen $3,0 \text{ g L}^{-1}$ Sorbitol beobachtet (Abbildung 5.22). Auch in Satzprozessen mit Zuckerrübenschnitzelhydrolysat konnte eine vollständige Umwandlung von D-GalA mit einer spezifischen Produktausbeute von $0,94 \pm 0,04 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1} \text{ D-GalA}$ erreicht werden. Der Ausbeutekoeffizient $Y_{P/Co-S}$ lag mit $0,16 \pm 0,01 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1} \text{ Sorbitol}$ um 14 % höher als in SC-Medium ($0,14 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1} \text{ Sorbitol}$, Abschnitt 5.3.3). Ab Prozessbeginn bis 48 h Prozesszeit wurde das initial im Hydrolysat befindliche Acetat (1 g L^{-1}) vollständig verstoffwechselt. Auch das über die Prozesszeit bis ca. 36 h akkumulierende Ethanol ($3,71 \pm 0,14 \text{ g L}^{-1}$) wurde im Prozessverlauf wieder verbraucht. Glycerin hingegen wurde ab 12 h kontinuierlich aufgebaut und akkumulierte bis zum Prozessende nach 72 h zu einer finalen Konzentration von $6,69 \pm 1,17 \text{ g L}^{-1}$, 14 mal so viel, wie in Satzprozessen in definiertem Medium. Die Konzentrationen der anderen im Hydrolysat befindlichen Zucker (Arabinose, Xylose, Mannose, Galaktose, Fruktose und Glukose) blieben über die Prozesszeit nahezu konstant (Daten nicht dargestellt).

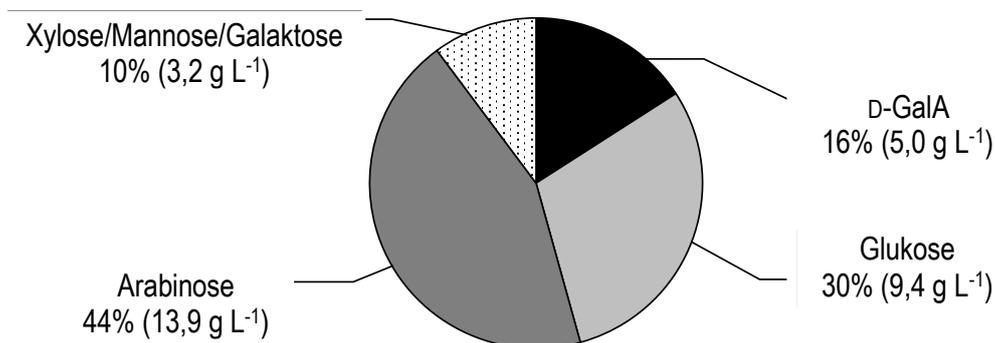


Abbildung 5.21: Prozentuale Zusammensetzung des Hydrolysats einer vorherigen enzymatischen Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln mit Pektinasen aus *A. niger* (Schäfer et al. 2020).

Diskussion

Bisher wurde Zuckerrübenschnitzelhydrolysat noch nicht für die Biotransformation von D-GalA zu L-GalOA durch rekombinante *S. cerevisiae* genutzt. Die meisten Studien zur Nutzung von pektinreichen Agrarreststoffen, wie beispielsweise Zuckerrübenschnitzel oder Zitruschalen, hatten hauptsächlich die Produktion von Bioethanol zum Ziel (Edwards und Doran-Peterson 2012, Martins et al. 2020).

5.4 Biotransformationen mit Hydrolysat aus Zuckerrübenschnitzeln

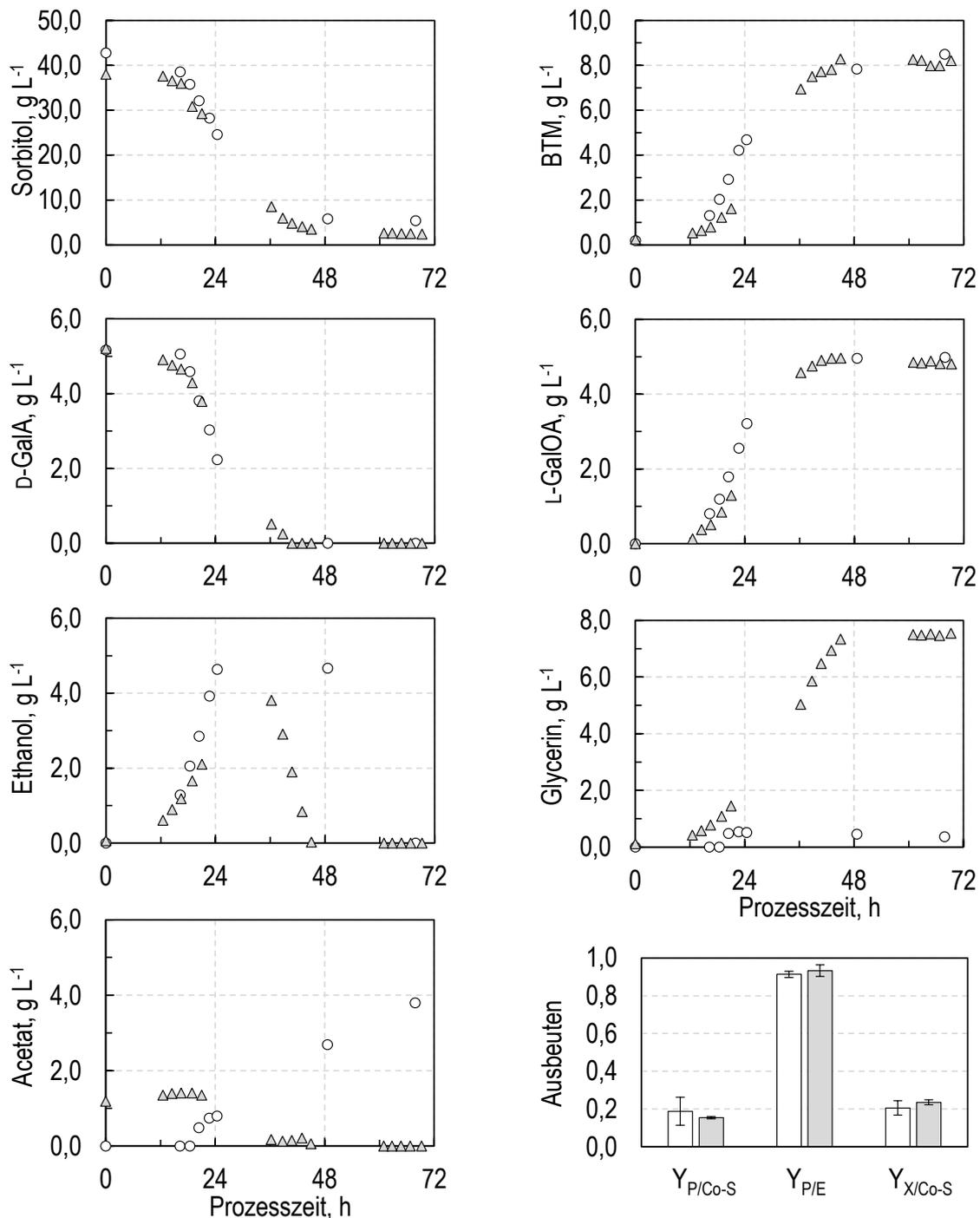


Abbildung 5.22: Vergleichende Satzkultivierung des rekombinanten *S. cerevisiae* Stamms SiHY001 mit Zuckerrübenschnitzelhydrolysat (Δ) bzw. in SC-Medium (\circ) mit 4 % (w/v) Sorbitol in kontrollierten Rührkesselbioreaktoren ($T=30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5$, $F_{\text{Luft}} = 0,5 \text{ vvm}$, $V_{\text{R}} = 1,2$ bzw. $0,6 \text{ L}$, $N_{\text{Start}}=200 \text{ min}^{-1}$). Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Sorbitol, Biotrockenmasse, sowie von D-GalA, L-GalOA, Ethanol, Glycerin und Acetat über die Prozesszeit. Berechnete Ausbeutekoeffizienten $Y_{\text{P/Co-S}}$ (mol mol^{-1}), $Y_{\text{P/E}}$ (mol mol^{-1}) und $Y_{\text{X/Co-S}}$ (g g^{-1}).

Andere Studien wiederum beschäftigten sich mit einer ganzheitlichen Nutzung von Pektin-Bestandteilen zum Biomasseaufbau oder zur Produktion anderer Moleküle (Huisjes et al. 2012, Jeong et al. 2020, Protzko et al. 2018, Yang et al. 2020).

Die Reduktion von D-GalA aus Hydrolysat zur Produktion von L-GalOA konnte mit dem Sorbitol-gekoppelten Reaktionssystem des rekombinanten *S. cerevisiae* Stammes Si-HY001 erstmals erfolgreich gezeigt werden. Dabei zeigte der Stamm kaum Unterschiede im Prozessverlauf verglichen mit Prozessen in definiertem Medium. Nur eine erhöhte Produktion von Glycerin wurde mit Hydrolysat als Substrat beobachtet. Dies kann nicht allein auf die Bildung von Glycerin als "NADH-Auffangbecken" während des fermentativen Wachstums infolge des Crabtree-Effekts zurückgeführt werden (Nevoigt und Stahl 1997). Vielmehr sind diese hohen Konzentrationen auf Komponenten des Hydrolysats zurückzuführen (Nielsen und Arneborg 2007, Scanes et al. 1998). Zum einen kommt es zu einer Hochregulierung von Proteinen der Glycerinbiosynthese als Stressantwort von *S. cerevisiae* auf Zitronensäure (Lawrence et al. 2004, Nielsen und Arneborg 2007). Auch ein hoher Anteil an im Hydrolysat vorhanden Proteinen aus Agrarreststoffen, wie von Edwards und Doran-Peterson (2012) beschrieben, könnte als alternative Stickstoffquelle für *S. cerevisiae* fungieren, die die Glycerinbildung induziert (Scanes et al. 1998).

Keinen Einfluss auf das Prozessverhalten des rekombinanten Stammes haben die verbleibenden 26,5 g L⁻¹ Zucker im Medium, da der Stamm durch die Deletion relevanter Hexosetransporter nicht in der Lage ist, diese aufzunehmen (Wieczorke et al. 1999). Insgesamt unterscheidet sich das Prozessverhalten des rekombinanten *S. cerevisiae* Stammes, bis auf die erhöhte Glycerinbildung, bei der Verwendung von Zuckerrübenschnitzelhydrolysat nicht vom Referenzprozess.

5.4.4 Biotransformation mit ungeklärtem Zuckerrübenschnitzelhydrolysat

Nach Kombination von Pektinaseherstellung mit *A. niger* aus Zuckerrübenschnitzeln und Hydrolyse bei 50°C wurden dem nicht geklärten Hydrolysat Sorbitol als Co-Substrat und Medienzusätze, wie unter Abschnitt 4.2.3 erläutert, zugegeben. Es wurden niedrige initiale Sorbitolkonzentrationen von 6 g L⁻¹ eingesetzt, um die Bildung fermentativer Nebenprodukte, wie unter Abschnitt 5.3.6 beschrieben, zu reduzieren. Im ungeklärten Hydrolysat lagen zu Prozessbeginn 4,1 g L⁻¹ Glycerin, 6,1 g L⁻¹ Glukose, 13,5 g L⁻¹ Ara-

binose, $3,2 \text{ g L}^{-1}$ eines Gemischs von Xylose, Mannose, Galaktose und Fruktose, sowie $1,4 \text{ g L}^{-1}$ Citrat, $0,4 \text{ g L}^{-1}$ Acetat und $10,3 \text{ g L}^{-1}$ D-GalA vor.

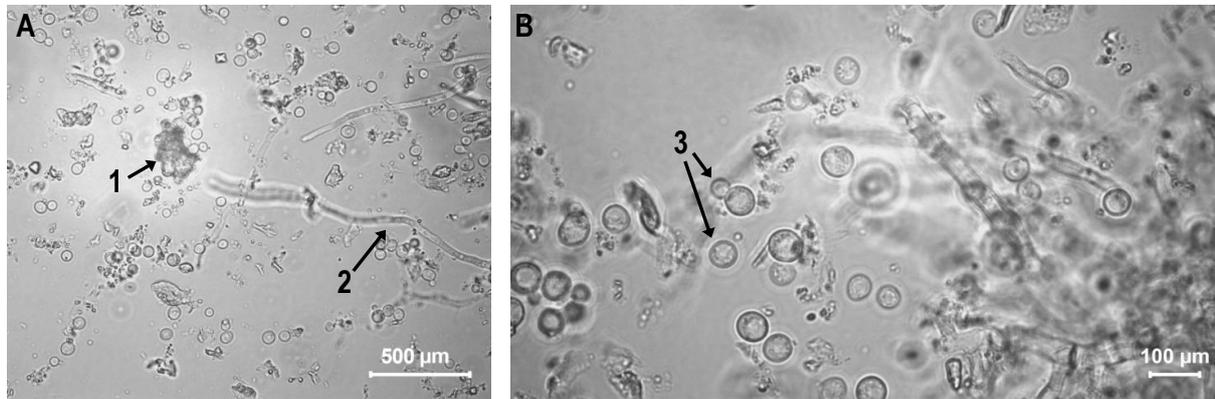


Abbildung 5.23: Lichtmikroskopische Vergrößerungen ((A) 40-fach und (B) 100-fach) der vorletzten Probe der Ganzzellbiotransformation nicht geklärtem Zuckerrübenschnitzelhydrolysat mit rekombinanten *S. cerevisiae*. Feststoffe des Zuckerrübenschnitzelhydrolyсата (1) und filamentöse Biomasse von *A. niger* (2), sowie Hefezellen (3).

Zusätzlich lagen im Medium nicht quantifizierte Feststoffe des Zuckerrübenschnitzelhydrolyсата und filamentöse Biomasse von *A. niger* vor. Das bedingte, dass die optische Dichte bzw. Biotrockenmassekonzentration der Hefezellen in Biotransformation mit ungeklärtem Hydrolysat nicht bestimmt werden konnte (siehe Abbildung 5.23).

Die Biotransformation startete mit Zugabe der Inokulation des Rührkesselreaktors mit *S. cerevisiae* SiHY001.

Bis zum Einstellen der Prozessparameter für die Biotransformation, also vor Inokulation des Rührkesselreaktors mit *S. cerevisiae* SiHY001, war keine Veränderung der Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Ab Inokulation und bis zu einer Prozesszeit von 11 h konnte Stoffwechselaktivität der Hefezellen durch ein Absinken der Konzentration des Gelöstsauerstoff im Medium bis auf 50 % Luftsättigung, sowie die Abnahme der O_2 -Konzentration im Abgas beobachtet werden (Abbildung 5.24). Gleichzeitig stieg die Konzentration von CO_2 im Abgas an und erreichte bei 11 h Prozesszeit ein Maximum.

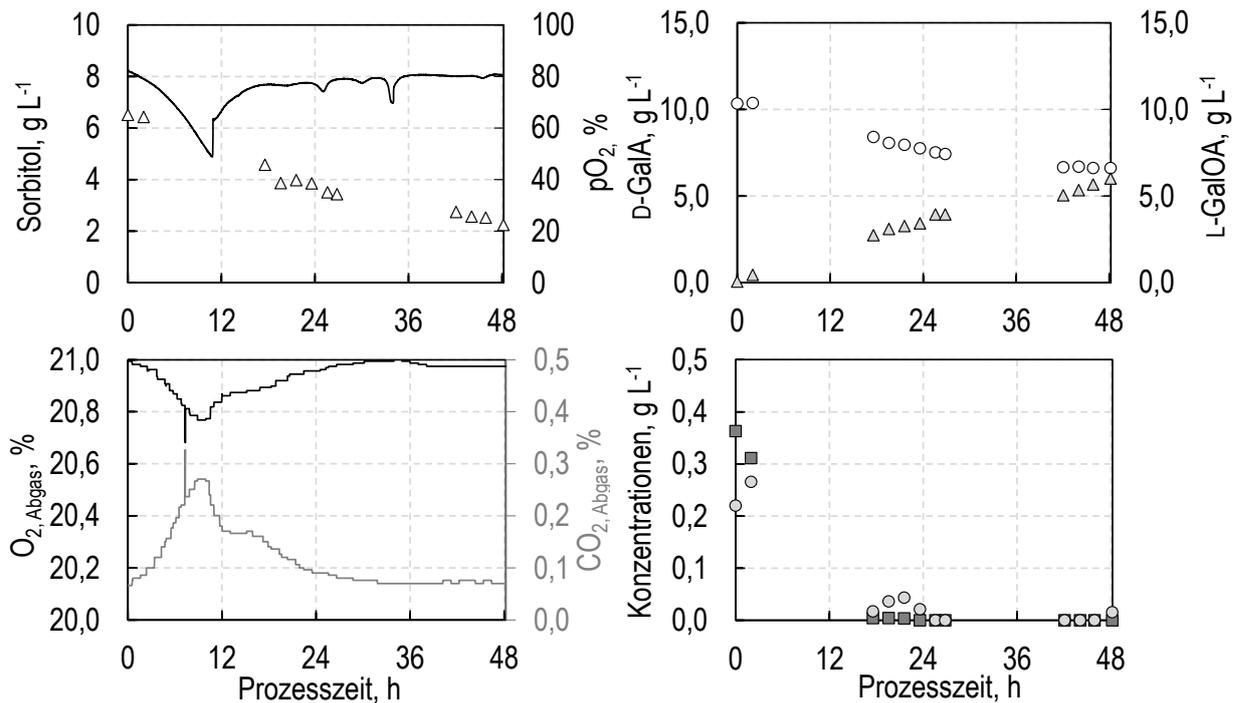


Abbildung 5.24: Prozessdaten der Ganzzellbiotransformation mit *S. cerevisiae* SiHY001 mit ungeklärtem Zuckerrübenschnitzelhydrolysat im kontrollierten Rührkesselreaktor ($T=30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5$, $F_{\text{Luft}} = 0,5 \text{ vvm}$, $V_{\text{R}} = 4,2 \text{ L}$, $N_{\text{Start}} = 600 \text{ min}^{-1}$). Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Sorbitol (Δ), D-GalA (\circ), L-GalOA (Δ), Ethanol (\circ) und Acetat (\blacksquare), sowie des Gelöstsauerstoffs (—) und der Konzentrationen von O_2 (schwarz) und CO_2 (grau) im Abgas über die Prozesszeit.

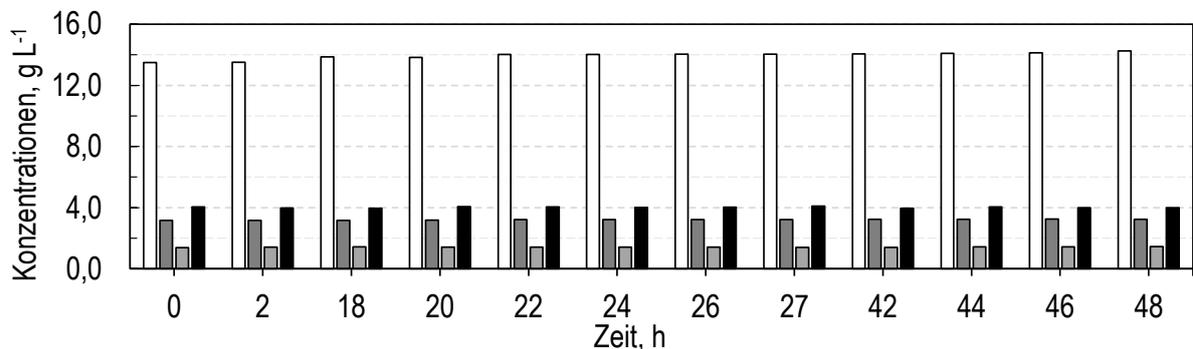


Abbildung 5.25: Konzentrationen von Arabinose (\square), Xylose/Mannose/Galaktose/Fruktose (\blacksquare), Citrat (\blacksquare) und Glycerin (\blacksquare) in ungeklärtem Zuckerrübenschnitzelhydrolysat zu Probenahmezeitpunkten der Ganzzellbiotransformation mit *S. cerevisiae* SiHY001.

Sowohl Sorbitolverbrauch als auch die Umwandlung von D-GalA zu L-GalOA fand während des gesamten Satzverfahrens bis 48 h Prozesszeit statt (Abbildung 5.24). Bis Prozessende nach 48 h konnten so $6,0 \text{ g L}^{-1}$ L-GalOA gebildet werden. Initial vorhandenes Acetat ($0,4 \text{ g L}^{-1}$) und Ethanol ($0,2 \text{ g L}^{-1}$) wurden innerhalb der ersten 24 h verstoffwechselt.

Im Gegensatz dazu blieben die Konzentrationen des initial im ungeklärten Zuckerrübenschnitzel enthaltenen Citrats ($1,4 \text{ g L}^{-1}$) und Glycerins ($4,0 \text{ g L}^{-1}$) konstant bis zum Prozessende nach 48 h (Abbildung 5.25). Bei den ebenfalls im Zuckerrübenschnitzelhydrolysat vorkommenden Zuckern Arabinose, Xylose, Mannose, Galaktose und Fruktose konnte über die Prozesszeit ein leichter Anstieg der Konzentrationen gemessen werden. Dieser belief sich bei Arabinose auf $0,7 \text{ g L}^{-1}$, bei Xylose/Mannose/Galaktose/Fruktose auf $0,1 \text{ g L}^{-1}$. Der Ausbeutekoeffizient $Y_{P/Co-S}$ war $1,4 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1}$ Sorbitol und damit höher als in allen bisherigen Ganzzellbiotransformationen mit *S. cerevisiae* SiHY001 mit Sorbitol.

Diskussion

Das in *S. cerevisiae* SiHY001 etablierte Redox-ausgeglichene Reaktionssystem zur NADPH-abhängigen Reduktion von D-GalA mit Sorbitol als Co-Substrat konnte zum ersten Mal erfolgreich auf hydrolysierte, nicht-filtrierte Zuckerrübenschnitzel übertragen werden. Erstaunlicherweise war es den Hefezellen möglich, mit deutlich geringerem Verbrauch von Sorbitol als in allen vorherigen Biotransformationen L-GalOA zu bilden, ersichtlich an dem höchsten berechneten Ausbeutekoeffizient $Y_{P/Co-S}$ von $1,4 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1}$ Sorbitol mit ungeklärtem Zuckerrübenschnitzelhydrolysat. Auffällig ist außerdem, dass der Ausbeutekoeffizient $Y_{P/Co-S}$ in allen bisherigen Biotransformationen mit Sorbitol umso größer war, je weniger Sorbitol den Hefezellen initial zur Verfügung stand. Während der Ausbeutekoeffizient $Y_{P/Co-S}$ in Biotransformation mit *S. cerevisiae* SiHY001 mit geklärtem Zuckerrübenschnitzelhydrolysat und 4 % (w/v) Sorbitol bei $0,16 \pm 0,01 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1}$ Sorbitol lag (Abschnitt 5.4.3), erreichte $Y_{P/Co-S}$ in Satzprozessen mit *S. cerevisiae* SiHY027 mit 0,6 % (w/v) Sorbitol bei $1,24 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1}$ Sorbitol (Abschnitt 5.4.1), ähnlich hoch wie in Ganzzellbiotransformation mit *S. cerevisiae* SiHY001 mit ungeklärtem Zuckerrübenschnitzelhydrolysat. Was die Ursache hierfür ist, kann nicht abschließend geklärt werden, da es zum Sorbitolmetabolismus in *S. cerevisiae* wenig Literatur gibt um dieses Phänomen zu erklären. Ein Grund könnte allerdings sein, dass *S. cerevisiae* bei hohen initialen Sorbitolkonzentrationen, ähnlich wie mit Glukose, fermentative Nebenprodukte bildet. Diese werden zum Teil, wie in Abschnitt 5.3.3 und Ab-

schnitt 5.3.5 gezeigt, wieder verstoffwechselt bei gleichzeitiger Produktbildung. Damit ist jedoch der Ausbeutekoeffizient $Y_{P/Co-S}$ für Sorbitol als C-Substrat niedriger.

Im ungeklärten Hydrolysat ist außerdem *A. niger*-Biomasse enthalten. Die Zellmembran von Pilzen, zu denen auch die Hefe *S. cerevisiae* gehört, enthält große Mengen an Ergosterol (Ng et al. 2008). Ergosterol wirkt sich vor allem bei anaeroben Bedingungen positiv auf das Wachstum von *S. cerevisiae* aus, da die in Hefezellen zur Biosynthese von einem Molekül Ergosterol benötigten 24 Moleküle ATP und 16 Moleküle NADPH durch Import von extrazellulärem Ergosterol nicht verbraucht werden müssen (Hu et al. 2017). Unter den aeroben Bedingungen der Biotransformation mit ungeklärtem Zuckerrübenschnitzelhydrolysat nimmt *S. cerevisiae* kein Ergosterol auf (Jacquier und Schneiter 2012). Es wirkt sich jedoch äußerst positiv auf die Adaption an osmotischen oder anderen Stress in *S. cerevisiae* aus, wenn es im Medium vorliegt (Endo et al. 2009, Jordá und Puig 2020, Liu et al. 2013). Die genaue Zusammensetzung des ungeklärten Zuckerrübenschnitzelhydrolysats war zwar nicht bekannt, Hydrolysate pektinreicher Feststoffe können jedoch eine Vielzahl unterschiedlicher inhibitorischer Komponenten enthalten, die sich negativ auf das Wachstum von Hefezellen auswirken (Martins et al. 2020). Im Prozess mit ungeklärtem Zuckerrübenschnitzelhydrolysat konnte jedoch keine Wachstumsverzögerung festgestellt werden, da die Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium mit Inokulation von *S. cerevisiae* SiHY001 sank. Ebenso war die Produktbildung nicht beeinflusst und es wurde innerhalb von 48 h Prozesszeit $6,0 \text{ g L}^{-1}$ L-GalOA gebildet.

Auch Glycerin spielt eine Rolle bei osmotischem Stress in *S. cerevisiae*, vor allem gegenüber Zitronensäure (Nielsen und Arneborg 2007). In vorherigen Biotransformationen mit *S. cerevisiae* SiHY001 mit geklärtem Zuckerrübenschnitzelhydrolysat mit Sorbitol wurden hohe Konzentration Glycerin gebildet (Abschnitt 5.4.3). Im Satzprozess mit ungeklärtem Zuckerrübenschnitzelhydrolysat konnte keine Bildung von Glycerin beobachtet werden. Die zu Prozessbeginn bereits vorhandenen 4 g L^{-1} Glycerin im Hydrolysat könnten aber ausreichend für *S. cerevisiae* sein, damit keine Stressantwort auf Zitronensäure, und somit Bildung von Glycerin, erfolgt.

Alle vorherigen Biotransformationen mit *S. cerevisiae* SiHY001 zeigten außerdem eine stöchiometrische Umsetzung von D-GalA zu L-GalOA. Im hier gezeigten Prozess mit ungeklärtem Zuckerrübenschnitzelhydrolysat konnte der Ausbeutekoeffizient $Y_{P/E}$ nicht berechnet werden. Das lag daran, dass die D-GalA-Konzentration im Prozessverlauf langsamer abnahm, als die L-GalOA-Konzentration zunahm. Der Stamm *S. cerevisiae* SiHY001 kann keine D-GalA produzieren und Gründe für eine "Zunahme" von D-GalA sind

auf geringe hydrolytische Aktivität der Pektinase im ungeklärten Zuckerrübenschnitzelhydrolysat zurückzuführen. Auch die leicht steigenden Konzentrationen von weiteren im Hydrolysat befindlichen Zuckern, vornehmlich Arabinose (Abbildung 5.25), deuten darauf hin, dass im Überstand befindliche Pektinasen weiterhin eine basale hydrolytische Aktivität aufweisen und D-GalA-Monomere sowie andere Zucker ins Medium freisetzen, trotz niedrigerer Temperatur und eines höheren pH im Vergleich zu Hydrolysebedingungen (Schäfer et al. 2020).

Zusammenfassend konnte bei der Verwendung von ungeklärtem Zuckerrübenschnitzelhydrolysat im Vergleich zu allen bisherigen Ganzzellbiotransformationen die beste Ausbeute von gebildeten Molekülen L-GalOA pro Molekül Sorbitol erzielt werden. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass ungeklärtes Zuckerrübenschnitzelhydrolysat keinen inhibierenden Effekt auf die Hefezellen hat. Als positiver Effekt kann außerdem die weitere pektinolytische Aktivität der Enzyme gewertet werden, die zu einer weiteren Freisetzung des Substrats D-GalA während der Biotransformationen mit *S. cerevisiae* über die Prozesszeit führen und damit eine Kopplung von enzymatischer Hydrolyse und Ganzzellbiokatalyse ermöglichen könnten.

6 Zusammenfassung

Die Nutzung landwirtschaftlicher Abfallströme zur Produktion hochwertiger Produkte mithilfe von Mikroorganismen ist ressourcenschonend, nachhaltig und umweltfreundlich (Martins et al. 2021). Pektinreiche Reststoffe, wie beispielsweise Zuckerrübenschnitzel, eignen sich durch ihren geringen Lignin-Gehalt für die Verwertung durch Mikroorganismen (Leijdekkers et al. 2013, Martins et al. 2020). Pektin besteht hauptsächlich aus D-Galakturonsäure (D-GalA), aber auch aus weiteren Zuckern wie Glukose oder Arabinose (Schmitz et al. 2019, Xiao et al. 2013). Die Hydrolyse pektinreicher Reststoffe erfolgt entweder chemisch oder enzymatisch und problematisch für die mikrobielle Verwertung von Hydrolysaten können die darin enthaltenen Wachstumsinhibitoren sein, zu denen auch schwache Säuren wie Acetat und D-GalA gehören (Martins et al. 2020).

D-GalA wird in Schimmelpilzen über eine D-GalA-Reduktase in einem ersten katabolen Schritt zu L-Galaktonat (L-GalOA) reduziert, was stöchiometrisch ein Cofaktor-Molekül NAD(P)H verbraucht. L-GalOA ist ein interessantes Zielmolekül, da es große chemische Ähnlichkeit zu Stoffen hat, die bereits in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie als Säureregulatoren oder Komplexbildner eingesetzt werden (Richard und Hilditch 2009). Zusätzlich laktonisiert L-GalOA bei saurem pH zum Galaktono-1,4-lakton (GgL), welches ein Vorläufermolekül der L-Ascorbinsäure darstellt (Kuivanen et al. 2012). Hinsichtlich der industriellen Anwendung der Produkte sollte eine vollständige Umsetzung von D-GalA zu L-GalOA und GgL erfolgen, um die kostenintensive Trennung von D-GalA und L-GalOA zu vermeiden, welche sich durch sehr ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften ergibt (Kuivanen et al. 2014).

Um unterschiedlich vorbehandelte Hydrolysate aus pektinreichen Reststoffen zur Produktion von L-GalOA zu nutzen, können rekombinante *S. cerevisiae* Stämme eingesetzt werden. Obwohl *S. cerevisiae* nativ nicht in der Lage ist, D-GalA zu verstoffwechseln, ist die Hefe aufgrund der einfachen Manipulierbarkeit, des schnellen Wachstums und der Toleranz gegenüber Inhibitoren in Hydrolysaten für industrielle biotechnologische Prozesse geeignet (Nielsen und Arneborg 2007).

Die meisten bisherigen Studien zur Nutzung von D-GalA mit rekombinanten *S. cerevisiae* wurden in definiertem Medium durchgeführt und verfolgten nicht die Umsetzung von D-GalA zu L-GalOA, sondern beispielsweise die Ethanol- oder Biomassebildung mit *S. cerevisiae* (Biz et al. 2016, Jeong et al. 2020, van Maris et al. 2006, Protzko

et al. 2018). Nur Benz et al. (2014) zeigte in Schüttelkolbenexperimenten in definiertem Medium mit rekombinanten *S. cerevisiae* eine unvollständige Umsetzung von D-GalA zu L-GalOA durch heterologe Expression eines D-GalA-Transporters aus *Neurospora crassa* (*N. crassa*) (GAT-1) und einer D-GalA-Reduktase aus *Aspergillus niger* (*A. niger*) (GAAA), was mit dem Fehlen des reduzierten Cofaktors für die weitere Reduktion von D-GalA begründet wurde.

Bisher konnte kein rekombinanter Hefestamm für eine effiziente Umwandlung von D-GalA zu L-GalOA aus hydrolysierten, pektinreichen Reststoffen gefunden werden. Daher war es Ziel dieser Arbeit, ein skalierbares biokatalytisches Verfahren mit Ganzzellbiokatalysatoren zur vollständigen Umsetzung von D-GalA zu L-GalOA mit rekombinanten *S. cerevisiae* mit unterschiedlichen Hydrolysaten zu etablieren. Hierfür wurden vom Kooperationspartner (Goethe-Universität Frankfurt, Institut für Molekulare Biowissenschaften) rekombinante *S. cerevisiae* Stämme mit verschiedenen Cofaktorregenerierungssystemen bereitgestellt, welche zunächst reaktionstechnisch in vollständig kontrollierten Rührkesselreaktoren in definiertem Medium im Satzprozess untersucht wurden. Neben der Regeneration des für die Reduktion von D-GalA zu L-GalOA nötigen reduzierten Cofaktors über den Zentralstoffwechsel wurde auch die Strategie verfolgt, den reduzierten Cofaktor Enzym-gekoppelt mit Sorbitol als Co-Substrat zu regenerieren.

Glukose wurde als Co-Substrat für die Regeneration des reduzierten Cofaktors über den Zentralstoffwechsel verwendet. Mit der Expression der D-GalA-Reduktase AnGar1, welche D-GalA NADPH-abhängig reduziert, und des D-GalA-Transporters AnGAT aus *A. niger* in rekombinanten *S. cerevisiae* konnte keine Produktion von L-GalOA mit Glukose als Co-Substrat festgestellt werden. Deswegen wurden *S. cerevisiae* Stämme bereitgestellt, die durch gerichtete Mutagenese in der Bindetasche der AnGar1 die Cofaktor-Akzeptanz Richtung NADH verschoben hatten, da dieses der hauptsächlich gebildete reduzierte Cofaktor der Glykolyse in *S. cerevisiae* ist. Die daraus resultierenden Stämme mit Reduktasen mit Einfach- (*) und Doppelmutation (**) waren in der Lage, 15 % (AnGar1*) und 7 % (AnGar1**) der eingesetzten 5 g L⁻¹ D-GalA im Satzverfahren in L-GalOA umzuwandeln. Mit einem Ausbeutekoeffizienten $Y_{D-GalA/L-GalOA}$ größer 90 % war die Umwandlung nahezu stöchiometrisch und es konnte ausgeschlossen werden, dass eine weitere Verstoffwechslung des Produkts oder des Edukts durch die rekombinanten *S. cerevisiae* Stämme stattfand. Zusätzlich wurde keine Inhibierung der Hefezellen durch das Produkt festgestellt. Allerdings ergab sich eine Verzögerung des Wachstums in Anwesenheit von D-GalA, ausgelöst durch den höheren Energiebedarf zum Import

von D-GalA durch den D-GalA-Transporter AnGAT und den leicht inhibierenden Effekt von D-GalA als schwache Säure beim Import ins Zytoplasma. Es konnte zwar die Produktion von L-GalOA mit Glukose als Substrat erreicht werden, die maximal erreichten Produktkonzentrationen waren mit $0,73 \text{ g L}^{-1}$ bei 15 % Umsatz von D-GalA jedoch niedrig. Die Ursache für den geringen Umsatz wurde auf einen Mangel an NADH zurückgeführt, welches augenscheinlich bei diesem Stamm nur ungenügend über den Zentralstoffwechsel bereitgestellt werden kann.

Zur Erhöhung der Verfügbarkeit an reduziertem Cofaktor im Ganzzellbiokatalysator wurden Stämme bereitgestellt, die die hauptsächlich in *S. cerevisiae* aktive Alkoholdehydrogenase ADH1 deletiert hatten. Da ADH1 unter Verbrauch eines NADH die Ethanolbildung aus Acetaldehyd katalysiert, sollte durch ihre Deletion ein NADH-Überschuss mit Glukose über den Zentralstoffwechsel generiert werden. In Satzprozessen mit diesen rekombinanten *S. cerevisiae* Stämmen konnte jedoch keine verbesserte Produktbildung beobachtet werden. Die Umsetzung von D-GalA zu L-GalOA war auch hier stöchiometrisch und die Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/E}$ lagen mit $0,98 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1} \text{ D-GalA}$ (AnGar1*) bzw. $0,92 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1} \text{ D-GalA}$ (AnGar1**) ähnlich hoch wie beim Vergleichsstamm ohne Deletion der ADH1. Der Umsatz der eingesetzten 5 g L^{-1} D-GalA lag allerdings nur bei 12 % (AnGar1*) und 10 % (AnGar1**). Zwar wurde deutlich weniger Ethanol mit diesen Stämmen gebildet, NADH wurde von den Hefezellen aber hauptsächlich zur Bildung von Glycerin verbraucht und nicht zur Produktion von L-GalOA.

Mit nur einem genomisch integrierten Gen für die D-GalA-Reduktase wurde vermutet, dass die Reduktion von D-GalA durch die geringe Kopienzahl der D-GalA-Reduktase nicht priorisiert ablaufen kann. Als Konsequenz wurden rekombinante *S. cerevisiae* Stämme bereitgestellt mit einer weiteren Kopie des jeweiligen AnGar1*/**-Gens im Genom. Diese zeigten jedoch keine Verbesserung der L-GalOA-Produktion im Satzverfahren.

Um die Limitierung der Reduktion durch nicht verfügbare reduzierte Cofaktoren zu lösen, wurden rekombinante *S. cerevisiae* mit einem zusätzlichen Regenerierungsenzym für den Cofaktor bereitgestellt, welche mit Sorbitol als Co-Substrat ein zusätzliches Cofaktor-Molekül generieren. Diese *S. cerevisiae* Stämme verfügten neben den Enzymen zur Reduktion von D-GalA (AnGar1, AnGAT) über eine Überexpression eines Sorbitol-Transporter Hxt13 sowie einer Sorbitol-Dehydrogenase zur NAD(P)H-Rückgewinnung. Die daraus resultierenden Stämme mit Varianten der AnGar1 (AnGar1, AnGar1* und AnGar1**) waren alle in der Lage, L-GalOA im Satzverfahren zu produzieren, wenn genügend Sorbitol vorgelegt wurde. Die Produktbildung erfolgte hauptsächlich während der Wachstumsphase der Hefezellen. Besonders die Stämme mit der Wildtyp Redukta-

se und der Einfachmutante der Reduktase (AnGar1*) zeigten in Satzprozessen eine deutlich gesteigerte Produktbildung mit Sorbitol im Vergleich zu Glukose als Co-Substrat. Die NADPH-gekoppelte Reduktion von D-GalA mit der Wildtyp Reduktase zeigte mit 66 % Umsatz von 5 g L⁻¹ D-GalA nach 72 h Prozesszeit die beste Prozessleistung (Abbildung 6.1, schematische Darstellung). Deswegen wurde dieser Stamm für die anschließenden reaktionstechnischen Untersuchungen zur vollständigen Umsetzung von D-GalA bei möglichst kurzer Prozesszeit im Satzverfahren verwendet.

Hierfür wurden neben dem pH auch die Konzentration an Co-Substrat Sorbitol und die Medienzusammensetzung untersucht. Ein vollständiger Umsatz von D-GalA innerhalb der ersten 48 h Prozesszeit konnten bei pH 5 mit 4 % (w/v) Sorbitol im Satzverfahren erzielt werden (Abbildung 6.1). Mit 4 % (w/v) Sorbitol wurde jedoch eine erhöhte Nebenproduktbildung (Glycerin, Acetat und Ethanol) mit *S. cerevisiae* beobachtet, welche vermutlich durch eine Katabolitrepression, ähnlich dem Crabtree-Effekt, ausgelöst wurde. Durch intermittierende Sorbitolzugabe konnte eine deutliche Reduzierung der Sekundärmetabolitkonzentrationen erreicht werden, aber bis Prozessende kein vollständiger Umsatz von D-GalA.

In allen Satzprozessen wurde eine wachstumsgekoppelte Umsetzung von D-GalA zu L-GalOA beobachtet. Je mehr Biokatalysator während der Wachstumsphase gebildet wurde, desto schneller war die Produktbildung. Durch die Variation des Mediums konnte bei Zugabe der zehnfachen Menge an Spurenelemente, Salzen und Vitaminen des definierten Mediums (Difco™ Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren) mit 11,14±0,69 g L⁻¹ fast 40 % höhere Biomassekonzentrationen erzielt werden im Vergleich zu 7,98 g L⁻¹ in vorherigen Satzprozessen.

Vom Kooperationspartner bereitgestellte Zuckerrübenschnitzelhydrolysate (Technische Universität München, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik) waren thermisch vorbehandelt und enthielten unterschiedliche Puffer für die enzymatische Hydrolyse mit Pektinase (Schäfer et al. 2020). Voruntersuchungen mit Natriumacetat-gepufferten Hydrolysate zeigten kein Wachstum von *S. cerevisiae* und Natriumacetat stellte sich bereits ab einer Konzentration von 50 mM als wachstumshemmend für die Hefe heraus. Kaliumcitrat zeigte hingegen keinen Einfluss auf das Wachstum von *S. cerevisiae* bis 250 mM, weswegen im Folgenden Hydrolysate mit Kaliumcitrat-Puffer zur Verfügung gestellt wurden. Biotransformationen mit rekombinanten *S. cerevisiae* in Satzprozessen mit Kaliumcitrat-gepuffertem, geklärtem Zuckerrübenschnitzelhydrolysat waren identisch zu Satzprozessen in definiertem Medium (Abbildung 6.1). Auch mit Hydrolysat wurde innerhalb von 48 h mit 4 % (w/v) Sorbitol ein vollständiger Umsatz von D-GalA zu L-GalOA er-

reicht (Abbildung 6.1). Es wurden ähnliche Ausbeuten $Y_{P/E}$ von $0,93 \pm 0,03$ mol L-GalOA mol⁻¹ D-GalA (Hydrolysat) bzw $0,91 \pm 0,02$ mol L-GalOA mol⁻¹ D-GalA (definiertes Medium) erzielt (Abbildung 6.1). Lediglich die Glycerinbildung war aufgrund des Citrats im Hydrolysatpuffer in Prozessen mit Hydrolysat deutlich erhöht.

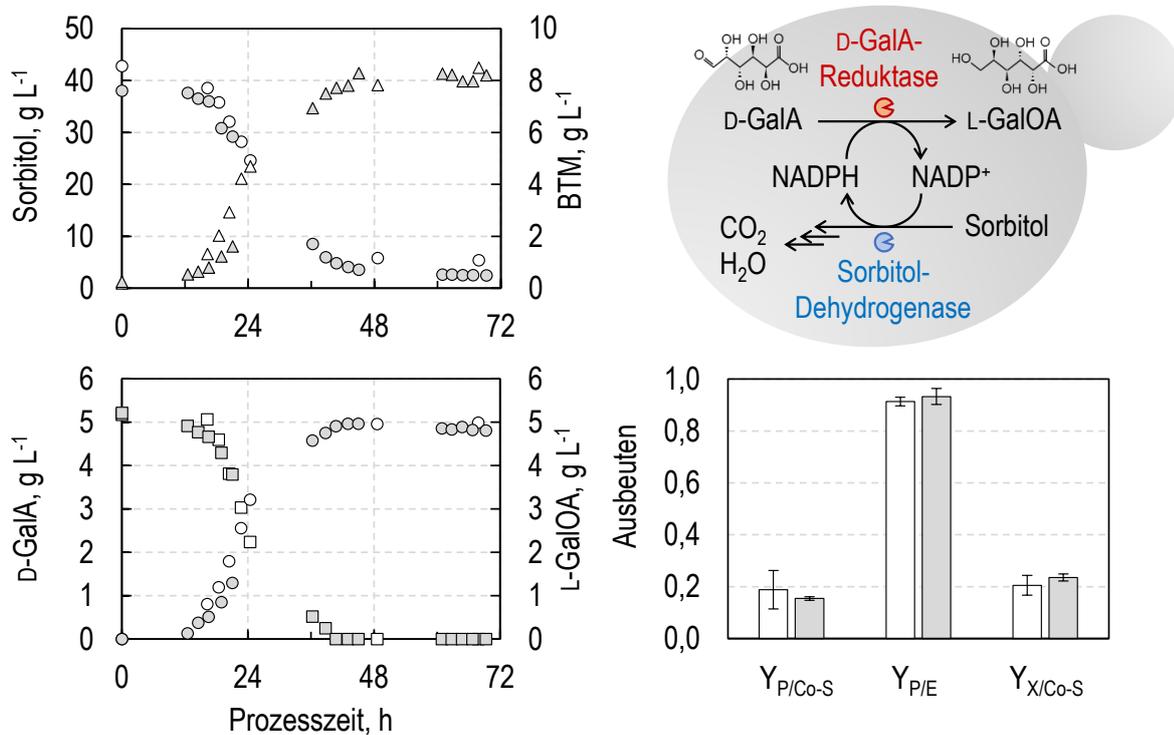


Abbildung 6.1: Vergleichende Satzkultivierung des rekombinanten *S. cerevisiae* Stamms SiHY001 mit Kaliumcitrat-gepufferten Zuckerrübenschnitzelhydrolysat (grau) bzw. in definiertem Medium (weiß) mit 4 % (w/v) Sorbitol in kontrollierten Rührkesselbioreaktoren ($T=30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5$, $F_{\text{Luft}} = 0,5$ vvm, $V_{\text{R}} = 0,6$ L, $N_{\text{Start}}=200$ min⁻¹, Gelöstsauerstoffkonzentration > 30 %). Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Sorbitol (○/○), Biotrockenmasse (△/△), sowie von D-GalA (□/□) und L-GalOA (○/○). Berechnete Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/Co-S}$ (mol mol⁻¹), $Y_{P/E}$ (mol mol⁻¹) und $Y_{X/Co-S}$ (g g⁻¹). Schematische Darstellung der besten Ganzzellbiokatalysatorstrategie mit Sorbitol als Co-Substrat zur Regenerierung des Cofaktors NADPH.

Abschließend wurde die Prozessintegration von Biotransformation und enzymatischer Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln untersucht. Im ungeklärten Hydrolysat waren unterschiedliche Feststoffe, abgetötete Biomasse von *A. niger* und nicht hydrolysierte Zuckerrübenschnitzel enthalten, welche die Biotransformation beeinflussen können. Er-

staunlicherweise konnte mit ungeklärtem Hydrolysat eine deutlich verbesserten Co-Substratnutzung zur Produktbildung $Y_{P/Co-S}$ von $1,4 \text{ mol L-GalOA mol}^{-1}$ Sorbitol festgestellt werden. Bis 48 h Prozesszeit konnten 6 g L^{-1} L-GalOA mit rekombinaten *S. cerevisiae* mit ungeklärtem Hydrolysat gebildet werden.

In allen vorherigen Prozessen wurde eine stöchiometrische Umsetzung von D-GalA zu L-GalOA gezeigt mit Ausbeuten $Y_{P/E} > 90 \%$. Im integrierten Satzprozess wurden für die Bildung von 6 g L^{-1} L-GalOA mit rekombinanten *S. cerevisiae* jedoch nur $3,7 \text{ g L}^{-1}$ D-GalA verbraucht. Das konnte mit der weiteren Freisetzung von D-GalA aus Zuckerrübenschnitzeln im ungeklärten Hydrolysat während der Biotransformation erklärt werden und auch weitere Zucker, wie beispielsweise Arabinose, wurden über die Prozesszeit aus noch nicht hydrolysierten Bestandteilen des Hydrolysats freigesetzt.

7 Ausblick

Die Redox-ausgeglichene Ganzzellbiokatalysatorstrategie ermöglichte in Kombination mit Sorbitol als Co-Substrat die Reduktion des aus Zuckerrübenschnitzeln mittels enzymatischer Hydrolyse herausgelösten Zuckermonomers D-GalA. Der rekombinante *S. cerevisiae* Stamm bietet eine grundlegende Basis für eine weitere Stamm- und Prozessentwicklung zur biotechnologischen Herstellung von L-GalOA aus pektinreichen Reststoffen der Zuckerindustrie mit der Hefe *S. cerevisiae*.

Die weitergehende Hydrolyse beim integrierten Ansatz von Biotransformation und enzymatischer Hydrolyse eröffnet einen neuen Weg zur Produktion von L-GalOA mit rekombinanten *S. cerevisiae*. Hier sollten Forschungsarbeiten zur Erzielung höherer Produktkonzentrationen bei vollständigem Umsatz von D-GalA zu L-GalOA anknüpfen.

Langfristig sollte zur Kostenersparnis auf die Zugabe eines Co-Substrates verzichtet werden. Deswegen ist es sinnvoll, weitere genetische Modifizierungen der Hefe vorzunehmen, um eine ganzheitliche Verwendung aller Zucker aus Zuckerrübenschnitzelhydrolysaten zu erreichen, ähnlich dem Konzept von Jeong et al. (2020). Besonders Arabinose ist als Co-Substrat interessant für die Biotransformation, da es in ähnlich hohen Konzentrationen wie D-GalA im Hydrolysat vorliegt (Micard et al. 1996). Die Nutzung von Arabinose als Kohlenstoffquelle wurde bereits in Studien mit rekombinanten *S. cerevisiae* gezeigt (Bera et al. 2010), allerdings sollte hier auf die Integration NADH-verbrauchender Enzyme geachtet werden, um keine Konkurrenzreaktion zur D-GalA-Reduktion zu erzeugen.

Die Kopplung der Reduktion von D-GalA an den Zentralstoffwechsel mit Glukose war in dieser Arbeit nicht so effizient wie die Kopplung an Sorbitol als Co-Substrat zur Regenerierung von NADPH. In mehreren Studien konnte jedoch erfolgreich die NADPH-Bereitstellung über den Zentralstoffwechsel mit Glukose gezeigt werden, wenn NAD⁺-verbrauchende Enzyme der Acetat- und Ammoniumassimilation oder des Pentose-Phosphat-Weges durch NADPH-generierende Enzyme ersetzt wurden (Kim et al. 2018, Verho et al. 2003). Um die in Hydrolysaten vorhandene Glukose zu nutzen, könnte eine ähnliche Strategie für die Biotransformation von D-GalA zu L-GalOA verfolgt werden.

Schlussendlich muss ein spezifisches Isolierungsverfahren von L-GalOA aus Fermentationsüberständen etabliert werden, sobald genügend hohe Produktkonzentrationen

vorliegen. Denkbar wäre beispielsweise die elektro-dialytische Reinigung von L-GalOA, wie sie bereits für andere organische Säuren angewendet wird (Handojo et al. 2019).

8 Literaturverzeichnis

- Abbott, D.A., Zelle, R.M., Pronk, J.T. und Van Maris, A.J. 2009. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of carboxylic acids: Current status and challenges. *FEMS Yeast Research*, 9 (8):1123–1136. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00537.x.
- Abdelraheem, E.M., Busch, H., Hanefeld, U. und Tonin, F. 2019. Biocatalysis explained: From pharmaceutical to bulk chemical production. *Reaction Chemistry and Engineering*, 4 (11):1878–1894. doi:10.1039/c9re00301k.
- Ángel Siles López, J., Li, Q. und Thompson, I.P. 2010. Biorefinery of waste orange peel. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30 (1):63–69. doi:10.3109/07388550903425201.
- Ariño, J., Ramos, J. und Sychrová, H. 2010. Alkali Metal Cation Transport and Homeostasis in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74 (1):95–120. doi:10.1128/membr.00042-09.
- Babazadeh, R., Lahtvee, P.J., Adiels, C.B., Goksör, M., Nielsen, J.B. und Hohmann, S. 2017. The yeast osmotic stress response is carbon source dependent. *Scientific Reports*, 7 (1):1–11. doi:10.1038/s41598-017-01141-4.
- Bakker, B.M., Overkamp, K.M., Van Maris, A.J., Kötter, P., Luttik, M.A., Van Dijken, J.P. und Pronk, J.T. 2001. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 25 (1):15–37. doi:10.1016/S0168-6445(00)00039-5.
- Baral, A. und Malins, C. 2014. Assessing the climate mitigation potential of biofuels derived from residues and wastes in the European context.
- Barnett, J.A. 1976. The utilization of sugars by yeasts. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 32 (C):125–234. doi:10.1016/S0065-2318(08)60337-6.
- Benz, J.P., Protzko, R.J., Andrich, J.M., Bauer, S., Dueber, J.E. und Somerville, C.R. 2014. Identification and characterization of a galacturonic acid transporter from *Neurospora crassa* and its application for *Saccharomyces cerevisiae* fermentation processes. *Biotechnology for Biofuels*, 7 (1):20. doi:10.1186/1754-6834-7-20.
- Bera, A.K., Sedlak, M., Khan, A. und Ho, N.W. 2010. Establishment of l-arabinose fermentation in glucose/xylose co-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST) by genetic engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87 (5):1803–1811. doi:10.1007/s00253-010-2609-0.
- Bérangère, F., Laurent, P., Agnès, P. und Claude-Gilles, D. 2012. Methodology for Bioprocess Analysis: Mass Balances, Yields and Stoichiometries. In *Stoichiometry and*

- Research - The Importance of Quantity in Biomedicine* (A. Innocenti, Hg.), Kapitel 12, 261–286. InTechOpen. ISBN 9789535101987. doi:10.5772/34673.
- Bergmeyer, U. und Buchner, E. 2012. Introduction. In *Yeast: Molecular and Cell Biology* (H. Feldmann, Hg.), Kapitel 1, 1–3. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2 Auflage. doi:https://doi.org/10.1002/9783527659180.ch1.
- Berlowska, J., Binczarski, M., Dziugan, P., Wilkowska, A., Kregiel, D. und Witonska, I. 2018. Sugar Beet Pulp as a Source of Valuable Biotechnological Products. In *Advances in Biotechnology for Food Industry*, Band 14, Kapitel 13, 359–392. Elsevier. ISBN 9780128114957. doi:10.1016/B978-0-12-811443-8.00013-X.
- Berthels, N.J., Cordero Otero, R.R., Bauer, F.F., Thevelein, J.M. und Pretorius, I.S. 2004. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Research*, 4 (7):683–689. doi:10.1016/j.femsyr.2004.02.005.
- Biz, A., Sugai-Guérios, M.H., Kuivanen, J., Maaheimo, H., Krieger, N., Mitchell, D.A. und Richard, P. 2016. The introduction of the fungal d-galacturonate pathway enables the consumption of d-galacturonic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 15 (1):144. doi:10.1186/s12934-016-0544-1.
- Boer, H., Maaheimo, H., Koivula, A., Penttilä, M. und Richard, P. 2010. Identification in *Agrobacterium tumefaciens* of the D-galacturonic acid dehydrogenase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86 (3):901–909. doi:10.1007/s00253-009-2333-9.
- Borodina, I. und Nielsen, J. 2014. Advances in metabolic engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for production of chemicals. *Biotechnology Journal*, 9:1–12. doi:10.1002/biot.201300445.
- Botham, P.A. und Ratledge, C. 1979. A biochemical explanation for lipid accumulation in *Candida 107* and other oleaginous micro-organisms. *Journal of General Microbiology*, 114 (2):361–375. doi:10.1099/00221287-114-2-361.
- Botstein, D. und Fink, G.R. 2011. Yeast: An experimental organism for 21st century biology. *Genetics*, 189 (3):695–704. doi:10.1534/genetics.111.130765.
- Branduardi, P. und Porro, D. 2012. Yeasts in Biotechnology. In *Yeast: Molecular and Cell Biology* (H. Feldmann, Hg.), Kapitel 14, 347–370. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2 Auflage. doi:https://doi.org/10.1002/9783527659180.ch14.
- Bräutigam, S., Dennewald, D., Schürmann, M., Lutje-Spelberg, J., Pitner, W.R. und Weuster-Botz, D. 2009. Whole-cell biocatalysis: Evaluation of new hydrophobic ionic liquids for efficient asymmetric reduction of prochiral ketones. *Enzyme and Microbial Technology*, 45 (4):310–316. doi:10.1016/j.enzmictec.2009.06.015.

-
- Bruder, S., Reifenrath, M., Thomik, T., Boles, E. und Herzog, K. 2016. Parallelised online biomass monitoring in shake flasks enables efficient strain and carbon source dependent growth characterisation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 15 (1):127. doi:10.1186/s12934-016-0526-3.
- Bruinenberg, P.M., Van Dijken, J.P. und Scheffers, W.A. 1983. A theoretical analysis of NADPH production and consumption in yeasts. *Journal of General Microbiology*, 129 (4):953–964. doi:10.1099/00221287-129-4-953.
- Çakar, Z.P., Turanli-Yildiz, B., Alkim, C. und Yilmaz, Ü. 2012. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties. *FEMS Yeast Research*, 12 (2):171–182. doi:10.1111/j.1567-1364.2011.00775.x.
- Çağlayan, M. und Wilson, S. 2014. Enzymatic Activity Assays in Yeast Cell Extracts. *BIO-PROTOCOL*, 4 (23):139–148. doi:10.21769/BioProtoc.1312.
- Carmelo, V., Bogaerts, P. und Sá-Correia, I. 1996. Activity of plasma membrane H⁺-ATPase and expression of PMA1 and PMA2 genes in *Saccharomyces cerevisiae* cells grown at optimal and low pH. *Archives of Microbiology*, 166 (5):315–320. doi:10.1007/s002030050389.
- Castiglione, K. 2018. Enzymkinetik. In *Bioprozesstechnik* (H. Chmiel, R. Takors und D. Weuster-Botz, Hg.), 1–44. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. ISBN 978-3-662-54042-8. doi:10.1007/978-3-662-54042-8_1.
- Castiglione, K., Fu, Y., Polte, I., Leupold, S., Meo, A. und Weuster-Botz, D. 2017. Asymmetric whole-cell bioreduction of (R)-carvone by recombinant *Escherichia coli* with in situ substrate supply and product removal. *Biochemical Engineering Journal*, 117:102–111. doi:10.1016/j.bej.2016.10.002.
- Caunt, P., Impoolsup, A. und Greenfield, P.F. 1988. Stability of recombinant plasmids in yeast. *Journal of Biotechnology*, 8 (3):173–192. doi:10.1016/0168-1656(88)90001-6.
- Chambers, R.P., Walle, E.M., Baricos, W.H. und Cohen, W. 1978. High Turnover NAD Regeneration in the Coupled Dehydrogenase Conversion of Sorbitol to Fructose. In *Enzyme Engineering* (E.K. Pye und H.H. Weetall, Hg.), Kapitel 4, 363–369. Springer US, Boston, MA, 1 Auflage. doi:10.1007/978-1-4757-5163-5_41.
- Chen, R., Wei, Q., Wei, X., Liu, Y., Zhang, X., Chen, X., Yin, X. und Xie, T. 2020. Stable and efficient immobilization of bi-enzymatic NADPH cofactor recycling system under consecutive microwave irradiation. *PLoS ONE*, 15 (11 November):1–15. doi:10.1371/journal.pone.0242564.
- Chen, X., Li, S. und Liu, L. 2014. Engineering redox balance through cofactor systems. *Trends in Biotechnology*, 32 (6):337–343. doi:10.1016/j.tibtech.2014.04.003.

- Cherubini, F. 2010. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 51 (7):1412–1421. doi:10.1016/j.enconman.2010.01.015.
- Compagno, C., Dashko, S. und Piškur, J. 2014. Introduction to Carbon Metabolism in Yeast. In *Introduction to Carbon Metabolism in Yeast* (J. Piškur und C. Compagno, Hg.), Kapitel 1, 1–19. Springer, Berlin, Heidelberg, 1 Auflage. ISBN 9783642550133. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-642-55013-3_1.
- Crabtree, H.G. 1929. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochemical Journal*, 23 (3):536–545. doi:10.1042/bj0230536.
- Csiba, M., Cleophax, J., Petit, S. und Gero, S.D. 1993. An Expedient and Practical Three-Step Synthesis of Vitamin C from a Byproduct of the Sugar Industry: The L-Galactono-1,4-lactone Pathway. 58 (25):7281–7282. doi:10.1021/jo00077a062.
- Cullen, P.J. und Sprague, G.F. 2002. The Roles of Bud-Site-Selection Proteins during Haploid Invasive Growth in Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 13 (9):2990–3004. doi:10.1091/mbc.e02-03-0151.
- Da Silva, S.S. und Chandel, A.K. 2012. D-Xylitol: Fermentative production, application and commercialization. *D-Xylitol: Fermentative Production, Application and Commercialization*, 1–345. doi:10.1007/978-3-642-31887-0.
- Dahiya, S., Kumar, A.N., Shanthi Sravan, J., Chatterjee, S., Sarkar, O. und Mohan, S.V. 2018. *Food waste biorefinery: Sustainable strategy for circular bioeconomy*, Band 248. Elsevier Ltd. ISBN 0091402719. doi:10.1016/j.biortech.2017.07.176.
- Damerow, P. 2011. Sumerian Beer : The Origins of Brewing Technology in Ancient Mesopotamia. *Cuneiform Digital Library Journal*, 3 (January).
- De Deken, R.H. 1966. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Journal of general microbiology*, 44 (2):149–156. doi:10.1099/00221287-44-2-149.
- De Smidt, O., Du Preez, J.C. und Albertyn, J. 2008. The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: A comprehensive review. *FEMS Yeast Research*, 8 (7):967–978. doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00387.x.
- Dickinson, J.R. und Schweizer, M. 2004. *The metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2. Auflage. ISBN 0415299004.
- Dijken, J.P. und Scheffers, W.A. 1986. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 32 (3-4):199–224. doi:10.1111/j.1574-6968.1986.tb01194.x.

-
- Dmytruk, K.V., Kurylenko, O.O., Ruchala, J., Abbas, C.A. und Sibirny, A.A. 2017. Genetic Improvement of Conventional and Nonconventional Yeasts for the Production of First- and Second- Generation Ethanol. In *Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi* (A.A. Sibirny, Hg.), Kapitel 1, 1–38. Springer, Cham, 1 Auflage. ISBN 9783319588292. doi:10.1007/978-3-319-58829-2.
- Drewke, C., Thielen, J. und Ciriacy, M. 1990. Ethanol formation in adh0 mutants reveals the existence of a novel acetaldehyde-reducing activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 172 (7):3909–3917. doi:10.1128/jb.172.7.3909-3917.1990.
- Duboc, P. und Von Stockar, U. 1998. Systematic errors in data evaluation due to ethanol stripping and water vaporization. *Biotechnology and Bioengineering*, 58 (4):428–439. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19980520)58:4<428::AID-BIT10>3.0.CO;2-7.
- Duc, C., Pradal, M., Sanchez, I., Noble, J., Tesnière, C. und Blondin, B. 2017. A set of nutrient limitations trigger yeast cell death in a nitrogen-dependent manner during wine alcoholic fermentation. *PLoS ONE*, 12 (9):1–22. doi:10.1371/journal.pone.0184838.
- Dunlop, M.J. 2011. Engineering microbes for tolerance to next-generation biofuels. *Biotechnology for Biofuels*, 4 (Figure 1):1–9. doi:10.1186/1754-6834-4-32.
- Duntze, W., Neumann, D., Gancedo, J.M., Atzpodien, W. und Holzer, H. 1969. Studies on the Regulation and Localization of the Glyoxylate Cycle Enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 10 (1):83–89. doi:https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1969.tb00658.x.
- Edwards, M.C. und Doran-Peterson, J. 2012. Pectin-rich biomass as feedstock for fuel ethanol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95 (3):565–575. doi:10.1007/s00253-012-4173-2.
- Endo, A., Nakamura, T. und Shima, J. 2009. Involvement of ergosterol in tolerance to vanillin, a potential inhibitor of bioethanol fermentation, in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 299 (1):95–99. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01733.x.
- Entian, K.D. und Kötter, P. 2007. 25 Yeast Genetic Strain and Plasmid Collections. *Methods in Microbiology*, 36 (06):629–666. doi:10.1016/S0580-9517(06)36025-4.
- Faber, K. 2011. *Biotransformations in Organic Chemistry*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 6 Auflage. ISBN 978-3-642-17392-9. doi:10.1007/978-3-642-17393-6.
- Favaro, L., Jansen, T. und van Zyl, W.H. 2019. Exploring industrial and natural *Saccharomyces cerevisiae* strains for the bio-based economy from biomass: the case of bioethanol. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39 (6):800–816. doi:10.1080/07388551.2019.1619157.

- Feldmann, H. 2012. Yeast Growth and the Yeast Cell Cycle. In *Yeast: Molecular and Cell Biology* (H. Feldmann, Hg.), Kapitel 7, 175–205. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2 Auflage. doi:<https://doi.org/10.1002/9783527659180.ch7>.
- Fiechter, A. und Seghezzi, W. 1992. Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Journal of Biotechnology*, 27 (1):27–45. doi:10.1016/0168-1656(92)90028-8.
- Flores, C.I., Rodríguez, C., Petit, T. und Gancedo, C. 2000. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts: Figure 1. *FEMS Microbiology Reviews*, 24 (4):507–529. doi:10.1111/j.1574-6976.2000.tb00553.x.
- Forti, L., Mauro, S.D., Cramarossa, M.R., Filippucci, S., Turchetti, B. und Buzzini, P. 2015. Non-conventional yeasts whole cells as efficient biocatalysts for the production of flavors and fragrances. *Molecules*, 20 (6):10.377–10.398. doi:10.3390/molecules200610377.
- Gancedo, C., Gancedo, J.M. und Sols, A. 1968. Glycerol Metabolism in Yeasts: Pathways of Utilization and Production. *European Journal of Biochemistry*, 5 (2):165–172. doi:10.1111/j.1432-1033.1968.tb00353.x.
- Gancedo, J.M. 1992. Carbon catabolite repression in yeast. *European Journal of Biochemistry*, 206 (2):297–313. doi:10.1111/j.1432-1033.1992.tb16928.x.
- Gancedo, J.M. 1998. Yeast Carbon Catabolite Repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (2):334–361.
- Gauer, S., Wang, Z., Otten, H., Etienne, M., Bjerrum, M.J., Lo Leggio, L., Walcarius, A., Giffhorn, F. und Kohring, G.W. 2014. An l-glucitol oxidizing dehydrogenase from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 for production of d-sorbose with enzymatic or electrochemical cofactor regeneration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98 (7):3023–3032. doi:10.1007/s00253-013-5180-7.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. und Oliver, S.G. 1996. Life with 6000 Genes. *Science*, 274 (5287):546–567. doi:10.1126/science.274.5287.546.
- Goldberg, K., Schroer, K., Lütz, S. und Liese, A. 2007. Biocatalytic ketone reduction—a powerful tool for the production of chiral alcohols—part II: whole-cell reductions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76 (2):249–255. doi:10.1007/s00253-007-1005-x.
- Günan Yücel, H. und Aksu, Z. 2015. Ethanol fermentation characteristics of *Pichia stipitis* yeast from sugar beet pulp hydrolysate: Use of new detoxification methods. *Fuel*, 158:793–799. doi:10.1016/j.fuel.2015.06.016.

-
- Guo, Z.P. und Olsson, L. 2016. Physiological responses to acid stress by *Saccharomyces cerevisiae* when applying high initial cell density. *FEMS Yeast Research*, 16 (7):1–11. doi:10.1093/femsyr/fow072.
- Hagen, J. 2006. Biocatalysis. In *Industrial Catalysis* (J. Hagen, Hg.), Band 122, Kapitel 4, 83–98. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, 3 Auflage. ISBN 9783527311446. doi:10.1002/3527607684.ch4.
- Hagman, A. und Piškur, J. 2015. A study on the fundamental mechanism and the evolutionary driving forces behind aerobic fermentation in yeast. *PLoS ONE*, 10 (1):1–24. doi:10.1371/journal.pone.0116942.
- Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Larsson, C.U., Gorwa-Grauslund, M., Görgens, J. und van Zyl, W.H. 2005. Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. *Microbial Cell Factories*, 4:1–16. doi:10.1186/1475-2859-4-31.
- Hamill, P.G., Stevenson, A., McMullan, P.E., Williams, J.P., Lewis, A.D., Sudharsan, S., Stevenson, K.E., Farnsworth, K.D., Khroustalyova, G., Takemoto, J.Y., Quinn, J.P., Rapoport, A. und Hallsworth, J.E. 2020. Microbial lag phase can be indicative of, or independent from, cellular stress. *Scientific Reports*, 10 (1):1–20. doi:10.1038/s41598-020-62552-4.
- Handojo, L., Wardani, A.K., Regina, D., Bella, C., Kresnowati, M.T. und Wenten, I.G. 2019. Electro-membrane processes for organic acid recovery. *RSC Advances*, 9 (14):7854–7869. doi:10.1039/C8RA09227C.
- Harth, S., Wagner, J., Botz, D.W. und Oreb, M. 2020. Engineering cofactor supply and NADH-dependent D-galacturonic acid reductases for redox-balanced production of L-galactonate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 1–12. doi:10.1038/s41598-020-75926-5.
- Haukeli, A.D. und Lie, S. 1971. Experimental Conditions affecting yeast growth. *Journal of the Institute of Brewing*, 77 (3):253–258. doi:10.1002/j.2050-0416.1971.tb06941.x.
- Hilditch, S., Berghäll, S., Kalkkinen, N., Penttilä, M. und Richard, P. 2007. The missing link in the fungal D-galacturonate pathway: Identification of the L-threo-3-deoxyhexulose aldolase. *Journal of Biological Chemistry*, 282 (36):26.195–26.201. doi:10.1074/jbc.M704401200.
- Hohmann, S. 2002. Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66 (2):300–372. doi:10.1128/mmbr.66.2.300-372.2002.
- Hohnholz, R., Pohlmann, K.J. und Achstetter, T. 2017. Impact of plasmid architecture on stability and yEGFP3 reporter gene expression in a set of isomeric multicopy vectors

- in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101 (23-24):8455–8463. doi:10.1007/s00253-017-8558-0.
- Holtmann, D. und Kochius, S. 2014. Cofactor Regeneration, Electrochemical. In *Encyclopedia of Applied Electrochemistry* (G. Kreysa, K.i. Ota und R.F. Savinell, Hg.), 214–221. Springer New York, New York, NY, 1 Auflage. ISBN 9781441969965. doi:10.1007/978-1-4419-6996-5_255.
- Holyoak, C.D., Stratford, M., McMullin, Z., Cole, M.B., Crimmins, K., Brown, A.J. und Coote, P.J. 1996. Activity of the plasma membrane H⁺-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (9):3158–3164. doi:10.1128/aem.62.9.3158-3164.1996.
- Hong, K.K. und Nielsen, J. 2012. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: A key cell factory platform for future biorefineries. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69 (16):2671–2690. doi:10.1007/s00018-012-0945-1.
- Hou, J., Lages, N.F., Oldiges, M. und Vemuri, G.N. 2009. Metabolic impact of redox cofactor perturbations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 11 (4-5):253–261. doi:10.1016/j.ymben.2009.05.001.
- Hu, Z., He, B., Ma, L., Sun, Y., Niu, Y. und Zeng, B. 2017. Recent Advances in Ergosterol Biosynthesis and Regulation Mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Indian Journal of Microbiology*, 57 (3):270–277. doi:10.1007/s12088-017-0657-1.
- Huisjes, E.H., Luttkik, M.A., Almering, M.J., Bisschops, M.M., Dang, D.H., Kleerebezem, M., Siezen, R., van Maris, A.J. und Pronk, J.T. 2012. Toward pectin fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Expression of the first two steps of a bacterial pathway for D-galacturonate metabolism. *Journal of Biotechnology*, 162 (2-3):303–310. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.10.003.
- Ida, Y., Furusawa, C., Hirasawa, T. und Shimizu, H. 2012. Stable disruption of ethanol production by deletion of the genes encoding alcohol dehydrogenase isozymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113 (2):192–195. doi:10.1016/j.jbiosc.2011.09.019.
- Jacquier, N. und Schneiter, R. 2012. Mechanisms of sterol uptake and transport in yeast. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 129 (1-2):70–78. doi:10.1016/j.jsbmb.2010.11.014.
- Janusz, G., Pawlik, A., Sulej, J., Świdarska-Burek, U., Jarosz-Wilkolazka, A. und Paszczyński, A. 2017. Lignin degradation: Microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 41 (6):941–962. doi:10.1093/femsre/fux049.

-
- Janzen, N.H., Schmidt, M., Krause, C. und Weuster-Botz, D. 2015. Evaluation of fluorimetric pH sensors for bioprocess monitoring at low pH. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38 (9):1685–1692. doi:10.1007/s00449-015-1409-4.
- Jeong, D., Park, H., Jang, B.K., Ju, Y., Shin, M.H., Oh, E.J., Lee, E.J. und Kim, S.R. 2021. Recent advances in the biological valorization of citrus peel waste into fuels and chemicals. *Bioresource Technology*, 323:124.603. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124603.
- Jeong, D., Ye, S., Park, H. und Kim, S.R. 2020. Simultaneous fermentation of galacturonic acid and five-carbon sugars by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 295 (October 2019):122.259. doi:10.1016/j.biortech.2019.122259.
- de Jong, B., Siewers, V. und Nielsen, J. 2012. Systems biology of yeast: Enabling technology for development of cell factories for production of advanced biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 23 (4):624–630. doi:10.1016/j.copbio.2011.11.021.
- Jönsson, L.J. und Martín, C. 2016. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*, 199:103–112. doi:10.1016/j.biortech.2015.10.009.
- Jordá, T. und Puig, S. 2020. Regulation of ergosterol biosynthesis in *saccharomyces cerevisiae*. *Genes*, 11 (7):1–18. doi:10.3390/genes11070795.
- Jordan, P., Choe, J.Y., Boles, E. und Oreb, M. 2016. Hxt13, Hxt15, Hxt16 and Hxt17 from *Saccharomyces cerevisiae* represent a novel type of polyol transporters. *Scientific Reports*, 6:23.502.
- Jouhten, P., Boruta, T., Andrejev, S., Pereira, F. und Rocha, I. 2016. Yeast metabolic chassis designs for diverse biotechnological products. *Nature Publishing Group*, (July):1–9. doi:10.1038/srep29694.
- Jouhten, P. und Penttilä, M. 2014. Anaerobic Carbon Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. In *Introduction to Carbon Metabolism in Yeast* (J. Piškur und C. Compagno, Hg.), Kapitel 3, 57–82. Springer, Berlin, Heidelberg, 1 Auflage. ISBN 9783642550133. doi:10.1007/978-3-642-55013-3.
- Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S. und Tewari, R. 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: A review. *Bioresource Technology*, 77 (3):215–227. doi:10.1016/S0960-8524(00)00118-8.
- Katz, M., Frejd, T., Hahn-Hägerdal, B. und Gorwa-Grauslund, M.F. 2003. Efficient anaerobic whole cell stereoselective bioreduction with recombinant *saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 84 (5):573–582. doi:10.1002/bit.10824.

- Kayikci, Ö. und Nielsen, J. 2015. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 15 (March):1–8. doi:<https://doi.org/10.1093/femsyr/fov068>.
- Kim, J.E., Jang, I.S., Sung, B.H., Kim, S.C. und Lee, J.Y. 2018. Rerouting of NADPH synthetic pathways for increased protopanaxadiol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 8 (1):1–11. doi:[10.1038/s41598-018-34210-3](https://doi.org/10.1038/s41598-018-34210-3).
- Kotyk, a. 1963. Intracellular pH of baker's yeast. *Folia Microbiologica*, 8 (1):27–31.
- Kroutil, W., Mang, H., Edegger, K. und Faber, K. 2004. Recent advances in the biocatalytic reduction of ketones and oxidation of sec-alcohols. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8 (2):120–126. doi:[10.1016/j.cbpa.2004.02.005](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.02.005).
- Kühnel, S., Schols, H.A. und Gruppen, H. 2011. Aiming for the complete utilization of sugar-beet pulp: Examination of the effects of mild acid and hydrothermal pretreatment followed by enzymatic digestion. *Biotechnology for Biofuels*, 4:1–14. doi:[10.1186/1754-6834-4-14](https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-14).
- Kuivanen, J., Dantas, H., Mojzita, D., Mallmann, E., Biz, A., Krieger, N., Mitchell, D. und Richard, P. 2014. Conversion of orange peel to L-galactonic acid in a consolidated process using engineered strains of *aspergillus niger*. *AMB Express*, 4 (1):1–8. doi:[10.1186/s13568-014-0033-z](https://doi.org/10.1186/s13568-014-0033-z).
- Kuivanen, J., Mojzita, D., Wang, Y., Hilditch, S., Penttilä, M., Richard, P. und Wiebe, M.G. 2012. Engineering filamentous fungi for conversion of d-galacturonic acid to L-galactonic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (24):8676–8683. doi:[10.1128/AEM.02171-12](https://doi.org/10.1128/AEM.02171-12).
- Kuivanen, J., Sugai-Guérios, M.H., Arvas, M. und Richard, P. 2016. A novel pathway for fungal D-glucuronate catabolism contains an L-idonate forming 2-keto-L-gulonate reductase. *Scientific Reports*, 6:26.329. doi:[10.1038/srep26329](https://doi.org/10.1038/srep26329).
- Kuorelahti, S., Jouhten, P., Maaheimo, H., Penttilä, M. und Richard, P. 2006. L-galactonate dehydratase is part of the fungal path for D-galacturonic acid catabolism. *Molecular Microbiology*, 61 (4):1060–1068. doi:[10.1111/j.1365-2958.2006.05294.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05294.x).
- Kuorelahti, S., Kalkkinen, N., Penttilä, M., Londesborough, J. und Richard, P. 2005. Identification in the mold *Hypocrea jecorina* of the first fungal D-galacturonic acid reductase. *Biochemistry*, 44 (33):11.234–11.240. doi:[10.1021/bi050792f](https://doi.org/10.1021/bi050792f).
- 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. doi:[10.1007/s00449-007-0195-z](https://doi.org/10.1007/s00449-007-0195-z).
- Lagunas, R. 1986. Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2 (4):221–228. doi:[10.1002/yea.320020403](https://doi.org/10.1002/yea.320020403).

-
- Lawrence, C.L., Botting, C.H., Antrobus, R. und Coote, P.J. 2004. Evidence of a New Role for the High-Osmolarity Glycerol Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Yeast: Regulating Adaptation to Citric Acid Stress. *Molecular and Cellular Biology*, 24 (8):3307–3323. doi:10.1128/mcb.24.8.3307-3323.2004.
- Leijdekkers, A.G.M., Bink, J.P.M., Geutjes, S., Schols, H.A. und Gruppen, H. 2013. Bioresource Technology Enzymatic saccharification of sugar beet pulp for the production of galacturonic acid and arabinose ; a study on the impact of the formation of recalcitrant oligosaccharides. *Bioresource Technology*, 128:518–525. doi: 10.1016/j.biortech.2012.10.126.
- Lemoigne, M., Aubert, J.P. und Millet, J. 1954. Ethyl alcohol production and growth of baker's yeast cultured under aerobic conditions. *Annales de l'Institut Pasteur*, 87 (4):427–39.
- Lemus, M.R., Roussarie, E., Hammad, N., Mougeolle, A., Ransac, S., Issa, R., Mazat, J.P., Uribe-Carvajal, S., Rigoulet, M. und Devin, A. 2018. The role of glycolysis-derived hexose phosphates in the induction of the Crabtree effect. *Journal of Biological Chemistry*, 293 (33):12.843–12.854. doi:10.1074/jbc.RA118.003672.
- Leskovac, V., Trivić, S. und Peričin, D. 2002. The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 2 (4):481–494. doi:10.1016/S1567-1356(02)00157-5.
- Lin, B. und Tao, Y. 2017. Whole-cell biocatalysts by design. *Microbial Cell Factories*, 16 (1):1–12. doi:10.1186/s12934-017-0724-7.
- Lin, Y. und Tanaka, S. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69 (6):627–642. doi: 10.1007/s00253-005-0229-x.
- Liu, J., Li, H., Zhao, G., Caiyin, Q. und Qiao, J. 2018. Redox cofactor engineering in industrial microorganisms: strategies, recent applications and future directions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 45 (5):313–327. doi: 10.1007/s10295-018-2031-7.
- Liu, J., Zhu, Y., Du, G., Zhou, J. und Chen, J. 2013. Exogenous ergosterol protects *Saccharomyces cerevisiae* from d-limonene stress. *Journal of Applied Microbiology*, 114 (2):482–491. doi:10.1111/jam.12046.
- Liu, W. und Wang, P. 2007. Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis. *Biotechnology Advances*, 25 (4):369–384. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.03.002.
- Liu, Z., Ho, S.H., Hasunuma, T., Chang, J.S., Ren, N.Q. und Kondo, A. 2016. Recent advances in yeast cell-surface display technologies for waste biorefineries. *Bioresource Technology*, 215:324–333. doi:10.1016/j.biortech.2016.03.132.

- Löser, C., Schröder, A., Deponte, S. und Bley, T. 2005. Balancing the ethanol formation in continuous bioreactors with ethanol stripping. *Engineering in Life Sciences*, 5 (4):325–332. doi:10.1002/elsc.200520084.
- van Maris, A.J., Abbott, D.A., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M.A., Wisselink, H.W., Scheffers, W.A., van Dijken, J.P. und Pronk, J.T. 2006. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: Current status. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 90 (4):391–418. doi:10.1007/s10482-006-9085-7.
- Marques, C., Tarek, R., Sara, M. und Brar, S. 2016. *Sorbitol Production From Biomass and Its Global Market*. Elsevier Inc. ISBN 9780128029800. doi:10.1016/b978-0-12-802980-0.00012-2.
- Martens-Uzunova, E.S. und Schaap, P.J. 2008. An evolutionary conserved d-galacturonic acid metabolic pathway operates across filamentous fungi capable of pectin degradation. *Fungal Genetics and Biology*, 45 (11):1449–1457. doi:10.1016/j.fgb.2008.08.002.
- Martins, C., Palma, M., Angelov, A., Nevoigt, E., Liebl, W. und Isabel, S. 2021. Complete Utilization of the Major Carbon Sources Present in Sugar Beet Pulp Hydrolysates by the Oleaginous Red Yeasts. *Journal of Fungi*, 7 (215). doi:https://doi.org/10.3390/jof7030215.
- Martins, L.C., Monteiro, C.C., Semedo, P.M. und Sá-Correia, I. 2020. Valorisation of pectin-rich agro-industrial residues by yeasts: potential and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104 (15):6527–6547. doi:10.1007/s00253-020-10697-7.
- Matsubara, T., Hamada, S., Wakabayashi, A. und Kishida, M. 2016. Fermentative production of L-galactonate by using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing the endogenous galacturonate reductase gene from *Cryptococcus diffluens*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 122 (5):639–644. doi:10.1016/j.jbiosc.2016.05.002.
- Micard, V., Renard, C.M. und Thibault, J.F. 1996. Enzymatic saccharification of sugar-beet pulp. *Enzyme and Microbial Technology*, 19 (3):162–170. doi:10.1016/0141-0229(95)00224-3.
- Mira, N.P., Teixeira, M.C. und Sá-Correia, I. 2010. Adaptive response and tolerance to weak acids in *Saccharomyces cerevisiae*: A genome-wide view. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 14 (5):525–540. doi:10.1089/omi.2010.0072.
- Mohd Azhar, S.H., Abdulla, R., Jambo, S.A., Marbawi, H., Gansau, J.A., Mohd Faik, A.A. und Rodrigues, K.F. 2017. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10:52–61. doi:10.1016/J.BBREP.2017.03.003.

-
- Mohnen, D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11 (3):266–277. doi:10.1016/j.pbi.2008.03.006.
- Mordhorst, S. und Andexer, J.N. 2020. Round, round we go-strategies for enzymatic cofactor regeneration. *Natural Product Reports*, 37 (10):1316–1333. doi:10.1039/d0np00004c.
- Nakamura, K., Yamanaka, R., Matsuda, T. und Harada, T. 2003. Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. *Tetrahedron Asymmetry*, 14 (18):2659–2681. doi:10.1016/S0957-4166(03)00526-3.
- Nandy, S.K. und Srivastava, R.K. 2018. A review on sustainable yeast biotechnological processes and applications. *Microbiological Research*, 207 (August 2017):83–90. doi:10.1016/j.micres.2017.11.013.
- Napora, K., Wrodnigg, T.M., Kosmus, P., Thonhofer, M., Robins, K. und Winkler, M. 2013. *Yarrowia lipolytica* dehydrogenase/reductase: An enzyme tolerant for lipophilic compounds and carbohydrate substrates. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23 (11):3393–3395. doi:10.1016/j.bmcl.2013.03.064.
- Narendranath, N.V. und Power, R. 2005. Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (5):2239–2243. doi:10.1128/AEM.71.5.2239-2243.2005.
- Nevoigt, E. 2008. Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72 (3):379–412. doi:10.1128/MMBR.00025-07.
- Nevoigt, E. und Stahl, U. 1997. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 21 (3):231–241. doi:10.1016/S0168-6445(97)00058-2.
- Ng, H.E., Raj, S.S., Wong, S.H., Tey, D. und Tan, H.M. 2008. Estimation of fungal growth using the ergosterol assay: A rapid tool in assessing the microbiological status of grains and feeds. *Letters in Applied Microbiology*, 46 (1):113–118. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02279.x.
- Nielsen, M.K. und Arneborg, N. 2007. The effect of citric acid and pH on growth and metabolism of anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* cultures. *Food Microbiology*, 24 (1):101–105. doi:10.1016/j.fm.2006.03.005.
- OECD 2004. Gluconic Acid and Its Derivatives. Technischer Bericht, OECD, Paris, France.

- Orij, R., Brul, S. und Smits, G.J. 2011. Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1810 (10):933–944. doi:10.1016/j.bbagen.2011.03.011.
- Orij, R., Postmus, J., Beek, A.T., Brul, S. und Smits, G.J. 2009. In vivo measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth. *Microbiology*, 155 (1):268–278. doi:10.1099/mic.0.022038-0.
- Otterstedt, K., Larsson, C., Bill, R.M., Ståhlberg, A., Boles, E., Hohmann, S. und Gustafsson, L. 2004. Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO reports*, 5 (5):532–7. doi:10.1038/sj.embor.7400132.
- Paciello, L., Parascandola, P. und Landi, C. 2014. Auxotrophic *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK strains as new performers in ethanol production. *Chemical Engineering Transactions*, 38 (2011):463–468. doi:10.3303/CET1438078.
- Palmqvist, E. und Hahn-Hägerdal, B. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74 (1):25–33. doi:10.1016/S0960-8524(99)00161-3.
- Pampulha, M.E. und Loureiro-Dias, M.C. 1989. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31 (5-6):547–550. doi:10.1007/BF00270792.
- Pandiyan, K., Singh, A., Singh, S., Saxena, A.K. und Nain, L. 2019. Technological interventions for utilization of crop residues and weedy biomass for second generation bio-ethanol production. *Renewable Energy*, 132:723–741. doi:10.1016/j.renene.2018.08.049.
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A.S. und Hatziloukas, E. 2020. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiology*, 6 (1):1–31. doi:10.3934/microbiol.2020001.
- Passoth, V. 2014. Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism : Bioethanol and Other Biofuels. In *Introduction to Carbon Metabolism in Yeast* (J. Piškur und C. Compagno, Hg.), Kapitel 9, 217–259. Springer, Berlin, Heidelberg, 1 Auflage. ISBN 9783642550133. doi:10.1007/978-3-642-55013-3.
- Perez-Samper, G., Cerulus, B., Jariani, A., Vermeersch, L., Barrajon Simancas, N., Bisschops, M.M., van den Brink, J., Solis-Escalante, D., Gallone, B., De Maeyer, D., van Bael, E., Wenseleers, T., Michiels, J., Marchal, K., Daran-Lapujade, P. und Verstrepen, K.J. 2018. The Crabtree Effect Shapes the *Saccharomyces cerevisiae* Lag Phase during the Switch between Different Carbon Sources. *mBio*, 9 (5):1–18. doi:10.1128/mBio.01331-18.

-
- Pfeiffer, T. und Morley, A. 2014. An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 1 (OCT):1–6. doi:10.3389/fmolb.2014.00017.
- Polakovič, M., Švitel, J., Bučko, M., Filip, J., Neděla, V., Ansorge-Schumacher, M.B. und Gemeiner, P. 2017. Progress in biocatalysis with immobilized viable whole cells: systems development, reaction engineering and applications. *Biotechnology Letters*, 39 (5):667–683. doi:10.1007/s10529-017-2300-y.
- Porro, D., Brambilla, L. und Alberghina, L. 2003. Glucose metabolism and cell size in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 229 (2):165–171. doi:10.1016/S0378-1097(03)00815-2.
- Porro, D. und Branduardi, P. 2017. Production of Organic Acids by Yeasts and Filamentous Fungi. In *Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi* (A.A. Sibirny, Hg.), Kapitel 7, 205–223. Springer, Cham, 1 Auflage. ISBN 9783319588292. doi:10.1007/978-3-319-58829-2.
- Postma, E., Verduyn, C., Scheffers, W.A. und van Dijken, J.P. 1989. Enzymic Analysis of the Crabtree Effect in Glucose-Limited Chemostat Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (2):468–477. doi:https://doi.org/10.1128/AEM.55.2.468-477.1989.
- Pronk, J.T. 2002. Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (5):2095–2100. doi:10.1128/AEM.68.5.2095-2100.2002.
- Pronk, J.T., Steensmays, H.Y. und van Dijken, J.P. 1996. Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12:1607–1633. doi:https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199612)12:16<1607::AID-YEA70>3.0.CO;2-4.
- Protzko, R.J., Hach, C.A., Coradetti, S.T., Hackhofer, M.A., Magosch, S., Thieme, N., Arkin, A.P., Skerker, J.M., Dueber, J.E. und Philipp Benz, J. 2019. Genome-wide and enzymatic analysis reveals efficient D-galacturonic acid metabolism in the basidiomycete yeast *Rhodospidium toruloides*. *bioRxiv*, 4 (6):1–16. doi:10.1101/675652.
- Protzko, R.J., Latimer, L.N., Martinho, Z., de Reus, E., Seibert, T., Benz, J.P. und Dueber, J.E. 2018. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for co-utilization of d-galacturonic acid and d-glucose from citrus peel waste. *Nature Communications*, 9 (1). doi:10.1038/s41467-018-07589-w.
- Pscheidt, B. und Glieder, A. 2008. Yeast cell factories for fine chemical and API production. *Microbial Cell Factories*, 7. doi:10.1186/1475-2859-7-25.
- Ratledge, C. 1991. Yeast physiology — a micro-synopsis. *Bioprocess Engineering*, 6 (5):195–203. doi:10.1007/BF00369712.

- Richard, P. und Hilditch, S. 2009. D-Galacturonic acid catabolism in microorganisms and its biotechnological relevance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82 (4):597–604. doi:10.1007/s00253-009-1870-6.
- Roberts, T.M., Kaltenbach, H.M. und Rudolf, F. 2020. Development and optimisation of a defined high cell density yeast medium. *Yeast*, 37 (5-6):336–347. doi:10.1002/yea.3464.
- Robinson, P.K. 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, 59:1–41. doi:10.1042/BSE0590001.
- Rodrigues, F., Ludovico, P. und Leão, C. 2006. Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism. In *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (G. Péter und C. Rosa, Hg.), Kapitel 6, 101–121. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. ISBN 978-3-540-30985-7. doi:10.1007/3-540-30985-3_6.
- Ryan, O.W., Skerker, J.M., Maurer, M.J., Li, X., Tsai, J.C., Poddar, S., Lee, M.E., DeLoache, W., Dueber, J.E., Arkin, A.P. und Cate, J.H. 2014. Selection of chromosomal DNA libraries using a multiplex CRISPR system. *eLife*, 3 (August2014):1–15. doi:10.7554/eLife.03703.
- Sabina, J. und Johnston, M. 2009. Asymmetric Signal Transduction through Paralogs That Comprise a Genetic Switch for Sugar Sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (43):29.635–29.643. doi:https://doi.org/10.1074/jbc.M109.032102.
- Sarthy, A.V., Schopp, C. und Idler, K.B. 1994. Cloning and sequence determination of the gene encoding sorbitol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 140 (1):121–126. doi:10.1016/0378-1119(94)90741-2.
- Scanes, K.T., Hohmann, S. und Prior, B. 1998. Glycerol production by the yeast *Saccharomyces* and its relevance to wine. 19 (1):8.
- Schaefer, C.A., Silva, V.D., Stambuk, B.U. und Nascimento, M.d.G. 2013. Use of *Saccharomyces cerevisiae* Yeasts in the Chemoselective Bioreduction of (1E,4E)-1,5-Bis(4-Methoxyphenyl)-1,4-Pentadien-3-one in Biphasic System. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24 (7):1116–1122. doi:10.5935/0103-5053.20130140.
- Schäfer, D., Schmitz, K., Weuster-Botz, D. und Benz, J.P. 2020. Comparative evaluation of *Aspergillus niger* strains for endogenous pectin-depolymerization capacity and suitability for d-galacturonic acid production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43 (9):1549–1560. doi:10.1007/s00449-020-02347-z.
- Scherens, B. und Goffeau, A. 2004. The uses of genome-wide yeast mutant collections. *Genome Biology*, 5 (7):1–8. doi:10.1186/gb-2004-5-7-229.

-
- Schmitz, K., Protzko, R., Zhang, L. und Benz, J.P. 2019. Spotlight on fungal pectin utilization—from phytopathogenicity to molecular recognition and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103 (6):2507–2524. doi:10.1007/s00253-019-09622-4.
- Schüller, H.J. und Entian, K. 1997. Glucose repression in yeast. In *Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications* (F. Zimmermann und K. Entian, Hg.), Kapitel 21, 409–434. Lancaster PA : Technomic Pub, 1 Auflage. ISBN 9781566764667.
- Schwede, T. 2013. Protein modeling: What happened to the "protein structure gap"? *Structure*, 21 (9):1531–1540. doi:10.1016/j.str.2013.08.007.
- Shang, F., Wen, S., Wang, X. und Tan, T. 2006. Effect of nitrogen limitation on the ergosterol production by fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 122 (3):285–292. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.11.020.
- Sheldon, R.A., Brady, D. und Bode, M.L. 2020. The Hitchhiker's guide to biocatalysis: Recent advances in the use of enzymes in organic synthesis. *Chemical Science*, 11 (10):2587–2605. doi:10.1039/c9sc05746c.
- Sheldon, R.A. und Woodley, J.M. 2018. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chemical Reviews*, 118 (2):801–838. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00203.
- Sherman, F. 1991. Getting Started with Yeast. *Methods in Enzymology*, 194 (C):3–21. doi:10.1016/0076-6879(91)94004-V.
- Silveira, M. und Jonas, R. 2002. The biotechnological production of sorbitol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59 (4-5):400–408. doi:10.1007/s00253-002-1046-0.
- Singh nee' Nigam, P. und Pandey, A. 2009. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. Springer Netherlands, Dordrecht. ISBN 978-1-4020-9941-0. doi:10.1007/978-1-4020-9942-7.
- Singhania, R.R., Patel, A.K. und Pandey, A. 2017. Biotechnology for Agricultural Waste Recycling. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Solid Waste Management* (J.W.C. Wong, R.D. Tyagi und A. Pandey, Hg.), Kapitel 10, 223–240. Elsevier B.V. ISBN 9780444636751. doi:10.1016/B978-0-444-63664-5.00010-1.
- Sloothaak, J., Schilders, M., Schaap, P.J. und de Graaff, L.H. 2014. Overexpression of the *Aspergillus niger* GatA transporter leads to preferential use of D-galacturonic acid over D-xylose. *AMB Express*, 4 (1):1–9. doi:10.1186/s13568-014-0066-3.
- Sonnleitner, B. und Käppeli, O. 1986. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of a hypothesis. *Biotechnology and Bioengineering*, 28 (6):927–937. doi:10.1002/bit.260280620.

- Souffriau, B., Den Abt, T. und Thevelein, J.M. 2012. Evidence for rapid uptake of d-galacturonic acid in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by a channel-type transport system. *FEBS Letters*, 586 (16):2494–2499. doi:10.1016/j.febslet.2012.06.012.
- Sousa, M.J., Ludovico, P., Rodrigues, F., Leao, C. und Côrte-Real, M. 2012. Stress and Cell Death in Yeast Induced by Acetic Acid. In *Cell Metabolism - Cell Homeostasis and Stress Response*. InTech. doi:10.5772/27726.
- Steensels, J., Snoek, T., Meersman, E., Nicolino, M.P., Voordeckers, K. und Verstrepen, K.J. 2014. Improving industrial yeast strains: Exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiology Reviews*, 38 (5):947–995. doi:10.1111/1574-6976.12073.
- Straathof, A. 2011. The Proportion of Downstream Costs in Fermentative Production Processes. In *Comprehensive Biotechnology*, Band 2, 811–814. Elsevier, second edition Auflage. ISBN 9780080885049. doi:10.1016/B978-0-08-088504-9.00492-X.
- Straathof, A.J., Panke, S. und Schmid, A. 2002. The production of fine chemicals by biotransformations. *Current Opinion in Biotechnology*, 13 (6):548–556. doi:10.1016/S0958-1669(02)00360-9.
- Teixeira, M.C., Mira, N.P. und Sá-Correia, I. 2011. A genome-wide perspective on the response and tolerance to food-relevant stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Opinion in Biotechnology*, 22 (2):150–156. doi:10.1016/j.copbio.2010.10.011.
- Thomson, J.M., Gaucher, E.A., Burgan, M.F., Kee, D.W.D., Li, T., Aris, J.P. und Benner, S.A. 2005. Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. *Nature Genetics*, 37 (6):630–635. doi:https://doi.org/10.1038/ng1553.
- Toscano, M.D., Woycechowsky, K.J. und Hilvert, D. 2007. Minimalist active-site redesign: Teaching old enzymes new tricks. *Angewandte Chemie - International Edition*, 46 (18):3212–3236. doi:10.1002/anie.200604205.
- Tronchoni, J., Gamero, A., Arroyo-López, F.N., Barrio, E. und Querol, A. 2009. Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 134 (3):237–243. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.004.
- Truppo, M.D. 2017. Biocatalysis in the Pharmaceutical Industry: The Need for Speed. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 8 (5):476–480. doi:10.1021/acsmedchemlett.7b00114.
- Turley, D., Evans, G. und Nattrass, L. 2013. Use of sustainably-sourced residue and waste streams for advanced biofuel production in the European Union: rural economic impacts and potential for job creation. A Report for the European Climate Foundation.

-
- Valli, M., Sauer, M., Branduardi, P., Borth, N., Porro, D. und Mattanovich, D. 2005. Intracellular pH distribution in *Saccharomyces cerevisiae* cell populations, analyzed by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (3):1515–1521. doi:10.1128/AEM.71.3.1515-1521.2005.
- Van Der Donk, W.A. und Zhao, H. 2003. Recent developments in pyridine nucleotide regeneration. *Current Opinion in Biotechnology*, 14 (4):421–426. doi:10.1016/S0958-1669(03)00094-6.
- Vandamme, E.J. 2009. Agro-Industrial Residue Utilization for Industrial Biotechnology Products. In *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*, 3–11. Springer Netherlands, Dordrecht. ISBN 9781402099410. doi:10.1007/978-1-4020-9942-7_1.
- Vendruscolo, F., Albuquerque, P.M., Streit, F., Esposito, E. und Ninow, J.L. 2008. Apple pomace: A versatile substrate for biotechnological applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28 (1):1–12. doi:10.1080/07388550801913840.
- Verduyn, C., Stouthamer, A.H., Scheffers, W.A. und Van Dijken, J.P. 1991. A theoretical evaluation of growth yields of yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 59 (1):49–63. doi:10.1007/BF00582119.
- Verduyn, C., Zomerdiijk, T.P., van Dijken, J.P. und Scheffers, W.A. 1984. Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 19 (3):181–185. doi:10.1007/BF00256451.
- Verho, R., Londesborough, J., Penttilä, M. und Richard, P. 2003. Engineering Redox Cofactor Regeneration for Improved Pentose Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (10):5892–5897. doi:10.1128/AEM.69.10.5892-5897.2003.
- Vermeersch, L., Perez-Samper, G., Cerulus, B., Jariani, A., Gallone, B., Voordeckers, K., Steensels, J. und Verstrepen, K.J. 2019. On the duration of the microbial lag phase. *Current Genetics*, 65 (3):721–727. doi:10.1007/s00294-019-00938-2.
- Villadsen, J., Nielsen, J. und Lidén, G. 2011. *Bioreaction Engineering Principles*. Springer US, Boston, MA. ISBN 978-1-4419-9687-9. doi:10.1007/978-1-4419-9688-6.
- Wachtmeister, J. und Rother, D. 2016. Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale. *Current Opinion in Biotechnology*, 42:169–177. doi:10.1016/j.copbio.2016.05.005.
- Wagner, C.R. und Benkovic, S.J. 1990. Site directed mutagenesis: a tool for enzyme mechanism dissection. *Trends in Biotechnology*, 8 (C):263–270. doi:10.1016/0167-7799(90)90189-5.

- Wang, H., Pu, Y., Ragauskas, A. und Yang, B. 2019. From lignin to valuable products—strategies, challenges, and prospects. *Bioresource Technology*, 271 (September):449–461. doi:10.1016/j.biortech.2018.09.072.
- Wang, X., Saba, T., Yiu, H.H., Howe, R.F., Anderson, J.A. und Shi, J. 2017. Cofactor NAD(P)H Regeneration Inspired by Heterogeneous Pathways. *Chem*, 2 (5):621–654. doi:10.1016/j.chempr.2017.04.009.
- Westergaard, S.L., Oliveira, A.P., Bro, C. und Olsson, L. 2007. A Systems Biology Approach to Study Glucose Repression in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 96 (1):134–145. doi:https://doi.org/10.1002/bit.21135.
- Weuster-Botz, D. und Takors, R. 2018. Wachstumskinetik. In *Bioprozesstechnik* (H. Chmiel, R. Takors und D. Weuster-Botz, Hg.), 45–70. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. ISBN 978-3-662-54042-8. doi:10.1007/978-3-662-54042-8_2.
- Wichmann, R. und Vasic-Racki, D. 2005. Cofactor regeneration at the lab scale. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 92:225–260. doi:10.1007/b98911.
- Wieczorke, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C.P. und Boles, E. 1999. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 464 (3):123–128. doi:10.1016/S0014-5793(99)01698-1.
- Woodley, J.M. 2019. Accelerating the implementation of biocatalysis in industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103 (12):4733–4739. doi:10.1007/s00253-019-09796-x.
- Xiao, C., Anderson, C.T., Scheller, H. und Berkeley, L. 2013. Roles of pectin in biomass yield and processing for biofuels. *Frontiers in Plant Science*, 4 (67):1–7. doi:10.3389/fpls.2013.00067.
- Yang, G., Tan, H., Li, S., Zhang, M., Che, J., Li, K., Chen, W. und Yin, H. 2020. Application of engineered yeast strain fermentation for oligogalacturonides production from pectin-rich waste biomass. *Bioresource Technology*, 300 (December 2019):122.645. doi:10.1016/j.biortech.2019.122645.
- Yazmin, J. und Saab-Rinco, G. 2013. Site-Directed Mutagenesis as Applied to Biocatalysts. *Genetic Manipulation of DNA and Protein - Examples from Current Research*. doi:10.5772/53330.
- Zema, D.A., Calabrò, P.S., Folino, A., Tamburino, V., Zappia, G. und Zimbone, S.M. 2018. Valorisation of citrus processing waste: A review. *Waste Management*, 80:252–273. doi:10.1016/j.wasman.2018.09.024.

Zhang, J., Li, J.B., Wu, S.B. und Liu, Y. 2013. Advances in the catalytic production and utilization of sorbitol. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 52 (34):11.799–11.815. doi:10.1021/ie4011854.

Żyłańczyk-duda, E., Żyłańczyk-duda, E., Klimek-ochab, M., Zerka, A. und Zerka, A. 2017. Yeast as a Versatile Tool in Biotechnology. In *Yeast - Industrial Applications* (A. Morata und I. Loira, Hg.), Kapitel 1, 3–40. InTechOpen, 1 Auflage. doi:10.5772/intechopen.70130.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Cofaktor-Regenerierung mit Glukose als Co-Substrat.	5
2.2	Cofaktor-Regenerierung mit Sorbitol als Co-Substrat.	6
3.1	Lichtmikroskopische Aufnahme sprossender Hefezellen.	10
3.2	Wachstumskurve von Mikroorganismen im Satzverfahren.	12
3.3	Zentraler Kohlenstoffwechsel	14
3.4	Beispiele des Einsatzes von <i>S. cerevisiae</i> in der Biotechnologie.	20
3.5	Zuckerrübenschnitzelzusammensetzung (Trockensubstanz) nach Micard et al. (1996)	25
3.6	Schematische Darstellung des D-GalA-Katabolismus in <i>A. niger</i>	26
3.7	Substrat-gekoppelter und Enzym-gekoppelter Ansatz der Cofaktor-Regenerierung.	31
4.1	Strukturhomologiemodell von AnGar1 mit Co-Faktor.	39
4.2	Versuchsstand für Experimente in miniaturisierten Rührkesselreaktoren.	46
4.3	Versuchsstand für Experimente im parallelen Bioreaktorsystem.	48
4.4	Versuchsstand für Experimente im Rührkesselreaktor im Liter-Maßstab.	50
4.5	Ethanolverdunstungsraten bei Prozessen in unterschiedlichen Rührkesselreaktoren.	52
5.1	Vergleichende Satzkultivierung des parentalen <i>S. cerevisiae</i> Stamms CEN.PK2-1C	60
5.2	Satzkultivierung des rekombinanten <i>S. cerevisiae</i> Stammes SiHY027 mit Glukose.	63
5.3	Kohlenstoffbilanz der Satzkultivierung von <i>S. cerevisiae</i> SiHY027 mit Glukose.	64
5.4	Vergleichende Satzkultivierung der rekombinanten <i>S. cerevisiae</i> Stämme SiHY040 und SiHY041 mit Glukose	67

5.5	Vergleichende Satzkultivierung der rekombinanten <i>S. cerevisiae</i> Δ adh1-Stämme SiHY036 und SiHY037	70
5.6	Vergleichende Satzkultivierung der rekombinanten <i>S. cerevisiae</i> Stämme SiHY058 und SiHY059	74
5.7	Einfluss von D-GalA auf das Wachstum des rekombinanten <i>S. cerevisiae</i> Stammes SiHY040 mit Glukose	77
5.8	Vergleichende Satzkultivierung der rekombinanten <i>S. cerevisiae</i> Stämme SiHY001, SiHY030 und SiHY032 mit Sorbitol	81
5.9	Kohlenstoffbilanz der Satzkultivierung von <i>S. cerevisiae</i> Stämmen mit Sorbitol.	83
5.10	Einfluss des pHs auf die Biotransformation mit Sorbitol.	87
5.11	Einfluss der Sorbitolkonzentration auf die Biotransformation.	90
5.12	Intermittierende Zugabe von Sorbitol.	93
5.13	Ausbeutekoeffizienten bei intermittierenden Zugabe von Sorbitol.	94
5.14	Einfluss der Zusammensetzung des SC-Mediums.	96
5.15	Kombination von Einflussgrößen	100
5.16	Kohlenstoffbilanz der Satzkultivierung von <i>S. cerevisiae</i> SiHY001 mit Kombination von Ergebnissen.	101
5.17	Satzkultivierung des rekombinanten <i>S. cerevisiae</i> Stammes SiHY027 mit Glukose.	104
5.18	Kohlenstoffbilanz der Satzkultivierung von <i>S. cerevisiae</i> SiHY027 mit Glukose und Sorbitol.	105
5.19	Satzprozesse mit unterschiedlichen Pufferbestandteilen des Hydrolysats.	107
5.20	Einfluss von Pufferbestandteilen des Hydrolysats auf das Wachstum von <i>S. cerevisiae</i>	108
5.21	Zusammensetzung des Zuckerrübenschnitzelhydrolysats.	110
5.22	Biotransformation mit Zuckerrübenschnitzelhydrolysat.	111
5.23	Mikroskopische Aufnahmen des Satzprozess mit ungeklärtem Zuckerrübenschnitzelhydrolysat.	113

5.24 Biotransformation mit <i>S. cerevisiae</i> SiHY001 mit ungeklärtem Zuckerrübenschnitzelhydrolysat.	114
5.25 Stoffkonzentrationen in ungeklärtem Zuckerrübenschnitzelhydrolysat. . .	114
6.1 Biotransformation mit Zuckerrübenschnitzelhydrolysat.	123
9.1 Kohlenstoffbilanz der Satzkultivierung von <i>S. cerevisiae</i> SiHY040 mit Glukose.	171
9.2 Kohlenstoffbilanz der Satzkultivierung von <i>S. cerevisiae</i> SiHY041 mit Glukose.	171
9.3 Kohlenstoffbilanz der Satzkultivierung von <i>S. cerevisiae</i> SiHY036 mit Glukose.	172
9.4 Kohlenstoffbilanz der Satzkultivierung von <i>S. cerevisiae</i> SiHY037 mit Glukose.	172
9.5 Kohlenstoffbilanz der Satzkultivierung von <i>S. cerevisiae</i> SiHY057 mit Glukose.	173
9.6 Kohlenstoffbilanz der Satzkultivierung von <i>S. cerevisiae</i> SiHY058 mit Glukose.	173
9.7 Kohlenstoffbilanz der Satzkultivierung von <i>S. cerevisiae</i> SiHY040 ohne D-GalA.	174
9.8 Kohlenstoffbilanz der Satzkultivierung von <i>S. cerevisiae</i> SiHY001 bei pH 3.175	
9.9 Kohlenstoffbilanz der Satzkultivierung von <i>S. cerevisiae</i> SiHY001 bei pH 3,5.	175
9.10 Kohlenstoffbilanz der Satzkultivierung von <i>S. cerevisiae</i> SiHY001 bei pH 4.176	
9.11 Kohlenstoffbilanz der Satzkultivierung von <i>S. cerevisiae</i> SiHY001 bei pH 4,5.	176
9.12 Kohlenstoffbilanz der Satzkultivierung von <i>S. cerevisiae</i> SiHY001 mit 2 % (w/v) Sorbitol.	177
9.13 Kohlenstoffbilanz der Satzkultivierung von <i>S. cerevisiae</i> SiHY001 mit 4 % (w/v) Sorbitol.	177
9.14 Kohlenstoffbilanz der Satzkultivierung von <i>S. cerevisiae</i> SiHY001 mit 10 % (w/v) Sorbitol.	178

9.15 Kohlenstoffbilanz der Satzkultivierung von <i>S. cerevisiae</i> SiHY001 mit intermittierender Sorbitol Zugabe.	178
9.16 Kohlenstoffbilanz der Satzkultivierung von <i>S. cerevisiae</i> SiHY001 mit veränderter Medienzusammensetzung.	179
9.17 Kohlenstoffbilanz der Satzkultivierung von <i>S. cerevisiae</i> SiHY001 mit veränderter Medienzusammensetzung.	179
9.18 Kohlenstoffbilanz der Satzkultivierung von <i>S. cerevisiae</i> SiHY001 mit Zuckerrübenschnitzelhydrolysat.	180

Tabellenverzeichnis

3.1	Übersicht unterschiedlicher mit <i>S. cerevisiae</i> hergestellter Produkte.	21
3.2	Einsatzspektrum von Enzymen in industriellen Prozessen nach Robinson (2015).	29
4.1	Verwendete rekombinante <i>S. cerevisiae</i> Stämme	41
4.2	Zusammensetzung des synthetischen Komplettmediums (SC-Medium).	42
4.3	Zusammensetzung der Reaktionsmedien im Rührkesselreaktor.	43
5.1	Berechnete Ausbeutekoeffizienten von Satzprozessen auf Sorbitol.	82
5.2	Berechnete Ausbeutekoeffizienten von <i>S. cerevisiae</i> SiHY001 bei unterschiedlichen pH.	86
5.3	Berechnete Ausbeutekoeffizienten von <i>S. cerevisiae</i> SiHY001 bei unterschiedlichen Sorbitolkonzentrationen.	89
5.4	Berechnete Ausbeutekoeffizienten von <i>S. cerevisiae</i> SiHY001 bei unterschiedlichen Einflussgrößen.	101
9.1	Liste verwendeter Chemikalien mit Artikelnummer und Hersteller.	159
9.2	Liste verwendeter Verbrauchsmittel mit Artikelnummer und Hersteller.	161
9.3	Liste der Rührkesselreaktoren im Labormaßstab.	162
9.4	Verwendete Geräte zur HPLC-Analytik.	163
9.5	Verwendete allgemeine Laborgeräte.	164
9.6	Zusammensetzung von PBS.	165
9.7	Zusammensetzung des 50 x Aminosäure-Mix.	166
9.8	Zusammensetzung des Trockenkulturmediums.	167
9.9	Zusammensetzung der Reaktionsmedien im Rührkesselreaktor.	168
9.10	Zusammensetzung der Nachdosierungen.	168

9.11 Zusammensetzung der Reaktionsmedien zur Untersuchung des Puffereinfluss.	169
9.12 Zusammensetzung des Lysepuffers.	169

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

1,3BPG	1,3-Bisphosphoglycerat
2PG	2-Phosphoglycerat
3PG	3-Phosphoglycerat
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
ADP	Adenindiphosphat
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
API	aktiver pharmazeutischer Wirkstoff (<i>active pharmaceutical ingredient</i>)
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
ATP	Adenintriphosphat
BTM	Biotrockenmasse
CoA	Coenzym A
<i>C. diffluens</i>	<i>Cryptococcus diffluens</i>
D-GalA	D-Galakturonsäure
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DLR	Dual-Lifetime-Referencing
DVB	Divinylbenzol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
F1,6bP	Fruktose-1,6-bisphosphat
F6P	Fruktose-6-phosphat
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid, (oxidiert)
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
G6P	Glukose-6-phosphat
GA-3-P	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GDP	Guanosindiphosphat
GgL	Galaktono-1,4-lakton
GTP	Guanosintriphosphat
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
L-GalOA	L-Galaktonat
min	Minute
MTP	Mikrotiterplatte
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid (oxidiert)

NADH	Nikotinamidadenindinukleotid (reduziert)
NADP ⁺	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidiert)
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
OD	optische Dichte
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PEP	Phosphoenolpyruvat
pI	isoelektrischer Punkt
pK _s	Säuredissoziationskonstante
RI-Detektor	Brechungsindex-Detektor (<i>refractive index detector</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute
RZB	Relative Zentrifugalbeschleunigung
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC-Medium	synthetisches Komplettmedium (<i>synthetic complete medium</i>)
SDH	Sorbitol-Dehydrogenase
SV	Säulenvolumen
TCA	Tricarbonsäurezyklus
<i>T. reseei</i>	<i>Trichoderma reseei</i>
VE-Wasser	voll entsalztes Wasser
vvm	Volumen Luft pro Volumen Kulturmedium pro Minute
<i>Y. lipolytica</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>

9 Anhang

9.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien

Tabelle 9.1: Liste verwendeter Chemikalien mit Artikelnummer und Hersteller.

Komponente	Artikelnummer	Hersteller
Adenin	3025.2	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Agar – Agar	5210.1	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Antifoam 204	A6426-1KG	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ammonium sulphate	7783-20-2	NeoFroxx GmbH
Ampicillin	HP62.1	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
D-(+)-Galacturonsäure Mono-hydrat	48280	Sigma Aldrich, Taufkirchen Deutschland
Difco™ Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren	291940	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	P030.1	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
D-Sorbit	3783.5	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	3783.5	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	3904.1	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydroxid	LC-7900.3	neoLab Migge Laborbedarf Vertriebs GmbH, Heidelberg
Kanamycinsulfat	T832.2	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
L-Arginin	1655.1	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 9.1: Fortsetzung der Liste verwendeter Chemikalien mit Artikelnummer und Hersteller.

Komponente	Artikelnummer	Hersteller
L-Histidin	1696.1	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
L-Isoleucin	1698.1	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
L-Leucin	1699.1	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
L-Lysin monohydrate	4207.1	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
L-Methionin	9359.1	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
L-Phenylalanin	1709.1	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
L-Threonin	1738.1	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
L-Tryptophan	1739.1	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
L-Tyrosin	1741.1	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
L-Valin	1742.1	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Uracil	7288.2	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland

Verbrauchsmaterial

Tabelle 9.2: Liste verwendeter Verbrauchsmittel mit Artikelnummer und Hersteller.

Verbrauchsmaterial	Artikelnummer	Hersteller
Cellstar™ Tubes	227261	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Spitzenaufsatzfilter / - CHRO-MAFIL RC20/15 MS	729036	Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren, Deutschland
Küvetten (1 mL)	2712120	Rationlab GmbH, Dreieich, Deutschland
HPLC Vials N11 (1,5 mL)	70201HP	Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren, Deutschland
HPLC Inserts (0,2 mL)	702813	Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren, Deutschland
Pipettenspitzen 200 µL		Gilson, Inc, Middleton, USA
Pipettenspitzen 1000 µL		Gilson, Inc, Middleton, USA
Plastikröhrchen 15 mL	188 261	Greiner Bio-One GmbH
Plastikröhrchen 50 mL	210 261	Greiner Bio-One GmbH
Vakuumfilter/Express™ PLUS (0,22 µm)	S2GPT02RE	Merck Millipore, Burlington, USA
Transferpipette BRAND™	100 µL	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland
Transferpipette BRAND™	200 µL	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland
Transferpipette BRAND™	1000 µL	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland
Transferpipette BRAND™	10000 µL	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland

9.2 Geräte

Bioreaktoren

Tabelle 9.3: Liste der Rührkesselreaktoren im Labormaßstab.

Geräte	Hersteller
DasGip®-System	DASGIP GmbH, Jülich, Deutschland
Steuerungseinheit CWD4	DASGIP GmbH, Jülich, Deutschland
Labfors 2 Glasrührkessel	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
Steuereinheit Labfors 2	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
BioREAKTOR 48	2mag, München, Deutschland
Rührerkontrolleinheit	2mag, München, Deutschland
Laborroboter/MICROLAB STAR™LetM	Hamilton Bonaduz AG, Kanton, Schweiz
Thermostat Reaktor Loop L 250	LAUDA, Lauda-Königshofen, Deutschland

Regelung der Bioreaktoren

Folgende Sequenz wurde als Regelung für die Kultivierungen im Rührkesselreaktor im Litermaßstab (Labfors 2, Infors HT, Schweiz) verwendet, um die Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium während des Prozesses über 30 % zu halten:

```
#0, initial_settings, 30
Stirrer.sp=200
Temp.sp=30
Flow.sp=0.6
pH.sp=5.0
if(seq_time>60) seq=1
#1, Feed_phase, 30
//Der pO2 wird oberhalb von etwa 30 % gehalten
if pO2.v<30 Stirrer.sp=Stirrer.sp+100
if (Stirrer.sp>800) Stirrer.sp=800
```

Folgende Sequenz wurde als Regelung für die Kultivierungen im Rührkesselreaktor im Litermaßstab (DASGIP GmbH, Jülich, Deutschland) verwendet, um die Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium während des Prozesses über 30 % zu halten:

```
FunctionCode=p.SampleTime = 300
if p.InoculationTime_H > 1 and p.DOPV < 35 and p.NSP <= 550 then
p.NSP = p.NSP + 50
p.LogMessage(Stirrer speed + 50 rpm")
```

HPLC-Analytik

Für die Messung von Konzentrationen von Metaboliten in Fermentationsmedien wurden unterschiedliche HPLC-Systeme verwendet. Für jede Messung wurden entsprechende Konzentrations-Standardreihen der einzelnen zu messenden Metabolite gemessen, um die Konzentrationen der Metabolite in den Proben ermitteln zu können.

Tabelle 9.4: Verwendete Geräte zur HPLC-Analytik.

Geräte	Hersteller
HPLC Anlage / Agilent 1100 Series	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
HPLC Säule / Aminex HPX-87H	Bio-Rad, München, Deutschland
HPLC UV/Vis Detektor 3300	KFA Jülich GmbH, Jülich, Deutschland
HPLC RI Detektor SPD-20A	Shimadzu, Kyoto, Japan
HPLC Anlage LC-2030C Plus	Shimadzu, Kyoto, Japan
HPLC RI Detektor RID-20A	Shimadzu, Kyoto, Japan

Allgemeine Laborgeräte

Tabelle 9.5: Verwendete allgemeine Laborgeräte.

Geräte	Hersteller
Analytische Waage 5 g - 32 kg	OHAUS Explorer, Nänikon, Schweiz
Analytische Waage 10 mg - 210 g	OHAUS Explorer, Nänikon, Schweiz
Autoklav / Systec VX-150	Systec GmbH, Nürnberg, Deutschland
Autoklav / Variklav 500 E	HP Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Feinwaage Extend	Satorius AG, Göttingen, Deutschland
Lab 850 Präzisions-pH-Meter	Schott Instruments, Mainz, Deutschland
Magnetrührer / NeoMag D-6010	neoLabLine, Heidelberg, Deutschland
Membran-Vakuumpumpe	KNF-Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland
Mikroskop / Axiola drb KT	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikrotiterplatten - Photomerter Multiscan FC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Schüttelinkubatro Multitron	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
Standzentrifuge / Rotixa 50 RS	Hettich GmbH Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Sterilbank / Waldner Tischabzug	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co.KG, Bensheim, Deutschland
Trockenschrank	Memmert, Büchenbach, Deutschland
UV/VIS-Spektralphotometer Genesys10S	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge Eppendorf 5424 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Mikro Rotana 460R	Hettich GmbH Co.KG, Tuttlingen, Deutschland

9.3 Medien, Puffer und Medienzusätze

Die Zusammensetzung aller Medien und ihrer Zusätze, sowie verwendeter Puffer ist im Folgenden gelistet.

PBS

Tabelle 9.6 listet die Zusammensetzung des 1 x PBS auf. Dieser wurde filtriert und bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 9.6: Zusammensetzung von PBS.

Komponente	Einwaage
NaCl	8 g L ⁻¹
KCl	0,2 g L ⁻¹
Na ₂ HPO ₄	1,44 g L ⁻¹
KH ₂ HPO ₄	0,24 g L ⁻¹

Aminosäure-Mix

Zum Wachstum auxotropher *S. cerevisiae* Stämme in SC-Medium wurde diesem ein Aminosäure-Mix zugesetzt (Tabelle 9.7). Dieser wurde als 50-fache Stammlösung angesetzt, sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 9.7: Zusammensetzung des 50 x Aminosäure-Mix.

Komponente	Konzentration, g L⁻¹	Konzentration, mM
Adenin	0,56	0,42
Arginin	1,92	1,11
Methionin	1,92	1,29
Tyrosin	0,72	0,40
Isoleucin	2,88	2,20
Lysin*H ₂ O	3,23	1,97
Phenylalanin	2,40	1,46
Valin	2,88	2,46
Threonin	2,88	2,42
auxotrophe Aminosäuren		
Uracil	0,96	0,86
Histidin	0,96	0,62
Tryptophan	0,95	0,47
Leucin	2,88	2,20

Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfate

Die kommerziell erhältliche Trockengrundlage des SC-Medium hatte die folgende Zusammensetzung wie vom Hersteller angegeben (Tabelle 9.8). Normalerweise wurde die 1-fache Menge (1,7 g) für einen Liter Medium eingewogen, auf die sich alle Vervielfachung bei unterschiedlichen Medien beziehen.

Tabelle 9.8: Zusammensetzung des Trockenkulturmediums (YNB) von BD Difco™ auf Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfate

Komponente	Konzentration, mg L ⁻¹
Biotin	0,002
Calcium Pantothenat	0,400
Folsäure	0,002
Inositol	2
Niacin	0,400
P-Aminobenzoessäure	0,200
Pyridoxin Hydrochlorid	0,400
Riboflavin	0,200
Thiamin-Hydrochlorid	0,400
Borsäure	0,500
Kupfersulfat	0,040
Kaliumjodid	0,100
Eisenchlorid	0,200
Mangansulfat	0,400
Natriummolybdat	0,200
Zinksulfat	0,400
KH ₂ PO ₄	1000
MgSO ₄	500
NaCl	100
CaCl ₂	100

Unterschiedliche Reaktionsmedien für Kultivierungen im Rührkesselreaktor

Zur Biotransformation in Rührkesselreaktoren wurde, wenn im Ergebnisteil angemerkt, abgewandeltes SC-Medium verwendet (Tabelle 4.2). Dieses unterschied sich meistens in der Konzentration des Co-Substrats (Sorbitol, Glukose) bzw. des Edukts D-GalA. Weitere Modifikationen sind in den nachfolgenden Tabellen gelistet.

Tabelle 9.9 listet die Medienzusammensetzung der Biotransformation im Rührkesselreaktor aus Abschnitt 5.3.5 auf.

Tabelle 9.9: Zusammensetzung der Reaktionsmedien im Rührkesselreaktor.

Komponente	1xSC	10xAA	10xSC	5xAA	10xSC	10xAA
YNB, g L ⁻¹	1,7		17		17	
(NH ₄) ₂ SO ₄ , g L ⁻¹	10		10		10	
Medienbestandteil						
Aminosäure-Mix	5x		10x		10x	

Tabelle 9.10 listet die Medienzusammensetzung der Nachdosierungen aus Abschnitt 5.3.6 auf für ein Reaktionsvolumen von 1,2 L.

Tabelle 9.10: Zusammensetzung der Nachdosierungen.

Komponente	1. Nachdosierung	1. Nachdosierung
Sorbitol	200 g L ⁻¹	200 g L ⁻¹
D-GalA	-	100 g L ⁻¹
YNB	17 g L ⁻¹	17 g L ⁻¹
Volumen der Zugabe	60 mL	120 mL

Tabelle 9.11 listet die Medienzusammensetzung der Untersuchung zum Einfluss unterschiedlicher Pufferkomponenten aus Abschnitt 5.4.2 auf für ein Reaktionsvolumen von 10 mL.

Tabelle 9.11: Zusammensetzung der Reaktionsmedien zur Untersuchung des Puffereinfluss. Na = Natrium, Cit = Citrat, K = Kalium, Ac = Acetat. Das Reaktionsvolumen der Rührkesselreaktoren betrug 10 mL.

Komponente	Konzentration Stammlösung	Konzentration im Medium
YNB	17 g L ⁻¹	1,7 g L ⁻¹
Aminosäure-Mix	50 x	5x
NaCit/KCit/NaAc/KAc	1 M	je nach Konzentration im Reaktionsansatz (50 - 100 mM)
Sorbitol	200 g L ⁻¹	10 g L ⁻¹
VE-H ₂ O	-	je nach Volumen auf V _R = 10 mL aufgefüllt

Lyse-Puffer für Enzymaktivitätsbestimmung aus Zelllysat

Der Lysepuffer wurde nach Çağlayan und Wilson (2014) hergestellt, sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 9.12: Zusammensetzung des Lysepuffers zur Bestimmung der Enzymaktivität in Zelllysat.

Komponente	Konzentration, mM
Tris-HCl (pH 7,5)	25
EDTA	1
NaCl	100
β -Mercaptoethanol	10
Protease-Inhibitor	1

9.4 Datenanhänge

MatLab-Skript zur Integration der Kohlenstoffdioxidbildungsrate

Folgendes MatLab-Skript wurde zur Integration der auf das Reaktionsvolumen (V_R) normierten Kohlenstoffdioxidbildungsrate (CER) in Satzprozessen mit *S. cerevisiae* verwendet:

```
clear n;
clear Sammel;

% X und Y nach erstem Durchlaufen des Skripts mit % auskommentieren

X=0;           %In X die Zeitdaten ablegen
Y=0;           %In Y die CER*VR Daten ablegen

Sammel = zeros(length(X),1);
for n=2:size(X)
Sammel(n)=trapz(X(1:n,1),Y(1:n,1));
end
plot(Sammel);
```

Kohlenstoffbilanzen zu Biotransformation mit mutierten D-GalA-Reduktasen mit Glukose

Kohlenstoffbilanzen zu Satzprozessen in Abschnitt 5.2.1.

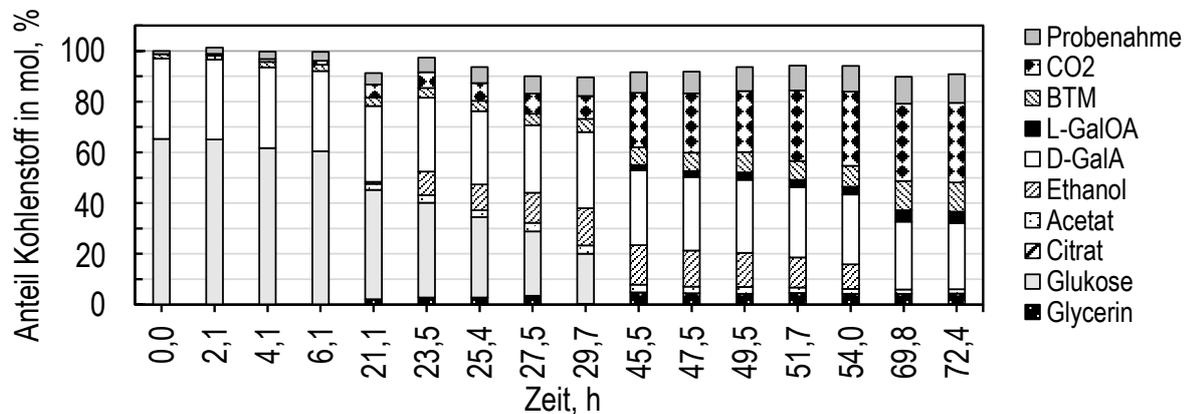


Abbildung 9.1: Kohlenstoffbilanz der einzelnen Probenahmezeitpunkte der Satzkultivierung von *S. cerevisiae* SiHY040 mit 1 % (w/v) Glukose und 0,5 % (w/v) D-GalA in SC-Medium im kontrollierten Rührkesselbioreaktor. Die Balken stellen die Anteile an Gesamtkohlenstoff dar, die im Prozessverlauf zu den gegebenen Probenahme-Zeitpunkten in Form der jeweiligen Komponenten vorlagen. Die Bilanz konnte zu über 90 % geschlossen werden.

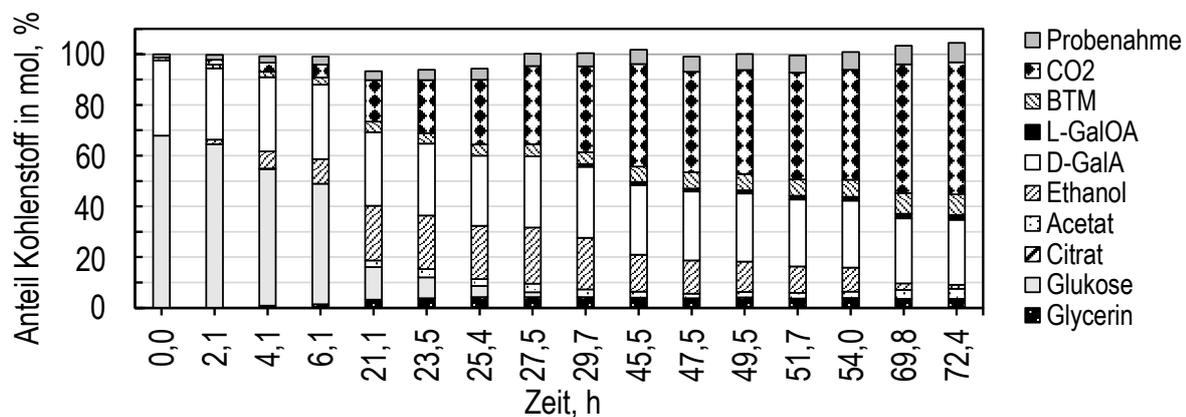


Abbildung 9.2: Kohlenstoffbilanz der einzelnen Probenahmezeitpunkte der Satzkultivierung von *S. cerevisiae* SiHY041 mit 1 % (w/v) Glukose und 0,5 % (w/v) D-GalA in SC-Medium im kontrollierten Rührkesselbioreaktor. Die Balken stellen die Anteile an Gesamtkohlenstoff dar, die im Prozessverlauf zu den gegebenen Probenahme-Zeitpunkten in Form der jeweiligen Komponenten vorlagen. Die Bilanz konnte zu über 90 % geschlossen werden.

Kohlenstoffbilanzen zu Biotransformation mit $\Delta adh1$ -Stämmen mit Glukose

Kohlenstoffbilanzen zu Satzprozessen in Abschnitt 5.2.1.

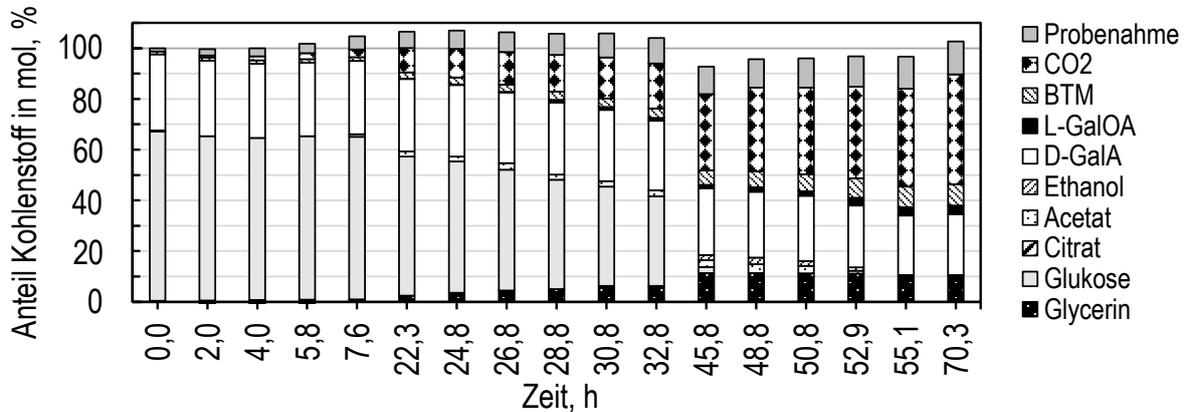


Abbildung 9.3: Kohlenstoffbilanz der einzelnen Probenahmezeitpunkte der Satzkulturierung von *S. cerevisiae* SiHY036 mit 1 % (w/v) Glukose und 0,5 % (w/v) D-GalA in SC-Medium im kontrollierten Rührkesselbioreaktor. Die Balken stellen die Anteile an Gesamtkohlenstoff dar, die im Prozessverlauf zu den gegebenen Probenahme-Zeitpunkten in Form der jeweiligen Komponenten vorlagen. Die Bilanz zu über 90 % geschlossen werden.

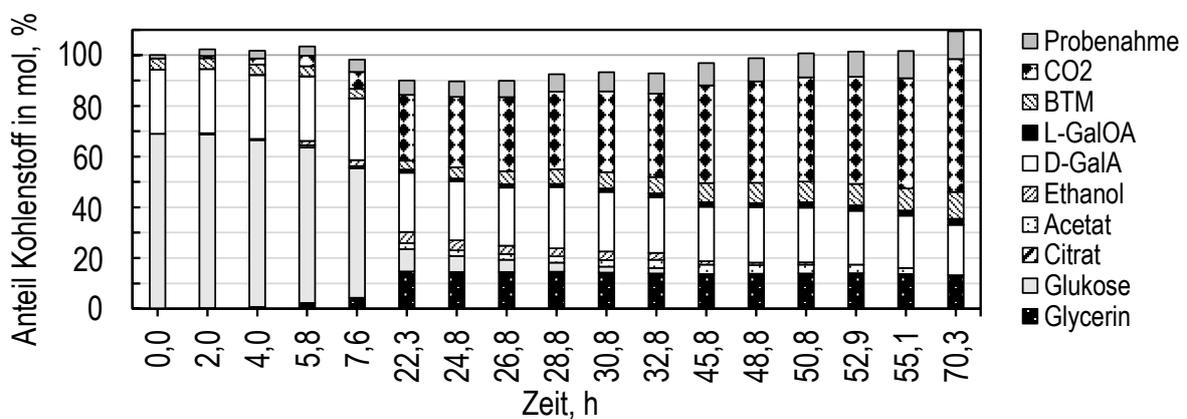


Abbildung 9.4: Kohlenstoffbilanz der einzelnen Probenahmezeitpunkte der Satzkulturierung von *S. cerevisiae* SiHY037 mit 1 % (w/v) Glukose und 0,5 % (w/v) D-GalA in SC-Medium im kontrollierten Rührkesselbioreaktor. Die Balken stellen die Anteile an Gesamtkohlenstoff dar, die im Prozessverlauf zu den gegebenen Probenahme-Zeitpunkten in Form der jeweiligen Komponenten vorlagen. Die Bilanz konnte zu über 90 % geschlossen werden.

Kohlenstoffbilanzen zu Biotransformation mit mehrfach integrierten D-GalA-Reduktasen mit Glukose

Kohlenstoffbilanzen zu Satzprozessen in Abschnitt 5.2.1.

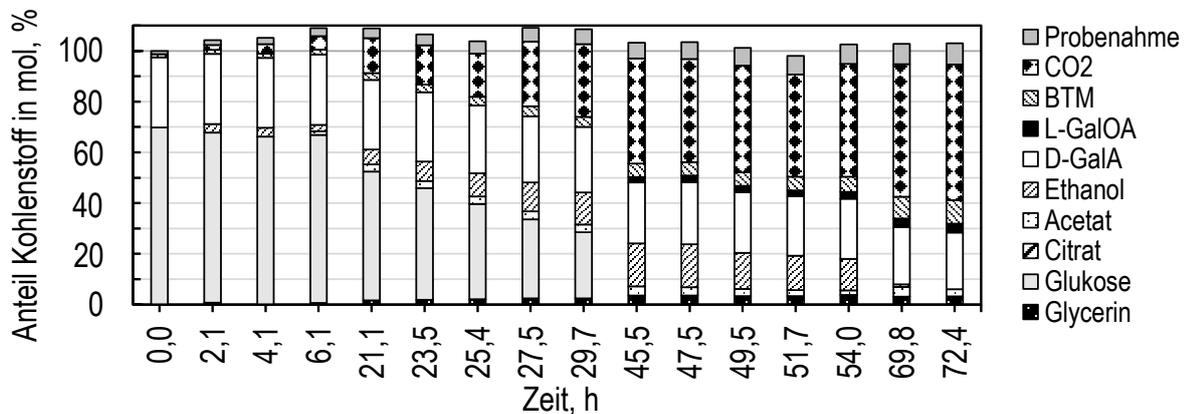


Abbildung 9.5: Kohlenstoffbilanz der einzelnen Probenahmezeitpunkte der Satzkultivierung von *S. cerevisiae* SiHY057 mit 1 % (w/v) Glukose und 0,5 % (w/v) D-GalA in SC-Medium im kontrollierten Rührkesselbioreaktor. Die Balken stellen die Anteile an Gesamtkohlenstoff dar, die im Prozessverlauf zu den gegebenen Probenahme-Zeitpunkten in Form der jeweiligen Komponenten vorlagen. Die Bilanz zu über 90 % geschlossen werden.

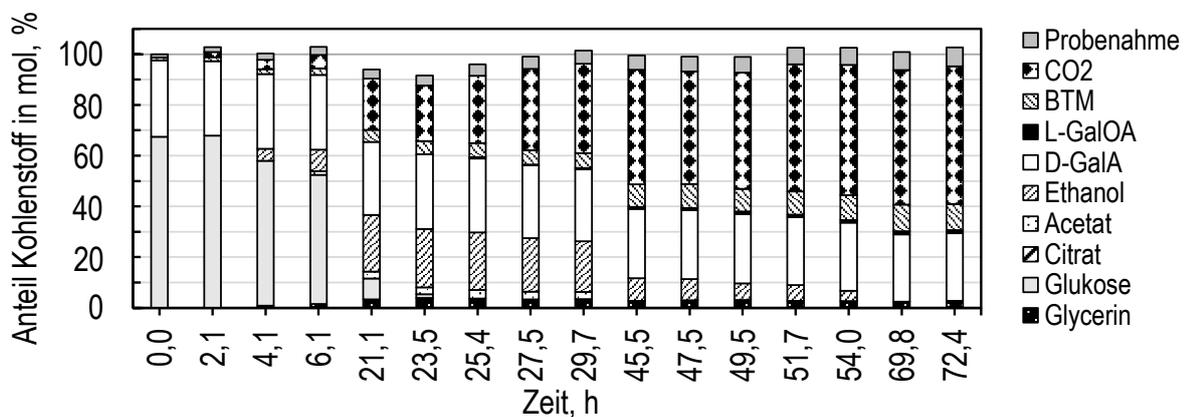


Abbildung 9.6: Kohlenstoffbilanz der einzelnen Probenahmezeitpunkte der Satzkultivierung von *S. cerevisiae* SiHY058 mit 1 % (w/v) Glukose und 0,5 % (w/v) D-GalA in SC-Medium im kontrollierten Rührkesselbioreaktor. Die Balken stellen die Anteile an Gesamtkohlenstoff dar, die im Prozessverlauf zu den gegebenen Probenahme-Zeitpunkten in Form der jeweiligen Komponenten vorlagen. Die Bilanz konnte zu über 90 % geschlossen werden.

Kohlenstoffbilanzen zu Biotransformation ohne D-GalA

Kohlenstoffbilanz zum Satzprozess in Abschnitt 5.2.2.

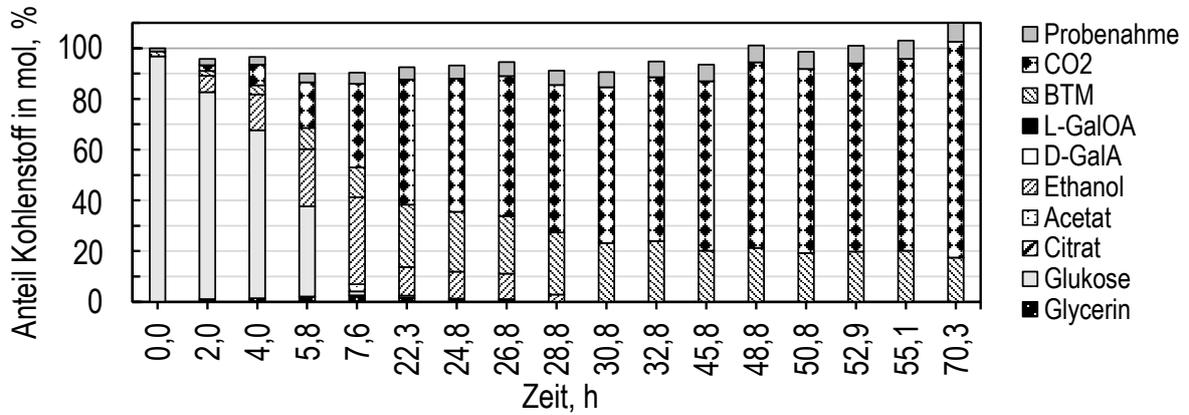


Abbildung 9.7: Kohlenstoffbilanz der einzelnen Probenahmezeitpunkte der Satzkultivierung von *S. cerevisiae* SiHY040 mit 1 % (w/v) Glukose und ohne D-GalA in SC-Medium im kontrollierten Rührkesselbioreaktor. Die Balken stellen die Anteile an Gesamtkohlenstoff dar, die im Prozessverlauf zu den gegebenen Probenahme-Zeitpunkten in Form der jeweiligen Komponenten vorlagen. Die Bilanz konnte zu über 90 % geschlossen werden.

Kohlenstoffbilanzen zu Biotransformationen bei unterschiedlichem pH

Kohlenstoffbilanzen zu Satzprozessen in Abschnitt 5.3.2.

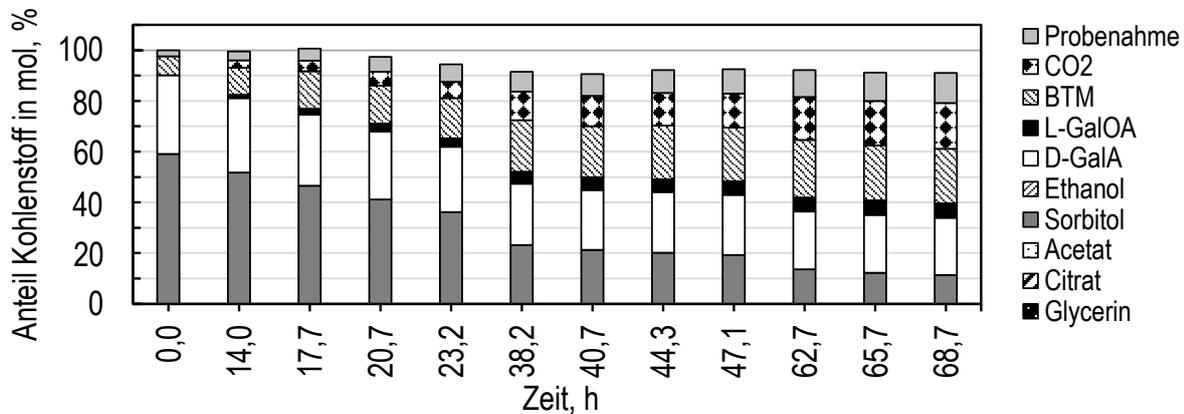


Abbildung 9.8: Kohlenstoffbilanz der einzelnen Probenahmezeitpunkte der Satzkultivierung von *S. cerevisiae* SiHY001 bei pH 3 mit 1 % (w/v) Sorbitol und 0,5 % (w/v) D-GalA in SC-Medium im kontrollierten Rührkesselbioreaktor. Die Balken stellen die Anteile an Gesamtkohlenstoff dar, die im Prozessverlauf zu den gegebenen Probenahme-Zeitpunkten in Form der jeweiligen Komponenten vorlagen. Die Bilanz konnte zu über 90 % geschlossen werden.

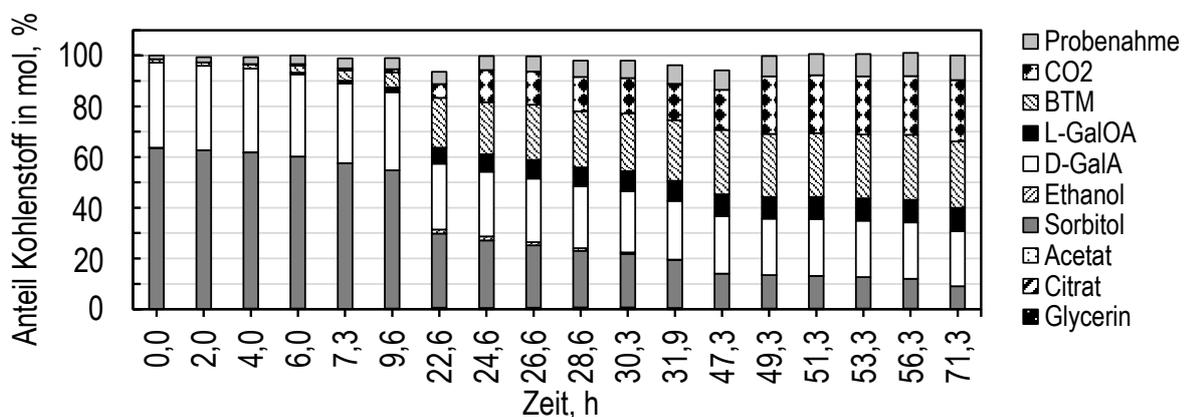


Abbildung 9.9: Kohlenstoffbilanz der einzelnen Probenahmezeitpunkte der Satzkultivierung von *S. cerevisiae* SiHY001 bei pH 3,5 mit 1 % (w/v) Sorbitol und 0,5 % (w/v) D-GalA in SC-Medium im kontrollierten Rührkesselbioreaktor. Die Balken stellen die Anteile an Gesamtkohlenstoff dar, die im Prozessverlauf zu den gegebenen Probenahme-Zeitpunkten in Form der jeweiligen Komponenten vorlagen. Die Bilanz konnte zu über 90 % geschlossen werden.

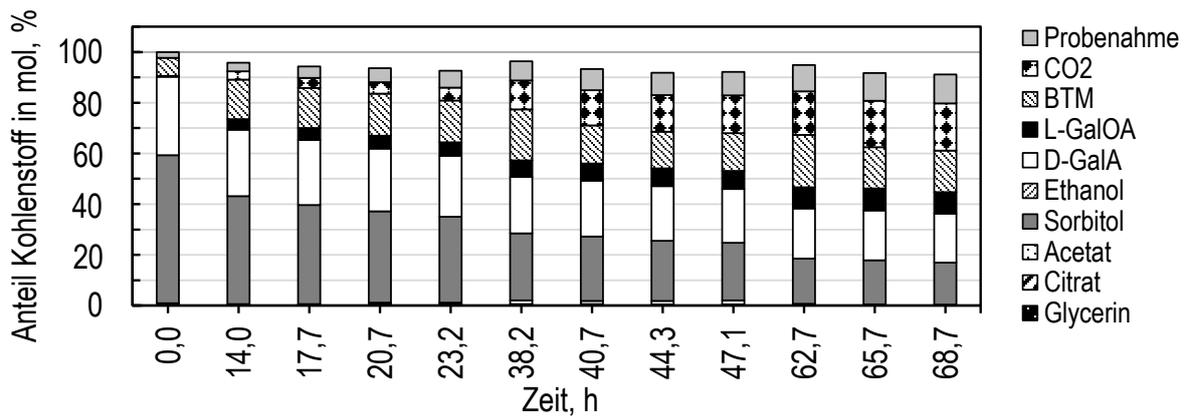


Abbildung 9.10: Kohlenstoffbilanz der einzelnen Probenahmezeitpunkte der Satzkultivierung von *S. cerevisiae* SiHY001 bei pH 4 mit 1 % (w/v) Sorbitol und 0,5 % (w/v) D-GalA in SC-Medium im kontrollierten Rührkesselbioreaktor. Die Balken stellen die Anteile an Gesamtkohlenstoff dar, die im Prozessverlauf zu den gegebenen Probenahme-Zeitpunkten in Form der jeweiligen Komponenten vorlagen. Die Bilanz konnte zu über 90 % geschlossen werden.

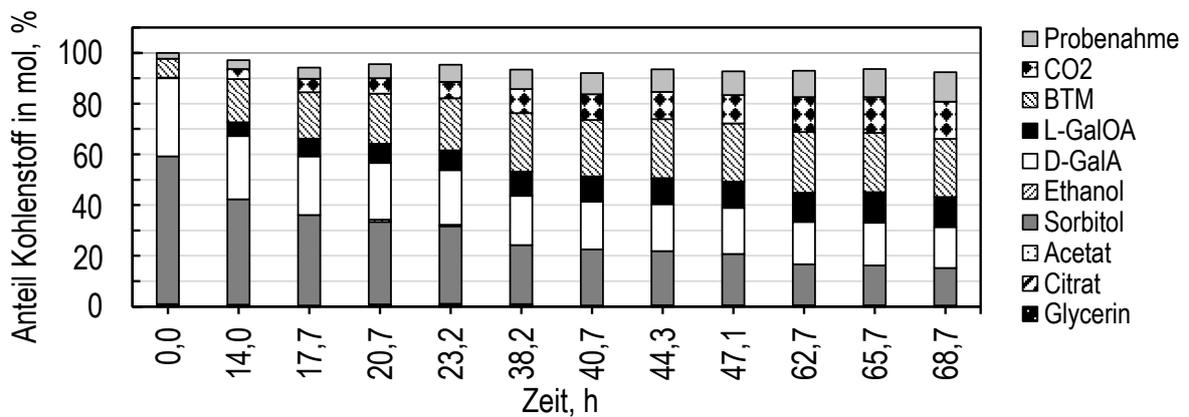


Abbildung 9.11: Kohlenstoffbilanz der einzelnen Probenahmezeitpunkte der Satzkultivierung von *S. cerevisiae* SiHY001 bei pH 4,5 mit 1 % (w/v) Sorbitol und 0,5 % (w/v) D-GalA in SC-Medium im kontrollierten Rührkesselbioreaktor. Die Balken stellen die Anteile an Gesamtkohlenstoff dar, die im Prozessverlauf zu den gegebenen Probenahme-Zeitpunkten in Form der jeweiligen Komponenten vorlagen. Die Bilanz konnte zu über 90 % geschlossen werden.

Kohlenstoffbilanzen zu Biotransformationen bei unterschiedlichen Sorbitolkonzentrationen

Kohlenstoffbilanzen zu Satzprozessen in Abschnitt 5.3.3.

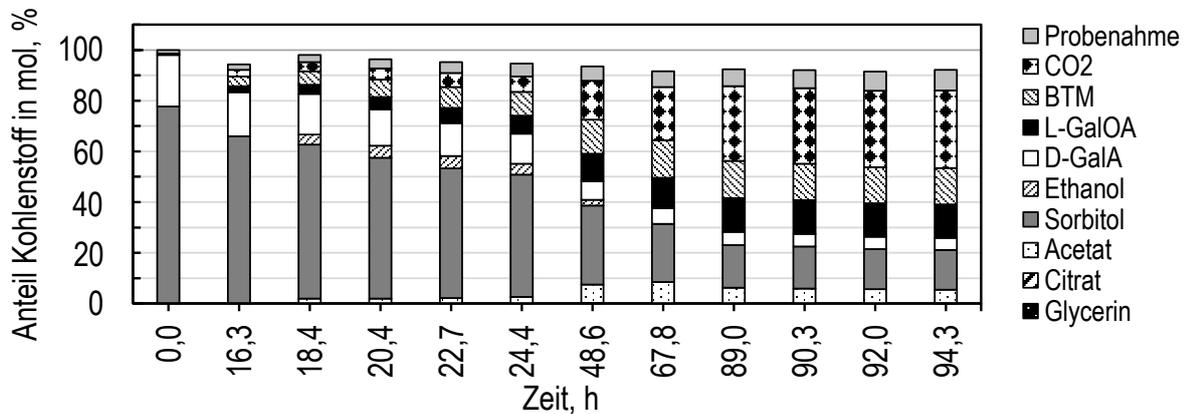


Abbildung 9.12: Kohlenstoffbilanz der einzelnen Probenahmezeitpunkte der Satzkultivierung von *S. cerevisiae* SiHY001 mit 2 % (w/v) Sorbitol und 0,5 % (w/v) D-GalA in SC-Medium im kontrollierten Rührkesselbioreaktor. Die Balken stellen die Anteile an Gesamtkohlenstoff dar, die im Prozessverlauf zu den gegebenen Probenahme-Zeitpunkten in Form der jeweiligen Komponenten vorlagen. Die Bilanz konnte zu über 90 % geschlossen werden.

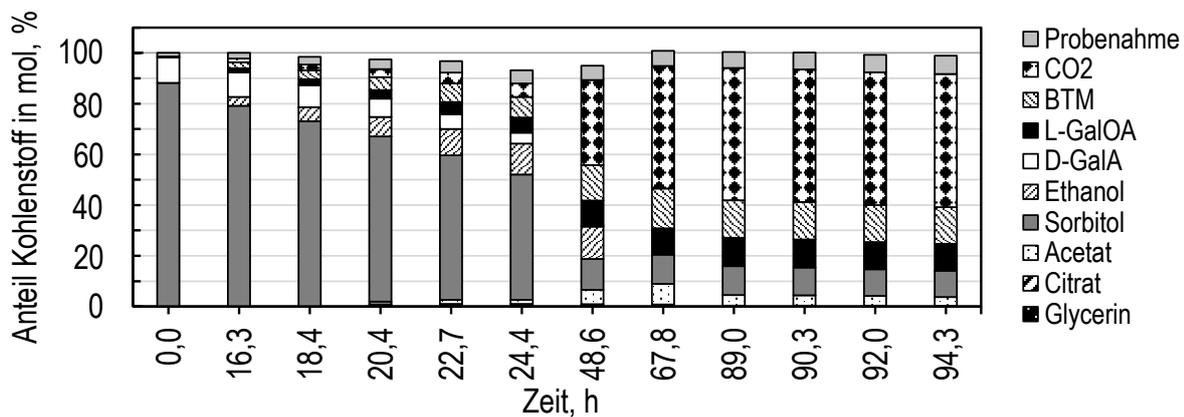


Abbildung 9.13: Kohlenstoffbilanz der einzelnen Probenahmezeitpunkte der Satzkultivierung von *S. cerevisiae* SiHY001 mit 4 % (w/v) Sorbitol und 0,5 % (w/v) D-GalA in SC-Medium im kontrollierten Rührkesselbioreaktor. Die Balken stellen die Anteile an Gesamtkohlenstoff dar, die im Prozessverlauf zu den gegebenen Probenahme-Zeitpunkten in Form der jeweiligen Komponenten vorlagen. Die Bilanz konnte zu über 90 % geschlossen werden.

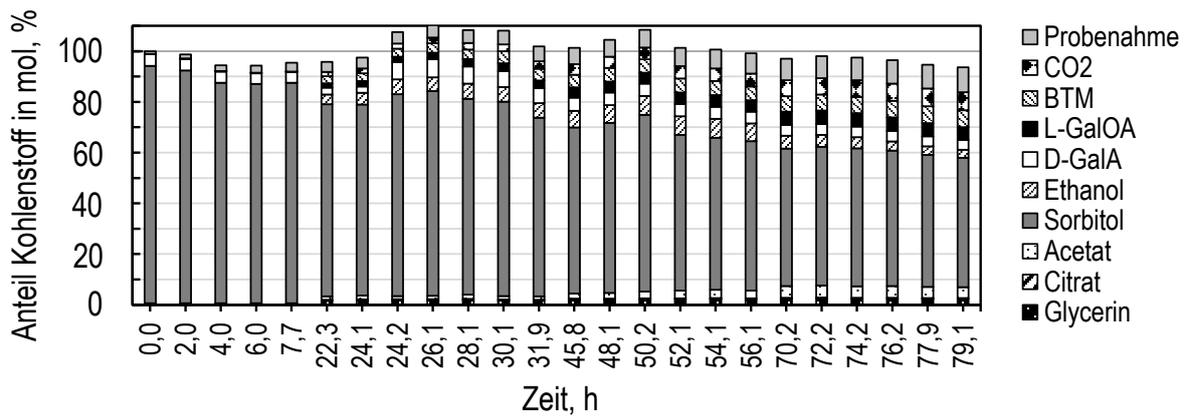


Abbildung 9.14: Kohlenstoffbilanz der einzelnen Probenahmezeitpunkte der Satzkultivierung von *S. cerevisiae* SiHY001 mit 10 % (w/v) Sorbitol und insgesamt 1 % (w/v) D-GalA in SC-Medium im kontrollierten Rührkesselbioreaktor. Die Balken stellen die Anteile an Gesamtkohlenstoff dar, die im Prozessverlauf zu den gegebenen Probenahme-Zeitpunkten in Form der jeweiligen Komponenten vorlagen. Die Bilanz konnte zu über 90 % geschlossen werden.

Kohlenstoffbilanz zur Biotransformation mit intermittierender Sorbitolzugabe

Kohlenstoffbilanzen zu Satzprozessen in Abschnitt 5.3.4.

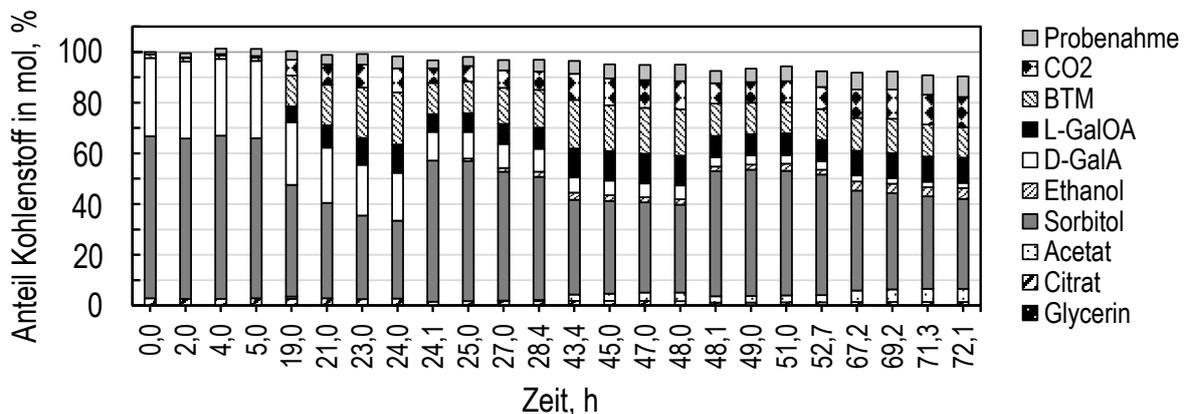


Abbildung 9.15: Kohlenstoffbilanz der einzelnen Probenahmezeitpunkte der Satzkultivierung von *S. cerevisiae* SiHY001 mit intermittierender Sorbitol Zugabe und 0,5 % (w/v) D-GalA in SC-Medium im kontrollierten Rührkesselbioreaktor. Die Balken stellen die Anteile an Gesamtkohlenstoff dar, die im Prozessverlauf zu den gegebenen Probenahme-Zeitpunkten in Form der jeweiligen Komponenten vorlagen. Die Bilanz konnte zu über 90 % geschlossen werden.

Kohlenstoffbilanzen zu Biotransformationen bei unterschiedlichen Medienzusammensetzungen

Kohlenstoffbilanzen zu Satzprozessen in Abschnitt 5.3.5.

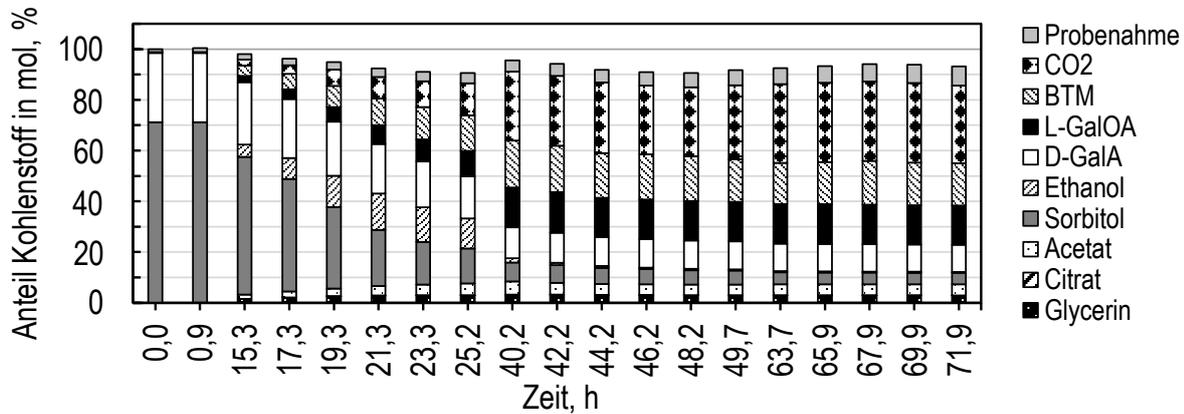


Abbildung 9.16: Kohlenstoffbilanz der einzelnen Probenahmezeitpunkte der Satzkultivierung von *S. cerevisiae* SiHY001 mit 4 % (w/v) Sorbitol und 1,5 % (w/v) D-GalA mit veränderter Medienzusammensetzung (10 x YNB, 5 x Aminosäuremix). Die Balken stellen die Anteile an Gesamtkohlenstoff dar, die im Prozessverlauf zu den gegebenen Probenahmezeitpunkten in Form der jeweiligen Komponenten vorlagen. Die Bilanz konnte zu über 90 % geschlossen werden.

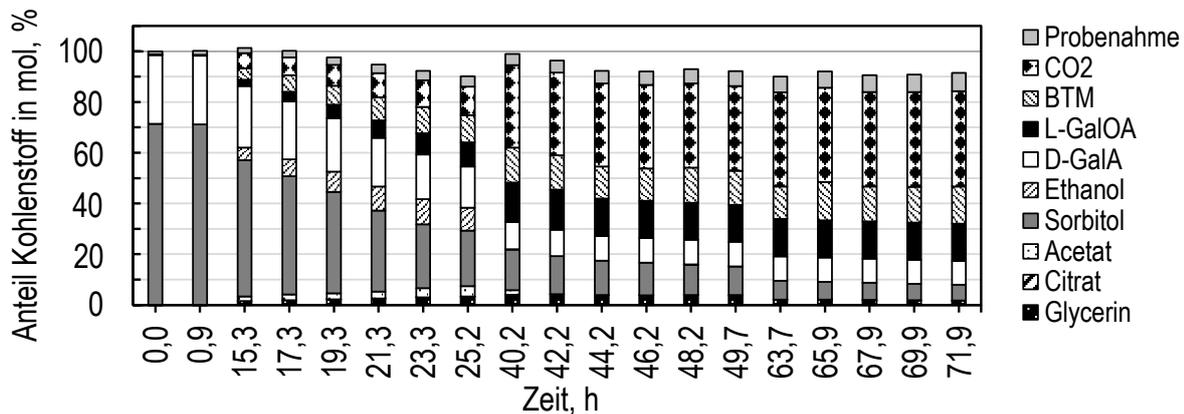


Abbildung 9.17: Kohlenstoffbilanz der einzelnen Probenahmezeitpunkte der Satzkultivierung von *S. cerevisiae* SiHY001 mit 4 % (w/v) Sorbitol und 1,5 % (w/v) D-GalA mit veränderter Medienzusammensetzung (10 x YNB, 10 x Aminosäuremix). Die Balken stellen die Anteile an Gesamtkohlenstoff dar, die im Prozessverlauf zu den gegebenen Probenahmezeitpunkten in Form der jeweiligen Komponenten vorlagen. Die Bilanz konnte zu über 90 % geschlossen werden.

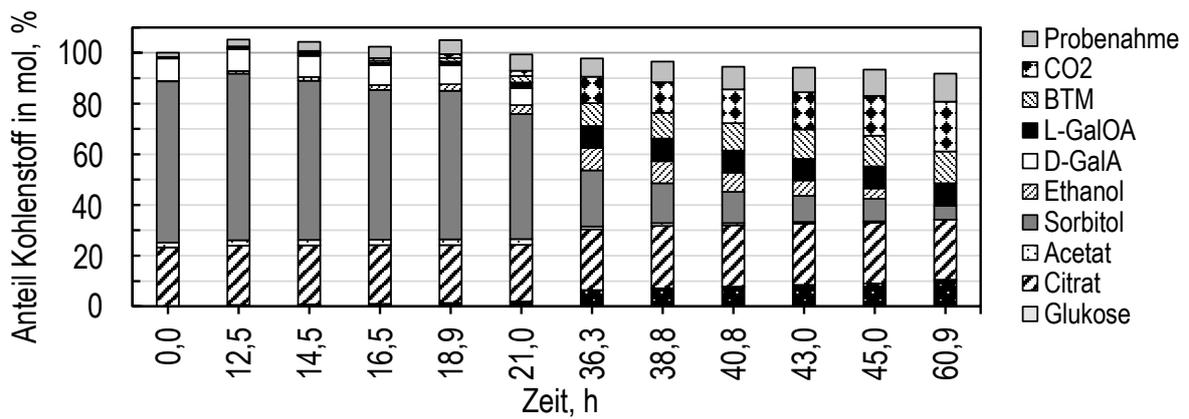


Abbildung 9.18: Kohlenstoffbilanz der einzelnen Probenahmezeitpunkte der Satzkultivierung von *S. cerevisiae* SiHY001 mit 4 % (w/v) Sorbitol und Zuckerrübenschnitzelhydrolysat im kontrollierten Rührkesselbioreaktor. Die Balken stellen die Anteile an Gesamtkohlenstoff dar, die im Prozessverlauf zu den gegebenen Probenahme-Zeitpunkten in Form der jeweiligen Komponenten vorlagen. Die Bilanz konnte zu über 90 % geschlossen werden.