

ABSCHLUSSBERICHT

für das DBU-Projekt AZ13040/05:

Entwicklung eines modellhaften biotechnologischen Verfahrens zur umweltverträglichen fermentativen Produktion von Brenztraubensäure

| Projektpartner | Institution | Teilprojekte (TP) |
|--|--|---|
| Prof. Dr. H. Sahm/ Prof. Dr. M. Bott Dr. T. Gerharz* | Institut für Biotechnologie 1 Forschungszentrum Jülich | Projektleitung Teilprojekt 1: Stammentwicklung |
| Dr. R. Takors Dr. B. Zelic* | Institut für Biotechnologie 2 Forschungszentrum Jülich | Teilprojekt 2: Fermentationsentwicklung |
| Dr. R. Faurie | Amino GmbH (Frellstedt) (ursprüngl. Rhein-Biotech GmbH) | Teilprojekt 3: Halbtechnische Realisierung |

Frau Gerharz und Herrn Zelic wurde im Laufe der Projektbearbeitung der Dokortitel der Universität Düsseldorf bzw. der Universität Zagreb (Kroatien) verliehen.

Projektbeginn: 01.04.2000

Projektende: 30.04.2004

Verfasser: Prof. Dr. Michael Bott
Institut für Biotechnologie 1
Forschungszentrum Jülich
52425 Jülich

Jülich, den 6. Juli 2004

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1. | ZUSAMMENFASSUNG | 3 |
| 2. | ANLASS UND ZIELSETZUNG DES PROJEKTES | 4 |
| 3. | METHODEN | 5 |
| 4. | ERGEBNISSE UND DISKUSSION | 5 |
| 4.1 | STAMMENTWICKLUNG UND –CHARAKTERISIERUNG | 6 |
| 4.1.1 | Konstruktion und Charakterisierung von <i>E. coli</i> YYC202 <i>ldhA</i> | 6 |
| 4.1.2 | Untersuchungen zum Pyruvat-Transport in <i>E. coli</i> | 9 |
| 4.1.3 | Vergleich des Pyruvat-Produzenten <i>E. coli</i> YYC202 mit dem Wildtypstamm <i>E. coli</i> MG1655 durch Transkriptomanalyse mit DNA-Microarrays | 9 |
| 4.1.4 | Vergleich des Pyruvat-Produzenten <i>E. coli</i> YYC202 mit dem Wildtypstamm <i>E. coli</i> MG1655 durch Proteom-Analyse | 12 |
| 4.1.5 | Einfluss der Pyruvat-Produktion auf die globale Genexpression: Transkriptom-Analysen mit DNA-Microarrays | 15 |
| 4.2 | FERMENTATIONSENTWICKLUNG | 17 |
| 4.2.1 | Geregelte fed-batch-Fermentationen | 17 |
| 4.2.2 | Repetitive fed-batch-Prozessführung | 19 |
| 4.2.3 | Vollständig integrierte Elektrodialyse | 21 |
| 4.2.4 | Prozessmodellierung | 22 |
| 4.3 | HALBTECHNISCHE REALISIERUNG | 25 |
| 4.3.1 | Marktrecherche | 25 |
| 4.3.2 | Etablierung und GMP-gerechte Validierung einer Analysen-Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Brenztraubensäure | 28 |
| 4.3.3 | Rohstoffanalysen | 28 |
| 4.3.4 | Übersicht über mögliche Aufarbeitungsstrategien | 30 |
| 4.3.5 | Verfahrenskonzept zur Aufreinigung von Brenztraubensäure | 33 |
| 5. | SOLL/IST-VERGLEICH | 36 |
| 6. | WIRTSCHAFTLICHKEITSBETRACHTUNGEN | 37 |
| 7. | KOOPERATION | 37 |
| 8. | LITERATUR | 37 |
| 9. | EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN ZUM THEMA | 38 |
| 10 | EIGENE PATENTANMELDUNGEN ZUM THEMA | 39 |
| 11. | VORTRÄGE UND POSTER | 39 |
| 12. | ANTWORTEN AUF FRAGEN DER DBU UND FAZIT | 40 |
| 13. | ANHANG | 41 |

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

| | | |
|---------|---|----|
| Abb. 1 | Glukose-Stoffwechsel von <i>E. coli</i> YYC202ldhA. | 7 |
| Abb. 2 | Umsetzung von Glucose zu Pyruvat durch eine Zellsuspension von <i>E. coli</i> YYC202 mit einer OD ₆₀₀ von 0,8. | 8 |
| Abb. 3 | Vergleich der Glucose-Umsetzung durch Zellsuspensionen (OD ₆₀₀ = 4,5) von <i>E. coli</i> YYC202 (A) und <i>E. coli</i> YYC202ldhA (B). | 8 |
| Abb. 4 | Coomassie-gefärbte 2D-Gele von <i>E. coli</i> MG1655 (A) und YYC202 (B). | 13 |
| Abb. 5 | Experimenteller Aufbau zur fed-batch-Fermentation von <i>E. coli</i> YYC202ldhA im 7.5-L-Bioreaktor. | 18 |
| Abb. 6 | Einfluss der Acetat-Feedstrategie auf den Pyruvat-Titer bei fed-batch-Fermentation von <i>E. coli</i> YYC202ldhA. | 18 |
| Abb. 7 | Ergebnis der repetitiven fed-batch-Fermentation mit <i>E. coli</i> YYC202ldhA. | 19 |
| Abb. 8 | Experimenteller Aufbau des kompletten ISPR-Prozesses mit vollständig integrierter Elektrodialyse-Anlage. | 20 |
| Abb. 9 | Pyruvat-Konzentration u. volumetrische Pyruvat-Produktionsrate im Verlaufe des ISPR-Prozesses mit vollständig integrierter Elektrodialyse. | 21 |
| Abb. 10 | Ergebnisse der Simulation unter Verwendung der Modelle 5, 7 und 9. | 24 |
| Abb. 11 | Schema der Ephedrin-Synthese aus Benzaldehyd und Pyruvat. | 27 |
| Abb. 12 | Klassisches Aufreinigungsverfahren für Zitronen- und Äpfelsäure. | 32 |
| Abb. 13 | Durchbruchskurve des Anionentauschers S4258 bei Beladung. | 32 |
| Abb. 14 | Verfahrensfließbild zur Aufreinigung von Brenztraubensäure bzw. Pyruvat. | 35 |
| Tab. 1 | Gene, für die eine erhöhte bzw. verringerte mRNA-Konzentration im Pyruvat-Produzenten <i>E. coli</i> YYC202 im Vergleich zum Wildtyp MG1655 bei Kultivierung auf Glucose-Acetat-Minimalmedium ermittelt wurde. | 10 |
| Tab. 2 | Unterschiede im Proteom von <i>E. coli</i> YYC202- und <i>E. coli</i> MG1655-Zellen welche in Minimalmedium mit 10 mM Glucose und 2 mM Acetat kultiviert und bei einer OD ₆₀₀ von ~0,4 geerntet wurden. | 14 |
| Tab. 3 | Gene, für die eine erhöhte bzw. verringerte mRNA-Konzentration im Pyruvat-Produzenten <i>E. coli</i> YYC202/pBR322 im Vergleich zum Nicht-Pyruvat-Produzenten YYC202/pGS87 (<i>aceEF-lpd</i>) bei Kultivierung in Glucose-Acetat-Minimalmedium ermittelt wurde. | 15 |
| Tab. 4 | Konkurrierende makrokinetische Modelle für den Pyruvat-Produzenten <i>E. coli</i> YYC202ldhA | 23 |
| Tab. 5 | Ergebnis der Modellidentifizierung für die besten Ansätze 5, 7 und 9. | 24 |
| Tab. 6 | Beispielanalyse | 29 |

1. ZUSAMMENFASSUNG

Stammentwicklung: Der *E. coli*-Stamm YYC202, der aufgrund mehrerer Mutationen Pyruvat nicht mehr zu Acetyl-CoA, Acetat bzw. PEP umsetzen kann, wurde als hervorragender Pyruvat-Produzent charakterisiert, der unter geeigneten Bedingungen Glucose vollständig in Pyruvat umsetzen kann ($>1,9$ mol/mol). Bei höheren Glucose-Konzentrationen, insbesondere bei fed-batch-Fermentationen, wurden jedoch erhebliche Mengen (>300 mM) Lactat gebildet. Durch Inaktivierung des *ldhA*-Gens für die NAD^+ -abhängige Lactat-Dehydrogenase konnte die Lactat-Bildung vollständig eliminiert und dadurch deutlich höhere Pyruvat-Titer, molare Ausbeuten und Raum-Zeit-Ausbeuten erreicht werden. Die Identifizierung des Gens für den Pyruvat-Importer mittels Transposon-Mutagenese und Selektion auf Fluorpyruvat-resistente Klone gelang nicht. Das Multidrug-Efflux-System AcrAB konnte als Pyruvat-Exporter ausgeschlossen werden. Proteomanalysen mittels 2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF-Massenspektrometrie sowie Transkriptom-Analysen mit DNA-Chips (Kooperation mit Dr. Wendisch, IBT1) zeigten, dass der Glyoxylat-Zyklus in YYC202 vermutlich fehlt und dass die Pyruvat-Produktion zur Induktion von Säurestress-Genen führt. Weiterhin zeigte ein Gen für einen bisher nicht charakterisierten sekundären Transporter eine stark erhöhte Expression, der mglw. am Pyruvat-Export beteiligt ist.

Fermentationsentwicklung: Mit *E. coli* YYC202*ldhA* konnte die Laktat-freie Pyruvat-Produktion im Labormaßstab in einem Glucose- und Acetat-geregelten fed-batch-Ansatz bis zu einem Titer von 700 mM (62 g/L) mit einer integralen Produkt/Substrat-Ausbeute von 1,1 mol/mol erzielt werden. Durch repetitive fed-batch-Prozessführung konnten sogar integrale Ausbeuten von 1,7 mol/mol und eine Raum-Zeit-Ausbeute von 145 g/(L*d) erreicht werden. Bei vergleichbarem Produkttiter liegt diese Werte um 10% bzw. 500 % höher als beim Konkurrenz-Verfahren mit *Torulopsis glabrata*. Während eine kontinuierliche Prozessführung mit Zellrückhaltung keine Verbesserungen ergab, gelang durch einen „in-situ product recovery“ (ISPR)-Ansatz mittels vollständig integrierter Elektrodialyse die on-line Abtrennung von Pyruvat aus dem laufenden Prozess bis zu einer Aufkonzentrierung von 550 mM mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 68 g/(L*d) und einer molaren Ausbeute von 1,19 mol/mol. Daraus ergibt sich, dass durch Kombination von repetitiver fed-batch-Kultivierung mit integrierter Produktabtrennung durch Elektrodialyse ein sehr effizientes Verfahren zur mikrobiellen Pyruvat-Produktion mit dem *E. coli*-Stamm YYC202 *ldhA* zur Verfügung steht. Darüber hinaus konnten einfache, nicht-strukturierte, formalkinetische Modelle zur Beschreibung von Wachstum,

Substratverbrauch und Produktbildung identifiziert werden, die die Basis für simulative Scale-up Studien und Prozessoptimierungen bieten.

Halbtechnische Realisierung: Das Biotransformations-Verfahren des IBT wurde im Hinblick auf die Verwendung der Brenztraubensäure bzw. der Na/Ca-Pyruvate als Pharma-Food-Wirkstoff analytisch bewertet. Neben pharmagerechten Analyseverfahren wurden Spezifikationen erarbeitet und erfolgreich an Modelllösungen ein entsprechendes umweltfreundliches Downstream-Processing-Verfahren für die Herstellung von Brenztraubensäure bzw. Na/Ca-Pyruvaten entwickelt. Das Verfahren erlaubt die Herstellung von Pharma-Food-Qualitäten mit minimaler Nebenproduktbildung und ist deshalb ein gutes Beispiel für produktionsintegrierten Umweltschutz. Eine detaillierte Marktanalyse konnte die Chancen und Risiken bei der Vermarktung von Brenztraubensäure bzw. Na/Ca-Pyruvaten aufzeigen. Dabei zeigte sich, dass die Verwendung von Pyruvat als Rohstoff sehr interessant ist und deshalb weiter verfolgt wird.

2. ANLASS UND ZIELSETZUNG DES PROJEKTES

Pyruvat ist ein zentrales Zwischenprodukt des Stoffwechsels aller Zellen und an einer Vielzahl von enzymatischen Reaktionen involviert. Daneben besitzt Pyruvat auch eine wirtschaftliche Bedeutung bei chemischen Synthesen, beispielsweise als Ausgangssubstrat bei der industriellen Herstellung der Aminosäuren L-Tryptophan, L-Tyrosin oder L-Dihydroxyphenylalanin (L-Dopa) [1].

Klassisch wird Brenztraubensäure durch Dehydrierung und Decarboxylierung von Weinsäure in Gegenwart eines hohen Überschusses an Natriumhydrogensulfat bei 220 °C hergestellt [2]. Daneben wurde auch eine Reihe von anderen chemischen Verfahren beschrieben, die wie der klassische Prozess sehr energieaufwendig und/oder umweltunverträglich sind. Als Alternative wurden daher biotechnologische Verfahren zur Pyruvat-Herstellung entwickelt, insbesondere aus Lactat [3] und Glucose.

Die auf Glucose basierenden mikrobiellen Verfahren verwenden intakte Zellen, die Pyruvat primär durch die Reaktionen der Glykolyse bilden. Ein gut untersuchter Prozess verwendet Stämme der Hefe *Torulopsis glabrata*, die eine multiple Vitamin-Auxotrophie für Thiamin, Nicotinsäure, Biotin und Pyridoxin besitzen [4, 5]. Bei fed-batch-Fermentation konnte mit diesem Organismus ein maximaler Pyruvat-Titer von 69 g/l (0,78 M) erreicht werden bei einer Ausbeute von 1,3 Mol/Mol (0,64 g/g) und einer Raum-Zeit-Ausbeute von 29,8 g/l/h. Aufgrund der multiplen Auxotrophien erwies sich eine ausgewogene Bereitstellung der essen-

tiellen Vitamine als sehr wichtig [4]. Ein vergleichbares Verfahren zur Pyruvat-Herstellung aus Glucose wurde auch für liponsäure-auxotrophe Stämme von *Escherichia coli* beschrieben [6]. Unter optimierten Bedingungen konnten mit diesen Stämmen maximal 30 g Pyruvat pro 50 g Glucose gebildet werden (1,2 Mol/Mol).

Ziel des Projektes war daher die Entwicklung eines Verfahrens bis in den halbtechnischen Massstab, bei dem **Glucose** mittels **rekombinanter *Escherichia coli*-Zellen** in **Pyruvat** umgesetzt wird, und zwar mit einer Ausbeute nahe der theoretisch maximal möglichen von **2 mol Pyruvat/mol Glucose**. Dazu schien der *E. coli*-Stamm YYC202 besonders geeignet, da er aufgrund mehrerer Mutationen nicht mehr in der Lage ist, Pyruvat zu Acetyl-CoA, Acetat oder Phosphoenolpyruvat umzusetzen, und daher Pyruvat ausscheiden sollte.

3. METHODEN

Teilprojekt Stammentwicklung: P1vir-Transduktion, Southern-Blot, Transposon-Mutagenese, HPLC- und enzymatische Analyse von organischen Säuren und Glucose, photometrischer Enzymtest für die NAD⁺-abhängige Lactat-Dehydrogenase, Transkriptom-Analyse mit DNA-Microarrays (Kooperation mit Dr. V. Wendisch, IBT1, FZ Jülich), 2D-Gelelektrophorese, MALDI-TOF-Massenspektrometrie.

Teilprojekt Fermentationsentwicklung: Batch-, Fed-batch- und repetitive Fed-batch-Kultivierung, kontinuierliche Prozessführung mittels Zellrückhaltung durch Ultrafiltrationsmembranen, online Glucose-Bestimmung und -Regelung, online Bestimmung des CO₂-Gehalts in der Abluft, integrierte Elektrodialyse zur on-line-Abtrennung und Aufreinigung von Pyruvat.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In den folgenden Kapiteln wird ein neues Verfahren zur Herstellung von Pyruvat aus Glucose mit Hilfe acetat-auxotropher *E. coli*-Stämme vorgestellt. Zunächst werden die Eigenschaften des Ausgangsstammes, seine gentechnische Optimierung sowie seine Charakterisierung durch Proteom- und Transkriptom-Analysen beschrieben. Anschliessend werden verschiedene Fermentationsprozessführungen dargestellt sowie der Einsatz der Elektrodialyse zur Online-Abtrennung des Pyruvats aus der Fermentationslösung. Am Ende werden Ansätze zur Prozessmodellierung vorgestellt.

4.1 STAMMENTWICKLUNG UND –CHARAKTERISIERUNG

4.1.1 Konstruktion und Charakterisierung von *E. coli* YYC202*ldhA*

Alle bisher beschriebenen mikrobiellen Verfahren zur Herstellung von Pyruvat aus Glucose basieren auf vitamin-auxotrophen Stämmen, bei den die Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und anderen Produkten bei entsprechender Vitamin-Limitierung partiell gehemmt ist und das angestaute Pyruvat daher ausgeschieden wird. Probleme bei der technischen Umsetzung dieser Verfahren liegen unter anderem in der schwierigen Kontrolle der Vitamin-Konzentration, insbesondere bei Verwendung von Stämmen mit multiplen Vitamin-Auxotrophien. Das hier beschriebene neue Verfahren basiert auf dem rekombinanten *E. coli*-Stamm YYC202, der prototroph für Vitamine ist, aber zum Wachstum in Glucose-Minimalmedium Acetat benötigt [7]. Diese Acetat-Auxotrophie ist eine Folge der vollständigen Blockade der Pyruvat-Umsetzung zu Acetyl-CoA oder Acetat, die durch eine Deletion der *aceEF*-Gene sowie Mutationen in den Genen *pflB* und *poxB* erreicht wurde (Abb. 1). Die *aceEF*-Gene kodieren für die Pyruvat-Dehydrogenase- bzw. die Dihydrolipoyl-Transacetylase-Untereinheit des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (PDH). Unter aeroben Bedingungen wird der überwiegende Teil des Pyruvats durch diesen Komplex zu Acetyl-CoA umgesetzt. Die Mutationen in *poxB* und *pflB* führen zur Inaktivierung der Pyruvat-„Oxidase“ (Pyruvat:Chinon-Oxidoreduktase) und der Pyruvat-Formiat-Lyase. Während die Funktion der Pyruvat-„Oxidase“ unklar ist, ersetzt die Pyruvat-Formiat-Lyase bei anaerobem Wachstum den PDH-Komplex. Neben den genannten Mutationen besitzt *E. coli* YYC202 eine weitere im *pps*-Gen für die PEP-Synthetase, die zur Inaktivierung dieses Enzyms führt.

Unter aeroben, nicht-wachsenden Bedingungen setzte *E. coli* YYC202 Glucose nahezu vollständig ($>1,9$ Mol/Mol) in Pyruvat um und sekretierte es ins Medium (Abb. 2) [8]. Diese Umsetzung kann durch folgende Reaktionsgleichung beschrieben werden:



Auch wachsende Zellen von *E. coli* YYC202 produzierten in Schüttelkolben in Abhängigkeit von der eingesetzten Acetat-Konzentration bis zu 1,7 Mol Pyruvat/Mol Glucose. Leider wurden die genannten Werte nur bei geringen Zelldichten erreicht, bei höheren sank die molare Ausbeute stark ab, bedingt durch die Bildung des Nebenprodukts Lactat (Abb. 3A). Für eine spätere technische Umsetzung ist die Lactat-Bildung sehr ungünstig, da sie nicht nur die Ausbeute reduziert, sondern auch die Aufarbeitung des Pyruvats aufwändiger macht. Um die Lactat-Bildung zu unterdrücken, wurde das *ldhA*-Gen, das für die NAD^+ -abhängige D-Lactat-Dehydrogenase kodiert, in *E. coli* YYC202 durch Insertion eines Kanamycin-

Resistenzgens inaktiviert. Der resultierende Stamm *E. coli* YYC202*ldhA* bildete sowohl im Schüttelkolben (Abb. 3B) als auch im Fermenter kein Lactat mehr, wodurch gezeigt wurde, dass ausschliesslich das *ldhA*-Genprodukt für die Lactat-Bildung verantwortlich war [8].

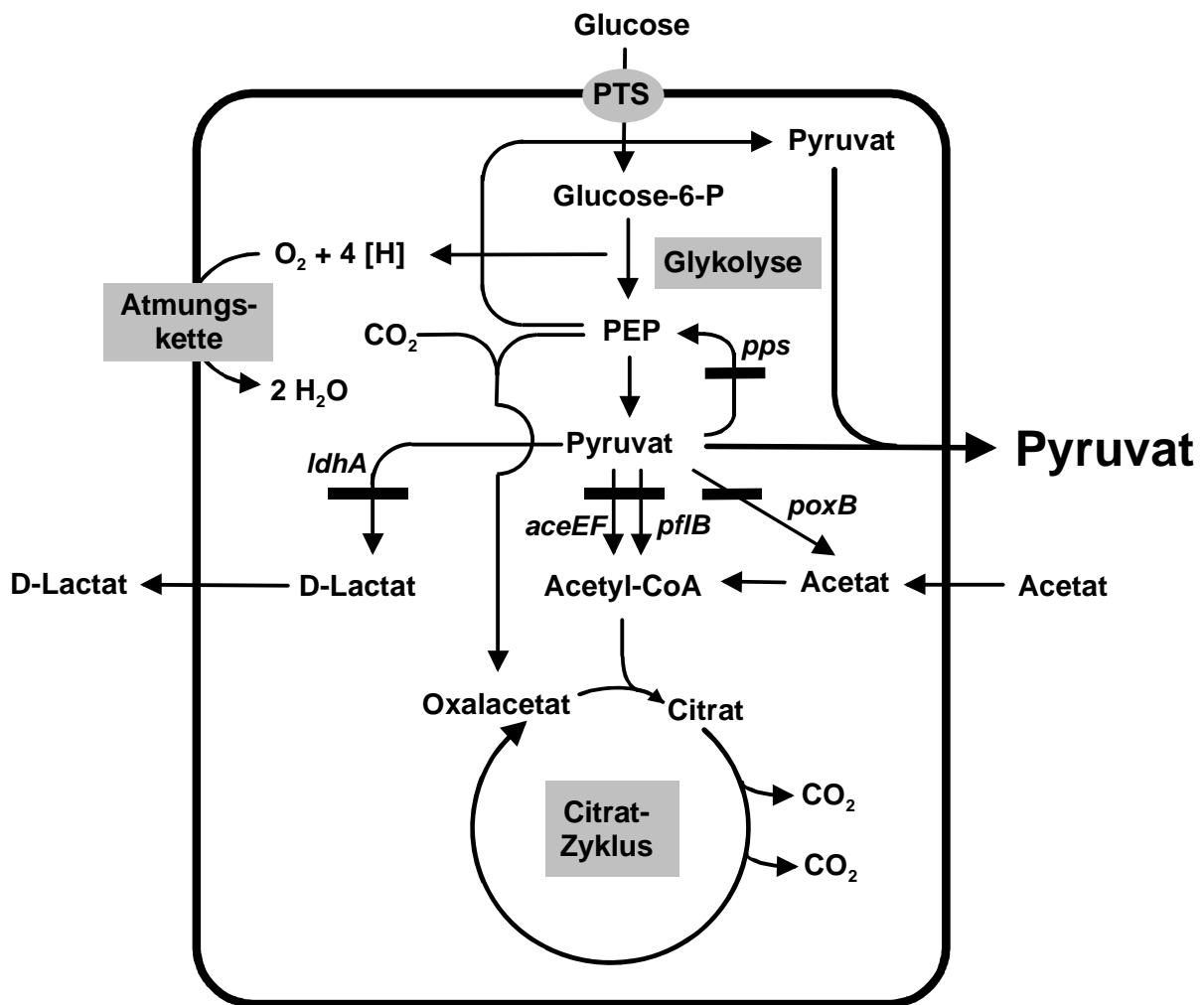


Abb. 1: Glukose-Stoffwechsel von *E. coli* YYC202*ldhA*. Dieser Stamm besitzt eine Deletion der *aceEF*-Gene, die für zwei Untereinheiten des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodieren, sowie Mutationen in den Genen *poxB* (Pyruvat-“Oxidase”), *pflB* (Pyruvat-Formiat-Lyase), *pps* (PEP-Synthetase) und *ldhA* (NAD⁺-abhängige D-Lactat-Dehydrogenase). Er ist daher nicht in der Lage, Pyruvat zu Acetyl-CoA, Acetat, PEP und Lactat umzusetzen und benötigt zum Wachstum in Glucose-Minimalmedium Acetat.

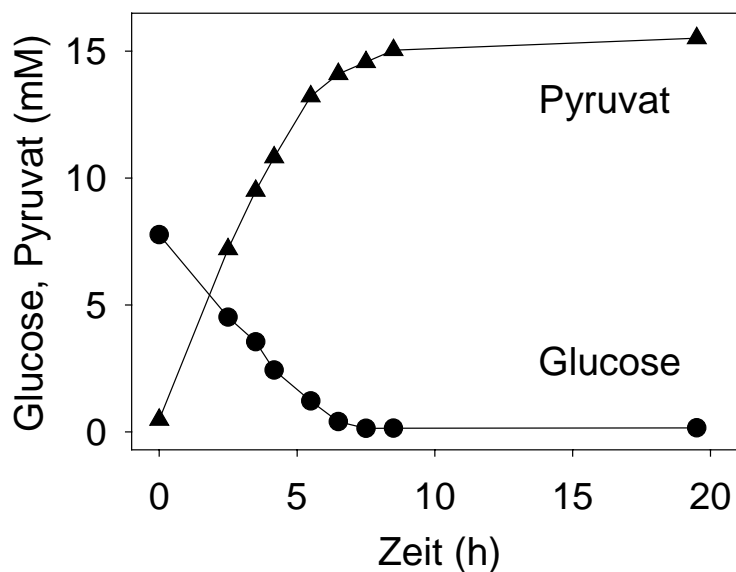


Abb. 2: Umsetzung von Glucose zu Pyruvat durch eine Zellsuspension von *E. coli* YYC202 mit einer OD_{600} von 0,8. Die Zellen wurden in Glucose-Acetat-Minimalmedium vorkultiviert, anschliessend in einem Puffer pH 7,0 mit 8 mM Glucose resuspendiert und bei 37 °C und 160 Upm inkubiert.

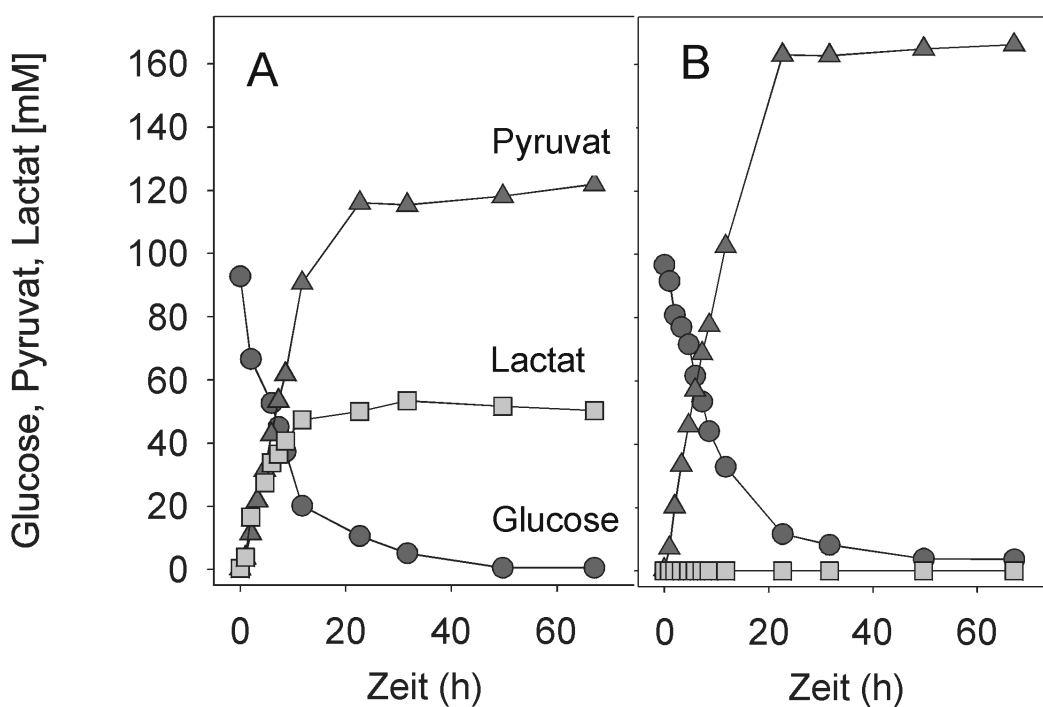


Abb. 3: Vergleich der Glucose-Umsetzung durch Zellsuspensionen ($OD_{600} = 4,5$) von *E. coli* YYC202 (A) und *E. coli* YYC202ldhA (B). Die Zellen wurden in Glucose-Acetat-Minimalmedium vorkultiviert und anschliessend in 500 mM MOPS-Puffer pH 7 mit ca. 100 mM Glucose bei 37 °C und 160 Upm inkubiert. In (A) wurden 1,3 Mol Pyruvat/Mol Glucose und 0,5 Mol Lactat/Mol Glucose gebildet, in (B) 1.7 Mol Pyruvat/Mol Glucose und kein Lactat.

4.1.2 Untersuchungen zum Pyruvat-Transport in *E. coli*

E. coli besitzt einen sekundär aktiven Pyruvat-Transporter [9], dessen Gen bisher nicht identifiziert wurde. Eigene Arbeiten mit dem *E. coli*-Wildtypstamm MG1655 haben gezeigt, dass Glucose und Pyruvat parallel verstoffwechselt werden, das Pyruvat-Aufnahmesystem also keiner Glucose-Repression unterliegt. Da ein aktiver Import von Pyruvat und ein dadurch hervorgerufener „futile cycle“ von Export und Import sich sicherlich negativ auf die Produktion auswirken, sollte das Pyruvat-Importer-Gen identifiziert und inaktiviert werden. Der Ansatz beruhte auf der Annahme, dass eine Transposon-Mutante, in der das Pyruvat-Importer-Gen inaktiviert ist, resistent gegenüber Fluoropyruvat sein sollte, weil diese toxische Verbindung dann nicht mehr in die Zelle gelangt. Es wurden Tn5-Mutanten von *E. coli* MG1655 erzeugt und auf LB-Platten mit Kanamycin und 80 mM Fluoropyruvat selektioniert. Dabei konnten fünf Klone isoliert werden, die auf Pyruvat-Platten deutlich schlechter wuchsen als der Wildtyp, auf Glucose-Platten dagegen wie der Wildtyp. Leider stellte sich heraus, dass diese Mutanten bei Kultivierung in Medium mit Glucose und Pyruvat immer noch in der Lage waren, Pyruvat zu verstoffwechseln. D.h., dass die Mutanten Pyruvat immer noch aufnehmen können und die Transposon-Insertion wahrscheinlich nicht in einem Pyruvat-Importer-Gen lokalisiert ist.

Bei der Suche nach einem möglichen Pyruvat-Exporter wurde getestet, ob es sich dabei um den Multidrug-Exporter AcrAB [10] handeln könnte. Durch P1vir-Transduktion wurde ein Derivat von YYC202 mit defektem *acrA*-Gen (*acrA::kan*) konstruiert. Der resultierende Stamm zeigte jedoch die gleichen Pyruvat-Bildungseigenschaften wie YYC202, d.h. der AcrAB-Transporter spielt keine Rolle beim Pyruvat-Export.

4.1.3 Vergleich des Pyruvat-Produzenten *E. coli* YYC202 mit dem Wildtypstamm *E. coli* MG1655 durch Transkriptomanalyse mit DNA-Microarrays

Um stammspezifische sowie Pyruvat-bedingte Unterschiede zwischen dem Pyruvat-Produzenten *E. coli* YYC202 und dem Wildtypstamm MG1655 global zu erfassen, wurden die beiden Stämme durch Transkriptom-Analysen mit DNA-Microarrays verglichen (Zusammenarbeit mit Dr. V. Wendisch, Institut für Biotechnologie, Forschungszentrum Jülich). Die Stämme wurden in M9-Minimalmedium mit 10 mM Glucose und 2 mM Acetat kultiviert. Unter diesen Bedingungen produziert YYC202 Pyruvat, nicht aber MG1655. Die Kultivierung erfolgte über vier Tage (~200 Generationen) durch fünfmaliges Überimpfen, um eine Adaptation an das entsprechende Medium zu gewährleisten. Die Hauptkultur zur Isolierung

von RNA wurde in der exponentiellen Phase bei einer OD_{600} zwischen 0,2 und 0,4 geerntet. Die Kulturen von YYC202 und MG1655 hatten beide eine durchschnittliche Wachstumsrate von $0,58 \text{ h}^{-1}$. Die Auswertung von drei unabhängigen Experimenten ergab, dass in YYC202 20 Gene eine $>2,5$ -fach erhöhte mRNA-Menge gegenüber MG1655 aufwiesen und 25 Gene eine $>2,5$ -fach reduzierte mRNA-Menge (Tab. 1).

Die Gengruppe mit erniedrigtem RNA-Level in YYC202 enthielt wie erwartet *aceE* und *aceF*, da diese beiden Gene in YYC202 deletiert sind. Auffällig war die stark reduzierte Expression der Gene *aceA* (Isocitrat-Lyase) und *aceK* (Isocitrat-Dehydrogenase-Kinase/Phosphatase) in YYC202 (das promotor-proximale *aceB*-Gen (Malat-Synthase) des *aceBAK*-Operons war nicht auswertbar). Das deutet daraufhin, dass der Glyoxylatzyklus in YYC202 stark reduziert ist. Übereinstimmend damit war der Befund, dass auch das *glcB*-Gen für die Malat-Synthase G, die durch Glycolat und Glyoxylat induziert wird, einen reduzierten RNA-Level aufwies.

Die Gen-Gruppe mit erhöhtem RNA-Level in YYC202 enthielt mehrere Gene (*flgCDEF*, *fliC*) aus der Flagellen-Biosynthese sowie mehrere Gene (mit unbekannter Funktion) des *yhfSTUVWXYZ*-Genclusters (YhfT könnte ein Transporter sein). Vom *appCBA*-Operon zeigten zwei Gene einen erhöhten RNA-Level, *appB* war nicht auswertbar. AppC und AppB sind die beiden Untereinheiten einer terminalen Oxidase vom Cytochrom-*bd*-Typ, AppA ist ein periplasmatische saure Phosphatase. Das *ndh*-Gen (2,6-fach erhöhter mRNA-Level) kodiert für die NADH-Dehydrogenase II. und zusammen mit der verstärkten Expression von *appBC* könnte dies auf eine erhöhte Aktivität der Atmungskette im Pyruvat-Produzenten hinweisen. Das *ycdZ*-Gen (4,3-fach erhöhter RNA-Level) kodiert für ein Membranprotein, bei dem es sich um einen Ionen-Kanal handeln könnte, der eventuell am Pyruvat-Transport beteiligt ist.

Tab. 1: Gene, für die eine erhöhte ($> 2,5$) bzw. verringerte ($< 0,4$) mRNA-Konzentration im Pyruvat-Produzenten *E. coli* YYC202 im Vergleich zum Wildtyp MG1655 bei Kultivierung auf Glucose-Acetat-Minimalmedium ermittelt wurde. Die Daten stellen die Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung bzw. einer Dreifach-Bestimmung dar (Spalte n), wobei jeweils von separaten Kulturen ausgegangen wurde. UE = Untereinheit, DH = Dehydrogenase, P = Phosphat

| B-Num. | Gen | Funktion | relativer mRNA-Level (YYC202/MG1655) | n | p-Wert |
|---------------------------|-------------|--|---|---|--------|
| Stoffwechselenzyme | | | | | |
| b0980 | <i>appA</i> | saure Phosphatase | $2,79 \pm 0,28$ | 2 | 0,018 |
| b0978 | <i>appC</i> | Cytochrom- <i>bd</i> -Oxidase II, UE I; liegt im <i>appCBA</i> -Operon | $3,97 \pm 1,13$ | 2 | 0,047 |

| B-Num. | Gen | Funktion | relativer mRNA-Level (YYC202/MG1655) | n | p-Wert |
|--------------------------------|--------------------------------|--|---|---|--------|
| b1109 | <i>ndh</i> | NADH-Dehydrogenase (NADH + UQ → NAD ⁺ + UQH ₂) | 2,61 ± 0,09 | 3 | 0,000 |
| b0115 | <i>aceF</i> | Pyruvat-DH (2. UE); liegt im <i>pdhR-aceEF-lpdA</i> -Operon | 0,15 ± 0,00 | 2 | 0,000 |
| b2976 | <i>glcB</i> | Malat-Synthase G (Acetyl-CoA + H ₂ O + Glyoxylat → L-Malat + CoA) | 0,15 ± 0,04 | 3 | 0,002 |
| b3774 | <i>ilvC</i> | Acetohydroxysäure-Isomero-Reduktase (Biosynthese von Valin und Leucin) | 0,46 ± 0,15 | 3 | 0,029 |
| b4015 | <i>aceA</i> | Isocitrat-Lyase (Isocitrat → Succinat + Glyoxylat) liegt im <i>aceBAK</i> -Operon | 0,15 ± 0,11 | 3 | 0,018 |
| b4016 | <i>aceK</i> | Isocitrat-DH-Kinase/Phosphatase (ATP + [Isocitrat-DH] → ADP + [Isocitrat-DH]-P) | 0,12 ± 0,01 | 3 | 0,000 |
| Transportproteine | | | | | |
| b0572 | <i>cusC</i> (<i>ylcB</i>) | Bestandteil eines putativen Cu-Effluxsystems; aktiviert durch CusSR, das aber keine veränderte Expression zeigt | 4,78 ± 0,39 | 2 | 0,007 |
| b0830 | <i>yliB</i> | periplasmatisches Bindeprotein eines ABC-Transportsystems | 2,73 ± 0,18 | 2 | 0,008 |
| b1036 | <i>ycdZ</i> | putatives Transportprotein, Ionen-Kanal | 4,33 ± 1,30 | 3 | 0,006 |
| b0112 | <i>aroP</i> | Transportprotein aromatischer AS | 0,07 ± 0,02 | 3 | 0,003 |
| b1037 | <i>csgG</i> | Curli-Transportsystem | 0,23 ± 0,02 | 2 | 0,009 |
| b1857 | <i>znuA</i> | ABC-Transportsystem für Zink | 0,11 ± 0,03 | 2 | 0,023 |
| b1859 | <i>znuB</i> | ABC-Transportsystem für Zink | 0,30 ± 0,05 | 2 | 0,028 |
| Galactitol-Stoffwechsel | | | | | |
| b2092 | <i>gatC</i> | Galactitol-spezifisches IIC-Enzym des PTS-Systems, integrales Membranprotein, liegt im <i>gatYZABCD</i> -Operon | 0,07 ± 0,06 | 3 | 0,025 |
| b2094 | <i>gatA</i> | Galactitol-spezifisches IIA-Enzym des PTS-Systems | 0,13 ± 0,09 | 3 | 0,017 |
| b2095 | <i>gatZ</i> | Tagatose-6-P-Kinase (ATP + D-Tagatose-6-P → ADP + D-Tagatose-1,6-bisphosphat) | 0,06 ± 0,01 | 3 | 0,000 |
| b2096 | <i>gatY</i> | Tagatose-bisphosphat-Aldolase (D-Tagatose-1,6-bisphosphat → Dihydroxyaceton-P + D-Glycerinaldehyd-3-P) | 0,16 ± 0,03 | 2 | 0,020 |
| Pyrimidin-Stoffwechsel | | | | | |
| b3831 | <i>udp</i> | Uridin-Phosphorylase (Uridin + P _i → Uracil + α-D-Ribose-1-P) | 2,72 ± 0,64 | 3 | 0,009 |
| b4244 | <i>pyrI</i> | Aspartat-Carbamoyltransferase, regulatorische UE; liegt im <i>pyrBI</i> -Operon | 0,10 ± 0,06 | 3 | 0,022 |
| b4245 | <i>pyrB</i> | Aspartat-Carbamoyltransferase, katalytische UE (Carbamoyl-P + L-Aspartat → N-Carbamoyl-L-Aspartat + P _i) | 0,14 ± 0,04 | 3 | 0,004 |
| b4246 | <i>pyrL</i> | <i>pyrBI</i> -Operon-Leader-Peptid | 0,17 ± 0,03 | 2 | 0,022 |
| Flagellen-Biosynthese | | | | | |
| b1074 | <i>flgC</i> | Flagellen-Biosynthese; liegt im <i>flgBCDEFG-HIJK</i> -Operon | 10,77 ± 1,27 | 2 | 0,009 |

| B-Num. | Gen | Funktion | relativer mRNA-Level (YYC202/MG1655) | n | p-Wert |
|------------------|-------------|--|---|---|--------|
| b1075 | <i>flgD</i> | Flagellen-Biosynthese | 15,19 ± 8,52 | 2 | 0,05 |
| b1076 | <i>flgE</i> | Flagellen-Biosynthese | 12,71 ± 5,03 | 2 | 0,036 |
| b1077 | <i>flgF</i> | Flagellen-Biosynthese | 2,67 ± 0,33 | 2 | 0,025 |
| b1923 | <i>fliC</i> | Flagellen-Biosynthese | 6,44 ± 3,83 | 3 | 0,016 |
| Sonstiges | | | | | |
| b1379 | <i>hslJ</i> | Hitzeschock-Protein | 2,80 ± 0,60 | 2 | 0,047 |
| b3376 | <i>yhfS</i> | Hypothetisches Protein | 7,10 ± 3,74 | 3 | 0,011 |
| b3377 | <i>yhfT</i> | putatives Transportsystem | 6,05 ± 1,88 | 3 | 0,005 |
| b3379 | <i>yhfV</i> | putative Hydrolase | 12,75 ± 3,72 | 3 | 0,002 |
| b3380 | <i>yhfW</i> | putative Mutase | 6,14 ± 2,33 | 3 | 0,009 |
| b3382 | <i>yhfY</i> | hypothetisches Protein | 16,92 ± 11,16 | 3 | 0,012 |
| b3716 | <i>yieI</i> | hypothetisches Protein | 4,71 ± 1,67 | 3 | 0,008 |
| b3717 | <i>yieJ</i> | hypothetisches Protein | 4,24 ± 0,15 | 2 | 0,000 |
| b0812 | <i>dps</i> | Fe-Speicherprotein, bindet unspez. an DNA u. schützt sie vor oxidativer Zerstörung | 0,39 ± 0,02 | 2 | 0,002 |
| b1145 | <i>ymfK</i> | putativer Phagenrepressor; | 0,06 ± 0,02 | 2 | 0,032 |
| b1178 | <i>ycgK</i> | hypothetisches Protein | 0,20 ± 0,02 | 2 | 0,007 |
| b1856 | <i>yebA</i> | Hypothetische Metalloprotease, event. beteiligt am Zellwandabbau oder -bildung, benötigt Zn ²⁺ als Cofaktor | 0,26 ± 0,08 | 2 | 0,047 |
| b1974 | <i>yodB</i> | integrales Membranprotein, gehört zur Cytochrom <i>b₅₆₁</i> Familie | 0,24 ± 0,00 | 2 | 0,000 |
| b2442 | <i>intZ</i> | putative Prophagenintegrase | 0,10 ± 0,08 | 3 | 0,040 |
| b2450 | <i>yffS</i> | hypothetisches Protein | 0,07 ± 0,06 | 3 | 0,018 |
| b3811 | <i>xerC</i> | Rekombinase | 0,34 ± 0,05 | 3 | 0,002 |
| b4243 | <i>yjgF</i> | hypothetisches Protein | 0,25 ± 0,03 | 2 | 0,019 |

4.1.4 Vergleich des Pyruvat-Produzenten *E. coli* YYC202 mit dem Wildtypstamm *E. coli* MG1655 durch Proteom-Analyse

Um Unterschiede im Proteinmuster von *E. coli* YYC202 und *E. coli* MG1655 festzustellen, wurden die löslichen Proteine durch 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 4) und die Protein-Muster visuell miteinander verglichen. Proteine, die in ihrer Intensität verändert waren, wurden durch eine Peptidmassenfingerprint-Analyse identifiziert. Hierzu wurden die aus dem Gel ausgestanzten Proteinspots mit Trypsin verdaut, die tryptischen Peptide aus dem Gel eluiert und danach mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. Die so erhaltenen Peptidmassenfingerprints wurden mit Hilfe der Software MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/ucshtml4.0/msfit.htm>) mit Proteindatenbanken verglichen und damit Proteinen zugeordnet.

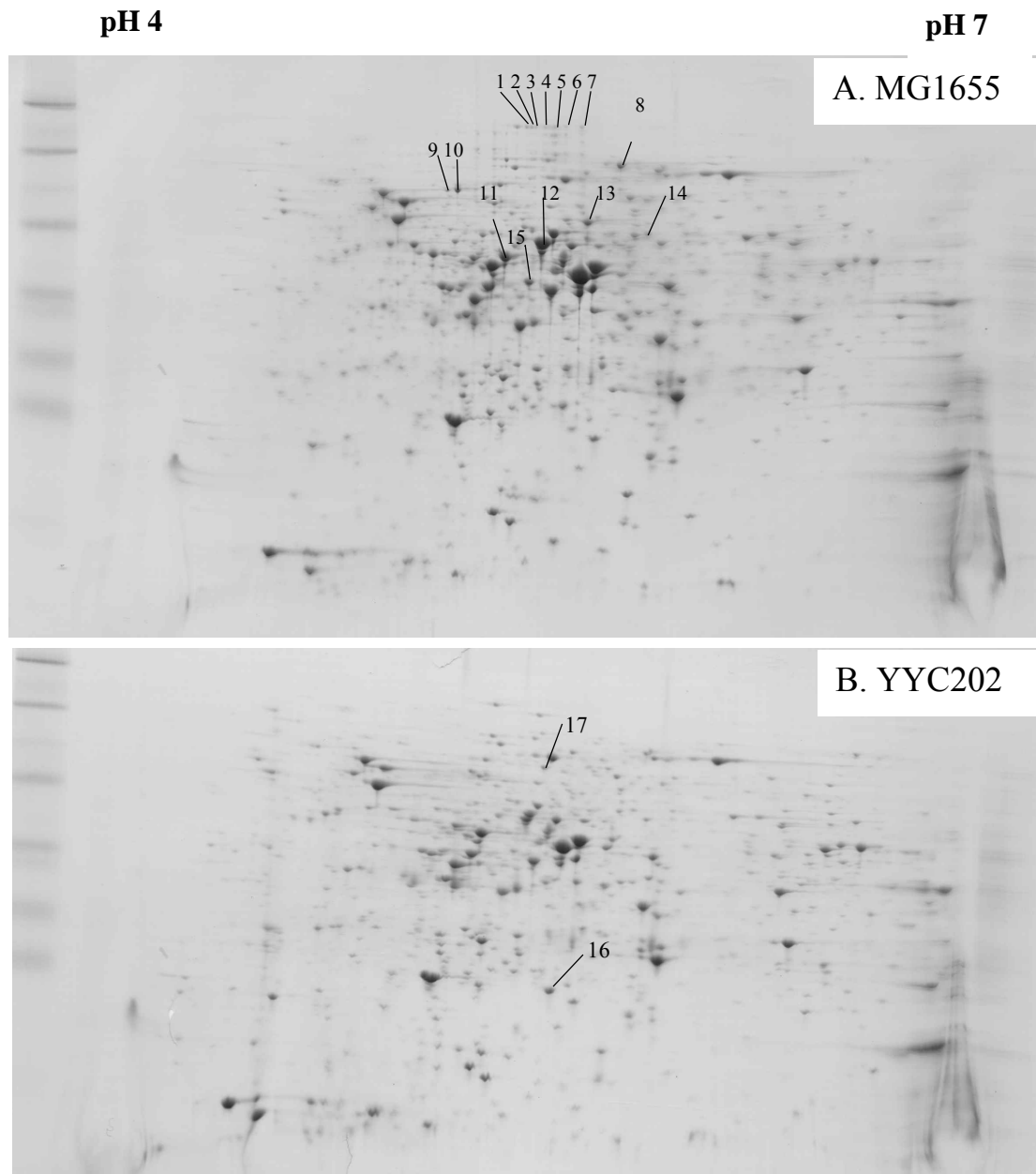


Abb. 4: Coomassie-gefärbte 2D-Gele von *E. coli* MG1655 (A) und YYC202 (B). 300 µg lösliche Proteine wurden unter Verwendung von IPG-Strips mit einem pH-Gradienten von 4 - 7 isoelektrisch fokussiert und anschließend in einer SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt. Die markierten Proteinspots wurden durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. Die Proteine mit den Spot-Nr. 1 - 15 zeigten in YYC202 eine stark reduzierte Intensität oder fehlten völlig, die Proteine mit den Spot-Nr. 16 - 17 wiesen dagegen eine erhöhte Intensität in YYC202 auf.

Bei dem Pyruvat-Produzenten YYC202 fehlten erwartungsgemäß die beiden Untereinheiten AceE und AceF der Pyruvat-Dehydrogenase, da die entsprechenden Gene ja deletiert wurden (Tab. 2). Die Schlüsselenzyme des Glyoxylatzyklus, Isocitrat-Lyase (AceA) und Ma-

lat-Synthase (AceB), konnten nur in MG1655, nicht aber in YYC202 detektiert werden. Dies bestätigt die oben beschriebenen Transkriptomanalysen (Tab. 1) und zeigt, dass der Glyoxylatzyklus in YYC202 völlig fehlt oder stark reduziert ist. Im YYC202 war auch die Acetohydroxysäure-Isomero-reduktase (kodiert durch *ilvC*) in deutlich geringerer Konzentration vorhanden, ein Enzym aus der Biosynthese der verzweigt-kettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin. Da die Biosynthese dieser Substanzen von Pyruvat ausgeht, ist vermutlich die erhöhte intrazelluläre Pyruvat-Konzentration in YYC202 die Ursache für diesen Befund. Auch bei den DNA-Chip-Experimenten war der *ilvC*-RNA-Level in YYC202 gegenüber MG1655 reduziert (Tab. 1).

Tab. 2: Unterschiede im Proteom von *E. coli* YYC202- und *E. coli* MG1655-Zellen (Y bzw. MG) welche in Minimalmedium mit 10 mM Glucose und 2 mM Acetat kultiviert und bei einer OD₆₀₀ von ~0,4 geerntet wurden. Die Proteine wurden durch 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt, Coomassie-gefärbt und visuell analysiert. Proteine mit deutlich unterschiedlichen Intensitäten in den beiden Stämmen wurden aus dem Gel ausgestanzt, mit Trypsin verdaut und die resultierenden Peptide durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. Anhand des Peptidmassenfingerprints konnten die Proteine identifiziert werden. Proteine, die in zwei unabhängigen Experimenten veränderte Intensitäten zeigten, sind fett hervorgehoben. Die Proteine aus den Spots 2 und 5 (s. Abb. 4) konnten nicht identifiziert werden. Zum Vergleich sind auch die RNA-Verhältnisse der Gene, die für diese Proteine kodieren, angegeben, wie sie aus den DNA-Microarray-Experimenten in drei unabhängigen Experimenten ermittelt wurden. Ein nach unten gerichteter Pfeil bedeutet ein geringer Spotintensität in YYC202, eine nach oben gerichteter Pfeil eine erhöhte Spotintensität in YYC202. Molekulare Masse (in kDa) und der pI wurden der Colibri-Datenbank entnommen (<http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>). n.a. = nicht auswertbar, UE = Untereinheit.

| Nr. | Identifiziertes Protein | Gen | Masse | pI | Protein (Y/MG) | relativer mRNA-Level (Y/MG) |
|------------|--|-------------|-------------|------------|----------------|-----------------------------|
| 11 | Isocitrat-Lyase | <i>aceA</i> | 47,4 | 5,0 | ↓ | 0.15 |
| 13 | Malat-Synthase | <i>aceB</i> | 60,1 | 5,3 | ↓ | n.a. |
| 7, 8 | Pyruvat-Dehydrogenase (1. UE) | <i>aceE</i> | 99,6 | 5,5 | ↓ | 0.45 |
| 10 | Pyruvat-Dehydrogenase (2. UE) | <i>aceF</i> | 66,1 | 5,1 | ↓ | n.a. |
| 12 | Acetohydroxysäure-Isomero-reduktase | <i>ilvC</i> | 53,9 | 5,0 | ↓ | 0.46 |
| 1, 3, 4, 6 | β-UE der RNA-Polymerase | <i>rpoB</i> | 150,6 | 5,2 | ↓ | ~1 |
| 9 | Colin I Rezeptor | <i>cirA</i> | 73,9 | 5,1 | ↓ | ~1 |
| 14 | Alkylhydroxyperoxid-Reduktase | <i>ahpF</i> | 54,1 | 5,2 | ↓ | ~1 |
| 16 | Hyperosmotisch induzierbares periplasmatisches Protein | <i>osmY</i> | 21,1 | 6,3 | ↑ | ~1 |
| 17 | β-UE der Glycin-Synthetase | <i>glyS</i> | 76,8 | 5,3 | ↑ | ~1 |

4.1.5 Einfluss der Pyruvat-Produktion auf die globale Genexpression: Transkriptom-Analysen mit DNA-Microarrays

Um spezifisch den Einfluss der Pyruvat-Produktion auf die Genexpression zu untersuchen, wurden die mRNA-Level der Stämme YYC202/pBR322 und YYC202/pGS87 durch Transkriptom-Analyse mit DNA-Microarrays miteinander verglichen. Das Plasmid pGS67 ist ein pBR322-Derivat mit den Genen *aceEF* und *lpd* für die Untereinheiten des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes. Aufgrund der Expression dieser Gene ist YYC202/pGS87 nicht mehr acetat-auxotroph und bildet kein Pyruvat mehr. In Tab. 3 sind die Resultate dieser Untersuchungen zusammengefasst. Die wenigen Gene mit erniedrigtem RNA-Level in YYC202/pBR322 beinhalteten wie erwartet die auf dem Plasmid pGS87 kodierten Gene. In der Gruppe von Genen mit erhöhtem RNA-Level in YYC202/BR322 waren *gadA*, *gadB*, *hdeA* und *hdeB* auffällig, die *E. coli* bekanntermassen als Antwort auf Säurestress induziert. Die Gene *gadA* und *gadB* kodieren für zwei Glutamat-Decarboxylase-Isoenzyme, die Glutamat zu γ -Aminobutyrat decarboxylieren. Dabei wird ein Proton verbraucht, was der Ansäuerung des Cytoplasmas entgegenwirkt. Die Gene *hdeA* und *hdeB* kodieren für kleine periplasmatische Proteine mit ähnlicher Struktur. HdeA bindet als Chaperon an säure-denaturierte Proteine und verhindert dadurch ihre irreversible Aggregation, so dass sie bei neutralem pH wieder in die native Form zurückfalten können. Die verstärkte Expression von Säurestressgenen in YYC202/pBR322 lässt sich mit der Freisetzung von Protonen bei der Umsetzung von Glucose zu Pyruvat erklären. Das Gen *ybgH*, das einen 12-fach erhöhten mRNA-Level im Pyruvatproduzenten YYC202-pBR322 zeigt, kodiert für einen sekundären Transporter und könnte ein Kandidat für einen Pyruvat-Exporter sein.

Tab. 3 (folgende Seite): Gene, für die eine erhöhte ($> 2,5$) bzw. verringerte ($< 0,4$) mRNA-Konzentration im Pyruvat-Produzenten *E. coli* YYC202/pBR322 im Vergleich zum Nicht-Pyruvat-Produzenten YYC202/pGS87 (*aceEF-lpd*) bei Kultivierung in Glucose-Acetat-Minimalmedium ermittelt wurde. Die Daten stellen die Mittelwerte aus Mehrfach-Bestimmungen dar, wobei jeweils von separaten Kulturen ausgegangen wurde. „n“ gibt die Zahl der Experimente an, „p“ die Wahrscheinlichkeit, dass das Verhältnis nicht zufällig ist. In der Tabelle wurden nur Gene mit P-Werten $< 0,05$ berücksichtigt.

| Gen | Funktion | relativer mRNA-Level (Y-pBR322/Y-pGS87) | n | p-Wert |
|--------------|------------------------------------|--|----------|---------------|
| <i>appY</i> | Phosphatase | 3,54 ± 0,26 | 2 | 0,001 |
| <i>artM</i> | Arginin-Permease | 6,16 ± 1,77 | 2 | 0,032 |
| <i>b2335</i> | putatives Fimbrinprotein | 17,99 ± 2,11 | 2 | 0,003 |
| <i>b2342</i> | putative Acyltransferase | 6,01 ± 1,43 | 2 | 0,025 |
| <i>basS</i> | Sensorkinase zu <i>basR</i> | 7,12 ± 2,36 | 2 | 0,036 |
| <i>emrR</i> | Regulator von <i>mcrB</i> | 3,61 ± 0,64 | 2 | 0,023 |
| <i>gabD</i> | Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase | 5,45 ± 1,61 | 2 | 0,036 |
| <i>gadA</i> | Glutamat-Decarboxylase A | 6,15 ± 0,03 | 2 | 0,000 |
| <i>gadB</i> | Glutamat-Decarboxylase B | 9,21 ± 2,70 | 2 | 0,027 |
| <i>hdeA</i> | Säurestress-Protein | 7,39 ± 1,31 | 3 | 0,000 |
| <i>hdeB</i> | Säurestress-Protein | 5,22 ± 0,73 | 4 | 0,007 |
| <i>mopA</i> | Hitze-Schockprotein | 3,95 ± 0,01 | 2 | 0,000 |
| <i>msrA</i> | Methionin-Sulfoxid-Reduktase | 3,99 ± 0,11 | 2 | 0,000 |
| <i>mtlA</i> | Mannitol-spezifisches PTS-System | 4,82 ± 0,53 | 2 | 0,006 |
| <i>thiH</i> | Thiamin-Biosynthese | 3,33 ± 0,46 | 2 | 0,016 |
| <i>tktB</i> | Transketolase B | 5,63 ± 0,53 | 2 | 0,003 |
| <i>yaaA</i> | ORF | 5,93 ± 0,63 | 2 | 0,004 |
| <i>yafV</i> | putatives Enzym | 3,61 ± 0,68 | 2 | 0,025 |
| <i>ybbK</i> | putative Protease | 3,36 ± 0,41 | 2 | 0,011 |
| <i>ybgH</i> | putatives Transportprotein | 12,63 ± 6,04 | 2 | 0,043 |
| <i>ycaC</i> | putative Isochorismatase | 3,81 ± 0,14 | 2 | 0,000 |
| <i>ygaF</i> | ORF | 3,52 ± 0,59 | 2 | 0,021 |
| <i>yjgG</i> | putative Ornithin-Aminotransferase | 5,84 ± 1,53 | 2 | 0,030 |
| <i>sstT</i> | Na ⁺ /Serin-Transporter | 7,92 ± 2,32 | 2 | 0,029 |
| <i>yhiE</i> | Transkriptionsregulator LuxR-Typ | 5,51 ± 2,90 | 3 | 0,014 |
| <i>yjjV</i> | ORF | 4,46 ± 0,96 | 2 | 0,027 |
| <i>ysgA</i> | putatives Enzym | 3,93 ± 0,85 | 2 | 0,029 |
| <i>aceE</i> | Pyruvat-Dehydrogenase (1. UE) | 0,05 ± 0,01 | 2 | 0,016 |
| <i>aceF</i> | Pyruvat-Dehydrogenase (2. UE) | 0,10 ± 0,10 | 4 | 0,006 |
| <i>lpdA</i> | Pyruvat-Dehydrogenase (3. UE) | 0,05 ± 0,01 | 4 | 0,000 |
| <i>ydgR</i> | putatives Transportprotein | 0,28 ± 0,02 | 2 | 0,000 |
| <i>ykfE</i> | ORF | 0,29 ± 0,05 | 2 | 0,026 |

4.2 FERMENTATIONSENTWICKLUNG

Für die Fermentationsentwicklung [11] wurde ein 7,5-Liter Bioreaktor (Infors, Schweiz) mit 2,5 Liter Startvolumen sowie ein Glucose-Acetat-Minimalmedium eingesetzt. Die pH-Regelung auf pH 7,0 erfolgte durch Titration mit 25 %iger Ammoniumlauge. In allen Experimenten wurde eine Temperatur von 37 °C und eine pO_2 -Konzentration $>40\%$ bei einem Reaktorüberdruck von 0,2 – 0,8 bar eingestellt. Die O_2 - und CO_2 -Konzentrationen im Abgas wurden über einen Gasanalysator (Binos 102 M, Rosemount, Deutschland) bestimmt. Die Glukose-Konzentration wurde online mittels Kamanfilter und Minimalvarianzregler zusammen mit einem Online-Glukose-Messgerät (OLGA, IBA GmbH, Göttingen) auf 5 g/l eingeregelt.

4.2.1 Geregelte fed-batch-Fermentationen

Die fed-batch-Prozessführung (Abb. 5) erfolgte durch Regelung von Glukose (auf 5 g/l) und Acetat [12]. Als Ergebnis einer ersten Versuchsserie konnte ein einfacher, äquimolarer Zusammenhang zwischen der Acetat-Verbrauchsrate (ACR) und der CO_2 -Produktionsrate (CTR) gefunden werden. Darauf aufbauend wurde eine indirekte Acetat-Regelung durch online-Bestimmung der CO_2 -Emissionsrate und Einstellung der Acetat-Feedrate nach folgender Gleichung etabliert, bei der VR das Reaktionsvolumen des Bioreaktors darstellt:

$$ACR \text{ (g/h)} = [927 \text{ (g/mmol)} \times CTR \text{ (mmol/l/h)} \times VR \text{ (l)}] / F$$

Mit Hilfe des eingeführten Faktors F (dimensionslos) kann bestimmt werden, ob die Acetat-Versorgung limitierend ist ($F > 1$) oder ob Acetat im Überschuss zugegeben wird und daher akkumuliert ($F < 1$). Der Acetat-Feed wurde gestoppt, nachdem die Biomassebildung über ein Zeitintervall von 3 h konstant blieb. Abb. 6 gibt einen Überblick über die erreichten Pyruvat-Titer unter Verwendung des Stammes *E. coli* *YYC202ldhA* bei verschiedenen Acetat-Feed-Strategien. Es ist zu erkennen, dass bei Acetat-Limitierung der Pyruvat-Titer unter 500 mM lag, während bei Acetat-Sättigung und Acetat-Überschuss Titer zwischen 630 – 700 mM Pyruvat erzielt wurden. Unter diesen Prozessbedingungen lag die integrale Pyruvat/Glukose-Ausbeute bei 1,11 Mol/Mol und die Raum-Zeit-Ausbeute bei 42 g/l/d. Allerdings wurde festgestellt, dass die spezifische Pyruvat-Produktionsrate bei Konzentrationen >350 mM Pyruvat drastisch abnahm und bei ca. 700 mM Pyruvat vollständig zum Erliegen kam. Die molekulare Ursache für diese Produkt-Inhibierung konnte noch nicht geklärt werden.

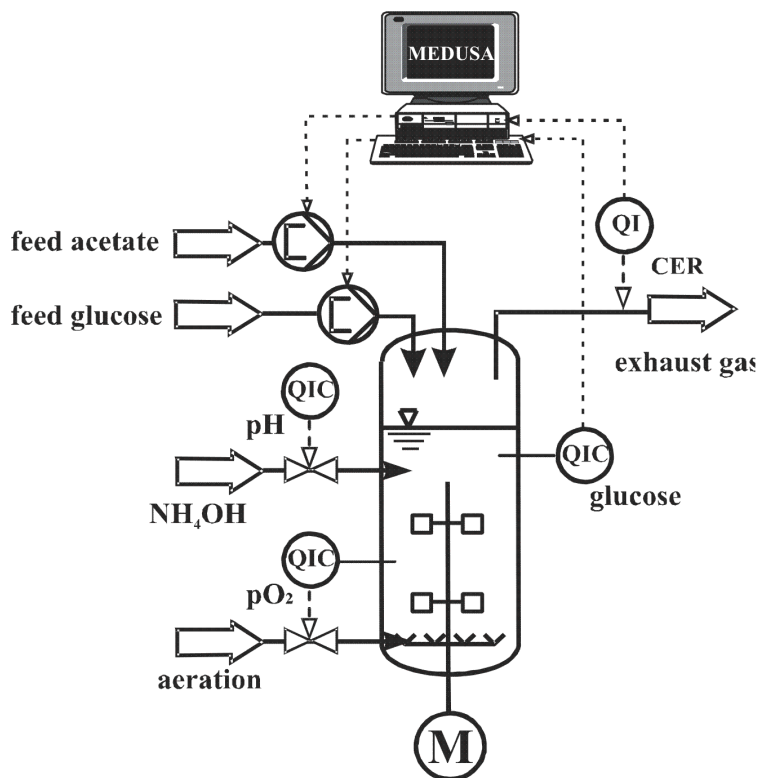


Abb. 5: Experimenteller Aufbau zur fed-batch-Fermentation von *E. coli* YYC2021dhA im 7.5-L-Bioreaktor. Wie im Text beschrieben, wurde die Glucose-Zugabe direkt, die Acetat-Zugabe indirekt geregelt. Zellfreies Permeat konnte über eine Ultrafiltrationseinheit abgezogen werden, die im Bypass des Bioreaktors installiert wurde (hier nicht dargestellt, siehe dazu Abb. 8).

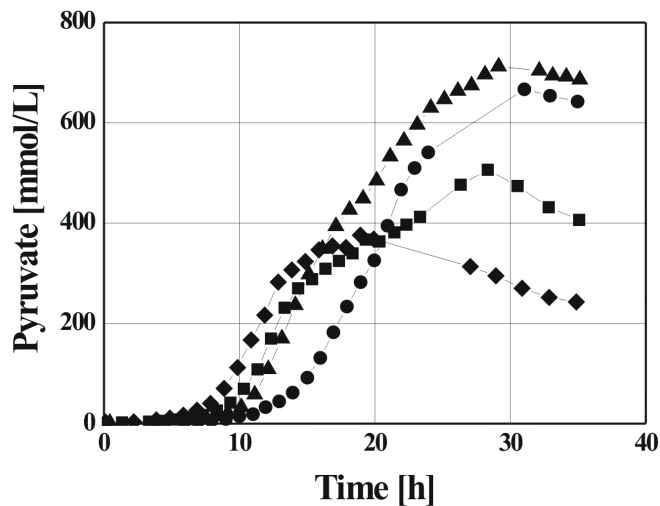


Abb. 6: Einfluss der Acetat-Feedstrategie auf den Pyruvat-Titer bei fed-batch-Fermentation von *E. coli* YYC2021dhA. Rauten, Acetat-Limitierung ($F = 2.0$); Quadrate, Acetat-Limitierung ($F = 1.5$); Kreise, Acetat-Sättigung ($F = 1.0$); Dreiecke, Acetat-Akkumulation ($F = 0.8$).

4.2.2 Repetitive fed-batch-Prozessführung

Um die Produkt-Inhibierung zu vermindern und die Produkt/Substrat-Ausbeute zu steigern, wurden Experimente zur kontinuierlichen Fermentation von *E. coli* YYC202ldhA mit Zellrückhaltung durchgeführt, die jedoch nicht den gewünschten Erfolg zeigten. Als Alternative wurde daher eine repetitive fed-batch-Prozessführung etabliert [13], wozu im Bypass des 7,5-Liter-Bioreaktors eine Ultrafiltrationseinheit (0,98 m² Membranfläche, 500 kDa Cut-off, Schleicher und Schüll, Deutschland) installiert und vor Beginn der Experimente 3 h mit 1 M Natronlauge gereinigt wurde. Die repetitive fed-batch-Prozessführung startete, nachdem in Phase I die Biomassebildung analog zur bisherigen Vorgehensweise erfolgt war und konstant blieb. Die Suspension wurde dann durch den Bypass gepumpt, bis ca. 60 % des Fermentationsmediums zellfrei aus dem System entnommen worden waren. Anschliessend wurde das gleiche Volumen an frischem Medium über die Ultrafiltrationseinheit in den Fermenter gepumpt. Dieser Zyklus wurde wiederholt, nachdem die Glucose-Feedrate auf <10 g/h gesunken war.

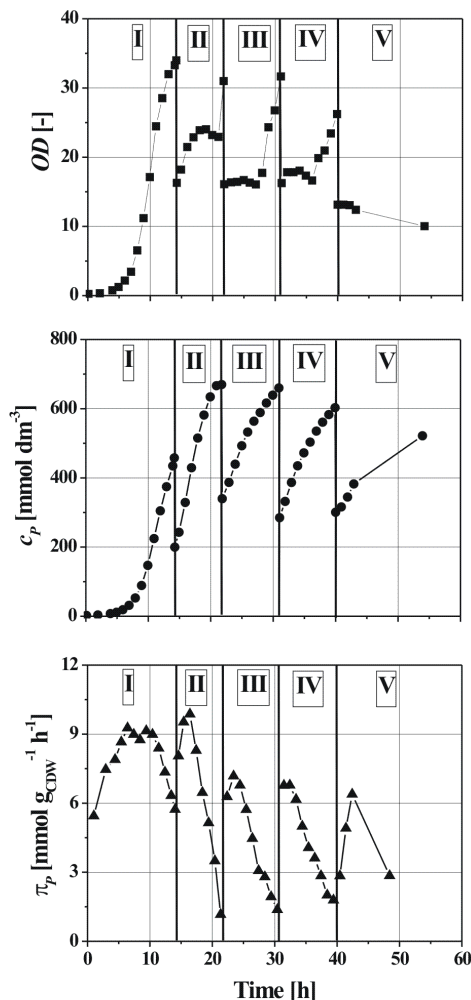


Abb. 7: Ergebnis der repetitiven fed-batch-Fermentation mit *E. coli* YYC202ldhA. Im oberen Teil der Abbildung ist der Verlauf der Zelldichte gezeigt (OD_{600}), im mittleren Teil der Verlauf der Pyruvat-Konzentration und im unteren Teil die spezifische Pyruvat-Produktionsrate. Details siehe Text.

Wie in Abb. 7 dargestellt, konnten vier Produktionszyklen (II-V) durchgeführt werden, bevor die Pyruvat-Produktionsrate stark absank. Die höchste Raum-Zeit-Ausbeute von 145 g/l/d konnte in Phase II erreicht werden und bedeutete eine beträchtliche Steigerung der maximalen Raum-Zeit-Ausbeute von 42 g/l/d aus dem nicht-repetitiven fed-batch-Ansatz [10]. Die molaren Pyruvat-/Glukose-Ausbeuten, die in den Produktionsphasen II-IV erreicht wurden, betragen über 1,7 Mol/Mol, was ebenfalls eine drastische Verbesserung gegenüber dem fed-batch-Prozess (1,1 Mol/Mol) darstellt. Wie aus Abb. 7 nochmals deutlich wird, konnte die maximale spezifische Pyruvatproduktionsrate von ca. 7-9 mmol/g_{BTM}/h nur bei Pyruvatkonzentrationen <500 mM erreicht wurde. Höhere Produkttiter führten zu drastisch abfallenden Pyruvat-Bildungsraten am Ende jeder Produktionsphase.

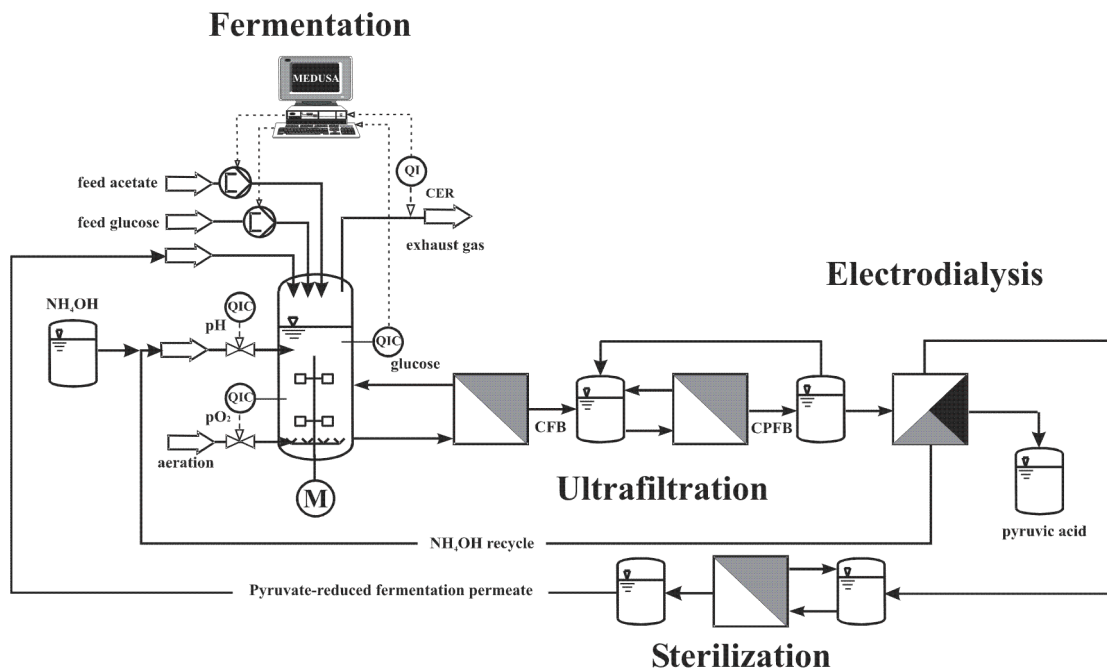


Abb. 8: Experimenteller Aufbau des kompletten ISPR-Prozesses mit vollständig integrierter Elektrodesialyse-Anlage. Zellfreies Permeat wurde dem Bioreaktor über die Ultrafiltrationseinheit entnommen, die darin enthaltenen Proteine in einem zweiten Ultrafiltrationsschritt (10 kDa Cut-off) abgetrennt und das Permeat zur Pyruvat-Abreicherung in die Elektrodesialyse-Einheit geleitet. Das abgereicherte Medium wurde in den Reaktor zurückgeführt. Die in der Elektrodesialyse gebildete Natronlauge bzw. das Ammonium wurde zur Unterstützung der Titration im Bioreaktor ebenfalls zurückgeführt.

4.2.3 Vollständig integrierte Elektrodialyse

Nachdem Voruntersuchungen zur Pyruvatabtrennung aus wässrigen Modelllösungen und aus Fermentationsüberstand mittels Elektrodialyse erfolgreich verliefen, erfolgte die vollständige Integration der Elektrodialyse-Einheit in den fed-batch-Prozess, resultierend in einem „in situ product recovery“-Verfahren (ISPR-Verfahren) [13]. Wie in Abb. 9 dargestellt, besteht der Prozess aus einer Fermentationseinheit mit integrierter Ultrafiltration, einem nachfolgenden Ultrafiltrationsschritt zur Proteinabtrennung, einer Pyruvatabtrennung mittels Elektrodialyse und einer nachgeschalteten Mikrofiltrationseinheit zur Rückführung des abgereicherten Mediums in den Reaktor. Die Abtrennung der Proteine im zweiten Ultrafiltrationsschritt erfolgte mit Ultrafiltrations-Flachmembranen (Schleicher und Schüll) mit einem Cut-off von 10 kDa. Die Mikrofiltrationseinheit mit einer Porengröße von 0,2 μm diente zur Aufrechterhaltung der Sterilitätsgrenze.

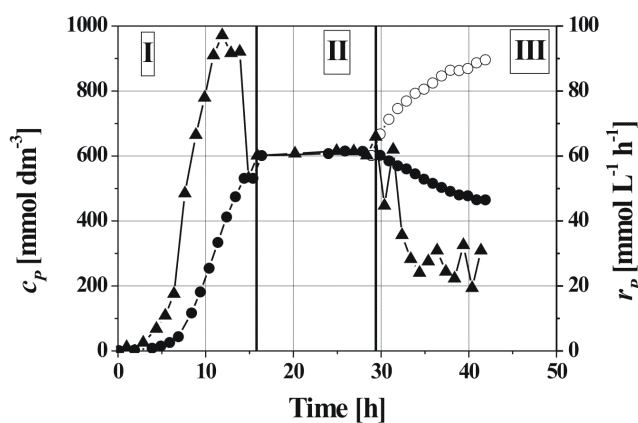


Abb. 9: Pyruvat-Konzentration c_p (Kreise) und volumetrische Pyruvat-Produktionsrate (PPR, Dreiecke) im Verlaufe des ISPR-Prozesses mit vollständig integrierter Elektrodialyse zur Pyruvat-Abtrennung. Phase I, Biomassebildung, Phase II, kontinuierliche Prozessführung mit Zellrückhaltung, Phase III, integrierte Pyruvatabtrennung. Die Konzentrationen des ‚integrierten Prozesses‘ (offene Kreise) sind rechnerisch und beziehen sich auf das tatsächliche Arbeitsvolumen im Reaktor.

Abb. 9 zeigt beispielhaft den Verlauf eines ISPR-Experimentes, das prinzipiell in drei Phasen eingeteilt werden kann, nämlich die fed-batch-Phase zur Biomasseproduktion (Phase I), die kontinuierliche Produktionsphase, bei der ein konstanter Feed von Medium (ca. 60 – 80 g Glucose/h) in den Reaktor gepumpt und die gleiche Menge über die Diafiltrationseinheit aus dem Reaktor entnommen wurde (Verdünnungsrate 0,1/h) (Phase II) und die ISPR-Phase mit vollständig integrierter Elektrodialyse (III). Wie bei den vorangegangenen Experimenten wurde in Phase I eine Pyruvat-Akkumulation bis ca. 600 mM erreicht. In der kontinuierlichen Produktionsphase II blieb diese Konzentration konstant, bis nach ca. 29 h in Phase III die Elektrodialyse zugeschaltet wurde. Die Elektrodialyse konnte ca. 14 h parallel zum Produktionsprozess vollständig integriert betrieben werden, was zu einer signifikanten Reduzierung der Pyruvatkonzentration im Reaktor um ca. 20 % führte. Entgegen der ursprünglichen Er-

wartung, dass die Reduktion der Pyruvatkonzentration einen positiven Effekt auf die Pyruvat-Produktionsrate hat, fiel diese Rate von ursprünglich 60 mM/h auf ca. 25 mM/h nach Beginn der Elektrodialyse ab. Als Ursache wird eine Limitierung des Stoffwechsels durch Co-Abtrennung von z. B. Salzen oder anderen geladenen Komponenten aus der Fermentationslösung vermutet. Als Folge dieser reduzierten Produktionsrate lag die Raum-Zeit-Ausbeute mit 68 g/l/d und die Produkt/Substrat-Ausbeute mit 1,2 Mol/Mol deutlich unter den im repetitiven fed-batch-Verfahren erzielten Werten. Wird die gesamte Menge des produzierten Pyruvats auf das Arbeitsvolumen des Reaktors bezogen, so wurde rein rechnerisch in dem Experiment ein Titer von >900 mM Pyruvat erreicht.

4.2.4 Prozessmodellierung

Basierend auf den experimentellen Daten der Laborexperimente mit dem *ldhA* defizienten Pyruvat-Produzenten wurde untersucht, inwieweit ein Prozessmodell erstellt werden kann, dass die grundlegenden Biokatalysatoreigenschaften – nämlich Wachstum, Substratverbrauch und Produktbildung - durch einfache, nicht-strukturierte formalkinetische Modelle wiedergeben kann. Tabelle 4 beinhaltet eine Auflistung von 10 formulierten Ansätzen zur Modellierung des Wachstums und der Produktbildung. Diese Liste aus ‚konkurrierenden‘ Ansätzen ist eine Folge noch ‚unzureichender‘ kinetischer Informationen über den Produktionsstamm. Es wurden verschiedene Möglichkeiten der Pyruvatinhibierung des Wachstums und/oder der Produktbildung berücksichtigt. Glucose und/oder Acetat wurden als essenzielle Substrate angenommen. Während die Modelle anhand eines fed-batch-Datensatzes identifiziert wurden, erfolgte danach deren Qualifizierung durch reine Simulation von zwei weiteren Fermentationsexperimenten und der abschließenden Bewertung der erzielten Modellaussagegüte. Tabelle 5 gibt die erzielten Parametergenauigkeiten für die ‚besten‘ Modelle 5, 7 und 9 an. Modell 9 wurde – auch wegen der Anpassungsgüte – favorisiert.

Zur Illustration der erzielten Vorhersagegenauigkeit ist Abbildung 11 beigelegt. Sie repräsentiert das Ergebnis einer Simulation unter Verwendung der zuvor identifizierten Modellparameter aus einem anderen fed-batch Experiment. Wie zu erkennen, kann die Wiedergabegenauigkeit für die Biomasse und den Produkttiter als gut bewertet werden, insbesondere für Modell 9 (graue Linie). Verbesserungsnotwendigkeiten existieren für die Wiedergabe der Glucosekonzentrations-Verläufe. Hier erwiesen sich alle ermittelten Modellaussagen für den Glucoseverbrauch als zu niedrig, was auf eine unzureichende Berücksichtigung z.B. des *maintenance*-Bedarfs oder ggfs. eines erhöhten Energiebedarfs wegen *futile cycling* schließen lässt.

Tab. 4: Konkurrierende makrokinetische Modelle für den Pyruvat-Produzenten *E. coli* YYC2021dhA

| Modell | Wachstum | Produktbildung |
|--------|--|---|
| 1 | $\mu = \mu_{\text{MAX}} \cdot \frac{c_G}{K_S^G + c_G} \cdot \frac{c_A}{K_S^A + c_A}$ | $r_p = \alpha \cdot \frac{dc_X}{dt} + \beta \cdot c_X$ |
| 2 | $\mu = \mu_{\text{MAX}} \cdot \frac{c_G}{K_S^G + c_G} \cdot \frac{c_A}{K_S^A + c_A}$ | $r_p = r_{p,\text{MAX}} \cdot \frac{c_p}{\left(K_P + c_p + \frac{c_p^2}{K_I} \right)}$ |
| 3 | $\mu = \mu_{\text{MAX}} \cdot \frac{c_G}{K_S^G + c_G} \cdot \frac{c_A}{K_S^A + c_A} \cdot \left(1 - \frac{c_p}{c_{p,\text{MAX}}} \right)^n$ | $r_p = \alpha \cdot \frac{dc_X}{dt} + \beta \cdot c_X$ |
| 4 | $\mu = \mu_{\text{MAX}} \cdot \frac{c_G}{K_S^G + c_G} \cdot \frac{c_A}{K_S^A + c_A} \cdot \left(1 - \frac{c_p}{c_{p,\text{MAX}}} \right)^n$ | $r_p = r_{p,\text{MAX}} \cdot \frac{c_p}{\left(K_P + c_p + \frac{c_p^2}{K_I} \right)}$ |
| 5 | $\mu = \mu_{\text{MAX}} \cdot \frac{c_G}{K_S^G + c_G} \cdot \frac{c_A}{K_S^A + c_A} \cdot \frac{K_P}{(c_p + K_P)}$ | $r_p = \alpha \cdot \frac{dc_X}{dt} + \beta \cdot c_X$ |
| 6 | $\mu = \mu_{\text{MAX}} \cdot \frac{c_G}{K_S^G + c_G} \cdot \frac{c_A}{K_S^A + c_A} \cdot \frac{K_P}{(c_p + K_P)}$ | $r_p = r_{p,\text{MAX}} \cdot \frac{c_p}{\left(K_P + c_p + \frac{c_p^2}{K_I} \right)}$ |
| 7 | $\mu = \mu_{\text{MAX}} \cdot \frac{c_A}{K_S^A + c_A}$ | $r_p = \alpha \cdot \frac{dc_X}{dt} + \beta \cdot c_X$ |
| 8 | $\mu = \mu_{\text{MAX}} \cdot \frac{c_A}{K_S^A + c_A}$ | $r_p = r_{p,\text{MAX}} \cdot \frac{c_p}{\left(K_P + c_p + \frac{c_p^2}{K_I} \right)}$ |
| 9 | $\mu = \mu_{\text{MAX}} \cdot \frac{c_G}{K_S^G + c_G} \cdot \frac{c_A}{K_S^A + c_A} \cdot \frac{K_P}{(c_p + K_P)}$ | $r_p = \left(\alpha \cdot \frac{dc_X}{dt} + \beta \cdot c_X \right) \cdot \left(1 - \frac{c_p}{c_{p,\text{MAX}}} \right)$ |
| 10 | $\mu = \mu_{\text{MAX}} \cdot \frac{c_A}{K_S^A + c_A + \frac{c_A^2}{K_I^A}}$ | $r_p = \alpha \cdot \frac{dc_X}{dt} + \beta \cdot c_X$ |

Tab. 5: Ergebnis der Modellidentifizierung für die besten Ansätze 5, 7 und 9.

| Parameter | Modell 5 | Modell 7 | Modell 9 |
|---------------|---|---|---|
| $Y_{X/G,MAX}$ | 1.45 ± 0.74 | - | $9.18 \cdot 10^{-1} \pm 1.01 \cdot 10^{-1}$ |
| $Y_{X/A,MAX}$ | $9.21 \cdot 10^{-1} \pm 2.18 \cdot 10^{-1}$ | $8.91 \cdot 10^{-1} \pm 5.14 \cdot 10^{-1}$ | $1.52 \pm 7.52 \cdot 10^{-1}$ |
| $Y_{P/G}$ | $6.78 \cdot 10^{-1} \pm 3.12 \cdot 10^{-1}$ | $5.49 \cdot 10^{-1} \pm 4.90 \cdot 10^{-2}$ | $9.32 \cdot 10^{-1} \pm 3.80 \cdot 10^{-1}$ |
| μ_{MAX} | 2.35 ± 2.27 | $1.31 \pm 9.04 \cdot 10^{-1}$ | $1.69 \pm 2.87 \cdot 10^{-1}$ |
| K_S^G | $1.78 \cdot 10^{-2} \pm 4.76 \cdot 10^{-2}$ | - | $1.10 \cdot 10^{-1} \pm 1.05 \cdot 10^{-1}$ |
| K_S^A | $2.93 \cdot 10^{-1} \pm 9.59 \cdot 10^{-2}$ | $2.46 \cdot 10^{-1} \pm 5.49 \cdot 10^{-3}$ | $3.22 \cdot 10^{-1} \pm 1.94 \cdot 10^{-1}$ |
| m_G | $4.41 \cdot 10^{-2} \pm 6.14 \cdot 10^{-2}$ | - | $4.90 \cdot 10^{-2} \pm 1.77 \cdot 10^{-2}$ |
| m_A | $1.26 \cdot 10^{-1} \pm 3.44 \cdot 10^{-2}$ | $1.13 \cdot 10^{-1} \pm 8.30 \cdot 10^{-2}$ | $1.47 \cdot 10^{-1} \pm 6.60 \cdot 10^{-2}$ |
| α | $7.91 \cdot 10^{-1} \pm 3.53 \cdot 10^{-1}$ | $5.34 \cdot 10^{-1} \pm 2.50 \cdot 10^{-1}$ | $6.10 \cdot 10^{-1} \pm 3.34 \cdot 10^{-1}$ |
| β | $2.03 \cdot 10^{-1} \pm 8.00 \cdot 10^{-2}$ | $1.79 \cdot 10^{-1} \pm 3.93 \cdot 10^{-2}$ | $2.14 \cdot 10^{-1} \pm 2.89 \cdot 10^{-2}$ |
| K_P | 1.77 ± 2.87 | - | 3.93 ± 1.32 |

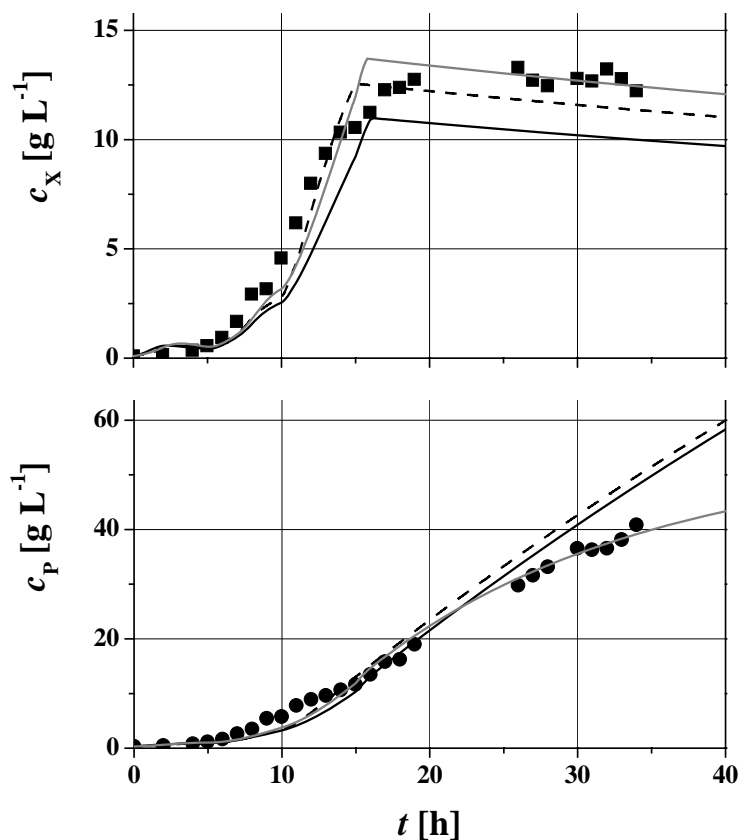


Abb. 10: Ergebnisse der Simulation unter Verwendung von Modell 5- —, Modell 7 - ---- -, and Modell 9 - ———). Die dazugehörigen experimentellen Daten für Biomasse (■) und Glucose (●) eines fed-batch Prozesses mit konstantem Glucose-Feed $q_{VG} = 20 \text{ mL h}^{-1}$ sind ebenfalls angegeben.

4.3 HALBTECHNISCHE REALISIERUNG

4.3.1 Marktrecherche

Von wesentlicher Bedeutung für eine wirtschaftliche Bewertung des Gesamtprojektes im Hinblick auf die Herstellkosten ist eine genaue Marktanalyse. Neben einer Bedarfsanalyse bzgl. Produkten aus Brenztraubensäure (incl. Salze und Derivate) wurde versucht, Anwendungsprofile, Mengen und vor allem mögliche Marktpreise zu ermitteln. Um die eigene Position bei möglichem Markteintritt hinsichtlich Preiselastizität und Wettbewerbsdruck zu bewerten ist eine Mitbewerberanalyse unumgänglich. Aus den sich hieraus abzuschätzenden Zielkosten lassen sich nach Abzug einer Mindestrendite Preisobergrenzen für die Herstellkosten ableiten. Hieraus leitet sich in Abhängigkeit potentieller Produktionsmengen die Wirtschaftlichkeit möglicher Herstellverfahren ab. Unsere Marketingabteilung hat hierzu internationale Recherchen durchgeführt und durch Teilnahme an allen wichtigen Messen, Ausstellungen und Kongressen (u.a. Supply Side East/West - USA, CPHI - Europe, IFT - USA) sowie Kontaktaufnahmen mit unseren Handelspartnern in Europa, USA, Japan, Indien und Südost-Asien die notwendigen Informationen zusammenzutragen.

Marktgröße: Sehr schwer einschätzbar da starke Fluktuationen und unübersichtliche Lieferanten aus China. Es ist ganz typisch für chinesische Mitbewerber, daß nicht nachvollziehbar ist, wer Hersteller und wer nur Zwischenhändler ist. Auch kann nicht ausgeschlossen werden bzw. ist sogar wahrscheinlich, dass sich in Analogie zum Aminosäuremarkt auch renommierte japanische Mitbewerber mit Rohware aus China versorgen. Bei steigendem Bedarf auf dem Weltmarkt, z.B. bei Einführung neuer Formulierungen im Health-Food-Sektor, steigen Anbieter aus Fernost in den Markt ein und versuchen durch massives Dumping Marktanteile zu erobern. Dies führt in der Folge oft dazu, dass die tatsächlichen Hersteller nicht mehr wirtschaftlich produzieren können und die Produktion einstellen. Dies bewirkt dann oft eine plötzliche Verknappung des Rohstoffes am Weltmarkt und zu einem drastischen Preisanstieg. Gerade im Food-Bereich kann dies dazu führen, dass solche Wirkstoffe dann aus Kostengründen aus Rezepturen verbannt oder durch billigere Alternativen ersetzt werden.

Geschätzte Größe der Marktsektoren: Biochemie: 10 tpa; Pharma/Food: 100 tpa ; Building-Block: 120 tpa.

Mitbewerber: Tanabe, Musashino und viele kleine chinesische Mitbewerber

Einsatzmöglichkeiten für Pyruvat:

a) Biochemikalie: Natrium-Pyruvat wird als Substrat für LDH in großem Umfang für enzymatisch optische Tests auf Basis der NADH-gekoppelten Reaktionen in der klinischen, biochemischen und Lebensmitteldiagnostik verwendet.

b) Supplement: Natrium- und Calcium-Pyruvat werden als Energielieferant und Fatburner für Sportler aber auch Übergewichtige verwendet. Preise: Calcium-Salz = 7 €/kg; Natrium-Salz = 10 €/kg. Beispiel der Indikation von Calcium-Pyruvat:

“Pyruvate is a substance that naturally occurs in the body. Pyruvate is the foundation of the Krebs, or Citric Acid, Cycle. This cycle is the process through which the body converts glycogen to energy. Simply stated, it is how the body burns sugar and starch. This is where pyruvate plays an important role in this conversion of food to energy. Calcium pyruvate has been the talk of scientific research and fitness buffs. A discovery was made at the University of Pittsburgh School of Medicine, which showed that a diet supplemented with pyruvate increased fat loss by up to 48% and minimized the associated loss of body protein. This study contradicts the fact that usually when a diet is restricted to promote fat loss there is always a corresponding loss of muscle. Preliminary research and anecdotal evidence with people (such as bodybuilders) has been promising except that some protocols called for as much as 30 grams of pyruvate daily. This volume would certainly result in upset stomach for most people. Optimal pyruvate dosages as little as 5 to 10 grams a day have been shown to produce results in recent studies. For those people who have trouble sticking to an exercise routine, calcium pyruvate may even reduce fat without exercise, which makes it an extremely attractive "fat burner." Pyruvate may help those who maintain a strict exercise program, but have trouble losing weight, attain their goals without the nervousness and jittering side-effects of other thermogenic fat burners. A person on a strict caloric intake, such as a bodybuilder, may benefit by supplementing with calcium pyruvate, which may increase endurance by up to 20%, which can increase workout intensity.“

c) Building-Block für L-Alanin: Markt: ca. 2000 jato (Pharma-Food) à 13 – 14 €/kg

Aktuell ist der Preis durch Billigexporte aus China extrem unter Druck geraten und deutlich unter den Pyruvat-Preis gesunken. Recherchen in China anlässlich zweier Besuche im Herbst 2003 und Frühjahr 2004 ergaben, dass Alanin in China durch Biotransformation aus Fumarsäure hergestellt wird. Um zu prüfen ob das Verfahren tatsächlich wesentlich günstigere Herstellkosten erlaubt, müssen beide Verfahren im Detail bewertet werden, was aber mangels Daten derzeit kaum möglich ist. Die Amino GmbH wird das Projekt aufgrund der Größe des Alaninmarktes weiterverfolgen.

d) Building-Block für L-Tryptophan:

Pyruvate + Indol + NH₃ → L-Tryptophan + H₂O (Tryptophanase, EC 4.1.99.1)

Markt: ca. 200 jato (Pharma-Food) à 70 – 80 €/kg

Um die Wirtschaftlichkeit dieses Verfahrens zu prüfen, wurde Kontakt zu zwei Arbeitsgruppen von Prof. Maria M. Regalo da Fonseca am Dept. De Engenharia Quimica der Universität Lissabon aufgenommen. Die im Zusammenhang mit diesem Evaluierungs-Projekt anfallen-

den Arbeiten würden aber den Rahmen dieses Fördervorhabens sprengen und werden deshalb auf eigene Kosten weiterverfolgt.

e) Building-Block für L-Serin:

Pyruvat + NH₃ → L-Serin + H₂O (L-Serin-Deaminase, EC 4.2.1.13)

Markt: ca. 200 jato (Pharma) à 40 – 60 €/kg

Eine Untersuchung ergab, dass aufgrund des Reaktionsgleichgewichts nur mit sehr schlechten Ausbeuten zu rechnen ist (Reaktion ist quasi irreversibel). Somit scheidet dieses Verfahren aus. Zudem wird die ökonomisch-ökologische Leistungsführerschaft zur fermentativen Herstellung von L-Serin bereits in einem anderen Projekt verfolgt.

f) Building-Block für L-Ephedrin:

Deutscher Chemiekonzern: ca. 120 jato à 5 €/kg Pyruvat

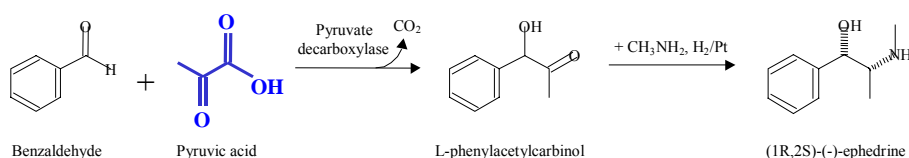


Abb. 11: Schema der Ephedrin-Synthese aus Benzaldehyd und Pyruvat

Aktuelle Gespräche mit Prof. Wurtman (Boston-MIT) und den FDA-Experten Prof. Borzelleca und Prof. Pariza (Washington DC) im Winter 2003 anlässlich einer Informationsreise in die USA ergaben, daß Ephedrin derzeit wegen ungeklärter tödlicher Nebenwirkungen in den USA als Nahrungsmittel-Supplement unter sehr starkem Beschuß steht („Fen-Phen“-Affäre). Mit einem kompletten Bann ist in 2004 zu rechnen. Aus diesem Grund ist leider auch die Nachfrage und der Preis in Deutschland unter Druck geraten. Bis zur endgültigen Klärung der Affäre ist mit keiner Erholung des Marktes zu rechnen.

4.3.2 Etablierung und GMP-gerechte Validierung einer Analysen-Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Brenztraubensäure

Weder Brenztraubensäure noch die Pyruvat-Salze sind in nationalen oder internationalen Pharmakopöen monographiert. In Anlehnung an die Monographie für L-Äpfelsäure aus dem DAB99 mußte deshalb zunächst erst einmal eine sichere Spezifikation entwickelt und entsprechende Analyseverfahren adaptiert und validiert werden.

Die nachfolgend aufgeführte HPLC-Methode wurde zur Reinheitsanalyse von Brenztraubensäure unter Beachtung der in Abhängigkeit von den Herstellverfahren auftretenden Verunreinigungen entwickelt. Mit dieser Methode werden die organischen Säuren e.g. Brenztraubensäure, Maleinsäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure und Äpfelsäure bestimmt. Die Angabe erfolgt in Prozent (g/100g).

Prinzip: Die in Fließmittel gelöste Probe wird mittels HPLC an einem Kationenaustauscher in H^+ -Form getrennt und anschließend im UV-Bereich bei 210 nm detektiert. Die quantitative Bestimmung erfolgt mit Hilfe von externen Standards. Literatur/Quellen: DAB 1999, USP XXIV, NF 19.

HPLC - Parameter

| | |
|-------------------|--|
| HPLC- Gerät: | z.B. Merck/ Hitachi |
| Säule: | Kationenaustauscher-Säule in H^+ -Form |
| Fließmittel: | 0,005 mol/l Schwefelsäure |
| Flußrate: | 0,5 ml/min |
| Säulentemperatur: | 35 °C |
| Detektion: | UV 210 nm |
| Probenvolumen: | 20 µl |
| Analysendauer: | 40 min |

4.3.3 Rohstoffanalysen

Fermentationsproben vom FZ-Jülich wurden mit div. Methoden auf deren Tauglichkeit für die Herstellung von Brenztraubensäure bzw. Pyruvaten gemäß u.g. Spezifikation untersucht. Hierbei zeigte sich, daß die Brenztraubensäure in der rohen Umsatzlösung leider nicht stabil ist. Die Proben mußten bei 0 °C gelagert werden, da bei Raumtemperatur eine schnelle Zersetzung eintritt (Ursache: enzymatische Aktivität).

Tab. 6: Beispielanalyse

| Aminosäure | in Original | in Gesamtaminosäure | in Trockensubstanz | Bemerkungen |
|----------------|--------------|---------------------|--------------------|-------------|
| Pyruvat | 3,8 | | 38,00 | |
| Asp | 0,008 | 1,37 | 0,08 | |
| Asn | n.b. | | | |
| Asx=Asp+Asn | n.b. | | | |
| Thr | 0,001 | 0,17 | 0,01 | |
| Ser | 0,001 | 0,17 | 0,01 | |
| Glu | 0,357 | 61,23 | 3,57 | |
| Gln | n.b. | | | |
| Glx=Glu+Gln | n.b. | | | |
| Pro | n.b. | | | |
| Gly | n.n. | | | |
| Ala | 0,150 | 25,73 | 1,50 | |
| Cyss | n.n. | | | |
| AABA | n.n. | | | |
| Val | 0,010 | 1,72 | 0,10 | |
| Met | 0,003 | 0,51 | 0,03 | |
| Ile | 0,008 | 1,37 | 0,08 | |
| Leu | 0,005 | 0,86 | 0,05 | |
| Tyr | 0,012 | 2,06 | 0,12 | |
| Phe | 0,010 | 1,72 | 0,10 | |
| GABA | n.n. | | | |
| His | 0,014 | 2,40 | 0,14 | |
| Trp | n.n. | | | |
| Lys | 0,004 | 0,69 | 0,04 | |
| Arg | n.n. | | | |
| AS | 0,583 | 100,00 | 5,83 | |
| %TS | 10,00 | | 100,00 | |
| %Rohasche | 1,91 | | | |

Alle Angaben in [X]g/100g []g/1000g []ppm [] μ mol/l [].....

Weitere Analysen:

- Untersuchung auf nicht-proteinogene Aminosäuren mittels Aminosäureanalyser (ASA) (Amino und Charité). Ergebnis: es sind keine nicht proteinogenen Aminosäuren, wie sie im Rahmen der Überproduktion von α -Oxosäuren durch Fehltransaminierung entstehen, nachweisbar.
- Untersuchung auf hydrophobe Verunreinigungen (HPLC-Screening gem. EPIII). Mit dieser Methode werden summarisch hydrophobe Verunreinigung durch RP-HPLC mittels UV-Detektion erfaßt und quantifiziert. Ergebnis: Es waren keine signifikanten Verunreinigungen zu entdecken.
- Untersuchung auf organische Säuren und hydrophile Verunreinigungen: unbekannter Peak vor dem Pyruvat wurde mittels LC-MS als Glutamat und Lactat identifiziert. Ergebnis: Es waren keine signifikanten Verunreinigungen zu entdecken. Minore Peaks (unter 0,1% Fläche) wurden nicht analysiert.

4.3.4 Übersicht über mögliche Aufarbeitungsstrategien

Parallel zu den in Abschnitten 4.3.1 4.3.3 dargestellten Arbeiten sollte für die industrielle Herstellung von Brenztraubensäure bzw. anorganischen Pyruvatsalzen (Ca und Na) ein an das Biotransformationsverfahren adaptiertes Aufreinigungsverfahren als DSP (downstream processing) erarbeitet werden. Folgende Qualitäten sollten je nach Anwendung mindestens erreicht werden:

Technische Qualität: als Building Block

Pharma-Food: Brenztraubensäure in Anlehnung an Malic Acid gem: DAB 99

Natrium- und Calciumpyruvat in Anlehnung an Tanabe

Sodium-Pyruvate:

| | |
|--------------------------------------|------------------------------|
| Appearance: | white-slightly yellow powder |
| Assay (HClO ₄ -Titration) | min 99% |
| Water | max 1% |
| Heavy metals | max 10 ppm |
| Arsenic | max 1 ppm |
| Chlorides | max 30 ppm |
| Sulfates | max 100 ppm |

Purity Check by HPLC

Hauptverunreinigungen: „Wasser und Medienbestandteile“, Glutaminsäure, Alanin, Asche, Lactat.

Aufreinigungsstrategie:

- **Ultrafiltration** zur Abtrennung der Pyruvat-abbauenden Aktivität
- **Direkte Kristallisation** ist wegen der hohen Löslichkeit in Wasser und des niedrigen Schmelzpunktes der Brenztraubensäure (Schmelzpunkt bei 13,5 °C), sowie der zu geringen Reinheit und der zu niedrigen Löslichkeiten der Kontaminaten nicht sinnvoll.
- **Direkte Präzipitation** als Calcium- oder Natriumsalz (sofern Glutamat-Anteil unproblematisch) wegen vergleichsweise hoher Löslichkeit und geringer Reinheit schwierig. Die Löslichkeit des Natriumsalzes liegt bei ca. 6% während das Calciumsalz eine Löslichkeit von ca. 8% besitzt. Eine Produktabtrennung durch Kalkmilchfällung in Analogie zur Äpfel- und Citronensäureherstellung (Abb. 12) ist nicht möglich, da Calciumpyruvat bei Ü-

berschreitung des Löslichkeitsproduktes in Wasser ein flüssigkristallines Gel ausbildet [14]. Somit erscheint eine einfache Verdampfungs/Kühlungskristallisation nicht ohne tiefergehende kristallographische und kristallisationskinetische Untersuchung möglich. Da das Unternehmen bereits über entsprechendes Knowhow bei der Kristallisation anderer schwer abzuscheidender organischer Verbindungen verfügt, wurde erfolgreich versucht, in Analogie zur Äpfelsäure mit organischen Lösungsmitteln als Fällungshilfe zu arbeiten. (s.u.)

- **Ionenaustausch** (sofern Glutamatanteil unproblematisch) ist am einfachsten über schwach oder stark basische Anionenaustauscher möglich. Der Vorteil dieser Verfahren, die mittlerweile auch bei der Citronensäureherstellung verwendet werden (Lurgiverfahren, UOP-Patent US 4,851,574), liegt darin begründet, daß nicht wie beim Kalkmilchverfahren das Calcium nach erfolgter Säurefällung seinerseits mittels Sulfatation durch Schwefelsäurezugabe als Gips abgetrennt werden muß, sondern das Produkt an einen Anionentauscher in OH-Form gebunden wird. Die Desorption kann dann mittels verdünnter Mineralsäure erfolgen. Dies ergibt eine wesentlich günstigere Ökobilanz, da bei der Regeneration des Tauschers nur 1 Äquivalent Kochsalz bzw. Ammoniumchlorid entstehen, beim Kalkmilchverfahren jedoch 3 t Gips / t Säure.

Aus ökologischen Gründen und da Brenztraubensäure unter alkalischen Bedingungen polymerisieren kann, wurde für die Adsorption des Pyruvats nicht ein stark basischer, quartärer Tauscher (z.B. Rohm und Haas IRA 458 oder IRA 958), sondern ein schwach basischer, tertiärer Anionentauscher der Fa. Bayer eingesetzt: Spezifikation S 4528, makroporöses Styrol-DVP Harz, 98% tertiäre Amine, 1,7 – 2,0% Totalkapazität, Volumenänderung (OH/Cl) von 45% !!

Der schwach basische Austauscher hat zwar gegenüber dem stärker basischen Tauscher eine geringere Affinität zur Brenztraubensäure, hat jedoch den Vorteil höherer Selektivität (kein Salzspaltung und damit Asche-Anreicherung) und vor allem einen wesentlich kleineren Regenerieraufwand und Waschwasserbedarf. Durch Elution mittels Mineralsäure kann die adsorbierte organische Säure wieder desorbiert werden. Hierbei geht der Tauscher bei üblicher Verwendung von HCl in die Chloridform über und wird dann mittels Ammoniak bzw. NaOH regeneriert. Hierbei entsteht das schon erwähnte Äquivalent an Salz.

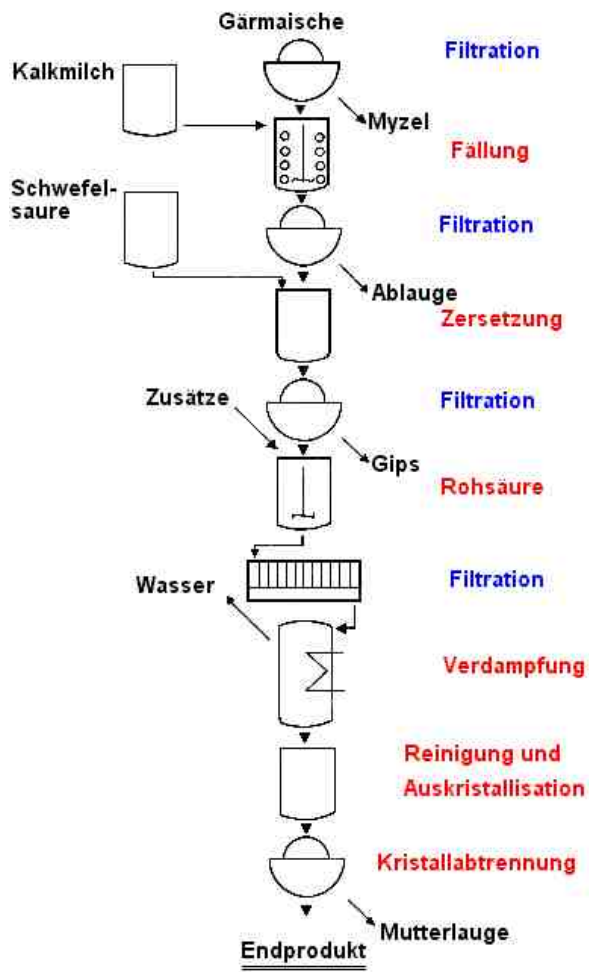


Abb. 12: Klassisches Aufreinigungsverfahren für Zitronen- und Äpfelsäure (Amino Patent).

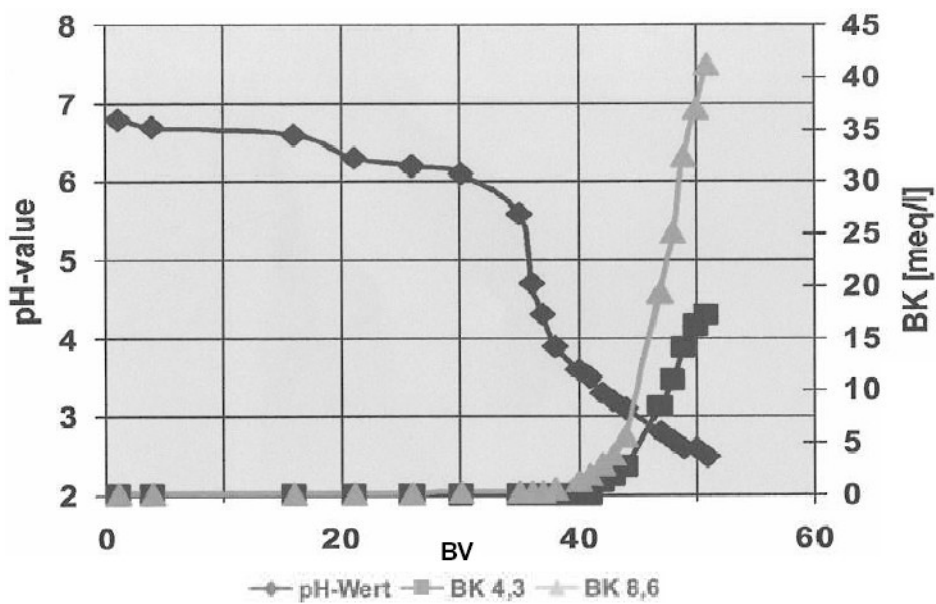


Abb. 13: Durchbruchkurve des Anionentauschers S4258 bei Beladung. BK-Werte = Basenkapazitäten bei pH 4.3 und 8.6 (m und p-Wert), BV = Bettvolumen.

- **Ionenausschlußchromatographie** (sofern hoher Glutamat- und Lactat-Anteil). Für die chromatographische Trennung kommen vom Grundsatz her zwei Verfahren in Frage: Die Ausschlußchromatographie an einem stark basischen Anionenaustauscher in alkalischer Lösung ist nicht ohne Verluste durch Polymerisation möglich und findet in der Hauptsache für Trennungen im Kleinmaßstab Anwendung. Die Ionenchromatographie an einem stark sauren, gelförmigen Kationenaustauscher in H^+ -Form in Analogie zur o.g. HPLC-Methode hat im präparativen Maßstab einige Nachteile. Technische Chromatographieranlagen, wie sie bei der Amino GmbH Verwendung finden, sind leider nicht für den Einsatz von Mineralsäuren (der pH-Wert im Eluenten muß deutlich unter dem pKs-Wert der Brenztraubensäure liegen) ausgelegt (V4a-Stähle). Zudem kommt es bei den für die Chromatographie notwendigen Temperaturen von 70-90°C in mineralaurer Lösung durch *cis*-Eliminierung zu einer Decarboxylierung bzw. Decarboxylierung der Brenztraubensäure unter Acetat- bzw. Acetaldehyd-Bildung.
- **Elektrodialyse** wurde erfolgreich vom IBT2 untersucht. Eine Anlage existiert bei der Amino nur im Labormaßstab, so daß dieser Ansatz nicht im technischen Maßstab verifiziert wurde.

4.3.5 Verfahrenskonzept zur Aufreinigung von Brenztraubensäure mittels Ionenaustausch zur Herstellung der freien Säure und ihren Salzen.

Die folgende Aufreinigungsstrategie wurde mittels synthetischer Modellösungen entwickelt, da für größere Versuche nicht genügend Fermenterbrühe zur Verfügung stand, bzw. nicht in ausreichender Menge transportstabil verfügbar war.

- **Filtration** über Aktivkohle (Abtrennung der restlichen Biomasse, Adsorption von Farbstoffen und schwerlöslichem Tyrosin), Microfilter und Ultrafiltrationsmodul (Keramikmodule).
- **Adsorption** der Brenztraubensäure am Anionenaustauscher S 4528
 - ◆ Flußrate max 3,5 BV/h
 - ◆ Raumtemperatur
 - ◆ Aufgabe 10 – 20°Bx, pH ca. 2.5
 - ◆ Detektion: Säuredurchbruch (pH unter 5) und Leitfähigkeitsanstieg

- ◆ Arbeitskapazität (NVK 1,2 eq/l)
- ◆ Desorption mit HCl (ca. 5%)
- ◆ Regeneration mit NH₃ (ca. 5%) und alle 5 Zyklen mit NaOH (5%)

Der Prozeß ließe sich beim Bau einer Neuanlage sehr leicht an die Biomasseabtrennung integrieren, indem im Schwebebettverfahren der komplette Fermenterinhalt über den Tauscher gefahren und das Produkt absorbiert wird. Eine Filtration zur Produktstabilisierung ist hier nicht notwendig.

- **Entfärbung** mit Aktivkohle (2-5% auf TS für 30-60 min.) und Mikrofiltration
- **Brenztraubensäure** (Wasserabtrennung und Wasserabdampfung durch Trocknungsmittel auf Zeolith-Basis). Eine weitere Feinreinigung ist durch fraktionierte Vakuum-Destillation (Kp₇₆₀ ca. 165°C Kp₁₃₀ ca. 110°C) möglich.
- **Titration** mittels Ca- oder Na-Lauge im Rührkessel oder direkte Desorption der Säure mittels NaOH bzw. Ca(OH)₂.
- **Fällungs- und Kühlungskristallisation** zu Calciumpyruvat bzw. zu Natriumpyruvat mittels Zusatz von 20% Ethanol (Alternative 70-80% Essigsäureester oder 20-30% Aceton). Problem: Die Fällung, Zentrifugation und Trocknung muß unter strikten Ex-Schutz-Bedingungen durchgeführt werden. Das ist zwar im Technikum der Amino GmbH möglich, jedoch nicht ohne weiteres im Betrieb. Die Behälter müssen aus zollrechtlichen Gründen verplombt sein bzw. vergällter Alkohol verwendet werden. Aceton und Essigsäureester scheiden aus gesundheitlichen Gründen als Fällungshilfe aus. Die unvermuteten Schwierigkeiten bei der Kristallisation der Pyruvate machen weitere Arbeiten notwendig um ggf. ein Lösungsmittel-freies Verfahren zu entwickeln.
- **Abtrennung** über Stülp- oder Korbzentrifuge
- **Trocknung** im Konus –Mischrockner unter Vakuum bei max. 65°C
Interessanterweise existieren Patentschriften über eine Stabilisierung von Pyruvaten durch Trocknung (JP 63203646 A).

Nebenprodukte des Verfahrens:

- ◆ Tauscherablauf (Fermenterbrühe ohne Produkt)
- ◆ Tauscherregenerat (je 1 Äquivalent Ammoniumchlorid oder Natriumchlorid; das Ammonium kann nach Alkalisierung gestrippt werden)
- ◆ Waschwasser (zur Ammoniak-Strippung)
- ◆ Alkoholhaltige Mutterlauge (Ethanol kann über Wasserdampf-Destillation zurückgeführt werden). Wässrige Phase muß abgestoßen werden.
- ◆ Aktivkohle aus der zweiten Entfärbung kann für die erste Filtration zurückgeführt werden.
- ◆ Ausbeute mind. ca. 70 – 75%

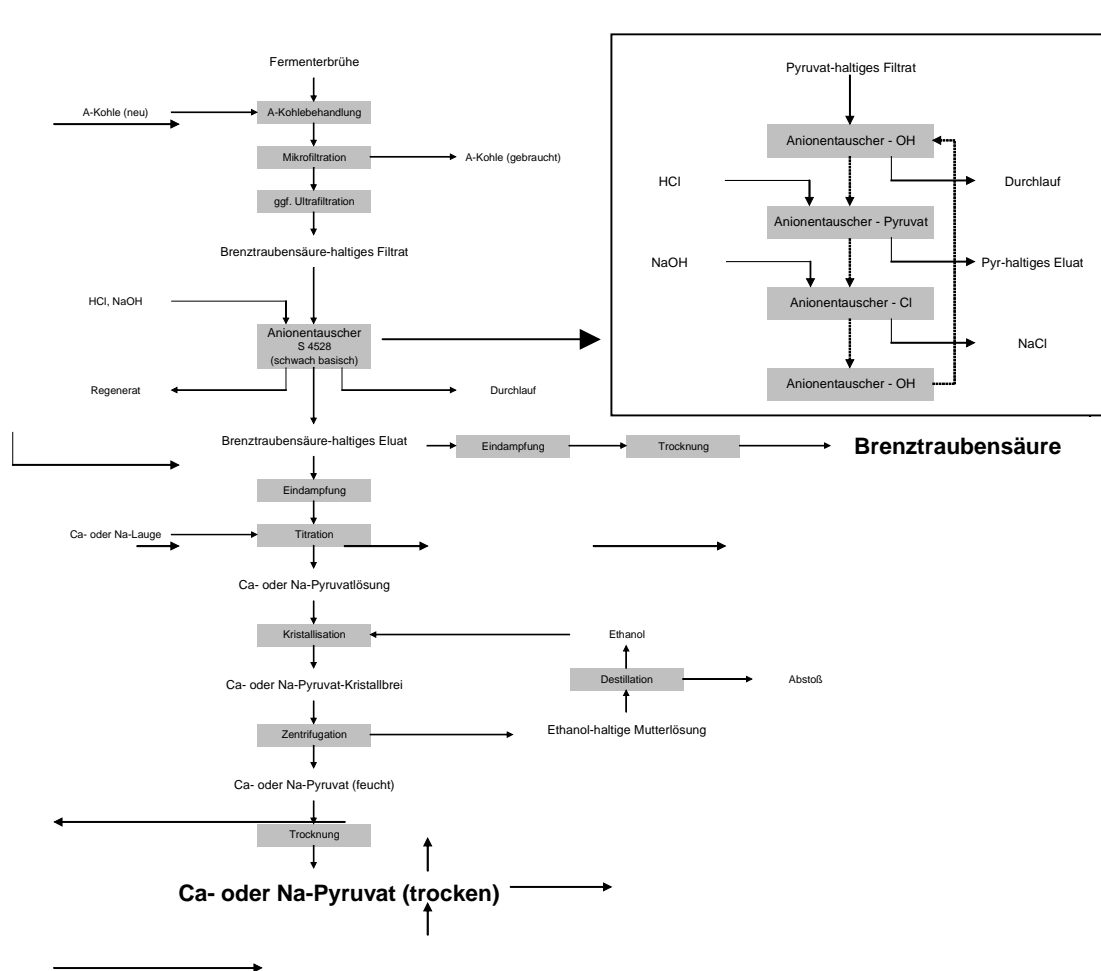


Abb. 14: Verfahrensfliessbild zur Aufreinigung von Brenztraubensäure und ihren Salzen

5. SOLL/IST-VERGLEICH

Stammentwicklung: Die im Antrag genannten Ziele wurden ausnahmslos erreicht. Mit der Inaktivierung des *ldhA*-Gens für die Lactat-Dehydrogenase wurde die Bildung von Lactat vollständig verhindert und damit die Nebenproduktbildung eliminiert. Der entsprechende Stamm wurde zum Patent angemeldet. Darüberhinaus wurden weiterführende Untersuchungen mit dem Ziel der Optimierung des Produktionsstammes durchgeführt. Die Suche nach dem Gen für den Pyruvat-Importer blieb leider erfolglos. Transkriptom- und Proteom-Analysen wurden durchgeführt, um die speziellen Charakteristika des Pyruvat-Produktionsstammes und insbesondere den Einfluss der Pyruvat-Produktion auf die Genexpression zu bestimmen. Dabei wurde gezeigt, dass der Glyoxylat-Zyklus im Stamm YYC202 vermutlich nicht aktiv ist, dass die Pyruvat-Produktion zu Stress, insbesondere zu Säurestress führt, und es konnten Gene identifiziert werden, die möglicherweise eine Rolle beim Pyruvat-Transport spielen.

Fermentationsentwicklung: Auch die prozesstechnische Entwicklung ging inhaltlich deutlich weiter als im Projektantrag vorgesehen. Neben der eigentlichen fed-batch-Entwicklung mit Glucose- und Acetat-Regelung wurden ‚repetitive fed-batch‘-Ansätze, die kontinuierliche Prozessführung mit Zellrückhaltung und ein *ISPR*-Ansatz mit vollständig integrierter Elektrodialyse untersucht. Letzterer zählt zu den wenigen Beispielen der erfolgreichen vollständigen Integration der Aufarbeitung in ein laufendes Fermentationsverfahren. Zudem gelang die Identifizierung eines geeigneten makrokinetischen Prozessmodells.

Halbtechnische Realisierung: Das Biotransformations-Verfahren des IBT wurde im Hinblick auf die Verwendung der Brenztraubensäure bzw. der Na/Ca-Pyruvate als Pharma-Food-Wirkstoff analytisch bewertet. Neben pharmagerechten Analyseverfahren wurden Spezifikationen erarbeitet und erfolgreich an Modellösungen ein entsprechendes umweltfreundliches Downstream-Processing-Verfahren für die Herstellung von Brenztraubensäure bzw. Na/Ca-Pyruvaten entwickelt. Das Verfahren erlaubt die Herstellung von Pharma-Food-Qualitäten mit minimaler Nebenproduktbildung und ist deshalb ein gutes Beispiel für produktionsintegrierten Umweltschutz. Eine detaillierte Marktanalyse konnte die Chancen und Risiken bei der Vermarktung von Brenztraubensäure bzw. Na/Ca-Pyruvaten aufzeigen. Dabei zeigte sich, dass die Verwendung von Pyruvat als Rohstoff sehr interessant ist und deshalb weiter verfolgt wird.

6. WIRTSCHAFTLICHKEITSBETRACHTUNGEN

Die Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen wurden im Rahmen des DBU-Projektes AZ 13040/02 „Ökonomische und ökologische Evaluation biokatalytischer Prozesse während ihrer Entwicklung“ durchgeführt und werden dort dokumentiert.

7. KOOPERATION

Zwischen den Mitarbeitern des IBT1 und des IBT2 gab es einen ständigen Erfahrungsaustausch und eine sehr enge Kooperation, da beide Institute im gleichen Gebäude auf dem Gelände des Forschungszentrums Jülich GmbH untergebracht sind.

Mit den Partnern aus dem Projekt „Ökologische und ökonomische Evaluation (AZ 13040/02)“ gab es am 21.08.2000 ein erstes Treffen im Forschungszentrum Jülich. Dr. Arno Biwer, der das Projekt bei Prof. Heinzle bearbeitete, war mehrmals während der Projektlaufzeit für mehrere Tage im Forschungszentrum Jülich, um die für die Evaluierung notwendigen Daten zu sammeln.

Mit der Firma Rhein-Biotech GmbH (Düsseldorf) vertreten durch Herrn Prof. Gellissen gab es am 6. Juni 2001 ein Treffen im Forschungszentrum Jülich. In 2002 schied die Rhein Biotech GmbH wegen interner Umorganisation aus dem Kooperationsprojekt aus. Seitdem ist die Firma Amino GmbH (Frellstedt) in das Projekt integriert. Es gab mittlerweile schon mehrere Treffen mit Herrn Dr. Faurie im Forschungszentrum Jülich, darüberhinaus wurden dem Industriepartner Pyruvat-haltige Überstände aus Fermentationsexperimenten für Aufreinigungs- und Analysestudien zur Verfügung gestellt.

Die Projektpartner nahmen an allen von der DBU organisierten Treffen in Hamburg teil, auch an der Biocat 2002 (28.-31.07., Hamburg). Darüber hinaus sind die Projektpartner z.B. in der Taskforce-Gruppe ‚Methoden‘ vertreten.

8. LITERATUR

- [1] Li, Y., Chen, J., Lun S.-Y. (2001) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 451-459.
- [2] Howard, J.W., Fraser, W.A. (1932) *Org. Synth. Coll.* 1: 475-476.
- [3] Eisenberg, A., Seip, J.E., Gavagan, J.E., Payne, M.S., Anton, D.L., DiCosimo, R. J. (1997) *Mol. Catal. B. Enzymatic* 2: 223-232.
- [4] Li, Y., Chen, J., Lun, S.Y., Rui, X.S. (2001) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 680-685.

- [5] Li, Y., Hugenholtz, J., Chen, J., Lun, S.-Y. (2002) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 101-107.
- [6] Yokota, A., Henmi, M., Takaoka, N., Hayashi, C., Takezawa, Y., Fukumori, Y., Tomita, F. (1997) *J. Ferm. Bioeng.* 83: 132-138.
- [7] Georgiou, C.D., Fang, H., Gennis, R.B. (1987) *J. Bacteriol.* 169: 2107-2112.
- [8] Gerharz, T., Zelić, B., Takors, R., Bott, M. (2001) German Patent Application 10129714.4.
- [9] Lang, V.J., Leystra-Lantz, C., Cook, R.A. (1987) *J. Bacteriol.* 169: 380-385.
- [10] Ma, D., Cook, D.N., Alberti, M., Pon, N.G., Nikaido, H., Hearst, J.E. (1995) *Mol. Microbiol.* 16: 45-55.
- [11] Gerharz, T., Zelić, B., Takors, R., Bott, M. (2002) German Patent Application 10220234.6.
- [12] Zelić, B., Gerharz, T., Bott, M., Vasić-Rački, Đ., Wandrey, C., Takors, R. (2003) *Chem. Eng. Technol.* 7: 299-355.
- [13] Zelić, B., Gostovic, S., Vuoriletho, K., Vasić-Rački, Đ., Takors, R. (2004) *Biotechnol. Bioeng.* 85: 638-646.
- [14] Paradies, H.H., Quitschau, P., and Pischel, I. (2000) Structure and properties of calcium pyruvate in aqueous solutions. *Int. J. Res. Physical Chemistry & Chemical Physics* 214: 301-311.

9. EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN ZUM THEMA

- Gerharz, T., Zelić, B., Takors, R. und Bott, M. (2001) Produktion von Pyruvat aus Glucose mit *Escherichia coli*. In *Biokatalyse*, Spektrum Akademischer Verlag (Heidelberg), pp. 29-33.
- Gerharz, T., Morjan, K., Polen, T., Wendisch, V.F. and Bott, M. (2003) Highly efficient production of pyruvate or L-alanine from glucose using acetate-auxotrophic *Escherichia coli* strains. In Vorbereitung.
- Gerharz, T. (2003) Pyruvat-Produktion durch acetat-auxotrophe *Escherichia coli*-Stämme. Dissertation, Universität Düsseldorf.
- Takors, R., Zelić, B., Gerharz, T. und Bott, M. (2003) Pyruvat-Produktion aus Glucose mit rekombinanten *Escherichia coli*-Stämmen. Transkript, Sonderband Nachhaltige Biokatalyse, 96-99.
- Zelić, B. (2003) Study of the process development for *Escherichia coli* based pyruvate production. Dissertation, University of Zagreb.

- Zelić, B., Gerharz, T., Bott, M., Vasić-Rački, D., Wandrey, C. and Takors, R. (2003) Fed-batch process for pyruvate production by recombinant *Escherichia coli* YYC202 strain. Eng. Life Sci. 3: 299-305.
- Zelić, B., Gostovic, S., Vuorilehto, K., Vasić-Rački, D., und Takors, R. (2004) Process strategies to enhance pyruvate production with recombinant *Escherichia coli*: From repetitive fed-batch to *ISPR* with fully integrated electro dialysis. Biotechnol. Bioeng. 85: 638-646.
- Zelić, B., Vasić-Rački, D., Wandrey, C. and Takors, R. (2004) Modeling of the pyruvate production with *Escherichia coli* in a fed-batch bioreactor. Bioproc. Biosyst. Eng., 26: 249-258.

10. EIGENE PATENTE ZUM THEMA

- Bott, M., Gerharz, T., Takors, R. und Zelić, B. (2001) Verfahren zur fermentativen Herstellung von Pyruvat. Deutsche Patentanmeldung 101 29 711.4 vom 22.06.01
- Gerharz, T., Zelić, B., Takors, R. und Bott, M. (2002) Verfahren sowie Mikroorganismen zur mikrobiellen Herstellung von Pyruvat aus Kohlenhydraten und Alkoholen. Deutsche Patentanmeldung 102 20 234.6 vom 06.05.02

11. VORTRÄGE UND POSTER

- Bott, M. (2001) Pathway analysis and metabolic engineering of bacteria for the production of useful compounds. Vortrag im Rahmen der Biotechnika am 11. Oktober in Hannover.
- Gerharz, T. und Bott, M. (2001) Pyruvate production from glucose by a recombinant *Escherichia coli* strain. Posterpräsentation bei der Tagung "Biotrans 2001" vom 2.-9. September in Darmstadt
- Gerharz, T. (2001) Pyruvate production from glucose by a recombinant *Escherichia coli* strain. Vortrag im Rahmen eines Workshops des Graduierten-Kollegs „Molekular Physiologie“ der Universität Düsseldorf vom 23.-25. November in Bad Neuenahr-Ahrweiler
- Gerharz, T. und Bott, M. (2002) Pyruvate production from glucose by a recombinant *Escherichia coli* strain. Vortrag bei der Jahrestagung der VAAM vom 24.-27. März in Göttingen
- Gerharz, T., Zelić, B., Takors, R. und Bott, M. (2002) Pyruvate production from glucose by acetate-auxotrophic *Escherichia coli* strains. Posterpräsentation bei der „Biocat“-Tagung vom 28.-31. Juli in Hamburg

Gerharz, T. und Bott, M. (2002) Pyruvate production from glucose by a recombinant *Escherichia coli* strain. Posterpräsentation im Rahmen der Tagung “Metabolic Engineering IV: Applied system biology” vom 6. - 11. Oktober in Castelvechio Pascoli, Italien.

Zelić, B., Takors, R., Vasic-Racki, D. und Wandrey, C. (2001) Process development for *Escherichia coli*-based pyruvate production. Posterpräsentation im Rahmen des „Croatian symposium of chemical engineers” vom 10. - 13. Juni, Osijek, Kroatien.

12. ANTWORTEN AUF FRAGEN DER DBU UND FAZIT

- Im Rahmen des Projektes wurden zwei Dissertationen von Frau Tanja Gerharz und Herrn Bruno Zelić erarbeitet.
- Es wurden zwei Patentanmeldungen eingereicht, über deren Erteilung noch nicht entschieden wurde (siehe Anhang).
- Es wurden drei Publikationen in referierten Zeitschriften publiziert sowie zwei Publikationen in nicht referierten Zeitschriften (siehe Punkt 9). Eine weitere Publikation in einer referierten Zeitschrift ist in Vorbereitung.
- Eine wirtschaftliche Verwertung der Ergebnisse durch die Amino GmbH steht noch aus, es besteht aber weiterhin grosses Interesse an einer Umsetzung.
- Von seiten der Firma Merck (Darmstadt) gab es eine Anfrage bezüglich der Möglichkeit, Pyruvat zu produzieren und an Merck zu liefern, an Herrn Takors, die er an die Firma Amino GmbH weiterleitete.
- Die im Rahmen des Projektes gewonnenen Ergebnisse bildeten die Grundlage für die Nutzung der Pyruvat-Produktionsstammes als Basis für die Herstellung von Substanzen, z.B. Aminosäuren, die sich vom Pyruvat ableiten.
- Weiterhin bildete das abgeschlossene Projekt die theoretische Basis für ein weiteres Projekt, das im Rahmen der DBU-Initiative IC Bio gestellt und bewilligt wurde (AZ 13088).

Fazit:

Die im Projektantrag formulierten Ziele konnten klar erreicht und in vielen Fällen sogar übertroffen werden. Es konnte ein rekombinanter *Escherichia coli*-Stamm konstruiert und charakterisiert werden, der mit bisher unerreichten Raum-Zeit-Ausbeuten und Selektivität

Glucose in Pyruvat umsetzt und ausscheidet. Die Evaluierung des Prozesses hinsichtlich Wirtschaftlichkeit, Umweltverträglichkeit und Nachhaltigkeit ergab klare Vorteile für das biotechnologische Verfahren gegenüber dem chemischen Verfahren zur Pyruvat-Herstellung durch Brenzen von Traubensäure. Insofern kann ein sehr positives Fazit gezogen werden und das beschriebene Verfahren als Musterbeispiel für die Vorzüge biotechnologischer Produktionsprozesse mit rekombinanten Mikroorganismen aufgeführt werden.

13. ANHANG

13.1 Eigene Publikationen zum Projekt

- 13.1.1 Gerharz, T., Zelić, B., Takors, R. und Bott, M. (2001) Produktion von Pyruvat aus Glucose mit *Escherichia coli*. In *Biokatalyse*, Spektrum Akademischer Verlag (Heidelberg), pp. 29-33.
- 13.1.2 Takors, R., Zelić, B., Gerharz, T. und Bott, M. (2003) Pyruvat-Produktion aus Glucose mit rekombinanten *Escherichia coli*-Stämmen. Transkript, Sonderband Nachhaltige Biokatalyse, 96-99.
- 13.1.3 Zelić, B., Gerharz, T., Bott, M., Vasić-Rački, D., Wandrey, C. and Takors, R. (2003) Fed-batch process for pyruvate production by recombinant *Escherichia coli* YYC202 strain. *Eng. Life Sci.* 3: 299-305.
- 13.1.4 Zelić, B., Gostovic, S., Vuorilehto, K., Vasić-Rački, D., und Takors, R. (2004) Process strategies to enhance pyruvate production with recombinant *Escherichia coli*: From repetitive fed-batch to *ISPR* with fully integrated electro dialysis. *Biotechnol. Bioeng.* 85: 638-646.
- 13.1.5 Zelić, B., Vasić-Rački, D., Wandrey, C. and Takors, R. (2004) Modeling of the pyruvate production with *Escherichia coli* in a fed-batch bioreactor. *Bioproc. Biosyst. Eng.*, 26: 249-258.

13.2 Eigene Patentanmeldungen zum Projekt

- 13.2.1 Bott, M., Gerharz, T., Takors, R. und Zelić, B. (2001) Verfahren zur fermentativen Herstellung von Pyruvat. Deutsche Patentanmeldung 101 29 711.4 vom 22.06.01
- 13.2.2 Gerharz, T., Zelić, B., Takors, R. und Bott, M. (2002) Verfahren sowie Mikroorganismen zur mikrobiellen Herstellung von Pyruvat aus Kohlenhydraten und Alkoholen. Deutsche Patentanmeldung 102 20 234.6 vom 06.05.02