

Abschlussbericht

Neue Wege zur Optimierung der biotechnologischen Herstellung pharmazeutischer Wirkstoffe am Beispiel der Produktion von L-Serin mit *Corynebacterium glutamicum* mit Schwerpunkt Stammentwicklung und Downstream Processing

Aktenzeichen: 13089

Koordination: Dr. Petra Peters-Wendisch

Verfasser der Teilabschnitte:

Teil I: Stammentwicklung

Dr. Petra Peters-Wendisch
Institut für Biotechnologie 1
Forschungszentrum Jülich
52425 Jülich
Tel: 02461 615430
Fax: 02461 612710

Teil II: Fermentation und Downstream Processing

Prof. Dr. Robert Faurie, Dr. Tanja Gerharz,
Dr. Holger Fersterra, Dr. Torsten Graf
Amino GmbH
An der Zucker-Raffinerie 10
38373 Frellstedt
Tel: 05355 699120
Fax: 05355 699294

Teil III: Stoffflussanalysen

Dr. Rainer Figge, Dr. Benjamin Gonzalez
METabolic EXplorer S.A.
Biopôle Clermont-Limagne
63360 Saint-Beauzire
FRANCE
Tel: ++33 473 334300
Fax: ++33 473 334301

Projektbeginn: 1. Juli 2003

Laufzeit: 2 Jahre

Jülich, August 2005

Zusammenfassung

Die nachhaltige Bioproduktion pharmazeutischer Wirkstoffe erfordert die Entwicklung von Bakterienstämmen, die ausgehend vom kostengünstigen und nachwachsenden Rohstoff Glucose bzw. Saccharose erfolgen kann. Am Beispiel der Aminosäure L-Serin, für die es einen steigenden Bedarf in der Pharma- und Ernährungsindustrie gibt, und die biotechnologisch bisher nur durch Einsatz teurer und ökologisch ungünstiger Substrate erzeugt werden kann, soll ein neues Verfahren zur Stammkonstruktion etabliert werden mit dem L-Serin aus Glucose bzw. Saccharose hergestellt werden kann, und welches eine frühzeitige Entwicklung eines integrierten Aufarbeitung ermöglicht. Dieses neue Verfahren basierte auf dem Prinzip des *Inverse Metabolic Engineering*, und hatte zum Ziel, durch ungerichtete Mutagenese zunächst undefinierte Serin-Produktionsstämme zu erhalten, um diese anschließend molekular zu charakterisieren. Auf diese Weise sollten neue Target-Gene für das gezielte *Metabolic Engineering* identifiziert werden. Gleichzeitig sollten die undefinierten Stämme für die Optimierung des *Downstream Processings* eingesetzt werden, um so schon früh einen Prozess zur Verfügung zu haben, der sich für die Aufarbeitung von Serin eignet. Aufgrund der zentralen Stellung von Serin im Stoffwechsel war es jedoch nicht möglich, undefinierte Serinproduktionsstämme zu erhalten.

Auf der Basis des *Metabolic Engineering* waren jedoch bereits wichtige Targets identifiziert worden, deren Veränderung notwendig für die Serin Produktion waren. Darauf aufbauend wurde ein Serinproduktionsstamm von *C. glutamicum* hergestellt, der über eine Deletion des Gens für die L-Serindehydratase verfügt, sowie die Serinbiosynthesegene überexprimiert, bei gleichzeitiger Deregulierung des Schlüsselenzyms. Als für die Serinproduktion wichtigste Veränderung wurde die Verminderung der Genexpression des Serinhydroxymethyltransferase-Gens *glyA*, bzw. Verminderung der entsprechenden Enzymaktivität identifiziert. Dadurch wird die Umsetzung von Serin zu Glycin reduziert und die Produktion von Serin entscheidend verbessert. In industrienahen Fermentationen erreichte dieser Stamm Produktivitäten von maximal 1,4 g Serin /l*h bzw. 0,93 g/l h kumulativ mit einem Titer von ca. 40 g/l Serin bei einer Produktausbeute von ca. 14% bezogen auf metabolisierten Zucker. Damit wurde gezeigt, dass die bisher bekannten Leistungsdaten für die Serinproduktion nicht nur erreicht sondern klar übertroffen werden konnten. In Stoffflussanalysen (durchgeführt durch den Partner MetEx) konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass das volle metabolische Optimierungspotential noch nicht ausgeschöpft ist. Auf dieser

Basis wurde die Verbesserung der Vorstufenbereitstellung untersucht. Durch Deletion des Pyruvatkinase Gens *pyk* konnte die Serinproduktion durch Schüttelkolbenexperimente noch einmal um weitere 50 % gesteigert werden. Die Fermentationen zeigten aber auch, dass die für die Serinproduktion entscheidende verminderte Expression des *glyA*-Gens instabil ist. Da das *glyA* Gen essentiell ist, und nicht deletiert werden kann, wurde ein indirekter Weg gewählt, die Umsetzung von Serin zu Glycin zu reduzieren. Durch die Deletion der Gene *pabABC*, die für eine p-Aminobenzoat Synthase kodieren, wurde die Folsäure Verfügbarkeit reduziert. Folsäure ist die Vorstufe für Tetrahydrofolat, dem Cosubstrat der SHMT. Es konnte gezeigt werden, dass diese genetische Veränderung in Kombination mit der Deletion des Gens für die L-Serindehydratase, sowie der Überexpression der Gene für den deregulierten Serinbiosyntheseweg in industrienahen Fermentationen ebenfalls zu einer Serin-Produktion von bis zu 40g/l führte, ohne dass direkt die Aktivität der SHMT verändert wurde. Damit war durch die Identifizierung neuer Targets, ein stabiler Stamm erzeugt worden, mit dem in Zukunft Serin fermentativ hergestellt werden kann.

Hinsichtlich des *Downstream Processing* konnte das geplante innovative Extraktionsverfahren der kontinuierlichen Ionenaustausch-Chromatographie im Technikumsmaßstab erprobt und hinsichtlich des Chemikalienverbrauchs optimiert werden. Die Verfahrensausbeute liegt derzeit bei 90% bezogen auf die „salzarme“ Fraktion bei einer Gesamtausbeute bezogen auf das Gesamteluat von 100%. Eine mögliche Serindegradation durch alkalisch katalysierte Razemisierung konnte unter den gewählten Elutions- und Evaporationsbedingungen nicht beobachtet werden. Die Abtrennung der nicht durch Kristallisation abzureichernden Aminosäuren bildet einen Schwerpunkt der künftigen Arbeiten zur Serinaufreinigung.

Zielsetzung und Umweltrelevanz:

Aminosäuren sind wirtschaftlich sehr wertvolle Produkte, die in der Pharmaindustrie, sowie der Nahrungs- und Futtermittelindustrie Verwendung finden. Sie werden für pharmazeutische Zwecke in höchster Reinheit ohne Anwesenheit von Nebenprodukten benötigt. Die Aminosäure Serin ist Bestandteil von Infusionslösungen für die prä- und postoperative parenterale Ernährung, die alle proteinogenen Aminosäuren enthalten können. Ferner wird Serin als Vorstufe zur enzymatischen Synthese von Tryptophan, einem ebenfalls wichtigen pharmazeutischen Wirkstoff benötigt. Darüber hinaus besteht ein zunehmender Bedarf an vielen Aminosäuren, einschließlich des Serins, in der Nahrungsmittelindustrie, aufgrund des wachsenden Gesundheits- und Fitnessbewusstseins.

Serin wird derzeit großtechnisch im Wesentlichen durch die Extraktion von Eiweißhydrolysaten nach saurer Hydrolyse isoliert, bzw. durch Biotransformation oder fermentativ aus der Aminosäure Glycin und Formaldehyd oder Methanol gewonnen. Diese Verfahren sind aufgrund hoher Umweltunverträglichkeit (saure Hydrolyse, Einsatz giftiger Substrate) heute nicht mehr zu vertreten. Daher ist es das Ziel des Projektes, ausgehend von einem geeigneten Bakterienstamm ein fermentatives Verfahren zu entwickeln, um Serin aus dem günstigen und nachwachsenden Rohstoff Glukose herzustellen. Darüber hinaus soll im Rahmen des Projektes ein effizientes und umweltschonendes Verfahren zur Aufreinigung von Serin aus Fermentationsbrühen etabliert werden.

Die Aminosäure Serin stellt eine besondere Herausforderung bei der Stammentwicklung dar, da eher als Intermediat denn als Endprodukt des Stoffwechsels zu betrachten ist. Es gibt in der Zelle eine Vielzahl von Reaktionen, die Serin umsetzen (s. auch Abb. 2). Viele dieser Reaktionen sind essentiell, so z.B. die Umsetzung von Serin zu Glycin, als Ausgangsreaktion für den Ein-Kohlenstoff (C1)-Kreislauf. Des Weiteren kann Serin auch über Pyruvat wieder in den Zentralstoffwechsel zugeführt werden. Für einen Fermentationsprozess bedeutet das, dass Serin selbst bei Überexpression der entsprechenden Biosynthesegene nicht akkumulieren muss, sondern dass es in Biomasse oder sogar in unerwünschte Nebenprodukte abfließt, die in der anschließenden Produktaufarbeitung (*Downstream Processing*) aufwendig chromatografisch von Serin getrennt werden müssen. Es können aber auch nicht-proteinogene, ggf. toxische Nebenprodukte entstehen, die die Produktsicherung, wie sie bei pharmazeutischen Wirkstoffen unabdingbar erforderlich ist erschweren. Dar-

über hinaus kann eine hohe Biomassebildung die optimale Raum-Zeit-Ausbeute verringern. Es ist daher notwendig, den Gesamtprozess von vornherein so zu entwickeln, dass der verwendete Stamm eine möglichst geringe Nebenprodukt- und Biomassebildung bei gleichzeitig optimaler Produktausbeute aufweist.

Die derzeit Markt bestimmenden Aminosäuren Glutamat und Lysin werden ausschließlich fermentativ aus der kostengünstigen Glukose hergestellt. Die dazu benutzten Stämme leiten sich von *Corynebacterium glutamicum* ab, dessen überragende Eigenschaften zur Glutamatbildung seit 1957 bekannt sind ¹. Durch klassische Mutagenese und geeignetes Screening wurden Stämme von *C. glutamicum* gewonnen, die heute zur großtechnischen Lysin-Produktion eingesetzt werden. Derzeit werden die enorm gewachsenen Kenntnisse zur Zelle, wie die Sequenzierung des Genoms ², die Quantifizierbarkeit der Stoffflüsse ³ und die Möglichkeit, Gene graduell zu exprimieren oder im Chromosom zu deletieren ⁴ genutzt, um gezielt in den Stoffwechsel einzugreifen, und diesen in eine gewünschte Richtung umzulenken. Dieser Ansatz des *Metabolic Engineering* hat zu einer erstaunlichen Weiterentwicklung klassischer Stämme geführt ^{5, 6, 7}. Tatsächlich wird industriell eine Kombination von klassischer Mutagenese und *Metabolic Engineering* eingesetzt, da trotz des Detailwissens, die Bakterienzelle noch nicht in ihrer Komplexität verstanden ist.

Die Voraussetzung für die Herstellung eines guten Serin-Produktionsstammes ist ein besseres Verständnis der Expression bzw. Regulation der Gene des Serin-Stoffwechsels in *C. glutamicum*. In unserem Projekt sollte daher ein Ansatz verfolgt werden, mit dem detaillierte Informationen erhalten werden, über die Veränderungen, die einen guten Produktionsstamm ausmachen. Diese Informationen sollten anschließend gezielt genutzt werden, um einen Produktionsstamm herzustellen, der definiert nur die gewünschten Eigenschaften zur Überproduktion von Serin aufweist. Dabei gibt es zwei Vorgehensweisen. (i) In einem auf klassischer Mutagenese basierenden Screening wird auf *C. glutamicum*-Stämme selektioniert, die in der Lage sind große Mengen Serin zu bilden. Anschließend werden die erhaltenen Stämme detailliert auf molekularer Ebene charakterisiert, und die Veränderungen definiert. (ii) Schon vorhandene gezielt erzeugte Stämme, die jedoch nur geringe Serin-Mengen produzieren, werden mithilfe neuester molekularer Techniken, wie DNA-Chip-Analyse und Stoffflussanalyse untersucht, um Engpässe bzw. unerwünschte Abflüsse aufzudecken. In beiden Fällen können die so gewonnenen Erkenntnisse dazu genutzt werden, wiederum gezielt und in Kombination mit schon vorhandenem Wissen zum Serin-Stoffwechsel, einen Hochleistungsproduktionsstamm zu generieren.

Die Stammentwicklung wird zu jeder Stufe begleitet durch Fermentationen zur Untersuchung der Leistungsfähigkeit der Stämme. Darüber hinaus wird die Produktaufarbeitung (*Downstream Processing*) schon in einem frühen Stadium parallel zur Stammentwicklung verfolgt, um frühzeitig mögliche Optimierungspotentiale zu erkennen und in die Entwicklung mit einzubeziehen. Auch wird die Optimierung des *Downstream Processings* durch eine vorgeschaltete optimale Stammentwicklung wesentlich vereinfacht, da weniger Nebenprodukte anfallen und eine bessere Produktausbeute erreicht werden kann. Darüber hinaus wird durch die Einführung und Optimierung einer kontinuierlichen Aufarbeitung im Ionenaustauschverfahren, eine Verminderung des Energie- und Chemikalienbedarfs sowie eine Reduktion der Abfallprodukte, und somit eine wesentlich umwelt- und kostenschonendere Isolierung von Serin erfolgen (Abb. 1).

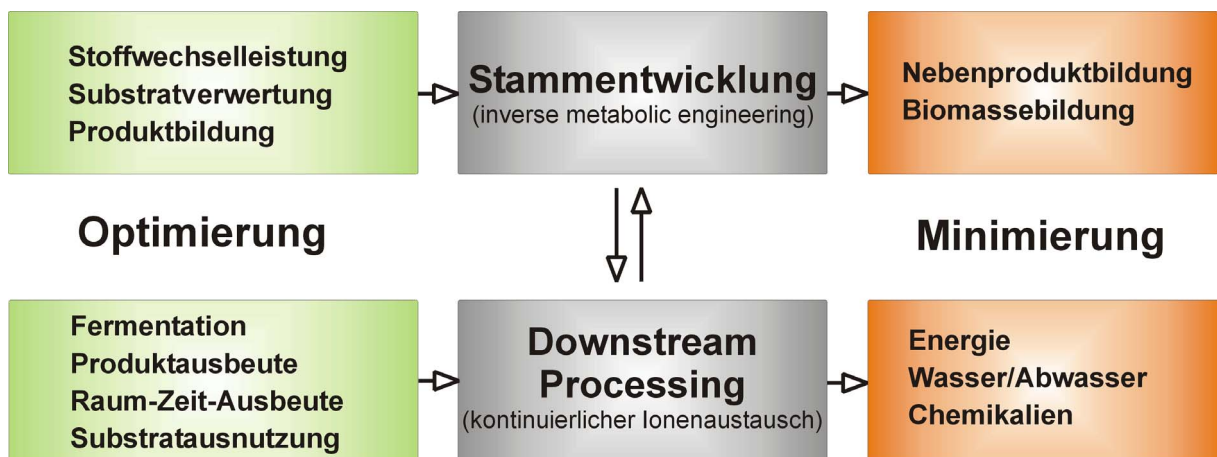


Abb. 1: Schematische Darstellung der Optimierung der Stammentwicklung und des *Downstream Processings* bzw. Minimierung der umweltrelevanten Komponenten, die bei der fermentativen Herstellung von Serin anfallen.

Literatur:

1. Kinoshita *et al.* (1957) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, Japan 3, 193-205.
2. Tauch *et al.* (2002) *J. Biotechnol.* 95: 25-38.
3. Marx *et al.* (1997) *Biotechnol. Bioengineering.* 56: 168-180.
4. Schäfer *et al.* (1990) *J. Bacteriol.* 172: 1663-6.
5. Eggeling *et al.* (1998) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 24-30.
6. Riedel *et al.* (2001) *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 573-83.
7. Peters-Wendisch *et al.* (2001) *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 295-300.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewendeten Methoden

1. Arbeitsschritte

Die Besonderheit des Projektes beruhte darauf, dass parallel zur Stammkonstruktion die Optimierung der Fermentation und des *Downstream Processings* erfolgte, um auf diese Weise schon früh eine Kopplung von grundlagenorientierter Stammentwicklung und anwendungsorientierter Prozessentwicklung zu ermöglichen. Zur Stammkonstruktion wurden zwei Wege parallel verfolgt. Einerseits wurden zunächst ungerichtete Mutanten erzeugt, die Serin ausscheiden um diese anschließend molekular, z.B. mit Hilfe der DNA-Chip Technologie zu charakterisieren, um die für den Phänotyp dieser Stämme verantwortlichen Schlüsselgene (Targetgene) zu identifizieren. Darüber hinaus wurden in einem *functional genomics* Ansatz neue Targetgene für die Serin Produktion identifiziert. Dieser Ansatz basierte auf den Ergebnissen der Stoffflussanalysen, sowie der Fermentationsexperimente, die unter produktionsrelevanten Bedingungen zu neuen Erkenntnissen führten. Die identifizierten Gene wurden anschließend zur Konstruktion definierter stabiler Hochleistungsproduktionsstämme von *C. glutamicum* eingesetzt. Parallel zu den Arbeiten zur Stammkonstruktion und Fermentation wurde auch das *Downstream Processing* zur Aufarbeitung der Aminosäure Serin optimiert. Dabei wurde ein einstufiges Verfahren zur Isolierung von Serin aus dem Fermentationsmedium über einen kontinuierlichen Ionenaustauscher etabliert.

2. Methoden

2.1 Stammentwicklung

2.1.1 Isolierung Serin-ausscheidender Stämme

Die chemische Mutagenese erfolgte durch 15 min Inkubation einer Übernachtskultur des Stammes *C. glutamicum* WT Δ sdaA mit 0,25 mg/ml *N*-Methyl-*N'*-Nitro-*N*-Nitrosoguanidin (NMMG). Die Absterberate lag bei 99%. Für das Screening auf Serin-ausscheidende Mutanten wurde ein auxanographischer Test entwickelt, der in Kapitel I.A näher beschrieben ist.

2.1.2 ¹³C-Isotopomer-Analyse

Die Stämme *C. glutamicum* Wildtyp und WT Δ sdaA wurden in 50 ml Minimalmedium mit 100 mM Glukose und 90 mM L-[U-¹³C]Serin bei 30°C für 20 h inkubiert. Nach Pelletierung wurden die Zellen hydrolysiert und die Biomasse-Hydrolysate wurden mittels 2-dimensionaler {¹H, ¹³C} HSQC NMR (heteronuclear single quantum correlation nuclear magnetic resonance) mit Inversionsdetektion vermessen. Dabei lassen sich isotopomere Feinstrukturen anhand des Auftretens von Singulett-, Doublett- bzw. Doublett von Doublets-Signalen aufklären. (Die Details sind in Netzer *et al.*, 2004 veröffentlicht.)

2.1.3 DNA-Chip-Experimente

Um eine hohe intrazelluläre Serin-Konzentration zu erreichen wurde der Wildtyp in Anwesenheit von 1 mM Seryl-Tripeptid inkubiert. Nach 3 h wurde die intrazelluläre Serin-Konzentration nach der Methode der Siliconölzentrifugation und anschließender HPLC analysiert und betrug 95 mM. Ohne Tripeptid-Zugabe hat der Wildtyp nur eine maximale intrazelluläre Serin-Konzentration von 2 mM. Die Gesamt-RNA wurde sowohl aus der Kultur mit als auch ohne Tripeptid isoliert und das Expressionsmuster dieser beiden Proben durch Hybridisierung gegen einen DNA-Chip, der das gesamte Genom von *C. glutamicum* trägt, analysiert. (Die Details sind in Netzer *et al.*, 2004 veröffentlicht.)

2.1.4 Gengerichtete Mutagenese

Der Austausch des nativen *glyA*-Promotors gegen den IPTG-induzierbaren *tac*-Promotor erfolgte durch homologe Integration des in *C. glutamicum* nicht replizierba-

ren Plasmids pK18mobglyA', wie in Simic *et al.* (2002)¹³ beschrieben. Die Deletion des *sdaA*-Gens erfolgte nach dem Prinzip der Gen-Austausch-Methode und ist ebenfalls in Netzer *et al.* (2004) beschrieben.

2.1.5 Anzucht von *C. glutamicum* Stämmen für die Serin-Produktion

Um maximale Serin-Ausbeute im Schüttelkolben zu erhalten wird folgende Animpf-schiene angewendet: Von einer Brain-Heart-Infusion- (BHI)-Agarplatte mit 100 μM Isopropylthiogalactosid (IPTG), 15 $\mu\text{g/l}$ Kanamycin (Kan_{15}) und 5 $\mu\text{g/l}$ Tetracyclin (Tet_5) wird ein 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen mit 50 ml BHI-Flüssigmedium (Kan_{15} ; Tet_5) angeimpft und 8 h bei 30°C und 120 rpm inkubiert. Anschließend werden die Zellen in Saline gewaschen und in CgXII-Minimalmedium mit 4% Glukose, 10 μM IPTG, 0,1% Biotin, Kan_{15} und Tet_5 überführt und über Nacht inkubiert. Diese Kultur wird ebenfalls mit Saline gewaschen und in die Hauptkultur überführt. Diese besteht aus 70 ml CgXII-Minimalmedium mit 4% Glukose, 0,1% Biotin, Kan_{15} und Tet_5 . Die Kultur wird bezüglich optischer Dichte ($\text{OD}_{600\text{nm}}$), Glukose-Verbrauch und Serin-Bildung untersucht.

2.1.6 Weitere Methoden

Molekularbiologische Methoden (DNA Isolierung, Transformation von DNA, PCR); Analyse von Enzymaktivitäten durch geeignete Enzymstests, Nachweis von Aminosäuren mittels HPLC.

2.2 Fermentation

Für die Fermentationsversuche wurden Standard-Rührkesselfermenter der Firma Bioengineering AG verwendet deren Bruttovolumen $V_B=19\text{l}$ beträgt. Ausgehend von einem Anfangsnettovolumen von $V_N=8\text{l}$ schloss sich in allen Experimenten einer diskontinuierlichen Phase der Zufütterungsbetrieb an. Die Fermenter und die Prozessführung der Versuche entsprachen maßstabsverkleinert den für den Produktionserfolg ausschlaggebenden Bedingungen der Produktionsanlage. Die Verifizierung dieser Maßstabsübertragung war in vorhergehenden Projekten bereits zufrieden stellend erfolgt. Als die in diesem Zusammenhang wichtigsten Größen sind Temperatur T , pH-Wert, Kopfraumüberdruck p_0 , volumetrischer Stoffübergangskoeffizient für Sauerstoff $k_L a$, spezifische Begasungsrate F_G und der spezifische

Leistungseintrag P_V zu betrachten. T und pH-Wert stellen natürlich Optimierungspareparameter der Fermentation dar. Sie wurden vom Beginn der Realisierung des Stammtransfers an bis zur Auswahl eines am besten geeigneten Stamms erst einmal als Standardgröße aus den Untersuchungen zur Stammentwicklung der Arbeitsgruppe Jülich entnommen und nicht verändert.

2.3 Stoffflussanalysen

Für das Markierungsexperiment wurde *C. glutamicum* $\Delta sdaA::pglyA'(pserA^{fbrCB})$ (Ser1) in Batch-Kultur mit einem Gemisch aus vollständig ^{13}C markierter, an Position C1 markierter ^{13}C -Glucose und unmarkierter Glucose im Verhältnis von 1:3:6 angezogen. Die Kultur erfolgte entweder unter Zugabe von IPTG was zu einer Induktion der Serinhydroxymethyltransferase führt oder in Abwesenheit von IPTG. Extrazelluläre Metabolite wurden über HPLC mittels Kationenchromatographie und refraktrometrischer Detektion per UV bestimmt. Die markierte Biomasse beider Fermentationen wurde für eine multiple Komponentenanalyse der proteinogenen Aminosäuren in 6N HCl hydrolysiert und spezifische Markierungen der Aminosäuren wurden mit zweidimensionaler NMR Spektroskopie (^{13}C , ^1H -ge-HSQC Spektrum) ermittelt.

Die Modellierung der Markierungsdaten erfolgte mit dem Programm ^{13}C -Flux (Möllney et al. 1999, *Biotechnol. Bioeng.* 66, 86; und darin zitierte Artikel) und einem aus der Literatur adaptierten Model (Marx et al. 1996, *Biotechnol. Bioeng.* 49, 111; Petersen et al. 2000, *J. Biol. Chem.* 275, 35932)

Ergebnisse

Abschnitt I: Abschlussbericht des Instituts für Biotechnologie 1 (IBT1) des Forschungszentrums Jülich – Stammentwicklung

1. Einleitung

Die Serinbiosynthese erfolgt in drei Schritten ausgehend von dem Glykolyseintermediat 3-Phosphoglycerat. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die Überexpression der drei Biosynthesegene (*serA*, *serC* und *serB*) und die gleichzeitige Deregulation des Schlüsselenzymes (3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase, *serA^{fbr}*⁸) nicht ausreicht, um einen Serin produzierenden Stamm zu erhalten. Da Serin Vorstufe für eine Vielzahl weiterer Stoffwechselintermediate ist (Abb. 2) wurde gezielt auch der Abbau von Serin untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym L-Serindehydratase, das durch das Gen *sdaA* kodiert wird, in *C. glutamicum* am Abbau von Serin beteiligt ist⁹. Die Deletion des *sdaA* Gens führte jedoch bei gleichzeitiger Überexpression der Serinbiosynthesegene (*serA^{fbr}CB*) ebenfalls zu keiner signifikanten Serin-Akkumulation.

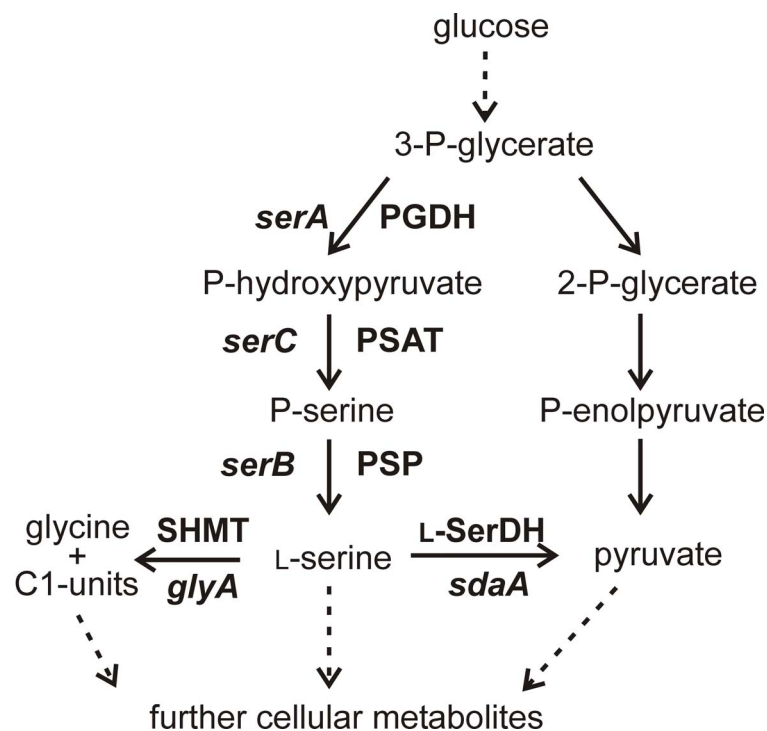


Abb. 2: Schema des Serin Stoffwechsels in *Corynebacterium glutamicum*. PGDH, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase; PSAT, Phosphoserin Aminotransferase; PSP, Phosphoserin Phosphatase; L-SerDH, L-Serindehydratase; SHMT, Serinhydroxymethyltransferase.

2. Klassischer Ansatz zur Gewinnung von Serin-Produktionsstämmen

Um ein besseres Verständnis über die notwendigen Voraussetzungen zur guten Serin-Produktion zu erhalten und um die Serin-Ausbeute weiter zu steigern, sollte der Ansatz des „Metabolic Engineering“ durch ungerichtete Mutagenese und geeignete Screeningverfahren ergänzt werden. Dabei wurde der Stamm *C. glutamicum* WT Δ sdaA, der über die Deletion des *sdaA*-Gens verfügt, als Ausgangsstamm verwendet. Die Vorgehensweise ist in Abbildung 3 dargestellt.

Zunächst sollte auf einen Stamm selektioniert werden, der einen sehr hohen Serin-Bedarf hat (Abb. 3; I und II). Dies ist z.B. durch eine Mutation in der Seryl-tRNA-Synthetase denkbar, welche durch die Mutation eine stark verringerte Affinität gegenüber Serin hat¹⁰. Von einer solchen Mutante sollten anschließend Suppressormutanten isoliert werden, die auch ohne externe Zugabe hoher L-Serin-Konzentrationen wieder wachsen können und gleichzeitig Serin in hohen Mengen in das Medium akkumulieren (Abb. 3; III und IV).

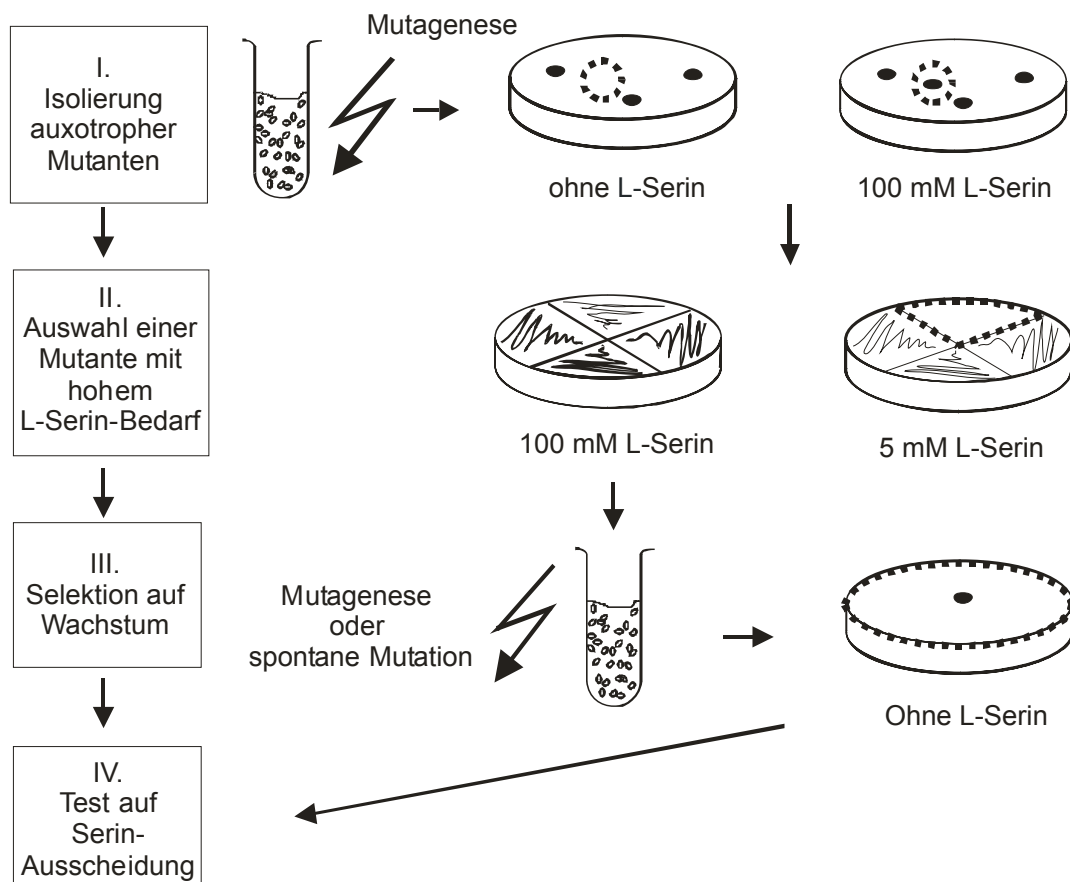


Abb. 3: Mutagenese und Screening auf *C. glutamicum*-Stämme mit erhöhter L-Serin-Bildung.

2.1 Screening nach auxotrophen Mutanten mit hoher Serinbedürftigkeit (I und II)

Als Ausgang für das Screening wurde der Stamm *C. glutamicum* WT Δ sdaA verwendet, da dieser schon über eine definierte Mutation im Serin-Abbau verfügt. Der Stamm wurde mit MNNG mutagenisiert, und anschließend auf Wachstum in Anwesenheit von 100 mM Serin selektioniert. Gesucht wurden solche Mutanten, die nur mit dieser hohen Serin-Konzentration wachsen konnten. Als Kontrolle wurde der Serin auxotrophe Stamm *C. glutamicum* WT Δ serA verwendet, der eine Deletion des Biosynthesegens *serA* trägt. Dieser Stamm wächst nicht ohne Serin, kann aber durch Zugabe von 5 mM Serin supplementiert werden. Zunächst wurde der MNNG-mutagenisierte Stamm WT Δ sdaA auf Komplexmedium mit 100 mM Serin ausplattiert. Die Kolonien, die auf diesen Platten gewachsen waren wurden auf glukose-haltiges Minimalmedium ohne Serin bzw. mit 100 mM Serin gestempelt. Solche Kolonien, die ohne Serin nicht, mit Serin aber gut wachsen konnten wurden wiederum auf Minimalmedium ohne bzw. mit 100 mM und zusätzlich mit 5 mM Serin übertragen.

Von den ca. 61.000 so getesteten Klonen wuchsen ca. 22.000 generell nicht auf Minimalmedium und waren somit auxotroph für einen anderen Metaboliten als Serin. Unter den verbleibenden 39.000 Klonen befanden sich 145 Serin auxotrophe Mutanten. Von diesen wurden 142 Mutanten durch Zugabe von 5 mM Serin wieder komplementiert, und waren somit für das weitere Vorgehen nicht interessant, da es sich vermutlich um Mutanten des Serinbiosyntheseweges handelte. Drei Mutanten (MS1, MS2 und MS3) konnten jedoch erst durch die Zugabe von 100 mM Serin auf Minimalmedium-Platte wieder wachsen, wie. Abbildung 4 exemplarisch für die Mutante MS1 zeigt. Zur Kontrolle wurde der Ausgangsstamm WT Δ sdaA und der Serin auxotrophe Stamm WT Δ serA ausgestrichen.

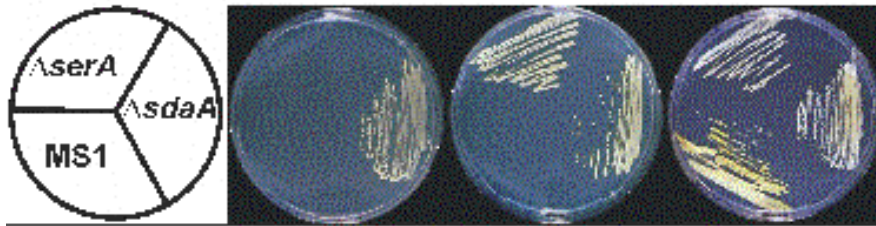


Abb. 4: Ausstriche von *C. glutamicum* WT Δ sdaA, WT Δ serA und der Serin auxotrophen Mutante MS1. (A) Minimalmedium ohne Serin; (B) Minimalmedium mit 5 mM Serin; (C) Minimalmedium mit 100 mM Serin.

Während der Ausgangsstamm WT Δ sdaA auf allen drei Medien gleich gut wuchs, konnte der Stamm WT Δ serA nur in Anwesenheit von Serin wachsen. Die Zugabe von 5 mM Serin reichte hierbei aus, um den Defekt in der Serinbiosynthese vollständig zu komplementieren. Die Mutante MS1, konnte jedoch erst in Anwesenheit von 100 mM Serin wachsen, was sie deutlich von einer „normalen“ Serin auxotrophen Mutante unterschied. In diesem ersten Screening wurden also drei unabhängige Mutanten erhalten, die den gesuchten Phänotyp einer stark erhöhten Serinbedürftigkeit zeigten.

2.2 Screening nach Suppressormutanten die wieder in der Lage sind ohne Serin zu wachsen (II und III)

Im Folgenden wurden nun die Mutanten MS1, MS2 und MS3 entweder erneut mutagenisiert, oder auf spontane Mutationen selektioniert, um Suppressormutanten zu erhalten, die wieder in der Lage waren, ohne Serin zu wachsen. Da es das Ziel war, in diesem Schritt sofort auf Serin-Ausscheidung zu selektionieren wurde zunächst ein geeigneter auxanographischer Plattentest etabliert. Hierzu wurde der schon vorher verwendete Serin auxotrophe Stamm WT Δ serA in glukose-haltiges Minimalmedium eingesät. Auf diese Platten wurden vorhandene Serinproduktionsstämme, die in einem parallelen Ansatz, auf den im folgenden Kapitel näher eingegangen wird, gezielt konstruiert wurden, und die im Schüttelkolben 5 (Ser2-1) bzw. 100 mM Serin (Ser1) produzieren, im Vergleich zum Stamm WT Δ sdaA ausgestrichen. Es zeigte sich, dass sich sowohl um den Stamm der 100 mM Serin ausscheidet (Abb. 5, C), als auch um

den Stamm, der nur 5 mM Serin ausscheidet (Abb. 5, B) ein deutlicher Wachstumshof bildete, während das bei dem Stamm $WT\Delta sdaA$ nicht der Fall war.

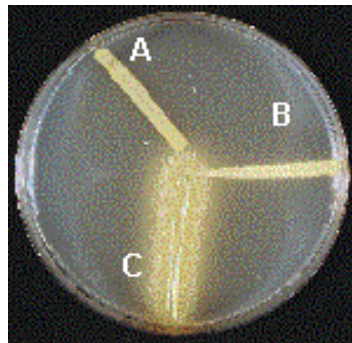


Abb. 5: Auxanographischer Plattentest zum Nachweis von Serin ausscheidenden *C. glutamicum* Stämmen. (A) *C. glutamicum* $\Delta sdaA$, (B) *C. glutamicum* Ser2-1, (C) *C. glutamicum* Ser1.

Anhand der Größe des Wachstumshofs konnte auch eine Differenzierung in Bezug auf die ausgeschiedene Serinmenge getroffen werden. Folglich konnte dieser Test zur schnellen Überprüfung von Mutanten nach Serinausscheidern mit großem Durchsatz angewandt werden, und gleichzeitig eine Unterscheidung zwischen schwachen und starken Produzenten getroffen werden.

Um nun auf Suppressormutanten der Stämme MS1, MS2 und MS3 zu selektionieren, wurden diese in Suspensionen mit ca. $2,5 \cdot 10^9$ Zellen pro Platte zunächst auf Minimalmedium ohne Serin ausplattiert. Zusätzlich wurde MS1 nochmal mit Hilfe von MNNG mutagenisiert und ebenfalls auf Minimalmedium ohne Serin ausplattiert. Die Kolonien die wieder in der Lage waren ohne Serin zu wachsen wurden anschließend auf die auxanographischen Platten aufgebracht, um solche zu isolieren, die zusätzlich auch Serin ausscheiden. Das Ergebnis dieses Screenings ist in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1: Ergebnis der Suche nach klassisch gewonnenen Serin-Produzenten.

Ausgangsmutante	Anzahl getesteter Klone	erhaltene Suppressormutanten	erhaltene Serinproduzenten
MS1 (MNNG)	$2,6 \cdot 10^{11}$	1655	0
MS1	$2,1 \cdot 10^{11}$	1146	0
MS2	$5,5 \cdot 10^{11}$	1676	0
MS3	$4,9 \cdot 10^{11}$	779	0
insgesamt	$1,5 \cdot 10^{12}$	5276	0

Insgesamt wurden über 5000 Suppressormutanten erhalten, die alle wieder in der Lage waren ohne Serin zu wachsen. Leider war unter diesen kein Serin-Ausscheider zu finden, was darauf hin deutet, dass es sich in allen Fällen um Revertanten handelte. Die Tatsache, dass trotz breit angelegtem *Screening* in diesem Ansatz des *Inverse Metabolic Engineering* kein Serin-Ausscheider isoliert werden konnte, könnte daran liegen, dass Serin ein so zentraler Metabolit in der Zelle ist, dass es durch eine einzige Mutation nicht möglich ist, die Zelle zur Serinausscheidung zu bringen. Die positiven Beispiele dieses Ansatzes ¹¹ wurden mit *E. coli* für die Aminosäuren Valin und Isoleucin erzielt, die nicht weiterverstoffwechselt werden, sondern ausschließlich in Protein eingebaut werden.

Dennoch liegen drei Mutanten vor (MS1-3), die einen interessanten, Serinspezifischen Phänotyp aufweisen. Diese Mutanten werden in Zukunft z.B. durch DNA-Chip-Analysen näher charakterisiert.

3. Gezielter Ansatz zur Gewinnung von Serin-Produktionsstämmen

3.1 Herstellung von Serin-Produktionsstämmen der ersten Generation

3.1.1 ¹³C-Isotopomerenanalyse der Mutante WT Δ *sdaA* im Vergleich zum Wildtyp

Parallel zu der Suche nach ungerichtet hergestellten Serin-Produzenten von *C. glutamicum* wurden auch die schon früher begonnenen Arbeiten zur gezielten Konstruktion eines Produktionsstammes fortgeführt. Da gezeigt werden konnte, dass in einem Stamm, der über eine Deletion des Gens *sdaA* verfügt, zwar vermindert, aber nach wie vor Abbau von extern zugegebenem Serin stattfindet ⁹, und darüber hinaus die gleichzeitige Überexpression der Serinbiosynthesegene nur einen geringen Effekt auf die Serin Produktion hat, wurde untersucht wie Serin im Stamm WT Δ *sdaA* abgebaut wird. Hierzu wurde der Stamm im Vergleich zum *C. glutamicum* Wildtyp mit Hilfe der ¹³C Isotopomer-Analyse nach Wachstum auf Minimalmedium mit Glukose und L-[U-¹³C]Serin untersucht. Es zeigte sich, dass der Abbau von ¹³C-markiertem Serin im Wildtyp einerseits über Pyruvat und andererseits über Glycin erfolgte. Der Anteil der Markierung im Alanin, das sich direkt von Pyruvat ableitet, war nach der Markierung im Serin am höchsten. Dieses Signal nimmt dann einerseits in Richtung Gluconeogenese (PEP, Glycerinaldehyd-3-P und Pentose-5-Phosphat)

und andererseits in Richtung Aspartat ab. Dies entspricht den Abbauwegen von Pyruvat im Zentralstoffwechsel von *C. glutamicum*. Die starke Markierung im Glycin deutet auf eine sehr aktive Serinhydroxymethyltransferase hin. Erstaunlicherweise war das Markierungsmuster das mit der $\Delta sdaA$ -Mutante erhalten wurde sehr ähnlich zu dem des Wildtyps, d.h. auch dieser Stamm setzte Serin immer noch zu Pyruvat um. Der Verlust der Serindehydratase in der Mutante führt jedoch dazu, dass der Umsatz von Serin zu Pyruvat zu 25% reduziert ist gegenüber dem Wildtyp. Das bedeutet, dass es in der Mutante noch wenigstens eine weitere Serin zu Pyruvat-umsetzende Reaktion geben muss. Diese Daten wurden in Netzer *et al.*, 2004 veröffentlicht.

3.1.2 DNA-Chip Experiment zur Aufklärung alternativer Serin-abbauender Reaktionen.

Um der Frage nachzugehen, welche Reaktion in *C. glutamicum* neben der L-Serindehydratase für den Abbau von Serin zu Pyruvat verantwortlich sein kann, wurde eine DNA-Chip Analyse zum Nachweis veränderter mRNA-Level im Wildtyp in Anwesenheit hoher interner Serin-Konzentration im Vergleich zu normaler, niedriger Serin-Konzentration durchgeführt⁹. Erstaunlicherweise zeigten keine der bekannten am Serin-Stoffwechsel beteiligten Gene eine Veränderung im Expressionslevel. Jedoch wurde bei hoher interner Serin-Konzentration das Gen *metC*, das für eine Cystathionin- β -Lyase kodiert 2,4-fach stärker exprimiert, als unter normalen Bedingungen. Dieses Enzym ist am Methioninstoffwechsel beteiligt, setzt aber neben Cystathionin auch Cystein zu Pyruvat und Ammonium um¹². Wir konnten für einen Stamm, der das *metC*-Gen überexprimiert zeigen, dass das Enzym tatsächlich auch Serin als Substrat verwendet, und mit einer Aktivität von 40 mU/mg zu Pyruvat deaminiert. Des Weiteren führte die Deletion von *metC* im $\Delta sdaA$ -Stammhintergrund zu einer Verminderung des Abbaus von extern zugegebenem Serin. Damit war ein weiteres Zielgen für das „Metabolic Engineering“ identifiziert.

3.1.3 Einfluss der Verminderung der *glyA*-Expression auf die Serin-Produktion.

Da das ¹³C-Markierungsexperiment gezeigt hat, dass der Anteil der Verstoffwechslung des Serins zu Glycin groß ist, wurde der Einfluss der Serinhydroxymethyltransferase (SHMT), die diese Reaktion katalysiert, auf die Serin Produktion näher untersucht. Da die SHMT ein essentielles Enzym des C1-

Stoffwechsels ist, und es in vielzähligen Versuchen unter Supplementation mit einer Reihe von Intermediaten, die sich aus dem C1-Stoffwechsel ableiten, nicht möglich war, das Gen zu inaktivieren oder zu deletieren, wurde das Plasmid pK18mobglyA' verwendet, dass in den Promotorbereich des chromosomalen *glyA*-Gens, das für SHMT kodiert, integrieren kann. Mit diesem Konstrukt ist es möglich, die Expression des *glyA*-Gens IPTG-abhängig zu regulieren. Hierzu wird chromosomal der native *glyA*-Promotor durch den induzierbaren *tac*-Promotor ausgetauscht¹³. In Anwesenheit von IPTG wird das *glyA* Gen ausreichend exprimiert um gutes Wachstum zu ermöglichen. Unter IPTG-Mangel wird die Expression und somit die Aktivität der SHMT reduziert, was zu einem gehemmten Wachstum führt. Dieses Konstrukt wurde sowohl in den Wildtyp als auch in den Stamm $\Delta sdaA$ eingeführt, sodass die Stämme WT::*pglyA*' und WT $\Delta sdaA$::*pglyA*' entstanden. Zusätzlich wurden die Serinbiosynthese-segene plasmid-kodiert in beiden Stämmen überexprimiert. Die resultierenden Stämme WT::*pglyA*'(*pserA^{fbr}CB*) und WT $\Delta sdaA$::*pglyA*'(*pserA^{fbr}CB*) wurden im 70 ml Labormaßstab in CgXII-Minimalmedium mit 4% Glukose ohne IPTG im Schüttelkolben im Vergleich zum Stamm WT $\Delta sdaA$ (*pserA^{fbr}CB*) kultiviert und die Serin-Bildung über einen Zeitraum von 75 h analysiert.

Der Stamm WT $\Delta sdaA$::*pglyA*'(*pserA^{fbr}CB*) (Abb. 6, C), der im Folgenden Ser1 genannt wird, produzierte tatsächlich bis zu 10 g/l Serin, während der Stamm WT::*pglyA*'(*pserA^{fbr}CB*) (Abb. 6, B) zwar auch immerhin fast 2 g/l Serin produzierte, dieses aber im Verlauf der Kultivierung wieder abbaute. Der Kontrollstamm WT $\Delta sdaA$ (*pserA^{fbr}CB*) (Abb. 6, A) produzierte hingegen Serin nur in nicht signifikanten Konzentrationen von max. 0,03 g/l. Die spezifische Produktivität des Ser1-Stammes war mit $1,3 \text{ mmol}(\text{g}^*\text{h})^{-1}$ außerordentlich gut.

Damit lag nun erstmals ein Stamm vor, der im Schüttelkolben ausgehend von Glucose einen hohen Serin-Titer von 10 g/l bei gleichzeitig sehr guter Produktivität erreichte. Der Stamm (Ser1) wurde daher an die Amino GmbH zur Charakterisierung unter industriell relevanten Bedingungen, sowie zur Optimierung der Aufarbeitung weitergeleitet. Die Arbeiten hierzu werden im Kapitel II beschrieben. Darüber hinaus wurde der Stamm bei der Firma Metabolic Explorer einer detaillierten Stoffflussanalyse unter Produktions- und Nicht-Produktionsbedingungen unterzogen, wie in Kapitel III dargestellt.

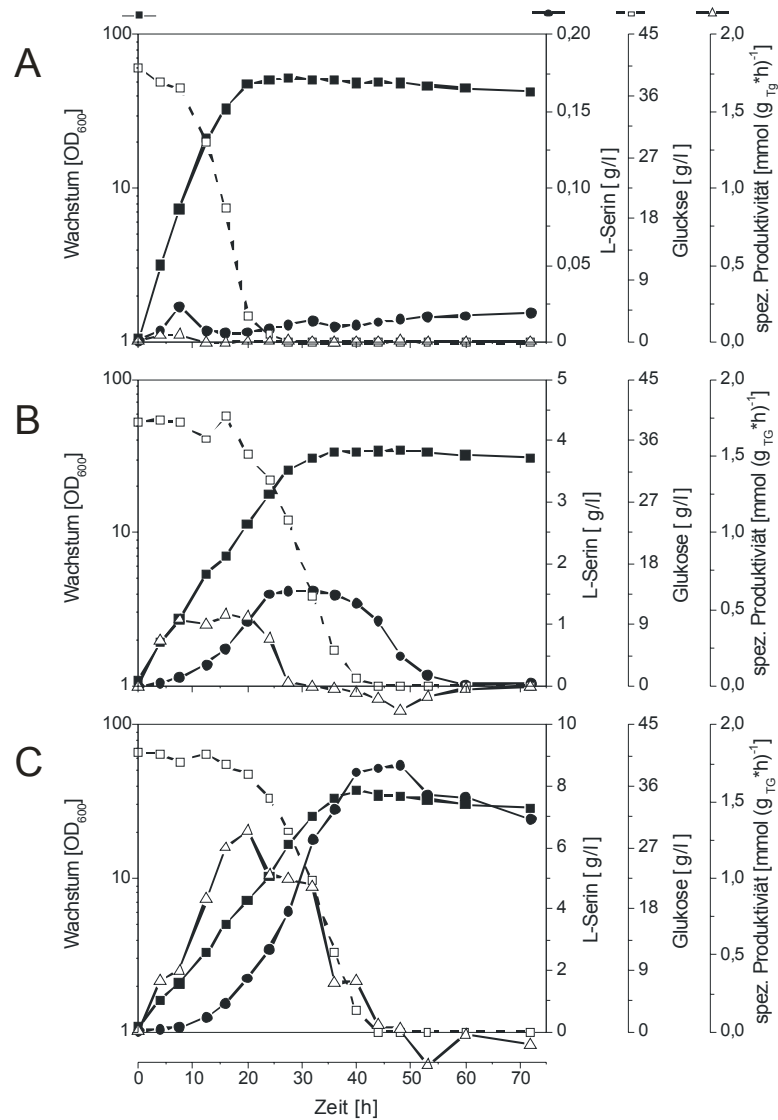


Abb. 6: Wachstum (!), Serin-Produktion (.), Glukoseverbrauch (□) und spezifische Produktivität (8) der Stämme WTΔsdaA(pserA^{fbr} CB) (A), WTΔsdaA::pglyA'(pserA^{fbr} CB) (B) und WTΔsdaA::pglyA'(pserA^{fbr} CB) (Ser1, C) auf Minimalmedium mit 4 % Glukose als Kohlenstoffquelle.

Deletion des metC Gens keine weitere Verbesserung der Serin Produktion erreicht.

3.2 Herstellung eines stabilen Serin-Produktionsstammes der zweiten Generation.

Mit beiden Serin-Produktionsstämmen, Ser1 und Ser2 konnten ausgezeichnete, und für die industrielle Fermentation hervorragend geeignete Produktivitäten von bis zu 1,5 mmol(g*h)⁻¹ erzielt werden, jedoch eigneten sich die Stämme dennoch nicht für den grosstechnischen Einsatz. Unter Verwendung des glyA-Konstruktes konnte gezeigt werden, dass die Verminderung oder sogar Verhinderung der Reaktion von

Die von den als *pabAB* und *pabC* bezeichneten Genen abgeleiteten Proteinsequenzen zeigen Ähnlichkeiten zu p-Aminobenzoat Synthasen aus verschiedenen Organismen. Diese Enzyme sind an der Biosynthese von Folsäure beteiligt, einer Vorstufe von Tetrahydrofolat. Tetrahydrofolat wiederum ist das Coenzym der SHMT und verantwortlich für die C1-Gruppenübertragung (Abb. 8).

Wir konnten zeigen, dass vor dem *glyA* Gen ein sehr starker Promotor lokalisiert ist, der in „Promoter Probe“ Studien eine spezifische Aktivität von 2 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ für das Reporterenzym vermittelt. Dagegen befindet sich vor dem Gen *pabAB* ein sehr schwacher Promotor, der lediglich eine spezifische Aktivität von 0,015 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ vermittelt. Northern Blot Analysen bestätigten, dass das *glyA* Gen ein stark exprimiertes Gen ist, während *pabABC* Transkripte bisher nicht nachgewiesen werden konnten. Um zu zeigen, dass *pabAB* und *pabC* tatsächlich funktionell an der Folsäure Synthese beteiligt sind, wurden die Gene einzeln und in Kombination im *C. glutamicum* Stamm $\text{WT}\Delta\text{sdaA}$ deletiert. Die so erhaltenen Mutanten zeigten nach mehrmaligem Überstreichen auf Minimalmedium-Agarplatten ohne Folsäure kein Wachstum mehr (Abb. 9). Durch Zugabe von Folsäure, sowie der Vorstufe p-Aminobenzoat ließ sich das Wachstum wieder herstellen. Damit war gezeigt, dass die Gene *pabAB* und *pabC* für funktionell an der Folsäure Synthese beteiligte Proteine kodieren, und vermutlich direkt für die Bildung von p-Aminobenzoat verantwortlich sind.










	ΔpabAB	ΔpabABC	ΔpabC
w/o addition			
+ 4-amino-benzoate			
+ folate			

Abb. 9: Wachstum der Stämme $\text{WT}\Delta\text{sdaA}\Delta\text{pabAB}$, $\text{WT}\Delta\text{sdaA}\Delta\text{pabABC}$ und $\text{WT}\Delta\text{sdaA}\Delta\text{pabC}$ auf Minimalmedium-Agarplatten unter Zugabe von Folsäure oder p-Aminobenzoat bzw. ohne Supplementation.

3.2.2 Einfluss der *pabABC* Deletion auf die Serin Produktion.

Da gezeigt werden konnte, dass eine Deletion von *pabAB* und *pabC* tatsächlich zu einer p-Aminobenzoat-Auxotrophie und somit indirekt zu einer Folsäure-Auxotrophie und damit zu einem Mangel an Tetrahydrofolat führt, wurde im Folgenden untersucht, ob auf diese Weise indirekt auf die Aktivität der SHMT Einfluss genommen werden kann. Ein Mangel an Tetrahydrofolat könnte dazu führen, dass die SHMT nicht ausreichend aktiv ist, um Serin zu Glycin abzubauen. Aus diesem Grund wurde der Stamm $WT\Delta sdaA\Delta pabABC$ mit dem Plasmid $pserA^{fbr}CB$ transformiert, das die Serinbiosynthese-Gene exprimiert, und in Flüssigkultur auf seine Folsäure-Abhängigkeit, sowie seine Fähigkeit Serin zu produzieren untersucht. Hierzu wurde der Stamm nach einer Passage in Vollmedium und einer Passage in Minimalmedium ohne Folsäurezugabe in Minimalmedium mit 0, 0,01, 0,1, 0,25 und 1 mM Folsäure überführt. Als Kontrolle wurde der Stamm $WT\Delta sdaA$ ohne Folsäure Zugabe kultiviert. Abbildung 10 zeigt das Wachstum (offene Symbole) und die Serin Bildung (geschlossene Symbole).

Unter den gewählten Bedingungen wuchs der Stamm $WT\Delta sdaA\Delta pabABC(pserA^{fbr}CB)$ auch ohne Folsäure, allerdings mit einer deutlich verringerten Wachstumsrate und zu einer geringeren End-OD als unter Folsäure-Überschuss. Interessanterweise bildete der Stamm unter diesen Bedingungen schon bis zu 10 g/l Serin. Ein ähnliches Ergebnis konnte auch bei Zugabe von 0,01 mM Folsäure erhalten werden. Die Zugabe von 0,1 mM Folsäure verbesserte das Wachstum deutlich, und der maximale Serin von wiederum 10 g/l wurde hier wesentlich früher erreicht. Eine weitere Steigerung der Folsäure Konzentration auf 0,25 mM führte dann zu einer Reduktion des max. Serin-Titers auf 6 g/l bei gleichzeitig verbessertem Wachstum. Unter Zugabe von 1 mM Folsäure wuchs der Stamm wie der Kontrollstamm, und akkumulierte ebenso wie dieser kein Serin. Dieses Ergebnis zeigt einerseits, dass sich tatsächlich durch eine Reduktion der Verfügbarkeit von Folsäure die Serin Produktion steigern lässt, und zwar bis auf Werte, die ein entsprechender Stamm mit erniedrigter Expression des *glyA*-Gens erzielt. Andererseits werden die besten Ergebnisse nicht erzielt, wenn der Stamm deutlich Folsäure limitiert wächst, sondern nach Zugabe von ca. 0,1 mM Folsäure. In der Regel reichen zur vollständigen Supplementation eines Vitamin-Mangels 100-fach geringere Konzentrationen. Der Bedarf an Folsäure in der Zelle scheint also sehr hoch zu sein. Da die Folsäure als Vitamin in Vollmedium enthalten ist, galt nun die Frage zu klären, ob auch unter industrienahen Bedingungen, also in einem Medium, das Corn Steep

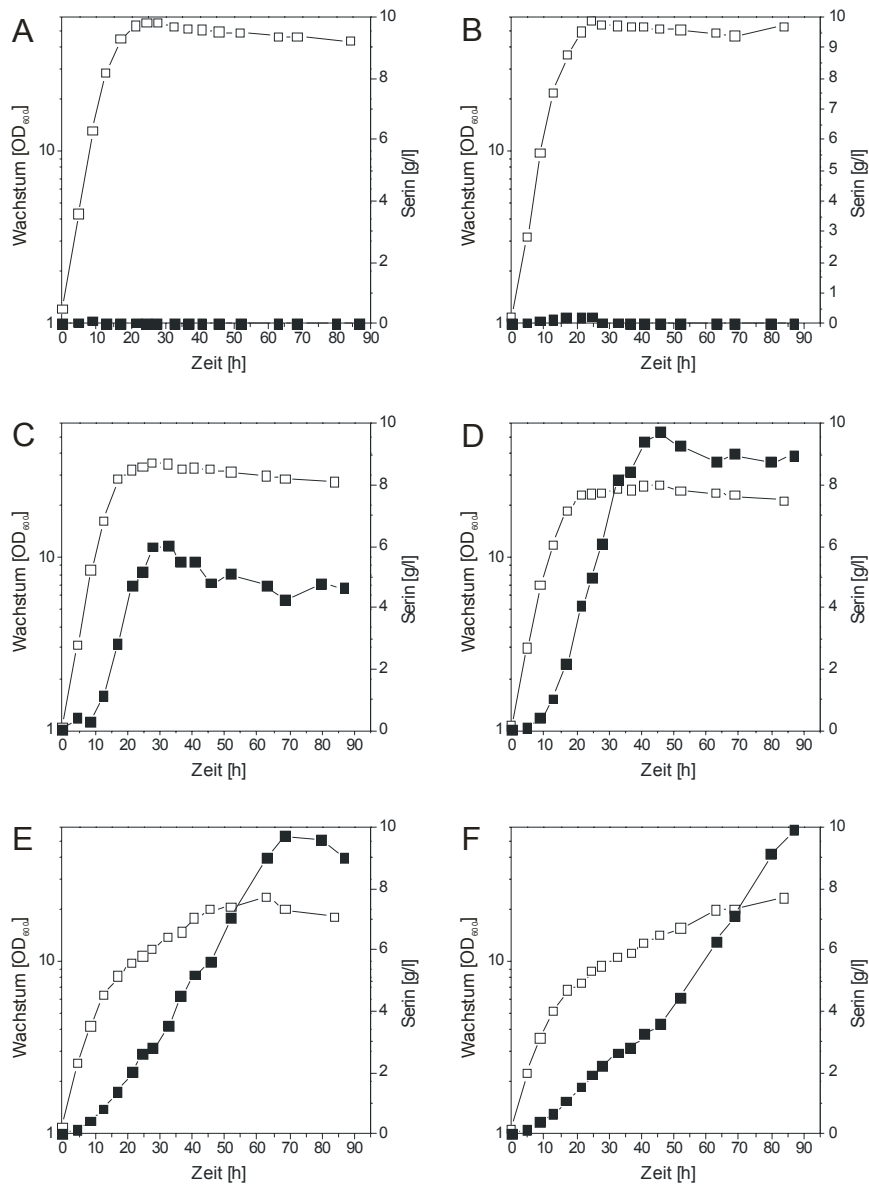


Abb. 10: Wachstum (offene Symbole) und Serin-Produktion (geschlossene Symbole) des Stammes WT Δ sdaA(pserA^{fbr}CB) in Minimalmedium ohne Folsäure (A) im Vergleich zum Stamm WT Δ sdaA Δ pabABC(pserA^{fbr}CB) in Minimalmedium mit 1 mM (B), 0,25 mM (C), 0,1 mM (D), 0,01 mM (E) und ohne Folsäure (F).

Liquor (CSL; Mais-Quellwasser) als Komponente enthält ebenfalls Serin bildet. Hierzu wurde der Stamm in CSL-Medium, wie es bei der Amino standardmäßig verwendet wird angezogen, und die Serin Bildung untersucht. Das Ergebnis war, dass auch unter diesen Bedingungen im Schüttelkolben bis zu 3,7 g/l Serin akkumuliert wird. Damit eignete sich dieser Stamm für weitere Untersuchungen unter industrierelevanten Bedingungen im Fermenter (siehe Abschnitt II).

4. Diskussion

In diesem Projekt wird das Ziel verfolgt, ein Verfahren zu etablieren, mit dem es zeitnah möglich ist, die Aminosäure Serin ausgehend von dem nachwachsenden Rohstoff Glukose industriell zu produzieren. Wichtigste Voraussetzung hierzu ist das Vorhandensein geeigneter Produktionsstämme. Es wurden zwei Ansätze zur Herstellung solcher Stämme verfolgt. Einerseits wurde versucht durch klassische Mutagenese und intelligentes *Screening* einen Serinproduzenten zu erhalten. Das trotz breit angelegtem *Screening* in diesem Ansatz kein Serinausscheider isoliert werden konnte, liegt vermutlich daran, dass Serin ein so zentraler Metabolit ist, dass es durch eine einzige Mutation nicht möglich ist, die Zelle zur Serinausscheidung zu bringen. Die positiven Beispiele dieses Ansatzes (Livshits *et al.* (1996) US Patent 5,658,766) wurden mit *E. coli* für die Aminosäuren Valin und Isoleucin erzielt, die nicht weiterverstoffwechselt werden, sondern ausschließlich in Protein eingebaut werden.

Der zweite Ansatz wurde gezielt verfolgt und basierte auf der Kombination von schon bekanntem Wissen zum Serinstoffwechsel und neuen Erkenntnissen basierend auf dem Einsatz analytischer Methoden z.B. der ¹³C-Isotopomer-Analyse sowie *functional genomics*. Auf diese Weise konnte tatsächlich ein Bakterienstamm hergestellt werden, der in seiner Produktivität und Ausbeute die erwarteten Vorgaben zur wirtschaftlichen Produktion von Serin bei weitem übertrifft. In industrienahen Fermentationen wurde gezeigt, dass der Stamm bis zu 40 g/l Serin akkumulierte, bei einer maximalen spezifischen Produktivität von 1,4 g/lh und einer Ausbeute $Y_{p/s}$ von 0,14. Dieser Stamm ist darüber hinaus genetisch stabil und eignet sich für den Einsatz in der Produktion.

5. Literatur

8. Peters-Wendisch *et al.* (2002) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60:437-41.
9. Netzer *et al.* (2004) *Appl. Environ. Microbiol.* 70:7148-7155.
10. Iaccarino *et al.* (1971) *J. Bacteriol.* 105: 527-37.
11. Livshits *et al.* (1996) United States Patent 5,658,766.
12. Rossol & Pühler (1992) *J. Bacteriol.* 174:2968-2977.
13. Simic *et al.* (2002) *Appl Environ Microbiol.* 68:3321-3327.

Abschnitt II: Abschlussbericht der Amino GmbH – Fermentation und Downstream-Processing

1. Fermentation

1.1 Einfluss von Biotin auf die Serin-Bildung in CSL-Medium

C. glutamicum ist ein biotin-auxotropher Organismus der zum optimalen Wachstum Biotin benötigt. Da das Biotin daher bei der Fermentation einen Kostenfaktor von ca. 7% ausmacht, wurde zunächst der Einfluss von Biotin auf die Serin-Bildung des Stammes *C. glutamicum* WT Δ sdaA::p*glyA'*(p*serA*^{fbr}CB (kurz: Ser1) in dem produktionsrelevanten CSL-Medium getestet, das neben einer Glukose/Fruktose-Mischung auch Maisquell-Wasser (CSL) enthält das vermutlich als Lieferant für Biotin dienen kann. Es wurden zwei unterschiedliche Arbeitszellbänke (WCB) von Ser1 getestet, die sich durch Kultivierung mit (WCB-A) bzw. ohne IPTG (WCB-B) unterscheiden, um gleichzeitig den Einfluss von IPTG auf die Stabilität des genom-integrierten Plasmids pK18mob*glyA'* in der industrierelevanten Stammhaltung zu testen. Die Experimente wurden im Schüttelkolben in CSL-Medium mit 0.1% bzw. ohne Biotin durchgeführt und es wurde das Wachstum, die Glukose-Abnahme und die Serin-Bildung analysiert (Tab. 2).

Tabelle 2: Vergleich der Wachstumsraten sowie Serin-Ausbeuten durch *C. glutamicum* Ser1 in Abhängigkeit der Biotin-Zugabe und unter Verwendung von WCB-A (A., Zusatz von 100 μ M IPTG) und WCB-B (B., ohne Zusatz von IPTG).

	Ser1-WCB-A		Ser1-WCB-B.	
0,1% Biotin	+	-	+	-
μ [h^{-1}]	0.28	0.23	0.35	0.37
Serin [g/l]	5.20	4.70	0.80	0.30
Serin/OD560	0.14	0.13	0.01	0.005
Serin/Glucose	0.25	0.22	0.03	0.011

Es zeigte sich, dass das Fehlen von Biotin keinen negativen Einfluss auf die Serin-Bildung hatte. Darüber hinaus zeigte sich aber, dass die Anwesenheit von IPTG in der Stammhaltung notwendig ist, da die Kultivierung mit Ser1-WCB-B nur maximale Serin-Titer von 0,8 g/l ergaben, während Ser1-WCB-A bis zu 5 g/l Serin produzierte. Die maximalen Wachstumsraten lagen für Ser1-WCB-B deutlich höher, als in dem

Experiment in dem die WCB-A verwendet wurde. Aus den Arbeiten aus Jülich ist bekannt, dass die Verminderung der *glyA*-Expression, als Voraussetzung für gute Serin-Produktion, zu einem limitierten Wachstum führt, wie es für Ser1-WCB-A, nicht aber Ser1-WCB-B zutrifft. Das bestärkt die Vermutung, dass es durch das Weglassen des IPTG bei der Anlage von WCB-B zu einer Instabilität des *glyA*-Konstruktes kam, sodass wieder das native *glyA* exprimiert wurde, was Serin-Abbau zur Folge hat.

Es konnte also gezeigt werden, dass die Erstellung der WCB mit bzw. ohne IPTG einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität des *glyA*-Konstruktes pK18mob*glyA'* und damit die Serin-Bildung hat. Außerdem konnte gezeigt werden, dass zukünftige Fermentationen ohne Biotinzusatz erfolgen können, was somit zu einer Kosteneinsparung führt.

1.2 Untersuchung der Stabilität *glyA'*-Konstruktes im Fermentationsprozess

Wie aus dem oben dargestellten Experimenten hervorgeht, kann es zu einer Instabilität des chromosomal integrierten Plasmids pK18mob*glyA'* kommen. Um die Instabilität von pK18mob*glyA'* im Chromosom von *C. glutamicum* Ser1, die z.B. auf einer Reversion der Rekombination beruhen kann, näher zu untersuchen wurden Proben zum Ende von Fermentationen mittels PCR untersucht. Durch die Wahl geeigneter PCR-Primer, die vom IBT1 zur Verfügung gestellt wurden, lässt sich sowohl die Integration des Plasmids pK18mob*glyA'* in den nativen *glyA*-Promotor-Bereich, als auch die Wildtyp-Situation nachweisen.

Die Fermentationen wurden im 10 l Maßstab durchgeführt und zeichneten sich dadurch aus, dass Serin-Titer zwischen 3 und 40 g/l erreicht wurden. Exemplarisch werden zwei dieser Fermentationen in Kapitel III.C näher beschrieben.

Es zeigte sich, dass nach PCR mit Fermentationsproben mit einer geringen Serin-Ausbeute in der Regel immer nur die Wildtyp-Situation erhalten wurde. Bei den Fermentationsproben mit einer guten Serin-Ausbeute war das Ergebnis heterogen. Zwar konnte immer das intakte *glyA'*-Konstrukt nachgewiesen werden, es gab aber auch Beispiele, wo gleichzeitig auch die Wildtyp-Situation detektiert werden konnte. Bei diesen Proben handelt es sich offensichtlich um eine Mischpopulation aus *C. glutamicum* mit dem nativen *glyA*-Promotor und dem *glyA'*-Konstrukt. Diese Fermentationen zeichneten sich gegenüber solchen, wo nur das *glyA'*-Konstrukt nachgewiesen werden konnte, durch eine intermediäre Serin-Produktion aus.

Die Reversion der Rekombination von pK18*mobglyA'* ist ein zufälliges Ereignis. Wenn dieses Ereignis zu einem frühen Zeitpunkt der Fermentation stattfindet, haben die Zellen mit einem konstitutiv exprimierten *glyA* Gen einen Wachstumsvorteil und setzen außerdem das gebildete Serin wieder um, was auch die geringeren Ausbeuten erklärt. Wenn dieses Ereignis erst zu einem späteren Zeitpunkt der Fermentation oder gar nicht auftritt, wird eine höhere Serin-Ausbeute erzielt.

Durch diese Experimente konnte die Instabilität des *glyA'*-Konstruktes eindeutig gezeigt werden, aber es konnte auch eindrucksvoll belegt werden, dass es möglich ist mit Ser1 hohe Serin-Ausbeuten zu erzielen. Eine genetische Stabilisierung durch z.B. eine Deletion von *glyA* würde einen effektiven Serin-Produzenten liefern, der in Zukunft auch im großtechnischen Maßstab eingesetzt werden kann.

1.3 Fermentationsversuche mit dem serinproduzierenden Spezialstamm *Corynebacterium glutamicum* Ser1 im Industriemedium

In der Fermentationsgruppe der Amino GmbH am Standort Braunschweig wurden Fermentationsversuche mit dem Stamm Ser1 durchgeführt. Die Ziele dieser Arbeiten waren:

- Realisierung des Stammtransfers von der Arbeitsgruppe Jülich (Stammentwicklung) in die Fermentationsgruppe in Braunschweig
- Maßstabsübertragung der Ergebnisse aus den Schüttelkolbenversuchen (Jülich) in den Fermenter
- Reproduktion der Ergebnisse
- Erarbeiten von Ansätzen zur weiteren Stammverbesserung in Zusammenarbeit mit Jülich und von Optimierungsparametern der Fermentation

Zunächst wurde eine Reihe von Zufütterungsfermentationen mit Ser1 im Industriemedium ohne IPTG durchgeführt. In zwei von siebzehn Fermentationsexperimenten wurden Leistungsdaten erreicht, die als Grundlage eines industriellen Fermentationsprozesses dienen könnten. In diesen zwei Fermentationen betragen die Produktivität der Serinbildung etwa $P=1,4$ g/l/h, der spezifische Ausbeutefaktor Serin pro umgesetzter Zucker etwa $Y'_{P/S}=0,14$ und die Endkonzentration des Serins in der Fermenterbrühe etwa $c_{\text{Serin,e}}=40$ g/l. Es viel auf, dass in den fünfzehn unbefriedigenden Fermentationen stets vergleichbares wie- oder schnelleres Zellwachstum als- in

den positiven Versuchen beobachtet werden konnte. Nach einer kurzen Periode der Serinbildung erfolgte in den negativ verlaufenden Fermentationen stets das Verstoffwecheln des Serins, das zu geringen Endkonzentrationen und zu unzureichenden Produktivitäten führte. Unterschiede zwischen den fünfzehn negativ und den zwei positiv verlaufenden Fermentationen bezüglich der Versuchsdurchführung, der Medienzusammensetzung usw. konnten ausgeschlossen werden. In der Tabelle 3 sind ausgewählte Daten der Fermentationen Nr. 62 (positiv) und Nr. 70 (negativ) zusammengestellt. Beide Fermentationen unterschieden sich in ihrer Durchführung nicht.

Tabelle 3: Fermentationsdaten der Fermentationen Nr. 62 und Nr.70 mit Ser1 im Industriemedium ohne IPTG.

Größe	62	70
Y' (BTM/Substrat) [g/g]	0,19	0,18
Y' (BTM/O ₂) [g/g]	0,39	0,40
Y' (BTM/N) [g/g]	25,1	29,4
Y' (BTM/CO ₂) [g/g]	0,29	0,28
Y' (Substrat/O ₂) [g/g]	2,1	2,2
Y' (Substrat/N) [g/g]	133	161
Y' (Produkt/Substrat) [g/g]	0,14	0,01
Y' (Produkt/BTM) [g/g]	0,76	0,03
Y' (Produkt/N) [g/g]	19,1	0,8
Y' (Produkt/O ₂) [g/g]	0,30	0,01
μ _{max} [h ⁻¹]	0,2	0,3

Alle spezifischen Ausbeutekoeffizienten Y', die sich auf die Biotrockenmasse BTM beziehen, sind zwischen den beiden Fermentationen vergleichbar. Es wurden jeweils die gleichen Mengen Substrat, Sauerstoff und Stickstoff aufgenommen um die gleichen Mengen Biotrockenmasse zu bilden. Auch die gebildete Biotrockenmasse pro gebildetes Kohlendioxid war gleich. Für das Substrat gilt Ähnliches. Hier wurde bei der positiv verlaufenden Fermentation etwas weniger Substrat pro Stickstoff aufgenommen als bei der negativ verlaufenden Fermentation. Das deutet bereits auf eine verminderte Serinbildung bei Nr.70 gegenüber Nr. 62 hin. Sämtliche produktbezogene spezifische Ausbeutekoeffizienten sind bei Nr. 62 größer als bei Nr. 70. Die Kinetik des Wachstums der Zellen in beiden Fermentationen schien sich ebenfalls etwas zu unterscheiden, wie die beiden maximalen spezifischen Wachstumsraten zeigen.

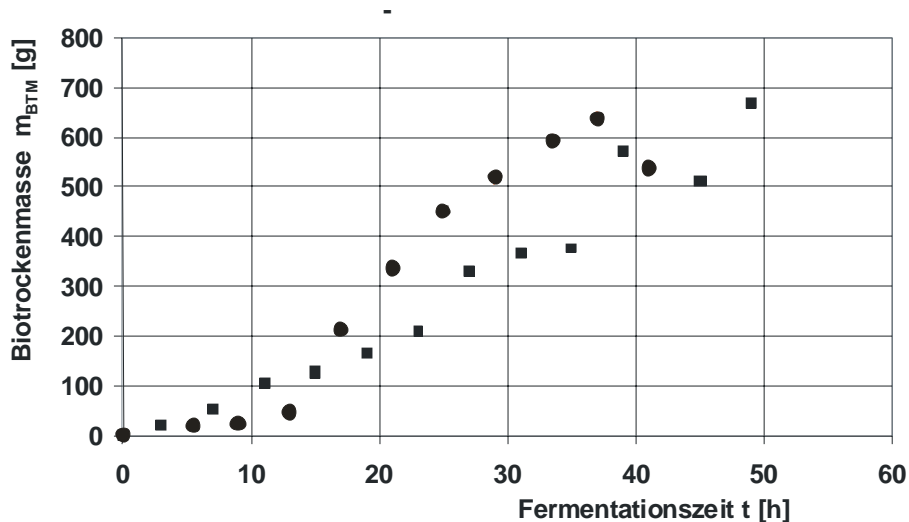


Abb. 11: Wachstum von Ser1 im Industriemedium ohne IPTG in fed-batch-Fermentationen. , Fermentation Nr. 70; ! Fermentation Nr. 62.

Die Zellen in der Fermentation mit geringer Serinproduktion wuchsen schneller als die in der Fermentation mit zufrieden stellender Serinproduktion. Ein solch starker Unterschied im Wachstumsverhalten trotz identischer Versuchsbedingungen zeigt eine Veränderung des Stamms an (Abb. 11).

Während Nr. 62 linear, also limitiert wächst, setzt bei Nr. 70 nach einer ausgeprägten lag-Phase exponentielles, das heißt unlimitiertes Wachstum, ein. Diese Ergebnisse führten, wie schon oben beschrieben, zu der Vermutung einer genetischen Instabilität des *glyA*-Konstruktes im Stamm Ser1. Unlimitiertes Wachstum könnte durch ein Freischalten des Stoffwechselwegs der Umwandlung des Serins mit THF zu Glycin und mTHF verursacht worden sein. Das Funktionieren des *glyA*-Konstruktes wurde bei Ser1 offensichtlich durch limitiertes Wachstum (Limitierung durch die Konzentration der Ersatzkomponenten im CSL) angezeigt. Das unlimitierte Wachstum führte innerhalb kurzer Zeit dazu, dass im fed-batch-Betrieb nicht mehr genügend Kohlenstoffsubstrat (Zucker) nachgeführt werden konnte. Die Folge davon war vermutlich eine verstärkte Nutzung des zellinternen Serinpools und eine Verringerung des Flusses von 3-Phosphoglycerat zu Serin zugunsten des Stoffwechselwegs 3-Phosphoglycerat --> PEP --> Pyruvat.

Die Bedeutung der Unterversorgung mit Zucker während der fed-batch-Fermentation für die Serinbildung verdeutlicht die Abbildung 12. Mit dem Einsetzen des unlimitierten Wachstums zum Zeitpunkt $t=13\text{h}$ (vergleiche Abb. 11), der gleichzeitig den Zeitpunkt beginnender Substratlimitierung markiert, verringerte sich in der Fermentation Nr. 70 die auf die Biotrockenmasse bezogene Serinproduktion stark. In

der positiv verlaufenden Fermentation Nr. 62 dagegen stieg sie bis zum Zeitpunkt $t=20\text{h}$ an und blieb im weiteren Fermentationsverlauf konstant auf hohem Niveau. Durch eine ausreichende Substratversorgung ließe sich der negative Effekt auf die Serinproduktion sicherlich verhindern und damit die Probleme durch die genetische Instabilität vermeiden. Eine solche ausreichende Substratversorgung ist bei unlimitiertem Wachstum entsprechend den ermittelten Daten jedoch unmöglich, wie die Abbildung 13 zeigt. Nur kurze Zeit nach dem Beginn des exponentiellen Wachstums in der Fermentation Nr. 70 erhöhte sich die Sauerstoffaufnahme im Fermenter gleichartig und erreichte bereits zum Zeitpunkt $t=16\text{h}$ mit $w_{\text{O}_2}=1700\text{mol/h}$ eine Geschwindigkeit, die einer Sauerstoffaufnahme von etwa $r_{\text{O}_2}=200\text{mmol/l/h}$ entsprach. Dieser Wert stellt den oberen Grenzwert der Sauerstofftransferrate des Produktionsfermenters dar.

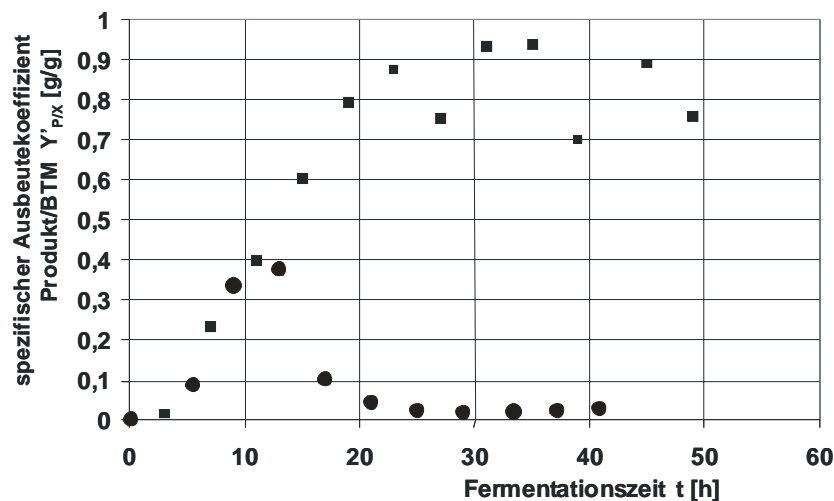


Abb. 12: Spezifischer Ausbeutekoeffizient während fed-batch-Fermentationen mit Ser1 im Industrie-medium ohne IPTG. , Fermentation Nr. 70; ! Fermentation Nr. 62.

Wäre der Versuch Nr. 70 mit ausreichender Substratversorgung in der Industrieanlage durchgeführt worden, hätten ab $t=16\text{h}$ anaerobe Verhältnisse im Fermenter geherrscht und der Prozess wäre verloren. Infolge der genetischen Instabilität ist eine Umsetzung der Fermentation in den Produktionsmaßstab nicht möglich, da Substratlimitierung zwar ausreichende Sauerstoffversorgung sichert, jedoch zur Verringerung der Serinbildung führt. Ausreichende Substratversorgung andererseits führt schnell zur Sauerstofflimitierung.

Das limitierte Wachstum von Ser1 in der Fermentation Nr. 62 erlaubte eine ausreichende Substratversorgung bei ausreichender Sauerstoffversorgung während

des gesamten Prozesses. Die genetische Instabilität von Ser1 stellt somit das wichtigste Problem bei der Entwicklung eines Fermentationsverfahrens dar.

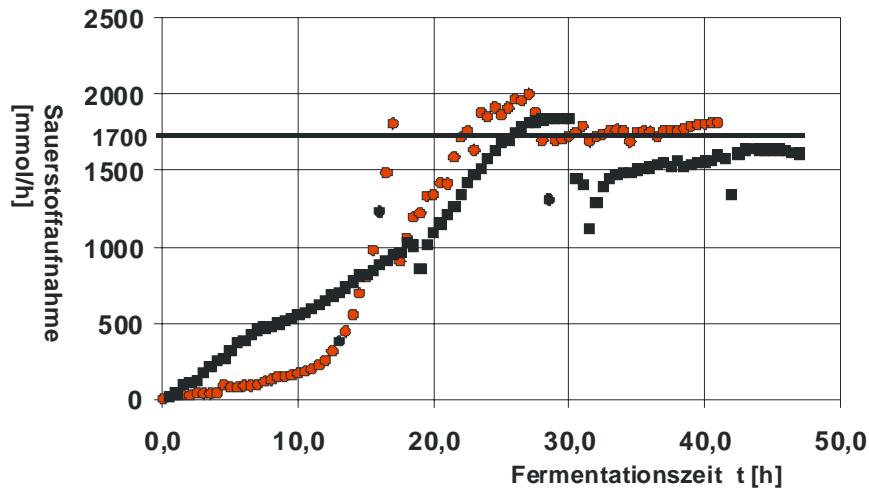


Abb. 13: Sauerstoffaufnahme während fed-batch-Fermentationen mit Ser1 im Industriemedium ohne IPTG. Fermentation Nr. 70; ■ Fermentation Nr. 62.

1.4. Stammtransfer eines Stammes der zweiten Generation

1.4.1 Überprüfung der Folat-Auxotrophie im Schüttelkolben-Maßstab

Erste Untersuchungen mit $WT\Delta sdaA\Delta pabABC(pserA^{fbr}CB)$ (kurz: Ser4) einem Stamm der zweiten Generation ins Labor der Amino GmbH in Braunschweig sollte die Folat-Auxotrophie im Schüttelkolben bestätigen (vgl. auch Abschnitt I, Kapitel 3.2.1, Abb. 9). Zunächst erfolgte eine Kultivierung in BHI-Medium. Anschließend wurde der Stamm mehrmals in Minimalmedium ohne Folsäure überimpft (Abb. 14). Es zeigte sich, dass bereits nach dreimaligem Überimpfen kein Wachstum mehr festgestellt werden konnte. Um zu zeigen, dass diese Wachstumslimitierung am Folsäure-Mangel liegt, wurde die Kultur geteilt. Die eine Hälfte diente als Kontrolle ohne Folsäure-Zusatz und der zweiten Hälfte wurde 1 mM Folsäure zugesetzt. Nach einer *lag*-Phase von etwa 12 Stunden konnte bei Ser4 ein deutliches Wachstum gegenüber der Kontrolle beobachtet werden. Die Folsäure-Auxotrophie konnte somit im Schüttelkolben-Maßstab bestätigt werden.

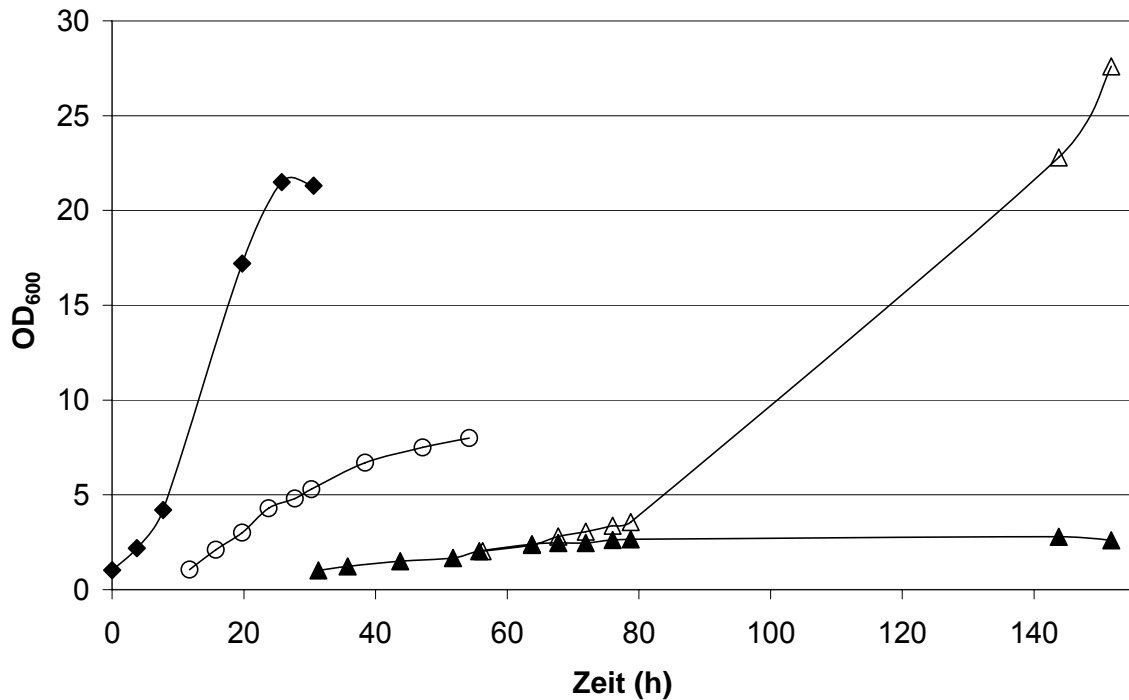


Abb. 14: Überprüfung der Folsäure-Auxotrophie von *C. glutamicum* Ser4 in CgXII-Minimalmedium. Die erste Kultivierung erfolgte in BHI-Medium. Danach wurde der Stamm in der exponentiellen Phase mehrmals überimpft (◆,○,▲). Nach der letzten Überimpfung wurde die Kultur ▲ geteilt. Die eine Hälfte diente als Kontrolle (▲) ohne Folsäure-Zusatz und der zweiten Hälfte wurde 1 mM Folsäure zugesetzt (△).

1.4.2. Kultivierung in CSL-Medium

Zunächst sollte der Stammtransfer von der Arbeitsgruppe Jülich (Stammentwicklung) in die Fermentationsgruppe in Braunschweig realisiert werden. Dazu wurden zunächst erste Untersuchungen mit Ser4 einem Stamm der zweiten Generationen im Schüttelkolben-Maßstab durchgeführt.

Es wurden analog zu den Experimenten in Jülich Versuche in CSL-Medium durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass trotz des deutlich schlechteren Wachstums im Vergleich zu der in Jülich durchgeführten Kultivierung (Abb. 15) eine Serinausbeute von 5 g/l erzielt werden konnte. Die Produktivität lag hier bei 0.18 g Serin/g Glucose.

Durch Experimente in Jülich konnte gezeigt werden, dass der Bedarf an Folsäure in der Zelle sehr hoch zu sein scheint (vgl. Abschnitt I, Kapitel 3.2.2). Es ist bekannt, dass die Zusammensetzung verschiedener CSL-Chargen insbesondere der Vitamin-Konzentrationen schwankt. Somit könnten, die unterschiedlichen Daten könnten auf

die Verwendung verschiedener CSL-Chargen in den Laboren in BS und Jülich zurückgeführt werden.

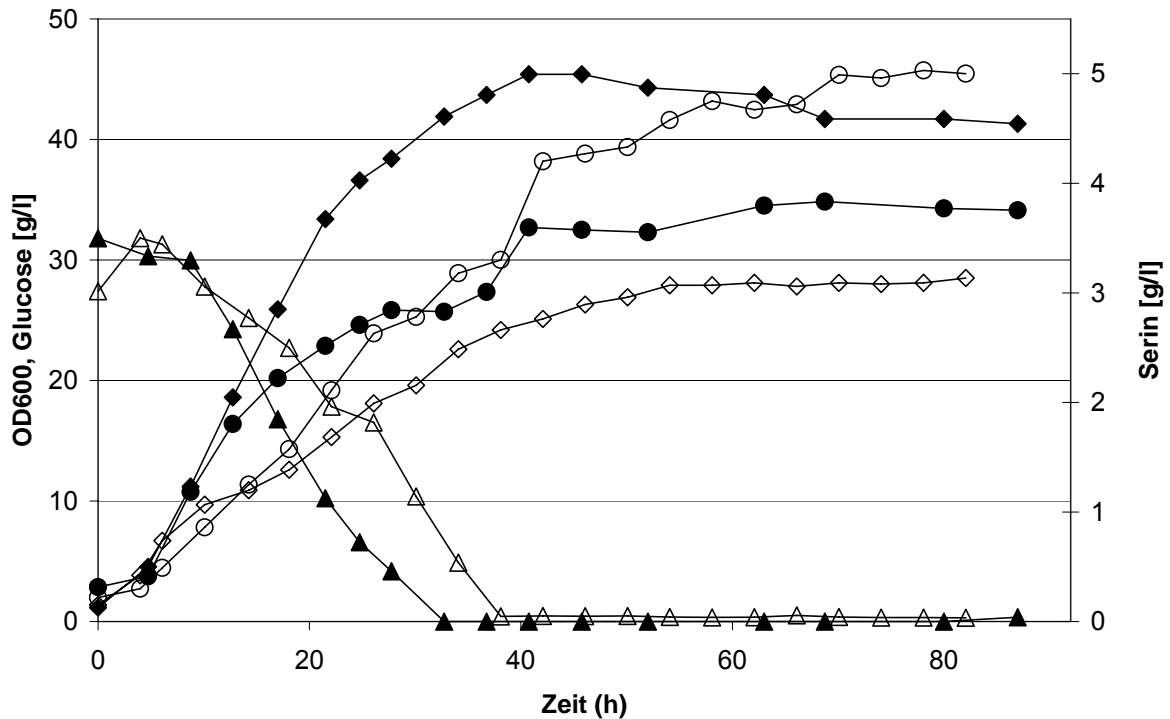


Abb. 15: Vergleich des Wachstums (◆,◇), der Serin-Produktion (●,○) sowie der Glucoseumsetzung (▲,△) durch *C. glutamicum* Ser4 in CSL-Medium mit 3 % Glucose als Kohlenstoffquelle. Die Kultivierung wurde zum einem in Jülich (geschlossene Symbole) und zum andern in Braunschweig (offene Symbole) durchgeführt.

1.4.3 Fermentationsversuche mit stabilen Serin-Produktionsstämmen der zweiten Generation.

Es wurden eine Reihe von Zufütterungsfermentationen mit Ser4 im Industriemedium in dem industrierelevanten CSL-Medium durchgeführt.

Es wurden zunächst 5 Fermentationen mit einer „residual sugar feed“ Strategie durchgeführt. Die erreichte Produktivität der Serinbildung betrug hierbei maximal $P=0.93$ g/l h, der spezifische Ausbeutefaktor Serin pro umgesetzter Zucker lag zwischen $Y'_{P/S}= 0.12$ g/g und 0.14 g/g. Die Endkonzentration des Serins in der Fermenterbrühe war etwa $c_{Serin} = 34 - 36$ g/l. Eine Reduktion der zu Beginn der Fermentation eingesetzten CSL-Konzentration um bis zu 1/3 reduziert das Wachstum und führte zu einer bis zu über 50% geringeren Produktivität. Ein positiver Einfluß auf die Nebenprodukt-Bildung konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Aufgrund der

hohen Nebenprodukt-Bildung (bis zu 50% bezogen auf gebildetes Serin) ist die Produktivität im Vergleich zu Ser1 um fast 1/3 geringer. Wohingegen der spezifische Ausbeutefaktor vergleichbar ist.

Um den Einfluss unterschiedlicher Fütterungsstrategie insbesondere auf die Nebenprodukt-Bildung auf Ser4 zu vergleichen wurden außerdem 4 Fermentationen mit einer CRSO Strategie durchgeführt. Bei Verwendung dieser Strategie wird der konsumierte Zucker ins Verhältnis mit dem aufgenommenen Sauerstoff gesetzt (CRSO = Consumptionrate sugar/oxygen m/m). Die Produktivität der Serinbildung betrug hierbei $P=0.90$ g/lh, der Ausbeutefaktor Serin pro umgesetzter Zucker lag zwischen $Y'_{P/S}=0.14$ g/g und die maximale Serin-Konzentration bei 39 g/l.

Im Folgenden werden zwei Fermentationen miteinander verglichen, die jeweils exemplarisch für die unterschiedlichen Fütterungsstrategie stehen. Wie in Abb. 16 dargestellt, gibt es kaum einen Wachstumsunterschied bei den Fermentationen Nr. 31 („residual sugar feed“) und Nr. 37 (CRSO).

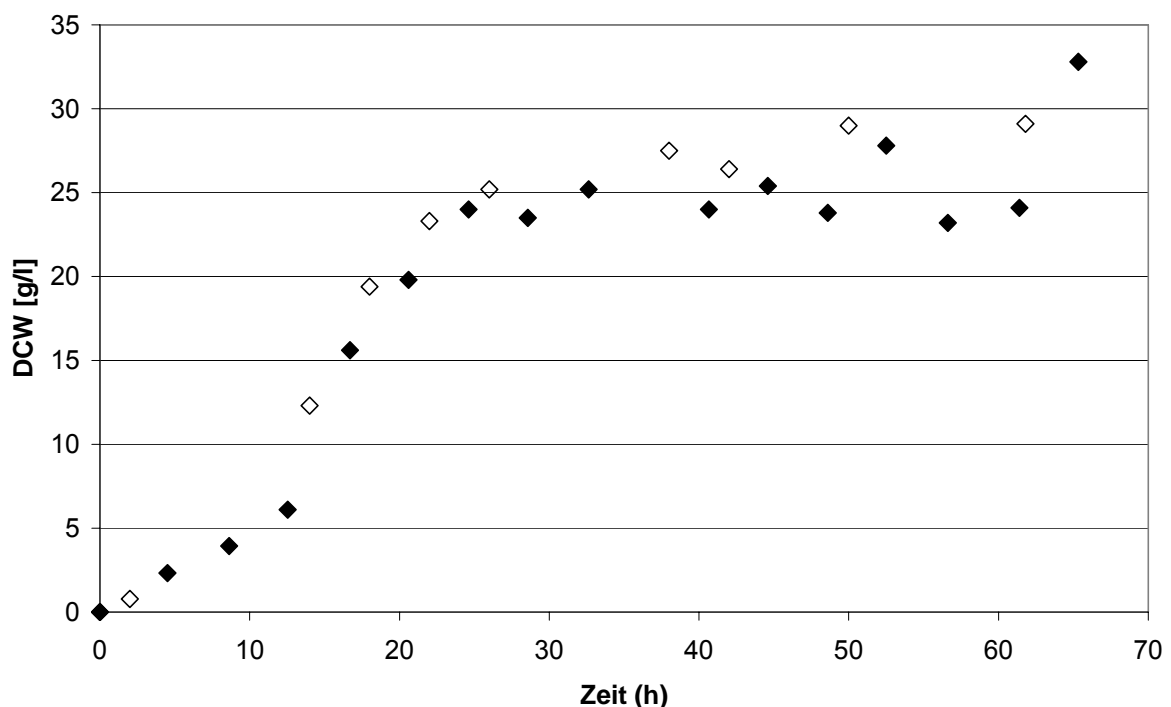


Abb 16: Vergleich des Wachstums im Industriemedium mit unterschiedlicher Fütterungsstrategie in Fed-batch-Fermentationen. Fermentation 31 (◇) wurde mit einer „limited sugar“ Strategie gefüttert. Bei Fermentation 37 (◆) erfolgte die Fütterung über CRSO.

Aus Abbildung 17 ist deutlich zu erkennen, dass sich durch eine geeignete Fütterungsstrategie die Nebenprodukt-Bildung deutlich reduzieren lässt. Während die Nebenprodukt-Bildung bei einer „residual sugar feed“ Strategie bei etwa 44% bezo-

gen auf Serin lag, so konnte die Nebenprodukt-Bildung um mehr als 10% bei der CRSO-Strategie gesenkt werden.

Eine gegenüber durch die Arbeitsgruppe in Jülich etablierte Vorkulturführung geänderte Vorkultur-Führung wirkte sich negativ auf die Produktivität aus (0.93 g/g vs 0.83 g/g).

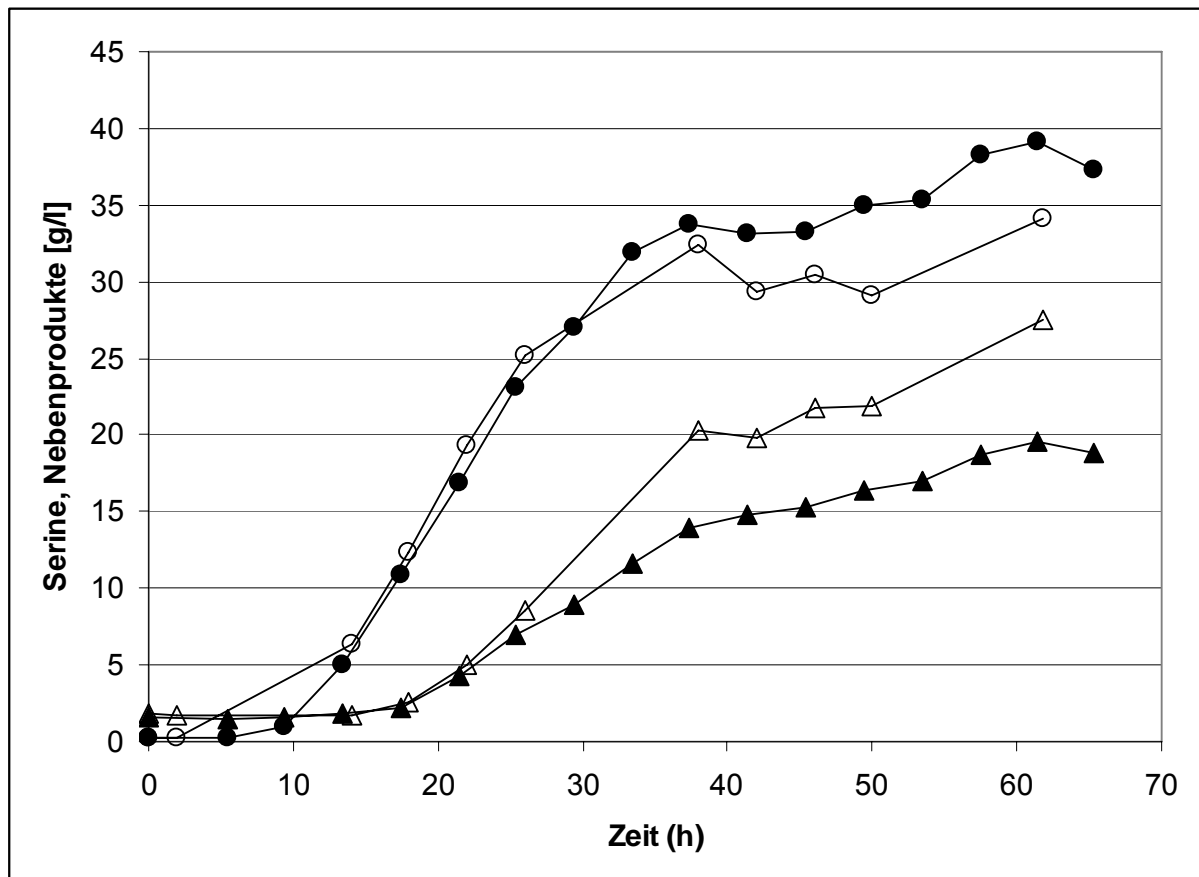


Abb. 17: Vergleich der Serin- (○) und Nebenprodukt-Bildung (▲,△) durch *C. glutamicum* Ser4 in Industriemedium mit unterschiedlicher Fütterungsstrategien in Fed-batch-Fermentationen. Fermentation 31 (offene Symbole) wurde mit einer „limited sugar“ Strategie gefüttert. Bei Fermentation 37 (geschlossene Symbole) erfolgte die Fütterung über CRSO.

1.5 Ausblick

In industrienahen Fermentationen wurde gezeigt, dass der Stamm bis zu 40 g/l Serin akkumulierte, bei einer maximalen spezifischen Produktivität von 0,93 g/l h und einer Ausbeute $Y_{p/s}$ von 0,14. Dieser Stamm ist darüber hinaus genetisch stabil und eignet sich für den Einsatz in der Produktion.

2. Die Isolierung und Aufreinigung des Serins aus dem Fermentationsmedium durch innovatives *Downstream Processing*

Am Amino-Standort am InnoCenter in Braunschweig wurden Fermentationsversuche zur Gewinnung von Serin mittels metabolisch optimierter *C. glutamicum*-Stämme durchgeführt. Die Isolierung des Serins aus der Fermenterbrühe, das so genannte Down-Stream-Processing, sollte parallel dazu im Technikum am Standort Frellstedt entwickelt werden.

Aus ökonomischen und ökologischen Gründen (Ausbeuteerhöhung bei gleichzeitiger Emissionsminderung) sollte versucht werden, das Serin durch direkten Ionenaustausch ohne vorherige Biomasseabtrennung aus dem Fermentationsmedium zu isolieren. Dazu wurde die zellhaltige Fermenterbrühe über einen Ionenaustauscher gefahren, das beladene Tauscherharz mit Wasser zellfrei gewaschen und anschließend das Serin mit Ammoniaklösung vom Harz verdrängt. Die Eindampfung des Eluates und nachfolgende Kristallisation führen zu einem Serin-Rohprodukt S1.

2.1 Abtrennung der Biomasse und des Serins aus der Fermenterbrühe

Erste Versuche dienten der Auslegung des Ionenaustauschers zur Isolierung von Serin aus Fermenterbrühe. Da die Fermenterbrühe neben Serin noch andere Aminosäuren und auch Salze enthält, kann die Kapazität des Ionenaustauscherharzes nicht durch Berechnung über den Serin-Gehalt der Fermenterbrühe bestimmt werden. Durch beabsichtigtes Befahren des Ionenaustauschers bis weit über den Aminosäure-Durchbruch hinaus, wurde dessen Kapazität für die Serin-Fermenterbrühe ermittelt. Für die Ionenaustauscherversuche kam ein stark saures Kationenaustauscherharz (IMAC HP1110 Rohm & Haas) in der H⁺-Form zum Einsatz. Als Aufgabelösung wurde eine zentrifugierte Serin-Fermenterbrühe (Batch-Nr. F3804062) mit einem Serin-Gehalt von 38,5 g/l verwendet. Die Brühe wurde bei einem Fluss von 1,0 BV/h (~ 100 ml/h) über den Ionenaustauscher gefahren (BV = Bettvolumen). Der Auslauf betrug konstant 1,0 BV/h und wurde in 20 min-Intervallen fraktioniert. Nach dem Waschen wurde der beladene Ionenaustauscher bei einer Flussrate von 1,0 BV/h innerhalb von 300 min mit 1,0 M Ammoniaklösung eluiert. Der Auslaufstrom wurde in 20 min-Intervallen (~ 0,33 BV) fraktioniert. Nach einer Beladung mit etwa 2,4 BV war der Ionenaustauscher erschöpft und das Serin brach durch. Die Serin-Konzentration stieg über den Ausgangsgehalt der Aufgabelösung hinaus an. Dies kann durch Verdrängung von

gebundenem Serin durch den Salzanteil der überschüssigen Aufgabelösung erklärt werden. Die Kapazität des Ionenaustauschers beträgt pro Bettvolumen Ionentauscherharz maximal etwa 2,3 BV Fermenterbrühe. Umgerechnet auf den Serin-Gehalt der Fermenterbrühe kann ein Liter Harz etwa 80 g Serin aufnehmen. Um sicher zu stellen, dass bei den folgenden Versuchen kein Serin ungebunden durch den Tauscher wandert, wurde die maximale Aufgabemenge auf 2,0 BV (bzgl. Harz) festgelegt. Die Verteilung und die Konzentration des Serins in den Fraktionsproben der Elution dieses Versuches sind nicht repräsentativ. Durch die starke Überladung des Tauschers wurde bereits ein Teil des gebundenen Serins durch nachfolgendes Salz wieder verdrängt. In weiteren Versuchen wurde mit der optimalen Menge Fermenterbrühe beladen, um bei der anschließenden Elution zuverlässige Daten für das Binde- und Elutionsverhalten des Serins zu erhalten. 200 g (2,0 BV bzgl. Harz) zentrifugierte Serin-Fermenterbrühe bei einem Fluss von 1,0 BV/h (~ 100 ml/h) über den Ionentauscher gefahren (Abb. 18).

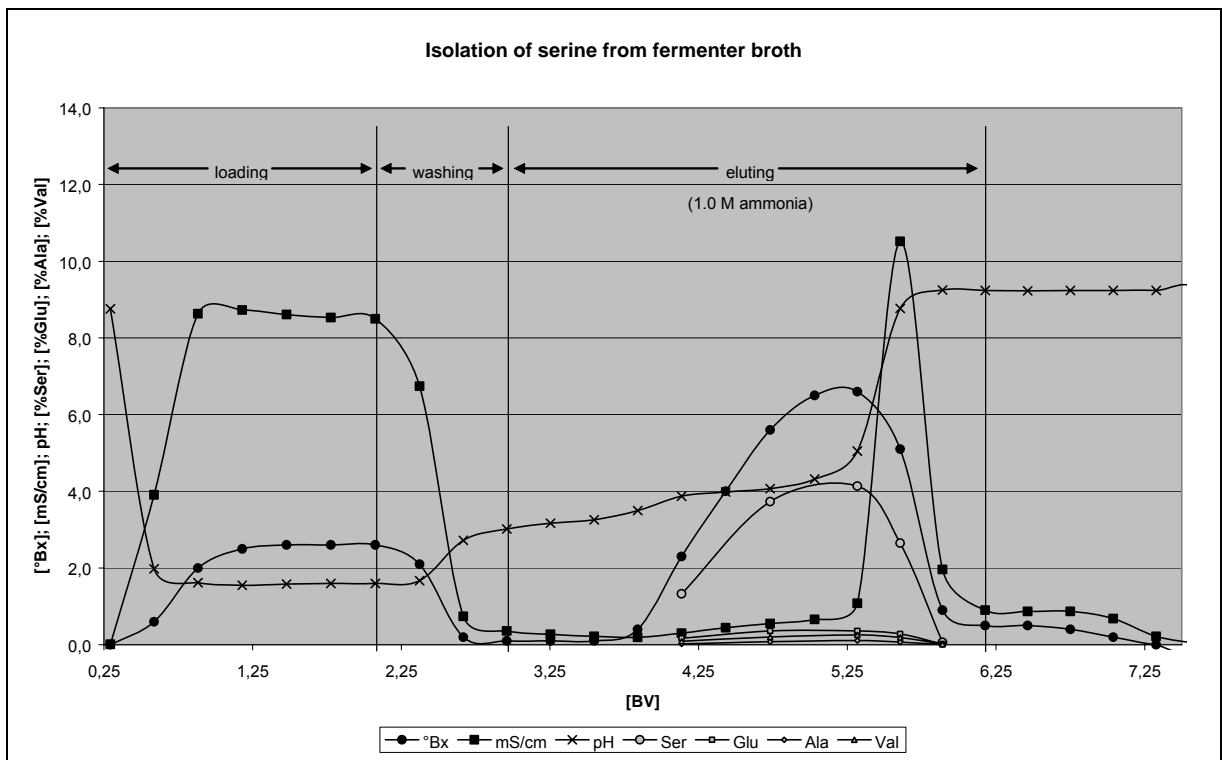


Abb. 18: Beladung mit zentrifugierter Fermenterbrühe und Elution mit 1,0 M Ammoniak.

Der Auslauf betrug konstant 1,0 BV/h und wurde in 20 min-Intervallen fraktioniert. Zum Auswaschen der nicht-ionischen Bestandteile der Fermenterbrühe wurde der Tauscher nach dem Beladen mit 1,0 BV Wasser gespült. Die Waschfraktionen nach Beendigung der Aufgabe wurden mittels Aminosäure-Analysator auf ihren Serin-Gehalt hin untersucht. Nur in den ersten beiden Proben wurden kleine Mengen

(0,001 %) Serin nachgewiesen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Kapazität des Ionenaustauschers ausreichend war für die bereitgestellte Fermenterbrühe. Nach dem Waschen wurde der Ionenaustauscher bei einem Fluss von 1,0 BV/h innerhalb von 200 min mit 1,0 M Ammoniak eluiert. Das Maximum der Aminosäuren wurde nach einem Durchfluss von etwa 2,2 BV Eluent erreicht. Nach einer Eluentmenge von 2,3 BV deutete der starke Anstieg der Leitfähigkeit auf die beginnende Elution der Salze hin.

Die gesamte Elution war nach etwa 3,0 BV beendet. Aus aliquoten Teilen der Fraktionsproben der Serin-Fraktion wurden zwei unterschiedliche Serin-Pools zusammengestellt (Tab. 4). Der Serin-Pool (ohne Salz) setzte sich aus den Fraktionsproben vom Beginn des Serin-Durchbruches bis zum Anstieg der Leitfähigkeit zusammen. Der Serin-Pool (mit Salz) bestand aus den Fraktionsproben der gesamten Serin-Fraktion. Mit 1,0 M Ammoniak konnten alle Aminosäuren vollständig eluiert werden. Die Wiederfindung fast aller Aminosäuren lag bei 95-102 %. Die anderen Aminosäuren konnten nicht vom Serin abgetrennt werden, da sie gleichzeitig mit dem Serin eluierten.

In weiteren Versuchen sollte das Elutionsverhalten des Serins bei der Elution mit 0,5 M Ammoniak betrachtet werden. Dies dient neben einer Optimierung der variablen Herstellkosten vor allem einer Reduktion potenzieller Stickstoffemissionen. Nach Beladung mit einer zellfreien Fermenterbrühe wurde der Tauscher bei einer Flussrate von 1,0 BV/h mit 0,5 M Ammoniak eluiert. Der Auslaufstrom wurde über den ganzen Zeitraum von Beladung bis zur Elution in 10 min-Intervallen ($\sim 0,17$ BV) fraktioniert. Wie im vorhergehenden Versuch wurden aus Aliquots der Fraktionsproben zwei Serin-Pools (ohne/mit Salz) zusammengestellt (Tab. 4). Auch mit der niedrigeren Ammoniak-Konzentration können die Aminosäuren vollständig vom Ionenaustauscher eluiert werden. Die Wiederfindung fast aller Aminosäuren lag bei 93-109 %. Auch hier eluierten alle anderen Aminosäuren zeitgleich vom Tauscher.

Die spätere großtechnische Abtrennung des Serins wird nicht aus der zellfreien, sondern aus der zellhaltigen Fermenterbrühe erfolgen. In weiteren Versuchen wurde deshalb die zellhaltige Fermenterbrühe auf den Ionenaustauscher aufgegeben, um diesem Faktor Rechnung zu tragen. Aus den ersten Versuchen ist bekannt, dass bereits nach etwas mehr als einem Bettvolumen zellhaltiger Fermenterbrühe mit der Verstopfung des Harzbettes zu rechnen ist und dadurch der Auslaufstrom zum Erliegen kommt. Eine Möglichkeit diese Schwierigkeiten zu vermeiden bestand darin, den Ionenaustauscher in zwei Etappen mit je 1,0 BV Fermenterbrühe zu beladen und zwi-

schen den Beladungsschritten mit 1,0 BV Wasser zu spülen. Der Auslaufstrom wurde über die gesamte Versuchsdauer konstant bei 1,0 BV/h gehalten.

Die Beladung des Tauschers mit zellhaltiger Fermenterbrühe in zwei Etappen ging problemlos vonstatten. Durch den Waschschrift zwischen den Beladungen wurden keine nennenswerten Mengen an Serin vom Tauscher gespült. Die Methode scheint daher geeignet zu sein die Probleme der Harzbettverstopfung durch die Zellmasse der Fermenterbrühe zu umgehen. Aus Aliquots der Serin-Fraktion wurden zwei Pools (ohne/mit Salz) zusammengestellt (Tab. 4). Die Aminosäuren konnten mit 1,0 M Ammoniak vollständig vom Ionentauscher eluiert werden. Die Wiederfindungsraten der meisten Aminosäuren lagen bei 94-113 %. In einem weiteren Versuch wurde der Tauschers ebenfalls mit zellhaltiger Fermenterbrühe beladen, die Elution jedoch mit 0,5 M Ammoniak durchgeführt. Die gesamte Serin-Fraktion wurde in einen salzfreien und einen salzhaltigen Pool aufgeteilt (Tab. 4).

Tabelle 4: Gegenüberstellung der Elutionen mit 0,5 M, 1,0 M und 2,0 M Ammoniak.

Eluent (NH ₃)	1,0 M	0,5 M	1,0 M	0,5 M	2,0 M
Aufgabelösung	zellfrei	zellfrei	zellhaltig	zellhaltig	zellhaltig
Serin-Konz. im Serin-Pool (ohne Salz)	2,33 %	1,61 %	2,84 %	1,63 %	6,52 %
Serin-Konz. im Serin-Pool (mit Salz)	2,08 %	1,42 %	2,43 %	1,43 %	5,43 %
Serin-Anteil im Serin-Pool (ohne Salz) bzgl. Serin _{gesamt}	63,7 %	89,4 %	80,1 %	89,5 %	81,6 %

Die Aminosäuren konnten mit der niedrigen NH₃-Konzentration vollständig vom Ionentauscher eluiert werden. Das aufgegebene Serin konnte zu 100 % wiedergefunden werden. Die Elutionskurven der Elutionen mit 0,5 M Ammoniak verlaufen sehr viel flacher und breiter im Vergleich zu den Elutionen mit 1,0 M Ammoniak. Die Serin-Konzentration in den Serin-Pools (ohne/mit Salz) der Elutionen mit 0,5 M Ammoniak ist um einiges niedriger als bei den Elutionen mit 1,0 M Ammoniak. Dafür enthalten die salzfreien Serin-Pools der Elutionen mit 0,5 M Ammoniak einen deutlich größeren Anteil des eingesetzten Serins als die salzfreien Pools der Elutionen mit 1,0 M Ammoniak (Tab. 4). Durch den Einsatz von Ammoniak geringerer Konzentration ist eine Abtrennung von Salz bei gleichzeitig hoher Serin-Ausbeute

möglich. Nach Literaturangaben (z. B. Merck-Chemikalien Katalog 2003, S. 904) racemisiert Serin in wässriger Lösung bei pH größer 9. Deshalb wurde in einem weiteren Versuch die Elution mit 2,0 M Ammoniak untersucht, um zu klären, ob bei der höheren Ammoniak-Konzentration bereits eine Racemisierung auftritt. Dabei eluiert Serin in kürzerer Zeit und in höherer Konzentration als bei der Elution mit 0,5 M und 1,0 M Ammoniak (Tab. 4). Das Serin konnte zu 100 % im Eluat wiedergefunden werden.

Wie bei den anderen Versuchen, lassen sich alle anderen nachgewiesenen Aminosäuren nicht abtrennen, sondern eluieren gleichzeitig mit dem Serin. In einem salzfreien Pool liegen deren Gehalte (bezogen auf Serin) bei: 9,7 % Glutamat / 5,9 % Valin / 2,2 % Alanin. Die unbekannt, mit Ninhydrin nachweisbaren Substanzen betragen etwa 1 % (bezogen auf Serin). Durch Eindampfung eines nicht aliquot gebildeten Gesamtpools konnte ein Kristall gewonnen werden. Dessen *D*-Serin-Anteil lag bei 0,47 %. Dieser Wert ist allerdings sicher zu hoch bestimmt, da der Pool zu einem größeren Anteil aus Proben vom Ende der Elution bestand, und der pH-Wert somit unverhältnismäßig hoch war. Somit konnte eines der gravierendsten Probleme bei der Serin-Abtrennung über Ionenaustauscher – die Racemisierung bei der Elution mit Alkali – befriedigend gelöst werden. Die übliche Grenze für racemische Verunreinigungen liegt bei über ca. 0,5 % und wird somit eingehalten.

2.2 Kristallisation des Serins aus den Ionenaustauschereluaten

Die weiteren Versuche zielten darauf ab, das in den Serin-Eluaten angereicherte Produkt durch fraktionierte Kristallisation von den noch vorhandenen Verunreinigungen (Asche und Fremdaminosäuren) zu befreien.

Anhand zellhaltiger Fermenterbrühe wurde versucht, nach vorheriger Abtrennung der Zellbestandteile durch Ionenaustausch-Chromatographie, einen Serin-Rohkristall S1 herzustellen. Durch Aufarbeitung verschiedener gepoolter Serin-Fractionen (salzfrei, salzhaltig, salzhaltig und mit Salzsäure neutralisiert) sollte ermittelt werden, von welcher Qualität der jeweils produzierte S1-Kristall ist.

In zwei Chromatographieversuchen wurde das Serin aus der Fermenterbrühe am IMAC HP 1110 (H^+ -Form) isoliert. Das in der Fermenterbrühe enthaltene Serin konnte nach Abtrennung der Zellmasse und der restlichen Nährlösung vollständig im Verfahrensschritt der Chromatographie gewonnen werden. Im Versuch a wurde bei der Elution des Tauschers ein salzfreier Serin-Pool (~ pH 5) und ein salzhaltiger Serin-Pool (pH 9,2) gewonnen. Im Versuch b wurde der gesamte Serin-Schnitt zum

Pool (pH 9) zusammengefasst (Tab. 5; Ser-Pool, a). Aus diesem Pool wurde ein aliquoter Teil mit Salzsäure neutralisiert (Tab. 6; Ser-Pool, n), um zu verhindern, dass es durch den hohen pH-Wert während der Aufarbeitung zu einer Racemisierung kommt. Die Serin-Pools wurden zunächst im Vakuumumlaufverdampfer voreingedampft und danach im Vakuumrotationsverdampfer auf die Endkonzentration von ~ 62 °Bx (~ 45 % Serin) eingeeengt (°Bx = Maß für den Feststoffgehalt einer Lösung). Die Konzentrate wurden unter ständigem Rühren auf Raumtemperatur abgekühlt und die Kristallsuspensionen bis zur vollständigen Kristallisation über mehrere Stunden hinweg in Bewegung gehalten.

Die Abtrennung der Kristalle von der Mutterlösung konnte in beiden Versuchen aufgrund der breiigen Konsistenz der Kristallsuspension nicht auf der Zentrifuge erfolgen, sondern wurde auf einer Filternutsche unter Verwendung eines Tuchfilters durchgeführt. Aus der Fermenterbrühe lässt sich nach erfolgter Abtrennung der Zellanteile mit der beschriebenen Methode ein S1-Kristall mit gelblich-hellbrauner Farbe (3700-5000 ICUMSA-Einheiten) und feiner Kristallstruktur gewinnen. Die hohe Löslichkeit des Serin trägt dazu bei, dass nach der Abtrennung des Kristalls, aus der auf 62 °Bx konzentrierten Lösung, eine große Menge an Serin in der Mutterlösung MS1 verbleibt. Eine Prüfung auf *D*- und *L*-Serin ist aus den vorliegenden Lösungen nur schwer möglich. Somit wurde die Analytik auf den herzustellenden S1-Kristall verlegt (Tab. 5). In den erzeugten S1-Kristallen konnte kein *D*-Serin nachgewiesen werden. Während der Aufkonzentrierung und Kristallisation der betroffenen Pools (pH 9) ist keine Racemisierung aufgetreten. Die Neutralisation eines Teils des ammoniakalischen Serin-Pools (Versuch b) brachte eine zusätzliche Salzfracht ins Produkt und verschlechtert dadurch die Serin-Reinheit, bezogen auf den TS-Gehalt (TS = Trockensubstanz).

Tabelle 5: Daten der S1-Kristall-Analytik.

Versuch	S1 aus Serin-Pool	[%Ser] bzgl. TS	[%Ser] bzgl. Σ_{AS}	<i>D</i> -Serin [%]
a	salzfrei	92,3	93,4	n.n.
	salzhaltig	90,4	93,9	n.n.
b	salzhaltig	95,8	96,6	n.n.
	salzh. (neutral)	80,0	94,2	n.n.

Aus den unterschiedlichen Pools zeichnen sich auch in Reinheit und Serin-Verteilung in Kristall und Mutterlösung Unterschiede ab (Tab. 6). Die hauptsächlichsten Verunrei-

nigungen im S1 stellen die Aminosäuren Glutaminsäure, Valin und Lysin dar, wobei das Lysin verstärkt im salzhaltigen Teil (NH₃-alkalischen Teil) des Serin-Eluates gefunden wurde.

Tabelle 6: Bilanz der Aufreinigung des Serins

	Fermenterbr.	Ser-Pool	Ser-Pool, a	Konzentrat ¹⁾	S1	MS1	Ser-Pool, n	Konzentrat ¹⁾	S1	MS1
Masse [g]	3250	4542,8	3181,7	208,1	62,4	138,9	1135,6	75,3	27,0	41,0
zur Weiterverar. [g]	3250	4255,9	3125,0	206,9	-	-	1130,9	74,1	-	-
°Bx	14,7	4,9	4,9	64,0	-	49,7	6,1	75,8	-	65,5
% TS	n.b.	3,89	3,89	58,42	93,1	45,67	4,90	73,59	91,08	64,92
pH	6,44	8,89	8,89	7,50	n.b.	7,5	5,89	5,2	n.b.	4,84
mS/cm	13,02	12,24	12,24	n.b.	n.b.	9,5	25,4	n.b.	n.b.	52,2
E 420	n.b.	0,614	0,614	9,22	3,462	17,635	0,543	8,76	4,805	14,408
Farbe	n.b.	15784	15784	15784	3719	38614	11082	11082	5276	22193
Asp [%]	0,042	0,029	0,029	0,44	0,114	0,475	0,03	0,45	0,152	0,543
Thr [%]	0,008	0,005	0,005	0,08	0,032	0,111	0,005	0,08	0,041	0,099
Ser [%]	4,014	2,830	2,830	42,50	89,17	23,619	2,731	41,02	72,65	24,098
Glu [%]	0,389	0,257	0,257	3,86	1,191	5,462	0,247	3,71	1,486	5,317
Gly [%]	0,017	0,013	0,013	0,20	0,072	0,254	0,013	0,20	0,085	0,255
Ala [%]	0,096	0,073	0,073	1,10	0,368	1,483	0,072	1,08	0,503	1,373
AAABA [%]	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011	0,000	0,00	0,008	0,011
Val [%]	0,251	0,177	0,177	2,66	0,658	3,556	0,172	2,58	1,160	3,384
Met [%]	0,002	0,001	0,001	0,02	0,005	0,030	0,001	0,02	0,008	0,027
Ile [%]	0,003	0,003	0,003	0,05	0,008	0,068	0,003	0,05	0,022	0,065
Leu [%]	0,048	0,013	0,013	0,20	0,045	0,263	0,013	0,20	0,087	0,246
Tyr [%]	0,003	0,003	0,003	0,05	0,013	0,045	0,003	0,05	0,014	0,048
Phe [%]	0,004	0,003	0,003	0,05	0,022	0,070	0,003	0,05	0,026	0,063
His [%]	0,000	0,009	0,009	0,14	0,076	0,107	0,01	0,15	0,093	0,176
Trp [%]	0,000	0,002	0,002	0,03	0,022	0,032	0,004	0,06	0,000	0,000
Lys [%]	0,000	0,094	0,094	1,41	0,402	1,829	0,091	1,37	0,607	1,822
Arg [%]	0,000	0,003	0,003	0,05	0,000	0,025	0,002	0,03	0,000	0,000
unbek. Peaks [%]	0,069	0,044	0,044	0,66	0,122	0,876	0,057	0,86	0,19	0,291
Summe AS [%]	4,877	3,559	3,559	53,44	92,32	38,316	3,457	51,92	77,132	37,818
Q _{ser/Su} AS	82,3	79,5	79,5	79,52	96,59	61,64	79,00	79,00	94,19	63,72
Ser [g]	130,46	128,56	90,04	88,44	55,64	32,81	31,013	30,88	19,62	9,88
Ser [g] - Weiterverarbeitung		120,44	88,44	87,93	-	-	30,88	30,39	-	-
Ser-Ausbeute [%]		98,55	74,76		63,28	37,31	24,12		63,51	31,99
Ser-Verteilung [%]		-	-		62,9	37,1	-		66,5	33,5

Anmerkungen:

Ser-Pool, a: original Ser-Pool; Ser-Pool, n: neutralisierter Ser-Pool

¹⁾ Die in kursiv gestellten Zahlenwerte im Konzentrat wurden aus der Ser-Poolprobe berechnet !

Ziel der weiteren Versuche war es, die Serin-Kristallisation physikochemisch hinsichtlich Ausbeute und Reinheit zu optimieren und mit den daraus gewonnenen Erkenntnissen einen S2-Kristall durch erneute Kristallisation zu gewinnen. Hierbei fiel der Mutterlösungsführung eine ganz besondere Rolle zu. Während die MS2 und weitere reinere Mutterlösungen in die vorhergehende Kristallisation zurückgeführt werden sollen, mußte für die erste Mutterlösung, die neben der Asche die Masse der Fremdaminosäuren enthielt, eine separate Strategie erarbeitet werden.

Dies ist alleine deshalb notwendig, da eine Entsorgung der Mutterlösung wirtschaftlich und ökologisch nicht zu vertreten ist. Hierzu bietet sich die Ionenausschluss-Chromatographie besonders an, da bei Verwendung von stark sauren Phasen die o.g. besonders störende Glutaminsäure mit dem Ausschlussvolumen separiert würde.

2.3 Umkristallisation des Rohserins S1 zum Endprodukt S2

In Kristallisationsversuchen wurden zwei Rohkristalle S1 aus Wasser umkristallisiert. Besondere Beachtung wurde bei der Umkristallisation der Abreicherung von Glutaminsäure, Alanin, Valin und Lysin gewidmet.

Nach Auflösung der Rohkristalle (Tab. 7) in Wasser und Behandlung mit Aktivkohle zur Entfernung der Farbanteile aus der Fermenterbrühe wurden die Serinlösungen eingedampft bis zu einer Serinkonzentration von ~ 50-52 %. Bei dieser Verdampfungskristallisation wurde die Löslichkeit des Serins bereits überschritten. Das heiße Konzentrat enthielt bereits einen Kristallanteil von ~ 30-35 %. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur unter Rühren wurde der Kristall durch Abnutschen von der Mutterlösung getrennt. Bedingt durch die hohe Löslichkeit des Serins ist die Kristallausbeute entsprechend niedrig. Etwa 66-68 % des eingesetzten Serins konnten als Kristall S2 aus dem Konzentrat isoliert werden.

Durch die Umkristallisation konnte Glutaminsäure durchschnittlich um 72 % abgereichert werden. Die Verringerung des Alanin- und Valingehaltes betrug im Durchschnitt etwa 80 % bzw. 83 %. Beim Lysin konnte eine Abnahme um durchschnittlich 81 % verzeichnet werden (Tab. 7).

Tabelle 7: Abreicherungsdaten bei der Umkristallisation von S1 zu S2

Umkrist. von	S1 (Rohkristall)	S2 (Endprodukt)		
S1 aus	AS	[% AS] bzgl. Ser	[% AS] bzgl. Ser	Abreicherung [%]
salzfreiem	Glu	1,34	0,76	63,8
Serin-Pool	Ala	0,42	0,12	81,0
Versuch a	Val	0,74	0,19	83,6
(Tab. 2)	Lys	0,45	0,15	79,6
salzhaltigem	Glu	2,97	0,82	80,6
Serin-Pool	Ala	0,63	0,19	78,9
Versuch b	Val	1,70	0,42	82,7
(Tab. 2)	Lys	0,44	0,10	83,8

Aus der Nebenproduktbilanz (Tab. 7) ergibt sich, dass der Gehalt an Alanin, Valin und Lysin deutlich unter 0,5% liegt und damit Pharmaanforderungen entspricht. Allerdings beträgt der Gehalt an Glutaminsäure 0,7-0,8%. Eine Abreicherung der Glutaminsäure unter 0,5% kann durch eine vorgeschaltete Ionenausschluß-Chromatographie wie sie auch für die Mutterlaugen-Behandlung vorgesehen ist erfolgen.

2.4 Ionenausschluss-Chromatographie zur Aufreinigung der Mutterlösung MS1

Es wurden Chromatographie-Versuche an einem stark sauren Kationentauscherharz – in den ionischen Formen K^+ und Ca^{2+} – mit einer synthetischen Serinlösung durchgeführt. Die Serinlösung enthielt 20 % Serin, sowie 5 % Glutaminsäure, 1 % Alanin und 2 % Valin (jeweils bezogen auf Serin). Der Modell-Lösung wurde kein Lysin zugesetzt, da Lysin unter den Bedingungen der Chromatographie vollständig am Kationentauscher bindet und erst beim Regenerieren des Tauscherharzes wieder eluiert. Der Auslauf der Chromatographie wurde fraktioniert und hinsichtlich physikalisch-chemischer Parameter analysiert. Die Aminosäure-Analytik erfolgte aus Aminosäure-Pools, die aus Aliquots der Fraktionsproben gemischt wurden.

Glutaminsäure liegt unter den Bedingungen der Chromatographie als Anion vor. Da keine Wechselwirkung mit dem Austauschharz erfolgt, eluiert das Glutamat zusammen mit allen anderen Salzen im Ausschlussvolumen. Bedingt durch die Peakbreite des Glutamat-Peaks kommt es in dessen auslaufender Flanke zu einer geringfügigen Überschneidung mit der nachfolgenden Serinfraktion. Durch eine geeignete Schnittsetzung der Serinfraktion ist allerdings mit beiden ionischen Formen des Kationentauscherharzes eine vollständige Abtrennung von Glutaminsäure aus dem Serin möglich.

Bei der Chromatographie auf dem Kationentauscher in der ionischen Form K^+ beläuft sich der Serinverlust mit der Salzfraktion auf 5,9 % des eingesetzten Serins, d. h. etwa 94 % des Serins können in der Serinfraktion isoliert werden (Abb. 19).

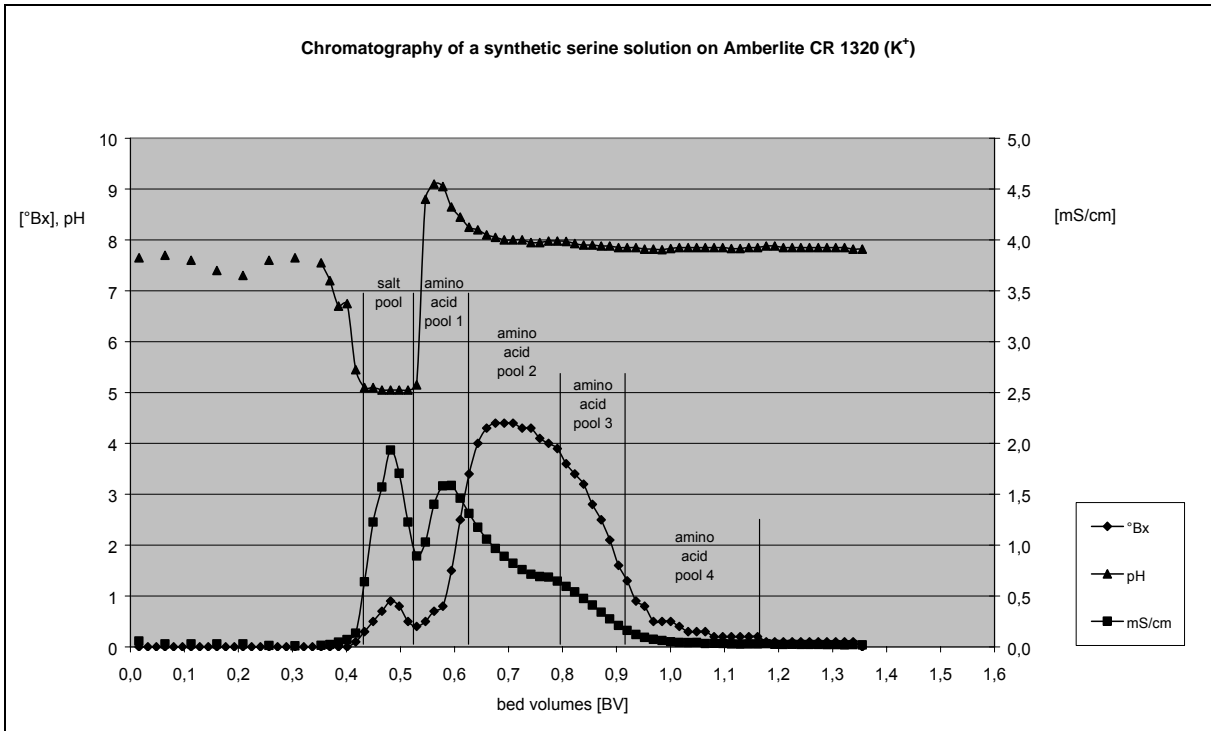


Abb. 19: Chromatographie von Serinlösung an Kationentauscherharz (K⁺)

Die Serin-Ausbeute in der Produktlösung der Chromatographie am K-Harz ist sehr gut, allerdings findet keine Abtrennung von Alanin und Valin statt. Beide eluieren zeitgleich mit dem Serin (Abb. 20).

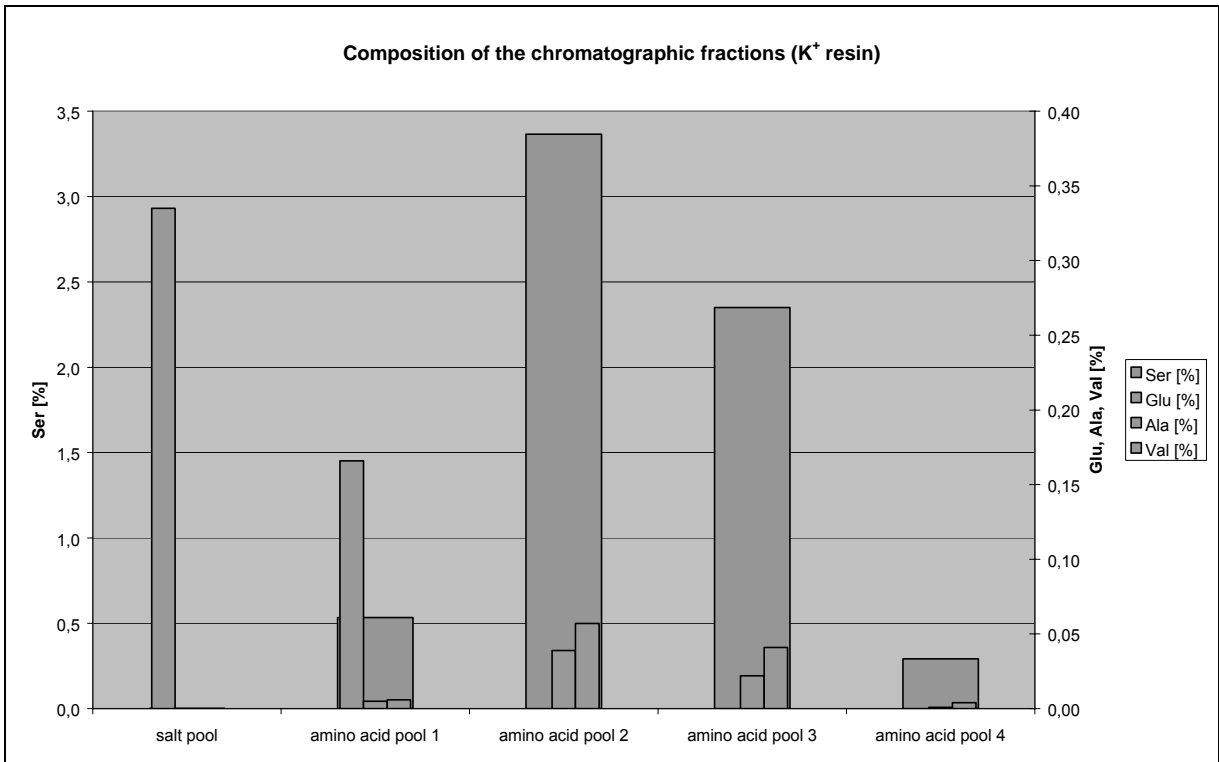


Abb. 20: Zusammensetzung der Fraktionen des Kationentauschers (K⁺)

Bei der Chromatographie am Ca-Harz (Abb. 21) sind die Peaks vergleichsweise breiter als bei der Chromatographie am K-Harz. Bedingt durch die relativ große Überschneidung des Glutaminsäure-Peaks mit dem nachfolgenden Serin-Peak muß bei der Chromatographie am Ca-Harz der Aminosäure-Pool 1 der Salzfraktion zugeschlagen werden, um eine vollständige Abtrennung der Glutaminsäure aus dem Serin zu gewährleisten.

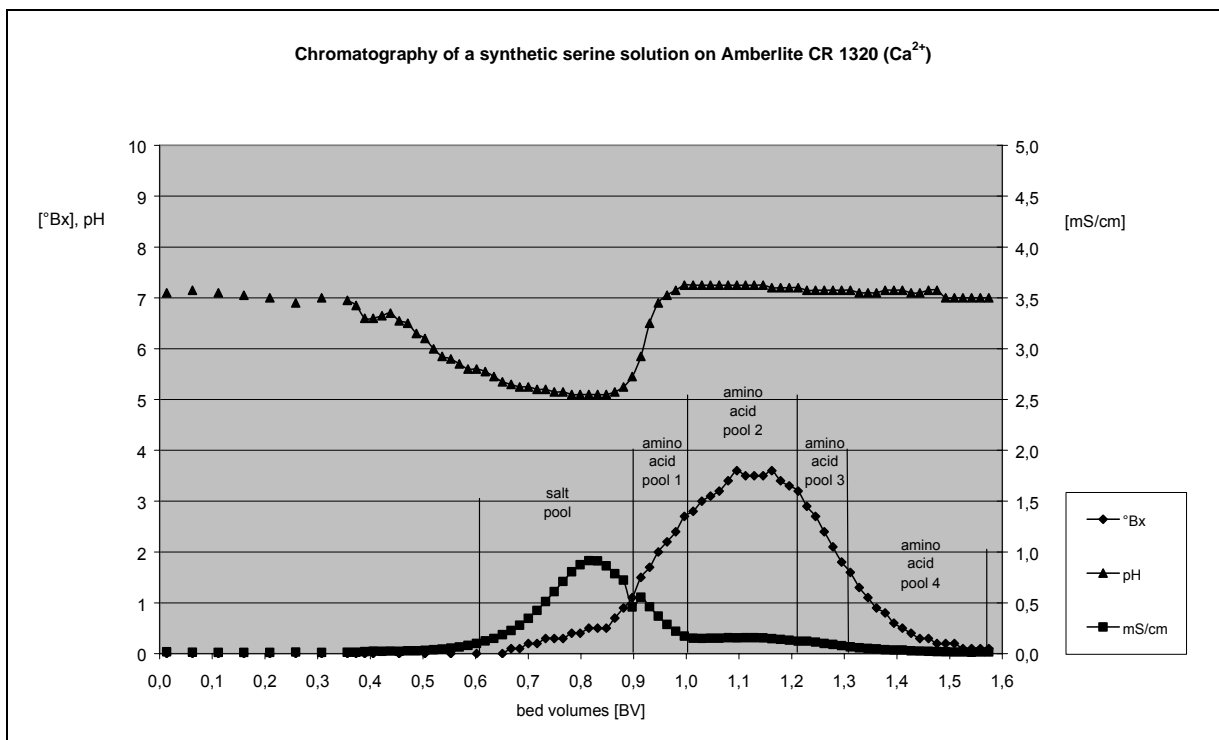


Abb. 21: Chromatographie an Kationentauscher (Ca²⁺-Form)

Der Anteil an Serin in der Salzfraktion beträgt dadurch 14,5 %, d. h. nur etwa 85 % des aufgegebenen Serins könnten mit der Serinfraktion isoliert werden. Auf dem Ca-Harz kann allerdings eine sehr deutliche Abtrennung von Valin beobachtet werden (Abb. 22). Die Hauptmenge des Valins findet sich dabei in den beiden letzten Aminosäure-Pools. Durch Schneiden des zweiten und dritten Aminosäure-Pools lässt sich eine Serinfraktion gewinnen, die zwar nur noch etwa 80 % des eingesetzten Serins enthält, aber deren Valingehalt um etwas mehr als die Hälfte geringer ist als in der aufgegebenen Serinlösung. Ein zusätzlicher Effekt des Abschneidens des vierten Aminosäure-Pools ist die Verringerung des Alaningehaltes in der Serinfraktion um etwa ein Viertel, da bei der Chromatographie auf dem Ca-Harz auch eine geringfügige Abtrennung des Alanins zu verzeichnen ist (Abb. 22).

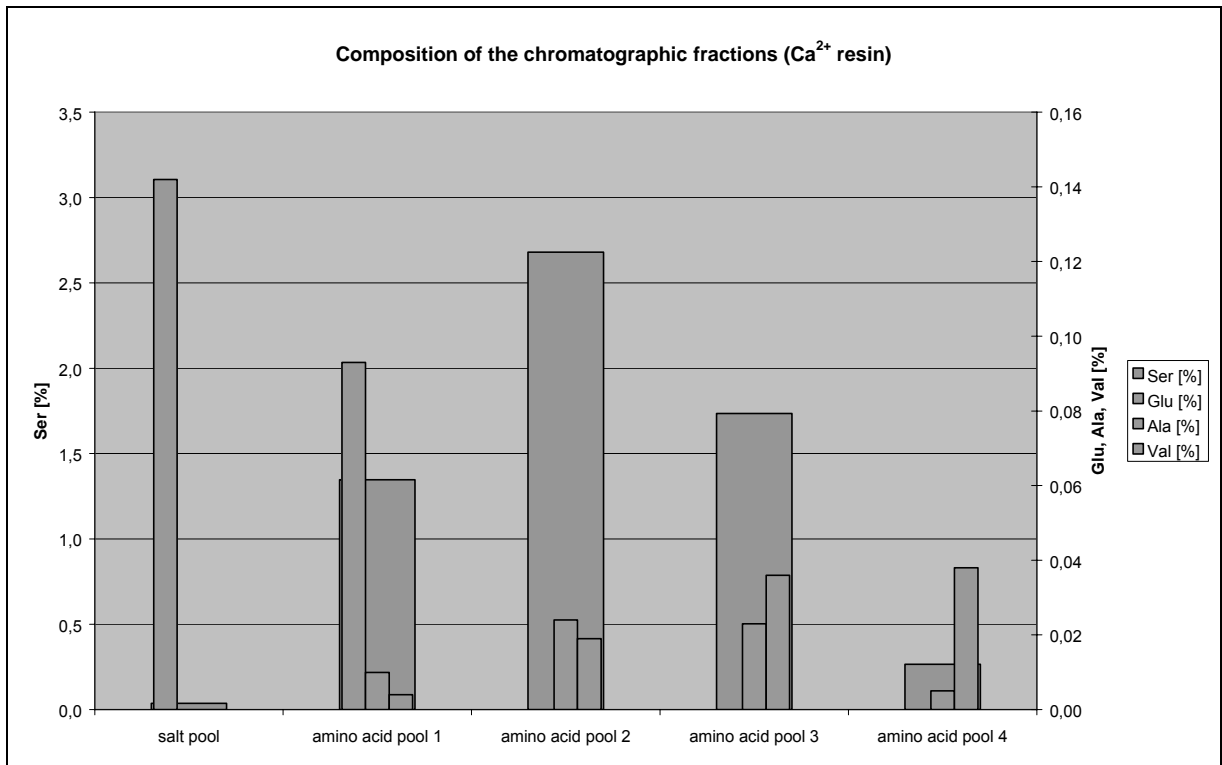


Abb. 22: Zusammensetzung der Fraktionen des Kationentauschers (Ca²⁺)

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass die Ionenausschluß-Chromatographie an Kationen-Austauscher in K⁺- Form sehr gut geeignet ist Glutaminsäure und Asche sowohl aus der salzhaltigen MS1 Mutterlauge als auch ggf. aus dem S1 zu entfernen. Die Ausbeute bezüglich des Serins ist mit 94% bezogen auf Serin als sehr gut einzustufen. Zur Abtrennung von Alanin und Valin ist die Methode allerdings weniger geeignet. Die Abtrennung dieser Aminosäuren kann über Kristallisation erfolgen. Das hier verwendete DSP-Verfahren ist somit geeignet Serin in Pharmaqualität herzustellen.

**Abschnitt III: Abschlussbericht der Metabolic Explorer S.A.
– Stoffflussanalyse**

1. Ergebnisse

Ziel der Arbeiten bei Metabolic Explorer in Clermont-Ferrand, Frankreich, war es zunächst, eine intrazelluläre Stoffflussanalyse des Produktionsstammes Ser1 ($\Delta sdaA::pglyA'(pserA^{fbrCB})$) unter Produktionsbedingung im Vergleich zur Nicht-Produktionsbedingung durchzuführen, um anhand dessen Aufschlüsse über mögliche Engpässe bzw. unerwünschte Abflüsse zu erhalten, die dann wieder zu einem verbesserten Produktionsstamm führen. Produktionsbedingungen wurden erreicht durch das Weglassen von IPTG, dem Induktor der *glyA*-Expression, was zu einer extrazellulären Akkumulation von Serin im Medium führt.

Tabelle 8: Metabolitkonzentrationen zu Beginn und Ende der Fermentation

	Ohne IPTG		Mit IPTG	
	C(t ₀)	C(t _{end})	C(t ₀)	C(t _{end})
Fermentationsvolumen	51.0 ml	46.0 ml	51.0 ml	47.5 ml
Biomasse	0.28 g/l	8.48 g/l	0.28 g/l	10.72 g/l
Glucose	276.7 mM	65.0 mM	276.7 mM	22.9mM
Succinat	0	1.7 mM	0	3.4 mM
Lactat	0	27.8 mM	0	50.0 mM
Acetat	0	8.3 mM	0	28.3 mM
Ethanol	23.9 mM	n.d.	26.1 mM	n.d.
Glutamat	0	< 0.1 mM	0	< 0.1 mM
Serin	0	46.4 mM	0	< 0.1 mM
Threonin	0	0.2 mM	0	n.d.
Alanin	0	3.5 mM	0	21.1 mM
Tyrosin	0	0.1 mM	0	0.1 mM
Valin	0	3.3 mM	0	4.9 mM
Leucin	0	0.2 mM	0	0.2 mM
Isoleucin	0	n.d.	0	0.2 mM
Lysin	0	0.6 mM	0	0.6 mM

n.d. nicht detektiert

Zwei 50 ml Batch-Experimente wurden durchgeführt und dienten der Erfassung von NMR-Daten und extrazellulärer Metabolit-Konzentrationen. Anhand der experimentellen Daten und einem Modell des Zentralstoffwechsels von *C. glutamicum* wurden intrazelluläre Flüsse kalkuliert.

Tabelle 8 zeigt extrazelluläre Metabolitkonzentrationen zu Beginn und am Ende der Fermentation des Stammes Ser1 unter Zugabe von oder ohne IPTG. Ohne IPTG Zugabe bildet der Stamm bis zum Ende der Fermentation (28 h) 46,4 mM Serin und geringe Mengen an Alanin (3,5 mM) und Valin (3,3 mM). Unter IPTG Zugabe wurden im Wesentlichen nur Alanin (21,1 mM) und Valin (4,9 mM) detektiert. Daneben wurden unter beiden Bedingungen auch größere Mengen an Laktat (27,8 mM ohne IPTG; 50 mM mit IPTG) und Acetat (entsprechend 8,3 mM und 28,3 mM) produziert.

Markierungsdaten der beiden Kulturen wurden aus den NMR-Spektren abgeleitet (nicht gezeigt) und in ein Flussmodell für *C. glutamicum* eingespeist. Da Serin möglicherweise über mehr als einen Stoffwechselweg zu Pyruvat abgebaut werden kann (s. Kapitel I), wurden Modelle getestet, die diesen Abbau einerseits erlauben oder andererseits verbieten. Ebenso wurde die Möglichkeit des Serinabbaus über Serinhydroxymethyltransferase (SHMT) zu Glycin erlaubt oder verboten. Aus der Kombination der beiden Möglichkeiten entstanden acht Modelle, die auf Ihre Validität geprüft wurden. Dabei werden die Modelle basierend auf der normalisierten Verteilung der Fehler (Differenz zwischen Modelwert und Messwert) und auf der Summe der quadrierten relativen Fehler bewertet. Es zeigt sich, dass eine gute Lösung des Modells den Abbau von Serin zu Glycin erfordert, da diese Option deutlich bessere Fehlerverteilungen und relative Fehlersummen (Σ der Fehlerquadrate: - IPTG=556/ + IPTG=878) liefert. Abbau von Serin zu Pyruvat bedingt keine deutliche Veränderung der beiden Modellparameter (Σ der Fehlerquadrate: - IPTG=562/+ IPTG=861).

Abbildung 23 und 24 zeigen exemplarisch die Stoffwechseldiagramme gezeigt, die Serin zu Glycin Abbau und Serin zu Pyruvat Abbau erlauben. Der Vergleich der beiden Flussanalysen zeigt, dass der Stamm Ser1 unter Produktionsbedingungen eine wesentlich höhere Citratzyklusaktivität aufweist (64% versus 23% des Glucose Importflusses). Interessanterweise beobachten wir das Gegenteil, betrachten wir den Glyoxylatzyklus (2% versus 6%). Der Serinproduktionsfluss ist unter beiden Bedingungen nahezu gleich. Das Modell ohne Serindeamination ergibt sogar eine Erhöhung um 11% unter nicht produzierenden Bedingungen (Daten nicht gezeigt). In beiden Fällen existiert ein deutlicher glykolytischer Fluss oder eine Serin zu

Pyruvat Umwandlung, die den glykolytischen Fluss ersetzt. Ethanol wurde als Lösungsmittel für Tetracyclin zugegeben.

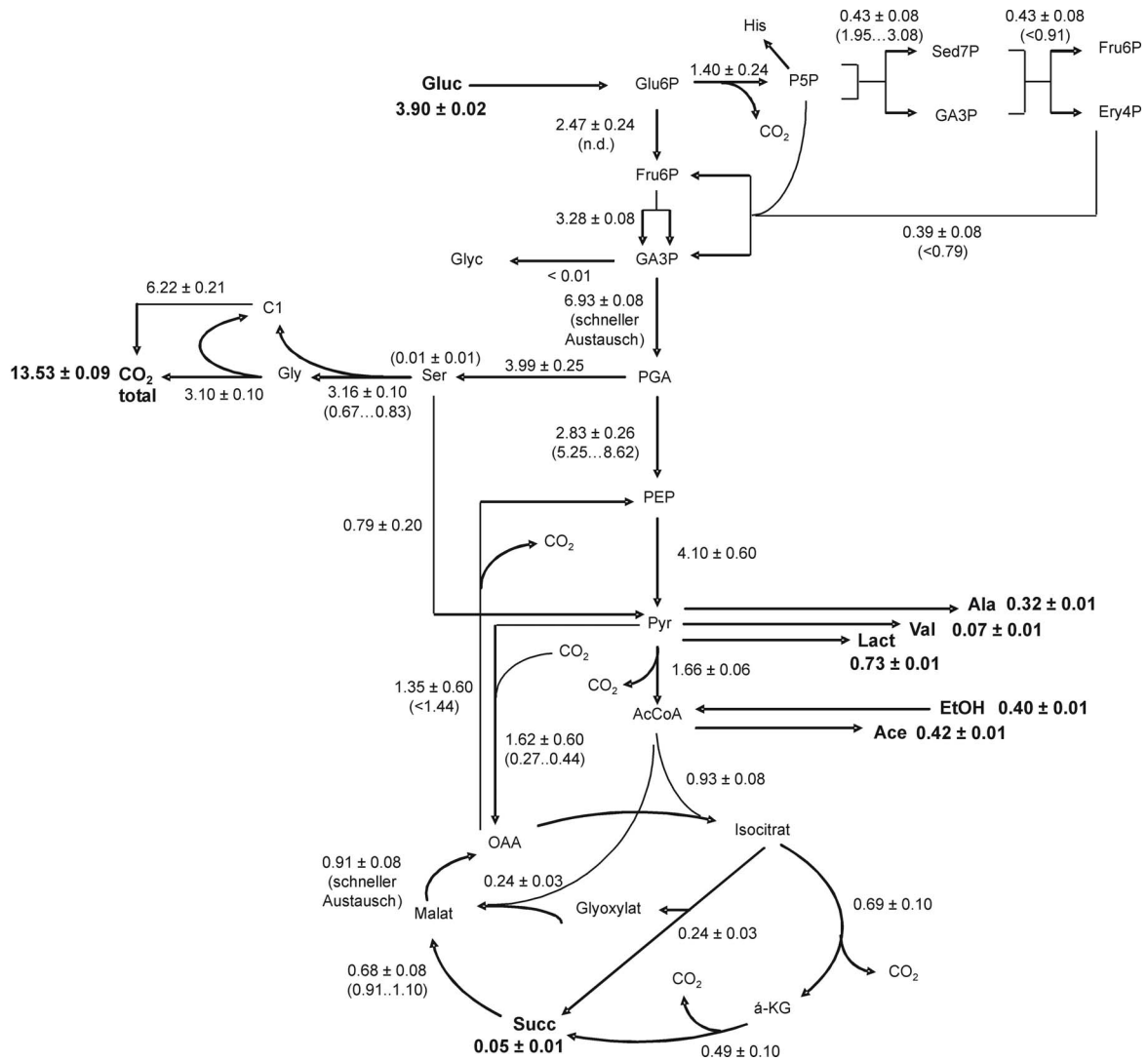


Abb. 23: Flussdiagramm der Fermentation mit IPTG, i.e mit funktioneller SHMT. Flussraten sind in mmol/g Tockengewicht / h angegeben. Fettgedruckte Metabolite und Flüsse sind extrazelluläre Flüsse. Austauschflüsse sind in Klammern angegeben. Die CO₂ Flussrate bezieht sich auf die gesamte CO₂ Produktion der Zelle.

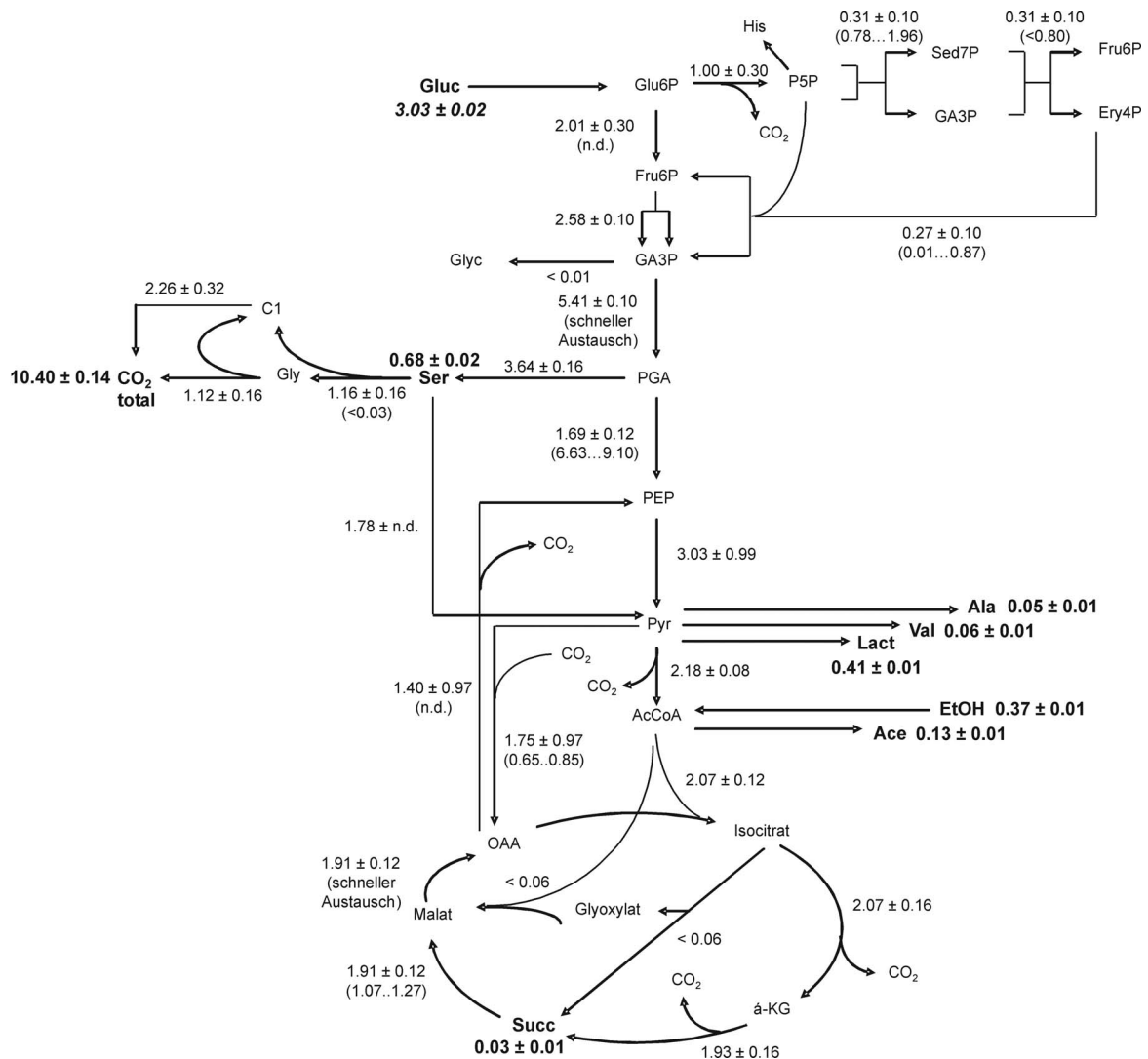


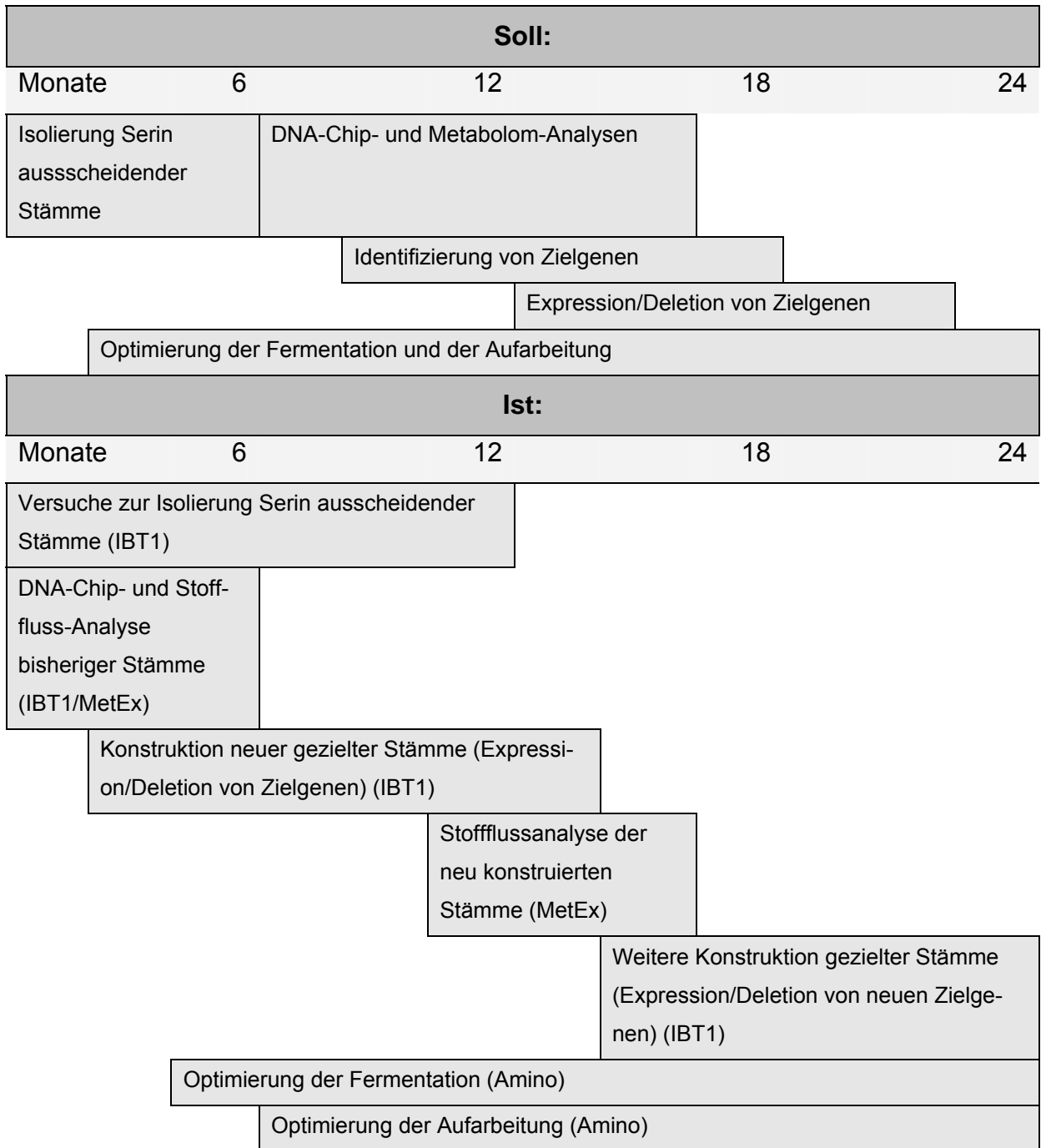
Abb. 24: Flussdiagramm der Fermentation ohne IPTG, i.e funktioneller SHMT. Beschreibungen sind wie in Abb.23.

2. Diskussion

Die deutlich erhöhte Citratzyklussaktivität unter Produktionsbedingungen könnte den Energiehaushalt der Zelle negativ beeinflussen und damit die Menge an synthetisiertem Serin verringern. Dieses Problem könnte entweder durch eine Reduktion der Citratzyklus Aktivität selbst oder eine Verringerung des glykolytischen Flusses ab der Phosphoglyceratemutase beseitigt werden. Letztere Glykolysemutanten könnten nicht nur den Energiehaushalt positiv beeinflussen, sondern auch direkt einen erhöhten Fluss in den Serin Biosyntheseweg erzwingen. Die Aktivitäten von

Phosphoglyceratmutase und Enolase sollten deshalb individuell oder in Kombination reduziert oder die Glykolyse an entsprechenden Stellen vollständig unterbrochen werden. Ein weiterer wichtiger Punkt betrifft den Abbau von Serin. Unser Model zeigt eindeutig einen sehr hohen Fluss in den Serin Biosyntheseweg unter Bedingungen, die zu keiner Serin-ausschleusung führen. Es muss also Stoffwechselwege geben, die das synthetisierte Serin abbauen. Unsere Daten zeigen, dass der Abbau von Serin zu Pyruvat bei weitem nicht ausreichend ist, um den Abbau des synthetisierten Serins zu erklären. In unserem Model haben wir vorausgesetzt, dass *C. glutamicum* ebenso wie *E. coli* Serin zu Glycin und dann weiter zu CO₂ abbaut. Alle Modelle, die Serinabbau bzw. Glycinabbau nicht zuließen, konnten nicht gelöst werden. Allerdings werden bei dem postulierten Serin- und Glycinabbau große Mengen an C1 Körpern produziert, die nicht durch den zellulären Bedarf allein konsumiert werden können. Da die Lösung der Modelle einen Konsum der C1 Körper verlangt, haben wir eine Umwandlung in CO₂ postuliert. Ob diese Umwandlung in *C. glutamicum* abläuft, ist derzeit nicht bekannt. Serin, Glycin und C1 Abbau verdienen also in jedem Fall weitere Untersuchungen. Um die Serinproduktion noch weiter zu steigern, könnte man versuchen die Aktivität der SHMT kontinuierlich niedrig zu halten, bzw. ihre Aktivität schon zu Beginn der Fermentation noch mehr zu drosseln. Ein Vergleich der Haushalts-Energien der Kulturen zeigt, dass die Serin produzierende Kultur einen deutlich höheren Energiebedarf (+ 5 mmol/g/h) hat als die Kultur die kein Serin produziert (nicht gezeigt). Dies könnte auf einen Energie verschwendenden Serin Import/ Export Kreislauf hinweisen. Laktat und Acetat Produktion können vermutlich durch bessere Sauerstoffversorgung reduziert werden. Ansonsten kann eine Expressionsverringernug der Laktatdehydrogenase oder anderer Laktat produzierender Stoffwechselwege in Betracht gezogen werden.

Soll/Ist-Vergleich



Wirtschaftlichkeits- und Umweltbetrachtungen

Die Amino GmbH erschließt neue Wege zur Gewinnung von Pharmaamino­säuren. und hat sich deshalb schon seit längerem im Bereich der biotechnologischen Herstellung von Aminosäuren engagiert und wird auch in Zukunft weiter in dieser Richtung diversifizieren. Aus der Sicht der Amino GmbH bietet dieses Konzept signifikante Vorteile wie (i) die schrittweise Überführung in die Unabhängigkeit von der Gewinnung von Aminosäuren aus pflanzlichen Rohstoffen, (ii) die Erreichung stabiler Produktausbeuten, sowie (iii) die Vermeidung von Umweltbelastenden Emissionen, die bei den bisher üblichen Extraktionsverfahren zwangsläufig anfallen.

Ein wesentlicher Schritt in diese Richtung ist die mikrobielle Produktion der auch ökonomisch wertvollen Aminosäure L-Serin, welche derzeit großtechnisch im Wesentlichen auf zwei Wegen gewonnen wird.

Einerseits wird L-Serin durch die Extraktion von Eiweißhydrolysaten isoliert. Die hierzu eingesetzte saure Hydrolyse erfordert zusammen mit der nachfolgenden chromatographischen Trennung einen sehr hohen Energie- und Chemikalieneinsatz (Abb. 14) und ist daher nur unter ökologisch und wirtschaftlich problematischen Rahmenbedingungen durchführbar. Es lässt sich abschätzen, dass in einem fermentativen Verfahren zur Gewinnung von L-Serin ausgehend von Glukose oder Saccharose als Kohlenstoff-Quelle bis zu 80 % weniger Wasser, 50 % weniger Energie und nahezu 100 % weniger schwerabbaubare Chemikalien benötigt werden als bei der sauren Hydrolyse. Bei einem derzeitigen Marktpreis von ca. 40 €/kg L-Serin erfolgt eine wirtschaftliche Produktion dieser Aminosäure in einem fermentativen Prozess ausgehend von Glukose ab einer etwa 3,5%igen Produktausbeute und einer 70%igen Aufarbeitungsausbeute.

Andererseits wird L-Serin durch Biotransformation oder fermentativ aus der Aminosäure Glycin gewonnen. Hierbei liefern 100 g/l Glycin und 48 g/l Methanol maximal rund 33 g/l L-Serin (Izumi *et al.*, 1993). Neben den hohen Kosten des Glycins (ca. 10-mal teurer als Glukose) ist dessen Herstellung aus Chloressigsäure leider relativ umweltbelastend.

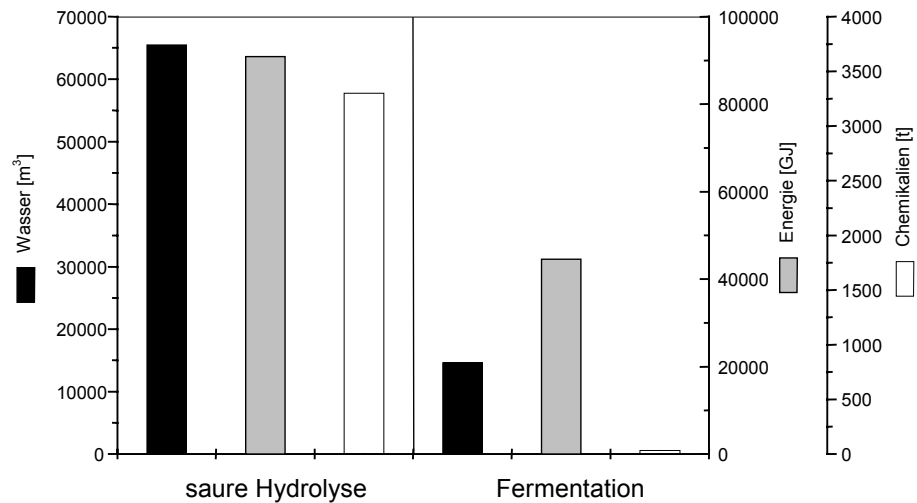


Abb. 25: Vergleich des Verbrauchs an Wasser, Energie und Chemikalien bei der herkömmlichen Extraktion von L-Serin aus proteinogenen Rohstoffen nach saurer Hydrolyse mit dem entsprechenden Verbrauch bei der fermentativen Gewinnung von L-Serin. Als Grundlage wurde eine Jahresproduktion von 30 t L-Serin angenommen (pers. Mitteilung Henning Serger, Universität Hannover).

Die optimierte fermentative Herstellung und Aufreinigung von Serin aus Zucker mittels metabolisch optimierter Corynebakterien ist das Ziel dieses Projektes und umfasst im Einzelnen:

- Die Optimierung der Raum-Zeit-Ausbeute, der Produktausbeute, des erreichbaren Titors und der Selektivität der Serinbildung (Minimierung der Nebenprodukte) durch metabolic engineering und Fermenterführung.
- Die Optimierung des down-stream-processing (DSP) durch Einführung einer innovativen Aufreinigungstechnik, d.h. direkte Produktabtrennung aus der Fermenterbrühe mittels kontinuierlichem Ionenaustausch und nachfolgende Kristallisation.

Wie oben gezeigt konnten mit dem Stamm „Ser1“ Produktivitäten von 1,4 g Serin /l h mit einem Titer von ca. 40 g/l Serin bei einer Produktausbeute von ca. 14% bezogen auf metabolisierten Zucker erreicht werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die bislang aus der Literatur bekannten Leistungsdaten nicht nur erreicht sondern klar übertroffen werden konnten, wobei das volle metabolische Optimierungspotential noch nicht ausgeschöpft ist. Darüberhinaus mussten zunächst die genetischen Instabilitäten des *glyA* Konstruktes beseitigt werden, was durch die Deletion der *pabABC* Gene auch gelang.

Die für eine wirtschaftliche Realisierung des Gesamtverfahrens notwendigen Mindestproduktivitäten (s.o.) konnten nicht nur erreicht sondern sogar deutlich überschritten werden. Hinsichtlich des DSP konnte das geplante innovative Extraktionsverfahren im Technikumsmaßstab erprobt und hinsichtlich des Chemikalienverbrauchs (Halbierung der Stickstoffemission durch Ammoniak) optimiert werden. Die Verfahrensausbeute liegt derzeit bei 90% bezogen auf die „salzarme“ Fraktion bei einer Gesamtausbeute bezogen auf das Gesamteluat von 100%. Es wird derzeit geprüft in wiefern die „Salzfraktion“, welche die restlichen 10% Serin enthält noch in die Aufreinigung integriert werden kann. Die befürchtete mögliche Seriodegradation durch alkalisch katalysierte Razemisierung konnte unter den gewählten Elutions- und Evaporationsbedingungen nicht beobachtet werden. Die variablen Herstellkosten betragen bis zu diesem Schritt ca. 5 €/kg Serin, davon entfallen 2,50 €/kg auf die Fermentation.

Die Kristallisationsausbeuten zum Endprodukt betragen ohne die Mutterlaugen-Rückführungen 66 - 68 %. Aus der Nebenproduktbilanz ergibt sich, dass der Gehalt an Alanin, Valin und Lysin deutlich unter 0,5% liegt und damit Pharmaanforderungen entspricht. Allerdings beträgt der Gehalt an Glutaminsäure 0,7 -0,8%. Eine Abreicherung der Glutaminsäure unter 0,5% kann durch eine vorgeschaltete Ionenausschluß-Chromatographie wie sie auch für die Mutterlaugen-Behandlung vorgesehen ist erfolgen. Somit konnte gezeigt werden, dass die Zielsetzung bezüglich eines ökonomisch und ökologisch überlegenen DSP erreicht werden konnte.

Fazit

In dem hier beschriebenen Projekt konnte ein fermentatives Verfahren entwickelt werden, mit dem es dem Industriepartner möglich ist, erstmals die Aminosäure L-Serin ausgehend von dem nachwachsenden Rohstoff Glukose bzw. Saccharose wirtschaftlich zu produzieren. Dies gelang vor allem aufgrund der engen Zusammenarbeit der drei Partner. So wurden schon früh Stämme aus dem Labor unter industrienahen Bedingungen analysiert. Das führte dazu, dass die Schwachstellen des Stammes durch eine weiterführende Stammentwicklung beseitigt werden konnten. Durch Stoffflussanalysen eines Stammes der ersten Generation gelang es Targets für diese Weiterentwicklung zu identifizieren.

Kooperation innerhalb des Projektes

1. Projekttreffen:

In regelmäßigen Abständen finden Treffen statt, an denen immer mindestens zwei der Kooperationspartner anwesend sind. Bei Bedarf wird der dritte Kooperationspartner per Telefon-Konferenz zugeschaltet.

05.02.04: IBT1 - MetEx in Clermont-Ferrand
02.06.04: IBT1 - Amino - TCI in Braunschweig
18.06.04: IBT1 - Amino - MetEx in Jülich
30.11.04: IBT1 - Amino in Jülich
11.02.05: IBT1 - MetEx in Clermont-Ferrand
14.04.05: Amino - MetEx in Clermont-Ferrand

Bei den Treffen wurden die Fortschritte der Arbeiten diskutiert und eine Planung für das weitere Vorgehen erarbeitet.

2. Austausch von Mitarbeitern:

Unabhängig von den Treffen stehen die Mitarbeiter des IBT1 in regelmäßigem telefonischen Kontakt zu den Mitarbeitern der Firmen Amino und MetEx, um aktuelle Fragen und Strategien zu diskutieren. Darüber hinaus hat Frau Dr. Tanja Gerharz von der Amino GmbH Untersuchungen zu Fermentationsproben am IBT1 durchgeführt. Herr Dipl. Ing. Michael Stolz (IBT1) hat im Rahmen seiner Doktorarbeit einen 2-wöchigen Forschungsaufenthalt bei der Amino GmbH in Braunschweig absolviert, um dort unter industrierelevanten Bedingungen die Eigenschaften der Produktionsstämme zu analysieren.

3. Engagement innerhalb des IC-Bio Verbundes:

Das Projekttreffen in Braunschweig, am 2.6.2004, wurde auch genutzt, um eine übergeordnete Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Scheper in Hannover (TCI) zu beginnen. Im Rahmen einer Diplomarbeit wurde die IPTG-abhängige Stabilität des *glyA*-Konstruktes im Stamm Ser1 untersucht.

Publikationen und Präsentationen:

1. Publikationen:

Peters-Wendisch, P., M. Stolz, H. Etterich, N. Kennerknecht, H. Sahm and L. Eggeling (2005) Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-Serine Production. Appl. Environ. Microbiol. (in press)

Netzer R., Peters-Wendisch, P., Eggeling L., and Sahm H. (2004) Co-metabolism of a Non-Growth Substrate: L-Serine Utilization by *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Environ. Microbiol. 70:7148-7155.

Peters-Wendisch P., Protsch C., Serger H., Sahm H., Faurie R., Ulber R. (2003) Biotechnologische Innovationen in der Aminosäure-Darstellung. Transkript Sonderheft: Nachhaltige Biokatalyse. p. 12-15.

Peters-Wendisch P, Eggeling L., Klößen B., Faurie R., Sahm H. (2003) Neue Wege zur Bioproduktion pharmazeutischer Wirkstoffe mit *Corynebacterium glutamicum*. Transkript Sonderheft: Nachhaltige Biokatalyse. p. 16-17

2. Vorträge und Poster:

P. Peters-Wendisch, M. Stolz, L. Eggeling, H. Sahm (2005) Biological basis for L-serine production: avoiding product degradation, Poster 19.5, Bioperspectives 2005, Wiesbaden.

Eggeling, L., P. Peters-Wendisch, M. Stolz und H. Sahm (2005) BioReality on strain engineering for L-serine production, Vortrag, Bioperspectives 2005, Wiesbaden.

Sahm, H., P. Peters-Wendisch, und L. Eggeling (2005) Entwicklung eines *Corynebacterium glutamicum*-Stammes für die L-Serin-Produktion, Vortrag, DECHEMA/GVC Vortrags- und Diskussionstagung „Systembiotechnologie für industrielle Prozesse“ 01.-04. Mai 2005, Braunschweig.

Peters-Wendisch, P., Stolz M., Etterich H., Eggeling L. und Sahm H. (2004) Metabolic engineering of an L-serine production strain, Poster P074, biocat2004, Hamburg.

Peters-Wendisch, Petra (2004) A concept for sustainable biotechnological amino acid production: The example L-serine. Vortrag, Bioperspectives 2004, Wiesbaden.