

Förderschwerpunkt Biotechnologie:
ChemBioTech (SP1):

**“Mikrodosiertechnik zur parallelen Optimierung der
biotechnischen Herstellung von Bernsteinsäure“
(AZ 13180)**

Projektbeginn: 01.08.2006

Laufzeit: 28 Monate + 6 Monate kostenneutrale Verlängerung

- Abschlußbericht -
31. August 2009

Projektpartner:

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Technische Universität München:
M.Sc. Gabi Gebhardt, Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz (Koordinator)

OrganoBalance GmbH:

Dipl.-Ing. Andreas Raab, Prof. Dr. Christine Lang

DASGIP AG:

Dipl.-Ing. Guido Ertel, Dr.-Ing. Matthias Arnold

AW-E:

Dr.-Ing. Klaus Kaufmann

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Anlass und Zielsetzung	4
3	Arbeitsschritte und angewandte Methoden	6
3.1	Grundkonzept der Stamm- und Prozessentwicklung zur Succinatproduktion mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
3.2	Konstruktion der rekombinanten Stämme	9
3.3	Etablierung der Analytik	12
3.4	Reaktionstechnische und metabolische Charakterisierung	13
3.4.1	Medien	13
3.4.2	Satzversuche im Schüttelkolben	15
3.4.3	Satzversuche im Bioreaktorblock	15
3.4.4	Zulaufversuche im Laborrührkessel im 1,2 L Maßstab	15
3.5	Ökoeffizienzanalyse	15
3.6	Entwicklung einer parallelen Mikrodosiertechnik	16
3.6.1	Anforderungen an eine parallele Dosiertechnik für das Bioreaktorsystem	16
3.6.2	Entwurf, Konstruktion und Evaluierung der Prototypen	17
3.6.3	Evaluierung der Dosiertechnik in Kultivierungen	18
4	Ergebnisse	19
4.1	Ökonomische und ökologische Bilanzierung eines Succinatproduktionsprozesses mit <i>S. cerevisiae</i>	19
4.2	Evaluierung erster Deletionsstämme und Nachweis der Succinatausschleusung	23
4.2.1	Charakterisierung der Einfach-Deletionsstämme	23
4.2.2	Nachweis der Ausschleusung von Succinat	24
4.2.3	Fazit der Untersuchung der Einfach-Deletionsstämme	26

4.3	Iterative Stammentwicklung- und charaktersisierung	29
4.3.1	Deletion der Succinatdehydrogenase	29
4.3.2	Reprimierbares Promotorsystem	31
4.3.3	Deletion der Succinat- und einer Isocitratdehydrogenase	35
4.3.4	Deletion der Succinatdehydrogenase und Deletion zweier Isocitratdehydrogenasen	36
4.3.5	Überexpression des transkriptionellen Regulationsfaktors HAP4 zur Glucosedereprimierung	37
4.3.6	Überexpressionen von Schlüsselenzymen im Glyoxylatzyklus in den sdh- und sdh-idh-Deletionsstämmen	39
4.3.7	Überexpressionen im Glyoxylatzyklus in den sdh-idh-idp-Deletionsstämmen	41
4.3.8	Fazit zur Stamm- und Prozessentwicklung	42
4.4	Nachweis der Grundfunktionalität der Mikropumpen	44
4.4.1	Entwurf und Fertigung eines skalierbaren Prototyps	44
4.4.2	Grundgedanken zum Dosieralgorithmus	45
4.4.3	Erster Prototyp der Ansteuerung	47
4.4.4	Evaluierung der Aktorik und Fluidik des 1xPrototyps	48
4.4.5	Redesign des 1xPrototyps	49
4.4.6	Charakterisierung der Mikropumpe im 1xPrototyp	49
4.5	Aufbau und Inbetriebnahme des 48xPrototyps der Mikrodosiertechnik	50
4.5.1	Entwurf und Fertigung des 48xPrototyps	50
4.5.2	Paralleler 48xPrototyp der Ansteuerung	53
4.5.3	Optimierung der 144x Ansteuerung der Dosierpumpen	54
4.5.4	Integration in das Prozessleitsystem	55
4.5.5	Inbetriebnahme und erstes Redesign	59
4.5.6	Charakterisierung des 48xPrototyps	59
4.5.7	Einsatz der Mikrodosiertechnik in Kultivierungen	60
4.5.8	Fazit	62
4.6	Soll-Ist-Vergleich	65

5	Sonstiges	67
5.1	Zusammenarbeit unter den Kooperationspartnern	67
5.2	Industrie-Kooperation	67
5.3	Patente	68
5.4	Öffentlichkeitsarbeit	68
6	Ausblick	70
7	Literatur	72
	Anhang	78
	Abkürzungsverzeichnis	78
	Anlagen	79

1 Zusammenfassung

Zielsetzung dieses Forschungs- und Entwicklungsvorhabens war zum einen die Entwicklung von *Saccharomyces cerevisiae* Bernsteinsäureproduzenten über gezieltes metabolisches Design des Zentralstoffwechsels. Zum anderen war die Entwicklung eines Mikrodosierkopfes für bis zu 48 parallele Bioreaktoren im Millilitermaßstab zur individuellen und sterilen, quasi-kontinuierlichen Dosierung von Substraten und Titrationsmittel im Nanoliter- bis Mikrolitermaßstab geplant, um die parallele Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Herstellung von Bernsteinsäure (Succinat) unter technischen Prozessbedingungen zu ermöglichen.

Zur Entwicklung einer parallelen Dosiertechnik wurde zunächst ein skalierbarer 1xPrototyp eines Mikrodosierkopfes für einen Milliliterbioreaktor in umfangreichen Simulationsstudien entwickelt, konstruiert und gefertigt. Mit diesem ersten Prototyp wurde die prinzipielle Funktionsfähigkeit der elektrischen „Aktuator“-Einheit in Kombination mit der sterilisierbaren „Dosier“-Einheit dieses Prototypen zur pulsgesteuerten Dosierung von Flüssigkeitsvolumina im 1 μL -Bereich nachgewiesen. Die Mikropumpe wurde umfassend charakterisiert. An Hand der Messergebnisse erfolgten mehrere Redesignschritte bis eine stabile, reproduzierbare Förderung der Mikropumpe über mehrere 100 Betriebsstunden erzielt wurde.

Basierend auf diesem optimierten 1xPrototyp wurde eine 48xMikrodosiertechnik mit 144 parallelen Mikropumpen für den Bioreaktorblock konstruiert, aufgebaut und evaluiert. Nach einer kurzen Redesignphase waren über 90% der Pumpen in diesem ersten Prototyp funktionstüchtig. Die durchschnittliche Förderung der Mikropumpen lag bei $1,6 \pm 0,28 \mu\text{L}$ pro Pumpenhub. Die Ansteuerung der 144 Mikropumpen im 48xPrototyp wurde mittels „Load Balancing“ optimiert und die Mikropumpen in die bestehende Prozessleitsoftware des Bioreaktorblocks fedbatch-XP eingebunden. Die 48xMikrodosiertechnik wurde bereits in ersten pH-geregelten Satz- und Zulaufversuchen eingesetzt.

Zur Produktion von Succinat mit *S. cerevisiae* wurde ein Konzept zur oxidativen Produktion von Succinat auf Glucose molekularbiologisch umgesetzt. Dazu wurde eine Strategie verfolgt, welche die Blockierung der Weiterverstoffwechslung des produzierten Succinats, sowie die Umlenkung des Kohlenstoffflusses über den Glyoxylatzyklus in Richtung Succinat umfasst. Diese Strategie wurde durch Repression bzw. Ausschaltung der Aktivitäten der Enzyme Succinat-Dehydrogenase

und Isocitrat-Dehydrogenase realisiert. Gleichzeitig wurden die Kernenzyme des Glyoxylatzyklus dereguliert, da diese in Anwesenheit von Glucose transkriptionell stark reprimiert sind (DeRisi *et al.*, 1997; Haurie *et al.*, 2001).

Zunächst stand der von den Gutachtern zusätzlich geforderte Nachweis, "dass der gewählte Produktionsorganismus in der Lage ist, Succinat in signifikanten Mengen unter bestimmten Bedingungen auszuschleusen" im Vordergrund. Hierzu wurden Deletionsstämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konstruiert, die im Vergleich zum Wildtyp größere Mengen an Bernsteinsäure produzierten und in den Kulturüberstand abgaben. Es konnte gezeigt werden, dass bereits ein Stamm mit nur einer Deletion bis zu $5,8 \text{ g L}^{-1}$ Succinat im Medium akkumulieren kann und dabei die zehnfache Menge des insgesamt produzierten Succinat in den Kulturüberstand sekretiert wird im Vergleich zur intrazellulären Anreicherung.

Im Verlauf der weiteren Stammentwicklung konnte, wie angestrebt, der Citratzyklus nach den Intermediaten Isocitrat und Succinat unterbrochen werden. Bei der rektionstechnischen Charakterisierung dieser *sdh2*- und *sdh1-sdh2*-Deletionsstämme zeigte sich eine erhöhte Succinatbildung. Im Zulaufverfahren wurden mit diesen ersten Deletionsstämmen Succinatkonzentrationen von bis zu $8,5 \text{ g L}^{-1}$ erzielt.

Als reprimierbares Promotorsystem zur Trennung eines Produktionsprozesses in Wachstums- und Produktionsphase wurde das tetO Promotorsystem erfolgreich etabliert und in den verwendeten Hefestämmen evaluiert.

Die im nächsten Schritt konstruierten Stämme mit einer zusätzlichen Deletion des Gens *IDH1* zeigten eine gegenüber den reinen *sdh*-Stämmen erhöhte Succinatbildung im Zulaufverfahren.

Der vollständige Verlust der Isocitratdehydrogenase-Aktivität durch zusätzliche Deletion des Gens *IDP1* führte zu einer Verstärkung des fermentativen Metabolismus.

Es wurde eine Vielzahl von Stämmen mit verschiedenen Kombinationen an homologen und heterologen Überexpressionen der Kernenzyme des Glyoxylatzyklus konstruiert. Eine partielle Deregulation des Glyoxylatzyklus wurde in *sdh2*-Deletionsstämmen erreicht.

Die Überexpression des globalen transkriptionellen Regulationsfaktors HAP4 führte zu einer Erhöhung der Wachstumsrate und einer verbesserten Succinatbildung unter Zulaufbedingungen.

Im Laufe der iterativen Stammentwicklung und -charakterisierung wurde eine Vielzahl an rekombinanten Hefestämmen mit Deletionen und Überexpressionen im Zentralstoffwechsel konstruiert und umfassend reaktionstechnisch und metabolisch charakterisiert. Es wurde damit eine grundlegende Basis für eine weitere Stamm- und Prozessentwicklung zur biotechnologischen Herstellung von Bernsteinsäure in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gelegt.

Mit Hilfe der Software Sabento wurde abschließend die Ökoeffizienz der mikrobiellen Succinatproduktion mit *Saccharomyces cerevisiae* bewertet.

2 Anlass und Zielsetzung

Jährlich werden 15 000 Tonnen Bernsteinsäure hauptsächlich durch chemische Prozesse aus fossilen Rohstoffen hergestellt und als Ausgangsstoff für Polyesterharze, Farbstoffe und Pharmazeutika verwendet (Zeikus *et al.* 1999). Die petrochemische Synthese von Bernsteinsäure, die Schwermetallkatalysatoren, hohe Temperaturen und hohe Drücke erfordert, erfolgt über die katalytische Hydrierung von Maleinsäureanhydrid oder Maleinsäure (Cornils und Lappe 2002). Auf Grund von ökologischen und ökonomischen Vorteilen besteht allerdings ein großes Interesse, diese Basischemikalie aus erneuerbaren Rohstoffen zu erzeugen. Hierfür bieten sich mikrobielle Produktionsverfahren an (McKinlay *et al.* 2007).

In jüngster Zeit wurden zahlreiche Studien zur Bernsteinsäureproduktion mit prokaryotischen Wildtyp- oder rekombinanten Mikroorganismen publiziert (Zeikus *et al.* 1999, Wendisch *et al.* 2006, McKinlay *et al.* 2007). Berichte zum Einsatz eukaryotischer Mikroorganismen zur Bernsteinsäureherstellung sind dagegen selten. Im Rahmen dieses Vorhabens wurde die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ausgewählt, um das Potential für die Herstellung von Bernsteinsäure auszuloten. Dieser gut charakterisierte eukaryontische Mikroorganismus, dessen Genom vollständig sequenziert ist und der als eukaryontischer Modellorganismus dient, ist ein industriell etablierter, robuster Produktionsorganismus in der Weißen Biotechnologie. *Saccharomyces cerevisiae* wird beispielsweise seit vielen Jahrzehnten zur Herstellung von Bioethanol industriell eingesetzt. Prozesstechnisch vorteilhaft sind die hohe pH- und Osmotoleranz, die guten Wachstumseigenschaften, das breite Substratspektrum und die relative Unempfindlichkeit gegenüber organischen Säuren (Nevoigt, 1997). Außerdem sind sämtliche Werkzeuge zur genetischen Optimierung etabliert. Daher ist *Saccharomyces cerevisiae* ein attraktiver Kandidat zur Entwicklung neuer biotechnologischer Prozesse zur Herstellung von Basischemikalien wie Succinat (Hansen und Kielland-Brandt, 1996 Ostergaard *et al.*, 2000).

Zielsetzung dieses Forschungs- und Entwicklungsvorhabens war die Entwicklung eines Bernsteinsäureproduktionsstammes basierend auf *Saccharomyces cerevisiae* über gezieltes metabolisches Design des Zentralstoffwechsels. Um die Vielzahl der rekombinanten Hefestämme, die im Rahmen der iterativen Stammentwicklung hergestellt werden unter prozesstechnischen Bedingungen zu evaluieren und zu

charakterisieren, wurde ein System aus parallelen Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab, bezeichnet als „Bioreaktorblock“, eingesetzt (Weuster-Botz *et al.* 2005).

Um Ausbeuteverluste durch den Crabtree-Effekt der Hefe bei der Produktion von Bernsteinsäure zu vermeiden und einen effizienten Prozess zu etablieren, muss die Bernsteinsäureproduktion im Zulaufverfahren erfolgen.

Hierzu war im Rahmen dieses Projekts eine Mikrodosiertechnik für das Milliliter-System neu zu entwickeln. Diese Mikrodosiertechnik soll in den 48 parallelen Bioreaktoren im Millilitermaßstab zur individuellen und sterilen, quasi-kontinuierlichen Dosierung von Substraten und Titrationsmittel im Nanoliter- bis Mikrolitermaßstab einsetzbar sein. Erst damit kann eine parallele Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Herstellung von Bernsteinsäure unter technischen Prozessbedingungen im Bioreaktorblock erfolgen.

Mit diesem Forschungsvorhaben soll ein Beitrag für die nachhaltige Bereitstellung des chemischen Zwischenprodukts Bernsteinsäure geleistet werden. Die Verwendung von nachwachsenden Rohstoffen zur Herstellung von Bernsteinsäure trägt zur Schonung endlicher fossiler Ressourcen bei. Eine wesentliche Umweltentlastung ist bei Ersatz der petrochemischen Synthese durch ein biologisches Verfahren aufgrund der Verwendung leicht abbaubarer nachwachsender Rohstoffe, hochaktiver und hochselektiver, sowie biologisch abbaubarer Biokatalysatoren, Verzicht auf organische Lösungsmittel und milden Reaktionsbedingungen mit geringem Energiebedarf zu erwarten.

3 Arbeitsschritte und angewandte Methoden

3.1 Grundkonzept der Stamm- und Prozessentwicklung zur Succinatproduktion mit *Saccharomyces cerevisiae*

Das Forschungsvorhaben strebte die Konstruktion eines mittels Metabolic Engineering optimierten Hefestammes an, welcher effizient Succinat im Kulturüberstand anreichert. Geplant war die Entwicklung eines zweistufigen Produktionsprozesses, bestehend aus einer Wachstumsphase und einer Produktionsphase. In der Wachstumsphase wird der Metabolismus in seiner Wildtyp-Konfiguration belassen, um optimales Wachstum zu gewährleisten, während anschließend in der Produktionsphase die Anreicherung von Bernsteinsäure aus primären Kohlenstoff-Quellen (z.B. Glucose) angeschlossen wird.

Bei der integrierten Stamm- und Prozessentwicklung handelt es sich um einen iterativen Optimierungsprozess, da im Laufe der Stammentwicklung immer wieder neue Mutanten unter unterschiedlichen Reaktionsbedingungen prozesstechnisch charakterisiert werden mussten.

Das Grundkonzept des Metabolic Design umfasst mehrere Deletionen und Überexpressionen zur Umlenkung des Kohlenstoffflusses des Zentralstoffwechsels in Richtung Succinat in der Produktionsphase und ist in Abbildung 3.1 skizziert. Es soll eine gezielte Umlenkung des Kohlenstoffflusses aus dem Citratzyklus in den Glyoxylatzyklus in Richtung Succinat erfolgen, sowie die Blockierung der Weiterverstoffwechslung des produzierten Succinats.

Der erste Schritt ist die Deletion des succinatabbauenden Enzyms Succinatdehydrogenase (SDH). Um Kohlenstoffverluste bei der Succinatbildung zu vermeiden, müssen die beiden Kohlendioxid freisetzenden Reaktionen des Citratzykluses umgangen werden. Dies erfolgt durch Ausschaltung der Isocitratdehydrogenaseaktivität zur Umlenkung des Kohlenstoffflusses in den Glyoxylatzyklus, einer verkürzten alternativen Variante des Citratzykluses.

Die Trennung des Prozesses in Wachstums- und Produktionsphase soll durch Repression verschiedener Enzymaktivitäten ermöglicht werden, indem die entsprechenden Gene, welche für diese Enzyme kodieren, deletiert werden. Sofern diese Gendeletionen zu starken Wachstumseinschränkungen führen, werden Stämme konstruiert, in welchen diesen Genen ein reprimierbarer Promotor vorgeschaltet wird, welcher während der Produktionsphase durch Zugabe eines Repressors reprimiert werden kann.

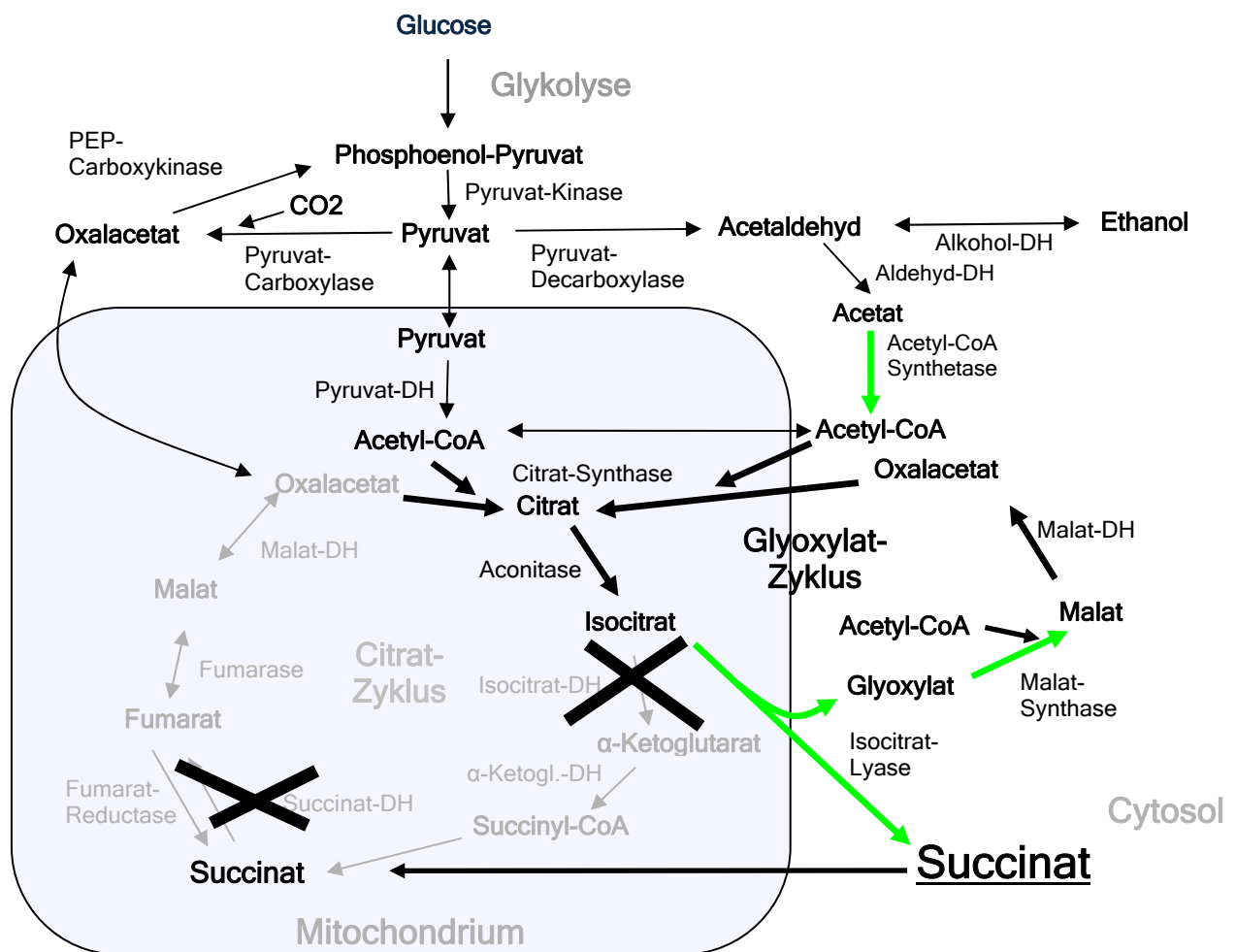


Abbildung 3.1: Zentralmetabolismus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, mit den zu deletierenden bzw. in der Produktionsphase auszuschaltenden Enzymaktivitäten (durch Kreuze markiert) und den zu deregulierenden Enzymaktivitäten (durch grüne Pfeile gekennzeichnet).

Die bevorzugte Kohlenstoffquelle von *S. cerevisiae* und das angestrebte Substrat für die Succinatproduktion ist Glucose. Allerdings kommt es in Gegenwart von hohen Glucosekonzentrationen in *S. cerevisiae* zur Glucoserepression, d.h. die Expression zahlreicher Enzyme, die an der Verwertung alternativer Kohlenstoffquellen beteiligt sind, und von Enzymen der Gluconeogenese, des Glyoxylatzykluses, des Citratzykluses und Atmungskette werden reprimiert (Duntze *et al.* 1969, Entian und Schüller, 1997, DeRisi *et al.* 1997).

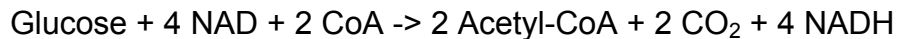
Für eine effiziente aerobe Succinatproduktion sind hohe Flüsse durch den respirativen Zentralstoffwechsel notwendig, daher ist eine Verminderung oder Aufhebung der Glucoserepression notwendig. Neben den Deletionen im Citratzyklus umfasst das Konzept zur Konstruktion eines Bernsteinsäure produzierenden Stamms

daher als zweiten Schritt eine systematische Identifizierung von Engpässen im Biosyntheseweg zum Succinat und die Überwindung dieser Engpässe durch transkriptionelle Deregulation der entsprechenden Gene. Dies erfolgt durch eine konstitutive Überexpression dieser Gene.

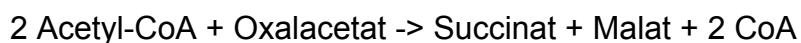
Die hier dargestellte Gesamtstrategie impliziert eine oxidative Succinatproduktion unter aeroben Bedingungen. Laut Lin *et al.* 2005a, 2005b und 2005c ist die aerobe Produktion von Bernsteinsäure den anaeroben Varianten überlegen, da hier keine Probleme mit der Redox-, sowie Energiebilanz auftreten und keine 2-phasigen Produktionsprozesse etabliert und angewendet werden müssen. Anaerobe Produktionsvarianten erfordern in der Regel zunächst eine Wachstumsphase unter aeroben Bedingungen zur effizienten Biomassebildung. Allerdings wird bei einer oxidativen Succinatproduktion unter aeroben Bedingungen kein CO₂ fixiert. Da die Vorteile der oxidativen Succinatproduktion jedoch überwiegen wurde diese metabolische Variante realisiert.

Dieser liegen folgende stöchiometrischen Gleichungen zu Grunde:

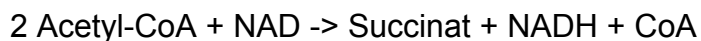
Glycolyse:



Glyoxylatweg:



Gesamtreaktion des Glyoxylatweges:



Bilanz aus Glyoxylatweg und Glycolyse:



Bei der aeroben Succinatbildung liegt die maximale theoretische Ausbeute somit bei 1 mol Succinat (mol Glucose)⁻¹. Da aerob keine CO₂-Fixierung erfolgt, muss Oxalacetat über Malat statt über Pyruvat regeneriert werden. Die Redoxbilanz wird durch Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor geschlossen.

3.2 Konstruktion der rekombinanten Stämme

Im Rahmen des Projektes wurden Stämme konstruiert, in welchen Gene, die für die Succinatdehydrogenase- und Isocitratdehydrogenase-Aktivität verantwortlich sind (*sdh1*, *sdh2*, *idh1*, *idp1*), in verschiedenen Kombinationen deletiert sind. Als Ausgangsstamm für die Einführung der Deletionen dient der Stamm AH22ura3. Dieser Stamm hat sich in früheren Projekten als robuster Produktionsstamm erwiesen, welcher insbesondere für das "Metabolic engineering" geeignet ist, da er sich gut genetisch verändern lässt und ein geeignetes Auxotrophiemuster für episomale Überexpressionen aufweist.

Das Enzym Succinat-Dehydrogenase (Sdhp) bildet den Komplex II der mitochondrialen Atmungskette und katalysiert die Oxidation von Succinat zu Fumarat und die Reduktion von Ubichinon (Coenzym Q) zu Ubichinol. Der heterotetramere Proteinkomplex besteht aus vier Untereinheiten: einem Flavoprotein (Sdh1p), einem Eisen-Schwefel-Protein (Sdh2p), einem Cytochrom b (Sdh3p) und einer Membran-"Anker"-Untereinheit (Sdh4p). Die Deletion des Gens *sdh1* in *S. cerevisiae* führt nicht zum vollständigen Verlust der Succinatdehydrogenase-Aktivität, da *S. cerevisiae* ein Genhomolog (*sdh1b*) aufweist, welches diese Deletion teilweise kompensiert (Colby *et al.*, 1998). Auch die Gene *sdh3* und *sdh4* weisen möglicherweise Homologe auf (Kubo *et al.*, 2000; Lemire und Oyedotun, 2002). In einer Studie von Kubo *et al.* 2000 war erst nach simultaner Deletion von *sdh1* und *sdh2* oder *sdh1* und *sdh1b* die Succinat-Dehydrogenase-Aktivität nicht mehr nachweisbar. Dagegen wird bei Arikawa *et al.* 1999 und Ciriacy 1977 beschrieben, dass bereits eine Deletion der Sdh1p-Untereinheit einen vollständigen Funktionsverlust der SDH zur Folge hat.

Die Isocitrat-Dehydrogenase katalysiert die Oxidation von Isocitrat zu α -Ketoglutarat und ist damit Teil des Citrat- und Glyoxylatzyklus. *Saccharomyces cerevisiae* weist vier Isoenzyme der Isocitrat-Dehydrogenase auf (Idhp, Idp1p, Idp2p, Idp3p). Das Hauptenzym Idhp ist ein Heterooctamer bestehend aus 2 Untereinheiten, welche durch die Gene *IDH1* und *IDH2* kodiert werden. Die Deletion jeweils einer Untereinheit führt zum vollständigen Verlust der Aktivität dieses Komplexes (Cupp und McAlister-Henn, 1991; Cupp und McAlister-Henn, 1992; Panisko und McAlister-Henn, 2001). Erst das Fehlen von Idhp und dem mitochondrialen, konstitutiv exprimierten Isoenzym Idp1p führt zu einer Glutamat-Auxotrophie auf Glucose, also

zu einem vollständigen Verlust der Isocitrat-Dehydrogenase Aktivität (McCammon und McAlister-Henn, 2003).

Um die entsprechenden Gene zu deletieren, wurden zunächst Deletionskassetten konstruiert, bestehend aus einem Gen zur Selektion von Integrations-Transformanten (Geneticin-Resistenz-Gen, *kanMX*), flankiert von 40 bp langen Sequenzbereichen, die homolog zum entsprechenden, zu deletierenden Ziellocus (*SDH2*, *IDP1* usw.) sind und die zielgerichtete Integration in das Hefegenom ermöglichen.

Nach Amplifikation der gesamten integrativen Genkassette mittels PCR, erfolgte eine Transformation, die zur zielgerichteten Integration der gesamten Kasette in das Hefegenom führte, wobei das Gen des entsprechenden Locus deletiert wurde. Positive Transformanten wurden über das integrierte Gen für die Geneticin Resistenz selektiert.

Abbildung 3.2 zeigt die molekularbiologische Umsetzung der Konstruktion der Deletionsstämme.

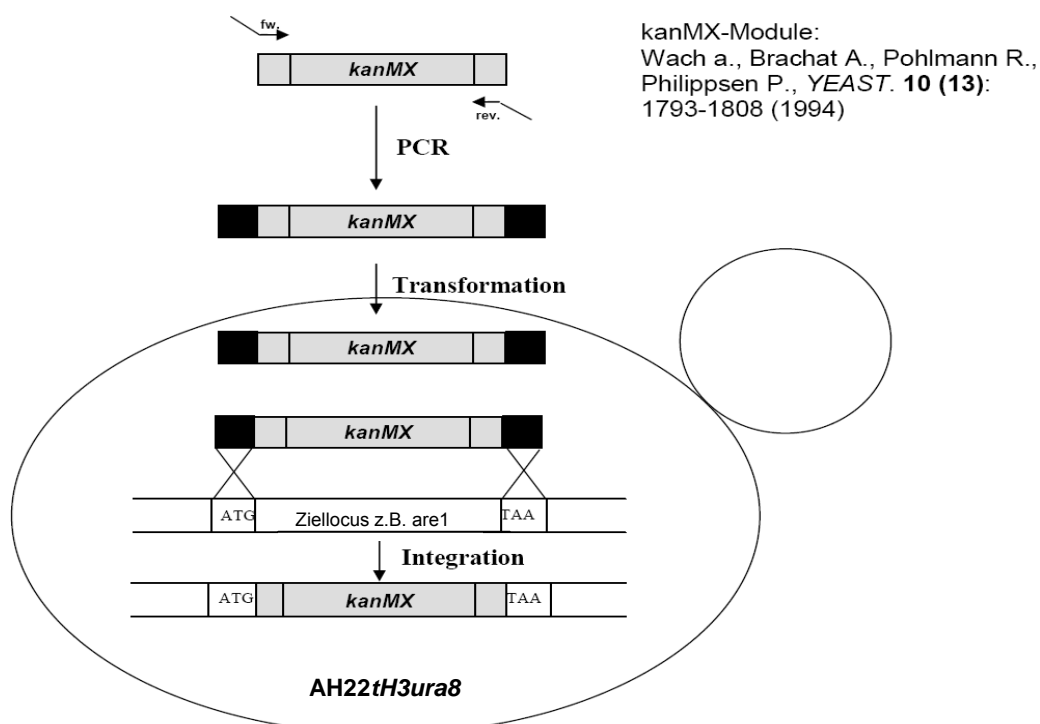


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der molekularbiologischen Umsetzung der Konstruktion Deletionsstämme.

Zur effizienten Succinatsynthese über den oxidativen Zentralmetabolismus ausgehend von Glucose muss das Succinat über den Glyoxylatzyklus gebildet werden, um den Verlust von 2 CO₂-Molekülen im Citratzyklus zu umgehen. Dies wird molekularbiologisch umgesetzt, indem die Engpässe im Biosyntheseweg zu Succinat über den Glyoxylatzyklus durch transkriptionelle Deregulation der entsprechenden Gene überwunden werden.

Nativ dient der Glyoxylatzyklus der Zelle zum Wachstum auf C₂-Körpern wie Acetat oder Ethanol und ist der erste Schritt der Gluconeogenese. Die Schlüsselenzyme, die den Glyoxylatzyklus vom Citratzyklus unterscheiden sind die Isocitratlyase und Malatsynthase. Der Citratzyklus ist in den Mitochondrien lokalisiert. Alle Reaktionen des Glyoxylatzyklus in der Hefe sind im Cytosol lokalisiert (McCammon *et al.* 1990; Regev-Rudzki *et al.* 2005; Duntze *et al.* 1969, Kunze *et al.* 2002), was eine metabolische Beeinflussung zur Ausbeute-Optimierung der Bernsteinsäure deutlich vereinfacht, da Probleme, die aus einem gegebenenfalls fehlgeleiteten Substratfluss resultieren könnten, auszuschließen sind

Das Kernenzym des Glyoxylatzyklus in *Saccharomyces cerevisiae* stellt, neben der Malat-Synthase, die Isocitrat-Lyase (Icl1p) dar, welche Isocitrat in den C₄-Körper Succinat und den C₂-Körper Glyoxylat spaltet.

Innerhalb eines Umlaufes des Glyoxylatzyklus werden 2 C₂-Moleküle (2 mal Acetyl-CoA) zu einem C₄-Molekül (Succinat) umgesetzt. Das dafür notwendige cytosolische Acetyl-CoA entsteht als Produkt der Umsetzung von Acetat durch die beiden Isoenzyme der Acetyl-CoA-Synthetase (Acs1p und Acs2p). Die meisten Gene des respirativen Zentralmetabolismus, also des Citrat- und Glyoxylatzyklus sind in Anwesenheit von Glucose reprimiert (DeRisi *et al.* 1997). Besonders stark reprimiert sind hier vor allem die Gene des Glyoxylatzyklus. Für die Derepression dieser Gene ist hauptsächlich der transkriptionelle Aktivator Cat8p verantwortlich, ein Zinkfingerprotein, welches im Promotorbereich bindet und die Expression induziert (Hedges *et al.*, 1995). Cat8p reguliert die Gene *ICL1*, *MLS1*, *ACS1* (Haurie *et al.*, 2001; Tachibana *et al.*, 2005), welche auch die Zielgene für eine transkriptionelle Deregulation im Rahmen des vorliegenden Projektes darstellen.

Zur transkriptionellen Deregulation wurde die kodierende Region dieser Gene aus genomischer DNA des Stammes S288c amplifiziert. Über entsprechende Primer wurden diese Gensequenzen mit Restriktionslinkern versehen, um eine Klonierung in die pFlat Vektorserie von ORGANOBALANCE zu ermöglichen. Die pFlat Vektorserie

besteht aus gleichartig konstruierten Shuttlevektoren, welche sich jeweils durch den Hefeselektionsmarker unterscheiden. Es stehen die vier folgenden Selektionsmarker zur Verfügung: URA3, LEU2, HIS3, kanMX. Abbildung 3.3 zeigt exemplarisch den Vektor pFlat3.

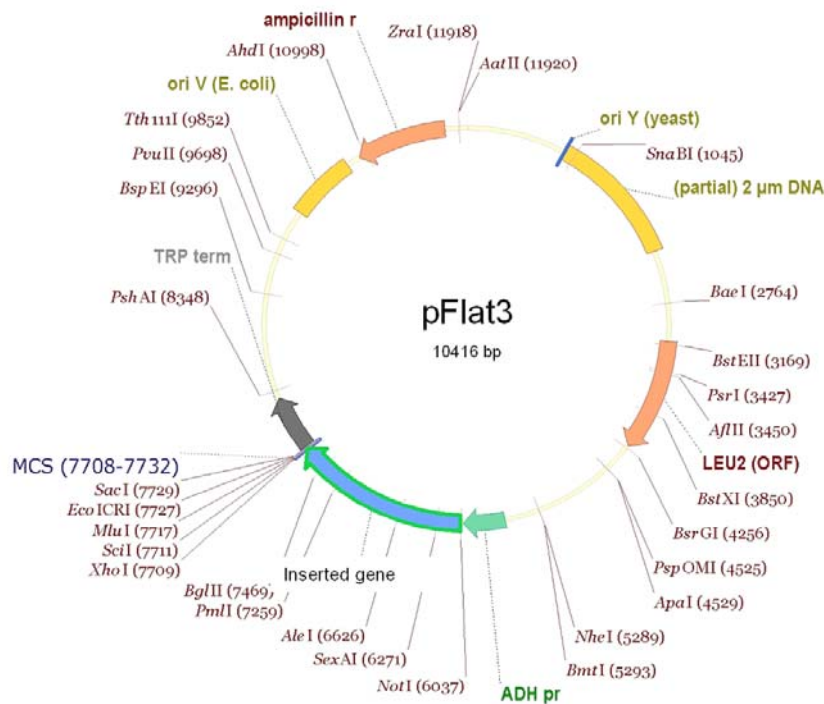


Abbildung 3.3: Hefeexpressionsvektor pFlat3 von ORGANOBALANCE. "Single-cutting" Restriktionsenzyme sind angegeben.

Die pFlat Vektoren tragen den TRP1 Terminator und eine modifizierte Version des ADH1 Promotors (Lang und Looman, 1995), welcher eine starke, konstitutive von Ethanol und Glucose unabhängige Expression des insertierten Gens gewährleistet. Die im Rahmen dieses Projektes klonierten Gene wurden über eine Not1 und Xho1 Schnittstelle in die pFlat Vektoren integriert. In AH22ura3, dem Basisstamm zur Succinatproduktion, ist auf Grund des Auxotrophiemusters die maximale Anzahl an pFlat-Plasmiden auf 3 festgelegt, so dass nicht mehr als 3 Überexpressionen parallel möglich waren.

3.3 Etablierung der Analytik

Die grundlegende Voraussetzung für alle weiteren Schritte im Rahmen der Stammentwicklung und -evaluierung war die Etablierung umfassender analytischer Methoden zum Nachweis des Substrats Glucose, des Produkts Succinat und

relevanter Nebenprodukte wie Ethanol, Glycerin und verschiedener organischer Säuren. Im Rahmen der metabolischen Studien mussten auch Methoden mit ausreichender Sensivität zur Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen etabliert werden.

Folgende Methoden wurden etabliert:

- HPLC-Analytik für organische Säuren (TUM)
Die Säule Aminex HPX-78H und 5 mM Schwefelsäure als Laufmittel wurde zur Bestimmung von Succinat, Acetat, Glycerin, Ethanol und verschiedener Zucker wie Glucose oder Galactose verwendet.
- LC-MS (TUM)
Die sensitivere LC-MS-Methodik (Link *et al.* 2008) diente zur Bestimmung intrazellulärer Metabolite. Bestimmt werden können organische Säuren und Verbindungen aus dem Energiestoffwechsel wie NAD oder ATP.
- Enzymtests für Glutamat (TUM)
Die Bestimmung von Glutamatkonzentration erfolgte enzymatisch mit einem Test der Firma R-Biopharm (Test Nr. 10139092035), der für den Einsatz in einer Mikrotiterplatte modifiziert wurde.
- HPLC-Analytik für organische Säuren (OB)
Mit der Säule Supelco Ascentis Express RP-Amide (Laufmittel: 99% 20 mM NaH₂PO₄ und 1% Acetonitril) wurde Succinat, 2-Oxoglutarat, Malat, Oxalacetat, Fumarat und Citrat bestimmt.
- GC-MS (OB)
Eine GC/MS Methode zur Bestimmung von Ethanol, Acetat und Glycerin, sowie eine weitere GC/MS Methode zur Bestimmung von organischen Dicarbon- und Aminosäuren nach Derivatisierung mit Methylchloroformiat wurden etabliert.

3.4 Reaktionstechnische und metabolische Charakterisierung

3.4.1 Medien

Zur umfassenden Charakterisierung der rekombinaten Stämme wurden diese in verschiedenen Medien charakterisiert. Die Konzentration der Kohlenstoffquelle betrug soweit nicht anderes angegeben in allen Versuchen 50 g L⁻¹ Glucose. Abhängig von den Auxotrophien bzw. der Antibiotikumresistenz des Stammes erfolgten entsprechende Zugaben an essentiellen Substanzen (Uracil, Methionin,

Leucin, Histidin) und Antibiotikum (Geneticin). Alle Kultivierungen erfolgten unter aeroben Bedingungen bei 30°C.

Folgende Medien wurden eingesetzt:

- CSL-Medium (Corn Steep Liquor 2% (v/v), 20 g L⁻¹ Pepton aus Casein, 10 g L⁻¹ Hefeextrakt)

CSL ist ein komplexes Medium für Hefen. Durch die im Corn Steep Liquor enthaltenen Partikel kann die Bestimmung der Biomasse verfälscht werden. Daher wurde nach ersten Versuchen stattdessen YEPD-Medium als komplexes Medium verwendet.

- YEPD-Medium (20 g L⁻¹ Pepton aus Casein, 10 g L⁻¹ Hefeextrakt)

YEPD ist ein komplexes Standardmedium für Hefen.

- WM8VIII-Medium (Lang und Loomann, 1995)

Reichhaltiges definitives Medium, das als Stickstoffquelle 8,7 g L⁻¹ Glutamat enthält. Da Glutamat über Ketoglutarat und Succinyl-CoA direkt in Succinat umgewandelt werden kann führt Glutamat zu einer erhöhten Succinatbildung der Hefe (Kleinzeller 1941, Oura 1977).

- WM8VIII A-Medium

Das WM8VIII A-Medium ist vom WM8VIII-Medium abgeleitet. Die organische Stickstoffquelle Glutamat wurde äquimolar gegen die anorganische Stickstoffquelle Ammoniumsulfat ausgetauscht. Da nach dem Austausch der Stickstoffquelle die Pufferkapazität des Medium zu gering war wurde ergänzend ein 0,4 molarer Kaliumphosphatpuffer zugesetzt. Dieses definierte Medium, dessen Start-pH bei 6,5 lag, wurde für alle Vorkulturen eingesetzt.

- Hoek-Medium (Hoek *et al.* 2000)

Beim definierte Medium nach van Hoek *et al.* 2000 mit Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle handelt es sich um ein spezielles Medium für Zulaufversuche. Neben einen Satzmedium beschreiben van Hoek *et al.* 2000 auch ein abgestimmtes Zulaufmedium, das neben Salzen und der Kohlenstoffquelle Glucose auch Vitamine und Spurenelemente enthält, um Limitierungen auch in Hochzelldichtekultivierungen zu vermeiden. Das Medium besitzt einen Soll-pH von 5 und ist kaum gepuffert. Daher kann es nicht ohne pH-Regelung eingesetzt werden.

3.4.2 Satzversuche im Schüttelkolben

Die Evaluierung aller konstruierten Stämme im Schüttelkolben unter standardisierten Bedingungen sollte Basisdaten für die Anzucht der Vorkulturen und die Kultivierung im Rührkesselreaktor liefern.

Die aeroben Satzversuche im Schüttelkolben erfolgten nach einem standardisierten Schema. Kultiviert wurde für 6 Tage in 0,5 L Kolben mit 50 mL Medium bei 30°C, 250 rpm und einer Exzentrizität von 5 cm. Die Startzellichte betrug OD 0,1. Durch die lange Versuchsdauer konnte auch der bei einigen rekombinanten Stämmen sehr langsame Ethanolverbrauch betrachtet werden.

3.4.3 Satzversuche im Bioreaktorblock

Zur effizienten Analyse der Vielzahl der rekombinanten Stämme wurde das bei TUM entwickelte automatisierte, parallele Milliliter-Bioreaktorsystem, das als Bioreaktorblock bezeichnet wird, eingesetzt (Weuster-Botz *et al.* 2005; Puskeiler *et al.* 2005). Die aeroben Satzversuche im Bioreaktorblock dienten vor allem der Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der Stämme. Die rekombinanten Stämme wurden im 3-fach Ansatz im definierten Medium WMVIII A mit Ammonium als Stickstoffquelle und WMVIII mit Glutamat als Stickstoffquelle, sowie YEPD als Komplexmedium durchgeführt. Alle Versuche wurden mit einer OD von 0,1 begonnen und liefen für 48 h.

3.4.4 Zulaufversuche im Laborrührkessel im 1,2 L Maßstab

Aerobe Satz- und Zulaufversuch erfolgten in einem Rührkesselreaktor im 1,2 L Maßstab im Hoek-Medium mit beidseitiger pH-Regelung. Nach zweitägiger Satzphase folgt gewöhnlich eine eintägige Zulaufphase mit dem Hoek-Zulaufmedium und einer Dosierate von $0,7 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ h}^{-1} \text{ L}^{-1}$. Alle Versuchsdaten aus den Zulaufversuchen sind volumenkorrigiert dargestellt.

3.5 Ökoeffizienzanalyse

Eine ökonomische und ökologische Bewertung des geplanten Succinatproduktionsprozesses erfolgte mit der kommerziell erhältlichen Software Sabento (Version 1.2.0.316) der Firma ifu Hamburg GmbH als zusätzliches Arbeitspaket. Mit diesem Programm war es möglich, alle beteiligten Stoffe, Prozessschritte sowie Stoff- und Energieströme zu erfassen.

3.6 Entwicklung einer parallelen Mikrodosiertechnik

3.6.1 Anforderungen an eine parallele Dosiertechnik für das Bioreaktorsystem

Zur Analyse der Vielzahl an rekombinanten Hefestämmen und zur Optimierung der Reaktionsbedingungen ist die Durchführung von kontrollierten Parallelexperimenten in großer Anzahl im Zulaufverfahren erforderlich.

Das am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik entwickelte Bioreaktorsystem zur Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklung, bestehend aus 48 parallelen Rührkesselreaktoren, wird über einen Pipitierroboter mit 8 Dosierstrecken mit Substrat und Titrationsmitteln versorgt. Zudem ist die Probennahme und –verarbeitung über den Pipettierroboter realisiert. Durch die Nutzung des Pipettierroboters können Substrate und Titrationsmittel jedoch nur intermittierend zugegeben werden (Weuster-Botz *et al.* 2005).

Um ein Arbeiten im Bioreaktorsystem unter kontinuierlichen Zulaufbedingungen zu ermöglichen wurde im Rahmen dieses Projekts eine Mikrodosiertechnik für das Milliliter-System entwickelt. Diese Mikrodosiertechnik soll in den 48 parallelen Bioreaktoren im Millilitermaßstab zur individuellen und sterilen, quasi-kontinuierlichen Dosierung von Substraten und Titrationsmittel im Nanoliter- bis Mikrolitermaßstab eingesetzt werden, um zusammen mit dem Bioreaktorsystem die parallele Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Herstellung von Bernsteinsäure unter technischen Prozessbedingungen zu ermöglichen.

Folgende Anforderungen wurden an das neue Dosiersystem gestellt:

- Förderung von $\sim 1 \mu\text{L}$ pro Pumpenhub.
- Bereitstellung von 3 Pumpen pro Reaktor:
Eine Mikrodosiertechnik für das Bioreaktorsystem muss daher über $3 \times 48 = 144$ Pumpen verfügen. Je 48 Mikropumpen sollen über eine zentrale Substratzuführung versorgt werden.
- Kompakte Bauweise:
Um auch beim Einsatz der Mikrodosiertechnik ein Probenahme durch einen Pipettierroboter zu ermöglichen, ist die Höhe der Mikrodosiertechnik mit ihren 144 unabhängigen Pumpen begrenzt. Inklusive der in die Dosiertechnik zu integrierenden Sterilgasabdeckung darf die Höhe maximal 4,5 cm betragen.
- Verwendung von Materialien für alle Medien berührende Komponenten mit den entsprechenden erforderlichen Zulassungen (z.B. FDA).

- Dampfsterilisierbarkeit der Dosiereinheit.
- Physikalische Entkopplung von Antriebseinheit von der Dosiereinheit, um die Dampfsterilisierbarkeit der Dosiereinheit zu ermöglichen.

3.6.2 Entwurf, Konstruktion und Evaluierung der Prototypen

Die Entwicklung einer parallelen Mikrodosiertechnik für bis zu 48 parallele Bioreaktoren im Millilitermaßstab zur individuellen und sterilen, quasi-kontinuierlichen Dosierung von Substraten und Titrationsmittel im Nanoliter- bis Mikrolitermaßstab erfolgte schrittweise über mehrere Prototypen.

Der prinzipielle Aufbau einer Dosiereinheit besteht aus zwei Mikroventilen und einer Mikromembranpumpe. Als dampfsterilisierbare und chemikalienresistente Materialien für die Dosiertechnik wurden Silikon, PEEK und Edelstahl verwendet.

Der erste Prototyp einer Dosiereinheit wurde basierend auf umfangreichen Simulationsstudien entworfen. Jede zunächst auch provisorische Änderung des ersten Prototyps wurde im Sinne eines ‚rapid-redesigns‘ sofort experimentell verifiziert und in Bezug auf die gewünschte Problemlösung beurteilt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die eigentliche parallele Mikrodosiereinheit für den Bioreaktorblock mit 48 parallelen Reaktionsgefäßen konstruktiv festgelegt.

Neben der Dosiereinheit wurde ein Antriebskonzept für die Aktorik einer von der Dosiereinheit entkoppelbaren Antriebseinheit festgelegt und entsprechende Prototypen gefertigt, sowie ein Programm zur Ansteuerung der Antriebseinheit erstellt.

Die Förderung der Dosierpumpen wurde gravimetrisch mit einer über PC auslesbarer Feinwaage bestimmt. Als Standardsubstrat wurde destilliertes Wasser eingesetzt.

Der Schwerpunkt der Untersuchung lag auf folgenden Parametern:

- Dosiergenauigkeit und Reproduzierbarkeit
- Förderleistung der Dosierpumpen
- Stabilität der Mikropumpen
- Förderung nicht viskoser und viskoser Flüssigkeiten
- Reinigbarkeit und Sterilisierbarkeit

Als viskose Modellflüssigkeit wurde Glycerin in Wasser eingesetzt. Die Viskosität wurde mit einem Rotationsviskosimeter bestimmt.

3.6.3 Evaluierung der Dosiertechnik in Kultivierungen

Zur Evaluierung wurde der 48xPrototyps der Dosiertechnik in Kultivierungen mit *S. cerevisiae* eingesetzt. Die aeroben Kultivierungen erfolgten im YEPD-Medium mit der Wildtyphefe AH22ura3 pFlat3.

Die Steuerung der Kultivierung erfolgte über die Prozeßleitsoftware fb-XP, die bislang Zudosierungen und eine pH-Regelung mittels eines PID-Reglers über den Pipettierroboter ermöglichte. Im Laufe dieses Projekts war auch die parallele Dosiertechnik in die fb-XP eingebunden worden war.

Zur pH-Regelung wurden 2 M Natronlauge und 8,5 %ige Phosphorsäure eingesetzt. In Zulaufversuchen hatte die Dosierlösung eine Glucosekonzentration von 100 g L^{-1} . Alle Zudosierungen erfolgten über den Prototyp der Dosiertechnik, die at-line Probennahme und Analyse per Pipettierroboter.

4 Ergebnisse

4.1 Ökonomische und ökologische Bilanzierung eines Succinatproduktionsprozesses mit *S. cerevisiae*

Eine ökonomische und ökologische Bewertung des geplanten Succinatproduktionsprozesses mit *S. cerevisiae* erfolgte als zusätzliches Arbeitspaket mit der Software Sabento (Version 1.2.0.316), da diese an der TUM bereits verfügbar war.

Im Moment werden jährlich 15 000 Tonnen Bernsteinsäure aus fossilen Rohstoffen produziert und als Ausgangsstoff für Polyesterharze, Farbstoffe und Pharmazeutika verwendet (Zeikus *et al.* 1999). Die chemische Synthese erfolgt durch katalytische Hydrierung von Maleinsäureanhydrid zu Bernsteinsäureanhydrid und nachfolgender Wasseranlagerung bzw. durch direkte katalytische Hydrierung von Maleinsäure. Zur effizienten katalytischen Hydrierung von Maleinsäure oder Maleinsäureanhydrid sind Schwermetallkatalysatoren in organischen Lösungsmitteln bei hohen Temperaturen und hohen Drücken (bis 2,5 MPa) erforderlich.

Biotechnologisch produziertes Succinat gilt als attraktiver Kandidat, um als Plattformchemikalie zum Ersatz petrochemisch produzierter Bulkchemikalien zu dienen (McKinlay *et al.* 2007, Sauer *et al.* 2008). Das Marktpotential von „Bio-Succinat“ wird auf 270 000 Tonnen pro Jahr geschätzt (Sauer *et al.* 2008).

Mit diesem Forschungsvorhaben sollte ein Beitrag für die Entwicklung von Prozessen zur nachhaltigen Bereitstellung des chemischen Zwischenprodukts Bernsteinsäure geleistet werden. Die Verwendung von nachwachsenden Rohstoffen wie Glucose oder Glucosesirup zur Herstellung von Bernsteinsäure trägt zur Schonung endlicher fossiler Ressourcen bei. Eine wesentliche Umweltentlastung ist bei Ersatz der petrochemischen Synthese durch ein biologisches Verfahren aufgrund der Verwendung leicht abbaubarer nachwachsender Rohstoffe, hochaktiver und hochselektiver, sowie biologisch abbaubarer Biokatalysatoren, Verzicht auf organische Lösungsmittel und milden Reaktionsbedingungen mit geringem Energiebedarf zu erwarten.

Da die Produktion von Succinat im Moment größtenteils chemisch erfolgt, müsste der biotechnologische Succinatproduktionsprozess mit *S. cerevisiae* mit der chemischen Synthese verglichen werden. Da mit Sabento keine chemischen Synthesen betrachtet werden können, wurden stattdessen ausgewählt publizierte Ansätze zur

Succinatproduktion mit dem geplanten Hefeprozess verglichen (Tabelle 4.1). Hierfür wurden folgende Prozesse gewählt:

- aerober Produktionsprozeß nach Lin *et al.* 2005 mit einem gentechnisch veränderten *Escherichia coli*

Das bei Lin *et al.* 2005 beschriebene Konzept zur aeroben Succinatprouktion ähnelt dem mit Hefe geplanten Prozess.

- anaerober Produktionsprozess mit *Corynebacterium glutamicum* nach Okino *et al.* 2008

Mit dem gentechnisch modifizierten *Corynebacterium glutamicum* wurde mit ~ 150 g L⁻¹ Succinat die bislang höchste Succinatkonzentration erreicht.

Die Zielsetzung mit einem optimierten Hefeproduktionsstamm ist die Entwicklung eines Prozesses mit einer Ausbeute von 0,6 g Succinat (g Glucose)⁻¹, einer Produktkonzentrationen von über 100 g L⁻¹ bei einer Raumzeitausbeute von 5 g L⁻¹ h⁻¹.

Tabelle 4.1: Prozessparameter ausgewählter biotechnologischer Ansätze mit rekombinaten Mikroorganismen zur Succinatproduktion

Mikroorganismus	<i>E. coli</i>	<i>C. glutamicum</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Prozessdauer, h	59	46	20
Eingesetztes Substrat Glucose, g L ⁻¹	~95 + CO ₂ - Fixierung	~100 + CO ₂ - Fixierung	170
Endkonzentration an Succinat, g L ⁻¹	58	146	100
Ausbeute mol Succinat (mol Glucose) ⁻¹	0,94	1,4	1
Raumzeitausbeute, g L ⁻¹ h ⁻¹	1,1	3,2	5
Durchschnittliche Biomassekonzentration, g L ⁻¹	?	50	50
Temperatur, °C	37	33	30
Quelle	Lin <i>et al.</i> 2005	Okino <i>et al.</i> 2008	Geplanter Produktionsprozess

Die ökonomische Bilanzierung erfolgte für eine Produktion 1 500 t pro Jahr (entsprechend 10 % der aktuellen jährlichen Produktion (Zeikus *et al.* 1999)) und einen Zeitraum von 10 Jahren. Dabei wurde auch die Anschaffung neuer Reaktoren für die jeweiligen Prozesse berücksichtigt.

Da es sich bei dem Endprodukt aller 3 betrachteter Prozesse um nicht aufgereinigtem Succinat in einer Fermentationsbrühe handelt und laut Zeikus *et al.* 1999 die Aufarbeitungskosten bis zu 70 % der Produktkosten ausmachen, wurde als Endprodukt ein „nicht aufgereinigtes Succinat“ mit einem entsprechenden Preisabschlag definiert.

Laut Literatur geeignete Aufarbeitungsschritte für Bernsteinsäure aus der Fermentationsbrühe sind Ammonium- oder Calciumhydroxidfällung, Elektrodialyse und Reaktivextraktion (McKinley *et al.* 2007). Da keines dieser Aufarbeitungsmodulen in der vorliegenden Sabentoversion 1.2.0.316 verfügbar ist, konnte die Aufarbeitung von Bernsteinsäure nicht betrachtet werden.

Wie Tabelle 4.2 zeigt, ist von den beiden publizierten Prozessen nur der Ansatz mit *C. glutamicum* bereits wirtschaftlich. Auch der geplante Hefeprozess ist prinzipiell rentabel.

Tabelle 4.2: Ökonomische Berachtung der 3 ausgewählten biotechnologischen Ansätze zur Bernsteinsäureproduktion

	<i>C. glutamicum</i>	<i>E.coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Gewinn			
€ (tBernsteinsäure) ⁻¹	3 459	-15 953	1 596

Die ökologische Bilanzierung liefert als Endergebnis einen Satz Kennzahlen, die sogenannten Umweltbewertungszahlen (Tabelle 4.3). Diese werden von Sabento aus den einzelnen unterschiedlich gewichteten Wirkungskategorien der Eingangs- und Ausgangsseite berechnet. Je niedriger die Umweltbewertungszahlen sind, desto umweltfreundlicher ist ein Prozess. Die Eingangs- und Ausgangs-Umweltbewertungszahl geben Auskunft über das Umweltwirkungspotential. Übersteigt – wie in allen bewerteten Prozessen der Fall – die Input-Umweltbewertungszahl die Output-Umweltbewertungszahl, so besteht noch ökologisches Optimierungspotential. Weitere Verbesserung der Ökologie der Prozesse könnte beispielsweise durch Verwendung alternativer Substrate wie Corn Steep Liquor oder Glucosesirup statt reiner Glucose erzielt werden.

Tabelle 4.3: Ökologische Berachtung der 3 ausgewählten biotechnologischen Ansätze zur Bernsteinsäureproduktion

Umweltbewertungszahlen	<i>C. glutamicum</i>	<i>E.coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Input	6	13	4
Output	0	2	0
Gesamt	2	6	2

Über die Gesamt-Umweltbewertungszahlen können die verschiedenen Prozesse verglichen werden. Die Gesamt-Umweltbewertungszahlen aller 3 Prozesse liegen in der gleichen Größenordnung. Alle Gesamt-Umweltbewertungszahlen sind sehr gering, da es sich um Prozesse bei milden Reaktionsbedingungen unter Verwendung von nachwachsenden Rohstoffen handelt.

4.2 Evaluierung erster Deletionsstämme und Nachweis der Succinatausschleusung

4.2.1 Charakterisierung der Einfach-Deletionsstämme

Ziel der ersten Phase dieses Projektes war die Erfüllung des von der Gutachterrunde der Deutschen Bundesstiftung Umwelt formulierten "Proof of concept", welches neben einem "Letter of Intent", den Nachweis fordert,

"dass der gewählte Produktionsorganismus in der Lage ist, Succinat in signifikanten Mengen unter bestimmten Bedingungen auszuschleusen."

Um diesen Nachweis zu erbringen, wurde zunächst vom Grundkonzept der sequenziellen Stammentwicklung abgesehen und ein zusätzliches Arbeitspaket AP_{neu1}, welche die frühzeitige Erfüllung dieser Auflage zum Ziel hat, eingeführt. Es wurden aus Zeitgründen zunächst konstitutive Deletionsstämme mit jeweils nur einer Deletion konstruiert und diese Stämme darauf getestet, ob sie in der Lage sind, Succinat in signifikanten Mengen unter bestimmten Bedingungen in den Kulturüberstand auszuschleusen. Dabei stand insbesondere der Nachweis im Vordergrund, dass die im Vergleich zum Wildtyp größere Menge an produziertem Succinat auch tatsächlich in den Kulturüberstand abgegeben wird und nicht intrazellulär akkumuliert.

Die hergestellten Deletionsmutanten sind in Tabelle 4.4 aufgeführt. Die Stämme wurden zunächst bei ORGANOBALANCE im Schüttelkolben evaluiert.

Tabelle 4.4: Deletionsmutanten des Stammes BY4741

Enzymaktivität	deletiertes Gen	Stamm
Isocitrat-Dehydrogenase	idp1	BY4741 idp1
	idp2	BY4741 idp2
Succinat-Dehydrogenase	sdh2	BY4741 sdh2
Succinat-Transporter	acr1	BY4741 acr1

Die höchste Succinatkonzentration wurde beim Stamm $\Delta sdh2$ gemessen (Daten nicht gezeigt). Daher wurde zum Nachweis der Succinatausschleusung dieser Stamm verwendet.

4.2.2 Nachweis der Ausschleusung von Succinat

Zum Nachweis der Succinatausschleusung wurde der Stamm BY4741 Δ sdh2 mit dem zugehörigen Wildtypstamm verglichen. Wie Tabelle 4.5 zeigt führt schon die Deletion eines einzigen Gens (sdh2) dazu, dass diese Deletionsmutante nach 72 Stunden im Produktionsmedium mit Galaktose als Kohlenstoffquelle 5,8 g L⁻¹ Succinat im Kulturüberstand anreichert. Diese Menge ist um den Faktor 3,6 höher, als beim Wildtyp (wt) und entspricht bereits einer molaren Succinatselektivität von 17,7 % mit Galactose als Substrat. Das Succinat- zu Biotrockenmasseverhältnis Y_{PX} betrug hierbei ca. 0,6 g g⁻¹.

Tabelle 4.5: Endkonzentrationen (g L⁻¹) der von BY4741 wt und sdh2 in den Kulturüberstand ausgeschleusten organischen Säuren nach 72 Stunden im entsprechenden Produktionsmedium (WMVIII-Medium 50 g L⁻¹ Galaktose bzw. Saccharose)

Stamm	Kohlenstoffquelle	Succinat	Citrat	Fumarat	Malat	Pyruvat
wt	Saccharose	1,0	0,5	0,0	0,0	0,0
Δ sdh2	Saccharose	2,9	0,0	0,0	0,0	0,2
wt	Galaktose	1,6	0,3	0,1	0,0	0,0
Δ sdh2	Galaktose	5,8	0,0	0,0	0,0	0,6

Um zu überprüfen, ob die Hefe das produzierte Succinat in den Kulturüberstand abgibt und nicht intrazellulär akkumuliert, wurde bestimmt, wie hoch der intrazellulär akkumulierte Mengenanteil an Succinat im Vergleich zum sekretierten Anteil ist.

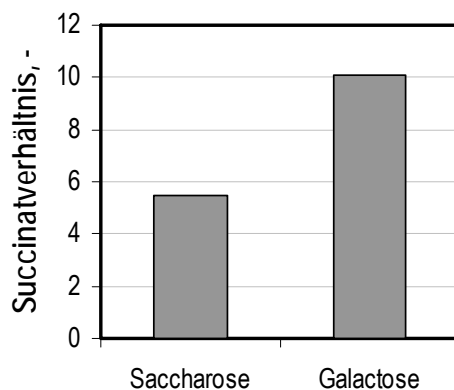


Abbildung 4.1: Verhältnis der intra- und extrazellulären Succinatmenge mit Saccharose oder Galaktose als Kohlenstoffquelle
Verhältnis extrazelluläres/intrazelluläres Succinat nach 6 Tagen Kultivierung des Stammes BY4741 Δ sdh2 im entsprechenden Produktionsmedium (WMVIII-Medium mit 50 g L⁻¹ Galaktose bzw. Saccharose)

Nach 6 Tagen Kultivierung hat die *sdh2*-Deletionsmutante die zehnfache Menge an Succinat in den Kulturüberstand abgegeben als intrazellulär akkumuliert (Abbildung 4.1). Von der insgesamt produzierten Succinatmenge hat die Hefezelle also signifikant mehr Succinat (90 %) in den Kulturüberstand sekretiert, als intrazellulär nachweisbar war.

Neuere Daten, welche mit Hilfe der äußerst genauen GC-MS Analytik generiert wurden, zeigen, dass das Verhältnis der sekretierten Succinatmenge zur intrazellulär angereicherten noch günstiger ausfällt. Üblicherweise sind etwa 99 % der insgesamt von der Hefekultur produzierten Succinatmenge im Kulturüberstand nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Abbildung 4.2 zeigt, dass der größte Teil des gebildeten Succinats bereits während der exponentiellen Wachstumsphase in den Kulturüberstand abgegeben wird. Da in dieser Phase keine signifikante Zellyse stattfindet, ist davon auszugehen, dass die Zellen das gebildete Succinat ausgeschleust und nicht durch Zellyse freigesetzt haben.

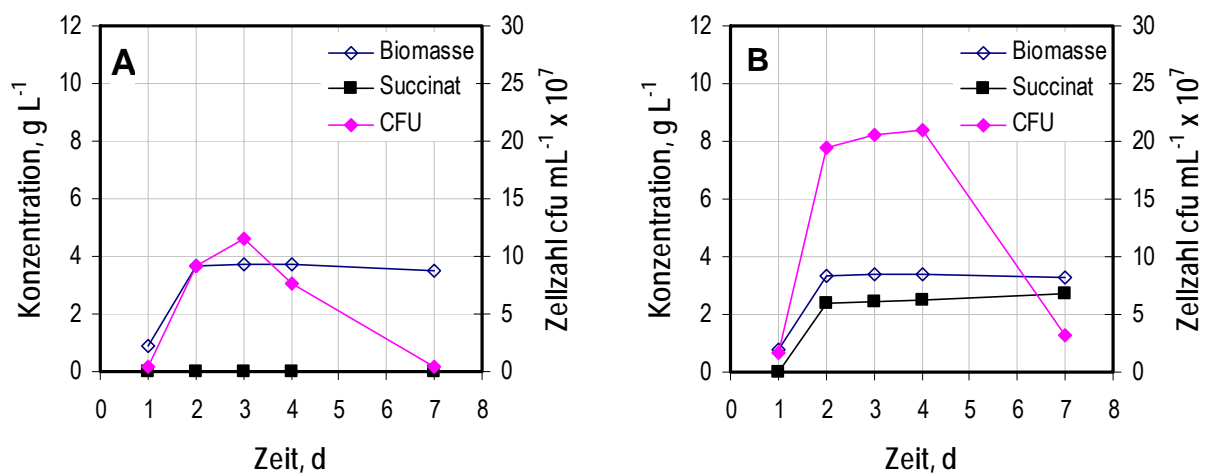


Abbildung 4.2: Wachstum und Succinatausschleusung von BY4741 wt (A) und $\Delta sdh2$ (B) im WM8-Medium mit Galaktose als Kohlenstoffquelle

Kultivierung des Wildtyps und der *sdh2*-Deletionsmutante des Stammes BY4741 in 50 ml WMVIII-Medium mit 50 g L⁻¹ Galaktose über einen Zeitraum von 7 Tagen. Die Kultur wurde am Tag 0 mit einer 48 h Stunden Vorkultur beimpft (1 %). Aufgezeichnet wurden Biotrockenmasse in g L⁻¹, die Zellzahl als Colony Forming Units pro mL und Succinatkonzentration in g L⁻¹ im Kulturüberstand.

Die Ergebnisse der "Proof of concept" Phase zeigten eindeutig, dass bei der Kultivierung der konstruierten Deletionsstämme Succinat im Kulturüberstand nachweisbar war, und zwar um ein Vielfaches mehr als bei der Kultivierung des

Wildtyps. Selbstverständlich handelt es sich bei einem Stamm mit einer einzelnen Deletion nicht um einen tatsächlichen Produktionsstamm, wie er in diesem Forschungsvorhaben angestrebt wird. Die angestrebte hohe Succinat-Produktivität und Ausbeute wird erst durch die Deregulation der entsprechenden Gene des Citrat- und Glyoxylatzyklus, die Verhinderung der Nebenprodukt- und Speicherstoffbildung, sowie durch die Umlenkung des Kohlenstoffflusses in den Glyoxylatzyklus und eine gezielte Bioprozessentwicklung zu einem Hochleistungsverfahren im Rührkesselreaktor erreicht werden können.

Als Beispiel für die reaktionstechnischen Untersuchung der rekombinaten Hefestämme im Hinblick auf die Succinatausschleusung an der TUM ist im Folgenden jeweils eine Satz- und Zulaufkultivierung des Stammes BY4741 $\Delta sdh2$ und des zugehörige Wildtyps dargestellt. Die Versuche erfolgten im CSL-Medium mit Glucose als Kohlenstoffquelle.

Durch eine parallele Satzkultivierung im Bioreaktorblock wurde der Stamm BY4741 $sdh2$ und der zugehörige Wildtyp im Hinblick auf die Wachstumsrate und Metabolitbildung untersucht.

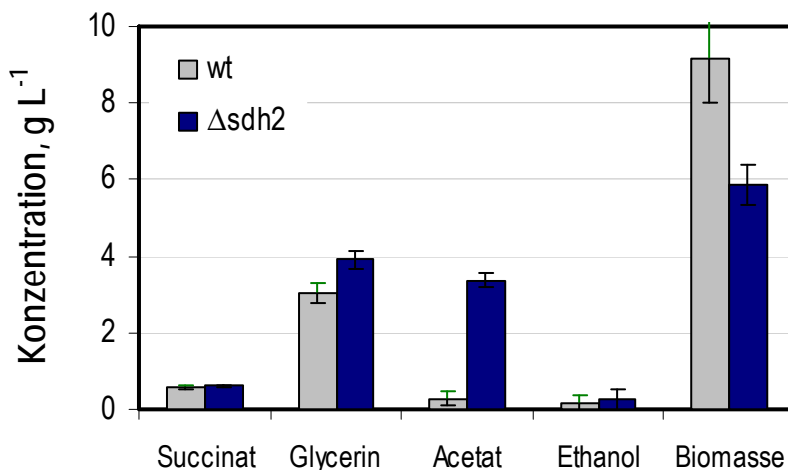


Abbildung 4.3: Metabolit- und Biomassekonzentrationen zu Beginn und am Ende einer 48- stündigen Parallelkultivierung im Bioreaktorblock im CSL-Medium mit 50 g L⁻¹ Glucose

Abbildung 4.3 zeigt die Biomassekonzentration und die Konzentrationen einiger Metabolite am Endpunkt der Kultivierung. Die erreichten Succinatkonzentrationen der beiden Stämme unterschieden sich in diesem Satzexperiment wie erwartet nicht signifikant (Repression der Gene des Citrat- und Glyoxylatzyklus). Deutliche Unterschiede sind dagegen bei den erzielten Biomassekonzentrationen zu

erkennen. Auffällig ist auch die deutlich höhere Acetatkonzentration beim Stamm $\Delta sdh2$.

Für die Zulaufversuche mit den Stämmen BY4741 wt und $\Delta sdh2$ wurde auf Grund der drei Auxotrophien der Stämme ein reichhaltiges komplexes Medium verwendet. Als Kohlenstoffquelle wurde erneut Glucose eingesetzt, um den Einfluss der Repression bei Glucoselimitierung zu untersuchen. In zwei Zulaufversuchen im Rührkesselreaktor im Liter-Maßstab (siehe Abbildung 4.4) wurde die Succinatproduktion der Hefestämme BY4741 wt und $\Delta sdh2$ in der Satz- und Zulaufphase ermittelt. Für beide Stämme wurde mit einer Zudosierung von $2,7 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glucose bei einem Arbeitsvolumen von 3,5 L gearbeitet. Der Zulauf war in diesen Versuchen nicht darauf ausgelegt, Ethanolbildung zu vermeiden, da dies auch zu einer Vermeidung weiterer Nebenprodukte wie Succinat führen könnte. Mit dem Zulauf wurde begonnen, sobald die eingesetzte Glucose verbraucht war.

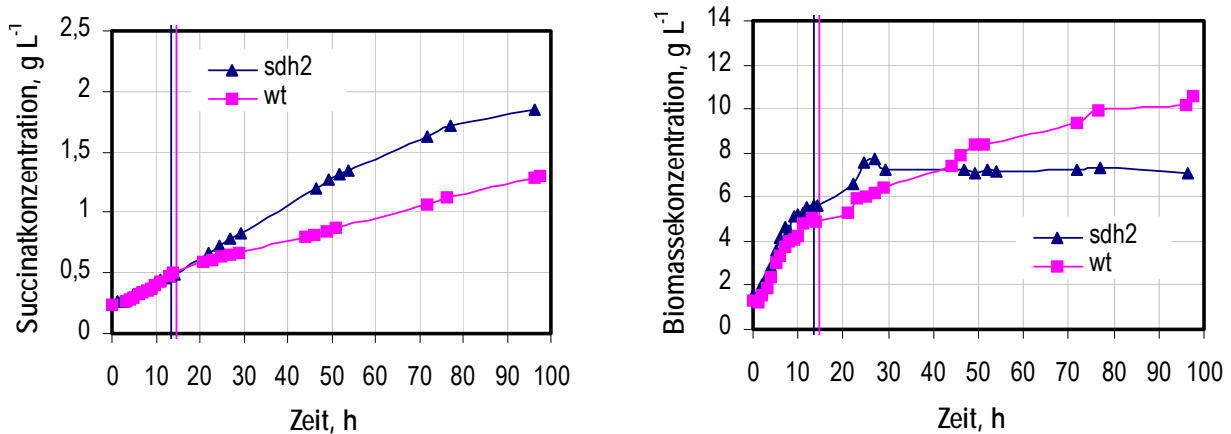


Abbildung 4.4: Biomasse- und Succinatkonzentrationsverläufe von BY4741 wt und $\Delta sdh2$ im Zulaufverfahren im CSL-Medium

Während beim Wildtyp bis zum Ende der 96-stündigen Kultivierung keine Akkumulation von Glucose auftrat, so dass auch eine längere Versuchsdauer möglich gewesen wäre, akkumulierte beim Stamm $\Delta sdh2$ gegen Ende des Versuches Glucose (Daten nicht gezeigt). Über mehr als 60 h war jedoch ein kontinuierlicher Anstieg der Succinatkonzentration meßbar.

Die spezifische Geschwindigkeit der Succinatbildung wurde aus der Zunahme der Succinatkonzentration als Funktion der Prozesszeit aus dem linearen Teil der Succinatkurve im Zulaufverfahren abgeschätzt und beträgt für den $\Delta sdh2$ -Stammes $2,3 \text{ mg g}^{-1} \text{ Biotrockenmasse h}^{-1}$ bei der gewählten Glucosedosierung.

4.2.3 Fazit der Untersuchung der Einfach-Deletionsstämme

Bei der Stammentwicklung stand zunächst der von den Gutachtern zusätzlich geforderte Nachweis, „dass der gewählte Produktionsorganismus in der Lage ist, Succinat in signifikanten Mengen unter bestimmten Bedingungen auszuschleusen“ im Vordergrund. Hierzu wurden Deletionsstämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konstruiert, die im Vergleich zum Wildtyp größere Mengen an Bernsteinsäure produzierten und in den Kulturüberstand abgaben. Es konnte gezeigt werden, dass bereits ein Stamm mit nur einer Deletion bis zu $5,8 \text{ g L}^{-1}$ Succinat im Medium akkumulieren kann und dabei die zehnfache Menge des insgesamt produzierten Succinat in den Kulturüberstand sekretiert wird im Vergleich zur intrazellulären Anreicherung. Unter Zulaufbedingungen konnte über 60 h ein kontinuierlicher Anstieg der Succinatkonzentration bei einem der Deletionsstämme gezeigt werden. Im Rahmen der Untersuchungen der 1 x Deletionsstämme konnte also gezeigt werden, dass die Hefe in der Lage ist Bernsteinsäure quantitativ in das Kulturmedium auszuschleusen. Bereits im Mai 2007 wurde zum Thema „Succinatausschleusung der Hefe“ ein Zwischenbericht mit den ausführlichen Ergebnissen hierzu eingereicht. Auf Basis dieses Berichtes sah die Gutachterrunde die Bewilligungsaufgaben erfüllt und die Projektförderung wurde fortgesetzt.

4.3 Iterative Stammentwicklung- und charaktersisierung

4.3.1 Deletion der Succinatdehydrogenase

Die systematische Stammentwicklung folgte an Hand des Basisstammes AH22ura3. Als erster Schritt der systematischen Stammentwicklung erfolgte die Deletion des succinatabbauenden Enzyms, Succinatdehydrogenase, im Basisstamm für die Succinatproduktion AH22ura3.

Beim Enzym SDH handelt es sich um einen Komplex aus 4 Untereinheiten. Während die Untereinheiten Sdh1p und Sdh2p das aktive Zentrum bilden, dienen Sdh3p und Sdh4p lediglich als sterische Elemente (Lemire und Oyedotun 2002). Zum *SDH1*-Gen existiert ein homologes Gen (*SDH1b*), welches den Verlust von *SDH1* kompensieren kann (Colby *et al.* 1998). Die SDH wird auch als Komplex II der Atmungskette bezeichnet und liefert durch die Oxidation von Succinat zu Fumarat Elektronen für den Ubiquinonpool.

Bei Arikawa *et al.* 1999 und Ciriacy 1977 wird beschrieben, dass eine Deletion der Sdh1p-Untereinheit einen vollständigen Verlust der SDH-Aktivität zur Folge hat. Dagegen führt laut Kubo *et al.* 2000 eine Deletion der Sdh1p-Untereinheit nicht zu einem vollständigen Aktivitätsverlust. Laut Kubo *et al.* 2000 ist erst bei Deletion beider katalytischer Untereinheiten SDH1 und SDH2 keine SDH-Aktivität mehr nachweisbar.

Stämme mit Deletion der SDH zeigen laut der Literatur kein Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie Ethanol, Acetat oder Glycerin (Tzagoloff und Dieckmann 1990, Ciriacy 1977). In einer aktuellen Publikation von Cimini *et al.* 2009 wird zudem beschrieben, dass eine *sdh3*-Deletion in Chemostatexperimenten zu einem ausgeprägten fermentativen Stoffwechsel führt. Zudem zeigte eine Transkriptionsanalyse einen repressiven Effekt der *sdh3*-Deletion auf Gene des Citratzyklus und der Atmungskette

Es wurden zunächst Stämme mit alleiniger Deletion einer der SDH-Untereinheiten konstruiert. Deletiert wurde das Gen *SDH2*, da eine Deletion von *SDH1* von dem Isogen *SDH1b* teilweise kompensiert werden kann (Colby *et al.* 1998). Auf Grund der unklaren Datenlage aus der Literatur folgte als weiterer Schritt der Stammentwicklung zusätzlich auch die Deletion des Gens für die zweite katalytische Untereinheit, *SDH1*, in AH22ura3.

Die umfassende reaktionstechnische und metabolische Charakterisierung dieser *sdh*-Deletionsstämme und aller weiteren Stämme der iterativen Stammentwicklung erfolgte im Schüttelkolben, im Bioreaktorsystem und im Laborrührkessel.

Wildtyphefen zeigen in aeroben Satzkultivierungen mit Glucose als Kohlenstoffquelle ein diauxisches Wachstum. Weder eine Deletion der *Sdh2p*-Untereinheit noch eine Deletion beider katalytischen Untereinheiten verminderten das Wachstum der Zellen auf Glucose in der Satzphase signifikant.

Ein deutlicher Effekt der Deletion(en) zeigte sich hingegen beim Verbrauch des aus der Glucose gebildeten Ethanol. Während der Wildtypstamm auf Ethanol wuchs, wandelten die SDH-Stämme das Ethanol lediglich in Acetat um. Für einen Hefestamm mit einer *sdh1*- oder *sdh4*-Deletion wurde diese Acetatbildung aus Ethanol bereits von Romano und Kolter 2005 beobachtet. Das geänderte Wachstum der SDH-Deletionsstämme auf dem nicht vergärbaren Substrat Ethanol ist zudem ein klassisches Verhalten von Stämmen mit den Deletionen im Citratzyklus, die sich zu meist nur im vollständig respirativen Stoffwechsel auswirken (Romano und Kolter 2005, McCammon 1996, Przybyla-Zawislak *et al.* 1999, Ciriacy 1977, Dennis *et al.* 1999)

Wie bereits für die BY4741-Stämme gezeigt, erhöht die SDH2-Deletion die Succinatbildung im Vergleich zum Wildtyp. Die zusätzliche Deletion der SDH1-Untereinheit führte nicht zu einer signifikanten erhöhten Succinatbildung der Zellen. Unter Zulaufbedingungen zeigten die beiden *sdh*-Deletionsstämme einen geringen aber kontinuierlichen Anstieg der Succinatkonzentration und einen starken Anstieg der Acetatkonzentration.

Als weiteres Experiment erfolgte ein Zulaufversuch mit WM8VIII-Originalmedium, welches $8,7 \text{ g L}^{-1}$ Glutamat als Stickstoffquelle enthält. Die Versuche erfolgten bei pH 6, da bei einem $\text{pH} > 6$ das Glutamat im Medium ausfällt. Da Glutamat über Ketoglutarat und Succinyl-CoA direkt in Succinat umgewandelt werden kann, führt Glutamat zu einer erhöhten Succinatbildung. Es wurde auf eine Satzphase verzichtet und der Zulauf bei Versuchsbeginn gestartet (Dosierrate $0,7 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Es zeigte sich eine wachstumsgekoppelte Succinatbildung unter Zulaufbedingungen mit Glucose und Glutamat. Das Wachstum und die Succinatbildung stagnierten nach 5 Tagen auf Grund einer Inhibierung durch das Nebenprodukt Acetat. Binnen 7 Tagen wurde eine Succinatkonzentration von $8,5 \text{ g L}^{-1}$ erzielt. Die starke Acetatbildung dieses Deletionsstammes ist unter Zulaufbedingungen nicht vermeidbar und begrenzt somit die erreichbare Succinatkonzentration dieses *sdh*-Deletionsstammes.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der Succinatbildung der *sdh2*- und *sdh1-sdh2*-Deletionsmutante festzustellen war. Beide *sdh*-Stämme zeigten eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte Succinatbildung und eine starke Acetatbildung auf Ethanol. Es wurden bis zu $8,5 \text{ g L}^{-1}$ Succinat erreicht. Die starke Acetatbildung im Zulaufverfahren begrenzte in diesen ersten Stämmen die erreichbare Succinatkonzentration.

4.3.2 Reprimierbares Promotorsystem

Da die Deletion der Gene, welche für die Succinat- bzw. Isocitratdehydrogenase kodieren, möglicherweise zu starken Wachstumseinschränkungen führen kann, soll diesen Genen ein in der Produktionsphase reprimierbarer Promotor vorgeschaltet werden. So kann die Trennung des Prozesses in Wachstums- und Produktionsphase realisiert werden. Der native Promotor dieser Gene wird dabei durch einen reprimierbaren Promoter ersetzt.

Hierzu wurde ein Tetracyclin-reguliertes Promotorsystem ausgewählt, welches neben dem eigentlichen *tetO*-Promotor aus dem transcriptional Transaktivator (tTA) besteht. Der tTA ist ein Protein, welches durch Bindung an den regulierbaren *tetO*-Promotor die Expression des nachgeschalteten Gens induziert. Antibiotika aus der Gruppe der Tetracycline induzieren höchst sensitiv eine Konformationsänderung des tTA, was zur Ablösung dieses Proteins von der Promotorregion führt. Dies hat zur Folge, dass das nachgeschaltete Gen nicht weiter exprimiert wird. So kann die Expression der entsprechenden Gene gezielt während der Produktionsphase durch Zugabe eines Derivates aus Gruppe der Tetracycline unterbunden werden. In der Wachstumsphase wird dem Medium kein Tetracyclin oder ein entsprechendes Derivat zugegeben und die Gene werden exprimiert.

Das Tetracyclin-System wurde bereits in verschiedenen eukaryotischen System eingesetzt und ist auch in *S. cerevisiae* etabliert (z. B. Park and Morschhauser 2005,

Wishart et. al. 2005). Zum Einfluss von Tetracyclin auf den Stoffwechsel oder das Wachstum der Hefe liegen trotz zahlreicher Einsatzes des Tetracyclinsystems keine detaillierten Untersuchungen vor, da beim Tetracyclin-System standardmäßig nicht Tetracyclin, sondern auf Grund der effektiven Wirkung bei gleicher zugesetzter Menge Doxycyclin als Repressor eingesetzt wird (Gari *et al.* 1997). Für Doxycyclin wurde gezeigt, dass die Genexpression der Hefe nicht beeinflusst wird (Wishart 2005). Allerdings ist Doxycyclin um den Faktor 100 teurer als Tetracyclin und daher für den industriellen Einsatz nicht relevant. Da Tetracyclin direkt in die Zellen diffundieren kann, ist dieser Repressor auch unabhängig von geeigneten Transportsystemen (Berens und Hillen 2004). Die Verwendung des Antibiotikums Tetracyclin im Rahmen des Prozesses zur Succinatproduktion erscheint auch unter ökologischen Aspekten unkritisch, da Tetracyclin durch Erhitzen und Lichteinstrahlung zersetzt wird (Kühne *et al.* 2001, Oka *et al.* 1989).

Das reprimierbare Promotorsystem soll nur vor den Genen implementiert werden, deren Deletion auch tatsächlich eine Wachstumsinhibierung zur Folge hat. Diejenigen Gene, deren Deletion nicht zu einer Wachstumseinschränkung führen, müssen nicht in der Wachstumsphase exprimiert werden, weshalb sie deletiert werden können. Der tetO-Promotor sollte ausschließlich implementiert werden, wo es nötig ist, da bei mehreren dieser Promotoren in der Zelle möglicherweise die Menge des tTA-Genprodukts für eine vollständige Repression in der Produktionsphase nicht ausreicht. Eventuell muss auch die Konzentration des Repressionsinduktors (Tetracyclin) zur vollständigen Repression der Gene erhöht werden. Desweiteren könnten viele homologe Sequenzen (tetO-Promotoren) zu einer Stamminstabilität durch intrachromosomale Rekombination führen. Außerdem gewährleistet der tetO-Promotor keine native, sondern eine konstitutive Expression des nach geschalteten Gens.

Um das Tetracyclin regulierte Promotorsystem im späteren Produktionsstamm AH22ura3 zu evaluieren, wurde zunächst der tTA in AH22ura3 chromosomal am *leu2*-Locus integriert. Der nächste Schritt war die Evaluierung des Promotorsystems. Dazu wurde ein β -Galaktosidase Reporter-Assay entwickelt, der die Untersuchung des Expressionsprofils des Tet-Promotors in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen an Tetracyclin ermöglicht.

Hierzu wurde zunächst ein Fragment aus dem Vektor pCM159 (Gari *et al.* 1997) ausgeschnitten und in den linearisierten Vektor pUG6 (Güldener *et al.* 1997) ligiert,

was in dem Vektor pUG6-tetO resultierte. Dieses Fragment enthält hinter dem eigentlichen Tet-Promotor das *lac-Z* Gen aus *E.coli*, welches die Expressionsstärke des Tet-Promotors in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen an Tetracyclin über einen β -Galaktosidase Reporter-Assay nachweisbar macht. Dieses Fragment wurde mit Primern, welche entsprechende homologe Sequenzen einführen, zusammen mit dem linearisierten Vektor pRS416 (Sikorski und Hieter 1989) in den Stamm AH22ura3tTA transformiert, wobei durch homologe Rekombination in der Hefezelle der Stamm AH22ura3tTA pRS416-tetO *lacZ* entstand und über das *Ura3* Gen auf pRS416 selektiert werden konnte. Mit diesem Stamm wurde das Tetracyclin regulierte Promotorsystem evaluiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.5 dargestellt.

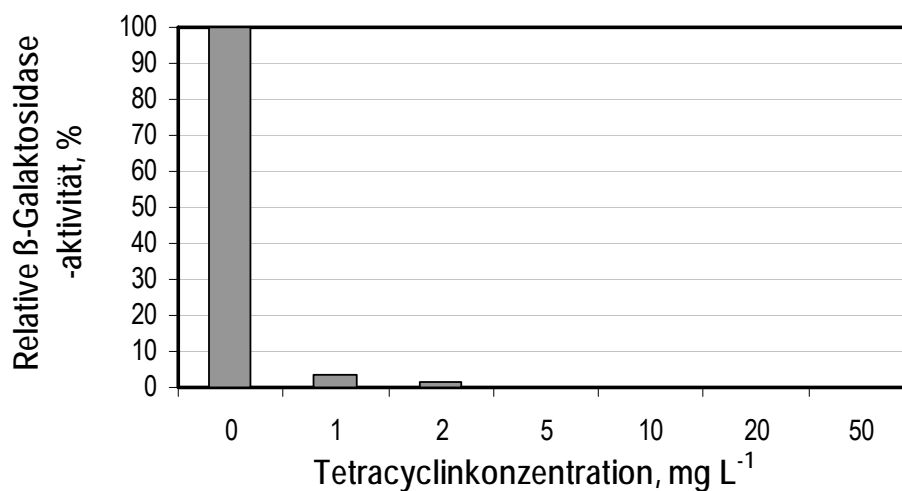


Abbildung 4.5: Relative β -Galaktosidaseaktivität bei verschiedenen Tetracyclinkonzentrationen

Relative β -Galaktosidase Aktivität in Kulturen des Stammes AH22ura3tTA pRS416-tetO *lacZ*, welche in WM8 Medium in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen an Tetracyclin 18 h kultiviert wurden. Die Biotrockenmassekonzentration betrug zum Ende dieser Kultivierungen etwa $0,8 \text{ g L}^{-1}$. 100 % entspricht einer β -Galaktosidase Aktivität von 86 U.

Es ist zu sehen, dass der tetO-Promotor aktiv ist, wenn kein Tetracyclin im Medium vorhanden ist. Schon ab einer Konzentration von 1 mg L^{-1} Tetracyclin ist nur noch 3,7 % der Promotoraktivität nachweisbar, welche ab einer Konzentration von 5 mg L^{-1} nicht mehr nachweisbar ist. Der pRS416 Vektor wurde gewählt, da er ein centromerisches Plasmid und kein episomales darstellt und somit nicht in hoher Kopiezahl in der Zelle vorliegt. Dies gleicht den späteren Einsatzbedingungen des

Tet-Promotorsystems, da auch die in der Produktionsphase zu reprimierenden Gene in einfacher Kopie vorliegen.

Die Ergebnisse in Abbildung 4.5 zeigen, dass das Tet-Promotorsystem im Produktionsstamm AH22ura3 verlässlich funktioniert und sich für den Einsatz eignet. Aus dem konstruierten Vektor pUG6-tetO kann durch entsprechende Primer der tetO-Promotor amplifiziert werden, welcher in den Produktionsstamm transformiert wird und durch homologe Rekombination anstelle des nativen Primers in das Genom vor die in der Produktionsphase zu reprimierenden Gene integriert. Die Kassetten für die konditionelle Expression der entsprechenden Gene sind also konstruiert.

Zur Evaluierung des durch Tetracyclin reprimierbaren Promotorsystems vor den eigentlichen Zielgenen wurde der tetO-Promotor exemplarisch vor das Gen *SDH2* implementiert. Dazu wurden folgende Stämme konstruiert:

- AH22ura3 tTA

In diesem Stamm wird der transcriptional trans activator tTA überexprimiert. Die tTA Expressionskassette wurde chromosomal in den *leu2*-Locus des Stammes AH22ura3 integriert.

- AH22ura3 tTA *sdh2prom::tetOprom*

Neben der tTA Überexpression wurde in diesem Stamm der Promotor des *SDH2* Gens gegen den reprimierbaren tetO-Promoter ausgetauscht, sodass ein Stamm mit einer induzierbaren *sdh2*-Deletion entstand.

In einer Satzkultivierung im Bioreaktorblock zeigt der mit 20 mg L⁻¹ Tetracyclin induzierte Stamm tTA *sdh2prom::tetOprom* das für *sdh*-Deletionsstämmen typischen Verhalten. Wie bei einem konstitutiven *sdh2*-Deletionsstamm wird bei dem induzierten *sdh2*-Stamm die Wachstumsrate auf Glucose kaum beeinflusst, aber es erfolgt statt Wachstum lediglich eine Acetatbildung auf Ethanol. Der nicht-induzierte tTA *sdh2prom::tetOprom*-Stamm verhält sich dagegen wie der wt-Stamm. Zudem wurde nachgewiesen, dass Tetracyclin bei Stämmen ohne das Tet-System wie dem Wildtypstamm nur vernachlässigbaren Einfluss auf das Wachstum besitzt. Die Eignung des Tetracyclin regulierten Promotorsystems zur Etablierung eines zweistufigen Prozesses zur Bernsteinsäureproduktion wurde somit beispielhaft an Hand einer induzierbaren *sdh2*-Deletion nachgewiesen. Sämtliche vorbereitenden molekularbiologischen Arbeiten zur Implementierung des Promotorsystems in die Produktionsstämme sind erfolgt.

4.3.3 Deletion der Succinat- und einer Isocitratdehydrogenase

Nach der Unterbrechung des Succinatabbaus war der nächste Schritt der Stammentwicklung die Umleitung des Kohlenstoffflusses in den Glyoxylatzyklus durch Deletion der Isocitratdehydrogenase. Isocitrat-Dehydrogenasen katalysieren die oxidative Decarboxylierung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat. In *S. cerevisiae* existieren vier verschiedene Isocitratdehydrogenasen, die sich in der Struktur ihrer Untereinheiten, Regulation, Cofaktor-Spezifität und Lokalisation unterscheiden.

Von diesen 4 Enzymen ist IDH das am Citratzyklus beteiligte Enzym. Die weiteren Isocitratdehydrogenasen sind nicht signifikant am Citratzyklus beteiligt (McCammon and McAlister-Henn 2003). Die IDPs sind im Gegensatz zur IDH NADP-abhängig und können bei einer IDH-Deletion, da die Hefe keine Transhydrogenase besitzt, die Funktion der IDH nicht vollständig kompensieren (Bakker *et al.* 2001).

Daher wurde die NAD-spezifische Isocitratdehydrogenase (IDH) deletiert. Die IDH ist ein Oktamer aus je 4 Idh1p and 4 Idh2p Untereinheiten, die durch die Gene *IDH1* und *IDH2* codiert werden. Die regulatorische Funktion liegt hauptsächlich bei der Idh1p-Untereinheit, die katalytische bei Idh2p Untereinheit (Gadde *et al.* 1998). Beide Untereinheiten sind essentiell für die katalytische Aktivität (McAlister-Henn und Small 1997), so dass eine Deletion der Idh1p oder Idh2p-Untereinheit ausreichend ist. Es wurde die Untereinheit Idh1p deletiert, da ein Knockout von *IDH2* einen "Open reading frame" (YOR135C) auf dem komplementären Strang unterbrochen hätte.

Durch die zusätzliche Deletion der NAD-abhängigen Isocitratdehydrogenase in den SDH-Deletionsstämmen wurde die Wachstumsrate auf Glucose in den definierten Medien halbiert, im reichhaltigen Komplexmedium sank die Wachstumsrate lediglich um ein Fünftel. Diese Abnahme der Wachstumsrate von IDH-Deletionsstämmen in definierten Medien ohne Glutamatzusatz wurde bereits von McCammon und McAlister-Henn (2003) beschrieben.

Unter Satzbedingungen sinkt wie von Asano *et al.* 1999 für einen Stamm mit alleiniger Deletion der IDH gezeigt, auch in den SDH-IDH-Deletionsstämmen die Succinatbildung im Vergleich zu den SDH-Stämmen, da der Fluss des Kohlenstoffs zum Succinat gestört wird. Auf Ethanol zeigen die SDH-IDH -Deletionsstämme wie die SDH -Stämme eine starke Acetatbildung und bilden keine Biomasse.

Hingegen zeigten die beiden SDH-IDH-Deletionsstämme unter Zulaufbedingungen die bereits für die SDH-Deletionsstämme beobachtete Acetatbildung, aber auch eine

Erhöhung der Succinatbildung gegenüber den SDH -Stämmen. Die Ausbeute Y_{PS} im Zulauf betrug $\sim 0,01$ g Succinat (g Glucose) $^{-1}$ für SDH-Deletionsstämme und über $0,03$ g Succinat (g Glucose) $^{-1}$ für *sdh-idh*-Stämme.

4.3.4 Deletion der Succinatdehydrogenase und Deletion zweier Isocitratdehydrogenasen

Es wurde ergänzend zur *idh1* Deletion das Isoenzym Idp1p deletiert, mit dem Ziel der Umlenkung des Kohlenstoffflusses in den Glyoxylatzyklus. Laut Haselbeck und McAlister-Henn (1993) und Zhao und McAlister-Henn (1996) sind Stämme, mit Deletionen der Gene *idh1* und *idp1* glutamatauxotroph im Wachstum auf Glucose und weisen somit keine Isocitratdehydrogenase-Aktivität mehr auf. Biomassebildung aus Glucose kann in diesen Stämmen nur bei Zusatz von Glutamat erfolgen. Beim Verbrauch von Ethanol kann das streng Glucose reprimierte Isoenzym Idp2p die Deletionen von *idh1* und *idp1* teilweise kompensieren (Zhao und McAlister-Henn 1996).

Daher wurde in ersten Experimenten das Ausmaß der Glutamatauxotrophie im Stamm mit zusätzlicher *idp1*-Deletion, $\Delta sdh2\Delta sdh1\Delta idh1\Delta idp1$, untersucht. Auch ohne Zusatz von Glutamat war ein geringes Wachstum des Stammes AH22ura3 $\Delta sdh2\Delta sdh1\Delta idh1\Delta idp1$ zu erkennen. Die eingesetzte Glucose war auch nach 6 Tagen nicht vollständig verbraucht. Das geringe Wachstum auch ohne Glutamat widerspricht der Literatur nicht. Die Versuche bezüglich der Glutamatauxotrophie erfolgten bei Haselbeck und McAlister-Henn (1993) für 3 Tage auf Agarplatten und in den Versuchen von Zhao und McAlister-Henn (1996) wurde das Wachstum binnen 24 h in Flüssigkulturen in einem definierten Medium getestet. Eine neue Publikation dieser Arbeitsgruppe beschreibt ein geringes Wachstum von IDH-IDP1-Deletionsstämmen nach 3 Tagen (Mammon und McAlister-Henn 2003). Neben dem geringen Wachstum zeigte sich eine deutliche Bildung von Metaboliten wie Glycerin, Ethanol und Acetat. Dies weist darauf hin, dass durch die zusätzliche *IDP1* Deletion zur *IDH1* Deletion in dem Stamm der Citratzyklus blockiert ist, sodass kein respirativer Stoffwechsel mehr möglich ist, und nur noch Gärprodukte des fermentativen Stoffwechsels gebildet werden können.

Ein ähnlicher Effekt wurde in Hefestämmen mit anderen vollständigen Deletionen im Citratzyklus beschrieben. Eine Deletion der Citratsynthase (beide Citratsynthase-Isoenzyme CIT1 und CIT2) oder der Aconitase führt zu Stämmen, die nicht in der

Lage sind, respirativ zu wachsen und die glutamatauxotroph sind (Gangloff *et al.* 1990, Kim *et al.* 1986).

Zusammenfassend zeigt der Stamm $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$ ohne Glutamat einen stark fermentativen Metabolismus, die Hauptprodukte sind Ethanol und Glycerin. Bei Zusatz von Glutamat erfolgt eine deutliche Biomassebildung, für die weiterführenden Experimente wurde der Glutamatzusatz im Medium auf 2 g L^{-1} festgelegt. Die Glutamatauxotrophie im Stamm AH22ura3 $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$ zeigt, dass die Deletion der Gene *IDH1* und *IDP1* zu einem Verlust der Isocitratdehydrogenase-Aktivität führen und somit der Kohlenstofffluss durch den Citratzyklus verhindert und in den Glyoxylatzyklus umgelenkt werden kann.

4.3.5 Überexpression des transkriptionellen Regulationsfaktors HAP4 zur Glucosedereprimierung

Hap4p ist die regulatorische Untereinheit des Hap2/3/4/5-Komplexes., welcher eine große Zahl von Glucose-reprimierten Genen reguliert. Dies sind vor allem Gene der Atmungskette, sowie des Citratzyklus. Als Aktivator induziert er die Transkription dieser Gene während des "diauxischen shift" und trägt stark zur Verschiebung des respiro-fermentativen Gleichgewichts in Richtung Respiration bei (Lascaris *et al.*, 2003; Lascaris *et al.*, 2004). Die Gene *HAP2*, *HAP3* und *HAP5* werden konstitutiv exprimiert (McNabb und Pinto, 2005). *HAP4* wird natürlicherweise nur auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen exprimiert. Bei der Kultivierung einer *HAP4*-Überexpressionsmutante wurde beobachtet, daß diese Mutation im Vergleich zum Wildtyp zu einer erhöhten Wachstumsrate, Biomasse- und Acetat-Produktion, sowie zu einer reduzierten Ethanol und Glycerin Bildung führt (Blom *et al.*, 2000). Der Hap2/3/4/5p Proteinkomplex propagiert das respirative System indem der Kohlenstofffluss durch den Citratzyklus und die respiratorische Kapazität der Atmungskette erhöht, sowie die mitochondriale Biogenese gefördert wird (Lascaris *et al.*, 2003).

In der Literatur wird beschrieben, dass zahlreiche für die Succinatbildung relevante Gene des Zentralstoffwechsels, wie zum Beispiel die Enzyme des Glyoxylatbypasses, *ICL1* und *MLS1*, und Gene des Citratzykluses dieselben Expressionsmuster wie *HAP4* zeigen (DeRisi *et al.* 1997, Buschlen *et al.* 2003). Berichte zur Überexpression von *HAP4* in Stämmen mit Deletionen im Citratzyklus liegen nicht vor. Ein Hefestamm, welcher trotz der Anwesenheit von Glucose keine

oder eine verminderte Glucose-Repression aufweist könnte für die Produktion von Bernsteinsäure auf primären Kohlenstoffquellen, wie Glucose, weit besser geeignet sein als ein Wildtypstamm, da Bernsteinsäure ein Intermediat des Citrat- und Glyoxylatzyklus ist, deren Gene dieser Repression unterliegen. Eine verminderte Glucose-Repression führt zu einer Verschiebung des respiro-fermentativen Gleichgewichtes in Richtung Respiration, was die Propagierung des gesamten respirativen Systems und die Erhöhung des Kohlenstoffflusses durch den Zentralmetabolismus in Richtung Bernsteinsäure zur Folge haben könnte. Daher wurde der Einfluss einer Überexpression von *HAP4* in den SDH- und SDH-IDH1-Deletionsstämmen auf Wachstum, Nebenprodukt- und Succinatbildung untersucht.

Die Überexpression von *HAP4* führte beim Wildtyp im Wildtypstamm wie von Blom *et al.* 2000 beschreiben zu einer Erhöhung der Wachstumsrate. Allerdings betrug die Erhöhung nur 9 %, statt der bei Blom *et al.* 2000 beschriebenen Erhöhung um 17 %. Dieser positive Effekt auf die Wachstumsrate wurde auch in den SDH- und SDH-IDH-Deletionsstämmen nachgewiesen.

Allerdings war keine signifikante Veränderung der Succinatbildung in den Stämmen mit *HAP4*-Überexpression unter Satzbedingungen nachzuweisen. Der Effekt der *HAP4*-Überexpression wurde detaillierter am Stamm $\Delta sdh2 \Delta idh1$ untersucht. Unter Zulaufbedingungen zeigte sich eine leichte Erhöhung der Succinatbildung durch die *HAP4*-Überexpression.

Eine *HAP4*-Überexpression ist daher auf Grund der Erhöhung der Wachstumsraten und der Succinatbildung in den Deletionsstämmen eine sinnvolle Überexpression in einem Stamm zur Succinatproduktion.

4.3.6 Überexpressionen von Schlüsselenzymen im Glyoxylatzyklus in den *sdh*- und *sdh-idh*-Deletionsstämmen

Für die Succinatproduktion in *S. cerevisiae* über den Glyoxylatzyklus auf primären Kohlenstoffquellen wie Glucose, ist eine Deregulation der Kernenzyme des Glyoxylatzyklus auf Transkript- und gegebenenfalls auch auf Proteinebene erforderlich, da die meisten Gene des respirativen Zentralmetabolismus von *S. cerevisiae* in Anwesenheit von Glucose reprimiert sind (DeRisi *et al.*, 1997). Deshalb bestand der nächste Schritt der Stammentwicklung in einer Überexpression der Gene, welche für die Schlüsselenzyme des Glyoxylatzyklus kodieren. Primäre Zielgene für diese Deregulation sind *ACS1*, *ICL1* und *MLS1* (siehe Abbildung 2, durch dicke Pfeile markiert). Diese Gene sind ausschließlich Teil des Glyoxylat- nicht des Citratzyklus und gehören zu einem besonders stark durch Glucose reprimierten "Gen-Cluster", deren Transkription durch das Protein Cat8p im Verlauf des "diauxischen shifts" induziert wird (Haurie *et al.*, 2001). Laut Lorenz *et al.* 2001 sind die Enzyme Icl1p und Mls1p die bei einer Umstellung der Zellen auf den Glyoxylatzyklus am stärksten induzierten Enzyme. Auch die Expression der weiteren Isoenzyme des Glyoxylatzyklus Mdh2p und Cit2p steigt an (Lorenz *et al.* 2001). Das Produkt des Gens *ACS1* ist ein Isoenzym der Acetyl-CoA-Synthetase (*ACS2* kodiert für das andere Isoenzym) und katalysiert die Umsetzung von Acetat zu Acetyl-CoA im Cytosol. *ACS2* ist essentiell für das Wachstum auf Glucose, wohingegen *ACS1* Glucose-reprimiert ist (de Jong-Gubbels *et al.*, 1997; Van den Berg und Steensma, 1995).

Daher wurden die beiden Schlüsselenzyme *ICL1* und *MLS1* in Kombination mit anderen Überexpressionen in den *sdh-idh*-Deletionsstämmen überexprimiert.

Folgende Stämme zur Succinatbildung basierend auf den Basisstamm $\Delta sdh2 \Delta idh1$ und $\Delta sdh \Delta sdh2 \Delta idh1$ konnten konstruiert werden und wurden evaluiert:

- $\Delta sdh2 \Delta idh1$ pFlat1-*ICL1* pFlat2-*MLS1* pFlat3
In diesen Stamm sind die Schlüsselenzyme des Glyoxylatbypasses *ICL1* und *MLS1* überexprimiert.

- $\Delta sdh2 \Delta idh1$ pFlat1-*ICL1* pFlat2-*MLS1* pFlat3-*ACS1*
 $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1$ „pFlat1-*ICL1*“ pFlat2-*MLS1* pFlat3-*ACS1*
Ergänzend wurde neben den beiden Glyoxylatbypassenzymen Icl1p und Mls1p auch das Enzym *Acs1p* überexprimiert. Die Acetyl-CoA-Synthetase

katalysiert die Aktivierung von Acetat zu Acetyl-CoA. Die Konstruktion von $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1$ pFlat1-*ICL1* pFlat2-*MLS1* pFlat3-*ACS1* erfolgte mehrmals allerdings war stets im Endstamm die *ICL1*-Überexpression nicht mehr per PCR nachweisbar, so dass unklar ist ob der Stamm die *ICL1*-Überexpression noch aufweist.

- $\Delta sdh2 \Delta idh1$ pFlat1-*aceA* pFlat2-*MLS1* pFlat3-*ACS1*

Es wurde ergänzend ein Stamm mit heterologer *ICL*-Überexpression hergestellt, da die homologe Isocitratlyase in Gegenwart von Glucose proteolytisch abgebaut wird (López-Boado *et al.* 1987). Im Stamm $\Delta sdh2 \Delta idh1$ pFlat1-*ACEA* pFlat2-*MLS1* pFlat3-*ACS1* ist alternativ zum Gen *ICL1* aus *S. cerevisiae* das Gen *aceA* (Isocitratlyase aus *E. coli*) überexprimiert.

Die *sdh2-idh*-Stämme zeigten auch mit Überexpressionen die für diese Stämme typische Halbierung der Wachstumsrate im definierten Medium. Im Komplexmedium zeigt $\Delta sdh2 \Delta idh1$ pFlat1-*ICL1* pFlat2-*MLS1* pFlat3 eine reduzierte Wachstumsrate gegenüber den beiden anderen Deletionsstämmen.

Bei dem Stamm $\Delta sdh2 \Delta idh1$ pFlat1-*ICL1* pFlat2-*MLS1* pFlat3 war eine deutliche Veränderung des metabolischen Verhaltens im Vergleich zu den Deletionsstämmen zu erkennen. Im Gegensatz zu den Deletionsstämmen zeigte dieser Stamm mit der Überexpression des Glyoxylatbypasses erstmals Wachstum auf Ethanol und Wachstum unter Zulaufbedingungen. Allerdings wurden mit dem Stamm nur maximal $0,1 \text{ g L}^{-1}$ Succinat erzielt.

Zudem wurde ein Stamm mit Überexpression des Glyoxylatbypasses und der *Acs1p*, $\Delta sdh2 \Delta idh1$ pFlat1-*ICL1* pFlat2-*MLS1* pFlat3-*ACS1*, evaluiert. $\Delta sdh2 \Delta idh1$ pFlat1-*ICL1* pFlat2-*MLS1* pFlat3-*ACS1* verbrauchte kein Ethanol und zeigte eine geringe Biomassebildung im Zulauf. Es wurde kein Succinat gebildet. Bei der Dosierrate von $0,7 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ wurde auch im Zulauf Ethanol gebildet. Weitere Zulaufversuche zeigten dass die Bildung der Gärprodukte Ethanol und Glycerin bei diesem Stamm prozesstechnisch nicht vermeidbar war. Während der Zulaufversuche war kein Acetat oder Succinat nachzuweisen. Dieser fermentative Stoffwechsel könnte durch die zusätzliche *ACS1* Überexpression verursacht worden sein. Möglich ist aber auch, dass in diesem Stamm eine Mutation in der Atmungskette aufgetreten ist. Laut McCammon und McAlister-Henn 2003 und Lin *et al.* 2001 führt eine *idh*-Deletion zu

einer erhöhten Rate an atmungsdefizienten Mutanten. Dies würde die fehlende Succinatbildung in dem Stamm erklären. Die im Rahmen dieses Projekts umgesetzte Strategie zur aeroben Succinatbildung erfordert jedoch zur Reoxidation der Reduktionsäquivalente eine funktionelle Atmungskette.

Der Stamm $\Delta sdh2 \Delta idh1$ pFlat1-*aceA* pFlat2-*MLS1* pFlat3-*ACS1* mit der heterologen Isocitratlyase-Überexpression zeigte als einziger der 3 Stämme, die zur Succinatbildung konstruiert wurden, eine deutliche Succinatbildung. Daher wurde dieser Stamm für 8 weitere Tage im Zulaufverfahren kultiviert.

Es zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg der Succinatkonzentration über die gesamte Zulaufdauer von 8 Tagen. Bei Versuchsende wurden 3 g L^{-1} Succinat erzielt.

Neben diesen 3 Stämmen zur Succinatbildung wurden auch die Stämme untersucht, die als Zwischenschritte der Stammentwicklung entstanden und nur einen Teil der Überexpressionen oder nur eine *sdh*-Deletion aufweisen, um den Effekt der einzelnen Überexpressionen einordnen zu können (Daten nicht gezeigt).

4.3.7 Überexpressionen im Glyoxylatzyklus in den *sdh-idh-idp*-Deletionsstämmen

Auch im 4 x Deletionsstamm $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$ wurden parallel zu den 2 x und 3 x Deletionsstämmen verschiedene Überexpressionen des Glyoxylatbypasses evaluiert.

Zusätzlich zu der Überexpression der Hefe-eigenen Gene *ICL1* und *MLS1* erfolgte im 4 x Deletionsstamm eine heterologe Überexpression der Gene *KIICL1* und *KIMLS1*. Diese beiden Gene kodieren für die Isocitrat-Lyase und die Malat-Synthase in der Hefe *Kluyveromyces lactis*. Diese beiden Enzyme aus der Crabtree-negativen Hefe *K. lactis* unterliegen im Vergleich zu den homologen Enzymen aus *S. cerevisiae* nicht einer durch Glucose induzierten negativen Regulation auf Proteinebene (Lopez *et al.*, 2004).

Folgende Kombinationen an Überexpressionen wurden in dem 4 x Deletionsstämmen charakterisiert:

- Überexpression der homologen Bypassenzyme und der *ACS1*
 $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$ pFlat1-*ICL1* pFlat2-*MLS1* pFlat3-*ACS1*
- Überexpression der heterologen Bypassenzyme aus *K. lactis*
 $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$ pFlat2-*KIICL1* pFlat3-*KIMLS1*

- Überexpression der heterologen Bypassenzyme aus *K. lactis* und Überexpression der Acetyl-CoA-Synthetase

$\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$ pFlat1-ACS1 pFlat2-KIIICL1 pFlat3-KIMLS1

Auch die 4 x Deletionsstämme mit Überexpressionen zeigten in definiertem Medium ohne Glutamatzusatz einen fermentativen Stoffwechsel. Beispielfür diese Stämme wird das Verhalten von $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$ pFlat1-ICL1 pFlat2-MLS1 pFlat3-ACS1 beschrieben. Bei geringem Wachstum wurde Glycerin und Ethanol sowie eine geringe Menge Acetat gebildet. Die Succinatbildung lag unter $0,1 \text{ g L}^{-1}$. Die geringe Biomasseausbeute von nur $0,03 \text{ g Biomasse (g Glucose)}^{-1}$ und die deutliche Produktion an Gärprodukten deuten darauf hin, dass der Citratzyklus durch die *idh1* und *idp1* Deletion unterbrochen ist.

Wurde dem definierten Medium 2 g L^{-1} Glutamat zugesetzt, erfolgt bei alle Stämmen deutliches Wachstum und eine Ethanol und Glycerinbildung in einer Größenordnung vergleichbar mit den 2 x und 3 x Deletionsstämmen. Allerdings blieben selbst bei Zusatz von 2 g L^{-1} Glutamat die Succinatkonzentrationen unter $0,4 \text{ g L}^{-1}$. Bei einer Zulauftrate von $0,7 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ kam es zu einer deutlichen Ethanolbildung. Diese Ethanolbildung trat auch bei einer deutlichen Reduzierung der Zulauftrate auf nur $0,015 \text{ g Glucose L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf, und ist somit prozesstechnisch nicht vermeidbar.

Festzuhalten ist, dass mit dem 4 x Deletionstämmen mit verschiedenen Überexpressionen keine signifikante Succinatbildung erreicht werden konnte, obwohl die SDH und IDH-Deletion vervollständigt wurde. Die zusätzliche eingeführte *idp1*-Deletion führte zu einer Blockade des respirativen Stoffwechsels, so dass nur noch Fermentationsprodukte nachweisbar waren. Durch die vollständige Blockade des respirativen Metabolismus scheinen Stämme mit Deletionen der Enzyme *Sdhp*, *Idhp* und *Idp1p* nicht zur oxidativen Succinatbildung geeignet. Da sich 4 x Deletionsstämme mit Überexpressionen nicht von dem Stamm ohne Überexpressionen unterscheiden, sind keine Aussagen zur Auswirkung der Überexpression der *Kluyveromyces lactis* Enzyme möglich.

4.3.8 Fazit zur Stamm- und Prozessentwicklung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine metabolische Variante zur oxidativen Produktion von Succinat ausgehend von Glucose in *Saccharomyces cerevisiae* molekularbiologisch umgesetzt. Dazu wurde, analog zu den Arbeiten mit *E. coli* (Lin

et al., 2005), eine Strategie verfolgt, welche die Blockierung der Weiterverstoffwechslung des produzierten Succinats, sowie die Umlenkung des Kohlenstoffflusses über den Glyoxylatzyklus in Richtung Succinat, umfasst. Diese Strategie wurde durch Repression bzw. Ausschaltung der Aktivitäten der Enzyme Succinat-Dehydrogenase und Isocitrat-Dehydrogenase realisiert.

Gleichzeitig wurden die Kernenzyme des Glyoxylatzyklus dereguliert, da diese in Anwesenheit von Glucose transkriptionell stark reprimiert sind (DeRisi *et al.*, 1997; Haurie *et al.*, 2001). Wie angestrebt konnte der Citratzyklus nach den Intermediaten Isocitrat und Succinat unterbrochen werden. Mit *sdh1* und *sdh2*-Deletionsstämmen wurde eine erhöhte Succinatbildung von *S. cerevisiae* erreicht. Im Zulaufverfahren wurden Succinatkonzentrationen von bis zu 8,5 g L⁻¹ erzielt.

Zudem wurde das tetO Promotorsystem als System für induzierbare Deletionen erfolgreich etabliert und in den verwendeten Hefestämmen evaluiert.

Die im nächsten Schritt konstruierten Stämme mit einer zusätzlichen Deletion des Gens *IDH1* zeigten im Zulaufversuch eine gegenüber den reinen *sdh*-Stämmen eine erhöhte Succinatbildung im Zulaufverfahren.

Eine vollständige Ausschaltung der Isocitratdehydrogenase-Aktivität durch zusätzliche Deletion des Gens *IDP1* führte zu einer Verstärkung des fermentativen Metabolismus. Die Überexpression des globalen transkriptionellen Regulationsfaktors Hap4p führte zu einer Erhöhung der Wachstumsrate und einer verbesserten Succinatbildung unter Zulaufbedingungen.

Es wurde eine Vielzahl von Stämmen mit verschiedenen Kombinationen an Überexpressionen der Kernenzyme des Glyoxylatzyklus (homolog und heterolog) konstruiert. Eine partielle Deregulation des Glyoxylatzyklus wurde in *sdh2*-Deletionsstämmen erreicht.

Im Laufe der iterativen Stammentwicklung und -charakterisierung wurde eine Vielzahl an rekombinanten Hefestämmen mit Deletionen und Überexpressionen im Zentralstoffwechsel konstruiert und umfassend reaktionstechnisch und metabolisch charakterisiert. Es wurde damit eine grundlegende Basis für eine weitere Stamm- und Prozessentwicklung zur biotechnologischen Herstellung von Bernsteinsäure in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gelegt.

4.4 Nachweis der Grundfunktionalität der Mikropumpen

4.4.1 Entwurf und Fertigung eines skalierbaren Prototyps

Als erster Schritt der Entwicklung einer parallelen Dosiertechnik wurde zum Nachweis des Funktionsprinzips ein Prototyp für 8 Reaktoren entworfen. Zur Fertigung des Prototyps mussten Lieferanten für die gewünschten Materialien ermittelt werden. Der entworfene 8xPrototyp für die individuelle Dosierung von jeweils 3 Flüssigkeiten in 8 Milliliter-Bioreaktoren musste wegen einer in Musterstückzahlen schlechten Verfügbarkeit einiger Teile (Präzisionskugeln für die Ventile, PEEK-Werkstoff, Silikonfolien in gewünschten Stärken, Edelstahl-Kapillaren) auf lieferbare Dimensionen hin abgeändert werden, so dass zunächst ein 1xPrototyp in „Sandwich“-Bauweise für die individuelle Dosierung von 3 Flüssigkeiten über einen magnetisch induktiven Antrieb konstruiert wurde.

Der Prototyp ist in 2 Segmente aufgeteilt:

- Aktorik

Die nicht autoklavierbare Aktoreinheit enthält die zum Antrieb der Mikropumpen notwendigen Elektromagneten und eine Platine zur Ansteuerung der Spulen.

- Fluidik

Die autoklavierbare Fluidsektion enthält die Fluidkanäle, die Mikropumpen und Dosierkanüle.

Bei den Mikropumpen handelt es sich um Membranpumpen. Eine Fördereinheit besteht aus der Pumpkammer sowie den Ein- und Auslassventilen der Membranpumpe. Eine Silikonmembran zwischen PEEK-Platte und Dosierplatte fungiert als Pumpmembran. Die Kraftübertragung von den Elektromagneten der Aktorik auf die Pumpmembran erfolgt über einen in die Fluidiksektion integrierten Hebel, der wiederum einen Dosierstift betätigt. Eine weitere Silikonmembran dichtet die in der sogenannten Dosierplatte verlaufenden Flüssigkeitskanäle ab. Die Aktorik wird im Betrieb auf die Fluidik aufgesteckt.

Jede Mikrodosiereinheit ist an einen zentralen Substratkanal angeschlossen. Im Ruhezustand sind sowohl das Einlassventil, als auch das Auslassventil geschlossen (ausreichende Vorspannung über ein Elastomer). Dieses Elastomer stellt gleichzeitig die Membran für das Membranventil. Wird der Dosierstift durch den Antrieb bewegt und drückt auf die Membran, so öffnet sich gleichzeitig das Auslassventil und eine definierte Menge Substrat wird in die Dosierkapillare gedrückt. Mit dem Abfließen des Substrates sinkt der Druck und das Auslassventil schließt sich. Sobald der Hubkern wieder in die Ausgangslage zurückkehrt, öffnet sich das Einlassventil aufgrund der Änderung der Druckverhältnisse und die nächste Dosiermenge wird in die Pumpenkammer gefördert.

Die Einzelteile dieses 1xPrototyps wurden weitgehend aus Vollmaterialien heraus gefräst. Einige Komponenten der Sandwich-Bauweise sollen später wirtschaftlich durch Laserschnitt hergestellt werden. Bei der Fertigung der Einzelteile waren hohe Maßgenauigkeiten gefordert, was besonders bei den Teilen aus dem Hochleistungskunststoff PEEK schwierig zu gewährleisten war und nur durch zwischenzeitliches Temperieren der Teile gelang. Die Einzelteile waren trotz zum Teil sehr kleiner Abmessungen problemlos montierbar. Der Flüssigkeitsteil des 1xPrototypen der Dosiereinheit wird über acht mit definiertem Moment angezogene Schrauben zusammengehalten und über die zwei Silikonfolien abgedichtet.

4.4.2 Grundgedanken zum Dosieralgorithmus

Die eingesetzten Mikrodosierpumpen arbeiten nach dem Verdrängungsprinzip und fördern pro Pumpentakt eine diskrete Volumenmenge dV in der Größenordnung von einem Mikroliter. Durch Abweichungen in Fertigung und Materialien können die diskreten Volumenmengen von Pumpe zu Pumpe variieren. Dies erfordert eine individuelle Kalibration der einzelnen Pumpen. Darüber hinaus können weitere Randbedingungen wie Fluidviskosität und aktuelle Flussrate diesen Parameter beeinflussen, welche durch hinterlegte typische Kennlinienfelder ebenfalls erfasst und berücksichtigt werden können (Abbildung 4.6). Über das Kennlinienfeld der Pumpe wird im Prozessleitsystem aus der vorgegebenen Förderrate die einzustellende Taktrate der Pumpe berechnet.

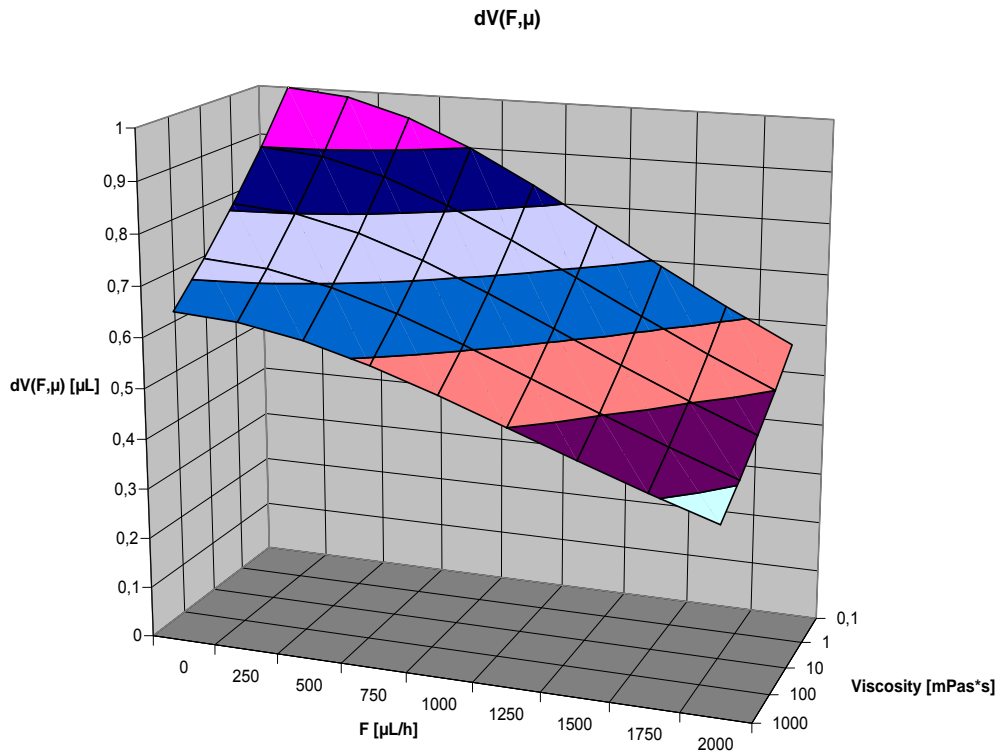


Abbildung 4.6: Prinzipielles Kennlinienfeld zur automatischen Anpassung der Pumpenkalibration

Das Prozessleitsystem überträgt diese als Sollwerte zur Ansteuerungselektronik. Der Mikrocontroller der Ansteuerungselektronik ermittelt wie folgt den Zeitpunkt des nächsten Dosierstoßes für eine bestimmte Pumpe: Zunächst wird durch Integration der Taktrate der Sollwert der Zykluszahl einer individuellen Pumpe ermittelt. Übersteigt der Sollwert der Zykluszahl die aktuelle Zykluszahl um 100 %, so wird der nächste Dosierstoß initiiert und der Istwert um 100 % erhöht.

Dieser Algorithmus, welcher auf einer stetigen Integration des Sollwerts der Dosierrate beruht, gewährleistet, dass auch mehrfache Sollwertänderungen zwischen zwei Dosierstößen mathematisch korrekt berücksichtigt werden.

Zur effizienten Abarbeitung wurde der Algorithmus in 32 bit Festkommaarithmetik implementiert. Im weiteren Verlauf des Projekts zeigte sich, dass der Mikrocontroller die Berechnungen für bis zu 144 parallele Dosierpumpen mit einer Zyklusrate von 100 Hz ausführen kann. Der unterstützte Sollwertbereich der Taktrate ist mit ~ 1 Takt pro Stunde bis zu 2 Takte pro Sekunde sehr weit und entspricht bei einem diskreten Pumpenvolumen $dV_i = 1 \mu\text{L}$ einem stetig einstellbaren Bereich der Flussrate von 1 bis $7200 \mu\text{L h}^{-1}$.

4.4.3 Erster Prototyp der Ansteuerung

Um schnell einen ersten Prototyp zur Ansteuerung der Pumpenhardware zur Verfügung zu stellen, wurde eine bereits vorhandene Elektronikbaugruppe modifiziert und der oben beschriebene Algorithmus implementiert. Die in Abbildung 4.7 gezeigte Elektronik erlaubt die Ansteuerung von bis zu 16 Magnetspulen.

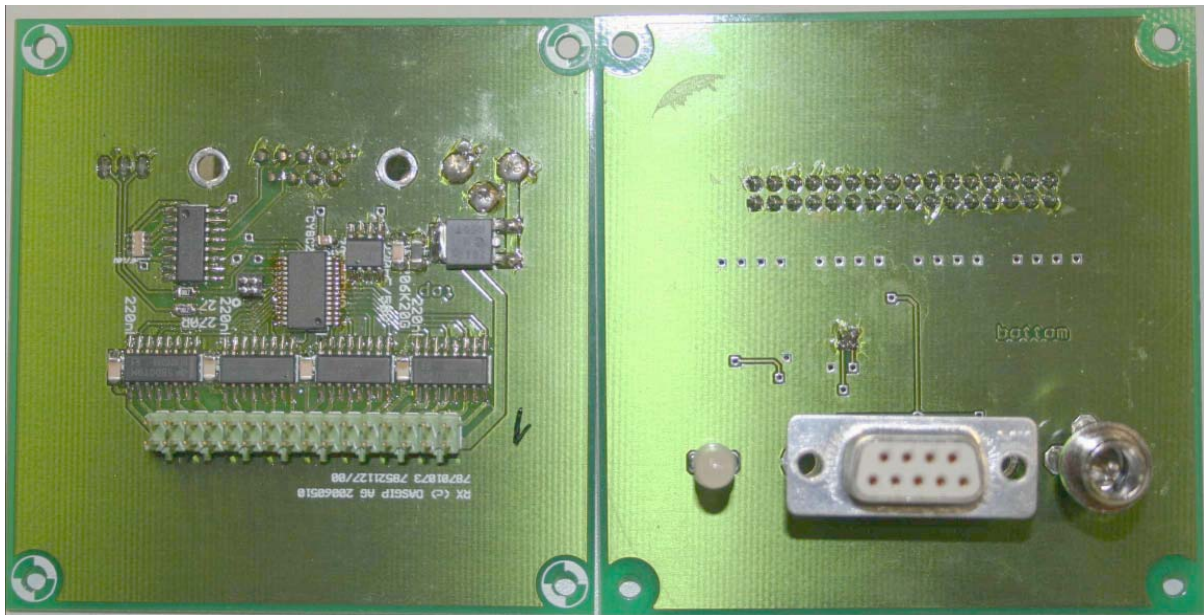


Abbildung 4.7: Elektronikbaugruppe für die Ansteuerung von bis zu 16 parallelen Mikropumpen

Zur Kommunikation wurde für diese, wie auch für alle nachfolgenden Schaltungsentwürfe das auf der Schnittstellenhardware RS232 basierte Protokoll DPP genutzt (Abbildung 4.8). Mit Hilfe des Programms DPP-Insight können auf einfache Art und Weise die Variablen und Parameter der Elektronikbaugruppe, wie beispielsweise die Taktraten der Pumpen oder die Aktivierungszeit der Magnetspulen, modifiziert werden.

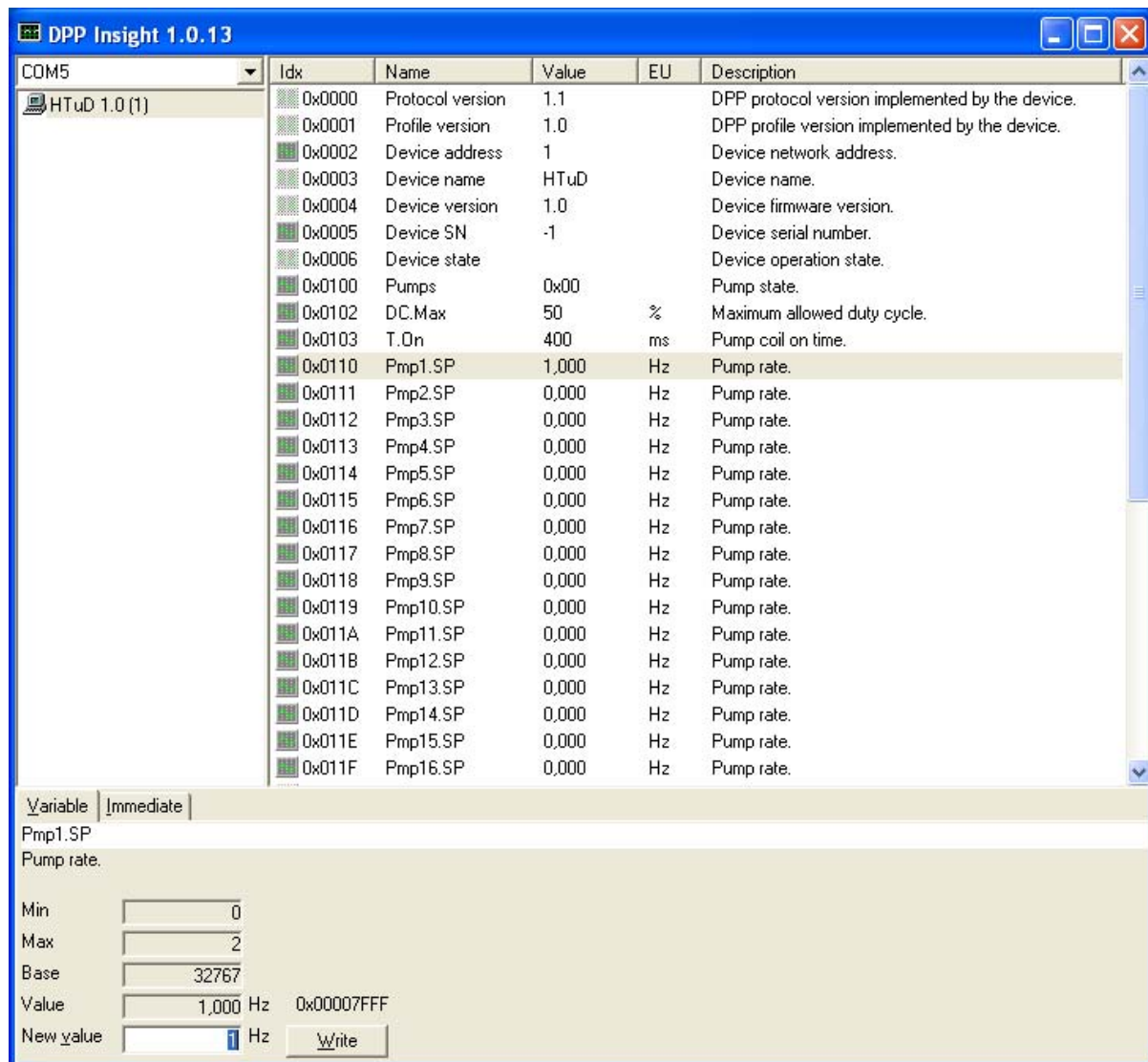


Abbildung 4.8: Benutzeroberfläche von „DPP-Insight“

4.4.4 Evaluierung der Aktorik und Fluidik des 1xPrototyps

Die Ansteuerung der Aktuator-Einheit per PC-Software, Schnittstelle und Steuerplatine der DASGIP erfolgt problemlos. Es wurden verschiedene Taktraten und Tastverhältnisse der elektrischen Pulse getestet und es wurde nachgewiesen, dass alle drei magnetische Hubkolben im 1xPrototyp - wie in der Konstruktionsphase mit der Finiten Elementen Methode simuliert – bei elektrischen Spulen-Leistungen von < 1 W/Spule und Zeiten im 100 ms-Bereich bereits mit vollem Hub arbeiten.

Die Dosierung von Flüssigkeiten schlug zunächst fehl, da die Kugel-Ein- und Auslass-Ventile nicht dicht abschlossen. Späne aus der Fertigung und eine unter dem Mikroskop erkennbare ungleichmäßige PEEK-Oberfläche im Ventilsitz verhinderten das Abdichten der Präzisions-Glaskugeln. Nachdem die Kegel-Sitze

nachgeschliffen und die Vorspannung der Kugeln erhöht wurde, förderten alle drei Mikropumpen Flüssigkeiten. Somit konnte die Grundfunktionalität der Konstruktion nachgewiesen werden. Allerdings zeigten sich in weiterführenden Langzeittests wiederholt Verschleiß und daraus resultierende Undichtigkeiten im Ventilbereich, weshalb die Konstruktion in diesem Bereich überarbeitet wurde.

4.4.5 Redesign des 1xPrototyps

Da ein Auswechseln der Ventile in der ursprünglichen Konstruktion einen kompletten Austausch der aufwändig zu fertigenden und teuren PEEK-Einheit erfordert hätte, wurde die Konstruktion überarbeitet und als alternative Variante zu den selbstgebauten Rückschlagventilen wurde auf preisgünstige, kommerziell erhältliche Miniaturventile zurückgegriffen. Diese wurden in die PEEK-Platte der Dosiertechnik eingesetzt. Die Ventile werden durch eine eingepresste Hülse in der Platte befestigt. Somit ist auch ein späterer Austausch der Ventile z.B. auf Grund von Verschleiß problemlos möglich. Die Haltbarkeit der kommerziellen Miniventile wurde anhand der Daten des Herstellers und zudosierten Volumina eines beispielhaften industriellen Prozesses auf mindestens 3 Jahre abgeschätzt.

Hub und Vorspannung des Dosierstiftes wurden in einer zusätzlichen manuell betriebenen Testeinrichtung, die lediglich aus einer Dosierpumpe besteht, optimiert. Statt PEEK wurde für die Ventilplatte Plexiglas verwendet, um den Ventilbereich optisch kontrollieren zu können. Da sowohl bei der manuellen Testvorrichtung als auch im Prototyp mit 3 Dosierpumpen nach mehr als 100 Betriebsstunden eine Beschädigung der Pumpenmembran durch den Dosierstift zu erkennen war, wurde als Alternative zum Dosierstift eine Dosierkugel verwendet, um die Pumpenmembran zu schonen. Der Umstieg auf eine Dosierkugel erforderte allerdings auch eine neue Konstruktion der Dosierhebel bzw. der Führung der Kugel durch die Dosierhebel.

4.4.6 Charakterisierung der Mikropumpe im 1xPrototyp

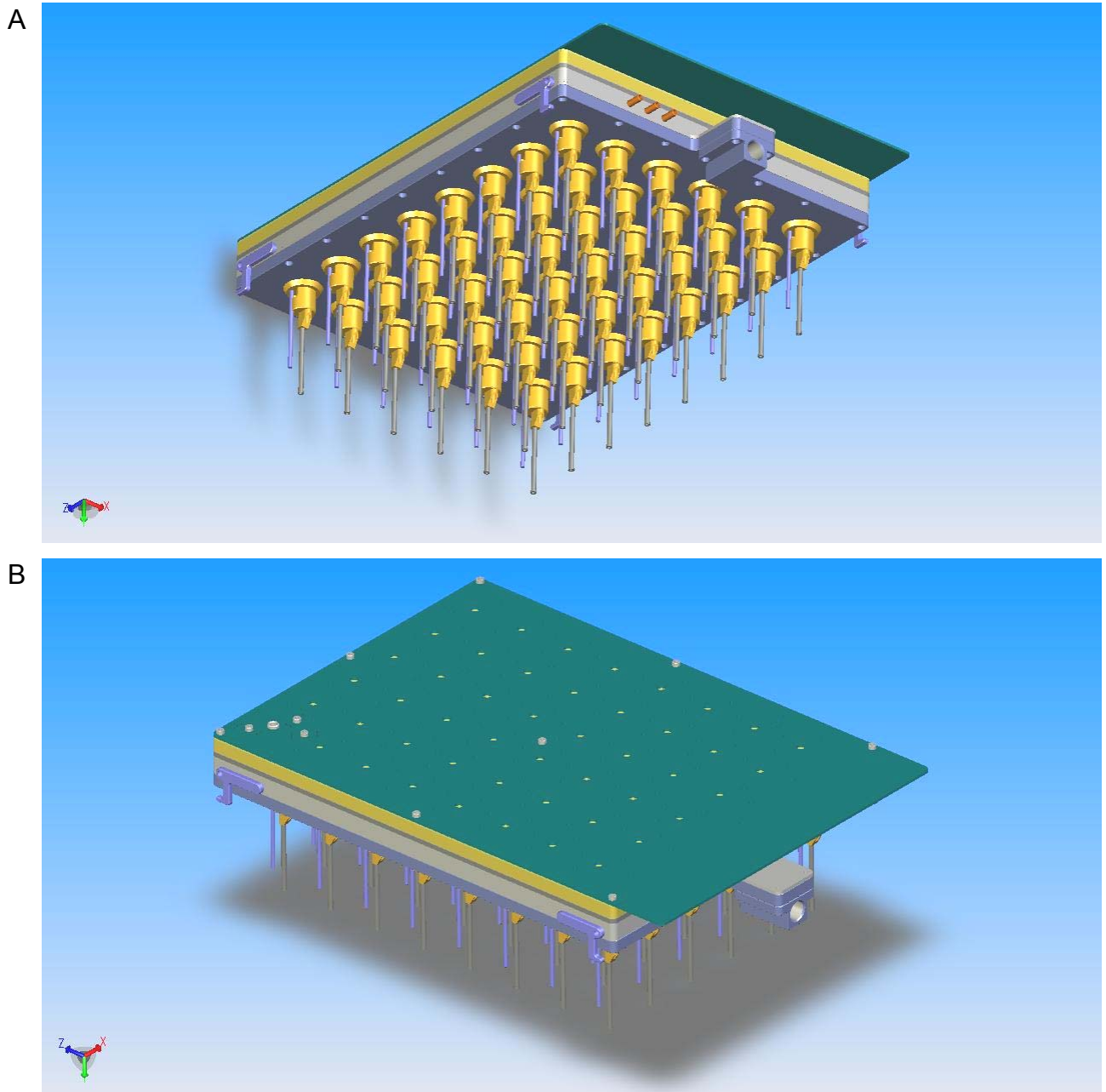
Zum Test von verbesserten magnetischen Hebeln und einer durch die Hubkugeln geänderten Fördercharakteristik, sowie den Miniventilen unter möglichst realistischen Einbauverhältnissen wurde am vorhandenen Prototyp mit 3 Kanälen ein Kanal entsprechend umgerüstet und evaluiert. Ausgewertet wurde die Förderung der Pumpe bezogen auf die Anzahl der Pumpenhübe, um verschiedenen Taktraten der Pumpen vergleichen zu können.

Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse der umfassenden Pumpencharakterisierung dargestellt. Die Reproduzierbarkeit der Förderung der Mikropumpe im 1xPrototyp über den getesteten Zeitraum von 4 Monaten und über 250 Betriebsstunden ist hervorragend. Es zeigt sich kein signifikanter Einfluss der Taktrate, mit der die Pumpe betrieben wird, auf die Förderung pro Hub. Der Einfluss der Ansprechzeit der Mikropumpe wurde ermittelt. Die Ansprechzeit gibt an, wie lange der Dosierhebel von den Elektromagneten angezogen wird. Für den späteren Betrieb wurde eine Ansprechzeit von 200 ms gewählt. Als Betriebsspannung wurden 9 und 12 V untersucht. Da kein Einfluss der erhöhten Spannung auf die Förderung festgestellt wurde, wurde die Betriebsspannung auf 9 V festgesetzt. Glycerin wurde als klassische Modellflüssigkeit für viskose Substrate eingesetzt. Auch viskose Substrate werden bis zu einer Viskosität von 8 mPa s, was einer 60 % (w/v) wässrige Glycerinlösung entspricht, ohne eine Verminderung der Förderleistung gepumpt. Dies deckt den für eine Mikropumpe für biotechnologische Anwendungen benötigten Viskositätsbereich komplett ab. Gängige Zudosierlösungen enthalten häufig bis zu 500 g L⁻¹ Glucose, was einer Viskosität von lediglich 3 mPa s entspricht. Auf Grund einer unzureichenden Befestigung der Dosierkapillare erfolgte diese Messungen ohne die Kapillare. Nach einer Überarbeitung der Abdichtung sank die Förderung der Mikropumpe pro Hub durch den erhöhten Widerstand von ~2 µL auf 1,5 µL ab. Dieser Wert liegt in Bereich der angesprebten Förderung von ~1 µL.

4.5 Aufbau und Inbetriebnahme des 48xPrototyps der Mikrodosiertechnik

4.5.1 Entwurf und Fertigung des 48xPrototyps

Basierend auf den vorangegangenen Ergebnissen der Evaluierung des 1xPrototyps erfolgte die Konstruktion eines 48xPrototyps (Abbildung 4.9). Generell hat sich gezeigt, dass mit zunehmender Komplexität und Detailtreue der Gesamtkonstruktion die Verzögerungen beim Aufbau der Modelle und der entsprechenden Darstellungen im Verlauf derart dominant wurden, dass sie die Arbeitszeiten wesentlich beeinflussten. Die Fertigstellung der Konstruktion und der Fertigungszeichnungen konnte daher nur mit Verzögerungen und erhöhtem Aufwand erreicht werden.



*Abbildung 4.9: Konstruktionszeichnungen des 48xPrototyps der Dosiertechnik
A: Unterseite (Darstellung ohne Rührorgane)
B: Oberseite (Platine ohne Elektronikbauteile und Verguss)*

Die Fertigung dieses großflächigen Systems stellte frästechnisch große Herausforderungen an die Aufspan- und Verarbeitungsgenauigkeit. Der Prototyp mit 48 Dosierstellen für den Bioreaktorblock besitzt 3 Mikropumpen pro Reaktor und unmittelbar neben der Injektor-Kapillare zusätzlich eine Durchgangsbohrung zur Probenentnahme aus dem Reaktor. Hierzu musste eine neue Anordnung der Dosierpumpen in der Fluidikeinheit mitsamt den jeweils zugehörigen und den größten Platzbedarf einnehmenden Spulen in der Aktorik gefunden werden. Die parallele Dosiertechnik für 48 Reaktoren musste in die bestehende Sterilgasabdeckung des

Bioreaktorblocks integriert werden. Hierzu wurde durch die PEEK-Einsätze, die die Gaszufuhröffnung und die Probe-Entnahmeöffnung eines Reaktors sowie die Rührachsenaufnahme der Sterilgasabdeckung umfasst, eine zusätzliche Durchführung für die Injektorkanüle geführt.

Für die 48xAKtorik wurde die mechanische Konstruktion (Positionen der Spulen, der Probeentnahmebohrungen und der Befestigungsbohrungen für die integrierte Platine) festgelegt. Des Weiteren wurden die entsprechende Platine, Spulen, die Kerne und die Laser geschnittenen Rückschlussbleche gefertigt, zusammengebaut und getestet. Mit der festgelegten Konfiguration wurde bei einem Hub von 0,2 mm ein Fördervolumen von $\sim 1,2 \mu\text{l}$ erreicht.

Die Fluidik-Platte aus PEEK stellt das aufwendigste Teil der Gesamtkonstruktion dar. Als Frästeil konzipiert muss es die entsprechend hohen Genauigkeitsanforderungen erfüllen, um die ober- und unterseitigen Membranabdichtungen zwischen den Durchflusskanälen zu ermöglichen als auch dichte Ventilsitze zu gewährleisten. Die Fertigung gelang erst nach mehreren Anläufen, da sich das Plattenmaterial anfangs durch innere Spannungen stark verformte. Es wurden mehrere Spezial-Fräswerkzeuge beschafft und spezielle Techniken der Aufspannung angewandt.

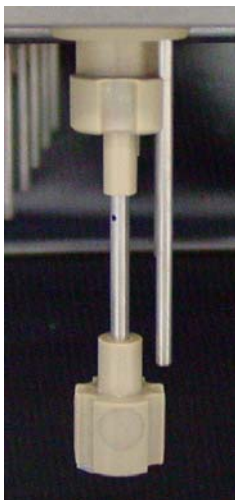


Abbildung 4.10: Position der Dosierkanüle relativ zum Magnetrührer

Die Länge der Kanüle wurde so gewählt, dass die Kanüle unmittelbar über dem Magnetrührkörper endet und daher auch beim minimalen Füllstand von 8 mL im Reaktor in das Reaktionsmedium eintaucht (Abbildung 4.10).

4.5.2 Paralleler 48xPrototyp der Ansteuerung

Mit dem Ziel insgesamt $3 \times 48 = 144$ einzelne Mikrodosierpumpen anzusteuern wurden die Arbeiten zur Umsetzung einer 48fach parallelen Dosiersteuerung begonnen. Aufgrund der großen Anzahl benötigter Steuerleitungen wurde ein neuer weiterentwickelter Typ des bisher genutzten Mikrocontrollers eingesetzt.

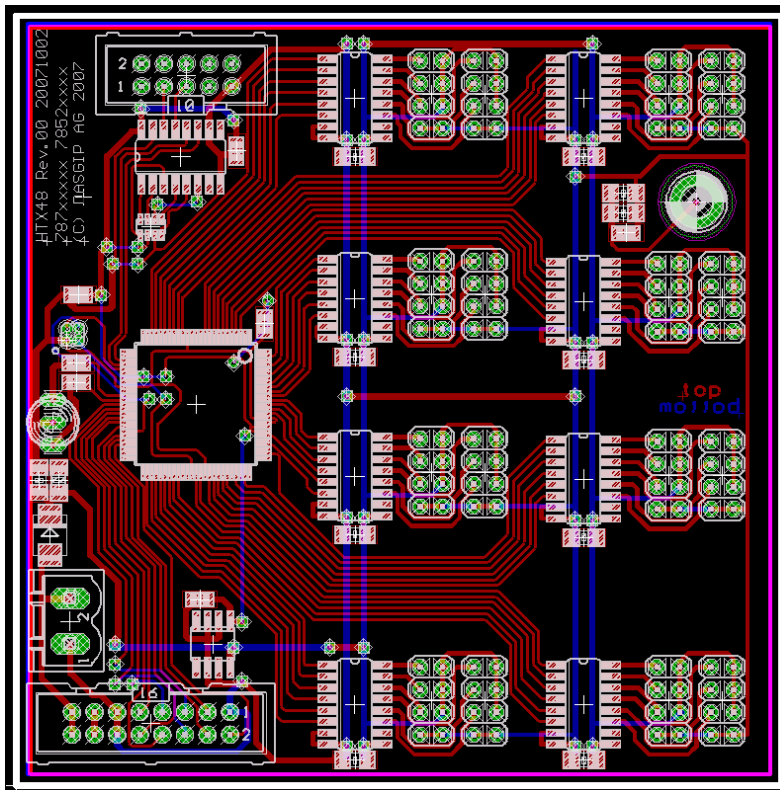


Abbildung 4.11: Platinenlayout 48xPrototyp

Wie aus der Abbildung des Platinenlayouts (Abbildung 4.11) ersichtlich, erscheint die Ansteuerung der im Endausbau 144 individuellen Mikrodosierpumpen durch einzelne Steuerleitungen nicht wirtschaftlich umsetzbar, da dann aufwändige Multilayer-Technologien zur Platinenfertigung zum Einsatz kommen müssten.

Aus diesem Grund wurde der Ansatz nach Aufbau eines ersten Modells und der erfolgreichen Portierung der Steuerungsfirmware auf den neuen Mikrocontroller nicht weiter verfolgt. Stattdessen musste ein alternativer Ansatz, der eine noch höhere Integrationsdichte bei gleichzeitig reduziertem „Verdrahtungsaufwand“ zur Ansteuerung der Leistungstreiber für die Magnetspulen erlaubt, gefunden werden.

Nach Recherche wurden aktuell am Markt eingeführte Leistungstreiber ICs identifiziert, welche die Ansteuerung von bis zu 16 Magnetspulen pro Bauelement inklusive Fehlererkennung und eine sequentiell kaskadierbare SPI-konforme serielle

Schnittstelle aufweisen. Aufgrund der relativ tiefgehenden Konfigurierbarkeit des Mikrocontrollers konnte auf Basis dieser Bausteine ein neues Schaltungskonzept entworfen werden. Dieses Konzept ermöglicht die Aktualisierung der Schaltzustände aller 144 Mikrodosierpumpen innerhalb der kurzen Zeitspanne von ca. 30 μ s. Diese liegt um Größenordnungen unter der angestrebten minimalen Zykluszeit der Schaltventile von 500 ms.

Das neuartige Schaltungskonzept erlaubt somit die hier angestrebte Ansteuerung der 144 Mikrodosierpumpen mit minimalem „Verdrahtungsaufwand“ und hohem Integrationsgrad.

4.5.3 Optimierung der 144x Ansteuerung der Dosierpumpen

Bei der parallelen Ansteuerung von 144 Mikrodosierpumpen, welche über Magnetspulen als Aktoren angesteuert werden, ist es ohne weitere Maßnahmen prinzipiell möglich, dass zu einem nicht vorhersehbaren Zeitpunkt alle Spulen gleichzeitig angesteuert werden. Pro Spule fließt ein typischer Strom von ca. $I = 0,2$ A. Im Fall einer gleichzeitigen Ansteuerung würde somit ein Gesamtstrom von $144 \cdot 0,2$ A = 28,8 A zur Versorgung benötigt. Würde dieser Gesamtstrom der Auslegung zugrunde gelegt, könnte das System nicht wirtschaftlich hergestellt werden, da z.B. Leiterbahnen mit sehr breiten Querschnitten ausgeführt oder auf teure Spezialkonstruktionen zurückgegriffen werden müsste.

Aus diesen Gründen liegt es nahe, eine automatische adaptive Lastverteilung (engl. „Load Balancing“) zu entwickeln, welche einen sicheren Betrieb im Auslegungsbereich des Dosiersystems ermöglicht.

Die maximal benötigte Dosierrate pro Pumpe beträgt wenige Milliliter pro Stunde. Bei einem typischen Volumen pro Dosierstoß von $dV = 1 \mu\text{L}$ und einer Auslegungsgrenze der maximalen Dosierrate $F_{\text{Max}} = 3,6 \text{ mL h}^{-1}$ ergibt sich eine maximal benötigte Taktrate je Pumpe von einem Hertz:

$$f_{\text{Max}} = \frac{F_{\text{Max}}}{dV} = \frac{3,6 \text{ mL/h}}{1 \mu\text{L}} = 3600 \frac{1}{h} = 1 \text{ Hz}$$

Während eines Dosierstoßes ist die Magnetspule für $t = 250$ ms aktiviert. Die relative Einschaltdauer beträgt in diesem Fall

$$f_{\text{Max}} \cdot t = 1 \text{ Hz} \cdot 0,25 \text{ s} = 25 \%$$

Mit Hilfe eines geeigneten Verfahrens zum „Load Balancing“, welches automatisch für jede beliebige Kombination von Taktraten im Auslegungsbereich eine geeignete Einschaltreihenfolge bildet, könnte bei Volllastbetrieb, d.h. alle Pumpen arbeiten mit $f_{\text{Max}} = 1 \text{ Hz}$, der maximal benötigte Gesamtstrom auf $I_{\text{Max}} = 48,8 \text{ A} * 25 \% = 7,2 \text{ A}$ begrenzt werden. Dieser deutlich niedrigere Maximalwert des Versorgungsstroms erlaubt eine Auslegung der Platine in konventioneller Technik. Im Betrieb werden maximal $144 * 25 \% = 36$ Magnetspulen gleichzeitig aktiviert.

Darüber hinaus stellen sich weitere Anforderungen an das Verfahren:

- Im Mittel keine Verschleppungen der zu fördernden Fluidvolumen; schnelles Aufholen von Rückständen nach Spitzenlast
- Robustes Verhalten in Überlastsituationen
- Im Mittel ausgeglichene Reihenfolgebildung bei der Ansteuerung der einzelnen Mikrodosierpumpen.

Ein entsprechendes Verfahren wurde entwickelt, in die Firmware des Mikrocontrollers integriert und erfolgreich in verschiedenen Lastsituationen getestet.

4.5.4 Integration in das Prozessleitsystem

Die Integration der Mikrodosierpumpensteuerung in das Prozessleitsystem fedbatch-XP umfasst im Wesentlichen zwei Aspekte. Zum einen müssen die Funktionen zur Kommunikation mit der Ansteuerungselektronik sowie der Pumpenkalibrierung in das Prozessleitsystem eingebaut werden. Zum anderen müssen die neu hinzugekommenen Mikrodosierpumpen geeignet in das übergeordnete Konzept der abstrakten Dosierfunktionen unter Berücksichtigung von Aspekten wie beispielsweise Ressourcenzuordnung während der Versuchsplanung integriert werden (Abbildung 4.12).

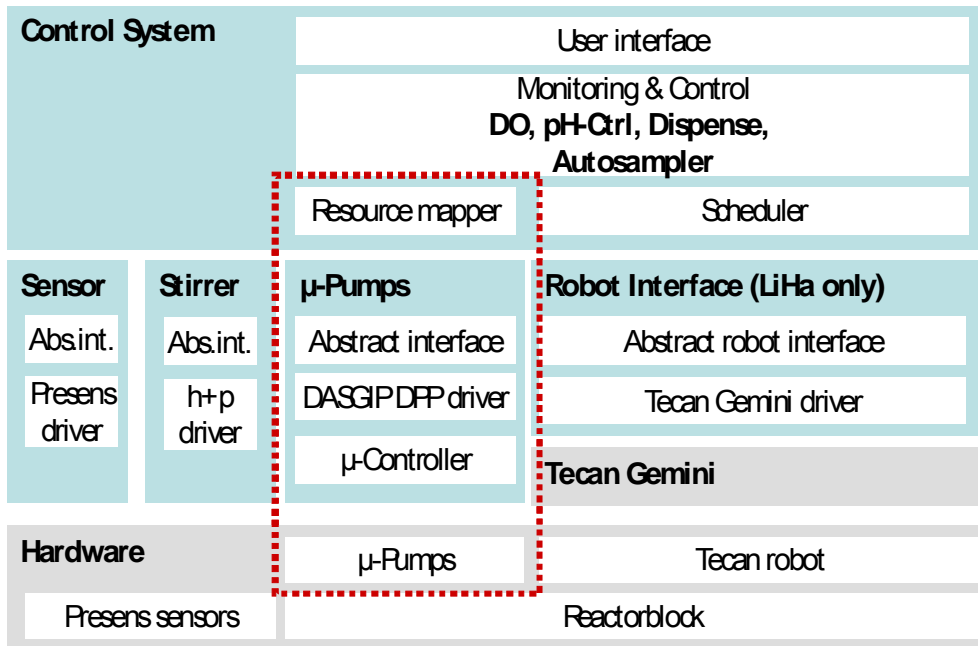


Abbildung 4.12: Integration der Mikrodosierpumpensteuerung in das Prozessleitsystem

Zunächst wurden die Funktionen eines DPP Kommunikationsmasters in das Prozessleitsystem implementiert. Aufgrund der großen Datenmengen, die zur online Ansteuerung der 144 Pumpen übertragen werden müssen, wurde das DPP Protokoll kompatibel erweitert. Innerhalb des Prozessleitsystems werden die Pumpen als eigenständige Objekte dargestellt. Diese Objekte enthalten die Funktionen zur individuellen Pumpenkalibrierung (Abbildung 4.13).

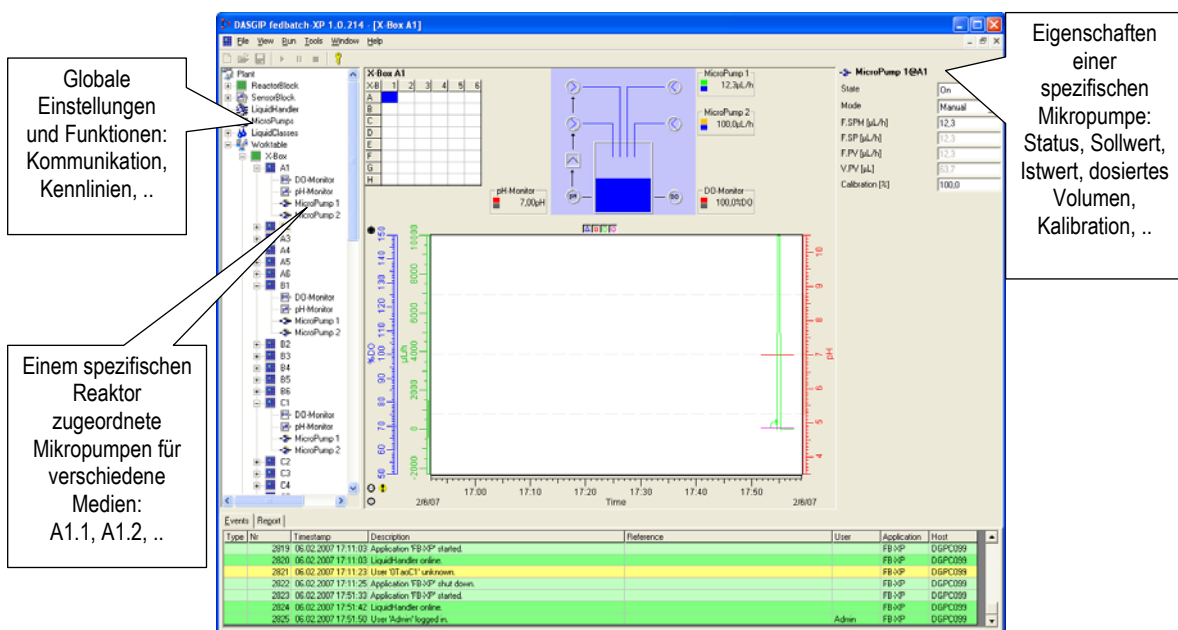


Abbildung 4.13: Benutzeroberfläche für die Dosiersteuerung in „fedbatch-XP“

Die Integration der Mikrodosierpumpen in das übergeordnete Systemkonzept des Prozessleitsystems erforderte einige Erweiterungen und Modifikationen. Dies liegt in dem unterschiedlichen Charakter von Dosiersteuerungen auf Basis eines LiquidHandlers einerseits sowie exklusiv zugeordneten Mikrodosierpumpen andererseits begründet:

- Bei dem bisher verfolgten Konzept einer Dosiersteuerung (inklusive Probenahme und -vorbereitung) mit Hilfe eines Pipettierroboters werden die einzelnen Dosiersteuerungen während der Versuchsplanung als abstrakte Objekte angelegt, bei dem Start eines Versuchs als virtuelle Pumpenobjekte innerhalb der Ablaufsteuerung (Schedulers) erzeugt und den Reaktoren zugeordnet sowie zur Laufzeit die eigentlichen Dosierfunktionen über die zentrale Ressource des LiquidHandlers sequentiell erbracht. Es besteht also eine N:1 Zuordnung zwischen abstrakten bzw. virtuellen Funktionen und realer Ressource. Die Zahl der über die Ressourcen realisierten Funktionen ist prinzipiell unbegrenzt, in der Praxis natürlich limitiert.
- Dem gegenüber handelt es sich bei den Mikrodosierpumpen um fest angelegte Ressourcen, die zahlenmäßig begrenzt sind (drei Pumpen pro Reaktor) und 1:1 den korrespondierenden Funktionen zugeordnet werden müssen. Darüber hinaus existieren die Dosiersteuerungen nicht nur als virtuelle Objekte zur Laufzeit des Versuchs sondern auch als reale Objekte unabhängig von einem gerade aktiven Versuch.

Zur Verwaltung der Mikropumpen inklusive ihrer Zuordnung zu Dosierfunktionen der Versuchsplanung und ihrer Freigabe zu Versuchende wurden weitere Funktionen implementiert sowie vorhandene Funktionen modifiziert.

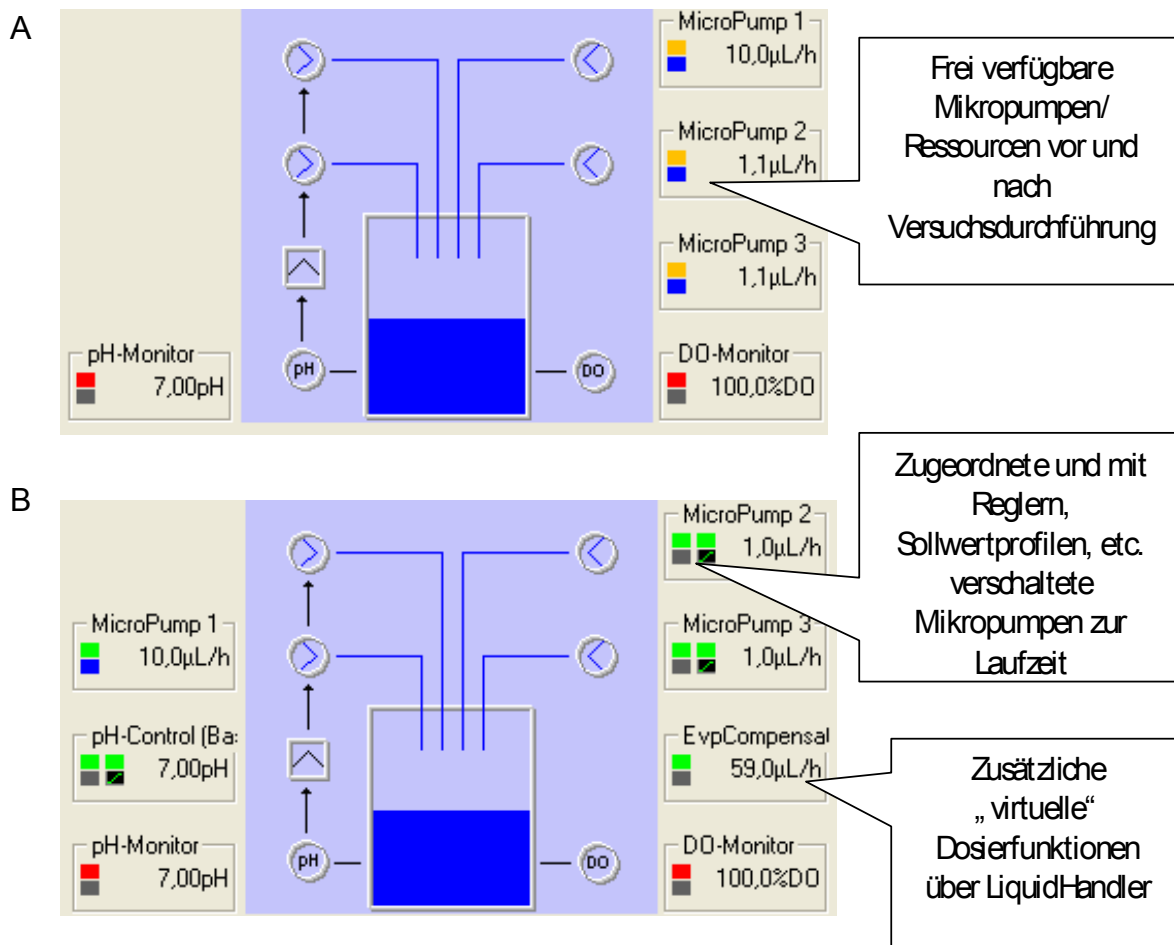


Abbildung 4.14: Mikropumpen als freie Ressourcen (A) sowie als zugeordnete Dosierfunktionen (B)

Abbildung 4.14 veranschaulicht noch einmal die wechselnden Rollen der Mikropumpen vor, während und nach einer Versuchsdurchführung sowie den gemischten Betrieb von Mikrodosierpumpen und LiquidHandler. Zum Einsatz der parallelen Dosiertechnik wurden folgende Schritte implementiert:

- **Laden einer Versuchsplanung**
Gemäß den Angaben in den Versuchsvorlagen und der Systemkonfiguration wird eine Zuordnung der Dosiersteuerungen zu den Ressourcen geplant
- **Starten eines Versuchs**
Nach positivem Konsistenztest werden die Mikrodosierpumpen belegt, verschaltet und in einen definierten Zustand versetzt. Mikrodosierpumpen und LiquidHandler können gemischt betrieben werden.
- **Beenden eines Versuchs**
Die Mikrodosierpumpen werden „entkabelt“, ausgeschaltet und freigegeben.

4.5.5 Inbetriebnahme und erstes Redesign

An der TUM wurde eine Testumgebung zur Evaluierungen der Mikropumpen im 144 x Prototyp aufgebaut und eine Befüll-, Spül- und eine Reinigungsmethode etabliert. Da sich die eingesetzten Ventile bei einem Druck von ~ 5 mbar öffnen, kann die Mikrodosiertechnik mittels Aufprägung eines hydrostatischen Drucks befüllt oder gespült werden. Zur Reinigung wurde eine Reinigungsprozedur bestehend aus einem Vorspülen der Flüssigkeitskanäle der Fluidik mit Wasser und Ethanol und einer anschließenden Reinigung der gesamten Fluidiksektion der Mikrodosiertechnik im Ultraschallbad mit Zusatz eines Neutralreinigers erfolgte. Da die Dosiertechnik nicht selbstansaugend ist, würde die Förderung der Mikropumpen durch Luftblasen in der Pumpenkammer vermindert bzw. könnte vollständig zum Erliegen kommen. Um diese zu vermeiden, wurde zwischen den Flüssigkeitsreservoirs und der Flüssigkeitseinlass an der Dosiertechnik ein Entgaser eingesetzt.

Bei der Inbetriebnahme des 48 x Prototyps an der TUM traten zunächst große Probleme mit der Dichtigkeit des Prototyps auf. Die Flüssigkeit trat vor allem an den der im 1 x Prototyp noch nicht vorhandenen Probenahmebohrungen aus. Gegeneinander dichteten die 3 Kanäle vollständig ab. Als Ursache wurde eine ungenügende Verpressung der beiden Membranen im Bereich der Probenahmebohrung identifiziert. Durch eine Erhöhung der Membrandicke wurde eine verbesserte Verpressung und eine Abdichtung der Membran erzielt, sodass eine erfolgreiche Inbetriebnahme des Prototyps erfolgen konnte.

4.5.6 Charakterisierung des 48xPrototyps

Zur ersten Evaluierung der Mikropumpen wurde die Förderung der Mikropumpen pro Hub mit VE-Wasser als Substrat bei der maximalen Pumpenfrequenz von 2 Hz getestet. Es waren über 90 % der Pumpen in diesem ersten 144 x Prototyp funktionstüchtig. Die durchschnittliche Förderung der funktionstüchtigen Mikropumpen lag bei $1,6 \pm 0,28$ μL pro Pumpenhub. In der fedbatch-Xp Software konnte eine unabhängige Kalibrierung der Mikropumpen durch Eintragen der Förderung pro Hub für jede einzelne Mikropumpe erfolgen.

Als Ursache für nicht funktionierende Pumpen im ersten Prototypen wurden Fertigungstoleranzen identifiziert, die die Funktionsfähigkeit der Dosierhebel oder Dosierkugeln einschränkten. Um diese Fehlfunktionen zu beheben, wären neben einer Nachbearbeitung der Dosierhebel und der Führungsplatte der Hebel auch Nachbearbeitungsschritte der aufwändig und erst nach mehreren Anläufen erfolgreich gefertigten PEEK-Platte notwendig gewesen. Auf diese Nachbearbeitung musste aus Zeitgründen verzichtet werden, da bereits die Fertigung und Inbetriebnahme des 144 x Prototyps auf Grund der Komplexität der Gesamtkonstruktion nur verzögert erfolgen konnte.

4.5.7 Einsatz der Mikrodosiertechnik in Kultivierungen

Vor dem Einsatz der Dosiertechnik zur pH-Regelung wurden geeignete PID-Regelparameter als Reaktion auf eine Sprungantwort identifiziert. Mit einem reinen PI-Regler mit dem Parametersatz $P=60$ und $I=10000$ wurde ein schnelles Einregeln auf den Sollwert ohne ein deutliches Überschwingen erzielt. Abbildung 4.16 und Abbildung 4.15 zeigen beispielhaft Daten aus einer pH-geregelten Satzkultivierung von AH22ura3 pFlat3 in Komplexmedium mit 50 g L^{-1} Glucose.

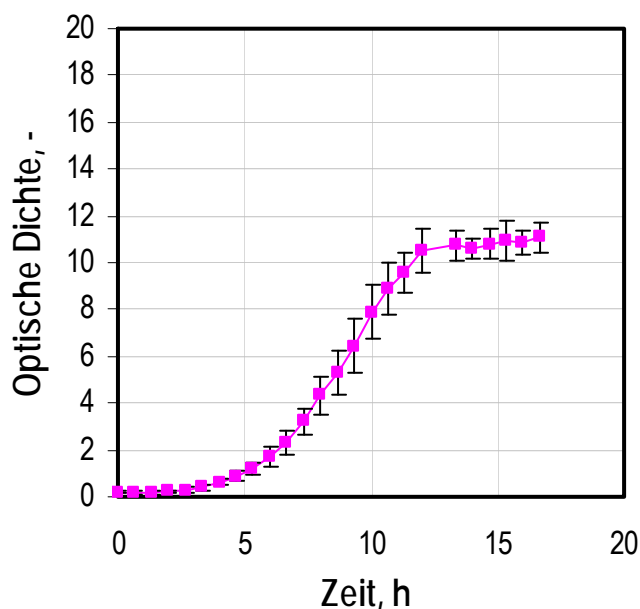


Abbildung 4.15: Mittelwert der Wachstumskurven aus einer Satzkultivierung von AH22ura3 pFlat3 in YEPD-Medium mit 50 g L^{-1} Glucose mit pH-Regelung durch die Mikrodosiertechnik

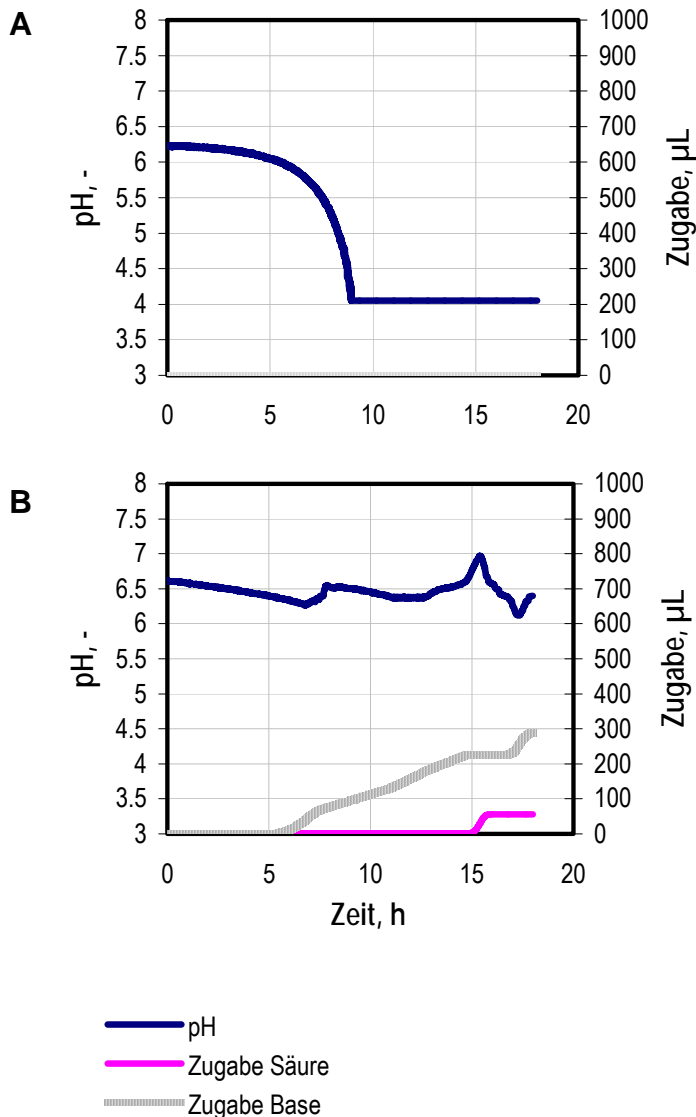


Abbildung 4.16: pH-Verläufe einer Satzkultivierung von AH22ura3 pFlat3 in YEPD-Medium mit 50 g L^{-1} Glucose mit pH-Regelung durch die Mikrodosierttechnik
 A: keine pH-Regelung (Der pH fällt bis unter das Detektionslimit der pH-Sensorik von 4 ab.)
 B: $P=60$ und $I=10000$

Der beste Parametersatz aus dem Experiment mit der Sprungantwort bewährte sich auch in Kultivierungen und führte zu einer schnellen kaum überschwingenden Regelung. Lediglich bei einem Wechsel von Basezugabe auf Säurezugabe oder umgekehrt (Abbildung 4.16 B nach 15,5 und 17,5 Stunden) weicht der pH um bis zu pH 0,4 vom Sollwert ab. Dieses Verhalten wird durch die Totzeit der Dosierkanüle verursacht. An dieser Stelle besteht somit noch Optimierungspotential.

Neben dem Einsatz der Mikrodosierertechnik zur pH-Regelung erfolgte auch ein erster Zulaufversuch mit einem exponentiellen Dosierprofil (Abbildung 4.17). Wie über das Dosierprofil vorgegeben wuchsen die Zellen mit einer Wachstumsrate von $0,12 \text{ h}^{-1}$.

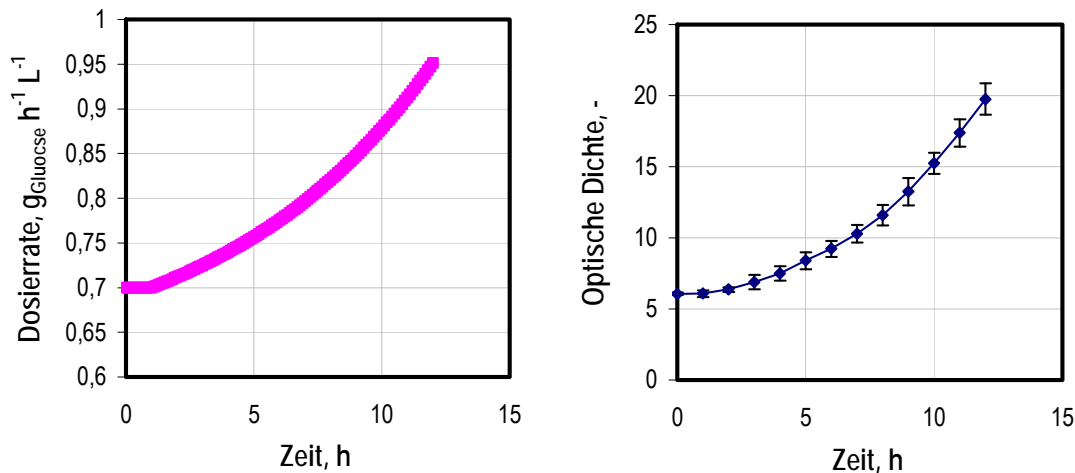


Abbildung 4.17: Zulaufkultivierung mit dem Stamm AH22ura3 pFlat3 in YEPD-Medium.

Es wurden bereits höhere Zelldichten vorgelegt. Das YEPD-Medium enthielt keine Glucose, so dass der Zulauf bereits bei Versuchsbeginn gestartet werden konnte. Das Dosierprofil gab nach einer Einlaufphase von einer Stunde, in der die Dosierrate bei $0,7 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ konstant gehalten wurde, eine Wachstumsrate von $0,12 \text{ h}^{-1}$ vor.

Der erste Prototyp einer 48 x parallelen Mikrodosierertechnik für Reaktoren im Millilitermaßstab wurde erfolgreich in ersten Kultivierungen evaluiert. Ein systematischer Einsatz des Prototypen zur reaktionstechnischen Untersuchung der rekombinanten Stämme zur Bernsteinsäureproduktion war auf Grund der Verzögerungen bei der Fertigung des Prototyps nicht mehr möglich.

4.5.8 Fazit

Im Projektteil „Mikrodosierung“ sollte eine parallele Mikrodosierertechnik für ein Bioreaktorsystem bestehend aus 48 Reaktoren im mL-Maßstab entwickelt werden. Die Dosiertechnik soll die quasikontinuierliche, individuelle Zudosierung von bis zu 3 Substraten in jeden der parallelen Bioreaktor ermöglichen.

Eine Mikrodosierertechnik für 48 Bioreaktoren sollte auf einem bestehenden Bioreaktorblock (Weuster-Botz *et al.* 2005) die folgenden integrierten Funktionen zeigen:

- Inertgaszuführung
- Aufnahme der 48 Rührorgane
- Probeentnahme-Öffnungen
- Dosier-Kanülen
- Dosierpumpen für 3 verschiedene Versorgungs-Flüssigkeiten für jedes Probegefäß
- drei Vorratsbehälter anschließbar.
- abnehmbare elektrische Aktuatereinheit

Im ersten Jahr wurden mehrere Prototypen zum Nachweis der prinzipiellen Funktionsfähigkeit aufgebaut. Dabei wurden die räumlichen Verhältnisse eingehalten, die der spätere Einsatz einer 144 x Dosiertechnik mit 48 unabhängigen Injektor-Kapillaren erfordert, d.h. alle Komponenten sind ohne wechselseitige Beeinflussung in einem Rastermaß von 35 mm Abstand betriebsfähig.

Es wurde zunächst eine funktionsfähige Dosiertechnik aus einer sterilisierbaren Fluidikeinheit und einer abnehmbaren nicht sterilisierbaren Antriebseinheit zur unabhängigen Mikrodosierung von einer Flüssigkeit in eine Injektor-Kapillare konstruiert, gefertigt und untersucht. Die elektromagnetischen und mikromechanischen Komponenten sowie die Ansteuerung erfüllten auf Anhieb die Erwartungen. Im Flüssigkeitsabschnitt gab es Undichtigkeiten an Kugelventilen und Kanal-Abdichtungen. Daher wurden die Kugelventile durch käufliche Spritzguss-„*Duckvalves*“ aus Silikongummi ersetzt und deren mehrfache Dampf-Sterilisierbarkeit ohne Funktionsverluste nachgewiesen.

Ein weiterer Prototyp wurde aufgebaut und eine verbesserte Charakteristik der Hubbewegung auf die Pumpmembran erreicht, indem die bisherigen Hubstifte durch Präzisions-Stahlkugeln ersetzt wurden, was eine schonende Membranverformung ermöglicht und eine bessere Anpassung an die magnetischen Momentankräfte darstellt.

Die Reproduzierbarkeit der Förderung der Mikropumpe in diesem optimierten 1 x Prototyp war über den getesteten Zeitraum von 4 Monaten und über 250 Betriebsstunden hervorragend. Die Förderung der Mikropumpe pro Hub lag bei 1,5 μL . Bei der Charakterisierung der Mikropumpe zeigt sich kein signifikanter Einfluss der Taktrate, mit der die Pumpe betrieben wird, auf die Förderung pro Hub. Auch

viskose Substrate wurden bis zu einer Viskosität von 8 mPa*s ohne eine Verminderung der Förderleistung gepumpt.

Mit den Erfahrungen im Einsatz der Prototypen wurde zu Beginn des dritten Jahres des Projekts die 48 x Mikrodosiertechnik für den 48-fachen, parallelen Bioreaktorblock konstruiert, aufgebaut und evaluiert. Hierbei kamen ökonomische Fertigungsverfahren wie z.B. Laserzuschnitte und Automattendrehteile zum Einsatz.

Die Ansteuerung der 144 Mikropumpen im 48 x Prototyp wurde mittels „Load Balancing“ optimiert und die Mikropumpen in die bestehende Prozessleitsoftware fedbatch-Xp des Bioreaktorblocks eingebunden.

Über 90 % der Pumpen in diesem ersten 48 x Prototyp waren nach ersten Redesignschritten funktionstüchtig und förderten über 0,8 μL pro Hub. Die durchschnittliche Förderung der funktionstüchtigen Mikropumpen lag bei $1,6 \pm 0,28$ μL pro Pumpenhub.

Eine Evaluierung des 48 x Prototyps in Kultivierungen mit *S. cerevisiae* im aeroben Satz- und Zulaufversuchen verlief erfolgreich.

4.6 Soll-Ist-Vergleich

Auf Grund der Gutachteraufgabe „Nachweis der Succinatausschleusung“ musste ein zusätzliches Arbeitspaket AP_{neu1} eingeführt und bearbeitet werden, dass bezüglich der ursprünglich geplanten Stammentwicklung zu Verzögerungen führte. Zudem wurde entsprechend der Anregungen der Gutachter zusätzlich das Arbeitspaket AP_{neu2} zur Ökoeffizienzanalyse ergänzt. Einen Überblick über den Status der einzelnen Arbeitspakete gibt Tabelle 4.6.

Tabelle 4.6: Soll-Ist-Vergleich

	Bearbeiter	Soll	Ist
AP _{neu1}	OB, TUM	Nachweis der Succinatausschleusung	Erfüllt: Quantitative Ausschleusung von Succinat wurde nachwiesen
AP1	OB	Bereitstellung von Expressionskassetten zur konditionellen Expression	Erfüllt: Entsprechende Vektoren sind konstruiert
AP2	OB	Integration der Expressionskassetten in das Hefegenom	Änderung: Es wurde aus Zeitgründen mit Plasmiden zur Überexpression gearbeitet.
AP3	OB, TUM	Metabolomics	Erfüllt: Es wurden entsprechende analytische Methoden etabliert, die rekombinanten Stämme wurden umfassend metabolisch untersucht und diese Informationen in der Stammentwicklung genutzt.
AP4	OB	Überexpression von Genen des Glyoxylat-Zyklus	Erfüllt: Die Schlüsselenzyme des Glyoxylatzyklus Icl1p, Mls1p und Acs1p wurden überexprimiert. Zusätzlich wurden auch heterologe Enzyme und Transkriptionsfaktoren überexprimiert.
AP5	AW-E, TUM	Entwurf von parallelisierbaren Mikrodosiereinheiten	Erfüllt: Ein skalierbarer Entwurf liegt vor und wurde erfolgreich umgesetzt.
AP6	DASGIP	Skalierbare parallele Ansteuerung der Aktoren	Erfüllt: Ein skalierbarer Entwurf liegt vor und wurde erfolgreich umgesetzt.

	Bearbeiter	Soll	Ist
AP7	AW-E, TUM	Aufbau der Prototypen DE-8 und AE-8	Änderung: Prototyp liegt vor. Aufgrund von Lieferschwierigkeiten wurde statt des 8 x Prototyp ein 1 x Prototyp gebaut.
AP8	DASGIP	Aufbau des Prototypen zur elektronischen Ansteuerung	Erfüllt: Prototyp liegt vor
AP9	TUM	Sicherstellung der Grundfunktionalität des Mikrodosierprototyps	Erfüllt: Grundfunktionalität wurde nachgewiesen.
AP10	TUM, AW-E, DASGIP	Redesign DE-8 und AE-8	Erfüllt: Es erfolgten zahlreiche Überarbeitungsschritte und Verbesserungen des Prototyps und eine Festlegung des Design des 144 x Prototyps.
AP11	AW-E, TUM	Aufbau der Dosiereinheit DE-48 und AE-48	Erfüllt: Der Prototyp mit 144 Mikropumpen liegt vor.
AP12	DASGIP	Aufbau der elektronischen Ansteuerung des Dosierblocks	Erfüllt: Die Ansteuerung des Prototyp mit 144 Mikropumpen liegt vor.
AP13	DASGIP	Einbindung in das Prozessleitsystem	Erfüllt: Die Mikropumpen wurden in die Prozeßleitsoftware fedbatch-XP eingebunden.
AP14	DASGIP, TUM	Systemintegration an der TUM	Erfüllt: Die Systemintegration des 144 x Prototyps der Mikrodosiertechnik in das HTBD-System ist erfolgt.
AP15	TUM	Überprüfung der Grundfunktionalität des Mikrodosierblocks	Erfüllt: Durch den Einsatz zur pH-Regelung und für Zulaufversuche wurde die Funktionalität der Dosiertechnik nachgewiesen.
AP16	TUM	Reaktionstechnische Untersuchungen der Bernsteinsäureherstellung mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Erfüllt: Die Vielzahl der in der iterativen Stammentwicklung entstanden rekombinanten Stämme wurde reaktionstechnisch im mL- und auch im L-Maßstab untersucht.
AP _{neu2}	TUM	Ökoeffizienzanalyse	Erfüllt: Es erfolgte eine vergleichende Ökoeffizienzanalyse mit Sabento

5 Sonstiges

5.1 Zusammenarbeit unter den Kooperationspartnern

Es fanden bisher folgende Projekttreffen statt:

- 16.08.06 1. Projekttreffen mit allen Partnern in Garching an der TUM
- 20.11.06 Kick-off der Projekte der ersten Antragsrunde im Rahmen von ChemBioTec in Osnabrück
- 09.02.07 2. Projekttreffen mit allen Partnern in Berlin bei der OrganoBalance GmbH
- 16.10.07 3. Projekttreffen mit allen Partnern in Jülich bei der Dasgip AG
- 20.11.07 Statusseminar der Projekte der ersten Antragsrunde im Rahmen von ChemBioTec in Dortmund
- 12.03.08 4. Projekttreffen mit allen Partnern in Garching an der TUM
- 08.09.08 5. Projekttreffen mit allen Partnern in München bei A-WE

In der Phase der Inbetriebnahme der Ansteuer-Elektronik für die Aktuator-Einheit hat ein reger und fruchtbarer Austausch von Informationen zwischen DASGIP und AW-E stattgefunden. Bezüglich der Details zum Betrieb der Mikropumpen aus der Prozessleitsoftware fedbatch-XP und den Evaluierungsphasen der Software am HTBD-System an der TUM erfolgte eine enge Zusammenarbeit zwischen TUM und DASGIP. Während der Inbetriebnahme und den Testphasen der verschiedenen Prototypen der Mikrodosieretechnik fand ein intensiver Austausch von Erfahrungen, Messergebnissen, Konstruktions- und Verbesserungsvorschlägen zwischen AW-E und TUM statt.

Zwischen OB und TUM erfolgt eine stetige intensive Diskussion und Kooperation zwischen den jeweiligen wissenschaftlichen Mitarbeitern bezüglich der Stammentwicklung und der reaktionstechnischen Untersuchung der Stämme.

5.2 Industrie-Kooperation

Nach Präsentationen dieses Verbundvorhabens bei verschiedenen international agierenden Unternehmen der chemischen Industrie wurden insgesamt drei ‚Letter-of-Intent‘ von den Firmen Degussa, BASF und DSM vorgelegt.

Auf der Basis der erarbeiteten Daten konnte ein Kooperationsvertrag zwischen der ORGANOBALANCE GmbH und einem europäischen Partner aus der chemischen Industrie abgeschlossen werden. Ziel dieser Kooperation ist die industrielle Umsetzung eines biotechnologischen Prozesses zur Bernsteinsäureherstellung.

5.3 Patente

Bei der parallelen Dosiertechnik wird zur Erreichung der Serienreife auch nach dem Abschluss dieses Projektes weiterhin an dem Gesamtsystem gearbeitet. Schutzrechte für das vorliegende Verfahren zur Mikrodosierung wurden zum derzeitigen Zeitpunkt noch nicht eingereicht.

Ein entsprechendes Patent zum Schutz der konstruierten Hefe-Stämme wurde beim deutschen Patentamt eingereicht und durchläuft mittlerweile die Internationalisierungsphase (PCT-Patentanmeldung PCT/DE 2008/000670 "Mikroorganismus zur Herstellung von Bernsteinsäure", Anmelderin: ORGANOBALANCE GmbH). Diese Patentanmeldung wurde dem vorliegenden Bericht angehängt.

5.4 Öffentlichkeitsarbeit

Vortrag auf dem ChemBioTec-Workshop „Ökoeffizienzsysteme: Quantifizierung und Nachhaltigkeit – Methoden und Tools“ am 12. September 2007 in Osnabrück: Bei diesem ChemBioTec-Workshop wurden die Möglichkeiten zur Durchführung von Ökoeffizienzanalysen diskutiert, wobei dort durch TUM erste Nutzererfahrungen mit der Software Sabento vorgestellt wurden.

Messepräsentation auf der Biotechnica 2007 vom 9.-11. Oktober 2007 in Hannover: Vorstellung des F&E-Vorhaben "Biotechnische Herstellung von Bernsteinsäure" durch OB auf dem Gemeinschaftsstand der Deutschen Bundesstiftung Umwelt.

Vortrag auf der DJTB (8.-10. September 2009) in Mannheim:

Gabi Gebhardt, Andreas Raab, Christine Lang, Dirk Weuster-Botz:

"Reaction engineering analysis of *Saccharomyces cerevisiae* strains for succinic acid production".

Publikation in Vorbereitung (Arbeitstitel):

Andreas Raab, Gabi Gebhardt, Dirk Weuster-Botz, Christine Lang: „Metabolic design and initial characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains for succinic acid production”.

Publikation in Vorbereitung (Arbeitstitel):

Gabi Gebhardt, Andreas Raab, Christine Lang, Dirk Weuster-Botz:

“Reaction engineering analysis of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains for succinic acid production”.

Doktorarbeit in Vorbereitung (Arbeitstitel):

Andreas Raab: Studien zum respirativen Zentralmetabolismus in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, TU Berlin.

Doktorarbeit in Vorbereitung (Arbeitstitel):

Gabi Gebhardt: Reaktionstechnische Untersuchungen zur Bernsteinsäureherstellung mit rekombinanten *Saccharomyces cerevisiae*, TU München.

6 Ausblick

Die im Rahmen dieses DBU Projekts erzeugten Stämme stellen den Auftakt zur mikrobiellen Succinatproduktion mit *S. cerevisiae* dar. Im Laufe der iterativen Stammentwicklung und -charakterisierung wurde eine Vielzahl an rekombinanten Hefestämmen mit Deletionen und Überexpressionen im Zentralstoffwechsel konstruiert und umfassend reaktionstechnisch und metabolisch charakterisiert. Zur industriellen Umsetzung muss zunächst die Stammentwicklung fortgesetzt werden. Weitere Arbeiten zur aeroben mikrobiellen Succinatproduktion müssen mit dem Ziel einer vollständigen Deregulierung des Glyoxylatzyklus erfolgen.

Mit einem optimierten Produktionsstamm kann auch auf Basis der bereits vorliegenden Daten ein Produktionsprozess entwickelt und ausgelegt werden. Die Zielgrößen dieses Prozesses sind eine Ausbeute von $0,6 \text{ g}_{\text{Succinat}} \text{ g}_{\text{Glucose}}^{-1}$, Produktkonzentrationen über 100 g L^{-1} bei einer Raumzeitausbeute von $5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Bei der Mikrodosiertechnik zeigten die ersten Kultivierungen, dass die Totzeit der Dosierkanüle zu einem unerwünschten Überschwingen der pH-Regelung führen kann. Die Distanz von den Auslass-Ventilen bis zur Zellsuspensionen im Reaktor wird durch die Injektorkanülen überbrückt und kann aus geometrischen Gründen (vorhandener Bioreaktor mit definierten Kultur-Einweggefäßen) nicht verkürzt werden. Das wünschenswerte, schnellere Ankommen des jeweiligen Pump-Volumens in der entsprechenden Zellkultur kann daher nur durch eine Verringerung des Kapillarquerschnitts der Kanülen erreicht werden. Hier sind jedoch Grenzen in Bezug auf die Strömungs-Widerstandserhöhung und damit auf das Puls-Förder-Verhalten über der Zeit und auf die industrielle Verfügbarkeit zusammen mit der verbundenen Genauigkeit und die mögliche Reinigung solcher Kanülen gegeben. Diese Grenzen müssen in weiteren Versuchen ausgelotet und in ihrem Zusammenspiel optimiert werden.

Zur Serienherstellung von Dosiereinheiten ist eine Versuchsanordnung zu entwerfen, die effizient und möglichst weitgehend automatisiert alle 144 Pumpen testet und vermisst, damit einerseits die Qualitätskontrolle gewährleistet ist und andererseits der Anwender eine seiner Einheit entsprechende individuelle Eich-tabelle in seinen Dosierbetrieb einarbeiten kann.

Da die Lebensdauer von einzelnen Komponenten, wie z.B. Ventile oder Silikonmembranen noch nicht ermittelt werden konnte, ist die Konstruktion auf „Wartung und Service“ zu überprüfen.

7 Literatur

Asano T, Kurose N, Hiraoka N, Kawakita S. (1999) Effect of NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase gene (IDH1, IDH2) disruption of sake yeast on organic acid composition in sake mash. *J Biosci Bioeng.*;88(3):258-63.

Bakker BM, Overkamp KM, van Maris AJ, Kötter P, Luttik MA, van Dijken JP, Pronk JT. (2001) Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.*;25(1):15-37.

Blom J, De Mattos MJ, Grivell LA. (2000) Redirection of the respiro-fermentative flux distribution in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the transcription factor Hap4p. *Appl Environ Microbiol.*;66(5):1970-3.

Buschlen S, Amillet JM, Guiard B, Fournier A, Marcireau C, Bolotin-Fukuhara M. (2003) The *S. Cerevisiae* HAP Complex, a Key Regulator of Mitochondrial Function, Coordinates Nuclear and Mitochondrial Gene Expression. *Comp Funct Genomics.*;4(1):37-46.

Cimini D, Patil KR, Schiraldi C, Nielsen J. (2009) Global transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to the deletion of SDH3. *BMC Syst Biol.* ;3:17.

Ciriacy M. (1977) Isolation and characterization of yeast mutants defective in intermediary carbon metabolism and in carbon catabolite derepression. *Mol Gen Genet.* 20;154(2):213-20.

Colby G, Ishii Y, Tzagoloff A. (1998) Suppression of *sdh1* mutations by the SDH1b gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.*;14(11):1001-6.

Cornils B, Lappe P (2002) Dicarboxylic acids, aliphatic. *Ullmann's Enzyklopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.

Cupp JR, McAlister-Henn L. (1991) NAD⁽⁺⁾-dependent isocitrate dehydrogenase. Cloning, nucleotide sequence, and disruption of the IDH2 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.*;266(33):22199-205.

Cupp JR, McAlister-Henn L. (1992) Cloning and characterization of the gene encoding the IDH1 subunit of NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.*;267(23):16417-23.

de Jong-Gubbels P, *et al.* (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* acetyl-coenzyme A synthetase encoded by the ACS1 gene, but not the ACS2-encoded enzyme, is subject to glucose catabolite inactivation. *FEMS Microbiol Lett* 153(1):75-81

Dennis RA, Rhodey M, McCammon MT. (1999) Yeast mutants of glucose metabolism with defects in the coordinate regulation of carbon assimilation. *Arch Biochem Biophys.*;365(2):279-88.

DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science.*;278(5338):680-6.

Duntze W, Neumann D, Gancedo JM, Atzpodien W, Holzer H. (1969) Studies on the regulation and localization of the glyoxylate cycle enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem.*;10(1):83-9.

Entian KD, Schüller HJ (1997) Glucose repression (carbon catabolite repression) in yeast. In: Zimmermann, F. K.; Entian, K.-D. (eds.); *Yeast sugar metabolism: biochemistry, genetics, biotechnology, and applications*. Technomic, Lancaster Basel (1997) 409-434.

Gangloff SP, Marguet D, Lauquin GJ. (1990) Molecular cloning of the yeast mitochondrial aconitase gene (ACO1) and evidence of a synergistic regulation of expression by glucose plus glutamate. *Mol Cell Biol.*; 10(7):3551-61.

Hansen J, Kielland-Brandt MC. (1996) Modification of biochemical pathways in industrial yeasts. *J Biotechnol.*;49(1-3):1-12.

Haurie V, Perrot M, Mini T, Jenö P, Sagliocco F, Boucherie H. (2001) The transcriptional activator Cat8p provides a major contribution to the reprogramming of carbon metabolism during the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.*;276(1):76-85.

- Hedges D, Proft M, Entian KD. (1995) CAT8, a new zinc cluster-encoding gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.*;15(4):1915-22.
- Kim KS, Rosenkrantz MS, Guarente L. (1986) *Saccharomyces cerevisiae* contains two functional citrate synthase genes. *Mol Cell Biol.*;6(6):1936-42.
- Kleinzeller (1941) The formation of succinic acid in yeast. *Biochem J.*;35(4):495-501
- Kubo Y, Takagi H, Nakamori S. (2000) Effect of gene disruption of succinate dehydrogenase on succinate production in a sake yeast strain. *J Biosci Bioeng.* 2000;90(6):619-24.
- Kunze M, Kragler F, Binder M, Hartig A, Gurvitz A. (2002) Targeting of malate synthase 1 to the peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae* cells depends on growth on oleic acid medium. *Eur J Biochem.*;269(3):915-22.
- Lang C, Looman AC (1995) Efficient expression and secretion of *Aspergillus niger* RH5344 polygalacturonase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 44(1-2): 147 - 156.
- Lascaris R, Bussemaker HJ, Boorsma A, Piper M, van der Spek H, Grivell L, Blom J. (2003) Hap4p overexpression in glucose-grown *Saccharomyces cerevisiae* induces cells to enter a novel metabolic state. *Genome Biol.*;4(1):R3.
- Lascaris R, Piwowarski J, van der Spek H, Teixeira de Mattos J, Grivell L, Blom J. (2004) Overexpression of HAP4 in glucose-derepressed yeast cells reveals respiratory control of glucose-regulated genes. *Microbiology.*;150(Pt 4):929-34.
- Lemire BD, Oyedotun KS. (2002) The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial succinate:ubiquinone oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Jan 17;1553(1-2):102-16.
- Lin AP, McCammon MT, McAlister-Henn L. (2001) Kinetic and physiological effects of alterations in homologous isocitrate-binding sites of yeast NAD(+)-specific isocitrate dehydrogenase. *Biochemistry.*;40(47):14291-301.

Lin H, Bennett GN, San KY. (2005) Fed-batch culture of a metabolically engineered *Escherichia coli* strain designed for high-level succinate production and yield under aerobic conditions. *Biotechnol Bioeng.*; 90(6):775-9.

Lin H, Bennett GN, San KY. (2005) Genetic reconstruction of the aerobic central metabolism in *Escherichia coli* for the absolute aerobic production of succinate. *Biotechnol Bioeng.*; 89(2):148-56.

Lin H, Bennett GN, San KY. (2005) Metabolic engineering of aerobic succinate production systems in *Escherichia coli* to improve process productivity and achieve the maximum theoretical succinate yield. *Metab Eng.*;7(2):116-27.

Link H, Anselment B, Weuster-Botz D (2008) Leakage of adenylates during cold methanol/glycerol quenching of *Escherichia coli*, *Metabolomics*, 4, 240-247.

López ML, Redruello B, Valdés E, Moreno F, Heinisch JJ, Rodicio R. (2004) Isocitrate lyase of the yeast *Kluyveromyces lactis* is subject to glucose repression but not to catabolite inactivation. *Curr Genet.*;44(6):305-16.

López-Boado YS, Herrero P, Gascón S, Moreno F. (1987) Catabolite inactivation of isocitrate lyase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol.*;147(3):231-4.

Lorenz MC, Fink GR. (2001) The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature.*;412(6842):83-6.

McCammon MT (1996) Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with Defects in Acetate Metabolism: Isolation and Characterization of *Acn-* Mutants, *Genetics Society of America*, 144, 57-69.

McCammon MT and McAlister-Henn L (2003) Multiple cellular consequences of isocitrate dehydrogenase isozyme dysfunction. *Arch Biochem Biophys* 419(2):222-33

McKinlay JB, Vieille C, Zeikus JG. (2007) Prospects for a bio-based succinate industry. *Appl Microbiol Biotechnol.* ;76(4):727-40.

McNabb DS, Pinto I. (2005) Assembly of the Hap2p/Hap3p/Hap4p/Hap5p-DNA complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell.*;4(11):1829-39.

Nevoigt E. (2008) Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.*;72(3):379-412.

Okino S, Noburyu R, Suda M, Jojima T, Inui M, Yukawa H. (2008) An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Appl Microbiol Biotechnol.*;81(3):459-64.

Ostergaard S, Olsson L, Nielsen J. (2000) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.*; 64(1):34-50.

Oura E (1977) Reaction products of yeast fermentations. *Process. Biochem.* **12** ,19–21.

Panisko EA, McAlister-Henn L. (2001) Subunit interactions of yeast NAD⁺-specific isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem.*;276(2):1204-10.

Pons MN, Rajab A, Engasser JM (1986), Influence of acetate on growth kinetics and production control of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose and ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24, 193-198.

Przybyla-Zawislak B, Gadde DM, Ducharme K, McCammon MT. (1999) Genetic and biochemical interactions involving tricarboxylic acid cycle (TCA) function using a collection of mutants defective in all TCA cycle genes. *Genetics*;152(1):153-66.

Puskeiler R, Kaufmann K, Weuster-Botz D. (2005) Development, parallelization, and automation of a gas-inducing milliliter-scale bioreactor for high-throughput bioprocess design (HTBD). *Biotechnol Bioeng.*;89(5):512-23.

Regev-Rudzki N, Karniely S, Ben-Haim NN, Pines O (2005): Yeast aconitase in two locations and two metabolic pathways: seeing small amounts is believing. *Mol Biol Cell* 16(9): 4163-4171.

Romano JD, Kolter R. (2005) *Pseudomonas-Saccharomyces* interactions: influence of fungal metabolism on bacterial physiology and survival. *J Bacteriol.*;187(3):940-8.

Rosenfeld E, Beauvoit B. (2003) Role of the non-respiratory pathways in the utilization of molecular oxygen by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.*;20(13):1115-44.

Sauer M, Porro D, Mattanovich D, Branduardi P. (2008) Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends Biotechnol.*;26(2):100-8.

Tachibana C, Yoo JY, Tagne JB, Kacherovsky N, Lee TI, Young ET. (2005) Combined global localization analysis and transcriptome data identify genes that are directly coregulated by Adr1 and Cat8. *Mol Cell Biol.*;25(6):2138-46.

van Hoek P, de Hulster E, van Dijken JP, Pronk JT. (2000) Fermentative capacity in high-cell-density fed-batch cultures of baker's yeast. *Biotechnol Bioeng.*; 68(5):517-23.

Verduyn C, Zomerdijk TP, van Dijken JP, Scheffers WA (1984) Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode. *Appl Microbiol Biotechnol*, 19, 181-185.

Wendisch VF, Bott M, Eikmanns BJ. (2006) Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids. *Curr Opin Microbiol.*;9(3):268-74.

Weuster-Botz D, Puskeiler R, Kusterer A, Kaufmann K, John GT, Arnold M. (2005) Methods and milliliter scale devices for high-throughput bioprocess design. *Bioprocess Biosyst Eng.*;28(2):109-19.

Zeikus JG, Jain MK, Elankovan P (1999) Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl Microbiol Biotechnol* 51: 545-552.

Zhao WN, McAlister-Henn L. (1996) Expression and gene disruption analysis of the isocitrate dehydrogenase family in yeast. *Biochemistry.*;35(24):7873-8.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

AP	Arbeitspaket
BTM	Biotrockenmasse
DH	Dehydrogenase
GC	Gaschromatographie
HPLC	High performance liquid chromatography
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
MS	Massenspektrometrie
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase chain reaction
SDH	Succinat-Dehydrogenase
Tet	Tetracyclin
tetO	Tetracyclin-Operator
tTA	transcriptional Transactivator

Anlagen

Patentanmeldung von ORGANOBALANCE



ORGANOBALANCE
PCT Patentanmeldung