

**Nutzung von Glycerin und Rohglycerin als C-Quelle für
die Produktion von L-Phenylalanin mit rekombinanten
Escherichia coli-Stämmen**

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

Katrin Gottlieb, geb. Ullrich
aus Bietigheim-Bissingen

Erstprüfer: Prof. Dr. G. A. Sprenger

Zweitprüfer: Prof. Dr. D. Weuster-Botz

Tag der mündlichen Prüfung: Donnerstag, 18. November 2010

Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart, 2011

Die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden unter der Leitung von Prof. Dr. G. A. Sprenger am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG.....	5
2.1	Der Modellorganismus <i>Escherichia coli</i>	9
2.2	Glucose- und Glycerinstoffwechsel in <i>E. coli</i>	9
2.3	Vergleich der C-Quellen Glycerin und Glucose für die Produktion von Feinchemikalien.....	17
2.4	Einsatz von Glycerin in biotechnologischen Prozessen	19
2.5	Was ist Rohglycerin?	23
2.6	Biosynthese aromatischer Aminosäuren bei <i>E. coli</i>	26
2.7	Mikrobielle Produktion von L-Phenylalanin.....	29
2.8	Berechnung der theoretisch maximal möglichen Ausbeute	35
2.9	Zielsetzung.....	39
3	MATERIAL UND METHODEN.....	41
3.1	Chemikalien und Enzyme	41
3.2	Verwendete Oligonucleotide, Plasmide und Bakterienstämme	41
3.2.1	Verwendete Oligonucleotide.....	41
3.2.2	Verwendete Plasmide.....	43
3.2.3	Verwendete Bakterienstämme	44
3.3	Kultivierung von <i>E. coli</i>	46
3.3.1	Kultivierung im Bioreaktor.....	48
3.4	Analytische Methoden	51
3.4.1	Zelldichtebestimmung.....	51
3.4.2	Bestimmung der Glycerinkonzentration	51
3.4.3	Bestimmung der Glucosekonzentration	52
3.4.4	Nachweis von L-Phenylalanin mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	52
3.4.5	Nachweis von Milchsäure und Essigsäure mittels HPLC	52
3.5	Molekularbiologische Methoden	53
3.5.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	53
3.5.2	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (Dower <i>et al.</i> , 1988)	54
3.5.3	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (Mülhardt, 2009).....	54
3.5.4	Gewinnung chromosomaler DNA.....	55
3.5.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	55
3.5.6	Plasmid-Isolierung	56
3.5.7	DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme	57
3.5.8	Auftrennung und Sichtbarmachung von DNA.....	57
3.5.9	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	57
3.5.10	Herstellung von blunt-end Fragmenten	57
3.5.11	Entfernen endständiger Phosphatreste von DNA-Fragmenten.....	58
3.5.12	Ligation von DNA-Fragmenten	58
3.5.13	Chromosomale Integration von Genen.....	58

3.5.14	PI-Transduktion	60
3.5.15	DNA-Sequenzierung	60
3.6	Proteinbiochemische Methoden.....	61
3.6.1	Aufschluss von Zellen.....	61
3.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	61
3.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	61
3.6.4	Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen.....	62
3.6.5	2D-SDS-Polyamidacrylgelelektrophorese (2D-PAGE)	63
3.6.6	Bestimmung der Enzymaktivitäten	65
4	ERGEBNISSE.....	68
4.1	Wachstumsverhalten von <i>E. coli</i> auf verschiedenen C-Quellen im Schüttelkolben.....	68
4.1.1	Untersuchung des Wildtyps <i>E. coli</i> LJ110	68
4.1.2	Wachstum von <i>E. coli</i> LJ110 auf verschiedenen Glycerin-/ Rohglycerinchargen.....	69
4.1.3	Untersuchung des L-Phenylalanin produzierenden Stammes <i>E. coli</i> FUS4/pF81	70
4.1.4	Vergleich der Substrattoleranz, des Wachstums, der Biomasseausbeute und der L-Phenylalaninproduktion auf den C-Quellen Glycerin und Rohglycerin.....	71
4.1.5	Vergleich der Proteinexpression bei Kultivierung von <i>E. coli</i> FUS4/pF81 auf Glycerin oder Rohglycerin mittels 2D-SDS-PAGE	78
4.2	Konstruktion und Überprüfung des Stammes <i>E. coli</i> FUS4.2 (<i>FUS4</i> Δ<i>mal::P_{tac}::glpK-cat</i>)	80
4.3	Kultivierung von <i>E. coli</i> FUS4/pF81 und <i>E. coli</i> FUS4.2/pF81 im Schüttelkolben	83
4.4	Kultivierung von <i>E. coli</i> FUS4/pF81 im Fermenter	84
4.5	Kultivierung von <i>E. coli</i> FUS4/pF81 auf Glycerin bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen im Medium.....	87
4.6	Fermentation des Stammes <i>E. coli</i> FUS4/pF81 mit Glucose oder Rohglycerin als C-Quelle.....	92
4.7	Maßnahmen zur Reduktion des Stoffflusses in den TCA-Zyklus	97
4.8	Maßnahmen zur Erhöhungen des C-Flusses in den Pentosephosphatweg	103
4.9	Kombination der <i>pykA</i>-Deletion mit der Überexpression von <i>tktA</i> und <i>glpX</i>.....	115
4.10	L-Phenylalaninproduktion nach der Deletion von <i>pykA</i> und <i>pykF</i>	121
4.11	Deletion von <i>pykA</i> und <i>pykF</i> mit gleichzeitiger Erhöhung des Stoffflusses in den Pentosephosphatweg	125
4.12	Vergleich aller durchgeführten Fermentationen	128
5	DISKUSSION UND AUSBLICK.....	131
6	ANHANG.....	158
7	DANKSAGUNG	173
8	LITERATUR	176

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1 Ökoeffizienzanalyse von Biodiesel nach der SEEBALANCE [®] -Methode von BASF (Achatz <i>et al.</i> , 2007).....	5
Abbildung 2-2 Die in der Ökoeffizienzanalyse betrachteten Parameter (Achatz <i>et al.</i> , 2007)..	6
Abbildung 2-3 Schematische Darstellung der folgenden Stoffwechselwege ausgehend von Glucose oder Glycerin: EMP (Embden-Meyerhof-Parnas-Weg, Schritte 1-6 und 9-14), aerobe Glycerinassimilation (Schritte 7 und 8), HMP (Hexosemonophosphatweg, Schritte 15-17), EDP (Entner-Doudoroff-Weg, Schritte 18 und 19) und PPP (Pentosephosphatweg, Schritte 20-23).....	11
Abbildung 2-4 Regulationsvorgänge in <i>E. coli</i> unter aeroben Bedingungen bei Verwendung der C-Quellen Glucose oder Glycerin.....	15
Abbildung 2-5 Schematisch vereinfachte Darstellung der Stoffwechselvorgänge bei <i>E. coli</i> in Gegenwart von Glucose oder Glycerin bei der Bildung von L-Phenylalanin.....	19
Abbildung 2-6 Chemische Synthese von 1,3-Propandiol.....	20
Abbildung 2-7 Das 1,3-Propandiol-Verfahren von DuPont mit dem Wirtstamm <i>E. coli</i> (verändert nach Sanford <i>et al.</i> , 2004).....	21
Abbildung 2-8 Anaerobe Verwertung von Glycerin in <i>E. coli</i>	23
Abbildung 2-9 Biodieselproduktionsprozess. Verändert nach http://www.emerald-biodiesel.de/emerald/herstellung.html	24
Abbildung 2-10 Vergleich von aufgereinigtem Glycerin (1) und Rohglycerin (2).....	25
Abbildung 2-11 Schematische Darstellung der Biosynthese aromatischer Aminosäuren in <i>E. coli</i>	28
Abbildung 2-12 Schematische Darstellung des Stoffflusses ausgehend von Glycerin bis zum L-Phenylalanin. Gestrichelte Pfeile bedeuten eine unvollständige Darstellung des Stoffwechselwegs.....	38
Abbildung 3-1 Das bei den beschriebenen Versuchen verwendete Modell der Firma Infors (Schweiz).....	49
Abbildung 3-2 Prinzip der enzymatischen Konzentrationsbestimmung von Glycerin.....	51
Abbildung 3-3 Prinzip der chromosomalen Integration von Genen nach Datsenko und Wanner (2000). Exemplarisch gezeigt ist hier die Integration von <i>glpK</i> ins Maltose-Operon. Die jeweils gleich schraffierten Bereiche sind dabei homolog zueinander und entsprechen ungefähr einer Größe von 40-45 Nucleotiden.....	59
Abbildung 4-1 Wachstum von <i>E. coli</i> LJ110 in Schüttelkolben mit Minimalmedium (Gerhardt <i>et al.</i> , 1984) ohne weitere Zusätze unter Verwendung der C-Quellen Glucose (0,5%), Glycerin (0,5%) oder Rohglycerin (0,5%).....	68
Abbildung 4-2 Wachstum von <i>E. coli</i> LJ110 in Minimalmedium (Gerhardt <i>et al.</i> , 1984) ohne weitere Zusätze unter Verwendung verschiedener Glycerin-/Rohglycerinchargen.....	69
Abbildung 4-3 Wachstum des Stammes FUS4/pF81 in Minimalmedium (Gerhardt <i>et al.</i> , 1984) mit zusätzlichem L-Tyrosin und L-Phenylalanin und Glucose (0,5%), Glycerin (0,5%) bzw. Rohglycerin (0,5%) als C-Quelle.....	71
Abbildung 4-4 Abhängigkeit der Wachstumsraten von der Konzentration an Glycerin oder Rohglycerin im Medium.....	73
Abbildung 4-5 Glycerinverbrauchs in den einzelnen Ansätzen aus Abbildung 4-4.....	73
Abbildung 4-6 L-Phenylalaninproduktion in den einzelnen Ansätzen aus Abbildung 4-4.....	74
Abbildung 4-7 Chorismatproduktion in den einzelnen Ansätzen aus Abbildung 4-4.....	74
Abbildung 4-8 Analyse der Produktion organischer Säuren in den einzelnen Ansätzen aus Abbildung 4-4.....	75
Abbildung 4-9 Verlauf der Wachstumsexperimente mit FUS4/pF81 in Minimalmedium + Glycerin.....	76

Abbildung 4-10 Verlauf der Wachstumsexperimente mit FUS4/pF81 in Minimalmedium + Rohglycerin.	77
Abbildung 4-11 Abhängigkeit der Wachstumsrate der einzelnen Ansätzen in Abbildung 4-9 und Abbildung 4-10 von der Glycerin-/Rohglycerinkonzentration im Medium.	77
Abbildung 4-12 Glycerinverbrauch in Bezug auf die Zelldichte zu den einzelnen Ansätzen in Abbildung 4-9 und Abbildung 4-10.	78
Abbildung 4-13 Vergleich der 2D-SDS-Gelelektrophorese von FUS4/pF81 (20% O ₂ , Glycerin, 27h, rot) und FUS4/pF81 (20% O ₂ , Rohglycerin 20,5h, grün).	79
Abbildung 4-14 SDS-Gelelektrophorese des Rohextrakts von DH5α pKUS3 (1) und DH5α pJF119EH (Kontrollvektor) (2).	80
Abbildung 4-15: Aktivität der Glycerinkinase im Rohextrakt von DH5α pKUS3 in Abhängigkeit der Konzentration an Fru-1,6-BP im Testansatz.	81
Abbildung 4-16 Ausstrich von GSL705 und GSL705 <i>mal::glpK-cat</i> auf MacConkey-Agarplatten mit 1% Glycerin (A) und 1% Maltose (B).	82
Abbildung 4-17 Kultivierung von FUS4/pF81 und FUS4.2/pF81 in Schüttelkolben mit Minimalmedium (Gerhardt <i>et al.</i> , 1984) + 0,5% Rohglycerin und zusätzlichem L-Tyrosin und L-Phenylalanin.	84
Abbildung 4-18 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4/pF81 in Minimalmedium + Glucose.	85
Abbildung 4-19 Vergleich der 2D-SDS-Gelelektrophorese von FUS4.11/pF81 nach der ersten (60% O ₂ , Glycerin/Lactat, 22h, rot) und der zweiten Induktion (60% O ₂ , Glycerin/Lactat 42h, grün).	86
Abbildung 4-20 Typischer Verlauf der g/g-Ausbeute während einer Fermentation mit FUS4/pF81.	87
Abbildung 4-21 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4/pF81 mit 60% Sauerstoffsättigung und Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%).	89
Abbildung 4-22: Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4/pF81 mit 30% O ₂ -Sättigung und Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%).	89
Abbildung 4-23 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4/pF81 mit 20% O ₂ -Sättigung und Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%).	90
Abbildung 4-24 Nebenproduktbildung während der Fermentation von FUS4/pF81 in Minimalmedium + Glycerin und einer Sauerstoffsättigung von 60% (Abbildung 4-21).	91
Abbildung 4-25 Nebenproduktbildung während der Fermentation von FUS4/pF81 in Minimalmedium + Glycerin und einer Sauerstoffsättigung von 30% (Abbildung 4-22).	91
Abbildung 4-26 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4/pF81 in Minimalmedium + Glucose (Startkonzentration 0,5%).	93
Abbildung 4-27 Nebenproduktanalyse für die Kultivierung von FUS4/pF81 in Minimalmedium + Glucose (Abbildung 4-26).	94
Abbildung 4-28 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4/pF81 in Minimalmedium + Rohglycerin (Startkonzentration 0,5%).	95
Abbildung 4-29 Nebenproduktanalyse für die Kultivierung von FUS4/pF81 in Minimalmedium + Rohglycerin (Abbildung 4-28).	96
Abbildung 4-30 Schematische Darstellung des erwünschten Stoffwechselwegs nach Deletion von <i>pykA</i> oder <i>pykF</i>	97
Abbildung 4-31 Schematische Darstellung der PykF- und PykA-Aktivitäten in den Stämmen FUS4, FUS4.4 und FUS4.3 nach Aktivierung mit AMP oder Fructose-1,6-bisphosphat.	98
Abbildung 4-32 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4.3/pF81 mit Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%).	99
Abbildung 4-33 Nebenproduktanalyse für die Kultivierung von FUS4.3/pF81 in Minimalmedium + Glycerin (Abbildung 4-32).	100

Abbildung 4-34 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation mit FUS4.4/pF81 kultiviert mit Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%).	101
Abbildung 4-35 Nebenprodukt-bildung während der Fermentation von FUS4.4/pF81 in Minimalmedium + Glycerin und einer Sauerstoff-sättigung von 60% (Abbildung 4-34).	102
Abbildung 4-36 Schematische Darstellung des erwünschten Stoffwechselwegs nach der Integration einer zusätzlichen Genkopie von <i>glpX</i> oder <i>tktA</i> .	105
Abbildung 4-37 (A) SDS-Gelelektrophorese des Rohextrakts von DH5 α pJF119EH (1) und DH5 α pKUS13 (2). Der Pfeil markiert das überproduzierte Protein mit einer Größe von 38kDa, was etwa der theoretischen Größe von GlpX entspricht. Der Anteil von GlpX am Gesamtprotein beträgt etwa 30%.	106
Abbildung 4-38 Aktivität von GlpX im Rohextrakt von FUS4 verglichen mit FUS4.6.	107
Abbildung 4-39 Ausstrich von BW25113 Δ <i>tktA</i> (1) und BW25113 Δ <i>gal::P_{tac}::tktA-cat</i> (2) auf MacConkey-Platten ohne C-Quelle.	108
Abbildung 4-40 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4.6/pF81 mit Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) bei 60% Sauerstoffsättigung.	109
Abbildung 4-41 Nebenprodukt-analyse für die Kultivierung von FUS4.6/pF81 in Minimalmedium + Glycerin (Abbildung 4-40).	110
Abbildung 4-42 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4.5/pF81 mit Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) bei 60% Sauerstoffsättigung.	111
Abbildung 4-43 Nebenproduktanalyse für die Kultivierung von FUS4.5/pF81 in Minimalmedium + Glycerin (Abbildung 4-42).	112
Abbildung 4-44 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4.7/pF81 mit Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) bei 60% Sauerstoffsättigung.	113
Abbildung 4-45 Nebenproduktanalyse für die Kultivierung von FUS4.7/pF81 in Minimalmedium + Glycerin (Abbildung 4-44).	113
Abbildung 4-46 Schematische Darstellung des erwünschten Stoffwechselwegs nach Deletion von <i>pykA</i> und der Integration einer zusätzlichen Genkopie von <i>glpX</i> oder <i>tktA</i> .	115
Abbildung 4-47 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4.8/pF81 mit Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) bei 60% Sauerstoffsättigung.	117
Abbildung 4-48 Nebenproduktanalyse für die Kultivierung von FUS4.8/pF81 in Minimalmedium + Glycerin (Abbildung 4-47).	117
Abbildung 4-49 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4.9/pF81 mit Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) bei 60% Sauerstoffsättigung.	118
Abbildung 4-50 Nebenproduktanalyse für die Kultivierung von FUS4.9/pF81 in Minimalmedium + Glycerin (Abbildung 4-49).	119
Abbildung 4-51 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4.10/pF81 in Minimalmedium + Glycerin (Startkonzentration 0,5%).	120
Abbildung 4-52 Nebenproduktanalyse für die Kultivierung von FUS4.10/pF81 in Minimalmedium + Glycerin (Abbildung 4-51).	120
Abbildung 4-53 Schematische Darstellung des erwünschten Stoffwechselwegs nach Deletion von <i>pykA</i> und <i>pykF</i> .	123
Abbildung 4-54 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4.11/pF81 in Minimalmedium + Glycerin/Lactat (Startkonzentration 0,5% Glycerin, 0,2% Lactat).	125
Abbildung 4-55 Schematische Darstellung des <i>E. coli</i> -Chromosoms.	126
Abbildung 4-56 Schematische Darstellung des erwünschten Stoffwechselwegs nach Deletion von <i>pykA</i> und <i>pykF</i> und der Integration einer zusätzlichen Genkopie von <i>glpX</i> und <i>tktA</i> .	127
Abbildung 4-57 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4.14/pF81 in Minimalmedium + Glycerin/Lactat (Startkonzentration 0,5% Glycerin, 0,5% Lactat).	128

Abbildung 4-58 Darstellung der C-Ausbeute (■) und der Raum-Zeit-Ausbeute (■) aller durchgeführten Fermentationen.	129
Abbildung 4-59 C-Bilanzierung der Stämme FUS4/pF81, FUS4.4/pF81 und FUS4.7/pF81.	130
Abbildung 5-1 Preisentwicklung für Zucker (Saccharose) während der letzten 5 Jahre.	155
Abbildung 6-1 Zweite Fermentation von FUS4/pF81 bei 60% O ₂ -Sättigung und Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) (oben) und Nebenproduktanalyse (unten).....	158
Abbildung 6-2 Zweite Fermentation von FUS4/pF81 bei 20% O ₂ -Sättigung und Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) (oben) und Nebenproduktanalyse (unten).....	159
Abbildung 6-3 Zweite Fermentation von FUS4/pF81 bei 60% O ₂ -Sättigung und Glucose als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) (oben) und Nebenproduktanalyse (unten).....	160
Abbildung 6-4 Zweite Fermentation von FUS4/pF81 bei 20% O ₂ -Sättigung und Rohglycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) (oben) und Nebenproduktanalyse (unten).	161
Abbildung 6-5 Zweite Fermentation von FUS4.3/pF81 bei 60% O ₂ -Sättigung und Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) (oben) und Nebenproduktanalyse (unten).....	162
Abbildung 6-6 Zweite Fermentation von FUS4.4/pF81 bei 60% O ₂ -Sättigung und Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) (oben) und Nebenproduktanalyse (unten).....	163
Abbildung 6-7 Zweite Fermentation von FUS4.5/pF81 bei 60% O ₂ -Sättigung und Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) (oben) und Nebenproduktanalyse (unten).....	164
Abbildung 6-8 Zweite Fermentation von FUS4.6/pF81 bei 60% O ₂ -Sättigung und Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) (oben) und Nebenproduktanalyse (unten).....	165
Abbildung 6-9 Zweite Fermentation von FUS4.7/pF81 bei 60% O ₂ -Sättigung und Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) (oben) und Nebenproduktanalyse (unten).....	166
Abbildung 6-10 Zweite Fermentation von FUS4.8/pF81 bei 60% O ₂ -Sättigung und Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) (oben) und Nebenproduktanalyse (unten).	167
Abbildung 6-11 Zweite Fermentation von FUS4.9/pF81 bei 60% O ₂ -Sättigung und Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) (oben) und Nebenproduktanalyse (unten).	168
Abbildung 6-12 Zweite Fermentation von FUS4.10/pF81 bei 60% O ₂ -Sättigung und Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) (oben) und Nebenproduktanalyse (unten).	169
Abbildung 6-13 Verlauf der zweiten Fed-Batch-Fermentation von FUS4.11/pF81 mit Glycerin und Lactat als C-Quelle (Startkonzentration 0,5% Glycerin, 0,5% Lactat) bei 60% Sauerstoffsättigung.	170
Abbildung 6-14 Verlauf der zweiten Fed-Batch-Fermentation von FUS4.14/pF81 mit Glycerin und Lactat als C-Quelle (Startkonzentration 0,5% Glycerin, 0,5% Lactat) bei 60% Sauerstoffsättigung.	170

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1 Nährwertanalysen verschiedener Rohglycerin- und Ölproben.	26
Tabelle 3-2 Ergebnis der Analyse auf Makroelemente, Kohlenstoff und Stickstoff verschiedener Rohglycerin- und Ölproben.	26
Tabelle 5-1 Überblick über die bei den Fermentationen gewählten Parameter.	50
Tabelle 6-1 Überblick über die Fermentationen von FUS4/pF81 bei unterschiedlichen O ₂ - Sättigungen.....	88
Tabelle 6-2 Überblick über die Fermentationen mit Glycerin, Glucose oder Rohglycerin als C- Quelle	96
Tabelle 6-3 Vergleich der Fermentationsergebnisse von FUS4/pF81, FUS4.3/pF81, FUS4.4/pF81 unter vergleichbaren Bedingungen.	103
Tabelle 6-4 Aufgelistet sind die Parameter, die zur Bewertung der Stämme FUS4.5/pF81, FUS4.6/pF81 und FUS4.7 verwendet wurden.	113
Tabelle 6-5 Aufgelistet sind die Parameter, die zur Bewertung der Stämme FUS4.8/pF81, FUS4.9/pF81 und FUS4.10/pF81 verwendet wurden	121

Abkürzungsverzeichnis

1,2-PDOR	1,2-Propandioloxidoreduktase
1,3-DPG	1,3-Diphosphoglycerat
1,3-PDO	1,3-Propandiol
1,3-PDODH	1,3-PDO Dehydrogenase;
2-PG	2-Phosphoglycerat
3-HPA	3-Hydroxypropionaldehyd
3-PG	3-Phosphoglycerat
6PGlu	6-Phosphogluconat
Ac-CoA	Acetyl-CoA
ADP	Adenosindiphosphat
AKR	Aldoketoreduktase
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AroA	5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase
AroB	3-Dehydroquinat-Synthase
AroC	Chorismat-Synthase
AroD	3-Dehydroquinat-Dehydratase
AroE	Shikimat-Dehydrogenase
AroF,	3-Deoxy-D-arabinoheptulosonat-7-phosphat-Synthase
AroG	3-Deoxy-D-arabinoheptulosonat-7-phosphat-Synthase
AroH	3-Deoxy-D-arabinoheptulosonat-7-phosphat-Synthase
AroK	Shikimatkinase 1
AroL	Shikimatkinase 2
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Absorptionseinheit, UV-Detektor
BDL	nicht detektierbar (Below Detection Limit)
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa
cAMP	Cyclisches AMP
cdw	Biotrockenmasse
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propan sulfonat
Cm ^R	Chloramphenicolresistenz
CoA	Coenzym A
Cra	Catabolite repressor activator
CRP	cAMP Rezeptor Protein
<i>crr</i>	Gen codiert für EIIA ^{Glc}
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
Da	Dalton
DAHP	3-Deoxy-D-arabinoheptulosonat-7-phosphat
DHA	Dihydroxyaceton
DhaB	Glycerindehydratase
DhaKLM	Dihydroxyacetonkinase (PEP-abhängig, <i>E. coli</i>)
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DhaT	1,3-Propandioloxidoreduktase
DNA	Deoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat

DTT	Dithiothreitol
€	Euro
ε	Extinktionskoeffizient
E4P	Erythrose-4-Phosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDP	Entner-Doudoroff-Weg
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas-Weg
e.V.	Eingetragener Verein
EPSP	5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase
F6P	Fructose-6-Phosphat
FAME	Fettsäuremethylester
fbr (als Index)	Feedback-Resistenz
Fbp	Fructose-1,6-bisphosphatase I
FLP	Flippase recombination enzyme
FRT	Flippase Recognition Target
Fru-1,6-BP	Fructose-1,6-Bisphosphat
FruR	Fructose repressor
g	Gramm
G6P	Glucose-6-Phosphat
G3P	Glycerin-3-Phosphat
G3PDH	G3P-Dehydrogenase
GA3P	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GL6P	Gluconolacton-6-Phosphat
GldA	Glycerindehydrogenase
GlpABC	Glycerin-3-Phosphatdehydrogenase (anaerob)
GlpF	Glycerinfacilitator
GlpK	Glycerinkinase
GlpD	Glycerin-3-Phosphatdehydrogenase (aerob)
GlpR	G3P-Repressor
GlyD	Glycerindehydratase
GlyDH-I,	Glycerindehydrogenase TypI
GlpX	Fructose-1,6-bisphosphatase II
GPP1/2	Glycerin-3-phosphatase (Hefe)
h	Stunde
HA	Hydroxyaceton
HMP	Hexosemonophosphatweg
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hpr	Histidine-containing carrier Protein
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactopyranosid
κ	Reduktionsgrad jedes einzelnen C-Atoms einer chemischen Verbindung
KDPG	2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat
K_m	Sättigungskonstante des Enzyms für den Metaboliten m
K_m^R	Kanamycinresistenz
K_s	Sättigungskonstante des limitierenden Substrats
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LAL	Lactaldehyd
lbm	Pfund (englische Gewichtseinheit, 1lbm = 453,59237 Gramm (Wikipedia))
μ (h^{-1})	spezifische Wachstumsgeschwindigkeit
m	Meter

max.	maximal
µl	Mikroliter
µF	Mikrofarad
MG	Methylglyoxal
MGR	Methylglyoxalreduktase
MGS	Methylglyoxalsynthase
Mlc	Makes Large Colonies
min	Minuten
mM	Millimolar
MM	Minimalmedium
MONG	Matter Organic Non Glycerol
mRNA	Boten-RNA
MW	Molekulargewicht
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinucleotid
NADP	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NADPH	reduziertes Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
nm	Nanometer
NMP	Nucleosidmonophosphat
OD ₆₀₀	Optische Dichte gemessen bei 600nm
Ω	elektrischer Widerstand
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pck	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDO	1,3-Propanediol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PfkA	Phosphofruktokinase
pfu	plaque forming unit
pH	negativ-dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PheA	Chorismat-Mutase
P _i	anorganisches Phosphat
<i>pntA</i>	codiert für Membran-gebundene Pyridinnucleotidtranshydrogenase
pO ₂	Konzentration des im Medium gelösten Sauerstoffs
PPP	Pentosephosphatweg
psi	lbf pro Quadratinch (1 psi = 6,8948 · 10 ⁻² bar (Wikipedia))
PTS	Phosphotransferasesystem
<i>ptsI</i>	codiert für PTS-Enzym I
<i>ptsH</i>	codiert für HPr
<i>ptsG</i>	Gen codiert für Glucosetransporter PtsG
PykA	Pyruvatkinase A
PykF	Pyruvatkinase F
PYR	Pyruvat
R5P	Ribose-5-Phosphat
Rib5P	Ribulose-5-Phosphat
rpm	Schüttlerdrehzahl
RT	Raumtemperatur
\$	Dollar
S7P	Sedoheptulose-7-Phosphat
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
sec	Sekunden
sRNA	Kleine Ribonucleinsäure

t	Zeit
Tal	Transaldolase
TCA	Tricarbonsäure
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TktA	Transketolase A
TrpD	Anthranilat-Synthase
TrpE	Anthranilat-Synthase
TrpR	Tryptophanrepressor
TyrA	Chorismat-Mutase
TyrB	Tyrosin-Aminotransferase
TyrR	Tyrosinrepressor
<i>udhA</i>	codiert für lösliche Pyridinnucleotidtranshydrogenase
ÜN	über Nacht
US	United States
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
(v/v)	Volumenanteil
wt	Wildtyp
(w/v)	Gewichtsanteil
WVO	pflanzliches Abfallöl (Waste Vegetable Oil)
X5P	Xylulose-5-Phosphat
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel

1 Zusammenfassung

Glycerin, das Hauptnebenprodukt der Biodieselproduktion, ist ein nachwachsender Rohstoff, der als C-Quelle von Mikroorganismen wie z. B. *Escherichia coli* (*E. coli*) für die mikrobielle Produktion von Fein- und Massenchemikalien genutzt werden kann. Da Biodiesel aufgrund der hohen Produktionskosten gegenüber fossilem Diesel einen Nachteil in der Ökoeffizienz hat, wäre eine ökonomische Umsetzung des Glycerins in wertvolle Feinchemikalien durch z.B. *E. coli* wünschenswert. In *E. coli* wird Glycerin durch Diffusion oder erleichterte Diffusion über den Glycerinfacilitator GlpF aufgenommen. Unter aeroben Bedingungen wird Glycerin über die ATP-abhängige Glycerinkinase GlpK zu Glycerin-3-Phosphat (G3P) phosphoryliert. Anschließend wird G3P über die Ubichinon-abhängige G3P-Dehydrogenase GlpD zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) oxidiert und geht dann in den Zentralstoffwechsel ein (Lin, *Annual Review of Microbiology*, 1976; 30, 535-578). Die derzeit üblicherweise für die mikrobielle Produktion von Fein- und Massenchemikalien eingesetzte C-Quelle Glucose wird dagegen PEP-abhängig in die Zelle aufgenommen (Postma *et al.*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1993; 57, 543-594). Bis zum Erreichen des DHAP werden mit Glucose keine Reduktionsäquivalente gebildet, weshalb mit dieser C-Quelle insgesamt weniger ATP über die Atmungskette regeneriert werden kann als mit Glycerin. Dies bedeutet, dass reduzierte Metabolite, oder Chemikalien, die von der Zelle mit einem hohen ATP-Aufwand synthetisiert werden, mit Glycerin als C-Quelle in höheren Ausbeuten gebildet werden können als mit Glucose. Aufgrund dieser Vorteile erscheint die Verwendung von Glycerin für die Ganzzellbiosynthese von aromatischen Aminosäuren, die von den Zellen mit einem hohen Energieaufwand gebildet werden (*Cellular energy metabolism and its regulation*, Atkinson, 1977, S. 74-77), als besonders sinnvoll. Die Verwendung von Glycerin hat aber auch Nachteile, wie z. B. das langsamere Zellwachstum, was zu einer verringerten Raum-Zeit-Ausbeute führen kann. Zurückzuführen ist die geringere Wachstumsrate vermutlich auf Limitierungen im Stoffwechsel durch GlpK (Zwaig *et al.*, *Journal of Bacteriology*, 1970; 102, 753-759) oder der Reaktion von Fructose-1,6-Bisphosphat (Fru-1,6-BP) zu Fructose-6-Phosphat (F6P) (Marr, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 55, 316-333). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb am Beispiel der L-Phenylalaninproduktion untersucht, wie diese möglichen Limitierungen durch metabolic engineering oder einer verbesserten Fermentationsführung umgangen werden können. Auch der direkte Einsatz des nicht aufgereinigten Rohglycerins als C-Quelle wurde untersucht. Weiterhin war gezeigt worden, dass die Bereitstellung der Vorläufermoleküle Phosphoenolpyruvat (PEP) und Erythrose-4-Phosphat (E4P) einen limitierenden Schritt für die Produktion aromatischer Stoffe darstellt. Dies war durch die Überexpression von *tktA*, dem Gen für die Transketolase oder der Inaktivierung von *pykA* oder *pykF*, den Genen für die Pyruvatkinasen A und F behoben worden (Bongaerts *et al.*, *Metabolic Engineering*, 2001; 3, 289-300). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb mittels metabolic engineering untersucht, ob diese Limitationen auch bei Glycerin als C-Quelle auftreten.

Als Modellorganismus wurde der *E. coli*-Stamm FUS4/pF81 verwendet (Rüffer *et al.*, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2004; 26, 239-248; Sprenger und Trachtmann, unveröffentlicht). Der Stamm hat den folgenden Genotyp: $\Delta pheA \Delta tyrA \Delta aroF \Delta lac: P_{tac}: aroFBL^+$ und trägt das Plasmid pF81, auf dem unter einem tac-Promotor die Gene *aroF*, *aroL*, *aroB* und *pheA^{fbr}* (*fbr* = Feedback-Resistenz) liegen. Aufgrund der chromosomalen Deletion von *pheA* und *tyrA* ist der Stamm zunächst auxotroph für L-Tyrosin und L-Phenylalanin. Durch Induktion der Plasmid-codierten Gene wird die Produktion von L-Phenylalanin gestartet. Der Stamm bleibt aber auxotroph für L-Tyrosin, was zur Kontrolle der Biomassebildung genutzt werden kann.

Durch Fermentation von FUS4/pF81 mit Glucose, Glycerin oder Rohglycerin wurde gezeigt, dass zwar das Wachstum des Stammes auf Glucose deutlich schneller war (Glucose $\mu = 0,49 \pm 0,1 \text{ h}^{-1}$; Glycerin $\mu = 0,26 \pm 0,1 \text{ h}^{-1}$; Rohglycerin $\mu = 0,32 \pm 0,1 \text{ h}^{-1}$) die C-Ausbeuten und die Raum-Zeit-Ausbeuten von Glycerin und Rohglycerin aber deutlich höher waren (Glucose: $18,8 \pm 2,0 \%$, $0,13 \pm 0,1 \text{ g/l/h}$; Glycerin: $26,3 \pm 0,3 \%$, $0,26 \pm 0,1 \text{ g/l/h}$; Rohglycerin: $23,2 \pm 4,5 \%$, $0,22 \pm 0,05 \text{ g/l/h}$). Es wurde hierbei auch gezeigt, dass bei der Fermentation von FUS4/pF81 mit Glycerin als C-Quelle das Absenken der O_2 -Verfügbarkeit vorteilhaft ist. Bei 60% O_2 -Sättigung im Medium wurde eine C-Ausbeute von $18,3 \pm 2,5 \%$ und eine Raum-Zeit-Ausbeute von $0,21 \pm 0,02 \text{ g/l/h}$ erreicht. Bei 20% O_2 -Sättigung wurden dagegen Werte von $26,3 \pm 0,3 \%$ und $0,26 \pm 0,1 \text{ g/l/h}$ erhalten. Die Beobachtung, dass durch die Erhöhung der O_2 -Verfügbarkeit der Glycerinverbrauch über den Verlauf der Fermentation erhöht (60% O_2 : $124,7 \pm 10,8 \text{g}$; 20% O_2 : $99,4 \pm 4,3 \text{g}$), die Produktbildung aber verringert wurde (Endkonzentration L-Phenylalanin: 60% O_2 : $7,9 \pm 0,2 \text{g}$; 20% O_2 : $9,4 \pm 0,7 \text{g}$), führte zu dem Schluss, dass die Aktivität von GlpK in diesem Fall nicht den limitierenden Schritt darstellt.

Untersuchungen an $\Delta pykA$ - oder $\Delta pykF$ -Stämmen zeigte, dass die Deletion des Gens *pykA* deutlichere Effekte auf die L-Phenylalaninproduktion ausübte, als die von *pykF*. Mit dem $\Delta pykA$ -Stamm war der Glycerinverbrauch im Verlauf der Fermentation von $124,7 \pm 10,8 \text{g}$ im unveränderten Stamm auf $68,9 \pm 10,3 \text{g}$ verringert und gleichzeitig die gebildete Menge an L-Phenylalanin gesteigert (von Endkonzentration $7,9 \pm 0,2 \text{ g/l}$ auf $9,5 \pm 0,8 \text{ g/l}$). Es konnte so eine Steigerung der C-Ausbeute von $18,1 \pm 2,3 \%$ beim unveränderten Stamm auf $33,3 \pm 2,7 \%$ erreicht werden.

Die Reaktion von Fru-1,6-BP zu F6P und die E4P-Bereitstellung sind eng miteinander verknüpft, da TktA nicht nur über den oxidativen Pentosephosphatweg E4P bereitstellen kann, sondern auch direkt F6P und Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu Xylulose-5-Phosphat und E4P umsetzen kann. Aus diesem Grund wurden diese beiden Punkte gemeinsam untersucht. Es zeigte sich, dass die Überexpression von *glpX*, dem Gen der Fru-1,6-BPase II (Donahue, *Journal of Bacteriology*, 2000; 182, 5624-5627), oder *tktA* alleine keine signifikante Verbesserung brachte, die gemeinsame Überexpression aber zu einer deutlichen Steigerung in der Raum-Zeit-Ausbeute von $0,21 \pm 0,01 \text{ g/l/h}$ bei FUS4/pF81 auf $0,40 \pm 0,02 \text{ g/l/h}$ führte.

Durch die Kombination der *pykA*-Deletion mit der Überexpression von *glpX* und *tktA* konnte aber die hohe Raum-Zeit-Ausbeute des einen Stammes nicht mit der hohen C-Ausbeute des anderen Stammes vereint werden.

Nach der Deletion der Gene beider Pyruvatkinasen musste dem Stamm für das Wachstum zusätzlich Lactat gefüttert werden, um den TCA-Zyklus zu erreichen. In der Produktionsphase nur auf Glycerin wurde dann aber gezeigt, dass dieser Stamm kurzzeitig eine sehr hohe Produktivität von 90% C-Ausbeute und eine Raum-Zeit-Ausbeute von $0,63 \pm 0,03 \text{ g/l/h}$ erreichte.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass in Bezug auf die L-Phenylalaninproduktion bei diesem Stamm die Eingangsreaktion über GlpK zunächst nicht den limitierenden Schritt darstellt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass wie auch bei Glucose, durch die Deletion von *pykA* eine Erhöhung der C-Ausbeute erreicht wurde. Außerdem wurde durch die gemeinsame Überexpression von *tktA* und *glpX* gezeigt, dass mit Glycerin als C-Quelle bei der Produktion von L-Phenylalanin die E4P-Verfügbarkeit zusammen mit der F6P-Verfügbarkeit limitierend ist. Die beste Produktivität konnte jedoch durch die Deletion der Gene beider Pyruvatkinasen erreicht werden. Da die Produktionsphase aber nur über einen sehr kurzen Zeitraum von 6 Stunden anhielt, sind hier weitere Optimierungsarbeiten notwendig. Es konnte insgesamt gezeigt werden, dass die Verwendung von Glycerin oder Rohglycerin anstelle von Glucose für die Produktion von L-Phenylalanin nicht nur möglich, sondern auch vorteilhaft ist, da mit dieser C-Quelle hohe C- und Raum-Zeit-Ausbeuten möglich sind. Dies könnte sich möglicherweise auch auf die Ökoeffizienz des Biodiesels auswirken und diesem einen Vorteil gegenüber fossilem Diesel verschaffen

Abstract

Glycerol, the main by-product of the biodiesel production process, is a renewable resource and can be used both as carbon- and energy-source by microorganisms like *E. coli*. When comparing fossil diesel with biodiesel, the biofuel has a disadvantage regarding eco-efficiency due to high production costs. Therefore the conversion of glycerol into valuable fine chemicals by microorganisms like *E. coli* would be desirable. Under aerobic conditions the dissimilation of glycerol in *E. coli* proceeds via uptake through diffusion or facilitated diffusion (GlpF) and activation by an ATP-dependent glycerol kinase (GlpK) to glycerol-3-phosphate (G3P). G3P is then ubiquinone-8-dependent oxidized by G3P dehydrogenase (GlpD) to dihydroxyacetone phosphate (DHAP), which enters the central carbon metabolism (Lin, *Annual Review of Microbiology*, 1976; 30, 535-578). Currently, glucose is the carbon- and energy-source of choice for the microbial production of fine chemicals. Glucose enters the cell in a PEP-dependent manner (Postma *et al.*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1993; 57, 543-594). During the metabolism of glucose no reducing equivalents are produced until DHAP is reached and so less ATP can be produced via the respiratory chain with this carbon source in comparison to glycerol. For this reason, reduced compounds or chemicals which afford high ATP-input, can be produced at higher yields with glycerol as carbon source than with glucose. Because of these advantages, the utilization of glycerol seems to be favourable for the whole cell biosynthesis of fine chemicals like aromatic amino acids, which are produced by the cell at high energy expenditure (Atkinson, *Cellular energy metabolism and its regulation*, 1977, pp. 74-77). The utilization of glycerol, however leads to slower cell growth, which can lead to a lower space-time-yield. This can probably be ascribed to limitations in the metabolism like the reaction catalyzed by GlpK (Zwaig *et al.*, *Journal of Bacteriology*, 1970; 102, 753-759) or the reaction from fructose-1,6-bisphosphate (Fru-1,6-BP) to fructose-6-phosphate (F6P) (Marr, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 55, 316-333). In the current work, it was investigated, at the example of L-phenylalanine production, how these limitations can be overcome by metabolic engineering or by an improved fermentation procedure. Also the usage of unpurified crude glycerol as carbon source was investigated. The supply of the precursor molecules phosphoenolpyruvate (PEP) and erythrose-4-phosphate (E4P) has been shown as limiting steps. This can be overcome by the overexpression of *tktA*, the gene for the transketolase A, or the inactivation of *pykA* or *pykF*, the genes for the pyruvate kinases A and F (Bongaerts *et al.*, *Metabolic Engineering*, 2001; 3, 289-300). Therefore in this work it was investigated by metabolic engineering, if these limitations also occur with glycerol as carbon source.

As model organism the *E. coli* strain FUS4/pF81 was utilized (Rüffer *et al.*, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2004; 26, 239-248; Sprenger and Trachtmann, unpublished). The strain has the following genotype: $\Delta pheA \Delta tyrA \Delta aroF \Delta lac: P_{tac}::aroFBL^+$ and carries the plasmid pF81 which carries the genes *aroF*, *aroL*, *aroB* und *pheA^{fbr}* (*fbr* = feedback-resistance) under a *tac*-promotor. Because of the chromosomal deletion of *pheA* and *tyrA* the strain is auxotroph for L-tyrosine and L-phenylalanine. After induction of the plasmid-encoded genes, the production of L-phenylalanine starts. The strain remains auxotroph for L-tyrosine. This feature can be used to control biomass production.

Through fermentation of FUS4/pF81 with glucose, glycerol, or crude glycerol cell growth was much faster on glucose (glucose $\mu = 0.49 \pm 0.1 \text{ h}^{-1}$; glycerol $\mu = 0.26 \pm 0.1 \text{ h}^{-1}$; crude glycerol $\mu = 0.32 \pm 0.1 \text{ h}^{-1}$) but the yield (gram $C_{\text{substrate}}$ / gram C_{product} [%]; space-time-yield [g/h/l]) was significantly higher with glycerol and crude glycerol (glucose: $18.8 \pm 2.0\%$, $0.13 \pm 0.1 \text{ g/l/h}$; glycerol: $26.3 \pm 0.3 \%$, $0.26 \pm 0.1 \text{ g/l/h}$; crude glycerol: $23.2 \pm 4.5 \%$, $0.22 \pm 0.05 \text{ g/l/h}$). During the growth of FUS4/pF81 on glycerol as carbon source the utilization of low oxygen concentrations appeared as beneficial. With 60% oxygen saturation yields of $18.3 \pm$

2.5 % and 0.21 ± 0.02 g/l/h were reached. In contrast, with 20% oxygen saturation values of 26.3 ± 0.3 % and 0.26 ± 0.1 g/l/h were obtained. Concomitantly with the increase of the oxygen availability the glycerol consumption increased (60% O₂: 124.7 ± 10.8 g; 20% O₂: 99.4 ± 4.3 g), but the production rate decreased (end concentration L-phenylalanine: 60% O₂: 7.9 ± 0.2 g; 20% O₂: 9.4 ± 0.7 g). It was therefore assumed that the activity of GlpK is not limiting in the strain FUS4/pF81.

The investigation of the two pyruvate kinases showed, that the deletion of *pykA* was more beneficial than the knockout of *pykF*. With the Δ *pykA*-strain the glycerol consumption decreased from 124.7 ± 10.8 g in the unmodified strain to 68.9 ± 10.3 g and concomitantly the production rate was increased (from end concentration L-phenylalanine 7.9 ± 0.2 g/l to 9.5 ± 0.8 g/l). Therefore an increase in the carbon yield from 18.1 ± 2.3 % with the unmodified strain to 33.3 ± 2.7 % was reached.

The reaction from Fru-1,6-BP to F6P and the supply of E4P are closely related, since TktA is not only able to provide E4P via the oxidative pentose phosphate pathway but can also directly convert F6P and glyceraldehyde-3-phosphate to xylulose-5-phosphate und E4P. For this reason, these two points were investigated together. It was shown that the overexpression of *glpX*, the gene for the Fru-1,6-BPase II (Donahue, *Journal of Bacteriology*, 2000; 182, 5624-5627) or *tktA* alone had no significant effects whereas the combination of both modifications led to an increase in space-time-yield from 0.21 ± 0.01 g/l/h with FUS4/pF81 to 0.40 ± 0.02 g/l/h.

However, the combination of the *pykA*-deletion with the overexpression of *glpX* and *tktA* did not lead to a merging of the high space-time-yield from the one strain with the high carbon recovery of the other strain.

After the deletion of both pyruvate kinase genes the strain had to be fed with additional lactate to fill the TCA-cycle. In the production phase, glycerol was fed as the sole carbon and energy-source. In this phase a short-time productivity of 90% carbon recovery and a space-time yield of 0.63 ± 0.03 g/l/h was reached.

In the current work, the reaction of GlpK is not limiting regarding L-phenylalanine production in the *E. coli* strain FUS4/pF81. Furthermore, in comparison to growth on glucose, the deletion of *pykA* also led to a higher carbon recovery. Additionally, the concomitant overexpression of *tktA* and *glpX* demonstrated, that with glycerol as carbon source the supply of F6P and E4P is limiting for the production of L-phenylalanine. However the best productivity was reached after deletion of the genes for both pyruvate kinases. Since in this process the production phase lasted for only 6 hours, further improvements are necessary. In summary it could be shown, that for the production of L-phenylalanine the utilization of glycerol or crude glycerol instead of glucose is not only possible but beneficial, since higher yields can be obtained with this carbon source. This could also possibly influence the eco-efficiency of biodiesel and contribute to an advantage over fossil diesel.

2 Einleitung

Biodiesel, also ein dem Dieseldieselkraftstoff ähnlicher Kraftstoff, hergestellt aus nachwachsenden Rohstoffen, wie z. B. Rapsöl, galt bis vor einigen Jahren als nachhaltige Energiequelle und wurde in Deutschland bevorzugt behandelt. So musste bis August 2006 für Biodiesel keine Kraftstoffsteuer bezahlt werden und auch der Beschluss der Europäischen Union, bis Ende 2010 den Anteil von Biotreibstoffen am Gesamtkraftstoff von derzeit 2% auf 6,75% zu erhöhen, garantierten einen steigenden Absatz des Ökokraftstoffs (BioKraftQuG; BT-Drs 16/2709). Neueste Studien zur Umweltverträglichkeit des Biodiesels zeigen jedoch, dass die bisherige Vorgehensweise bei der Herstellung des Kraftstoffs eher umweltschädigend ist (Gerbens-Leenes *et al.*, 2009). Auch die BASF kam bei der Erstellung einer Ökoeffizienzanalyse für Biodiesel zu dem Ergebnis (Abbildung 2-1), dass insgesamt fossiler Diesel ökoeffizienter ist als Biodiesel (Achatz *et al.*, 2007). Das Schaubild ist dabei so zu lesen, dass je weiter die Markierung eines Produktes entfernt ist von der Diagonalen in Richtung linke untere Ecke, desto schlechter ist die Ökoeffizienz. Hier ist die Skalierung so zu lesen, dass der Wert 0,2 einen guten und 1,8 einen schlechten Wert für die Ökoeffizienz darstellt.

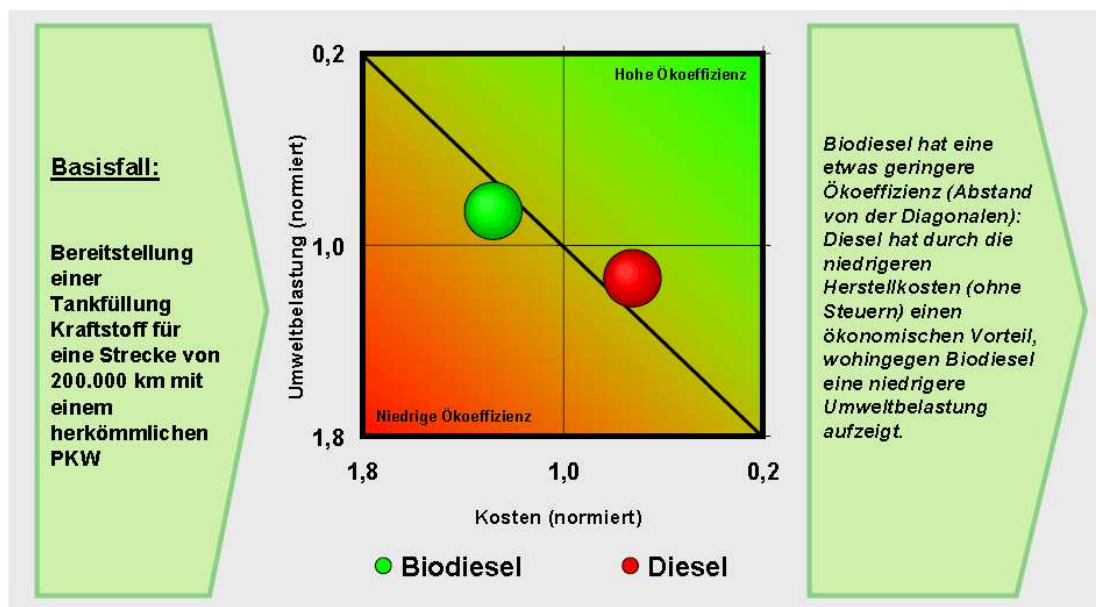


Abbildung 2-1 Ökoeffizienzanalyse von Biodiesel nach der SEEBALANCE®-Methode von BASF (Achatz *et al.*, 2007). Mit freundlicher Genehmigung von Brigitte Achatz.

Die Skalierung ist so zu lesen, dass 1,8 einen schlechten und 0,2 einen guten Wert für die Ökoeffizienz darstellt. Die für die Bewertung eingeflossenen Parameter sind in Abbildung 2-2 aufgeführt.

Die Ökoeffizienz betrachtet dabei die ökonomischen und ökologischen Einflüsse eines Produktes über den gesamten Lebensweg (Saling und Kicherer, 2004). Neben der

Umweltrelevanz werden die Kosten eines Produktes gleichwertig in die Analyse miteinbezogen. Dies gilt in gleichem Maße für Vergleiche von Produktionsverfahren. Die von der Umweltdatenbank veröffentlichte Definition der Ökoeffizienz lautet: „Das Konzept, dass eine sinnvollere Ressourcennutzung die Umweltbelastung vermindert und Kosten senkt“. Nach einer Definition des World Business Council for Sustainable Development ist Ökoeffizienz dann erreicht, wenn folgende Voraussetzungen erfüllt sind: Ressourcenschonende Produkte und Dienstleistungen, die die menschlichen Bedürfnisse befriedigen und einen Beitrag zur Lebensqualität leisten, werden zu wettbewerbsfähigen Preisen angeboten (Umweltdatenbank, 25.03.2010, letzte Änderung: 28.09.2008, <http://www.umweltdatenbank.de/lexikon/oekoeffizienz.htm>). Die für die Erstellung der Ökoeffizienzanalyse des Biodiesels betrachteten Parameter sind in Abbildung 2-2 dargestellt. Im Einzelnen handelt es sich dabei um Energieverbrauch, Emissionen, Ökotoxizitätspotential, Ressourcenverbrauch und Flächenbedarf. Die Skalierung von 0-1 bedeutet dabei entweder gut (0) oder schlecht (1) für die Ökoeffizienz und wird stufenlos verwendet.

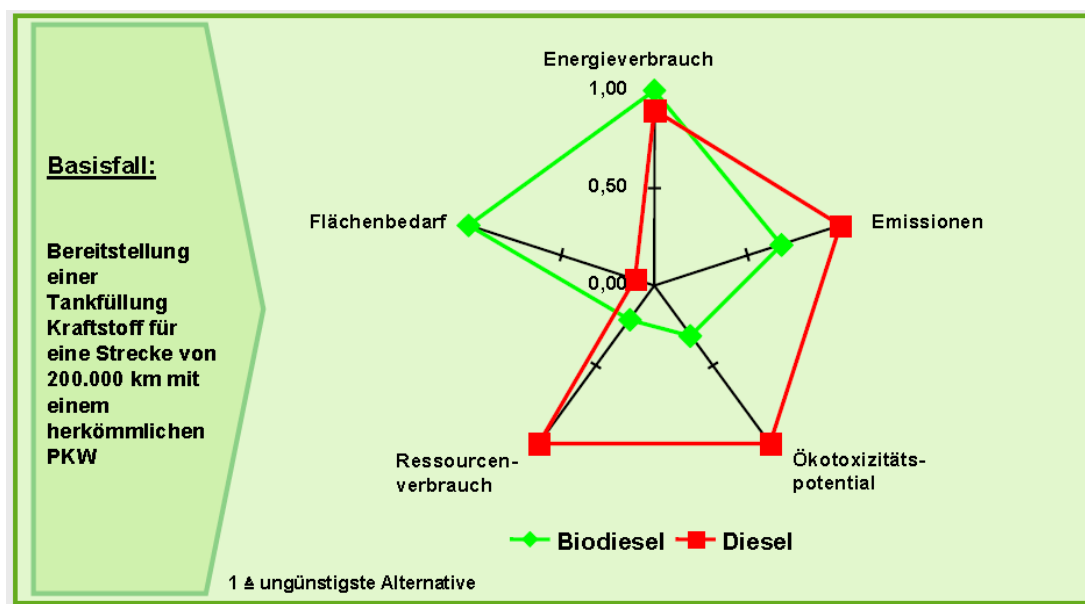


Abbildung 2-2 Die in der Ökoeffizienzanalyse betrachteten Parameter (Achatz *et al.*, 2007). Mit freundlicher Genehmigung von Brigitte Achatz.

Hier nicht aufgeführt, aber auch betrachtet worden waren die anfallenden Kosten. Der Wert 0 der Skalierung bedeutet einen guten Wert, beeinflusst die Ökoeffizienz also positiv, während die Bewertung mit dem Faktor 1 einen negativen Einfluss auf die Ökoeffizienz bedeutet.

In der Abbildung nicht dargestellt, aber trotzdem in die Bilanzierung eingeflossen sind die bei den jeweiligen Produktionsprozessen anfallenden Kosten (Achatz *et al.*, 2007). Die hohen Kosten sind dabei auch der Punkt, der die Ökoeffizienz des Biodiesels deutlich verschlechtert

(Abbildung 2-1). Dies führt zu dem Schluss, dass durch günstigere Produktionsprozesse oder einer ökonomischeren Verwertung der anfallenden Nebenprodukte die Ökoeffizienz des Biodiesels deutlich verbessert werden könnte. Ein weiteres Problem bei der Verwendung von Biodiesel ist seine Inkompatibilität mit älteren Fahrzeugen. Die früher verwendeten Gummidichtungen werden, aufgrund der etwas anderen Eigenschaften von Biodiesel verglichen mit fossilem Diesel, leicht porös und müssen ausgetauscht werden. Diese Erkenntnisse führten dazu, dass staatliche Unterstützungen für Biodiesel wieder zurückgezogen wurden. Zunächst wurden die steuerlichen Vergünstigungen schrittweise abgeschafft und dann die Quote des Biodiesels am Gesamtkraftstoff wieder auf 5,25% gesenkt, statt sie weiter zu erhöhen (Süddeutsche Zeitung, 13./14. Juni 2009, Das Ende einer Verheißung (Politikteil) <http://archiv.sueddeutsche.de/sueddz/index.php?id=A45312130OGTPOGWPTPAOEGEAARAGEPCRHSRSEORWHS>). Da jedoch das Vorkommen fossilen Öls begrenzt ist und Dieselmotoren aufgrund hoher Drücke bei der Verbrennung auf einen Kraftstoff mit guten Schmiereigenschaften angewiesen sind, bleibt die Entwicklung neuer, ökoeffizienter Verfahren zur Produktion von Biodiesel, der die entsprechenden Eigenschaften besitzt, wünschenswert. Eine Vielzahl biotechnologischer Ansätze verfolgt alternative Methoden für die Produktion von Biodiesel. Zum Einsatz kommen dabei Enzyme, ganze Zellen oder auch Mikroalgen (Chisti, 2008; Fjerbaek *et al.*, 2009). Als bislang unvermeidbares Nebenprodukt entsteht bei all diesen Prozessen Rohglycerin in stöchiometrischen Mengen. Pro Tonne an produziertem Biodiesel entstehen etwa 100kg an Rohglycerin. Durch die hohe Biodieselproduktion sank in den letzten Jahren der Preis für Glycerin und Rohglycerin drastisch. Im Jahr 2004 wurde für eine Tonne aufgereinigtes Glycerin nur 500€ bezahlt. Dieser Preisverfall war mit einer der Gründe, dass z.B. die Biodiesel Schwarzheide GmbH Ende 2003 Insolvenz anmelden musste (<http://www.neueenergie.net/index.php?id=662>). Eine ökonomischere Weiterverwertung des Rohglycerins könnte sich somit positiv auf die Gesamtbilanz auswirken und möglicherweise eine Markteinführung ökoeffizienter Methoden zur Biodieselproduktion erleichtern. Ein weiterer Vorteil der Rohglycerininnutzung wäre für die Pflanzenölraffinerien, dass die kostspielige Aufreinigung von 300 US\$/m³ Rohglycerin wegfallen würde (Rupilius und Ahmad, 2007).

Viele Projekte befassen sich seit dem Preisverfall des Glycerins mit der Verwendung von Rohglycerin als alternativem Rohstoff und es konnten bereits neue Anwendungsbereiche erschlossen werden (Pagliaro *et al.*, 2007). Durch Zumischung des Rohglycerins zu Beton erhielt dieser verbesserte Eigenschaften (Rossi *et al.*, 2008). Auch bei der Produktion von

Frostschutzmittel kann Rohglycerin eingesetzt werden (Dasari *et al.*, 2005). Des Weiteren wird es dem Tierfutter beigemischt (Lammers *et al.*, 2008). Als Zusatz für die Verbrennung in Heizkraftwerken wurde es ebenfalls verwendet, allerdings besteht hier die Gefahr, dass bei unvollständiger Verbrennung (Temperaturen $\leq 550^{\circ}\text{C}$) giftiges Acrolein entsteht (Pedersen *et al.*, 1999; Stevens und Maier, 2008). Durch Projekte wie diese konnten Ölmühlen wie die Firma IBG Monforts Oekotec GmbH & Co. KG aber trotzdem nur mit einem Reinerlös von 0,008€/l Rohglycerin rechnen (IBG Monforts Oekotec GmbH & Co. KG, Kosten der Biodieselerzeugung mit der RMEnergy-500 CM bis RMEnergy-4000 CM, Stand 2006, www.biokraftstoff-portal.de/data/File/Monforts_Wirtschaftl.pdf). Eine Umsetzung des Rohglycerins in wirtschaftlich wertvolle Feinchemikalien mithilfe von Mikroorganismen könnte diesen Betrag deutlich übertreffen und somit dazu beitragen eine nachhaltige und umweltverträglichere Biodieselproduktion zu etablieren. Die mikrobielle Chemikalienproduktion ausgehend von nachwachsenden Rohstoffen ist dabei die gängige Technologie, um in großem Umfang diverse natürliche Substanzen wie unter anderem Ethanol (Lin und Tanaka, 2006), organische Säuren, z. B. Essigsäure und Citronensäure (Berovic und Legisa, 2007; Sauer *et al.*, 2008) und Aminosäuren (Ikeda, 2003) auf nachhaltige Weise herzustellen. Ebenfalls mikrobiell hergestellt werden Produkte, deren Komplexität durch chemische Synthese nicht oder nur schwer erreicht werden kann, wie z. B. Antibiotika (Heide, 2009) oder Vitamine (Soetaert und Vandamme, 2006). Die wichtigste C-Quelle für die mikrobielle Fermentation ist derzeit Glucose, welche durch Hydrolyse von Stärke oder Cellulose gewonnen wird (Peters, 2006). Alternativ können Mikroorganismen wie z.B. *Escherichia coli* aber auch Glycerin als C-Quelle für die Synthese von Chemikalien nutzen (Lin, 1976). Die hier beschriebene Arbeit soll deshalb einen neuen Ansatz zur Nutzung des Rohglycerins bei der mikrobiellen Produktion von Feinchemikalien am Beispiel von L-Phenylalanin aufzeigen.

2.1 Der Modellorganismus *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) gehört in die Gruppe der Enterobacteriaceae und ist ein Gram-negatives, stäbchenförmiges, peritrich begeißeltes, nicht sporenbildendes Bakterium. *E. coli* K12 wurde bereits vollständig sequenziert (Blattner *et al.*, 1997; Hayashi *et al.*, 2006) und ist der am besten untersuchte Mikroorganismus, weshalb er zu einem Modellorganismus der Mikrobiologie wurde. Das Bakterium ist anspruchslos, nicht pathogen und einfach zu kultivieren. Das Temperaturoptimum liegt bei 37°C, das pH-Optimum bei 6-7. Bei Wachstum auf komplexen Nährmedien werden unter optimalen Bedingungen Generationszeiten von ca. 20 min erreicht. Auf synthetischen Nährmedien aus Kohlenstoffquelle, Stickstoffquelle und Mineralsalzen liegen die Generationszeiten mit Glucose als C-Quelle bei 50 min (Neidhardt *et al.*, 1990). Aufgrund dieser Eigenschaften und der zur Verfügung stehenden molekulargenetischen Methoden wird *E. coli* häufig als Ganzzell-Biokatalysator in biotechnologischen Prozessen verwendet. Die Ganzzell-Biokatalyse wird zunehmend dazu eingesetzt, Fein- und Massenchemikalien für die Nahrungsmittelindustrie, Pharmaindustrie oder den Energiesektor zu produzieren (Liese und Villela, 1999; Schmid *et al.*, 2001; Ishige *et al.*, 2005; Tao and Xu, 2009). Die Vorteile bei der Verwendung von Biokatalysatoren, also ganze Zellen sowie auch Enzyme, sind die Reaktionsführung bei milden Bedingungen (Temperatur meistens bei 20-40°C, Wasser als Solvens, keine Gefahrstoffe wie z.B. Wasserstoff als Reagenzien notwendig), die hohe Enantio- und Regioselektivität und die Umweltfreundlichkeit des Katalysators (Kompostierbarkeit des Biokatalysators, wenn Wildtyp verwendet wird) (Nakamura *et al.*, 2003). Diese Vorteile führen dazu, dass Aufreinigungsschritte eingespart und die Menge unerwünschter oder schwierig zu entsorgender Nebenprodukte reduziert werden kann. Ein weiterer Vorteil der Ganzzell-Biokatalyse liegt in der Möglichkeit, das intrazelluläre Cofaktor-Regenerierungssystem zu nutzen (Schmid *et al.*, 2001). Als ein Beispiel kann hier die Produktion chiraler Alkohole mit einem rekombinanten *E. coli*-Stamm genannt werden (Wang *et al.*, 1999). In dieser Arbeit war gezeigt worden, dass dieser Stamm mithilfe seines Cofaktor-Regenerierungssystem in der Lage ist chirale Alkohole mit hoher Ausbeute zu produzieren.

2.2 Glucose- und Glycerinstoffwechsel in *E. coli*

Glucose ist die von *E. coli* bevorzugte C-Quelle und gehört zu den Zuckern, die über das PEP-abhängige Phosphotransferasesystem (PTS) mittels Gruppentranslokation transportiert

und phosphoryliert werden (Postma *et al.*, 1993). Die Glucoseaufnahme ist dabei gekoppelt an die Phosphorylierung des Substrats. Der Phosphatrest stammt vom Phosphoenolpyruvat (PEP) und wird über eine gekoppelte enzymatische Kaskade auf das Glucosemolekül übertragen. Das so aktivierte Molekül Glucose-6-Phosphat (G6P) steht dann für den zentralen Stoffwechsel zur Verfügung. Der Abbau von Glucose kann über drei verschiedene Abbauwege erfolgen. Der wichtigste ist der Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (EMP), gefolgt von Pentosephosphatweg (PPP) und Entner-Doudoroff-Weg (EDP). Für den EDP war allerdings gezeigt worden, dass dieser Stoffwechselweg bei Glucose als C-Quelle in *E. coli* üblicherweise nicht aktiv ist (Wang *et al.*, 1958). In der Glykolyse wird G6P zunächst zu Fructose-6-Phosphat (F6P) isomerisiert, welches dann ATP-abhängig zu Fructose-1,6-Bisphosphat (Fru-1,6-BP) phosphoryliert wird. Fru-1,6-BP wird anschließend über die Aldolase aufgespalten in Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GA3P), welches über mehrere Schritte weiter verstoffwechselt wird zu PEP und Pyruvat und dann über Oxalacetat und Acetyl-CoA in den TCA-Zyklus gelangt (Abbildung 2-3). Der PPP ist für die Bereitstellung von Intermediaten (Erythrose-4-Phosphat, Ribose-5-Phosphat) und Cofaktoren (NADPH) für die Synthese von Biomolekülen wichtig. Das Endprodukt des Stoffwechselwegs ist GA3P bzw. F6P, welches dann wieder in die Glykolyse eingeschleust werden kann (Fuchs, 2006).

Glycerin dagegen kann, wie andere ungeladene kleine Moleküle durch passive Diffusion in die Zelle gelangen. Bei *Escherichia coli* erfolgt die Aufnahme zusätzlich über erleichterte Diffusion. Dies wird durch den Glycerinfacilitator GlpF katalysiert (Heller *et al.*, 1980). Da Glycerin auch durch passive Diffusion in die Zelle gelangen kann, spielt GlpF aber nur bei geringen Konzentrationen an Glycerin eine wichtige Rolle (Richey und Lin, 1972). Es war gezeigt worden, dass eine *E. coli* $\Delta glpF$ -Mutante bei Konzentrationen unter 5 mM deutlich im Wachstum gehemmt ist, während das Wachstum bei Konzentrationen ≥ 5 mM ähnlich dem *E. coli* $glpF^+$ -Stamm war, durch weitere Erhöhung der Glycerinkonzentration aber nicht weiter gesteigert werden konnte. In weiterführenden Studien war gezeigt worden, dass schon bei einer Konzentration von 2 mM Glycerin die halbmaximale Transportkapazität von GlpF erreicht ist (Lu *et al.*, 2003). Im Metabolismus von Glycerin existieren in *E. coli* zwei unabhängige Wege, die zu DHAP führen, welches in den Zentralstoffwechsel eingeht.

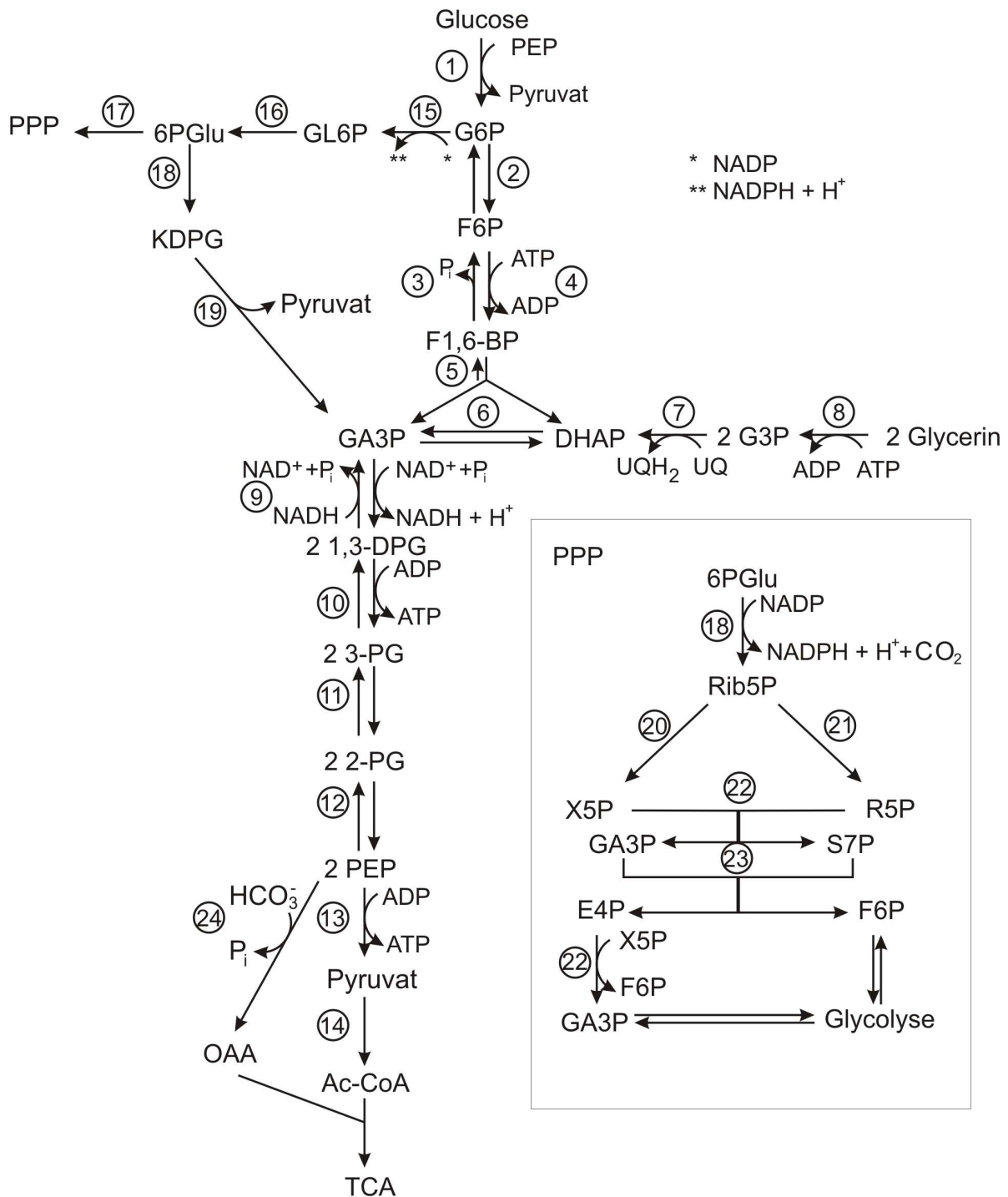


Abbildung 2-3 Schematische Darstellung der folgenden Stoffwechselwege ausgehend von Glucose oder Glycerin: EMP (Embden-Meyerhof-Parnas-Weg, Schritte 1-6 und 9-14), aerobe Glycerinassimilation (Schritte 7 und 8), HMP (Hexosemonophosphatweg, Schritte 15-17), EDP (Entner-Doudoroff-Weg, Schritte 18 und 19) und PPP (Pentosephosphatweg, Schritte 20-23)

Abkürzungen: G6P – Glucose-6-Phosphat, F6P - Fructose-6-Phosphat, F1,6-BP – Fructose-1,6-bisphosphat, G3P – Glycerin-3-Phosphat, DHAP – Dihydroxyacetonphosphat, GA3P – Glycerinaldehyd-3-Phosphat, 1,3-DPG – 1,3-Diphosphoglycerat, 3-PG – 3-Phosphoglycerat, 2-PG – 2-Phosphoglycerat, PEP – Phosphoenolpyruvat, Ac-CoA – Acetyl-CoA, TCA – Tricarbonsäurezyklus, GL6P – Gluconolacton-6-Phosphat, 6PGlu – 6-Phosphogluconat, KDPG – 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat, PPP – Pentosephosphatweg, Rib5P – Ribulose-5-Phosphat, X5P – Xylulose-5-Phosphat, R5P – Ribose-5-Phosphat, S7P – Sedoheptulose-7-Phosphat., OAA - Oxalacetat

Beteiligte Enzyme: 1 – Phosphotransferasesystem, 2 – Phosphoglucoisomerase, 3 – Fructose-1,6-bisphosphatase, 4 – 6-Phosphofruktokinase, 5 – Fructosebisphosphataldolase, 6 – Triosephosphatisomerase, 7 – Glycerin-3-Phosphatdehydrogenase, 8 – Glycerinkinase, 9 – Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase, 10 – Phosphoglyceratkinase, 11 – Phosphoglyceratmutase, 12 – Enolase, 14 – Pyruvatkinase, 15 – Glucose-6-Phosphatdehydrogenase, 16 – Phosphogluconolactonase, 17 – 6-Phosphogluconatdehydrogenase, 18 – Phosphogluconatdehydratase, 19 – 2-Keto-3-Deoxygluconat-6-Phosphataldolase, 20 – Ribulosephosphat-3-Epimerase, 21 – Ribose-5-Phosphatisomerase, 22 – Transketolase, 23 – Transaldolase, 24 – Phosphoenolpyruvatcarboxylase.

Der erste Weg ist der vom Wildtyp unter normalen Bedingungen genutzte Weg: Glycerin wird von der Glycerinkinase (GlpK) ATP-abhängig phosphoryliert (Zwaig *et al.*, 1970) und anschließend von der Glycerin-3-Phosphatdehydrogenase (GlpD, aerob; GlpABC, anaerob) zu DHAP oxidiert (Kistler *et al.*, 1969). Der zweite Weg wird möglicherweise nur unter anaeroben Bedingungen genutzt (Gonzalez *et al.*, 2008). Hierbei kann das Glycerin zuerst durch die Glycerindehydrogenase (GldA) NAD⁺-abhängig oxidiert (Tang *et al.*, 1979) und anschließend von der Dihydroxyacetonkinase (DhaKLM) PEP-abhängig zu DHAP phosphoryliert werden (Jin und Lin, 1984). Beim zweiten Weg ist zu beachten, dass die Expression von *gldA* nach Induktion durch Hydroxyaceton erfolgt (Jin *et al.*, 1983; Truniger und Boos, 1994), weshalb hier vermutlich zunächst eine Deregulation notwendig ist, um diesen Weg tatsächlich nutzen zu können.

Im Gegensatz zu Glucose müssen bei Verwendung von Glycerin als C-Quelle aber auch gluconeogenetische Reaktionen stattfinden. Dies ist notwendig, um einen Stofffluss in Richtung des PPP zu erreichen (Abbildung 2-3).

Die Dissimilation von Glucose bzw. Glycerin ist auf mehreren Ebenen streng reguliert. Hauptangriffspunkt der verschiedenen Regulationsmechanismen sind die nichtreversiblen Reaktionen, die im Folgenden näher beschrieben und in Abbildung 2-4 dargestellt sind.

Die Phosphorylierung der Glucose erfolgt über das PTS-System. Die Gene *ptsH*, *ptsI* und *crr*, welche für die Enzyme des PTS-Systems codieren, sind in einem Operon lokalisiert und werden auf einem gewissen Grundniveau konstitutiv exprimiert (De Reuse *et al.*, 1984). Zusätzlich induziert wird das System zum einen durch den CRP-cAMP-Komplex (De Reuse *et al.*, 1992). Der CRP-cAMP-Komplex ist ein dualer Regulator und besteht aus dem „cAMP Rezeptor Protein“ (CRP) und dem Effektormolekül cAMP (siehe dazu Review Botsford und Harman, 1992). Das Effektormolekül cAMP wird durch die Adenylatcyclase gebildet, die dann aktiv ist, wenn wenig oder keine Glucose vorhanden ist, somit das Enzym EIIA^{Glc} hauptsächlich phosphoryliert vorliegt und in diesem Zustand an die Adenylatcyclase bindet und damit aktiviert (Saier, 1998). Das gebildete cAMP bindet dann an CRP, welches dadurch allosterisch aktiviert wird und an eine bestimmte DNA-Sequenz binden kann (Won *et al.*, 2009). Die Genexpression kann dann entweder induziert oder reprimiert werden (Botsford

und Harman, 1992). Ein weiterer Induktor ist extrazelluläre Glucose (De Reuse *et al.*, 1992). Die Untersuchung verschiedener durch extrazelluläre Glucose induzierbarer Gene, wie z. B. *ptsH* (codiert für „Histidine-containing carrier Protein“ (Hpr) (Saffen *et al.*, 1987)) und *ptsG* (codiert für Glucosetransporter Enzym IIBC^{Glc} (Bouma *et al.*, 1987)), führte zu der Erkenntnis, dass der schon früher entdeckte Repressor Mlc (Makes Large Colonies) (Hosono *et al.*, 1995) hierbei eine Rolle spielt (Plumbridge, 1998; Kimata *et al.*, 1998; Zeppenfeld *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2000). Es war gezeigt worden, dass Mlc sich in Gegenwart von Glucose von der DNA löst, an Enzym IIBC^{Glc} bindet und damit die Transkription des bisher reprimierten Gens ermöglicht (Lee *et al.*, 2000). Eine weitere Regulation des Gens *ptsG* erfolgt posttranskriptionell über eine kleine, nicht-codierende sRNA (Vanderpool und Gottesman, 2004). sRNAs im Allgemeinen agieren hauptsächlich posttranskriptionell, indem sie die Translation oder Stabilität der Ziel-mRNA beeinflussen (Gottesman, 2004; Storz *et al.*, 2004). Es war gezeigt worden, dass unter Glucose-6-Phosphat-Anhäufung die Stabilität der *ptsG*-mRNA signifikant abnimmt (Kimata *et al.*, 2001). Im Folgenden war dann entdeckt worden, dass die sRNA SgrS (davor: RyaA (Zhang *et al.*, 2003)) für die Instabilität der *ptsG*-mRNA unter Glucose-6-Phosphat-Stress verantwortlich ist (Vanderpool und Gottesman, 2004). Es war das Modell vorgeschlagen worden, dass G6P an das Rezeptorprotein SgrR bindet und dieser Komplex dann die Transkription der SgrS-sRNA induziert. Zusammen mit Hfq, einem Protein, das die Bindung zwischen RNA-Molekülen verstärkt (Valentin-Hansen *et al.*, 2004; Aiba, 2007), bindet diese sRNA dann an die *ptsG*-mRNA und fördert so den Abbau dieser mRNA durch die RNase E (Vanderpool und Gottesman, 2004).

Die nächste Reaktion, die einer Regulation unterliegt, ist die Phosphorylierung von Fructose-6-Phosphat zu Fructose-1,6-bisphosphat durch die Phosphofruktokinase PfkA. Die Kontrolle erfolgt hier hauptsächlich auf Proteinebene (Blangy *et al.*, 1968; Ewings und Doelle, 1980; Auzat *et al.*, 1994). Es war gezeigt worden, dass PfkA in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen kann, in der aktiven R- oder der inaktiven T-Form. Die T-Form wird durch Binden an PEP, den allosterischen Inhibitor gebildet. Die R-Form dagegen erhält das Protein durch Binden an die allosterischen Aktivatoren ADP oder GDP. In dieser Form hat das Protein dann eine hohe Affinität zu Fructose-6-Phosphat. Zusätzlich wird die Transkription von *pfkA* durch Cra inhibiert (Nègre *et al.*, 1996; Hardiman, 2010). Cra, früher FruR genannt (Geerse *et al.*, 1989), übt seine Regulation bei geringen Konzentrationen an Fructose-6-Phosphat und Fructose-1,6-bisphosphat aus, indem es an eine palindromische Operatorsequenz bindet und so die Transkription entweder aktivieren oder reprimieren kann (Ramseier, 2007). Cra aktiviert dabei im Allgemeinen Gene, die für biosynthetische oder oxidative Enzyme codieren

(z. B. Schlüsselenzyme des TCA-Zyklus, des Glyoxalatzyklus, der Gluconeogenese und des Elektronentransfers) und reprimiert Gene, die für glycolytische Enzyme codieren (Schlüsselenzyme des Embden-Meyerhof-Parnas- und Entner-Doudoroff-Weg) (Saier, Jr. und Ramseier, 1996).

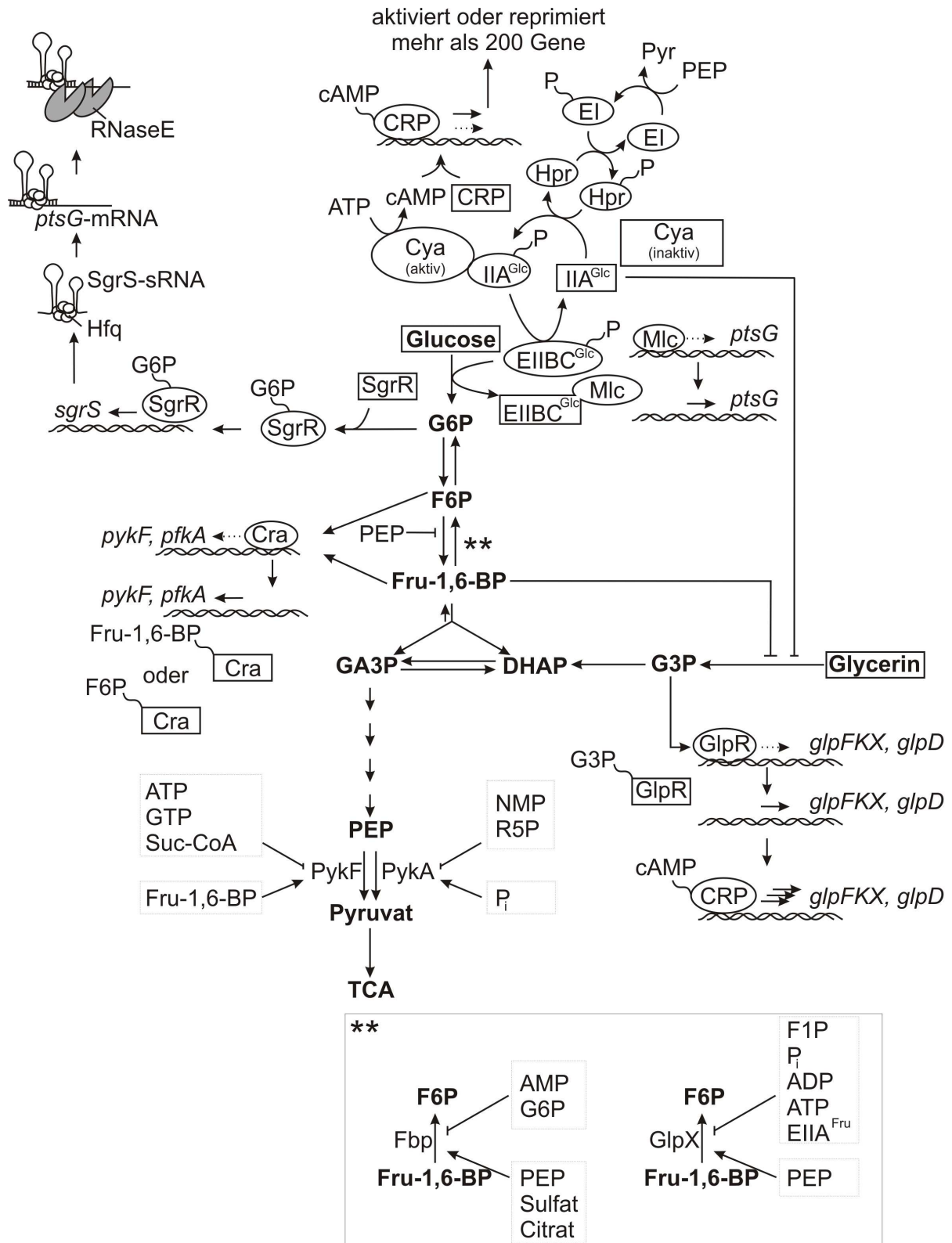


Abbildung 2-4 Regulationsvorgänge in *E. coli* unter aeroben Bedingungen bei Verwendung der C-Quellen Glucose oder Glycerin.

Umrahmte Metabolite sind extrazellulär. Bei der Genregulation bedeuten gestrichelte Pfeile eine Repression und durchgezogene Pfeile die Induktion der Transkription. Fett dargestellt ist der Stoffwechselweg ausgehend von Glucose oder Glycerin.

Abkürzungen: G6P – Glucose-6-Phosphat, F6P – Fructose-6-Phosphat, Fru-1,6-BP – Fructose-1,6-bisphosphat, G3P – Glycerin-3-Phosphat, DHAP – Dihydroxyacetonphosphat, GA3P – Glycerinaldehyd-3-Phosphat, PEP – Phosphoenolpyruvat, Pyr - Pyruvat, TCA – Tricarbonsäurezyklus, R5P -

Ribose-5-Phosphat, NMP - Nucleosidmonophosphat, F1P - Fructose-1-Phosphat, P_i - freies Phosphation, Fbp - Fructose-1,6-bisphosphatase I, GlpX - Fructose-1,6-bisphosphatase II, cAMP - zyklisches Adenosinmonophosphat, Cya - Adenylatzyklase, Cra - Catabolite repressor activator, CRP - Catabolism repressor protein, PtsG - Glucose-spezifische PTS-Permease, Mlc - making large colonies, GlpR - G3P-Repressor, *glpK* - Glycerinkinase, *glpD* - G3P-Dehydrogenase, SgrR - Sugar transport-related Regulator, SgrS - Sugar transport-related sRNA, Hfq - RNA-Bindeprotein, PykF - Pyruvatkinase F, PykA - Pyruvatkinase A, *pfkA* - Phosphofruktokinase.

Die Regulation der Glycerinkinase erfolgt auf Protein- und Transkriptionsebene. Auf Proteinebene wird das Enzym durch Fructose-1,6-bisphosphat allosterisch inhibiert (Thorner und Paulus, 1973). Ein weiterer allosterischer Inhibitor ist unphosphoryliertes EIIA^{Glc} (Novotny *et al.*, 1985), welches in Gegenwart von Glucose in diesem Zustand vorliegt (Saier, 1998). Diese Art der Inhibition wird dann üblicherweise „Inducer Exclusion“ genannt, weil hier in Gegenwart einer C-Quelle die Dissimilation einer anderen C-Quelle verhindert wird, indem die Aufnahme oder Bildung der entsprechenden Induktor-Molekülen gehemmt wird (Saier und Crasnier, 1996). Das für die Glycerinkinase codierende Gen *glpK* wird ebenfalls auf einem geringen Niveau konstitutiv exprimiert und die Transkription durch sein Produkt, Glycerin-3-Phosphat zusätzlich induziert, indem die Bindung des Repressors GlpR an die Operatorsequenz im *glpK*-Gen verhindert wird (Lin, 1976; Weissenborn *et al.*, 1992). Wenn der Repressor sich von diesem Bereich der DNA gelöst hat, wird zusätzlich eine Konsensussequenz freigelegt, die vom CRP/cAMP-Komplex erkannt wird. Dies führt dann zu einer weiteren Induktion der Transkription (Weissenborn *et al.*, 1992). Ein weiteres Gen, das durch GlpR reprimiert wird ist *glpD* (Ye und Larson, 1988). Induziert wird *glpD* ebenfalls durch den cAMP/CRP-Komplex (Choi *et al.*, 1991). Für die Dephosphorylierung von Fructose-1,6-bisphosphat zu Fructose-6-Phosphat stehen *E. coli* zwei Enzyme zur Verfügung, die Fructose-1,6-bisphosphatase I (Fbp) und II (GlpX). Die Regulation von Fbp erfolgt über PEP, Sulfat und Citrat, welche als allosterische Aktivatoren agieren (Hines *et al.*, 2006). In weiteren Experimenten war gezeigt worden, dass AMP und Glucose-6-Phosphat allosterische Inhibitoren der Fructose-1,6-bisphosphatase I sind (Hines *et al.*, 2007). Das Gen für das zweite Enzym mit Fructose-1,6-bisphosphataseaktivität *glpX* liegt distal auf einem Operon zusammen mit *glpF* und *glpK* (Donahue *et al.*, 2000). Es war gezeigt worden, dass die Aktivität des Enzyms in Gegenwart von Fructose-1-Phosphat, anorganischem Phosphat, ADP und ATP inhibiert und durch PEP aktiviert wird. Aufgrund dieser regulatorischen Eigenschaften war vermutet worden, dass dieses Enzym bei Wachstum auf Glycerin gebildet wird und unterstützend für Fbp wirkt (Donahue *et al.*, 2000; Col, 2004).

Die Pyruvatkinase PykA wird aktiviert durch Nucleosidmonophosphate und Ribose-5-Phosphat. Inhibiert wird das Enzym durch freie Phosphationen (Waygood *et al.*, 1975). PykF aus *E. coli* dagegen wird durch Fructose-1,6-bisphosphat aktiviert und inhibiert durch ATP, GTP und Succinyl-CoA (Waygood *et al.*, 1976). Auf Transkriptionsebene erfolgt die Regulation von *pykF* durch Cra. Die Bindung des Regulators an die Operatorsequenz bewirkt in diesem Fall eine Reprimierung der Transkription, was zeigt, dass es sich bei PykF um ein glycolytisches Enzym handelt (Bledig *et al.*, 1996; Ramseier, 2007). *pykA* unterliegt dabei keiner Regulation durch Cra (Bledig *et al.*, 1996). Unter microaeroben Bedingungen war für *pykA* gezeigt worden, dass eine Regulation durch ArcA und FNR besteht (Shalel-Levanon *et al.*, 2005). Die Regulatoren ArcA und FNR sind dabei hauptsächlich dafür zuständig, die Expression verschiedenster Gene unter aeroben oder anaeroben Bedingungen zu steuern (Iuchi und Lin, 1988; Salmon *et al.*, 2003).

2.3 Vergleich der C-Quellen Glycerin und Glucose für die Produktion von Feinchemikalien

Wie bei den meisten gluconeogenetischen C-Quellen weist *E. coli* auch bei Verwendung von Glycerin eine geringere Wachstumsrate auf als bei glycolytischen C-Quellen wie Glucose (Andersen und von Meyenburg, 1980; Bettenbrock *et al.*, 2007). Zurückzuführen ist dies möglicherweise auf die Feedback-Inhibition der Glycerinkinase durch Fru-1,6-BP (Thorner und Paulus, 1973) und der dephosphorylierten Form des Proteins EIIA^{Gluc} (Novotny *et al.*, 1985). Ein weiterer Punkt, der im Zusammenhang mit einer reduzierten Wachstumsrate auf Glycerin diskutiert worden war, ist die geringe Glucose-6-Phosphat-Verfügbarkeit (Marr, 1991). Es war gezeigt worden, dass mit Glycerin als C-Quelle ein deutlich geringerer Pool an Glucose-6-Phosphat in der Zelle vorhanden ist (Lowry *et al.*, 1971) und somit möglicherweise auch die Aktivität der Fructose-1,6-bisphosphatase einen limitierenden Schritt in der Glycerinverwertung darstellen könnte. Ebenfalls erwähnt werden sollte hier die Katabolitenrepression. Es war gezeigt worden, dass nicht nur Glucose Katabolitenrepression auslösen kann (vgl. Kapitel 2.2 und Postma *et al.*, 1993), sondern auch Glycerin-3-Phosphat (Eppler *et al.*, 2002). Schon vorher war gezeigt worden, dass auch andere nicht-PTS-Substrate Katabolitenrepression durch unphosphoryliertes EIIA^{Gluc} auslösen können (Hogema *et al.*, 1998). Als möglicher Grund für die Dephosphorylierung von EIIA^{Gluc} war dabei das Verhältnis PEP/Pyruvat diskutiert worden, da eine Korrelation zwischen einem geringen PEP-/Pyruvat-Quotienten ($\leq 0,4$) und der Dephosphorylierung von EIIA^{Gluc} beobachtet worden war. Für Glycerin-3-Phosphat war dagegen postuliert worden, dass es die Aktivierung

der Adenylatcyclase durch phosphoryliertes EIIA^{Glc} inhibiert (Eppler *et al.*, 2002). Verglichen mit Glucose können diese Limitierungen dann z.B. bei der Produktion von Shikimisäure zu einer reduzierten Raum-Zeit-Ausbeute führen (Ahn *et al.*, 2008). Dagegen weist die Verwendung von Glycerin aber auch einige Vorteile auf, wie z.B. das höhere Reduktionspotential von $\kappa = 4,7$ /Glycerin im Vergleich zu $\kappa = 4/0,5$ Glucose (Yazdani und Gonzalez, 2007), weshalb pro C-3-Einheit Glycerin ein Reduktionsäquivalent mehr gebildet werden kann als bei der Verwendung von Glucose. κ ist dabei definiert als Reduktionsgrad jedes einzelnen C-Atoms. Dies kann ausgenutzt werden, um unter anaeroben Bedingungen hochreduzierte Chemikalien wie 1,2-Propandiol herzustellen (Yazdani und Gonzalez, 2008). Eine weitere Möglichkeit besteht darin unter aeroben Bedingungen Feinchemikalien zu produzieren, die von den Zellen mit einem hohen ATP-Aufwand hergestellt werden. Aufgrund des hohen Reduktionspotentials von Glycerin kann hier bei gleicher C-Aufnahmemenge verglichen mit Glucose mehr ATP über die Atmungskette regeneriert werden. Dies spiegelt sich im P/O-Quotienten wider. Der P/O-Quotient gibt dabei das Verhältnis von produziertem ATP pro reduziertem Molekül Sauerstoff an ($\text{mol}_{\text{ATP}}/\text{mol}_{\text{O}_2}$). Für den Wildtyp *E. coli* war bei Glucose als C-Quelle ein P/O-Quotient von $0,43 \pm 0,09$ gemessen und berechnet worden. Für Glycerin war dagegen ein Wert von 0,83 bestimmt worden (Andersen und von Meyenburg, 1980). Auch die PEP-unabhängige Phosphorylierung von Glycerin stellt einen Vorteil dar. PEP wird bei einer Reihe anaboler Prozesse, wie z. B. der Synthese aromatischer Aminosäuren (siehe Kapitel 2.6) bei der Nutzung von Glucose oder anderen PTS-Substraten als C-Quelle aber auch als Phosphatdonor für die Phosphorylierung benötigt (Postma *et al.*, 1993). Diese Konkurrenzreaktionen zwischen anabolen und katabolen Prozessen können bei Verwendung von Glycerin vermieden werden, was theoretisch ebenfalls zu einer höheren C-Ausbeute führt (Abbildung 2-5).

Durch das höhere Energie- und Reduktionspotential von Glycerin im Vergleich zu Glucose erscheint deshalb eine Ganzzellbiosynthese von energieaufwändigen Verbindungen wie zum Beispiel aromatische Aminosäuren als besonders sinnvoll.

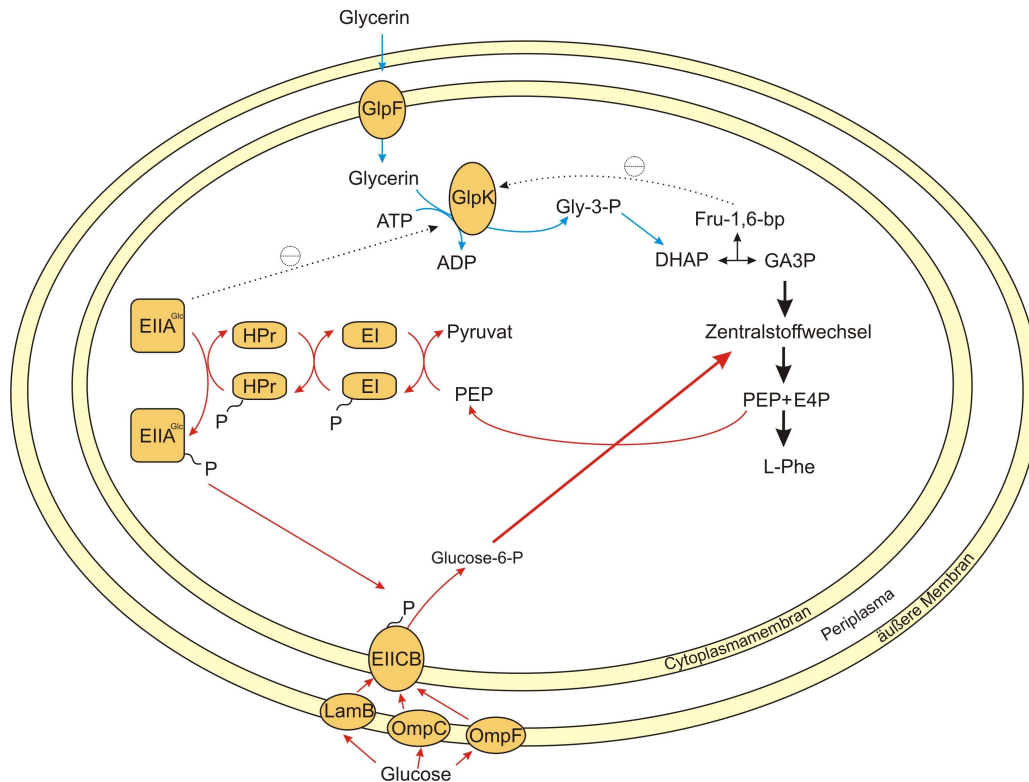


Abbildung 2-5 Schematisch vereinfachte Darstellung der Stoffwechselvorgänge bei *E. coli* in Gegenwart von Glucose oder Glycerin bei der Bildung von L-Phenylalanin.

Rote Pfeile betreffen dabei nur den Glucosstoffwechsel, blaue Pfeile nur den Glycerinstoffwechsel. Fett dargestellte Pfeile weisen auf eine unvollständige Darstellung des Stoffwechselwegs hin, gestrichelte Pfeile auf eine Interaktion der unterschiedlichen Komponenten. LamB, OmpC und OmpF stellen die hauptsächlichen Eintrittspforten für Glucose über die äußere Membran dar (Nikaido und Vaara, 1985; Death *et al.*, 1993). Für eine stöchiometrisch genaue Darstellung der Stoffwechselabläufe vgl. Abbildung 2-3 und Abbildung 2-11.

2.4 Einsatz von Glycerin in biotechnologischen Prozessen

Aufgrund der aktuellen Marktsituation für Glycerin, wird diese Kohlenstoffquelle für immer mehr biotechnologische Prozesse als lohnende Alternative zu Glucose entdeckt. Ein Beispiel ist die mikrobielle Produktion von Bernsteinsäure. Bernsteinsäure bzw. Succinat ist ein wichtiger Baustein für eine ganze Reihe von Chemikalien wie z.B. Tetrahydrofuran, 1,4-Diaminobutan und Succinonitril und wurde bislang rein chemisch aus Erdöl hergestellt. Eine mikrobielle Bereitstellung von Bernsteinsäure in industriellem Maßstab erfolgt bislang noch nicht (Sauer *et al.*, 2008; Kurzrock und Weuster-Botz, 2010). In *E. coli* war kürzlich gezeigt worden, dass die Produktion von Bernsteinsäure allein durch Verstärken des Glycerinstoffwechsels mit einer Ausbeute von 0,45g/g Glycerin möglich ist (Gonzalez *et al.*, 2008). Vergleichsprozesse mit Glucose können zwar etwa doppelt so hohe Werte liefern, allerdings war bei diesen Stämmen auch schon der weitere Stoffwechsel für die

Bernsteinsäureproduktion angepasst worden (Okino *et al.*, 2008). Ein weiteres Beispiel ist die mikrobielle Produktion von Lysin und Glutamat mit *Corynebacterium glutamicum*. Es war gezeigt worden, dass in *C. glutamicum* nach heterologer Expression der Gene *glpF*, *glpK* und *glpD* aus *E. coli* die Aminosäuren Lysin und Glutamat mit Glycerin als C-Quelle produziert werden konnten. Es waren dabei Ausbeuten erhalten worden, die im Bereich der Werte waren, die auch mit Glucose als C-Quelle erhalten worden waren (Rittmann *et al.*, 2008). Ein sehr bekanntes Beispiel für einen Glycerin-basierenden Prozess ist die Herstellung von 1,3-Propandiol mit *K. pneumoniae*. 1,3-Propandiol wird für die Produktion von Polyester und biologisch abbaubarem Plastik verwendet. Kommerziell wird 1,3-Propandiol über chemische Synthese von den Konzernen Shell und DuPont hergestellt (Abbildung 2-6).

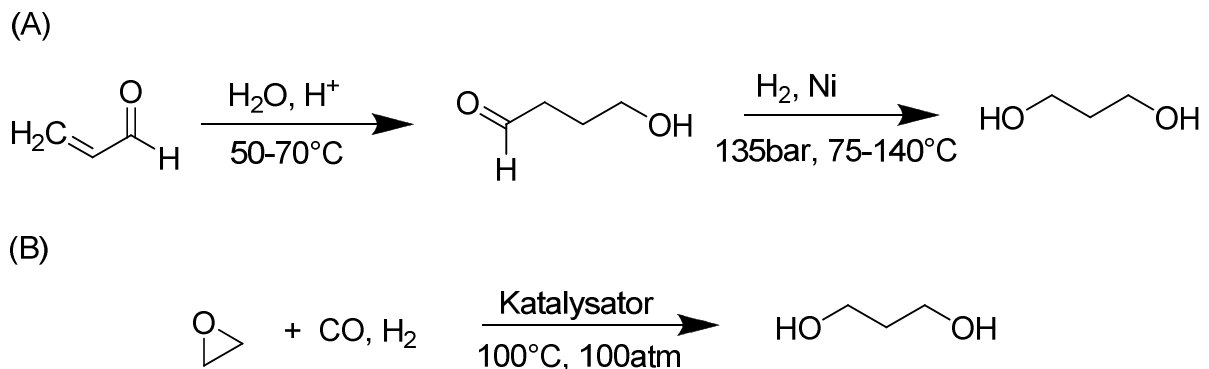


Abbildung 2-6 Chemische Synthese von 1,3-Propandiol.

(A) Bei DuPont früher verwendete Methode ausgehend von Acrolein. (B) Bei Shell verwendete Methode ausgehend von Ethylenoxid. Verändert nach Saxena *et al.*, 2009.

Die mikrobielle Produktion von 1,3-Propandiol erfolgt gewöhnlich mit Bakterienstämmen, die natürlicherweise das Produkt bilden können. Hierzu gehören Stämme der Gattungen *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Citrobacter*, *Enterobacter* und *Clostridium*. Üblicherweise waren die Stämme dabei so verändert worden, dass 1,3-Propandiol aus Glucose gewonnen werden konnte. Die zugeführte Glucose wird dabei zunächst über das Glycolyse-Intermediat DHAP mithilfe einer DHAP-Dehydrogenase und einer G3P-Phosphatase aus *Saccharomyces cerevisiae* in Glycerin überführt. Die anschließende Umsetzung in 1,3-Propandiol erfolgt durch die Glycerin-Dehydratase und die 1,3-Propandiol-Dehydrogenase (Chotani *et al.*, 2000; Saxena *et al.*, 2009).

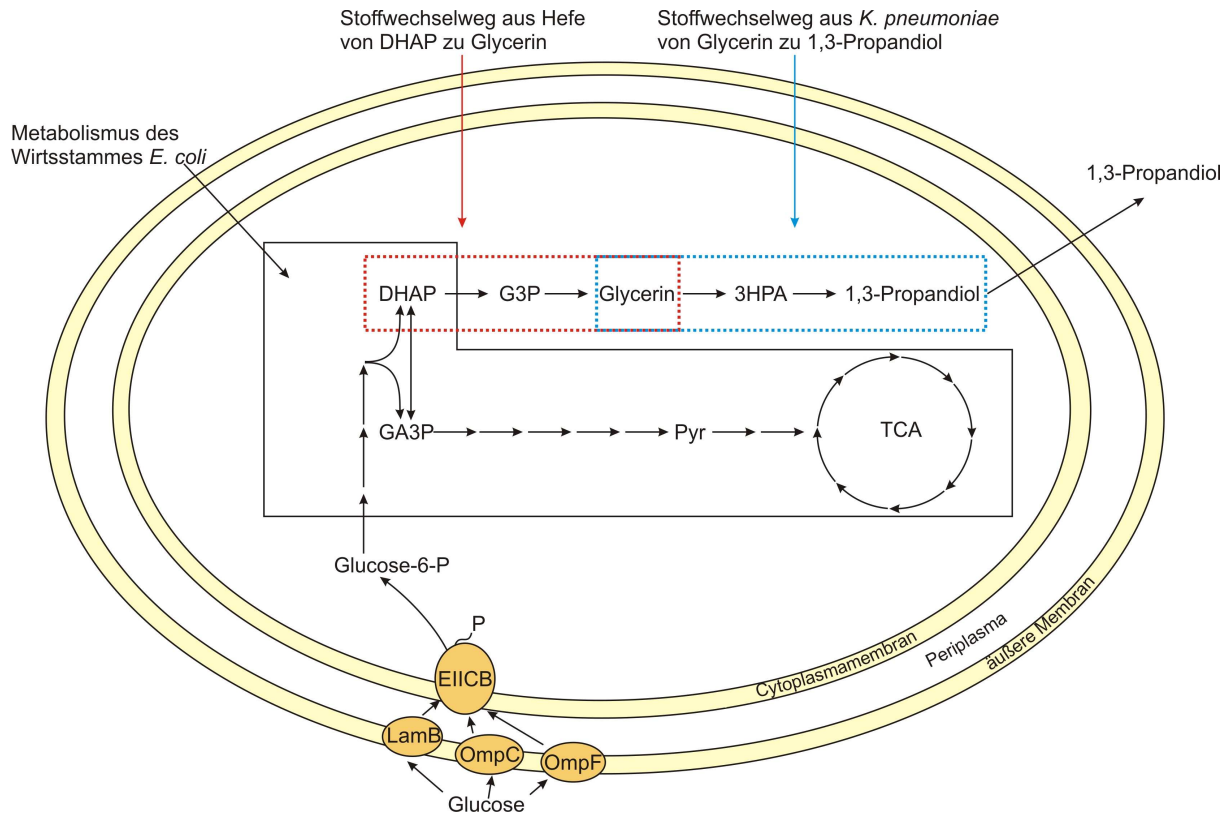


Abbildung 2-7 Das 1,3-Propanediol-Verfahren von DuPont mit dem Wirtsstamm *E. coli* (verändert nach Sanford *et al.*, 2004).

Die Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis, die Glucoseaufnahme in Abbildung 2-5 näher erläutert.

Eine weitere Möglichkeit ist die heterologe Expression der für die 1,3-Propanediolproduktion notwendigen Gene in *E. coli*. Hier liegt vor allem der Forschungsschwerpunkt von DuPont und Genencor International (2004), die einen gentechnisch veränderten *E. coli*-Stamm entwickelt haben (Abbildung 2-7), der aus Glucose mit 51%iger g/g-Ausbeute 1,3-Propanediolkonzentrationen von bis zu 135 g/l erreicht (Sanford *et al.*, 2004). In Rahmen einer Joint Venture Firma der Unternehmen DuPont und Tate & Lyle BioProducts wird momentan das biobasierte PDO-Verfahren stark vorangetrieben, weshalb diese Firma 2007 das einzige Unternehmen war, das biobasiertes PDO mit einer Produktionskapazität von 1000000 lbm/Jahr (ca. 227000kg/Jahr) in kommerziellem Maßstab produziert (DuPont Tate & Lyle BioProducts, 2007, <http://www.duponttateandlyle.com/faqs.html>). Sorona[®], ein PDO-basiertes Produkt, besteht aktuell zu 37% (bezogen auf das Gewicht) aus erneuerbaren Rohstoffen (Dupont, 2009, http://www2.dupont.com/Sorona/en_US/). Da Glycerin inzwischen deutlich billiger geworden ist, ist auch ein direkter Einsatz dieser C-Quelle denkbar, so dass für die Zelle ein deutlich geringerer metabolischer Aufwand notwendig ist, um das Endprodukt zu synthetisieren. Inzwischen war auch gezeigt worden, dass im

industriellen Maßstab der Umsatz von Glycerin zu 1,3-Propandiol in *Klebsiella pneumoniae* mit einer mol/mol-Ausbeute von 57%, was einer g/g-Ausbeute von 67,3% entspricht und einer Raum-Zeit-Ausbeute von 2,2g/l/h möglich ist (Liu *et al.*, 2007). Im Vergleich dazu lieferten Prozesse mit Glucose als C-Quelle Raum-Zeit-Ausbeuten von 3,5g/l/h und g/g-Ausbeuten von 51% (Nakamura und Whited, 2003). In weiteren Experimenten war dann auch gezeigt worden, dass für 1,3-Propandiolproduktionsprozesse mit *Klebsiella pneumoniae* direkt Rohglycerin als C-Quelle eingesetzt werden konnte und damit ähnliche Werte erhalten wurden wie mit reinem Glycerin (Mu *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2009).

Kürzlich war behauptet worden, dass *E. coli* auch ohne externe Elektronenakzeptoren unter anaeroben Bedingungen Glycerin verwerten kann (Dharmadi *et al.*, 2006; Murarka *et al.*, 2008). Der vorgeschlagene Stoffwechselweg ist in Abbildung 2-8 dargestellt. Eine kritische Bewertung des vorgeschlagenen Stoffwechselwegs erfolgt in der Diskussion. Es war berichtet worden, dass zur Erhaltung des intrazellulären Gleichgewichts der Reduktionsäquivalente 1,2-Propandiol-Gärung statt findet (Gonzalez *et al.*, 2008). Die Arbeiten zu diesem Stoffwechsel stehen zwar noch in den Anfängen, aber sie bieten vielleicht Potential für die Entwicklung neuer, *E. coli*-basierter Plattformchemikalien, die auf anaerobem Wege produziert werden können. Aufgrund des hohen Reduktionspotentials von Glycerin ist die anaerobe Produktion von z.B. Propionsäure, Bernsteinsäure, Butanol und Ethanol theoretisch mit einer höheren Ausbeute möglich als z.B. mit Glucose oder Xylose (Yazdani und Gonzalez, 2007). In einem Versuch zur Produktion von Ethanol mit Glycerin als C-Quelle war dann gezeigt worden, dass auch bei diesem Prozess mühelos reines Glycerin durch Rohglycerin ersetzt werden konnte (Yazdani und Gonzalez, 2008). Weitere biotechnologische Ansätze, in denen erfolgreich der Einsatz von Rohglycerin als C-Quelle erfolgte, wurden beschrieben. Als Beispiel wäre hier die Wasserstoff- und Ethanolproduktion mit *Enterobacter aerogenes* zu nennen. Es war gezeigt worden, dass Ethanol mit einer Ausbeute von 0,85 mol/mol Glycerin gebildet werden konnte (Ito *et al.*, 2005). Ein weiteres Beispiel ist die Produktion von Wasserstoff durch Photofermentation mit dem Organismus *Rhodospseudomonas palustris*. Hier war ebenfalls gezeigt worden, dass durch den Austausch von reinem Glycerin durch Rohglycerin nur sehr geringe Verluste in der Produktivität entstanden. Statt einer Ausbeute von 3,5 H₂/Glycerin (reines Glycerin) war mit Rohglycerin eine Ausbeute von 3,1 H₂/Glycerin gemessen worden (Sabourin-Provost und Hallenbeck, 2009).

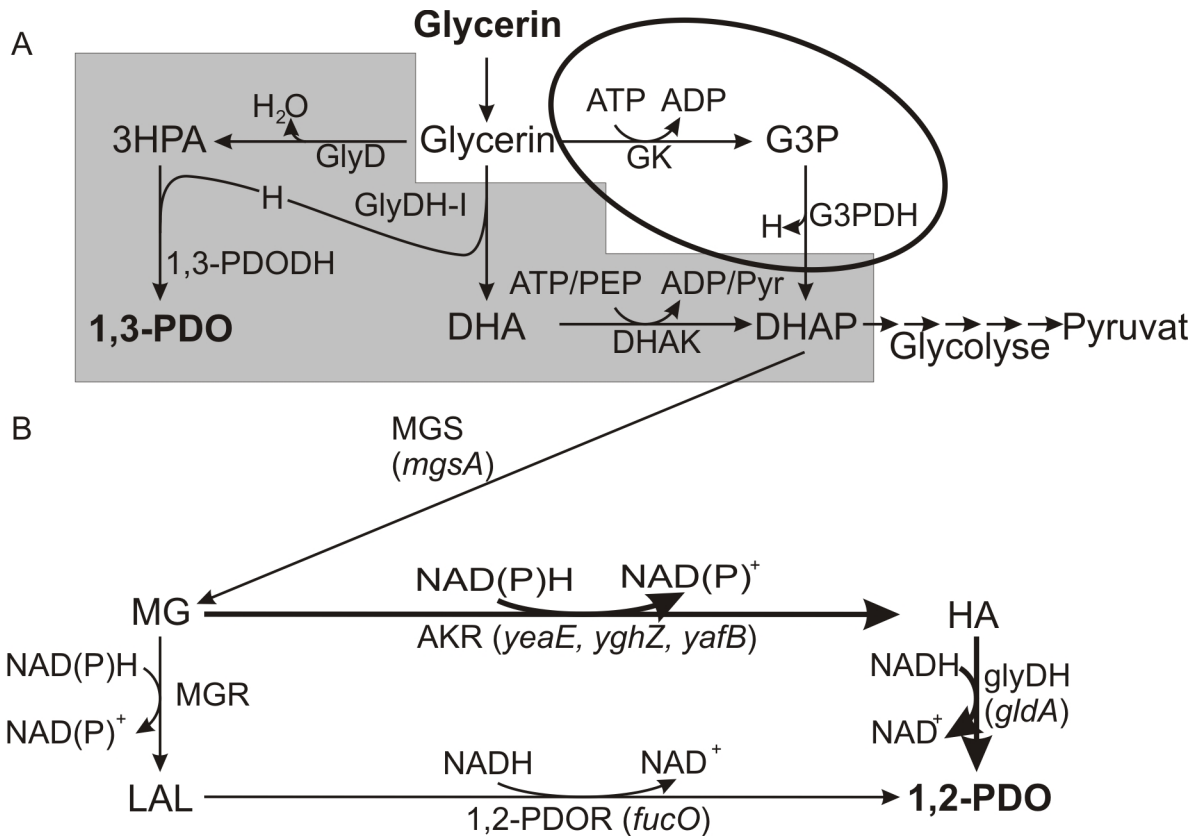


Abbildung 2-8 Anaerobe Verwertung von Glycerin in *E. coli*.

(A) Grau hinterlegt ist der anaerobe Stoffwechselweg, wie er aus z.B. *Enterobacteriaceae* bekannt ist. Der mit einem Oval markierte Weg stellt den aeroben Abbau von Glycerin in *E. coli* dar. Experimentell war gezeigt worden, dass *E. coli* in der Lage ist, unter anaeroben Bedingungen Glycerin zu DHA zu oxidieren. Weitere Versuche hatten zu dem Schluss geführt, dass die in (B) fett markierten Pfeile auf den tatsächlich ablaufenden Weg zum 1,2-Propandiol hinweisen. AKR, Aldoketoreduktase; DHAK, DHA kinase; GK, Glycerinkinase; GlyD, Glycerindehydratase; GlyDH-I, Glycerindehydrogenase, Typ I; G3PDH, G3P-Dehydrogenase; H, Reduktionsäquivalente ($H \frac{1}{4} NADH/NADPH/FADH_2$); HA, Hydroxyaceton; LAL, Lactaldehyd; MG, Methylglyoxal; MGR, Methylglyoxalreduktase; MGS, Methylglyoxalsynthase; PYR, Pyruvat; 1,2-PDOR, 1,2-Propandiolreduktase; 1,3-PDO, 1,3-Propandiol; 1,3-PDODH, 1,3-PDO Dehydrogenase; 3HPA, 3-Hydroxypropionaldehyd. Fett dargestellte Metabolite sind extrazellulär. Verändert nach Gonzalez *et al.*, 2008.

2.5 Was ist Rohglycerin?

Seit der Preis für Glycerin auf ein ökonomisch interessantes Niveau gesunken ist, wird diese C-Quelle auch als Alternative zu Glucose gehandelt. Um weitere Kosten zu senken, wird oftmals auch untersucht, ob der direkte Einsatz von Rohglycerin möglich ist. Hier stellt sich die Frage, um was es sich bei Rohglycerin handelt. Zur Beantwortung dieser Frage ist es notwendig, sich den Biodieselproduktionsprozess genauer zu betrachten (Abbildung 2-9). Bei der Herstellung von Biodiesel wird zunächst das Pflanzenrohöl zur Entschleimung und

Entsäuerung mit Wasser, Phosphorsäure und Natronlauge behandelt. Das raffinierte Pflanzenöl wird dann mit Methanol und einem Katalysator umgeestert zu Fettsäuremethylester (FAME) und Glycerin. Als Katalysator wird dabei üblicherweise KOH oder NaOH verwendet. Die FAME stellen den Biodiesel dar. Das Glycerin ist in diesem Stadium noch sehr verdünnt und enthält Verunreinigungen wie restliches Methanol, Katalysator, unveresterte Fettsäuren und Asche und wird deshalb als Rohglycerinwasser bezeichnet. Durch Destillation des Rohglycerinwassers wird überschüssiges Wasser und Methanol entfernt, so dass letztendlich das eigentliche Rohglycerin übrig bleibt.

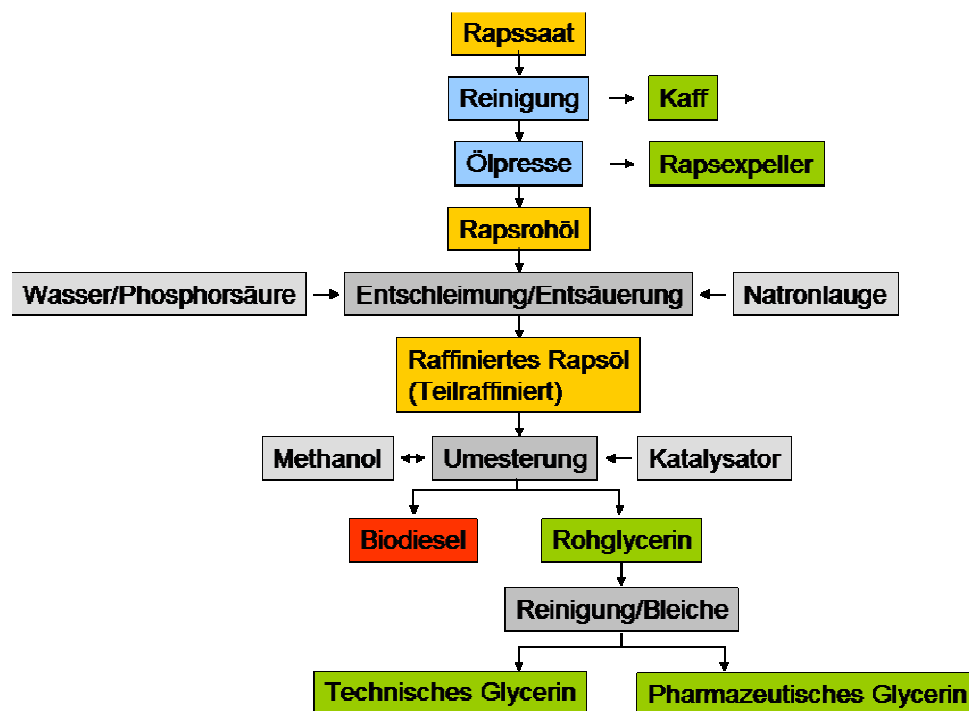


Abbildung 2-9 Biodieselproduktionsprozess. Verändert nach <http://www.emerald-biodiesel.de/emerald/herstellung.html>

Als übliche Werte der Zusammensetzung des Rohglycerins werden im Internet oft folgende Werte angegeben: Glyceringehalt mindestens 80%, Wassergehalt maximal 15%, Asche maximal 7,5%, MONG (**M**atter **O**rganic **N**on **G**lycerol) maximal 1,5%, Methanol maximal 0,5% und Salze maximal 5,5% (<http://www.biodiesel.de/index.php3?hid=010139>). Hierbei ist zu beachten, dass es sich bei diesen Werten um Grenzwerte handelt. In Abbildung 2-10 ist ein Vergleich von Glycerin und Rohglycerin gezeigt. Das Bild macht deutlich, dass auch schon visuell klare Unterschiede zwischen den beiden Substanzen zu erkennen sind.

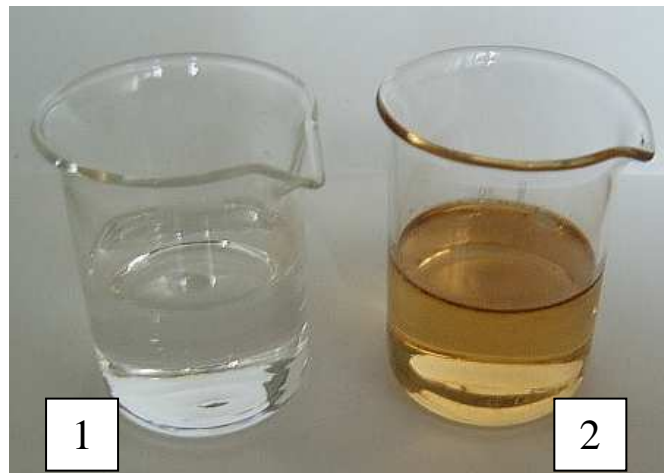


Abbildung 2-10 Vergleich von aufgereinigtem Glycerin (1) und Rohglycerin (2).

Das Foto wurde im Jahr 2008 am Institut für Mikrobiologie aufgenommen. Der Glycingehalt des aufgereinigten Glycerins beträgt $\geq 86\%$ (v/v). Die Grenzwerte der Zusammensetzung eines typischen Rohglycerins (ADM Biodiesel) sind im Folgenden aufgelistet: Glycingehalt mindestens 80%, Wassergehalt maximal 15%, Asche maximal 7,5%, MONG (Matter Organic Non Glycerol) maximal 1,5%, Methanol maximal 0,5% und Salze maximal 5,5% (<http://www.biodiesel.de/index.php3?hid=010139>).

Viele Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit Pflanzenöl und dem daraus gewonnenen Rohglycerin. Analysen dieser Stoffe zeigen, dass auch das Ausgangsmaterial Einfluss auf die Zusammensetzung des Öls und des Rohglycerins haben. In Tabelle 2-2 und Tabelle 2-1 sind die Ergebnisse der Analyse der Nährwerte, sowie die Analyse auf Makroelemente, Kohlenstoff und Stickstoff von verschiedenen Pflanzenölen und dem daraus hergestellten Rohglycerin dargestellt (Thompson und He, 2006). Zur Lagerung und Haltbarkeit ist wenig bekannt. Bei Verwendung des Rohglycerins als Tierfuttermittel wird angegeben, dass die Haltbarkeit mindestens ein Jahr beträgt (Sepura, 2006, <http://www.sepura.de/agrarservice.php?rubrik=agrar&site=rohglycerin.php&name=Rohglycerin%2080%20%20ig%20QS%20-%20zertifiziert>). Da Rohglycerin als schwach wassergefährdend gilt und Glycerin allgemein hygroskopisch ist, wird empfohlen die Lagerbehälter geschlossen zu halten und vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung zu schützen (Dr. Pieper Technologie- und Produktentwicklung GmbH, 2006, http://www.dr-pieper.com/catalog/ge/i/012_glycerin.htm5; EOP Falkenhagen 2008, <http://www.eopbiodieselag.de/qualitaet.php?mid=2>).

Tabelle 2-1 Nährwertanalysen verschiedener Rohglycerin- und Ölproben (aus Thompson und He, 2006).

Ausgangsmaterial	Ida Gold Senfsaat	Pac Gold Senfsaat	Rapssaat	Canola	Sojabohne	Meerkohl	WVO
Öle							
Fett [%]	98,2	99,8	98,9	97,3	97	98,7	99,9
Kohlenhydrate [%]	1,36	n.d.	1,05	2,36	2,91	1,18	n.d.
Protein [%]	0,08	0,07	0,06	0,09	0,09	0,1	0,1
Kalorien [kJ/kg]	37,2	37,6	37,4	37,1	37	37,4	37,7
Asche [%]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Rohglycerin							
Fett [%]	2,03	1,11	9,74	13,1	7,98	13,1	7,98
Kohlenhydrate [%]	82,8	83,8	75,5	75,2	76,2	78,6	26,9
Protein [%]	0,14	0,18	0,07	0,06	0,05	0,44	0,23
Kalorien [kJ/kg]	14,6	14,5	16,3	17,5	15,8	16,3	27,2
Asche [%]	2,8	1,9	0,7	0,65	2,73	0,25	5,5

n.d. – nicht detektierbar, Canola – Erucasäure-freier Raps (<http://en.wikipedia.org/wiki/Canola>), WVO – pflanzliches Abfallöl (Waste Vegetable Oil).

Tabelle 2-2 Ergebnis der Analyse auf Makroelemente, Kohlenstoff und Stickstoff verschiedener Rohglycerin- und Ölproben (aus Thompson und He, 2006).

Ausgangsmaterial	Ida Gold Senfsaat	Pac Gold Senfsaat	Rapssaat	Canola	Sojabohne	Meerkohl	WVO
Öle							
Calcium, ppm	2,7 ± 0,2	4,9 ± 0,5	15,7 ± 0,6	7,6 ± 0,9	3,1 ± 0,2	47,7 ± 0,6	n.d.
Kalium, ppm	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Magnesium, ppm	0,8 ± 0,0	1,3 ± 0,1	2,1 ± 0,1	1,6 ± 0,0	1,2 ± 0,1	28,3 ± 2,1	n.d.
Phosphor, ppm	n.d.	8,0 ± 0,9	13,0 ± 0,9	10,0 ± 0,8	10,0 ± 0,9	256,7 ± 5,8	n.d.
Schwefel, ppm	26,0 ± 2,2	23,0 ± 1,5	24,0 ± 1,1	22,0 ± 1,8	22,0 ± 0,6	44,0 ± 1,2	28,0 ± 2,7
Natrium, %wt	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kohlenstoff, %wt	77,3 ± 0,58	77,0 ± 0,58	77,3 ± 0,58	77,0 ± 0,0	77,0 ± 0,0	77,7 ± 0,58	76,3 ± 0,58
Stickstoff, %wt	0,22 ± 0,03	0,21 ± 0,02	0,17 ± 0,12	0,22 ± 0,01	0,22 ± 0,06	0,22 ± 0,01	0,25 ± 0,03
Rohglycerin							
Calcium, ppm	11,7 ± 2,9	23,0 ± 1,0	24,0 ± 1,7	19,7 ± 1,5	11,0 ± 0,0	163,3 ± 11,6	n.d.
Kalium, ppm	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	216,7 ± 15,3	n.d.
Magnesium, ppm	3,9 ± 1,0	6,6 ± 0,4	4,0 ± 0,3	5,4 ± 0,4	6,8 ± 0,2	126,7 ± 5,8	0,4 ± 0,0
Phosphor, ppm	25,3 ± 1,2	48,0 ± 2,0	65,0 ± 2,0	58,7 ± 6,8	53,0 ± 4,6	136,7 ± 57,7	12,0 ± 1,5
Schwefel, ppm	21,0 ± 2,9	16,0 ± 1,4	21,1 ± 1,0	14,0 ± 1,5	n.d.	128,0 ± 7,6	19,0 ± 1,8
Natrium, %wt	1,17 ± 0,15	1,23 ± 0,12	1,06 ± 0,07	1,07 ± 0,12	1,20 ± 1,10	1,10 ± 0,10	1,40 ± 0,16
Kohlenstoff, %wt	24,0 ± 0,0	24,3 ± 0,58	25,3 ± 0,58	26,3 ± 0,58	26,0 ± 1,00	24,1 ± 0,0	37,7 ± 0,58
Stickstoff, %wt	0,04 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,03	0,06 ± 0,02	0,12 ± 0,01

n.d. – nicht detektierbar, Canola – Erucasäure-freier Raps (<http://en.wikipedia.org/wiki/Canola>), WVO – pflanzliches Abfallöl (Waste Vegetable Oil).

2.6 Biosynthese aromatischer Aminosäuren bei *E. coli*

Die Synthese aromatischer Aminosäuren erfolgt in Pflanzen, Pilzen, Bakterien, Archäen und Apicomplexa. Unterschiede bestehen hauptsächlich in den Proteineigenschaften der einzelnen Enzyme, wie es z. B. für die Chorismatsynthese und die DAHP-Synthase gezeigt worden war. Einen Überblick über diesen Stoffwechselweg und die einzelnen Enzyme in den unterschiedlichen Organismen geben zahlreiche Reviews zu diesem Thema (Herrmann, 1995; Herrmann und Weaver, 1999; Macheroux *et al.*, 1999). Da in dieser Arbeit das Bakterium *E.*

coli als Wirtsorganismus verwendet worden war, wird hier nur der in diesem Organismus ablaufende Stoffwechsel betrachtet.

Die Biosynthese aromatischer Aminosäuren (Abbildung 2-11) startet mit der Kondensation von einem Molekül PEP mit einem Molekül E4P zu DAHP + P_i. Katalysiert wird diese Reaktion durch die DAHP Synthase. Über 3-Dehydroquinat und 3-Dehydroshikimat wird das Zwischenprodukt Shikimat erreicht, nach welchem der Zyklus manchmal auch Shikimatweg genannt wird (Sprenger, 2007a). Nach ATP-abhängiger Phosphorylierung des Shikimats und Einbau eines weiteren Moleküls PEP wird EPSP und schließlich Chorismat erhalten. Chorismat stellt einen Verzweigungspunkt in diesem Stoffwechselweg dar, an dem die Synthese entweder weiterlaufen kann in Richtung L-Tryptophan oder L-Phenylalanin und L-Tyrosin. Der nächste Knotenpunkt ist Prephenat. Hier wird jeweils über einen weiteren Zwischenschritt L-Tyrosin oder L-Phenylalanin synthetisiert (Pittard, 1996a). Die Bereitstellung aromatischer Aminosäuren ist für die Zelle mit einem sehr hohen Energieaufwand verbunden (Atkinson, 1977) und wird deshalb, wie auch die Glykolyse, auf mehreren Ebenen streng reguliert. Die zwei wichtigsten Regulationspunkte sind die Eingangsreaktion und die Reaktionen ausgehend von Chorismat. Die Kondensation von PEP und E4P kann von drei Isoenzymen (AroF, AroH, AroG) durchgeführt werden (Pittard, 1996a). Jedes der drei Isoenzyme wird dabei spezifisch von einer aromatischen Aminosäure inhibiert. L-Tyrosin hemmt dabei die Aktivität von AroF (Schoner und Herrmann, 1976), L-Phenylalanin die von AroG (McCandliss *et al.*, 1978) und L-Tryptophan die von AroH (Camakaris und Pittard, 1974). Für *aroB* war zwar gezeigt worden, dass die Überexpression dieses Gens bei der Produktion von Komponenten aus dem Biosyntheseweg der aromatischen Aminosäuren notwendig ist, damit keine Zwischenprodukte akkumulieren (vgl. Kapitel 2.7 und (Dell und Frost, 1993)), aber wie auch für *aroD* und *aroE* war gezeigt worden, dass dieses Gen konstitutiv exprimiert wird und keiner Regulation unterliegt (Tribe *et al.*, 1976).

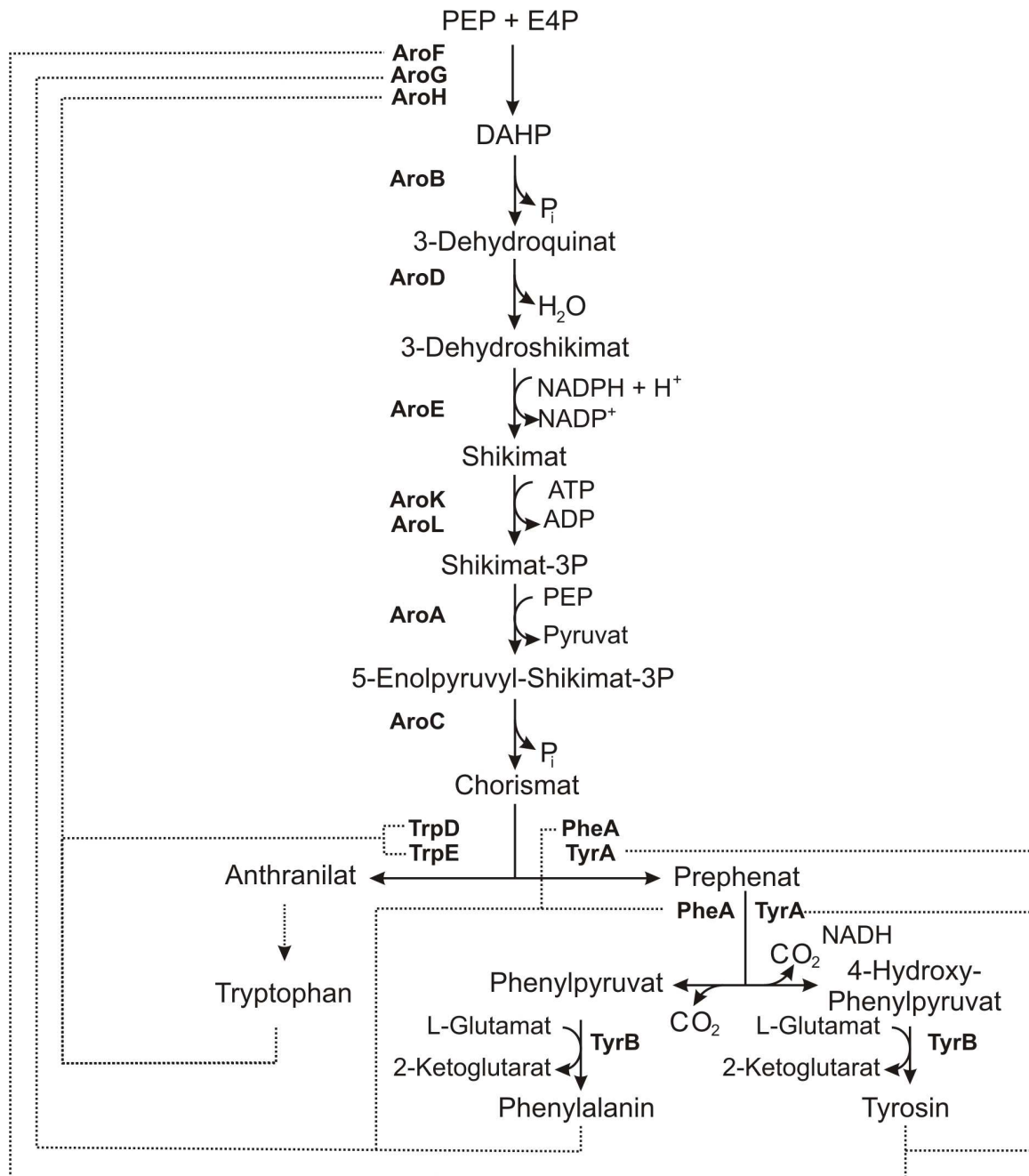


Abbildung 2-11 Schematische Darstellung der Biosynthese aromatischer Aminosäuren in *E. coli*.

Gestrichelte Linien weisen auf eine Feedback-Inhibierung hin. Der Weg vom Anthranilat zum Tryptophan ist unvollständig dargestellt. Abkürzungen: AroF, AroG, AroH - 3-Deoxy-D-arabinoheptulosonat-7-phosphate-Synthase, AroB - 3-Dehydroquinat-Synthase, AroD - 3-Dehydroquinat-Dehydratase, AroE - Shikimat-Dehydrogenase, AroK, AroL - Shikimat-Kinase 1 + 2, AroA - 5-Enolpyruvyl-shikimat-3-Phosphat-Synthase, AroC - Chorismat-Synthase, TrpD, TrpE - Anthranilat-Synthase, PheA, TyrA - Chorismat-Mutase, TyrB - Tyrosin-Aminotransferase. Verändert nach www.ecocyc.org (superpathway of phenylalanine, tyrosine, and tryptophan biosynthesis) (Keseler *et al.*, 2009).

Weiterhin findet Regulation auf der Transkriptionsebene durch die Repressoren TyrR und TrpR statt. Die Produktion der beiden Repressoren wiederum wird durch eine hohe intrazelluläre Konzentration an L-Tryptophan (TrpR) (Gunsalus und Yanofsky, 1980) oder L-

Phenylalanin und L-Tyrosin aktiviert (TyrR) (Cornish *et al.*, 1986; Pittard *et al.*, 2005). TyrR reprimiert dann die Transkription der beiden Gene *aroF* und *aroG* (Pittard *et al.*, 2005), während TrpR die Transkription von *aroH* hemmt (Gunsalus und Yanofsky, 1980). Die nächste Reaktion, die einer Kontrolle unterliegt, ist die Reaktion der Shikimatkinase II (AroL). Dieses Enzym wird auf Transkriptionsebene ebenfalls durch die Repressoren TyrR und TrpR inhibiert (Lawley und Pittard, 1994). Eine weitere Regulation erfolgt für die Enzyme TrpDE, PheA und TyrA. Hier erfolgt eine Feedback-Inhibierung durch das jeweilige Endprodukt (Pittard, 1996b). Eine weitere Besonderheit der Regulation ist hier der Mechanismus der Attenuation. Gezeigt wurde dieses Prinzip für die Transkription von *pheA* und dem *trp*-Operon. Die Transkription ist dabei abhängig von der zur Verfügung stehenden Menge an tRNA beladen mit der jeweiligen Aminosäure. Bei geringen Konzentrationen der jeweiligen Aminosäure wird die Transkription erleichtert, bei hohen Konzentrationen dagegen verhindert (Yanofsky *et al.*, 1996; Pittard, 1996b). Einen genaueren Überblick über diese Art der Regulation ist in zahlreichen Reviews gegeben (Yanofsky, 2000; Henkin und Yanofsky, 2002; Gollnick und Babitzke, 2002).

2.7 Mikrobielle Produktion von L-Phenylalanin

Die Synthese von L-Phenylalanin wurde für dieses Projekt als Modell ausgewählt, da diese sich für die Verwendung von Glycerin anstelle von Glucose als Substrat aus mehreren Gründen besonders eignet. Im Gegensatz zu Glucose wird Glycerin PEP-unabhängig von der Zelle aufgenommen (vgl. Kapitel 2.2). Da L-Phenylalanin von der Zelle aus zwei Molekülen PEP und einem Molekül E4P synthetisiert wird (vgl. Kapitel 2.6), kann mit Glycerin die Konkurrenzreaktion um PEP vermieden werden und eine höhere C-Ausbeute erreicht werden (vgl. Kapitel 2.8). Ein weiterer Vorteil ist das höhere Reduktionspotential von Glycerin, aufgrund dessen mit dieser C-Quelle mehr ATP synthetisiert werden kann als mit Glucose (vgl. Kapitel 2.3). Da die ATP-Regenerierung für die Synthese von L-Phenylalanin limitierend wird, ist Glycerin hier ebenfalls im Vorteil gegenüber Glucose (vgl. Kapitel 2.8). Auch die Verwendung der L-Phenylalaninsynthese statt z.B. der Ethanol synthese als Modell hat einen deutlichen Vorteil. Bei der Bildung von L-Phenylalanin geht nur ein CO₂ pro drei Moleküle Glycerin verloren, bei der Produktion von Ethanol entsteht aber ein Verlust von einem CO₂ pro Molekül Glycerin (Neidhardt *et al.*, 1990).

Die mikrobielle Produktion einer Aminosäure ist dabei ein gängiger Modellprozess, da heutzutage viele Aminosäuren biotechnologisch hergestellt werden. Die Entwicklung neuer Techniken zur gentechnischen Veränderung von Bakterien beschleunigte den Prozess,

Bakterienstämme mit hoher Produktionskapazität zu entwickeln (Ikeda, 2003). Auch die aromatischen Aminosäuren L-Tyrosin, L-Tryptophan und L-Phenylalanin und Derivate davon können mittels *E. coli* biotechnologisch hergestellt werden (Bongaerts *et al.*, 2001; Sprenger, 2007a; Sprenger, 2007b; Gosset, 2009). In Tabelle 2-3 sind Daten bezüglich Weltjahresproduktion und Weltmarktpreis zu verschiedenen, über biotechnische Verfahren hergestellte Aminosäuren dargestellt (Positionspapier der DECHEMA e.V., 2004).

Tabelle 2-3 Von der DECHEMA 2004 veröffentlichte Daten über Aminosäuren, die durch biotechnologische Verfahren hergestellt werden (aus Positionspapier der DECHEMA e.V., 2004)

Name der Aminosäure	Weltjahresproduktion in Tonnen	Weltmarktpreis (€/kg)
L-Glutaminsäure	1.500.000	1,20
L-Lysin	700.000	2,00
L-Threonin	300.000	6,00
L-Asparaginsäure	13.000	-
L-Phenylalanin	10.000	10
L-Tryptophan	1.200	20
L-Arginin	1.000	20
L-Cystein	500	20
L-Methionin	400	20
L-Dopa	300	-
L-Alanin	500	-
D- und L-Valin	50	-
L- <i>tert</i> -Leucin	10	500
L-Carnitin	200	-

Das Interesse L-Phenylalanin zu produzieren stammt hauptsächlich daher, dass es neben L-Asparaginsäure der zweite Baustein für die Synthese des Süßstoffes Aspartam ist. Die Jahresproduktion von Aspartam der japanischen Firma Ajinomoto belief sich im Jahr 2008 auf 21000-22000t (Ajinomoto Co., Inc. Third quarter-FY2009 Market and other information, Februar 2010). Bei der DSM Holland Sweetener Company (Niederlande) und der Tosoh Corporation (Japan) wurde Aspartam bis 2006 im Thermolysinverfahren hergestellt (Iriño *et al.*, 1995). Dabei wird zunächst N-Benzoyloxycarbonyl-L-Asparaginsäure enzymatisch mit L-Phenylalaninmethylester verbunden. Die daraus resultierende Verbindung ist N-

Benzyloxycarbonyl-L-Aspartyl-Phenylalanin-Methylester. Durch Hydrogenolyse wird daraus dann L-Aspartyl-Phenylalanin-Methylester (= Aspartam) erhalten.

Die Synthese von Phenylalanin kann mittels chemischer, enzymatischer oder mikrobieller Methoden erfolgen. Die chemische Synthese liefert dabei ein racemisches Gemisch aus D- und L-Phenylalanin. Enzymatisch kann die Produktion von L-Phenylalanin über Aminierung von trans-Zimtsäure erfolgen (Yamada *et al.*, 1981), des Weiteren über Transaminierung (Ziehr und Kula, 1985) oder reduktiver Aminierung von Phenylpyruvat (Hummel *et al.*, 1986). Die mikrobielle Produktion von L-Phenylalanin kann zum einen über Biotransformation von Phenylpyruvat und Aspartat mithilfe rekombinanter *E. coli*-Stämme erfolgen, die die Aminotransferase TyrB und Phosphoenolpyruvatcarboxykinase Pck überproduzieren (Calton *et al.*, 1986; Chao *et al.*, 1999) und zum anderen über Fermentation. Die fermentative Herstellung von L-Phenylalanin erfolgt hauptsächlich mit gentechnisch veränderten *E. coli*-Stämmen. Weitere Veröffentlichungen berichten auch von L-Phenylalaninproduktion mit *Corynebacterium glutamicum* (Ikeda *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2004). Da in dieser Arbeit aber die Produktion von L-Phenylalanin mithilfe rekombinanter *E. coli*-Stämme erfolgen soll, wurden hier nur Arbeiten betrachtet, die ebenfalls mit diesem Organismus durchgeführt wurden.

Heutzutage erfolgt die Konstruktion L-Phenylalanin produzierender Bakterienstämme über metabolic engineering, also der zielgerichteten genetischen Veränderung eines Bakterienstammes (Bailey, 1991). Wichtig ist hierbei vor allem die Umgehung der in Kapitel 2.6 beschriebenen Regulationsmechanismen. Erreicht werden kann dies durch die Überexpression des ursprünglichen Gens, das eine Limitierung darstellt, wie z.B. bei der Shikimatkinase. Die Regulation wurde in diesem Fall einfach durch eine erhöhte Enzymmenge zumindest teilweise umgangen (Ikeda, 2006; Sprenger, 2007b). Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung alternativer Promotoren, z.B. P_{tac} , so dass die transkriptionelle Regulation aufgehoben wird (Sugimoto *et al.*, 1987). Auf Proteinebene kann die Regulation durch den Einsatz Feedback-resistenter Enzyme umgangen werden. Eine Vielzahl verschiedener Mutationen, die die allosterische Regulation der DAHP-Synthase und der Chorismatmutase verhindern, wurden bereits beschrieben, sollen hier aber nicht im Einzelnen aufgeführt werden (Bongaerts *et al.*, 2001). In einem Versuch die limitierenden Schritte der Biosynthese von L-Phenylalanin und Phenyllactat zu identifizieren und durch gezielte Überexpression zu beheben waren eine Reihe verschiedener Stämme konstruiert worden (Dell und Frost, 1993). Es war gezeigt worden, dass durch die Überexpression der Gene für die 3-Dehydroquinate-Synthase (*aroB*), die 5-Enolpyruvat-3-phosphat-Synthase

(*aroA*) und die Chorismat-Synthase (*aroC*) nur noch die Endprodukte, aber keines der entsprechenden Zwischenprodukte mehr im Überstand nachgewiesen werden konnte. Gleichzeitig war dabei entdeckt worden, dass mit der Überexpression von *aroL* auch die Limitierung durch die Shikimatdehydrogenase (*aroE*) aufgehoben worden war, da kein Shikimat mehr akkumulierte, welches auf dieses Enzym eine Feedback-Inhibierung ausüben konnte. In einem weiteren Vorhaben, dem Projekt „Fermentation And Metabolic Engineering“ (FAME) der DSM Biotech GmbH in Kooperation mit dem Forschungszentrum Jülich war der *E. coli*-Stamm F4/pF81 für die Produktion von L-Phenylalanin entwickelt worden (Gerigk *et al.*, 2002; Oldiges *et al.*, 2004; Ruffer *et al.*, 2004; Sprenger, 2007b). Der Ursprungstamm war dabei *E. coli* W3110. Dem Wildtyp waren zunächst die Gene *pheA*, *aroF* und *tyrA* zusammen mit der TyrR Repressorstelle und der *pheL* Attenuator Region deletiert worden. Der resultierende Stamm wurde als F4 bezeichnet und war zunächst auxotroph für L-Phenylalanin und L-Tyrosin. Die Auxotrophie für L-Tyrosin war in diesem Projekt für die Kontrolle der Biomasseproduktion verwendet worden. Durch Transformation des Stammes mit einem *aroF-pheA^{fbr}*-codierenden Plasmid unter der Kontrolle eines tac-Promotors war dann nach IPTG-Zugabe die L-Phenylalaninproduktion induziert worden. In zahlreichen weiteren Experimenten war dann gezeigt worden, dass durch die gemeinsame Expression der Gene *aroF*, *aroB*, *aroL*, *pheA^{fbr}* der höchste Produktiter mit 38g/l innerhalb von 50 Stunden erreicht werden konnte (Ruffer *et al.*, 2004). Da in dieser Arbeit mit streng limitierten Mengen an L-Tyrosin gearbeitet worden war, war der Einsatz einer Feedback-resistenten Form von *aroF* (*aroF^{fbr}*) nicht nötig. Es war sogar gezeigt worden, dass der Einsatz von *aroF^{fbr}* sich negativ auf die erreichbare Endkonzentration auswirkte (Gerigk *et al.*, 2002). Die Konzentration an L-Phenylalanin in dieser Veröffentlichung lag mit dem *aroF*-Stamm bei 34g/l, während mit dem *aroF^{fbr}*-Stamm nur 28g/l erreicht worden waren. In einer anschließenden Arbeit war auch gezeigt worden, dass durch eine integrierte Reaktivextraktion im 300l-Maßstab eine maximale Extraktionsrate von 110g/h erreicht werden konnte (Gerigk *et al.*, 2002). Die erreichte Raum-Zeit-Ausbeute in dieser Arbeit betrug 0,8g/l/h. Die verwendete C-Quelle war Glucose. Tyrosin war in strikt limitierenden Mengen zugegeben worden.

Weitere Arbeiten beschäftigen sich damit, den zentralen Kohlenstoffwechsel so zu verändern, dass die Vorläufermoleküle PEP und E4P in optimaler Menge zur Verfügung stehen. Für die im Folgenden beschriebenen Arbeiten wurde ebenfalls Glucose als C-Quelle eingesetzt. Das Ziel dieser Arbeiten war dabei nicht immer die Produktion von L-Phenylalanin, sondern auch die Biosynthese anderer Intermediate des Aromatenstoffwechsels, wie z.B. DAHP oder

Shikimat. Da aber auch hierfür die Bereitstellung von PEP und E4P notwendig ist, werden in diesem Abschnitt auch diese Arbeiten betrachtet. Die Strategien, um eine optimale PEP- und E4P-Verfügbarkeit zu erreichen, sind sehr vielfältig. Eine Möglichkeit besteht darin, Enzyme wie die Pyruvatkinase und die PEP-Carboxylase, die den PEP-Pool in der Zelle reduzieren, zu inaktivieren. Durch Deletion des Gens für die Pyruvatkinase *PykA* war ein deutlicher Anstieg der intrazellulären DAHP-Konzentration, einem Intermediat des Aromatensynthesewegs, von 0,37 auf 0,54 mmol/g [dw] gezeigt worden. Nach Deletion von *pykF*, dem Gen für die Pyruvatkinase *PykF*, war dagegen eine etwas geringere Erhöhung gemessen worden (0,44 mmol/g [dw]) (Gosset *et al.*, 1996). Die Inaktivierung des Gens, welches für die PEP-Carboxykinase codiert, ist bereits patentiert und führte ebenfalls zu einer erhöhten Produktausbeute (Backmann, 1992). Der hauptsächliche PEP-Verbrauch geschieht aber durch das PTS-System, das pro aufgenommenem Molekül Glucose ein Molekül PEP zu Pyruvat für die Phosphorylierung der Glucose umsetzt (Postma *et al.*, 1993). Einsparpotential beim PEP-Verbrauch bietet sich daher auch durch Ersetzen des PEP-abhängigen PTS-Systems mit einem ATP-abhängigen Glucoseaufnahmesystem an (Parker *et al.*, 1995; Weisser *et al.*, 1995; Berry, 1996; Flores *et al.*, 1996; Gosset *et al.*, 1996; Sprenger *et al.*, 1998; Chandran *et al.*, 2003; Yi *et al.*, 2003; Gosset, 2005). Eine weitere Strategie bestand darin, das durch die Pyruvatkinasen oder dem PTS-System gebildeten Pyruvat wieder mithilfe der PEP-Synthase oder der PEP-Carboxykinase zu PEP zu recyceln (Liao *et al.*, 1996; Gulevich *et al.*, 2006). Es war berechnet worden, dass durch Umgehen sämtlichen Pyruvatverlusts eine doppelt so hohe theoretische Ausbeute von 0,55g/g statt 0,275g/g erreicht werden kann (Förberg *et al.*, 1988). Dies entspricht einer C-Ausbeute von 90% statt 45%. Weitere Möglichkeiten ergeben sich durch Eingriffe in regulatorische Abläufe. Es war nachgewiesen worden, dass sich die C-Ausbeute durch Aktivierung des Glyoxylat-Zyklus verbessern ließ (Koehn *et al.*, 1994). Ebenfalls positiv auf den intrazellulären PEP-Pool hatte sich die Deletion des Gens *csrA* ausgewirkt, welches für einen Regulator für die Kohlenstoffspeicherung codiert und auch Einfluss auf die intrazelluläre PEP-Konzentration hat (Sabnis *et al.*, 1995). Durch Aufheben dieser Regulationsmöglichkeit war eine Verdopplung der Phenylalaninausbeute für den in dieser Studie verwendeten Modellorganismus erreicht worden (Tatarko und Romeo, 2001).

Auch der intrazelluläre Pool des zweiten Vorläufermoleküls E4P kann durch genetische Veränderungen erhöht werden. Eine Möglichkeit besteht darin, die für die Enzyme des nicht-oxidativen Pentosephosphatwegs codierenden Gene zu überexprimieren. Es war gezeigt worden, dass durch Überexpression von *tktA*, dem Gen für die Transketolase A eine Erhöhung des DAHP-Pools von 0,37 auf 1,65 mmol/g [dw] erreicht werden konnte (Gosset *et*

al., 1996). In diesem Zusammenhang war auch die Transaldolase untersucht worden. Es zeigte sich aber, dass durch die Überexpression von *tal* nur eine etwas geringere Verbesserung erreicht werden konnte, als durch die Überexpression von *tktA* (Lu und Liao, 1997; Sprenger *et al.*, 1998). Eine andere Strategie zur Erhöhung des E4P-Pools war die Inaktivierung der Phosphoglucoisomerase. In diesem Experiment war die Tryptophan-Synthese nach Deletion des Gens für die Phosphoglucoisomerase *pgi* untersucht worden. Es war dabei eine Erhöhung der Umsatzeffizienz von 6,2% auf 11,3% erreicht worden (Mascarenhas *et al.*, 1991).

Anhand der L-Tyrosin-Produktion war gezeigt worden, dass auch die Kombination verschiedener Maßnahmen Vorteile bringt (Lütke-Eversloh und Stephanopoulos, 2007). In dieser Arbeit war in einem L-Tyrosin produzierendem Stamm durch die zusätzliche Überexpression von *tktA* und *ppsA* eine Erhöhung der g/g-Ausbeute von 0,037g/g auf 0,102g/g erreicht worden. Es waren dabei in den einzelnen Ansätzen absolute Mengen an L-Tyrosin von 466 ± 38 mg/l bei Überexpression von *ppsA*, 380 ± 72 mg/l bei Überexpression von *tktA* und 621 ± 26 mg/l bei Überexpression von *ppsA* und *tktA* gebildet worden. In einer weiteren Veröffentlichung war die Synthese von Anthranilat mit Glucose als C-Quelle näher untersucht worden (Balderas-Hernandez *et al.*, 2009). In dieser Arbeit war die Inaktivierung des PTS-Systems mit der Überexpression von *tktA* untersucht worden. Es war dabei gezeigt worden, dass die gebildete Menge an Anthranilat, bezogen auf die Biomasse, nach Überexpression von *tktA*, unabhängig, davon, ob das PTS-System aktiv oder inaktiv war, zunahm. Die g/g-Ausbeute wies jedoch deutliche Unterschiede auf. Der ursprüngliche Produktionsstamm wies eine g/g-Ausbeute von 0,08 g/g auf. Mit dem PTS⁻-Stamm waren 0,15 g/g erhalten worden, nach Überexpression von *tktA* 0,20 g/g, die Kombination beider Merkmale führte aber zu einer Reduktion der Ausbeute auf 0,11 g/g. In einer Arbeit zur Produktion von L-Phenylalanin war dagegen gezeigt worden, dass die Deletion des PTS-Systems zusammen mit der Überexpression von *tktA* vorteilhaft ist (Baez-Viveros *et al.*, 2004). Hier war gezeigt worden, dass durch die Inaktivierung des PTS-Systems mit gleichzeitiger Überexpression von *tktA* die Produktausbeute gegenüber einem Stamm, der nur *tktA* überexprimierte, um 57% gesteigert worden war. In einer weiteren Arbeit war von der Produktion von Shikimisäure mit Glucose als C-Quelle berichtet worden (Escalante *et al.*, 2010). Hier war gezeigt worden, dass die Inaktivierung des PTS-Systems mit gleichzeitiger Deletion von *pykF* einen positiven Einfluss auf die Produktion von Intermediaten des Aromatenwegs hat. Die Inaktivierung des PTS-Systems führte zu einer mol/mol-Ausbeute (mol aromatischer Komponenten/mol Glucose) von 0,33 mol/mol. Durch die zusätzliche

Deletion von *pykF* war eine Ausbeute von 0,50 mol/mol erreicht worden, während die zusätzliche Inaktivierung von *pykA* die Ausbeute verschlechterte und nur zu einem Wert von 0,07 mol/mol führte. Diese Beispiele zeigen, dass nicht in allen Fällen die Kombinationen einzelner, sich positiv auswirkender Merkmale additive Effekte haben.

Ein etwas anderer Ansatz beschäftigte sich mit der L-Phenylalaninproduktion auf Basis von Glycerin (Khamduang *et al.*, 2009). Die Bildung von L-Phenylalanin war in diesem Experiment durch die Überexpression eines Plasmid codierten Gens, welches für die Phenylalanindehydrogenase aus *Acinetobacter lwoffii* codiert, erreicht worden. Das Enzym katalysiert die folgende, reversible Reaktion: Phenylpyruvat + NH₃ + NADH + H⁺ ⇌ L-Phenylalanin + H₂O + NAD⁺. Der Bakterienstamm war sonst nicht weiter für die Produktion aromatischer Komponenten angepasst. Umso interessanter ist deshalb, dass für diesen Stamm eine erreichte Ausbeute im Bereich des theoretischen Maximums berichtet worden war. Eine kritische Bewertung dieser Arbeit erfolgt in der Diskussion.

2.8 Berechnung der theoretisch maximal möglichen Ausbeute

Die Berechnung der maximal möglichen Ausbeute wurde in Zusammenarbeit mit Dr.-Ing. Schmid der Firma Insilico Biotechnology AG durchgeführt. Die mikrobielle Produktion von L-Phenylalanin mit einem Stamm ähnlich dem hier verwendeten, war schon in zahlreichen Arbeiten untersucht worden (Gerigk *et al.*, 2002; Rüffer *et al.*, 2004) und es war gezeigt worden, dass die Produktbildung nicht an das Zellwachstum gekoppelt ist, sondern auch in der stationären Phase noch erfolgt. Für die Berechnung der theoretisch maximal möglichen Ausbeute an L-Phenylalanin wurde deshalb davon ausgegangen, dass kein Zellwachstum mehr statt findet.

Im Stoffwechselweg von *E. coli* wird pro Molekül Glycerin zunächst 1 ATP für die Phosphorylierung benötigt und 1 Ubichinol bei der Oxidation von Glycerin-3-Phosphat (G3P) zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) gebildet. Die Übertragung der Protonen von G3P direkt auf Ubichinon ist in diesem Fall von Nachteil, da so in der Atmungskette der Schritt von NADH auf Ubichinon entfällt und deshalb weniger Protonen ins Periplasma gepumpt werden. Das entstandene DHAP steht im Gleichgewicht mit GA3P und Fru-1,6-BP. Fru-1,6-BP geht in Richtung Pentosephosphatweg, GA3P in Richtung PEP und TCA-Zyklus. Bei den Reaktionen in Richtung PEP wird zum ersten Mal Energie in Form von 1 ATP pro Molekül PEP über Substratkettenphosphorylierung konserviert. Da jedoch schon ein Teil des Glycerins in andere Stoffwechselwege geflossen ist, kann nicht das komplette, am Anfang verbrauchte

ATP zurück gewonnen werden. Das Defizit wird durch den ATP verbrauchenden Schritt vom Shikimat zum Shikimat-3P noch größer, so dass eine ATP-Regenerierung mithilfe von Reduktionsäquivalenten notwendig ist. Da Glycerin ein hohes Reduktionspotential besitzt, werden bei der Umsetzung von Glycerin bis zum PEP 1 NADH+H⁺ und 1 Ubichinol gebildet. Für die Produktion von Phenylalanin wird jedoch nur 1 NADPH+H⁺ pro Molekül Produkt benötigt, so dass ein deutlicher Überschuss an Reduktionsäquivalenten gebildet wird. Verlust an C-Quelle entsteht bei der Reaktion von Prephenat zu Phenylpyruvat. Hier geht Kohlenstoff in Form eines Moleküls CO₂ verloren, weshalb die maximal mögliche Ausbeute auch ohne Einbeziehen des Energiehaushalts nur 90% betragen kann. Im Folgenden sind die Parameter beschrieben, die für die Berechnung des Energiehaushalts verwendet wurden. Das Ergebnis der Berechnung ist in Abbildung 2-12 schematisch dargestellt.

Für die Umwandlung von Reduktionsäquivalenten in ATP wurde von einem P/O-Quotienten von 0,83 ausgegangen (Andersen und von Meyenburg, 1980). Dieser Wert war berechnet worden, indem bei der Fermentation einer *tonA*-negativen Mutante des Wildtyps *E. coli* B/r CP14 auf Glycerin als C-Quelle der Sauerstoffverbrauch gemessen worden war. Anschließend war die für Zellwachstum benötigte ATP-Menge berechnet worden, um so den P/O-Wert bestimmen zu können. Der Erhaltungsstoffwechsel war in dieser Betrachtung nicht miteinberechnet worden, so dass der angenommene ATP-Verbrauch einen Minimalwert darstellt. Das bedeutet, dass der berechnete P/O-Wert ebenfalls einen Minimalwert darstellt und wahrscheinlich *in vivo* mehr ATP pro reduziertem Molekül Sauerstoff generiert werden kann, als hier angegeben. Das Experiment in dieser Veröffentlichung war zwar nur einmal durchgeführt und nicht statistisch abgesichert worden, aber sonstige Publikationen zu diesem Thema beziehen sich auf Glucose als C-Quelle und können deshalb nicht auf Glycerin übertragen werden.

Die Protonenübertragung von NADH auf NADP⁺ erfolgt in *E. coli* über zwei verschiedene Transhydrogenasen, PntAB und UdhA. UdhA ist ein cytosolisches Protein und katalysiert die energieunabhängige Übertragung von Protonen von NADH+H⁺ auf NADP⁺ oder umgekehrt (Boonstra *et al.*, 1999). PntAB ist ein membrangebundenes Protein (Clarke *et al.*, 1986) und katalysiert energieabhängig die Übertragung von Protonen. Erfolgt die Protonenübertragung durch PntAB, so gelangt pro übertragenem Hydrid ein H⁺ aus dem Periplasma wieder ins Cytosol (Jackson, 2003). Bei dieser Reaktion wird also der Protonengradient herabgesetzt und so die ATP-Bildung pro Molekül umgesetzten Substrats reduziert. Es war gezeigt worden, dass beim Wildtyp *E. coli* MG1655 bei Wachstum auf Glycerin das Verhältnis der mRNA-Levels für *pntA:udhA* etwa 8,5:1,5 beträgt (Sauer *et al.*, 2004). Des Weiteren war in dieser

Arbeit gezeigt worden, dass eine PntAB-Mutante bei Wachstum auf Glycerin eine deutlich verlängerte lag-Phase hatte. Dies deutet darauf hin, dass die energieunabhängige Transhydrogenase UdhA bei Wachstum auf Glycerin eine eher untergeordnete Rolle spielt. Aus diesem Grund wurde für die Berechnung der theoretisch maximal möglichen Ausbeute davon ausgegangen, dass der Hydridtransfer durch PntAB erfolgt.

Der Energieaufwand zur Regenerierung von Glutamat aus α -Oxoglutarat, welches für die Aminierung von Phenylpyruvat benötigt wird, beläuft sich auf 1 NADPH+H⁺ (Sakamoto *et al.*, 1975). Hier werden also weitere Reduktionsäquivalente verbraucht.

Für den Erhaltungsstoffwechsel von FUS4/pF81 gibt es keine Werte, weshalb dies bei der Berechnung nicht berücksichtigt wurde. Da jedoch der angenommene P/O-Quotient auch ohne Einbeziehen des Erhaltungsstoffwechsels ermittelt wurde, sollte hier kein allzu großer Fehler entstehen.

Wird für die Berechnung der maximal möglichen Ausbeute von einem Startwert von 1000 Molekülen Glycerin ausgegangen, die für die Bildung von 300 Molekülen L-Phenylalanin genutzt werden, bleiben nach Durchlaufen des Stoffwechsels 1000 Ubichinol übrig, die für den Aufbau des Protonengradienten und somit der ATP-Gewinnung genutzt werden können. Pro gebildetem NADH+H⁺ werden bei *E. coli* 8 Protonen gepumpt, während bei Ubichinol nur 4 H⁺ über die Cytoplasmamembran gepumpt werden (Schönheit, 2006). Nach Abzug von 600 Protonen, die durch die Transhydrogenase-vermittelte Übertragung eines Hydrids von NADH auf NADP⁺ zurückfließen, werden bei der Produktion von L-Phenylalanin netto 3400 Protonen pro 1000 Molekülen Glycerin gepumpt. Die notwendige Menge an ATP setzt sich zusammen aus 1000 Molekülen ATP, die erforderlich sind, um Glycerin zu phosphorylieren. Weitere 300 Moleküle ATP werden für die Reaktion von Shikimat zu Shikimat-3-Phosphat benötigt. 600 Moleküle ATP werden über Substratkettenphosphorylierung bei der Reaktion von 1,3-Bisphosphoglycerat zu 3-Phosphoglycerat frei. Die erforderliche Nettomenge an ATP liegt also bei 700 Molekülen.

Bei Verwendung des für den Wildtyp *E. coli* gemessenen P/O-Quotienten von 0,83 und unter Vernachlässigung des Protonenverlusts durch die Aktivität der Transhydrogenase würde die gebildete Menge an NADH und Ubichinol ausreichen, um genügend ATP zu regenerieren, so dass der theoretisch maximale Wert von 90% auch unter Einbeziehen des Energieverbrauchs erreicht werden kann. Der minimale P/O-Quotient, der nötig ist, um einen ausgeglichenen Energiehaushalt zu sichern beträgt unter diesen Voraussetzungen 0,7. Der Anteil der Protonen, die durch die Aktivität der Transhydrogenase ins Cytosol zurück fließen, liegt bei 17,6% der gesamten gepumpten Protonen. Es ist also damit zu rechnen, dass auch der P/O-

Quotient entsprechend geringer ist. Wird davon ausgegangen, dass der P/O-Quotient proportional zum Protonenverlust im Periplasma sinkt, würde nur ein Wert von 0,68 erreicht werden. Diese Menge an regeneriertem ATP pro reduziertem Sauerstoffmolekül würde dann aber nicht mehr ausreichen, um einen ausgeglichenen Energiehaushalt zu gewährleisten. Es ist somit notwendig, dass ein Teil des PEP umgesetzt wird zu Pyruvat, um in den TCA-Zyklus zu gelangen und weiteres ATP zu regenerieren. In Abbildung 2-12 ist schematisch der Stofffluss dargestellt, der notwendig ist, um unter den getroffenen Annahmen einen ausgeglichenen Energiehaushalt zu gewährleisten. Die theoretisch maximal erreichbare C-Ausbeute beträgt 89,6%.

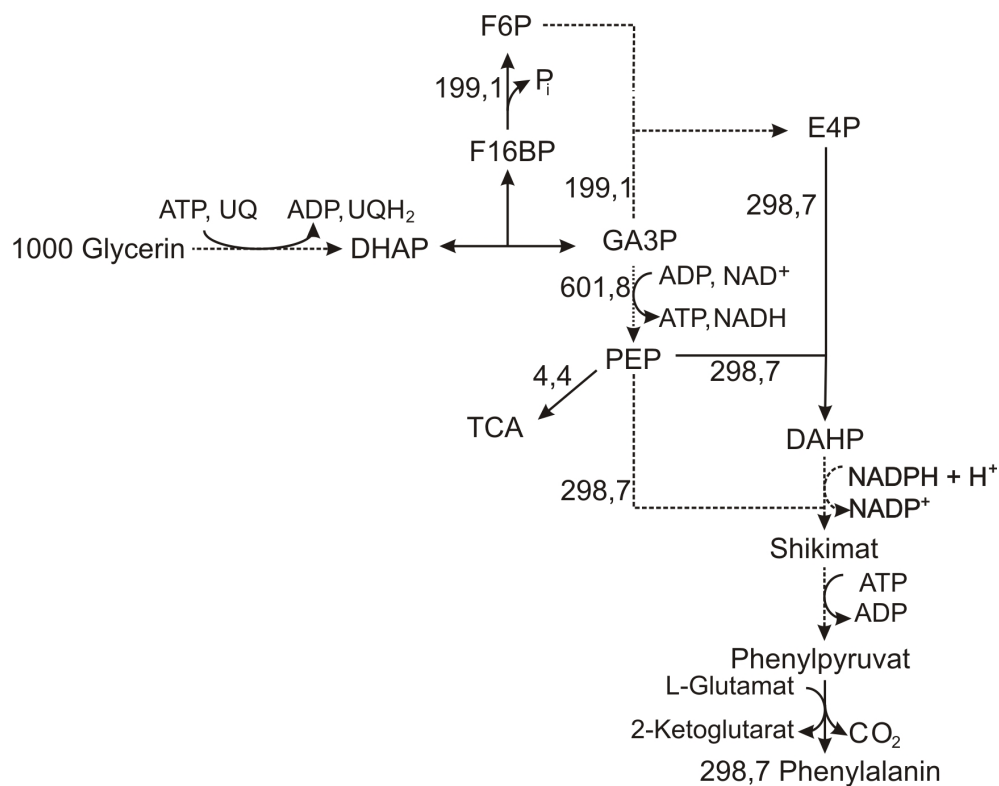


Abbildung 2-12 Schematische Darstellung des Stoffflusses ausgehend von Glycerin bis zum L-Phenylalanin. Gestrichelte Pfeile bedeuten eine unvollständige Darstellung des Stoffwechselwegs.

Abkürzungen: DHAP- Dihydroxyacetonphosphat, F16BP- Fructose-1,6-bisphosphat, F6P- Fructose-6-phosphat, GA3P- Glycerinaldehyd-3-phosphat, E4P- Erythrose-4-phosphat, PEP- Phosphoenolpyruvat, DAHP- 3-Deoxy-D-arabinoheptulosonat-7-phosphat.

Mit Glucose kann bei einem für die Eingangsreaktionen unveränderten Stamm nur eine maximale C-Ausbeute von 45% erreicht werden. Grund hierfür ist das PEP-verbrauchende PTS-System, das für die Phosphorylierung der Glucose benötigt wird. Es war gezeigt worden, dass mittels pathway engineering in *E. coli* auch eine PEP-unabhängige Glucoseaufnahme möglich ist (vgl. Kapitel 2.7). Glucose wird dabei durch die Galaktosepermease in die Zelle

transportiert und mithilfe einer ATP-abhängigen Glucosekinase phosphoryliert. Bei einer PEP-unabhängigen Aufnahme steigt die maximale theoretische Ausbeute bei Vernachlässigung des Energiebedarfs mit Glucose ebenfalls auf 90%. Bei Glucose als C-Quelle kann *E. coli* (Wildtyp) aber mit einem P/O-Quotienten von $0,43 \pm 0,09$ (Andersen und von Meyenburg, 1980) deutlich weniger ATP mithilfe des Protonengradienten regenerieren. Werden die gleichen Annahmen getroffen wie oben beschrieben, kann eine maximale C-Ausbeute von 84,6% erreicht werden.

2.9 Zielsetzung

Um eine ökonomischere Biodieselproduktion zu erreichen, wäre es sinnvoll, das Hauptnebenprodukt Rohglycerin in höherwertige Produkte umzusetzen. Da *E. coli* in der Lage ist, Glycerin als C-Quelle zu verwerten, ist eine mikrobielle Umsetzung in wertvollere Feinchemikalien denkbar. Aus diesem Grund sind *E. coli*-Stämme, die Rohglycerin ökonomisch zu Feinchemikalien umsetzen können, von großem Interesse. Dies erfordert Produktionsstämme, die Rohglycerin als C-Quelle verwenden können und zusätzlich einen effizienten Glycerinstoffwechsel besitzen.

Da die Synthese aromatischer Aminosäuren mit Glycerin als C-Quelle bislang nicht näher betrachtet worden war, sollte in dieser Arbeit am Beispiel der L-Phenylalaninsynthese untersucht werden, ob der Einsatz von Glycerin hierfür möglich ist. Die Vorteile, die die Synthese dieser aromatischen Aminosäure auf Basis von Glycerin mit sich bringt, sind in Kapitel 2.7 aufgeführt. Es sollte im Rahmen dieser Arbeit auch festgestellt werden, ob für diesen Prozess direkt unaufgereinigtes Rohglycerin eingesetzt werden kann, da dieses Vorgehen in einem industriellen Prozess Kosten senken und somit den Wirkungsgrad erhöhen könnte.

Beim Einsatz von Glycerin als C-Quelle für einen Produktionsprozess mit rekombinanten *E. coli* könnte möglicherweise die Eingangsreaktion durch die Glycerinkinase (Zwaig et al., 1970), oder ein unzureichender Stofffluss in Richtung PPP (Marr, 1991) problematisch werden, da diese beiden Aspekte für das Wachstum des Wildtyps als limitierend beschrieben bzw. diskutiert worden waren. Weiterhin könnte für die L-Phenylalaninbildung auch die Bereitstellung der Vorläufermoleküle PEP und E4P limitierend werden (Bongaerts et al., 2001). Beim Einsatz von Rohglycerin als C-Quelle wäre denkbar, dass Verunreinigungen in diesem Abfallprodukt problematisch werden (vgl. Kapitel 2.5).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb nicht nur untersucht werden, ob prinzipiell der Einsatz von Glycerin oder Rohglycerin im Vergleich zu Glucose für die L-Phenylalaninsynthese möglich ist. Es sollte auch überprüft werden, ob mittels pathway engineering die beschriebenen, möglichen Limitationen umgangen und Produktionsstämme konstruiert werden können, die auf Basis von Glycerin effizient L-Phenylalanin bilden. Als Vergleichswerte sollten die mit Glucose erreichbaren Werte herangezogen werden. Da bisher beschriebene Produktionsprozesse mit der C-Quelle Glucose durchgeführt worden waren, sollte auch untersucht werden, ob eine Anpassung der Fermentationsführung an die C-Quelle Glycerin oder Rohglycerin erforderlich ist.

Die Zielsetzung lässt sich somit in 3 Teile unterteilen:

- die Gewinnung der aromatischen Aminosäure L-Phenylalanin mit Glycerin oder Rohglycerin als C-Quelle im Vergleich zu Glucose,
- die Bereitstellung von Produktionsstämmen, die auf Basis von Glycerin eine effiziente Produktbildung aufweisen,
- das Anpassen der Fermentationsbedingungen an die C-Quelle Glycerin bzw. Rohglycerin.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit in der nachfolgenden Liste nicht anders vermerkt, von Merck KgaA (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen), Serva (Heidelberg), Novagen (Schwalbach) und Roth (Karlsruhe) im jeweils höchsten Reinheitsgrad bezogen. DNA-Polymerasen wurden von der Firma Genaxxon (Martinsried) verwendet. Alle weiteren Enzyme für molekularbiologische Arbeiten stammten von New England Biolabs (Frankfurt a. M.), Fermentas (St. Leon-Rot) und Roche Diagnostics GmbH (Mannheim).

Oligonucleotide	Operon (Köln)
DNA-Präparationskits	Macherey-Nagel (Düren)
DNA-Präparations- und Aufreinigungskits	Qiagen GmbH (Hilden)
MacConkey-Agar Base	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Glycerin-Testkit	r-biopharm (Darmstadt)
Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Protein-Standard	Biorad (München)
Rohglycerin	ADM Hamburg (2 verschiedene Chargen) EOP Falkenhagen (2 verschiedene Chargen)

3.2 Verwendete Oligonucleotide, Plasmide und Bakterienstämme

3.2.1 Verwendete Oligonucleotide

Klonierung chromosomaler Gene mit eingefügten Schnittstellen (unterstrichen)

<i>glpK_for</i>	5'-GCTGT <u>CATATG</u> ACTACGGGACAATTAAACATG-3'	<i>Nde</i> I
<i>glpK_rev</i>	5'-CCGGATGCGGCATAAA <u>AAGCTT</u> CATTCGGC-3'	<i>Hind</i> III
<i>glpX_for</i>	5'-TTTT <u>CATATG</u> AGACGAGA <u>ACTTGCC</u> ATCGAATTTTCC-3'	<i>Nde</i> I
<i>glpX_rev</i>	5'-TTTTA <u>AAGCTT</u> CAATCAGAGGATGTGCACCTGCATTTCC-3'	<i>Hind</i> III

Primer für die Inaktivierung von Genen

<i>dhaA-L-del-5'</i> (<i>dhaKLM</i>)	5'-GCCCTACCGTAATTGCTGGAGCAAATAATGAAAAAATT GATCTTG TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'
<i>dhaA-L-del-3'</i> (<i>dhaKLM</i>)	5'-TTTTACAACATCACTCATTAACATCTGACGGGCTAATTC ACATAT GAATATCCTCCTTAGTTC-3'
<i>glpABC del-5'</i>	5'-TGCGCGTGATTTTGGTTGAGCGCCACGACATCGCAACCGG TTGTGT AGGCTGGAGCTGCTTCG-3'
<i>glpABC del-3'</i>	5'-TAATATCGCCAATCTTCACATCGGACGGGCAGGCGACTTC ACAATT GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'
<i>glpD del-5'</i>	5'-GCTGGCTGAACGTGAAGTGCTGCTGAAAATGGCCCCGCA TATCGCC TTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'
<i>glpD del-3'</i>	5'-CACACGAGATTGTTGATCCGCATTTAGCCACATGCCTTGT TTTGTC ATATGAATATCCTCCTTAGTTC-3'
<i>del-pykA-for</i>	5'-CGTTACCACGTTAGGCCAGCAACAGATCGCGATAATAA TCTTGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'
<i>del-pykA-rev</i>	5'-ACGGTACTCATCACGTCGCCCTGGGTGACAATCACCAGG TCACATATGAATATCCTCCTTAGTTC-3'
<i>del-pykF-for</i>	5'-GAATCTGAAGAGATGTTAGCTAAAATGCTGGACGCTGGC ATGAACTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'
<i>del-pykF-rev</i>	5'-GTGCACCAGAAACCATAACTACAACGTCACCTTTGTGTGC CAGACCATATGAATATCCTCCTTAGTTC-3'

Primer für die chromosomale Integration in unterschiedliche Loci bei Verwendung von pJF119EH
(unterstrichen sind die zum Integrationsort homologen Sequenzen)

<i>malE</i> -Integration	5'- <u>AAGGTA</u> AACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAAGGCT <u>ATAACGGTCTCGCTGTCAAGGCGCACTCCCGTTCTGG</u> -3'
<i>malG</i> -Integration	5'- <u>GATCGGTAATGCAGACATCACGGCAGCGGCGGCAAAGTC</u> <u>ACCCACAGGTAGTTTT</u> CAGGGTTATTGTCTCATGAGCG-3'
<i>rbs</i> -Integration	5'- <u>ACCGTTCTTAATTCTGATATTT</u> CATCGGTGATCTCCCGTCT <u>GGGACATAACCGATATCAAGGCGCACTCCCGTTCTGG</u> -3'
<i>rbs</i> -Integration	5'- <u>ATTCACGCTAGCCC</u> ATAACACCACGACTTCCTAAAGTAAT <u>CAGTACAGTACGGATACCCAGGGTTATTGTCTCATGAGCG</u> -3'

Primer zur Kontrolle der Deletionen und Integrationen

<i>glpABC</i> -screen	5'-AGTGAGAGAACCTGCCGTTTCTTGAG-3'
<i>dha</i> -screen	5'-CGCCGATAAATAGAAGCAAATGTCACGCC-3'
<i>glpD</i> -screen	5'-TAACGAAAGTGAATGAGGGCAGCATGG-3'
<i>cat</i> -screen	5'-CAAGGCGACAAGGTGCTGATG-3'
<i>xylB</i> -screen2	5'-CAACGTAACACTTTGCGGTTTAATACC-3'
<i>mal</i> -screen- <i>xyl</i>	5'-GGAGTTGGCAGCGGATTCACTTAAG-3'
<i>malK</i> -screen	5'-GCTTTCGTTACATTTTGCAGCTGTACG-3'
<i>cat</i> -control	5'-CCGTCACAGGTAGGCGGCC-3'

del- <i>pykF</i> -screen	5'-CGCTCAAAGAAGCATCGAACGCTGGG-3'
del- <i>pykA</i> screen	CTCTCGCGAGGAGAGGCCTTCGC
Sequenzierprimer	
pJF119 upstream	5'-CGGCTCGTATAATGTGTGGA-3'
pJF119 downstream	5'-CAGAAGCTTGCATGCCTGCA-3'

3.2.2 Verwendete Plasmide

Name	Beschreibung	Herkunft/Referenz
pET28b	P _{T7} , Km ^R , <i>ori</i> pBR322, <i>ori</i> f1, <i>lacI</i> , T7 Tag N-term. 6xHis, C-term. 6xHis	Novagen, Schwalbach
pJF119EH	Ptac, RBS, Amp ^R , <i>lacI</i>	(Fürste <i>et al.</i> , 1986)
pJF119ΔN	Ptac, RBS, Amp ^R , <i>lacI</i> , Δ <i>Nde</i> I- Schnittstelle. <i>Nde</i> I in MCS	(Albermann <i>et al.</i> , 2008)
pCP20	<i>FLP</i> ⁺ , λ <i>ci857</i> ⁺ , λ <i>ρ_R</i> Rep ^{ts} , Ap ^R , Cm ^R	(Cherepanov und Wackernagel, 1995)
pKD46	Red disruption system (γ, β, <i>exo</i> unter Kontrolle von <i>araBp</i>), Amp ^R	(Datsenko und Wanner, 2000)
pCO1-km	Amp ^R Km ^R	U.Degner und G. Sprenger, unveröffentlicht
pCO1-cat	Amp ^R Cm ^R	U.Degner und G. Sprenger, unveröffentlicht
pF81	P _{tac} :: <i>aroF</i> , <i>pheA</i> ^{<i>fbr</i>} , <i>aroB</i> , <i>aroL</i> Amp ^R , <i>lacI</i>	(Rüffer <i>et al.</i> , 2004; Sprenger, 2007b)
pKUS3-1	1,5kb <i>glpK</i> -PCR-Produkt aus <i>E. coli</i> LJ110 (W3110) in pJF119ΔN (<i>Nde</i> I/ <i>Hind</i> III)	diese Arbeit
pKUS3	<i>Nde</i> I→blunt / <i>Hind</i> III-Fragment aus pKUS3-1 in pJF119EH (<i>EcoRI</i> →blunt/ <i>Hind</i> III)	diese Arbeit

pKUS7	<i>Nde</i> I/ <i>Hind</i> III-Fragment aus pKUS3-1 kloniert in pET28b (<i>Nde</i> I/ <i>Hind</i> III), ergibt GlpK mit N-terminalem 6x His-Tag	diese Arbeit
pKUS10	pKUS3 mit Chloramphenicol-Resistenz- Kassette in <i>Sph</i> I-Schnittstelle	diese Arbeit
pKUS13-1	1,5kb <i>glpX</i> -PCR-Produkt aus <i>E. coli</i> LJ110 (W3110) in pJF119 ΔN (<i>Nde</i> I/ <i>Hind</i> III)	diese Arbeit
pKUS13	<i>Nde</i> I→blunt / <i>Hind</i> III-Fragment aus pKUS13-1 in pJF119EH (<i>Eco</i> RI→blunt/ <i>Hind</i> III)	diese Arbeit
pKUS14	pKUS13 mit Chloramphenicol-Resistenz- Kassette in <i>Sph</i> I-Schnittstelle	diese Arbeit

3.2.3 Verwendete Bakterienstämme

Soweit nicht anders bezeichnet, handelt es sich bei den Stämmen um *Escherichia coli*-Stämme.

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia blattae</i>	Wildtyp, DSM4481	(Burgess <i>et al.</i> , 1973)
<i>E. coli</i> B-Stamm:		
BL21(DE3) pLysS	F- ompT <i>hds</i> S _B (rB- mB-) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS Cm ^R ; exprimiert T7-RNA- Polymerase	Novagen, Schwalbach
<i>E. coli</i> K-12-Stämme:		
BW25113	<i>lacIq rrnB</i> _{T14} Δ <i>lacZ</i> WJ _{WJ16} <i>hdsR</i> 514 Δ <i>araBAD</i> _{AH33} Δ <i>rhaBAD</i> _{LD78}	(Datsenko und Wanner, 2000)
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169</i> (Φ80 <i>lacZ</i> _M15) <i>hdsR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Hanahan, 1983)
LJ110	Wildtyp W3110 (F, λ, IN (<i>rrnD-rrnE</i>) 1, <i>rph-1</i>)	(Bachmann, 1972)
GSL 705	Δ <i>glpK ΔgldA</i>	(Sprenger <i>et al.</i> , 1989)
GSL 707	F- <i>gld::ΔTn10glpK::ΔTn10 ptsD::ΔTn10</i> <i>araD139 flbBΔ(lacU169) ptsF25 relA</i> <i>rpsL thi</i>	(Sprenger <i>et al.</i> , 1989)

F4	LJ110 Δ (<i>pheA tyrA aroF</i>)	Rüffer <i>et al.</i> , 2004
F144	LJ110 Δ <i>lac</i> : P _{tac} :: <i>aroFBL</i>	Bongaerts, unveröffentlicht
FUS4	LJ110 Δ (<i>pheA tyrA aroF</i>) <i>lac</i> : P _{tac} :: <i>aroFBL</i> ⁺ = F4 x P1-Lysat F144	Sprenger und Trachtmann, unveröffentlicht
BW25113 <i>glpK</i> ⁺	BW25113 Δ <i>mal</i> : P _{tac} :: <i>glpK-cat</i>	diese Arbeit
BW25113 Δ <i>pykF</i>	BW25113 Δ <i>pykF</i> :: <i>km</i>	diese Arbeit
BW25113 Δ <i>pykA</i>	BW25113 Δ <i>pykA</i> :: <i>km</i>	diese Arbeit
BW25113 <i>glpX</i> ⁺	BW25113 Δ <i>rbs</i> : P _{tac} :: <i>glpX-cat</i>	diese Arbeit
FUS4.2	FUS4 Δ <i>mal</i> : P _{tac} :: <i>glpK-cat</i> = FUS4 x P1-Lysat BW25113 <i>glpK</i> ⁺	diese Arbeit
FUS4.3	FUS4 Δ <i>pykF</i> :: <i>km</i> = FUS4 x P1-Lysat BW25113 Δ <i>pykF</i>	diese Arbeit
FUS4.4	FUS4 Δ <i>pykA</i> :: <i>km</i> = FUS4 x P1-Lysat BW25113 Δ <i>pykA</i>	diese Arbeit
FUS4.4-2	FUS4 Δ <i>pykA</i>	diese Arbeit
FUS4.5	FUS4 Δ <i>gal</i> : P _{tac} :: <i>tktA-cat</i> = FUS4 x P1-Lysat BW25113 Δ <i>tktA tktA</i> ⁺	diese Arbeit
FUS4.6	FUS4 Δ <i>rbs</i> : P _{tac} :: <i>glpX-cat</i> = FUS4 x P1-Lysat BW25113 <i>glpX</i> ⁺	diese Arbeit
FUS4.6-2	FUS4 Δ <i>rbs</i> : P _{tac} :: <i>glpX</i>	diese Arbeit
FUS4.7	FUS4 Δ <i>rbs</i> : P _{tac} :: <i>glpX</i> Δ <i>gal</i> : P _{tac} :: <i>tktA-cat</i> = FUS4.6 x P1-Lysat BW25113 Δ <i>tktA tktA</i> ⁺	diese Arbeit
FUS4.8	FUS4 Δ <i>pykA-km</i> Δ <i>gal</i> : P _{tac} :: <i>tktA-cat</i> = FUS4.4 x P1-Lysat BW25113 Δ <i>tktA tktA</i> ⁺	diese Arbeit
FUS4.9	FUS4 Δ <i>pykA-km</i> Δ <i>rbs</i> : P _{tac} :: <i>glpX-cat</i> = FUS4.4 x P1-Lysat BW25113 <i>glpX</i> ⁺	diese Arbeit
FUS4.9-2	FUS4 Δ <i>pykA</i> Δ <i>rbs</i> : P _{tac} :: <i>glpX</i>	diese Arbeit
FUS4.10	FUS4 Δ <i>pykA</i> Δ <i>rbs</i> : P _{tac} :: <i>glpX</i> Δ <i>gal</i> : P _{tac} :: <i>tktA-cat</i> = FUS4.9-2 x P1-Lysat BW25113 Δ <i>tktA tktA</i> ⁺	diese Arbeit
FUS4.11	FUS4 Δ <i>pykA</i> Δ <i>pykF-km</i>	diese Arbeit

	= FUS4.4-2 x P1-Lysat BW25113 $\Delta pykF$	
FUS4.12	FUS4 $\Delta pykA \Delta pykF-km \Delta gal::P_{tac}::tktA-cat$ = FUS4.11 x P1-Lysat BW25113 $\Delta tktA tktA^+$	diese Arbeit
FUS4.13	FUS4 $\Delta pykA \Delta pykF-km \Delta rbs::P_{tac}::glpX-cat$ = FUS4.11 x P1-Lysat BW25113 $glpX^+$	diese Arbeit
FUS4.13-2	FUS4 $\Delta pykA \Delta pykF \Delta rbs::P_{tac}::glpX$	diese Arbeit
FUS4.14	FUS4 $\Delta pykA \Delta pykF-km \Delta rbs::P_{tac}::glpX \Delta gal::P_{tac}::tktA-cat$ = FUS4.13-2 x P1-Lysat BW25113 $\Delta tktA tktA^+$	diese Arbeit
BW25113 $\Delta tktA$	$\Delta tktA$	N. Trachtmann (unveröffentlicht)
BW25113 $\Delta tktA tktA^+$	$\Delta tktA gal::P_{tac}::tktA-cat$	N. Trachtmann (unveröffentlicht)

3.3 Kultivierung von *E. coli*

Als Standardmedium für die Anzucht von *E. coli* im Schüttelkolben oder auf Agarplatten diente Luria-Bertani (LB)-Medium (Sambrook *et al.*, 1989). Durch Zugabe von 1,8% Agar zum Medium wurde festes Nährmedium erhalten. Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Bakterien bei 37°C kultiviert. Flüssigkulturen wurden dabei im Schüttler bei 200rpm inkubiert. Für die Anzucht der Bakterien in Flüssigmedium wurden Erlenmeyerkolben verwendet, die mit maximal 10% des Gesamtvolumens befüllt wurden. Für Volumina bis zu 5ml wurden Reagenzgläser (max. Füllvolumen 20ml) benutzt. Zur langfristigen Stammhaltung wurde 1ml einer ÜN-Kultur (LB-Medium) abzentrifugiert (30 sec, 14000rpm, RT). Der Zellüberstand wurde anschließend in 1ml frischem LB-Medium resuspendiert und mit 1ml 50% (v/v) sterilem Glycerin versetzt. Die Kulturen wurden dann bei -80 °C gelagert. Für die Versuche zur Proteinexpression wurden zunächst ÜN-Vorkulturen in 5ml Gesamtvolumen angesetzt, mit denen dann die Hauptkultur beimpft wurde. Für das Beimpfen wurde dann 1/50 des Gesamtvolumens der Hauptkultur eingesetzt. Bei $OD_{600} = 0,5$ wurde mit 0,5mM IPTG induziert und die Kultur mindestens für weitere 4 Stunden bei 37°C auf dem Schüttler kultiviert. Den Kulturen wurde dabei immer das für die Selektion notwendige Antibiotikum zugegeben.

LB-Medium

10g Tryptone

5g Hefeextrakt

10g NaCl

pH 7,0 einstellen mit NaOH

→ auffüllen auf 1000ml mit H₂O,

autoklavieren

Für die Herstellung von Agarplatten

erfolgte die Zugabe von 18g Agar.

Minimalmedium flüssig (Gerhardt *et al.*, 1984)3g/l KH₂PO₄12g/l K₂HPO₄5g/l (NH₄)₂SO₄0,3g/l MgSO₄*7H₂O0,015g/l CaCl₂*2H₂O

0,1g/l NaCl

0,1125g/l FeSO₄*7H₂O/NaCitrat (Stock:7,5 g/l FeSO₄*7H₂O, 100g/l NaCitrat →

15ml Stocklösung/l Medium)

0,0075g/l Thiamin

5g/l Glucose (bei Verwendung anderer C-

Quellen wurde die zuzugebende Menge

entsprechend des C-Anteils umgerechnet)

Minimalmedium fest (Tanaka *et al.*, 1967)

Lösung A:

47g NaH₂PO₄*H₂O115g K₂HPO₄26,4g (NH₄)₂SO₄→ auffüllen auf 1000ml mit H₂O,

autoklavieren

Lösung B:

7,4g MgSO₄*7H₂O147mg CaCl₂*2H₂O13,5mg ZnCl₂28mg FeSO₄*7H₂O1ml 1N HCl → auffüllen auf 1000ml mit H₂O

5ml Lösung B

9g Agar

→ auffüllen auf 450ml mit H₂O, autoklavieren

→ 50ml sterile Lösung A und 20µg/ml

Thiamin (sterilfiltriert) zugeben

Für alle Wachstumsversuche mit FUS4/pF81-Stämmen in Minimalmedium (MM) wurden zunächst die untransformierten FUS-Zellen frisch aus der Kryokultur ausgestrichen. Anschließend erfolgte die Transformation mit dem Plasmid pF81. Zur Selektion wurden die Zellen dann auf LB-Ampicillin ausplattiert. Im Anschluss daran erfolgte eine Adaptation der transformierten Zellen an Wachstum auf Minimalmedium durch Ausstreichen auf MM-

Agarplatten + Ampicillin und der entsprechenden C-Quelle. Die Platten wurden dann für 1-3 Tage bei 30-37°C inkubiert und dann für die Wachstumsversuche verwendet. Da die Zellen ein Plasmid trugen, wurde dem Medium immer Ampicillin zugegeben. Der Wildtyp wurde für die Wachstumsexperimente ebenfalls frisch ausgestrichen und dann auf MM-Agarplatten an das Wachstum auf Minimalmedium mit der entsprechenden C-Quelle adaptiert. Da der Stamm kein Plasmid trug, wurden hier keine Antibiotika eingesetzt. Für die Wachstumsversuche wurde zunächst ebenfalls eine ÜN-Vorkultur in 5ml Gesamtvolumen angesetzt. Die Hauptkultur wurde, soweit nicht anders erwähnt, zu $OD_{600}=0,05$ beimpft. Für die Versuche im Schüttelkolben wurden immer 250ml-Kolben verwendet, die mit 25ml Medium befüllt waren. Soweit nicht anders erwähnt wurden die Versuche mit 0,5% C-Quelle durchgeführt. Erfolgte Induktion für die Produktbildung, wurde bei $OD_{600}=0,5$ IPTG zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 0,25mM erreicht wurde. Da der Stamm FUS4/pF81 ohne Induktion auxotroph ist für L-Tyrosin und L-Phenylalanin wurden dem Medium für Versuche mit diesem Stamm bis zur Induktion diese beiden Aminosäuren (0,02mg/ml) zugegeben. Nach der Induktion wurde, wenn für das Zellwachstum erforderlich, noch L-Tyrosin zugegeben.

Wenn nötig wurden weitere Zusätze, wie z.B. Antibiotika, zum Wachstumsmedium zugegeben.

	Stammlösung	Endkonzentration im Medium	Lösemittel
Kanamycin	50mg/ml	50µg/ml	H ₂ O
Ampicillin	100mg/ml	100µg/ml	H ₂ O
Chloramphenicol	25mg/ml	25µg/ml	50% Ethanol
IPTG	1M	0,1-1mM	H ₂ O
X-Gal	2%	0,01%	DMSO
L-Phenylalanin	4mg/ml	0,02mg/ml	H ₂ O
L-Tyrosin	4mg/ml	0,02mg/ml	H ₂ O (titriert mit 5N KOH)

3.3.1 Kultivierung im Bioreaktor

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in einem Kleinfärmerter (Labfors[®] Klein Fermenter System, Infors AG, Schweiz). Das in diesen Versuchen verwendete Modell ist in Abbildung 3-1 dargestellt. Es handelt sich dabei um einen freistehenden Tischfermenter mit Mikroprozessor-Steuerung und einem Menü gesteuerten LCD-Display. Das Gefäß besteht aus

Edelstahl (316L) und Borsilikatglas. Während der Kultivierung herrscht im Gefäß Umgebungsdruck. Der verwendete Blattrührer wird über einen direkten Oben-Antrieb betrieben. Die Umdrehungszahl kann dabei stufenlos von 0-700 rpm eingestellt werden. Die Temperierung erfolgt durch Wasser über einen Doppelmantel des Glasgefäßes. Bei den über die Konsole gemessenen Parametern handelt es sich um Rührerdrehzahl, Temperatur, pH-Wert und pO_2 . Die übrigen Eigenschaften und die verwendeten Elektroden sind in der Bedienungsanleitung (Handbuch 1.4, 1995) beschrieben.

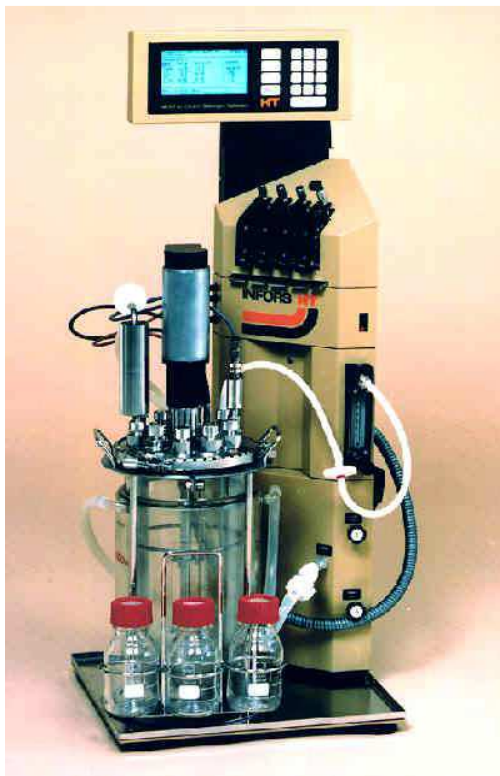


Abbildung 3-1 Das bei den beschriebenen Versuchen verwendete Modell der Firma Infors (Schweiz).

Für die Kultivierung der Bakterienstämme wurde Minimalmedium verwendet. Die Hauptkultur wurde aus einer Vorkultur angeimpft, die im gleichen Medium wuchs, wie anschließend die Hauptkultur. Es wurde jeweils so angeimpft, dass die Hauptkultur eine anfängliche $OD_{600} = 0,05$ hatte. Die Temperatur wurde immer auf $37^{\circ}C$ eingestellt. Damit wurde die von Gerigk und Rüffer verwendete Einstellung übernommen (Gerigk *et al.*, 2002; Rüffer, 2004) Das Füllvolumen betrug 1,5l bei einem Maximalvolumen von 3,6l. Der pH-Wert wurde vom Gerät kontinuierlich überprüft und automatisch reguliert (5M H_3PO_4 , 5M KOH). Der O_2 -Gehalt der Kultur wurde ebenfalls automatisch kontrolliert und die Drehzahl bis zu einer maximalen Drehzahl von 700rpm angepasst. Die Zugabe von Antischaum (Polypropylenglycol P 2000) und Ammoniumsulfat (Stocklösung: 200g/l, autoklaviert) erfolgte nach Bedarf. Ammoniumsulfat wurde dabei als Stickstoffquelle verwendet. Die

Zelldichtemessung erfolgte durch Messen der optischen Dichte bei 600nm am Photometer (Kapitel 3.4.1). Die Konzentrationsbestimmung von Glycerin und Rohglycerin erfolgte durch einen enzymatischen Test (siehe Kapitel 3.4.2). Die Glucosebestimmung wurde mithilfe eines Blutzuckermessgeräts durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.3). Der Nachweis von L-Phenylalanin und gebildeten Nebenprodukten wie Lactat und Acetat erfolgte mittels HPLC (siehe Kapitel 3.4.4 und 3.4.5). Die bei den Fermentationen gewählten Parameter sind in Tabelle 3-1 dargestellt. Während der Fermentation wurde immer automatisch die Pumpdauer jeder einzelnen Pumpe erfasst, was die Berechnung des jeweils aktuellen Arbeitsvolumens und somit auch der Ausbeute zu einem bestimmten Zeitpunkt ermöglichte. Pro Minute Pumpdauer wurde bei jeder Pumpe 12 ml Flüssigkeit in den Fermenter gepumpt. Da es sich hierbei um ein relativ hohes Volumen handelt, war eine sehr genaue Berechnung des Arbeitsvolumens möglich. Zur Kontrolle wurde nach jeder Fermentation das berechnete Volumen mit dem gemessenen Volumen verglichen. Die Fehlerabweichung lag dabei unter 5%. Bis zur Induktion wurde dem Medium neben L-Tyrosin auch L-Phenylalanin zugegeben. Die weitere L-Tyrosinzugabe (Stocklösung: 4mg/ml, sterilfiltriert) erfolgte bis zu einer optischen Dichte von 14, anschließend wurde kein L-Tyrosin mehr zugegeben.

Tabelle 3-1 Überblick über die bei den Fermentationen gewählten Parameter.

Durchschnittliche OD ₆₀₀ der Vorkultur	1 (exponentielle Phase)
Anfangskonzentration an C-Quelle	0,5%, Feed gestartet nach Induktion
Temperatur	37°C
pH-Wert	7,0 (online gemessen und automatisch reguliert mit 5N KOH)
Sauerstoffsättigung	20-60% (online gemessen und automatisch reguliert über Rührergeschwindigkeit)
Start-OD ₆₀₀	0,05
End-OD ₆₀₀	14-18 (kontrolliert durch Tyrosinzugabe)
Induktion	0,1mM IPTG bei OD ₆₀₀ = 2,5; erhöhen auf 0,3mM bei OD ₆₀₀ = 10
Antischaum	Nach Bedarf
Ammoniumsulfat (200g/l)	Nach Bedarf
Antibiotikum	Ampicillin 100µg/ml
IPTG - Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	
OD ₆₀₀ - optische Dichte bei 600nm	

3.4 Analytische Methoden

3.4.1 Zelldichtebestimmung

Die Dichte der Bakterienkulturen wurde am Photometer (Cary 50 Bio, Varian) bei einer Wellenlänge von 600nm (=OD₆₀₀) gemessen. Der Leerwert bestand aus unbeimpftem Medium. Erreichten Proben einen Extinktionswert größer als 0,5, wurde die zu messende Probe mit unbeimpftem Medium entsprechend verdünnt.

3.4.2 Bestimmung der Glycerinkonzentration

Zur Bestimmung der Glycerinkonzentration wurde der Glycerin-Testkit (Art. Nr. 10 148 270 035) der Firma r-biopharm aus Darmstadt entsprechend der Bedienungsanleitung verwendet. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt dabei durch einen mit Glycerinkinase, Lactatdehydrogenase und Pyruvatkinase (PK) gekoppelten Enzymtest. Dabei wird zunächst Glycerin und ATP von der Glycerinkinase zu Glycerin-3-Phosphat und ADP umgesetzt. Das entstandene ADP wird dann zusammen mit PEP von der Pyruvatkinase zur Bildung von Pyruvat und ATP genutzt. Im letzten Schritt wird Pyruvat durch die Lactatdehydrogenase unter Oxidation von NADH+H⁺ zu Lactat umgewandelt. Dies kann photometrisch bei 340nm verfolgt werden. Diese Messmethode erlaubt die Bestimmung von Glycerinkonzentrationen zwischen 0,04 und 0,4g/l Glycerin. Die Proben wurden daher entsprechend verdünnt. Das Prinzip der Reaktion ist in Abbildung 3-2 dargestellt.

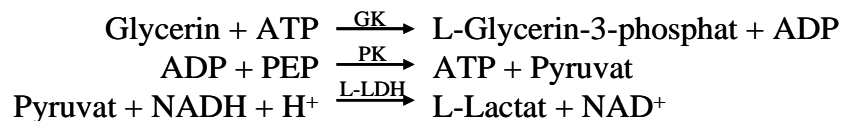


Abbildung 3-2 Prinzip der enzymatischen Konzentrationsbestimmung von Glycerin.

Photometrisch gemessen wurde dabei der Verbrauch an NADH+H⁺ bei 340nm. PK - Pyruvatkinase

Die Berechnung der Glycerinkonzentration erfolgte über die Extinktionsdifferenz. Da der Berechnungskoeffizient für NADH bekannt ist, konnte der erhaltene Wert direkt in folgende Formel eingesetzt werden:

$$c = \frac{V \cdot MW}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000}$$

c = Glycerinkonzentration, V = Endvolumen in ml, MW = Molekulargewicht in g/l (Glycerin = 92,1),
 v = Probenvolumen in ml, d = Lichtweg in cm, $\epsilon = 6,3 \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Extinktionskoeffizient für NADH bei 340nm).

3.4.3 Bestimmung der Glucosekonzentration

Zur Bestimmung der Glucosekonzentration wurde das Blutzuckermessgerät One touch ultra (Lifescan, Ortho-Clinical Diagnostics GmbH, Neckargemünd) eingesetzt und die Messung entsprechend den Vorschriften durchgeführt. Das Messprinzip beruht hier auf der Glucoseoxidase/Peroxidase-Methode (<http://www.fidev.de/LS/download.htm>, Blutzucker Selbstkontrolle, Stand 12/2001). Die Glucoseoxidase setzt dabei Glucose mit Sauerstoff und H_2O zu D-Gluconsäure und H_2O_2 um. Im nächsten Schritt wird durch die Peroxidase H_2O_2 und ein Chromogen zu 2 H_2O und einem Farbstoff umgesetzt, welches dann vom Gerät detektiert und anhand einer Kalibriergeraden auf die entsprechende Glucosekonzentration umgerechnet wird

3.4.4 Nachweis von L-Phenylalanin mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Für den Nachweis von L-Phenylalanin wurde folgendes Trennsystem verwendet:

HPLC-System: Dionex (Germering)

Säule: Lichrospher 100, C18, Korngröße $5\mu\text{m}$, $250 \times 4\text{mm}$, mit Vorsäule (Trentec, Gerlingen)

Detektionswellenlänge: 210nm

Flussrate: 1ml/min, RT

Laufmittel A: 0,01% Trifluoressigsäure in Wasser

Laufmittel B: 0,01% Trifluoressigsäure in Acetonitril oder Methanol

Elutionsprogramm:	0-5min	100% A/ 0% B
	5-30min	linearer Gradient zu 70% A/30% B
	30-39min	linearer Gradient zu 0% A/100% B
	39-46min	0% A/100% B

Die Auswertung der Messung erfolgte mittels der Software Chromeleon 6.0.

3.4.5 Nachweis von Milchsäure und Essigsäure mittels HPLC

Für den Nachweis organischer Säuren wurde folgendes Trennsystem verwendet:

HPLC-System: Waters (Milford, USA)

Säule: Resex ROA organic acid, 300 x 7,8mm, Korngröße 8µm, mit Vorsäule (Phenomenex)

Detektionswellenlänge: 210nm

Flussrate: 0,5ml/min, RT

Laufmittel: 5mM H₂SO₄

Elutionsdauer: 30 Minuten

Die Auswertung der Messung erfolgte mittels der Software Millennium32 Version 3.05.01.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (<http://www.dwalab.ca/common/pdf/comp1.html>) wurde zunächst eine 5ml Übernachtskultur (LB-Medium) angesetzt, die dann zum Animpfen einer 100ml Hauptkultur in 2xYT-Medium (16g Tryptone, 10g Hefeextrakt, 5g NaCl in 1l H₂O) verwendet wurde. Die Hauptkultur wurde bis zum Erreichen von OD₆₀₀ = 0,5 bei 37°C mit 200rpm geschüttelt. Anschließend wurden weitere 400ml 2xYT-Medium zugegeben und erneut das Erreichen von OD₆₀₀ = 0,5 abgewartet. Die Kultur wurde danach auf Eis abgekühlt und die Zellen bei 4°C für 10min bei 5000rpm abzentrifugiert. Der Zellüberstand wurde zunächst in 100ml Tfb-1 resuspendiert und nach einer 10-minütigen Inkubationszeit erneut abzentrifugiert (4000rpm, 5min, 4°C). Die Zellen wurden dann in 20ml Tfb-2 resuspendiert und auf Eis aufbewahrt. Die Zellen können so direkt für die Transformation eingesetzt, oder aliquotiert in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert werden.

Tfb-I		Tfb-II	
30mM	KOAc	10mM	Na-MOPS pH 7,0
50mM	MnCl ₂	75mM	CaCl ₂
100mM	KCl	10mM	KCl
10mM	CaCl ₂	15% (w/v)	Glycerin
15% (w/v)	Glycerin		

Eine Schnellmethode zur Transformation von Zellen wurde durchgeführt, wenn die Zellen lediglich mit Plasmid-DNA, aber keinem Ligationsansatz oder PCR-Produkt transformiert wurden (Kurien und Scofield, 1995). Allerdings musste dabei beachtet werden, dass die

Zellen nicht älter als 3 Tage sind, da sonst die Transformationsrate zu gering ist. Bei dieser Methode wurden Zellen von einer Agarplatte in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden dann in 100µl eiskaltem PEG-Puffer resuspendiert und 30 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurde das Plasmid zugegeben und der Ansatz für 10min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock (42°C, 1min 45sec) wurden 400µl 2xYT-Medium zugegeben. Der Transformationsansatz wurde für 1h bei 37°C geschüttelt, dann auf Selektionsmedium ausplattiert und bei 37°C inkubiert.

PEG-Puffer

1% Polyethylenglycol 8000
0,1M CaCl₂
0,05M MgCl₂

3.5.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen (Dower *et al.*, 1988)

Um elektrokompetente Zellen zu erhalten, wurde zunächst eine Übernachtskultur der zu transformierenden Zellen in LB-Medium angeimpft. Am nächsten Tag wurden 50µl der Übernachtskultur in 5ml LB-Medium überführt. Nach Erreichen von OD₆₀₀ = 0,5 wurden die Zellen abzentrifugiert und in 1 ml eiskaltem 10%igem Glycerin resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend ein weiteres Mal abzentrifugiert und wieder in 1ml eiskaltem 10%igem Glycerin resuspendiert. Nach einer letzten Zentrifugation wurden die Zellen dann in 100µl eiskaltem 10%igem Glycerin resuspendiert und sofort für die Transformation verwendet.

3.5.3 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen (Mülhardt, 2009)

Zur Transformation chemisch kompetenter Zellen wurden diese entweder sofort frisch verwendet oder auf Eis aufgetaut. 100µl kompetente Zellen wurden dann mit etwa 20ng Plasmid-DNA oder einem Ligationsansatz gemischt und für 30min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 1min 30sec. Nach dem Hitzeschock wurden 400µl 2xYT-Medium zugegeben. Der Transformationsansatz wurde dann, soweit nicht anders erwähnt, für 1h bei 37°C und 200 rpm geschüttelt, anschließend auf Selektionsmedium ausplattiert und bei 37°C inkubiert.

Zur Transformation elektrokompetenter Zellen wurden diese sofort nach der Herstellung verwendet und mit Plasmid-DNA (ca. 20ng DNA) oder aufgereinigtem PCR-Fragment (ca. 100ng DNA) versehen. Das Gemisch wurde anschließend in eine vorgekühlte

Elektroporationsküvette (Biozym) überführt. Die Elektroporation (Gene Pulser[®] II (Bio-Rad)) wurde mit 1,9kV, 200 Ω , 25 μ F durchgeführt. Der Spannungsimpuls sollte dabei 4-5msec erreichen. Nach erfolgtem Elektroschock wurden die Zellen sofort in 1ml 2xYT-Medium überführt und bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach 2 Stunden wurde eine Hälfte des Ansatzes auf Selektionsmedium ausplattiert, die andere Hälfte wurde über Nacht bei 30°C inkubiert. Wurden keine Kolonien auf dem Selektionsmedium erhalten, wurde der restliche Transformationsansatz ebenfalls ausplattiert.

3.5.4 Gewinnung chromosomaler DNA

Für die Gewinnung chromosomaler DNA wurde eine Übernachtskultur in 15ml LB-Medium angesetzt. Die optimale OD₆₀₀ für die DNA-Isolation liegt bei 3-4. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10min, 5000rpm) und in Na₂HPO₄-Puffer, pH 6,8 gewaschen. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 15 min bei 5000rpm. Die Zellen wurden dann in 0,85ml Saccharose-Tris-Lösung (siehe unten) resuspendiert. Anschließend wurden 100 μ l Lysozym (10mg/ml) zugegeben und der Ansatz bei 37°C für 15min inkubiert bevor die Lösung mit weiteren 1,25ml Saccharose-Tris-Lösung versetzt wurde. Danach wurden zuerst 100 μ l Proteinase K (2,5mg/ml), dann 1,25ml 1,5% SDS-Lösung zugegeben und es folgte eine weitere Inkubation für 3h bei 37°C. Nach der Inkubationszeit wurde der Ansatz vorsichtig mit 0,94ml 5M NaClO₄ gemischt. Anschließend wurden durch eine Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion die Proteine aus der Lösung entfernt. Die proteinfreie Lösung wurde dann einer RNase-Behandlung unterzogen (50 μ l RNase(5mg/ml), 30min, 37°C) bevor die DNA durch Zugabe von Isopropanol (0,8-1x Volumen) schließlich gefällt und abzentrifugiert wurde. Die DNA wurde dann getrocknet, in 5ml H₂O oder TE-Puffer gelöst und bei 4°C gelagert.

Saccharose-Tris-Lösung	TE-Puffer
25% Saccharose	10mM Tris-HCl, pH 7,8
10mM Tris-HCl	1mM EDTA

3.5.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Standard-PCR (Saiki *et al.*, 1985) wurde in einem Volumen von 25 μ l pro Reaktionsgefäß in Gegenwart von 2,5 μ l 10x PCR-Puffer, 0,5 μ l dNTPs (10 mM), 5 U Taq-DNA-Polymerase und je 10 μ M Forward- und Reverse Primer durchgeführt. Die Menge an

Template-DNA variierte je nach Ausgangsmaterial (Plasmid-DNA ca. 10ng, oder genomische DNA ca. 30ng). Für die Amplifikation von DNA-Sequenzen, die für weitere Klonierungsarbeiten eingesetzt werden sollen, wurde Pfu-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot) mit proof-reading Aktivität verwendet. Zusätzlich wurden hierbei die Oligonucleotide so gewählt, dass am 5'-Ende Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme entstanden, um die weitere Arbeit mit den DNA-Fragmenten zu erleichtern. Um eine chromosomale Integration von PCR-Produkten mittels homologer Rekombination zu ermöglichen, wurde an die Primer eine Sequenz aus etwa 40 Nucleotiden angehängt, die homolog zu der gewünschten Integrationstelle im Chromosom war (Datsenko und Wanner, 2000; Albermann *et al.*, 2010). Für die Amplifikation dieser Fragmente wurde das Expand Long Template PCR System mit einem Polymerase-Mix von Roche Diagnostic verwendet. Die PCR wurde in einem Thermocycler von Thermal Electron Corporation (Milford, USA) durchgeführt. Die Annealingtemperatur und Elongationszeit wurden je nach Primer und erwarteter Fragmentlänge angepasst. Es wurden dabei die von den Herstellern empfohlenen Bedingungen gewählt. Ein Standardprogramm ist in Tabelle 3-2 dargestellt. Die PCR-Produkte wurden dann durch Gelelektrophorese aufgetrennt (Kapitel 3.5.8) und je nach Verwendungszweck mittels Gelelution (Kapitel 3.5.9) aufgereinigt.

Tabelle 3-2 Standardbedingungen einer PCR.

Funktion	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95°C	4-10 min ^a	1
Denaturierung	95°C	30 s	30
Annealing	Primerspezifisch ^b	30 s	
Elongation	72°C ^c	Produktspezifisch (1min pro 1kb)	
Elongation	72°C	7 min	1

^a Der erste Zyklus der Denaturierung wurde bei Amplifikation gereinigter DNA für 4min durchgeführt, bei einer Kolonie-PCR für 10min.

^b entsprechend den Empfehlungen des Herstellers.

3.5.6 Plasmid-Isolierung

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde das NucleoSpin Plasmid Kit[®] (Macherey-Nagel) laut Vorschrift verwendet. Zur Isolation größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde das Plasmid Midi Kit von Qiagen laut Herstellervorschrift verwendet.

3.5.7 DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme

Die Restriktionsenzyme wurden gemäß den Vorgaben der Hersteller verwendet. In einem analytischen Restriktionsverdau wurden ca. 200ng DNA in einem 20µl-Ansatz verdaut. Für einen präparativen Restriktionsansatz wurden bis zu 5µg DNA in einem Gesamtvolumen von 100µl eingesetzt. Der Ansatz wurde dann 1-4 Stunden bei der jeweils optimalen Temperatur inkubiert.

3.5.8 Auftrennung und Sichtbarmachung von DNA

DNA wurde in einem TAE-Agarosegel (0,8 % Agarose in 1x TAE-Puffer, 0,1 % Ethidiumbromidlösung (10mg/ml)) aufgetrennt und sichtbar gemacht. Die Elektrophorese lief in 1x TAE-Puffer bei 80-140 V. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen 10xLadepuffer versetzt. Als Größenstandard wurde DNA-Ladder (Fermentas) aufgetragen. Nach der Auftrennung der DNA konnte diese unter UV-Licht bei 365nm sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

50x TAE-Puffer (T ris, A cetic acid, E DTA	10x Ladepuffer
242,2g Tris base	50 % Glycerin
100ml 0,5M EDTA	1 mM EDTA
57,12ml Essigsäure	0,03 % Bromphenolblau oder Xylencyanol
→ auffüllen auf 1l mit H ₂ O	

3.5.9 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde das "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen) gemäß den Vorschriften des Herstellers verwendet.

3.5.10 Herstellung von blunt-end Fragmenten

Zur Entfernung von DNA-Überhängen nach einem Restriktionsverdau erfolgte eine Behandlung der DNA-Fragmente mit T4-DNA-Polymerase. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 100µl in Gegenwart von 100µM dNTPs, 20µl 5xPuffer und 0,33µl T4-DNA-Polymerase durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde zunächst 10min bei 37°C und anschließend 20min bei 10°C inkubiert. Sollte die DNA ohne weitere Aufreinigung

verwendet werden, wurde die T4-DNA-Polymerase inaktiviert. Dazu wurde der Ansatz für 10min auf 75°C erhitzt.

3.5.11 Entfernen endständiger Phosphatreste von DNA-Fragmenten

Um die Religation geschnittener Vektoren zu verhindern, erfolgte eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase (shrimp alkaline phosphatase, Roche) zur Entfernung endständiger Phosphatreste. Die DNA-Fragmente wurden dabei mit dem entsprechenden Puffer versehen und nach Zugabe des Enzyms für 30min bei 37°C inkubiert. Die alkalische Phosphatase wurde schließlich durch 10minütiges Erhitzen auf 65°C inaktiviert. Die DNA konnte anschließend ohne weitere Aufreinigung für die Ligation eingesetzt werden.

3.5.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten wurde unterschieden zwischen sticky-end Ligationen und blunt-end Ligationen. Erstere wurden in einem Gesamtvolumen von 10µl durchgeführt. Die eingesetzten Mengen an Vektor und Insert wurden so gewählt, dass ein Mengenverhältnis Vektor:Insert von ca. 1:5 entsteht. Für die Ligation wurde eine maximale Gesamtmenge von 20ng DNA eingesetzt. Zusätzlich zu 1µl 10xPuffer und 1µl Ligase wurde 1µl ATP (10mM) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde dann für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend komplett in *E. coli* DH5α transformiert.

Blunt-end Ligationen wurden in einem Gesamtvolumen von 15µl in Gegenwart von 1,5µl 10xPuffer, 1,5µl PEG4000, 1µl ATP (10mM) und 1µl Ligase durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde dann zunächst für 4 Stunden bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert bevor die Transformation des kompletten Ansatzes in *E. coli*-Zellen erfolgte.

3.5.13 Chromosomale Integration von Genen

Bei der chromosomalen Integration von Genen wurden entweder chromosomale Gene inaktiviert, indem sie durch ein Markergen ersetzt wurden („knock-out“), oder es wurden gewünschte zusätzliche Gene an einer ausgewählten Stelle ins Chromosom integriert (knock-in“).

Die Inaktivierung von Genen wurde entsprechend der Vorschrift von Datsenko und Wanner (2000) durchgeführt. Hierbei wurde zunächst das Markergen mit flankierenden FRT-

Kassetten mittels PCR amplifiziert. Hierfür wurden die Plasmide pCO1-km oder pCO1-cat verwendet. Die Primer wurden dabei so gewählt, dass sich an beiden Seiten Überhänge von 40-45 Nucleotiden befanden, die homolog zu der Stelle waren, an der das DNA-Fragment integriert werden sollte. Die Selektion positiver Klone erfolgte durch den eingebrachten Marker und durch PCR. Veränderungen im Chromosom wurden üblicherweise am Stamm BW25113 vorgenommen und anschließend durch P1-Phagen vermittelte Transduktion in den gewünschten Stamm überführt. Das Prinzip der Inaktivierung oder Integration von Genen unter zu Hilfenahme des λ -Red Systems ist in Abbildung 3-3 dargestellt. Die FRT-Kassetten dienen als Erkennungsstellen für die FLP-Rekombinase. Nach erfolgreichem Knockout des entsprechenden Gens kann nach Transformation der veränderten Zellen mit dem Plasmid pCP20, welches das Gen für die FLP-Rekombinase trägt, die Markerkassette wieder aus dem Chromosom entfernt werden.

Die Integration zusätzlicher Gene erfolgte nach demselben Prinzip wie dem der Inaktivierung von Genen. Vor der Amplifikation des Gens wurde jedoch die gewünschte Sequenz mit einem Markergen gekoppelt. Das komplette Konstrukt wurde dann, wie bei der Inaktivierung beschrieben, mittels PCR amplifiziert und durch homologe Rekombination ins Chromosom eingebracht. Bei der Integration zusätzlicher Gene wurde die Stelle, an der integriert werden sollte, nach Möglichkeit so gewählt, dass ein einfacher phänotypischer Test den Erfolg der durchgeführten Arbeiten zeigen konnte, z.B. konnte nach Integration von *glpK* ins *mal*-Operon auf MacConkey-Platten + 1% Maltose gezeigt werden, dass erfolgreich transformierte Zellen nicht mehr in der Lage sind Maltose zu Säuren abzubauen.

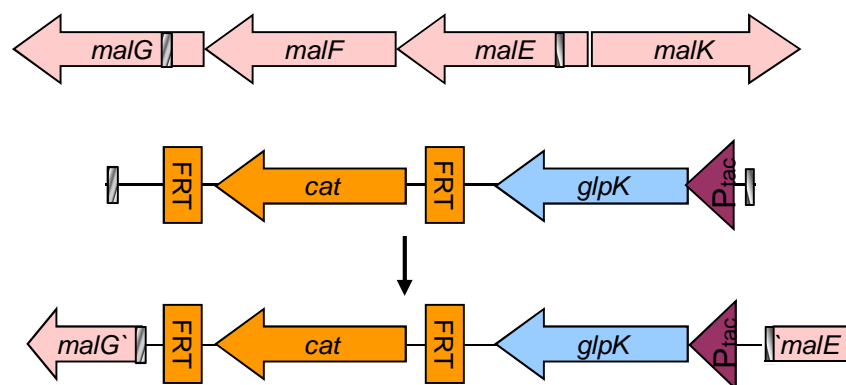


Abbildung 3-3 Prinzip der chromosomalen Integration von Genen nach Datsenko und Wanner (2000). Exemplarisch gezeigt ist hier die Integration von *glpK* ins Maltose-Operon. Die jeweils gleich schraffierten Bereiche sind dabei homolog zueinander und entsprechen ungefähr einer Größe von 40-45 Nucleotiden.

3.5.14 P1-Transduktion

Durch Phagen-vermittelte Transduktion (Lennox, 1955; Thierauf *et al.*, 2009) wurden die chromosomalen Veränderungen von BW25113 in andere Stämme, wie z.B. FUS4, überführt (siehe Kapitel 3.2.3). Hierfür musste vorab der entsprechend veränderte BW25113-Stamm (= Donorstamm) mit P1-Phagen infiziert werden. Für die Infektion wurde zunächst eine Übernachtskultur des veränderten BW25113-Stammes angesetzt. Hieraus wurde am nächsten Tag die Hauptkultur in LB-Medium + 0,2% Glucose + 5mM CaCl₂ angeimpft. Nach ca. 4 Stunden wurden 30µl Phagenlysate (Phagentiter ca. 10⁹ pfu/ml) und 100µl Zellkultur in 4ml aufgelöstem, ca. 45°C warmem 0,6%igem Agar gemischt. Dieses Gemisch wurde auf LB-Agarplatten + 0,2% Glucose + 5mM CaCl₂ gegossen und bis zum vollständigen Erstarren des 0,6%igen Agars bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C. Anschließend wurden die Phagen durch Filtration vollständig von den Zellen abgetrennt. Der zu transduzierende Stamm wurde als Übernachtskultur in LB-Medium angezogen. Am nächsten Tag wurden 100µl der Vorkultur in die Hauptkultur (LB-Medium + 0,2% Glucose + 5mM CaCl₂) überimpft. Nach Erreichen von OD₆₀₀ = 0,5 wurden die Zellen abzentrifugiert und in 1ml LB + 0,2% Glucose + 5mM CaCl₂ resuspendiert. Da keine Bestimmung des Phagentiters vorgenommen wurde, wurden je 100µl der Zellsuspension mit unterschiedlichen Mengen Phagenlysate (1, 3, 5µl) für exakt 20min bei 37°C infiziert. Die Infektion wurde anschließend durch Zugabe von 1ml LB + Natriumpyrophosphat (NaPP_i) (125 µM) gestoppt. Die Zellen wurden ein weiteres Mal mit LB + NaPP_i (125 µM) gewaschen, dann für 1 Stunde ohne zu schütteln bei 37°C inkubiert und schließlich auf Selektionsmedium ausplattiert. Transduktanten, die das Markergen trugen, wurden zunächst so lange aufgereingt bis sie phagenfrei waren und anschließend durch PCR überprüft. Die Aufreinigung erfolgte dabei durch mehrere aufeinander folgende Vereinzlungsausstriche auf dem entsprechenden Selektionsmedium.

3.5.15 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Proben erfolgte durch die Firmen MWG Biotech oder GATC.

3.6 Proteinbiochemische Methoden

3.6.1 Aufschluss von Zellen

Zellen wurden entweder mit der French® Pressure Cell Press oder per Ultraschall aufgeschlossen. Beim Ultraschall wurde nach Zentrifugation der Zellkultur der Zellüberstand im entsprechenden Puffer resuspendiert und dann durch 2-6 Ultraschallpulse (30sec, 40 Zyklen) unter Eiskühlung aufgeschlossen (Bandelin Sonopuls HD 200, Leistung: 200W, Frequenz: 20 kHz (BANDELIN electronic GmbH & Co., Berlin). Anschließend wurden durch Zentrifugation (30min, 4 °C, 14.000rpm) die Zelltrümmer abgetrennt. Für den Zellaufschluss mit einer French® Pressure Cell Press wurden die Zellen in 2ml Puffer resuspendiert. Die Flüssigkeit wurde dann in die dafür vorgesehene Zelle (SLM AMINCO®, PC-180, max. operating pressure 20000 psi) gegeben und in eine French® Pressure Cell Press eingebaut. Der Druck in der Zelle wurde auf 750 psi (entspricht 5170500 Pa) erhöht. Die Bakterienkultur wurde dann langsam abgelassen. Durch einen anschließenden Ultraschallpuls von 30 Sekunden wurde die chromosomale DNA zerstört. Anschließend wurden ebenfalls durch Zentrifugation (30min, 4 °C, 14.000rpm) die Zelltrümmer abgetrennt.

3.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford ist ein einfacher kolorimetrischer Test für die Messung der Gesamtproteinkonzentration (Bradford, 1976). Durch die Bindung von Proteinen an Coomassie Brilliant Blue R-250 erfolgt eine Farbänderung, die bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Photometer (Cary 50 Bio, Varian) gemessen wird. Bei den durchgeführten Versuchen wurde ein Teil der zu bestimmenden Proteinlösung in 100µl H₂O gelöst und mit 900µl Bradford-Reagenz versetzt. Anschließend wurde die Absorption im Photometer bei 595 nm gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer Rinderserumalbumin (BSA)-Eichgerade errechnet.

3.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Analyse von Proteingemischen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) im diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli (Lämmli, 1970). Hierzu wurden die Proteinextrakte mit 3x SDS-Puffer versetzt, für 10 min auf 100°C erhitzt und über ein Polyacrylamidgel in 1x SDS-Laufpuffer bei 120 V aufgetrennt. Als Größenstandard wurden 4µl „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ aufgetragen.

10x SDS-Laufpuffer	SDS-Probenpuffer(3x)
30,2g Tris-base	1,35ml H ₂ O
188g Glycin	1,5ml 1M Tris-HCl, pH 6,8
10g SDS	3ml Glycerin
→ auffüllen auf 1l mit H ₂ O	3ml 20 % SDS-Lösung
	400µl 1 % Bromphenolblau in H ₂ O
	6% β-Mercaptoethanol

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

Trenngel	Sammelgel
4,2ml 40 % (w/v) Acrylamidstammlösung	1,1ml 40% (w/v) Acrylamidstammlösung
9,6ml H ₂ O	6,3ml H ₂ O
4,6ml 4x Trenngelpuffer	2,5ml 4 x Sammelgelpuffer
200µl 10 % (w/v) APS	100µl 10 % (w/v) APS
20µl TEMED	10µl TEMED

3.6.4 Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Die Detektion der Proteinbanden in Gelen erfolgte mithilfe des Farbstoffs Coomassie-Brilliant Blue, der unspezifisch an kationische und hydrophobe Seitenketten des Proteins bindet. Das Gel wurde dabei für 30min in der Coomassie-Färbelösung inkubiert und dann in mehreren Schritten mit Entfärbelösung gewaschen.

Färbelösung	Entfärbelösung
0,1% Coomassie Brilliant blue R250	10% Essigsäure
40% Isopropanol	
10% Essigsäure	

3.6.5 2D-SDS-Polyamidacrylgelelektrophorese (2D-PAGE)

Die 2D-PAGE ist eine effektive Methode zur Analyse von komplexen Proteingemischen (O'Farrell, 1975; Klose, 1975). Das Proteingemisch wird nach zwei unterschiedlichen und voneinander unabhängigen Parametern aufgetrennt. In der ersten Dimension werden die Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Nettoladungen durch isoelektrische Fokussierung (IEF), in der zweiten Dimension durch SDS-PAGE entsprechend ihrer molekularen Massen aufgetrennt. Um die 2-D Muster so weit wie möglich zu standardisieren, werden die Trennungen in beiden Dimensionen unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt.

Für diese Analysemethode wurden 25ml einer Flüssigkultur mit $OD_{600} > 2,5$ abzentrifugiert, in 40mM TrisHCl gewaschen und anschließend erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 2ml Lysepuffer gelöst. Mittels Ultraschallbehandlung wurde die vollständige Lyse der Zellen sichergestellt und die chromosomale DNA zerstört. Zur Entfernung der Zelltrümmer wurde die Lösung für 30min bei 4°C und 14000rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradfordtest. Für die Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt wurden IPG-Streifen (IPG = immobilisierter pH-Gradient) der Firma GE Healthcare verwendet. Für die Rehydratisierung der IPG-Streifen wurden bei 18 cm langen Streifen 400µg Protein mit Rehydratisierungspuffer gemischt (Endvolumen 340µl) (bei 7cm: 50µg Protein in einem Gesamtvolumen von 125µl) und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend für 10min bei 14000rpm zentrifugiert und dann blasenfrei in die Furche der Rehydratisierungskammer pipettiert. Der IPG-Streifen wurde mit der Gelseite nach unten so in die Lösung gelegt, dass keine Luftblasen zwischen Gel und Flüssigkeit zu sehen waren. Anschließend wurde der Ansatz mit Mineralöl überschichtet. Die Rehydratisierung der Streifen erfolgte über Nacht.

Lysepuffer		Rehydratisierungspuffer	
40mM	TrisHCl	7M	Harnstoff
8M	Harnstoff	2M	Thioharnstoff
4% (w/v)	CHAPS	2% (w/v)	CHAPS
Frisch zugegeben:		0,002%	Bromphenolblau
65mM	DTT	Frisch dazugeben:	
		10mM	DTT
		2% (v/v)	Pharmalyte, pH entsprechend der Streifen

3.6.5.1 1. Dimension

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte bei 20°C (Temperierung durch Wasserbad). Die rehydratisierten Streifen wurden dazu mit der Gelseite nach oben in die Elektrophoreseapparatur gelegt. Um sicherzustellen, dass Strom fließen kann, wurde zwischen Gel und Elektrode ein Streifen nasses Filterpapier gelegt.

Elektrophoreseprogramme:

7cm, pH 3-10

200V	10mA	5W	0:01h
3500V	30mA	25W	1:30h
3500V	30mA	25W	1:00h

18cm, pH 3-10

500V	10mA	5W	0:01h
3500V	30mA	25W	1:30h
3500V	30mA	25W	6:20h

Nach der isoelektrischen Fokussierung erfolgt die Äquilibration der IPG-Streifen in 10ml SDS-Äquilibrationpuffer für 15min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln.

SDS-Äquilibrationpuffer

4% (w/v)	SDS	0,002%	Bromphenolblau
50mM	TrisHCl	→ pH 8,8 einstellen, frisch dazu geben:	
6M	Harnstoff	2% (w/v)	DTT
30%	Glycerin		

3.6.5.2 2. Dimension

Für die zweite Dimension wurden 12% SDS-Polyacrylamidgele vorbereitet. Die äquilibrierten Streifen wurden blasenfrei auf das Gel gelegt und mit 0,5% (w/v) Agarose in 0,5 M TrisHCl, pH 8,8 überschichtet. Die Elektrophorese kleiner Gele erfolgte bei Raumtemperatur (100V, 1,5h), die großer Gele bei 4°C (120V, 14h).

Nach der Elektrophorese erfolgte eine Inkubation der Gele in Fixierungslösung für 30min. Anschließend wurden die Gele über Nacht gefärbt. Die Entfärbung der Gele erfolgte mit Wasser.

Fixierungslösung	Färbelösung
10% Essigsäure	160g Ammoniumsulfat
40% Methanol	1,6g Coomassie G250
	2% o-Phosphorsäure
	→ auf 1,6l auffüllen, frisch dazugeben: 400ml Methanol

3.6.6 Bestimmung der Enzymaktivitäten

Zur Überprüfung der Enzymaktivität wurden verschiedene Enzymtests durchgeführt. Die Reaktionen wurden, soweit nicht anders erwähnt, durch Zugabe des Substrats gestartet. Erfolgte die Messung der Enzymaktivität über die Änderung der NADH-Konzentration, wurde die Extinktionsänderung bei 340nm verfolgt und die Aktivität nach folgender Formel berechnet:

$$A_s = \frac{V \cdot \Delta E}{\epsilon \cdot c \cdot d}$$

A_s = spezifische Aktivität, ΔE = Extinktionsdifferenz/min, V = Probenvolumen in ml, ϵ = $6,3 \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm), c = Proteinkonzentration in mg, d = Lichtweg in cm.

3.6.6.1 Enzymtest für Glycerinkinase

Zur Messung der Aktivität von GlpK wurde der Rohextrakt von DH5 α pKUS3 verwendet. Die Enzymaktivität wurde mit dem bereits bei der Messung der Glycerinkonzentration beschriebenen Reaktionsansatz bestimmt (Abbildung 3-2). Es wurde dabei derselbe Kit der Firma r-biopharm verwendet und statt der mitgelieferten Glycerinkinase der Rohextrakt von DH5 α pKUS3 eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100mM Glycerin gestartet. Bei der Bestimmung der Enzymaktivität in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an Fructose-1,6-bisphosphat wurde der Reaktionsansatz vor Substratzugabe für fünf Minuten bei 25°C inkubiert, um dem Inhibitor die Möglichkeit zu geben, an die entsprechenden Stellen im Enzym zu binden, bevor die Reaktion gestartet wurde. Die Messung erfolgte bei 25°C.

3.6.6.2 Enzymtest für Fructose-1,6-bisphosphatase II

Die Aktivität der Fructose-1,6-bisphosphatase II wurde diskontinuierlich mithilfe eines kolorimetrischen Tests durch die Zunahme der Phosphatkonzentration im Reaktionsansatz gemessen (Col, 2004). Zunächst wurde der Rohextrakt von DH5 α pKUS13 in den Reaktionsansatz gegeben und in Intervallen von 5 Minuten wurden 50 μ l des Gemischs zu 800 μ l frisch hergestellter Malachitgrünlösung pipettiert. Diese Lösung wurde dann für 20min bei RT inkubiert. In dieser Zeit reagierte das frei gewordene Phosphat mit Malachitgrün und Ammoniummolybdat zu einem stabilen Farbstoffsalz. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 μ l 34% Na-Citrat. Dies bewirkt die Abreaktion des überschüssigen Malachitgrüns zu einem farblosen Endprodukt (Altmann *et al.*, 1971). Durch Messen der Extinktion bei 660nm konnte dann die Phosphatkonzentration bestimmt werden. Für die Berechnung der Enzymaktivität wurde zunächst eine Standardkurve mit 0-0,5mM KH₂PO₄ erstellt, anhand deren Werte dann die Aktivität berechnet werden konnte. Als Kontrolle wurde der gleiche Ansatz mit einem Rohextrakt von DH5 α pJF119EH durchgeführt. Für den Nullwert wurde Wasser anstelle des Rohextrakts eingesetzt.

Reaktionsansatz		Malachitgrünlösung	
20mM	Tricin, pH7,7	3 Teile	0,045% Malachitgrün
50mM	KCl	1 Teil	4,2% Ammoniummolybdat in 4N HCl
1mM	MnCl ₂		
1,5mM	Fru-1,6-BP		

3.6.6.3 Enzymtest für Pyruvatkinase A und F

Der Test zur Bestimmung der Aktivität von PykF wurde dem Buch Practical Enzymology (Bisswanger, 2004) entnommen. Für den Aktivitätstest von PykA wurde der gleiche Ansatz mit AMP statt Fructose-1,6-bisphosphat als Aktivator verwendet. Der Aktivitätstest wurde bei 25°C durchgeführt und die Reaktion durch Zugabe von PEP gestartet. Die Bestimmung der Pyruvatkinaseaktivität wurde als Kontrolle für die chromosomale Deletion von *pykA* bzw. *pykF* durchgeführt und dementsprechend mit dem Rohextrakt der jeweiligen Zellen durchgeführt. Als Kontrolle diente ein Rohextrakt des Ursprungsstamms. Für den Nullwert wurde Wasser anstelle des Rohextrakts eingesetzt.

Reaktionsansatz

82mM	Triethanolamin, pH 7,6
10mM	KCl
2,5mM	MgCl ₂
0,5mM	PEP
5mM	ADP
15U/ml	Lactatdehydrogenase
0,2mM	NADH
1mM	AMP (bei PykA), Fructose-1,6-bisphosphat (bei PykF)

4 Ergebnisse

4.1 Wachstumsverhalten von *E. coli* auf verschiedenen C-Quellen im Schüttelkolben

4.1.1 Untersuchung des Wildtyps *E. coli* LJ110

Zur Überprüfung der generellen Verwertbarkeit der C-Quellen Glycerin und Rohglycerin im Vergleich zu Glucose wurde zunächst der Wildtyp *E. coli* LJ110 in Schüttelkolben untersucht. Es wurde Minimalmedium (Gerhardt *et al.*, 1984) mit 0,5% der jeweiligen C-Quelle verwendet (Vorgehensweise siehe Kapitel 3.3). Für Glucose wurde eine Wachstumsrate von $\mu=0,64 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$, für Glycerin $\mu=0,48 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ und für Rohglycerin $\mu=0,47 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ (Abbildung 4-1) gemessen. Ein Vergleich mit Literaturdaten ist hier nicht ganz einfach, da oft unterschiedliche Angaben gemacht werden (siehe Diskussion). Die im Photometer bei 600nm gemessenen Endwerte für die optischen Dichten lagen bei 5,2 (Glucose), 4,7 (Glycerin) und 4,6 (Rohglycerin).

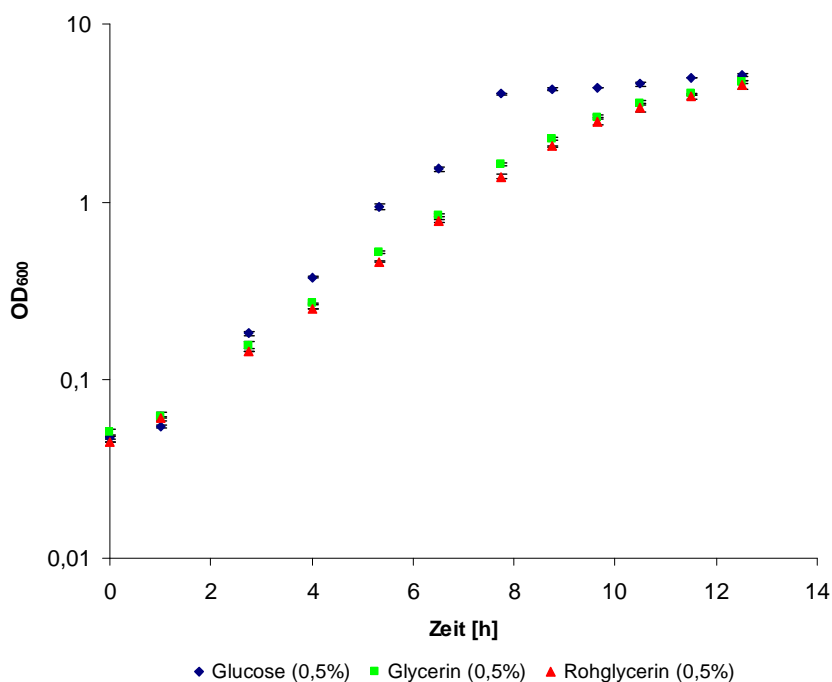


Abbildung 4-1 Wachstum von *E. coli* LJ110 in Schüttelkolben mit Minimalmedium (Gerhardt *et al.*, 1984) ohne weitere Zusätze unter Verwendung der C-Quellen Glucose (0,5%), Glycerin (0,5%) oder Rohglycerin (0,5%).

Die erreichten Wachstumsraten wurden für den Zeitraum 1-8 Stunden gemessen und betragen $\mu=0,64 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ (Glucose), $\mu=0,48 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ (Glycerin) und $\mu=0,47 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ (Rohglycerin). Der Versuch wurde zwei Mal unabhängig voneinander durchgeführt unter Verwendung von 250ml-Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 25ml, bei 37°C und einer Schüttlerdrehzahl von 200rpm.

4.1.2 Wachstum von *E. coli* LJ110 auf verschiedenen Glycerin-/Rohglycerinchargen

Rohglycerin ist ein Abfallprodukt der Biodieselindustrie und kann daher in seiner Zusammensetzung variieren. Um zu testen, ob die Zusammensetzung verschiedener Rohglycerinchargen Einfluss auf das Wachstum der Zellen besitzen, wurden Wachstumskurven mit unterschiedlichen Rohglycerinchargen erstellt (Vorgehensweise siehe Kapitel 3.3). Dafür verwendet wurde der Stamm *E. coli* LJ110. Die Firma EOP Falkenhagen stellte für diesen Versuch zwei verschiedene Rohglycerinchargen, zum einen eine Probe aus NaOH-katalysiertem und zum anderen aus KOH-katalysiertem Biodiesel. Von der Firma ADM Hamburg wurde eine Probe Rohglycerin (NaOH-katalysierter Biodiesel) und eine Probe aufgereinigtes Pharmaglycerin gestellt. Des Weiteren stand eine ältere Charge Rohglycerin zur Verfügung (2006, ADM Hamburg) und aufgereinigtes Glycerin der Firma Roth mit einer Konzentration $\geq 86\%$ wurde getestet. Es wurde gezeigt, dass keine nennenswerten Unterschiede zwischen dem Wachstum auf den einzelnen Glycerin-/Rohglycerinchargen zu sehen sind (Abbildung 4-2). Die Wachstumsraten erreichten Werte von $\mu=0,48 - 0,51 \text{ h}^{-1}$.

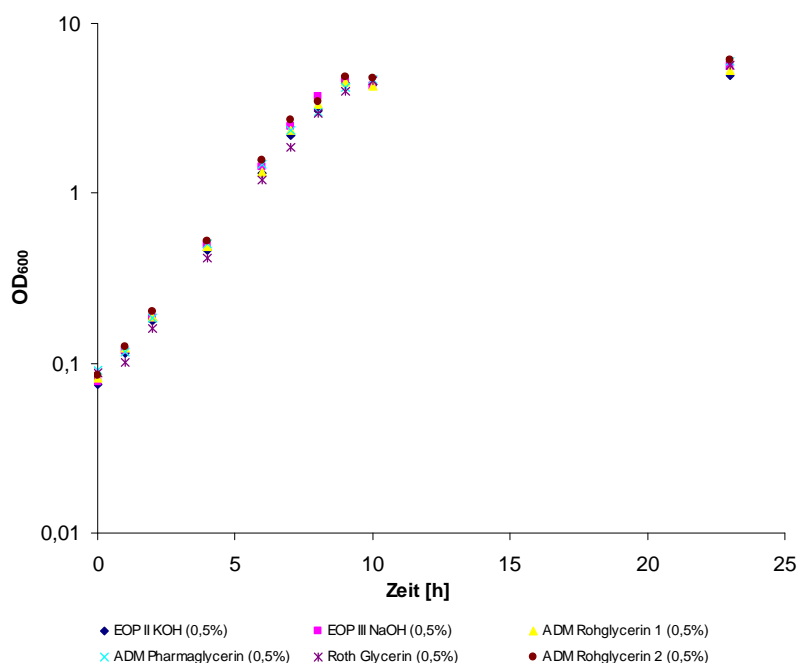


Abbildung 4-2 Wachstum von *E. coli* LJ110 in Minimalmedium (Gerhardt *et al.*, 1984) ohne weitere Zusätze unter Verwendung verschiedener Glycerin-/Rohglycerinchargen.

Die Konzentration an C-Quelle betrug jeweils 0,5%. Die Wachstumsraten wurden für den Zeitraum 1-8 Stunden gemessen und lagen im Bereich $\mu= 0,48 - 0,51 \text{ h}^{-1}$. Durchgeführt wurde der Versuch zwei Mal wie in Abbildung 4-1 beschrieben.

4.1.3 Untersuchung des L-Phenylalanin produzierenden Stammes *E. coli* FUS4/pF81

Der Stamm *E. coli* FUS4/pF81 wurde zunächst im Schüttelkolben untersucht. Bei diesem Stamm handelt es sich um einen Phenylalanin produzierenden *E. coli*-Stamm (Kapitel 3.2.3). FUS4 ist auxotroph für L-Tyrosin und L-Phenylalanin. Durch Transformation des Stammes mit dem Plasmid pF81, welches unter anderem das Gen *pheA^{fbr}* unter der Kontrolle eines tac-Promotors trägt (siehe Material und Methoden), kann dann nach Induktion mit IPTG die Produktion von L-Phenylalanin erfolgen. Der Stamm bleibt aber auxotroph für L-Tyrosin. Das bedeutet, dass die Zellen vor der Induktion zusätzlich L-Phenylalanin und L-Tyrosin für das Wachstum benötigen. Nach der Induktion benötigen die Zellen nur noch L-Tyrosin für das Wachstum. Da bei dem hier beschriebenen Versuch die Produktbildung untersucht wurde, wurde auch nach der Induktion kein weiteres L-Tyrosin zugegeben, um eine Inhibition von AroF zu vermeiden. Für den Wachstumsversuch wurden die Zellen vorbereitet und kultiviert wie in Kapitel 3.3 beschrieben. Die Hauptkultur wurde auf $OD_{600}=0,1$ angeimpft. Die Konzentration an eingesetzter C-Quelle betrug jeweils 0,5%. Der typische Verlauf einer solchen Wachstumskurve ist in Abbildung 4-3 dargestellt. Jeder Ansatz wurde zwei Mal gemessen. Die erreichten Wachstumsraten waren $\mu=0,40 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ für Glucose, $\mu=0,29 \pm 0,05 \text{ h}^{-1}$ für Glycerin und $\mu=0,29 \pm 0,06 \text{ h}^{-1}$ für Rohglycerin. Dies sind deutlich geringere Werte als mit dem Wildtyp erhalten wurden (Kapitel 4.1.1). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die geringe Wachstumsrate möglicherweise auf eine Limitierung durch L-Tyrosin hervorgerufen wurde, da keine höhere Konzentration dieser Aminosäure getestet wurde, um die Produktbildung nicht zu hemmen. Auch eine höhere Anfangskonzentration an L-Phenylalanin wurde nicht getestet. Die gebildeten Mengen an L-Phenylalanin betragen $0,19 \pm 0,09 \text{ g/l}$ (Glucose), $0,31 \pm 0,07 \text{ g/l}$ (Glycerin) und $0,27 \pm 0,05 \text{ g/l}$ (Rohglycerin).

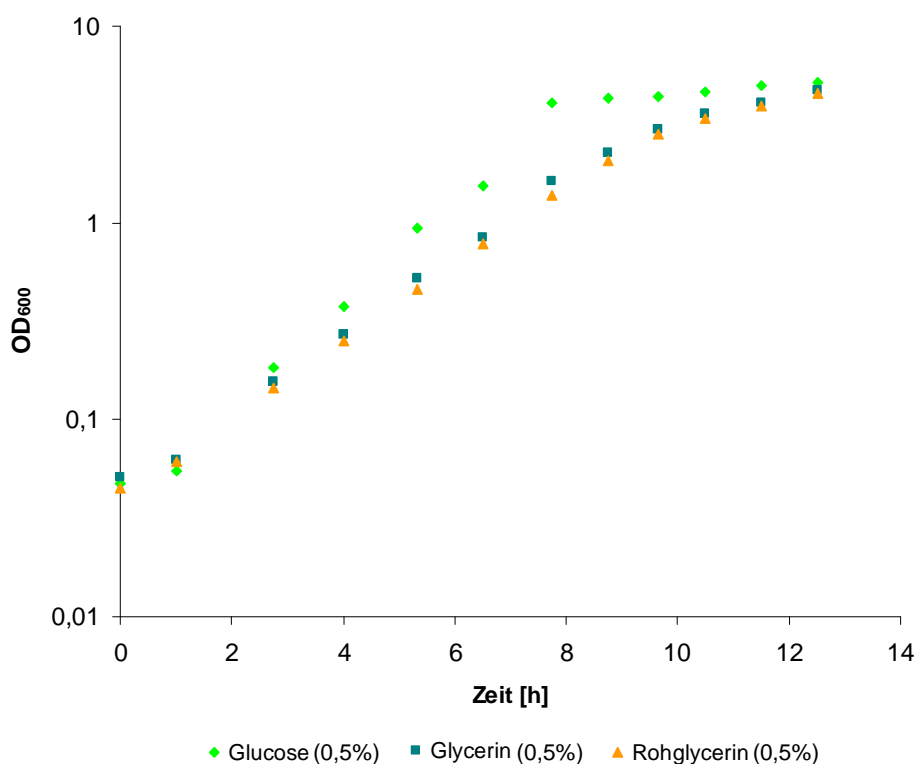


Abbildung 4-3 Wachstum des Stammes FUS4/pF81 in Minimalmedium (Gerhardt *et al.*, 1984) mit zusätzlichem L-Tyrosin und L-Phenylalanin und Glucose (0,5%), Glycerin (0,5%) bzw. Rohglycerin (0,5%) als C-Quelle.

In dem hier exemplarisch dargestellten Experiment wurden für den Zeitraum 1-7 Stunden die folgenden Wachstumsraten erreicht: $\mu=0,37 \text{ h}^{-1}$ (Glucose), $\mu=0,27 \text{ h}^{-1}$ (Glycerin) und $\mu=0,27 \text{ h}^{-1}$ (Rohglycerin). Durchgeführt wurde der Versuch zwei Mal wie in der Legende zu Abbildung 4-1 beschrieben.

4.1.4 Vergleich der Substrattoleranz, des Wachstums, der Biomasseausbeute und der L-Phenylalaninproduktion auf den C-Quellen Glycerin und Rohglycerin

Die vorhergehenden Ergebnisse zeigen, dass der Stamm FUS4/pF81 in der Lage ist, wie auch der Wildtyp, ohne vorherige Aufreinigung des Rohglycerins auf dieser C-Quelle zu wachsen und L-Phenylalanin zu produzieren. In weiteren Experimenten wurde deshalb untersucht, ob dies auch noch bei hohen Konzentrationen an Rohglycerin gilt. Um die Toleranz von FUS4/pF81 gegenüber Rohglycerin zu testen, wurden Schüttelkolbenversuche mit Minimalmedium und Rohglycerinkonzentrationen von 0,5%-10% durchgeführt. Die Zellen wurden hierfür vorbereitet und kultiviert wie in Kapitel 3.3 beschrieben. Als Kontrolle diente der jeweils gleiche Ansatz mit reinem Glycerin als C-Quelle. Nach 30 Stunden wurde der Versuch beendet und die gebildeten Mengen an Phenylalanin, Chorismat und organischen

Säuren gemessen, sowie der Glycerinverbrauch und die Wachstumsrate bestimmt. Es zeigte sich, dass die Wachstumsrate mit 0,5% C-Quelle mit Glycerin und Rohglycerin jeweils bei $\mu=0,28 \text{ h}^{-1}$ lag, mit zunehmender Rohglycerinkonzentration aber stärker abnahm als bei reinem Glycerin (Abbildung 4-4). Der Verbrauch an C-Quelle war bei Rohglycerin etwas höher als bei Glycerin (Abbildung 4-5). Allerdings ist zu beachten, dass die Fehlerbalken bei Rohglycerin mit zunehmender Konzentration sehr hoch sind und so eine aussagekräftige Interpretation nicht möglich ist. Auch die Messungen zur gebildeten Menge an L-Phenylalanin weisen recht hohe Fehlerbalken auf. Es scheint jedoch, dass mit Rohglycerin doch etwas mehr Produkt gebildet werden kann als mit Glycerin (Abbildung 4-6). Mit Rohglycerin (5%) konnte eine maximale Konzentration von $0,61 \pm 0,02 \text{ g/l}$ erreicht werden, während die maximale Endkonzentration mit Glycerin (5%) bei $0,48 \pm 0,03 \text{ g/l}$ lag. Interessant ist die Auswertung der Chorismatbildung (Abbildung 4-7). Hier wurde mit Rohglycerin als C-Quelle teilweise die doppelte bis dreifache Menge an Chorismat gebildet verglichen mit dem Kontrollansatz. Eine Limitierung durch $(\text{NH}_4)_2$ kann ausgeschlossen werden, da die im Medium enthaltene Stickstoffquelle bei den Fermentationen ausreichend war, um Zellwachstum bis zu einer optischen Dichte von $\text{OD}_{600}=10$ und einer L-Phenylalaninbildung von 1 g/l zu gewährleisten. Die Analyse der gebildeten Nebenprodukte zeigt, dass mit zunehmender Glycerinkonzentration die Rate an produziertem Lactat und Acetat erst zu- und dann wieder abnimmt (Abbildung 4-8). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass eine hohe Glycerinkonzentration den Stoffwechsel insgesamt inhibiert. Mit Rohglycerin wurden etwas mehr Nebenprodukte gebildet, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass hier der Stoffwechsel etwas schneller abläuft als mit reinem Glycerin. Einen weiteren Hinweis für die schnelle Glycerinverwertung mit Rohglycerin als C-Quelle liefert der Glycerinverbrauch (Abbildung 4-5), der im Falle des Rohglycerins zwar auch mit hohen Fehlerbalken behaftet ist, aber trotzdem höher zu sein scheint, als bei reinem Glycerin (siehe auch Diskussion).

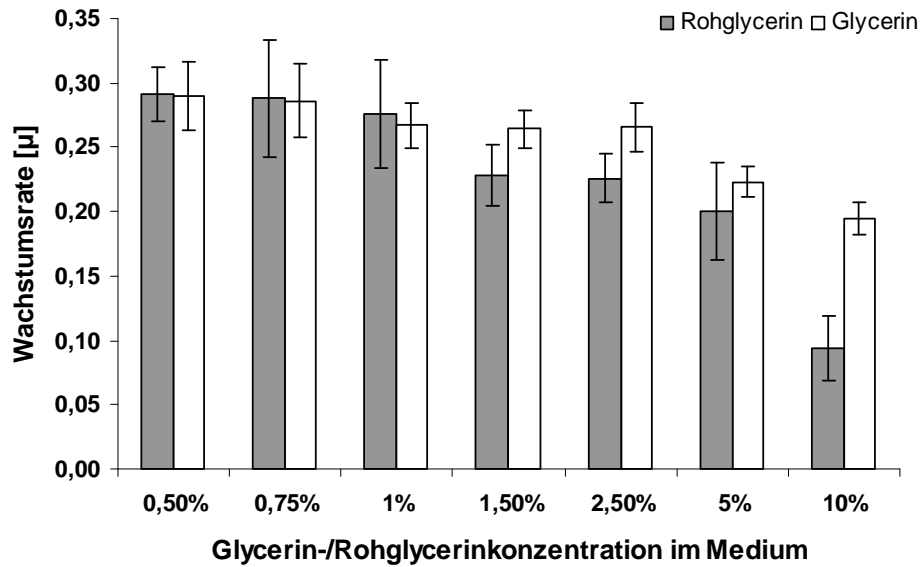


Abbildung 4-4 Abhängigkeit der Wachstumsraten von der Konzentration an Glycerin oder Rohglycerin im Medium. Durchgeführt wurden die Versuche zwei Mal mit dem Stamm FUS4/pF81.

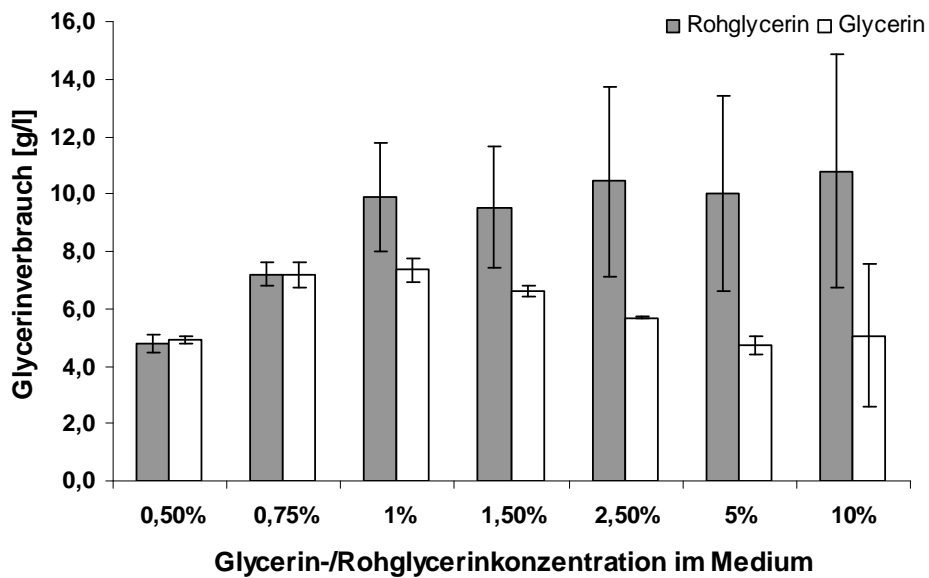


Abbildung 4-5 Glycerinverbrauch in den einzelnen Ansätzen aus Abbildung 4-4. Durchgeführt wurden die Versuche zwei Mal mit dem Stamm FUS4/pF81.

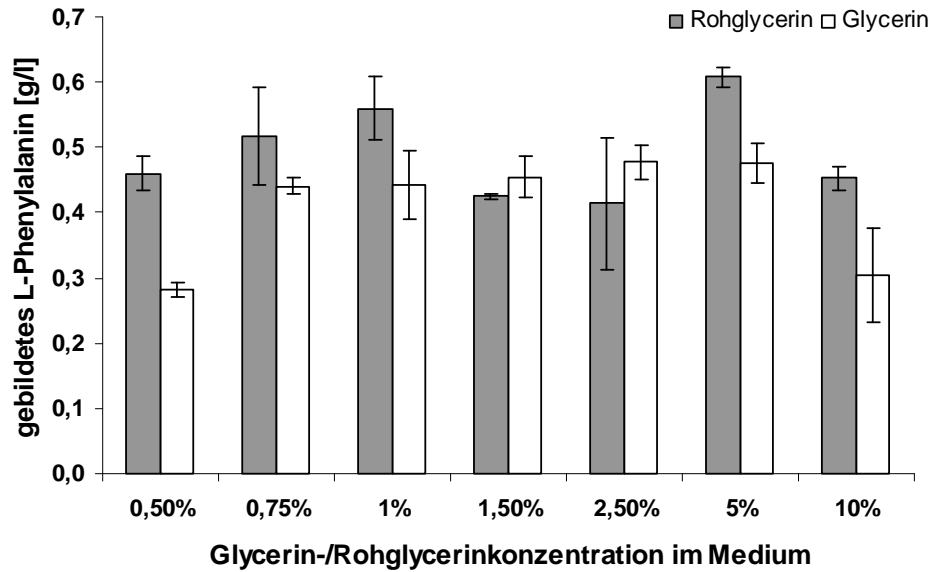


Abbildung 4-6 L-Phenylalaninproduktion in den einzelnen Ansätzen aus Abbildung 4-4. Durchgeführt wurden die Versuche zwei Mal mit dem Stamm FUS4/pF81.

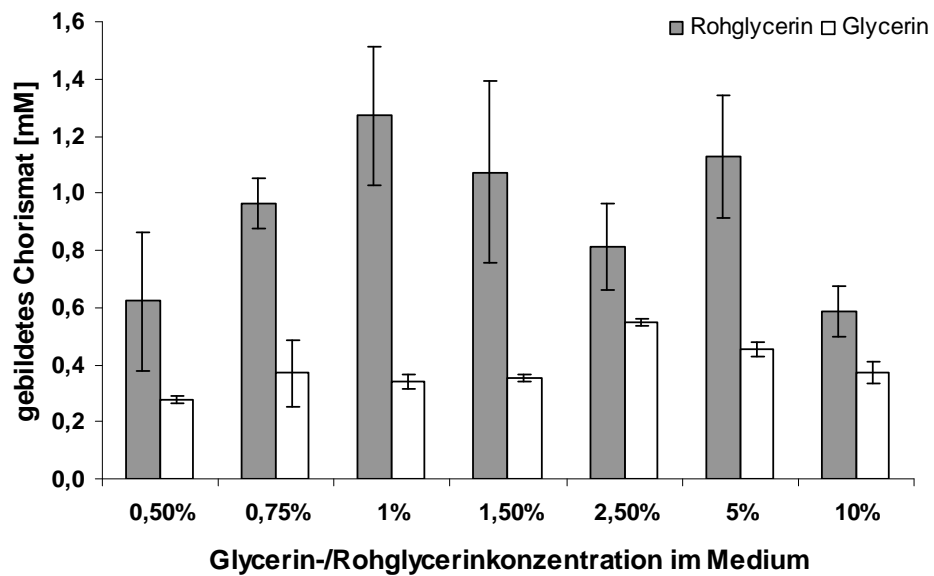


Abbildung 4-7 Chorismatproduktion in den einzelnen Ansätzen aus Abbildung 4-4. Durchgeführt wurden die Versuche zwei Mal mit dem Stamm FUS4/pF81.

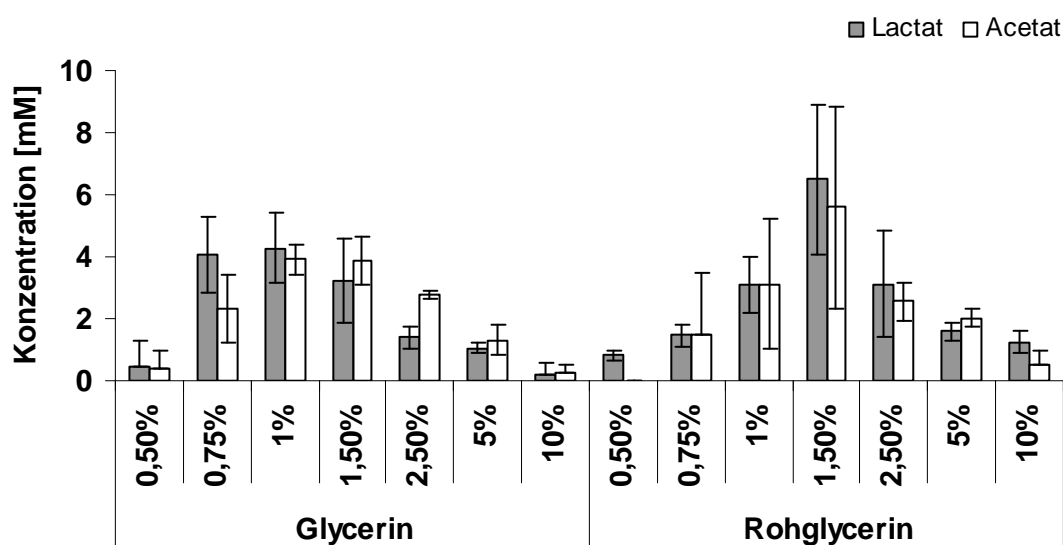


Abbildung 4-8 Analyse der Produktion organischer Säuren in den einzelnen Ansätzen aus Abbildung 4-4.

Durchgeführt wurden die Versuche zwei Mal mit dem Stamm FUS4/pF81.

Für den Vergleich der Biomasseausbeute wurde der Stamm FUS4/pF81 bei geringen Konzentrationen (0,01%-0,5%) an Glycerin und Rohglycerin kultiviert. Es erfolgte keine Induktion, so dass die komplette C-Quelle für die Biomasseproduktion zur Verfügung stehen sollte. Der Verlauf der Wachstumskurven ist in Abbildung 4-9 und Abbildung 4-10 dargestellt. Es zeigte sich, dass die Wachstumsraten bei Rohglycerin und Glycerin sehr ähnlich waren (Abbildung 4-11). Die maximale Wachstumsrate von $\mu=0,32 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ wurde mit Rohglycerin bei einer Konzentration von 0,1% C-Quelle erreicht und mit Glycerin bei 0,05% ($\mu=0,31 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$). Allerdings waren die Unterschiede in den Wachstumsraten bei den verschiedenen Konzentrationen nicht groß genug, um eine sinnvolle K_s -Wert-Bestimmung durchführen zu können. Nicht auszuschließen ist allerdings, dass beim FUS-Stamm nicht die Substrataufnahme, sondern die Aufnahme von L-Tyrosin oder L-Phenylalanin limitierend ist. Für die Berechnung der Biomasseausbeute wurde die exakte Glycerinkonzentration im Medium bestimmt und dann die Menge an Glycerin berechnet, die notwendig war, um eine Zunahme von $\text{OD}_{600}=1$ zu erhalten. Hierzu wurde der gemessene Glycerinverbrauch durch den erhaltenen OD_{600} -Wert geteilt. Die Ergebnisse zeigen, dass bei sehr geringen Konzentrationen (0,01%-0,025%) die Biomasseausbeute mit Rohglycerin besser ist, bei höheren Konzentrationen über 0,25% aber Glycerin einen Vorteil hat (Abbildung 4-12). Bei Konzentrationen $\leq 0,025\%$ wurden sehr hohe Fehlerbalken erhalten, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass die zur Verfügung gestandenen Messmethoden keine genaueren

Werte liefern konnten. Bei beiden Ansätzen ist zu beobachten, dass bei Konzentrationen $\geq 0,25\%$ der Glycerinverbrauch bezogen auf die Zellmenge stark zunimmt. Da ab $OD_{600}=1$ in regelmäßigen Abständen L-Phenylalanin und L-Tyrosin zugefüttert wurde (jeweils $250\mu\text{l}$ der Stammlösung (4mg/ml) bei $OD_{600}=1$, bei den Ansätzen mit $0,25\%$ und $0,5\%$ C-Quelle zusätzlich zum Zeitpunkt 12h und zum Zeitpunkt $22,5\text{h}$) und in Bezug auf diese beiden Stoffe keine Limitierung bestehen sollte, wäre es möglich, dass bei höheren Zelldichten die Sauerstoffversorgung im Schüttelkolben limitierend wird. Diese Ergebnisse zeigen, dass prinzipiell die Nutzung von Rohglycerin für die L-Phenylalaninproduktion möglich sein sollte.

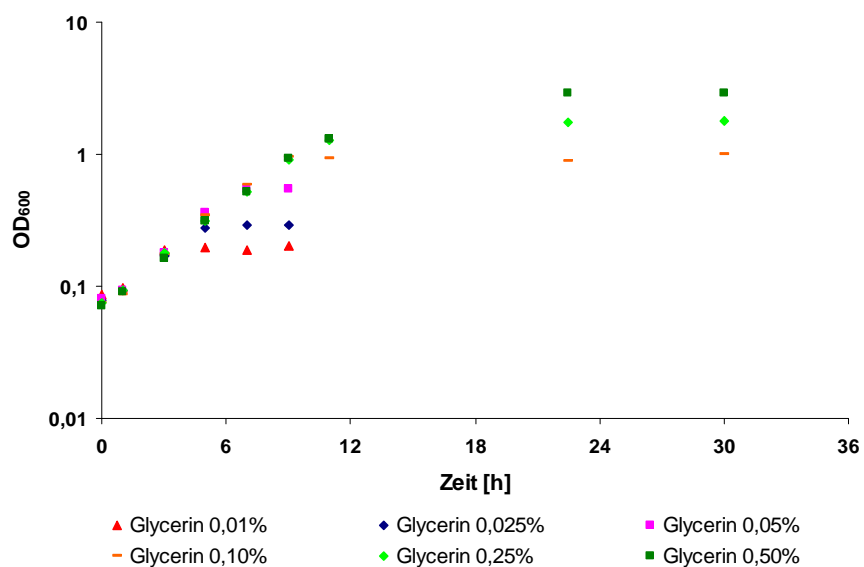


Abbildung 4-9 Verlauf der Wachstumsexperimente mit FUS4/pF81 in Minimalmedium + Glycerin.

Die Konzentrationen an eingesetzter C-Quelle lagen bei $0,01\text{-}0,5\%$. Die Wachstumsraten sind in Abbildung 4-11 dargestellt. Behandelt und kultiviert wurden die Stämme wie in Kapitel 3.3 beschrieben. Durchgeführt wurden die Versuche zwei Mal mit dem Stamm FUS4/pF81.

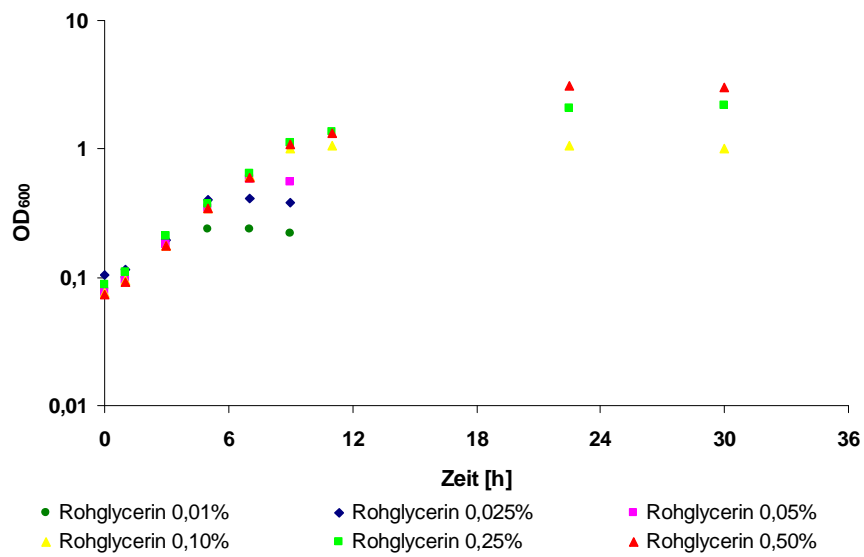


Abbildung 4-10 Verlauf der Wachstumsexperimente mit FUS4/pF81 in Minimalmedium + Rohglycerin.

Die Konzentrationen an eingesetzter C-Quelle lagen bei 0,01-0,5%. Die Wachstumsraten sind in Abbildung 4-11 dargestellt. Behandelt und kultiviert wurden die Stämme wie in Kapitel 3.3 beschrieben. Durchgeführt wurden die Versuche zwei Mal mit dem Stamm FUS4/pF81.

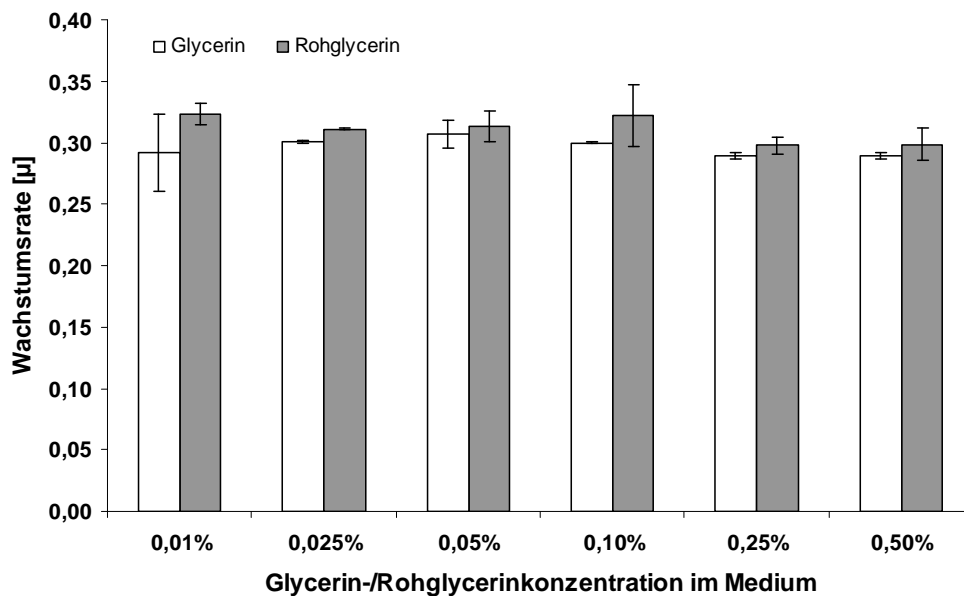


Abbildung 4-11 Abhängigkeit der Wachstumsrate der einzelnen Ansätze in Abbildung 4-9 und Abbildung 4-10 von der Glycerin-/Rohglycerin-Konzentration im Medium.

Durchgeführt wurden die Versuche zwei Mal mit dem Stamm FUS4/pF81.

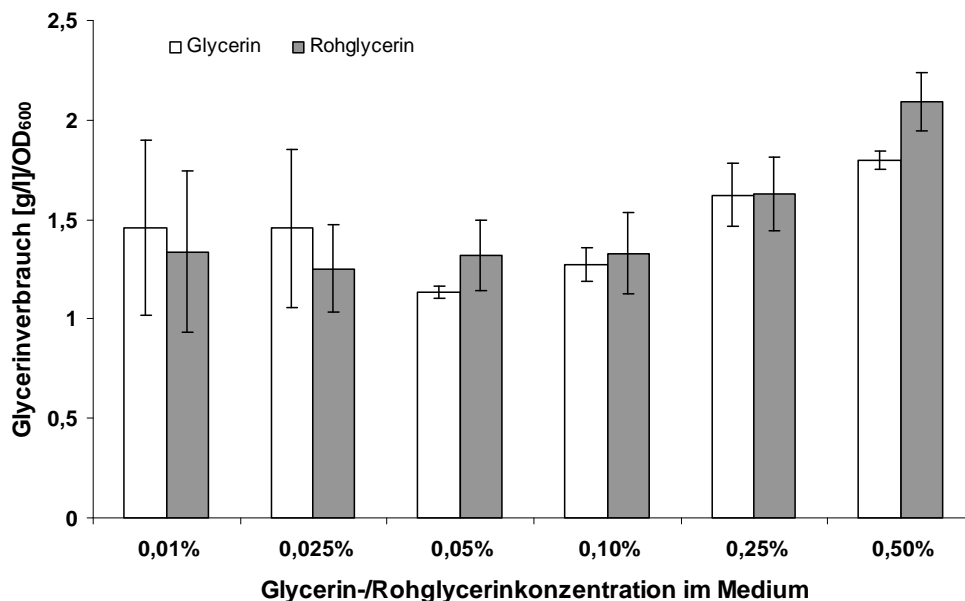


Abbildung 4-12 Glycerinverbrauch in Bezug auf die Zelldichte zu den einzelnen Ansätzen in Abbildung 4-9 und Abbildung 4-10. (0,01% = 0,1g/l, 0,025% = 0,25g/l, 0,05% = 0,5g/l, 0,1% = 1g/l, 0,25% = 2,5g/l, 0,5% = 5g/l)

Die Werte besagen, wieviel g/l Glycerin benötigt werden, um eine Biomassezunahme von einer OD₆₀₀-Einheit zu erhalten. Durchgeführt wurden die Versuche zwei Mal mit dem Stamm FUS4/pF81.

4.1.5 Vergleich der Proteinexpression bei Kultivierung von *E. coli* FUS4/pF81 auf Glycerin oder Rohglycerin mittels 2D-SDS-PAGE

Für einen Vergleich der Proteinzusammensetzung von FUS4/pF81, kultiviert mit Glycerin oder Rohglycerin, wurden während einer Fermentation des Stammes mit der jeweiligen C-Quelle Proben für eine 2D-SDS-PAGE Analyse genommen. Bei der Fermentation mit reinem Glycerin war zum Zeitpunkt der Probenahme OD₆₀₀=6,1 erreicht und 12g/l Glycerin zudosiert worden (Abbildung 4-23). Bei FUS4/pF81 kultiviert in Minimalmedium + Rohglycerin waren zu diesem Zeitpunkt (20,5h) bereits 23g/l Rohglycerin zudosiert und OD₆₀₀=10 erreicht worden (Abbildung 4-26). Sollte es durch die Akkumulation eines im Rohglycerin enthaltenen Schadstoffes zu einer Änderung der Proteinzusammensetzung kommen, dann sollte es bei dieser Menge an zudosiertem Rohglycerin bereits detektiert werden können, da im Schüttelkolben bei einer Konzentration von 2,5% Rohglycerin im Medium schon ein deutlicher Unterschied im Wachstumsverhalten gegenüber reinem Glycerin erkannt worden war (Abbildung 4-4). Im Schüttelkolbenversuch betrug die Wachstumsrate bei dieser Konzentration an Rohglycerin $\mu=0,23\pm 0,02 \text{ h}^{-1}$, während bei der gleichen Menge an reinem Glycerin eine Wachstumsrate von $\mu=0,27\pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ erreicht wurde. In Bezug auf mögliche abweichende Spots mit Rohglycerin als C-Quelle konnten allerdings keine nennenswerten

Unterschiede in der Proteinzusammensetzung der beiden Ansätze festgestellt werden (Abbildung 4-13). Für die Detektion einzelner Proteinspots wurden die vorliegenden 2D-SDS-Gele mit Gelen aus früheren Veröffentlichungen verglichen. Für die Recherche wurde die Internetdatenbank EcoProDB verwendet (<http://eecoli.kaist.ac.kr/main.html>). Deutlich zu erkennen sind die Plasmid-codierten Proteine AroF, AroB, AroL und PheA. Mögliche Spots für PykA, PykF, GlpK und GlpD wurden ebenfalls markiert (Abbildung 4-13). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde davon ausgegangen, dass bei Verwendung von Rohglycerin als C-Quelle nicht mögliche Verunreinigungen im Substrat, sondern vorrangig der Glycerinstoffwechsel limitierend ist. Im Folgenden wurden deshalb Möglichkeiten untersucht, durch metabolic engineering eine bessere Glycerinverwertung zu erreichen.

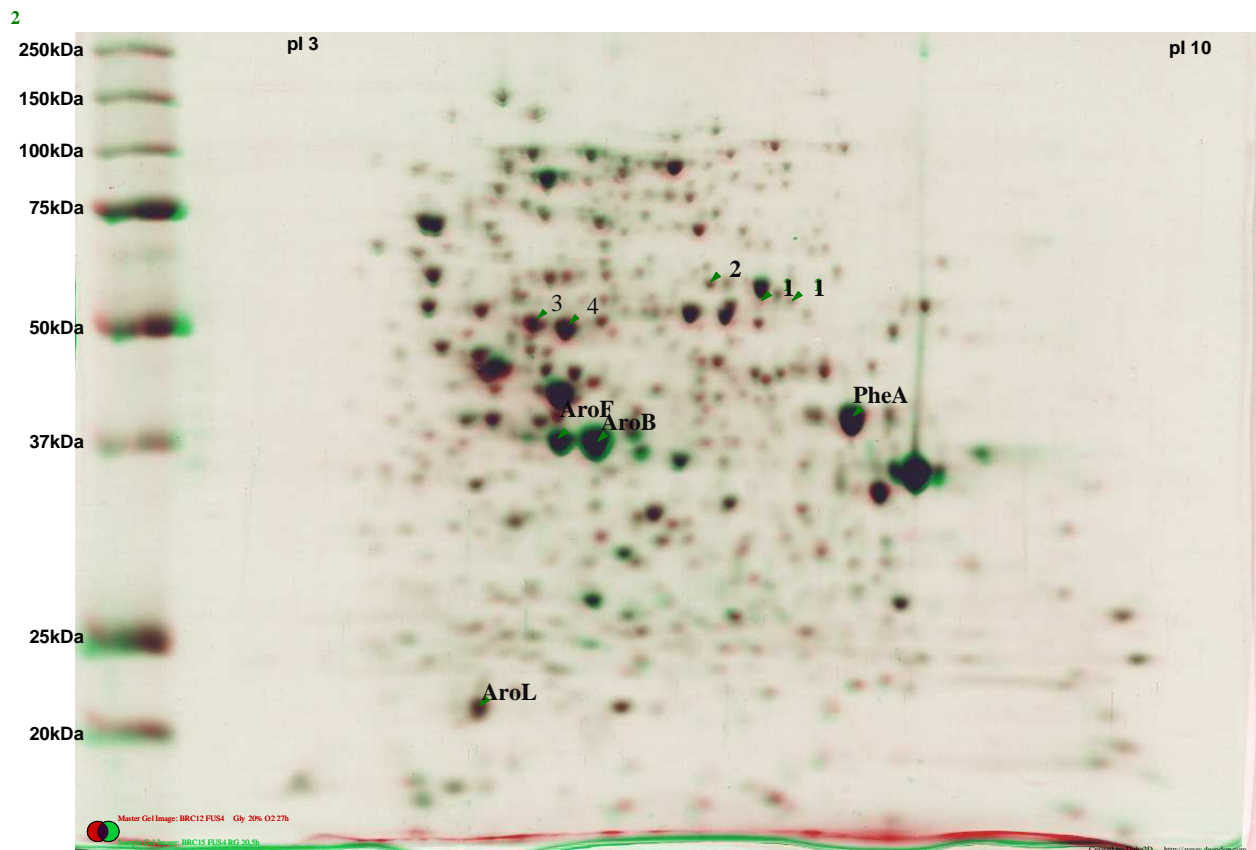


Abbildung 4-13 Vergleich der 2D-SDS-Gelelektrophorese von FUS4/pF81 (20% O₂, Glycerin, 27h, rot) und FUS4/pF81 (20% O₂, Rohglycerin 20,5h, grün).

Für die Auswertung verwendet wurde die Software Delta2D Version 3.2 (Decodon GmbH). Deutlich zu erkennen sind die Plasmid-codierten Proteine AroF, AroB, AroL und PheA. Die Identifikation der Spots erfolgte mittels pI- und Größenvergleich der einzelnen Spots mit Daten der EcoProDB-Datenbank (<http://eecoli.kaist.ac.kr/main.html>). Mögliche Spots für PykA (1) und PykF (2), konnten mittels Vergleich mit Gelen von entsprechenden Deletionsmutanten identifiziert werden (PykF durch Vergleich mit einem 2D-Gel von FUS4.3/pF81, PykA durch Vergleich mit einem 2D-Gel von FUS4.4/pF81, siehe Anhang Abbildung 6-15 und Abbildung 6-16). Die möglichen Spots für GlpK (3) und GlpD (4) wurden ebenfalls durch pI- und Größenvergleich mit Daten der EcoProDB-Datenbank ermittelt.

4.2 Konstruktion und Überprüfung des Stammes *E. coli* FUS4.2 (FUS4 $\Delta mal::P_{tac}::glpK-cat$)

Es war beschrieben worden, dass die Aktivität von GlpK der limitierende Schritt in der Glycerinverwertung ist (Zwaig *et al.*, 1970). Aufgrund dieses Befundes sollte zunächst eine zusätzliche Genkopie von *glpK* ins Chromosom integriert werden. Ziel war es, die Gesamtmenge an produziertem GlpK zu erhöhen und so eine schnellere Phosphorylierung des Glycerins zu gewährleisten. Dafür musste zuerst die Klonierung von *glpK* auf ein Plasmid erfolgen. Die Nucleotidsequenz des Gens *glpK* aus *E. coli* LJ110 wurde mittels PCR amplifiziert und in pJF119EH kloniert. Durch Sequenzierung wurde die korrekte Nucleotidabfolge bestätigt. Für die Expressionsanalyse wurde *E. coli* DH5 α mit dem resultierenden Plasmid, pKUS3, transformiert. Die Kultivierung der transformierten Stämme wurde wie in Kapitel 3.3 beschrieben durchgeführt. Die aus der Nucleotidsequenz berechnete Proteingröße beträgt 56kDa. Experimentell war jedoch eine Größe von 50kDa bestimmt worden (Phillips *et al.*, 1980; Yoon *et al.*, 2003). Nach SDS-Gelelektrophorese des Rohextrakts zeigte sich, dass eine deutliche Überproduktion eines Proteins auf der erwarteten Höhe von 50kDa erreicht wurde und das Enzym löslich vorlag (Abbildung 4-14).

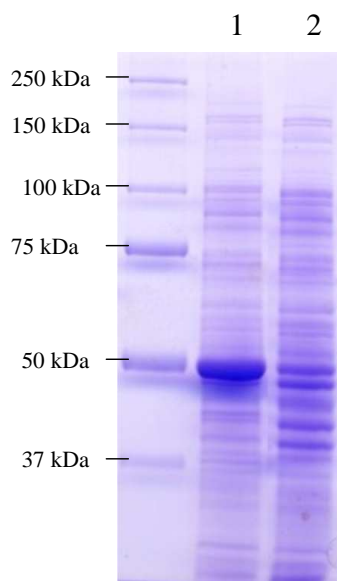


Abbildung 4-14 SDS-Gelelektrophorese des Rohextrakts von DH5 α pKUS3 (1) und DH5 α pJF119EH (Kontrollvektor) (2).

In (1) ist ein überproduziertes Protein mit einer Größe von 50kDa zu sehen, was der erwarteten Größe von GlpK entspricht. Der Anteil von GlpK am Gesamtprotein beträgt etwa 40%.

Für die Messung der Enzymaktivität wurde der Rohextrakt verwendet (Abbildung 4-14). Bestimmt wurde die Aktivität über einen gekoppelten Test (Abbildung 3-2). Dabei wurde zunächst Glycerin durch die Glycerinkinase ATP-abhängig phosphoryliert. Das dabei entstandene ADP wurde von der Pyruvatkinase für die Dephosphorylierung von PEP zu Pyruvat verwendet. Im letzten Schritt erfolgte die NADH+H⁺-abhängige Reduktion von Pyruvat zu Lactat, welche photometrisch bei 340nm gemessen wurde. Als Kontrolle wurde

die Reaktion mit dem Rohextrakt von DH5 α pJF119EH durchgeführt. Hier wurde ebenfalls eine Extinktionsabnahme beobachtet, was vermutlich auf unspezifische Reaktionen mit noch im Rohextrakt enthaltenen Enzymen der Atmungskette zurückzuführen ist. Die Extinktionsabnahme im Rohextrakt der Negativkontrolle wurde von der Extinktionsabnahme im Rohextrakt von DH5 α pKUS3 subtrahiert. Nach Abzug des Wertes aus der Negativkontrolle wurde im Rohextrakt von DH5 α pKUS3 eine spezifische Aktivität von $17,7 \pm 1,2$ U/mg Gesamtprotein ermittelt. In früheren Arbeiten war für aufgereinigtes GlpK $V_{\max} = 15,3 \pm 0,3$ U/mg gemessen worden (Pettigrew *et al.*, 1990). Die höhere Aktivität im Rohextrakt könnte auf veränderte Reaktionsbedingungen zurückzuführen sein. Das Prinzip des Tests ist zwar in beiden Fällen gleich, aber der hier verwendete, fertig zubereitete Puffer der Firma r-biopharm wurde möglicherweise weiter an die Bedürfnisse der Glycerinkinase angepasst, so dass hier schon im Rohextrakt sehr hohe Aktivitäten gemessen werden konnten. Die Inhibition durch Fru-1,6-BP wurde ebenfalls getestet. Der Wert für die Aktivität im Rohextrakt von DH5 α pKUS3 wurde ebenfalls durch Subtraktion des Wertes aus der Negativkontrolle berechnet. Es zeigte sich, dass durch Zugabe von Fru-1,6-BP bereits bei einer Konzentration von unter 1mM eine starke Inhibition der Glycerinkinase auftritt (Abbildung 4-15). Für Fru-1,6-BP war ein K_i -Wert von 2mM bestimmt worden (Liu *et al.*, 1994). Diese Ergebnisse belegen die starke Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Fru-1,6-BP-Konzentration.

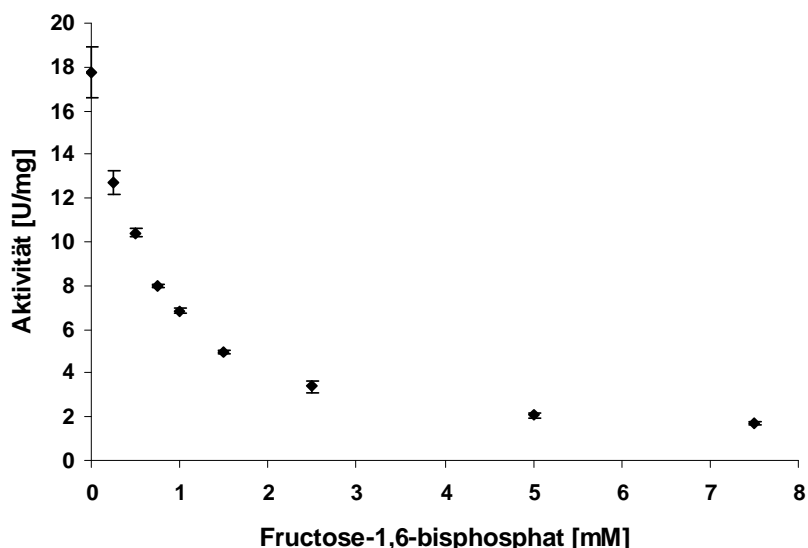


Abbildung 4-15: Aktivität der Glycerinkinase im Rohextrakt von DH5 α pKUS3 in Abhängigkeit der Konzentration an Fru-1,6-BP im Testansatz.

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte über einen mit Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase gekoppelten Test (Abbildung 3-2). Die halbmaximale Hemmung ist hier bei $0,65 \pm 0,02$ mM Fru-1,6-bp erreicht. Durchgeführt wurde der Test zwei Mal.

Die Integration von *glpK* erfolgte ins *mal*-Operon. Als Markergen wurde die Chloramphenicol-Resistenzkassette gewählt (Abbildung 3-3). Nach erfolgreicher Integration des Gens ins *mal*-Operon von BW25113 wurde die chromosomale Veränderung mittels P1-Transduktion in die Stämme GSL705 ($\Delta gldA \Delta glpK$) (Sprenger *et al.*, 1989) und FUS4 übertragen. Der Stamm GSL705 kann kein Glycerin mehr verwerten und diente als Kontrolle. Abbildung 4-16 stellt GSL705 und GSL705 $\Delta mal P_{tac}::glpK-cat$ auf MacConkey-Agarplatte + 1% Glycerin + 0,5mM IPTG (A) dar. Die rote Färbung bei GSL705 $\Delta mal P_{tac}::glpK-cat$ zeigt, dass dieser Stamm wieder in der Lage ist Glycerin umzusetzen. Den Nachweis für die Glycerindissimilation liefert hier die Rotfärbung auf der Platte, welche nach der Ausscheidung von organischen Säuren durch den pH-Indikator Neutralrot ausgelöst wird. Dies zeigt, dass durch das integrierte *glpK-cat*-Konstrukt eine aktive Glycerinkinase gebildet werden kann. Die Rotfärbung des unveränderten Stammes GSL705 und das Ausbleiben der Verfärbung bei GSL705 $\Delta mal P_{tac}::glpK-cat$ auf MacConkey-Agarplatte + 1% Maltose (B) zeigen, dass die Integration am gewählten Ort statt fand.

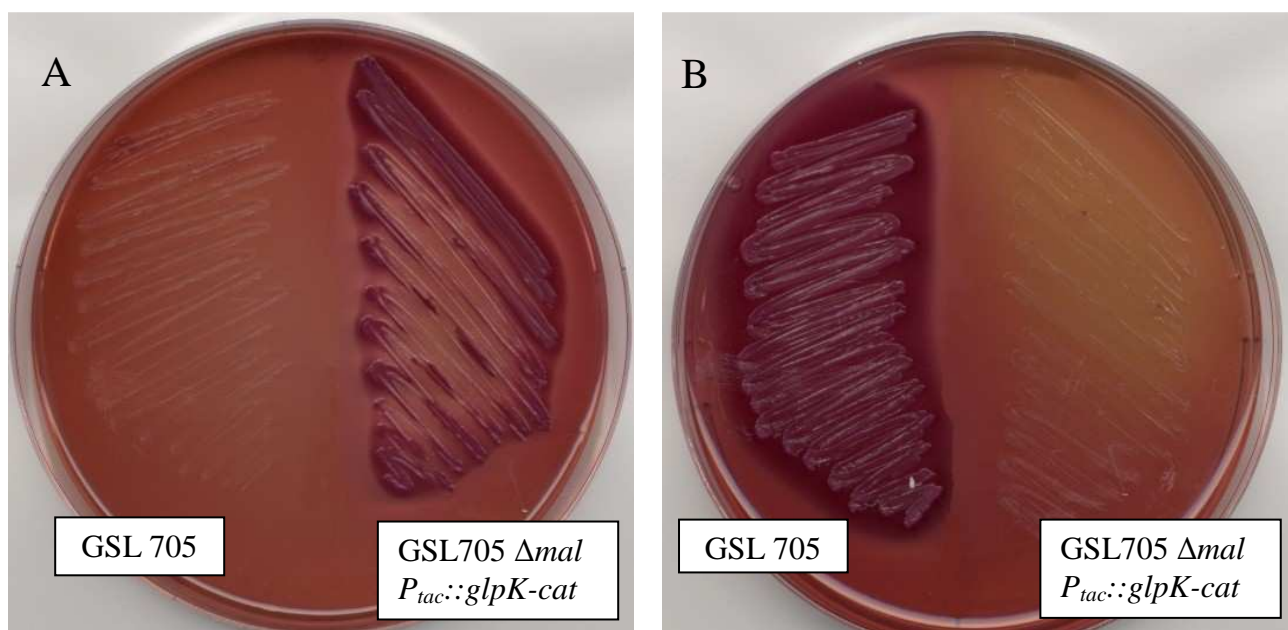


Abbildung 4-16 Ausstrich von GSL705 und GSL705 $\Delta mal P_{tac}::glpK-cat$ auf MacConkey-Agarplatten mit 1% Glycerin + 0,5mM IPTG (A) und 1% Maltose (B). Die Rotfärbung zeigt die Ausscheidung organischer Säuren von GSL705 $\Delta mal P_{tac}::glpK-cat$ bei Vorhandensein von Glycerin im Wachstumsmedium. In Gegenwart von Maltose im Medium werden von GSL705 $\Delta mal P_{tac}::glpK-cat$ keine organischen Säuren ausgeschieden.

4.3 Kultivierung von *E. coli* FUS4/pF81 und *E. coli* FUS4.2/pF81 im Schüttelkolben

Nachdem im Stamm FUS4 erfolgreich eine zusätzliche Genkopie von *glpK* ins *mal*-Operon integriert worden war, wurden zunächst Versuche im Schüttelkolben durchgeführt, um Aufschluss über veränderte Eigenschaften des neuen Stammes FUS4.2 gegenüber dem unveränderten Stamm FUS4 geben. Beide Stämme wurden dafür parallel wie in 3.3 beschrieben behandelt. Die Hauptkultur wurde jeweils auf $OD_{600} = 0,1$ angeimpft. Untersucht wurden die Kulturen dann auf Wachstum und Produktion von L-Phenylalanin. Die Ergebnisse im Schüttelkolben zeigten dabei keine Unterschiede zwischen FUS4/pF81 und FUS4.2/pF81. Beispielhaft dargestellt sind die Wachstumskurven von FUS4/pF81 und FUS4.2/pF81 in Minimalmedium + 0,5% Rohglycerin (Abbildung 4-17). Bei diesem Experiment wurde für beide Stämme eine Wachstumsrate von $0,26 \text{ h}^{-1}$ gemessen. Die gebildete Menge an L-Phenylalanin erreichte in beiden Ansätzen eine Konzentration von $0,28 \text{ g/l}$. Dies bedeutet, dass die Integration einer zusätzlichen Genkopie von *glpK* entweder keine Verbesserung für Zellwachstum oder L-Phenylalaninbildung bringt, oder ein anderer Faktor limitierend wirkt. Da in vorhergehenden Experimenten bereits mit dem unveränderten Stamm FUS4/pF81 gezeigt worden war, dass bei höheren Zelldichten vermutlich die Sauerstoffversorgung einen limitierenden Faktor darstellt (Kapitel 4.1.4), wäre es möglich, dass auch bei diesen Versuchen eine Limitierung durch Sauerstoff besteht. Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, wurde deshalb in weiteren Experimenten zunächst der Stamm FUS4/pF81 im Fermenter mit kontrollierter Luftzufuhr kultiviert und untersucht.

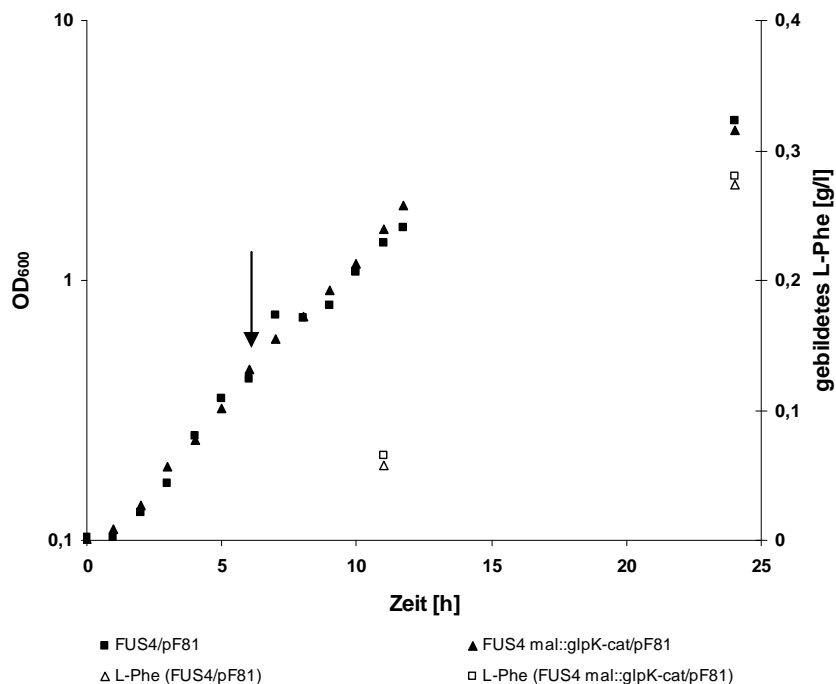


Abbildung 4-17 Kultivierung von FUS4/pF81 und FUS4.2/pF81 in Schüttelkolben mit Minimalmedium (Gerhardt *et al.*, 1984) + 0,5% Rohglycerin und zusätzlichem L-Tyrosin und L-Phenylalanin.

Beide Stämme erreichten eine Wachstumsrate von $0,26 \text{ h}^{-1}$ und produzierten $0,28 \text{ g/l}$ Phenylalanin. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Induktion mit $0,3 \text{ mM}$ IPTG. Durchgeführt wurde der Versuch vier Mal wie in Abbildung 4-1 beschrieben.

4.4 Kultivierung von *E. coli* FUS4/pF81 im Fermenter

Für die Kultivierung der verschiedenen FUS4/pF81-Stämme wurde zunächst überprüft, welche Konzentration an IPTG für die Induktion optimal ist. Dazu wurde FUS4/pF81 in Minimalmedium + Glucose kultiviert. Bei $\text{OD}_{600}=2,5$ wurde zum ersten Mal mit $0,1 \text{ mM}$ IPTG induziert. Bei Stillstand der L-Phenylalaninbildung wurde mit weiteren $0,1 \text{ mM}$ IPTG induziert. So konnte gezeigt werden, dass bis zu einer Erhöhung der Konzentration auf $0,3 \text{ mM}$ eine Steigerung der Produktbildung erreicht wurde (Abbildung 4-18). Im Zeitraum 10-15 Stunden fand bei dieser Fermentation kein Zellwachstum statt, was auf eine Tyrosinlimitierung zurückzuführen war. Um eine einheitliche IPTG-Zugabe bei den einzelnen Versuchen zu erhalten, wurde bei allen folgenden Fermentationen auf zwei Zeitpunkte verteilt insgesamt $0,3 \text{ mM}$ IPTG zugegeben. Bei Erreichen von $\text{OD}_{600}=2,5$ wurde dabei $0,1 \text{ mM}$ IPTG zugegeben und die Konzentration nach Erreichen von $\text{OD}_{600}=10$ auf $0,3 \text{ mM}$ erhöht. Auf zwei Zeitpunkte wurde die IPTG-Zugabe verteilt, da mittels 2D-SDS-PAGE mit dem Stamm FUS4.11/pF81 gezeigt werden konnte, dass so der Anteil der Plasmid-codierten Proteine im Verlauf der Fermentation konstant bleibt (Abbildung 4-19). Dies ist möglicherweise darauf

zurückzuführen, dass IPTG im Laufe der Fermentation abgebaut werden kann (siehe Diskussion).

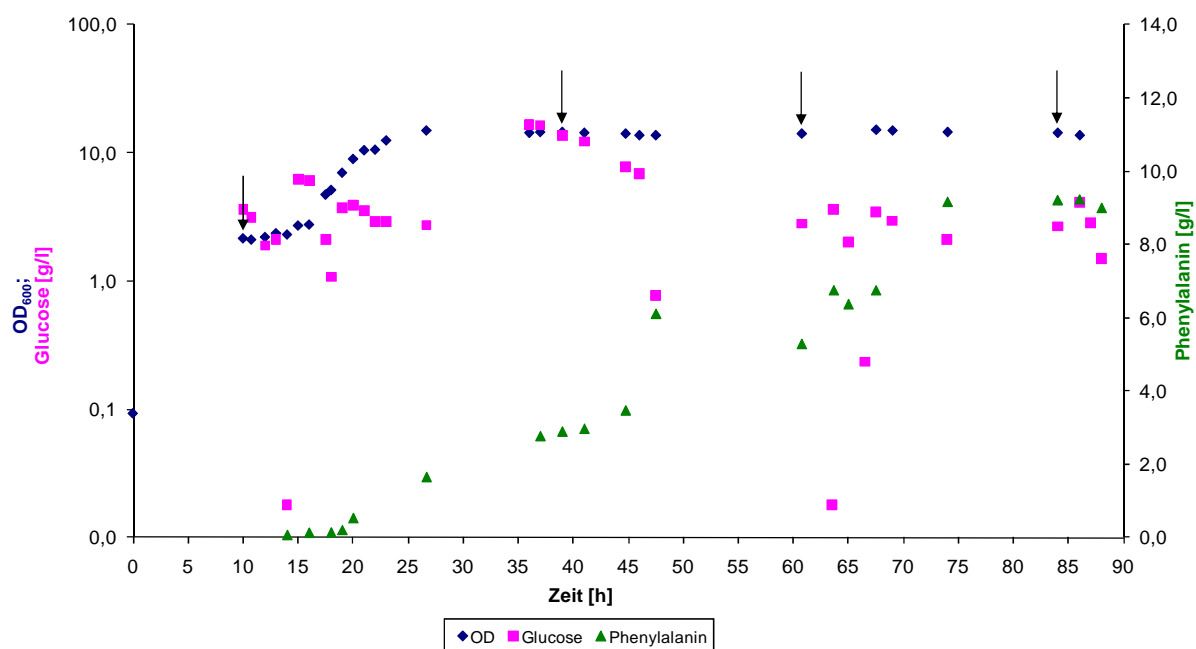


Abbildung 4-18 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4/pF81 in Minimalmedium + Glucose.

Die Pfeile markieren die Zeitpunkte der IPTG-Zugaben. Insgesamt verbraucht wurden 110g Glucose. Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin im Überstand betrug 9,2g/l.

Die hier gewählte Konzentration an C-Quelle im Medium (C-Quelle konstant bei 3-7g/l) ist nicht optimal für die Produktbildung, da es bei einem ständigen Angebot an ausreichend C-Quelle leicht zu einem Überflussmetabolismus kommen kann, was zur Bildung ungewünschter Nebenprodukte wie Milchsäure und Essigsäure führt (Wolfe, 2005). Die Konzentration an verfügbarer C-Quelle wurde aber so gewählt, da es bei diesen Versuchen auch darum ging, zu zeigen welche Nebenprodukte in welcher Menge gebildet werden, um so Hinweise zu bekommen, wie der Stamm genetisch weiter verbessert werden kann. Durchgeführt wurden die einzelnen Fermentationen mindestens solange, bis der Zeitpunkt der maximalen g/g-Ausbeute überschritten war. In den meisten Fällen war dieser Zeitpunkt nach etwa 60-64h erreicht. Abbildung 4-20 zeigt beispielhaft den Verlauf der g/g-Ausbeute während der Fermentation mit FUS4/pF81 (20% O₂, Glycerin). Der Verlauf der zugehörigen Fermentation ist in Abbildung 4-23 dargestellt. Es wird dabei ersichtlich, dass die g/g-Ausbeute bis zum Erreichen der stationären Phase zunimmt, dann über mehrere Stunden nur noch geringfügig steigt, bis ein Maximum erreicht wird und anschließend wieder sinkt. Da der Verlauf der g/g-Ausbeute für jede Fermentation ähnlich war, wurde in den folgenden

Beschreibungen der einzelnen Versuche auf die Darstellung der Balkendiagramme verzichtet und nur der Zeitpunkt der höchsten g/g-Ausbeute im Diagramm mit einem Stern markiert.

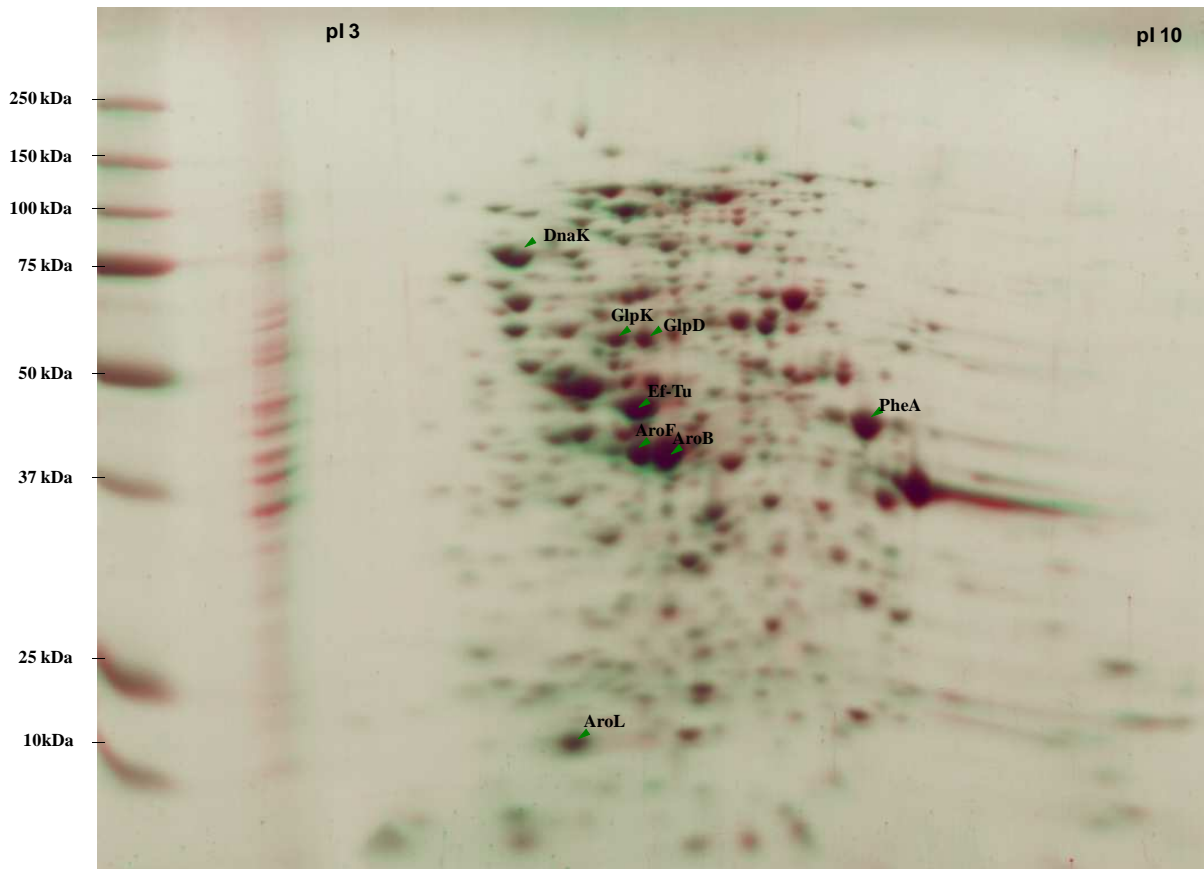


Abbildung 4-19 Vergleich der 2D-SDS-Gelelektrophorese von FUS4.11/pF81 nach der ersten (60% O₂, Glycerin/Lactat, 22h, rot) und der zweiten Induktion (60% O₂, Glycerin/Lactat 42h, grün).

Für die Auswertung verwendet wurde die Software Delta2D Version 3.2 (Decodon GmbH). Die Identifikation der Spots erfolgte mittels Vergleich der Gele mit Daten der EcoProDB-Datenbank (<http://ecoli.kaist.ac.kr/main.html>) wie in Abbildung 4-13 beschrieben.

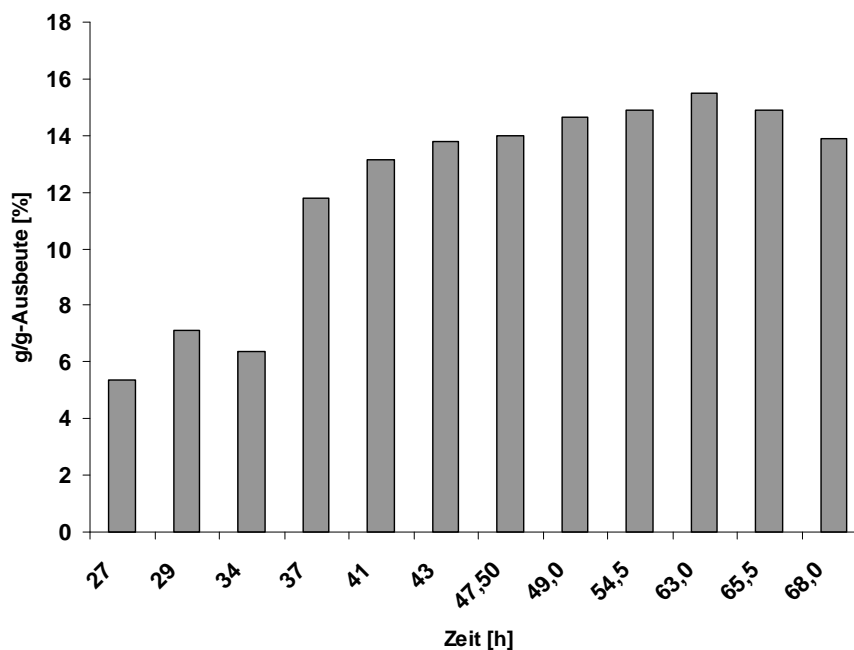


Abbildung 4-20 Typischer Verlauf der g/g-Ausbeute während einer Fermentation mit FUS4/pF81.

Dargestellt ist beispielhaft die g/g-Ausbeute (g Phe/ g Gly) zu verschiedenen Zeitpunkten der Fermentation von FUS4/pF81 (20% O₂, Glycerin) (Abbildung 4-23).

4.5 Kultivierung von *E. coli* FUS4/pF81 auf Glycerin bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen im Medium

Um den Einfluss der Sauerstoffsättigung im Medium zu überprüfen, wurden Fermentationen mit unterschiedlichen Sauerstoffgehalten durchgeführt und anschließend verglichen. Die Berechnung der Wachstumsrate erfolgte immer für den Zeitraum bis zur Induktion. Für die Auswertung der Ausbeute wurde immer der Zeitpunkt der höchsten g/g-Ausbeute gewählt. Es wurde dabei ersichtlich, dass der Grad der Sauerstoffsättigung im Medium eine nicht unbeträchtliche Auswirkung auf die Ergebnisse hatte (Tabelle 4-1). Die Wachstumsrate blieb zwar konstant. Unterschiede wurden jedoch in der Produktion von L-Phenylalanin gemessen. Mit abnehmender Sauerstoffsättigung nahm die Produktivität der Zellen zu. Während bei 60% O₂-Sättigung nur $1,05 \pm 0,03$ g L-Phe/g (dw) gebildet wurden, wurden mit 30% O₂-Sättigung $1,42$ g L-Phe/g (dw) und mit 20% O₂-Sättigung $1,35 \pm 0,12$ g L-Phe/g (dw) erreicht. Auch die C/C-Ausbeute lag bei geringen Sauerstoffkonzentrationen mit $26,3 \pm 0,3\%$ deutlich über der mit hohen Konzentrationen an Sauerstoff erreichbaren C-Ausbeute von $18,1 \pm 2,3\%$, ebenso wie die Raum-Zeit-Ausbeute, die von $0,21 \pm 0,02$ g/l/h auf $0,26 \pm 0,01$ g/l/h stieg. Anders als im Schüttelkolben konnte hier zu keinem Zeitpunkt Chorismat nachgewiesen werden. Da die Werte der Fermentation mit 30% O₂-Sättigung im Bereich zwischen den Fermentationen mit

60% O₂-Sättigung und 20% O₂-Sättigung lag, wurde hierfür keine Wiederholung durchgeführt.

Tabelle 4-1 Überblick über die Fermentationen von FUS4/pF81 bei unterschiedlichen O₂-Sättigungen

Stamm	FUS4/ pF81	FUS4/ pF81	FUS4/ pF81
Sauerstoffsättigung [%]	60	30	20
C-Quelle	Glycerin	Glycerin	Glycerin
Wachstumsrate [h ⁻¹]	0,27±0,01	0,25	0,26±0,01
End-OD ₆₀₀ (Tyrosin-limitiert)	17,6±0,17	18,2	16,0±0,25
Verbrauchte C-Quelle [g]	124,7±10,8	103,7	99,4±4,3
Phe im Überstand [g/l]	7,9±0,2	11,4	9,4±0,7
max. g/g-Ausbeute [%]	10,7±1,7	14,2	15,7±0,2
max. C/C-Ausbeute [%]	18,1±2,3	23,7	26,3±0,3
Phe-Produktion [g/g(dw)]	1,05±0,03	1,42	1,35±0,12
Raum-Zeit-Ausbeute [g/l/h]	0,21±0,02	0,26	0,26±0,01

Der Versuchsverlauf ist in Abbildung 4-21 -Abbildung 4-23 und Abbildung 6-1 - Abbildung 6-2 dargestellt. Die Angaben zu verbrauchter C-Quelle, gebildetem L-Phenylalanin, der g/g- und C-Ausbeute beziehen sich auf den Zeitpunkt, an dem die maximale C-Ausbeute erreicht war. Dieser Zeitpunkt ist in den Schaubildern jeweils mit einem Stern markiert (vgl. dazu auch Kapitel 4.4). Die gebildete Menge an Phenylalanin bezieht sich auf den Zeitpunkt, ab dem keine weitere Produktzunahme feststellbar war. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

Der Verlauf der Fermentationen ist in Abbildung 4-21 bis Abbildung 4-23 zu sehen. Da es bei einer Versuchslaufzeit von über 60h nicht möglich war, bei beiden Versuchen immer zu gleichen Zeitpunkten Proben zu nehmen, wurde auf die Angabe der Fehlerbalken für die einzelnen Messpunkte verzichtet und nur die ausgewerteten Parameter, wie z. B. Wachstumsrate und Ausbeute, gemittelt. Die Abbildungen, in denen der Verlauf der Wiederholungen dargestellt ist, befinden sich im Anhang (Abbildung 6-1 und Abbildung 6-2).

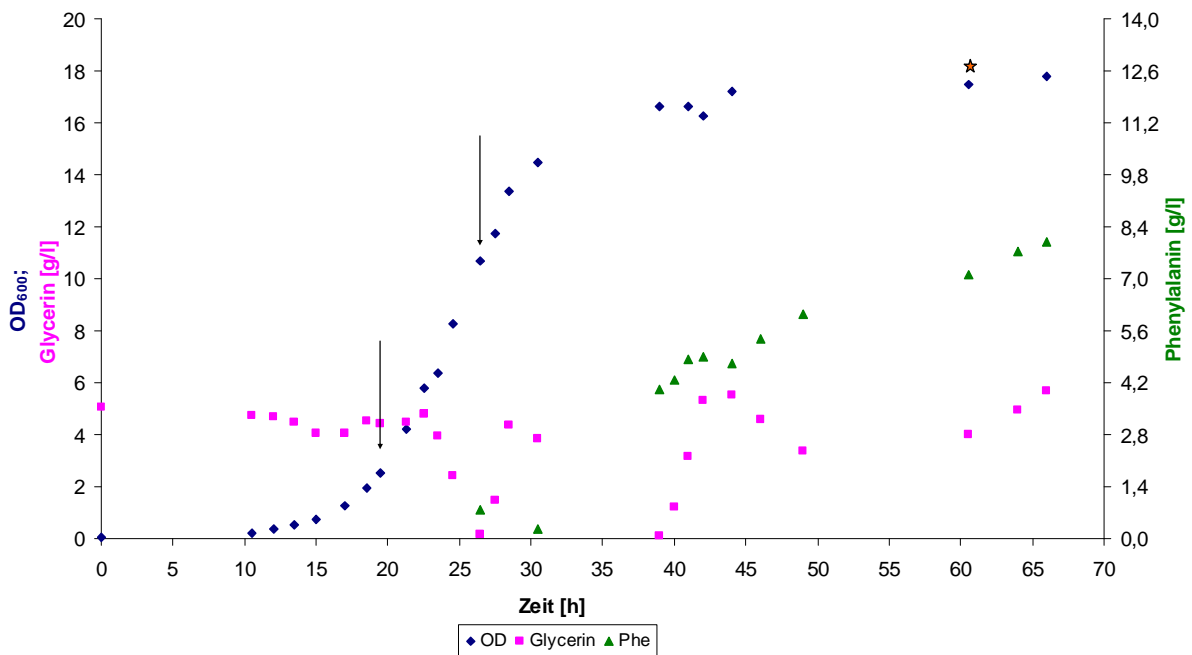


Abbildung 4-21 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4/pF81 mit 60% Sauerstoffsättigung und Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%).

Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin war 8,2g/l. Insgesamt wurden 142g Glycerin verbraucht. Die Wachstumsrate betrug $0,27 \text{ h}^{-1}$. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl auch Kapitel 4.4). Der Stern markiert den Zeitpunkt der höchsten C-Ausbeute. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

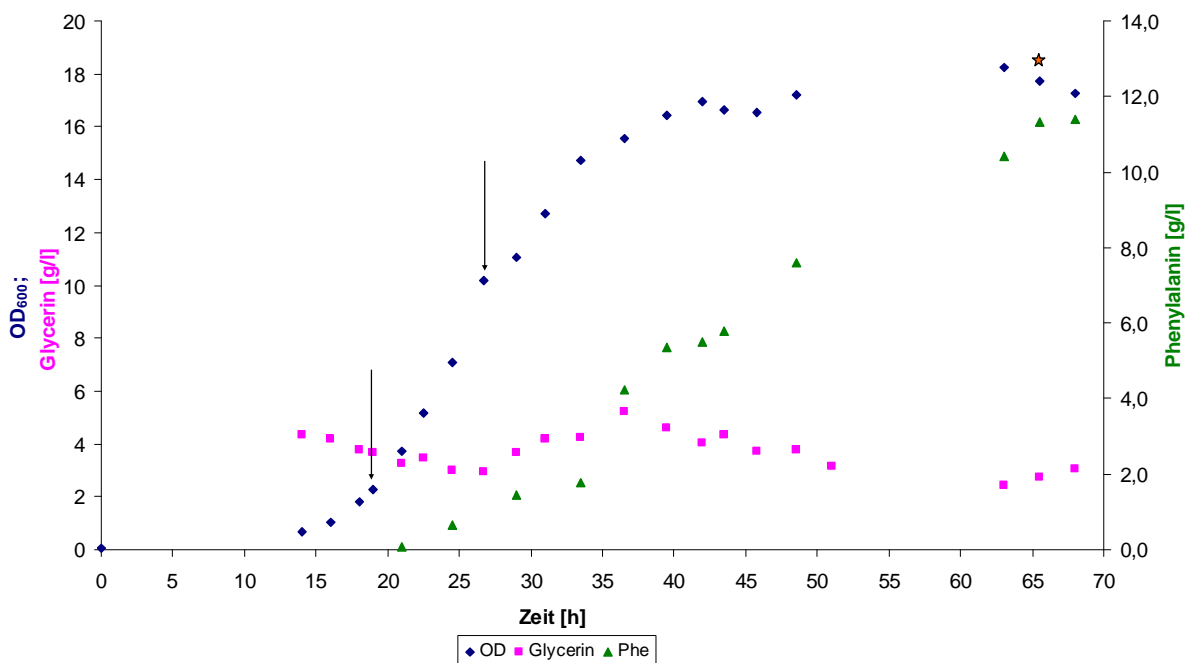


Abbildung 4-22: Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4/pF81 mit 30% O_2 -Sättigung und Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%).

Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin war 11,4g/l. Insgesamt wurden 137g Glycerin verbraucht. Die Wachstumsrate betrug $0,25 \text{ h}^{-1}$. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl auch Kapitel 4.4). Der Stern markiert den Zeitpunkt der höchsten C-Ausbeute. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

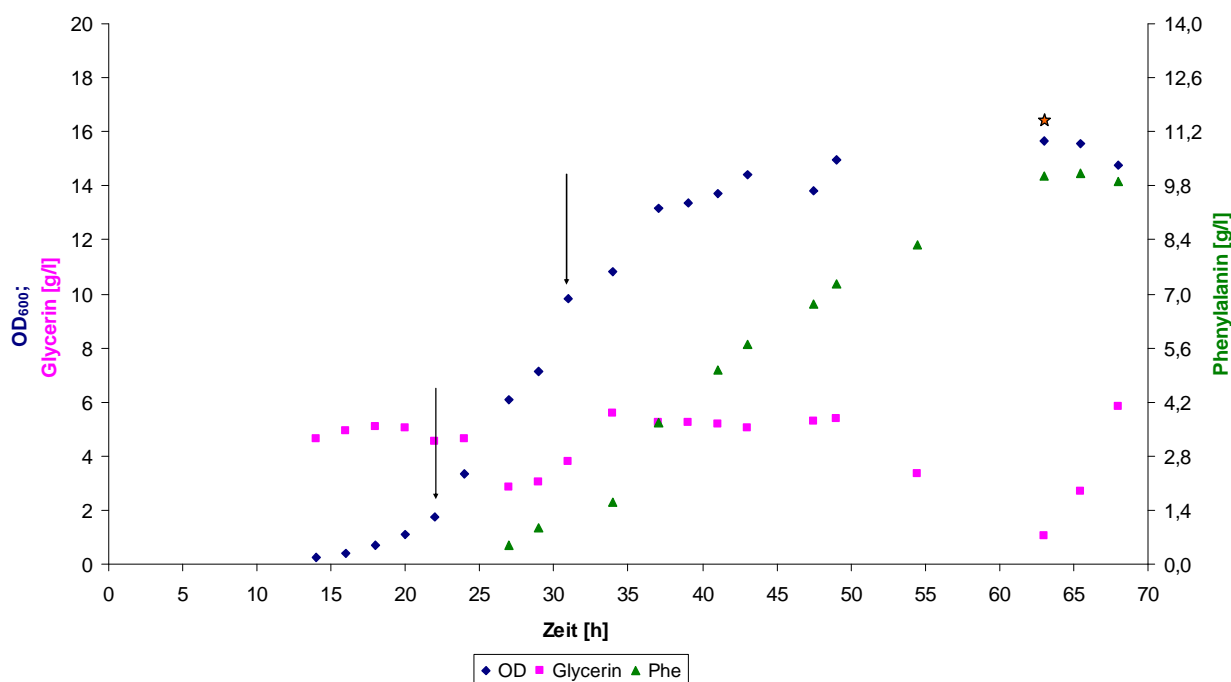


Abbildung 4-23 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4/pF81 mit 20% O₂-Sättigung und Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%).

Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin war 10,1g/l. Insgesamt wurden 114g Glycerin verbraucht. Die Wachstumsrate betrug 0,25 h⁻¹. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl auch Kapitel 4.4). Der Stern markiert den Zeitpunkt der höchsten C-Ausbeute. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

Die Analyse der Nebenprodukte zeigte, dass mit zunehmender Sauerstoffsättigung schon zu einem frühen Zeitpunkt mehr Nebenprodukte gebildet wurden. Ein deutlicher Anstieg der Konzentration organischer Säuren erfolgte bei 60% O₂-Sättigung schon nach 28 Stunden. Die Nebenproduktbildung begann dabei mit der Produktion von Milchsäure. Etwa 14 Stunden später begann dann die Akkumulation von Essigsäure. Die erreichten Konzentrationen betragen 41mM Lactat und 15mM Acetat (Abbildung 4-24). Bei 30% O₂-Sättigung begann die Konzentration an Lactat erst nach 51 Stunden zu steigen. Interessant ist auch, dass hier nur die Menge an Lactat zunahm und eine Konzentration von 27mM erreichte, während Acetat mit maximal 2,6mM konstant niedrig blieb (Abbildung 4-25). Bei 20% O₂-Sättigung konnten im ersten Versuch zu keinem Zeitpunkt Nebenprodukte detektiert werden. Im zweiten Versuch wurden bis zu 60mM Lactat gebildet. Dies ist aber möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Pumpfrequenz für die feed-Pumpe bei diesem Versuch zu hoch eingestellt worden war und zum Zeitpunkt 39 Stunden mit beinahe 12g/l zuviel Glycerin im Medium war und dadurch offenbar die Lactatbildung ausgelöst wurde. Da das gebildete Lactat gegen Ende des Versuchs wieder abnahm und nicht wie bei Fermentationen mit hohen Sauerstoffkonzentrationen auf einem hohen Level stagnierte und auch die Ausbeuten ähnliche

Werte erreichten wie beim ersten Versuch (Tabelle 4-1), wurde dieses Experiment trotz der abweichenden Nebenproduktbildung kein drittes Mal durchgeführt.

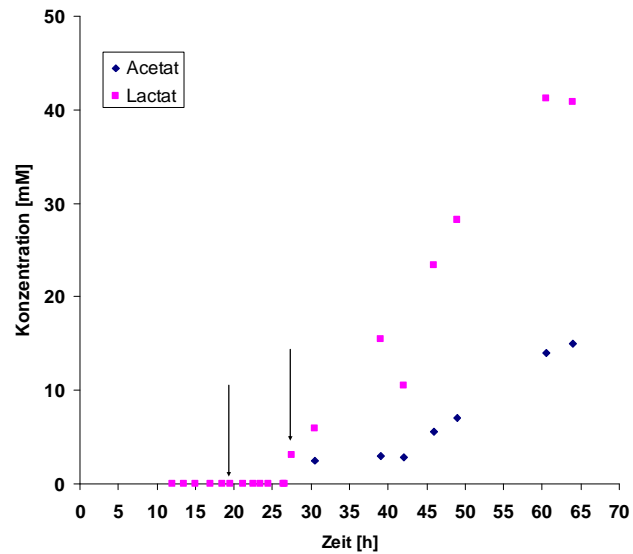


Abbildung 4-24 Nebenproduktbildung während der Fermentation von FUS4/pF81 in Minimalmedium + Glycerin und einer Sauerstoffsättigung von 60% (Abbildung 4-21).

Die Pfeile markieren die Zeitpunkte an denen Induktion mit IPTG erfolgte. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

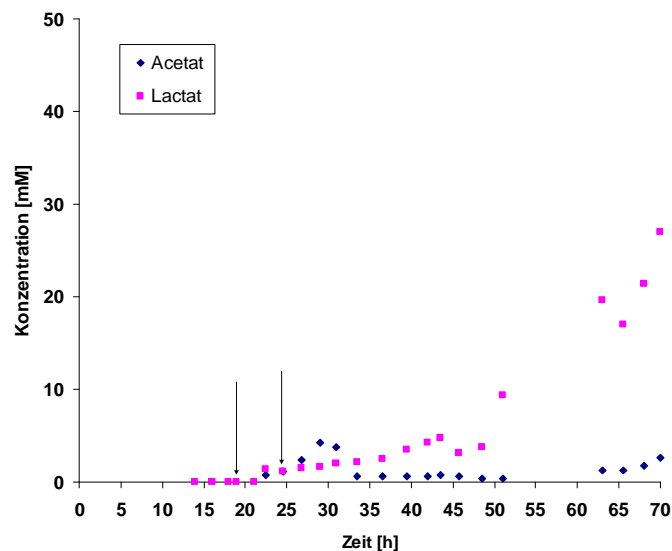


Abbildung 4-25 Nebenproduktbildung während der Fermentation von FUS4/pF81 in Minimalmedium + Glycerin und einer Sauerstoffsättigung von 30% (Abbildung 4-22).

Die Pfeile markieren die Zeitpunkte an denen Induktion mit IPTG erfolgte. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

Diese Ergebnisse zeigen, dass zunächst wahrscheinlich nicht die Aktivität der Glycerinkinase den limitierenden Schritt darstellt. Allein durch Erhöhen der Sauerstoffkonzentration im Medium konnte der Glycerinumsatz gesteigert werden (Tabelle 4-1). Allerdings floss die höhere Menge an aufgenommenem Glycerin nicht in die L-Phenylalaninproduktion, sondern es wurde vermehrt Lactat und Acetat gebildet. Diese Ergebnisse führten zu der Arbeitshypothese, dass der TCA-Zyklus mit mehr Sauerstoff schneller abläuft und nur eine unzureichende Menge an Kohlenstoff in Richtung E4P fließt.

4.6 Fermentation des Stammes *E. coli* FUS4/pF81 mit Glucose oder Rohglycerin als C-Quelle

Ziel dieses Projektes war es, L-Phenylalanin ausgehend von der C-Quelle Rohglycerin zu produzieren. Im Schüttelkolben war gezeigt worden, dass bei hohen Konzentrationen an Rohglycerin das Wachstum, aber nicht die Produktivität des Stammes FUS4/pF81 gehemmt wird (Kapitel 4.1.4). Im Fermenter sollte nun überprüft werden, ob es während der Kultivierung im Bioreaktor zu Unregelmäßigkeiten bezüglich des Wachstums oder der Produktivität kommt. Des Weiteren sollte die Produktivität des Stammes mit Glucose ermittelt werden, da industrielle Vergleichsprozesse mit dieser C-Quelle durchgeführt werden (siehe Einleitung und Diskussion). Der Verlauf der Fermentation von FUS4/pF81 mit Glucose als C-Quelle ist in Abbildung 4-26 dargestellt. Die Sauerstoffsättigung wurde auf 60% eingestellt. Die erreichte Wachstumsrate lag mit $\mu=0,49 \text{ h}^{-1}$ wie erwartet deutlich höher als mit Glycerin oder Rohglycerin als C-Quelle. Die Ausbeuten waren aber deutlich geringer mit Glucose. Es wurde eine Raum-Zeit-Ausbeute von 0,14g/l/h und eine maximale C-Ausbeute von 21,3% erreicht. Ein Vergleich der Ergebnisse ist in Tabelle 4-2 aufgelistet. Chorismat tauchte während dieser Fermentation nicht auf. Da die Nebenproduktbildung mit 10,7mM Lactat und 1mM Acetat recht gering ausfiel (Abbildung 4-29), wurde für diese Fermentation keine Veränderung der Sauerstoffversorgung vorgenommen. Interessant ist hier der Zeitpunkt der einsetzenden Nebenproduktbildung. Während bei Glycerin schon in der späten exponentiellen Phase hohe Mengen an Lactat und auch Acetat gebildet wurden, wurde hier erst etwa 20 Stunden nach Erreichen der stationären Phase ein Ansteigen der Lactatkonzentration festgestellt. Acetat wurde zwar auch gebildet, die Konzentration überstieg aber zu keinem Zeitpunkt 1mM. Im zweiten Versuch (Abbildung 6-3) konnten die Werte des ersten Versuchs für die Raum-Zeit-Ausbeute und die Wachstumsrate mit 0,12g/l/h

und $\mu=0,48 \text{ h}^{-1}$ bestätigt werden, die C-Ausbeute fiel mit 16,7% etwas geringer aus. Es ist jedoch nicht klar, wodurch die Produktbildung im zweiten Versuch gestört wurde. Die Nebenproduktanalyse der zweiten Fermentation wies etwas höhere Mengen an organischen Säuren auf. Es wurden 20mM Lactat und 2,2mM Acetat erreicht. Der Zeitpunkt, ab dem eine kontinuierliche Lactatzunahme zu beobachten war, lag auch hier eher im Bereich der stationären Phase. Diese Ergebnisse zeigen, dass mit Glucose die Verteilung der C-Quelle in der Zelle möglicherweise etwas günstiger abläuft als mit Glycerin, was sich in der später einsetzenden Säurebildung niederschlägt (siehe auch Diskussion).

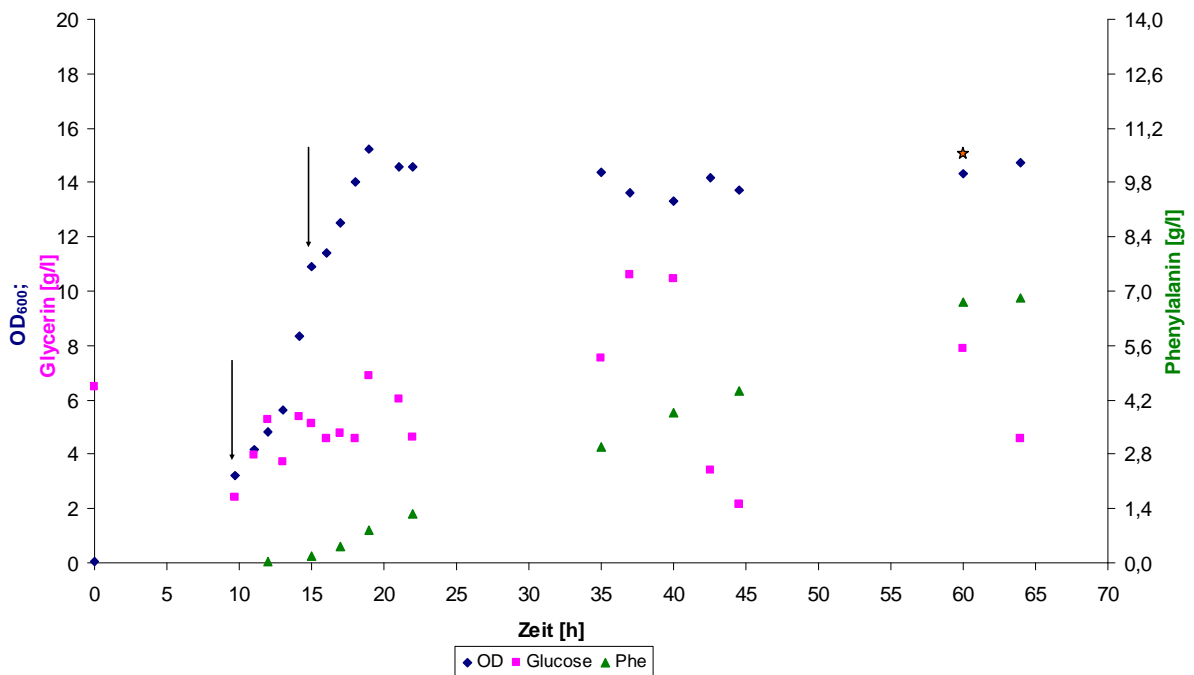
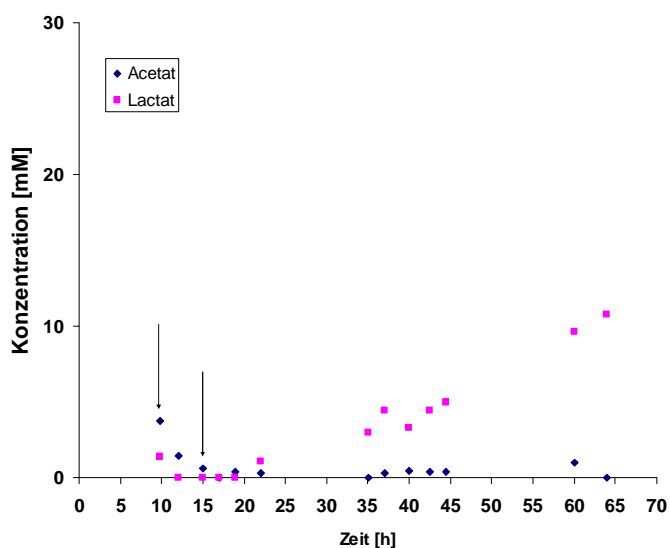


Abbildung 4-26 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4/pF81 in Minimalmedium + Glucose (Startkonzentration 0,5%).

Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin war 6,8g/l. Insgesamt wurden 92,9g Glucose verbraucht. Die Wachstumsrate betrug $0,49 \text{ h}^{-1}$. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl auch Kapitel 4.4). Der Stern markiert den Zeitpunkt, an dem die höchste C-Ausbeute erreicht war. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

**Abbildung 4-27**

Nebenproduktanalyse für die Kultivierung von FUS4/pF81 in Minimalmedium + Glucose (Abbildung 4-26).

Die Pfeile markieren die Zeitpunkte an denen Induktion mit IPTG erfolgte. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

Der Verlauf der Fermentationen mit der C-Quelle Rohglycerin ist in Abbildung 4-28 dargestellt. Ein Vergleich der erhaltenen Werte ist in Tabelle 4-2 dargestellt. Da mit Glycerin als C-Quelle gezeigt worden war, dass die beste Ausbeute mit 20% O₂-Sättigung erhalten werden kann, wurde auch hier diese Einstellung gewählt. Die Wachstumsrate war mit $\mu=0,33 \text{ h}^{-1}$ höher, als bei Verwendung von Glycerin als C-Quelle. Deutlich abweichend war die Produktion von Nebenprodukten. Es konnte eine starke Akkumulation von Lactat und Acetat zum Ende der Fermentation hin gemessen werden. Die Endkonzentrationen betragen 48,2mM Lactat und 18,1mM Acetat. Die C-Ausbeute lag aber trotz höherer Nebenproduktbildung mit 27,7% im Bereich der Fermentation mit Glycerin als C-Quelle (26,3%). Mit Rohglycerin als C-Quelle konnten von 27-44h geringe Mengen an Chorismat gemessen werden. Die Konzentration überstieg dabei aber in keinem Fall 2mM. Dies entspricht einer Konzentration von unter 0,5g/l und wurde deshalb nicht für die Statistik erfasst. Zum Zeitpunkt der höchsten g/g-Ausbeute war kein Chorismat mehr nachweisbar. Es konnte also gezeigt werden, dass die Verwendung von Rohglycerin ohne Komplikationen für den Prozess eingesetzt werden kann. Durch eine veränderte Fütterungsstrategie wäre vermutlich auch eine Vermeidung der Säurebildung möglich. Im zweiten Versuch wurde eine sehr lange lag-Phase von 30 Stunden festgestellt. Da die Zellen aber nach Wachstumsbeginn ähnliche Werte aufwiesen wie bei der ersten Fermentation, wurde der Versuch einfach um die entsprechende Zeit verlängert. Die Wachstumsrate war im zweiten Versuch mit $\mu=0,31 \text{ h}^{-1}$ wieder deutlich höher als mit Glycerin. Die Raum-Zeit-Ausbeute war mit 0,26g/l/h geringer als im ersten Versuch. Es wurde auch nur eine etwas geringere C-Ausbeute von 21,0% erreicht. Die Analyse der Nebenprodukte zeigte wie im ersten Versuch eine starke

Akkumulation von Lactat und auch Acetat. Die erreichten Konzentrationen betragen 31,7mM Acetat und 45,3mM Lactat. Es konnte bei diesen Versuchen gezeigt werden, dass die Verwendung von Rohglycerin für das Zellwachstum ohne weitere Aufreinigung möglich ist. Wie bei den Schüttelkolbenversuchen wurden aber für die Produktbildung große Abweichungen zwischen den einzelnen Versuchen festgestellt.

Die relativ hohen Konzentrationen an organischen Säuren, die auch mit reinem Glycerin erreicht wurden zeigen, dass hier noch Potenzial für Verbesserungen im Stoffwechsel besteht. Durch Erhöhen der Sauerstoffsättigung konnte der Glycerinverbrauch um etwa 25% gesteigert werden. Durch den erhöhten Glycerinfluss wurde aber nicht mehr L-Phenylalanin, sondern nur mehr Nebenprodukt gebildet. Aus diesem Grund wurde in den weiteren Arbeiten der Focus darauf gelegt, den Stoffwechsel von *E. coli* so zu verändern, dass bei hohem Glycerinverbrauch möglichst viel Kohlenstoff in die Produktbildung eingeht und weniger organische Säuren gebildet werden.

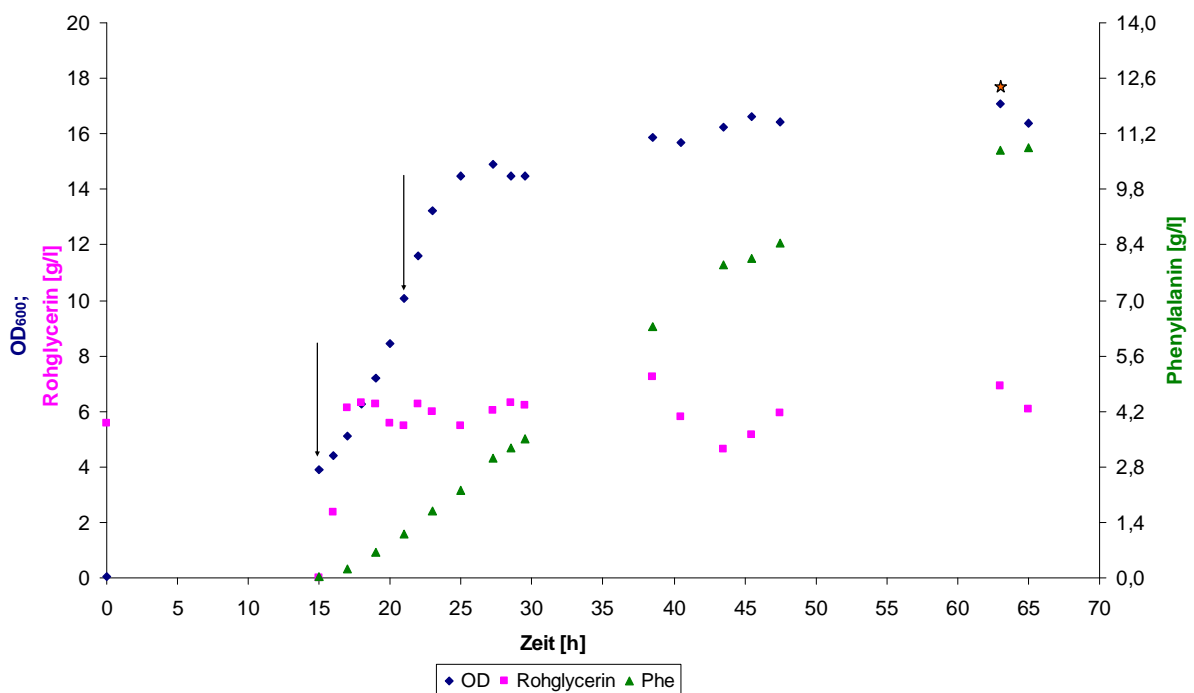
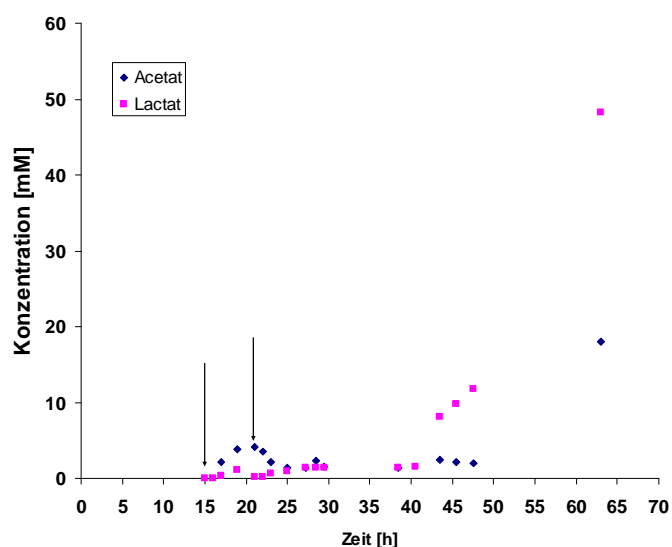


Abbildung 4-28 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4/pF81 in Minimalmedium + Rohglycerin (Startkonzentration 0,5%).

Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin war 10,8g/l. Insgesamt wurden 105,8g Rohglycerin verbraucht. Die Wachstumsrate betrug $0,33 \text{ h}^{-1}$. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl. auch Kapitel 4.4). Der Stern markiert den Zeitpunkt, an dem die höchste C-Ausbeute erreicht war. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

**Abbildung 4-29**

Nebenproduktanalyse für die Kultivierung von FUS4/pF81 in Minimalmedium + Rohglycerin (Abbildung 4-28).

Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

Tabelle 4-2 Überblick über die Fermentationen mit Glycerin, Glucose oder Rohglycerin als C-Quelle

Stamm	FUS4/ pF81	FUS4/ pF81	FUS4/ pF81
Sauerstoffsättigung [%]	20	20	60
C-Quelle	Glycerin	Rohglycerin	Glucose
Wachstumsrate [h^{-1}]	$0,26 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,01$	$0,49 \pm 0,01$
End-OD ₆₀₀ (Tyrosin-limitiert)	$16,0 \pm 0,25$	$18,3 \pm 1,2$	$14,9 \pm 0,2$
Verbrauchte C-Quelle [g]	$99,4 \pm 4,3$	$131,5 \pm 27,2$	$76,4 \pm 8,0$
Phe im Überstand [g/l]	$9,4 \pm 0,7$	$10,0 \pm 0,9$	$5,5 \pm 1,3$
max. g/g-Ausbeute [%]	$15,7 \pm 0,2$	$13,8 \pm 2,7$	$11,5 \pm 1,3$
max. C/C-Ausbeute [%]	$26,3 \pm 0,3$	$23,2 \pm 4,5$	$18,8 \pm 2,0$
Phe-Produktion [g/g(dw)]	$1,35 \pm 0,12$	$1,25 \pm 0,18$	$0,85 \pm 0,2$
Raum-Zeit-Ausbeute [g/l/h]	$0,26 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,05$	$0,13 \pm 0,01$

Der Verlauf der Fermentationen ist in Abbildung 4-23 und Abbildung 6-2, Abbildung 4-26 und Abbildung 6-3, Abbildung 4-28 und Abbildung 6-4 dargestellt. Die Angaben zu verbrauchter C-Quelle, produziertem L-Phenylalanin, der g/g- und C-Ausbeute beziehen sich auf den Zeitpunkt, an dem die maximale C-Ausbeute erreicht war. Dieser Zeitpunkt ist in den jeweiligen Schaubildern mit einem Stern markiert (vgl. dazu auch Kapitel 4.4). Die gebildete Menge an Phenylalanin bezieht sich auf den Zeitpunkt, ab dem keine weitere Produktzunahme feststellbar war. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

4.7 Maßnahmen zur Reduktion des Stoffflusses in den TCA-Zyklus

Mit dem Ziel den Umsatz von PEP zu Pyruvat zu verlangsamen und so eine Erhöhung des intrazellulären PEP-Pools bei gleichzeitiger Verringerung der Säureproduktion zu erreichen, wurden die Gene *pykF* bzw. *pykA* deletiert. Dadurch sollte auch der komplette Stofffluss verzögert werden, so dass mehr GA3P und DHAP für die Bildung von Fru-1,6-BP zur Verfügung stehen. Fru-1,6-BP wird von der Fructose-1,6-Bisphosphatase zu Fructose6P dephosphoryliert, das dann von der Phosphoglucoisomerase zu Glucose6P umgewandelt wird, welches schließlich in den Pentosephosphatweg eingeht. Ziel war somit auch die Erhöhung des Stoffflusses in den Pentosephosphatweg (Abbildung 4-30). Mit Glycerin als C-Quelle kann *E. coli* aber nur mithilfe einer Pyruvatkinase ohne zusätzlichen Energieaufwand PEP zu Pyruvat umsetzen. Da diese Reaktion für das Zellwachstum auf C-Quellen, die nicht über das PTS phosphoryliert werden, notwendig ist, konnte nur jeweils eines der beiden Isoenzyme deletiert werden. Es gibt zwar Literaturdaten zu den unterschiedlichen Funktionen der beiden Pyruvatkinasen. So war zum Beispiel gezeigt worden, dass bei Wachstum des Wildtyps *E. coli* JM101 auf Glucose die Enzymaktivität von PykF 15x höher war als die von PykA (Ponce *et al.*, 1995). Da sich diese Ergebnisse aber alle auf Glucose als C-Quelle beziehen, konnte daraus nicht die Pyruvatkinase ermittelt werden, die sich bei Verwendung von Glycerin als C-Quelle besser eignet. Deshalb wurden beide Veränderungen durchgeführt und untersucht.

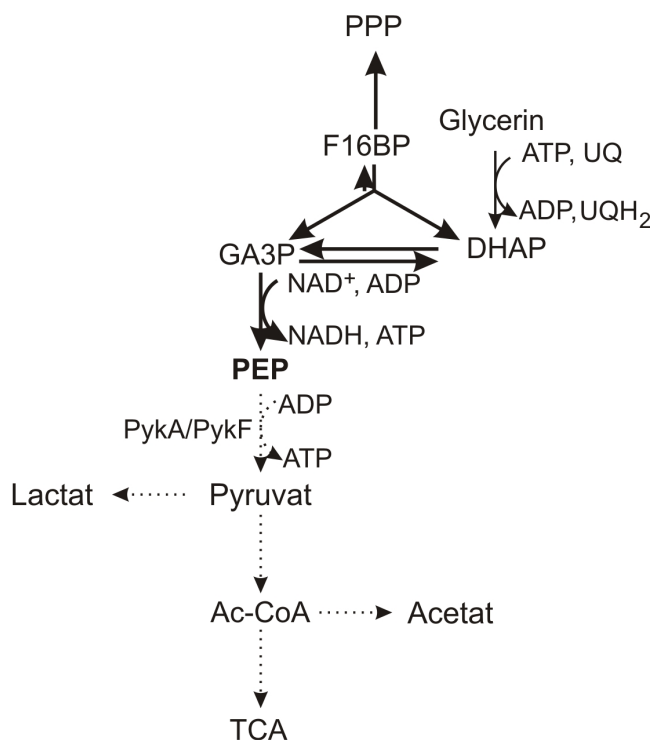


Abbildung 4-30 Schematische Darstellung des erwünschten Stoffwechselwegs nach Deletion von *pykA* oder *pykF*.

Gestrichelte Pfeile bedeuten einen Verringerung, fett dargestellte Pfeile eine Erhöhung des C-Flusses.

Die Stämme FUS4.3 (FUS4 $\Delta pykF::km$) und FUS4.4 (FUS4 $\Delta pykA::km$) wurden mit der Methode nach Datsenko und Wanner hergestellt. Zur Kontrolle wurde zunächst eine Kolonie-PCR durchgeführt. Positive Klone wurden anschließend in Minimalmedium + Glucose kultiviert und dann auf Enzymaktivitäten von PykA und PykF hin untersucht. Es zeigte sich dabei, dass im Reaktionsansatz zur Messung der PykF-Aktivität im Rohextrakt von FUS4.3 auch nach Aktivierung mit Fru-1,6-BP noch eine Extinktionsabnahme messbar war. Dies ist vermutlich auf das noch vorhandene PykA zurückzuführen. Bei FUS4.4 konnte dagegen ohne Fru-1,6-BP im Reaktionsansatz keine Pyruvatkinaseaktivität festgestellt werden. Durch die Zugabe von 1mM Fru-1,6-BP konnte dann Aktivität nachgewiesen werden, die um etwa 0,3 Units/mg Rohextrakt niedriger war, als bei FUS4, aber etwa doppelt so hoch, wie die PykA-Aktivität im Rohextrakt von FUS4.3. Diese Ergebnisse zeigen, dass in beiden Stämmen der jeweilige Knockout erfolgreich durchgeführt wurde und die Deletion sich auch auf die Enzymaktivität im Rohextrakt auswirkt. Je nach intrazellulärer Konzentration an Fru-1,6-BP kann dann entweder bei FUS4.4 oder bei FUS4.3 die höhere Pyruvatkinaseaktivität in der Zelle vorhanden sein.

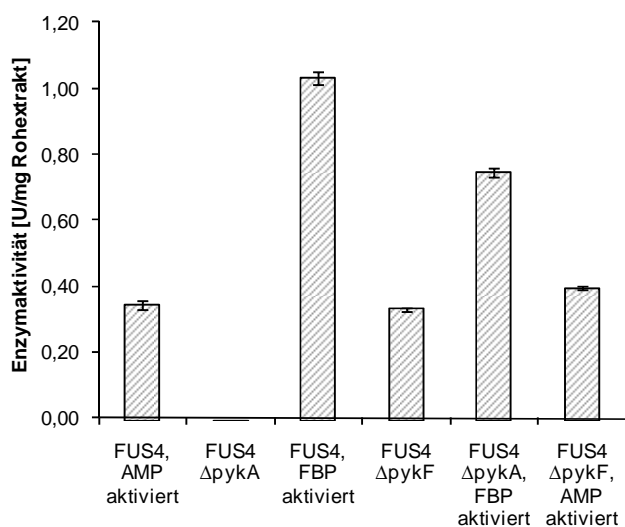


Abbildung 4-31 Schematische Darstellung der PykF- und PykA-Aktivitäten in den Stämmen FUS4, FUS4.4 und FUS4.3 nach Aktivierung mit AMP oder Fructose-1,6-bisphosphat.

Zur Bestimmung der Aktivität wurde ein mit Lactatdehydrogenase gekoppelter Test durchgeführt (Kapitel 3.6.6.3). Die Messung erfolgte zwei Mal.

Die Idee der *pykF*-Deletion war, dass durch die Deletion einer der beiden Pyruvatkinasen eine verlangsamte Reaktion vom PEP zum Pyruvat stattfindet. Da bei dieser Überlegung davon ausgegangen wurde, dass nicht der TCA-Zyklus, sondern der Pentosephosphatweg oder die PEP-Verfügbarkeit limitierend ist, wurde die Sauerstoffsättigung auf 60% eingestellt. Dies sollte einen schnellen Stofffluss garantieren und einen möglichen Effekt der vorgenommenen Veränderung am besten ersichtlich machen. Die Ergebnisse der Fermentation mit FUS4.3/pF81 sind in Abbildung 4-32 dargestellt und die Ergebnisse in Tabelle 4-3

zusammengefasst. Die erreichte Wachstumsrate betrug $\mu=0,23 \text{ h}^{-1}$, insgesamt wurden 151g Glycerin verbraucht und 20,3g Phenylalanin gebildet. Die maximale C-Ausbeute lag bei 27,9%, die Raum-Zeit-Ausbeute bei 0,3g/l/h. Interessant war die Wachstumskurve, die charakteristische Merkmale einer Diauxie aufwies. Bei der Betrachtung der Nebenprodukte (Abbildung 4-33) fällt auf, dass ab 27h Lactat gebildet wird und die Konzentration nach 50h aber wieder abnimmt. Dies entspricht genau dem Zeitpunkt, an dem die Wachstumskurve die für Diauxie charakteristischen Merkmale aufweist und deutet somit auf ein Umschalten des Organismus von Glycerinverbrauch auf Lactatverbrauch. Allerdings hält der Lactatverbrauch nicht lange an und es kam zum Ende der Fermentation wiederum zu einer starken Akkumulation von Lactat.

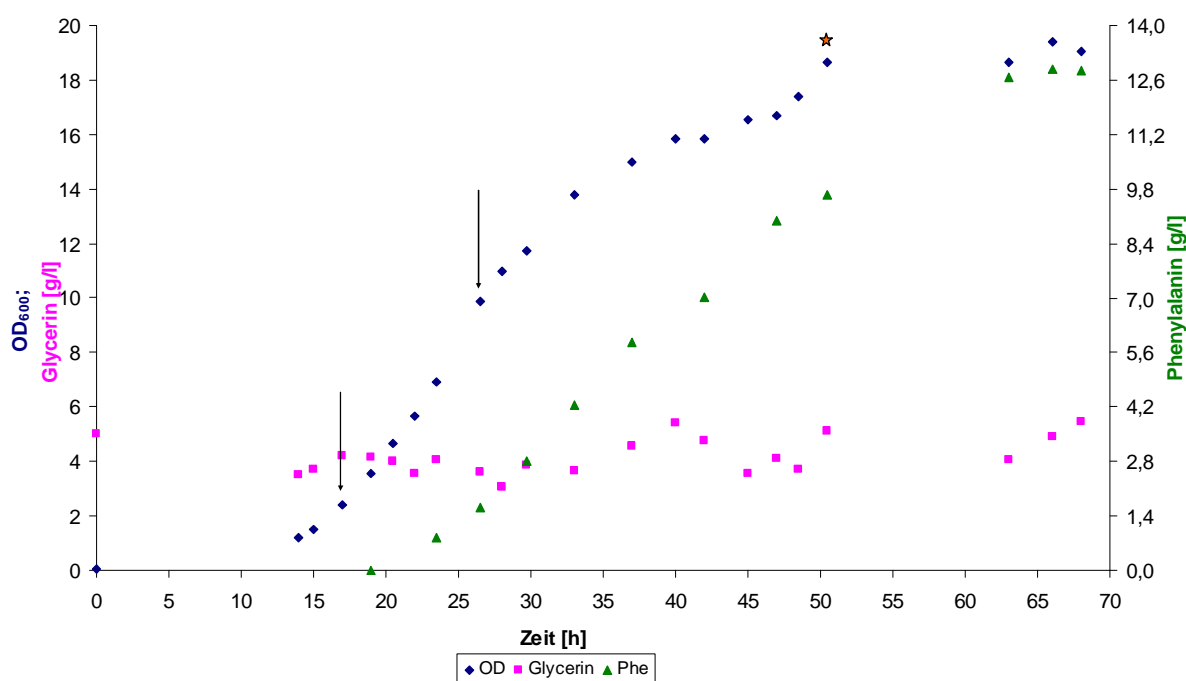


Abbildung 4-32 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4.3/pF81 mit Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%).

Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin betrug 12,9g/l. Insgesamt wurden 151g Glycerin verbraucht. Die Wachstumsrate betrug $0,23 \text{ h}^{-1}$. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl. auch Kapitel 4.4). Der Stern markiert den Zeitpunkt der höchsten C-Ausbeute. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

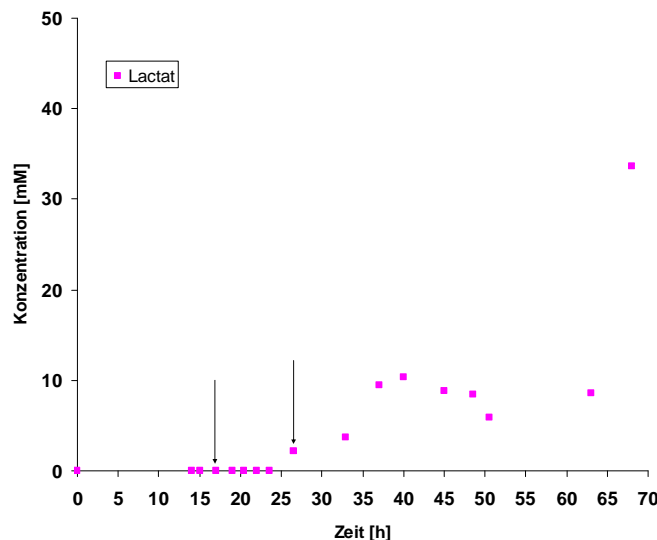


Abbildung 4-33 Nebenproduktanalyse für die Kultivierung von FUS4.3/pF81 in Minimalmedium + Glycerin (Abbildung 4-32).

Die Pfeile markieren die Zeitpunkte an denen Induktion mit IPTG erfolgte. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

Im zweiten Versuch wurden ähnliche Ergebnisse erhalten. Die Wachstumsrate lag bei $\mu=0,24 \text{ h}^{-1}$, die maximale C-Ausbeute bei 26,5% und die Raum-Zeit-Ausbeute bei 0,28g/l/h. Wie auch bei der ersten Fermentation war der Glycerinverbrauch mit 131g recht hoch und es wurde nur Lactat als Nebenprodukt gebildet. Bei der zweiten Fermentation wurden in der Zeit von 48-60h keine Messpunkte genommen, weshalb keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob auch hier Diauxie-charakteristisches Wachstum aufgetreten ist (Abbildung 6-6). Die Messlücke lässt hier auch nicht zu, dass eine mögliche Korrelation mit der Lactatbildung beobachtet werden kann.

Im nächsten Versuch wurde der Stamm FUS4.4/pF81 kultiviert und untersucht. Der Verlauf der ersten Fermentation ist in Abbildung 4-34 dargestellt. Auffällig ist auch hier der Wachstumsverlauf. Wie bei FUS4.3/pF81 weist die Kurve typische Eigenschaften einer Diauxie auf. Allerdings kann hier kein Zusammenhang mit den gebildeten Nebenprodukten festgestellt werden. Insgesamt wurden im Verlauf der Fermentation 83,5g Glycerin umgesetzt und 17,6g Phenylalanin gebildet. Im Gegensatz zu FUS4.3/pF81 wurde mit diesem Stamm eine drastische Verringerung des Kohlenstoffflusses mit gleichzeitiger Erhöhung der L-Phenylalaninproduktion erhalten. Die C-Ausbeute war mit 36% wesentlich höher als bei FUS4/pF81 und FUS4.3/pF81. Im Zeitraum ohne Zunahme der Biomasse (44-49h) wurde sogar eine C-Ausbeute von 65% erreicht. Die Raum-Zeit-Ausbeute war allerdings mit 0,27g/l/h etwas geringer als der im ersten Versuch mit FUS4.3/pF81 erreichte Wert von

0,30g/l/h. Die Betrachtung der Nebenprodukte zeigte bei FUS4.4/pF81 einen ähnlichen Kurvenverlauf wie beim unveränderten Stamm. Zunächst begann die Akkumulation von Lactat und etwas verzögert die Bildung von Acetat. Bei FUS4.4/pF81 begann die Produktion organischer Säuren wie bei FUS4/pF81 ab der späten exponentiellen Phase, allerdings wurde eine um etwa 50% verminderte Bildungsrate gemessen.

Der Verlauf der zweiten Fermentation von FUS4.4/pF81 in Minimalmedium + Glycerin ist im Anhang (Abbildung 6-7) dargestellt. Auch hier wurde der für Diauxie typische Wachstumsverlauf beobachtet, aber auch hier konnte kein Zusammenhang mit den gebildeten Nebenprodukten hergestellt werden. Insgesamt wurden bei dieser Fermentation 84g Glycerin verbraucht und 14,5g L-Phenylalanin gebildet. Die C-Ausbeute lag bei 30,0%, was etwas unter dem Wert der ersten Fermentation ist. Wird hier der Zeitraum ohne Biomassezunahme betrachtet (37-45h), wird ebenfalls eine leicht verringerte, aber trotzdem noch sehr hohe C-Ausbeute von 56% erreicht. Die Produktion an organischen Säuren zeigte ein etwas abweichendes Muster gegenüber dem ersten Versuch. Es wurde nur Lactat bis zu einer Konzentration von 17mM gebildet.

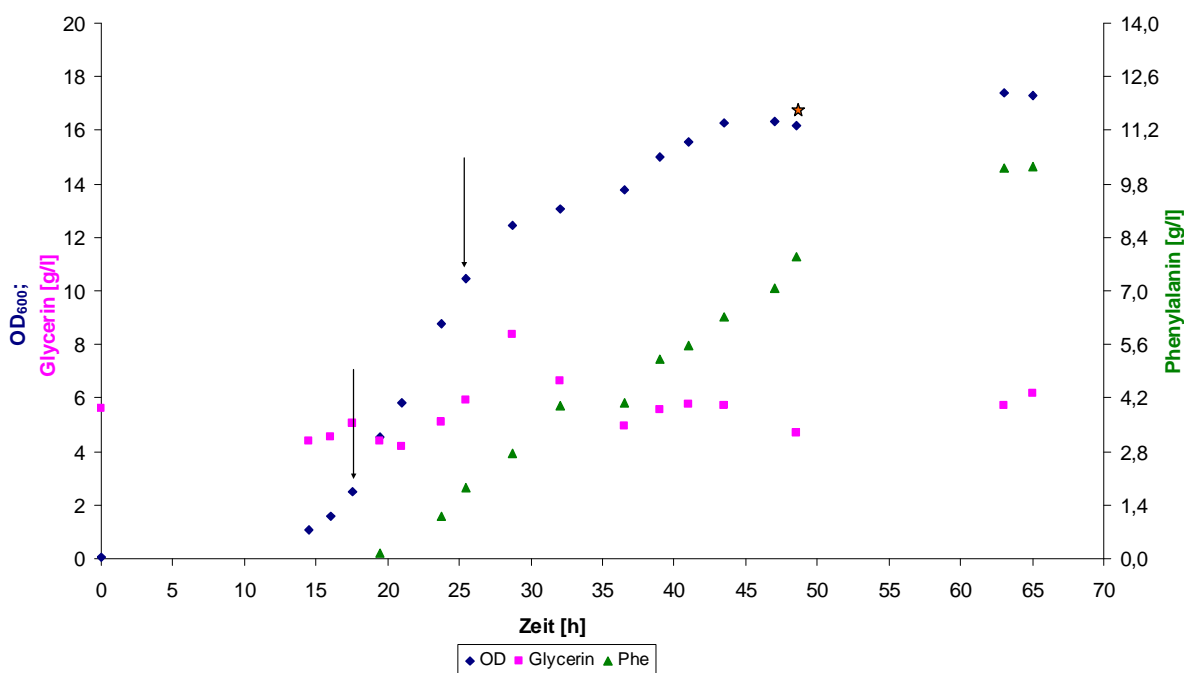


Abbildung 4-34 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation mit FUS4.4/pF81 kultiviert mit Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%).

Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin betrug 10,3g/l. Insgesamt wurden 83,5g Glycerin verbraucht. Die Wachstumsrate betrug $0,28 \text{ h}^{-1}$. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl. auch Kapitel 4.4). Der Stern markiert den Zeitpunkt, an dem die maximale C-Ausbeute erreicht war. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

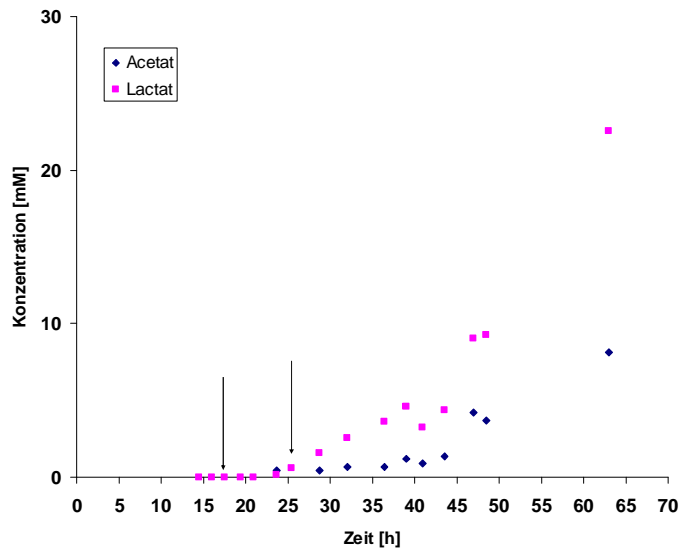


Abbildung 4-35 Nebenproduktbildung während der Fermentation von FUS4.4/pF81 in Minimalmedium + Glycerin und einer Sauerstoffsättigung von 60% (Abbildung 4-34). Die Pfeile markieren die Zeitpunkte an denen Induktion mit IPTG erfolgte. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

Beim Vergleich der Fermentationen von FUS4/pF81, FUS4.3/pF81 und FUS4.4/pF81 unter vergleichbaren Bedingungen wird ersichtlich, dass durch die vorgenommenen Veränderungen ein deutlicher Anstieg der g/g-Ausbeute von $10,7 \pm 1,7\%$ auf $15,4 \pm 0,5\%$ (FUS4.3/pF81) bzw. $19,9 \pm 1,6\%$ (FUS4.4/pF81) erreicht werden konnte. Auch die Raum-Zeit-Ausbeute stieg von $0,21 \pm 0,01$ g/l/h auf $0,29 \pm 0,01$ g/l/h (FUS4.3/pF81) bzw. $0,26 \pm 0,02$ g/l/h (FUS4.4/pF81) (Tabelle 4-3).

Tabelle 4-3 Vergleich der Fermentationsergebnisse von FUS4/pF81, FUS4.3/pF81, FUS4.4/pF81 unter vergleichbaren Bedingungen.

Stamm	FUS4/ pF81	FUS4.3/pF81	FUS4.4/pF81
Sauerstoffsättigung [%]	60	60	60
C-Quelle	Glycerin	Glycerin	Glycerin
Wachstumsrate [h^{-1}]	0,27±0,01	0,24±0,01	0,29±0,01
End-OD ₆₀₀ (Tyrosin-limitiert)	17,6±0,17	20,0±0,6	17,9±0,5
Verbrauchte C-Quelle [g]	124,7±10,8	117,5±13,2	68,9±10,3
Phe im Überstand [g/l]	7,9±0,2	11,9±1,0	9,5±0,8
max. g/g-Ausbeute [%]	10,7±1,7	15,4±0,5	19,9±1,6
max. C/C-Ausbeute [%]	18,1±2,3	27,2±0,7	33,3±2,7
Phe-Produktion [g/g(dw)]	1,05±0,03	1,35±0,15	1,25±0,18
Raum-Zeit-Ausbeute [g/l/h]	0,21±0,01	0,29±0,01	0,26±0,02

Der Verlauf der Versuche ist in Abbildung 4-21 und Abbildung 6-1, Abbildung 4-32 und Abbildung 6-5, Abbildung 4-34 und Abbildung 6-6 dargestellt. Die Angaben zu verbrauchter C-Quelle, produziertem L-Phenylalanin, der g/g- und C-Ausbeute beziehen sich auf den Zeitpunkt, an dem die maximale C-Ausbeute erreicht war. Dieser Zeitpunkt ist in den Schaubildern jeweils mit einem Stern markiert (vgl. dazu auch Kapitel 4.4). Die gebildete Menge an L-Phenylalanin bezieht sich auf den Zeitpunkt, ab dem keine weitere Produktzunahme feststellbar war. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in FUS4/pF81 tatsächlich die Verteilung des Stoffflusses problematisch sein könnte. Interessanterweise wurde jedoch der C-Fluss in Richtung Nebeproduktbildung nur durch die Deletion von *pykA* verlangsamt. Nicht klar wird anhand dieser Ergebnisse, wodurch die Ausbeute mit FUS4.4/pF81 gesteigert werden konnte. Möglich wäre hier zum einen der gesteigerte C-Fluss in den Pentosephosphatweg, aber auch eine Erhöhung des intrazellulären PEP-Pools wäre vorstellbar. Um dies zu klären wurde im nächsten Versuch gezielt nur der C-Fluss in Richtung Pentosephosphatweg gesteigert.

4.8 Maßnahmen zur Erhöhungen des C-Flusses in den Pentosephosphatweg

Die vorangegangenen Experimente lieferten weitere Hinweise, dass mit Glycerin als C-Quelle der Fluss in den Pentosephosphatweg limitierend sein könnte. Deshalb sollte in den folgenden Experimenten der Stofffluss gezielt in diese Richtung verstärkt werden. Erreicht werden sollte dies durch das Einbringen einer zusätzlichen Genkopie von *glpX*, das für die Fructose-1,6-

bisphosphatase II codiert (Donahue *et al.*, 2000) und von *tktA*, das für die Transketolase A codiert (Sprenger *et al.*, 1995).

E. coli besitzt zwei Fructose-1,6-bisphosphatasen: Fbp und GlpX. Da gezeigt worden war, dass sich *glpX* auf einem Operon mit *glpF* und *glpK* befindet (Truniger *et al.*, 1992), wurde vermutet, dass diese Fructose-1,6-bisphosphatase auch eine Rolle bei der Glycerinverwertung spielt. Ziel der Überexpression von *glpX* war zum einen eine Verstärkung des Stoffflusses in den Pentosephosphatweg und zum anderen der zügige Abbau von Fru-1,6-BP. Fru-1,6-BP ist ein allosterischer Inhibitor der Glycerinkinase und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass in der Zelle Fru-1,6-BP-Konzentrationen entstehen, die möglicherweise so hoch sind, dass sie einen negativen Effekt auf die Glycerindissimilation haben (Bennett *et al.*, 2009). Durch die Integration einer zusätzlichen Kopie für *glpX* sollte deshalb überprüft werden, ob der Stamm so einen Vorteil gegenüber dem unveränderten Stamm hat.

Die industrielle Produktion von L-Phenylalanin erfolgt üblicherweise durch Fermentation eines Produktionsstammes mit Glucose als C-Quelle, weshalb die meisten Forschungsarbeiten zur Verbesserung von Stammeigenschaften mit diesem Zucker durchgeführt wurden (vgl. Kapitel 2.7). So war z. B. gezeigt worden, dass durch Überexpression des Gens für die Transketolase A die E4P-Verfügbarkeit gesteigert und so eine erhöhte Produktion von DAHP, einer Komponente des Shikimatwegs, erreicht werden konnte. Für C5-Zucker war in derselben Publikation gezeigt worden, dass die Überexpression von *tktA* keine Steigerung der DAHP-Produktion brachte (Patnaik *et al.*, 1995). Weitere Beispiele, bei denen die Überexpression von *tktA* vorteilhaft für die Produktion von Komponenten aus dem Aromatenweg auf Basis von Glucose ist, sind in Kapitel 2.7 beschrieben. Für Glycerin liegen jedoch keine entsprechenden Daten vor. Aus diesem Grund sollte hier überprüft werden, ob die Überexpression von *tktA* möglicherweise auch mit Glycerin als C-Quelle einen Vorteil bringt. Die Transketolase A ist im Pentosephosphatweg für folgende Reaktionen zuständig: Sedoheptulose-7-Phosphat + Glycerinaldehyd-3-Phosphat \rightleftharpoons Ribose-5-Phosphat + Xylulose-5-Phosphat. Sie kann aber auch direkt aus Fructose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat Erythrose-4-Phosphat und Xylulose-5-Phosphat bilden. Die Überexpression von *tktA* sollte deshalb nicht nur den Fluss Richtung Pentosephosphatweg lenken, sondern auch ganz gezielt den E4P-Pool in der Zelle erhöhen (Abbildung 4-36).

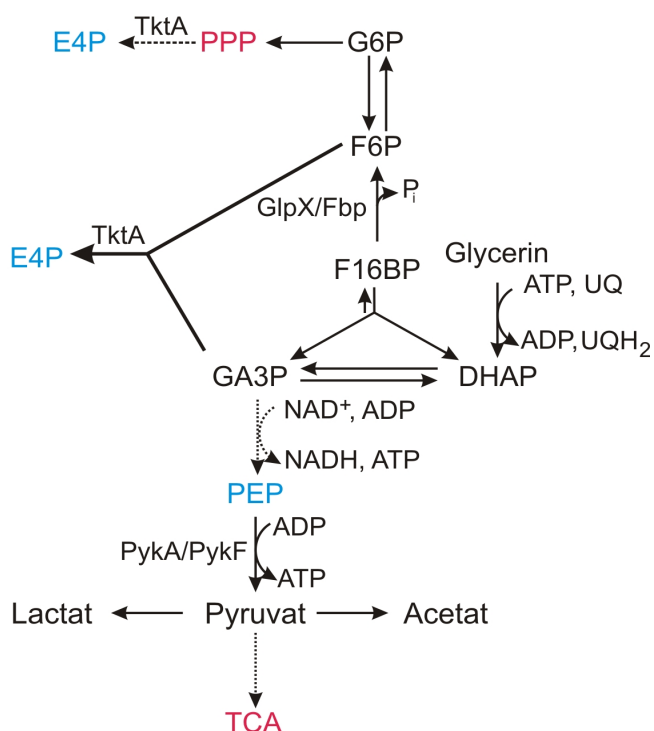


Abbildung 4-36 Schematische Darstellung des erwünschten Stoffwechselwegs nach der Integration einer zusätzlichen Genkopie von *glpX* oder *tktA*.

Gestrichelte Pfeile bedeuten eine Verringerung, fett dargestellte Pfeile eine Erhöhung des C-Flusses.

Für die Integration einer zusätzlichen Genkopie von *glpX* ins Chromosom wurde das Gen zunächst auf das Plasmid pJF119EH kloniert. Hierzu wurde die Nucleotidsequenz von *glpX* aus *E. coli* LJ110 mittels PCR amplifiziert, in den Expressionsvektor pJF119EH in die Schnittstellen *EcoR* I und *Hind* III kloniert und so das Plasmid pKUS13 konstruiert. Die Richtigkeit der Nucleotidabfolge wurde durch Sequenzierung bestätigt. Die Expressionsanalyse erfolgte wie in Kapitel 3.3 beschrieben in *E. coli* DH5 α . Rechnerisch ergibt sich für GlpX eine Größe von 35,85 kDa. Mittels SDS-Gelelektrophorese konnte die Überproduktion eines Proteins auf Höhe von 38 kDa gezeigt werden (Abbildung 4-37). Zur Messung der Enzymaktivität wurde der Rohextrakt verwendet. Als Kontrolle diente *E. coli* DH5 α transformiert mit dem Vektor pJF119EH. Die Enzymaktivität wurde über die Zunahme der Phosphatkonzentration gemessen (Col, 2004). Als Substrat diente dabei Fructose-1,6-Bisphosphat. Das durch die Aktivität der Fructose-1,6-Bisphosphatase freigesetzte Phosphat wurde dann durch einen kolorimetrischen Test, bei dem das Phosphat mit Malachitgrün und Ammoniummolybdat zu einem stabilen Farbstoffsalz reagiert, bestimmt (siehe Kapitel 3.6.6.2). Im Gegensatz zu *E. coli* DH5 α pJF119EH konnte bei *E. coli* DH5 α pKUS13 eine deutliche Zunahme an freiem Phosphat gemessen werden (Abbildung 4-37). Die Berechnung der Enzymaktivität auf Grundlage der erhaltenen Ergebnisse ergaben $0,67 \pm 0,06$ U/mg Rohextrakt. Ein U ist dabei definiert als die Menge an Enzym, die in einer Minute 1 μ mol Phosphat freisetzt. Für GlpX war bereits eine Aktivität von $\sim 3,3$ U/mg berichtet worden (Donahue *et al.*, 2000). Die Differenz ist dadurch zu erklären, dass bei diesem Versuch

aufgereinigtes Protein eingesetzt worden war, die hier erhaltenen Ergebnisse aber mit dem Rohextrakt ermittelt wurden, bei dem der Anteil von GlpX am Gesamtprotein etwa 30% entspricht. Die Ergebnisse zeigen, dass ein funktionsfähiges Enzym gebildet werden kann und das Plasmid pKUS13 somit für die Integration von *glpX* ins Chromosom verwendet werden kann. Die Subklonierung von *tktA* war von Dr. Natalie Trachtmann durchgeführt worden (unveröffentlicht).

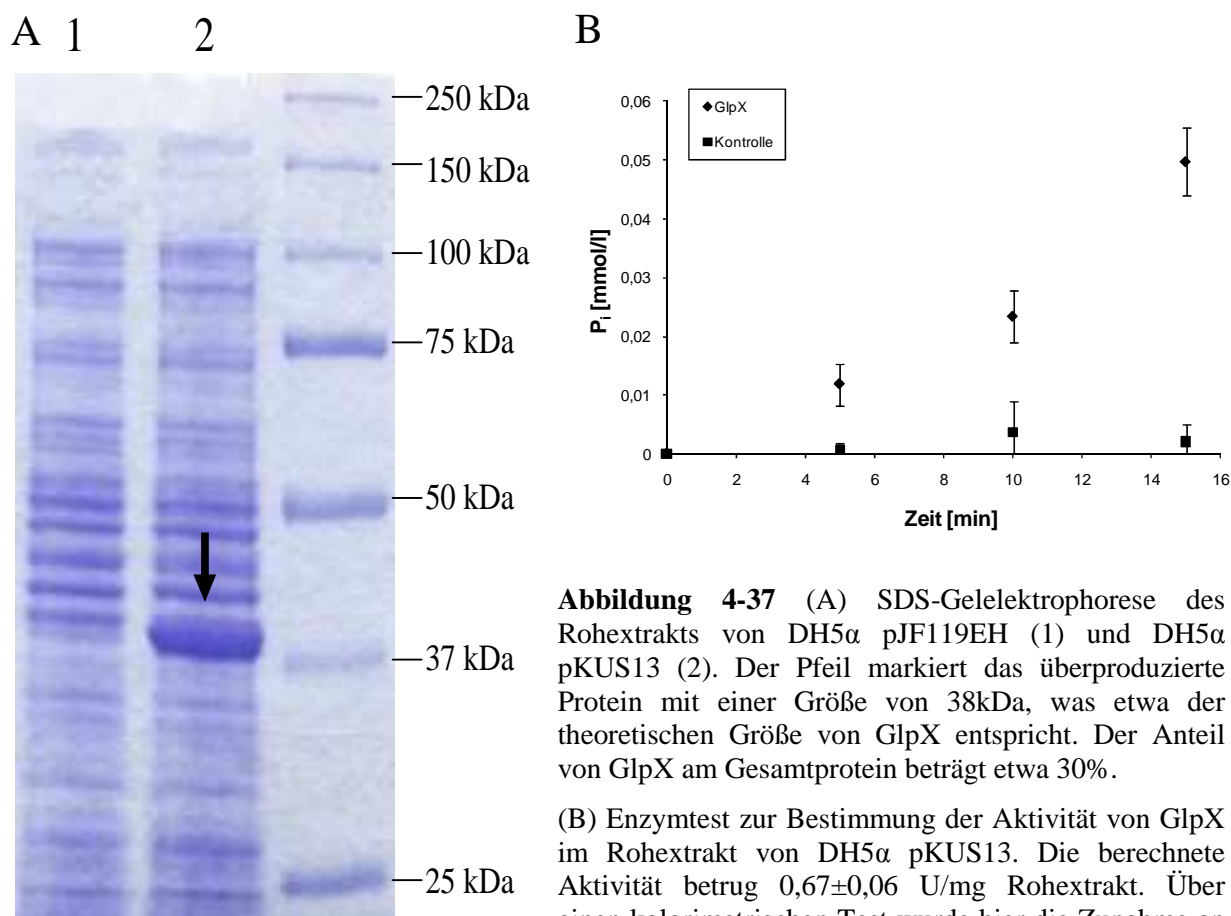


Abbildung 4-37 (A) SDS-Gelelektrophorese des Rohextrakts von DH5 α pJF119EH (1) und DH5 α pKUS13 (2). Der Pfeil markiert das überproduzierte Protein mit einer Größe von 38kDa, was etwa der theoretischen Größe von GlpX entspricht. Der Anteil von GlpX am Gesamtprotein beträgt etwa 30%.

(B) Enzymtest zur Bestimmung der Aktivität von GlpX im Rohextrakt von DH5 α pKUS13. Die berechnete Aktivität betrug $0,67 \pm 0,06$ U/mg Rohextrakt. Über einen kolorimetrischen Test wurde hier die Zunahme an freiem Phosphat gemessen (siehe Kapitel 3.6.6.2) Als Substrat wurde Fructose-1,6-Bisphosphat zugegeben. Als Negativkontrolle wurde der Rohextrakt von DH5 α pJF119EH verwendet. Durchgeführt wurde der Versuch zwei Mal.

Die zusätzliche Genkopie von *glpX* wurde ins *rbs*-Operon integriert. Die Integration einer zusätzlichen Genkopie von *tktA* erfolgte ins *gal*-Operon (P1-Lysat von Dr. Natalie Trachtmann zur Verfügung gestellt). Um den Erfolg der durchgeführten Veränderungen zu überprüfen, wurden die Stämme FUS4 $\Delta rbs::P_{tac}::glpX-cat$ (FUS4.6) und FUS4 $\Delta gal::P_{tac}::tktA-cat$ (FUS4.5) sowie die beiden Stämme BW25113 $\Delta tktA$ und BW25113 $\Delta tktA \Delta gal::P_{tac}::tktA-cat$ (beide Stämme von N. Trachtmann zur Verfügung gestellt) für 6 Stunden

in LB-Medium bei 37°C kultiviert. Die Induktion mit 0,5mM IPTG erfolgte von Anfang an. Der Enzymtest wurde mit dem Rohextrakt durchgeführt. Es zeigte sich, dass durch die Integration von *glpX* im Stamm FUS4.6 verglichen mit dem unveränderten Stamm FUS4 in den ersten Minuten eine erhöhte Phosphatfreisetzung und somit eine höhere Aktivität gemessen werden konnte (Abbildung 4-38). Die Menge an freigesetztem Phosphat pro Zeitintervall gleicht sich gegen Ende dem unveränderten Stamm an, was aber auch daran liegen könnte, dass die Konzentration des Substrats Fructose-1,6-bisphosphat im Reaktionsansatz nicht mehr ausreichend war. Die Betrachtung der Fehlerbalken dieses Experiments könnte zu dem Schluss führen, dass die Aktivität im veränderten Stamm nicht unbedingt höher sein muss, als im unveränderten. Die Fehlerbalken kommen allerdings deshalb zustande, weil die Phosphatfreisetzung im zweiten Versuch insgesamt höher lag, sowohl bei FUS4 als auch bei FUS4.6.

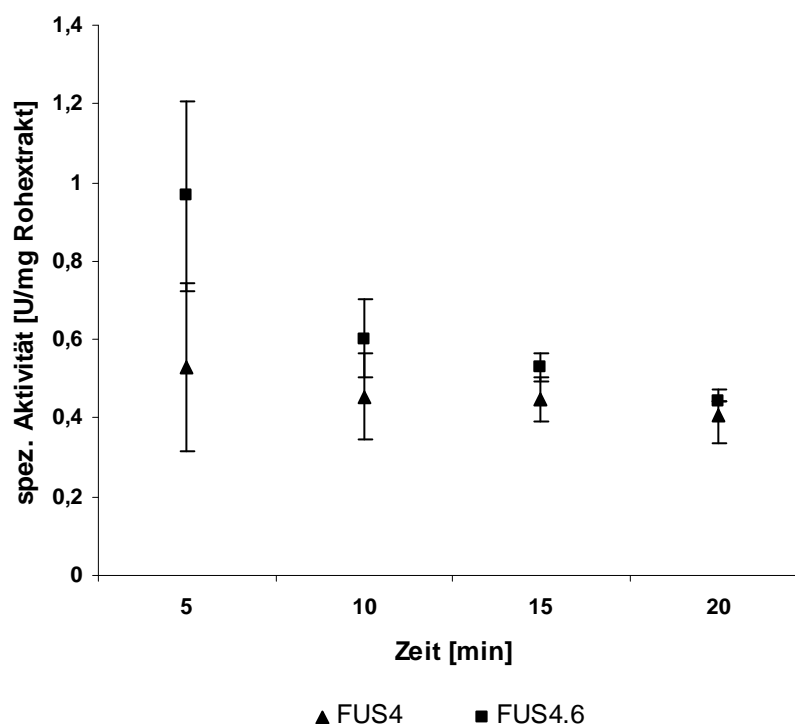


Abbildung 4-38 Aktivität von GlpX im Rohextrakt von FUS4 verglichen mit FUS4.6.

Gemessen wurde die Freisetzung von Phosphat aus Fru-1,6-BP (Startkonzentration im Reaktionsansatz: 1,5mM) durch einen kolorimetrischen Test. Da die Messung diskontinuierlich erfolgte, geben die Werte immer den Durchschnittswert für die jeweils vergangenen fünf Minuten an (siehe Kapitel 3.6.6.2).

Die Integration von *tktA* ließ sich *in vitro* durch PCR, aber nicht durch einen enzymatischen Test feststellen. Die Stämme BW25113 $\Delta tktA$ und BW25113 $\Delta tktA \Delta gal::P_{tac}::tktA-cat$ wurden deshalb auch auf MacConkey-Platten ohne C-Quelle ausgestrichen. *E. coli* reagiert

ohne TktA sensitiver auf die im MacConkey-Agar enthaltenen Gallensäuren, da ohne dieses Enzym keine korrekte Bildung der Lipopolysaccharidschicht (LPS) erfolgen kann (Eidels und Osborn, 1971) und die Zellmembran so den schädigenden Substanzen mehr ausgesetzt ist als bei einer fehlerfrei gebildeten LPS. In Abbildung 4-39 ist der Ausstrich von BW25113 $\Delta tktA$ (1) und BW25113 $\Delta tktA \Delta gal::P_{tac}::tktA-cat$ (2) zu sehen. Beide Ausstriche wurden gleich durchgeführt. Es wird deutlich, dass die Mutante ohne *tktA* nur dort wachsen kann, wo sich aufgrund der Art des Ausstrichs eine hohe Zelldichte befand. Nach Integration von *tktA* ist dieser Stamm dann wieder in der Lage gleichmäßig zu wachsen. Dies zeigt, dass TktA gebildet wird und aktiv ist auch wenn *in vitro* keine Aktivität über dem Hintergrund nachweisbar ist.

Für die Konstruktion des Stammes FUS4 $\Delta rbs::P_{tac}::glpX \Delta gal::P_{tac}::tktA-cat$ (FUS4.7) wurden die chromosomalen Veränderungen mittels P1-Transduktion miteinander kombiniert. Die Kontrolle des Stammes erfolgte mittels MacConkey-Agarplatten + 1% Galaktose + 1% Ribose.

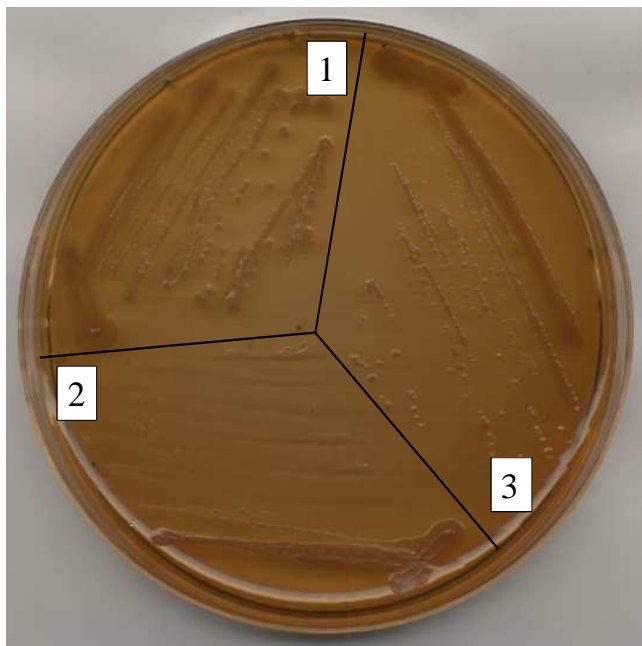


Abbildung 4-39 Ausstrich von BW25113 (1), BW25113 $\Delta tktA$ (2) und BW25113 $\Delta tktA \Delta gal::P_{tac}::tktA-cat$ (3) auf MacConkey-Platten ohne C-Quelle.

Zu sehen ist, dass BW25113 $\Delta tktA$ deutliche Schwierigkeiten beim Wachstum hat, während BW25113 $\Delta tktA \Delta gal::P_{tac}::tktA-cat$ gleichmäßig wachsen kann und Kolonien in beinahe gleicher Größe wie der unveränderte Stamm BW25113 bildet.

Der Verlauf der Fermentation von FUS4.6/pF81 ist in Abbildung 4-40 dargestellt. In Bezug auf die Wachstumsrate konnte unter Einbeziehen der Fehlerabweichung kaum ein Unterschied zum unveränderten Stamm gemessen werden. Die maximale C-Ausbeute betrug 19,2%, was keine Erhöhung gegenüber FUS4/pF81 darstellt ($18,1 \pm 2,3\%$). Die Raum-Zeit-Ausbeute lag mit $0,23 \text{ g/l/h}$ geringfügig über dem Vergleichsstamm ($0,21 \pm 0,01 \text{ g/l/h}$), konnte allerdings nur bis kurz nach der Wachstumsphase aufrechterhalten werden. In der späteren stationären Phase konnte keine weitere Produktbildung festgestellt werden. Die Analyse der

Nebenprodukte (Abbildung 4-41) zeigte ein ähnliches Muster wie bei FUS4/pF81 und FUS4.4/pF81. Auch hier begann die Lactatproduktion in der späten exponentiellen Phase und erreichte eine Konzentration von 22,5mM, während Acetat nur eine Konzentration von 2,5mM erreichte. Es konnte somit eine gegenüber dem unveränderten Stamm verminderte Säureproduktion festgestellt werden (41mM Lactat, 15mM Acetat).

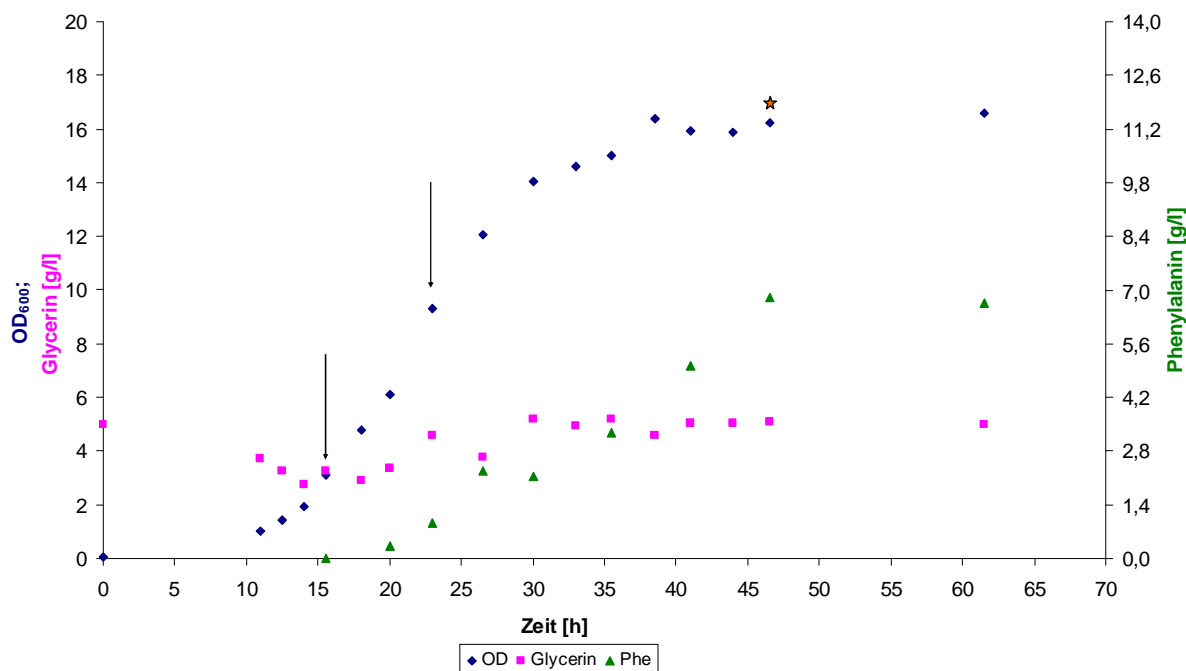


Abbildung 4-40 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4.6/pF81 mit Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) bei 60% Sauerstoffsättigung.

Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin betrug 6,8g/l. Insgesamt wurden 111,5g Glycerin verbraucht. Die Wachstumsrate betrug $0,26 \text{ h}^{-1}$. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen die Zugabe von IPTG erfolgte (vgl. auch Kapitel 4.4). Der Stern markiert den Zeitpunkt, an dem die maximale C-Ausbeute erreicht war. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

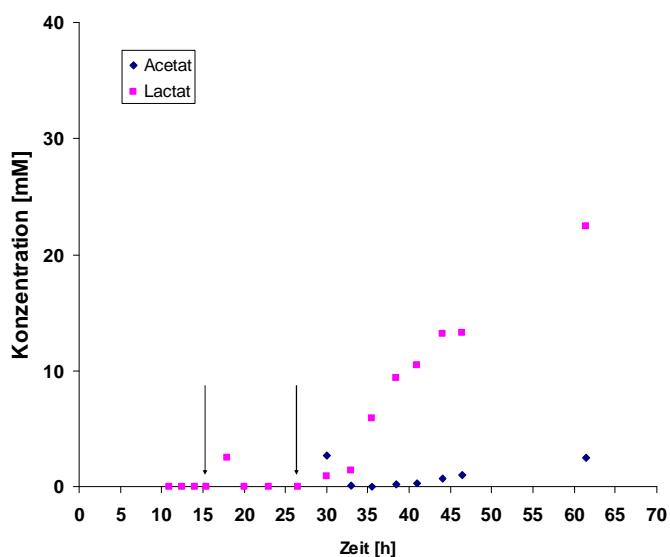


Abbildung 4-41 Nebenproduktanalyse für die Kultivierung von FUS4.6/pF81 in Minimalmedium + Glycerin (Abbildung 4-40).

Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen die Zugabe von IPTG erfolgte. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

Im zweiten Versuch wurden sehr ähnliche Ergebnisse erhalten. Der Verlauf dieser Fermentation ist im Anhang dargestellt (Abbildung 6-8). Die maximale C-Ausbeute betrug hier 21,6%, die Raum-Zeit-Ausbeute lag bei 0,26g/l/h. Wie auch beim ersten Versuch stoppte die Produktbildung rasch nach Erreichen der stationären Phase. Die gebildeten Mengen an organischen Säuren betragen beim zweiten Versuch 19,7mM Lactat und 3,5mM Acetat und bestätigten die Ergebnisse des ersten Versuchs. Die Integration von *glpX* hatte somit in Bezug auf die C-Ausbeute und die Raum-Zeit-Ausbeute geringe positive Effekte gegenüber dem unveränderten Stamm. Allerdings konnte die Raum-Zeit-Ausbeute nicht über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden.

Der Verlauf der Fermentation von FUS4.5/pF81 in Minimalmedium + Glycerin ist in Abbildung 4-42 dargestellt. Die Wachstumsrate war nahezu unverändert gegenüber FUS4/pF81. Die C-Ausbeute war mit 24,4% etwas höher als beim unveränderten Stamm ($18,1 \pm 2,3\%$). Die Raum-Zeit-Ausbeute war mit 0,23g/l/h ebenfalls geringfügig höher ($0,21 \pm 0,01\text{g/l/h}$). Die Analyse der Nebenprodukte zeigte aber, dass relativ hohe Konzentrationen an organischen Säuren erreicht wurden. Lactat und Acetat wurden auch hier ab der späten exponentiellen Phase gebildet. Die Akkumulation von Acetat erfolgte erst verzögert zur Lactatproduktion. Die erreichten Konzentrationen lagen mit 59mM Lactat und 18,2mM Acetat leicht über den mit FUS4/pF81 erreichten Werten (41mM Lactat, 15mM Acetat). Der Verlauf der zweiten Fermentation von FUS4 *gal::tktA-cat* in Minimalmedium + Glycerin ist im Anhang dargestellt. Die Wachstumsrate war bei diesem Versuch mit $\mu = 0,25\text{ h}^{-1}$ etwas niedriger im Vergleich zu $\mu = 0,3\text{ h}^{-1}$ beim ersten Versuch. Auch die C-Ausbeute war mit 16,6% geringer als beim ersten Versuch. Die Raum-Zeit-Ausbeute lag mit 0,22g/l/h im

gleichen Bereich wie bei der ersten Fermentation. Die Analyse der Nebenprodukte zeigte, dass bei der Wiederholung sogar noch höhere Konzentrationen an organischen Säuren erreicht wurden. Die Lactatkonzentration betrug am Ende der Fermentation 78,6mM, die Acetatkonzentration 25,6mM. Die Ergebnisse der beiden Fermentationen weisen somit die gleichen Tendenzen auf und zeigen nur geringfügige Verbesserungen gegenüber dem Vergleichsstamm. Dies führt zu dem Schluss, dass die E4P-Verfügbarkeit nicht das vorrangige Problem der Aromatenproduktion auf Basis von Glycerin darstellt. Eine mögliche Erklärung dafür, dass die Überexpression von *tktA* nur einen geringen positiven Effekt hatte, könnte aber auch in einer Limitierung durch Fructose-6-Phosphat liegen. Deshalb sollten in einem weiteren Versuch die beiden Integrationen miteinander kombiniert und der resultierende Stamm untersucht werden.

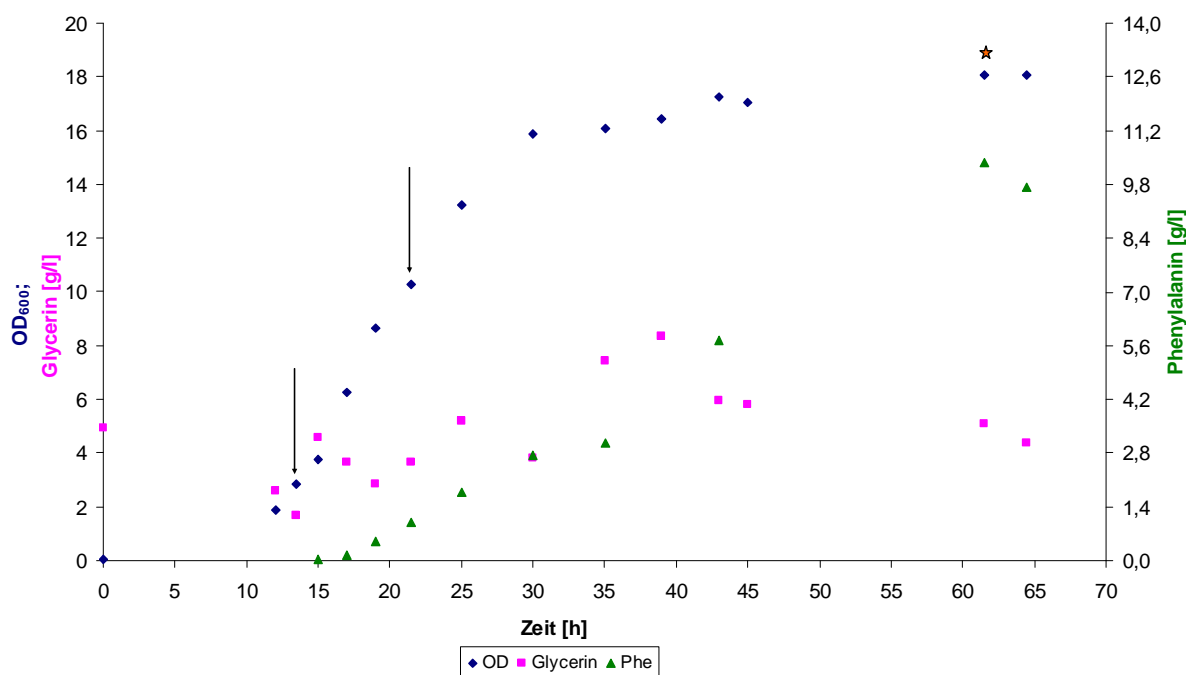


Abbildung 4-42 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4.5/pF81 mit Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) bei 60% Sauerstoffsättigung.

Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin betrug 10,4g/l. Insgesamt wurden 138g Glycerin verbraucht. Die Wachstumsrate betrug in der exponentiellen Phase $0,3 \text{ h}^{-1}$. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl. auch Kapitel 4.4). Der Stern markiert den Zeitpunkt, an dem die maximale C-Ausbeute erreicht war. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

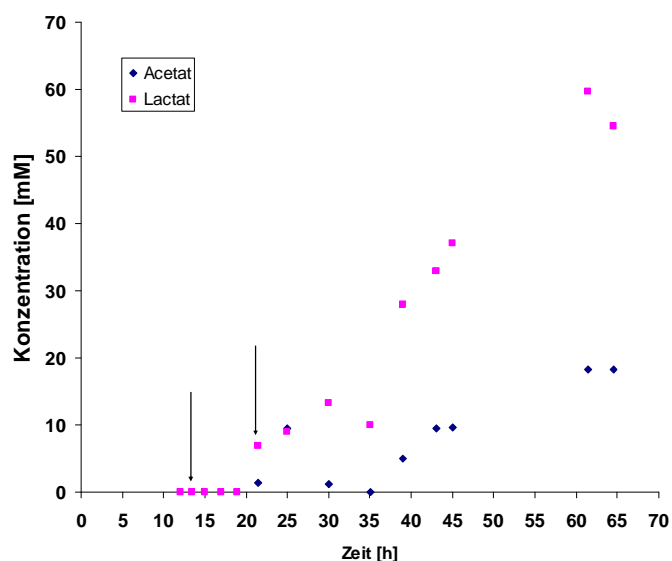


Abbildung 4-43 Nebenproduktanalyse für die Kultivierung von FUS4.5/pF81 in Minimalmedium + Glycerin (Abbildung 4-42).

Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

Der Verlauf der Fermentation mit FUS4.7/pF81 ist in Abbildung 4-44 dargestellt. Das Wachstum dieses Stammes war mit $\mu = 0,24 \text{ h}^{-1}$ verhältnismäßig langsam und es wurde eine lange lag-Phase von ca. 12h beobachtet. Die erreichte C-Ausbeute lag bei 25,4%, die Raum-Zeit-Ausbeute lag mit 0,42g/l/h sehr hoch. Die gebildete Menge an Nebenprodukten war mit 36,3mM Lactat und 11,7mM Acetat etwas höher als im Stamm FUS4.6/pF81, aber deutlich geringer als im Stamm FUS4.5/pF81. Im zweiten Versuch (Abbildung 6-9) konnte die geringe Wachstumsrate mit $\mu = 0,23 \text{ h}^{-1}$ bestätigt werden, allerdings wurde hier keine lag-Phase beobachtet. Die erreichte C-Ausbeute lag auch hier mit 26,7% deutlich über den Stämmen FUS4/pF81, FUS4.5/pF81 und FUS4.6/pF81. Auch die Raum-Zeit-Ausbeute war mit 0,37g/l/h wieder deutlich über den Vergleichsstämmen. Die gebildete Menge an Nebenprodukten lag im ähnlichen Bereich wie beim ersten Versuch (Abbildung 6-9).

Es konnte also gezeigt werden, dass die Integration von *glpX* und *tktA* jeweils geringfügige Verbesserungen in der g/g-Ausbeute sowie in der Raum-Zeit-Ausbeute brachten. Eine Kombination beider Veränderungen aber zu einer deutlichen Verbesserungen führte, so dass der Stamm FUS4.7/pF81 bei den betrachteten Parametern signifikante Vorteile gegenüber den Vergleichsstämmen aufweist (Tabelle 4-4).

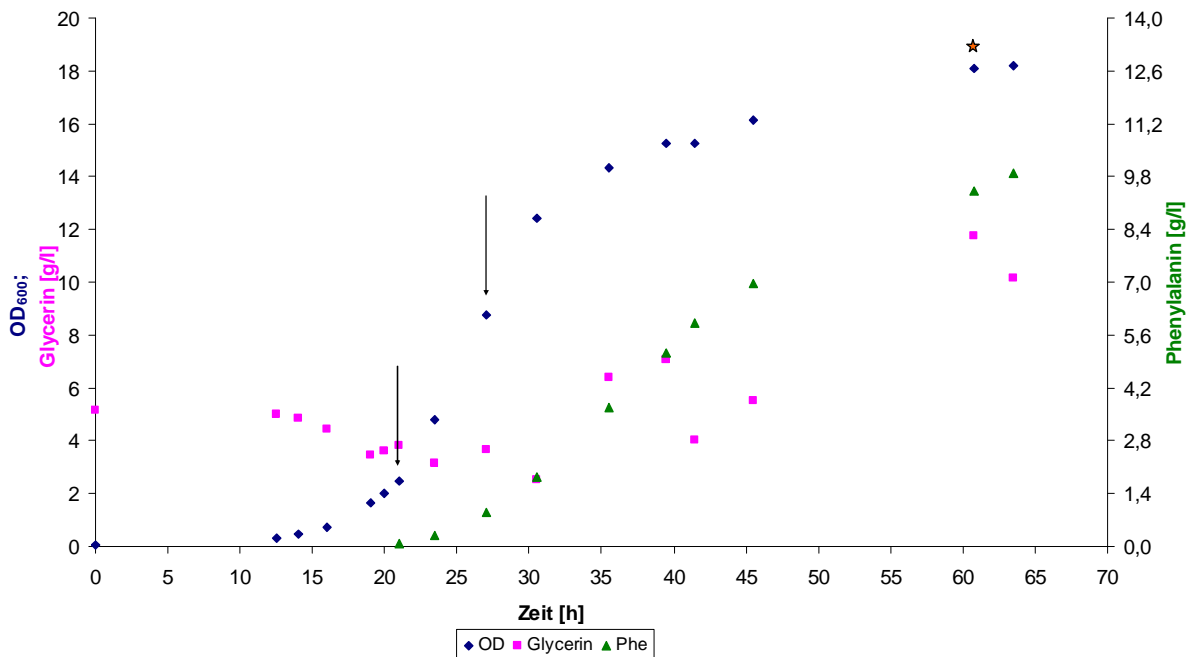


Abbildung 4-44 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4.7/pF81 mit Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) bei 60% Sauerstoffsättigung.

Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin betrug 9,9g/l. Die absolute Menge an gebildetem L-Phenylalanin hätte hier vermutlich noch höher ausfallen können, aber da die maximale C-Ausbeute schon überschritten war, wurde die Fermentation an dieser Stelle abgebrochen. Insgesamt wurden 116g Glycerin verbraucht. Die Wachstumsrate betrug $0,24 \text{ h}^{-1}$. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl. auch Kapitel 4.4). Der Stern markiert den Zeitpunkt, an dem die maximale C-Ausbeute erreicht war. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

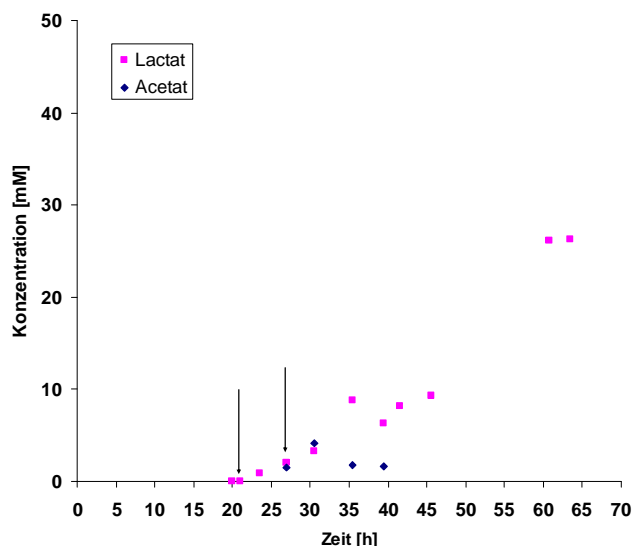


Abbildung 4-45 Nebenproduktanalyse für die Kultivierung von FUS4.7/pF81 in Minimalmedium + Glycerin (Abbildung 4-44).

Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

Tabelle 4-4 Aufgelistet sind die Parameter, die zur Bewertung der Stämme FUS4.5/pF81, FUS4.6/pF81 und FUS4.7 verwendet wurden.

Stamm	FUS4/ pF81	FUS4.6/ pF81	FUS4.5/ pF81	FUS4.7/ pF81
Sauerstoffsättigung [%]	60	60	60	60
C-Quelle	Glycerin	Glycerin	Glycerin	Glycerin
Wachstumsrate [h^{-1}]	0,27±0,01	0,29±0,03	0,28±0,03	0,24±0,01
End-OD ₆₀₀ (Tyrosin-limitiert)	17,6±0,17	16,5±0,3	17,0±1,1	19,1±0,9
Verbrauchte C-Quelle [g]	124,7±10,8	89,8±6,2	135,6±0,6	122,4±6,3
Phe im Überstand [g/l]	7,9±0,2	7,3±0,5	9,7±0,8	10,1±0,2
max. g/g-Ausbeute [%]	10,7±1,7	12,2±0,7	12,4±2,2	15,6±0,4
max. C/C-Ausbeute [%]	18,1±2,3	20,4±1,2	20,7±3,8	26,0±0,6
Phe-Produktion [g/g(dw)]	1,05±0,03	1,01±0,05	1,37±0,07	1,2±0,03
Raum-Zeit-Ausbeute [g/l/h]	0,21±0,01	0,25±0,02	0,23±0,00	0,4±0,02

Der Verlauf der Versuche ist in Abbildung 4-42 und Abbildung 6-7, Abbildung 4-40 und Abbildung 6-8, Abbildung 4-44 und Abbildung 6-9 dargestellt. Die Angaben zu verbrauchter C-Quelle, der g/g- und C-Ausbeute beziehen sich auf den Zeitpunkt, an dem die maximale C-Ausbeute erreicht war. Dieser Zeitpunkt ist in den Schaubildern jeweils mit einem Stern markiert (vgl. dazu auch Kapitel 4.4). Die gebildete Menge an L-Phenylalanin bezieht sich auf den Zeitpunkt, ab dem keine weitere Produktzunahme feststellbar war. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

4.9 Kombination der *pykA*-Deletion mit der Überexpression von *tktA* und *glpX*

In den vorigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die gemeinsame Überexpression von *tktA* und *glpX* einen deutliche Verbesserung der Raum-Zeit-Ausbeute bringt (Kapitel 4.8). Die Untersuchungen der Stämme mit Deletion für *pykA* (FUS4.4) bzw. *pykF* (FUS4.3) zeigten, dass mit dem Stamm FUS4.4 zwar keine deutliche Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute, aber eine signifikante Verbesserung der C-Ausbeute auf $33,3 \pm 2,7$ % erreicht werden konnte. Die Ausbeuten mit dem Stamm FUS4.3 wiesen dagegen kaum Verbesserungen gegenüber dem unveränderten Stamm auf (Kapitel 4.6). In weiteren Experimenten sollte deshalb überprüft werden, ob eine Kombination der *pykA*-Deletion mit der Überexpression von *tktA* und *glpX* weitere Vorteile bringt (vgl. auch Abbildung 4-46).

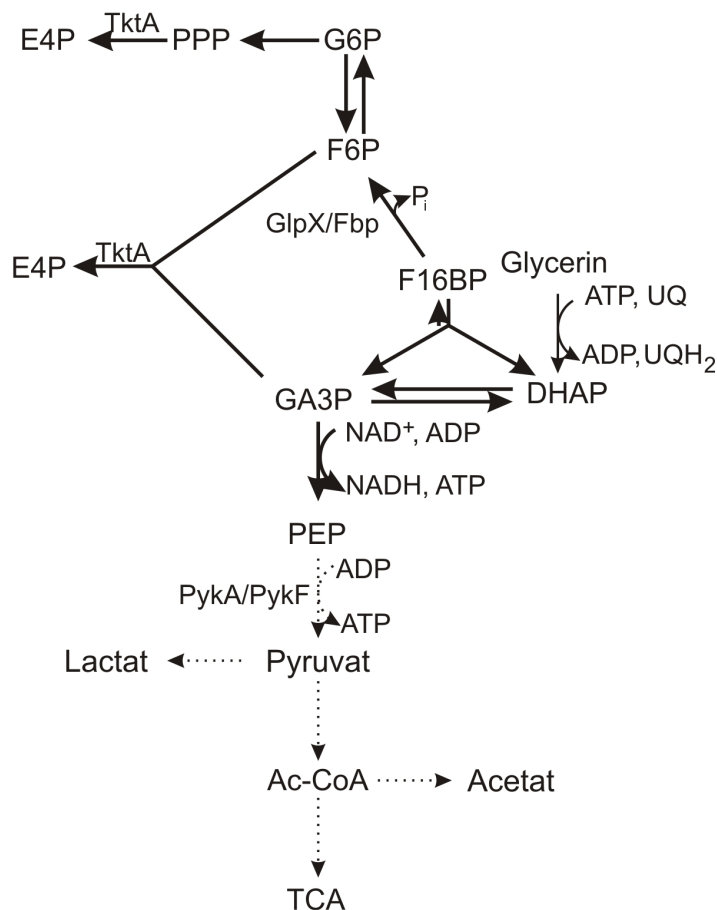


Abbildung 4-46 Schematische Darstellung des erwünschten Stoffwechselwegs nach Deletion von *pykA* und der Integration einer zusätzlichen Genkopie von *glpX* oder *tktA*.

Gestrichelte Pfeile bedeuten einen Verringerung, fett dargestellte Pfeile eine Erhöhung des C-Flusses.

Die Stammkonstruktionen erfolgten ausnahmslos mittels P1-Transduktion. Es wurden folgende Stämme konstruiert:

- FUS4.8 (FUS4 Δ pykA-km Δ gal:: P_{tac} ::*tktA-cat*)
- FUS4.9 (FUS4 Δ pykA-km Δ rbs:: P_{tac} ::*glpX-cat*)
- FUS4.10 (FUS4 Δ pykA Δ rbs:: P_{tac} ::*glpX* Δ gal:: P_{tac} ::*tktA-cat*)

Der Verlauf der Fermentation mit FUS4.8/pF81 ist in Abbildung 4-47 dargestellt. Die Wachstumsrate lag mit $\mu=0,29 \text{ h}^{-1}$ im Bereich von FUS4.4/pF81. Erreicht wurde eine C-Ausbeute von 29,7%, was unter dem Wert der Einfachmutante FUS4.4/pF81 liegt ($33,3\pm 2,7\%$). Die Raum-Zeit-Ausbeute war mit $0,26 \text{ g/l/h}$ im Bereich von FUS4.4/pF81 ($0,26\pm 0,02$). Bei der Analyse der Nebenprodukte zeigte sich, dass die Produktion organischer Säuren einen ähnlichen Verlauf zeigt wie bei FUS4.4/pF81 und auch die erreichten Konzentrationen an Lactat ($19,8 \text{ mM}$) und Acetat ($6,8 \text{ mM}$) auf etwa dem gleichen Niveau liegen ($22,5 \text{ mM}$ Lactat, $8,1 \text{ mM}$ Acetat). Im zweiten Versuch (Abbildung 6-10) wurde eine C-Ausbeute von 27,7% erreicht, was im Bereich des ersten Versuchs lag. Die Wachstumsrate ($\mu= 0,29 \text{ h}^{-1}$), die Raum-Zeit-Ausbeute ($0,20 \text{ g/l/h}$) und die gebildete Menge an organischen Säuren ($15,5 \text{ mM}$ Lactat, $7,9 \text{ mM}$ Acetat) waren ebenfalls ähnlich wie bei der ersten Fermentation. Die zusätzliche Integration von *tktA* in den Stamm FUS4.4 hatte also eher negative Auswirkungen auf die Produktivität.

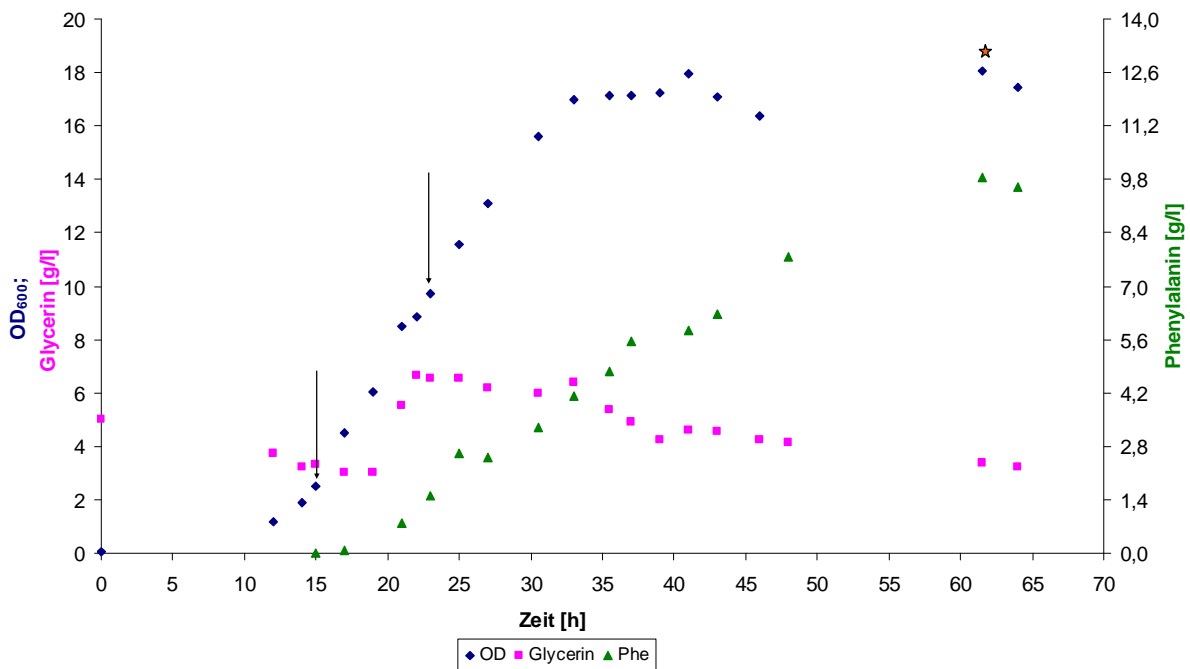


Abbildung 4-47 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4.8/pF81 mit Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) bei 60% Sauerstoffsättigung.

Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin betrug 9,8g/l. Insgesamt wurden 94g Glycerin verbraucht. Die Wachstumsrate betrug $0,29 \text{ h}^{-1}$. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl. auch Kapitel 4.4). Der Stern markiert den Zeitpunkt, an dem die maximale C-Ausbeute erreicht war. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

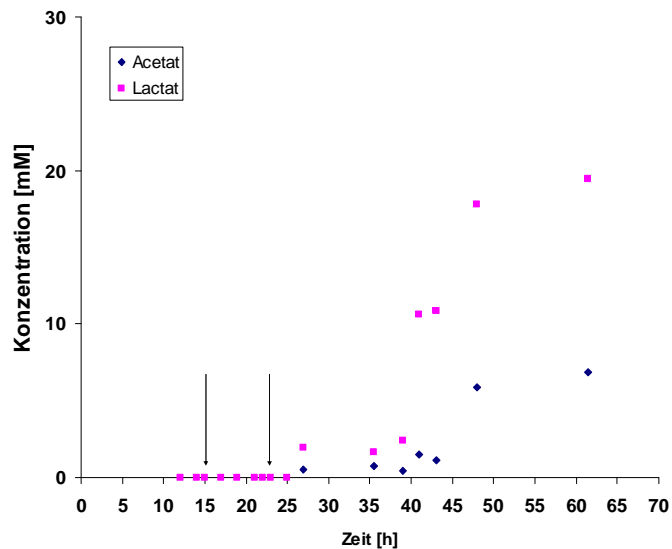


Abbildung 4-48
Nebenproduktanalyse für die Kultivierung von FUS4.8/pF81 in Minimalmedium + Glycerin (Abbildung 4-47).

Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

In Abbildung 4-49 ist der Verlauf der Fermentation mit FUS4.9/pF81 dargestellt und die Ergebnisse in Tabelle 4-5 zusammengefasst. Die Wachstumsrate war mit $\mu=0,29 \text{ h}^{-1}$ im gleichen Bereich wie bei FUS4.8/pF81 und FUS4.4/pF81. Auch der Verlauf der Nebenproduktbildung unterschied sich nicht wesentlich vom vorhergehenden Versuch

(Abbildung 4-50). Gegen Ende der exponentiellen Phase und während der stationären Phase wurde Lactat bis zu einer Endkonzentration von 17,4mM gebildet. Die produzierte Menge an Acetat war 3,8mM. Mit dem Stamm FUS4.9/pF81 wurde in diesem Versuch eine C-Ausbeute von 26,1% erreicht. Die Raum-Zeit-Ausbeute lag bei 0,28g/l/h. Diese Ergebnisse bedeuten zwar eine Verbesserung gegenüber dem unveränderten Stamm, aber eine relative Verschlechterung gegenüber der Einfachmutante FUS4.4/pF81.

Im zweiten Versuch (Abbildung 6-11) wurden für die Ausbeuten etwas niedrigere Werte erhalten als im ersten Versuch. Die C-Ausbeute betrug 19%, die Raum-Zeit-Ausbeute 0,22g/l/h. Die Wachstumsrate war mit $\mu = 0,3 \text{ h}^{-1}$ im gleichen Bereich wie beim ersten Versuch. Diese Ergebnisse zeigten, dass auch die Kombination $\Delta pykA\text{-}km \text{ rbs}::glpX\text{-}cat$ keinen weiteren Vorteil brachte. Da bei den Versuchen zur Erhöhung des Stoffflusses in Richtung Pentosephosphatweg durch Integration von *glpX* bzw. *tktA* gezeigt worden war, dass eine Einzelintegrationen für sich keine große Verbesserung brachte, die Kombination aber zu einer signifikanten Erhöhung der Produktivität führte (Kapitel 4.8), wurde in einem weiteren Versuch die Kombination $glpX^+/tktA^+$ in FUS4.4 integriert und ebenfalls im Fermenter kultiviert und untersucht.

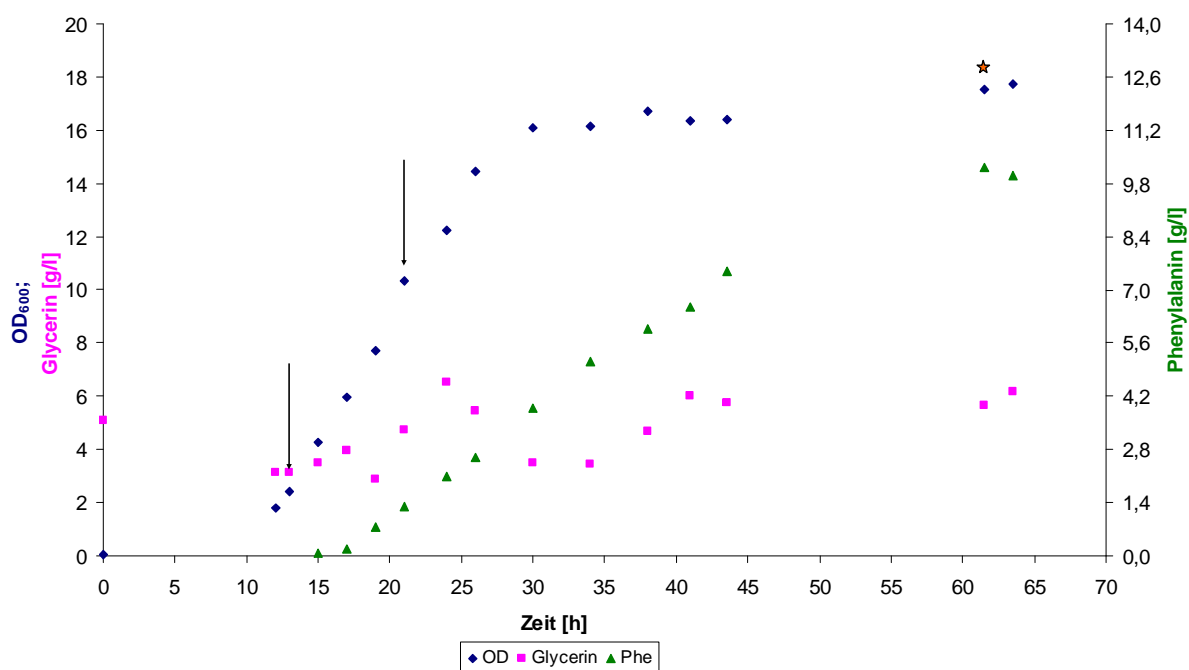


Abbildung 4-49 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4.9/pF81 mit Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) bei 60% Sauerstoffsättigung.

Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin betrug 10,2g/l. Insgesamt wurden 118g Glycerin verbraucht. Die Wachstumsrate betrug $0,29 \text{ h}^{-1}$. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl. auch Kapitel 4.4). Der Stern markiert den Zeitpunkt, an dem die maximale C-Ausbeute erreicht war. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

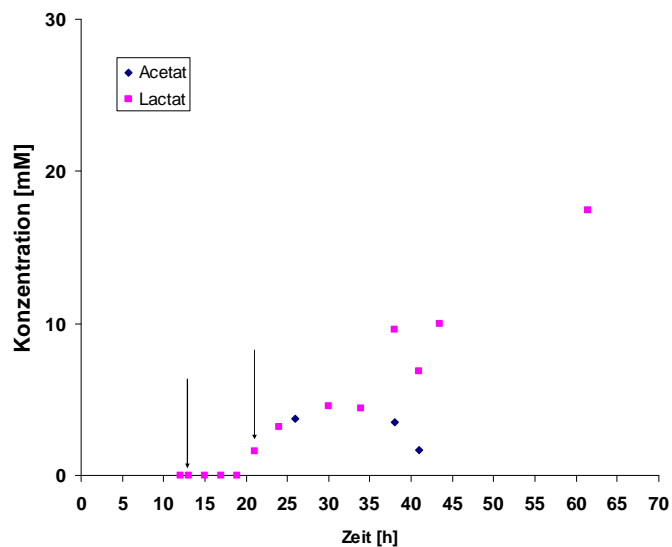


Abbildung 4-50 Nebenproduktanalyse für die Kultivierung von FUS4.9/pF81 in Minimalmedium + Glycerin (Abbildung 4-49).

Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

Der Verlauf der Fermentation mit dem Stamm FUS4.10/pF81 ist in Abbildung 4-51 dargestellt. Das Wachstum war konstant wie bei den vorhergehenden Versuchen bei etwa $\mu=0,3 \text{ h}^{-1}$. Anders als beim Stamm FUS4.7/pF81 konnte bei diesem Stamm keine Verbesserung der Ausbeute durch die zusätzliche Integration von *tktA* und *glpX* erhalten werden. Die Integration von *tktA* in FUS4.4 bewirkte sogar eine Verringerung der Produktivität, genauso wie die Integration von *glpX*. Die gemeinsame Integration hatte sogar einen noch stärkeren negativen Effekt. Die Produktivität wurde durch die Integration von *glpX* und *tktA* noch stärker verringert, als nur durch ein einzelnes zusätzlich integriertes Gen (vgl. auch Tabelle 4-5). Die C-Ausbeute sank im Stamm FUS4.10/pF81 auf maximal 16% (64h), was auf dem Niveau von FUS4/pF81 liegt. Die Raum-Zeit-Ausbeute lag mit 0,25g/l/h etwas höher als beim unveränderten Stamm. Insgesamt wurden etwas mehr Nebenprodukte gebildet als bei den Stämmen FUS4.4/pF81, FUS4.8/pF81 und FUS4.9/pF81. Lactat und Acetat erreichten Konzentrationen von 32,7mM und 9,5mM. Beim zweiten Versuch mit diesem Stamm trat eine sehr lange lag-Phase von etwa 30 Stunden auf (Abbildung 6-12). Das anschließende Wachstum war aber ähnlich wie beim ersten Versuch und es wurde eine Wachstumsrate von $\mu=0,29 \text{ h}^{-1}$ erreicht. Die maximale C-Ausbeute wurde nach 68h Stunden erreicht und lag mit 22% etwas höher. Die Raum-Zeit-Ausbeute lag mit 0,18g/l/h wesentlich niedriger als beim ersten Versuch. Im Verlauf der zweiten Fermentation wurden nur geringfügige Mengen an Lactat gebildet (3,8mM), was auch mit an der langen lag-Phase liegen könnte. Da der Stamm FUS4.10/pF81 aber keine Verbesserung gegenüber FUS4.4/pF81 darstellte und der zweite Versuch, wenn auch mit leicht abweichenden

Ergebnissen, diese Tendenz bestätigte, wurde von einer zweiten Wiederholung des Versuchs abgesehen.

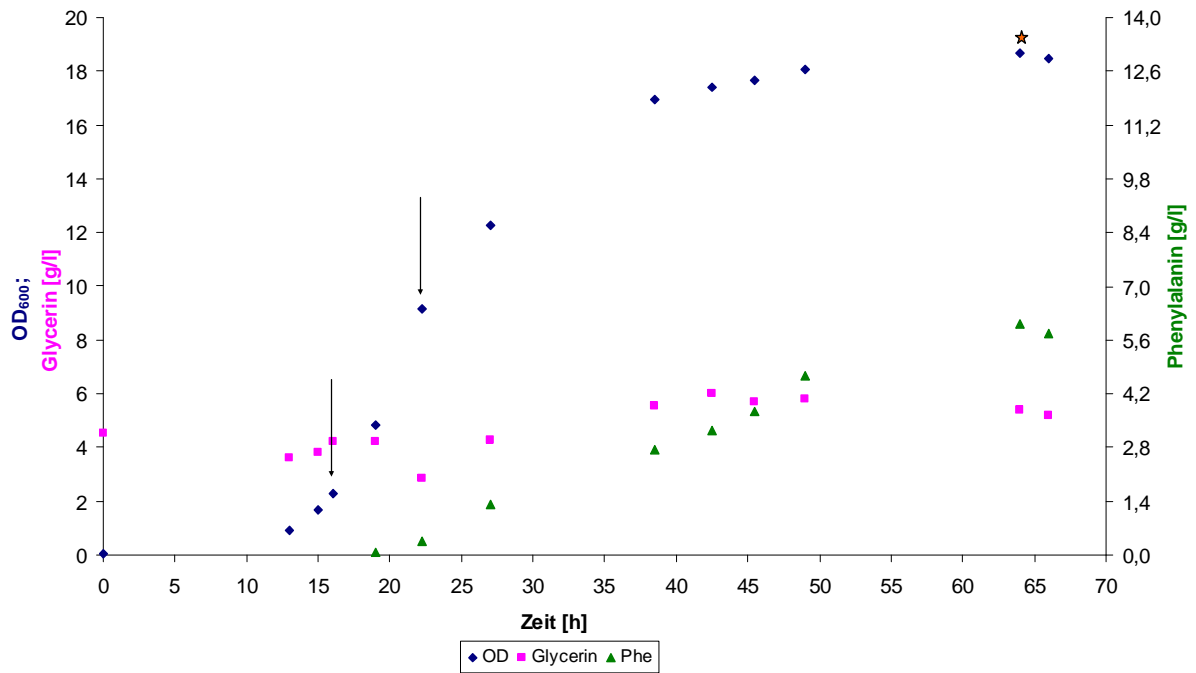


Abbildung 4-51 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4.10/pF81 in Minimalmedium + Glycerin (Startkonzentration 0,5%).

Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin betrug 6,0g/l. Insgesamt wurden 131g Glycerin verbraucht. Die Wachstumsrate betrug $0,30 \text{ h}^{-1}$. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl. auch Kapitel 4.4). Der Stern markiert den Zeitpunkt, an dem die maximale C-Ausbeute erreicht war. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

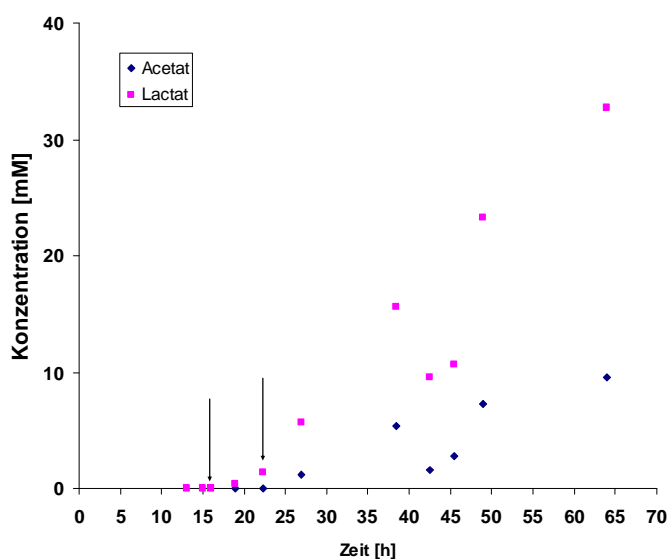


Abbildung 4-52 Nebenproduktanalyse für die Kultivierung von FUS4.10/pF81 in Minimalmedium + Glycerin (Abbildung 4-51).

Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

Insgesamt kann nach diesen Ergebnissen die Aussage getroffen werden, dass die Verringerung des C-Flusses über Pyruvat in den TCA-Zyklus, sowie die Erhöhung des C-Flusses in den Pentosephosphatweg eine Verbesserung in der Produktivität der Stämme bringt, die Kombination beider Maßnahmen aber negative Auswirkungen auf die Produktivität hat. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine Verringerung der intrazellulären Fru-1,6-BP-Konzentration und der damit einhergehenden Aktivierung des Regulators Cra sein (siehe Diskussion).

Tabelle 4-5 Aufgelistet sind die Parameter, die zur Bewertung der Stämme FUS4.8/pF81, FUS4.9/pF81 und FUS4.10/pF81 verwendet wurden

Stamm	FUS4/ pF81	FUS4.4/ pF81	FUS4.7/ pF81	FUS4.8/ pF81	FUS4.9/ pF81	FUS4.10/ pF81
Sauerstoffsättigung [%]	60	60	60	60	60	60
C-Quelle	Glycerin	Glycerin	Glycerin	Glycerin	Glycerin	Glycerin
Wachstumsrate [h^{-1}]	0,27±0,01	0,29±0,01	0,24±0,01	0,29±0,01	0,30±0,01	0,30±0,01
End-OD ₆₀₀ (Tyrosin-limitiert)	17,6±0,17	17,9±0,5	19,1±0,9	18,9±0,75	17,0±0,6	17,8±0,9
Verbrauchte C-Quelle [g]	124,7±10,8	68,9±10,3	122,4±6,3	80,4±13,9	94,3±21,6	107,2±19,7
Phe im Überstand [g/l]	7,9±0,2	9,5±0,8	10,1±0,2	8,6±1,2	8,1±2,1	6,2±0,2
max. g/g-Ausbeute [%]	10,7±1,7	19,9±1,6	15,6±0,4	17,3±0,8	13,7±2,2	13,3±1,8
max. C/C-Ausbeute [%]	18,1±2,3	33,3±2,7	26,0±0,6	28,7±1,0	22,6±3,6	19,0±3,0
Phe-Produktion [g/g(dw)]	1,05±0,03	1,25±0,18	1,2±0,03	1,04±0,19	1,08±0,25	0,8±0,07
Raum-Zeit-Ausbeute [g/l/h]	0,21±0,01	0,26±0,02	0,4±0,02	0,23±0,03	0,25±0,03	0,22±0,03

Der Verlauf der Versuche ist in Abbildung 4-47 und Abbildung 6-10, Abbildung 4-49 und Abbildung 6-11, Abbildung 4-51 und Abbildung 6-12 dargestellt. Im Vergleich hierzu dargestellt sind die Werte für die Stämme FUS4.4/pF81 (Abbildung 4-34 und Abbildung 6-6) und FUS4.7/pF81 (Abbildung 4-44 und Abbildung 6-9). Die Angaben zu verbrauchter C-Quelle, der g/g- und C-Ausbeute beziehen sich auf den Zeitpunkt, an dem die maximale C-Ausbeute erreicht war. Dieser Zeitpunkt ist in den Schaubildern jeweils mit einem Stern markiert (vgl. dazu auch Kapitel 4.4). Die gebildete Menge an L-Phenylalanin bezieht sich auf den Zeitpunkt, ab dem keine weitere Produktzunahme feststellbar war. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

4.10 L-Phenylalaninproduktion nach Knockout von *pykA* und *pykF*

Ziel der Deletion beider Pyruvatkinasen war es, die Produktion organischer Säuren aus Glycerin komplett zu verhindern, um so mehr PEP in die Produktion von L-Phenylalanin zu schleusen. Problematisch ist dabei jedoch, dass der Stamm so nur noch die Möglichkeit hat, über die PEP-Carboxylase (Ppc) zu Oxalacetat (OAA) und Malat und daraus zum Pyruvat und dem TCA-Zyklus zu kommen. Dieser Weg bedeutet für die Zelle aber einen höheren

Energieaufwand, da statt nur einem Enzym (PykA oder PykF) drei gebildet werden müssen und bei der Reaktion der Ppc vom PEP zum OAA das Phosphat abgespalten wird und nicht wie bei der Pyruvatkinase auf ADP übertragen wird. Es geht somit ein ATP verloren. Außerdem besteht die Gefahr, dass ein Substratzyklus („futile cycle“) entstehen könnte, da der Stamm noch in der Lage ist, ausgehend von Pyruvat PEP zu bilden, welches dann wieder zu OAA umgesetzt werden könnte und so zu einem weiteren ATP-Verlust führen würde. Zumindest in der Wachstumsphase ist aber das Erreichen des TCA-Zyklus unerlässlich. Nach der Deletion beider Pyruvatkinasen wurden die Zellen deshalb in der Wachstumsphase zusätzlich mit einer C-Quelle gefüttert, die es den Zellen ermöglichte, den TCA-Zyklus zu erreichen, ohne dabei den Glycerinverbrauch zu inhibieren. Bei den hier durchgeführten Versuchen wurde D,L-Lactat gewählt. D,L-Lactat wird über eine D- oder L- spezifische Lactatdehydrogenase (Garvie, 1980) zu Pyruvat oxidiert und gelangt dann in den TCA-Zyklus (Abbildung 4-53). Während der Fermentation wurden die Zellen bis Erreichen von $OD_{600}=14$ mit Glycerin und Lactat gefüttert. Anschließend wurde die weitere Lactatzugabe gestoppt, so dass ab diesem Zeitpunkt nur noch Glycerin für den Erhaltungsstoffwechsel und die L-Phenylalaninproduktion zur Verfügung stand. Da nach Deletion beider Pyruvatkinasen von Glycerin aus nur noch ein sehr ungünstiger Stofffluss in Richtung TCA-Zyklus stattfinden kann, wurde zunächst untersucht, ob die Deletion beider Isoenzyme ohne zusätzliche Überexpression von *glpX* und/oder *tktA* ausreichend ist, um die Ausbeute zu erhöhen. Aus diesem Grund wurde zunächst der Stamm FUS4.11 (*FUS4 ΔpykA ΔpykF-km*) konstruiert. Die Veränderungen wurden durch P1-Transduktion vorgenommen.

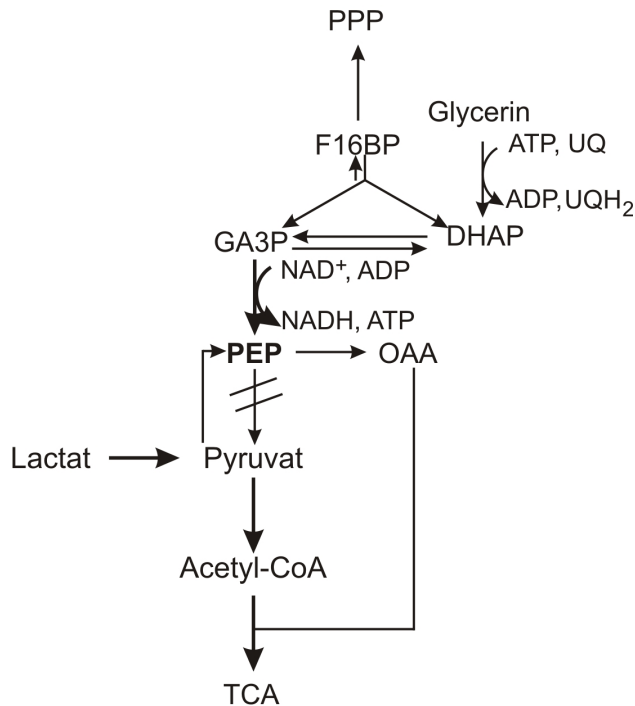


Abbildung 4-53 Schematische Darstellung des erwünschten Stoffwechsels nach Deletion von *pykA* und *pykF*.

Fett dargestellte Pfeile bedeuten eine Erhöhung des C-Flusses.

Der Verlauf der Fermentation mit FUS4.11/pF81 ist in Abbildung 4-54 dargestellt. Die letzte Lactatzugabe erfolgte bei diesem Versuch nach 32 Stunden. Interessant war hier der Verlauf der L-Phenylalaninproduktion. Während im Medium noch Lactat vorhanden war, fand nur eine geringe Zunahme der L-Phenylalaninkonzentration statt. Nachdem das Lactat verbraucht war, konnte eine kurzzeitige Abnahme an L-Phenylalanin festgestellt werden, gefolgt von einer kurzzeitig sehr hohen Produktbildungsrate mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 0,59g/l/h (42-48h). In diesem Zeitabschnitt konnte eine C-Ausbeute von 90% erreicht werden, was dem theoretisch maximal erreichbaren Wert entspricht. Allerdings konnte diese hohe Produktbildungsrate nicht lange aufrechterhalten werden, sondern knickte sehr schnell wieder ein. Die Wachstumsrate war mit $\mu=0,32 \text{ h}^{-1}$ relativ hoch. In einem zweiten Versuch konnte das Produktionsverhalten des ersten Versuchs reproduziert werden. Der Verlauf der zweiten Fermentation ist im Anhang (Abbildung 6-13) dargestellt. Die Wachstumsrate war bei diesem Experiment mit $\mu=0,37 \text{ h}^{-1}$ noch höher als beim ersten Versuch. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass zunächst eine geringe Produktionsrate erreicht wurde. Nachdem Lactat verbraucht war, sank die L-Phenylalaninkonzentration kurzzeitig ab, gefolgt wiederum von einer sehr hohen Produktionsrate mit 0,66g/l/h (43-46h). In diesem Zeitraum wurde eine C-Ausbeute von 65% erreicht. Die letzte Lactatzugabe erfolgte bei diesem Versuch nach 22 Stunden, so dass die hohe Produktbildung auch tatsächlich auf Glycerinverbrauch zurückzuführen ist. Der Zeitabschnitt mit hoher Produktbildung wurde hier nur über 3 Stunden erfasst. Es wäre also möglich, dass die hohe Produktionsrate länger anhält, als

tatsächlich gemessen wurde und letztendlich auch hier wieder kurzzeitig eine noch höhere C-Ausbeute hätte erreicht werden können. Die Ursache der schnellen Abnahme der Produktionsrate ist möglicherweise in der Erschöpfung des ATP-Pools zu suchen. Wie in Kapitel 2.8 dargestellt ist, muss die Zelle theoretisch bei Produktion von L-Phenylalanin auf Basis von Glycerin einen Teil der C-Quelle in den TCA-Zyklus schleusen, um genügend ATP bereit zu stellen. Da bei FUS4.11 über die Pyruvatkinase kein Kohlenstoff in den TCA-Zyklus gelangt, kann ohne Lactat, welches durch die Oxidation zu Pyruvat eine zusätzliche Generierung von Reduktionsäquivalenten bewirkt und somit eine Regenerierung der ATP-Vorräte ermöglichen könnte, sehr schnell ein Ungleichgewicht in der Zelle entstehen, was dann die Produktion von L-Phenylalanin hemmt. Interessant wäre hier, dem Stamm zum Zeitpunkt der starken Produktionsphase wieder geringe Mengen an Lactat zur Verfügung zu stellen. Dies könnte möglicherweise eine ausreichende ATP-Regeneration ermöglichen und so die Produktionsphase unter Umständen verlängern. Außerdem wäre es vermutlich sinnvoll, die Zellen bei $OD_{600}=12$ zu induzieren, so dass die Produktionsphase erst bei Vorhandensein von ausreichend Biomasse beginnt. Somit könnte das schnelle Wachstum auf Glycerin und Lactat genutzt werden, um möglichst schnell genügend Biomasse für die Produktion von L-Phenylalanin zu bekommen. Die Wachstumsraten liegen bei diesen Versuchen mit $\mu=0,35\pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ etwas höher, als bei den übrigen Stämmen. Dies ist aber nicht weiter verwunderlich, da der unveränderte Stamm bei Wachstum auf Glycerin und Lactat ebenfalls eine um 30% erhöhte Wachstumsrate hat. Bei diesem Stamm wurden keine Nebenprodukte detektiert.

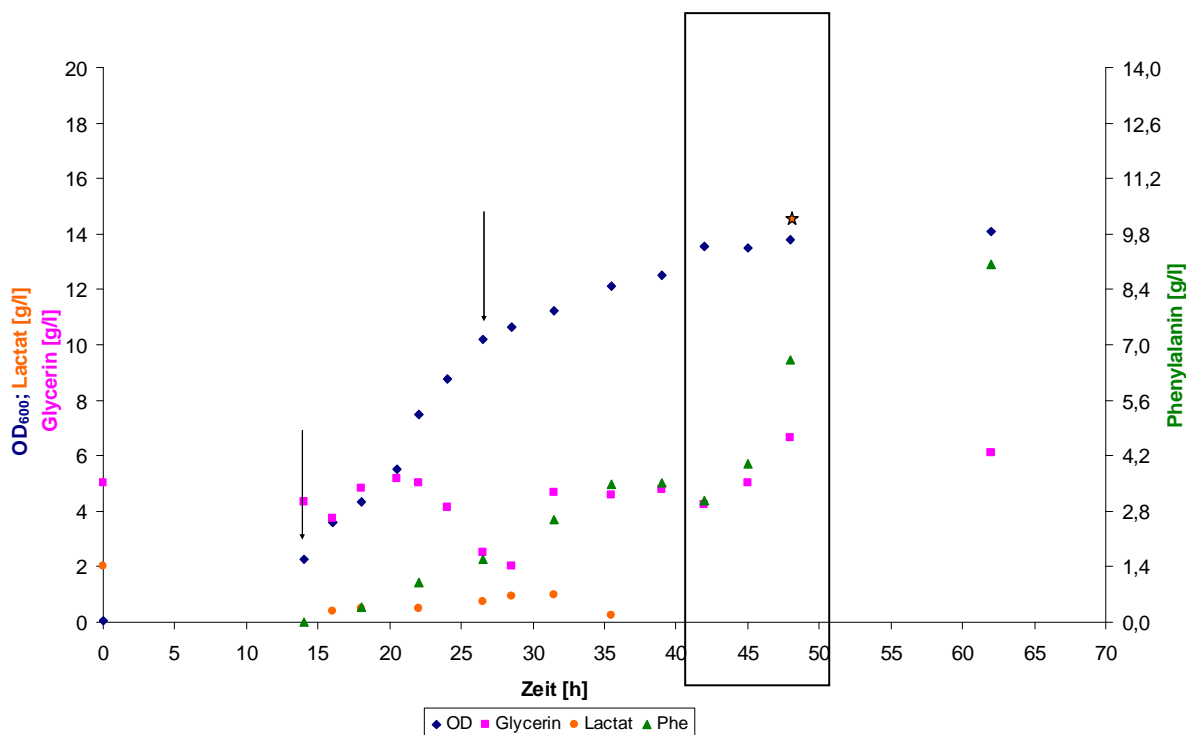


Abbildung 4-54 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4.11/pF81 in Minimalmedium + Glycerin/Lactat (Startkonzentration 0,5% Glycerin, 0,2% Lactat).

Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin betrug 9,0g/l. Insgesamt wurden 78g Glycerin und 27g Lactat verbraucht. Die Wachstumsrate betrug $0,32 \text{ h}^{-1}$. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl. auch Kapitel 4.4). Der Stern markiert den Zeitpunkt, an dem die höchste C-Ausbeute erreicht war. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben. Für den markierten Zeitraum (42-48h) wurden eine Raum-Zeit-Ausbeute von $0,59 \text{ g/l/h}$ und eine C-Ausbeute von 90% erreicht.

4.11 Deletion von *pykA* und *pykF* mit gleichzeitiger Erhöhung des Stoffflusses in den Pentosephosphatweg

Mit dem Stamm FUS4.11/pF81 konnte gezeigt werden, dass kurzzeitig sehr hohe C-Ausbeuten erreichbar sind. Eine Möglichkeit die Produktionsphase zu verlängern, wäre die Verbesserung der Fermentationsbedingungen. Gegebenenfalls könnte aber auch eine weitere Anpassung des Stoffwechselwegs eine Verbesserung der Produktivität bringen. Möglich wäre auch hier eine Erhöhung des Stoffflusses in Richtung Pentosephosphatweg. Für die Berechnung der theoretisch maximalen Ausbeute wurde davon ausgegangen, dass Fru-1,6-BP zu Fructose-6-phosphat umgesetzt wird und dieses dann sofort mit Glycerinaldehyd-3-phosphat zu Xylulose-5-phosphat und Erythrose-4-phosphat reagiert ohne den Umweg über Glucose-6-Phosphat zu machen, da hier der Verlust von einem CO_2 zu erwarten wäre. Es ist jedoch wenig wahrscheinlich, dass tatsächlich kein Stofffluss über Glucose-6-phosphat stattfindet. Bei einer Erhöhung des C-Flusses in den Pentosephosphatweg wird somit auch mit hoher Wahrscheinlichkeit mehr Kohlenstoff den Umweg über Glucose-6-phosphat nehmen.

Dies hätte zwar den Verlust von Kohlenstoff zur Folge, aber es könnten auch 2 weitere Reduktionsäquivalente gebildet werden, die dann für die Regenerierung des ATP-Bedarfs zur Verfügung stehen (vgl. auch Abbildung 2-3). Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden mittels P1-Transduktion folgende Stämme konstruiert:

- FUS4.12 (FUS4 Δ pykA Δ pykF-km Δ gal::P_{tac}::tktA-cat)
- FUS4.13 (FUS4 Δ pykA Δ pykF-km Δ rbs::P_{tac}::glpX-cat)
- FUS4.14 (FUS4 Δ pykA Δ pykF Δ rbs::P_{tac}::glpX Δ gal::P_{tac}::tktA-cat)

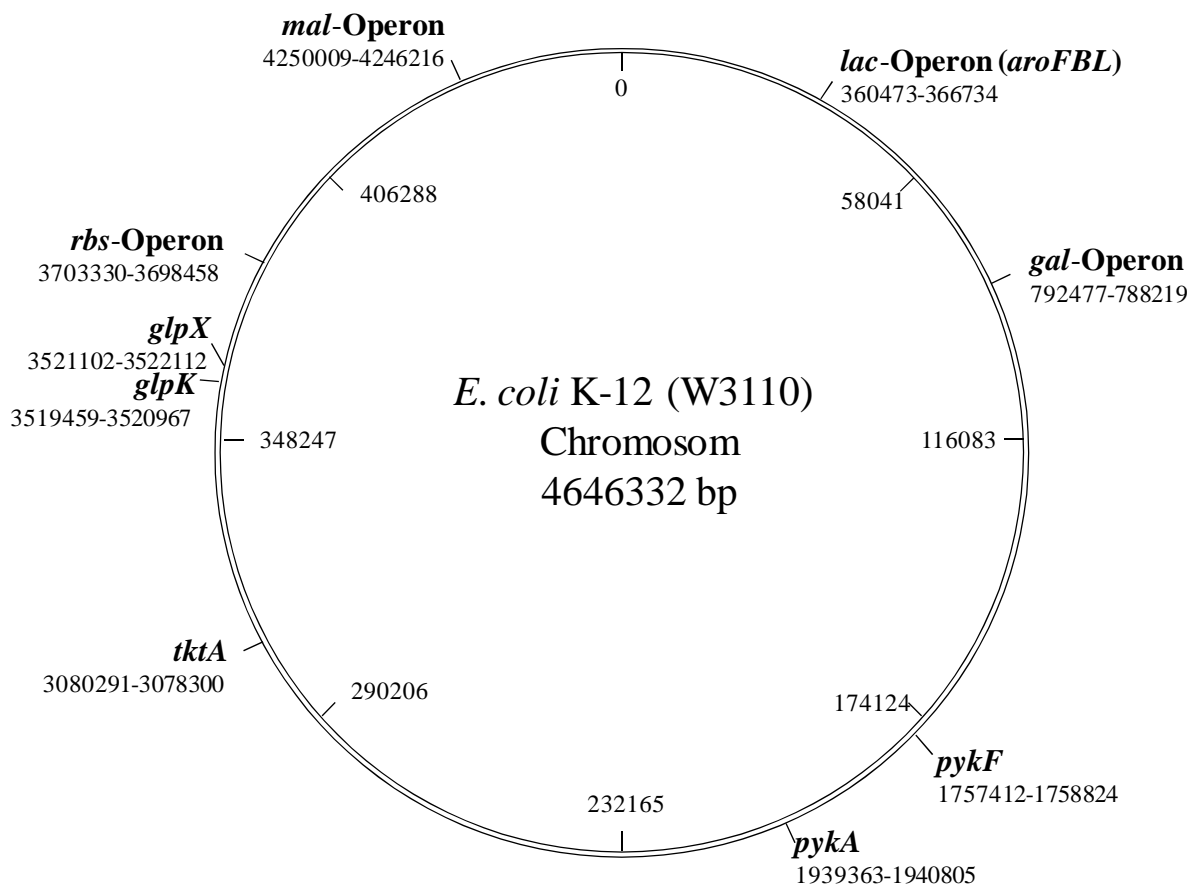


Abbildung 4-55 Schematische Darstellung des *E. coli*-Chromosoms.

Markiert sind die Genorte, die von den hier durchgeführten Veränderungen betroffen sind.

Aus Zeit- und Fermenterkapazitätsgründen wurden diese Stämme nicht alle im Bioreaktor kultiviert und analysiert, sondern zunächst in Schüttelkolben untersucht. Es zeigte sich, dass die Gesamtmenge an produziertem L-Phenylalanin in allen Ansätzen ähnlich war, in Bezug auf Wachstumsrate und Biomasseausbeute der Stamm FUS4.14/pF81 aber einen Vorteil gegenüber FUS4.11-13/pF81 hatte (Riemer, 2010). Für die Kultivierung im Bioreaktor wurde deshalb nur der Stamm FUS4.14/pF81 ausgewählt.

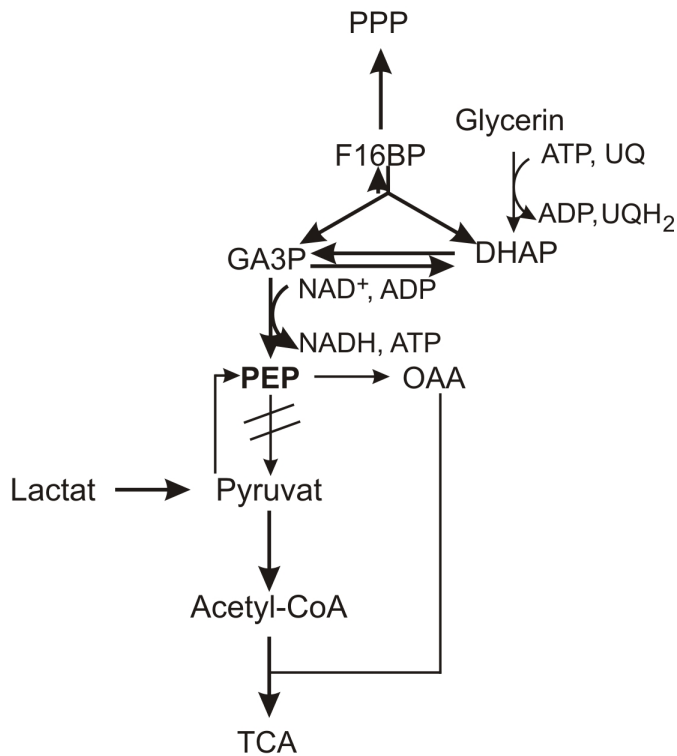


Abbildung 4-56 Schematische Darstellung des erwünschten Stoffwechselwegs nach Deletion von *pykA* und *pykF* und der Integration einer zusätzlichen Genkopie von *glpX* und *tktA*.

Fett dargestellte Pfeile kennzeichnen eine Erhöhung des C-Flusses.

Der Verlauf der Fermentation mit dem Stamm FUS4.14/pF81 ist in Abbildung 4-57 dargestellt. Wie bereits im Schüttelkolben gezeigt wurde, hatte FUS4.14/pF81 mit $\mu=0,42 \text{ h}^{-1}$ eine etwas höhere Wachstumsrate als FUS4.11/pF81 ($\mu=0,35\pm 0,03 \text{ h}^{-1}$). Allerdings konnte das Ziel, die Produktionsphase zu verbessern, nicht erreicht werden. Anders als beim Stamm FUS4.11/pF81 fand hier zwar eine gleichmäßige Produktbildung unabhängig von der Lactatverfügbarkeit statt. Die Raum-Zeit-Ausbeute war aber mit $0,14 \text{ g/l/h}$ sehr gering. Die maximale C-Ausbeute war mit $19,3\%$ nach 49 Stunden erreicht. In dem Zeitabschnitt, in dem den Zellen nur Glycerin zur Verfügung stand und noch L-Phenylalanin gebildet wurde (33-49h), konnte eine C-Ausbeute von $39,7\%$ erreicht werden. Im zweiten Versuch konnten diese Ergebnisse bestätigt werden (Abbildung 6-14). Die Wachstumsrate betrug $\mu=0,41 \text{ h}^{-1}$. Die Raum-Zeit-Ausbeute war beim zweiten Versuch mit $0,13 \text{ g/l/h}$ noch geringer als bei der ersten Fermentation. Die erreichte C-Ausbeute lag bei $21,3\%$ und im Zeitraum ohne Zellwachstum (36-48h) wurde eine C-Ausbeute von $46,1\%$ gemessen. Dies ist eine deutliche Verschlechterung gegenüber dem Stamm FUS4.11/pF81 und zeigt, dass durch die zusätzliche Verstärkung des C-Flusses in den Pentosephosphatweg keine Steigerung der Produktivität erreicht werden konnte.

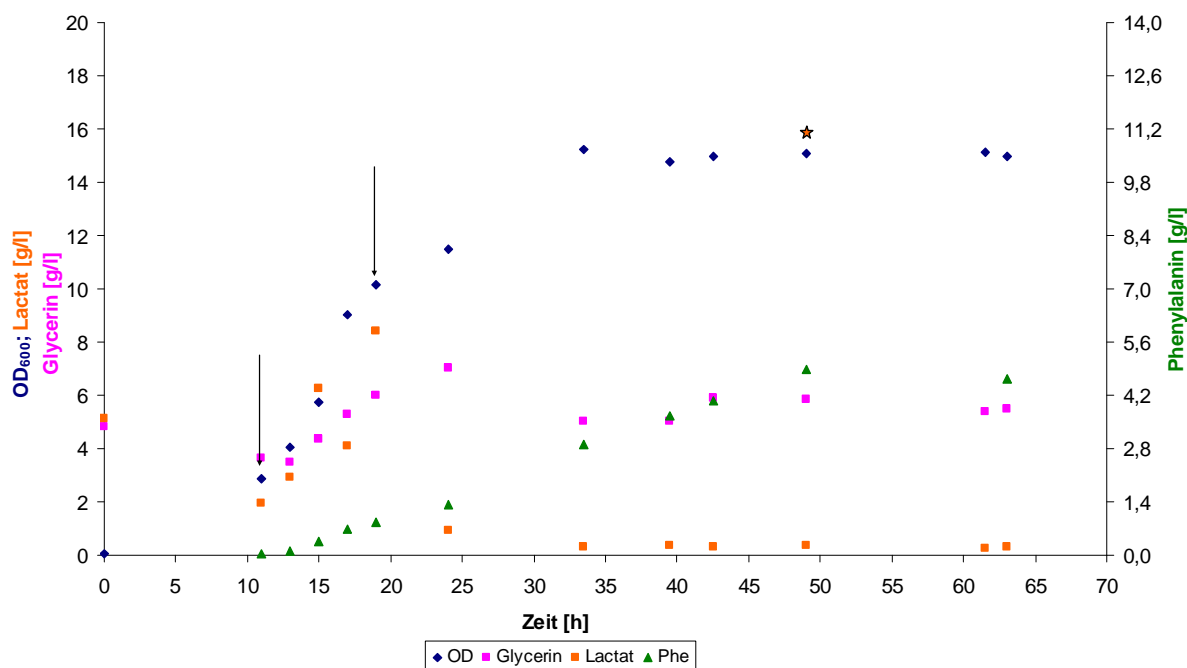


Abbildung 4-57 Verlauf der Fed-Batch-Fermentation von FUS4.14/pF81 in Minimalmedium + Glycerin/Lactat (Startkonzentration 0,5% Glycerin, 0,5% Lactat).

Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin betrug 4,9g/l. Insgesamt wurden 52,2g Glycerin und 33,6g Lactat verbraucht. Die Wachstumsrate betrug $0,42 \text{ h}^{-1}$. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl. auch Kapitel 4.4). Der Stern markiert den Zeitpunkt, an dem die höchste C-Ausbeute erreicht war. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

4.12 Vergleich aller durchgeführten Fermentationen

Um einen besseren Überblick über die gesamten Ergebnisse zu erhalten, sollen abschließend in diesem Kapitel alle durchgeführten Fermentationen miteinander verglichen werden. In Betracht gezogen werden sollen dabei vor allem zwei Parameter: die C-Ausbeute und die Raum-Zeit-Ausbeute. Die C-Ausbeute ist deshalb wichtig, da dieser Wert angibt, wie viel des eingesetzten Substrats letztendlich als Produkt wieder gewonnen werden kann. Für die industrielle Anwendung ist diese Angabe wichtig, da hiermit der Gewinn pro eingesetztem Substrat berechnet werden kann. Wichtiger ist jedoch die Raum-Zeit-Ausbeute, da dieser Wert besagt, in welcher Zeit wie viel Produkt gebildet werden kann. Abbildung 4-58 zeigt eine Übersicht über die bei den hier beschriebenen Fermentationen erhaltenen Ergebnisse bezüglich der C-Ausbeute und der Raum-Zeit-Ausbeute.

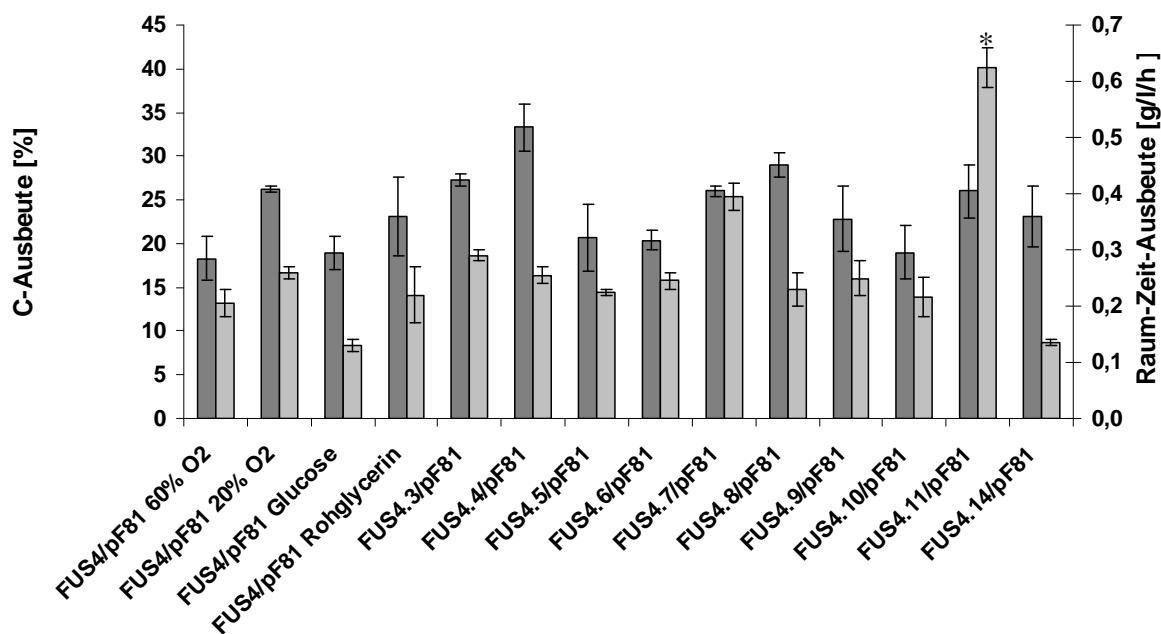


Abbildung 4-58 Darstellung der C-Ausbeute (■) und der Raum-Zeit-Ausbeute (●) aller durchgeführten Fermentationen.

Alle Versuche wurden zwei Mal durchgeführt. (* dieser Wert konnte nur für einen sehr kurzen Zeitraum von 6 Stunden gemessen werden).

Bei dem Vergleich aller Fermentationen wird ersichtlich, dass nicht ein Top-Kandidat ermittelt werden konnte, sondern, je nachdem wie die Prioritäten gesetzt sind, verschiedene Stämme zur Auswahl stehen. Eine besonders hohe C-Ausbeute von $33,3 \pm 2,7\%$ konnte mit dem Stamm FUS4.4/pF81 erreicht werden. Die konstant höchste Raum-Zeit-Ausbeute von $0,4 \pm 0,02 \text{ g/l/h}$ wurde bei dem Stamm FUS4.7/pF81 gemessen. Bei FUS4.11/pF81 wurde zwar ein deutlich höherer Wert von $0,63 \pm 0,03 \text{ g/l/h}$ erreicht, dieser konnte aber nur für 6 Stunden aufrechterhalten werden. Hier wäre eine weitere Optimierung des Stammes und der Fermentationsparameter unabdingbar. Wird die Produktivität über einen längeren Zeitraum betrachtet, sind die Stämme FUS4.4/pF81 und FUS4.7/pF81 am interessantesten. Für diese beiden Stämme wurde deshalb auch eine C-Bilanz erstellt und mit dem unveränderten Stamm verglichen. Da bei dem hier verwendeten System keine Abgasanalyse vorhanden ist, konnte keine geschlossene Bilanz erstellt werden. Der höchste erreichte Wert an zurückverfolgbarem Kohlenstoff waren knapp 37% bei FUS4.4/pF81. Für die Berechnung des Glycerinbedarfs zur Bildung der Biomasse wurde von $12,14 \text{ mM Glycerin/g [dw]}$ ausgegangen (Andersen und von Meyenburg, 1980). Für die Ermittlung des Verlustes an CO_2 wurden keine Literaturdaten

herangezogen, da die Werte von Stamm zu Stamm und je nach C-Quelle doch sehr unterschiedlich sein können (Andersen und von Meyenburg, 1980). Einen groben Anhaltspunkt über die Größenordnung des CO₂-Verlustes geben aber Experimente mit dem Wildtyp *E. coli* W3110 (Yang *et al.*, 2003) und mit dem Stamm *E. coli* 4pF81 (Rüffer, 2004). In Untersuchungen zum Metabolismus mit Glucose als C-Quelle war gezeigt worden, dass bei einer Wachstumsrate von $\mu=0,32$ knapp die Hälfte der aufgenommenen C-Quelle wieder als CO₂ ausgeschieden wurde (Yang *et al.*, 2003). Bei der Produktion von L-Phenylalanin mit dem Vorläufer von FUS4/pF81, *E. coli* 4pF81, war mit Glucose als C-Quelle gemessen worden, dass auch hier der Anteil des CO₂ am Gesamtverbrauch bei etwa 50% lag (Rüffer, 2004). Es ist also zu erwarten, dass mit einer Abgasanalyse ein deutlich höherer C-Anteil zurückverfolgt werden könnte.

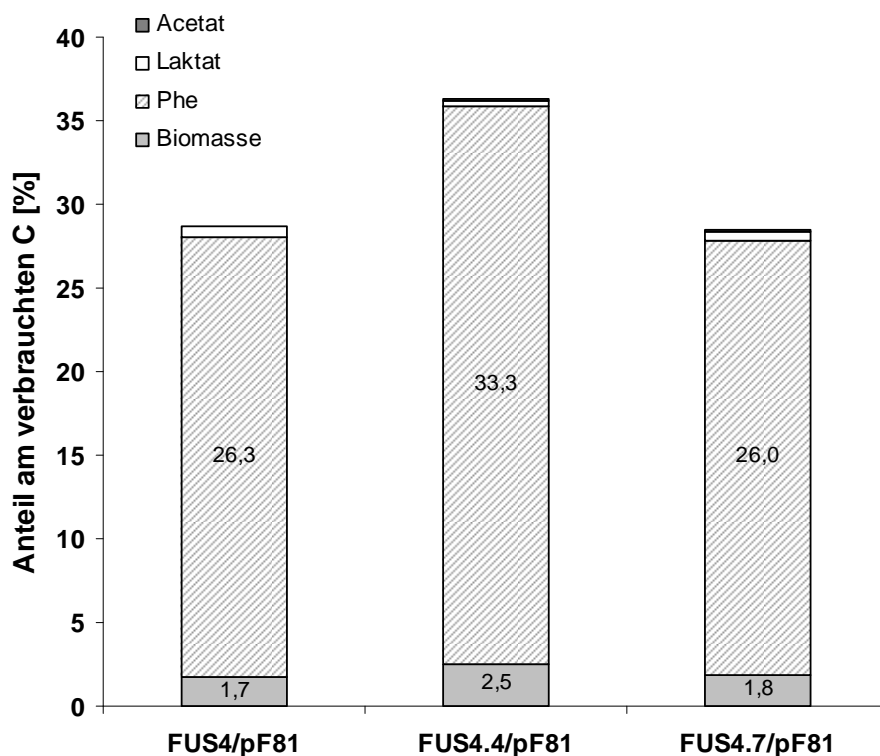


Abbildung 4-59 C-Bilanzierung der Stämme FUS4/pF81, FUS4.4/pF81 und FUS4.7/pF81.

Die Bilanzierung wurde für den Zeitpunkt der höchsten C-Ausbeute durchgeführt. Erfasst wurden die Biomasse, L-Phenylalanin, Laktat und Acetat. Gerechnet wurde mit den Mittelwerten der beiden beschriebenen Fermentationen (vgl. Tabelle 4-5).

5 Diskussion und Ausblick

Ziel dieses Projektes war die Produktion von L-Phenylalanin mithilfe des rekombinanten *E. coli*-Stammes FUS4/pF81 (Sprenger und Trachtmann, unveröffentlicht) und als C-Quelle sollte hierfür, anstelle der sonst üblichen C-Quelle Glucose, Glycerin und letztendlich Rohglycerin, welches als Abfallprodukt bei der Biodieselproduktion anfällt, eingesetzt werden. Glycerin eignet sich als C-Quelle besonders für die Produktion von aromatischen Aminosäuren wie L-Phenylalanin, da die Biosynthese dieser Aminosäuren aus den Vorläufermolekülen PEP und E4P erfolgt und zudem energieaufwändig ist (vgl. Kapitel 2.8). Da Glycerin ein hohes Reduktionspotential besitzt, würde sich diese C-Quelle auch für die anaerobe Produktion reduzierter Chemikalien und Treibstoffe wie z.B. Butanol, Ethanol, Succinat oder 1,2-Propandiol eignen (Murarka *et al.*, 2008). Der von Gonzalez *et al.*, 2008 vorgeschlagene Weg zum anaeroben Abbau von Glycerin in *E. coli* ist in Kapitel 2.4 dargestellt. Es war gezeigt worden, dass *E. coli* unter anaeroben Bedingungen Glycerin zunächst über die Glycerindehydrogenase NAD^+ -abhängig zu DHA oxidiert und dann über die PEP-abhängige DHA-Kinase zu DHAP phosphoryliert. Der Vorteil dieses Weges besteht darin, dass nicht wie bei dem unter aeroben Bedingungen aktiven Stoffwechselweg UQ (vgl. Abbildung 2-3), sondern NAD^+ reduziert wird und somit das Reduktionspotential von Glycerin besser ausgenutzt werden könnte. Allerdings steht unter anaeroben Bedingungen kein Sauerstoff als Elektronenakzeptor zur Verfügung, weshalb die Zellen hauptsächlich über die Bildung von Acetat ATP regenerieren und dabei Kohlenstoff in Form von CO_2 verlieren (Yazdani und Gonzalez, 2008; Murarka *et al.*, 2008). Die anaerobe Glycerinverwertung ist deshalb nur für die Produktion ATP-unabhängig gebildeter, reduzierter Chemikalien interessant, aber nicht für die Synthese von Stoffen, die von der Zelle mit einem hohen ATP-Aufwand produziert werden. In anderen Organismen wie z. B. *K. aerogenes*, deren anaerobe Glycerinverwertung schon lange bekannt ist, wird zur Regenerierung des NAD^+ 1,3-Propandiol gebildet (Ruch *et al.*, 1974; Lin, 1976; Bouvet *et al.*, 1995). Da *E. coli* nicht in der Lage ist, 1,3-Propandiol zu bilden, war davon ausgegangen und auch gezeigt worden, dass für diesen Organismus das Vorhandensein eines Elektronenakzeptors, wie z. B. Fumarat oder Nitrat notwendig ist (Lin, 1976; Bouvet *et al.*, 1994). Von Gonzalez *et al.*, war dann aber gezeigt worden, dass *E. coli* mit Glycerin als C-Quelle unter anaeroben Bedingungen über Methylglyoxal und Hydroxyaceton 1,2-Propandiol bilden kann (Abbildung 2-8). Dies würde zum Teil eine NAD^+ -Regenerierung unter anaeroben Bedingungen ermöglichen. Problematisch bei diesem Weg ist die Bildung von Methylglyoxal, welches toxisch für die

Zellen ist (Cooper, 1984; Ferguson *et al.*, 1998). Zudem waren bei diesen Versuchen bei einer Startkonzentration von 110 mM Glycerin nur 0,5 mM 1,2-Propandiol gebildet und dem Medium zusätzlich Hefeextrakt zugefügt worden, dessen Bestandteile ebenfalls als Elektronenakzeptoren dienen könnten. Es ist deshalb fraglich, ob die gebildete Menge an 1,2-Propandiol ausreicht, um das intrazelluläre Gleichgewicht der Reduktionsäquivalente aufrecht zu erhalten. Es war zwar gezeigt worden, dass die 1,2-Propandiolbildung in Zusammenhang steht mit der anaeroben Glycerinassimilation, aber in genau diesen Versuchen war auch gezeigt worden, dass der Wildtyp in einem reinen Minimalmedium mit Glycerin unter anaeroben Bedingungen nur dann wachsen kann, wenn Hydroxyaceton, das Vorläufermolekül von 1,2-Propandiol und gleichzeitiger Induktor von *gldA* (vgl. Kapitel 2.2), dem Medium zugegeben wird, oder der Stamm zusätzlich über ein Plasmid die Gene *gldA* und *mgsA* (codiert für die Methylglyoxalsynthase (Hopper und Cooper, 1972)) überexprimiert (Gonzalez *et al.*, 2008). Auch in den weiteren Arbeiten zur Untersuchung des anaeroben Glycerinstoffwechsels in *E. coli* war nicht gezeigt worden, dass dieser Organismus anaerob in einem reinen Minimalmedium mit Glycerin als C-Quelle wachsen kann, da den Medien bei allen Versuchen Trypton oder Hefeextrakt zugefügt worden war (Dharmadi *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2008; Murarka *et al.*, 2008). Dies könnte bedeuten, dass *E. coli* unter anaeroben Bedingungen in einem Minimalmedium ohne externen Elektronenakzeptor und nur mit Glycerin als C-Quelle deshalb nicht wachsen kann, weil das für diesen Stoffwechselweg notwendige Gen *gldA* nicht durch Glycerin, sondern durch Hydroxyaceton induziert wird (Jin *et al.*, 1983; Truniger und Boos, 1994). Es war zwar mittels U-¹³C-markiertem Glycerin gezeigt worden, dass das Glycerin unter anaeroben Bedingungen von *E. coli* tatsächlich für die Bildung von Biomasse und Nebenprodukten wie Ethanol verwendet wurde (Murarka *et al.*, 2008), aber es war in diesen Arbeiten nicht geklärt worden, warum es notwendig war, dem Minimalmedium Komplexmedien wie Hefeextrakt oder Trypton zuzugeben. Es stellt sich deshalb die Frage, ob und inwiefern mit *E. coli* tatsächlich eine wirtschaftlich interessante, anaerobe Glycerinverwertung möglich ist, da auch die Wachstumsrate, die gebildete Biomasse und die Menge an verstoffwechseltem Glycerin sehr gering ist. Es war gezeigt worden, dass der Wildtyp *E. coli* MG1655 in der Lage ist, unter anaeroben Bedingungen innerhalb von 110 Stunden 8,8 g/l Glycerin (Startkonzentration: 10 g/l) zu verbrauchen (Dharmadi *et al.*, 2006). Ein Vergleich dieses Werts mit den hier erhaltenen Werten zeigt, dass der Glycerinverbrauch unter anaeroben Bedingungen sehr gering ist. Mit dem Stamm FUS4/pF81 waren unter aeroben Bedingungen in 64 Stunden etwa 70-80 g/l Glycerin verbraucht worden. Ebenfalls zu beachten ist, dass bei Dharmadi *et al.* 1,2 g/l

Glycerin im Medium verblieben waren. Dies könnte eventuell problematisch bei einer Produktaufreinigung werden. Bei Dharmadi *et al.* waren zudem Wachstumsraten von $\mu = 0,04 \text{ h}^{-1}$ gemessen worden. Dies entspricht einer Verdopplungszeit von etwa 17 Stunden und ist damit uninteressant für industrielle Prozesse, bei denen auch die Raum-Zeit-Ausbeute eine sehr wichtige Rolle spielt. Ebenfalls beachtet werden sollte, dass in diesen Arbeiten nur Biomasse im Bereich von 500mg/l gebildet worden war. Die Biomasseausbeute ist somit ebenfalls uninteressant für die industrielle Anwendung. Auch in einer anderen Arbeit war die anaerobe Dissimilation von Glycerin mit ähnlichen Werten für Biomassebildung und Glycerinverbrauch beschrieben worden (Zhang *et al.*, 2010). Hier war die Produktion von Succinat untersucht worden. Die Raum-Zeit-Ausbeute war zwar nicht angegeben worden, aber es war berichtet worden, dass 80% der theoretisch maximalen mol/mol-Ausbeute erreicht wurde. In zwei der durchgeführten Versuche trat jedoch Lactat als Hauptnebenprodukt auf. Die Autoren dieser Studie führen an, dass die Bildung von Lactat nicht zum Redoxausgleich beiträgt und deshalb vermutlich geringe Mengen an Sauerstoff im Fermenter waren, was dann einen Teil der NADH-Regeneration beisteuerte. Da die Autoren hier selbst an der Zuverlässigkeit ihres Systems zweifeln, stellt dies leider auch die Versuche in Frage, bei denen kein Lactat als Nebenprodukt gemessen worden war. Prinzipiell würde zwar die anaerobe Glycerinassimilation Vorteile bringen bei der Produktion hochreduzierter Chemikalien, da aufgrund des höheren Reduktionspotentials von Glycerin eine höhere maximal mögliche C-Ausbeute im Vergleich zu Glucose erreicht werden kann. Für die praktische Anwendung müssen aber noch erhebliche Verbesserungen in Wachstumsrate, Glycerinverbrauch und Biomasseausbeute erreicht werden. Solange diese Limitationen nicht überwunden sind, ist auf jeden Fall die aerobe Glycerinassimilation klar im Vorteil.

Erste Versuche mit dem Wildtyp *E. coli* LJ110 zeigten die generelle Verwertbarkeit von Rohglycerin im Vergleich zu Glycerin oder Glucose (Kapitel 4.1.1 und Tabelle 5-1). Die erhaltenen Werte für die Wachstumsraten lagen bei $\mu = 0,64 \text{ h}^{-1}$ (Glucose), $\mu = 0,48 \text{ h}^{-1}$ (Glycerin) und $\mu = 0,46 \text{ h}^{-1}$ (Rohglycerin).

Tabelle 5-1 Vergleich der Wachstumsraten von *E. coli* LJ110 und *E. coli* FUS4/pF81 im Schüttelkolben mit Literaturwerten

	<i>E. coli</i> LJ110	<i>E. coli</i> FUS4/pF81	Literaturwerte
Glucose	0,64 ±0,01	0,4±0,03	0,8 (Neidhardt et al., 1990)
Glycerin	0,48±0,01	0,29±0,05	0,23-0,55 (Ibarra et al., 2002)
Rohglycerin	0,46±0,01	0,29±0,06	kein direkter Vergleich möglich

Alle Wachstumsraten sind angegeben in $\mu = \text{h}^{-1}$.

Ein Vergleich der erhaltenen Werte mit Literaturdaten ist zumindest für Rohglycerin nicht ganz einfach. Der Grund hierfür ist, dass mit dieser C-Quelle kaum Versuche zur generellen Verwertbarkeit durch den Wildtyp *E. coli* durchgeführt worden waren, sondern hauptsächlich der Austausch von Glycerin durch Rohglycerin in bereits bestehende Produktionsprozessen untersucht worden war und auch die beschriebenen Ergebnisse deutlich abweichend waren. Bei Wachstumsexperimenten in Flüssigmedium (3ml Medium in Reagenzglas mit 15ml Gesamtvolumen) mit dem Wildtyp *E. coli* MG1655 war beobachtet worden, dass auf Rohglycerin kein Wachstum möglich ist (Rumbold *et al.*, 2009). In anderen Publikationen war zwar nicht explizit auf die Wachstumsrate eingegangen, für Glycerin-basierende Produktionsprozesse aber gezeigt worden, dass der problemlose Austausch von Glycerin und Rohglycerin möglich war. Ein Beispiel ist die anaerobe Produktion von Ethanol und Wasserstoff (Yazdani und Gonzalez, 2008). Hier war gezeigt worden, dass der Austausch von Glycerin durch Rohglycerin ohne Einschränkungen machbar war. Auch für die Produktion von 1,3-Propanediol mithilfe von *K. pneumoniae* war gezeigt worden, dass die Produktivität auf Rohglycerin vergleichbar war mit der auf reinem Glycerin (Mu *et al.*, 2006). Eine weitere Anpassung der Stämme an die C-Quelle Rohglycerin, z.B. durch metabolic engineering, war dabei bisher nicht beschrieben worden. Unterschiede in diesen Veröffentlichungen bestehen deshalb hauptsächlich in der Medienzusammensetzung und der eingesetzten Menge an C-Quelle. Möglich wäre, dass die bei Rumbold *et al.* verwendete Anfangskonzentration von 40g/l Rohglycerin zu hoch für die Zellen war. Mit dem Stamm FUS4/pF81 war zwar auch bei 100g/l Rohglycerin noch Wachstum beobachtet worden (Kapitel 4.1.4), möglicherweise ist dies aber auch auf Unterschiede in den Rohglycerinchargen zurückzuführen. Für Glycerin war in Experimenten zur adaptiven Evolution mit dem Stamm *E. coli* MG1655 gezeigt worden, dass die Wachstumsrate zu Beginn des Experiments bei etwa $0,23 \text{ h}^{-1}$ lag und gegen Ende $0,55 \text{ h}^{-1}$ erreichte (Ibarra *et al.*, 2002). Die Verbesserungen im Wachstum waren in diesen Experimenten auf eine optimierte Sauerstoffaufnahme zurückgeführt worden. Da diese Autoren nicht beschrieben, wie die Zellen vor dem Wachstumsversuch behandelt worden waren, könnte es sein, dass die mit *E. coli* LJ110 durchgeführte Adaptation der Zellen an Wachstum auf Minimalmedium (vgl. Kapitel 3.3) dazu führte, dass hier gleich zu Beginn relativ hohe Wachstumsraten von $0,48 \text{ h}^{-1}$ erhalten worden waren (Kapitel 4.1). Für Glucose war in der Literatur für den Wildtyp $\mu = 0,8 \text{ h}^{-1}$ veröffentlicht worden (Neidhardt *et al.*, 1990). Dieser Wert ist somit etwas höher als der hier gemessene Wert, was daran liegen könnte, dass die Bedingungen möglicherweise nicht optimal waren und z. B. die Sauerstoffversorgung limitierend für das Wachstum war. Die Wachstumsraten des Stammes FUS4/pF81 waren auf

allen C-Quellen etwas geringer als beim Wildtyp (Kapitel 4.1.3). Zurückzuführen ist dies vermutlich auf die chromosomalen Veränderungen oder die Auxotrophie für L-Tyrosin und L-Phenylalanin dieses Stammes. Untersuchungen zum Wachstums- und Produktionsverhalten von FUS4/pF81 im Schüttelkolben bei unterschiedlichen Konzentrationen an Glycerin oder Rohglycerin ergaben, dass bei geringen Konzentrationen ($\leq 1,5\%$) keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden C-Quellen gemessen werden konnten (Kapitel 4.1.4). Bei höheren Konzentrationen an Rohglycerin wurde dann das Wachstum, nicht aber die Produktivität gehemmt. Dies führt zu dem Schluss, dass die im Rohglycerin enthaltenen Verunreinigungen ab einer gewissen Konzentration einen negativen Einfluss auf den Zellmetabolismus ausüben. Da nur das Zellwachstum, aber nicht die Produktivität oder der Glycerinverbrauch gehemmt wurde, wäre es möglich, dass die im Rohglycerin enthaltenen Verunreinigungen gezielt nur die Zellteilung inhibieren. Eine Möglichkeit, wie Verunreinigungen im Rohglycerin die Zellteilung hemmen könnten, ergibt sich bei der Betrachtung des Min-Systems. Dieses System ist dafür verantwortlich, dass die Zellteilung immer in der Mitte der Zelle und nicht an Polen auftritt (Harry, 2001; Lutkenhaus, 2007). Es war weiterhin gezeigt worden, dass dieses System in Abhängigkeit von Phospholipiden arbeitet (Hu und Lutkenhaus, 2001; Zhou und Lutkenhaus, 2003; Mileykovskaya *et al.*, 2003). Da Rohglycerin Phospholipide enthalten kann (Xu *et al.*, 1992), wäre es möglich, dass diese mit dem Min-System interagieren und so zwar die Zellteilung aber nicht den Metabolismus stören. Hier könnten mikroskopische Untersuchungen weiteren Aufschluss liefern. Auffällig waren bei den Versuchen zur Untersuchung von FUS4/pF81 aber die hohen Fehlerabweichungen mit Rohglycerin als C-Quelle. Dies könnte möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass die Verunreinigungen im Rohglycerin eventuell nicht alle gleichmäßig verteilt sind, sondern auch teilweise mit der Asche verklumpen und sich an der Oberfläche absetzen (vgl. Abbildung 2-10). Aufgrund dieser Eigenschaft ist es wahrscheinlich nicht gewährleistet, dass die Menge an Verunreinigungen in jedem Ansatz gleich ist. Ein weiteres Problem könnte darin bestehen, dass diese Verunreinigungen möglicherweise auch die Analytik stören und es deshalb zu abweichenden Ergebnissen kommt. Im Gegensatz zu den Versuchen im Schüttelkolben zeigte sich dagegen im Fermenter, dass der Einsatz dieser C-Quelle im Fed-batch-Verfahren ohne signifikante Probleme, wie z.B. verringertes Wachstum, geringe oder stark abweichende Produktivität oder erhöhte Schaumbildung möglich ist (Kapitel 4.6). Die Wachstumsrate war mit $0,32 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ sogar etwas höher als mit reinem Glycerin ($0,26 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$), die Produktivität mit einer C-Ausbeute von $23,2 \pm 4,5\%$ und einer Raum-Zeit-Ausbeute von $0,41 \pm 0,03 \text{ g/l/h}$ lag in einem ähnlichen Bereich wie

mit reinem Glycerin ($26,3 \pm 0,3\%$ und $0,44 \pm 0,04$ g/l/h). Die Werte bei Rohglycerin scheinen zwar etwas geringer zu sein. Die Berücksichtigung der Fehlerabweichung zeigt aber, dass die Werte in ähnlichen Bereichen liegen. Auch hier fällt auf, dass die Fehlerabweichung mit Rohglycerin als C-Quelle bei der C-Ausbeute deutlich höher ausfällt als mit reinem Glycerin. Ein möglicher Grund könnte bei diesen Versuchen, wie auch bei den Experimenten im Schüttelkolben, die Verunreinigungen im Rohglycerin sein. Die lange lag-Phase bei der zweiten Fermentation mit Rohglycerin könnte zwar dafür sprechen, dass die verwendete C-Quelle problematisch ist, aber es kam mit dem Stamm FUS4/pF81 auch bei den C-Quellen Glycerin und Glucose immer wieder zu langen lag-Phasen (auch bei Überimpfung aus dem gleichen Vormedium), weshalb dies nicht auf die verwendete C-Quelle zurückgeführt werden kann. Da im Fermenter insgesamt kein bedeutsamer Nachteil durch Rohglycerin beobachtet worden war, wäre es möglich, dass bei einer kontinuierlichen Zugabe die inhibierenden Stoffe abgebaut werden und deshalb keinen Einfluss mehr auf den Verlauf der Fermentation haben. In den weiteren Arbeiten wurde deshalb der Focus darauf gelegt, den Glycerinstoffwechsel so zu verändern, dass eine bessere Produktivität mit Glycerin als C-Quelle erhalten werden kann. Für die Glycerin-basierte Produktion von L-Phenylalanin mit einem *E. coli*-Stamm waren bereits sehr hohe Werte veröffentlicht worden (Khamduang *et al.*, 2009). Es war von einer Ausbeute von 0,58g/g berichtet worden. Wird dieser Wert umgerechnet auf die C-Ausbeute (Glycerin: 39,1g C/100g, L-Phe 65,5g C/100g) ergibt sich ein Wert von 95%. Dieser Wert kann aber theoretisch nicht erreicht werden, da für jedes gebildete Molekül L-Phenylalanin ein Molekül CO₂ verloren geht und somit nur eine maximale Ausbeute von 90% erreicht werden kann (Kapitel 2.8). Da die beschriebenen Versuche im Batch-Verfahren durchgeführt worden waren und nicht nur die Produktionsphase, sondern der komplette Verlauf betrachtet worden war, kann selbst bei einer Rückgewinnung des abgespaltenen CO₂ keinesfalls eine C-Ausbeute von 95% erreicht werden, da auch für die Bildung der Biomasse ein Teil der C-Quelle benötigt wird. Auch etwaige auftretende Nebenprodukte waren nicht erwähnt worden. Ebenfalls fragwürdig erscheint der verwendete *E. coli*-Stamm BL21(DE3) und die Stammhaltung. Bis auf eine Plasmid-codierte Genkopie, welche für die L-Phenylalanindehydrogenase aus *Acinetobacter lwoffii* codiert, war der Stamm genetisch nicht weiter für die Produktion von L-Phenylalanin angepasst worden. In zahlreichen früheren Studien (vgl. auch Kapitel 2.7) zur Produktion aromatischer Aminosäuren und anderen Komponenten aus diesem Biosyntheseweg war aber gezeigt worden, dass weitere Veränderungen, wie die Überexpression von *aroF*, *aroB* und *aroL* notwendig sind, um Limitierungen in diesem Biosyntheseweg zu umgehen (Dell und Frost, 1993; Gerigk *et al.*,

2002; Ikeda, 2003; Rüffer, 2004; Oldiges *et al.*, 2004; Sprenger, 2007b). Für die Stammhaltung war beschrieben worden, dass sie über Wochen auf LB-Agarplatten im Kühlschrank erfolgte (Khamduang *et al.*, 2009). Nach Beimpfen von Minimalmedium war dann nach etwa 16-18 Stunden $OD_{600} = 0,6-0,8$ erreicht worden. Da während der Durchführung der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche mit dem Wildtyp-Stamm ohne Plasmid und ohne Selektionsdruck durch ein Antibiotikum beobachtet wurde, dass nach etwa 3-wöchiger Lagerung des Stammes auf LB-Agarplatten kein Wachstum mehr auf Minimalmedium möglich war, erscheint diese Aussage fraglich. Auch die Tatsache, dass der Stamm nicht vor jedem Experiment frisch transformiert wurde, erscheint ungewöhnlich. Weiterhin scheinen die Durchführung und Ergebnisse der Experimente etwas fragwürdig zu sein. Laut dem Material- und Methodenteil war die Hauptkultur mit $OD_{600} = 0,03-0,04$ gestartet worden, allerdings war entsprechend den Schaubildern kein logistisches, sondern logarithmisches Wachstum beobachtet worden, was für biologische Systeme doch eher ungewöhnlich ist. Auch die analytischen Methoden scheinen außergewöhnlich kompliziert zu sein. Es waren für alle nachzuweisenden Substanzen (L-Phenylalanin, Glycerin und Ammoniumsulfat) zunächst Derivatisierungen vorgenommen worden, die entstandenen Stoffe waren dann getrocknet, anschließend wieder in einem nicht näher definierten Volumen aufgenommen und schließlich analysiert worden. Diese Vorgehensweise scheint doch eher aufwändig und auch fehleranfällig zu sein. Da diese Arbeit deswegen wenig vertrauenswürdig erscheint, wurden diese Ergebnisse nicht als Vergleichswert betrachtet. Für einen Vergleich wurden deshalb die von Rüffer, 2004 mit dem Stamm F4/pF81 veröffentlichten Werte herangezogen. Im Gegensatz zu F4 sind bei dem Stamm FUS4 zusätzlich die Gene *aroF*, *aroB* und *aroL* unter einem *tac*-Promotor chromosomal ins *lac*-Operon integriert (Sprenger und Trachtmann, unveröffentlicht). Der Stamm FUS4 kann also nach Induktion mit IPTG Plasmid-unabhängig diese drei Gene exprimieren und sollte deshalb auch insgesamt eine etwas höhere Menge der entsprechenden Proteine haben. Da die Experimente mit F4/pF81 mit Glucose als C-Quelle durchgeführt worden waren, sollen zunächst die mit dieser C-Quelle erhaltenen Ergebnisse verglichen werden.

In dem hier verwendeten System konnte mit dem Stamm FUS4/pF81 eine Wachstumsrate von $0,49 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$, eine C-Ausbeute von $18,2 \pm 2,6\%$ und eine Raum-Zeit-Ausbeute von $0,23 \pm 0,02 \text{ g/l/h}$ erreicht werden (Kapitel 4.6). Für den Stamm F4/pF81 war die Wachstumsrate nicht explizit berechnet worden (Rüffer, 2004), in der Produktionsphase war aber eine C-Ausbeute von 20-26% beobachtet worden. Die Produktionsphase bezieht sich in diesem Fall auf den Zeitabschnitt, während dem kaum noch Biomassezunahme stattfand. Für den

Zeitraum ohne Biomassezunahme waren auch bei FUS4/pF81 C-Ausbeuten über 20% erreicht worden, so dass diese Werte vergleichbar sind. Nicht vergleichbar ist dagegen die Raum-Zeit-Ausbeute, die bei Ruffer 1,05 g/l/h erreichte. Dies ist aber vermutlich auf Unterschiede in der Prozessführung zurückzuführen. Während der Bioreaktor bei Ruffer mit einer Zelldichte von $OD_{620} = 40-50$ betrieben worden war, wurde in der vorliegenden Arbeit nur mit $OD_{600} = 15-20$ gearbeitet, so dass insgesamt weniger Zellen für die L-Phenylalaninbildung zur Verfügung standen. Der Grund für das Arbeiten mit einer geringeren Biomassekonzentration war die bessere Reproduzierbarkeit. Da der Stamm FUS4/pF81 mit Glycerin als C-Quelle nur relativ geringe Wachstumsraten von $\mu = 0,25-0,3 \text{ h}^{-1}$ aufwies, wäre die Wachstumsphase bis Erreichen von $OD_{620} = 40-50$ zu lange gewesen, um bei einer Prozessdauer von 60 Stunden auch die stationäre Phase erfassen zu können. Ebenfalls leicht abweichend war die Zufütterung von L-Tyrosin. Während bei Ruffer auch noch in der Produktionsphase geringe Mengen an L-Tyrosin zugegeben worden waren, wurde bei den hier beschriebenen Experimenten in dieser Phase kein L-Tyrosin mehr zugegeben. Dies ist zwar möglicherweise problematisch in Hinblick auf den Erhaltungsstoffwechsel, aber da für den hier verwendeten Fermenter keine Abgasanalyse zur Verfügung stand und der L-Tyrosinbedarf mit dem Sauerstoffverbrauch korreliert (Gerigk, 2001), wurde dies vernachlässigt. Es sollte damit auch verhindert werden, dass L-Tyrosin akkumuliert und dann die Aktivität von AroF inhibiert (Pittard, 1996a). Hinsichtlich des Feeds und der Induktion war die Prozessdurchführung in beiden Fällen sehr ähnlich. Die Konzentration an C-Quelle betrug 5 g/l und es erfolgte zu zwei verschiedenen Zeitpunkten Induktion mit IPTG. Da bei Ruffer insgesamt mit höheren Zelldichten gearbeitet worden war, war erst zu einem späteren Zeitpunkt IPTG zugegeben worden, so dass die erste Induktion bei $OD_{620} = 10-12$ erfolgte und die zweite Induktion etwa 20 Stunden später. Als Grund für die zweimalige IPTG-Zugabe war die Verdünnung durch Zugabe von C-Quelle, L-Tyrosin, Base usw. genannt worden. Durch die zweite Induktion sollte die IPTG-Konzentration an das veränderte Volumen angepasst werden. Da hierbei jedoch keine Kontrolle gezeigt worden war, die belegt, dass die zweimalige IPTG-Zugabe sinnvoll oder notwendig ist, wurde in der vorliegenden Arbeit die Proteinzusammensetzung des Stammes FUS4.11/pF81 über den Verlauf der Fermentation mittels 2D-SDS-PAGE analysiert. Es wurde gezeigt, dass die intrazelluläre Konzentration an Proteinen, die aufgrund der Plasmid-codierten Gene IPTG-abhängig produziert wurden, nach der ersten und der zweiten IPTG-Zugabe gleich blieb (Kapitel 4.4). Dies bestätigt, dass die zweimalige Zugabe des Induktors durchaus Sinn macht.

Die Fermentationen von FUS4/pF81 mit Glycerin als C-Quelle lieferten zum Teil überraschende Ergebnisse. Durch Erhöhen der Sauerstoffkonzentration im Medium von 20% auf 60% war eine deutlich höhere Produktion an organischen Säuren beobachtet worden. Überraschend war dieses Ergebnis deshalb, weil für Glucose in einem Prozess zur Produktion rekombinanter Proteine genau das Gegenteil beschrieben worden war. Bei hohen Sauerstoffkonzentrationen war weniger Acetat gebildet worden, als bei geringer Sauerstoffverfügbarkeit (Krishna Rao *et al.*, 2008). Gleichzeitig mit der erhöhten Säurebildung war auch der Glycerinverbrauch gesteigert worden (Kapitel 4.5). Allerdings waren gleichzeitig mit dem gesteigerten Glycerinumsatz nicht mehr, sondern weniger Produkt und mehr Nebenprodukte gebildet worden, was sich auch auf die C-Ausbeute auswirkte. Bei 20% Sauerstoffsättigung waren $26,3 \pm 0,3\%$ erreicht worden, wohingegen bei 60% Sauerstoffsättigung nur $18,8 \pm 2,0\%$ erreicht worden waren. Während der zweiten Fermentation mit FUS4/pF81 bei 20% Sauerstoffsättigung wurde zwar mit einer maximalen Konzentration von etwa 70mM auch eine sehr hohe Lactatbildung beobachtet (Abbildung 6-2). Dies könnte aber mit der hohen Glycerinkonzentration von über 12g/l im Medium zusammenhängen, die erreicht wurde, weil die feed-Pumpe zu hoch eingestellt war. Eine ähnliche Beobachtung war mit Glucose gemacht worden (Gerigk *et al.*, 2002). Während beim L-Phenylalanin produzierenden Stamm *E. coli aroF-wt* bei einer kontinuierlichen Konzentration von 0,1 g/l bzw. 5 g/l Glucose (Fed-batch-Verfahren) weniger als 2 g/l Acetat als Nebenprodukt gebildet worden waren, akkumulierten bei 30 g/l Glucose über 40 g/l Acetat (= 667mM Acetat). Eine weitere Möglichkeit, die die Nebenproduktbildung beeinflussen könnte, ist die Sauerstoffverfügbarkeit. Es ist sehr schwierig, eine genau reproduzierbare Sauerstoffkonzentration im Medium einzustellen, da die angegebenen Werte immer Relativwerte sind und die absolute Menge an gelöstem Sauerstoff nicht nur vom Medium abhängt, sondern auch von Faktoren wie Luftdruck und Anteil des Sauerstoffs in der Zuluft (bei den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuchen: ~21% O₂) (Henry, 1803). Es wäre deshalb möglich, dass zwar der relative Wert gleich ist, die absolute Konzentration im Medium aber trotzdem abweichend war und es deshalb zu Unterschieden in der Nebenproduktbildung kam. Nicht beeinflusst durch diesen Unterschied waren aber der Glycerinverbrauch und die Produktivität des Stammes. Es konnte mit diesen Versuchen also gezeigt werden, dass bei einer erhöhten Sauerstoffsättigung im Medium mehr Glycerin verbraucht wurde. Es wurde unter diesen Bedingungen zwar weniger L-Phenylalanin gebildet, aber diese Ergebnisse zeigen trotzdem, dass zunächst nicht die Eingangsreaktion über GlpK den limitierenden Schritt darstellt. Verantwortlich für den höheren Glycerinverbrauch bei

hoher Sauerstoffkonzentration ist möglicherweise der TCA-Zyklus. Bei hoher Sauerstoffverfügbarkeit werden die Gene für diesen Stoffwechselweg und die Elektronentransportkette stärker exprimiert (Iuchi und Lin, 1988; Iuchi und Weiner, 1996) und so der Fluss durch den TCA-Zyklus vermutlich beschleunigt. Dies würde bedeuten, dass der Glycerinfluss nicht nur durch Enzymaktivitäten bestimmt wird, sondern auch der Bedarf an bestimmten Stoffwechselintermediaten eine Rolle spielt. Theorien zum bedarfsgesteuerten Stofffluss waren schon vor vielen Jahren von Kacser und Burns aufgestellt (Kacser und Burns, 1973) und zumindest teilweise auch experimentell bewiesen worden (Westerhoff *et al.*, 1984; Koebmann *et al.*, 2002). Möglich wäre deshalb, dass im Falle des FUS4/pF81 bei einem erhöhten Sauerstoffgehalt der TCA-Zyklus schneller abläuft, der Stamm somit einen höheren Bedarf an den Eingangsmolekülen Acetyl-CoA und Oxalacetat hat und damit indirekt für eine Beschleunigung der Glycerinassimilation sorgt. Da Glycerin jedoch ein hohes Reduktionspotential besitzt (Yazdani und Gonzalez, 2007), kann es bei einem schnellen Glycerinumsatz leicht zu einem Überschuss an NADH kommen (vgl. Abbildung 2-3). Wird NADH nicht über Reaktionen des anabolen oder katabolen Stoffwechsels wieder zu NAD⁺ oxidiert, kann es über die Atmungskette oxidiert werden und so zum Protonengradienten und der ATP-Regenerierung beitragen (Unden und Bongaerts, 1997), aber auch hier sind die Kapazitäten begrenzt. Um das intrazelluläre Gleichgewicht der Reduktionsäquivalente zu gewährleisten, bildet der Stamm dann alternative Endprodukte, wie z.B. Milchsäure im Falle des Stammes FUS4/pF81, um die Regenerierung von NAD⁺ erreichen (vgl. auch Abbildung 5-1).

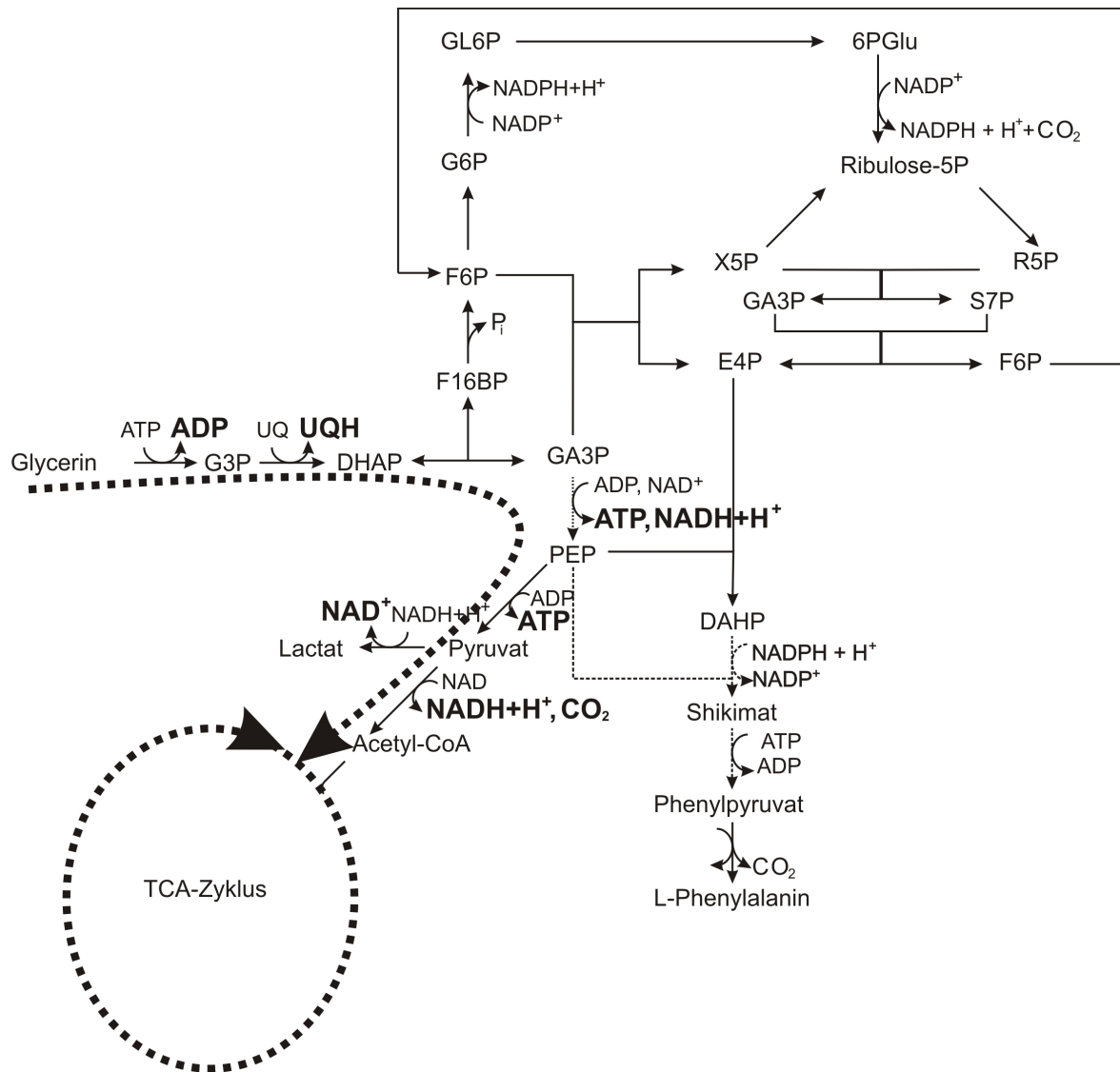


Abbildung 5-1 Schematisch dargestellt ist der Stoffwechselweg vom Glycerin zu L-Phenylalanin. Die fett dargestellten, gestrichelten Pfeile zeigen den möglichen Stofffluss bei hoher Sauerstoffsättigung. Ebenfalls fett dargestellt sind die bei diesem Weg anfallenden Cofaktoren und CO_2 . Dünn gestrichelte Pfeile weisen auf eine unvollständige Darstellung des Stoffwechselwegs hin.

Abkürzungen: G6P – Glucose-6-Phosphat, F6P – Fructose-6-Phosphat, F1,6-BP – Fructose-1,6-bisphosphat, G3P – Glycerin-3-Phosphat, DHAP – Dihydroxyacetonphosphat, GA3P – Glycerinaldehyd-3-Phosphat, PEP – Phosphoenolpyruvat, TCA-Zyklus – Tricarbonsäurezyklus, GL6P – Gluconolacton-6-Phosphat, 6PGlu – 6-Phosphogluconat, Ribulose-5P – Ribulose-5-Phosphat, X5P – Xylulose-5-Phosphat, R5P – Ribose-5-Phosphat, S7P – Sedoheptulose-7-Phosphat, DAHP – 3-Deoxy-D-arabinoheptulose-7-Phosphat.

Einen Zusammenhang zwischen Milchsäurebildung und einem intrazellulären Überschuss an NADH war bereits diskutiert und auch gezeigt worden (Berríos-Rivera *et al.*, 2004; El Mansi, 2004). Weiterhin war auch die Rolle der Sauerstoffverfügbarkeit schon für andere Prozesse gezeigt worden. Ein Beispiel ist die Synthese von Poly(3-Hydroxybuttersäure) (PHB) mit einem *E. coli*-Stamm (de Almeida *et al.*, 2010). Es war gezeigt worden, dass mit Glucose als C-Quelle die höchste Produktausbeute bei der höchsten Sauerstoffverfügbarkeit erreicht

wurde. Bei Glycerin dagegen war bei geringen Sauerstoffkonzentrationen die höchste Ausbeute beobachtet worden. Da bei diesen Versuchen keine Sauerstoffkonzentration angegeben ist, sondern nur die Rührgeschwindigkeit, ist ein direkter Vergleich mit den hier beschriebenen Versuchen nicht möglich. Die Nebenproduktanalyse bei der Produktion von PHB zeigt aber, dass bei beiden C-Quellen unter Sauerstoff limitierten Bedingungen mehr Nebenprodukte gebildet worden waren, als bei hohen Sauerstoffkonzentrationen (de Almeida *et al.*, 2010). Bei den Versuchen mit dem Stamm FUS4/pF81 mit Glycerin als C-Quelle trat jedoch der entgegengesetzte Fall ein. Bei geringer Sauerstoffsättigung im Medium traten weniger organische Säuren auf als bei hoher Sauerstoffsättigung. Allerdings war bei der PHB-Produktion die Sauerstoffversorgung bei niedriger Rührzahl so gering, dass auch Formiat, welches nur unter anaeroben oder microaeroben Bedingungen entsteht (Iuchi und Weiner, 1996), gebildet worden war (de Almeida *et al.*, 2010). Dies wurde in keinem der in dieser Arbeit beschriebenen Versuche mit FUS4/pF81 beobachtet (Formiat wäre beim Nachweis von Lactat/Acetat sichtbar geworden). Diese Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass möglicherweise mit Glycerin bei hohen Sauerstoffkonzentrationen viel Nebenprodukt gebildet wird, dies mit abnehmender Sauerstoffsättigung zunächst ebenfalls abnimmt, bei Unterschreiten eines gewissen Schwellenwertes aber wieder zunimmt. Möglicherweise lag die höhere Säurebildung bei der PHB-Bildung aber auch an der hohen Konzentration von 30g/l Glycerin, die hierfür eingesetzt worden war (de Almeida *et al.*, 2010). Eine genauere Untersuchung der bakteriellen Antwort auf verschiedene Sauerstoffkonzentrationen bei Glycerin als C-Quelle durch Stofffluss-, Metabolom- oder Transkriptomanalysen wäre sicher interessant und könnte dazu beitragen die Regulationsvorgänge während der Glycerinassimilation besser zu verstehen. Hierfür wäre es allerdings notwendig, ein System zu verwenden, in dem die absolute Menge an gelöstem Sauerstoff messbar ist, da nur so allgemeingültige Aussagen getroffen werden können.

Interessant ist im Zusammenhang mit der Nebenproduktanalyse auch der Vergleich der Fermentationen mit Glucose bzw. Glycerin als C-Quelle bei jeweils 60% Sauerstoffsättigung. Während es bei Verwendung von Glycerin schon in der späten exponentiellen Wachstumsphase zur Akkumulation organischer Säuren, vor allem Milchsäure, kam (Abbildung 4-24), wurden mit Glucose als C-Quelle erst in der stationären Phase Nebenprodukte gebildet (Abbildung 4-27). Hauptnebenprodukt war in beiden Fällen Milchsäure. Das zeigt, dass mit Glycerin als C-Quelle der Haushalt an Reduktionsäquivalenten wahrscheinlich schneller aus dem Gleichgewicht gerät als mit Glucose. Bemerkenswert ist bei dem Vergleich Glucose – Glycerin auch, dass durch

Absenken der Sauerstoffverfügbarkeit bei Glycerin als C-Quelle schon mit dem unveränderten Stamm deutlich bessere Werte für die Produktivität (C-Ausbeute $26,3 \pm 0,3\%$, Raum-Zeit-Ausbeute $0,44 \pm 0,04$ g/l/h) erreicht werden konnten als mit Glucose (C-Ausbeute $18,2 \pm 2,6\%$, Raum-Zeit-Ausbeute $0,23 \pm 0,02$ g/l/h). Dies ist möglicherweise auf das höhere Reduktionspotential von Glycerin und der höheren PEP-Verfügbarkeit zurückzuführen (vgl. auch Kapitel 2.3). Da bei geringen Sauerstoffkonzentrationen weniger Glycerin verbraucht worden war, war hier möglicherweise das Verhältnis $\text{NAD}^+/\text{NADH}+\text{H}^+$ ausgeglichener, was zu einer verbesserten Produktivität führte. Wünschenswert wäre aber, dass nicht bei einem geringen, sondern bei einem hohen Glycerinverbrauch eine gute Produktivität erreicht wird. Mittels metabolic engineering sollten deshalb Stämme konstruiert werden, die bei hoher Sauerstoffverfügbarkeit und somit einem hohen Glycerinverbrauch eine verbesserte Produktivität aufweisen. Erreicht werden sollte dies durch eine optimierte Bereitstellung der Vorläufermoleküle PEP und E4P, um so die Produktbildungsrate zu erhöhen und die Bildung von Nebenprodukten zu minimieren.

Als eine Möglichkeit dieses Ziel zu erreichen, wurde die Deletion eines der beiden Gene *pykF* oder *pykA* untersucht, um so den Fluss in Richtung Lactat und in den TCA-Zyklus zu verringern und gleichzeitig die PEP-Verfügbarkeit zu erhöhen (Abbildung 4-30). Mit Glucose als C-Quelle waren bereits einige Experimente mit ΔpykF bzw. ΔpykA -Mutanten durchgeführt worden (vgl. Kapitel 2.7). So war von Ponce *et al.* 1995 gezeigt worden, dass bei Wachstum des Wildtyps *E. coli* JM101 auf Glucose die Aktivität von PykF 15x höher war als die von PykA. Diese Ergebnisse konnten mit den Stämmen FUS4.3 und FUS4.4 zwar nicht bestätigt werden, da hier die Aktivität von PykF nur etwa doppelt so hoch war, wie die von PykA (Kapitel 4.7). Dies könnte möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass die Zellen sich hier in einer anderen Wachstumsphase befanden, was einen Einfluss auf die Expressionshöhe der Gene *pykA* und *pykF* und somit auch auf die Menge an gebildetem Protein haben kann. Da der Enzymtest *in vitro* durchgeführt wurde und externes Fru-1,6-bp zugegeben wurde, um das Enzym zu aktivieren, spielt die zum Zeitpunkt der Probennahme vorhandenen Fru-1,6-bp-Konzentration keine Rolle. Als Beispiel wäre für Wachstumsphasen-abhängige Regulatoren der Sigma-Faktor RpoS zu nennen, der hauptsächlich in der stationären Phase aktiv ist und unter anderem die Transkription von *pykA* reprimiert (Patten *et al.*, 2004). Hier sollte jedoch auch erwähnt werden, dass der Stamm *E. coli* W3110, welches der Ursprungsstamm der FUS4-Stämme ist, eine um 117 Nucleotide verkürzte Version (ausgehend vom 5'-Ende) von *rpoS* besitzt (Vergleich der Datenbankeinträge bei www.ecocyc.com). Dies führt dazu, dass in diesem Stamm, verglichen mit *E. coli* MG1655,

viele RpoS-regulierte Gene unterschiedlich exprimiert werden (Vijayendran *et al.*, 2007). Es war gezeigt worden, dass im Stamm W3110 z.B. Gene für den TCA-Zyklus hochreguliert sind, während andere Gene, wie z.B. die für die Antwort auf osmotischen Stress weniger stark exprimiert werden. Da in der von Ponce *et al.* 1995 beschriebenen Arbeit mit dem Stamm JM101 gearbeitet worden war, könnte das in der vorliegenden Arbeit beschriebene, abweichende Verhältnis von PykA zu PykF auch auf die unterschiedlichen Stämme zurückgeführt werden. Außerdem sollte bei dem hier beschriebenen Versuch bei einer Ausgangskonzentration von 0,5% C-Quelle in der stationären Phase keine Glucose mehr im Medium sein, was zur Folge hätte, dass kein Stofffluss mehr durch den EMP erfolgt und somit die Fru-1,6-BP- bzw. F6P-Konzentration in der Zelle sinkt. Dies wiederum hätte zum einen Einfluss auf den Regulator Cra, der bei geringen Konzentrationen an Fru-1,6-BP und F6P unter anderem die Expression von *pykF* reprimiert (vgl. Kapitel 2.2) und zum andern aber auch auf PykF direkt, das erst durch die Anwesenheit von Fru-1,6-BP aktiviert wird (Waygood *et al.*, 1976). Im Fermenter wurde dann gezeigt, dass die Deletion von *pykA* zu einem verringerten Glycerinverbrauch mit gleichzeitiger Erhöhung der absoluten Menge an gebildetem L-Phenylalanin und somit auch der C-Ausbeute führte, während durch die Deletion von *pykF* der Glycerinverbrauch leicht gesteigert, die C-Ausbeute aber nur geringfügig verbessert wurde (Kapitel 4.7). Interessant war, dass bei beiden Stämmen für Diauxie charakteristisches Wachstum beobachtet wurde. Teilweise konnte hierbei gezeigt werden, dass eine Korrelation mit der Abnahme des Nebenprodukts Lactat besteht. Es kann aber keine Aussage getroffen werden, warum zu diesem Zeitpunkt nochmals eine Zunahme der Biomasse stattfand, da aufgrund der Tyrosinlimitierung kein Wachstum mehr hätte stattfinden sollen. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass noch geringe Mengen an L-Tyrosin im Medium vorhanden waren, da zu diesen Zeitpunkten schon sehr hohe Konzentrationen an L-Phenylalanin erreicht waren und L-Tyrosin über HPLC nicht mehr detektierbar war. Eine Kontamination mit anderen Bakterien kann ausgeschlossen werden, da am Ende der Fermentation die Kulturen überprüft wurden. Auch die Kontamination mit einem Wildtyp-*E. coli* kann ausgeschlossen werden, da in diesem Fall mit hoher Wahrscheinlichkeit höhere Zelldichten und auch eine Abnahme der L-Phenylalaninkonzentration bemerkbar gewesen wäre. Weiterhin war auch das sehr unterschiedliche Verhalten der beiden Stämme interessant. Möglicherweise wurde durch die Deletion von *pykA* der Stofffluss in den TCA-Zyklus verringert und deshalb auch insgesamt weniger Glycerin verbraucht. Hierfür spricht auch, dass die Konzentrationen an entstandenen Nebenprodukten, Lactat und Acetat, verglichen mit dem unveränderten Stamm nur etwa halb

so hoch waren. Die Deletion von *pykF* wirkte sich dagegen deutlich anders aus. Der Glycerinverbrauch war erhöht und von den untersuchten Nebenprodukten konnte nur die Bildung von Lactat beobachtet werden. Dies weist darauf hin, dass hier auch andere Stoffwechselwege aktiviert wurden. Möglicherweise wurde eine hohe intrazelluläre PEP-Konzentration erreicht, die dann die Fructose-1,6-bisphosphatase I bzw. II aktivierte (Donahue *et al.*, 2000; Hines *et al.*, 2006) und so den Stofffluss verstärkt auch in Richtung Gluconeogenese und PPP lenkte. Bei Glucose als C-Quelle war gezeigt worden, dass bei einer $\Delta pykF$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp die intrazelluläre PEP-Konzentration im Verlauf der Kultivierung leicht anstieg auf etwa 0,1mM (Siddiquee *et al.*, 2004). Gemessen wurde die PEP-Konzentration in diesem Versuch durch Isotopenmarkierung und anschließender GC-MS (Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung)- und 2D-NMR (zweidimensionale Kernspinresonanz)-Analyse. Da bei Wachstum auf Glucose PEP vor allem für die Phosphorylierung der Glucose benötigt wird (Postma *et al.*, 1993), wäre es denkbar, dass bei Wachstum auf Glycerin insgesamt höhere PEP-Konzentrationen erreicht werden. Dies würde ausreichen, um eine Aktivierung von Fbp oder GlpX zu erreichen. Für GlpX war *in vitro* zwar gezeigt worden, dass die Aktivität erst bei einer Konzentration von 1mM PEP 170% des Referenzwertes ohne Effektor erreichte (Donahue *et al.*, 2000). Für Fbp reichen *in vitro* aber weitaus geringere PEP-Konzentrationen. Es war beobachtet worden, dass der K_a -Wert bei unter 0,1mM liegt und die Aktivität durch Zugabe von 2mM PEP auf insgesamt über 300% gesteigert worden war (Hines *et al.*, 2006). Bei einem erhöhten Stofffluss in Richtung PPP würden dann auch mehr Reduktionsäquivalente in Form von NADPH gebildet werden (vgl. Abbildung 2-3). *E. coli* kann zwar auch direkt aus F6P und GA3P E4P bilden und könnte so die NADPH-Bildung umgehen, es erscheint aber eher unwahrscheinlich, dass bei einem erhöhten Stofffluss in Richtung F6P der HMP-Weg nicht abläuft. Dies hätte zur Folge, dass weniger NADH als Protonendonator für die Regenerierung von NADPH benötigt wird und somit ein Überschuss an NADH entstünde, was die höhere Lactatbildung erklären würde (vgl. Kapitel 2.8).

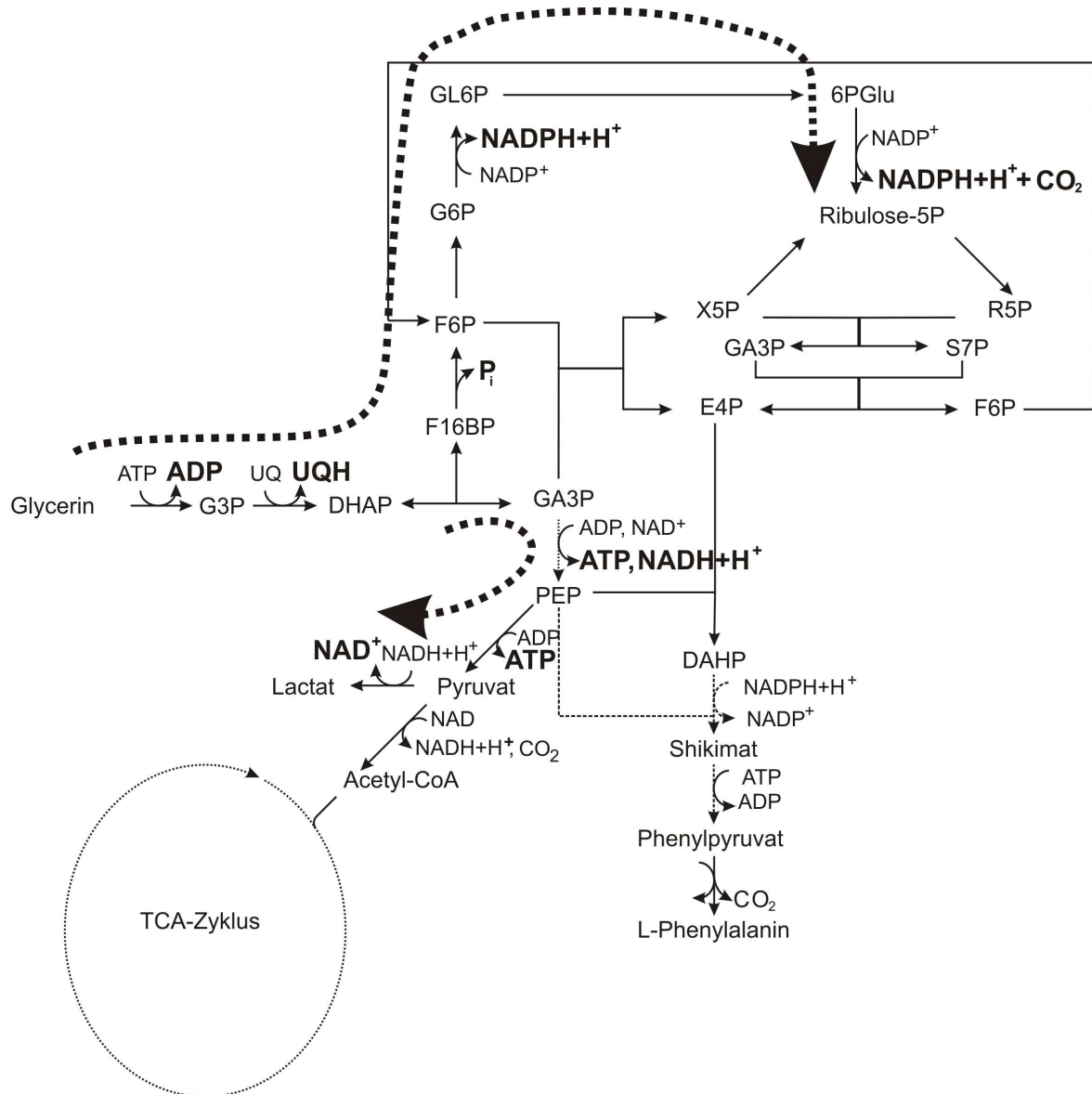


Abbildung 5-2 Schematisch dargestellt ist der Stoffwechselweg vom Glycerin zu L-Phenylalanin. Die fett dargestellten, gestrichelten Pfeile zeigen den möglichen Stofffluss nach Deletion von *pykF*. Ebenfalls fett dargestellt sind die bei diesem Weg anfallenden Cofaktoren und CO₂. Dünn gestrichelte Pfeile weisen auf eine unvollständige Darstellung des Stoffwechselwegs hin.

Abkürzungen: G6P – Glucose-6-Phosphat, F6P - Fructose-6-Phosphat, F1,6-BP – Fructose-1,6-bisphosphat, G3P – Glycerin-3-Phosphat, DHAP – Dihydroxyacetonphosphat, GA3P – Glycerinaldehyd-3-Phosphat, PEP – Phosphoenolpyruvat, TCA-Zyklus – Tricarbonsäurezyklus, GL6P – Gluconolacton-6-Phosphat, 6PGlu – 6-Phosphogluconat, Ribulose-5P – Ribulose-5-Phosphat, X5P – Xylulose-5-Phosphat, R5P – Ribose-5-Phosphat, S7P – Sedoheptulose-7-Phosphat, DAHP – 3-Deoxy-D-arabinoheptulosonat-7-Phosphat.

Nach der Deletion von *pykF* oder *pykA* in einem für die Shikimisäureproduktion entwickelten Stamm, war mit Glucose als C-Quelle das Gegenteil gezeigt worden (Escalante *et al.*, 2010). Während die Deletion von *pykF* die mol/mol-Ausbeute (mol aromatischer Komponenten/mol Glucose) deutlich verbesserte von 0,33 mol/mol auf 0,50 mol/mol, verschlechterte sich die Ausbeute nach der Inaktivierung von *pykA* auf 0,07 mol/mol. Als Ursache war hier die hohe

Wachstumsrate des *pykA*⁻-Stammes diskutiert worden. Allerdings war die Wachstumsrate in diesem Stamm nicht signifikant höher als im entsprechenden *pykA*⁺-Stamm, weshalb fraglich ist, ob dies tatsächlich die Ursache für die geringe Ausbeute ist. Um die Gründe für die unterschiedlichen Auswirkungen der beiden Deletionen bei den C-Quellen Glucose und Glycerin zu untersuchen, wäre eine Stofffluss- oder Transkriptomanalyse sinnvoll.

Die Möglichkeit, dass E4P und damit die Aktivität von TktA limitierend sein könnte, wurde zusammen mit der zweiten möglichen Limitierung im Glycerinstoffwechsel untersucht. Außer der Aktivität von GlpK war auch die Reaktion von Fru-1,6-BP zu F6P als limitierend für das Wachstum diskutiert worden (Marr, 1991). Ein weiterer Hinweis, dass diese Reaktion mit Glycerin limitierend sein könnte, liefert die Tatsache, dass das Gen für die zweite Fructose-1,6-bisphosphatase, *glpX*, zusammen mit *glpK* und *glpF* in einem Operon codiert ist (Truniger *et al.*, 1992). Da in der vorliegenden Arbeit die Verwendung von Glycerin als C-Quelle im Fokus stand und ein direkter Zusammenhang der von *glpX* codierten Fructose-1,6-bisphosphatase II mit dem Glycerinstoffwechsel zu vermuten ist, wurde die Überexpression von *glpX* der Überexpression von *fbp* vorgezogen. Zur Erhöhung des intrazellulären E4P-Pools wurde *tktA* überexprimiert. Zum ersten Mal erwähnt wurde die Transketolase TktA in Zusammenhang mit der Produktion von Komponenten aus dem Aromatenbiosyntheseweg 1990 (Draths und Frost, 1990). Es war gezeigt worden, dass durch Überexpression von *tktA* zusammen mit dem Gen für die DAHP-Synthase eine deutliche Steigerung der DAHP-Produktion erreicht werden konnte. Da TktA auch direkt aus F6P und GA3P E4P herstellen kann, wird bei Betrachtung des Stoffwechselwegs deutlich, dass nach Überexpression von *tktA* die Reaktion von F1,6BP zu F6P limitierend werden kann (vgl. Abbildung 4-36), weshalb auch die gemeinsame Überexpression von *tktA* und *glpX* in einem Stamm (FUS4.7/pF81) untersucht wurde. Die Ergebnisse zeigten, dass die Überexpression eines einzelnen der beiden Gene kaum Vorteile brachte, die gemeinsame Überexpression aber zu einer deutlichen Steigerung um fast 100% in der Raum-Zeit-Ausbeute von $0,34 \pm 0,01$ g/l/h auf $0,63 \pm 0,01$ g/l/h führte. Mit dem Stamm F4/pF81 war nach Optimierung der Fermentationsparameter und integrierter Reaktivextraktion mit Glucose als C-Quelle die Raum-Zeit-Ausbeute von 7 mmol/l/h (= 1,16 g/l/h) auf 7,5 mmol/l/h (= 1,24 g/l/h) erhöht worden (Rüffer, 2004). Da bei den hier durchgeführten Fermentationen keine Optimierung der Prozessführung oder Abtrennung des Produkts erfolgte und auch die Zelldichte nicht einem industriellen Prozess entsprach, sollte durch Verbesserung der Fermentationsbedingungen bei FUS4.7/pF81 eine weitere Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute möglich sein. Gegenüber dem unveränderten Stamm (C-Ausbeute 18,3%) war auch

die C-Ausbeute leicht gesteigert (26%). Diese Ergebnisse belegen, dass bei der mikrobiellen Produktion von L-Phenylalanin mit Glycerin als C-Quelle der Stofffluss in den Pentosephosphatweg zusammen mit der E4P-Bereitstellung einen limitierenden Faktor darstellt. Nicht erreicht wurde mit dem Stamm FUS4.7/pF81 aber die hohe C-Ausbeute, die bei dem Stamm FUS4.4/pF81 beobachtet wurde.

Mit dem Ziel, die hohe C-Ausbeute von FUS4.4/pF81 mit der hohen Raum-Zeit-Ausbeute von FUS4.7/pF81 zu verbinden, wurden die durchgeführten Veränderungen über P1-Transduktion miteinander kombiniert. Die Ergebnisse zeigten aber, dass diese Maßnahmen nicht wie erhofft einen additiven Effekt aufwiesen, sondern sich negativ beeinflussten, so dass im Endeffekt sogar eine geringere Produktivität erhalten wurde als mit dem unveränderten Stamm. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte der Regulator Cra liefern. Cra bindet bei geringen Fructose-6-Phosphat- und Fructose-1,6-bisphosphat-Konzentrationen an eine palindromische Operatorsequenz und kann so die Transkription verschiedener Gene entweder aktivieren oder reprimieren (Ramseier, 2007). Üblicherweise aktiviert Cra dabei Gene für die Gluconeogenese, z. B. *fdp* (Gen für Fructose-1,6-bisphosphatase), und reprimiert die für die Glykolyse, wie z.B. *pykF* (Saier und Ramseier, 1996). Die Betrachtung des Stoffwechselwegs in Abbildung 4-36 lässt die Vermutung zu, dass nach Deletion von *pykA* und gleichzeitiger Überexpression von *glpX*, *tktA* oder beiden gemeinsam die intrazelluläre Konzentration an Fructose-6-Phosphat und Fructose-1,6-bisphosphat sinkt und somit die Gluconeogenese durch Cra aktiviert wird (vgl Kapitel 2.2). Ebenfalls durch Cra reprimiert wird die Transkription von *pykF* (Bledig *et al.*, 1996), so dass im Stamm FUS4.10/pF81 vermutlich kaum noch Stofffluss zum TCA-Zyklus stattfindet. Der Pentosephosphatweg scheint dagegen keiner Regulation durch Cra zu unterliegen (Saier, 1996) und mündet mit den Metaboliten GA3P und F6P wieder in die Glykolyse (Abbildung 2-3). Unter der Annahme, dass im Stamm FUS4.10/pF81 zunächst kaum noch glykolytische Aktivität vorhanden ist, wäre hier möglicherweise die Entstehung eines „Futile Cycles“ denkbar, indem die C-Quelle immer wieder in Richtung Pentosephosphatweg geschleust wird und bei jedem Durchgang ein Kohlenstoffatom in Form von CO₂ verloren geht. TktA und GlpX können zwar über den nicht-oxidativen PPP auch ohne CO₂-Verlust zum E4P kommen (vgl. Abbildung 2-3), aber da das Gen für die Phosphoglucoisomerase konstitutiv exprimiert wird (Fraenkel, 1967) ist davon auszugehen, dass zumindest teilweise auch der oxidative PPP durchlaufen wird. Beim Durchlaufen des oxidativen PPP werden jedoch viele Reduktionsäquivalente in Form von NADPH+H⁺ gebildet, was dann letztendlich zur Folge hat, dass die Bildung von Milchsäure aktiviert wird, um den Überschuss an Reduktionsäquivalenten abzubauen (vgl. Abbildung 5-3). Die hohe

Milchsäurebildung (> 30mM) ist anhand der ersten Fermentation mit FUS4.10/pF81 auch deutlich zu sehen ist. Bei der zweiten Fermentation wurde keine so hohe Milchsäurekonzentration erreicht (< 5mM). Hier war jedoch auch eine sehr lange lag-Phase zu beobachten, so dass es sich hierbei vermutlich um kein repräsentatives Ergebnis handelt. Wird davon ausgegangen, dass in FUS4.10/pF81 die meiste C-Quelle in den PPP geschleust wird, wäre es vorstellbar, dass dann auch die PEP-Verfügbarkeit limitierend wird. Die Ursache, dass dies nicht im Stamm FUS4.7/pF81 auftritt, liegt vermutlich im noch vorhandenen Gen *pykA*, welches nicht durch Cra reguliert wird (Bledig *et al.*, 1996). Es wird deshalb wahrscheinlich ausreichend glykolytischer Stofffluss erreicht, der verhindert, dass zuviel CO₂ im oxidativen PPP verloren geht und gleichzeitig dafür sorgt, dass ausreichend PEP gebildet wird. Für diese Erklärungsmöglichkeit spricht auch, dass der Stamm FUS4.11/pF81 ($\Delta pykA/\Delta pykF$) kurzzeitig eine hohe Produktivität aufwies (Raum-Zeit-Ausbeute 0,63 g/l/h, C-Ausbeute 90%), die aber nach der zusätzlichen Überexpression von *glpX* und *tktA* im Stamm FUS4.14/pF81 deutlich verschlechtert wurde (Raum-Zeit-Ausbeute 0,13 g/l/h, C-Ausbeute 46,1%) (vgl. Kapitel 4.10 und nachfolgenden Abschnitt). Möglich wäre, dass auch hier ein „Futile Cycle“ entsteht, indem die Kohlenstoffquelle immer wieder erneut in den PPP geschleust wird und nur unzureichende Mengen an PEP gebildet werden. Auch hier wäre eine weitere Untersuchung mittels Stoffflussanalysen sinnvoll, um die intrazellulären Vorgänge zu verstehen.

FUS4.11/pF81 die interessantesten Ergebnisse lieferte (Abbildung 4-54), da kurzzeitig eine Raum-Zeit-Ausbeute von 0,63 g/l/h mit einer gleichzeitigen C-Ausbeute von 90% erhalten wurde. Der anschließende Produktivitätsstopp ist möglicherweise auf eine ATP-Limitierung zurückzuführen, da die Betrachtung der maximal theoretischen Ausbeute gezeigt hatte, dass 90% C-Ausbeute aufgrund des ATP-Bedarfs nicht erreicht werden können (Kapitel 2.8). Das Problem bei der Glycerinverwertung ist dabei, dass bei der Oxidation des G3P zu DHAP nicht NAD^+ sondern Ubichinon reduziert wird (vgl. Abbildung 2-3). Damit wird die Komponente I der Atmungskette nicht genutzt (Schönheit, 2006). Dies hat zur Folge, dass weniger Elektronen pro umgesetztem Glycerin gepumpt werden, was sich in einer geringeren ATP-Regenerierung und somit einem geringeren P/O-Quotienten niederschlägt. Sollte tatsächlich die ATP-Verfügbarkeit das Problem sein, wäre möglicherweise die Nutzung der alternativen Eingangsreaktion oder einer NAD^+ -abhängigen G3P-Dehydrogenase, wie z.B. in *Saccharomyces cerevisiae* vorhanden (Albertyn *et al.*, 1992), von Vorteil. Beim alternativen Weg kann Glycerin zunächst von GldA NAD^+ -abhängig oxidiert (Tang *et al.*, 1979) und anschließend von DhaKLM PEP-abhängig phosphoryliert werden (Jin und Lin, 1984). Gelänge ein Austausch der PEP-abhängigen durch eine ATP-abhängige DHA-Kinase, wie z.B. DhaK aus *Escherichia blattae* (Andres *et al.*, 2004), wäre dieser Weg energetisch günstiger und es könnte möglicherweise die Produktionsphase des Stammes FUS4.11/pF81 verlängert werden. Untersuchungen hierzu werden in einer laufenden Diplomarbeit durchgeführt (Riemer, 2010).

Ein weiterer Ansatzpunkt, den Fermentationsprozess zu verbessern, liegt in der genaueren Regulierung der Sauerstoffverfügbarkeit. Es wurden Fermentationen mit dem unveränderten Stamm mit Glycerin und Glucose als C-Quelle durchgeführt. Bei beiden Fermentationen wurde neben Lactat und Acetat auch Formiat als Nebenprodukt nachgewiesen, was darauf schließen ließ, dass die Pyruvat-Formiat-Lyase aktiv war. Dieses Enzym sollte aber nur unter anaeroben Bedingungen aktiv sein (Iuchi und Weiner, 1996). Auch andere Wege wie z.B. der Abbau von Threonin oder die Purinsynthese führen zum Formiat (siehe dazu Review Leonhartsberger *et al.*, 2002). Es erscheint aber unwahrscheinlich, dass auf diesen Wegen größere Mengen an Formiat im Medium anfallen. Es stellte sich heraus, dass eine Störung der Sauerstoffsonde vorlag und der Sauerstoffgehalt im Medium wahrscheinlich zwischen aeroben und microaeroben Bereichen schwankte. Das interessante hierbei war jedoch, dass bei diesen Versuchen für jeden Ansatz die höchste C-Ausbeute erreicht werden konnte. So wurde für Glucose eine C-Ausbeute von 28% und für Glycerin 38% erreicht. Unter kontrollierten Bedingungen lagen die maximalen C-Ausbeuten für Glycerin bei 26% und für

Glucose bei 19%. Es wäre also möglich, dass für die Produktion von L-Phenylalanin mit dem hier beschriebenen Stamm eine kontinuierliche Veränderung der Sauerstoffsättigung vom microaeroben bis hin zum aeroben Bereich von Vorteil wäre. Da es bei dem verwendeten System nicht möglich war, kontrolliert den Sauerstoffgehalt im Medium ständig zu verändern, konnte diese Idee nicht weiter verfolgt werden. Ein weiterer Punkt, der den hohen Einfluss des Sauerstoffgehalts deutlich macht, waren Versuche, die mit Bioreaktoren des Instituts für Bioverfahrenstechnik an der Uni Stuttgart durchgeführt worden waren. Hauptunterschied des hier verwendeten Reaktors (Bioengineering) war der leichte Überdruck von 0,3 bar über Umgebungsdruck, mit dem gearbeitet wurde. Da die in Flüssigkeit gelöste Menge an Gas proportional zum Druck an der Oberfläche der Flüssigkeit ist (Henry, 1803), war der absolute Sauerstoffgehalt in diesen Versuchen 30% höher, als bei dem Infors-System, das bei Umgebungsdruck arbeitet. Interessant war hier, dass der Stamm FUS4/pF81 unter diesen Bedingungen entweder gar nicht, oder nur nach einer lag-Phase von mehr als 30 Stunden wuchs. Durch Umstellen der Begasung von Mediumbegasung auf Kopfraumbegasung konnte die Sauerstoffsättigung in diesem System auf 70-80% gesenkt werden. Dies hatte zur Folge, dass die Bakterien ohne lag-Phase wuchsen. Da die C-Ausbeuten mit Glycerin als C-Quelle bei diesen Versuchen unter 10% lagen und somit nicht vergleichbar zu den am Institut für Mikrobiologie durchgeführten Versuchen, wurde dieses System nicht weiter verwendet. Es machte aber nochmals deutlich, wie wichtig für den hier verwendeten Stamm die richtige Sauerstoffkonzentration ist.

Insgesamt konnte mit dieser Arbeit hinreichend gezeigt werden, dass der Einsatz von Glycerin oder Rohglycerin für die Synthese der aromatischen Aminosäure L-Phenylalanin möglich und sogar vorteilhaft ist. Es wurde gezeigt, dass zum einen die Anpassung von Fermentationsparameter, wie in diesem Fall die Sauerstoffverfügbarkeit im Medium und zum andern die genetische Veränderung des Produktionsstammes an zentralen Knotenpunkten des Stoffwechsels zu einer Verbesserung in der Produktivität führten. Für ein besseres Verständnis, was in den einzelnen Mutanten passiert und wie sie weiter verbessert werden können, wären Transkriptom-, Metabolom- und Stoffflussanalysen sehr hilfreich. Bei diesen Analysen wird der mRNA-Pool, der Pool an Stoffwechselintermediaten bzw. die Verteilung der C-Quelle in der Zelle näher untersucht. Ergebnisse dieser Analysen könnten weitere Limitierungen im Stoffwechsel oder der Enzymverfügbarkeit für einen bestimmten Schritt im Metabolismus identifizieren und so einen Hinweis darauf geben, ob und wenn ja, welche weiteren genetischen Veränderungen zusätzliche Vorteile bringen können („Metabolic Control Analysis“). Möglich wäre, dass z. B. nicht nur die Veränderung eines einzelnen Gens

vorteilhaft ist, sondern auch die Deletion oder Überexpression eines Regulators, der dann die Expression oder Reprimierung mehrerer Gene beeinflusst. Besonders interessant wäre in diesem Zusammenhang die nähere Betrachtung des Stammes FUS4.11/pF81. Eine genauere Analyse der zellulären Vorgänge während der kurzen, aber äußerst effizienten Produktionsphase dieses Stammes könnte möglicherweise Aufschluss darüber geben, warum diese Phase nicht länger anhält und was getan werden muss, um diese Phase zu verlängern. Auch die Untersuchung des Stammes FUS4.7/pF81 wäre interessant. Möglicherweise wäre hier eine stärkere Expression von *glpX* und *tktA* sinnvoll, z.B. durch Einbringen einer weiteren Genkopie ins Chromosom. Weiterhin wäre unter Umständen auch eine Untersuchung der Fermentationsparameter vorteilhaft. Für den unveränderten Stamm konnte mit Glycerin als C-Quelle gezeigt werden, dass die Sauerstoffsättigung im Medium eine große Rolle spielt. Es wäre sicher auch interessant, das Verhalten und die Eigenschaften der einzelnen Mutanten bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen zu untersuchen. Auch die Veränderung anderer Parameter, wie Induktionszeitpunkt, Zufütterung geringer Mengen an L-Tyrosin in der stationären Phase oder auch die Verwendung von Ammoniak statt KOH zur pH-Kontrolle könnten einen Einfluss auf das Ergebnis haben.

Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass Glycerin und Rohglycerin für die mikrobielle Produktion von L-Phenylalanin Vorteile gegenüber der Verwendung von Glucose hat, wäre auch die Erstellung einer neuen Ökoeffizienzanalyse für Biodiesel interessant. Zur Erstellung einer Ökoeffizienzanalyse werden die ökonomischen und ökologischen Einflüsse eines Produktes über den gesamten Lebensweg betrachtet (Saling und Kicherer, 2004). Hierfür stehen mehrere Methoden zur Auswahl, bei denen die betrachteten Parameter normiert werden und letztendlich eine Kennzahl ausgegeben wird, welche die Ökoeffizienz quantifiziert. Die Unterschiede der verschiedenen Programme liegen dabei in der Anzahl der betrachteten Parameter und in den anfallenden Kosten. Die Software EATOS (**E**nvironmental **A**ssessment **T**ool for **O**rganic **S**yntheses, Dr. Eisser) beispielsweise kann kostenlos im Internet herunter geladen werden (<http://www.metzger.chemie.uni-oldenburg.de/eatos/>), eignet sich aber, wie der Name schon sagt, nur für die Betrachtung chemischer Prozesse. Die Betrachtung von Fermentationsprozessen ist für dieses Programm aber zu komplex, um zu einer verwertbaren Aussage über die Ökoeffizienz zu gelangen. Sabento (ifu Hamburg GmbH) stellt eine weitere Software dar, die für die Erstellung einer Ökoeffizienzanalyse in Frage käme. Der Vorteil dieses Programms ist, dass hiermit auch komplexere Prozesse wie eine Fermentation erfasst werden können. Der Nachteil ist, dass sozio-ökonomische Aspekte

nicht erfasst werden. Die Software ist nicht kostenlos erhältlich, sondern beläuft sich auf 2900€ für Universitäten. Eine weitere Möglichkeit ist die Nutzung der von der BASF entwickelten Methode „SEEBALANCE®“. Hierbei handelt es sich jedoch um eine Dienstleistung, d.h., die Analyse wird von der BASF selbst durchgeführt. Es steht somit keine Software zur Verfügung, mit der auch weitere Prozesse betrachtet werden können. Der Vorteil dieser Methode ist die umfassende Betrachtung verschiedenster Aspekte, angefangen vom chemischen Prozess bis hin zu sozialen Auswirkungen. Die Kosten belaufen sich hierbei pro ausgewertetem Prozess aber auf ca. 25000€ und ist damit nicht geeignet für den universitären Bereich. Da für die Erstellung einer Ökoeffizienzanalyse keine der oben genannten Softwares zur Verfügung stand oder geeignet war, wurden im Folgenden nur die einzelnen, sich verändernden Parameter betrachtet und abgeschätzt, ob dabei eine Verbesserung oder eine Verschlechterung in der Ökoeffizienz zu erwarten ist.

Bei dem hier beschriebenen Projekt gibt es zwei Prozesse, deren Ökoeffizienzen betrachtet werden können. Zum einen sollte durch die gewinnbringende Verarbeitung des Rohglycerins die Ökoeffizienz des Biodiesels verbessert werden. Anhand der von der BASF veröffentlichten Ökoeffizienzanalyse des Biodiesels (Achatz *et al.*, 2007) wird ersichtlich, dass Biodiesel aufgrund der hohen Kosten dem fossilen Diesel unterlegen ist (siehe Einleitung). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Rohglycerin ohne weitere Aufreinigung als C-Quelle für die mikrobielle Produktion von Feinchemikalien verwendet werden kann. Es sollte deshalb möglich sein, mit einer ökonomischeren Weiterverwertung des Rohglycerins die Ökoeffizienzanalyse des Biodiesels so zu verbessern, dass möglicherweise sogar ein Vorteil gegenüber dem fossilen Diesel entsteht.

Der zweite zu betrachtende Prozess ist die L-Phenylalaninproduktion mithilfe gentechnisch veränderter *E. coli*-Stämmen. Die übliche C-Quelle Glucose soll dabei gegen Rohglycerin ausgetauscht werden. Wie bei allen Fermentationen fallen auch hier unvermeidbar Energiekosten und Abfallströme an. Da keine Werte für industrielle Vergleichsprozesse öffentlich zugänglich sind, wurden hier die Fermentationen von FUS4/pF81 mit Glucose und mit Rohglycerin als C-Quelle verglichen. Die Parameter, die in die Erstellung einer Ökoeffizienzanalyse einfließen, sind sehr vielfältig. Betrachtet werden alle Edukte hinsichtlich ihrer Gefährlichkeit, ihrer Umweltverträglichkeit und ihrer Kosten. Ebenso erfolgt die Betrachtung der Produkte und Nebenprodukte. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die prozessbegleitende Logistik. Hier spielen Faktoren eine Rolle wie:

- Transport,
- Handhabung der Chemikalien,

- Kühl-/Heizwasser,
- Strombedarf
- Bedarf an bestimmten Räumlichkeiten, wie z.B. der Bedarf spezieller Sicherheitsvorkehrungen bei Verwendung von gentechnisch veränderten Mikroorganismen,
- Autoklavier- oder Verbrennungsmöglichkeiten.

Da der Prozess der L-Phenylalaninproduktion unter Verwendung von Rohglycerin statt Glucose prinzipiell gleich bleiben soll, wurden hier nur die abweichenden Parameter betrachtet.

Für die bestehenden Prozesse wird hauptsächlich Glucose als C-Quelle verwendet. Der aktuelle Preis für Zucker liegt momentan bei 0,16\$/lb (22.04.2010) was einem Tonnenpreis von etwa 350\$ entspricht. Abbildung 5-4 zeigt den zeitlichen Verlauf des Zuckerpreises für die letzten 5 Jahre in \$/lb. Aufgrund des stark schwankenden Preises für Zucker und den Währungsschwankungen zwischen € und US\$ ist die Betrachtung der Ökoeffizienz für die mikrobielle L-Phenylalaninproduktion auf Zuckerbasis im Hinblick auf diesen Faktor schwierig.

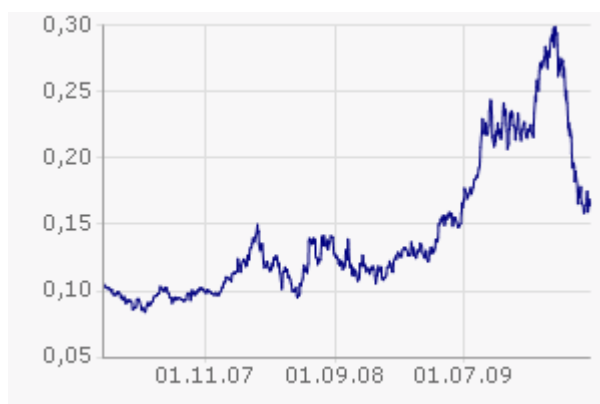


Abbildung 5-4 Preisentwicklung für Zucker (Saccharose) während der letzten 5 Jahre.

Der Preis ist dargestellt in \$/lb. (Quelle: <http://www.finanzen.net/rohstoffe/zuckerpreis>)

Der Preis von Glycerin ist in den letzten Jahren aufgrund der erhöhten Biodieselpromotion stetig gefallen und der Einkaufspreis der BASF lag im dritten Quartal 2009 für den Bezug kleinerer Tonnen-Mengen bei 1250€/t (Cooper, 2009). Da sich dieser Preis auf aufgereinigtes Glycerin bezieht und sich die Kosten für die Aufreinigung des Rohglycerins auf etwa 300US\$/m³ belaufen (Rupilius und Ahmad, 2007), kann davon ausgegangen werden, dass der Preis für Rohglycerin etwas geringer ist. Von der BASF wird Glycerin trotz seines höheren Preises aufgrund mehrerer vorteilhafter Eigenschaften für die Produktion von Spezialenzymen genutzt. Zu nennen sind hier der Aggregatzustand, die Mischbarkeit mit Wasser in jedem Verhältnis und die Möglichkeit, Glycerin zusammen mit Phosphat, Ammonium oder Aminosäuren zu autoklavieren, was z.B. mit Glucose nicht möglich ist. Dies ermöglicht es,

dass hochkonzentrierte Lösungen verwendet werden können und sich der Aufwand für die Sterilisation drastisch verringert. Die Tatsache, dass Glycerin bis Temperaturen $>18^{\circ}\text{C}$ flüssig bleibt, erlaubt, dass weder Lagerbehälter noch Glycerin führende Leitungen beheizt werden müssen, wie es bei Glucose der Fall ist. Vorteilhaft ist hierbei auch, dass der flüssige Zustand es gestattet reines Glycerin zu füttern. Es ist deshalb möglich große Mengen an Kohlenstoff in den Fermenter zu bringen, ohne die Lösung zu sehr zu verdünnen. Es ist also möglich, bei einer einzelnen Fermentation mit Glycerin als C-Quelle mehr Produkt zu produzieren als mit Glucose. Diese Vorteile bringen im großen Maßstab nicht nur eine enorme Kostenersparnis, sondern sind auch deutlich umweltfreundlicher und sollten somit eine deutliche Verbesserung der Ökoeffizienz bringen. Ein weiterer Punkt, dem Beachtung geschenkt werden sollte ist die Sauerstoffversorgung. Es war nicht nur bei den hier beschriebenen Versuchen beobachtet worden, dass mit Glycerin als C-Quelle geringere Sauerstoffkonzentrationen von Vorteil sind, sondern auch in einem jüngst veröffentlichten PHB-Produktionsprozess (de Almeida *et al.*, 2010). Dies sind zwar noch zu wenige Beispiele, bei denen der Vorteil einer geringen Sauerstoffversorgung beobachtet worden war, um eine Verallgemeinerung für alle Glycerin-basierten Prozesse zuzulassen, aber es macht doch deutlich, dass es mehr als nur ein Beispiel gibt. Der geringere Sauerstoffbedarf würde sich dann auch wieder positiv auf den Energiebedarf des kompletten Prozesses auswirken, da mit geringeren Rührgeschwindigkeiten und/oder weniger Druckluft gearbeitet werden kann. Dies hätte auch den Vorteil, dass eine geringere Wärmeentwicklung am Rührer entsteht.

Da im Rohglycerin aber Verunreinigungen auftreten, ist nicht klar, ob die Vorteile auch alle so auf diesen Stoff übertragen werden können. Rohglycerin scheint zwar das Zellwachstum und die Produktbildung nicht wesentlich zu stören, aber bei den Fermentationen mit dieser C-Quelle konnte beobachtet werden, dass verklumpte Ascherückstände im Rohglycerin sich an Oberflächen wie Glas und Plastik absetzen und so eine häufigere Reinigung der Zulaufgefäße nötig ist. Da sich die Ascherückstände an der Oberfläche des Rohglycerins absetzen, wäre auch denkbar, die oberste Schicht abzuschöpfen. Aber auch hier ist auf jeden Fall ein weiterer Arbeitsschritt notwendig, der sich dann wieder auf die Kosten niederschlägt, da entweder ein Gerät zum Abschöpfen angeschafft oder Betriebspersonal für diesen Vorgang beschäftigt werden muss. Die Medienzusammensetzung sollte bei Verwendung für Rohglycerin gleich bleiben, so dass hier nichts weiter zu beachten ist. Der Verlauf der Fermentation hinsichtlich Temperatur und Laufzeit sollte sich ebenfalls nicht ändern. Was allerdings beachtet werden sollte, ist die möglicherweise höhere Säurebildung mit Rohglycerin als C-Quelle. Die Neutralisierung der Säuren erfordert den Einsatz höherer Mengen an Lauge. Das daraus

resultierende Salz stellt dann bei der Entsorgung ein Problem dar, da ein hoher Salzgehalt eine Versalzung der Gewässer zur Folge hat und somit eine Beeinträchtigung für die Umwelt darstellt. Ein weiteres Problem eines hohen Salzgehaltes ist die Korrosivität der Lösung. Für die Entsorgung salzhaltiger Lösungen müsste deshalb entweder das Salz entfernt oder die Lösung so weit verdünnt werden, dass keine Versalzungsgefahr für die Umwelt mehr besteht. Als Möglichkeit, dem entgegenzukommen, wäre hier vielleicht die Verwendung von Ammonium zur pH-Stabilisierung, das auch gleichzeitig als Stickstoffquelle dienen könnte oder die Etablierung einer verbesserten Fütterungsstrategie. Kann die Säurebildung aber nicht durch eine der beiden Maßnahmen vermieden werden, würden beide Alternativen eine Verschlechterung der Ökoeffizienz darstellen. Nicht geklärt werden kann anhand der in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse, ob Probleme bezüglich der Chargengleichheit des Rohglycerins entstehen könnten. Es konnte hier zwar gezeigt werden, dass das Wachstum des Wildtyp-*E. coli* auf verschiedenen Chargen gleich war, aber um statistisch gesicherte Aussagen treffen zu können, wäre die Untersuchung weiterer Chargen notwendig.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Aufreinigung. Da es möglich ist, die Zellen nach Beendigung der Produktionsphase noch so lange weiter zu kultivieren, bis das restliche Glycerin verbraucht ist, sollten hier keine Probleme entstehen. Nicht abgeschätzt werden kann dagegen, ob Verunreinigungen im Rohglycerin, die möglicherweise im Laufe der Fermentation akkumulieren, einen störenden Einfluss auf die Aufreinigung haben. Insgesamt gibt es also bei Verwendung von Rohglycerin statt Glucose Faktoren, die sich positiv auf die Ökobilanz auswirken. Dies sind die verbesserte Ökoeffizienz des Biodiesels und die bessere und einfachere Handhabung von Glycerin und damit vielleicht auch von Rohglycerin. Negativ könnte sich dagegen vielleicht eine höhere Säurebildung bei Rohglycerin auswirken, wie es im Labormaßstab gezeigt wurde. Hier müsste aber zunächst untersucht werden, ob dies auch im technischen Maßstab auftritt und nicht durch verfahrenstechnische Verbesserungen vermieden werden kann. Ebenfalls problematisch ist der Mehraufwand an Reinigung oder Vorbehandlung des Rohglycerins, der durch die Verunreinigung durch Asche entsteht. Für den Prozess der L-Phenylalaninproduktion kann also nicht eindeutig gesagt werden, ob der Einsatz von Rohglycerin eindeutig vorteilhaft für die Ökoeffizienz ist. Hierfür wäre es notwendig zu ermitteln, inwiefern die oben genannten Probleme bereits durch verbesserte Fermentationsbedingungen oder Verwendung besser geeigneter Zulaufgefäße behoben werden können.

6 Anhang

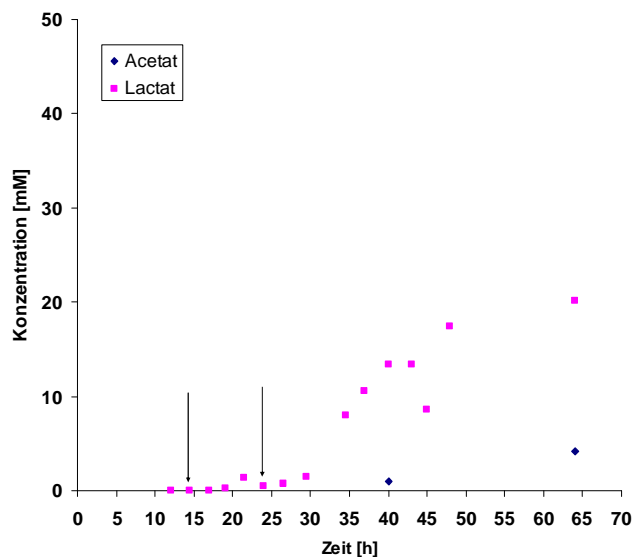
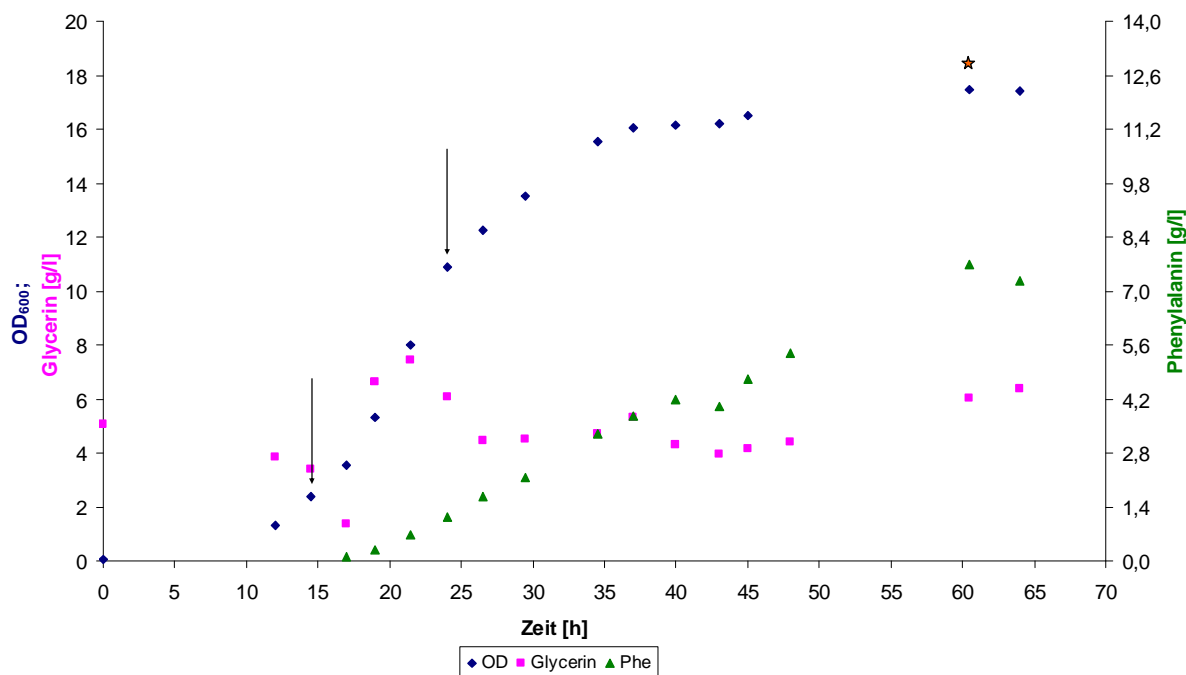


Abbildung 6-1 Zweite Fermentation von FUS4/pF81 bei 60% O₂-Sättigung und Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) (oben) und Nebenproduktanalyse (unten).

Oben: Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin betrug 7,7g/l. Insgesamt wurden 122g Glycerin verbraucht. Die Wachstumsrate betrug 0,27 h⁻¹. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben. Unten: Ergebnis der Nebenproduktanalyse im Verlauf der oben dargestellten Fermentation. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl. Kapitel 4.4).

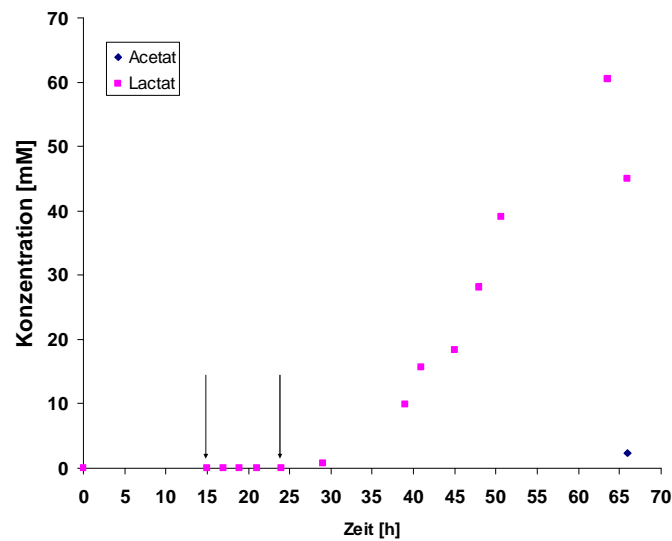
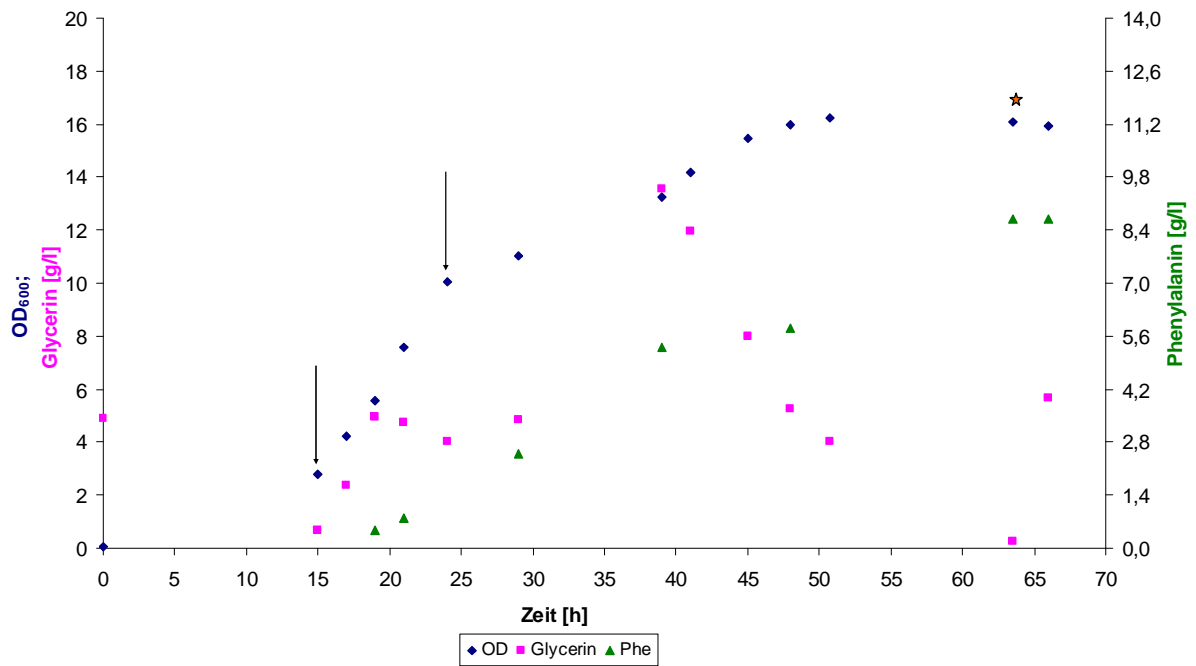


Abbildung 6-2 Zweite Fermentation von FUS4/pF81 bei 20% O₂-Sättigung und Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) (oben) und Nebenproduktanalyse (unten).

Oben: Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin betrug 8,7g/l. Insgesamt wurden 98g Glycerin verbraucht. Die Wachstumsrate betrug 0,26 h⁻¹. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben. Unten: Nebenproduktbildung im Verlauf der oben dargestellten Fermentation. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl. Kapitel 4.4).

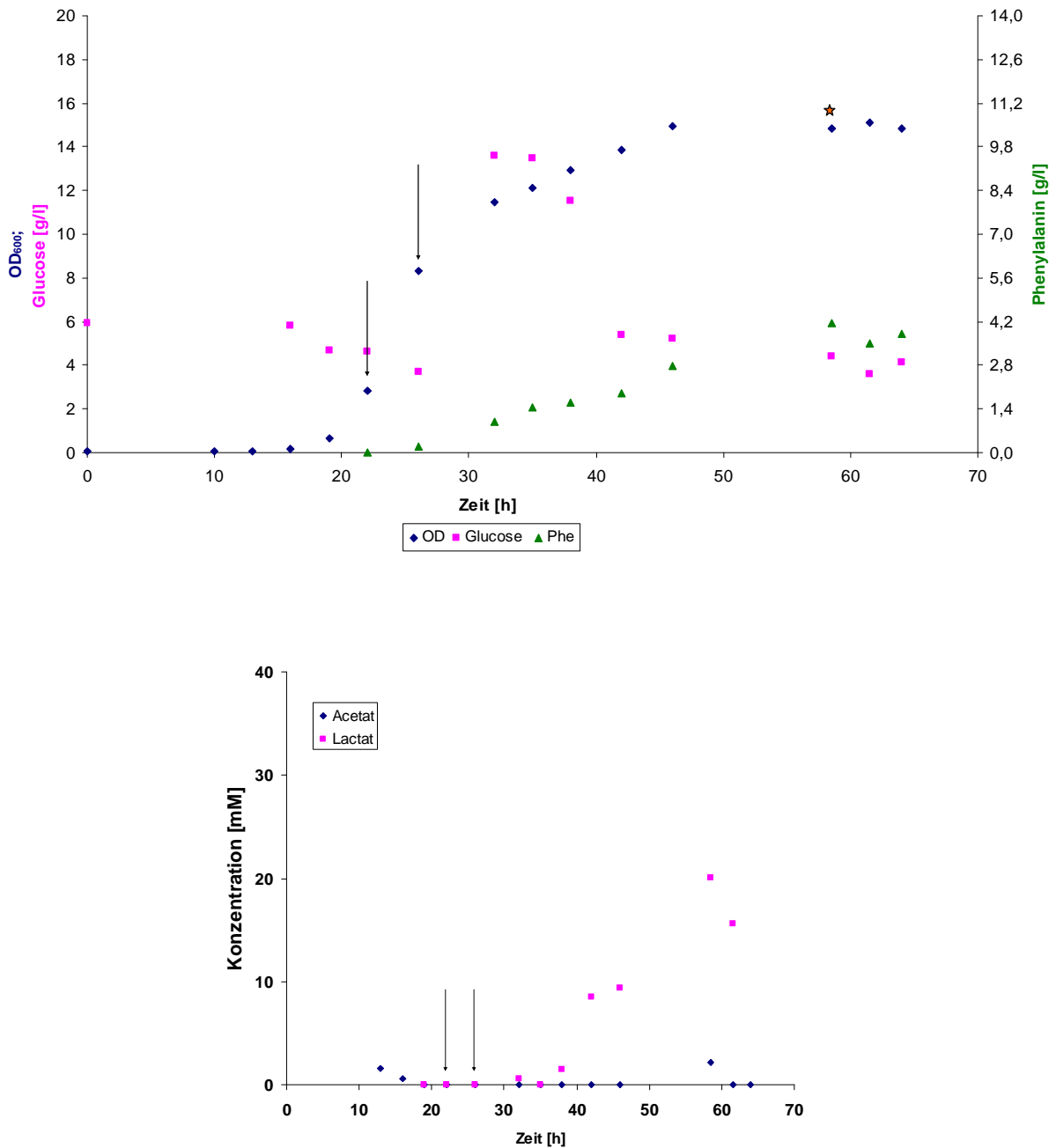


Abbildung 6-3 Zweite Fermentation von FUS4/pF81 bei 60% O₂-Sättigung und Glucose als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) (oben) und Nebenproduktanalyse (unten).

Oben: Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin betrug 3,0g/l. Insgesamt wurden 72g Glucose verbraucht. Die Wachstumsrate betrug 0,48 h⁻¹. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben. Der Stern markiert den Zeitpunkt, an dem die maximale C-Ausbeute erreicht war. Unten: Ergebnis der Nebenproduktanalyse für die Kultivierung von FUS4/pF81 in Minimalmedium + Glucose. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl. Kapitel 4.4).

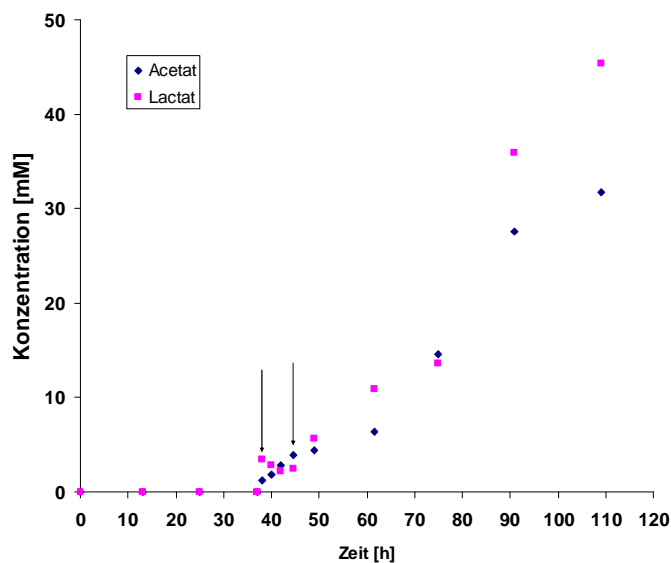
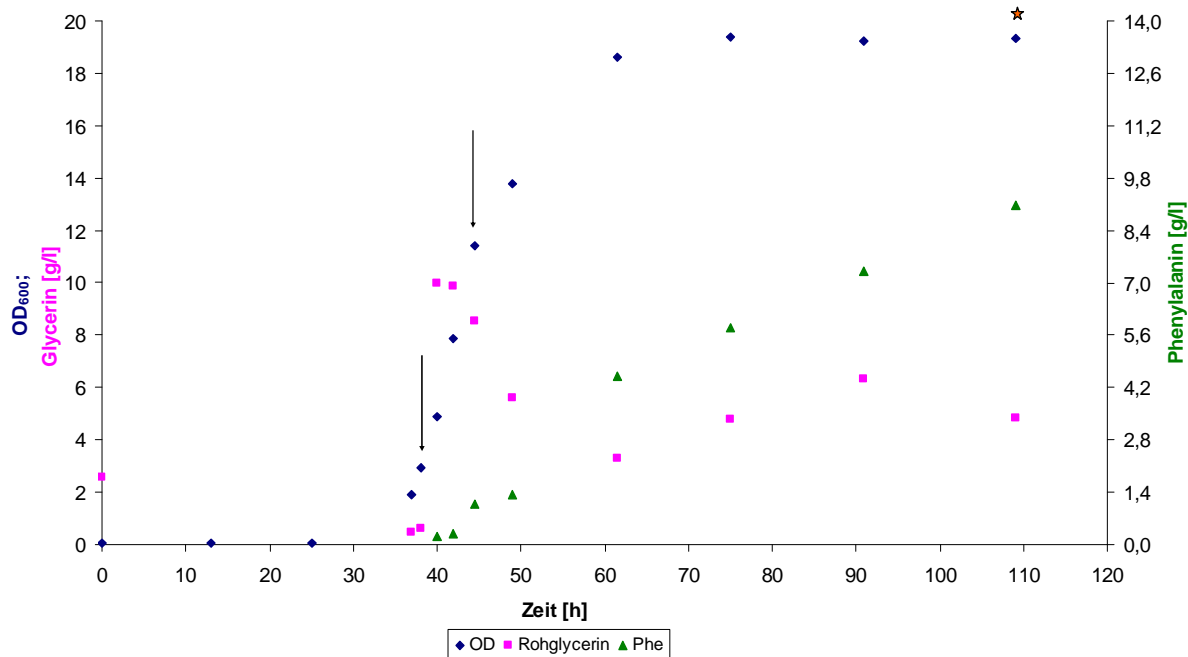


Abbildung 6-4 Zweite Fermentation von FUS4/pF81 bei 20% O₂-Sättigung und Rohglycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) (oben) und Nebenproduktanalyse (unten).

Oben: Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin betrug 9,1g/l. Insgesamt wurden 158,7g Rohglycerin verbraucht. Die Wachstumsrate betrug 0,31 h⁻¹. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben. Der Stern markiert den Zeitpunkt, an dem die maximale C-Ausbeute erreicht war. Unten: Ergebnis der Nebenproduktanalyse für die Kultivierung von FUS4/pF81 in Minimalmedium + Rohglycerin. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl. Kapitel 4.4).

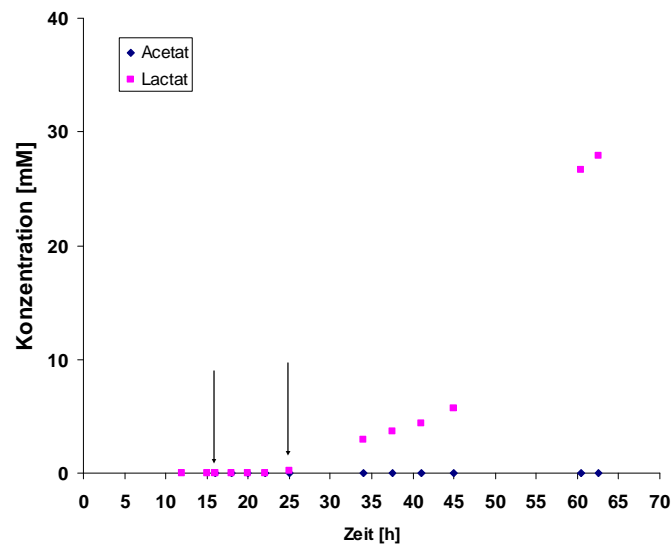
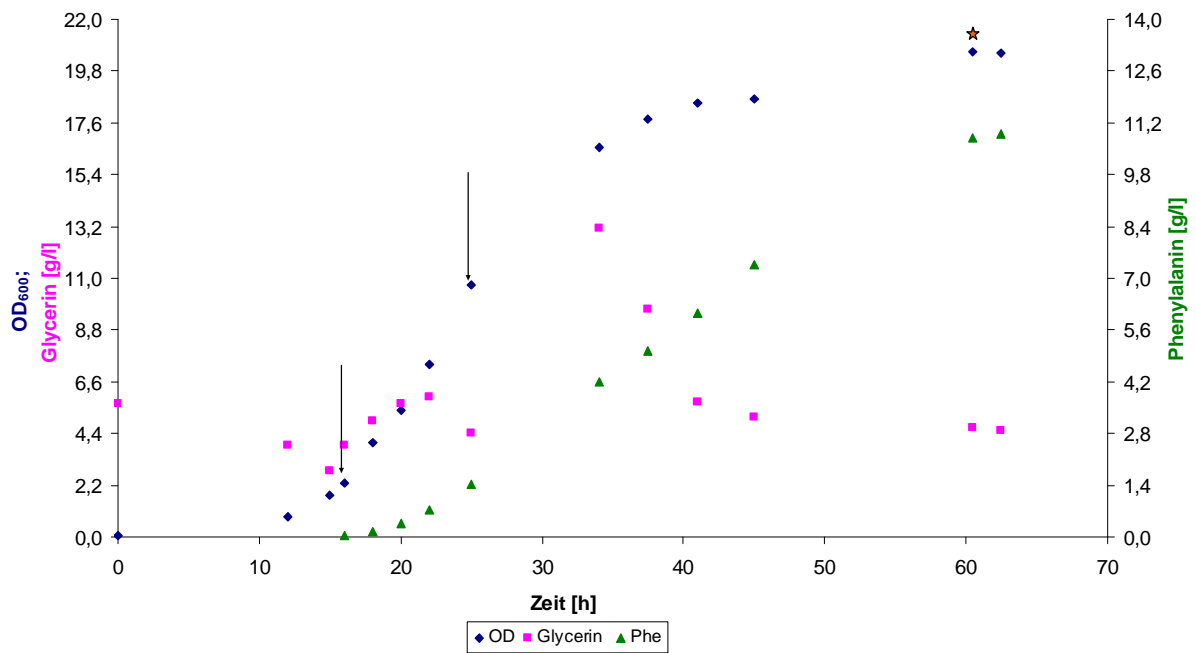


Abbildung 6-5 Zweite Fermentation von FUS4.3/pF81 bei 60% O₂-Sättigung und Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) (oben) und Nebenproduktanalyse (unten).

Oben: Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin betrug 10,9g/l. Insgesamt wurden 131g Glycerin verbraucht. Die Wachstumsrate betrug 0,24 h⁻¹. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben. Der Stern markiert den Zeitpunkt, an dem die maximale C-Ausbeute erreicht war. Unten: Ergebnis der Nebenproduktanalyse für die Kultivierung von FUS4.3/pF81 in Minimalmedium + Glycerin. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl. Kapitel 4.4).

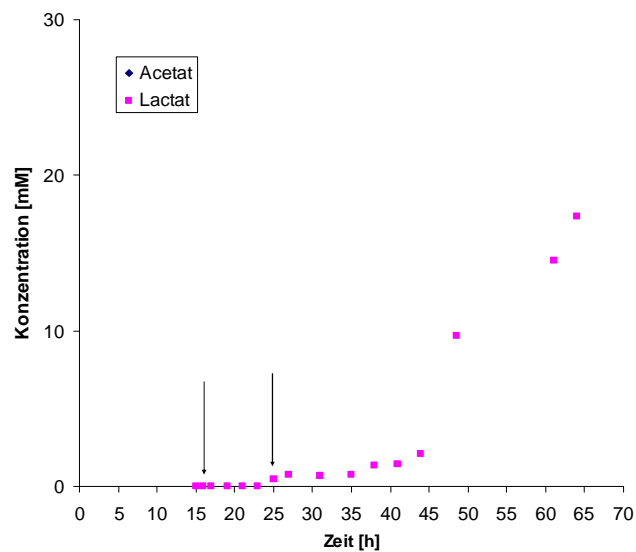
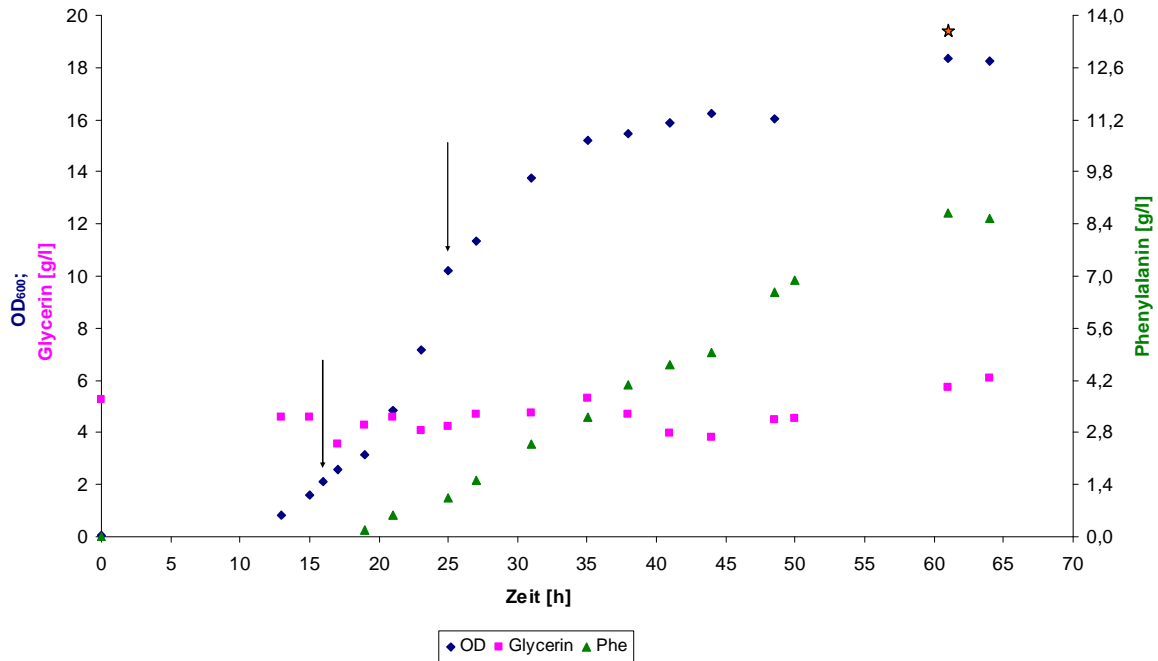


Abbildung 6-6 Zweite Fermentation von FUS4.4/pF81 bei 60% O₂-Sättigung und Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) (oben) und Nebenproduktanalyse (unten).

Oben: Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin betrug 8,7g/l. Insgesamt wurden 84g Glycerin verbraucht. Die Wachstumsrate betrug 0,30 h⁻¹. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben. Der Stern markiert den Zeitpunkt, an dem die maximale C-Ausbeute erreicht war. Unten: Ergebnis der Nebenproduktanalyse für die Kultivierung von FUS4.4/pF81 in Minimalmedium + Glycerin. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl. Kapitel 4.4).

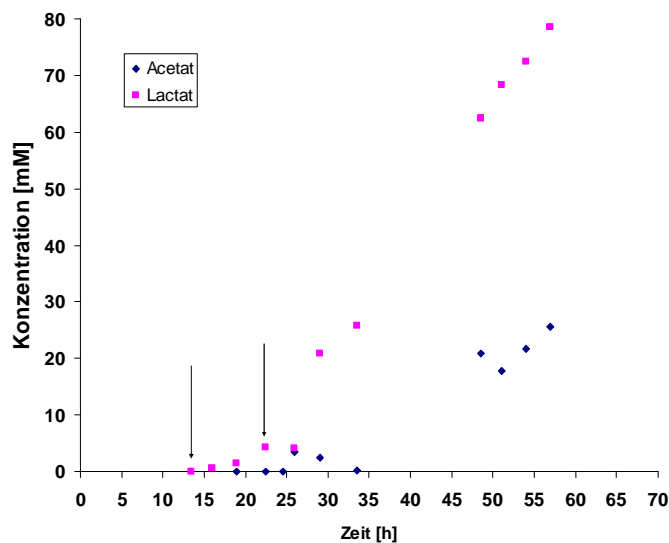
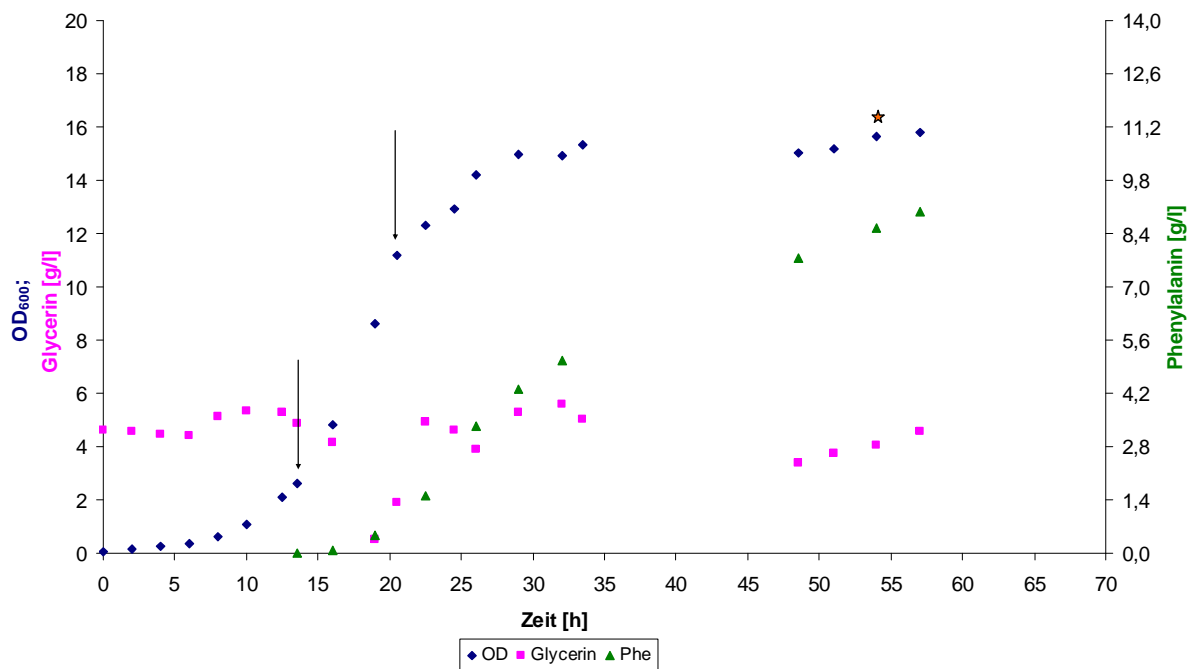


Abbildung 6-7 Zweite Fermentation von FUS4.5/pF81 bei 60% O₂-Sättigung und Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) (oben) und Nebenproduktanalyse (unten).

Oben: Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin betrug 8,9g/l. Insgesamt wurden 135g Glycerin verbraucht. Die Wachstumsrate betrug 0,25 h⁻¹. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben. Der Stern markiert den Zeitpunkt, an dem die maximale C-Ausbeute erreicht war. Unten: Ergebnis der Nebenproduktanalyse für die Kultivierung von FUS4.5/pF81 in Minimalmedium + Glycerin. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl. Kapitel 4.4).

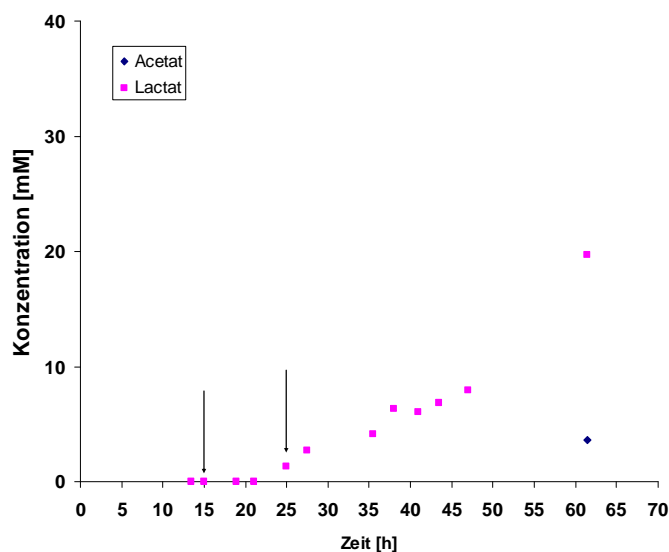
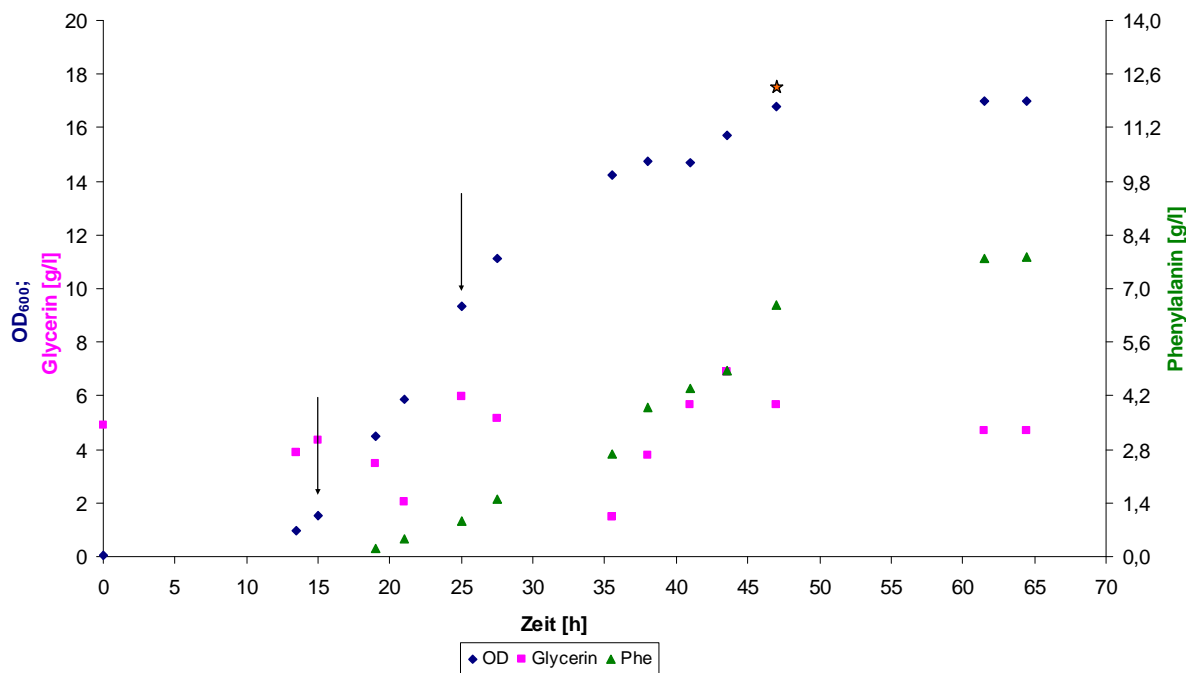


Abbildung 6-8 Zweite Fermentation von FUS4.6/pF81 bei 60% O₂-Sättigung und Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) (oben) und Nebenproduktanalyse (unten).

Oben: Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin betrug 7,8g/l. Insgesamt wurden 135g Glycerin verbraucht. Die Wachstumsrate betrug 0,32 h⁻¹. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben. Der Stern markiert den Zeitpunkt, an dem die maximale C-Ausbeute erreicht war. Unten: Ergebnis der Nebenproduktanalyse für die Kultivierung von FUS4.6/pF81 in Minimalmedium + Glycerin. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl. Kapitel 4.4).

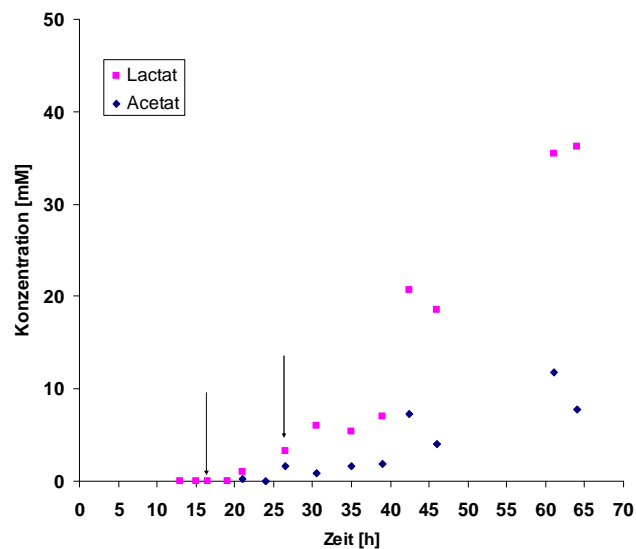
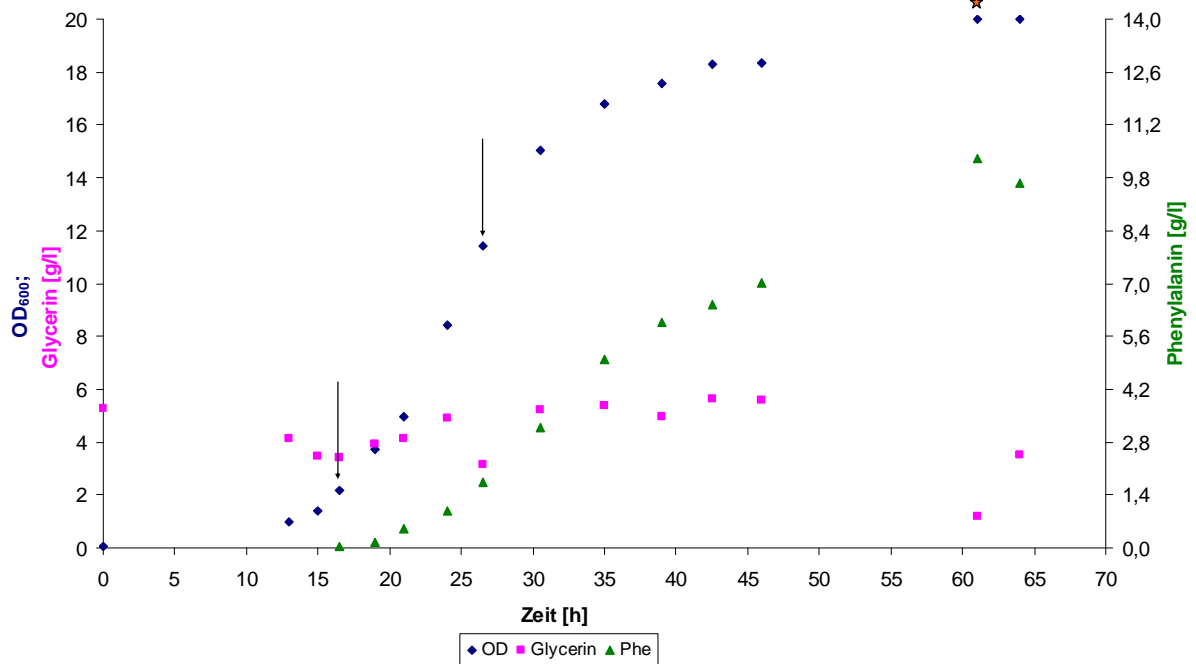


Abbildung 6-9 Zweite Fermentation von FUS4.7/pF81 bei 60% O₂-Sättigung und Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) (oben) und Nebenproduktanalyse (unten).

Oben: Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin betrug 10,3g/l. Insgesamt wurden 129g Glycerin verbraucht. Die Wachstumsrate betrug 0,23 h⁻¹. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben. Unten: Ergebnis der Nebenproduktanalyse für die Kultivierung von FUS4.7/pF81 in Minimalmedium + Glycerin. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl. Kapitel 4.4).

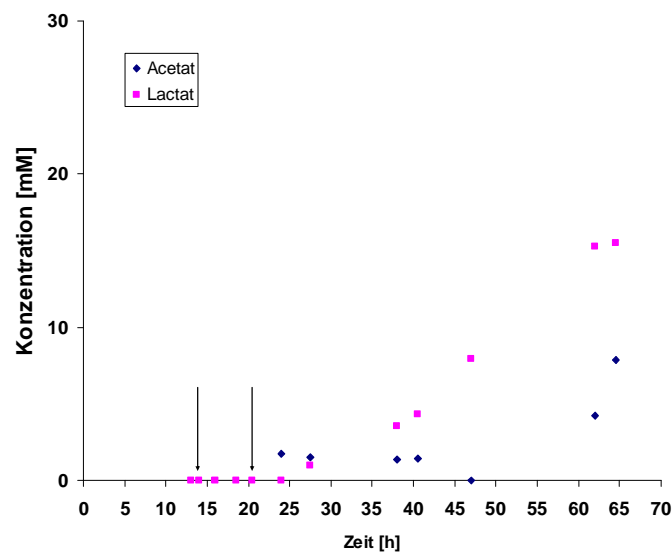
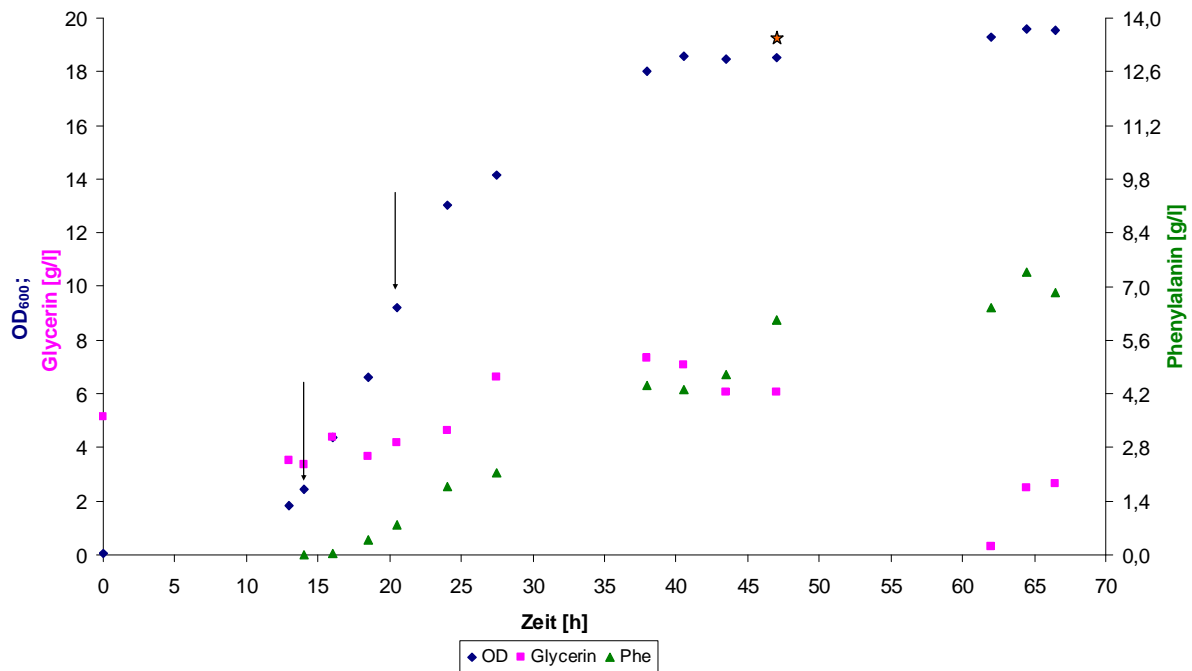


Abbildung 6-10 Zweite Fermentation von FUS4.8/pF81 bei 60% O₂-Sättigung und Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) (oben) und Nebenproduktanalyse (unten).

Oben: Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin betrug 7,4g/l. Insgesamt wurden 101g Glycerin verbraucht. Die Wachstumsrate betrug 0,28 h⁻¹. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben. Unten: Ergebnis der Nebenproduktanalyse für die Kultivierung von FUS4.8/pF81 in Minimalmedium + Glycerin. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl. Kapitel 4.4).

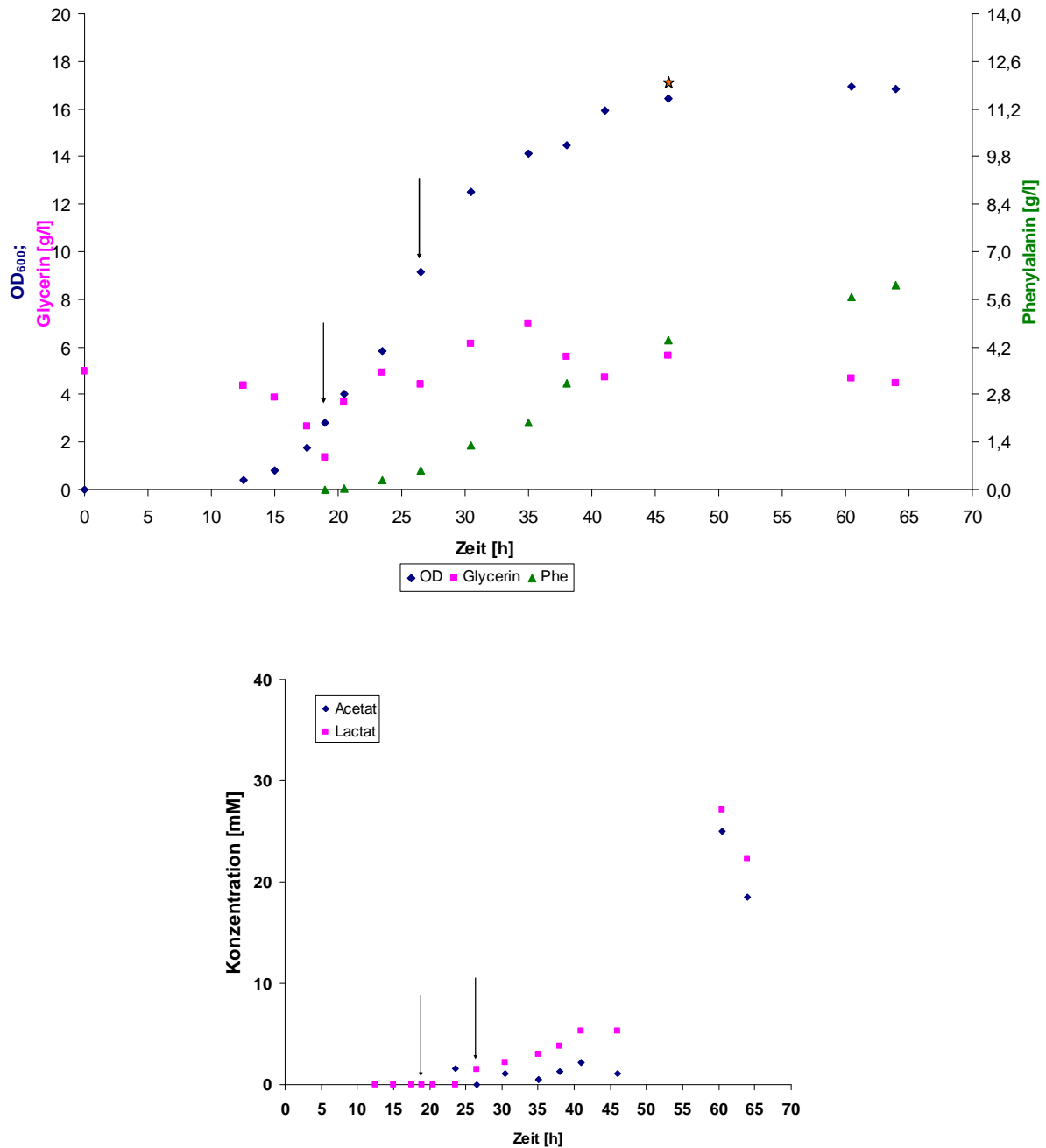


Abbildung 6-11 Zweite Fermentation von FUS4.9/pF81 bei 60% O₂-Sättigung und Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) (oben) und Nebenproduktanalyse (unten).

Oben: Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin betrug 6,0g/l. Insgesamt wurden 110g Glycerin verbraucht. Die Wachstumsrate betrug 0,30 h⁻¹. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben. Unten: Ergebnis der Nebenproduktanalyse für die Kultivierung von FUS4.9/pF81 in Minimalmedium + Glycerin. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl. Kapitel 4.4).

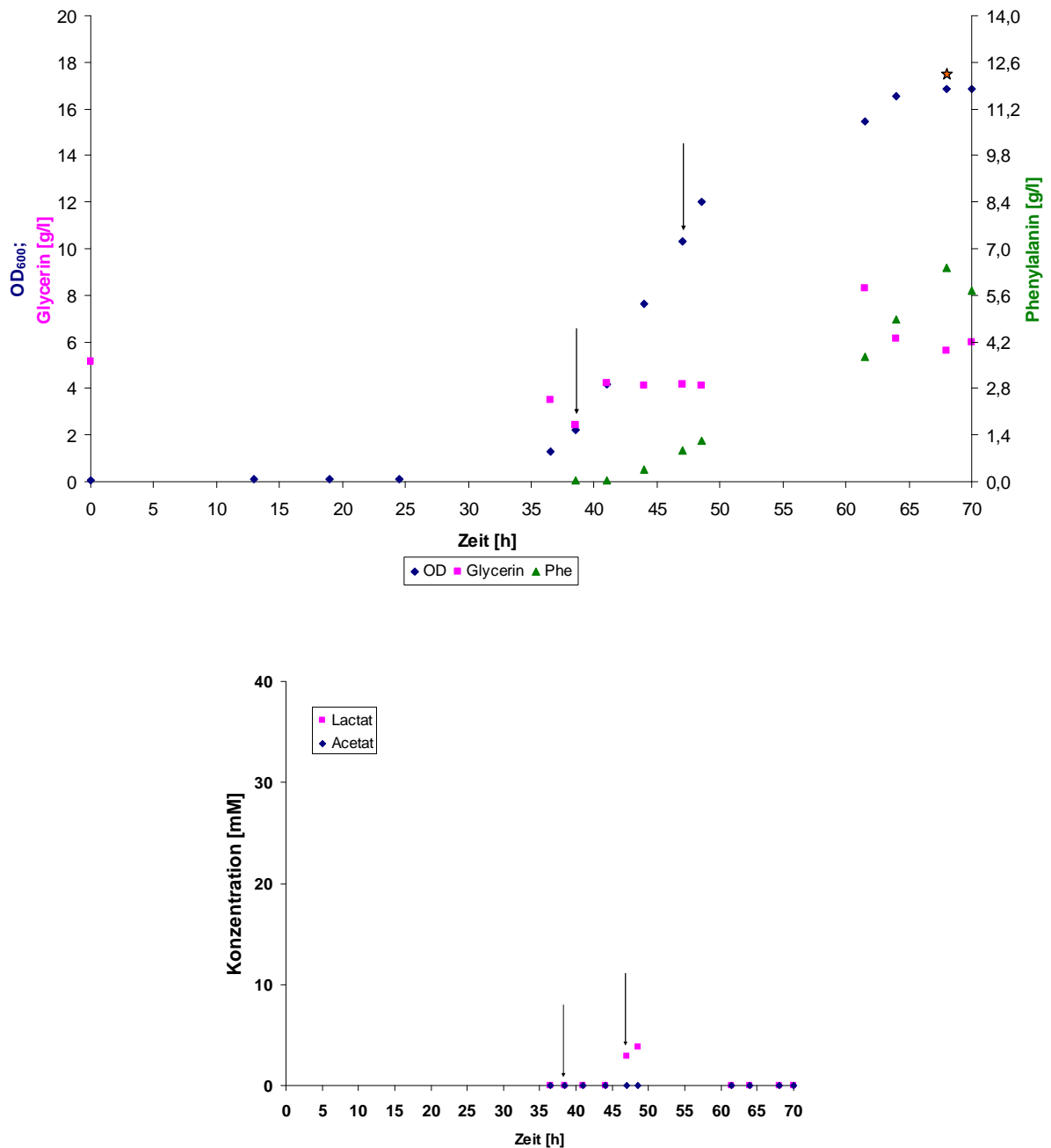


Abbildung 6-12 Zweite Fermentation von FUS4.10/pF81 bei 60% O₂-Sättigung und Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) (oben) und Nebenproduktanalyse (unten).

Oben: Verlauf der zweiten Fed-Batch-Fermentation von FUS4.10/pF81 mit Glycerin als C-Quelle (Startkonzentration 0,5%) bei 60% Sauerstoffsättigung. Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin betrug 6,4g/l. Insgesamt wurden 92g Glycerin verbraucht. Die Wachstumsrate betrug 0,29 h⁻¹. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben. Unten: Ergebnis der Nebenprodukt-analyse für die zweite Kultivierung von FUS4.10/pF81 in Minimalmedium + Glycerin. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl. Kapitel 4.4).

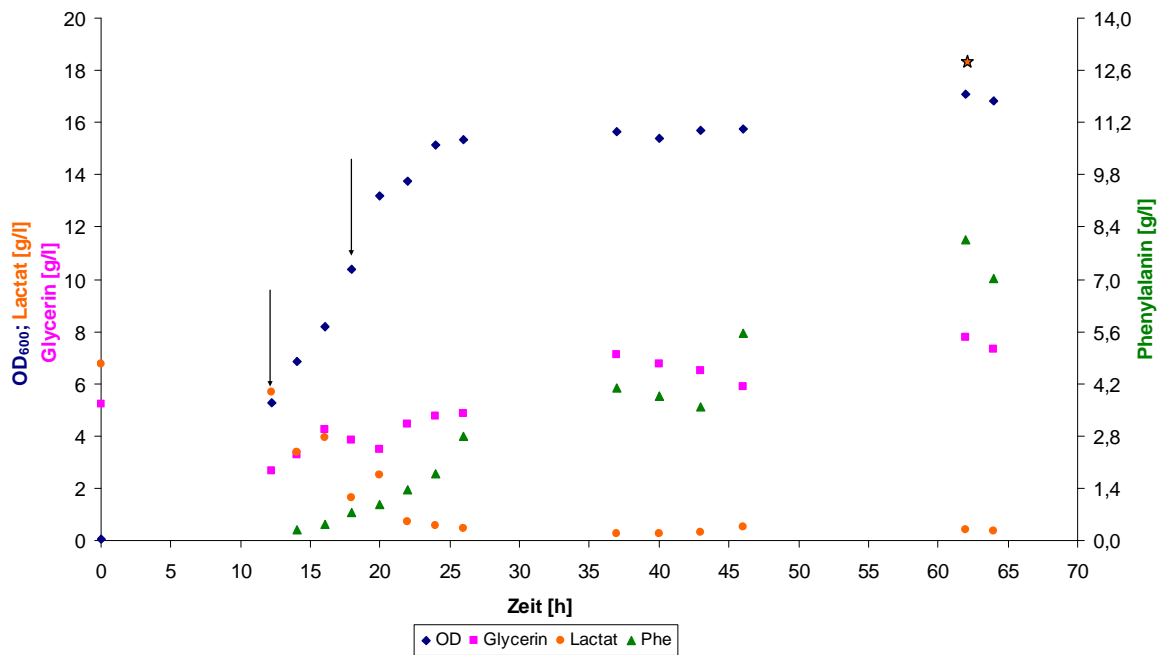


Abbildung 6-13 Verlauf der zweiten Fed-Batch-Fermentation von FUS4.11/pF81 mit Glycerin und Lactat als C-Quelle (Startkonzentration 0,5% Glycerin, 0,5% Lactat) bei 60% Sauerstoffsättigung.

Die erreichte Konzentration an L-Phenylalanin betrug 8,1g/l. Insgesamt wurden 58g Glycerin und 22g Lactat verbraucht. Die Wachstumsrate betrug $0,37 \text{ h}^{-1}$. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl. Kapitel 4.4). Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben. Der Stern markiert den Zeitpunkt, an dem die maximale C-Ausbeute erreicht war.

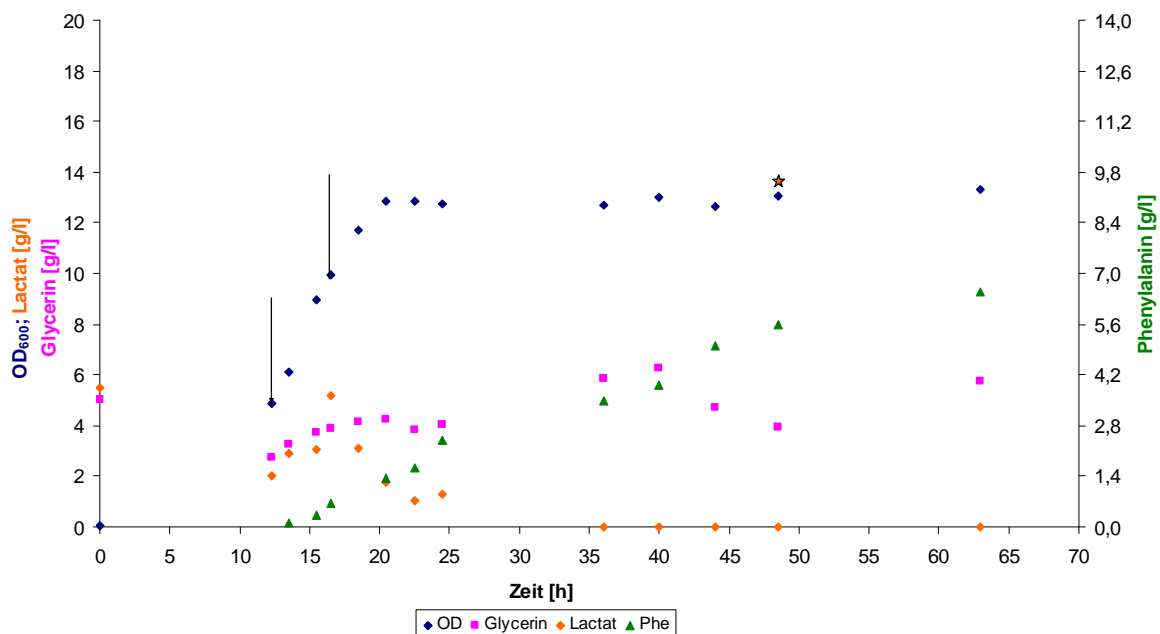


Abbildung 6-14 Verlauf der zweiten Fed-Batch-Fermentation von FUS4.14/pF81 mit Glycerin und Lactat als C-Quelle (Startkonzentration 0,5% Glycerin, 0,5% Lactat) bei 60% Sauerstoffsättigung.

Die erreichte Konzentration an L-Phe betrug 6,5g/l. Insgesamt wurden 88g Glycerin und 33g Lactat verbraucht. Die Wachstumsrate betrug $0,41 \text{ h}^{-1}$. Die Fermentationsparameter sind in Kapitel 3.3.1 beschrieben. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Induktion mit IPTG erfolgte (vgl. Kapitel 4.4). Der Stern markiert den Zeitpunkt, an dem die maximale C-Ausbeute erreicht war.

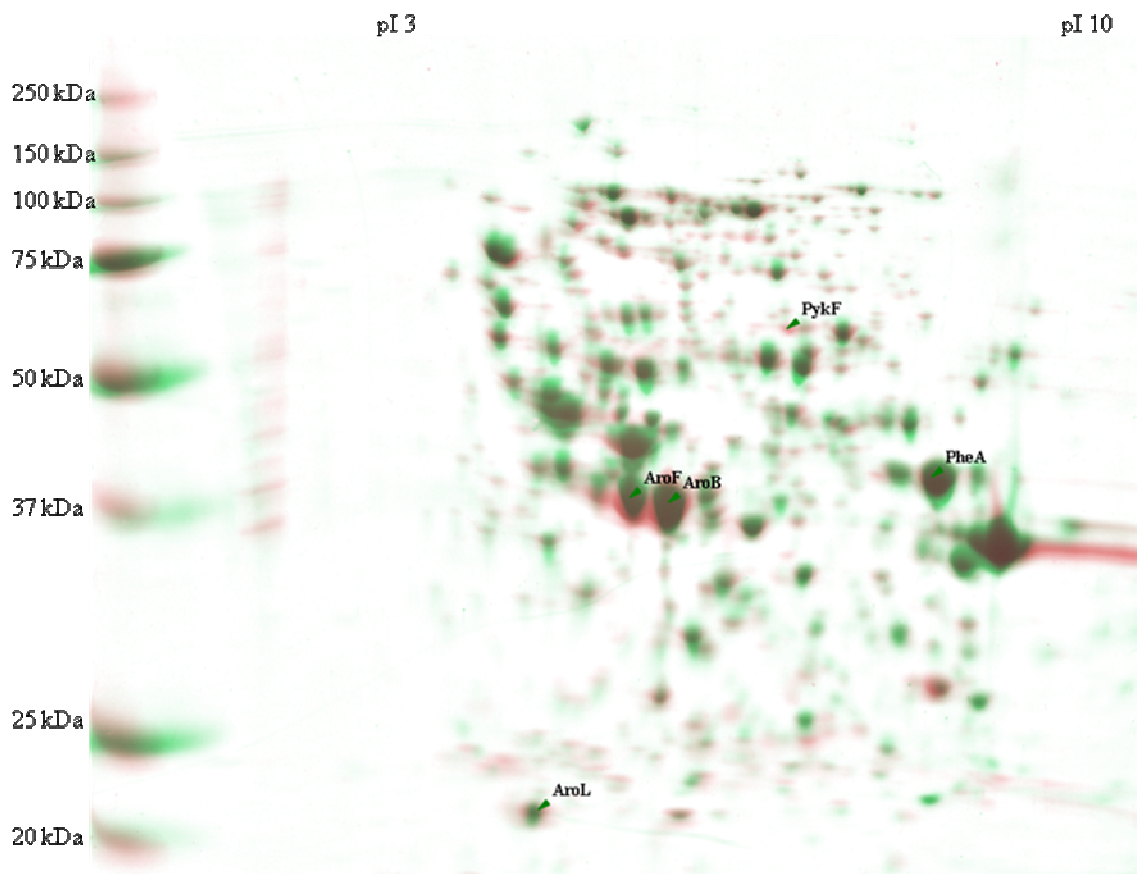


Abbildung 6-15 Vergleich der 2D-SDS-Gelelektrophorese von FUS4/pF81 (20% O₂, Glycerin, 37h, rot) und FUS4.3/pF81 (60% O₂, Glycerin 30h, grün).

Für die Auswertung verwendet wurde die Software Delta2D Version 3.2 (Decodon GmbH). Deutlich zu erkennen sind die Plasmid-codierten Proteine AroF, AroB, AroL und PheA. Die Identifikation der Spots erfolgte mittels pI- und Größenvergleich der einzelnen Spots mit Daten der EcoProDB-Datenbank (<http://eecoli.kaist.ac.kr/main.html>).

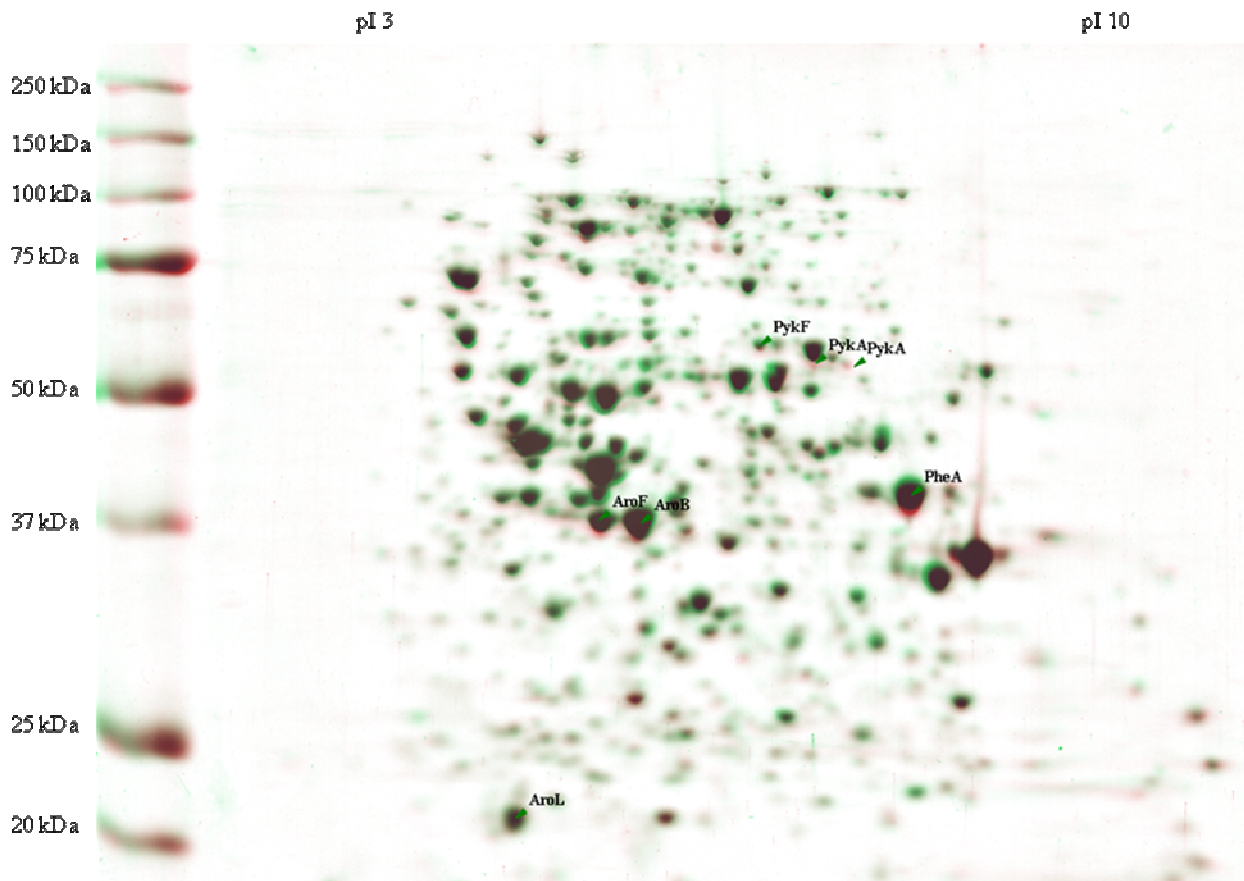


Abbildung 6-16 Vergleich der 2D-SDS-Gelelektrophorese von FUS4/pF81 (20% O₂, Glycerin, 27h, rot) und FUS4.4/pF81 (60% O₂, Glycerin 20h, grün).

Für die Auswertung verwendet wurde die Software Delta2D Version 3.2 (Decodon GmbH). Deutlich zu erkennen sind die Plasmid-codierten Proteine AroF, AroB, AroL und PheA. Die Identifikation der Spots erfolgte mittels pI- und Größenvergleich der einzelnen Spots mit Daten der EcoProDB-Datenbank (<http://eecoli.kaist.ac.kr/main.html>).

7 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde vom 1. Januar 2008 bis zum 31. März 2010 am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt daher Herrn Prof. Dr. Georg A. Sprenger für die Überlassung dieses interessanten Themas, für die angenehmen Arbeitsbedingungen und das in mich gesetzte Vertrauen. Besonders bedanken möchte ich mich für die hervorragende Betreuung und die stete Diskussionsbereitschaft.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dirk. Weuster-Botz für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Ein besonderer Dank geht an die DBU für die finanzielle und ideelle Förderung im Rahmen des Stipendenschwerpunkts „Nachhaltige Bioprozesse“. Namentlich erwähnen möchte ich hier Frau Dr. H. Schlegel-Starmann für die Betreuung seitens der DBU und Herrn Prof. Dr. A. Liese von der TU Hamburg-Harburg als wissenschaftlicher Koordinator. Besonders bedanken möchte ich mich in diesem Zusammenhang für die vielen Treffen, die einen intensiven Austausch mit anderen Doktoranden ermöglichten und so zu neuen Ideen und Gedankengängen führten. Auch die neu geknüpften Kontakte sollten nicht unerwähnt bleiben, die dazu führten, dass bei technischen Engpässen oder Schwierigkeiten am eigenen Institut eine einfachere Kooperation mit anderen Instituten möglich war.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Andreas Schmid von der TU Dortmund, dass er mir ermöglicht hat, die Fermenter an seinem Institut für meine Versuche zu nutzen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ralf Takors, der mir ebenfalls ermöglichte, an seinem Institut Fermentationen durchzuführen. Besonders bedanken möchte ich mich in diesem Zusammenhang bei Dipl.-Ing (FH) Andreas Freund und B. sc. (FH) Christina Krämer für die technische Unterstützung während diesen Versuchen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Joachim Schmid von der Firma Insilico Biotechnology, der mir bei der Berechnung der theoretisch maximal möglichen Ausbeute behilflich war.

Ein Dank hier auch an die ADM Hamburg und die EOP Falkenhagen für die Bereitstellung mehrerer Rohglycerinproben.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. C. Albermann für die Betreuung und Unterstützung bei den eher chemischen Problemen bedanken.

Bei Dipl.-Ing (FH) Olaf Dickel und M. sc. Shashank Ghanegaonkar möchte ich mich für die Hilfe am Fermenter bedanken.

Mein Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie für die stetige Hilfsbereitschaft. Besonders bedanken möchte ich mich hier bei den Mitarbeitern, Diplomanden, Studienarbeiter und F2-Praktikanten aus Labor1 und Büro1. Vor allem Frau Dr. Natalie Trachtmann trug mit ihrer langjährigen Erfahrung wesentlich dazu bei, dass die durchgeführten Klonierungsarbeiten in so kurzer Zeit bewältigt werden konnten. Bei Stephan Riemer möchte ich mich für die im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführten Untersuchungen zum alternativen Glycerinstoffwechsel und der weiteren Analyse der Stämme FUS4.11/pF81-FUS4.14/pF81 bedanken.

Ein herzlicher Dank geht auch an meine ganze Familie für die Unterstützung und das Verständnis dafür, dass die Arbeit manchmal Vorrang hatte.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt und sowohl wörtliche, als auch sinngemäß entlehnte Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Stuttgart, 3.Mai 2010

8 Literatur

Achatz, B., Saling, P., Kölsch, D. Nachhaltigkeitsbewertung mit der Ökoeffizienz-Analyse. 2007. Ökoeffizienzsysteme - Workshop "Quantifizierung und Nachhaltigkeit / Methoden und Tools. 12-9-2007.

Ahn, J.O., Lee, H.W., Saha, R., Park, M.S., Jung, J.K., Lee, D.Y. (2008). Exploring the Effects of Carbon Sources on the Metabolic Capacity for Shikimic Acid Production in *Escherichia coli* Using In Silico Metabolic Predictions. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18, 1773-1784.

Aiba, H. (2007). Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. *Current Opinion in Microbiology* 10, 134-139.

Albermann, C., Ghanegaonkar, S., Lemuth, K., Vallon, T., Reuss, M., Armbruster, W., Sprenger, G.A. (2008). Biosynthesis of the Vitamin E Compound delta-Tocotrienol in Recombinant *Escherichia coli* Cells. *Chembiochem* 9, 2524-2533.

Albermann, C., Trachtmann, N., Sprenger, G.A. (2010). A simple and reliable method to conduct and monitor expression cassette integration into the *Escherichia coli* chromosome. *Biotechnology Journal* 5, 32-38.

Albertyn, J., van Tonder, A., Prior, B.A. (1992). Purification and characterization of glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 308, 130-132.

Altmann, H., Fürstenau, E., Gielewski, A., Scholz, L. (1971). Photometrische Bestimmung kleiner Phosphatmengen mit Malachitgrün. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 256, 274-276.

Andersen, K.B., von Meyenburg, K. (1980). Are growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration? *Journal of Bacteriology* 144, 114-123.

Andres, S., Wiezer, A., Bendfeldt, H., Waschowitz, T., Toeche-Mittler, C., Daniel, R. (2004). Insights into the Genome of the Enteric Bacterium *Escherichia blattae*: Cobalamin (B₁₂) Biosynthesis, B₁₂-Dependent Reactions, and Inactivation of the Gene Region Encoding B₁₂-Dependent Glycerol Dehydratase by a New Mu-Like Prophage. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 8, 150-168.

Atkinson, D.E. (1977). Cellular Energy Metabolism and Its Regulation. New York : Academic Press S. 74-77.

Auzat, I., Lebras, G., Garel, J.R. (1994). The Cooperativity and Allosteric Inhibition of *Escherichia-Coli* Phosphofructokinase Depend on the Interaction Between Threonine-125 and Atp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 5242-5246.

Bachmann, B.J. (1972). Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 36, 525-557.

Backmann, K. C. Method of biosynthesis of phenylalanine, 1992 US. Patent [5169768]

- Baez-Viveros, J.L., Osuna, J., Hernandez-Chavez, G., Soberon, X., Bolivar, F., Gosset, G. (2004). Metabolic engineering and protein directed evolution increase the yield of L-phenylalanine synthesized from glucose in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 87, 516-524.
- Bailey, J.E. (1991). Toward A Science of Metabolic Engineering. *Science* 252, 1668-1675.
- Balderas-Hernandez, V., Sabido-Ramos, A., Silva, P., Cabrera-Valladares, N., Hernandez-Chavez, G., Baez-Viveros, J., Martinez, A., Bolivar, F., Gosset, G. (2009). Metabolic engineering for improving anthranilate synthesis from glucose in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* 8, 19.
- Berovic, M., Legisa, M. (2007). Citric Acid Production. In: *Biotechnology Annual Review*, (ed. M.R.El Gewely) Elsevier, München, 303-343.
- Berríos-Rivera, S.J., Sánchez, A.M., Bennett, G.N., San, K.Y. (2004). Effect of different levels of NADH availability on metabolite distribution in *Escherichia coli* fermentation in minimal and complex media. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65, 426-432.
- Berry, A. (1996). Improving production of aromatic compounds in *Escherichia coli* by metabolic engineering. *Trends in Biotechnology* 14, 250-256.
- Bettenbrock, K., Sauter, T., Jahreis, K., Kremling, A., Lengeler, J.W., Gilles, E.D. (2007). Correlation between Growth Rates, EIICrr Phosphorylation, and Intracellular Cyclic AMP Levels in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 189, 6891-6900.
- Bisswanger, H. (2004). Practical Enzymology. Wiley-VCH, Weinheim 97-98.
- Blangy, D., Buc, H., Monod, J. (1968). Kinetics of the allosteric interactions of phosphofructokinase from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 31, 13-35.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453-1469.
- Bledig, S.A., Ramseier, T.M., Saier, M.H., Jr. (1996). FruR mediates catabolite activation of pyruvate kinase (pykF) gene expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 178, 280-283.
- Bongaerts, J., Krämer, M., Müller, U., Raeven, L., Wubbolts, M. (2001). Metabolic Engineering for Microbial Production of Aromatic Amino Acids and Derived Compounds. *Metabolic Engineering* 3, 289-300.
- Boonstra, B., French, C.E., Wainwright, I., Bruce, N.C. (1999). The *udhA* Gene of *Escherichia coli* Encodes a Soluble Pyridine Nucleotide Transhydrogenase. *Journal of Bacteriology* 181, 1030-1034.
- Botsford, J.L., Harman, J.G. (1992). Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 56, 100-122.

- Bouma,C.L., Meadow,N.D., Stover,E.W., Roseman,S. (1987). Ii-Bglc, A Glucose Receptor of the Bacterial Phosphotransferase System - Molecular-Cloning of Ptsg and Purification of the Receptor from An Overproducing Strain of *Escherichia-Coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 930-934.
- Bouvet,O.M.M., Lenormand,P., Ageron,E., Grimont,P.A.D. (1995). Taxonomic diversity of anaerobic glycerol dissimilation in the Enterobacteriaceae. *Research in Microbiology* 146, 279-290.
- Bouvet,O.M.M., Lenormand,P., Carlier,J.P., Grimont,P.A.D. (1994). Phenotypic diversity of anaerobic glycerol dissimilation shown by seven enterobacteriol species. *Research in Microbiology* 145, 129-139.
- Bradford,M.M. (1976). Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Burgess,N.R.H., McDermot.SN, Whiting,J. (1973). Aerobic Bacteria Occurring in Hind-Gut of Cockroach, *Blatta-Orientalis*. *Journal of Hygiene* 71, 1-7.
- Calton,G.J., Wood,L.L., Updike,M.H., Lantz,L., Hamman,J.P. (1986). The Production of L-Phenylalanine by Polyazetidine Immobilized Microbes. *Nature Biotechnology* 4, 317-320.
- Camakaris,J., Pittard,J. (1974). Purification and Properties of 3-Deoxy-D-Arabinohexulosonic Acid-7-Phosphate Synthetase (trp) from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 120, 590-597.
- Chandran,S.S., Yi,J., Draths,K.M., von Daeniken,R., Weber,W., Frost,J.W. (2003). Phosphoenolpyruvate Availability and the Biosynthesis of Shikimic Acid. *Biotechnology Progress* 19, 808-814.
- Chao,Y.P., Lai,Z.J., Chen,P., Chern,J.T. (1999). Enhanced conversion rate of L-phenylalanine by coupling reactions of aminotransferases and phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Escherichia coli* K-12. *Biotechnology Progress* 15, 453-458.
- Cherepanov,P.P., Wackernagel,W. (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158, 9-14.
- Chisti,Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology* 26, 126-131.
- Choi,Y.L., Kawase,S., Kawamukai,M., Sakai,H., Komano,T. (1991). Regulation of *glpD* and *glpE* gene expression by a cyclic AMP-cAMP receptor protein (cAMP-CRP) complex in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1088, 31-35.
- Clarke,D.M., Loo,T.W., Gillam,S., Bragg,P.D. (1986). Nucleotide-Sequence of the Pnta and Pntb Genes Encoding the Pyridine-Nucleotide Transhydrogenase of *Escherichia-Coli*. *European Journal of Biochemistry* 158, 647-653.

Col, Bekir. (2004) Regulation of Fructose 1,6-bisphosphatase II (GlpX) Gene Expression in *Escherichia coli*. Dissertation, Blacksburg, Virginia, State University

Cooper,R.A. (1984). Metabolism of Methylglyoxal in Microorganisms. *Annual Review of Microbiology* 38, 49-68.

Cornish,E.C., Argyropoulos,V.P., Pittard,J., Davidson,B.E. (1986). Structure of the *Escherichia coli* K12 regulatory gene *tyrR*. Nucleotide sequence and sites of initiation of transcription and translation. *Journal of Biological Chemistry* 261, 403-410.

Dasari,M.A., Kiatsimkul,P.P., Sutterlin,W.R., Suppes,G.J. (2005). Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. *Applied Catalysis A: General* 281, 225-231.

Datsenko,K.A., Wanner,B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 6640-6645.

de Almeida,A., Giordano,A.M., Nickel,P.I., Pettinari,M.J. (2010). Aeration affects poly(3-hydroxybutyrate) synthesis from glycerol and glucose in recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology AEM*. 76; 7400-7406.

De Reuse,H., Kolb,A., Danchin,A. (1992). Positive regulation of the expression of the *Escherichia coli pts* operon : Identification of the regulatory regions. *Journal of Molecular Biology* 226, 623-635.

De Reuse,H., Huttner,E., Danchin,A. (1984). Analysis of the *ptsH-ptsI-crr* region in *Escherichia coli* K-12: evidence for the existence of a single transcriptional unit. *Gene* 32, 31-40.

Death,A., Notley,L., Ferenci,T. (1993). Derepression of LamB protein facilitates outer membrane permeation of carbohydrates into *Escherichia coli* under conditions of nutrient stress. *Journal of Bacteriology* 175, 1475-1483.

Dell,K.A., Frost,J.W. (1993). Identification and removal of impediments to biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: rate-limiting enzymes in the common pathway of aromatic amino acid biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* 115, 11581-11589.

Dharmadi,Y., Murarka,A., Gonzalez,R. (2006). Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: A new platform for metabolic engineering. *Biotechnology and Bioengineering* 94, 821-829.

Donahue,J.L., Bownas,J.L., Niehaus,W.G., Larson,T.J. (2000). Purification and characterization of *glpX*-encoded fructose 1,6-bisphosphatase, a new enzyme of the glycerol 3-phosphate regulon of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 182, 5624-5627.

Dower,W.J., Miller,J.F., Ragsdale,C.W. (1988). High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* 16, 6127-6145.

- Draths,K.M., Frost,J.W. (1990). Synthesis using plasmid-based biocatalysis: plasmid assembly and 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate production. *Journal of the American Chemical Society* 112, 1657-1659.
- Durnin,G., Clomburg,J., Yeates,Z., Alvarez,P.J.J., Zygorakis,K., Campbell,P., Gonzalez,R. (2009). Understanding and Harnessing the Microaerobic Metabolism of Glycerol in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 103, 148-161.
- Eidels,L., Osborn,M.J. (1971). Lipopolysaccharide and Aldoheptose Biosynthesis in Transketolase Mutants of *Salmonella-Typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68, 1673-1677.
- El Mansi,M. (2004). Flux to acetate and lactate excretions in industrial fermentations: physiological and biochemical implications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 31, 295-300.
- Eppler,T., Postma,P., Schutz,A., Volker,U., Boos,W. (2002). Glycerol-3-Phosphate-Induced Catabolite Repression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 184, 3044-3052.
- Escalante,A., Calderon,R., Valdivia,A., De Anda,R., Hernandez,G., Ramirez,O., Gosset,G., Bolivar,F. (2010). Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Microbial Cell Factories* 9: 21.
- Ewings,K.N., Doelle,H.W. (1980). Further Kinetic Characterization of the Non-Allosteric Phosphofructokinase from *Escherichia-Coli* K-12. *Biochimica et Biophysica Acta* 615, 103-112.
- Ferguson,G.P., Töttemeyer,S., MacLean,M.J., Booth,I.R. (1998). Methylglyoxal production in bacteria: suicide or survival? *Archives of Microbiology* 170, 209-218.
- Fjerbaek,L., Christensen,K.V., Norddahl,B. (2009). A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification. *Biotechnology and Bioengineering* 102, 1298-1315.
- Flores,N., Xiao,J., Berry,A., Bolivar,F., Valle,F. (1996). Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* 14, 620-623.
- Förberg,C., Eliaeson,T., Häggström,L. (1988). Correlation of theoretical and experimental yields of phenylalanine from non-growing cells of a rec *Escherichia coli* strain. *Journal of Biotechnology* 7, 319-331.
- Fraenkel,D.G. (1967). Genetic Mapping of Mutations Affecting Phosphoglucose Isomerase and Fructose Diphosphatase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 93, 1582-1587.
- Fuchs,G. (2006). Wege Des Hexoseabbaus. In: Allgemeine Mikrobiologie. Thieme-Verlag, Stuttgart, 202-203
- Fürste,J.P., Pansegrau,W., Frank,R., Blocker,H., Scholz,P., Bagdasarian,M., Lanka,E. (1986). Molecular-Cloning of the Plasmid Rp4 Primase Region in A Multi-Host-Range Tacp Expression Vector. *Gene* 48, 119-131.

- Garvie,E.I. (1980). Bacterial lactate dehydrogenases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 44, 106-139.
- Geerse,R.H., Izzo,F., Postma,P.W. (1989). The PEP: fructose phosphotransferase system in *Salmonella typhimurium*: FPr combines Enzyme III Fru and pseudo-HPr activities. *Molecular and General Genetics MGG* 216, 517-525.
- Gerbens-Leenes,W., Hoekstra,A.Y., van der Meer,T.H. (2009). The water footprint of bioenergy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 10219-10223.
- Gerhardt,P., Murray,R.G.E., Wood,W., Krieg,N. (1984). Methods for General and Molecular Bacteriology.
- Gerigk, Gerigk,M., Maass, Maass,D., Kreutzer, Kreutzer,A., Sprenger, Sprenger,G., Bongaerts, Bongaerts,J., Wubbolts, Wubbolts,M., Takors, Takors,R. (2002a). Enhanced pilot-scale fed-batch L-phenylalanine production with recombinant *Escherichia coli* by fully integrated reactive extraction. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 25, 43-52.
- Gerigk,M., Bujnicki,R., Ganpo-Nkwenkwa,E., Bongaerts,J., Sprenger,G., Takors,R. (2002b). Process control for enhanced L-phenylalanine production using different recombinant *Escherichia coli* strains. *Biotechnology and Bioengineering* 80, 746-754.
- Gollnick,P., Babitzke,P. (2002). Transcription attenuation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1577, 240-250.
- Gonzalez,R., Murarka,A., Dharmadi,Y., Yazdani,S.S. (2008). A new model for the anaerobic fermentation of glycerol in enteric bacteria: Trunk and auxiliary pathways in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering* 10, 234-245.
- Gosset,G., YongXiao,J., Berry,A. (1996). A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology* 17, 47-52.
- Gosset,G. (2005). Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Microbial Cell Factories* 4, 14.
- Gosset,G. (2009). Production of aromatic compounds in bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 20, 651-658.
- Gottesman,S. (2004). The Small RNA Regulators of *Escherichia coli*: Roles and Mechanisms. *Annual Review of Microbiology* 58, 303-328.
- Gulevich, Andrey Yurievich; Gaydenko, Tatyana Aleksandrovna, Ermishev, Vladimir Yurievich, Skorokhodova, Aleksandra Yurievna, Biryukova, Irina Vladimirovna, and Mashko, Sergei Vladimirovich. (2006) A Method for producing an L-amino acid using a bacterium of the eneterobacteriaceae family with attenuated expression of the *ydiN* gene or the *ydiB* gene or combination thereof. [WO/2008/020650]. RU.

- Gunsalus, R.P., Yanofsky, C. (1980). Nucleotide-Sequence and Expression of *Escherichia-Coli* Trp^r, the Structural Gene for the Trp Aporepressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 77, 7117-7121.
- Hanahan, D. (1983). Studies on Transformation of *Escherichia-Coli* with Plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166, 557-580.
- Hardiman, T. (2010) Dynamics and Regulation of the Central Carbon Metabolism in *Escherichia coli* During Fed-Batch Cultivations. Dissertation, Universität Stuttgart, Institut für Bioverfahrenstechnik
- Harry, E.J. (2001). Bacterial cell division: regulating Z-ring formation. *Molecular Microbiology* 40, 795-803.
- Heide, L. (2009). Genetic engineering of antibiotic biosynthesis for the generation of new aminocoumarins. *Biotechnology Advances* 27, 1006-1014.
- Heller, K.B., Lin, E.C.C., Wilson, T.H. (1980). Substrate-Specificity and Transport-Properties of the Glycerol Facilitator of *Escherichia-Coli*. *Journal of Bacteriology* 144, 274-278.
- Henkin, T.M., Yanofsky, C. (2002). Regulation by transcription attenuation in bacteria: how RNA provides instructions for transcription termination/antitermination decisions. *Bioessays* 24, 700-707.
- Henry, W. (1803). Experiments on the Quantity of Gases Absorbed by Water, at Different Temperatures, and Under Different Pressures. London: Phil. Trans. R. Soc. Lond.
- Herrmann, K.M. (1995). The Shikimate Pathway as an Entry to Aromatic Secondary Metabolism. *PLANT PHYSIOLOGY* 107, 7-12.
- Herrmann, K.M., Weaver, L.M. (1999). The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 473-503.
- Hines, J.K., Fromm, H.J., Honzatko, R.B. (2006). Novel Allosteric Activation Site in *Escherichia coli* Fructose-1,6-bisphosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 281, 18386-18393.
- Hines, J.K., Kruesel, C.E., Fromm, H.J., Honzatko, R.B. (2007). Structure of Inhibited Fructose-1,6-bisphosphatase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 282, 24697-24706.
- Hogema, B.M., Arents, J.C., Bader, R., Eijkemans, K., Yoshida, H., Takahashi, H., Alba, H., Postma, P.W. (1998). Inducer exclusion in *Escherichia coli* by non-PTS substrates: the role of the PEP to pyruvate ratio in determining the phosphorylation state of enzyme IIA(Glc). *Molecular Microbiology* 30, 487-498.
- Hopper, D.J., Cooper, R.A. (1972). The purification and properties of *Escherichia coli* methylglyoxal synthase. *Biochem J.* 128, 321-329.

Hosono,K., Kakuda,H., Ichihara,S. (1995). Decreasing Accumulation of Acetate in a Rich Medium by *Escherichia coli* on Introduction of Genes on a Multicopy Plasmid. *Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry* 59, 256-261.

Hu,Z., Lutkenhaus,J. (2001). Topological Regulation of Cell Division in *E. coli*: Spatiotemporal Oscillation of MinD Requires Stimulation of Its ATPase by MinE and Phospholipid. *Molecular Cell* 7, 1337-1343.

Hummel,W., Schmidt,E., Wandrey,C., Kula,M.R. (1986). l-Phenylalanine dehydrogenase from *Brevibacterium sp.* for production of l-phenylalanine by reductive amination of phenylpyruvate. *Applied Microbiology and Biotechnology* 25, 175-185.

Ibarra,R.U., Edwards,J.S., Palsson,B.O. (2002). *Escherichia coli* K-12 undergoes adaptive evolution to achieve in silico predicted optimal growth. *Nature* 420, 186-189.

Ikeda,M., Okamoto,K., Katsumata,R. (1999). Cloning of the transketolase gene and the effect of its dosage on aromatic amino acid production in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51, 201-206.

Ikeda,M. (2003). Amino Acid Production Processes. 1-35.

Ikeda,M. (2006). Towards bacterial strains overproducing l-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69, 615-626.

Irino, Shigeaki, Nakamura, Shin-ichiro, Oyama, Kiyotaka, Quaedflieg, Peter Jan Leonard, and Van Dooren, Theodorus Johannes Godfried. Enzymatic coupling of L-phenylalanine methyl ester and N-benzyloxycarbonyl-aspartic acid. HOLLAND SWEETENER COMPANY V.O.F.(Blekerij 52, XW Maastricht 6212 NL. [EP0664338]. 1995. NL.

Ishige,T., Honda,K., Shimizu,S. (2005). Whole organism biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology* 9, 174-180.

Ito,T., Nakashimada,Y., Senba,K., Matsui,T., Nishio,N. (2005). Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100, 260-265.

Iuchi,S., Lin,E.C.C. (1988). Arca (Dye), A Global Regulatory Gene in *Escherichia-Coli* Mediating Repression of Enzymes in Aerobic Pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 1888-1892.

Iuchi,S., Weiner,L. (1996). Cellular and Molecular Physiology of *Escherichia coli* in the Adaptation to Aerobic Environments. *Journal of Biochemistry* 120, 1055-1063.

Jackson,J.B. (2003). Proton translocation by transhydrogenase. *FEBS Letters* 545, 18-24.

Jin,R.Z., Lin,E.C.C. (1984). An Inducible Phosphoenolpyruvate: Dihydroxyacetone Phosphotransferase System in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* 130, 83-88.

Jin,R.Z., Tang,J.C., Lin,E.C.C. (1983). Experimental evolution of a novel pathway for glycerol dissimilation in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Evolution* 19, 429-436.

- Kacser,H., Burns,J.A. (1973). The control of flux. *Symp Soc Exp Biol* 27, 65-104.
- Keseler IM, Collado-Vides J, Santos-Zavaleta A, Peralta-Gil M, Gama-Castro S, Muñiz-Rascado L, Bonavides-Martinez C, Paley S, Krummenacker M, Altman T, Kaipa P, Spaulding A, Pacheco J, Latendresse M, Fulcher C, Sarker M, Shearer AG, Mackie A, Paulsen I, Gunsalus RP, Karp PD (2011). EcoCyc: a comprehensive database of *Escherichia coli* biology. *Nucleic Acids Res.* 39 (Database issue):D583-90.
- Khamduang,M., Packdibamrung,K., Chutmanop,J., Chisti,Y., Srinophakun,P. (2009). Production of l-phenylalanine from glycerol by a recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36, 1267-1274.
- Kimata,K., Inada,T., Tagami,H., Aiba,H. (1998). A global repressor (Mlc) is involved in glucose induction of the *ptsG* gene encoding major glucose transporter in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 29, 1509-1519.
- Kimata,K., Tanaka,Y., Inada,T., Aiba,H. (2001). Expression of the glucose transporter gene, *ptsG*, is regulated at the mRNA degradation step in response to glycolytic flux in *Escherichia coli*. *EMBO J* 20, 3587-3595.
- Kistler,W.S., Hirsch,C.A., Cozzarelli,N.R., Lin,E.C.C. (1969). Second Pyridine Nucleotide-Independent L-Glycerophosphate Dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 100, 1133-1135.
- Klose,J. (1975). Protein Mapping by Combined Isoelectric Focusing and Electrophoresis of Mouse Tissues - Novel Approach to Testing for Induced Point Mutations in Mammals. *Humangenetik* 26, 231-243.
- Koebmann,B.J., Westerhoff,H.V., Snoep,J.L., Nilsson,D., Jensen,P.R. (2002). The Glycolytic Flux in *Escherichia coli* Is Controlled by the Demand for ATP. *Journal of Bacteriology* 184, 3909-3916.
- Koehn, S. J., Evans, T. M., Nelson, R. A., and Taylor, P. P. (1994) Methods for increasing carbon conversion efficiency in microorganisms. CA 2140527[WO1994/028154]. CA.
- Krishna Rao,D., Ramu,C., Rao,J., Narasu,M., Bhujanga Rao,A. (2008). Impact of dissolved oxygen concentration on some key parameters and production of rhG-CSF in batch fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35, 991-1000.
- Kurien,B.T., Scofield,R.H. (1995). Polyethylene Glycol-Mediated Bacterial Colony Transformation. *Biotechniques* 18, 1023-1026.
- Kurzrock,T., Weuster-Botz,D. (2010). Recovery of succinic acid from fermentation broth. *Biotechnology Letters* 32, 331-339.
- Lammers,P.J., Kerr,B.J., Weber,T.E., Dozier,W.A., III, Kidd,M.T., Bregendahl,K., Honeyman,M.S. (2008). Digestible and metabolizable energy of crude glycerol for growing pigs. *Journal of Animal Science* 86, 602-608.
- Lämmli,U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Lawley,B., Pittard,A.J. (1994). Regulation of *aroL* expression by TyrR protein and Trp repressor in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 176, 6921-6930.
- Lee,S.J., Boos,W., Bouche,J.P., Plumbridge,J. (2000). Signal transduction between a membrane-bound transporter, PtsG, and a soluble transcription factor, Mlc, of *Escherichia coli*. *EMBO J* 19, 5353-5361.
- Lennox,E.S. (1955). Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* 1, 190-206.
- Liao,J.C., Hou,S.Y., Chao,Y.P. (1996). Pathway analysis, engineering, and physiological considerations for redirecting central metabolism. *Biotechnology and Bioengineering* 52, 129-140.
- Liese,A., Villela,M. (1999). Production of fine chemicals using biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology* 10, 595-603.
- Lin,E.C.C. (1976). Glycerol Dissimilation and its Regulation in Bacteria. *Annual Review of Microbiology* 30, 535-578.
- Lin,Y., Tanaka,S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69, 627-642.
- Liu,D.X., Song DX., Li X, Wang HJ, Gao SE, Liang GX, Tao JH, Fan CS (2004). Integration of *E. coli aroG-pheA* tandem genes into *Corynebacterium glutamicum tyrA* locus and its effect on L-phenylalanine biosynthesis. *World J Gastroenterol* 10, 3683-3687.
- Liu,H.J., Zhang,D.J., Xu,Y.H., Mu,Y., Sun,Y.Q., Xiu,Z.L. (2007). Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions up to a pilot scale. *Biotechnology Letters* 29, 1281-1285.
- Liu,W.Z., Faber,R., Feese,M., Remington,S.J., Pettigrew,D.W. (1994). *Escherichia coli* Glycerol Kinase: Role of a Tetramer Interface in Regulation by Fructose 1,6-Bisphosphate and Phosphotransferase System Regulatory Protein IIIglc. *Biochemistry* 33, 10120-10126.
- Lowry,O.H., Carter,J., Ward,J.B., Glaser,L. (1971). The Effect of Carbon and Nitrogen Sources on the Level of Metabolic Intermediates in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 246, 6511-6521.
- Lu,D., Grayson,P., Schulten,K. (2003). Glycerol Conductance and Physical Asymmetry of the *Escherichia coli* Glycerol Facilitator GlpF. *Biophysical Journal* 85, 2977-2987.
- Lu,J.L., Liao,J.C. (1997). Metabolic engineering and control analysis for production of aromatics: Role of transaldolase. *Biotechnology and Bioengineering* 53, 132-138.
- Lütke-Eversloh,T., Stephanopoulos,G. (2007). L -Tyrosine production by deregulated strains of *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75, 103-110.
- Lutkenhaus,J. (2007). Assembly Dynamics of the Bacterial MinCDE System and Spatial Regulation of the Z Ring. *Annual Review of Biochemistry* 76, 539-562.

- Macheroux,P., Schmid,J., Amrhein,N., Schaller,A. (1999). A unique reaction in a common pathway: mechanism and function of chorismate synthase in the shikimate pathway. *Planta* 207, 325-334.
- Marr,A.G. (1991). Growth rate of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 55, 316-333.
- Mascarenhas,D., Ashworth,D.J., Chen,C.S. (1991). Deletion of *pgi* alters tryptophan biosynthesis in a genetically engineered strain of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2995-2999.
- McCandliss,R.J., Poling,M.D., Herrmann,K.M. (1978). 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase. Purification and molecular characterization of the phenylalanine-sensitive isoenzyme from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 253, 4259-4265.
- Mileykovskaya,E., Fishov,I., Fu,X., Corbin,B.D., Margolin,W., Dowhan,W. (2003). Effects of Phospholipid Composition on MinD-Membrane Interactions in Vitro and in Vivo. *Journal of Biological Chemistry* 278, 22193-22198.
- Mu,Y., Teng,H., Zhang,D.J., Wang,W., Xiu,Z.L. (2006). Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. *Biotechnology Letters* 28, 1755-1759.
- Mülhardt,C. (2009). Die Klonierung von DNA-Fragmenten. In. *Der Experimentator*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 139-168.
- Murarka,A., Dharmadi,Y., Yazdani,S.S., Gonzalez,R. (2008). Fermentative Utilization of Glycerol by *Escherichia coli* and Its Implications for the Production of Fuels and Chemicals. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 1124-1135.
- Nakamura,C.E., Whited,G.M. (2003). Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Current Opinion in Biotechnology* 14, 454-459.
- Nakamura,K., Yamanaka,R., Matsuda,T., Harada,T. (2003). Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. *Tetrahedron: Asymmetry* 14, 2659-2681.
- Nègre,D., Bonod-Bidaud,C., Geourjon,C., Deléage,G., Cozzone,A.J., Cortay,J.C. (1996). Definition of a consensus DNA-binding site for the *Escherichia coli* pleiotropic regulatory protein, FruR. *Molecular Microbiology* 21, 257-266.
- Neidhardt,F.C., Ingraham,J., Schaechter,M. (1990). *Physiology of the Bacterial Cell: A Molecular Approach*.
- Nikaido,H., Vaara,M. (1985). Molecular-Basis of Bacterial Outer-Membrane Permeability. *Microbiological Reviews* 49, 1-32.
- Novotny,M.J., Frederickson,W.L., Waygood,E.B., Saier,M.H., Jr. (1985). Allosteric regulation of glycerol kinase by enzyme III_{glc} of the phosphotransferase system in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology* 162, 810-816.

- O'Farrell,P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* 250, 4007-4021.
- Okino,S., Noburyu,R., Suda,M., Jojima,T., Inui,M., Yukawa,H. (2008). An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81, 459-464.
- Oldiges,M., Kunze,M., Degenring,D., Sprenger,G.A., Takors,R. (2004). Stimulation, monitoring, and analysis of pathway dynamics by metabolic profiling in the aromatic amino acid pathway. *Biotechnology Progress* 20, 1623-1633.
- Pagliari,M., Ciriminna,R., Kimura,H., Rossi,M., Della Pina,C. (2007). From glycerol to value-added products. *Angewandte Chemie-International Edition* 46, 4434-4440.
- Parker,C., Barnell,W.O., Snoep,J.L., Ingram,L.O., Conway,T. (1995). Characterization of the *Zymomonas-Mobilis* Glucose Facilitator Gene-Product (Glf) in Recombinant *Escherichia-Coli* - Examination of Transport Mechanism, Kinetics and the Role of Glucokinase in Glucose-Transport. *Molecular Microbiology* 15, 795-802.
- Patten,C.L., Kirchhof,M.G., Schertzberg,M.R., Morton,R.A., Schellhorn,H.E. (2004). Microarray analysis of RpoS-mediated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Molecular Genetics and Genomics* 272, 580-591.
- Pedersen,J.R., Ingemarsson,A., Olsson,J.O. (1999). Oxidation of rapeseed oil, rapeseed methyl ester (RME) and diesel fuel studied with GC/MS. *Chemosphere* 38, 2467-2474.
- Peters,D. (2006). Carbohydrates for fermentation. *Biotechnology Journal* 1, 806-814.
- Pettigrew,D.W., Yu,G.J., Liu,Y. (1990). Nucleotide regulation of *Escherichia coli* glycerol kinase: initial-velocity and substrate binding studies. *Biochemistry* 29, 8620-8627.
- Phillips,T.A., Bloch,P.L., Neidhardt,F.C. (1980). Protein identifications on O'Farrell two-dimensional gels: locations of 55 additional *Escherichia coli* proteins. *Journal of Bacteriology* 144, 1024-1033.
- Pittard,A.J. (1996a). Biosynthesis of the Aromatic Amino Acids (in: *Escherichia Coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology). Washington D.C.: Neidhardt, F. C.
- Pittard,J. (1996b). Biosynthesis of the Aromatic Amino Acids.
- Pittard,J., Camakaris,H., Yang,J. (2005). The TyrR regulon. *Molecular Microbiology* 55, 16-26.
- Plumbridge,J. (1998). Expression of *ptsG*, the gene for the major glucose PTS transporter in *Escherichia coli*, is repressed by Mlc and induced by growth on glucose. *Molecular Microbiology* 29, 1053-1063.
- Ponce,E., Flores,N., Martinez,A., Valle,F., Bolivar,F. (1995). Cloning of the two pyruvate kinase isoenzyme structural genes from *Escherichia coli*: the relative roles of these enzymes in pyruvate biosynthesis. *Journal of Bacteriology* 177, 5719-5722.

Positionspapier der DECHEMA e.V. Weiße Biotechnologie: Chancen für Deutschland . 2004.

Postma,P.W., Lengeler,J.W., Jacobson,G.R. (1993). Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 57, 543-594.

Ramseier,T.M. (2007). Cra and the control of carbon flux via metabolic pathways. *Research in Microbiology* 147, 489-493.

Richey,D.P., Lin,E.C.C. (1972). Importance of Facilitated Diffusion for Effective Utilization of Glycerol by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 112, 784-790.

Rittmann,D., Lindner,S.N., Wendisch,V.F. (2008). Engineering of a glycerol utilization pathway for amino acid production by *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 6216-6222.

Rossi,M., Della Pina,C., Pagliaro,M., Ciriminna,R., Forni,P. (2008). Greening the Construction Industry: Enhancing the Performance of Cements by Adding Bioglycerol. *Chemosuschem* 1, 809-812.

Ruch,F.E., Lengeler,J., Lin,E.C.C. (1974). Regulation of Glycerol Catabolism in *Klebsiella aerogenes*. *Journal of Bacteriology* 119, 50-56.

Rüffer, N. (2004) Fermentative Produktion von L-Phenylalanin mit *Escherichia coli* und integrierter Produktabtrennung. Dissertation, Forschungszentrum Jülich

Rüffer,N., Heidersdorf,U., Kretzers,I., Sprenger,G.A., Raeven,L., Takors,R. (2004). Fully integrated L-phenylalanine separation and concentration using reactive-extraction with liquid-liquid centrifuges in a fed-batch process with *E. coli*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 26, 239-248.

Rumbold,K., van Buijsen,H., Overkamp,K., van Groenestijn,J., Punt,P., Werf,M. (2009). Microbial production host selection for converting second-generation feedstocks into bioproducts. *Microbial Cell Factories* 8, 64.

Rupilius,W., Ahmad,S. (2007). Palm oil and palm kernel oil as raw materials for basic oleochemicals and biodiesel. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109, 433-439.

Sabnis,N.A., Yang,H., Romeo,T. (1995). Pleiotropic Regulation of Central Carbohydrate Metabolism in *Escherichia coli* via the Gene *csrA*. *Journal of Biological Chemistry* 270, 29096-29104.

Sabourin-Provost,G., Hallenbeck,P.C. (2009). High yield conversion of a crude glycerol fraction from biodiesel production to hydrogen by photofermentation. *Bioresource Technology* 100, 3513-3517.

Saffen,D.W., Presper,K.A., Doering,T.L., Roseman,S. (1987). Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Molecular cloning and structural analysis of the *Escherichia coli* *ptsH*, *ptsI*, and *crr* genes. *Journal of Biological Chemistry* 262, 16241-16253.

Saier,M.H. (1996). Cyclic AMP-independent catabolite repression in bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 138, 97-103.

Saier,M.H. (1998). Multiple mechanisms controlling carbon metabolism in bacteria. *Biotechnology and Bioengineering* 58, 170-174.

Saier,M.H., Crasnier,M. (1996). Inducer exclusion and the regulation of sugar transport. *Research in Microbiology* 147, 482-489.

Saier,M.H., Jr., Ramseier,T.M. (1996). The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria. *Journal of Bacteriology* 178, 3411-3417.

Saiki,R.K., Scharf,S., Faloona,F., Mullis,K.B., Horn,G.T., Erlich,H.A., Arnheim,N. (1985). Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle-Cell Anemia. *Science* 230, 1350-1354.

Sakamoto,N., Kotre,A.M., Savageau,M.A. (1975). Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: purification and properties. *Journal of Bacteriology* 124, 775-783.

Saling, P and Kicherer, A. Die Ökoeffizienz-Analyse nach BASF - Ein Beitrag zu mehr Nachhaltigkeit in der Chemie. Mitteilungen der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie 1. 2004.

Salmon,K., Hung,S.p., Mekjian,K., Baldi,P., Hatfield,G.W., Gunsalus,R.P. (2003). Global Gene Expression Profiling in *Escherichia coli* K12. *Journal of Biological Chemistry* 278, 29837-29855.

Sambrook,J., Fritsch,E.F., Maniatis,T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanford, K, Valle, F, and Ghirnikar, R. Pathway Engineering through Rational Design. *DailyBiotechUpdates* 24[2]. 2004.

Sauer,M., Porro,D., Mattanovich,D., Branduardi,P. (2008). Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends in Biotechnology* 26, 100-108.

Sauer,U., Canonaco,F., Heri,S., Perrenoud,A., Fischer,E. (2004). The Soluble and Membrane-bound Transhydrogenases UdhA and PntAB Have Divergent Functions in NADPH Metabolism of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 6613-6619.

Saxena,R.K., Anand,P., Saran,S., Isar,J. (2009). Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances* 27, 895-913.

Schmid,A., Dordick,J.S., Hauer,B., Kiener,A., Wubbolts,M., Witholt,B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409, 258-268.

Schoner,R., Herrmann,K.M. (1976). 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase. Purification, properties, and kinetics of the tyrosine-sensitive isoenzyme from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 251, 5440-5447.

Schönheit,P. (2006). Grundlagen Des Kohlenhydratabbaus in Mikroorganismen. In: Angewandte Mikrobiologie, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 23-72.

Shalel-Levanon,S., San,K.Y., Bennett,G.N. (2005). Effect of ArcA and FNR on the expression of genes related to the oxygen regulation and glycolysis pathway in *Escherichia coli* under growth conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 92, 147-159.

Siddiquee,K.A., Arauzo-Bravo,M.J., Shimizu,K. (2004). Metabolic flux analysis of *pykF* gene knockout *Escherichia coli* based on C-13-labeling experiments together with measurements of enzyme activities and intracellular metabolite concentrations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63, 407-417.

Soetaert,W., Van Damme,E. (2006). The impact of industrial biotechnology. *Biotechnology Journal* 1. 7-8, 756-769.

Sprenger,G.A. (2007a). Aromatic Amino Acids. In: Amino Acid Biosynthesis - Pathways, Regulation and Metabolic Engineering, Springer Verlag Heidelberg Berlin New York, 93-129.

Sprenger,G.A. (2007b). From scratch to value: engineering *Escherichia coli* wild type cells to the production of l-phenylalanine and other fine chemicals derived from chorismate. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75, 739-749.

Sprenger,G.A., Hammer,B.A., Johnson,E.A., Lin,E.C.C. (1989). Anaerobic Growth of *Escherichia coli* on Glycerol by Importing Genes of the *dha* Regulon from *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of General Microbiology* 135, 1255-1262.

Sprenger,G.A., Schorken,U., Sprenger,G., Sahm,H. (1995). Transketolase-A of *Escherichia-Coli* K12 - Purification and Properties of the Enzyme from Recombinant Strains. *European Journal of Biochemistry* 230, 525-532.

Sprenger, G. A., Siewe, R, Sahm, H, Karutz, M, and Sonke, T. (1998) Microbial preparation of substances from aromatic metabolism/I US Patent 09/298843[6316232 B1].

Stevens,J.F., Maier,C.S. (2008). Acrolein: Sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Molecular Nutrition & Food Research* 52, 7-25.

Storz,G., Opdyke,J.A., Zhang,A. (2004). Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. *Current Opinion in Microbiology* 7, 140-144.

Sugimoto,S., Yabuta,M., Kato,N., Seki,T., Yoshida,T., Taguchi,H. (1987). Hyperproduction of phenylalanine by *Escherichia coli*: application of a temperature-controllable expression vector carrying the repressor-promoter system of bacteriophage lambda. *Journal of Biotechnology* 5, 237-253.

- Tanaka,S., Lerner,S.A., Lin,E.C.C. (1967). Replacement of a Phosphoenolpyruvate-dependent Phosphotransferase by a Nicotinamide Adenine Dinucleotide-linked Dehydrogenase for the Utilization of Mannitol. *Journal of Bacteriology* 93, 642-648.
- Tanaka,Y., Kimata,K., Aiba,H. (2000). A novel regulatory role of glucose transporter of *Escherichia coli*: membrane sequestration of a global repressor Mlc. *EMBO J* 19, 5344-5352.
- Tang,C.T., Ruch,F.E., Jr., Lin,C.C. (1979a). Purification and properties of a nicotinamide adenine dinucleotide-linked dehydrogenase that serves an *Escherichia coli* mutant for glycerol catabolism. *Journal of Bacteriology* 140, 182-187.
- Tao,J., Xu,J.H. (2009). Biocatalysis in development of green pharmaceutical processes. *Current Opinion in Chemical Biology* 13, 43-50.
- Tatarco,M., Romeo,T. (2001). Disruption of a Global Regulatory Gene to Enhance Central Carbon Flux into Phenylalanine Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Current Microbiology* 43, 26-32.
- Thierauf,A., Perez,G., Maloy,a.S. (2009). Generalized Transduction. 267-286. *Methods Mol Biol.*;501:267-86.
- Thompson,J.C., He,B. (2006). Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. *Applied Eng.Agric.* 22, 261-265.
- Thorner,J.W., Paulus,H. (1973). Catalytic and Allosteric Properties of Glycerol Kinase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 248, 3922-3932.
- Tribe,D.E., Camakaris,H., Pittard,J. (1976). Constitutive and repressible enzymes of the common pathway of aromatic biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: regulation of enzyme synthesis at different growth rates. *Journal of Bacteriology* 127, 1085-1097.
- Truniger,V., Boos,W. (1994). Mapping and cloning of *gldA*, the structural gene of the *Escherichia coli* glycerol dehydrogenase. *Journal of Bacteriology* 176, 1796-1800.
- Truniger,V., Boos,W., Sweet,G. (1992). Molecular analysis of the *glpFKX* regions of *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*. *Journal of Bacteriology* 174, 6981-6991.
- Uden,G., Bongaerts,J. (1997). Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1320, 217-234.
- Valentin-Hansen,P., Eriksen,M., Udesen,C. (2004). The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Molecular Microbiology* 51, 1525-1533.
- Vanderpool,C.K., Gottesman,S. (2004). Involvement of a novel transcriptional activator and small RNA in post-transcriptional regulation of the glucose phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. *Molecular Microbiology* 54, 1076-1089.
- Vijayendran,C., Polen,T., Wendisch,V.F., Friehs,K., Niehaus,K., Flaschel,E. (2007). The plasticity of global proteome and genome expression analyzed in closely related W3110 and

- MG1655 strains of a well-studied model organism, *Escherichia coli*-K12. *Journal of Biotechnology* 128, 747-761.
- Wang,C.H., Stern,I., Gilmour,C.M., Klungsoyr,S., Reed,D.J., Bialy,J.J., Christensen,B.E., Cheldelin,V.H. (1958). Comparative study of glucose catabolism by the radiorespirometric method. *Journal of Bacteriology* 76, 207-216.
- Wang,J.C., Sakakibara,M., Liu,J.Q., Dairi,T., Itoh,N. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding phenylacetaldehyde reductase from styrene-assimilating *Corynebacterium sp.* strain ST-10. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52, 386-392.
- Waygood,E.B., Mort,J.S., Sanwal,B.D. (1976). The control of pyruvate kinase of *Escherichia coli*. Binding of substrate and allosteric effectors to the enzyme activated by fructose 1,6-bisphosphate. *Biochemistry* 15, 277-282.
- Waygood,E., Rayman,M., Sanwal,B. (1975). The control of pyruvate kinases of *Escherichia coli*. II. Effectors and regulatory properties of the enzyme activated by ribose 5-phosphate. *Can J Biochem* 53, 444-454.
- Weissenborn,D.L., Wittekindt,N., Larson,T.J. (1992). Structure and regulation of the *glpFK* operon encoding glycerol diffusion facilitator and glycerol kinase of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Biological Chemistry* 267, 6122-6131.
- Weisser,P., Kramer,R., Sahm,H., Sprenger,G.A. (1995). Functional expression of the glucose transporter of *Zymomonas mobilis* leads to restoration of glucose and fructose uptake in *Escherichia coli* mutants and provides evidence for its facilitator action. *Journal of Bacteriology* 177, 3351-3354.
- Westerhoff,H., Groen,A., Wanders,R. (1984). Modern theories of metabolic control and their applications. *Bioscience Reports* 4, 1-22.
- Wolfe,A.J. (2005). The Acetate Switch. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69, 12-50.
- Won,H.S., Lee,Y.S., Lee,S.H., Lee,B.J. (2009). Structural overview on the allosteric activation of cyclic AMP receptor protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1794, 1299-1308.
- Xu,S., Matsuo,T., Danno,G., Wakiuchi,N., Fujii,S. (1992). Fate of minor free amino acids and phospholipids in crude tallow during steam splitting. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 69, 1043-1045.
- Xu,Y.Z., Guo,N.N., Zheng,Z.M., Ou,X.J., Liu,H.J., Liu,D.H. (2009). Metabolism in 1,3-Propanediol Fed-Batch Fermentation by a D-Lactate Deficient Mutant of *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnology and Bioengineering* 104, 965-972.
- Yamada,S., Nabe,K., Izuo,N., Nakamichi,K., Chibata,I. (1981). Production of L-Phenylalanine from trans-Cinnamic Acid with *Rhodotorula glutinis* Containing L-Phenylalanine Ammonia-Lyase Activity. *Applied and Environmental Microbiology* 42, 773-778.

- Yang,C., Hua,Q., Baba,T., Mori,H., Shimizu,K. (2003). Analysis of *Escherichia coli* anaplerotic metabolism and its regulation mechanisms from the metabolic responses to altered dilution rates and phosphoenolpyruvate carboxykinase knockout. *Biotechnology and Bioengineering* 84, 129-144.
- Yanofsky,C., Konan,K.V., Sarsero,J.P. (1996). Some novel transcription attenuation mechanisms used by bacteria. *Biochimie* 78, 1017-1024.
- Yanofsky,C. (2000). Transcription Attenuation: Once Viewed as a Novel Regulatory Strategy. *Journal of Bacteriology* 182, 1-8.
- Yazdani,S.S., Gonzalez,R. (2007). Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion in Biotechnology* 18, 213-219.
- Yazdani,S.S., Gonzalez,R. (2008). Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products. *Metabolic Engineering* 10, 340-351.
- Ye,S.Z., Larson,T.J. (1988). Structures of the promoter and operator of the *glpD* gene encoding aerobic sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 170, 4209-4215.
- Yi,J., Draths,K.M., Li,K., Frost,J.W. (2003). Altered Glucose Transport and Shikimate Pathway Product Yields in *E.coli*. *Biotechnology Progress* 19, 1450-1459.
- Yoon,S.H., Han,M.J., Lee,S.Y., Jeong,K.J., Yoo,J.S. (2003). Combined transcriptome and proteome analysis of *Escherichia coli* during high cell density culture. *Biotechnology and Bioengineering* 81, 753-767.
- Zeppenfeld,T., Larisch,C., Lengeler,J.W., Jahreis,K. (2000). Glucose Transporter Mutants of *Escherichia coli* K-12 with Changes in Substrate Recognition of IICB^{Glc} and Induction Behavior of the *ptsG* Gene. *Journal of Bacteriology* 182, 4443-4452.
- Zhang,A.X., Wassarman,K.M., Rosenow,C., Tjaden,B.C., Storz,G., Gottesman,S. (2003). Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq. *Molecular Microbiology* 50, 1111-1124.
- Zhang,X., Shanmugam,K.T., Ingram,L.O. (2010). Fermentation of Glycerol to Succinate by Metabolically Engineered Strains of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 2397-2401.
- Zhou,H., Lutkenhaus,J. (2003). Membrane Binding by MinD Involves Insertion of Hydrophobic Residues within the C-Terminal Amphipathic Helix into the Bilayer. *Journal of Bacteriology* 185, 4326-4335.
- Ziehr,H., Kula,M.R. (1985). Isolation and characterization of a highly inducible -aspartate--phenylpyruvate transaminase from *Pseudomonas putida*. *Journal of Biotechnology* 3, 19-31.
- Zwaig,N., Kistler,W.S., Lin,E.C.C. (1970). Glycerol Kinase, Pacemaker for Dissimilation of Glycerol in *Escherichia-Coli*. *Journal of Bacteriology* 102, 753-759.