

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

**Ganzzellbiokatalyse mit rekombinanten
Gluconobacter oxydans Stämmen**

Christian Burger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen
Grades eines Doktor-Ingenieurs genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Hartmut Spliethoff

Prüfer der Dissertation : 1. Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
2. Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Liebl

Die Dissertation wurde am 11.04.2019 bei der Technischen Universität
eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 11.06.2019
angenommen.

„Die letzte Stimme, die man hört, bevor die Welt explodiert, wird die Stimme eines Experten sein, der sagt: 'Das ist technisch unmöglich!'“

Peter Alexander Ustinov (1921 – 2004)

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz. An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen und mich herzlichst bei all denjenigen bedanken, die mich in dieser aufregenden sowie lehrreichen Phase meines Lebens begleitet und unterstützt haben.

An erster Stelle bedanke ich mich bei Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz für die hervorragende Betreuung, das Vertrauen, das Sie mir entgegengebracht haben und die Einräumung notwendiger Freiräume bei der Bearbeitung des Projekts. Sie sorgten stets für eine konstruktive Arbeitsatmosphäre und standen immer für alle erdenklichen wissenschaftlichen Fragestellungen zur Verfügung. Recht herzlichen Dank dafür!

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Liebl sowie tbd für die Übernahme der jeweiligen Aufgaben als Koreferent sowie als Prüfungsvorsitzender.

Auch bei meinen Projektpartnern des Lehrstuhls für Mikrobiologie der Technischen Universität München, Prof. Dr. Wolfgang Liebl und Dr. Armin Ehrenreich möchte ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit und dem stets offenen Wissensaustausch bedanken. Mein besonderer Dank geht an Simone Gruber, die mir bei Fragestellungen zum Organismus *Gluconobacter oxydans* unterstützend zur Seite gestanden ist.

Ebenso möchte ich mich bei allen Studierenden (Andreas, Caroline, Constantin, Giulia, Ludwig, Marc, Miriam, Nadine, Nicolas, Patric) herzlichst bedanken – ihr habt mit den Stunden im Labor und eurer Diskussionsfreude zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen!

Zusätzlich danke ich allen jetzigen und früheren Kollegen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik sowie der Fachgebiete für Selektive Trenntechnik und Systembiotechnologie für die konstruktive Zusammenarbeit und eure Freundschaft. Ihr habt die Zeit am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik für mich unvergesslich gemacht! Ein herzlicher Dank geht selbstverständlich auch an die (ehemaligen) Festangestellten – Ellen, Gabi, Georg, Markus, Marlene, Norbert - für ihre organisatorische oder technische Hilfe.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Freundin Theresa und ihrer Familie für die Geduld, den Rückhalt und die fortlaufende Unterstützung bedanken. Danke, dass ihr immer für mich da seid!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Problemstellung und Zielsetzung	3
3	Theoretische Grundlagen	7
3.1	Biologische Grundlagen	7
3.1.1	<i>Gluconobacter oxydans</i>	7
3.1.2	Zentralstoffwechsel	8
3.1.3	Membranständige Dehydrogenasen und Energiemetabolismus	13
3.1.4	Biotechnologische Anwendungen von <i>G. oxydans</i>	16
3.1.5	<i>G. oxydans</i> als Basisstamm für selektive Oxidationen	26
3.2	Bioprozesstechnik	29
3.2.1	Kinetik von Wachstum und Produktbildung	29
3.2.2	Biokatalytische Prozesse	34
3.2.3	Betriebsweise von Bioreaktoren.....	39
3.2.4	Sauerstofftransfer in Rührkesselreaktoren	46
4	Material und Methoden	49
4.1	Reaktionsmedien	49
4.2	Stamm und Stammhaltung	54
4.2.1	<i>Gluconobacter oxydans</i> Stämme	54
4.2.2	Stammhaltung.....	57
4.3	Kultivierung und Biotransformation mit <i>G. oxydans</i>	57
4.3.1	Vorkulturherstellung und Zellernte	57
4.3.2	Satzverfahren in Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab.....	58
4.3.3	Satz- und Zulaufverfahren in Rührkesselreaktoren im Liter-Maßstab.....	60
4.3.4	Kontinuierliche Prozessführung im Litermaßstab mit totaler Zellrückhaltung	62
4.4	Präparative Produktaufarbeitung	65
4.5	Analytische Methoden	66
4.5.1	Bestimmung der Zellkonzentration	66
4.5.2	Bestimmung von Substrat- und Produktkonzentration.....	67
4.5.3	Durchflussszytometrie	73
4.5.4	Bestimmung zellspezifischer Raten	73
5	Bereitstellung von <i>Gluconobacter oxydans</i> zur Verwendung als Ganzzellbiokatalysator	75
5.1	Bereitstellung im Satzverfahren.....	75

5.1.1	Wahl der Kohlenstoffquelle und der Komplexmedienbestandteile	75
5.1.2	Bereitstellung des Multideletionsstamms <i>G. oxydans</i> 621H BP.8 im kontrollierten Rührkesselreaktor im Satzverfahren	77
5.1.3	Wachstumsvergleich des Multideletionsstamms mit dem Wildtypstamm.....	83
5.2	Bereitstellung von <i>G. oxydans</i> 621H BP.8 im kontinuierlichen Verfahren mit totaler Zellrückhaltung	87
6	Reaktionstechnische Charakterisierung der L-Erythrulose Herstellung mit <i>G. oxydans</i>	91
6.1	Selektion verschiedener Multideletionsstämmе	91
6.1.1	Vergleichende Analyse im Milliliter-Maßstab	91
6.1.2	Vergleichende Analysen im Liter-Maßstab	97
6.2	Wachstumsentkoppelte Biotransformation im Satzverfahren.....	100
6.2.1	Medienkomponenten	100
6.2.2	pH.....	107
6.2.3	Biokatalysatorkonzentration	109
6.2.4	Eduktkonzentration	112
6.2.5	Produktkonzentration	120
6.2.6	Vergleich von Wildtypstamm mit dem Multideletionsstamm	122
6.3	Wachstumsgekoppelte Biotransformation im Satzverfahren.....	124
6.4	Kontinuierliche Biotransformation mit getauchtem Hohlfasermembranmodul	126
6.5	Kopplung von Biokatalysatorherstellung und Biotransformation im kontinuierlichen System mit totaler Zellrückhaltung	129
6.5.1	Verwendung des getauchten Hohlfasermembranmoduls	129
6.5.2	Verwendung des externen Querstromfiltrationsmoduls	131
7	Reaktionstechnische Charakterisierung der 5-Ketogluconat Herstellung mit <i>G. oxydans</i>	134
7.1	Selektion verschiedener Multideletionsstämmе	134
7.1.1	Einstufige Biotransformation von Gluconat zu 5-Ketogluconat	134
7.1.2	Zweistufige Biotransformation von Glucose zu 5-Ketogluconat mit Multideletionsstämmеn	138
7.1.3	Zweistufige Oxidation mit dem Wildtypstamm	143
7.2	pH	144
7.3	Eduktkonzentration.....	148
7.4	Zwischenproduktkonzentration	151
7.5	Medienkomponenten.....	153
7.5.1	Vergleich von Phosphatpuffer mit Komplexmedium	153
7.5.2	Variation der Calciumacetatkonzentration.....	157
7.6	Biotransformation im Zulaufverfahren.....	160
8	Zusammenfassung	165

9	Ausblick	170
10	Literaturverzeichnis	172
11	Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	185
12	Anhang	187
12.1	Puffer und Medien	187
12.2	Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	190
12.3	Prozesskontrolle	197

1 Einleitung

„Biotechnologische Prozesse“ wurden schon vor Jahrtausenden eingesetzt, ohne deren Grundlagen verstanden zu haben. So wurde beispielsweise in Ägypten bereits 3.000 vor Christus Essig aus Wein zur Konservierung von Lebensmitteln hergestellt (Eikmanns und Eikmanns 2013; El-Mansi *et al.* 2006). Den Beginn der systematischen Erforschung der Mikrobiologie und damit den Grundstein für deren industrielle Ausschöpfung legte Pasteur im 19. Jahrhundert, indem er den Nachweis dafür erbrachte, dass spezifische Gärprozesse an die Anwesenheit eines entsprechenden Mikroorganismus gekoppelt sind (Eikmanns und Eikmanns 2013). Im Jahr 2006 wurde die Biotechnologie, die als die „Anwendung von Wissenschaft und Technik auf lebende Organismen, Teile von ihnen, ihre Produkte oder Modelle von ihnen [...] zur Erweiterung des Wissenstandes, zur Herstellung von Gütern und zur Bereitstellung von Dienstleistungen“ (OECD 2001) definiert ist, von der Bundesregierung als eine der sieben Schlüsseltechnologien des 21. Jahrhunderts identifiziert (Falke 2010). Innerhalb der Biotechnologie wird je nach Anwendung zwischen roter (Medizin), grüner (Pflanzenbiotechnologie), blauer (marine Biotechnologie), grauer (Umweltbiotechnologie) und weißer Biotechnologie unterschieden (Flaschel und Sell 2005). Letztere befasst sich mit der Herstellung einer Vielzahl unterschiedlicher chemischer Produkte mit Hilfe von Mikroorganismen und dient somit der Etablierung ressourcenschonender Produktionsverfahren (Drepper *et al.* 2006; Falke 2010). Neben der Bereitstellung neuer Produkte, die aufgrund mangelnder chemischer Katalysatoren nicht herstellbar sind, können auch bestehende, chemisch synthetisierte Produkte über biotechnologische Verfahren teilweise umweltfreundlicher – also unter mildereren Bedingungen hinsichtlich Temperatur, Druck und Lösemittel – oder ressourcenschonender – somit unter Verwendung nachwachsender Rohstoffe – bereitgestellt werden (Drepper *et al.* 2006). Die möglichen Produkte sind dabei äußerst vielfältig und reichen von Energieträgern, über Polymere, bis zu Grund- und Feinchemikalien (Flaschel und Sell 2005). Im Jahr 2011 wurde ein weltweites Umsatzvolumen

zwischen 50 – 75 Milliarden Euro mit Produkten aus der weißen Biotechnologie erzielt, was etwa 2 - 3 % des Gesamtumsatzes der chemischen Industrie entsprach (Nieuwenhuizen und Lyon 2011). Der Anteil chemischer Verfahren, die zumindest zum Teil einen biotechnologischen Schritt verwenden, lagen im Jahr 2015 bei 5 %, was verdeutlicht, dass es noch Verbesserungen hinsichtlich biotechnologischer Prozessschritte bedarf, um den Anteil weiter zu erhöhen (Graf und Wirsching 2015).

Innerhalb der weißen Biotechnologie können Stoffumwandlungen entweder mit isolierten Enzymen oder unter Einsatz integraler Zellen erfolgen. Ein Beispiel für einen biokatalytischen Prozess mit Verwendung eines isolierten Enzyms (D-Xylose-Isomerase) ist die Glucoseisomerisierung zu *High Fructose Corn Sirup*, welches alternativ zu Saccharose in der Lebensmittelindustrie verwendet wird. Ein Beispiel für einen Prozess mit Verwendung ganzer Zellen ist die Herstellung der Grundchemikalie Acrylamid mit *Rhodococcus rhodochrous* Stämmen mit einem Volumen von mehreren 100.000 Jahrestonnen (Castiglione und Weuster-Botz 2018). Die Nutzung integraler Zellen (auch Ganzzellbiokatalyse genannt) bietet häufig Kostenvorteile, da teure Enzymreinigungsschritte entfallen und die Zellen die Cofaktor-Regenerierung übernehmen. Jedoch weisen integrale Zellen auch Nachteile auf, da zum einen der Stofftransport der Substrate in das Cytoplasma sowie der Produkte aus der Zelle in das Medium limitiert sein kann. Zum anderen können aufgrund von konkurrierenden enzymatischen Reaktionen innerhalb der Zelle Nebenprodukte entstehen, was zu niedrigen Produktausbeuten führt (Castiglione und Weuster-Botz 2018).

Der Mikroorganismus *Gluconobacter oxydans* bietet Vorteile als Ganzzellbiokatalysator, da dieser eine Vielzahl natürlicher Dehydrogenasen in der Cytoplasmamembran besitzt. Biokatalytische Reaktionen können im periplasmatischen Raum stattfinden und die Produkte akkumulieren im Medium, womit der Nachteil der Massentransferlimitierung überwunden wird (Deppenmeier *et al.* 2002; Gupta *et al.* 2001; Liebl *et al.* 2014). Gleichzeitig sind die Oxidationsreaktionen der Dehydrogenasen an die Atmungskette gekoppelt, über die die freiwerdenden Elektronen auf Sauerstoff übertragen werden. Somit entfällt auch eine potentiell aufwendige Cofaktor-Regenerierung (Deppenmeier und Ehrenreich 2009; Macauley *et al.* 2001). Aufgrund dieser Eigenschaften stellt *Gluconobacter oxydans* einen äußerst interessanten Ganzzellbiokatalysator für die industrielle Biotechnologie dar.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Der Mikroorganismus *Gluconobacter oxydans* besitzt bis zu 32 verschiedene Dehydrogenasen in der cytoplasmatischen Membran, die unterschiedliche Oxidationsreaktionen im periplasmatischen Raum katalysieren (Richhardt *et al.* 2013). Die bei den Oxidationsreaktionen freigesetzten Elektronen werden mit Hilfe prosthetischer Gruppen wie beispielsweise Pyrrolochinolinchinon (PQQ) oder Flavinadenindinukleotid (FAD) auf den in der Membran gelösten Elektronenakzeptor Ubiquinon übertragen, welcher dadurch zu Ubiquinol reduziert wird. Ubiquinol wiederum wird mit der Quinol-Oxidase oxidiert und Sauerstoff dient dabei als terminaler Elektronenakzeptor, wodurch der Cofaktor Ubiquinon regeneriert wird (Deppenmeier *et al.* 2002; Gupta *et al.* 2001). Aufgrund der Oxidationsreaktionen im periplasmatischen Raum treten keine Stofftransportlimitierungen des Substrats vom Medium in das Cytoplasma auf und die Reaktionsprodukte akkumulieren im Medium (Adachi *et al.* 2007; Macauley *et al.* 2001; Matsushita *et al.* 1994). Somit werden die Kosten für die Produktisolierung und Produktreinigung im Vergleich zur herkömmlichen Biokatalyse mit integralen Zellen reduziert. Aufgrund der hohen Regio- und Stereoselektivität der Oxidationsreaktionen sind die erzielten Produkte chemisch nicht oder nur mit einer aufwendigen Schutzgruppenchemie herstellbar (Deppenmeier *et al.* 2002; Gupta *et al.* 2001). Wegen dieser Charakteristika eignet sich *G. oxydans* als Ganzzellbiokatalysator und wird industriell in einigen biotechnologischen Verfahren eingesetzt.

Eine der bekanntesten und ältesten industriellen Anwendungen von *G. oxydans* und weiteren Essigsäurebakterien ist die Essigherstellung über eine zweistufige, membranassoziierte Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd und anschließend von Acetaldehyd zu Acetat, wobei der Ethanol in einem vorgeschalteten Prozess aus einer anaeroben Fermentation von Zuckern mit Hefen, wie beispielsweise *Saccharomyces cerevisiae*, gewonnen wird (Ho *et al.* 2017; Vidra und Németh 2018). Weiterhin wird der Mikroorganismus beispielsweise bei der Herstellung von Vitamin C aus D-Glucose in der „Reichstein-Grüssner“ Synthese eingesetzt.

In diesem Verfahren wird der Teilschritt der regioselektiven Oxidation von D-Sorbitol zu L-Sorbose mit *G. oxydans* im kontrollierten Rührkesselreaktor durchgeführt (Pappenberger und Hohmann 2014; Reichstein und Grüssner 1934). Eine weitere industriell relevante Anwendung ist die Oxidation von Glycerin zu Dihydroxyaceton, welches für kosmetische Anwendungen als Zusatzstoff in Bräunungscremes von Bedeutung ist (Deppenmeier *et al.* 2002). Eine ähnliche physiologische Wirkung liegt bei L-Erythrose vor, die ebenfalls mit *G. oxydans* biotechnologisch aus *meso*-Erythritol hergestellt werden kann. L-Erythrose weist einige Vorteile gegenüber Dihydroxyaceton auf wie beispielsweise ein geringeres allergenes Potential (Jermann *et al.* 2002; Whistler und Underkofler 1938). In der pharmazeutischen Industrie wird *G. oxydans* bei der Herstellung von Miglitol verwendet. Miglitol ist ein Wirkstoff, der die α -Glucosidase inhibiert und daher aufgrund unterdrückter Polysaccharidspaltung hohe Blutzuckerkonzentrationen nach Nahrungsmittelaufnahme verhindert. Miglitol kann als Medikament bei nicht-insulinabhängigem Diabetes mellitus eingesetzt werden (Deppenmeier *et al.* 2002; Schedel 2001). Eine weitere Anwendung ist die Herstellung von Gluconsäure oder 5-Ketogluconat durch Oxidation von Glucose (Deppenmeier *et al.* 2002). Gluconsäure wird als Antioxidans in der Lebensmittelindustrie genutzt und 5-Ketogluconat dient als Ausgangsstoff zur Herstellung von L-Weinsäure, die beispielsweise für die Textilindustrie als Reduktionsmittel von Interesse ist (Klasen *et al.* 1992; Matzerath *et al.* 1995; Meiberg und Spa 1983).

Durch die Entwicklung neuer gentechnischer Methoden wurde die Grundlage geschaffen, das Spektrum dieser Dehydrogenasen in der Cytoplasmamembran von *G. oxydans* gezielt zu verändern (Peters *et al.* 2013a). So wurden Multideletionsstämme erzeugt, bei denen die Gene von bis zu neun annotierten membranständigen Dehydrogenasen deletiert wurden (Peters *et al.* 2013b). In Schüttelkolbenexperimenten konnten Peters *et al.* (2013b) zeigen, dass diese Multideletionsstämme vergleichbare spezifische Wachstumsraten sowie ähnliche maximale Zelldichten erzielen, sofern keine der deletierten Dehydrogenasen zur Oxidation der Kohlenstoffquelle benötigt wird. Mit Hilfe des Expressionsvektors pMM4a konnten native membranständige Dehydrogenasen wieder in *G. oxydans* re-integriert und erfolgreich exprimiert werden, ohne hierbei die Integrität der Zellen zu schädigen (Mientus *et al.* 2017). Mit diesem Expressionssystem war es darüber hinaus möglich, membranständige Dehydrogenasen aus dem Metagenom einer „Essigmutter“ erfolgreich zu exprimieren und somit Oxidationsreaktionen mit einem neuen Substratspektrum zu erschließen (Peters *et al.* 2017). So waren Peters *et al.* (2017) in der Lage, eine Glucose-Dehydrogenase mit einem erweiterten Substratspektrum (Oxidation von Aldoheptosen oder D-Ribose) erfolgreich in einem Multideletionsstamm von *G. oxydans* zu exprimieren. Es wird erwartet, dass durch Verwendung solcher Multideletionsstäme nur mit Expression der gewünschten Dehydrogenasen Nebenreaktionen verhindert und somit die Produktausbeuten gesteigert

sowie die zellspezifischen Produktbildungsraten aufgrund der erhöhten Membrankapazität für die gewünschten Dehydrogenasen erhöht werden.

Das Problem ist, dass die Multideletionsstämme bis jetzt lediglich in Schüttelkolben hinsichtlich des Substratspektrums der membranständigen Dehydrogenasen (Peters *et al.* 2013b), der Expression membranständiger Dehydrogenasen aus dem Metagenom der Essigmutter (Peters *et al.* 2017) und der Analyse verschiedener Expressionssysteme zur homologen Expression der membranständigen Polyol-Dehydrogenase (Mientus *et al.* 2017) untersucht wurden. Allerdings weisen Verfahren in Schüttelkolben Nachteile auf, da in der Regel keine pH-Regelung erfolgt und der Sauerstoffeintrag im Vergleich zu Rührkesselreaktoren geringer ist und daher geringere Zelldichten sowie Produktkonzentrationen erzielt werden (Büchs 2001; Chmiel und Weuster-Botz 2018). Da für die mit *Gluconobacter* Stämmen durchgeführten Oxidationsreaktionen Sauerstoff benötigt wird, dieser aber mit etwa 1 mmol L^{-1} ($30 \text{ }^\circ\text{C}$) eine geringe Löslichkeit in wässrigen Medien aufweist, ist es zwingend erforderlich die reaktionstechnische Charakterisierung in Rührkesselreaktoren durchzuführen, da mit diesen ein hoher Sauerstoffeintrag von bis zu $200 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht wird und eine Skalierung in den technischen Maßstab möglich ist (Chmiel und Weuster-Botz 2018; Weuster-Botz *et al.* 2007). Mit Rührkesselreaktoren ist es darüber hinaus möglich eine variable Prozessführungsstrategie in Abhängigkeit von entsprechenden Inhibierungskinetiken durchzuführen. Somit werden die mit *Gluconobacter* Stämmen durchgeführten industriellen Prozesse - wie beispielsweise die Vitamin C Herstellung - in Rührkesselreaktoren durchgeführt (Pappenberger und Hohmann 2014). Daher ist es das Ziel dieser Arbeit verschiedene Multideletionsstämme in Rührkesselreaktoren anhand von zwei beispielhaften Oxidationsreaktionen reaktionstechnisch zu charakterisieren.

Zunächst wird die Charakterisierung der Multideletionsstämme anhand der einstufigen Oxidation von *meso*-Erythritol zu L-Erythrose durchgeführt. Diese Oxidation wird von der membranständigen Polyol-Dehydrogenase katalysiert und es wurden Multideletionsstämme mit bis zu neun deletierten membranständigen Dehydrogenasen und entweder noch vorhandener oder homolog exprimierter Polyol-Dehydrogenase untersucht. Die Polyol-Dehydrogenase besitzt ein breites Substratspektrum und ist daher für andere Oxidationsreaktionen von Interesse (Adachi *et al.* 2001; Matsushita *et al.* 2003). Zur L-Erythroseherstellung aus *meso*-Erythritol sind bereits wachstumsgekoppelte Prozesse mit *Gluconobacter* Wildtypstämmen beschrieben, mit denen hohe Produktausbeuten von bis zu 96 % (Mizanur *et al.* 2001; Pan *et al.* 2016; Vorlop *et al.* 2009) und hohe Produktkonzentrationen von bis zu 235 g L^{-1} L-Erythrose erreicht wurden (Vorlop *et al.* 2009). Ziel dieser Arbeit ist die L-Erythroseherstellung mit einem geeigneten Multideletionsstamm zu charakterisieren und ein skalierbares Herstellungsverfahren zu etablieren.

Aufbauend auf dieser einstufigen Oxidationsreaktion erscheint es sinnvoll auch eine zweistufige Oxidation mit einem geeigneten Multideletionsstamm von Glucose zu Gluconat und weiter zu 5-Ketogluconat zu untersuchen. Bei der 5-Ketogluconatherstellung ist die Herausforderung, dass zum einen in den Multideletionsstämmen zusätzlich zur membranständigen Polyol-Dehydrogenase noch die membranständige Glucose-Dehydrogenase homolog exprimiert werden muss und zum anderen, dass die Bildung des Nebenprodukts 2-Ketogluconat durch die Glycerin-2-Dehydrogenase unterdrückt werden muss (Merfort *et al.* 2006b). Yuan *et al.* (2016a) konnten eine 5-Ketogluconatkonzentration von 162 g L^{-1} innerhalb von 64 h bei einer Produktausbeute von 69 % mit einem rekombinanten *Gluconobacter* Stamm mit homologer Überexpression der membranständigen Glucose-, Polyol-Dehydrogenase und der Quinol-Oxidase sowie der Gene zur Synthese der prosthetischen Gruppe Pyrrolochinolinchinon (PQQ) erzielen. Ziel ist die 5-Ketogluconatherstellung mit einem Multideletionsstamm mit geeigneter homologer Expression der beiden membranständigen Dehydrogenasen zu charakterisieren und ein Herstellungsverfahren zu etablieren.

Im Einzelnen ist folgende Vorgehensweise geplant:

- Reproduzierbare Zellherstellung von Multideletionsstämmen im kontrollierten Rührkesselreaktor und Vergleich mit dem Wildtypstamm
- Auswahl eines geeigneten Multideletionsstamms anhand der zellspezifischen L-Erythrosebildung sowie der zellspezifischen 5-Ketogluconatbildung
- Identifikation eines geeigneten Mediums und pH für die wachstumsentkoppelte Biotransformation und Vergleich mit wachstumsgekoppelter Biotransformation im kontrollierten Rührkesselreaktor im Satzverfahren
- Charakterisierung der Multideletionsstämme durch Identifikation maximaler zellspezifischer Produktbildungsraten sowie der maximalen Sauerstoffaufnahme
- Wahl einer geeigneten Prozessführungsstrategie im kontrollierten Rührkesselreaktor in Abhängigkeit von einer möglichen Substratüberschuss- und/oder einer möglichen Produktinhibierung

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Biologische Grundlagen

Im Folgenden wird ein Überblick über den verwendeten Mikroorganismus *Gluconobacter oxydans* (*G. oxydans*) gegeben. Im Anschluss wird der Stoffwechsel des Bakteriums beschrieben, wobei sowohl zwischen dessen Zentralstoffwechsel als auch den membranständigen Oxidationen und des daran gekoppelten Energiestoffwechsels unterschieden wird. Anschließend wird ein Überblick industrieller Anwendungen des Organismus als Ganzzellbiokatalysator gegeben. Zuletzt wird auf die metabolische Weiterentwicklung dieses Biokatalysators durch gentechnische Modifikation eingegangen.

3.1.1 *Gluconobacter oxydans*

G. oxydans ist ein gram-negatives Bakterium, welches zur Familie der *Acetobacteraceae* und zur Klasse der α -Proteobakterien gehört. Die Familie der *Acetobacteraceae* wiederum beinhaltet die Gattungen *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Ameyamaea*, *Asaia*, *Gluconoacetobacter*, *Gluconobacter*, *Granulibacter*, *Kozakia*, *Komagataeibacter*, *Neoasaia*, *Neokomagataea*, *Saccharibacter*, *Swaminathania* und *Tanticharoenia* (Saichana *et al.* 2015). Innerhalb der Gattung *Gluconobacter* wird zwischen den fünf Spezies *G. oxydans*, *G. frateurii*, *G. cerinus*, *G. albidus* und *G. thailandicus* unterschieden (Yamada *et al.* 1999). Innerhalb der Spezies *G. oxydans* gibt es verschiedene Subspezies und der in dieser Arbeit verwendete Biokatalysator beruhte auf der Subspezies 621H.

Bakterien der Gattung *Gluconobacter* haben eine Größe von 0,5 – 0,8 x 0,9 – 4,2 μm und eine ellipsoide bis stäbchenförmige Gestalt. Die Zellen können einzeln oder/und in Paaren vorkommen. Seine natürlichen Habitate sind Früchte oder zucker- und alkoholhaltige

Flüssigkeiten. Der Organismus kann bei hohen Zuckerkonzentrationen und niedrigem pH wachsen, wobei ein Wachstum bis zu einem pH von 2,5 beschrieben ist. (Deppenmeier und Ehrenreich 2009; Gupta *et al.* 2001; Macauley *et al.* 2001; Olijve und Kok 1979b). Der optimale pH für Wachstum liegt allerdings im Bereich zwischen pH 5,5 und pH 6,0, da der Pentose-Phosphat-Weg (PPW) als Hauptstoffwechselweg bei niedrigerem pH inhibiert wird. Der optimale Temperaturbereich für das Wachstum liegt zwischen 25 und 30 °C.

Es handelt es sich um einen obligat aeroben Mikroorganismus, der Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor nutzt (Gupta *et al.* 2001; Macauley *et al.* 2001). So konnte gezeigt werden, dass es unter Sauerstoffausschluss zu einer Änderung der Expression von 486 Genen kommt, was etwa 20 % der annotierten, chromosomalen Gene entspricht. So wurde beispielsweise ein erhöhter mRNA Gehalt für die terminale Oxidase, für den Cytochrom-*bc1*-Komplex sowie für zwei Alkohol-Dehydrogenasen nachgewiesen, wohingegen eine geringere Expressionsrate für Gene der respiratorischen Dehydrogenasen, der Pyrrolochinolinchinon-Biosynthese (PQQ-Biosynthese) sowie des Zentralstoffwechsels eingetreten ist. Bei einem Sauerstoffpartialdruck von 15 % Luftsättigung konnten hingegen kaum eine Änderungen des Expression nachgewiesen werden, weshalb hier von nicht sauerstofflimitierenden Bedingungen ausgegangen werden kann (Hanke *et al.* 2012).

Das Genom der Subspezies *G. oxydans* 621H wurde vollständig sequenziert (Prust *et al.* 2005). Basierend auf dieser Sequenz konnten grundlegende Erkenntnisse bezüglich der am Metabolismus beteiligten Enzyme sowohl hinsichtlich des Zentralstoffwechsels als auch der membranständigen Oxidationen geschaffen werden. Im Folgenden wird der Zentralstoffwechsel näher beschrieben.

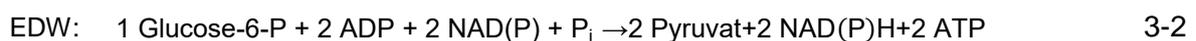
3.1.2 Zentralstoffwechsel

Es konnte gezeigt werden, dass der Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (Glykolyse) aufgrund der nicht vorhandenen 6-Phosphofruktokinase, nicht funktionsfähig ist (Prust *et al.* 2005). Für den Entner-Doudoroff-Weg (EDW) und den Pentose-Phosphat-Weg (PPW) hingegen sind alle Enzyme annotiert, weshalb der Katabolismus vermutlich über diese Wege (Abbildung 3-1) erfolgt (Kerstens und Ley 1968; Kitos *et al.* 1958; Prust *et al.* 2005).

Die Schlüsselenzyme des PPW sind die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase sowie die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase mittels derer Glucose-6-Phosphat unter CO₂ Freisetzung zu Ribulose-5-Phosphat oxidiert wird und Reduktionsäquivalente in Form von NAD(P)H gebildet werden (oxidativer, nicht-reversibler Teil). Ribulose-5-Phosphat dient entweder als Ausgangssubstrat für den Anabolismus oder durch eine Transketolase und Aldolase über Zwischenstufen wie beispielsweise Erythrose-4-Phosphat zu Fructose-6-Phosphat

umgewandelt (nicht-oxidativer, reversibler Teil). Aus diesem wird über die Glucose-6-Phosphat-Isomerase/Aldolase Glucose-6-Phosphat gebildet, welches wiederum als Ausgangssubstrat für den PPW fungiert (Berg *et al.* 2014; Deppenmeier und Ehrenreich 2009; Hanke *et al.* 2013; Prust *et al.* 2005).

Richhardt *et al.* (2012) konnten zeigen, dass trotz der Anwesenheit der Schlüsselenzyme des EDW (6-Phosphogluconat-Dehydratase und 2-Dehydro-3-deoxy-6-Phosphogluconat-Aldolase) der PPW als primärer Weg im Katabolismus fungiert, da die Gendeletion der für den PPW benötigten 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase das Wachstum erheblich reduzierte. Nach Kruger und Schaewen (2003) unterscheiden sich der PPW und der EDW folgendermaßen hinsichtlich der energetischen Effizienz sowie der Bildung an Reduktionsäquivalenten:



Im Gegensatz zu vielen anderen aeroben Organismen wird die Kohlenstoffquelle von *G. oxydans* nicht vollständig zu Kohlenstoffdioxid (CO₂) und Wasser, sondern zu CO₂ und Acetat oxidiert. Dies liegt an dem unvollständigen Citratzyklus aufgrund der fehlenden Succinat-Dehydrogenase und Succinyl-CoA Synthase (Greenfield und Claus 1972; Olijve und Kok 1979a; Sievers und Swings 2006). Acetat wird durch eine Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetaldehyd mittels der Pyruvat-Decarboxylase und anschließender Oxidation durch die NADP-abhängige Acetaldehyd-Dehydrogenase gebildet und akkumuliert daher im Medium (Krajewski *et al.* 2010; Peters *et al.* 2013a).

Außerdem liegt eine Vielzahl weiterer cytoplasmatischer Dehydrogenasen vor, welche diverse Polyole und Zucker oxidieren. Die daraus resultierenden Ketosen und Zuckeralkohole werden entweder durch Epimerasen und Isomerasen modifiziert oder durch Kinasen phosphoryliert und dienen wiederum als Intermediate für den PPW. Aufgrund der Tatsache, dass keine Phosphoenolpyruvat-Synthase oder andere Phosphoenolpyruvat synthethisierenden Enzyme vorhanden sind, kann keine Gluconeogenese stattfinden, weshalb der PPW auch zur Bereitstellung von Intermediaten für den Anabolismus dient (Deppenmeier und Ehrenreich 2009). Des Weiteren konnte durch die Genomanalyse von Prust *et al.* (2005) gezeigt werden, dass alle Enzyme für die Synthese von Aminosäuren, Phospholipiden und der meisten Vitamine vorliegen. *G. oxydans* weist niedrige Biomasseertragskoeffizienten auf, so sind

substratspezifische Biomasseertragskoeffizienten $Y_{X/S}$ zwischen 0,09 - 0,1 $g_X g_S^{-1}$ beschrieben (Kiefler *et al.* 2017; Krajewski *et al.* 2010; Richhardt *et al.* 2012), was im Vergleich zu *Escherichia coli* – einem Standardorganismus in der Biotechnologie – mit einem Biomasseertragskoeffizienten $Y_{X/S}$ von 0,49 $g_X g_S^{-1}$ (Ng 1969) bei Wachstum mit Glucose gering ist.

Da im Rahmen dieser Arbeit D-Mannitol, D-Fructose sowie D-Glucose als Kohlenstoffquellen (im weiteren Verlauf der Arbeit werden lediglich die L-Stereoisomere explizit genannt und das D bei D-Stereoisomeren weggelassen) verwendet wurden, wird im Folgenden auf den Katabolismus dieser Kohlenstoffquellen eingegangen (Abbildung 3-1).

Mannitol als Kohlenstoffquelle

Mannitol ist als Kohlenstoffquelle für *G. oxydans* beschrieben (Gosselé *et al.* 1981). Es wird zunächst membranständig durch die Polyol-Dehydrogenase zu Fructose oxidiert. Fructose kann nun über einen unbekanntem Transporter in das Cytoplasma aufgenommen werden. Eine direkte cytoplasmatische Oxidation von Mannitol scheint nicht möglich zu sein, da ein Deletionstamm ohne Polyol-Dehydrogenase kein Wachstum im Medium mit Mannitol als Kohlenstoffquelle aufwies (Peters *et al.* 2013b). Dies bestätigen Ergebnisse von Hölscher und Görlich (2006), die zeigten, dass nach Blockade der PQQ-Biosynthese kein Wachstum mit Mannitol als Kohlenstoffquelle mehr möglich war. Da PQQ für die membranständigen Dehydrogenasen als prosthetische Gruppe benötigt wird, war dies ein indirekter Nachweis, dass bei Wachstum mit Mannitol als Kohlenstoffquelle zunächst eine membranständige Oxidation des Mannitols erforderlich ist.

Die ins Cytoplasma transportierte Fructose wird anschließend unter ATP-Verbrauch zu Fructose-6-Phosphat von der Fructose-Kinase phosphoryliert, das als Ausgangssubstrat für den PPW dient. Erfolgt der Katabolismus im EDW, so wird Fructose-6-Phosphat von der 6-Phosphat-Isomerase zu Glucose-6-Phosphat isomerisiert (Richhardt *et al.* 2012). Es konnte festgestellt werden, dass die Wachstumsraten bei Verwendung von Mannitol als Kohlenstoffquelle mit bis zu 0,39 h^{-1} höher sind als bei Verwendung von Fructose als Kohlenstoffquelle (Wachstumsrate 0,23 h^{-1}), was vermutlich auf den zusätzlichen membranständigen Oxidationsschritt aufgrund des reduzierteren Zustandes von Mannitol gegenüber Fructose zurückzuführen ist (Peters *et al.* 2013b).

Glucose als Kohlenstoffquelle

Glucose wird entweder durch die PQQ-abhängige Glucose-Dehydrogenase membranständig zu Gluconat oxidiert (Ameyama *et al.* 1981; Levering *et al.* 1988) oder über einen unbekanntes Transporter aufgenommen. Intrazellulär wird es dann entweder mit einer cytoplasmatischen NADP-abhängigen Glucose-Dehydrogenase zu Gluconat oxidiert oder von einer Glucokinase zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert, um anschließend in den PPW eingeschleust zu werden. Gluconat wird entweder membranständig mit der Gluconat-2-Dehydrogenase zu 2-Ketogluconat oder mit der Polyol-Dehydrogenase zu 5-Ketogluconat oxidiert oder mit Hilfe einer Permease ins Cytoplasma aufgenommen (Matsushita *et al.* 1982; Shinagawa *et al.* 1981). Dort wird es von einer Gluconatkinase zu 6-Phosphogluconat phosphoryliert und kann sowohl in den PPW als auch in den EDW eingespeist werden (Pronk *et al.* 1989).

Das Wachstum mit Glucose als Kohlenstoffquelle kann in zwei Wachstumsphasen unterteilt werden. In der ersten findet die Oxidation von Glucose zu Gluconat statt. Hierbei werden Wachstumsraten von bis zu $0,36 \text{ h}^{-1}$ erreicht. In der zweiten Wachstumsphase erfolgt die Oxidation von Gluconat mit einer erheblich niedrigeren Wachstumsrate von $0,002 \text{ h}^{-1}$ (Hanke *et al.* 2013; Kiefler *et al.* 2017). Zwischen beiden Wachstumsphasen konnten erhebliche Unterschiede im Transkriptom und erhöhte Aktivitäten der Gluconokinase, der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase sowie der Gluconat-6-Phosphat-Dehydrogenase in der zweiten Wachstumsphase erkannt werden. In der zweiten Wachstumsphase wurden erhebliche Ähnlichkeiten zum Transkriptom bei sauerstofflimitierenden Bedingungen identifiziert, was sich beispielsweise in einem erhöhten mRNA-Gehalt des Operons der ATP-Synthase sowie des Operons der Quinol-Oxidase vom Typ *bd* äußerte (Hanke *et al.* 2013).

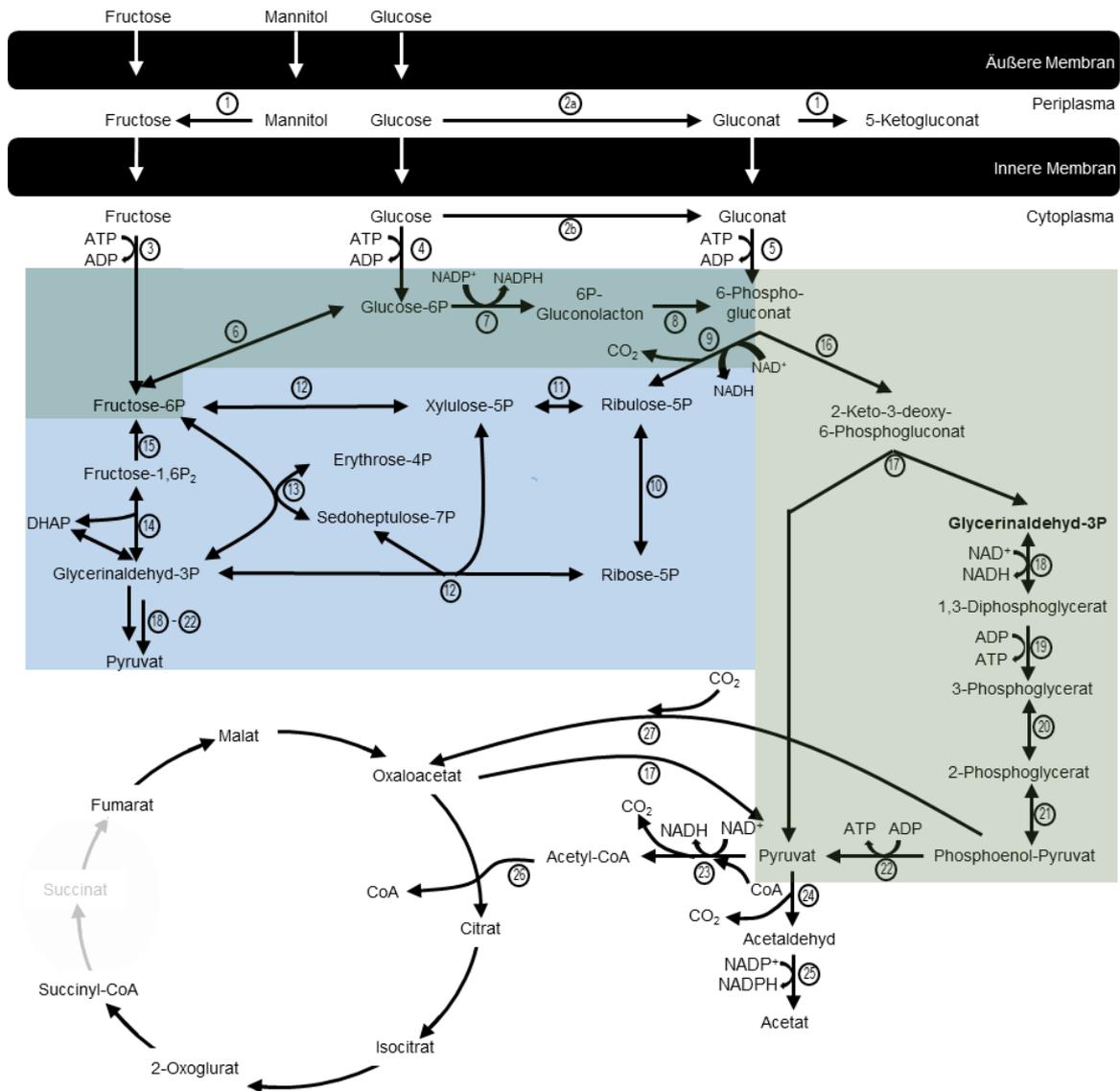


Abbildung 3-1: Zentralstoffwechsel von Mannitol und Glucose über den Pentose-Phosphat-Weg (PPW, blau) und den Entner-Doudoroff-Weg (EDW, grün) mit unvollständigem Citratzyklus, abgewandelt von Richhardt *et al.* (2012). Enzyme: membranständige Polyol-Dehydrogenase (1), membranständige Glucose-Dehydrogenase (2a), cytoplasmatischen Glucose-Dehydrogenase (2b), Fructokinase (3), Glucokinase (4), Gluconokinase (5), Glucose-6-Phosphat-Isomerase (6), Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (7), 6-Phosphogluconolactonase (8), 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (9), Ribose-5-Phosphat-Isomerase (10), Epimerase (11), Transketolase (12), Transaldolase (13), Fructose-bisphosphat Aldolase (14), Fructose-1,6-bisphosphatase (15), 6-Phosphogluconat-Dehydratase (16), 2-Dehydro-3-deoxy-6-Phosphogluconat-Aldolase (17), Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (18), Phosphoglyceratkinase (19), Phosphoglyceratmutase (20), Enolase (21), Pyruvatkinase (22), Pyruvat-Dehydrogenase (23), Pyruvat-Decarboxylase (24), Acetaldehyd-Dehydrogenase (25), Citrat-Synthase (26), Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (27).

3.1.3 Membranständige Dehydrogenasen und Energiemetabolismus

G. oxydans verfügt über 75 annotierte Gene für Dehydrogenasen, von denen 32 in der Cytoplasmamembran verankert sind. Eine Vielzahl dieser Dehydrogenasen ist im Periplasma aktiv, da das aktive Zentrum dorthin gerichtet ist (Richhardt *et al.* 2013). Somit ist es möglich, dass kleine Moleküle durch Porine in den periplasmatischen Raum gelangen und dort oxidiert werden. Neben den charakterisierten membranständigen Dehydrogenasen (siehe Tabelle 3-1) wurden durch Prust *et al.* (2005) weitere PQQ-abhängige Dehydrogenasen mit unbekannter Reaktion (Dehydrogenase 2, 3 und 4) sowie 21 vermeintliche Dehydrogenasen aufgrund einer Transmembranhelixdomäne identifiziert.

Die durch Oxidation freigesetzten Elektronen werden mit Hilfe prosthetischer Gruppen in die Atmungskette eingeschleust. Bei einer Vielzahl von Dehydrogenasen dienen als prosthetische Gruppen PQQ, Cytochrom c (Cyt c) oder Flavinadenindinukleotid (FAD) (Matsushita *et al.* 1994; Prust *et al.* 2005; Richhardt *et al.* 2013). Über den jeweiligen Cofaktor werden die Elektronen auf Ubiquinon als Elektronenakzeptor übertragen, das wiederum die Elektronen zu Quinol-Oxidasen (Cytochrom abhängige Oxidase vom Typ *bd* und *bo*₃) transferiert, bei denen Sauerstoff (O₂) als terminaler Elektronenakzeptor fungiert (Ameyama *et al.* 1987; Matsushita *et al.* 1987; Matsushita *et al.* 1989; Prust *et al.* 2005).

Bei der Quinol-Oxidase vom Typ *bo*₃ wird durch Translokation der Protonen ein elektrochemischer Protonengradient aufgebaut, da diese aus dem Cytoplasma in das Periplasma geschleust werden. Dieser wird mit Hilfe der F₁F₀-Typ ATP-Synthase zur Generierung von ATP genutzt (Hanke *et al.* 2012; Prust *et al.* 2005; Richhardt *et al.* 2013).

Allerdings können nicht nur Elektronen durch Oxidation externer Polyole oder Zucker für die Atmungskette genutzt werden, sondern auch die Reduktionsäquivalente der cytoplasmatischen Oxidationen (NADH). Diese werden mittels einer NADH-Dehydrogenase vom Typ II, die keine Protonen transloziert, oxidiert, wodurch NAD⁺ für den cytoplasmatischen Stoffwechsel regeneriert wird (Prust *et al.* 2005). Abbildung 3-2 zeigt schematisch den beschriebenen Aufbau sowie die Funktionsweise der Atmungskette.

Tabelle 3-1: Übersicht beschriebener membranständiger Dehydrogenasen in *G. oxydans*.

Name	Reaktion	Cofaktor	Quelle
Alkohol-Dehydrogenase (GOX1068, <i>adhA</i> und GOX1067, <i>adhB</i>)	Ethanol → Acetaldehyde	PQQ/Cyt <i>c</i>	Adachi <i>et al.</i> (1978)
Inositol-Dehydrogenase (GOX1857)	myo-Inositol → Pentahydroxycyclo-hexanon	PQQ	Hölscher <i>et al.</i> (2007)
Aldehyd-Dehydrogenase (GOX0585 - GOX0587)	Acetaldehyd → Acetat	Cyt <i>c</i>	Adachi <i>et al.</i> (1980)
Sorbitol-Dehydrogenase (GOX2094-GOX2097)	D-Sorbitol → Sorbose	Cyt <i>c</i> /FAD	(Shinagawa <i>et al.</i> 1981) 1
Gluconat-2-Dehydrogenase (GOX1230 - GOX1232)	D-Gluconat → 2-Ketogluconat	Cyt <i>c</i> /FAD	Shinagawa <i>et al.</i> (1984)
Glucose-Dehydrogenase (GOX0265)	D-Glucose → D-Gluconat	PQQ	Ameyama <i>et al.</i> (1981)
Polyol-Dehydrogenase (GOX0854: <i>sldA</i> ; GOX0855: <i>sldB</i>)	D-Mannitol → Fructose <i>meso</i> -Erythritol → L-Erythrulose Glycerin → Dihydroxyaceton und weitere Substrate.	PQQ	Matsushita <i>et al.</i> (2003) Adachi <i>et al.</i> (2001)
Lactat-Dehydrogenase	D-Lactat → Pyruvat	PQQ	Ma <i>et al.</i> (2007), Treu und Minter (2008)

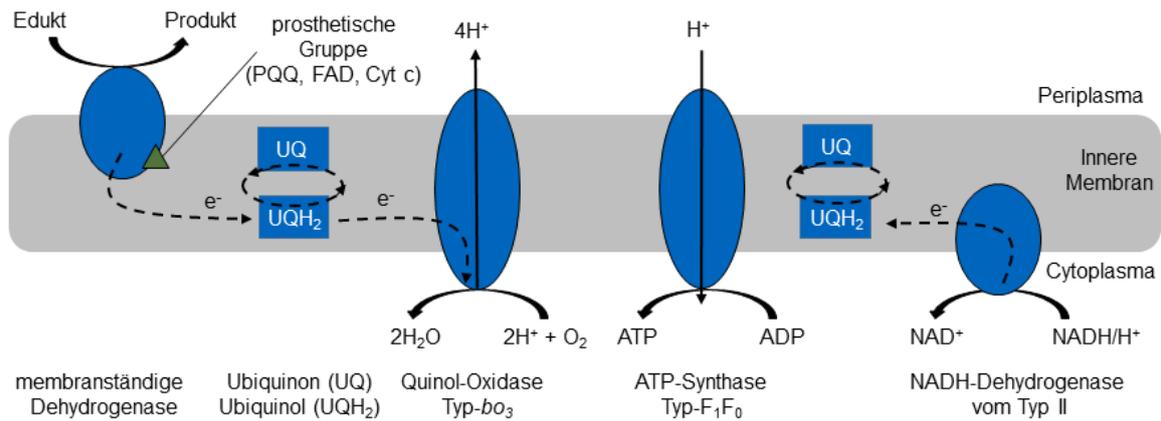


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung des Elektronentransfers in der inneren Membran, abgewandelt nach Deppenmeier und Ehrenreich (2009).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Biotransformationen waren Oxidationsreaktionen, bei denen zum einen die membranständige Polyol-Dehydrogenase und zum anderen die ebenfalls in der Membran verankerte Glucose-Dehydrogenase benötigt wurden. Letztere oxidiert äußerst selektiv D-Glucose zu D-Gluconat und nur in geringem Maße andere Zucker, wie beispielsweise Maltose. Es wurde festgestellt, dass PQQ als prosthetische Gruppe fungiert und das Enzym aus einer Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 87 kDa besteht (Ameyama *et al.* 1981).

Die Polyol-Dehydrogenase hingegen weist ein extrem breites Substratspektrum für diverse Zuckeralkohole und organische Säuren auf, wie beispielsweise Glycerin, Gluconat, Sorbitol oder *meso*-Erythritol. Sie besteht aus zwei Untereinheiten, der großen PQQ-abhängigen Einheit *sl**dA* (82 kDa) und der kleineren Untereinheit *sl**dB* (14 kDa) (Matsushita *et al.* 2003; Matsushita und Adachi 1994). Für die Bindung von Apo- und der prosthetischen Gruppe PQQ wird ein divalentes Kation in Form von Mg^{2+} oder Ca^{2+} benötigt (Matsushita *et al.* 2003).

3.1.4 Biotechnologische Anwendungen von *G. oxydans*

Gluconobacter bietet aufgrund folgender Charakteristika Potential für industrielle, biotechnologische Anwendungen:

- (i) **Regio- und stereoselektive Oxidationen** nach der Bertrand-Hudson Regel, die chemisch entweder mit aufwendiger Schutzgruppenchemie oder gar nicht durchführbar sind (Deppenmeier *et al.* 2002; Gupta *et al.* 2001). Die Bertrand-Hudson Regel besagt, dass die sekundäre Hydroxylgruppe zur Ketogruppe oxidiert wird, die zwischen einer primären Hydroxylgruppen und einer weiteren sekundären Hydroxylgruppe in *cis*-Konfiguration steht (Kulhánek und Tadra 1973).
- (ii) **Unvollständige Oxidation** diverser Zucker, Zuckeralkohole oder Alkohole, die somit nicht vollständig zu CO₂ und Wasser abgebaut werden (Macauley *et al.* 2001).
- (iii) Schnelle **Akkumulation der Oxidationsprodukte im Medium** aufgrund des Stattfindens der Oxidationsreaktionen im periplasmatischen Raum (Adachi *et al.* 2007; Kulhánek 1989; Macauley *et al.* 2001; Matsushita *et al.* 1994).

Da eine Vielzahl diverser Anwendungen beschrieben wird, soll explizit auf die Produktion von Essigsäure, Vitamin-C, Dihydroxyaceton/L-Erythulose sowie 5-Ketogluconat eingegangen werden.

Herstellung von Essigsäure

Essigsäure ist eine der wichtigsten Plattformchemikalien und wird großtechnisch überwiegend chemisch aus Erdöl basierten Rohstoffen wie Methanol, Acetaldehyd oder Ethylen hergestellt. Lediglich 4 - 10 % der jährlichen Produktion stammen aus biotechnologischer Herstellung (Ragsdale und Pierce 2008; Rogers *et al.* 2013). Verdünnte Essigsäure (4 – 6 % (v/v), die als Speiseessig bezeichnet wird, findet in der Lebensmittelindustrie als Geschmacksträger oder Konservierungsmittel Anwendung (Deppenmeier *et al.* 2002). Vertreter der Gattungen *Gluconobacter*, *Gluconoacetobacter* und *Acetobacter* werden bereits seit Jahrhunderten für die Essigherstellung eingesetzt (Sengun und Karabiyikli 2011). Die zellspezifische Herstellung erfolgt über eine zweistufige, membranassoziierte Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd und anschließend von Acetaldehyd zu Acetat, wobei der Ethanol in einem vorgeschalteten Prozess aus einer anaeroben Fermentation von Zuckern mit Hefen, wie beispielsweise *Saccharomyces cerevisiae*, gewonnen wird (Ho *et al.* 2017). Die Essigproduktion wird vorwiegend mit Stämmen der Gattung *Acetobacter* durchgeführt, die aufgrund spezifischer Proteine wie der Aconitase und eines mutmaßlichen ABC-Transporters eine erhöhte Essigsäuretoleranz aufweisen (Vidra und Németh 2018).

Es gibt diverse technische Herstellungsmethoden, wovon die älteste die Orléans-Methode (Oberflächenverfahren) ist (siehe Abbildung 3-3 A). Hierbei wird ein belüftetes Fass mit Wein gefüllt und als Starterkultur Essigsäurebakterien aus einer vorherigen Oxidation zugegeben. Diese bilden aufgrund der Sauerstoffverfügbarkeit in dem Fass einen auf der Flüssigkeitsoberfläche schwimmenden Biofilm („Essigmutter“) und setzen in einem 8 – 14 Wochen andauernden Prozess den Ethanol des Weins zu Essigsäure um. Hierbei wird in regelmäßigen Intervallen weiterer Wein in das Fass zugegeben, ohne dabei die Oberfläche mit den Essigsäurebakterien zu zerstören. Abschließend wird der Essig unterhalb des Biofilms abgenommen (Hutkins 2006; Vidra und Németh 2018).

In der industriellen Anwendung befinden sich heute das Rieselbettverfahren sowie das Submersverfahren. Im Rieselbettverfahren werden die Essigsäurebakterien auf einem inerten Trägermaterial fixiert und von unten mit Luft begast. Von oben werden sie mit einer Nährstofflösung aus Ethanol und weiteren Substraten berieselt, welche dann durch das mit Essigsäurebakterien beladene Trägermaterial nach unten läuft. Dieser Vorgang wird durch Pumpen der Nährstofflösung nach oben und erneutes Berieseln der fixierten Bakterien mit der Nährstofflösung wiederholt. Aufgrund der durch die Oxidation freigesetzten Wärme können Temperaturen erreicht werden, bei der zum einen die immobilisierten Bakterien inaktiviert werden und zum anderen Verluste aufgrund von Verdunstung des Substrats Ethanol auftreten (Tesfaye *et al.* 2002). Daher ist eine aktive Kühlung des Reaktionsbereichs erforderlich (Raspor und Goranovic 2008; Vidra und Németh 2018).

Beim Submersverfahren sind die Bakterien frei in Suspension. Der hierfür industriell verbreitete „Frings-Acetator“ (siehe Abbildung 3-3 B) erzielt durch einen rotierenden Belüfter einen hohen Sauerstoffeintrag. Die durch Oxidation freiwerdende Reaktionswärme wird durch integrierte Rohrwärmetauscher effizient abgeführt. Durch *online* Sonden wird der Ethanolgehalt des Reaktionsmediums gemessen, was ein semi-kontinuierliches Verfahren ermöglicht. Sobald die Ethanolkonzentration auf 0,05 bis 0,3 % (w/v) abgesunken ist, wird die Hälfte des Rohessigs abgelassen und der Reaktor mit neuer Nährstofflösung befüllt. (Hagen *et al.* 2013; Sahn *et al.* 2013; Tesfaye *et al.* 2002; Vidra und Németh 2018). Mit diesem Verfahren konnten Produktkonzentrationen von 93 g L^{-1} mit einer Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) von $1,83 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und einer Produktausbeute $Y_{P/S}$ von $0,94 \text{ g}_{\text{Acetat}} \text{ g}_{\text{Ethanol}}^{-1}$ erzielt werden (Qi *et al.* 2014).

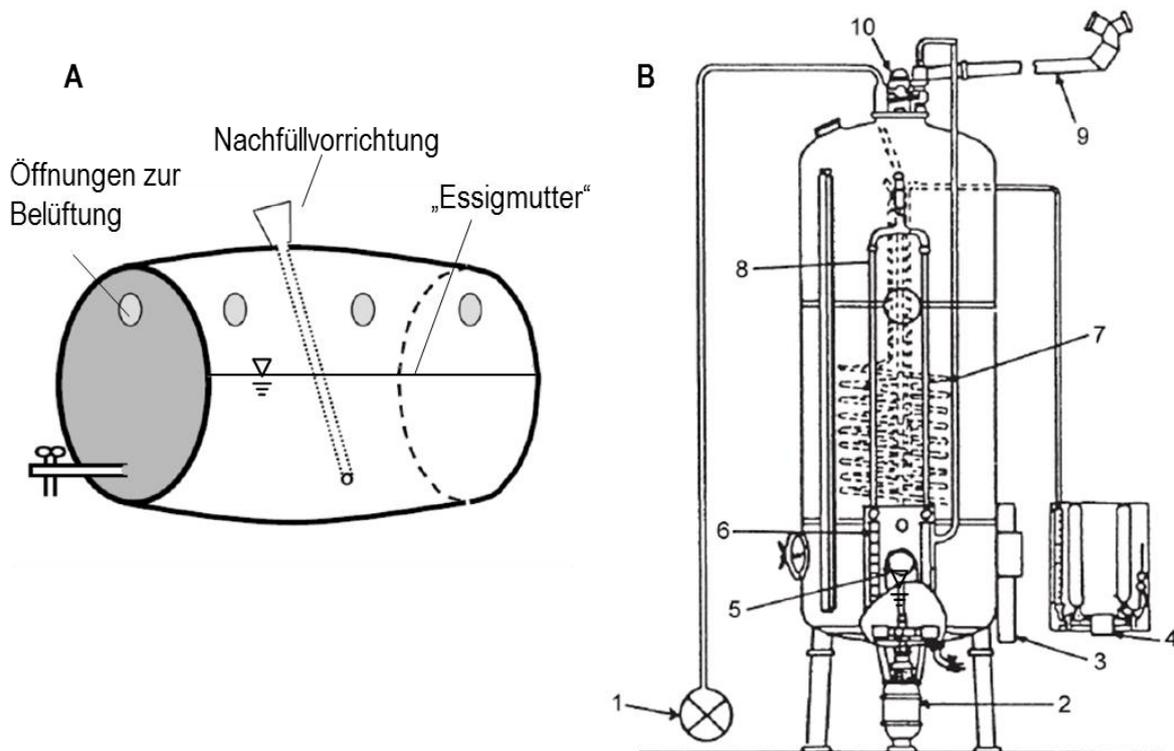


Abbildung 3-3: Verfahren zur Speiseessigherstellung: Traditionelle Orléans-Methode (A) und schematische Darstellung eines „Frings-Acetators“ (B) mit Zulaufpumpe (1), selbstansaugender Belüfter mit Motor (2), Sensor zur *online* Ethanolbestimmung (3), Kühlwasserventil (4), Thermometer zur Temperaturkontrolle (5), Strömungsmesser zur Zuluft-Regelung (6), integrierter Rohrwärmetauscher (7), Zuluftrohr (8), Abgasrohr (9), mechanischer Schaumzerstörer (10) (Adams und Moss 2008; Hutkins 2006).

Herstellung von Vitamin C

Vitamin C (L-Ascorbinsäure) - jährliche Produktion von 110.000 Tonnen - wird als Antioxidans und Konservierungsmittel in der Lebensmittelindustrie eingesetzt (Deppenmeier *et al.* 2002; Macauley *et al.* 2001; Pappenberger und Hohmann 2014). Die Herstellung erfolgt über die „Reichstein-Grüssner Synthese“, die ein Beispiel für das Zusammenwirken von chemischer Synthese (siehe Abbildung 3-4) und biotechnologischen Prozessschritten ist (Reichstein und Grüssner 1934). So wird D-Glucose chemisch mit einem Nickel-Katalysator zu D-Sorbitol hydriert, welches biotechnologisch mit *G. oxydans* regioselektiv zu L-Sorbose oxidiert wird. Diese wird anschließend kristallisiert und mit Aceton zu Diaceton-L-Sorbose kondensiert und zuletzt mit einem Platin-Katalysator zu 2-Keto-L-Gluconsäure (2-KLG) oxidiert. Durch Enol- und Laktonisierung kann aus 2-KLG mit einer Gesamtausbeute von etwa 50 % L-Ascorbinsäure hergestellt werden, obwohl die theoretisch mögliche Ausbeute bei 98 % liegt (Boudrant 1990; Deppenmeier *et al.* 2002). Mit Hilfe eines optimierten *G. oxydans* Stammes

und Verfahrens waren Wulf *et al.* (2000) in der Lage, bei dem biotechnologischen Prozessschritt aus 200 g L^{-1} D-Sorbitol quantitativ 200 g L^{-1} L-Sorbose herzustellen. Im Labormaßstab wurde das Reichstein-Grüssner Verfahren um einen zweiten biotechnologischen Prozessschritt mit *Ketogulonicigenium vulgare* erweitert, wodurch eine Biokonversion von D-Sorbitol zu 2-KLG ohne chemische Verfahrensschritte ermöglicht wurde (Pappenberger und Hohmann 2014).

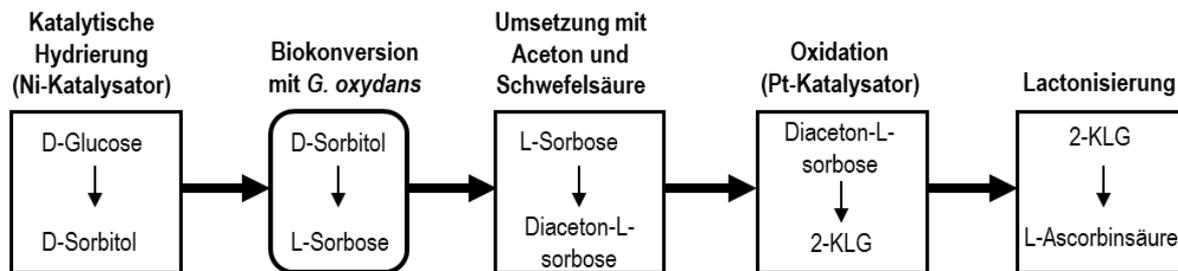


Abbildung 3-4: Prozessschema der Vitamin C Herstellung mit der "Reichstein-Grüssner" Synthese, welche aus vier chemischen Katalysen und einer biotechnologisch durchgeführten Oxidation zusammengesetzt ist (Pappenberger und Hohmann 2014).

Herstellung von Dihydroxyaceton und L-Erythrose

Dihydroxyaceton (DHA) und L-Erythrose sind verbreitete Komponenten in der kosmetischen Industrie zur Nutzung in verschiedenen Bräunungscremes oder dienen als Ausgangsstoff für organische Synthesen von Chemikalien (La China *et al.* 2018). So wurde der jährliche Bedarf an Dihydroxyaceton mit 2,000 t pro Jahr angegeben (Pagliaro *et al.* 2007). Sowohl Dihydroxyaceton als auch L-Erythrose werden durch Oxidation mit Hilfe der membranständigen Polyol-Dehydrogenase (*mldAB*) aus Glycerin oder *meso*-Erythritol gewonnen (siehe Abbildung 3-5). Glycerin entsteht primär als Nebenprodukt bei der Biodieselherstellung, wohingegen *meso*-Erythritol sowohl chemisch als auch biotechnologisch hergestellt wird (Pagliaro *et al.* 2007; Rzechonek *et al.* 2018). Die chemische Herstellung erfolgt entweder mit der Hydrierung von Weinsäure-Dialkylester in Methanol- oder Ethanollösung mit Metallkatalysatoren bei hohem Druck von 20 bar und einer hohen Temperatur zwischen 125 und 200 °C. Die Produktausbeute wird durch das Nebenprodukt Threitol reduziert (Rzechonek *et al.* 2018). Auch bei Verwendung von Dialdehydstärke als Substrat ist die Produktausbeute durch die Bildung von Ethylenglycol reduziert. Die Ausbeute wurde durch ein anderes chemisches Verfahren in Form der elektrolytischen Decarboxylierung von C6-Zuckern zwar gesteigert, dennoch erfolgt die industrielle Herstellung primär biotechnologisch (Rzechonek *et al.* 2018). Hierbei kommen verschiedene Organismen, wie

beispielsweise *Moniliella pollinis* (Burschäpers *et al.* 2002), *Pseudozyma tsukubaensis* (Jeya *et al.* 2009) und *Yarrowia lipolytica* (Rzechonek *et al.* 2018) zum Einsatz und als Substrat dient entweder Glucose, welches durch chemische und enzymatische Hydrolyse von Weizen gewonnen wird oder Glycerin (Rzechonek *et al.* 2018).

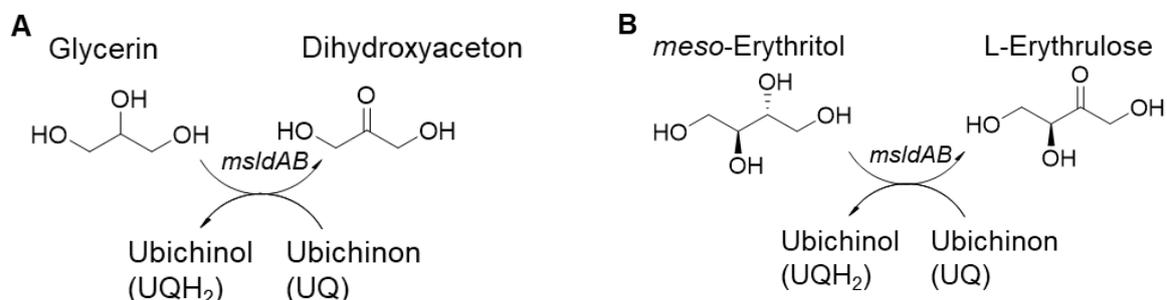


Abbildung 3-5: Oxidation von Glycerin zu Dihydroxyaceton (A) und *meso*-Erythritol zu L-Erythrulose (B) mit Hilfe der membranständigen Polyol-Dehydrogenase (*mslAB*).

Trotz der möglichen Dihydroxyacetonherstellung mit heterogener, chemischer Katalyse erfolgt die industrielle Produktion biotechnologisch mit *G. oxydans* in einem diskontinuierlichen Zulaufverfahren (Bauer *et al.* 2005; Katryniok *et al.* 2011). Allerdings sind bei der biotechnologischen Herstellung von DHA folgende Herausforderungen beschrieben (Claret *et al.* 1992, 1993; Claret *et al.* 1994):

- (i) Substratüberschussinhibierung durch Glycerin (Reduktion der zellspezifischen Produktbildungsrate um zwei Drittel auf $2,2 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei Erhöhung der initialen Glycerinkonzentration von 31 g L^{-1} auf 129 g L^{-1})
- (ii) Produktinhibierung (Reduktion der Enzymaktivität um 50 % bei einer DHA Konzentration von 52 g L^{-1} , keine Produktbildung mehr ab einer DHA Konzentration von 85 g L^{-1})
- (iii) Irreversible Zellschädigung aufgrund von Interaktion mit dem PPW (kein Zellwachstum ab einer DHA Konzentration von 67 g L^{-1})

Aufgrund dieser Herausforderungen wurde in akademischen Ansätzen versucht die Effekte der Produktinhibierung zu umgehen. Im Labormaßstab wurde ein semi-kontinuierliches Verfahren ähnlich der Essigherstellung im Rieselbettverfahren entwickelt. Hierbei wurden die Zellen auf einer hydrophilen Matrix immobilisiert, welche zyklisch mit Medium berieselt wurde. Bei einer maximalen DHA-Konzentration von 60 g L^{-1} wurde ein Teil des Reaktionsmediums entnommen und anschließend frisches Medium zugegeben. Somit konnte eine Produktivität von $2,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erzielt werden (Hekmat *et al.* 2003).

Die industrielle Herstellung von L-Erythrose erfolgt ebenfalls biotechnologisch. Im Labormaßstab werden sowohl Prozesse mit ruhenden Zellen als auch mit wachsenden Zellen beschrieben. Mit ruhenden *G. frateurii* IFO3254 wurden hohe Produktausbeuten von 98 % bei einer initialen Konzentration von 100 g L^{-1} meso-Erythritol innerhalb von 48 h erzielt, was einer Raum-Zeit-Ausbeute von $2 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ L-Erythrose entspricht. Hierzu fand zunächst das Wachstum der Zellen in einem Komplexmedium mit Sorbitol als Kohlenstoffquelle statt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit dem Biotransformationspuffer (50 mM Phosphatpuffer) gewaschen und die Biotransformation durch Zugabe des Substrats bei einer Zelldichte von $\text{OD}_{600} = 20$ gestartet. (Mizanur *et al.* 2001). Eine weitere Steigerung der Produktkonzentration war mit einem Zulaufprozesses mit wachsenden *G. kondonii* möglich, wobei eine Konzentration von 208 g L^{-1} L-Erythrose mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von $6,5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und einer Produktausbeute von $0,94 \text{ g}_P \text{ g}_S^{-1}$ erzielt wurde (Pan *et al.* 2016). Während der Biotransformation stieg die Biotrockenmassekonzentration auf $2,7 \text{ g L}^{-1}$ an. Die meso-Erythritolkonzentration der initialen Satzphase betrug 100 g L^{-1} und nach 12 h wurde ein intermittierender Zulauf gestartet, der alle 4 h derart angepasst, dass die verfügbare meso-Erythritolkonzentration im Reaktor zwischen $5 - 20 \text{ g L}^{-1}$ lag (Pan *et al.* 2016). Mit *G. oxydans* DSM21030 konnten durch ein vergleichbares intermittierendes Zulaufverfahren 235 g L^{-1} L-Erythrose in 147 h hergestellt werden, da mit dieser Prozessführung die Inhibierung aufgrund von hohen Substratkonzentrationen reduziert wurde (Vorlop *et al.* 2009; Willke *et al.* 2009). Die Raum-Zeit-Ausbeute war mit $1,6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ L-Erythrose niedriger als bei Pan *et al.* (2016). Allerdings wurde eine niedrigere maximale Biotrockenmassekonzentration von $1,6 \text{ g L}^{-1}$ erzielt, was die niedrigere Raum-Zeit-Ausbeute erklärt. Die geringere Biotrockenmassekonzentration könnte auf die Verwendung des halbdefinierten Mediums mit einer geringen Konzentration von $0,25 \text{ g L}^{-1}$ Hefeextrakt zurückzuführen sein, da Pan *et al.* (2016) ein Komplexmedium mit 15 g L^{-1} Pepton verwendeten. Unter Berücksichtigung der verfügbaren Biotrockenmassekonzentrationen ergeben sich ein zellspezifischer Produktertragskoeffizient von $77 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1}$ für *G. kondonii* (Pan *et al.* 2016) und $147,77 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1}$ für *G. oxydans* DSM21030 (Vorlop *et al.* 2009).

Alternativ zur Oxidation von meso-Erythritol kann L-Erythrose auch aus Glycolaldehyd und β -Hydroxypyruvat enzymatisch mit einer Transketolase durch den Aufbau einer C-C Bindung hergestellt werden. Allerdings ist diese Syntheseroute gegenüber der Oxidation von meso-Erythritol von Nachteil. Dies liegt zum einen an der geringeren Verfügbarkeit der Substrate Glycolaldehyd und β -Hydroxypyruvat im Gegensatz zu meso-Erythritol, das biotechnologisch aus Glucose oder Glycerin hergestellt werden kann (Mizanur *et al.* 2001; Rzechonek *et al.* 2018) und zum anderen an den geringeren Produktausbeuten, die erzielt werden können (Mizanur *et al.* 2001). Vor allem die chemische Synthese von

β -Hydroxypyruvat mit Natriumhydroxyd und β -Bromopyruvat unterliegt einer geringen Produktausbeute aufgrund der nicht vollständigen Hydrolyse von β -Bromopyruvat. Auch bei alternativen biotechnologischen Syntheserouten der β -Hydroxypyruvat aus Glycerin mit *Pseudomonas* sp. XP-LM war die Produktausbeuten mit 49 % noch gering (Gao *et al.* 2013). Glycolaldehyd kann hingegen mit hohen Produktausbeuten von bis zu 97 % bei Produktkonzentrationen von 58 g L⁻¹ biotechnologisch aus Ethylenglycol mit der Alkohol-Oxidase von *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) oder der Glycerin-Oxidase von *Aspergillus japonicus* hergestellt werden (Isobe und Nishise 1995). Bongs *et al.* (1997) beschrieben ein kontinuierliches Verfahren mit immobilisierter Transketolase aus *E. coli*, bei dem eine L-Erythrosekonzentration im Fließgleichgewicht von 5,4 g L⁻¹ bei einer Raum-Zeit-Ausbeute von 1,9 g L⁻¹ h⁻¹ erreicht wurde. Durch rekombinante Expression der nativen Transketolase in *P. pastoris* GS115 unter Kontrolle des Methanol induzierbaren Promotor AOX1 im Expressionsplasmid pAO815 konnten Wei *et al.* (2018) eine L-Erythrosekonzentration von 93,2 g L⁻¹ nach 2 h bei einer Raum-Zeit-Ausbeute von 46,58 g L⁻¹ h⁻¹ erreichen. Mit der eingesetzten Biotrockenmassekonzentration von 41,75 g L⁻¹ ergab sich ein zellspezifischer Produktertragskoeffizient von 2,23 g_P g_X⁻¹. Allerdings bestätigt die niedrige Produktausbeute von 52 % den Nachteil dieses Produktionsansatzes (Wei *et al.* 2018). Tabelle 3-2 zeigt zusammenfassend die verschiedenen Prozesse zur L-Erythrose Herstellung anhand verschiedener Zustandsgrößen.

Tabelle 3-2: Übersicht der Zustandsgrößen maximale L-Erythrosekonzentration ($c_{P,max}$), Raum-Zeit-Ausbeute (RZA), Produktausbeute ($Y_{P/S}$) und zellspezifischer Produktertrag ($Y_{P/X}$) verschiedener Verfahren zur L-Erythroseherstellung.

Verfahren	Betriebsweise	$c_{P,max}$, g L ⁻¹	RZA, g L ⁻¹ h ⁻¹	$Y_{P/S}$, %	$Y_{P/X}$, g _P g _X ⁻¹
wachsende <i>G. oxydans</i> (Mizanur <i>et al.</i> 2001)	Satzprozess	98	2	98	---
wachsende <i>G. kondonii</i> (Pan <i>et al.</i> 2016)	Zulaufprozess	208	6,5	94	77
wachsende <i>G. oxydans</i> DSM21030 (Vorlop <i>et al.</i> 2009)	Zulaufprozess	235	1,6	96	147
immobilisierte Transketolase aus <i>E. coli</i> (Bongs <i>et al.</i> 1997)	kontinuierlicher Enzym- membranreaktor	5,4	1,9	90	---
Transketolase in <i>P. pastoris</i> (Wei <i>et al.</i> 2018)	Satzprozess	93	47	52	2,2

Bei der Verwendung in Kosmetikprodukten wirken DHA und L-Erythrose physiologisch ähnlich, da die erzielte Bräunung auf einer Maillard-Reaktion der Ketogruppe mit freien Aminogruppen von Peptiden und Proteinen auf der Hornschicht der Epidermis beruht. Bei der Maillard-Reaktion werden durch das Zusammentreffen von reduzierenden Zuckern mit Aminogruppen, nicht-enzymatisch reaktive Di- und Tricarbonylverbindungen gebildet, die wiederum zu zyklischen und nicht-zyklischen Polymeren weiterreagieren können und eine Braunfärbung bewirken (Angrick und Rewicki 1980). Allerdings zeichnet sich L-Erythrose durch einige Vorteile gegenüber DHA aus, da eine gleichmäßigere, natürlichere Bräunung erzielt wird. Darüber hinaus führt DHA zu einer schnelleren Austrocknung der Epidermis und weist ein höheres allergenes Potential auf (Jermann *et al.* 2002; Schreier und Jermann 2002). Aufgrund der hohen Reaktivität von L-Erythrose mit Aminogruppen ist eine Glykierung – also eine nicht-enzymatische Glykosylierung (Ahmed 2005) - von Proteinen beschrieben. So konnten Simpson und Ortwerth (2000) qualitativ eine Quervernetzung von bovinem Protein beschreiben (Simpson und Ortwerth 2000).

Herstellung von 5-Ketogluconat

Neben der Gluconsäure mit einer jährlichen Produktionsmenge von 65,000 bis 100,000 t, finden auch die Ketogluconsäuren Anwendung in der industriellen Herstellung (García-García *et al.* 2017). So wird 5-Ketogluconat mit *G. oxydans* durch zweistufige Oxidation aus D-Glucose gewonnen. Die D-Glucose wird zunächst mit der PQQ-abhängigen membranständigen Glucose-Dehydrogenase zu D-Gluconat oxidiert. Im Anschluss wird mit der membranständigen Polyol-Dehydrogenase D-Gluconat zu 5-Ketogluconat oxidiert. Allerdings dient D-Gluconat auch als Edukt für die membranständige Gluconat-2-Dehydrogenase, da diese D-Gluconat zu 2-Ketogluconat oxidiert (Ano *et al.* 2011; Merfort *et al.* 2006a; Merfort *et al.* 2006b). Letzteres kann mit der Polyol-Dehydrogenase zu 2,5-Diketogluconat oxidiert werden (siehe Abbildung 3-6).

Aus 5-Ketogluconat kann durch einen Vanadium-Katalysator im Phosphatpuffer in saurem bis neutralem Milieu L-Weinsäure hergestellt werden, die wiederum für die Lebensmittelindustrie als Antioxidans oder für die Textilindustrie als saures Reduktionsmittel von Interesse ist (Matzerath *et al.* 1995).

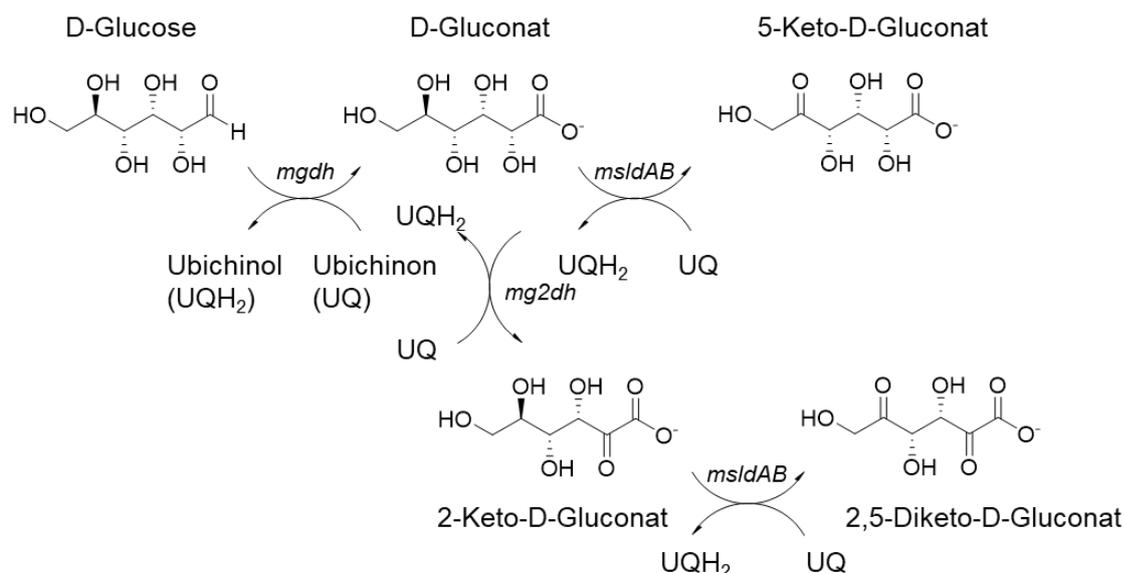


Abbildung 3-6: Oxidation von D-Glucose zu D-Gluconat und weiter zu 5-Keto-D-Gluconat oder 2-Keto-D-Gluconat. Dieses kann zu 2,5-Diketo-D-Gluconat oxidiert werden. *mgdh*: membranständige Glucose-Dehydrogenase, *msldAB*: membranständige Polyol-Dehydrogenase, *mg2dh*: membranständige Gluconat-2-Dehydrogenase.

Bei der 5-Ketogluconat Herstellung ist ein pH-kontrollierter Prozess erforderlich, da ohne pH-Regelung der pH in Folge der Gluconatbildung unter pH 2,5 abfällt und dabei keine Bildung der Ketogluconate beobachtet werden konnte (Weenk *et al.* 1984). So wurde von Silberbach *et al.* (2003) pH 4,8 als optimal für die Polyol-Dehydrogenase zur Oxidation von Gluconat angegeben, wobei die Biotransformation auch bei pH 2,5 und pH 4 erfolgreich durchgeführt wurde (Shinagawa *et al.* 1999). Sobald die Herstellung von 5-Ketogluconat mit wachsenden Zellen erfolgt, sollte pH 5, der zwischen dem Optimum der enzymatischen Katalyse und dem Optimum des Zellwachstums liegt, eingestellt werden (Elfari *et al.* 2005). Weiterhin wurde in der Literatur festgestellt, dass eine erhöhte Calciumkonzentration förderlich ist, da - aufgrund der geringen Löslichkeit der Calcium-Ketogluconatsalze - das chemische Gleichgewicht in Richtung der Ketogluconate verschoben wird (García-García *et al.* 2017).

Durch Gendelektion der Gluconat-2-Dehydrogenase sowie der rekombinanten Expression der Polyol-Dehydrogenase wurden 5-Ketogluconatkonzentrationen von 57 g L⁻¹ innerhalb von 95 h erzielt, was einer Raum-Zeit-Ausbeute von 0,6 g L⁻¹ h⁻¹ entspricht. Trotz Deletion der Gluconat-2-Dehydrogenase und damit unterdrückter Nebenproduktbildung war die Produktausbeute $Y_{P/S}$ mit 0,54 g g⁻¹ gering, was auf unvollständigen Gluconatumsatz zu Prozessende zurückzuführen ist (Merfort *et al.* 2006a).

Yuan *et al.* (2016b) konnten durch den Einsatz eines gentechnisch veränderten *G. oxydans* DSM2343 eine 5-Ketogluconat Konzentration von 118 g L⁻¹ mit einer Produktivität von

2,1 g L⁻¹ h⁻¹ erzielen. In diesem Organismus wurden zunächst die Gene für die Gluconat-2-Dehydrogenase sowie für die cytoplasmatische Pyruvat-Decarboxylase deletiert (*G. oxydans* ZJU2). Durch die Deletion der Pyruvat-Decarboxylase konnte die Bildung des finalen Stoffwechselprodukts Acetat unterdrückt und somit eine höhere Produktausbeute von 0,82 g g⁻¹ erzielt werden. Anschließend wurde eine sekundäre Alkohol-Dehydrogenase aus *Xanthomonas campestris* DSM 3586 heterolog unter der Kontrolle des nativen Promotors P₀₁₆₉ exprimiert, da diese sekundäre Alkohol-Dehydrogenase im Vergleich zur Polyol-Dehydrogenase *in vitro* eine siebenfach höhere Aktivität gegenüber D-Gluconat aufwies (Salusjärvi *et al.* 2005). Allerdings zeigte sich, dass die Produktivität *in vivo* nur um den Faktor 2,7 erhöht werden konnte (Yuan *et al.* 2016b).

Darüber hinaus wurde ausgehend von *G. oxydans* ZJU2 ein Stamm entwickelt, bei dem unter Kontrolle des Promotors P₀₁₆₉ die Genexpression der Polyol-Dehydrogenase mit dem Gencluster der PQQ-Biosynthese und dem Gen der terminalen Quinol-Oxidase vom Typ *bo₃* auf einem Plasmid gekoppelt wurde und somit ganzheitlich in die gesamte Atmungskette eingegriffen wurde. Mit diesem Stamm (*G. oxydans* ZJU5) wurde in einem Zulaufprozess mit Variation des pH eine 5-KGA Konzentration von 162 g L⁻¹ innerhalb von 64 h erzielt, was einer Raum-Zeit-Ausbeute von 2,5 g L⁻¹ h⁻¹ entsprach (Yuan *et al.* 2016a). Der pH wurde initial auf pH 5,5 geregelt, um optimale Bedingungen für Biomassewachstum zu gewährleisten. Um jedoch dem optimalen pH für die Oxidation von D-Gluconat zu 5-Ketogluconat gerecht zu werden, wurde dieser nach 30 h auf pH 4,5 reduziert. Tabelle 3-3 zeigt zusammenfassend die verschiedenen Prozesse zur 5-Ketogluconat Herstellung anhand verschiedener Zustandsgrößen.

Tabelle 3-3: Übersicht der Zustandsgrößen maximale 5-Ketogluconatkonzentration (c_{p,max}), Raum-Zeit-Ausbeute (RZA), Produktausbeute (Y_{P/S}) und zellspezifischer Produktertrag (Y_{P/X}) verschiedener Verfahren zur 5-Ketogluconatherstellung.

Verfahren	Betriebsweise	c _{p,max} , g L ⁻¹	RZA, g L ⁻¹ h ⁻¹	Y _{P/S} , %	Y _{P/X} , g _P g _X ⁻¹
wachsende <i>G. oxydans</i> (Merfort <i>et al.</i> 2006a)	Satzprozess	57	0,6	54	---
wachsende <i>G. oxydans</i> (Yuan <i>et al.</i> 2016b) (Merfort <i>et al.</i> 2006b)	Satzprozess	118	2,1	73	42
wachsende <i>G. oxydans</i> (Yuan <i>et al.</i> 2016a)	Zulaufprozess	162	2,5	69	---

3.1.5 *G. oxydans* als Basisstamm für selektive Oxidationen

Die gentechnische Weiterentwicklung von *G. oxydans* zur Nutzung als Ganzzellbiokatalysator zielt auf folgende Aspekte ab:

- (i) Erhöhung der Produktselektivität und biokatalytischen Aktivität durch Eingriffe in das Spektrum der membranständigen Dehydrogenasen
- (ii) Erhöhung der biokatalytischen Aktivität durch Eingriffe in die Atmungskette
- (iii) Erhöhung des Biomasseertragskoeffizienten oder der Wachstumsrate durch Eingriffe in den Stoffwechsel

Peters *et al.* (2013b) deletierte durch neue molekularbiologische Methoden (Peters *et al.* 2013a) schrittweise die annotierten membranständigen Dehydrogenasen und entwickelte daher verschiedene Multideletionsstämme (siehe Tabelle 3-4). Peters *et al.* (2013b) konnten zeigen, dass die Deletion von bis zu 9 membranständigen Dehydrogenasen nicht letal für den Stamm *G. oxydans* 621H Δupp ist. Erst sobald eine der membranständigen Dehydrogenasen fehlt, um ein Substrat für Biomassegenerierung bereitzustellen, findet kein Wachstum mehr statt. So ist der Stamm *G. oxydans* 621H BP.9 mit deletierter Alkohol-, Inositol-, Sorbitol-, Aldehyd-, Gluconat-2-, Glucose- sowie der Polyol-Dehydrogenase und den PQQ-abhängigen Dehydrogenasen 3 und 4 nicht mehr in der Lage, in einem Medium mit Mannitol als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen, da dieses zunächst mit der Polyol-Dehydrogenase zu Fructose oxidiert werden muss, ehe es ins Cytoplasma aufgenommen und metabolisiert werden kann (s. Abschnitt 3.1.2). Durch Deletion konkurrierender membranständiger Dehydrogenasen können Produktselektivitäten gesteigert werden, ohne das Wachstum sowie die Biokatalysatorbereitstellung zu erniedrigen (Ano *et al.* 2011; Elfari *et al.* 2005; Merfort *et al.* 2006a). So haben Elfari *et al.* (2005) bei der 5-Ketogluconat Herstellung die Produktausbeute durch Deletion der Gluconat-2-Dehydrogenase von 45 % auf 84 % gesteigert, da die Konkurrenzreaktion von Gluconat zu 2-Ketogluconat unterdrückt wurde.

Tabelle 3-4: Die von Peters *et al.* (2013b) entwickelten Multideletionsstämmen.

Stamm	Deletierte membranständige Dehydrogenase
<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.1	<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp mit deletierter Alkohol-Dehydrogenase
<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.2	<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.1 mit deletierter Inositol-Dehydrogenase
<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.3	<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.2 mit deletierter Aldehyd-Dehydrogenase
<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.4	<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.3 mit deletierter Sorbitol-Dehydrogenase
<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.5	<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.4 mit deletierter Gluconat-2-Dehydrogenase
<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.6	<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.5 mit deletierter Glucose-Dehydrogenase
<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.7	<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.6 mit deletierter PQQ-abhängiger Dehydrogenase 3
<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.8	<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.7 mit deletierter PQQ-abhängiger Dehydrogenase 4
<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.9	<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.8 mit deletierter Polyol-Dehydrogenase

Neben des Eingriffs in die Atmungskette über die membranständigen Dehydrogenasen, können auch andere Komponenten der Atmungskette verändert werden. So kann eine Einschränkung der Oxidationsaktivität aufgrund einer Limitierung der prosthetischen Gruppe wie beispielsweise PQQ vorliegen. So konnten durch rekombinante Expression des PQQ Genclusters *pqqABCDE* oder der Peptidase TldD, die zur PQQ-Biosynthese benötigt wird, höhere Konzentrationen von 5-Ketogluconat erzielt werden (Hölscher und Görlich 2006; Yuan *et al.* 2016a). Auch zur Herstellung von 2-Ketogluconat wurde die PQQ-Biosynthese gesteigert und damit die finale Produktkonzentration um das Achtfache auf 39,2 g L⁻¹ erhöht (Gao *et al.* 2014). Darüber hinaus wurde auch vermutet, dass die Quinol-Oxidasen vom Typ *bo*₃ und *bd* zu einer Limitierung der Oxidationsaktivität bei der Glucoseoxidation führen (Meyer *et al.* 2013). Außerdem wurde durch plasmidbasierte Expression der Quinol-Oxidase vom Typ *bo*₃ die 5-Ketogluconat Konzentration auf 162 g L⁻¹ mit der bis jetzt höchsten beschriebenen Raum-Zeit-Ausbeute von 2,5 g L⁻¹ h⁻¹ gesteigert (Yuan *et al.* 2016a). Die Hypothese ist, dass eine erhöhte Menge der Quinol-Oxidase vom Typ *bo*₃ dem durch rekombinante Expression

einer membranständigen Dehydrogenase erhöhten Sauerstoffbedarf gerecht wird (Richardt *et al.* 2013).

Im Fall einer Konkurrenz von membranständigen und cytoplasmatischen Dehydrogenasen um ein Substrat wurde gezeigt, dass durch Deletion der membranständigen Dehydrogenasen die Biomasseertragskoeffizienten und somit die finalen Biotrockenmassekonzentrationen gesteigert werden können. So wurde durch Deletion der membranständigen Glucose-Dehydrogenase der Biomasseertragskoeffizient von $0,09 \text{ g g}^{-1}$ auf $0,14 \text{ g g}^{-1}$ und die Wachstumsrate von $0,18 \text{ h}^{-1}$ auf $0,32 \text{ h}^{-1}$ gesteigert (Krajewski *et al.* 2010).

Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung des Biomasseertragskoeffizienten stellt die Möglichkeit der Deletion der Pyruvat-Decarboxylase dar, da hierdurch die Acetaldehydbildung unterdrückt wird (Peters *et al.* 2013a). Dieses stellt wie auch Acetat für *G. oxydans* ein inhibierendes Intermediat dar (Adachi *et al.* 1980). Um die Acetaldehydkonzentration zu reduzieren, sind acht cytosolische Dehydrogenasen, die Acetaldehyd als Edukt verwenden, annotiert (Prust *et al.* 2005).

Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Biotrockenmassekonzentration wird durch die plasmidbasierte Expression der Gene der NADH-Dehydrogenase vom Typ II (NDH), die das im Zentralstoffwechsel gebildete NADH oxidiert und die Elektronen auf Ubiquinon überträgt, aus *G. oxydans* DSM3504 in *G. oxydans* 621H beschrieben (Kostner *et al.* 2015). Das Vorhandensein einer zweiten NADH-Dehydrogenase in *G. oxydans* 621H führt zu einer effizienteren Re-Oxidation von NADH, das in der Folge wieder im PPW zur Verfügung steht. Allerdings tritt dadurch die NADH-Dehydrogenase in Konkurrenz zu der membranständigen Dehydrogenase um den Ubiquinon-Vorrat zur Oxidation der Edukte der Biotransformation (Kostner *et al.* 2015).

Durch Einbringen der fehlenden Gene in dem Citratzyklus in Form der Succinat-Dehydrogenase und der Succinyl-CoA-Synthetase (zusätzlich zur NADH-Dehydrogenase vom Typ II und der Deletion der membranständigen Gluconat-2-Dehydrogenase) konnte der Biomasseertragskoeffizient um 60 % auf $0,17 \text{ g g}^{-1}$ erhöht werden (Kiefler *et al.* 2017).

3.2 Bioprozesstechnik

In diesem Abschnitt wird zunächst die Kinetik von Wachstum und Produktbildung vorgestellt. Anschließend wird auf biokatalytische Grundlagen eingegangen. Die Kopplung von Stoffbilanz und Kinetik wird in Abschnitt 3.2.3 Betriebsweise von Bioreaktoren vorgestellt. Da der Sauerstoffeintrag eine wichtige Rolle bei den Oxidationsreaktionen spielt, werden abschließend die wesentlichen Kenngrößen des Massentransfers gas-flüssig vorgestellt.

3.2.1 Kinetik von Wachstum und Produktbildung

Sofern nicht anders gekennzeichnet, wurden die in diesem Abschnitt vorgestellten mathematischen Zusammenhänge aus Weuster-Botz und Takors (2018) entnommen. Der Biokatalysator ist im Gegensatz zu einem chemischen Katalysator in der Lage, sich autokatalytisch zu regenerieren oder gar zu vermehren. Voraussetzung hierfür ist die ausreichende Versorgung mit Nährstoffen, eine geeignete Temperatur sowie ein passender pH des wässrigen Reaktionsmediums.

Bei *G. oxydans* kann aufgrund der Vermehrung durch Zellteilung und der Approximation einer konstanten mittleren Zellgröße davon ausgegangen werden, dass die Vermehrung (Zunahme der Zellzahl) mit dem Wachstum (Zunahme der Zellmasse) in einem linearen Zusammenhang steht. Vereinfachend werden für die quantitativen Betrachtungen unsegregierte Populationen betrachtet, was bedeutet, dass nicht zwischen verschiedenen Zellpopulationen unterschieden wird und darüber hinaus wird die Zelle als unstrukturiert angesehen, sodass keine Kompartimentierung berücksichtigt werden muss. Diese modellhafte Betrachtung führt dazu, dass quantitative Zusammenhänge auf empirischen Daten beruhen und daher eine formalkinetische Charakterisierung darstellen.

Die zellspezifische Wachstumsrate μ ist folgendermaßen definiert:

$$\mu \equiv \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_x}{dt} \quad 3-3$$

μ	zellspezifische Wachstumsrate, h ⁻¹
c_x	Biotrockenmassekonzentration, g L ⁻¹
t	Zeit, h

Durch Integration von Gleichung 3-3 über die Prozesszeit ergibt sich die exponentielle Wachstumskinetik von Gleichung 3-4.

$$c_X = c_{X,0} \cdot e^{\mu \cdot t} \quad 3-4$$

$c_{X,0}$ initiale Biotrockenmassekonzentration, g L⁻¹

Oftmals ist die spezifische Wachstumsrate unter definierten Bedingungen nur von der Konzentration einer Komponente – dem limitierenden Substrat – abhängig und kann quantitativ darüber beschrieben werden. Weitere essentielle Bestandteile, wie Sauerstoff und Stickstoff, sind in (geringem) Überschuss vorhanden, sodass sie weder limitierend noch inhibierend wirken.

Monod (1949) (siehe Abbildung 3-7) beschreibt den Zusammenhang der Wachstumsrate in Abhängigkeit von einem limitierenden Substrat in Form einer Sättigungskinetik. Formalkinetisch ist diese analog zur Michaelis-Menten-Kinetik einer Enzymreaktion mit einem Substrat. Es wird die maximale Wachstumsrate μ_{\max} erreicht, sobald die Substratkonzentration deutlich größer als die Halbsättigungskonstante ($c_S \gg K_S$) ist (siehe Gleichung 3-5). Mit abnehmender Substratkonzentration nimmt auch die spezifische Wachstumsrate ab. Bei einer Konzentration, die der Halbsättigungskonstante entspricht ($c_S = K_S$), stellt sich eine halbmaximale Wachstumsrate ein. Da die Halbsättigungskonstante eine Affinität zum Substrat angibt, kann diese unter der Annahme eines Aufnahmesystems als unabhängig von der Substratkonzentration angesehen werden.

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{c_S + K_S} \quad 3-5$$

μ_{\max} maximale zellspezifische Wachstumsrate h⁻¹

c_S Konzentration des limitierenden Substrats, g L⁻¹

K_S Halbsättigungskonstante, g L⁻¹

Häufig ist bei limitierenden Substraten, wie beispielsweise Alkoholen oder organischen Säuren, eine Substratüberschussinhibierung beschrieben, da sich in diesem Fall hohe Konzentrationen negativ auf die Wachstumsrate auswirken. Hierzu kann nach Andrews (1968) Gleichung 3-5 um eine Inhibierungskonstante K_I erweitert werden, bei der die Wachstumsrate erneut eine halbmaximale Geschwindigkeit erreicht (siehe Gleichung 3-6 und Abbildung 3-7). Mit den formalkinetischen Modellparametern K_S und K_I ist es möglich, die Zustandsgröße der

optimalen Substratkonzentration $c_{S,opt}$ abzuschätzen, die dann erreicht wird, wenn die Steigung der Wachstumsrate als Funktion der Substratkonzentration Null wird (optimale Wachstumsrate μ_{opt}) (Gleichung 3-7).

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{c_S}{c_S + K_S + \frac{c_S^2}{K_I}} \quad 3-6$$

K_I Inhibierungskonstante, $g L^{-1}$

$$c_{S,opt} = \sqrt{K_S \cdot K_I} \quad 3-7$$

$c_{S,opt}$ Optimale Substratkonzentration bei der die optimale Wachstumsrate μ_{opt} erreicht wird, $g L^{-1}$

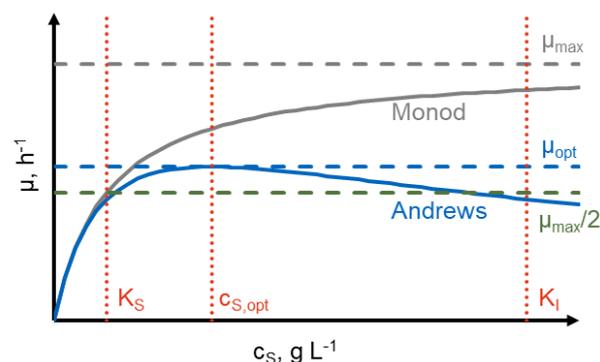


Abbildung 3-7: Spezifische Wachstumsrate in Abhängigkeit der Substratkonzentration mit den formalkinetischen Modellen nach Monod (1949) und Andrews (1968) in Abhängigkeit der Modellparameter μ_{max} , K_S und K_I sowie der sich ergebenden Zustandsgrößen μ_{opt} und $c_{S,opt}$.

Neben hohen Konzentrationen des limitierenden Substrats können die Zellen durch das Wachstum selbst oder durch wachstumsassoziierte Produkte inhibiert werden. Dies wurde allgemeingültig durch Levenspiel (1980) in Form eines Exponentialansatzes beschrieben. Bei diesem wird die Wachstumsrate in Abhängigkeit von einer maximalen Produktkonzentration $c_{P,max}$, ab der die Wachstumsrate Null wird, dargestellt (siehe Gleichung 3-8 und Abbildung 3-8). Der Wert n in dem Exponenten gibt an, ob die Wachstumsrate bereits bei niedrigen Produktkonzentrationen ($n < 1$) oder erst bei hohen Produktkonzentrationen ($n > 1$) gegen Null geht.

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{c_S + K_S} \cdot \left(1 - \frac{c_P}{c_{P,\max}}\right)^n \quad 3-8$$

c_P Konzentration des inhibierenden Produkts, g L⁻¹

$c_{P,\max}$ maximal mögliche Konzentration des inhibierenden Produkts, g L⁻¹

n Exponent, -

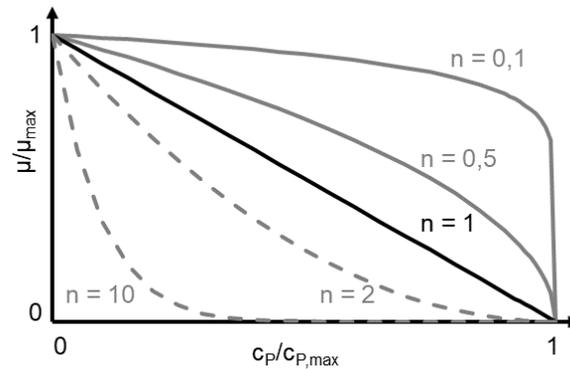


Abbildung 3-8: Produktinhibierung des Wachstums mit dem formalkinetischem Modell nach Levenspiel (1980) in Abhängigkeit der Produktkonzentration bei unlimitierten Bedingungen.

Analog zur zellspezifischen Wachstumsrate μ (siehe Gleichung 3-3) können zellspezifische Raten q_i formuliert werden:

$$q_i \equiv \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_i}{dt} \quad 3-9$$

q_i zellspezifische Rate der Komponente i , h⁻¹

c_i Konzentration der Komponente i , g L⁻¹

Die Verknüpfung von gebildeter Biomasse und gebildetem Produkt mit eingesetztem Substrat (siehe Gleichungen 3-10 und 3-11) bzw. die gebildete Menge an Produkt pro eingesetzter Biomasse (siehe Gleichung 3-12) erfolgt über die Ausbeutekoeffizienten.

$$Y_{X/S} = \frac{dc_X}{dc_S} = \frac{\mu}{q_{S,\mu}} \quad 3-10$$

$$Y_{P/S} = \frac{dc_P}{dc_S} = \frac{q_P}{q_S} \quad 3-11$$

$$Y_{P/X} = \frac{dc_P}{c_X} \quad 3-12$$

$Y_{P/S}$	Produktausbeute (gebildete Menge an Produkt pro eingesetzter Menge an Substrat), $g_P g_S^{-1}$
$q_{S,\mu}$	zellspezifische Substrataufnahmerate für Zellwachstum, $g_S g_X^{-1} h^{-1}$
$Y_{X/S}$	Biomasseertragskoeffizient, $g_X g_S^{-1}$
$Y_{P/X}$	zellspezifischer Produktertrag $g_P g_X^{-1}$

Gleichung 3-10 gilt in dieser Form nur, wenn die spezifische Substrataufnahmerate ausschließlich für den Aufbau von Biomasse verwendet wird. Die spezifische Substrataufnahmerate erweitert sich allerdings, wenn zusätzlich der Erhaltungsstoffwechsel sowie die Produktbildung berücksichtigt werden müssen (siehe Gleichung 3-13).

$$q_S = q_{S,\mu} + q_{S,m} + q_{S,P} = \frac{\mu}{Y_{X/S}} + q_{S,m} + q_{S,P} \quad 3-13$$

$q_{S,m}$	zellspezifische Substrataufnahmerate für den Erhaltungsstoffwechsel, $g g^{-1} h^{-1}$
$q_{S,P}$	zellspezifische Substrataufnahmerate für die Produktbildung, $g g^{-1} h^{-1}$

Die Produktbildung nach Gleichung 3-12 ist als streng wachstumsgekoppelte Produktbildungskinetik definiert (Gaden 1959). Zwei weitere Formen der Produktbildungskinetik sind die teilweise wachstumsgekoppelte Produktbildungskinetik (siehe Gleichung 3-14) sowie die wachstumsunabhängige Produktbildungskinetik (siehe Gleichung 3-15), bei der im einfachsten Fall die zellspezifische Produktbildungsgeschwindigkeit als konstant angenommen wird. Es ist anzumerken, dass für die Formulierung einer Produktbildungskinetik viel spezifisches Prozesswissen auf metabolischer Ebene benötigt wird, weswegen das unstrukturierte und unsegregierte Modell häufig eine nicht ausreichende Beschreibung darstellt.

$$q_P = q_{P,\mu} + q_{P,P} = \mu \cdot Y_{P/X} + k_P \quad 3-14$$

$$q_P = k_P \quad 3-15$$

k_P konstante zellspezifische Produktbildungsrate, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$

3.2.2 Biokatalytische Prozesse

Im Gegensatz zu mikrobiellen Prozessen, bei denen häufig komplexe metabolische Netzwerke zur Herstellung des gewünschten Produkts genutzt werden, finden biokatalytische Stoffumwandlungen meist nur unter der Nutzung eines Enzyms statt. Diese Stoffumwandlungen werden auch Biotransformation genannt und machen sich die Eigenschaft vieler Enzyme zu Nutze, dass die Umsetzung äußerst chemo-, regio-, und stereoselektiv abläuft. Gerade hohe Regioselektivitäten erfordern in der chemischen Synthese entweder sehr aufwendige Schutzgruppenchemie oder sind nicht möglich, was zu niedrigeren Produktausbeuten führt (Castiglione und Weuster-Botz 2018; Schmid *et al.* 2001).

Weiterhin führen die hohen Selektivitäten der Biokatalyse dazu, dass bei gleicher Effizienz die Anzahl der Prozessschritte im Vergleich zur chemischen Synthese geringer ist und weniger Abfallstoffe erzeugt werden. Darüber hinaus laufen die Reaktionen häufig unter milden Bedingungen hinsichtlich des Lösemittels (meist wässriges Lösungsmittel), des pH (meist im neutralen Bereich), der Temperatur (meist zwischen 20 – 40 °C) sowie des Drucks (meist bei Atmosphärendruck) ab, wohingegen chemische Synthesen häufig unter harschen Reaktionsbedingungen stattfinden (Bornscheuer *et al.* 2012; Castiglione und Weuster-Botz 2018).

Zusätzlich ist durch die Vielzahl an Organismen in teilweise extremen Habitaten ein nahezu unermessliches Substrat- und Produktspektrum möglich. Darüber hinaus sind Enzyme auch in der Lage, nicht natürliche Substrate umzuwandeln, was deren Anwendungsspektrum noch erweitert. Durch neue Technologien wie Hochdurchsatzverfahren zur Durchmusterung von Enzymvarianten, synthetische Biologie zur DNA-Synthese, Metagenomanalysen sowie artifizielle Intelligenz wird es deutlich schneller möglich sein, Vorhersagen zur Enzymfunktion auf Grundlage der Aminosäuresequenz zu treffen und Enzyme für neuartige Biotransformationen bereitzustellen (Badenhorst und Bornscheuer 2018; Bornscheuer *et al.* 2012; Heidelberg *et al.* 2010; Robertson und Steer 2004).

Grundsätzlich kann nach Castiglione und Weuster-Botz (2018) bei der Anwendung der Enzyme zwischen isolierten Enzymen, immobilisierten Enzymen oder der Verwendung ganzer

Zellen zur Enzymbereitstellung unterschieden werden. Die Verwendung immobilisierter Enzyme gegenüber isolierten Enzymen bietet den Vorteil, dass hierdurch die Kosten aufgrund von Wiederverwendbarkeit erheblich reduziert werden. Darüber hinaus können mit Hilfe immobilisierter Enzyme kontinuierliche Verfahren angewendet werden, da eine Verweilzeitentkopplung von Biokatalysator und Durchflussrate des Edukts gewährleistet wird. Weitere Gründe für eine Immobilisierung der Enzyme sind möglicherweise der stabilisierende Effekt auf das Enzym sowie die leichtere Produktabtrennung. Demgegenüber stehen unter Umständen Stofftransportlimitierungen, zusätzliche Kosten für die Immobilisierung und eventuell veränderte Enzymeigenschaften.

Bei der Immobilisierung von Enzymen kann zwischen chemischer Fixierung und physikalischem Einschluss des löslichen Enzyms differenziert werden. Beispiele für die chemische Fixierung von Enzymen sind die Quervernetzung von Enzymen untereinander ohne ein externes Trägermaterial (CLEAs: *cross-linked enzyme aggregates*). Dies erfolgt beispielsweise durch Zugabe von Glutardialdehyd, welches reaktive NH_2 -Gruppen auf der Proteinoberfläche untereinander verbindet. Eine Alternative ist die Immobilisierung auf einem externen Trägermaterial. Dies sind im Wesentlichen anorganische Trägermaterialien (z.B. Glas oder Silica-Matrix), natürliche Polymere (Cellulose, Polysaccharide und deren Derivate) oder synthetische Polymere (Polystyrol, Polyamide, uvm.). Bei der Bindung selbst kann zwischen physikalischen Interaktionen (Adsorption, ionische Wechselwirkung) oder chemisch-kovalenter Bindung unterschieden werden (Castiglione und Weuster-Botz 2018).

Der Vorteil der Nutzung integraler Zellen (Ganzzellbiokatalyse) gegenüber der enzymatischen Katalyse ist die Kostenreduktion aufgrund des Wegfalls aufwendiger Reinigungsschritte. So kann die Enzymreinigung die Kosten im Vergleich zur Nutzung ganzer Zellen verzehnfachen (Tufvesson *et al.* 2011). Dieser Vorteil wird noch ausgeprägter, sobald mit einer Zelle ganze Enzymkaskaden durch das Bereitstellen mehrerer Syntheseenzyme durchgeführt werden können. Darüber hinaus kann die zelleigene Cofaktor-Regenerierung genutzt werden, weshalb die Zugabe eines zweiten Enzyms entfällt (Bertau 2002; Castiglione und Weuster-Botz 2018; Schmid *et al.* 2001).

Ein größerer Vorteil bei der Verwendung isolierter Enzyme im Vergleich zur Ganzzellbiokatalyse ist die hohe Selektivität aufgrund des Wegfalls von potentiellen Nebenreaktionen durch andere Enzyme in der Zelle. Ist es bei der Ganzzellbiokatalyse nicht möglich, die Nebenproduktbildung durch gentechnischer Methoden abzustellen, kann die Produktreinigung erschwert werden (Woodley 2006). Darüber hinaus stellt bei Verwendung ganzer Zellen in der Regel die Massentransferlimitierung des Substrats in das Cytoplasma eine Herausforderung dar, insbesondere bei Verwendung nicht-natürlicher Substrate, bei

denen keine natürlichen Transportmechanismen vorhanden sind (Castiglione und Weuster-Botz 2018).

Tabelle 3-5 stellt die Nutzung isolierter Enzyme und der ganzer Zellen gegenüber. Gleichzeitig wird auf Charakteristika von Multideletionsstämmen von *G. oxydans* in der Ganzzellbiokatalyse eingegangen.

Tabelle 3-5: Gegenüberstellung von isolierten Enzymen, integralen Zellen und der Nutzung von *G. oxydans* als Spezialfall der integralen Zellen hinsichtlich verschiedener Eigenschaften.

Eigenschaft	isolierte Enzyme	integrale Zellen	Spezialfall: Multideletionsstämme von <i>G. oxydans</i>
Herstellungskosten	hoch (je nach Reinheitsanforderung)	niedrig	niedrig
Multienzymsynthese	aufwendig und sehr teuer, da Produktion und Aufarbeitung jedes Enzyms	Zelle als natürlicher Wirt der Multienzymsynthese	einfach durch Nutzung der membranständigen Dehydrogenasen
Cofaktor-Regenerierung	Zugabe eines zweiten Enzyms	Nutzung zellulärer Cofaktor-Regeneration möglich	Nutzung der Atmungskette
Produktaufarbeitung	einfach	potentiell aufwendig (Ort der Biotransformation, Nebenprodukte)	einfach (Akkumulation der Produkte im Medium)
Selektivität	hoch	möglicherweise reduziert aufgrund von Nebenproduktbildung oder Wachstum	hoch (Deletion konkurrierender Dehydrogenasen)

Bei der Ganzzellbiokatalyse ist zwischen ruhenden und metabolisierenden (wachsenden) Zellen zu unterscheiden, wobei erstere von Castiglione und Weuster-Botz (2018) als „Enzymsäcke“ bezeichnet werden, bei denen der Stoffwechsel nicht mehr aktiv ist. Der Vorteil der Verwendung ruhender Zellen liegt in der reduzierten Medienzusammensetzung, da in der Regel lediglich ein Puffer mit Substrat benötigt wird. Dies führt dazu, dass eine räumliche und zeitliche Trennung von Biokatalysatorherstellung und Biotransformation möglich ist. Ebenso können hohe Produktausbeuten erzielt werden, da kein Edukt der Biotransformation für das Wachstum verwendet wird. Insbesondere wenn um das Edukt eine Konkurrenz zwischen Wachstum und spezifischer Produktbildung besteht, ist eine Biotransformation mit ruhenden Zellen den metabolisierenden Zellen vorzuziehen (Carvalho 2017).

Bei der Verwendung metabolisierender Zellen sind die Anforderungen höher, da zumeist mehr Medienbestandteile notwendig sind. Hierfür wird häufig die Zellherstellung mit der Biotransformation gekoppelt, weswegen eine räumliche und zeitliche Trennung von Biokatalysatorbereitstellung und Biotransformation nicht üblich ist (Castiglione und Weuster-Botz 2018).

Bewertung biokatalytischer Prozesse

Die Bewertung technischer Prozesse unter Nutzung von Ganzzellbiokatalysatoren kann neben spezifischer Eduktverbrauchsrate und Produktbildungsraten (siehe Abschnitt 3.2.1) durch folgende Kenngrößen erfolgen (Emig und Klemm 2017). Der Umsatz X gibt den prozentualen Anteil des verbrauchten Edukts an:

$$X = \frac{n_{E,0} - n_E}{n_{E,0}} \cdot 100 \quad 3-16$$

X Umsatz, %

$n_{E,0}$ Menge des eingesetzten Edukts, mol

n_E Menge des verbliebenen Edukts, mol

Die Produktausbeute Y gibt den prozentualen Anteil des gebildeten Produkts bezogen auf das initiale Edukt an, wobei das stöchiometrische Verhältnis berücksichtigt werden muss:

$$Y = \frac{n_P - n_{P,0}}{n_{E,0}} \cdot \frac{v_E}{v_P} \cdot 100 \quad 3-17$$

Y Ausbeute, %

$n_{P,0}$	Menge des Produkts zu Reaktionsbeginn, mol
n_P	Menge des finalen Produkts, mol
v_E	Stöchiometrischer Faktor Edukt, -
v_P	Stöchiometrischer Faktor Produkt, -

Die Selektivität σ gibt die prozentuale Menge an gebildetem Produkt pro umgesetztem Edukt an:

$$\sigma = \frac{n_P - n_{P,0}}{n_{E,0} - n_E} \cdot \frac{v_E}{v_P} \cdot 100 = \frac{Y}{X} \cdot 100 \quad 3-18$$

3.2.3 Betriebsweise von Bioreaktoren

Sofern nicht anders gekennzeichnet, beruhen die in diesem Abschnitt vorgestellten Betriebsweisen von Bioreaktoren auf den Ausführungen von Takors und Weuster-Botz (2018).

Der in dieser Arbeit verwendete Rührkesselreaktor ist ein Standardapparat in der industriellen Biotechnologie, da dieser durch mechanisch bewegter Einbauten die Aufgaben eines Bioreaktors erfüllt. Zu diesen gehören das Homogenisieren, das Suspendieren von Feststoffen und das Dispergieren der Gaskomponenten. Weiterhin ist ein Energie- und Stoffaustausch mit der Umgebung möglich und der Rührkesselreaktor stellt eine Sterilbarriere zur Umgebung dar. Der Rührkesselreaktor wird als idealisierter homogen durchmischter Reaktor angesehen, was bedeutet, dass keine Gradienten in den Konzentrationen der Reaktionskomponenten sowie den physikalischen Eigenschaften berücksichtigt werden. Das hat zur Folge, dass auch die Reaktionsgeschwindigkeiten innerhalb des Reaktors unabhängig vom Ort sind.

Ausgehend von dieser Annahme stellt der Rührkesselreaktor einen Bilanzraum dar, für diesen die in Gleichung 3-19 beschriebene Massenbilanz gilt.

$$\frac{dm_i}{dt} = \frac{d(c_i \cdot V_R)}{dt} = F_{\text{ein}} \cdot c_{i,\text{ein}} - F_{\text{aus}} \cdot c_{i,\text{aus}} + r_i \cdot V_R \quad 3-19$$

m_i Masse der Komponente i , g

t Reaktionszeit, h

c_i	Konzentration der Komponente i im Reaktor, g L^{-1}
V_R	Reaktorvolumen, L
F_{ein}	Zulaufvolumenstrom, L h^{-1}
$c_{i,\text{ein}}$	Konzentration der Komponente i im Zulauf, g L^{-1}
F_{aus}	Ablaufvolumenstrom, L h^{-1}
$c_{i,\text{aus}}$	Konzentration der Komponente i im Ablauf, g L^{-1}
r_i	Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$

Bei der Betriebsweise von Reaktoren wird zwischen geschlossenen (Satzprozesse), teil-offenen (Zulaufprozesse) und offenen (kontinuierliche Prozesse) Systemen unterschiedenen, die im Folgenden genauer betrachtet werden. Darüber hinaus kann aufgrund der Annahme des ideal durchmischten Rührkesselreaktors die Konzentration im Reaktor c_i mit der Konzentration im Ablauf $c_{i,\text{aus}}$ gleichgesetzt werden.

Satzverfahren

Im geschlossenen System des Satzprozesses sind alle Inhaltsstoffe für die Durchführung der biologischen Stoffumwandlung bereits im Reaktor vorgelegt. Unter Vernachlässigung des Titrationsmittels und der Probenahme wird das Volumen als konstant angesehen. Außer Luft tritt kein Substrat über die Bilanzgrenzen hinweg. Daher vereinfacht sich die Massenbilanzgleichung (siehe Gleichung 3-19) folgendermaßen:

$$\frac{dc_i}{dt} = r_i \quad 3-20$$

Im Satzprozess können unter der Voraussetzung unlimitierter Bedingungen die in Abbildung 3-5 dargestellten Wachstumsphasen beobachtet werden. Nach Inokulation kommt es zunächst zu einer Adaption der Zellen an das Reaktionsmedium (Verzögerungsphase, I). Im Anschluss ist eine Zunahme der Wachstumsrate zu beobachten (Übergangsphase, II), die in der maximalen, spezifischen Wachstumsrate μ_{max} unter den gewählten Reaktionsbedingungen mündet (exponentielle Wachstumsphase, III). Aufgrund einer Nährstofflimitierung oder einer Inhibierung durch Stoffwechselprodukte verlangsamt sich die Wachstumsrate (Limitierungsphase, IV) und es wird eine Phase erreicht, in der sich die Wachstums- und Absterberate im Gleichgewicht befinden (stationäre Phase, V). In dieser

Phase ist empirisch eine konstante Biomassekonzentration vorhanden, die, sobald die Absterberate die Wachstumsrate übersteigt, abnimmt (Absterbephase, VI).

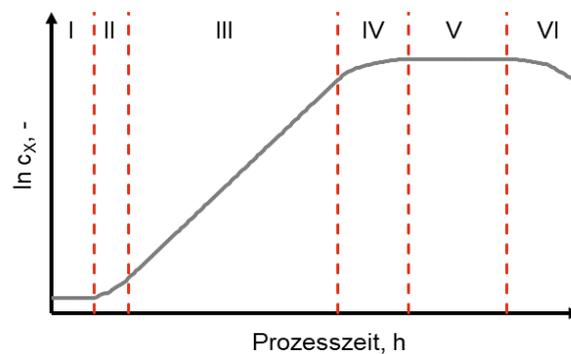


Abbildung 3-9: Wachstumsphasen von Mikroorganismen mit Verzögerungsphase (I), Übergangsphase (II), exponentielle Wachstumsphase (III), Limitierungsphase (IV), stationäre Phase (V) und Absterbephase (VI). Abgeändert nach Weuster-Botz und Takors (2018).

Die volumetrische Produktivität wird auch als Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) angegeben.

$$RZA = \frac{m_p}{t \cdot V_R}$$

3-21

RZA_p	Raum-Zeit-Ausbeute, $g L^{-1} h^{-1}$
m_p	Masse des gebildeten Produkts, g
t	Reaktionszeit, h
V_R	Reaktorvolumen, L

Zulaufverfahren

Im Gegensatz zum Satzverfahren handelt es sich beim Zulaufverfahren um ein teil-offenes System, bei dem Medienbestandteile, wie beispielsweise die Kohlenstoffquelle, als Funktion der Zeit steril dem Reaktor zugeführt werden. Gründe hierfür können beispielsweise das Vermeiden einer unerwünschten Substratüberschussinhibierung (siehe Abschnitt 3.2.1) oder Nebenproduktbildung bei zu hohen Substratkonzentrationen sein.

Die Massenbilanzgleichung (Gleichung 3-19) vereinfacht sich unter der Berücksichtigung der Produktregel zur nachfolgenden Gleichung:

$$\frac{dm_i}{dt} = V_R \frac{dc_i}{dt} + c_i \cdot \frac{dV_R}{dt} = F_{\text{ein}} \cdot c_{i,\text{ein}} + r_i \cdot V_R \quad 3-22$$

Die zeitliche Änderung des Reaktorvolumens ist dabei durch den Zulaufvolumenstrom F_{ein} beschrieben, weshalb sich die Gleichung 3-22 nach der zeitlichen Änderung der Reaktionskomponente i umstellen lässt (Gleichung 3-23).

$$\frac{dc_i}{dt} = \frac{F_{\text{ein}}}{V_R} \cdot (c_{i,\text{ein}} - c_i) + r_i \quad 3-23$$

Kontinuierliches Verfahren

Bei dem kontinuierlichen Verfahren handelt es sich um ein offenes System, was bedeutet, dass es neben dem Zulaufvolumenstrom auch einen Ablaufvolumenstrom gibt. Dies ermöglicht deutlich längere Prozesslaufzeiten als im Zulaufverfahren, da keine Begrenzung durch das endliche Reaktorvolumen besteht. In der Regel werden Zu- und Ablaufvolumenstrom identisch gewählt ($F_{\text{ein}} = F_{\text{aus}} = F$), was dazu führt, dass das Reaktorvolumen über die Prozesszeit konstant bleibt. Dadurch stellt sich nach einer gewissen Prozesszeit ein Gleichgewichtszustand (Fließgleichgewicht) ein, bei dem keine zeitliche Änderung der Zustandsgrößen mehr auftritt. Daher kann Gleichung 3-19 der Massenbilanz folgendermaßen vereinfacht werden:

$$\frac{dm_i}{dt} = \frac{d(c_i \cdot V_R)}{dt} = 0 = F \cdot (c_{i,\text{ein}} - c_{i,\text{aus}}) + r_i \cdot V_R \quad 3-24$$

Der Volumenstrom F kann hierbei auf das Reaktorvolumen V_R bezogen werden und dieser Term wird Durchflussrate (*dilution rate*) D genannt:

$$D = \frac{F}{V_R} \quad 3-25$$

F Volumenstrom, $L \cdot h^{-1}$

D Durchflussrate, h^{-1}

Der Kehrwert der Durchflussrate entspricht der mittleren hydraulischen Verweilzeit τ .

$$\tau = \frac{1}{D} = \frac{V_R}{F} \quad 3-26$$

τ mittlere hydraulische Verweilzeit, h

Mit diesem Zusammenhang ergibt sich folgende Massenbilanz im Fließgleichgewicht:

$$r_i = D \cdot (c_{i,\text{aus}} - c_{i,\text{ein}}) \quad 3-27$$

Unter der Annahme, dass keine Biomasse dem System zugeführt wird, ergibt sich folgende Gleichung für die volumetrische Biomassebildung im Fließgleichgewicht:

$$r_X = \mu \cdot c_X = D \cdot c_X \quad 3-28$$

$$\mu = D \quad 3-29$$

Gleichung 3-29 kann nun entweder über die triviale Lösung $c_X = 0$ (was jedoch unerwünscht ist) oder über $\mu = D$ gelöst werden. Die zweite Lösung stellt den Fließgleichgewichtszustand dar und es ist ersichtlich, dass die Durchflussrate die Wachstumsrate determiniert ($D < \mu_{\text{max}}$). Dies bedeutet allerdings auch, dass eine beliebige Steigerung der Durchflussrate nicht möglich ist. $D \geq \mu_{\text{max}}$ führt zur trivialen Lösung und wird auch als Auswaschpunkt bezeichnet, ab dem keine Biomassebildung mehr stattfindet.

Für die Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) oder volumetrische Produktbildungsrate r_P ergibt sich im Gegensatz zu Gleichung 3-21, die für Satz- und Zulaufprozesse gültig ist, folgender Zusammenhang für kontinuierliche Prozesse bei Erreichen des Fließgleichgewichts:

$$\text{RZA} = D \cdot c_P \quad 3-30$$

Kontinuierliche Verfahren mit Zellrückhaltung

Ein kontinuierliches System kann derart erweitert werden, dass die Zellen zurückgehalten werden und im Reaktor verbleiben. Die Rückhaltung kann entweder intern (im Reaktor) oder extern (außerhalb des Reaktors) erfolgen (s. Abbildung 3-10).

Interne Zellrückhaltungsmethoden reichen von der Ausbildung von Biofilmen auf geeigneten Trägermaterialien bis hin zu getauchten Mikrofiltrationsmembranen („*dead-end*“). Aufgrund geringerer Überströmungsgeschwindigkeiten wird jedoch häufig Biofilmbildung (*fouling*) beobachtet, was zu einer Verblockung der Poren des Filtrationsmoduls führen kann (Carstensen *et al.* 2012).

Externe Zellrückhaltung erfolgt gewöhnlich über einen Umlauf (*bypass*), in dem die Flüssig-Fest-Trennung über Mikrofiltration und anschließender Rückführung der konzentrierten Zellsuspension in den Reaktor erfolgt. Externe Systeme erfordern aufgrund des zusätzlichen Umlaufs einen höheren technischen Aufwand. Darüber hinaus wirken in diesem Umlauf Gradienten (Substrat, Sauerstoff, pH) und eine erhöhte Scherbelastung, was zur Reduktion der Produktivität führen kann (Carstensen *et al.* 2012; Takors und Weuster-Botz 2018). Allerdings sind aufgrund der parallel zur Membran verlaufenden Strömungsrichtung der Flüssigkeit höhere Überströmungsgeschwindigkeiten einstellbar, wodurch Biofilmbildung minimiert wird (Carstensen *et al.* 2012).

Zellrückhaltung empfiehlt sich vor allem dann, wenn die Zellen als nicht wachsender oder nur geringfügig wachsender Biokatalysator eingesetzt werden. Voraussetzung hierbei ist, dass die Zellen mit gelösten Nährstoffen und Gaskomponenten ausreichend versorgt werden. Durch die Rückhaltung der Zellen findet eine Entkopplung der Verweilzeit von Biokatalysator und Substrat statt. Aufgrund der Zellrückhaltung ist die Durchflussrate nicht mehr von der Wachstumsrate begrenzt, sodass höhere Durchflussraten verwendet werden können. Daher kann mit solchen Systemen die Raum-Zeit-Ausbeute gesteigert werden, ohne dass die Zellen ausgewaschen werden. Die Stoffbilanz 3-24 des kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktors bleibt bestehen (Takors und Weuster-Botz 2018).

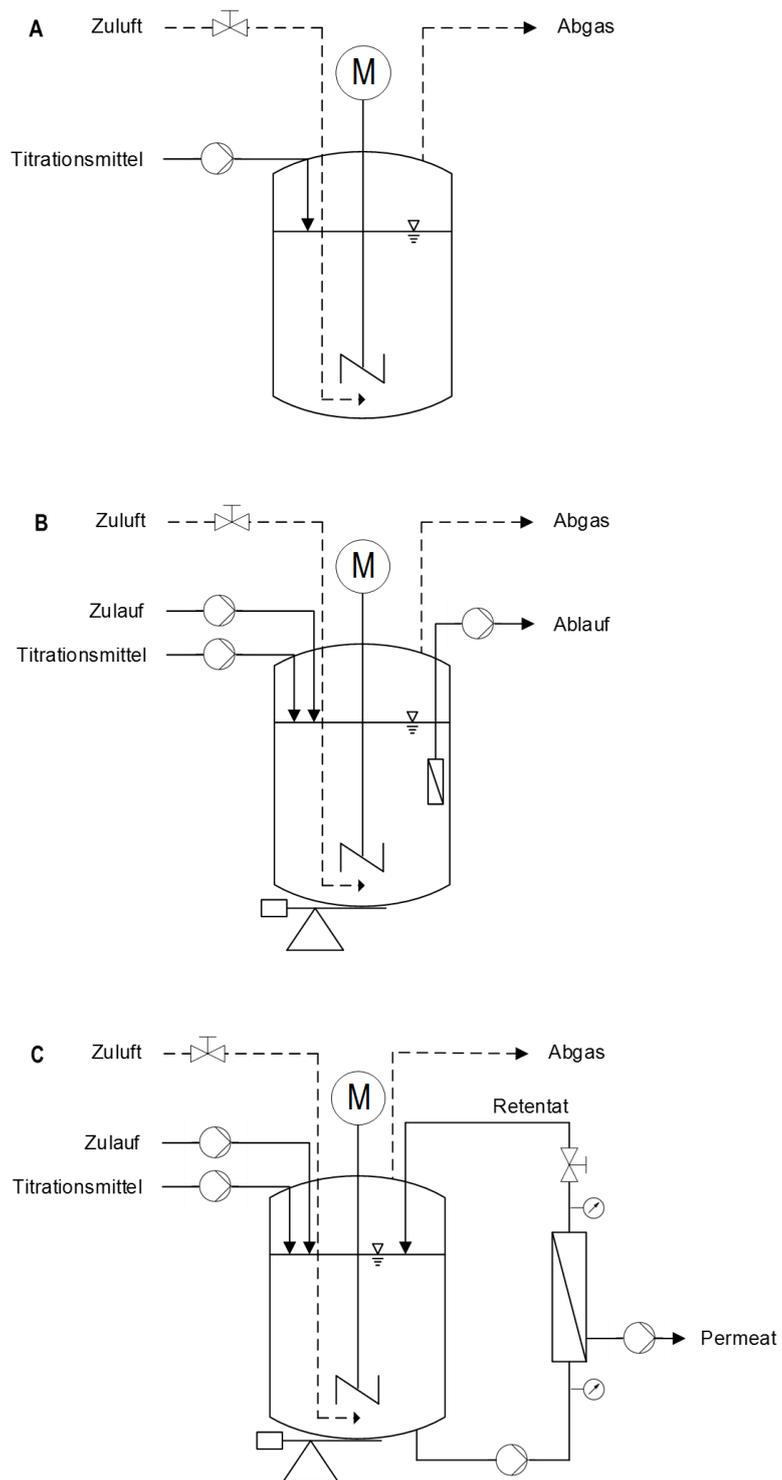


Abbildung 3-10: Schematische Darstellung der Prozesskonfigurationen. **(A):** Rührkesselreaktor im Satzverfahren, **(B):** Kontinuierlicher Betrieb eines Rührkesselreaktors mit getauchtem Mikrofiltrationshohlfasermembranmodul, **(C):** Kontinuierlicher Betrieb eines Rührkesselreaktors mit externem Hohlfasermembranmodul im Umlauf.

3.2.4 Sauerstofftransfer in Rührkesselreaktoren

Bei aeroben Prozessen ist der Sauerstoffeintrag eine wichtige Prozessgröße. Im Rührkesselreaktor wird der Sauerstoff in der Regel in Form von Druckluft steril in den Reaktor geführt. Hierbei wird er mit spezifischer Begasungsorgane in der Nähe der Rührwerke in den Reaktor eingebracht. Durch den mechanischen Leistungseintrag über Rührorgane werden möglichst kleine Gasblasen mit einer großer spezifischer Oberfläche erzeugt und dispergiert (Takors und Weuster-Botz 2018).

Der Massentransfer wird beispielsweise durch das Zwei-Film-Modell beschrieben (Abbildung 3-10). Dieses besagt, dass zwei Phasen, die miteinander im Austausch stehen, eine Grenzfläche bilden, an der die Konzentrationen im thermodynamischen Gleichgewicht sind. Beiderseits dieser Grenzfläche existiert eine laminare Phasengrenzschicht, in welcher diffusiver Stofftransport entlang des Konzentrationsgradienten vorherrscht. Der Stofftransport selbst kann mit dem 1. Fick'schen Gesetz beschrieben werden. Im Kern der jeweiligen Phase kann von einer homogenen Durchmischung ausgegangen werden. Der Zusammenhang zwischen Partialdruck in der Gasphase und der Konzentration in der Flüssigphase an der Grenzfläche wird durch das Henry-Gesetz beschrieben.

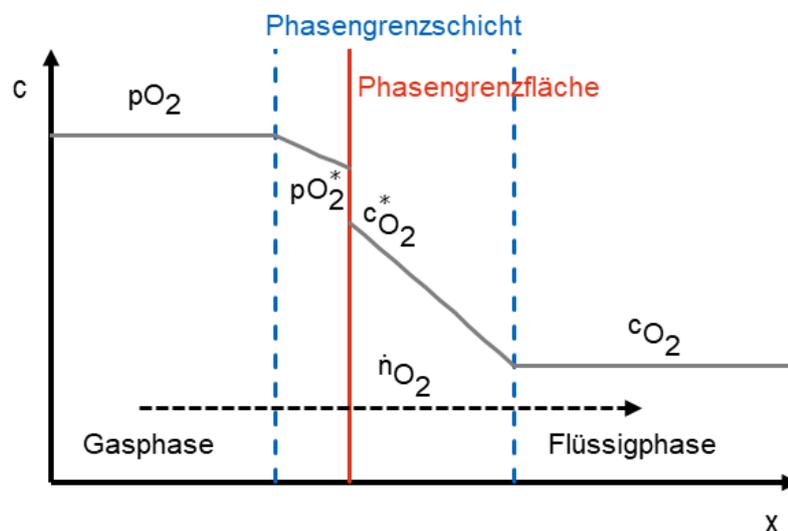


Abbildung 3-11: Zweifilmmodell des Stofftransports, das den Sauerstofftransport von der Gasphase in die Flüssigphase, beschreibt. p_{O_2} : Sauerstoffpartialdruck in der Gasphase, c_{O_2} : Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase. Abgewandelt nach Draxler und Siebenhofer (2014).

Aufgrund des geringeren Transportwiderstands in der Gasphase, wird dieser vernachlässigt und somit ergibt sich folgende Beziehung für die Sauerstoffeintragsrate OTR (*oxygen transfer rate*) (Draxler und Siebenhofer 2014; Takors und Weuster-Botz 2018):

$$\text{OTR} = \frac{\dot{n}_{\text{O}_2}}{V_R} = k_L \cdot \frac{A}{V_R} \cdot (c_{\text{O}_2}^* - c_{\text{O}_2}) = k_L a \cdot (c_{\text{O}_2}^* - c_{\text{O}_2}) \quad 3-31$$

OTR	Sauerstoffeintragsrate, mol L ⁻¹ h ⁻¹
\dot{n}_{O_2}	Stofftransferrate, mol h ⁻¹
A	Phasengrenzfläche, m ²
$k_L a$	volumetrischer Stofftransportkoeffizient, h ⁻¹
$c_{\text{O}_2}^*$	Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase (im Gleichgewicht mit der Gasphase), mol L ⁻¹
c_{O_2}	Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase (in Kernströmung), mol L ⁻¹

Durch quantitativer Erfassung der Abgaszusammensetzung kann die Sauerstoffaufnahme rate OUR (*oxygen uptake rate*) der Mikroorganismen unter Annahme eines gleichen Zuluft- und Abluftstroms folgendermaßen abgeschätzt werden:

$$\text{OUR} = \frac{F_{\text{Luft,ein}} \cdot y_{\text{O}_2,\text{ein}} - F_{\text{Luft,aus}} \cdot y_{\text{O}_2,\text{aus}}}{V_R \cdot V_m} \quad 3-32$$

OUR	Sauerstoffaufnahme rate, mol L ⁻¹ h ⁻¹
$F_{\text{Luft,ein}}$	Zuluftstrom in den Reaktor, L h ⁻¹
$F_{\text{Luft,aus}}$	Abluftstrom aus dem Reaktor, L h ⁻¹
V_R	Reaktorvolumen, L
V_m	molares Volumen, L mol ⁻¹ (22,414 L mol ⁻¹ bei Normbedingungen)
$y_{\text{O}_2,\text{ein}}$	Stoffmengenanteil O ₂ in der Zuluft, -
$y_{\text{O}_2,\text{aus}}$	Stoffmengenanteil O ₂ in der Abluft, -

Zur genauen Berechnung wird der Inertgasanteil berücksichtigt, um die Änderung der Stoffströme von Zuluft- und Abluftstrom einzuschließen.

$$1 = y_{\text{inert}} + y_{\text{O}_2} + y_{\text{CO}_2} \quad 3-33$$

y_{inert} Stoffmengenanteil N_2 in der Zuluft, -

Hieraus ergibt sich für den Abluftstrom folgender Zusammenhang für den Inertgasfaktor Θ .

$$F_{\text{Luft,ein}} \cdot \Theta = F_{\text{Luft,aus}} \quad 3-34$$

$$\Theta = \frac{1 - y_{\text{O}_2,\text{ein}} - y_{\text{CO}_2,\text{ein}}}{1 - y_{\text{O}_2,\text{aus}} - y_{\text{CO}_2,\text{aus}}} \quad 3-35$$

Daraus ergibt sich folgender Zusammenhang für die Sauerstoffaufnahme (OUR):

$$\text{OUR} = \frac{F_{\text{Luft,ein}} \cdot (y_{\text{O}_2,\text{ein}} - \Theta \cdot y_{\text{O}_2,\text{aus}})}{V_{\text{R}} \cdot V_{\text{m}}} \quad 3-36$$

Analog kann hierzu die CO_2 -Emmisionsrate CER (*carbon dioxide emisison rate*) aus der Bilanzierung der Abluft berechnet werden:

$$\text{CER} = \frac{F_{\text{Luft,ein}} \cdot (\Theta \cdot y_{\text{CO}_2,\text{aus}} - y_{\text{CO}_2,\text{ein}})}{V_{\text{R}} \cdot V_{\text{m}}} \quad 3-37$$

4 Material und Methoden

4.1 Reaktionsmedien

Komplexes Vorkulturmedium

Für die Herstellung von Vorkulturen wurde ein abgewandeltes MYP-Medium (*mannitol yeast peptone*-Medium; s. Tabelle 4-1) verwendet. Hierzu wurden Hefeextrakt und Pepton aus Casein in 5-fach konzentrierter Menge wie in Tabelle 4-1 angegeben eingewogen, in einem Liter voll entsalztem Wasser (VE-Wasser) gelöst und der pH auf 6 mit 3 M KOH eingestellt. Die 5-fach konzentrierte Stammlösung wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Nach Abkühlen wurden sowohl die 5-fach konzentrierte Stammlösung sowie die separat hergestellte, sterile D-Mannitol-Stammlösung (100 g L⁻¹) in entsprechendem Volumen in einem separat sterilisierten Messzylinder zugegeben und mit sterilem VE-H₂O auf einen Liter aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

Tabelle 4-1: Zusammensetzung des MYP-Mediums (*mannitol yeast peptone*-Medium) zur Vorkulturherstellung.

Komponente	Konzentration, g L ⁻¹
D-Mannitol	10
Hefeextrakt	5
Pepton aus Casein	3

Halb-definiertes Vorkulturmedium

Zur Untersuchung des Einflusses von Komplexmedienbestandteilen wurde ein halb-definiertes Medium angelehnt an Wethmar und Deckwer (1999) mit Mannitol als Kohlenstoffquelle eingesetzt (siehe Tabelle 4-2). Hierbei wurden zunächst alle Medienbestandteile außer der Kohlenstoffquelle, MgSO_4 sowie der Vitaminlösung unter Rühren in $\text{VE-H}_2\text{O}$ gelöst, der pH auf 6 eingestellt und diese bei $121\text{ }^\circ\text{C}$ für 21 min autoklaviert. Die zuvor separat autoklavierte Mannitol- und die MgSO_4 -Stammlösung sowie die zuvor sterilfiltrierte ($0,22\text{ }\mu\text{m}$) Vitaminstammlösung (siehe Tabelle A 2) wurden anschließend aseptisch zugegeben.

Tabelle 4-2: Zusammensetzung des halb-definierten Mediums nach Wethmar und Deckwer (1999).

Komponente	Konzentration, g L^{-1}
Hefeextrakt	0,5
L-Glutamin	0,09
L-Serin	0,028
KH_2PO_4	0,9
K_2HPO_4	0,1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,5
FeCl_3	0,005
NaEDTA	0,013
CaCl_2	1,25
	Zugabevolumen, mL L^{-1}
D-Mannitol (100 g L^{-1})	250
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{ H}_2\text{O}$ (250 g L^{-1})	1
Vitaminstammlösung (100-fach)	10

Medium zur Kultivierung von *Gluconobacter oxydans* im Rührkesselreaktor

Als Medium zur Kultivierung von *G. oxydans* wurde ein modifiziertes Komplexmedium nach Buchert *et al.* (1988) (siehe Tabelle 4-3) eingesetzt. Hierbei wurden zunächst alle Medienbestandteile außer der Kohlenstoffquelle, MgSO_4 und Antischaummittel unter Rühren in VE- H_2O gelöst, der pH auf 6 eingestellt und diese bei 121 °C für 21 min autoklaviert. Die zuvor separat autoklavierte, konzentrierte Mannitol-Stammlösung, die MgSO_4 -Stammlösung sowie das Antischaummittel (AF204) wurden steril zugegeben. Bei Stämmen mit Plasmid wurde zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks zusätzlich Kanamycin aus einer Stammlösung zugegeben, um eine finale Konzentration von 50 mg L^{-1} im Medium zu erzielen.

Tabelle 4-3: Zusammensetzung des Mediums nach Buchert *et al.* (1988) zur Kultivierung von *G. oxydans*.

Komponente	Konzentration, g L^{-1}
Hefeextrakt	5,0
Pepton aus Casein	3,0
KH_2PO_4	1,0
K_2HPO_4	1,5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,0
	Zugabevolumen, mL L^{-1}
D-Mannitol (100 g L^{-1})	250
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (250 g L^{-1})	2
Antischaum AF204 10 % (v/v)	1

Produktionsmedien für die Biotransformation

Für Oxidationsreaktionen wurden verschiedene Medien untersucht, die im Folgenden fortlaufend gekennzeichnet sind.

Medium A ist ein 67 mM Phosphatpuffer, bei dem alle Medienbestandteile (siehe Tabelle 4-4) unter Rühren in VE- H_2O gelöst, der pH auf 5 eingestellt und diese bei 121 °C für 21 min autoklaviert wurde.

Tabelle 4-4: Zusammensetzung des Mediums A.

Komponente	Konzentration, g L⁻¹
K ₂ HPO ₄	2,2
KH ₂ PO ₄	7,3
<i>meso</i> -Erythritol	10 - 100
	Zugabevolumen, mL L⁻¹
Antischaum AF204 10 % (v/v)	0,6

Medium B (siehe Tabelle 4-5) wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt. Hierbei wurden zunächst alle Medienbestandteile unter Rühren in VE-H₂O gelöst, der pH auf 6 eingestellt und diese bei 121 °C für 21 min autoklaviert. Im Anschluss wurden die in Tabelle 4-6 angegebenen Volumina der Stammlösungen zugegeben.

Tabelle 4-5: Zusammensetzung des Mediums B.

Komponente	Konzentration, g L⁻¹
Na ₂ HPO ₄	1,6
KH ₂ PO ₄	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,4
<i>meso</i> -Erythritol	10 -350
	Zugabevolumen, mL L⁻¹
MgSO ₄ ·7 H ₂ O (250 g L ⁻¹)	0,8
CaCl ₂ ·2 H ₂ O (250 g L ⁻¹)	0,4
Antischaum AF204 10 % (v/v)	0,6

Medium C wurde nach Vorlop *et al.* (2009) hergestellt. Hierzu wurden drei Lösungen entsprechend Tabelle 4-6 hergestellt. Die angegebenen Medienbestandteile wurden unter Rühren in VE-H₂O gelöst und anschließend bei 121 °C für 21 min autoklaviert. In Lösung 2 wurden nach Abkühlen die Vitamin- und Spurenelementstammlösungen in den in Tabelle 4-6 angegebenen Volumina zugegeben und die drei Lösungen aseptisch vereint. Die Vitaminlösung wurde dabei sterilfiltriert (0,22 µm) zugegeben.

Tabelle 4-6: Zusammensetzung des Mediums C nach Vorlop *et al.* (2009).

Komponente	Konzentration, g L⁻¹
<i>Lösung 1</i>	
Na ₂ HPO ₄	1,60
KH ₂ PO ₄	1,00
in 250 mL VE-H₂O lösen	
<i>Lösung 2</i>	
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,40
CaCl ₂ · 2 H ₂ O (250 g L ⁻¹)	0,10
MgSO ₄ · 7 H ₂ O (250 g L ⁻¹)	0,20
Hefeextrakt	0,25
Zugabevolumen, mL L⁻¹	
5-fach Spurenelementlösung DSMZ 144 (siehe Tabelle A 4)	2,00
10-fach Vitaminlösung DSMZ-141 (siehe Tabelle A 3)	1,00
in 250 mL VE-H₂O lösen	
<i>Lösung 3</i>	
meso-Erythritol	100
in 500 mL VE-H₂O lösen	

Medium D wurde nach Merfort *et al.* (2006a) hergestellt. Hierbei wurden zunächst alle Medienbestandteile unter Rühren in VE-H₂O gelöst, der pH auf 5 eingestellt und diese bei 121 °C für 21 min autoklaviert. Im Anschluss wurden die in Tabelle 4-7 angegebenen Volumina der Stammlösungen zugegeben.

Tabelle 4-7: Zusammensetzung des Mediums D nach Merfort.

Komponente	Konzentration, g L ⁻¹
Maisquellpaste	7,5
Calciumacetat	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,4
	Zugabevolumen, mL L⁻¹
MgSO ₄ · 7 H ₂ O (250 g L ⁻¹)	0,04
Glucose (500 g L ⁻¹)	50-200
Antischaum AF204 10 % (v/v)	1,4

4.2 Stamm und Stammhaltung

4.2.1 *Gluconobacter oxydans* Stämme

In diesem Projekt wurden mehrere *G. oxydans* Stämme zur L-Erythrose und 5-Ketogluconat Herstellung eingesetzt. Die Konstruktion der Stämme wurde vom Projektpartner des Lehrstuhls für Mikrobiologie der TU München unter Leitung von Prof. Liebl ausgeführt. Als Ausgangsstamm diente *G. oxydans* 621H (DSM2343) mit deletierter Uracil-Phosphoribosyltransferase (upp): *G. oxydans* 621HΔupp (Peters *et al.* 2013a). Ausgehend hiervon wurden membranständige Dehydrogenasen deletiert und somit Multideletionsstämme entwickelt (Peters *et al.* 2013b) (siehe Tabelle 3-4). Diese dienten als Ausgangsstämme für die Expressionsstämme, die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden (siehe Tabelle 4-8). Zum Teil wurden Stämme verwendet, in die vektorbasiert die Polyol-Dehydrogenase oder die Glucose-Dehydrogenase auf Grundlage des pJV17 Plamids (Mientus *et al.* 2017) reintegriert wurden (siehe Tabelle 4-9).

Tabelle 4-8: Verwendete Multideletionsstämme ohne Vektor (chromosomale Genintegration) zur Herstellung von L-Erythrose und 5-Ketogluconat.

Stamm	Beschreibung
<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.8	<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp mit deletierter Alkohol-, Inositol-, Aldehyd-, Sorbitol-, Gluconat-2-, Glucose-, PQQ-abhängige-Dehydrogenase 3 und 4
<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.9	<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.8 mit deletierter Polyol-Dehydrogenase
<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.8 P_{TufB} sldAB	<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.8 mit inseriertem Promotor P_{TufB}
<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.9 $\Delta adh::sldAB$	<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.9 mit inserierter Polyol-Dehydrogenase im Locus der Alkohol-Dehydrogenase
<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.9 $\Delta g2dh::sldAB$	<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.9 mit inserierter Polyol-Dehydrogenase im Locus der Gluconat-2-Dehydrogenase
<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.8 $\Delta gdh::gdh$	<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.8 mit re-inserterter Glucose-Dehydrogenase
<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.8 $\Delta adh::gdh_{3504}$	<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp BP.8 mit inserierter Glucose-Dehydrogenase von <i>G. oxydans</i> DSM3504 in den Locus der Alkohol-Dehydrogenase

Tabelle 4-9: Vektoren, die in *G. oxydans* 621HΔupp BP.9 integriert wurden.

Stammbezeichnung	Beschreibung
pSLDAB- <i>sdAB</i>	Polyol-Dehydrogenase unter Kontrolle des nativen Promotors
pIDH- <i>sdAB</i>	Polyol-Dehydrogenase unter Kontrolle des Promotors der Inositol-Dehydrogenase
pSDH- <i>sdAB</i>	Polyol-Dehydrogenase unter Kontrolle des Promotors der Sorbitol-Dehydrogenase
pADH- <i>sdAB</i>	Polyol-Dehydrogenase unter Kontrolle des Promotors der Alkohol-Dehydrogenase
pG2DH- <i>sdAB</i>	Polyol-Dehydrogenase unter Kontrolle des Promotors der Gluconat-2-Dehydrogenase
pTufB- <i>sdAB</i>	Polyol-Dehydrogenase unter Kontrolle des Promotors des Elongationsfaktors TufB
p452- <i>sdAB</i>	Polyol-Dehydrogenase unter Kontrolle des Promotors des Elongationsfaktors 452
pGDH: <i>gdh</i> -pADH: <i>sdAB</i>	Polyol-Dehydrogenase unter Kontrolle des Promotors der Alkohol-Dehydrogenase und Glucose-Dehydrogenase unter Kontrolle des nativen Promotors
pLGDH: <i>gdh</i> -pADH: <i>sdAB</i>	Polyol-Dehydrogenase unter Kontrolle des Promotors der Alkohol-Dehydrogenase und Glucose-Dehydrogenase unter Kontrolle des verlängerten nativen Promotors
pG2DH: <i>gdh</i> -pADH: <i>sdAB</i>	Polyol-Dehydrogenase unter Kontrolle des Promotors der Alkohol-Dehydrogenase und Glucose-Dehydrogenase unter Kontrolle des Promotors der Gluconat-2-Dehydrogenase
pLG2DH: <i>gdh</i> -pADH: <i>sdAB</i>	Polyol-Dehydrogenase unter Kontrolle des Promotors der Alkohol-Dehydrogenase und Glucose-Dehydrogenase unter Kontrolle des verlängerten Promotors der Gluconat-2-Dehydrogenase

4.2.2 Stammhaltung

Die langfristige Stammhaltung erfolgte in Form von Glyceringefrierkulturen bei -80 °C. Hierfür wurde ein Schüttelkolben mit sterilem MYP-Medium (vgl. Tabelle 4-1) mit Zellen von einer Agarplatte oder einer Glyceringefrierkultur angeimpft und für 20 h bei 30 °C, 250 rpm und 5 cm Exzentrizität inkubiert. Sobald die Zellsuspension eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) – gemessen im Einstrahlphotospektrometer (Spectronic Genesys 10S, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) – zwischen 0,8 und 1,0 aufwies, wurde sie im Verhältnis 1:2 mit 50 % (v/v) sterilem Glycerin in Eppendorf Reagenzgefäßen mit Sicherheitsverschluss vermischt und als 1 mL Aliquots bei -80 °C eingefroren.

4.3 Kultivierung und Biotransformation mit *G. oxydans*

4.3.1 Vorkulturherstellung und Zellernte

Die Herstellung der Vorkulturen erfolgte zweistufig. Die erste Vorkultur wurde in einem 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen mit 50 mL MYP-Medium (siehe Tabelle 4-1) mit 0,1 % (v/v) sterilfiltrierter Thymidinstammlösung (siehe Tabelle A 5), welches mit 500 µL einer Glyceringefrierkultur angeimpft wurde, hergestellt. Bei Verwendung von rekombinanten Stämmen mit Expressionsplasmid wurde zusätzlich 0,1 % (v/v) der Kanamycinsulfatstammlösung (siehe Tabelle A 5) zugegeben. Die Inkubation erfolgte bis zu 72 h bei 30 °C, 250 rpm und 5 cm Exzentrizität.

Die Zellen aus der ersten Vorkultur wurden anschließend in die zweite Vorkultur transferiert. Hierzu wurden in einem 1.000 mL Schüttelkolben mit Schikanen 100 – 200 mL MYP-Medium mit 10 % (v/v) Zellsuspension der ersten Vorkultur (OD_{600} zwischen 1,8 – 2,2), 0,1 % (v/v) Thymidinstammlösung und 0,1 % (v/v) Kanamycinsulfatstammlösung angeimpft. Vorkultur zwei wurde dann für 24 h bei 30 °C, 180 rpm und 5 cm Exzentrizität inkubiert.

Nach Fremdkeimkontrolle unter dem Mikroskop wurden die Zellen zu je 50 mL in sterilen Zentrifugationsröhrchen (50 mL Falcon, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) bei 4.500 rpm (3.620 rcf) für 30 min bei 30 °C in einer Standzentrifuge (Rotixa 50 RS, Andreas Hettich GmbH & Co.KG; Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert.

Der Zellüberstand wurde unter der Sterilwerkbank verworfen und die Zellen wurden in frischem MYP-Medium zur Kultivierung oder Biotransformation mit einer 10 mL Pipette re-suspendiert und konnte nun zur Inokulation des jeweiligen Prozesses verwendet werden. Sofern das benötigte Volumen 1 L überstieg, wurde eine zweistufige Zentrifugation durchgeführt. Hierfür

wurden jeweils 500 mL der Zellsuspension in zuvor autoklavierte Zentrifugenbecher (Centrifuge Bottle 1000 mL, Nalge Nunc International, Rochester, USA) überführt und diese für 20 min bei 4.500 rpm (3.620 rcf) abzentrifugiert. Der Zellüberstand wurde anschließend zu ca. 70 % steril verworfen und das Zellpellet anschließend im Überstand mit einer 10 mL Pipette resuspendiert, ehe es wie oben beschrieben in sterile 50 mL Zentrifugationsröhrchen überführt wurde.

4.3.2 Satzverfahren in Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab

Für Versuche, bei denen keine pH-Regelung erforderlich war, wurden die miniaturisierten parallelen Rührkesselreaktoren des Bioreaktorblocks bioREACTOR 48 (2mag AG, München, Deutschland) verwendet, welcher mit bis zu 48 Einweg-Rührkesselreaktoren aus Polystyrol bestückt wurde (Abbildung 4-1). Diese verfügen über ein Arbeitsvolumen von 8 - 12 mL, vier Strömungsbrecher sowie zwei fluorometrische Sensoren zur Messung der Konzentration des gelösten Sauerstoffs und des pH zwischen 6,5 und 8,0 (PreSens GmbH, Regensburg, Deutschland). Diese Prozessparameter werden durch Sensorriegel unterhalb der Reaktoren und somit nicht-invasiv nach der *Dual-Lifetime-Referencing* (DLR) Methode gemessen (Janzen *et al.* 2015; Kusterer *et al.* 2008). Zur Sicherstellung des Gaseintrags sowie zur Durchmischung wurden auf einer Hohlachse gelagerte, gasinduzierende Rührer eingesetzt. Mit Hilfe der in den Rührern integrierten Dauermagneten wird über einen Elektromagneten des bioREACTOR48 die Drehbewegung erzeugt. Hierbei wird das Medium aus dem Reaktor und Gas aus dem Kopfraum über die Hohlachse angesaugt und im Reaktionsmedium dispergiert, wobei hohe Sauerstofftransferraten mit einem maximalen volumenbezogenen Stoffübergangskoeffizienten ($k_L a$) von $0,4 \text{ s}^{-1}$ erzielt werden (Hortsch *et al.* 2011; Puskeiler und Weuster-Botz 2004)

Des Weiteren ist der Bioreaktorblock mit zwei Wärmetauschern ausgestattet, von denen einer zur Temperaturkontrolle des Reaktionsraums und einer zur Temperierung des Kopfraums dient. Um Verdunstungseffekte zu reduzieren, wurde der Kopfraum mit 40 % (v/v) Ethanol auf 20 °C gekühlt und die Zuluft mit sterilem VE-H₂O gesättigt. Die Reaktoren sind über Steckverbindungen an einer Sterilgasabdeckung angebracht, über die die Zuluft in den Kopfraum der Reaktoren geleitet wird. Die Abdeckung verfügt über Öffnungen, über die das Prozessgas entweicht. Die Reaktoren können weiterhin durch diese Öffnungen mit Hilfe eines Laborroboters (Tecan GmbH, Crailsheim, Deutschland) mit Pipettiernadeln angesteuert werden und somit Titrationsmittel und Zulaufmedium zugeführt oder Proben für *offline*-Messungen entnommen werden. Neben dem Pipettierarm ist auch ein Greifarm für Mikrotiterplatten (MTP), ein MTP-Photometer und eine MTP-Waschstation in den Laborroboter integriert. Das Prozessleitsystem ist mehrstufig aufgebaut, sodass die Steuerung und

Dokumentation der Prozesse über Fedbatch-XP (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) erfolgt, die wiederum über die Kommunikationssoftware FBXP Server auf die Robotersoftware Gemini (Tecan GmbH, Crailsheim Deutschland) zugreift.



Abbildung 4-1: Aufbau des bioREACTOR48: Steuergerät der gasinduzierenden Rührer (1), Flasche mit sterilem VE-H₂O zur Sättigung der Zuluft (2), Bioreaktorblock mit miniaturisierten Einweg-Bioreaktoren (3), Pipettierarm (4), Vorlage für *offline*-Prozessproben (5), Greifarm (6).

Die Versuchsdurchführung erfolgte in der Regel steril, indem zunächst die einzelnen Einweg-Bioreaktoren unter der Sterilwerkbank ausgepackt und in den Reaktorblock eingesetzt wurden. Nach Zugabe aller Medienbestandteile wurden die Zellen zugegeben und es konnte die autoklavierte Sterilgasabdeckung mit den eingesetzten gasinduzierenden Rührern auf den Bioreaktoblock gesetzt werden. Nach Zusammenbau wurde der Reaktorblock von der Sterilwerkbank an die Arbeitsfläche transferiert und die bereits temperierten Wasserbäder, die Steuereinheit der Rührer sowie die Zuluft angeschlossen. Hierbei lag die Reaktortemperatur immer bei 30 °C und die Kopfraumkühlung bei 20 °C. Die Begasung wurde auf 0,1 L min⁻¹ pro Reaktor und die Rührerdrehzahl auf 2.200 rpm eingestellt. Unmittelbar im Anschluss wurde die Nullprobe automatisch mit dem Pipettierarm gezogen. Es erfolgten in definierten Zeitabständen (1 -3 h) automatisch Probenahmen zur Bestimmung der optischen Dichte (OD₆₀₀) sowie zur Substrat- und Produktanalytik. Die Pipettenspitzen wurden dabei entweder mit sterilem VE-H₂O oder 70 % (v/v) Ethanol gespült.

4.3.3 Satz- und Zulaufverfahren in Rührkesselreaktoren im Liter-Maßstab

Kultivierungen und Biotransformationen im Satz- und Zulaufbetrieb erfolgten im 1,5 L-Maßstab im DASGIP®-Bioblock (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Dieser besteht aus vier einwandigen Glasreaktoren mit jeweils zwei Seitenarmen und einem Arbeitsvolumen zwischen 0,3 und 0,8 L (s. Abbildung 4-2). Die Temperierung des Mediums erfolgt über einen Kühl-/Heizblock, in welchen die Reaktoren eingesetzt werden. An der Rührwelle sind im Abstand von 2,5 cm zwei 6-Blatt-Scheibenrührer angebracht, die über einen am Reaktordeckel aufgesetzten Elektromotor stufenlos angetrieben werden. Über Zulaufstutzen am Reaktorkopf können mittels Mikrodosierpumpen automatisiert Säure, Base, Zulaufmedium sowie Antischaummittel für jeden Reaktor separat angesteuert werden. Des Weiteren sind am Reaktordeckel Gewinde für pH-Sonde, pO₂-Sonde, Probenahmerohr, Füllstandsensoren und Temperaturfühler angebracht. Die Begasung erfolgt steril über vier getrennte Gasmischstationen, weshalb eine individuelle Begasung mit Druckluft und Stickstoff möglich ist. Die Abluft wird mit Hilfe von Kondensatoren gekühlt, um Verdunstungseffekte zu reduzieren und kann einer externen Abgasanalytik Easy Line (ABB AG, Zürich, Schweiz) zugeführt werden, um den O₂- und CO₂-Gehalt im Abgas jedes Reaktors aufzuzeichnen.

Die Inokulation des in den Reaktoren befindlichen Mediums erfolgte mit sterilen Einwegspritzen und Kanülen über das Septum, das in jeweils einem der beiden Seitenarme eingesetzt ist. Zur Probenahme wurde das am Lehrstuhl entwickelte Probenahmesystem ohne Totvolumen verwendet (Hiller *et al.* 2007). Als Prozessleitsystem für jeden der vier Reaktoren wird die Software DASGIP Control genutzt.

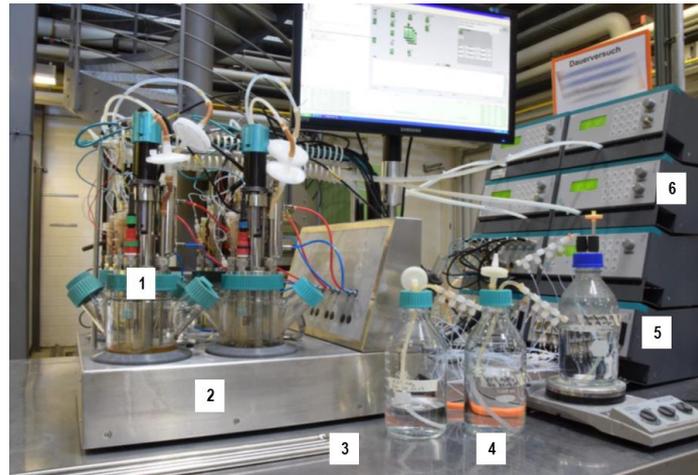


Abbildung 4-2: Aufbau des DASGIP®-Bioblocks: (1): Glasrührkesselreaktor mit jeweils 2 Seitenarmen, (2): Kühl-/Heizblock, (3): Probenahmerohre ohne Totvolumen, (4): Vorlagegefäße für Titrationsmittel, Antischaummittel und Zulaufmedium, (5): Mikrodosierpumpen, (6): vier Gasmischstationen und Steuereinheiten zur Messung und Regelung von Temperatur, Rührerdrehzahl, pH und Sauerstoffpartialdruck.

Nachdem die pH-Sensoren über eine Zweipunktkalibrierung bei pH 4 und pH 7 kalibriert wurden, konnten die Glasrührkesselreaktoren zusammengebaut, mit VE-H₂O befüllt und anschließend bei 121 °C für 20 min sterilisiert werden. Die Desinfektion der Zulaufleitungen für Titrationsmittel, Zulaufmedium und Antischaummittel erfolgte nach Girot *et al.* (1990) über ein vorgegebenes Protokoll beginnend mit 70 % (v/v) Ethanol, sterilem VE-H₂O, 2 M NaOH und erneut sterilem VE-H₂O. Nach Abkühlung der Reaktoren wurde das VE-H₂O unter der Sterilwerkbank über den Seitenarm ohne Septum verworfen, die Reaktoren wurden mit dem entsprechenden Medium befüllt und an der Station angeschlossen. Dabei wurde die Temperierung auf 30 °C, die Begasung auf 2 vvm eingestellt sowie das Ventil zur Bereitstellung von Kühlwasser für die Abluftkühlung geöffnet. Die anschließende Kalibrierung der pO₂-Sensoren war ebenfalls eine Zweipunktkalibrierung, wobei 100 % Luftsättigung bei Begasung mit Druckluft und 0 % Luftsättigung bei Begasung mit Stickstoff eingestellt wurden. Anschließend erfolgte die zweistufige Kalibrierung der Abgasanalytikeinheit (O₂: 0 % mit Stickstoff, 20,95 % mit Raumluft; CO₂: 0 % mit Stickstoff, oberer Referenzwert mit interner Kalibrierzelle).

Durch Inokulation wurde im Anschluss der Bioprozess gestartet. Während des Prozesses wurde der Sauerstoffpartialdruck auf einen Wert von mindestens 20 % Luftsättigung geregelt.

Im Falle eines Zulaufprozesses erfolgte während des Autoklavierens eine Kalibrierung der internen Mikrodosierpumpen mit einer konstanten Rate von 5 mL h^{-1} für 1 h.

4.3.4 Kontinuierliche Prozessführung im Litermaßstab mit totaler Zellrückhaltung

Für kontinuierliche Biotransformationen wurde der doppelwandige 3,6 L Glasrührkesselreaktor vom Typ Labfors 2 (Infors HT, Bottmingen, Schweiz) mit Strömungsbrecher verwendet. Dieser wird mit zwei 6-Blatt-Scheibenrührern im Abstand von 2,5 cm betrieben, die an der Rührwelle befestigt werden. Die Rührwelle wird über einen am Reaktordeckel angebrachten Elektromotor angetrieben. Des Weiteren sind am Reaktordeckel Gewinde für pH-Sonde, pO_2 -Sonde, Begasungsrohr, Probenahmerohr, Temperaturfühler, Abgaskondensator und Zulaufstutzen für Titrationsmittel und Zulaufmedium angebracht. Hierbei werden die Titrationsmittel über die Pumpen der Steuereinheit zugegeben, wohingegen das Zulaufmedium über eine externe Schlauchpumpe zugeführt wird. Die zur Begasung benötigte Druckluft wird auf 2,5 bar Vordruck geregelt und erfolgt über einen integrierten Massendurchflussregler, mit dem der Volumenstrom eingestellt wird. Die Abluft wird mit Hilfe eines Kondensators gekühlt, um Verdunstungseffekte zu reduzieren und kann einer externen Abgasanalytik Easy Line (ABB AG, Zürich, Schweiz) zugeführt werden, um den O_2 - und CO_2 -Gehalt im Abgas jedes Reaktors aufzuzeichnen. Die Temperierung geschieht über einen mit Wasser gefüllten Doppelmantel. Als Prozessleitsystem wird die Software IRIS 5 (Infors HT, Bottmingen, Schweiz) genutzt.

Nachdem der pH-Sensor mit einer Zweipunktkalibrierung bei pH 4 und pH 7 kalibriert und der Membrankörper des pO_2 -Sensors blasenfrei mit Elektrolytflüssigkeit befüllt wurde, konnte der Glasrührkesselreaktor zusammengebaut, mit VE- H_2O befüllt und anschließend bei $121 \text{ }^\circ\text{C}$ für 20 min sterilisiert werden. Im Anschluss daran wurde der Glasrührkesselreaktor an die Station angeschlossen, die sterile Begasung mit einem Wert von 2 vvm bei einer Temperierung von $30 \text{ }^\circ\text{C}$ gestartet und das Ventil für das Kühlwasser des Kondensators geöffnet. Mit Hilfe der externen Schlauchpumpe wurde das VE- H_2O aus dem Reaktor abgepumpt, das entsprechende Medium in den Reaktor gepumpt und die pH-Kontrolle gestartet. Nach einer Polarisationszeit von 6 h des pO_2 -Sensors wurde dieser durch Zweipunktkalibrierung kalibriert, wobei 100 % Luftsättigung bei Begasung mit Druckluft und 0 % Luftsättigung bei Begasung mit Stickstoff eingestellt wurden. Ebenso wurde die Abgasanalytikeinheit kalibriert (O_2 : 0 % mit Stickstoff, 20,95 % mit Raumluft; CO_2 : 0,4 % mit Raumluft, oberer Referenzwert mit interner Kalibrierzelle). Durch Inokulation wurde im Anschluss der Bioprozess gestartet. Inokulation des in den Reaktoren befindlichen Mediums erfolgte mit einer Einweg-Spritze und Kanüle über das Septum, welches in einer Durchführung am Reaktordeckel integriert ist. Während des Prozesses wurde der Sauerstoffpartialdruck auf einen Wert von mindestens 20 %

Luftsättigung durch Erhöhung der Rührerdrehzahl durch eine Steuersequenz geregelt, wobei die initiale Rührerdrehzahl bei 400 rpm lag.

Membranbioreaktor mit getauchtem Hohlfasermembranmodul

Nach Kantzow *et al.* (2015) wurde in den 3,6 L Glasrührkesselreaktor ein Mikrofiltrationshohlfasermembranmodul aus Polysulfon (Start AXH microfiltration hollow fiber tangential flow cartridge CFP-4-E-2U, GE Healthcare, Chicago, USA) integriert. Hierzu wurde das Modul vorsichtig aus dem Plexiglas entfernt, mit einem perforierten Silikonschlauch überzogen und ein Ende mittels eines Zweikomponenten-Silikons (TFC Silikon Kautschuk Typ6, Troll Factory, Riede, Deutschland) vollständig abgedichtet. Am anderen Ende wurde es über einen *Luer-Lock*-Anschluss mit einem Stutzen am Reaktordeckel verbunden. Über eine CPC-Kupplung war dieser mit einer peristaltischen Pumpe (REGLO analog, Ismatec, Wertheim, Deutschland) verbunden, welche den gravimetrisch geregelten Permeatfluss in einem Behälter antrieb und das Membranmodul somit im „*Dead-End*“-Modus (siehe Abschnitt 3.2.3) verwendet wurde.

Das Mikrofiltrationshohlfasermembranmodul besteht aus sechs einzelnen, jeweils 0,8 mm breiten und 34 cm langen Fasern, die eine Membranfläche von 50 cm² bei einer mittleren Porengröße von 0,45 µm zur Verfügung stellen. Das Mikrofiltrationshohlfasermembranmodul wurde vor Prozessbeginn mit dem Rührkesselreaktor bei 121 °C für 20 min im Autoklav sterilisiert. Nach Prozessende wurde es bei 50 °C für jeweils 1 h mit VE-H₂O und anschließend mit 0,5M NaOH gespült. Nach oberflächlicher Reinigung mit VE-H₂O wurde es in 70 % (v/v) Ethanol bis zur nächsten Verwendung aufrecht gelagert. Der Aufbau ist photographisch in Abbildung 4-3 B und schematisch in Abbildung 3-10 B dargestellt.

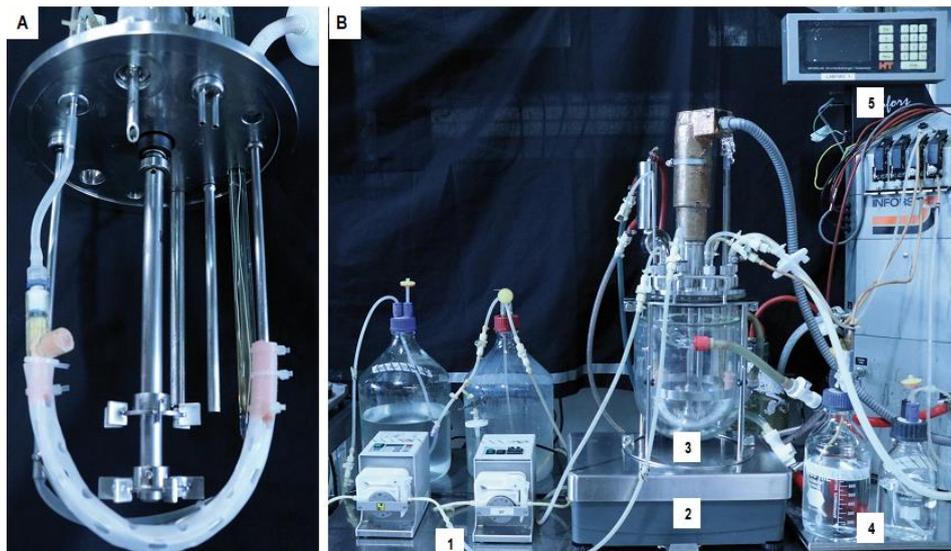


Abbildung 4-3: Aufbau des getauchten Mikrofiltrationshohlfasermembranmoduls am Reaktordeckel (A) und Versuchsaufbau des 3,6 L Glasrührkesselreaktors mit getauchter Membran (B): Externe Schlauchpumpen für Zulauf und Permeatfluss mit Gefäßen (1), Waage zur gravimetrischen Regelung des Reaktorvolumens (2), doppelwandiger Glasrührkesselreaktor mit getauchtem Mikrofiltrationshohlfasermembranmodul (3), Vorlagegefäße für Titrationsmittel (4), Steuereinheit zur Messung und Regelung von Temperatur, Rührerdrehzahl, pH und Sauerstoffpartialdruck (5).

Membranbioreaktor mit externem Hohlfasermembranmodul

Der 3,6 L Glasrührkesselreaktor wurde um ein externes Hohlfasermembranmodul aus Polysulfon (UFP-750-E-4A, GE Healthcare, Chicago, USA) zur Separation der Zellen erweitert. Das Hohlfasermembranmodul besteht aus 50, jeweils 30 cm langen Fasern mit einem Innendurchmesser (ID) von 1 mm, die zusammen eine Membranfläche von 420 cm² bei einer mittleren Ausschlussgröße von 750 kDa zur Verfügung stellen. Aufgrund der höheren Membranoberfläche ist der Betrieb mit größeren Durchflussraten möglich. Das Volumen des Lumens des externen Hohlfasermembranmoduls beträgt 12 mL, das durch die Leitungen im Bypass auf 46,5 mL erhöht wurde. Vor und nach dem Hohlfasermembranmodul wurden zwei Manometer integriert, um den Transmembrandruck (TMP) zu kontrollieren. Dieser wurde durch Reduktion des Schlauchdurchmessers am Retentat eingestellt und sollte 3,4 bar nicht übersteigen.

Im Glasrührkesselreaktor wurde ein zweites Probenahmerohr integriert, das über den Reaktordeckel an die peristaltische Zirkulationspumpe angeschlossen wurde, die für eine konstante Zirkulation im Umlauf sorgte. Gleichzeitig wurde eine zweite peristaltische Pumpe am Permeat des Hohlfasermembranmoduls angeschlossen. Diese konnte über das

Prozessleitsystem angesteuert werden, um das Reaktorvolumen gravimetrisch konstant zu halten. Das externe Hohlfasermembranmodul sowie sämtliche Schlauchverbindungen wurden vor Prozessbeginn bei 121 °C für 20 min, die Manometer mit einer UV-Lampe für mindestens 1 h unter der Sterilwerkbank sterilisiert. Nach Prozessende wurde das Modul bei 50 °C für jeweils 1 h zunächst mit VE-H₂O und anschließend mit 0,5 M NaOH gespült. Nach erneutem Spülen mit VE-H₂O wurde es mit 70 % (v/v) Ethanol gereinigt und in Ethanol gelagert. Der Aufbau ist photographisch in Abbildung 4-4 und schematisch in Abbildung 3-10 C dargestellt.

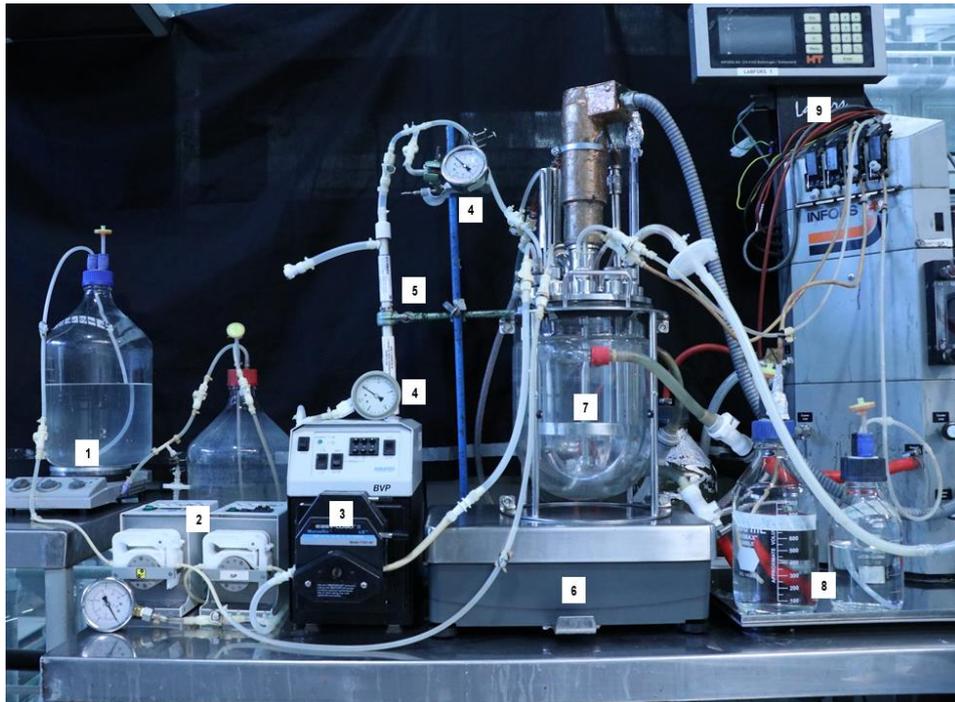


Abbildung 4-4: Versuchsaufbau des 3,6 L Glasrührkesselreaktors mit externem Hohlfasermembranmodul: Vorlagegefäß für den Zulauf (1), externe peristaltische Pumpen für den Zulauf- und Permeatstrom (2), externe Schlauchpumpe zur Zirkulation der Suspension durch das Hohlfasermembranmodul (3), Manometer zur Kontrolle des TMP (4) Hohlfasermembranmodul (5), Waage zur gravimetrischen Regelung des Reaktorfüllstands (6), Glasrührkesselreaktor (7), Vorlagegefäße für Titrationsmittel (8), Steuereinheit zur Messung und Regelung von Temperatur, Rührerdrehzahl, pH und Sauerstoffpartialdruck (9).

4.4 Präparative Produktaufarbeitung

Die Zellsuspension wurde zunächst in Einwegreaktionsgefäßen bei 15.000 rcf zentrifugiert (Rotanta 460R, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland). Anschließend

wurde die Flüssig-Fest-Trennung von Überstand und Zellen durchgeführt. Die Reinigung der Produkte aus der wässrigen Lösung des Überstands wurde im Rotationsverdampfer (Laborota 4003, Heidolph, Schwabach, Deutschland) durchgeführt. Im Vorlagekolben wurde die Suspension temperiert. Bei temperatursensitiven Substanzen wie der L-Erythrose wurde jedoch bei maximal 30°C gearbeitet. Anschließend wurde die Prozesskühlung gestartet und der Druck mit einer Vakuumpumpe schrittweise auf bis zu 18 mbar eingestellt. Zur Gewährleistung eines möglichst großen Oberflächen- zu Volumenverhältnisses wurde der Vorlagekolben maximal zu 30 % befüllt und der Flüssigkeitsoberflächenfilm durch Rotation des Verdampfungskolbens bis zu 100 rpm erhöht. Verdampftes Wasser kondensierte am Rückflusskühler und wurde in einem Auffangkolben gesammelt. Bei L-Erythrose verblieb ein viskoser Sirup und bei 5-Ketogluconat ein Feststoff im Vorlagekolben.

4.5 Analytische Methoden

4.5.1 Bestimmung der Zellkonzentration

Die optische Dichte (OD_{600}) wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Einstrahlphotospektrometer (Spectonic Genesys 10S, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gemessen. Der lineare Bereich des verwendeten Spektrometers erstreckt sich bis 0,3, weshalb entsprechende Verdünnungen in PBS (*Phosphate buffered saline*)-Puffer (siehe Tabelle A 1) gemacht wurden, um Proben unterhalb des Grenzwerts zu halten. Als Referenz diente der PBS-Puffer.

Aufgrund niedriger Zelldichten bei Kultivierungen mit *G. oxydans* sind gravimetrische Methoden zur Bestimmung der Zellkonzentration fehlerbehaftet oder erfordern ein großes Probenvolumen. Da der OD_{600} und die Biotrockenmassekonzentration (BTM) c_x im linearen Bereich korrelieren, kann über einen Proportionalitätsfaktor f_x nach Gleichung

4-1 von der OD_{600} auf die BTM geschlossen werden.

$$c_x = f_x \cdot OD_{600}$$

4-1

c_x Biotrockenmassekonzentration, g L⁻¹

OD_{600} optische Dichte bei 600 nm

f_x Proportionalitätsfaktor, g L⁻¹

Es wurden zunächst 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße geöffnet bei 80 °C im Trockenschrank für mindestens 24 h bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach einer Abkühlung von 10 min bei Raumtemperatur wurde das Eigengewicht mit einer Feinwaage bestimmt. Die Zellsuspension wurde zu Prozessende entnommen und auf eine optische Dichte von 20 durch Zentrifugation konzentriert. Hiervon ausgehend wurde eine neunstufige Verdünnungsreihe im Dreifachansatz erstellt und die jeweilige OD₆₀₀ gemessen. Von den Verdünnungen wurde die Biotrockenmassekonzentration im Dreifachansatz gemessen. Dazu wurden je 2 mL der Verdünnungsstufen in die leer gewogenen Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Die mit Proben befüllten Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden bei 13.000 rpm für 10 Minuten in einer Tischzentrifuge (Mikro 20, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Eppendorf Reaktionsgefäße bei 13.000 rpm für zwei Minuten zentrifugiert. Der restliche Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette entnommen und die Eppendorf-Reaktionsgefäße anschließend geöffnet bei 80 °C für mindestens 24 Stunden bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach kurzem Abkühlen bei Raumtemperatur, wurde durch erneutes Wiegen das Gewicht der befüllten Eppendorf-Reaktionsgefäße bestimmt und aus der Gewichts Differenz die Biotrockenmassekonzentration errechnet. Die lineare Korrelation der optischen Dichten mit den bestimmten Biotrockenmassekonzentrationen ergab für *G. oxydans* 621H einen Korrelationsfaktoren f_x von 0,36 g L⁻¹ OD₆₀₀⁻¹ (wachsende Zellen) und 0,48 g L⁻¹ OD₆₀₀⁻¹ (ruhende Zellen).

4.5.2 Bestimmung von Substrat- und Produktkonzentration

Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Mannitol, *meso*-Erythritol, L-Erythrose, 5-Ketogluconat, 2-Ketogluconat sowie Gluconat wurden mittels HPLC quantifiziert. Prozessproben wurden durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 min und anschließende Filtration (0,22 µm Spritzenvorsatzfilter, Chromafil RC-20/15 MS, Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren, Deutschland) von Zellen befreit. Falls keine sofortige Messung erfolgte, wurden die Proben bei -20°C gelagert. Zur Vermessung wurden die Proben in eine Rollrandflasche überführt und mit einer Bördelkappe verschlossen. Bei geringen Probenvolumina wurde ein Mikroinsert für die Rollrandflasche verwendet, wodurch Volumina von 150 µL ausreichend waren. Je nach Konzentration mussten Verdünnungen der Proben in VE-H₂O angefertigt werden.

Zur Quantifizierung diente ein Agilent 1100 System (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, USA) im isokratischen Betrieb. Die Detektion erfolgte mit einem UV-Detektors bei 210 nm und

eines Brechungsindex-Detektors (RI-Detektor). Es wurden externe Standards (0,5 – 25 g L⁻¹) vermessen. Über lineare Korrelation von Konzentration zu Peakfläche der Standards wurde die Konzentration der Prozessproben ermittelt. Als Software zur Integration der Chromatogramme diente ChemStation (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, USA). Je nach zu trennenden Substanzen wurden als Trennsäulen entweder der Anionentauscher Aminex®-HPX-87H (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, USA) oder RSpak DE613 (Showa Denko GmbH, München, Deutschland) verwendet. Die unterschiedlichen Bedingungen sind in Tabelle 4-10 und Tabelle 4-11 aufgelistet.

Tabelle 4-10: Betriebsbedingungen bei Verwendung der Aminex®-HPX-87H Trennsäule.

Aminex®-HPX-87H	
Dimensionierung	300 mm x 7,8 mm
Vorsäule	Micro-Guard CationH Cartridge
Laufmittel	5 mM Schwefelsäure
Temperatur	25 °C
Flussrate	0,45 mL min ⁻¹
Substanzen	Mannitol, <i>meso</i> -Erythritol, L-Erythrulose

Tabelle 4-11: Betriebsbedingungen bei Verwendung der RSpak DE613 Trennsäule.

RSpak DE613	
Dimensionierung	150 mm x 6,0 mm
Vorsäule	RSpak DE4A
Laufmittel	2 mM Perchlorsäure
Temperatur	30 °C
Flussrate	0,45 mL min ⁻¹
Substanzen	Gluconat, 2-Ketogluconat, 5-Ketogluconat

Enzymatische Bestimmung der Glucosekonzentration

Für die Bestimmung der Glucosekonzentration wurde ein Enzymtest (D-Glucose, R-Biopharm, Darmstadt) verwendet. Die D-Glucose wird indirekt gemessen. In einer ersten Reaktion wird sie durch das Enzym Hexokinase unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) phosphoryliert. Die Oxidation von Glucose-6-Phosphat zu D-Gluconat-6-phosphat wird durch das Enzym Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase katalysiert. Dabei wird NADP⁺ stöchiometrisch zu NADPH/H⁺ (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat) reduziert, welches photometrisch bei 340 nm bestimmt werden kann. Die Glucosekonzentration wurde über eine Kalibriergerade (0,075 – 0,375 g L⁻¹) von der mitgelieferten Standardlösung nach Gleichung 4-2 ermittelt. Um im linearen Bereich zu liegen, müssen die Überstände der Prozessproben in VE-H₂O verdünnt werden. Die Messung erfolgte in Mikrotiterplatten (MTP) im Dreifachansatz bei 340 nm im MTP-Photometer (Multiscan, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) nach dem in Tabelle 4-12 angegebenen Pipettierschema.

4-2

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{Standard/Probe}} - (A_2 - A_1)_{\text{Leerwert}}$$

Tabelle 4-12: Pipettierschema des Enzymtests zur Ermittlung der Glucosekonzentration im MTP-Format.

In jede Vertiefung der MTP zugeben	Leerwert, μL	Probe, μL
Lösung 1	50	50
Probe / Standard	-	20
VE-H ₂ O	80	60
Mischen, nach 5 min Absorption (A_1) bei 340 nm messen, Start der Reaktion durch Zugabe von:		
Enzymlösung (1:10 in Lösung 1 verdünnt)	20	20
Mischen, nach 30 min Absorption (A_2) bei 340 nm messen		

Enzymatische Bestimmung der Fructosekonzentration

Für die Bestimmung der Fructosekonzentration wurde ein Enzymtest (D-Glucose / D-Fructose, R-Biopharm, Darmstadt) verwendet. Sowohl Glucose als auch Fructose werden in einer ersten Reaktion durch das Enzym Hexokinase unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) phosphoryliert. Die Oxidation von Glucose-6-Phosphat zu D-Gluconat-6-phosphat wird durch das Enzym Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase katalysiert. Dabei wird NADP⁺ stöchiometrisch zu NADPH/H⁺ (Nicotinamidadeninukleotidphosphat) reduziert, das photometrisch bei 340 nm bestimmt wird. Fructose-6-phosphat wird durch die Phosphoglucose-Isomerase in Glucose-6-phosphat überführt, welches dann ebenfalls unter Bildung von NADPH/H⁺ oxidiert und bei 340 nm gemessen werden wird. Auch hier ist die Bildung von NADH/H⁺ stöchiometrisch zur eingesetzten Fructose. Die Konzentration wurde über eine Kalibriergerade ($0,075 - 0,375 \text{ g L}^{-1}$) von einer Standardlösung nach Gleichung 4-3 ermittelt. Um im linearen Bereich zu liegen, müssen die Überstände der Prozessproben in VE-H₂O verdünnt werden. Die Messung erfolgte in MTP-Platten im Dreifachansatz bei 340 nm im MTP-Photometer nach dem in Tabelle 4-13 angegebenen Pipettierschema.

4-3

$$\Delta A = (A_3 - A_2)_{\text{Standard/Probe}} - (A_3 - A_2)_{\text{Leerwert}}$$

Tabelle 4-13: Pipettierschema des Enzymtests zur Ermittlung der Fructosekonzentration im MTP-Format.

In jede Vertiefung der MTP zugeben	Leerwert, μL	Probe, μL
Lösung 1	50	50
Probe / Standard	-	20
VE-H ₂ O	80	60
Mischen, nach 5 min Absorption (A_1) bei 340 nm messen, Start der Reaktion durch Zugabe von:		
Enzymlösung 1 (1:20 in Lösung 1 verdünnt)	20	20
Mischen, nach 30 min Absorption (A_2) bei 340 nm messen, Start der Reaktion durch Zugabe von:		
Enzymlösung 2 (1:20 in Lösung 1 verdünnt)	20	20
Mischen, nach 30 min Absorption (A_3) bei 340 nm messen		

Enzymatische Bestimmung der Acetatkonzentration

Die Bestimmung der Acetatkonzentration über einen Enzymtest (Essigsäure, R-Biopharm, Darmstadt) bestimmt. In einer ersten Reaktion wird Acetat unter Verbrauch von ATP und in Gegenwart von Coenzym A (CoA) durch das Enzym Acetyl-CoA-Synthetase (ACS) zu Acetyl-CoA umgesetzt. Acetyl-CoA reagiert in Anwesenheit von Oxalacetat mit der Citrat-Synthase zu Citrat. Das Oxalacetat wird in einer vorherigen Reaktion stöchiometrisch aus L-Malat mittels der Malat-Dehydrogenase gewonnen, wobei wiederum NADPH/H⁺ gebildet wird. Die Acetatkonzentration wird nach Gleichung 4-4 bestimmt. Um im linearen Bereich zu liegen, müssen die Überstände der Prozessproben in VE-H₂O verdünnt werden. Die Messung des gebildeten NADPH/H⁺ erfolgte in MTP-Platten im Dreifachansatz bei 340 nm im MTP-Photometer nach dem in Tabelle 4-14 angegebenen Pipettierschema.

$$\Delta A = \left((A_2 - A_0)_{\text{Probe}} - \frac{(A_1 - A_0)_{\text{Probe}}^2}{(A_2 - A_0)_{\text{Probe}}} \right) - \left((A_2 - A_0)_{\text{Leerwert}} - \frac{(A_1 - A_0)_{\text{Leerwert}}^2}{(A_2 - A_0)_{\text{Leerwert}}} \right)$$

Tabelle 4-14: Pipettierschema des Enzymtests zur Ermittlung der Acetatkonzentration im MTP-Format.

In jede Vertiefung der MTP zugeben	Leerwert, μL	Probe, μL
Lösung 1	50	50
Lösung 2	12	12
Probe / Standard	-	20
VE-H ₂ O	78	58
Mischen, Absorption (A_0) bei 340 nm messen, Start der Reaktion durch Zugabe von:		
Enzymlösung 1 (1:20 in Lösung 1 verdünnt)	20	20
Mischen, nach 3 min Absorption (A_1) bei 340 nm messen, Start der Reaktion durch Zugabe von:		
Enzymlösung 2 (1:10 in Lösung 1 verdünnt)	20	20
Mischen, nach 20 min Absorption (A_2) bei 340 nm messen		

Quantitative Kernspinresonanzspektroskopie (¹H-qNMR)

Eine etablierte Methode zur Überprüfung der Reinheit des gekauften L-Erythrose-Standards ist die quantitative Kernspinresonanzspektroskopie (¹H-qNMR). Hierzu wurde Maleinsäure als interner Standard verwendet, von der 0,2 g in 8 mL D₂O gelöst wurden. Anschließend wurden jeweils 500 μL des internen Standards sowie der gekauften L-Erythrose-Lösung in einem NMR-Röhrchen vereint, durch Schwenken gemischt und anschließend vermessen (AV300, 300 MHz). Durch Integration der Peaks im ¹H-NMR Spektrum konnte mit Gleichung 4-5 die Reinheit überprüft werden und die Daten mit denen, die aus HPLC-Messungen stammten, verglichen werden. Diese Messungen wurden für jeden gekauften Standard durchgeführt, allerdings wurde im Prozessverlauf auf die Reinheit aus der Integration der HPLC Flächen zurückgegriffen.

$$P_{\text{Probe}} = \frac{I_{\text{Analyt}}}{I_{\text{Standard}}} \cdot \frac{N_{\text{Standard}}}{N_{\text{Analyt}}} \cdot \frac{M_{\text{Analyt}}}{M_{\text{Standard}}} \cdot \frac{m_{\text{Standard}}}{m_{\text{Analyt}}} \cdot P_{\text{Analyt}}$$

P	Reinheit, %
I	Integral des Signals
N	Zahl der Protonen
M	Molekulargewicht
m	Masse

4.5.3 Durchflusszytometrie

Qualitativ wurden sowohl wachsende Zellen während der Kultivierung als auch ruhende Zellen im Laufe der Biotransformation durch Durchflusszytometrie (Cyflow, Sysmex Partec GmbH, Görlitz, Deutschland) miteinander verglichen. Alle verwendeten Gefäße wurden mit sterilfiltriertem VE-H₂O mindestens zweimal gespült, um das Hintergrundrauschen durch Partikel zu reduzieren. Die Prozessproben wurden in 8,5 g L⁻¹ sterilfiltrierter Kochsalzlösung auf eine Partikelzahl von etwa 10⁹ mL⁻¹ verdünnt. Diesen Verdünnungen wurden jeweils 1,5 µL der auf Eis gelagerten Farbstoffe DiBAC₄(3) (0,5 mM) und RH414 (2 mM) zugesetzt. RH414 färbt hierbei selektiv die Zellmembran und dient somit zur Reduktion von Hintergrundrauschen. DiBAC₄(3) kann durch geschädigte Membranen eindringen und färbt intrazelluläre Proteine an. Die Auswertung erfolgte mit der Software FloMax.

4.5.4 Bestimmung zellspezifischer Raten

Um verschiedene Prozesse vergleichen zu können, wurden für Kultivierungen die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{max} und für die Biotransformation zellspezifische Eduktverbrauchsrate q_{Edukt} oder Produktbildungsraten q_{Produkt} herangezogen. Die maximale Wachstumsrate μ_{max} wurde durch exponentielle Regression aus der *offline* ermittelten Biotrockenmassekonzentration (vgl. Gleichung 3-4) ermittelt.

Bei einstufigen Oxidationsreaktionen wurden die volumetrischen Raten r_i durch lineare Regression des Verlaufs der Konzentrationen berechnet. Bei der zweistufigen Biotransformation wurde die maximale volumetrische Produktbildungsrate über das Differential der nicht-linearen Regression einer sigmoidalen Ausgleichsfunktion (vgl. Gleichung 4-6) der Konzentration über die Prozesszeit ermittelt. Sowohl lineare, als auch nicht-

lineare Regressionsanalysen wurden mit Matlab (The MathWorks Inc., Natick, USA) unter Verwendung der *Curve-fitting Toolbox* durchgeführt (Trust-Region Algorithmus). Die Berechnung von Standardabweichungen erfolgte über das 95 %-Konfidenzintervall, welches von Matlab ausgegeben wird. Aus den volumetrischen Raten r_i wurden unter Berücksichtigung der Biotrockenmassekonzentration nach Gleichung 3-9 die spezifischen Raten q_i ermittelt.

$$c_P = a \cdot e^{-e^{\frac{-(t-c)}{b}}} \quad 4-6$$

c_P Produktkonzentration, g L⁻¹

t Prozesszeit, h

a, b, c Regressionsfaktoren, -

5 Bereitstellung von *Gluconobacter oxydans* zur Verwendung als Ganzzellbiokatalysator

5.1 Bereitstellung im Satzverfahren

5.1.1 Wahl der Kohlenstoffquelle und der Komplexmedienbestandteile

Im Rahmen der Untersuchung verschiedener Medien wurde ausgehend vom MYP-Medium (siehe Tabelle 4-1) der Einfluss der Kohlenstoffquelle auf das Wachstum durch Zugabe von entweder 10 g L^{-1} Mannitol oder 10 g L^{-1} Fructose untersucht (Abbildung 5-1 A). Außerdem wurden bei den Untersuchungen mit 10 g L^{-1} Mannitol als Kohlenstoffquelle die Konzentrationen der Komplexbestandteile des MYP-Mediums von 5 g L^{-1} auf 3 g L^{-1} Hefeextrakt und von 3 g L^{-1} auf 1 g L^{-1} Pepton aus Casein reduziert. Darüber hinaus wurde das Wachstum im halb-definierten Medium nach Wethmar und Deckwer (1999) (siehe Tabelle 4-2) untersucht (Abbildung 5-1 B), da dieses für das Wachstum von *G. oxydans* beschrieben wurde. Dieses enthält mit $0,5 \text{ g L}^{-1}$ Hefeextrakt die geringste Konzentration komplexer Medienbestandteile, aber zusätzliche Aminosäuren (L-Glutamin und L-Serin), Vitamine (Pantothensäure, p-Aminobenzoensäure und Nikotinsäure) und Spurenelemente (FeCl_3). Abbildung 5-1 zeigt den Verlauf der Biotrockenmassekonzentrationen bei Verwendung der Medien in Schüttelkolbenexperimenten.

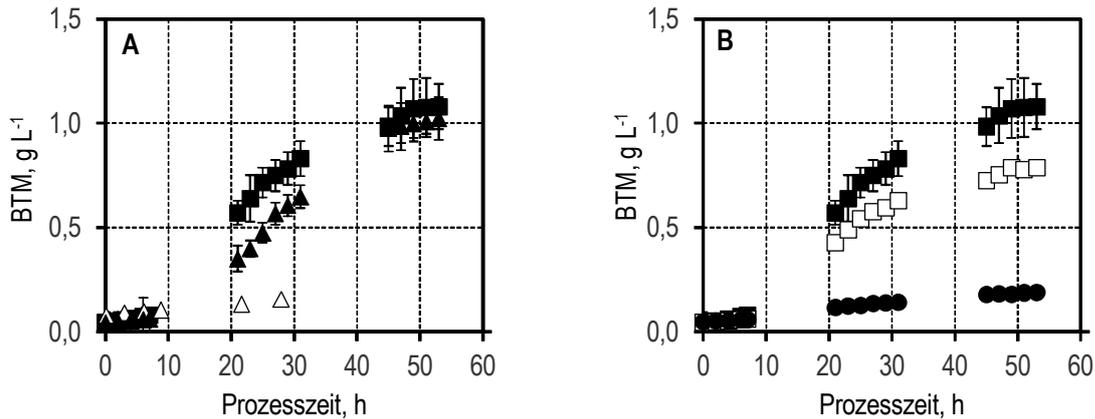


Abbildung 5-1: Zeitlicher Verlauf der Biotrockenmassekonzentration (BTM) von *G. oxydans* 621H im MYP-Medium mit 10 g L⁻¹ Mannitol (■), 10 g L⁻¹ Fructose (▲) oder ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle (Δ) (A) und bei 10 g L⁻¹ Mannitol mit reduziertem Komplexmedienbestandteil von 3 g L⁻¹ Hefeextrakt und 1 g L⁻¹ Pepton (□) sowie im halb-definierten Medium nach Wethmar und Deckwer (1999) (●) (B) (T = 30 °C; 250 rpm, Exzentrizität 5 cm, V = 50 mL, Angabe von Standardabweichungen bei drei biologischen Triplikaten).

Bei der Verwendung von Mannitol oder Fructose als Kohlenstoffquelle im MYP-Medium wurden innerhalb von 53 h Biotrockenmassekonzentrationen von $1,1 \pm 0,1$ g L⁻¹ (Mannitol als Kohlenstoffquelle) oder $1,0 \pm 0,1$ g L⁻¹ (Fructose als Kohlenstoffquelle) erzielt. Bei der Verwendung des MYP-Mediums ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle wurde mit einer Biotrockenmassekonzentration von 0,2 g L⁻¹ nach 28 h kaum Biomassezuwachs festgestellt (Abbildung 5-1 A).

Die Reduktion der Konzentration der Komplexmedienbestandteile auf ein Drittel des MYP-Mediums (von 5 g L⁻¹ auf 3 g L⁻¹ Hefeextrakt und von 3 g L⁻¹ auf 1 g L⁻¹ Pepton) führte dazu, dass nach 53 h eine Biotrockenmassekonzentration von 0,8 g L⁻¹ erzielt wurde. Im halb-definierten Medium nach Wethmar und Deckwer (1999), wurde lediglich eine Biotrockenmassekonzentration von 0,2 g L⁻¹ nach 53 h erreicht (Abbildung 5-1 B).

Diskussion

Zwischen der Verwendung von Mannitol und Fructose war ein geringer Unterschied hinsichtlich einer verlängerten Adaptionphase bei Fructose zu erkennen, jedoch wurden nach 53 h vergleichbare Biokatalysatorkonzentrationen von etwa 1 g L⁻¹ erreicht. Die Wachstumsraten innerhalb von 23 h unterschieden sich mit $0,12 \pm 0,01$ h⁻¹ (Mannitol als Kohlenstoffquelle) und $0,11 \pm 0,01$ h⁻¹ (Fructose als Kohlenstoffquelle) nicht signifikant. Die

geringere Adaptionsphase bei Mannitol ist wahrscheinlich auf die geringere Oxidationsstufe von Mannitol im Vergleich zu Fructose zurückzuführen, da der zusätzliche Oxidationsschritt Energie bereitstellt (Peters *et al.* 2013a). Die Tatsache, dass ohne Kohlenstoffquelle im Medium mit Pepton und Hefeextrakt die Biotrockenmassezunahme mit $0,2 \text{ g L}^{-1}$ nach 28 h äußerst gering war, zeigt deutlich, dass eine Kohlenstoffquelle für Wachstum benötigt wird.

Die Verringerung der Konzentrationen von Hefeextrakt und Pepton führte zu einer verlängerten Verzögerungsphase des Wachstums und zu geringerer Akkumulation von Biomasse mit $0,8 \text{ g L}^{-1}$ (anstatt $1,1 \text{ g L}^{-1}$) nach 53 h. Das ist ein Hinweis darauf, dass Komponenten des Komplexmediums im Prozessverlauf limitierend werden. Bei Verwendung des Mediums nach Wethmar und Deckwer (1999) wurde nur $0,2 \text{ g L}^{-1}$ Biotrockenmasse nach 53 h erreicht, wodurch deutlich wird, dass essentielle Wachstumsfaktoren wie Nikotin- und Pantothersäure (Gosselé *et al.* 1981), eine anorganische Stickstoffquelle in Form von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sowie Aminosäuren (L-Serin und L-Glutamin) nicht den Hefeextrakt sowie das Pepton ersetzen können.

Dies steht im Einklang mit den Erkenntnissen von Rao R. und Stokes (1952), die zeigten, dass die Stickstofflimitierung durch Zugabe von Pepton und Hefeextrakt vermieden werden muss. Das Ergebnis von Wethmar und Deckwer (1999) mit einer spezifischen Wachstumsrate von $0,24 \text{ h}^{-1}$ konnte daher nicht beobachtet werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im weiteren Verlauf auf die Nutzung von halb-definierten Medien für Wachstumsversuche verzichtet und ein Medium mit Hefeextrakt sowie Pepton verwendet.

5.1.2 Bereitstellung des Multideletionsstamms *G. oxydans* 621H BP.8 im kontrollierten Rührkesselreaktor im Satzverfahren

Zur Bereitstellung des Biokatalysators für die anschließenden Biotransformationen wurden Untersuchungen im Satzverfahren mit dem Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.8 im kontrollierten Rührkesselreaktor durchgeführt. Hierfür wurde das Medium nach Buchert *et al.* (1988) (siehe Tabelle 4-3) mit 5 g L^{-1} Hefeextrakt, 3 g L^{-1} Pepton aus Casein und Mannitol als Kohlenstoffquelle verwendet. Dabei wurde die initiale Mannitolkonzentration von 19 g L^{-1} auf bis zu 76 g L^{-1} erhöht um zu untersuchen, ob hierdurch eine Steigerung der Biokatalysatorkonzentration möglich war.

Durch Regelung der Rührerdrehzahl war es möglich den Sauerstoffpartialdruck über 20 % Luftsättigung zu halten und eine Sauerstofflimitierung zu vermeiden. Im Weiteren wurden für das Wachstum optimale Prozessbedingungen mit einer Temperatur von $30 \text{ }^\circ\text{C}$ und pH 6 eingestellt. Abbildung 5-2 zeigt die zeitlichen Verläufe der Biotrockenmasse-(BTM), Mannitol-,

Fructose- und Acetatkonzentrationen sowie den zugehörigen Sauerstoffpartialdruck, die Rührerdrehzahl und die Sauerstoffaufnahme (OUR) sowie die CO₂-Bildungsraten (CER). Bei einer initialen Mannitolkonzentration von 19 g L⁻¹ (siehe Abbildung 5-2 A; D, G, J) konnte eine Zunahme der Biotrockenmassekonzentration von 0,2 g L⁻¹ auf 2,0 g L⁻¹ nach 21 h erzielt werden. Nach kurzer Verzögerungsphase von 1 h wurde eine exponentielle Wachstumsphase über mindestens 5 h mit einer spezifischen Wachstumsrate von $0,32 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ aufrechterhalten. Der Sauerstoffpartialdruck wurde durch Erhöhung der Rührerdrehzahl auf bis zu 630 rpm während der exponentiellen Wachstumsphase auf 20 % Luftsättigung geregelt. Nach 6 h konnte ein Anstieg auf 50 % Luftsättigung bei reduzierender Rührerdrehzahl beobachtet werden. Der Sauerstoffpartialdruck verblieb bei 20 % Luftsättigung bei konstanter Rührerdrehzahl von 500 rpm bis nach 20 h ein erneuter Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks zu verzeichnen war. Gleichzeitig mit dem Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks von 20 % auf 50 % wurde die initiale Mannitolkonzentration von 19 g L⁻¹ vollständig zu Fructose umgesetzt. Nach 6 h nahm die Fructosekonzentration ab und es lag eine Konzentration von 16 g L⁻¹ nach 25,5 h vor. Wie in Abschnitt 3.1.2 erläutert, ist ein Hauptprodukt des Zentralstoffwechsels Acetat. Dieses akkumulierte bis zu einer Konzentration von 1 g L⁻¹ nach 25,5 h. Während der exponentiellen Phase ist eine Zunahme der Sauerstoffaufnahme auf 17 mM h⁻¹ nach 4,5 h zu erkennen. Die CO₂-Bildungsrate stieg ebenfalls während der exponentiellen Wachstumsphase binnen 5 h auf 4 mM h⁻¹ an, steigerte sich danach nur noch langsam bis zu 5 mM h⁻¹ und begann nach 19 h zeitgleich mit dem Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks abzufallen.

Mit einer initialen Konzentration von 50 g L⁻¹ Mannitol (siehe Abbildung 5-2, B, E, H, K) wurde eine maximale Biotrockenmassekonzentration von 2,5 g L⁻¹ nach 19 h erzielt. Die exponentielle Wachstumsphase wurde unmittelbar nach Inokulation über mindestens 5 h mit einer spezifischen Wachstumsrate von $0,28 \pm 0,09 \text{ h}^{-1}$ aufrechterhalten. Während der ersten 5 h Prozesszeit wurde der Sauerstoffpartialdruck auf 20 % Luftsättigung durch Erhöhung der Rührerdrehzahl von 500 rpm auf bis zu 796 rpm geregelt. Nach 5 h war ein Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks zu erkennen, weshalb die Rührerdrehzahl wieder auf die initiale Rührerdrehzahl von 500 rpm geregelt wurde. Somit verblieb der Sauerstoffpartialdruck nach 8 h Prozesszeit auf den minimalen 20 % Luftsättigung und stieg erst nach 19 h an. Nach 6 h wurde eine Restkonzentration von 1 g L⁻¹ Mannitol quantifiziert. Der Mannitolumsatz ging einher mit der Fructosebildung, wobei eine maximale Fructosekonzentration von 48 g L⁻¹ nach 6 h erzielt wurde. Nach 20 h nahm diese Konzentration auf 41 g L⁻¹ ab. Innerhalb der ersten 5 h war keine Acetatbildung messbar, erst ab 6 h wurde eine Konzentration von 0,2 g L⁻¹ gemessen, die auf eine Konzentration von 1,2 g L⁻¹ nach 20 h anstieg. Sowohl die Sauerstoffaufnahme als auch die CO₂-Bildungsrate stiegen innerhalb von 5 h auf

42 mM h⁻¹ bzw. 6 mM h⁻¹ an. Die Sauerstoffaufnahme rate fiel nach 5 h auf 10 mM h⁻¹ ab, wohingegen die CO₂-Bildungsrate um die 6 mM h⁻¹ verweilte und nach 21 h 5 mM h⁻¹ erreichte. Bei weiterer Steigerung der initialen Mannitolkonzentration auf 76 g L⁻¹ (siehe Abbildung 5-2, C, F, I, L) konnte eine Zunahme der Biotrockenmassekonzentration von 0.4 g L⁻¹ auf 3,8 g L⁻¹ nach 22 h erzielt werden. Ohne eine initiale Verzögerungsphase trat die exponentielle Wachstumsphase über mindestens 6 h mit einer spezifischen Wachstumsrate von $0,33 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ ein. Der Sauerstoffpartialdruck wurde durch sukzessive Erhöhung der Rührerdrehzahl auf bis zu 910 rpm während der exponentiellen Wachstumsphase auf 20 % Luftsättigung gehalten. Nach 5 h wurde ein Anstieg auf 25 % Luftsättigung beobachtet. Daher wurde die Rührerdrehzahl auf 590 rpm reduziert, welche ausreichte, um den Sauerstoffpartialdruck auf 20 % Luftsättigung zu halten. Während der ersten 7,5 h war ein vollständiger Umsatz der Mannitolkonzentration zu erkennen, wohingegen die Fructosekonzentration auf 69 g L⁻¹ nach 22 h anstieg. Die Acetatkonzentration akkumulierte bis 2,0 g L⁻¹ nach 22 h. Während der exponentiellen Wachstumsphase war eine Zunahme der Sauerstoffaufnahme rate bis zu maximal 71 mM h⁻¹ nach 4,5 h zu erkennen. Die CO₂-Bildungsrate stieg ebenfalls während der exponentiellen Wachstumsphase auf 7 mM h⁻¹ an. Mit vollständigem Umsatz des Mannitols war zunächst eine Reduktion der Sauerstoffaufnahme rate auf 22 mM h⁻¹ und ein anschließender leichter Anstieg auf 30 mM h⁻¹ zu erkennen. Die CO₂-Bildungsrate stieg auf maximal 9 mM h⁻¹ nach 13 h an. Im Anschluss war ein linearer Abfall der CO₂-Bildungsrate bis auf 3 mM h⁻¹ nach 21 h zu verzeichnen.

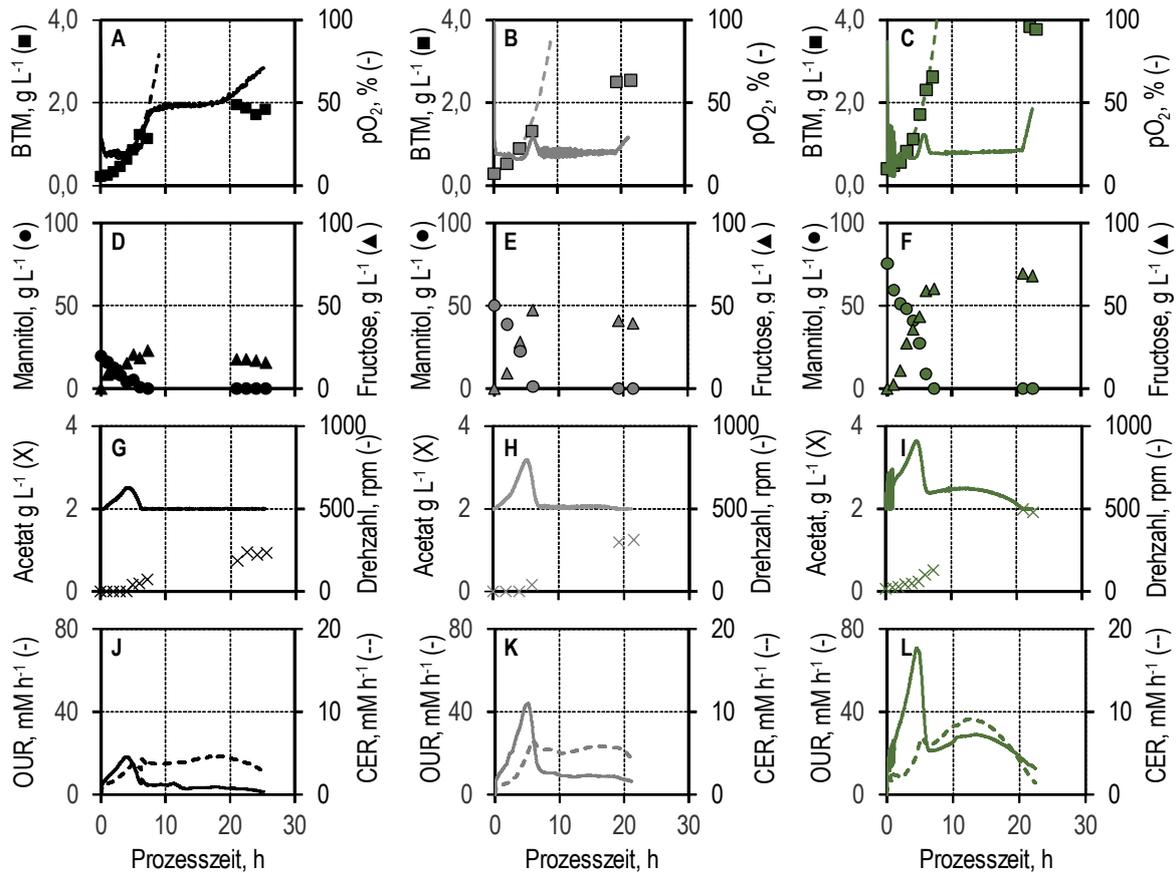


Abbildung 5-2: Bereitstellung von *G. oxydans* 621H BP.8 im Satzverfahren bei unterschiedlichen initialen Mannitolkonzentrationen von 19 g L^{-1} (schwarz), 50 g L^{-1} (grau) sowie 76 g L^{-1} (grün) im kontrollierten Rührkesselreaktor. Zeitlicher Verlauf der Biotrockenmassekonzentrationen (BTM) mit exponentieller Ausgleichsfunktion und des Sauerstoffpartialdrucks (**A / B / C**), der Mannitol- und der Fructosekonzentration (**D / E / F**), der Acetatkonzentration und der Rührerdrehzahl (**G / H / I**) sowie der Sauerstoffaufnahme- (OUR) und der CO_2 -Bildungsrate (CER) (**J / K / L**) ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6$; $P V^{-1}_{\text{max}} = 5,9 \text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, Vollmedium nach Buchert *et al.* (1988)).

Diskussion

Die Berechnung der spezifischen Wachstumsraten während der exponentiellen Wachstumsphasen zeigte im Bereich zwischen 19 g L^{-1} und 76 g L^{-1} keine signifikante Änderung. So ergaben sich spezifische Wachstumsraten von $0,32 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ ($c_{\text{Mannitol}, 0} = 19 \text{ g L}^{-1}$), $0,28 \pm 0,09 \text{ h}^{-1}$ ($c_{\text{Mannitol}, 0} = 50 \text{ g L}^{-1}$), $0,33 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ sowie $0,34 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$ ($c_{\text{Mannitol}, 0} = 58 \text{ g L}^{-1}$ – Daten nicht gezeigt). Diese liegen in einer ähnlichen Größenordnung wie die von Kiefler *et al.* (2017) bestimmte Wachstumsrate von $0,35 \text{ h}^{-1}$ mit *G. oxydans* 621H unter

Nutzung von Glucose als Kohlenstoffquelle sowie $0,39 \text{ h}^{-1}$ bei Nutzung von Mannitol als Kohlenstoffquelle (Peters *et al.* 2013b).

Der substratspezifische Biomasseertragskoeffizient lag bei der niedrigsten initialen Mannitolkonzentration von 19 g L^{-1} bei 10,4 %. Bei Erhöhung der initialen Mannitolkonzentration wurde zwar die maximale Biotrockenmassekonzentration gesteigert, aber der substratspezifische Biomasseertragskoeffizient sank auf 6,1 % ($C_{\text{Mannitol},0} = 50 \text{ g L}^{-1}$) sowie 5,5 % ($C_{\text{Mannitol},0} = 76 \text{ g L}^{-1}$) (siehe Tabelle 5-1). Diese Ergebnisse waren vergleichbar mit denen von Richhardt *et al.* (2012), die mit *G. oxydans* 621H Δ *upp* auch lediglich 6 % Biomasse bei initialen 40 g L^{-1} Mannitol erreichten. Solange Mannitol vorhanden war, fand die membranständige Oxidation von Mannitol zu Fructose durch die Polyol-Dehydrogenase statt, wodurch der eingetragene Sauerstoff verbraucht wurde. Sobald Mannitol vollständig umgesetzt war, sanken der Sauerstoffbedarf und damit die Sauerstoffaufnahme ab.

Die gebildete Fructose wiederum wird entweder in das Cytoplasma aufgenommen und dort im Wesentlichen über den Pentosephosphatweg (PPW) metabolisiert, wobei unter anderem CO_2 gebildet wird (vgl. Gleichung 3-1) oder sie wird durch ein noch nicht spezifiziertes Enzym zu Ketofructose oxidiert (Richhardt *et al.* 2012). Die Menge des gebildeten CO_2 sowie die niedrigen Acetatkonzentrationen von maximal $2,0 \text{ g L}^{-1}$ bestätigten, dass der Großteil des initialen Mannitols zu Fructose oder Ketofructose akkumulierte.

Tabelle 5-1: Zustandsgrößen der verschiedenen Satzprozesse mit variierten initialen Mannitolkonzentrationen. Maximale Biotrockenmassekonzentration $c_{X,max}$, zellspezifische Wachstumsrate μ , Biomasseertragskoeffizient $Y_{X/S}$, gebildetes CO_2 und Angabe der Kohlenstoffbilanz ($T = 30\text{ °C}$, $pH\ 6$; $P\ V^{-1}_{max} = 5,9\ W\ L^{-1}$, $F_{Luft} = 2\ vvm$, $V_R = 0,7\ L$, Vollmedium nach Buchert *et al.* (1988)).

Parameter	initiale Mannitolkonzentration $c_{S,0}$		
	19 g L ⁻¹	50 g L ⁻¹	76 g L ⁻¹
$c_{X,max},\ g\ L^{-1}$	2,0	2,5	3,8
$\mu,\ h^{-1}$	0,32 ± 0,01	0,28 ± 0,09	0,33 ± 0,02
$Y_{X/S},\ \%$	10,4	6,1	5,5
gebildetes CO_2 , mM	91	96	132
Kohlenstoffbilanz, %	111	96	105

Ein finales Produkt des cytoplasmatischen Metabolismus stellt Acetat dar, welches aus Pyruvat über Acetaldehyd gebildet wird. *Gluconobacter* ist im Gegensatz zu *Acetobacter* nicht für die Toleranz von hohen Acetatkonzentrationen bekannt. So konnten Peters *et al.* (2013a) zeigen, dass durch Deletion der Pyruvat-Decarboxylase kein Acetat mehr gebildet und eine um 1,5-fach erhöhte Biotrockenmassekonzentration erzielt wurde.

Mit erhöhter Mannitolkonzentration wurden neben höheren Biotrockenmassekonzentrationen in der stationären Phase nach 21 h auch höhere Acetatkonzentrationen von bis zu 2,0 g L⁻¹ erzielt. Dies entsprach substratspezifischen Ausbeutekoeffizienten von bis zu 4 %. Allerdings wurden noch keine inhibierenden Konzentrationen von über 8 g L⁻¹ (Poget *et al.* 1994) erreicht. Im Folgenden Abschnitt wurde untersucht, ob der Aufbau solch niedriger Biotrockenmassekonzentrationen an der Verwendung von Multideletionsstämmen lag, da bei diesen ein erheblicher Eingriff in die Atmungskette durchgeführt wurde. Daher wurde ein vergleichender Satzprozess mit dem Wildtypstamm durchgeführt.

5.1.3 Wachstumsvergleich des Multideletionsstamms mit dem Wildtypstamm

Im Folgenden wurde in einer Satzkultivierung der Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.8 mit dem Wildtypstamm *G. oxydans* 621H im kontrollierten Rührkesselreaktor verglichen. Hierfür wurde das Medium nach Buchert *et al.* (1988) verwendet. Weiterhin wurde durch Regelung der Rührerdrehzahl der Sauerstoffpartialdruck auf 20 % Luftsättigung gehalten, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Darüber hinaus wurden für das Wachstum optimale Prozessbedingungen mit einer Temperatur von 30 °C und einem pH von 6 eingestellt. Abbildung 5-3 zeigt die resultierenden Biotrockenmasse-(BTM), Mannitol-, Fructose- und Acetatkonzentrationen sowie den zugehörigen Sauerstoffpartialdruck, die Rührerdrehzahl, die Sauerstoffaufnahme (OUR) und CO₂-Bildungsraten (CER) über die Prozesszeit.

In beiden Satzprozessen wurde eine vergleichbare Mannitolkonzentration von 80 g L⁻¹ (Satzprozess mit Wildtyp *G. oxydans* 621H) und 76 g L⁻¹ (Satzprozess mit Multideletionstamm *G. oxydans* 621H BP.8) vorgelegt. Bei beiden Stämmen trat die exponentielle Wachstumsphase ohne Verzögerungsphase über mindestens 5 h mit einer spezifischen Wachstumsrate von $0,33 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ (*G. oxydans* 621H BP.8) bzw. $0,34 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ (*G. oxydans* 621H) ein. Neben den ähnlichen maximalen spezifischen Wachstumsraten wurden auch vergleichbare maximale Biotrockenmassekonzentrationen nach 22 h von 4,0 g L⁻¹ (*G. oxydans* 621H) und 3,8 g L⁻¹ (*G. oxydans* 621H BP.8) erzielt.

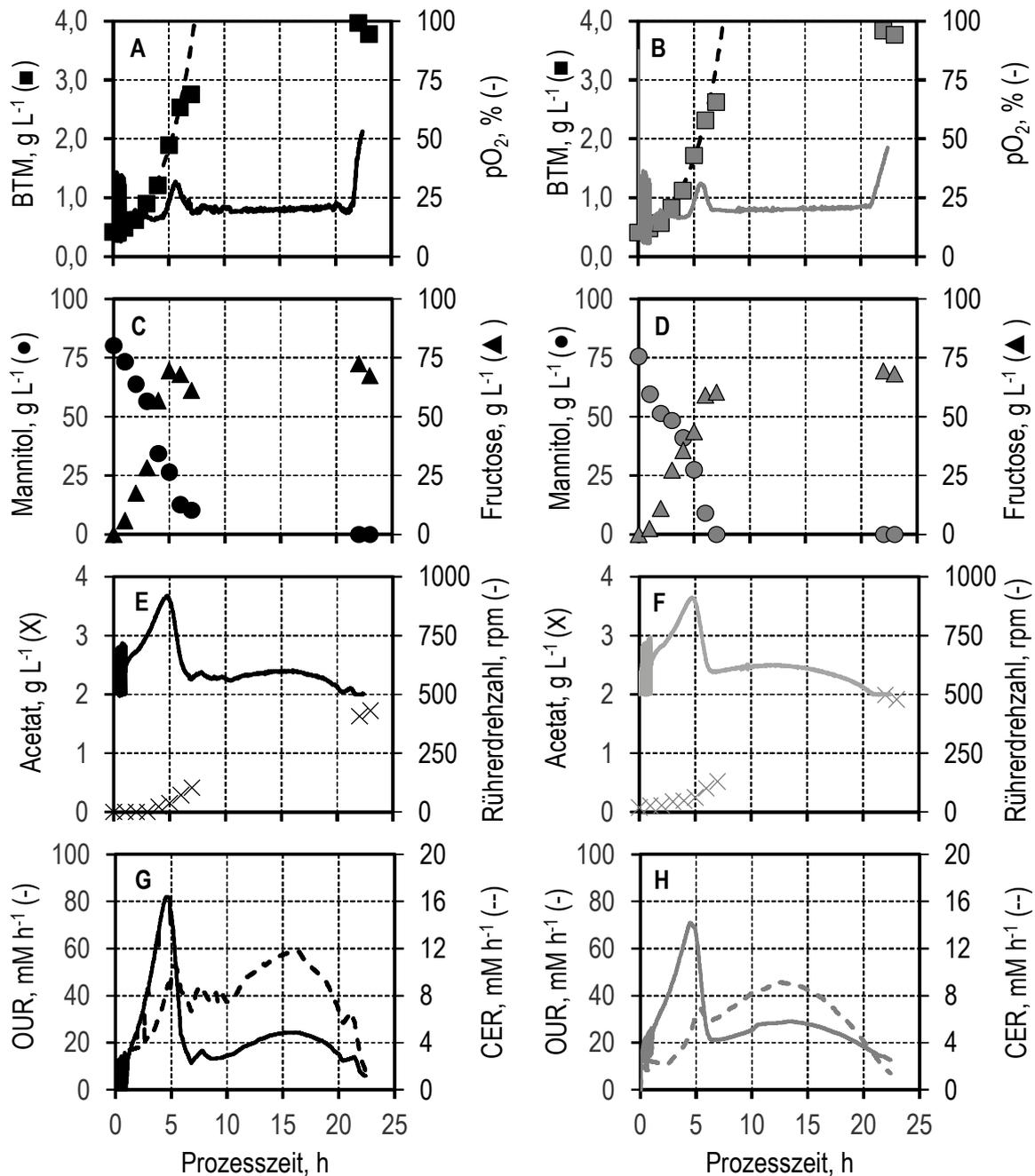


Abbildung 5-3: Vergleichende Satzkultivierung des Wildtypstamms *G. oxydans* 621H (schwarz, **A, C, E, G**) mit dem Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.8. (grau, **B, D, F, H**) im kontrollierten Rührkesselreaktor. Zeitlicher Verlauf der Biotrockenmassekonzentrationen (BTM) mit exponentieller Ausgleichsfunktion, des Sauerstoffpartialdrucks (**A / B**), der Mannitol- und der Fructosekonzentration (**C / D**), der Acetatkonzentration und der Rührerdrehzahl (**E / F**) sowie der Sauerstoffaufnahme- (OUR) und der CO₂-Bildungsrate (CER) (**G / H**) (T = 30 °C, pH 6; $P V^{-1}_{max} = 5,9 \text{ W L}^{-1}$, $F_{Luft} = 2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, Vollmedium nach Buchert *et al.* (1988) mit 75 g L^{-1} Mannitol).

In beiden Satzprozessen musste die Rührerdrehzahl während der exponentiellen Wachstumsphase sukzessive auf bis zu 900 rpm gesteigert werden, um einen minimalen Sauerstoffpartialdruck von 20 % Luftsättigung aufrechtzuerhalten. Nach 5 h wurde bei beiden Stämmen ein Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks auf 25 % Luftsättigung beobachtet. In der Folge wurde die Rührerdrehzahl auf 620 rpm geregelt, da dieser Leistungseintrag für einen minimalen Sauerstoffpartialdruck von 20 % Luftsättigung ausreichte. Mit beiden Stämmen wurde Mannitol zu Fructose umgesetzt. Nach 22 h wurden Fructosekonzentrationen von 72 g L^{-1} (*G. oxydans* 621H) bzw. 69 g L^{-1} (*G. oxydans* 621H BP.8) gemessen. Der Multideletionstamm generierte eine etwas höhere Acetatkonzentration von $2,0 \text{ g L}^{-1}$ nach 22 h. Im Gegensatz hierzu wurde beim Wildtyp nur eine Konzentration von $1,6 \text{ g L}^{-1}$ nach 22 h gemessen. Während der exponentiellen Wachstumsphase stieg die Sauerstoffaufnahme innerhalb von 5 h auf 82 mM h^{-1} (*G. oxydans* 621H) bzw. 71 mM h^{-1} (*G. oxydans* 621H BP.8) an. Mit zunehmendem Mannitolumsatz war eine Reduktion der Sauerstoffaufnahme bei beiden Stämmen zu erkennen. Die CO_2 -Bildungsrate nahm bei beiden Stämmen über die Prozesszeit zu, wobei die Zunahme während der exponentiellen Phase schneller erfolgte als nach vollständigem Mannitolumsatz. Nach einer Prozesszeit von 16 h wurde beim Wildtyp die maximale CO_2 -Bildungsrate von 12 mM h^{-1} und beim Multideletionstamm nach 13 h von 9 mM h^{-1} erreicht. Im Anschluss war bei beiden Stämmen ein schneller linearer Abfall der CO_2 -Bildungsrate zu beobachten.

Diskussion

Hinsichtlich der spezifischen Wachstumsrate während der exponentiellen Phase und der maximal erzielten Biotrockenmassekonzentration war der Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.8 ähnlich mit dem Wildtypstamm. Demzufolge war auch der substratspezifische Biomasseertragskoeffizient $Y_{X/S}$ von etwa 5 % identisch (siehe Tabelle 5-2). Dies zeigt, dass die Deletion von membranständigen Dehydrogenasen keine Auswirkung auf das Wachstum hat, sofern das Substrat für das Wachstum nicht zuvor oxidiert werden muss. Dies deckt sich mit Erkenntnissen von Peters *et al.* (2013b), der in Schüttelkolbenversuchen erst bei dem Multideletionsstamm ohne Polyol-Dehydrogenase (*G. oxydans* 621H BP.9) kein Wachstum mehr unter Verwendung von Mannitol als Kohlenstoffquelle feststellen konnte. Somit hat die Deletion einiger membranständiger Dehydrogenasen keinen negativen Einfluss auf die Atmungskette. Die für die Biomassebereitstellung benötigten Reduktionsäquivalente werden außerdem von der NADH-Dehydrogenase Typ II oxidiert. Aufgrund der hohen Fructosekonzentrationen von bis zu 70 g L^{-1} nach 22 h konnte eine Limitierung durch die Kohlenstoffquelle ausgeschlossen werden. Daher wurde vermutet, dass eine Limitierung

durch Komplexmedienbestandteile vorlag. Ein Hinweis hierfür könnte der ähnliche Verlauf mit einer abfallenden CO₂-Bildungsrate ab spätestens 15 h sein. Daher wurde im Folgenden die kontinuierliche Prozessführung mit totaler Zellrückhaltung im kontrollierten Rührkesselreaktor untersucht.

Tabelle 5-2: Zustandsgrößen der Satzprozesse mit dem Wildtypstamm *G. oxydans* 621H und dem Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.8. Maximale Biotrockenmassekonzentration $c_{X,max}$, zellspezifische Wachstumsrate μ , Biomasseertragskoeffizient $Y_{X/S}$ ($T = 30\text{ °C}$, $pH\ 6$; $P\ V^{-1}_{max} = 5,9\ W\ L^{-1}$, $F_{Luft} = 2\ vvm$, $V_R = 0,7\ L$, Vollmedium nach Buchert *et al.* (1988) mit $75\ g\ L^{-1}$ Mannitol).

Parameter	Wildtypstamm	Multideletionsstamm
$c_{X,max},\ g\ L^{-1}$	4,0	3,8
$\mu,\ h^{-1}$	$0,34 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,02$
$Y_{X/S},\ \%$	4,7	5,0

5.2 Bereitstellung von *G. oxydans* 621H BP.8 im kontinuierlichen Verfahren mit totaler Zellrückhaltung

Um die Akkumulation des inhibierenden Stoffwechselprodukts Acetat zu reduzieren wurde im Folgenden mit dem Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.8 die kontinuierliche Prozessführung im kontrollierten Rührkesselreaktor mit totaler Zellrückhaltung durchgeführt und die Auswirkung auf das Wachstum untersucht. Hierbei wurde entweder ein getauchtes (internes) Membranmodul oder ein externes Membranmodul (siehe Abschnitt 4.3.4) verwendet. Bei dem Prozess mit dem internen Hohlfasermembranmodul konnte anfänglich ein stabiler Betriebspunkt bis zu einer Durchflussrate $D = 0,16 \text{ h}^{-1}$ ($\tau = 6,25 \text{ h}$) erzielt werden (siehe Abbildung 5-4 A, B, C). Aufgrund der 8,4-fach höheren spezifischen Membranoberfläche des externen Moduls war es möglich, höhere Durchflussraten von $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ ($\tau = 5 \text{ h}$) und $D = 0,3 \text{ h}^{-1}$ ($\tau = 3,33 \text{ h}$) einzustellen, ohne dass eine Verblockung der Membran beobachtet wurde. Die Konzentration des limitierenden Substrats Mannitol betrug initial 10 g L^{-1} und 50 g L^{-1} im Zulaufmedium nach Buchert *et al.* (1988). Weiterhin wurde durch Regelung der Rührerdrehzahl der Sauerstoffpartialdruck auf einen minimalen Schwellenwert von 20 % Luftsättigung gehalten und somit eine ausreichende Sauerstoffversorgung sichergestellt. Darüber hinaus wurden für das Wachstum optimale Prozessbedingungen (siehe Abschnitt 3.1.1) mit einer Temperatur von $30 \text{ }^\circ\text{C}$ und pH 6 eingestellt. Abbildung 5-4 zeigt den zeitlichen Verlauf der Biotrockenmassekonzentrationen (BTM), der wachstumsabhängigen CO_2 -Bildungsraten (CER) sowie die Mannitol- und Acetatkonzentrationen im Reaktor bei Verwendung des internen Hohlfasermoduls (A - C) bei einer Durchflussrate von $D = 0,16 \text{ h}^{-1}$ sowie des externen Membranmoduls bei Durchflussraten von $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ (D - F) und $D = 0,3 \text{ h}^{-1}$ (G - I) in Abhängigkeit von der mittleren hydraulischen Verweilzeit (τ).

Bei Verwendung des getauchten Hohlfasermembranmoduls mit einer Durchflussrate von $D = 0,16 \text{ h}^{-1}$ wurde nach fünf hydraulischen Verweilzeiten (5τ) eine Biotrockenmassekonzentration von $8,3 \text{ g L}^{-1}$ gemessen. Während der exponentiellen Wachstumsphase wurde eine spezifische Wachstumsrate von $0,31 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ erzielt. Zugleich stieg die CO_2 -Bildungsrate an und erreichte maximal 50 mM h^{-1} nach $2,2 \tau$ (Abbildung 5-4, A - B). Ab $3,4 \tau$ waren aufgrund von Problemen mit einsetzender Membranverblockung bei der gewählten Durchflussrate Schwankungen in der CO_2 -Bildungsrate zu erkennen. Während des gesamten Prozesses war ein vollständiger Mannitolumsatz zu erkennen und es wurden $3,5 \text{ g L}^{-1}$ Acetat wachstumsassoziiert nach fünf hydraulischen Verweilzeiten (5τ) gebildet (Abbildung 5-4 C).

Bei Einsatz eines externen Membranmoduls mit einer Durchflussrate von $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ wurde nach fünf hydraulischen Verweilzeiten (5τ) eine BTM von $11,6 \text{ g L}^{-1}$ (Abbildung 5-4 D) mit einer spezifischen Wachstumsrate während der exponentiellen Wachstumsphase von $0,34 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ erreicht. Die CO_2 -Bildungsrate stieg während der 5τ auf 84 mM h^{-1} und es wurde eine Acetatkonzentration von $2,7 \text{ g L}^{-1}$ gemessen. Bei Erhöhung der Durchflussrate auf $D = 0,30 \text{ h}^{-1}$ wurde eine maximale Biotrockenmassekonzentration von $14,2 \text{ g L}^{-1}$ nach $6,2 \tau$ mit einer spezifischen Wachstumsrate von $0,35 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ erzielt. Hierbei stieg die CO_2 -Bildungsrate auf 100 mM h^{-1} . Nach drei mittleren hydraulischen Verweilzeiten von 3τ konnte kein Mannitol mehr gemessen werden, was einem vollständigen Umsatz entsprach. Eine maximale Acetatkonzentration von $2,4 \text{ g L}^{-1}$ wurde nach $6,8 \tau$ gemessen.

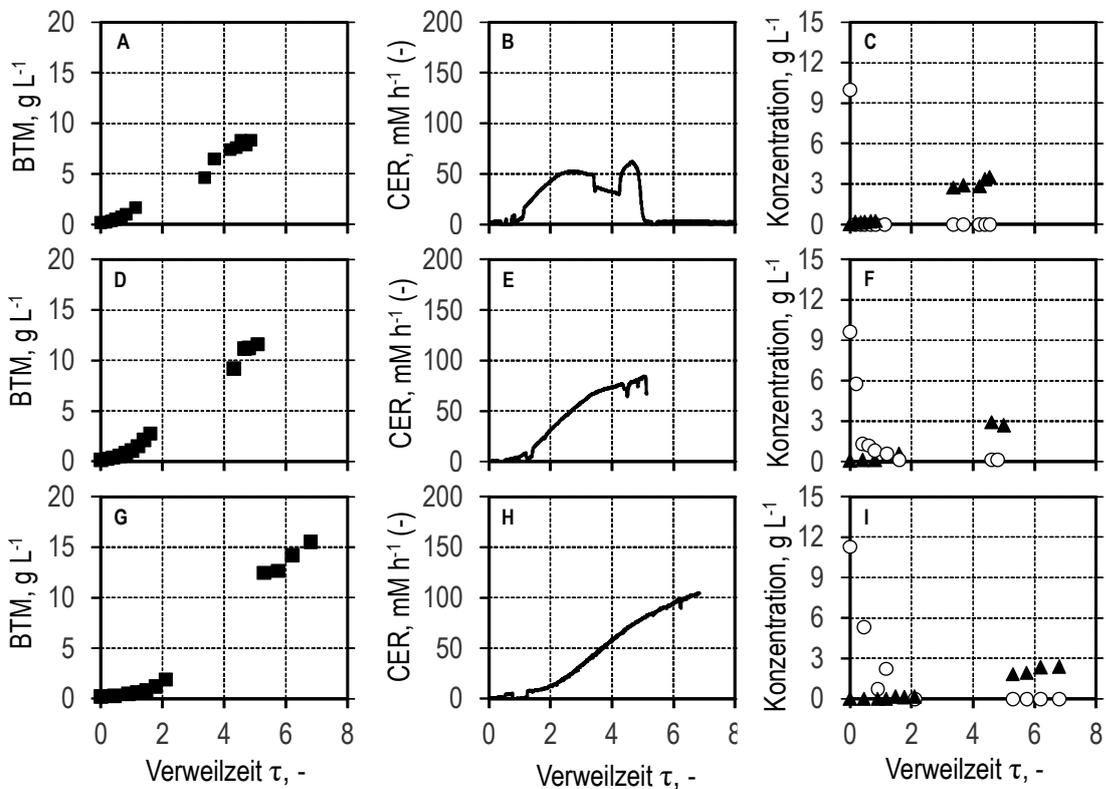


Abbildung 5-4: Kontinuierliche Zellherstellung von *G. oxydans* 621H BP.8 im Rührkesselreaktor mit totaler Zellrückhaltung mit einem internen (getauchten) Hohlfasermembranmodul (A – C) oder einem externen Querstromfiltrationsmodul (D-I) bei verschiedenen Durchflussraten von $D = 0,16 \text{ h}^{-1}$ (A - C), $D = 0,20 \text{ h}^{-1}$ (D - F) und $D = 0,30 \text{ h}^{-1}$ (G - I). A, D, G: Biotrockenmassekonzentration (BTM) (■); B, E, H: CO_2 -Bildungsrate (CER), C, F, I: Mannitol- (○) und Acetatkonzentration (▲) ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6,0$; $n = 400 - 1.050 \text{ rpm}$, $F_{\text{Luft}} = 2 \text{ vvm}$, $V_R = 1 \text{ L}$, $c_{\text{Mannitol, zu}} = 50 \text{ g L}^{-1}$).

Diskussion

Die im kontinuierlichen Betrieb erzielten spezifischen Wachstumsraten zwischen $0,31 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ ($D = 0,16 \text{ h}^{-1}$) und $0,35 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ ($D = 0,3 \text{ h}^{-1}$) waren mit den spezifischen Wachstumsraten von bis zu $0,34 \text{ h}^{-1}$ der Satzprozesse aus Abschnitt 5.1.2 vergleichbar. Die Acetatkonzentration im Reaktor nahm erwartungsgemäß mit zunehmender Durchflussrate ab, so betrug sie nach fünf hydraulischen Verweilzeiten (5τ) $3,4 \text{ g L}^{-1}$ ($D = 0,16 \text{ h}^{-1}$) $2,7 \text{ g L}^{-1}$ ($D = 0,2 \text{ h}^{-1}$) oder $1,8 \text{ g L}^{-1}$ ($D = 0,3 \text{ h}^{-1}$). Bei diesen niedrigen Konzentrationen konnte davon ausgegangen werden, dass das Acetat keine inhibierende Wirkung auf das Wachstum von *G. oxydans* hatte.

Bei der Durchflussrate von $D = 0,16 \text{ h}^{-1}$ wurde eine stationäre Biotrockenmassekonzentration von etwa 8 g L^{-1} sowie eine konstanten CO_2 -Bildungsrate von knapp 50 mM h^{-1} erreicht. Im Gegensatz hierzu wurde bei höheren Durchflussraten von $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ und $D = 0,3 \text{ h}^{-1}$ noch keine konstante CO_2 -Bildungsrate nach fünf hydraulischen Verweilzeiten (5τ) erreicht. Bei beiden Durchflussraten wurde nach fünf hydraulischen Verweilzeiten (5τ) eine vergleichbare Biotrockenmassekonzentration von $11,6 \text{ g L}^{-1}$ ($D = 0,2 \text{ h}^{-1}$) und $12,4 \text{ g L}^{-1}$ ($D = 0,3 \text{ h}^{-1}$) erzielt. Bei $D = 0,16 \text{ h}^{-1}$ wurde hingegen nur eine Biotrockenmassekonzentration von $8,3 \text{ g L}^{-1}$ nach fünf hydraulischen Verweilzeiten (5τ) erreicht. Daraus ergaben sich unter Berücksichtigung der jeweiligen Durchflussrate folgende Raum-Zeit-Ausbeuten nach Gleichung 3-30: $0,7 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($D = 0,16 \text{ h}^{-1}$), $2,3 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($D = 0,2 \text{ h}^{-1}$) sowie $3,7 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($D = 0,3 \text{ h}^{-1}$) (siehe Abbildung 5-5).

Im Reaktor war aufgrund eines minimalen Sauerstoffpartialdrucks von 20 % Luftsättigung eine ausreichende Sauerstoffversorgung sichergestellt. Im Umlauf des externen Moduls fand allerdings kein Sauerstoffeintrag statt, weshalb potentiell eine Sauerstofflimitierung auftreten kann. Durch Einstellen einer hohen Pumprate der Zirkulationspumpe wurde eine sehr geringe Verweilzeit der Suspension von maximal 6 s erreicht. Aufgrund der vergleichbaren spezifischen Wachstumsraten bei den erreichten Biotrockenmassekonzentrationen konnte eine mögliche Sauerstofflimitierung im Umlauf des Membranmoduls ausgeschlossen werden. Durch Verweilzeitentkopplung von Wachstums- und Durchflussrate konnte eine Biotrockenmassekonzentration von bis zu $12,5 \text{ g L}^{-1}$ nach fünf hydraulischen Verweilzeiten (5τ) bei einer Durchflussrate von $0,3 \text{ h}^{-1}$ erreicht werden. Die entsprechende Raum-Zeit-Ausbeute von ($3,7 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) lag nahezu mit Faktor 10 über der Raum-Zeit-Ausbeute ($0,4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) eines Zulaufverfahrens, mit welchem unter Verwendung von Sorbitol als Kohlenstoffquelle $14,1 \text{ g L}^{-1}$ *G. oxydans* DSM 2003 innerhalb von 35 h hergestellt wurden (Wei *et al.* 2009). Somit kann der kontinuierliche Prozess mit totaler Zellrückhaltung für Herstellung

des Biokatalysators genutzt werden, um eine ausreichende Biotrockenmassekonzentration bereitzustellen.

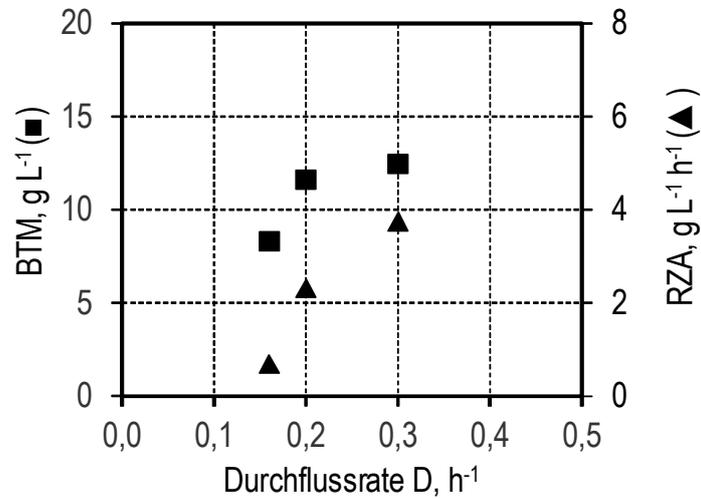


Abbildung 5-5: Die maximalen Biotrockenmassekonzentrationen BTM (■) und die Raum-Zeit-Ausbeuten der Biotrockenmasse RZA (▲) in kontinuierlichen Prozessen im Membranbioreaktor mit totaler Zellrückhaltung in Abhängigkeit von der eingestellten Durchflussrate D nach fünf hydraulischen Verweilzeiten (5τ). Verwendung eines internen Hohlfasermembranmoduls bei $D = 0,16 \text{ h}^{-1}$ und von externen Querstromfiltrationsmodulen bei $D = 0,20 \text{ h}^{-1}$ und $D = 0,30 \text{ h}^{-1}$.

6 Reaktionstechnische Charakterisierung der L-Erythrose Herstellung mit *G. oxydans*

6.1 Selektion verschiedener Multideletionsstämme

Die Expression der Polyol-Dehydrogenase erfolgte mit teilweise rekombinanten *G. oxydans* Stämmen, die vom Lehrstuhl für Mikrobiologie (Technische Universität München, Prof. Dr. Wolfgang Liebl) bereitgestellt wurden (siehe Tabelle 4-8). Hierbei erfolgte die Genexpression der Polyol-Dehydrogenase entweder plasmidbasiert (siehe Tabelle 4-9) oder chromosomal (siehe Abschnitt 4.2.1). Es wurden verschiedene Promotoren zur Expression der Polyol-Dehydrogenase in den rekombinanten Stämmen verwendet und anhand der Produktbildung die biokatalytische Leistungsfähigkeit der Multideletionsstämme untersucht. Als Referenzstämme dienten der Wildtypstamm *G. oxydans* 621H (Positivkontrolle) sowie der Multideletionsstamm ohne Polyol-Dehydrogenase *G. oxydans* 621H BP. 9 (Negativkontrolle).

6.1.1 Vergleichende Analyse im Milliliter-Maßstab

Die Biotransformationen wurden in parallelisierten, miniaturisierten Rührkesselreaktoren (siehe Abschnitt 4.3.2) in 67 mM Kaliumphosphatpuffer (Medium A siehe Tabelle 4-4) mit 10 g L^{-1} des Edukts *meso*-Erythritol durchgeführt. Im Kaliumphosphatpuffer wurde kein Wachstum von *G. oxydans* mehr beobachtet, weshalb dies als Biotransformation mit ruhenden Zellen bezeichnet wurde. Die initiale Biokatalysatorkonzentration betrug $0,25 \text{ g L}^{-1}$ und durch Einstellen der Rührerdrehzahl auf 2.200 rpm (volumetrischer Leistungseintrag von $6,5 \text{ W L}^{-1}$) wurde der Sauerstoffpartialdruck auf mindestens 20 % Luftsättigung gehalten, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Abbildung 6-1 zeigt den zeitlichen

Verlauf der resultierenden Biotrockenmasse-(BTM), *meso*-Erythritol- sowie L-Erythrosekonzentration der beiden Kontrollstämme.

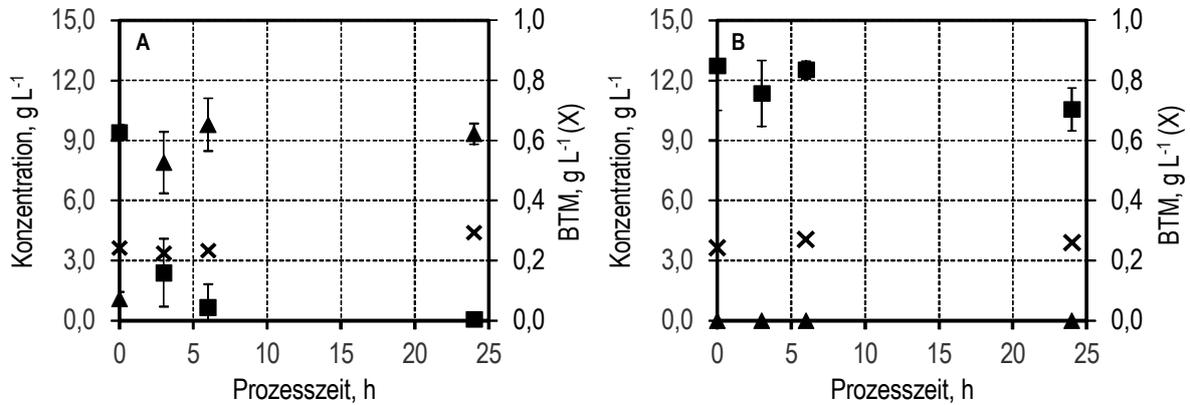


Abbildung 6-1: Oxidation von *meso*-Erythritol (■) zu L-Erythrose (▲) mit ruhenden Zellen (X) des Wildtypstamms *G. oxydans* 621H (A) und des Multideletionsstamms ohne Polyol-Dehydrogenase *G. oxydans* 621H BP.9 (B) (T = 30 °C, initialer pH 5; P V⁻¹ = 6,5 W L⁻¹, F_{Luft} = 8,3 vvm, V_R = 12 mL, n = 8 biologische Replikate für *G. oxydans* 621H und 3 biologische Replikate für *G. oxydans* 621H BP.9, 67 mM Phosphatpuffer).

Bei beiden Kontrollstämmen zeigte sich während der Biotransformation keine wesentliche Änderung der Biotrockenmassekonzentration von 0,25 g L⁻¹. Produktbildung (L-Erythrose) trat beim Wildtypstamm ohne Verzögerungsphase ein. So wurden innerhalb von 3 h bereits 7,9 ± 1,5 g L⁻¹ und nach 6 h 9,8 ± 1,3 g L⁻¹ L-Erythrose gebildet. Zu diesen Zeitpunkten wurden Eduktkonzentrationen von jeweils 2,4 ± 1,7 g L⁻¹ nach 3 h sowie 0,7 ± 1,2 g L⁻¹ nach 6 h gemessen. Nach 24 h wurde eine L-Erythrosekonzentration von 9,3 ± 0,5 g L⁻¹ bei einer verbleibenden Eduktkonzentration von 0,1 ± 0,1 g L⁻¹ gemessen. In Tabelle 6-1 sind die Produktausbeuten, Eduktumsätze sowie Selektivitäten zu den jeweiligen Prozesszeiten gezeigt. Innerhalb von 6 h wurde bereits ein nahezu vollständiger Umsatz des Edukts erzielt und aufgrund der Selektivität von >99 % fand keine Nebenproduktbildung statt. Die Betrachtung des Multideletionsstamms ohne Polyol-Dehydrogenase zeigte hingegen keinerlei L-Erythrose Bildung, allerdings waren bei *meso*-Erythritol Konzentrationsschwankungen von bis zu 17 % messbar.

Tabelle 6-1: Umsatz X , Produktausbeute $Y_{P/S}$ und Selektivität σ bei Biotransformation (Satzprozess) unter Verwendung des Wildtypstamms *G. oxydans* 621H ($T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, initialer pH 5; $P V^{-1} = 6,5\text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 8,3\text{ vvm}$, $V_R = 12\text{ mL}$, $n = 8$ biologische Replikate für *G. oxydans* 621H und 3 biologischen Replikaten für *G. oxydans* 621H BP.9, 67 mM Phosphatpuffer).

Prozesszeit, h	Umsatz X , %	Ausbeute $Y_{P/S}$, %	Selektivität σ , %
3	75 ± 18	74 ± 17	99 ± 39
6	93 ± 12	94 ± 15	101 ± 21

Anschließend wurde die Biotransformation unter identischen Bedingungen mit rekombinanten Multideletionsstämmen durchgeführt. Hierbei handelte es sich um Multideletionsstämmen von *G. oxydans* BP.9 mit einer plasmidbasierten Expression der Polyol-Dehydrogenase unter Kontrolle verschiedener Promotoren oder mit einer chromosomalen Integration der Polyol-Dehydrogenase in verschiedenen Loci. Abbildung 6-2 zeigt den zeitlichen Verlauf der *meso*-Erythritol- sowie L-Erythrosekonzentrationen.

Anhand des zeitlichen Verlaufs der Edukt- sowie der Produktkonzentrationen ist zu erkennen, dass je nach verwendetem Expressionsvektor Unterschiede auftraten. Bei einigen rekombinanten Biokatalysatoren wurden nach 6 h *meso*-Erythritolkonzentrationen zwischen $5,0\text{ g L}^{-1}$ und $6,9\text{ g L}^{-1}$ gemessen. Diese waren höher als die gemessene Eduktkonzentration nach 6 h beim Wildtypstamm mit $0,7 \pm 1,2\text{ g L}^{-1}$. Die hohen Eduktkonzentrationen traten bei rekombinanten Stämmen auf, bei denen die Expression der Polyol-Dehydrogenase unter Kontrolle des nativen Promotors (*G. oxydans* 621H BP.9 pSLDAB-*sldAB*; Abbildung 6-2 A), des Promotors der membranständigen Inositol-Dehydrogenase (pIDH; Abbildung 6-2 B) sowie des Promotors der membranständigen Sorbitol-Dehydrogenase (pSDH; Abbildung 6-2 C) erfolgte. Darüber hinaus führte auch die Expression der Polyol-Dehydrogenase 2 aus *G. oxydans* DSM3504 unter Kontrolle des Promotors der membranständigen Alkohol-Dehydrogenase von *G. oxydans* 621H zu geringen Eduktumsätzen (pADH-*sldAB*₃₅₀₄; Abbildung 6-2 D). Allerdings konnten auch rekombinante Biokatalysatoren identifiziert werden, mit denen nach 6 h lediglich *meso*-Erythritol Konzentrationen zwischen $1,0\text{ g L}^{-1}$ und $0,5\text{ g L}^{-1}$ gemessen wurden. Dies wurde mit folgenden rekombinanten Biokatalysatoren erreicht: Expressionskontrolle der Polyol-Dehydrogenase durch den Promotor der membranständigen Alkohol-Dehydrogenase (pADH; Abbildung 6-2 E), durch den ribosomalen Promotor p452 (p452; Abbildung 6-2 F), durch den Promotor des Elongationsfaktors Tu (pTufB; Abbildung 6-2 G) sowie durch den Promotor der membranständigen Gluconat-2-Dehydrogenase (pG2DH; Abbildung 6-2 H).

Neben der plasmidkontrollierten Expression der Polyol-Dehydrogenase wurden auch rekombinante Biokatalysatoren basierend auf *G. oxydans* 621H BP.9, bei denen die Gene der Polyol-Dehydrogenase ins Genom reintegriert wurden sowie der Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.8 hinsichtlich der L-Erythrosebildung untersucht. Bei Integration beider Gene der Polyol-Dehydrogenase in den Locus der membranständigen Alkohol-Dehydrogenase ($\Delta adh::sldAB$; Abbildung 6-2 I) sowie in den Locus der Gluconat-2-Dehydrogenase ($\Delta g2dh::sldAB$; Abbildung 6-2 J), wurde nach 6 h eine *meso*-Erythritol Konzentration von 3 g L^{-1} gemessen. Mit dem Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.8, bei dem die Polyol-Dehydrogenase nicht deletiert wurde, wurde nach 6 h eine *meso*-Erythritol Konzentration von $0,3 \text{ g L}^{-1}$ (Abbildung 6-2 K) gemessen. Mit dem rekombinanten Biokatalysator *G. oxydans* 621H BP.8 $Ins_{pTufB}\text{-}sldAB$, bei dem der Promotor des Elongationsfaktors TU in das Chromosom zur Expression der Polyol-Dehydrogenase integriert wurde, konnte kein *meso*-Erythritol nach 6 h nachgewiesen werden (Abbildung 6-2 L).

Die zellspezifische Produktertrag wurde zur Bewertung der biokatalytischen Effizienz der verschiedenen rekombinanten Biokatalysatoren bei der Oxidation von *meso*-Erythritol zu L-Erythrose genutzt. Aufgrund der Tatsache, dass ab 6 h teilweise ein nahezu vollständiger Eduktumsatz erfolgt war, wurden die zellspezifischen Produkterträge nach 3 h miteinander verglichen, was in Abbildung 6-3 dargestellt ist.

Mit dem Wildtypstamm wurde ein zellspezifischer Produktertrag nach 3 h von $28 \pm 6 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1}$ erzielt. Vergleichbare zellspezifische Produkterträge konnten mit diesen rekombinanten Biokatalysatorstämmen erzielt werden: pG2DH mit $35 \pm 3 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1}$, BP.8 $Ins_{pTufB}\text{-}sldAB$ mit $34 \pm 1 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1}$, p452 mit $31 \pm 1 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1}$, BP.8 mit $30 \pm 5 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1}$ und pADH mit $28 \pm 5 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1}$. Andere rekombinante Biokatalysatoren wiesen niedrigere zellspezifische Produkterträge auf. Dabei handelte es sich um pSLDAB, pIDH, pSDH, pTufB, pADH- $sldAB_{23504}$, $\Delta adh::sldAB$ und $\Delta g2dh::sldAB$.

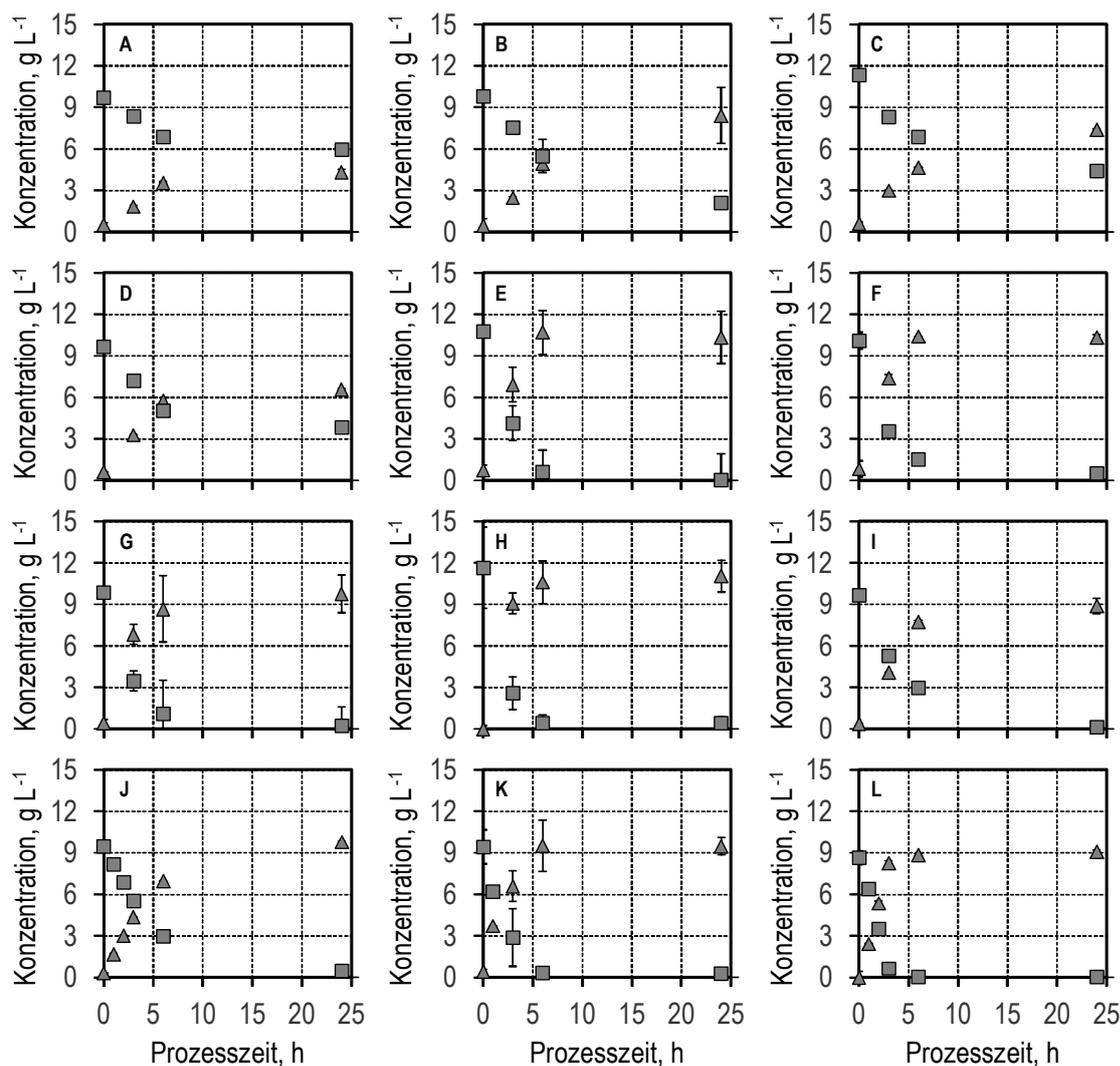


Abbildung 6-2: Oxidation von *meso*-Erythritol (■) zu L-Erythrose (▲) mit rekombinanten Biokatalysatoren: **A:** *G. oxydans* 621H BP.9 pSLDAB-*sldAB* **B:** *G. oxydans* 621H BP.9 pIDH-*sldAB*; **C:** *G. oxydans* 621H BP.9 pSDH-*sldAB*; **D:** *G. oxydans* 621H BP.9 pADH-*sldAB*₂₃₅₀₄; **E:** *G. oxydans* 621H BP.9 pADH-*sldAB*; **F:** *G. oxydans* 621H BP.9 p452-*sldAB*; **G:** *G. oxydans* 621H BP.9 pTufB-*sldAB*; **H:** *G. oxydans* 621H BP.9 pG2DH-*sldAB*; **I:** *G. oxydans* 621H BP.9 Δ *adh*::*sldAB*; **J:** *G. oxydans* 621H BP.9 Δ *g2dh*::*sldAB*; **K:** *G. oxydans* 621H BP.8 **L:** *G. oxydans* 621H BP.8 *Ins*_{pTufB}-*sldAB*. (T = 30 °C, initialer pH 5; P V⁻¹ = 6,5 W L⁻¹, F_{Luft} = 8,3 vvm, V_R = 12 mL, c_{x,0} = 0,25 g L⁻¹, 2 - 8 biologische Replikate, Medium A).

Diskussion

Anhand der zellspezifischen Produkterträge war kein systematischer Unterschied in der biokatalytischen Leistungsfähigkeit zwischen chromosomaler und plasmidbasierter Expression der Polyol-Dehydrogenase zu erkennen. Daher kann eine zu geringe Plasmidzahl ausgeschlossen werden. Die geringere Biotransformationseffizienz bei Verwendung einiger Promotoren könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Expression zu stark war, da dies zur Aggregation der Enzyme aufgrund der hydrophoben Transmembrandomänen führen kann (Wagner *et al.* 2008; Zorman *et al.* 2015).

Es wurde mit keinem rekombinanten Multideletionsstamm ein signifikant höherer zellspezifischer Produktertrag erreicht. Daher könnte die biokatalytische Aktivität durch andere Komponenten der Atmungskette limitiert sein als durch die Anzahl der Polyol-Dehydrogenasen in der Cytoplasmamembran. So könnten die prosthetische Gruppe PQQ, das Ubiquinon oder die Quinol-Oxidase limitierend wirken. Sauerstoff wurde aufgrund des ausreichenden Sauerstoffeintrags als nicht-limitierend angesehen. So vermuteten Meyer *et al.* (2013) bei der Glucoseoxidation mit einem rekombinanten Biokatalysator, in dem die membranständige Glucose-Dehydrogenase mit dem Expressionsvektor pBBR1p452 überexprimiert wurde, dass nicht die Glucose-Dehydrogenase, sondern die Quinol-Oxidase geschwindigkeitslimitierend sein könnte. Auch Yuan *et al.* (2016a) konnten die biokatalytische Effizienz bei der 5-Ketogluconatherstellung maximieren, indem sie zusätzlich zur Überexpression der Polyol-Dehydrogenase die PQQ-Biosynthese-Gene überexprimierten. Da eine plasmidbasierte Expression keine Vorteile zeigte, wurden im Folgenden pH geregelte Biotransformationen im Litermaßstab mit den Multideletionsstämmen mit chromosomaler Integration der Polyol-Dehydrogenase durchgeführt.

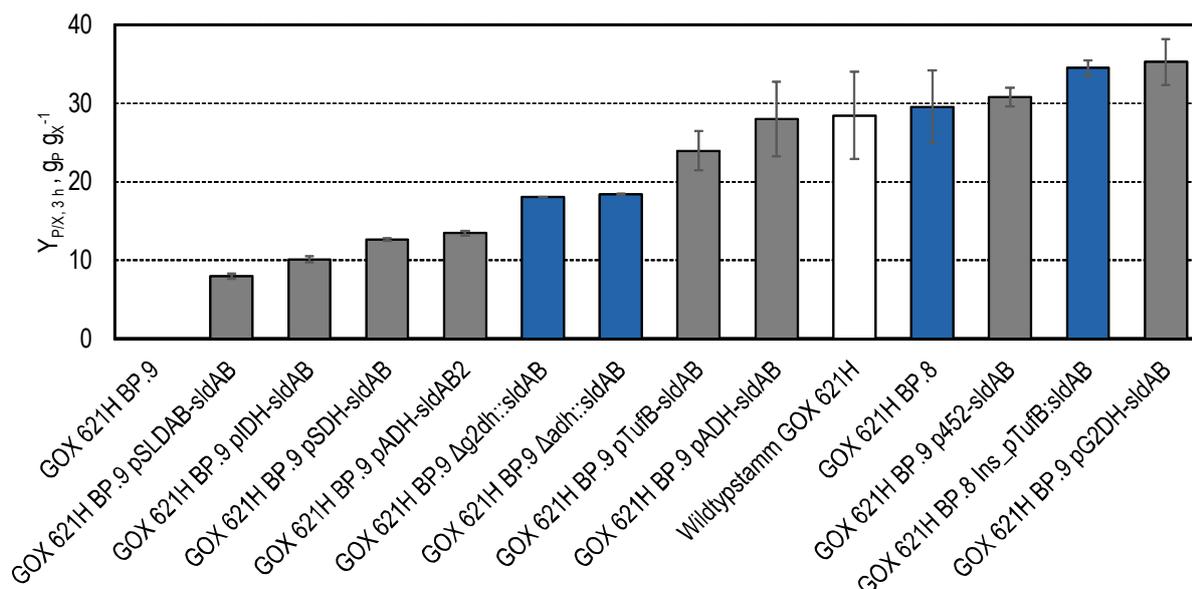


Abbildung 6-3: Zellspezifische Produkterträge nach 3 h ($Y_{PIX,3h}$) aller untersuchten Biokatalysatoren, bei denen die Gene der Polyol-Dehydrogenase entweder unter der Kontrolle verschiedener Promotoren plasmidbasiert exprimiert wurden (grau), die Gene der Polyol-Dehydrogenase im Chromosom (re-)integriert wurden (blau). Vergleichend hierzu ist der Wildtypstamm weiß dargestellt ($T = 30\text{ °C}$, initialer pH 5; $P V^{-1} = 6,5\text{ W L}^{-1}$, $F_{Luft} = 8,3\text{ vvm}$, $V_R = 12\text{ mL}$, $c_{X,0} = 0,25\text{ g L}^{-1}$, 2 - 8 biologische Replikate, 67 mM Phosphatpuffer).

6.1.2 Vergleichende Analysen im Liter-Maßstab

Es wurden pH geregelte Biotransformationen im Liter-Maßstab mit den Multideletionsstämmen mit chromosomaler Integration der Polyol-Dehydrogenase durchgeführt. Als Übertragungskriterium diente dabei die maximale Sauerstoffeintragsrate im Milliliter-Maßstab. Die maximale Sauerstoffeintragsrate im bioREACTOR 48 wurde bei einem Reaktionsvolumen von 12 mL, einer Rührerdrehzahl von 2,200 rpm, einer Begasungsrate von $0,1\text{ L min}^{-1}$ und einer Temperatur von 30 °C abgeschätzt. Basierend auf dem volumetrischen Sauerstofftransferkoeffizienten $k_{La} = 0,18\text{ s}^{-1}$ (Hortsch 2011) und der abgeschätzten Sauerstoffsättigungskonzentration von $6,8\text{ mg L}^{-1}$ (Schmideder 2016; Schumpe 1993; Weisenberger und Schumpe 1996) wurde die maximale Sauerstoffeintragsrate $OTR_{max} = 110\text{ mmol L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ abgeschätzt. Die Biotransformationen wurden in 67 mM Kaliumphosphatpuffer (siehe Medium A, Tabelle 4-4) mit einer Eduktkonzentration von 50 g L^{-1} durchgeführt. Durch Variation der Rührerdrehzahl wurde der Sauerstoffpartialdruck

auf mindestens 20 % Luftsättigung gehalten, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Abbildung 6-4 zeigt die zeitlichen Verläufe der L-Erythrosekonzentrationen.

Bei Verwendung von $0,5 \text{ g L}^{-1}$ des Wildtypstamms wurden nach 3 h $13,9 \text{ g L}^{-1}$ L-Erythrose erzielt. Mit $0,5 \text{ g L}^{-1}$ der rekombinanten Biokatalysatoren *G. oxydans* 621H BP.9 $\Delta adh::sldAB$ wurden $12,7 \text{ g L}^{-1}$ L-Erythrose und mit *G. oxydans* 621H BP.8 $Ins_{pTufB}-sldAB$ $13,1 \text{ g L}^{-1}$ L-Erythrose nach 3 h gemessen (siehe Abbildung 6-4 A). Vergleichend hierzu konnten mit dem Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.8 je nach eingesetzter Biotrockenmassenkonzentration L-Erythrosekonzentrationen zwischen $6,5 \text{ g L}^{-1}$ ($c_{X,0} = 0,3 \text{ g L}^{-1}$) und $25,3 \text{ g L}^{-1}$ ($c_{X,0} = 0,9 \text{ g L}^{-1}$) nach 3 h erzielt werden (siehe Abbildung 6-4 B).

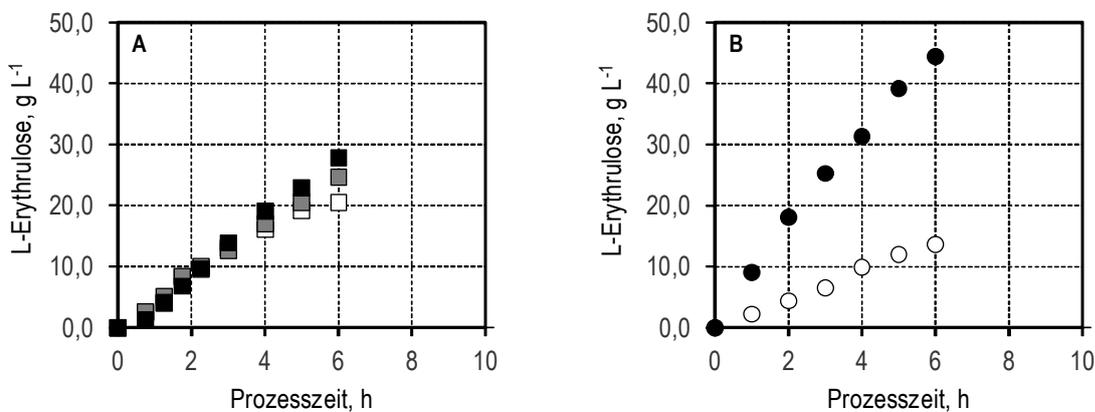


Abbildung 6-4: L-Erythrose Bildung bei pH geregelter Biotransformation im Liter-Maßstab mit Biokatalysatoren mit chromosomaler (Re-) Integration der Gene der Polyol-Dehydrogenase: *G. oxydans* 621H (■), *G. oxydans* 621H BP.9 $\Delta adh::sldAB$ (▣), *G. oxydans* 621H BP.8 $Ins_{pTufB}-sldAB$ (□) bei einer Biotrockenmassenkonzentration von $0,5 \text{ g L}^{-1}$ (A) und *G. oxydans* 621H BP.8 mit einer Biotrockenmassenkonzentrationen von $0,3 \text{ g L}^{-1}$ (○) und $0,9 \text{ g L}^{-1}$ (●) (B) ($T = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $c_{E,0} = 50 \text{ g L}^{-1}$, $\text{pH } 5$; $P V^{-1}_{\text{min}} = 11 \text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 2,8 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, Medium A).

Anhand der Produktkonzentration nach 3 h wurde der zellspezifische Produktertrag als Maß für die biokatalytische Leistungsfähigkeit abgeschätzt (siehe Abbildung 6-5 A). Für den Wildtypstamm *G. oxydans* 621H wurde ein zellspezifischer Produktertrag von $35 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1}$ ermittelt. Weiterhin wurde durch lineare Regression der initialen L-Erythrosekonzentrationen über 2 h die zellspezifische Produktbildungsrate berechnet (siehe Abbildung 6-5 B). Für den Wildtypstamm wurde eine zellspezifische Produktbildungsrate von $11,3 \pm 0,3 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ ermittelt. Für den Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.8 $Ins_{pTufB}-sldAB$ wurde ein zellspezifischer Produktertrag von $33 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1}$ sowie eine zellspezifische Produktbildungsrate von $10,8 \pm 3,1 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ ermittelt. Eine vergleichbare biokatalytische Leistungsfähigkeit zeigte

G. oxydans 621H BP.8 mit einem zellspezifischem Produktertrag von $33 \pm 1 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1}$ und einer zellspezifischen Produktbildungsrate von $10,2 \pm 0,2 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$. Für den Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.9 $\Delta\text{adh}::\text{sldAB}$ wurde ein zellspezifischer Produktertrag von $25 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1}$ sowie eine zellspezifische Produktbildungsrate von $9,7 \pm 2,7 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ ermittelt. In Abbildung 6-5 A sind zum Vergleich die zellspezifischen Produkterträge nach 3 h im Milliliter-Maßstab ohne pH-Regelung dargestellt. Außer bei der Biotransformation mit *G. oxydans* 621H BP.9 $\Delta\text{adh}::\text{sldAB}$ wurden im Rahmen der Messgenauigkeit im Milliliter-Maßstab vergleichbare zellspezifische Produkterträge nach 3 h identifiziert. Somit kann bei den entsprechenden Bedingungen binnen 3 h der Einfluss der fehlenden pH-Regelung im Milliliter-Maßstab vernachlässigt werden.

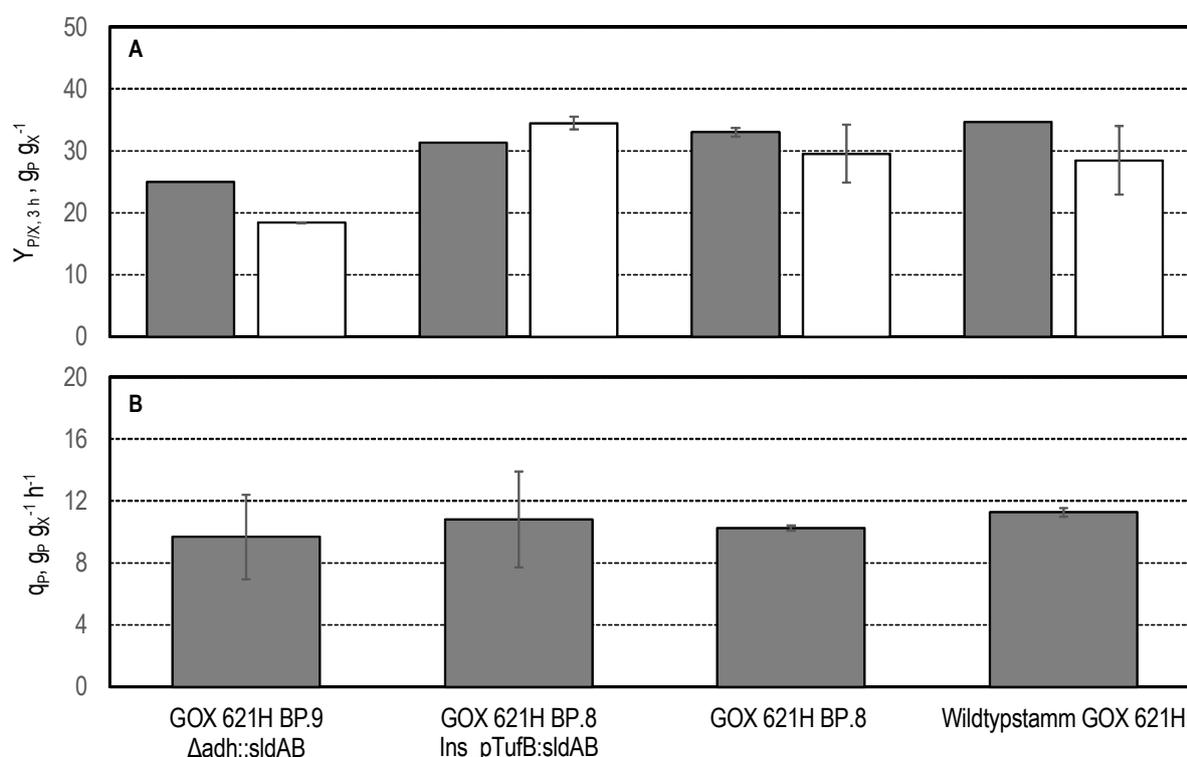


Abbildung 6-5: Zellspezifischer Produktertrag nach 3 h ($Y_{P/X,3h}$) im Liter-Maßstab (grau) und im Milliliter-Maßstab (weiß) (A) sowie die initiale zellspezifische Produktbildungsrate q_P der ersten zwei Prozessstunden (B) bei Biotransformationen im Liter-Maßstab mit unterschiedlichen Biokatalysatoren mit chromosomaler (Re-)Integration der Gene der Polyol-Dehydrogenase ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $c_{E,0} = 50 \text{ g L}^{-1}$, $\text{pH } 5$; $P V^{-1}_{\text{min}} = 11 \text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 2,8 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_{X,0} = 0,3 \text{ g L}^{-1} - 0,9 \text{ g L}^{-1}$, 67 mM Phosphatpuffer).

Diskussion

Die Skalierbarkeit von Bioprozessen zwischen Milliliter-Maßstab (bioREACTOR 48) und Liter-Maßstab mit der maximalen Sauerstofftransfertrate OTR_{max} als Kriterium zur Maßstabsübertragung zwischen konnte trotz Verwendung verschiedener Rührerkonfigurationen bereits gezeigt werden (Hoefel *et al.* 2010; Schmideder *et al.* 2015). Anhand der vergleichbaren zellspezifischen Produkterträge nach 3 h ist zu erkennen, dass trotz fehlender pH-Regelung im Milliliter-Maßstab vergleichbare Ergebnisse erzielt werden konnten. Es konnte mit keinem der rekombinanten Stämme eine signifikant höhere spezifische Produktbildungsrate im Vergleich zum Wildtypstamm nachgewiesen werden. Dies steht in Einklang mit den Erkenntnissen der Biotransformationen im Milliliter-Maßstab (siehe Abschnitt 6.1.1). Für weitere wachstumsentkoppelte Biotransformationen zur Festlegung von Standardbedingungen wurde der Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.8 verwendet.

6.2 Wachstumsentkoppelte Biotransformation im Satzverfahren

Zunächst wurde die wachstumsentkoppelte Biotransformation untersucht, da diese eine räumliche und zeitliche Trennung von Biokatalysatorbereitstellung und Biotransformation ermöglicht. Es wurde mit einer Parameterstudie zur Identifikation eines geeigneten Mediums begonnen. Anschließend wurde der Einfluss von pH, Edukt- sowie Produktkonzentration auf die Produktbildung untersucht.

6.2.1 Medienkomponenten

Das Ziel dieser Versuche war, ein Medium zu identifizieren, das auf der einen Seite eine Maximierung der spezifischen Produktbildungsrate sowie der Produktausbeute ermöglicht und auf der anderen Seite kostengünstig zusammengesetzt ist. Als Ausgangspunkt für die Medienentwicklung diente der 67 mM Phosphatpuffer (siehe Tabelle 4-4), da Mizanur *et al.* (2001) in einem ähnlichen Medium wachstumsentkoppelte Biotransformationen durchgeführt hatten. Die Biotransformation erfolgte in pH geregelten Satzprozessen im Liter-Maßstab. Die initiale Biokatalysatorkonzentration betrug $0,35 \text{ g L}^{-1}$ und der Sauerstoffpartialdruck betrug mindestens 20 % Luftsättigung, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. In Abbildung 6-6 sind die zeitlichen Verläufe der *meso*-Erythritol- sowie L-Erythrosekonzentrationen, des Sauerstoffpartialdrucks sowie der zugehörige Biotrockenmassekonzentrationen gezeigt.

Es war anhand der zeitlichen Verläufe der *meso*-Erythritol- und L-Erythrosekonzentration zu erkennen, dass die Oxidation unmittelbar startete und nach 6 h eine Konzentration von $21,5 \text{ g L}^{-1}$ L-Erythrose erzielt wurde. Zwischen 21 h und 23 h war keine Zunahme der Produktkonzentration zu erkennen, sondern diese stagnierte bei 40 g L^{-1} . Der Sauerstoffpartialdrucklag stieg ausgehend von 30 % Luftsättigung nach Start der Biotransformation sukzessive an und erreichte 58 % Luftsättigung nach 6 h und 94 % Luftsättigung nach 23 h. Durch erneute Zellzugabe nach 23 h wurde die Biotrockenmassekonzentration von $0,35 \text{ g L}^{-1}$ auf $0,54 \text{ g L}^{-1}$ erhöht, was zu einer Reduktion des Sauerstoffpartialdrucks von 94 % auf 55 % Luftsättigung führte. In der Folge war eine Zunahme der L-Erythrose Konzentration von 40 g L^{-1} auf 51 g L^{-1} nach 45 h zu erkennen. Der Sauerstoffpartialdruck stieg allerdings auch nach der erneuten Zellzugabe wieder an und erreichte nach 45 h 96 % Luftsättigung. Nach 49 h wurde eine Produktkonzentration von 52 g L^{-1} erreicht, was einer Produktausbeute von 55 % und einer Raum-Zeit-Ausbeute von $1,1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ entsprach.

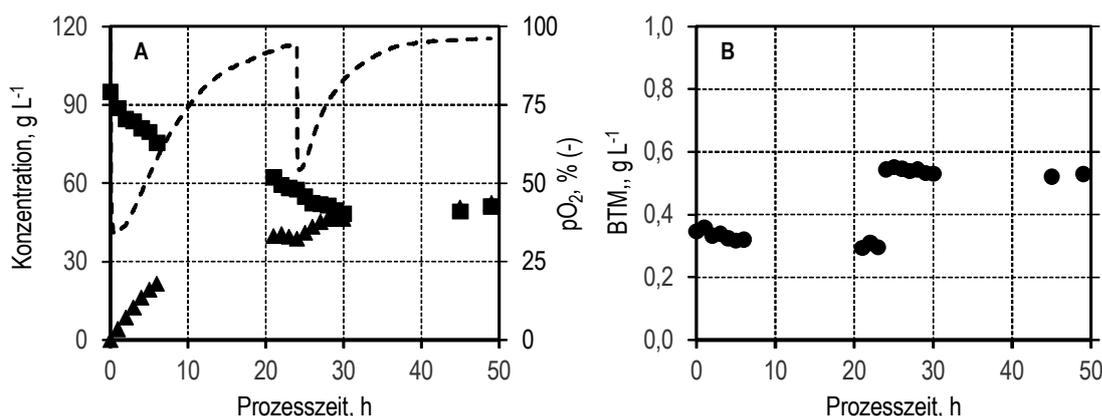


Abbildung 6-6: Zeitlicher Verlauf der Oxidation (A) von *meso*-Erythritol (■) zu L-Erythrose (▲) unter Verwendung nicht wachsender Zellen (●) in 67 mM Kaliumphosphatpuffer bei einer initialen BTM von $0,35 \text{ g L}^{-1}$ mit weiterer Biokatalysatorzugabe auf $0,54 \text{ g L}^{-1}$ nach 23 h (B) ($T = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $c_{E,0} = 90 \text{ g L}^{-1}$, $\text{pH } 5$; $P V^{-1}_{\text{min}} = 11 \text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 2,8 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_{X,0} = 0,3 \text{ g L}^{-1}$, 67 mM Phosphatpuffer, *G. oxydans* 621H BP.8).

Aufgrund des schnell ansteigenden Sauerstoffpartialdrucks wurde eine mögliche Medienlimitierung bei Verwendung des 67 mM Phosphatpuffers vermutet, die nachfolgend untersucht wurde. Daher wurde eine Biotransformation im halb-definierten Medium nach Vorlop et al. (2009) (siehe Tabelle 4-6) mit 107 g L^{-1} *meso*-Erythritol durchgeführt. Dieses Medium stellt einen Phosphatpuffer dar, der zusätzlich Spurenelemente (DSMZ-Lösung 144, siehe Tabelle A 4), Vitamine (DSMZ-Lösung 141, siehe

Tabelle A 3), Hefeextrakt ($0,25 \text{ g L}^{-1}$), eine anorganische Stickstoffquelle in Form von $1,4 \text{ g L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sowie Magnesium ($0,2 \text{ g L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$) und Calcium ($0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$) enthält. Abbildung 6-7 zeigt die zeitlichen Verläufe der resultierenden *meso*-Erythritol- sowie L-Erythrosekonzentration, des Sauerstoffpartialdrucks sowie der zugehörigen Biotrockenmassekonzentration über die Prozesszeit.

Es erfolgte ein unmittelbarer Umsatz von *meso*-Erythritol zu L-Erythrose. Nach 24,8 h wurde eine L-Erythrosekonzentration von 105 g L^{-1} erzielt, was einer Produktausbeute von 98 % bei einer Raum-Zeit-Ausbeute von $4,2 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ entspricht. Nach 24,8 h betrug die *meso*-Erythritolkonzentration $0,9 \text{ g L}^{-1}$ und ohne Nebenproduktbildung wurde eine Selektivität von 99 % erreicht. Im Vergleich zur Biotransformation im Phosphatpuffer (siehe Abbildung 6-6) konnte somit durch Medienanpassung ein vollständiger Eduktumsatz nach 24 h erzielt werden. Dies wurde auch durch den Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks deutlich, da dieser im Gegensatz zur Biotransformation im 67 mM Phosphatpuffer nicht sofort anstieg. Auch die Biotrockenmassekonzentration stieg zunächst leicht von $0,5 \text{ g L}^{-1}$ auf $0,6 \text{ g L}^{-1}$ an, was im 67 mM Phosphatpuffer nicht beobachtet wurde.

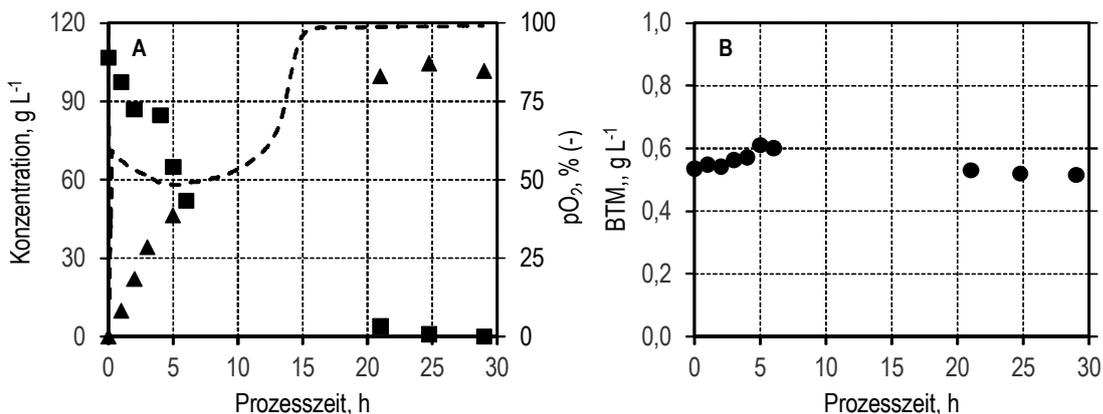


Abbildung 6-7: Oxidation von *meso*-Erythritol (■) zu L-Erythrose (▲) unter Verwendung nicht wachsender Zellen (●) im halb-definierten Mediums nach Vorlop *et al.* (2009) bei einer initialen BTM von $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $c_{E,0} = 107 \text{ g L}^{-1}$, $\text{pH } 6$; $P V^{-1}_{\text{min}} = 11 \text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 2,8 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_{X,0} = 0,5 \text{ g L}^{-1}$, *G. oxydans* 621H BP.8).

Es ist festzustellen, dass durch die Verwendung des Mediums nach Vorlop *et al.* (2009) im Gegensatz zum Phosphatpuffer die Limitierung behoben werden konnte und eine initiale Eduktkonzentration von 107 g L^{-1} vollständig innerhalb von 24,8 h umgesetzt wurde. Allerdings enthält das Medium nach Vorlop *et al.* (2009) noch Zusätze in Form von $0,25 \text{ g L}^{-1}$ Hefeextrakt sowie einer Vitamin- und Spurenelementlösung. Daher wurde im Folgenden überprüft, ob das Medium weiter um diese Bestandteile reduziert und der vollständige Eduktumsatz

aufrechterhalten werden kann. Diese Biotransformationen wurden aufgrund der gezeigten Übertragbarkeit im Milliliter-Maßstab ohne pH-Regelung durchgeführt.

Die Biotransformationen mit stufenweiser Reduktion des Mediums nach Vorlop *et al.* (2009) um die Spurenelementlösung, die Vitaminlösung sowie dem Hefeextrakt wurden mit einer initialen Biokatalysatorkonzentration von $0,5 \text{ g L}^{-1}$ bei einem initialen pH 6 durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde auch eine Biotransformation im 67 mM Phosphatpuffer bei initialem pH 6 durchgeführt. Durch eine Rührerdrehzahl von 2.200 rpm wurde der Sauerstoffpartialdruck auf mindestens 20% Luftsättigung gehalten. Abbildung 6-8 zeigt die zeitlichen Verläufe der resultierenden *meso*-Erythritol Konzentrationen.

Bei Durchführung der Biotransformation im 67 mM Phosphatpuffer wurde eine *meso*-Erythritolkonzentration von 27 g L^{-1} nach 24 h festgestellt (siehe Abbildung 6-8 (x)), sodass hierbei sondern lediglich ein Umsatz von 67% erzielt wurde. Bei Durchführung der Biotransformation im Medium nach Vorlop *et al.* (2009) ohne Spurenelemente (siehe Abbildung 6-8 (A)) sowie ohne Vitaminlösung (siehe Abbildung 6-8 (B)) wurde ein vollständiger Eduktumsatz nach 24 h erzielt. Ebenso wurde ein vollständiger Umsatz nach 24 h im Medium nach Vorlop *et al.* (2009) ohne die Spurenelemente, Vitamine und das Hefeextrakt erreicht (siehe Abbildung 6-8 (C)). Somit konnte das Medium nach Vorlop *et al.* (2009) zu einem Phosphatpuffer mit $1,4 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{SO}_4$, $0,2 \text{ g L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ und $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ (siehe Tabelle 4-5) reduziert und der vollständige Eduktumsatz aufrechterhalten werden. Dieses Medium wird im Folgenden als Medium B abgekürzt.

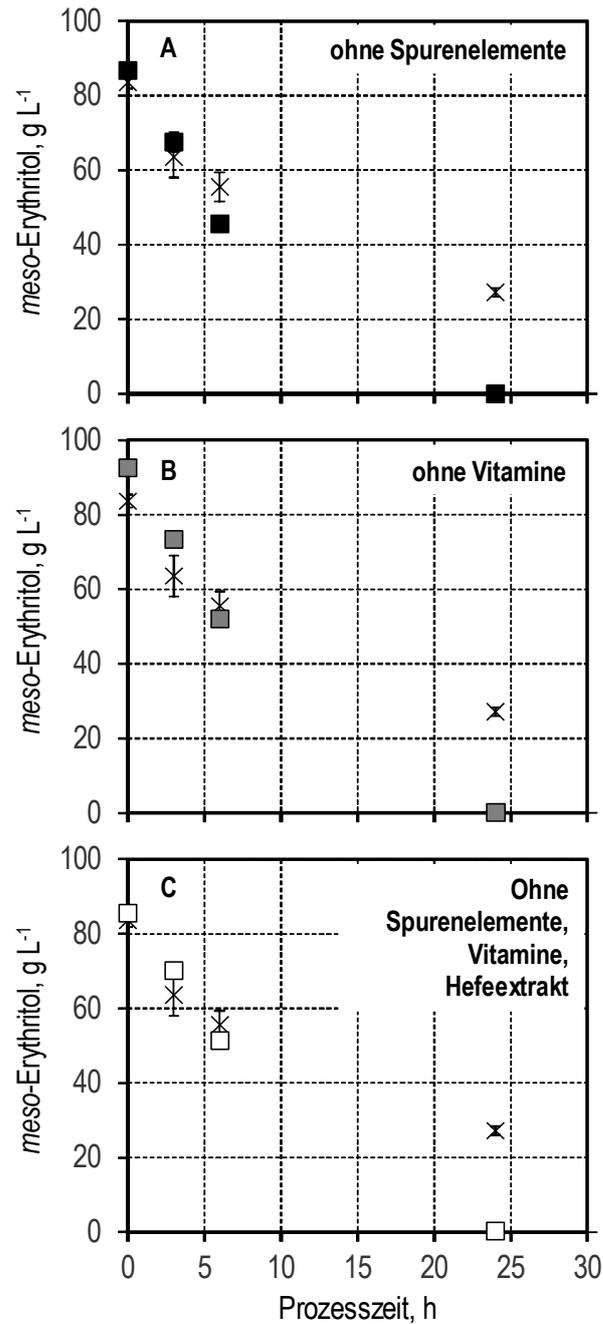


Abbildung 6-8: Verlauf der *meso*-Erythritolkonzentration bei Biotransformationen im halb-definierten Medium nach Vorlop *et al.* (2009) ohne Spurenelemente (A, ■), ohne Vitamine (B, ■) sowie ohne Spurenelemente, Vitamine und Hefeextrakt (C, □) und bei Verwendung des 67 mM Phosphatpuffers (x) ($T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, initialer pH 6; $P\text{ V}^{-1} = 6,5\text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 8,3\text{ vvm}$, $V_{\text{R}} = 12\text{ mL}$, $c_{\text{X},0} = 0,5\text{ g L}^{-1}$, drei biologische Replikate, *G. oxydans* 621H BP.8).

Abbildung 6-9 zeigt die zeitlichen Verläufe der *meso*-Erythritol- sowie L-Erythrosekonzentrationen, des Sauerstoffpartialdrucks sowie die zugehörige

Biotrockenmassekonzentrationen im Liter-Maßstab. Bei Betrachtung des Sauerstoffpartialdrucks ist zu erkennen, dass dieser nach 2,9 h einen minimalen Wert von 30 % Luftsättigung erreicht. Anschließend fand ein kontinuierlicher Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks statt, bis dieser nach 15 h 99 % Luftsättigung erreichte. Die Biotransformation erfolgte durch unmittelbare Umsetzung von *meso*-Erythritol zu L-Erythrose. Nach 21 h wurde eine L-Erythrosekonzentration von 98 g L^{-1} erreicht, was einer Produktausbeute von 99 % bei einer Raum-Zeit-Ausbeute von $4,7 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ entspricht. Die Biotrockenmassekonzentration stieg anfänglich geringfügig von $0,55 \text{ g L}^{-1}$ auf $0,65 \text{ g L}^{-1}$ innerhalb von 4 h an. Die Raum-Zeit-Ausbeute nach 21 h war identisch zu der Biotransformation bei Verwendung des nicht reduzierten Mediums nach Vorlop *et al.* (2009) mit Vitaminen, Spurenelementen und Hefeextrakt. Demzufolge war die biokatalytische Aktivität in dem reduzierten Medium reproduzierbar.

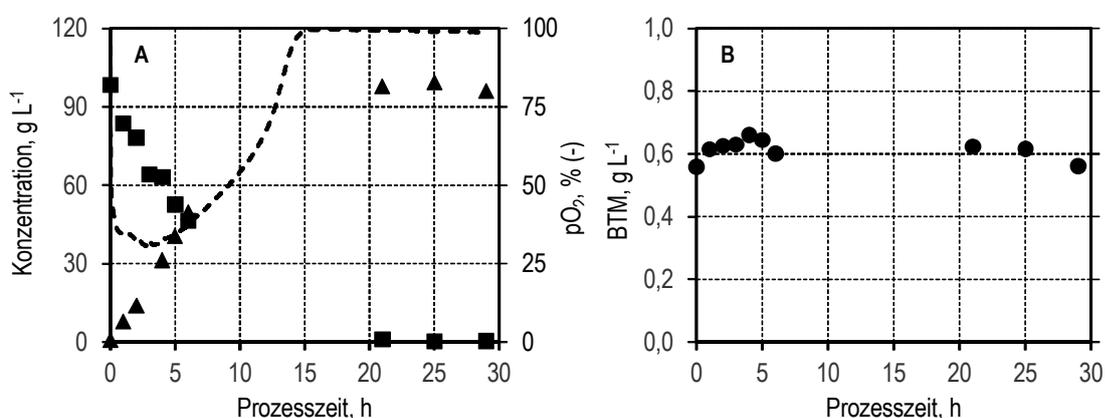


Abbildung 6-9: Oxidation von *meso*-Erythritol (■) zu L-Erythrose (▲) (A) unter Verwendung nicht wachsender Zellen (●) (B) im Medium B bei einer initialen BTM von $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ($T = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $c_{E,0} = 98 \text{ g L}^{-1}$, $\text{pH } 6,0$; $P V^{-1}_{\text{min}} = 11 \text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 2,8 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_{X,0} = 0,5 \text{ g L}^{-1}$, *G. oxydans* 621H BP.8).

Da in dem reduzierten Medium nach Vorlop *et al.* (2009) neben Kaliumphosphat noch $1,4 \text{ g L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sowie Magnesium ($0,2 \text{ g L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$) und Calcium ($0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$) enthalten sind, wurde untersucht, welcher dieser Bestandteile limitierend ist. Abbildung 6-10 zeigt die zeitlichen Verläufe der resultierenden *meso*-Erythritolkonzentrationen. Anhand der Verläufe ist zu erkennen, dass bei weiterer Reduktion des Mediums um $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nach 24 h kein Edukt mehr messbar war und daher ein vollständiger Umsatz erzielt wurde. Im Gegensatz dazu konnte bei Verwendung des Mediums ohne $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ nach 24 h noch eine *meso*-Erythritol Konzentration von $17,5 \text{ g L}^{-1}$ gemessen werden, was einem Umsatz von nur 79 % entsprach.

Bei Verwendung von Trinkwasser hingegen wurde ein vollständiger Umsatz des *meso*-Erythritols nach 24 h erzielt.

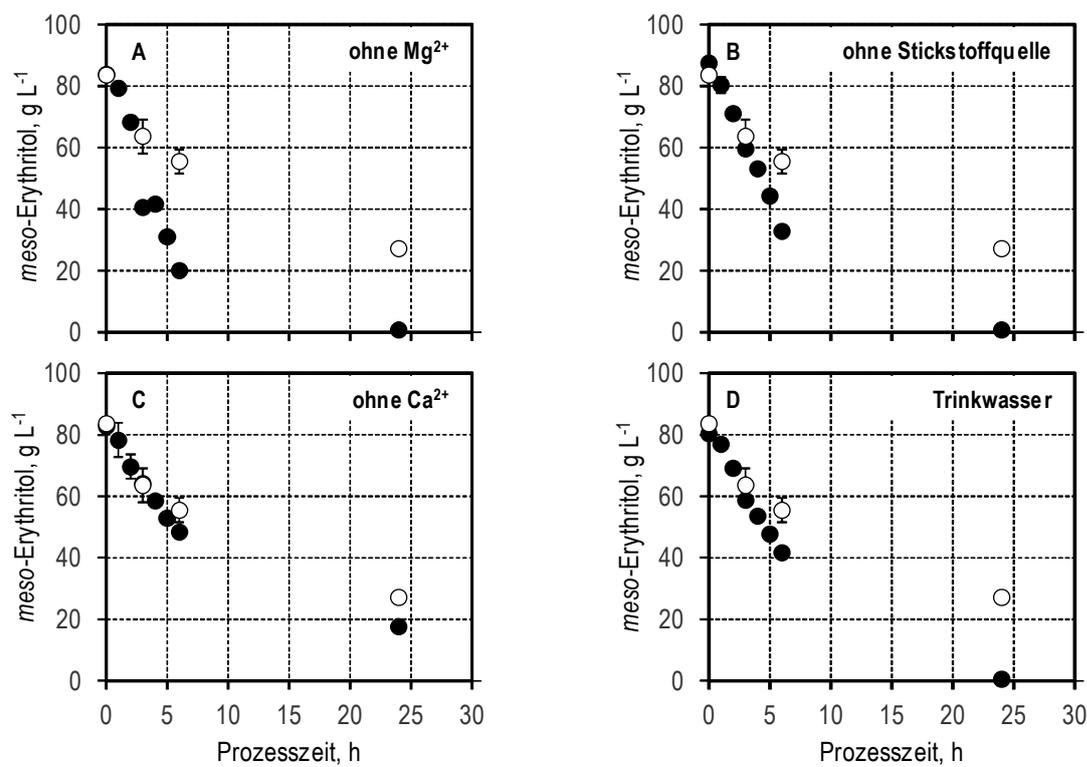


Abbildung 6-10: Verlauf der *meso*-Erythritolkonzentrationen bei Biotransformation im Medium B ohne MgSO_4 (A), ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (B) ohne CaCl_2 (C) sowie unter Verwendung von Trinkwasser (D) und bei Verwendung des 67 mM Phosphatpuffers (○) ($T = 30\text{ }^\circ\text{C}$, initialer pH 6; $P V^{-1} = 6,5\text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 8,3\text{ vvm}$, $V_R = 12\text{ mL}$, $c_{X,0} = 0,5\text{ g L}^{-1}$, drei biologische Replikate, *G. oxydans* 621H BP.8).

Diskussion

Bei Vergleich der Ergebnisse der Biotransformationen unter Verwendung verschiedener Medienkomponenten wurde deutlich, dass bei Einsatz des Phosphatpuffers ohne weitere Zusätze eine schnelle Abnahme der biokatalytischen Aktivität nach weniger als 1 h erfolgte und kein vollständiger Umsatz von 97 g L^{-1} *meso*-Erythritol möglich war. Somit war es mit ruhenden *G. oxydans* nicht wie mit *G. frateurii* IFO 3254 möglich 100 g L^{-1} *meso*-Erythritol in Kaliumphosphatpuffer nahezu vollständig umzusetzen (Mizanur *et al.* 2001).

Ca^{2+} wird für die Bindung des Apoenzyms mit der prosthetischen Gruppe PQQ benötigt und falls die Ca^{2+} Konzentration zu niedrig ist, wird die Enzymaktivität reduziert (Anthony 2004; Matsushita *et al.* 2003; Zheng und Bruce 1997). Der Umsatz nach 24 h im Medium mit Mg^{2+}

aber ohne Ca^{2+} lag mit 79 % (siehe Abbildung 6-10 C) zwischen dem vollständigen Umsatz bei Verwendung des Mediums mit Ca^{2+} aber ohne Mg^{2+} (siehe Abbildung 6-10 A) und einem Umsatz von 69 % bei Verwendung des Mediums ohne Mg^{2+} und Ca^{2+} (siehe Abbildung 6-10 (x)).

Für die Polyol-Dehydrogenase aus *G. industrius* wurde gezeigt, dass der Komplex aus Enzym und PQQ im Gegensatz zum Enzymkomplex der membranständigen Glucose-Dehydrogenase instabil ist (Ameyama *et al.* 1985). Somit ist es möglich, dass PQQ aus dem Enzym gelöst wird und nicht mehr gebunden wird. Im Münchener Trinkwasser wurde eine Calciumkonzentration von durchschnittlich $81,5 \text{ mg L}^{-1}$ gemessen (Stadtwerke München 2018). Die Calciumkonzentration von $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ in Medium B entspricht einer Calciumkonzentration von $7,4 \text{ mg L}^{-1}$. Die im Trinkwasser enthaltene Calciumkonzentration liegt damit um knapp den Faktor 11 höher als in Medium B. Dies bestätigt, dass Calcium die limitierende Komponente bei Verwendung des Phosphatpuffers darstellt. Es wurde somit ein geeignetes Medium für die wachstumsentkoppelte Biotransformation identifiziert, welches zum einen kostengünstig ist und eine effiziente Biokatalyse ermöglicht (siehe Tabelle 4-5). Medium B wurde im Folgenden – sofern nicht genannt – für wachstumsentkoppelte Biotransformationen verwendet.

6.2.2 pH

Das Ziel dieser Versuche war, einen geeigneten pH-Bereich für die Biotransformationen zu identifizieren. Hierzu wurde die Biotransformation mit einer initialen Eduktkonzentration von knapp 100 g L^{-1} bei pH 3 – pH 7 durchgeführt. Die Biotransformationen erfolgten im Milliliter-Maßstab, wobei die initiale Biokatalysatorkonzentration 2 g L^{-1} betrug. Nach 0,5 h erfolgte eine manuelle Überprüfung des pH und Titration auf die vorgegebenen Sollwerte mit 1 M KOH. Abbildung 6-11 zeigt den zeitlichen Verlauf der resultierenden *meso*-Erythritolkonzentrationen sowie den Umsatz nach 6 h.

Anhand der Verläufe der *meso*-Erythritolkonzentrationen ist zu erkennen, dass diese bei einem initialen pH zwischen 4 und 6 abnahm. Nach 6 h wurden Eduktkonzentrationen von 7 g L^{-1} (pH 4), $0,5 \text{ g L}^{-1}$ (pH 5) sowie $0,4 \text{ g L}^{-1}$ (pH 6) gemessen. Hingegen war bei pH 3 und pH 7 mit einer *meso*-Erythritolkonzentration von 78 g L^{-1} sowie 79 g L^{-1} nach 6 h nur ein geringer Umsatz der initialen 100 g L^{-1} des Edukts zu erkennen. Somit wurde nach 6 h bei pH 5 und pH 6 ein vollständiger Umsatz, bei pH 4 ein Umsatz von $93 \pm 5 \%$ erzielt, wohingegen die Umsätze bei pH 3 $15 \pm 2 \%$ und bei pH 7 lediglich $10 \pm 2 \%$ betrug. Aus diesem Grund sollten die Biotransformationen im pH-Bereich zwischen pH 5 und pH 6 durchgeführt werden.

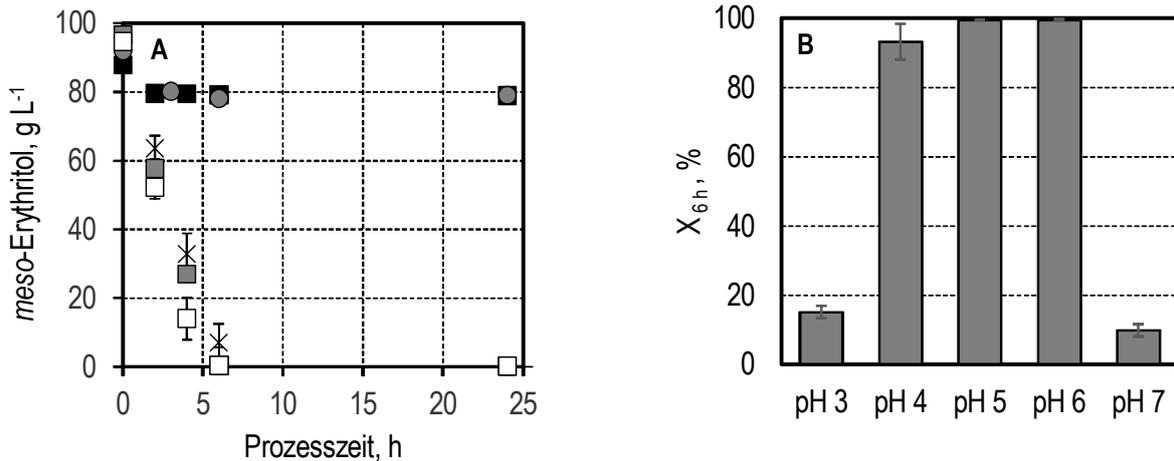


Abbildung 6-11: Verlauf der *meso*-Erythritolkonzentrationen (A) sowie der Umsatz nach 6 h (B) bei Biotransformation im Medium B bei pH 3 (●), 4 (X), 5 (■), 6 (□), 7 (■) ($T = 30\text{ °C}$; $P V^{-1} = 6,5\text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 8,3\text{ vvm}$, $V_R = 12\text{ mL}$, $c_{X,0} = 2\text{ g L}^{-1}$, drei biologische Replikate, *G. oxydans* 621H BP.8).

Diskussion

Bei Membranproteinen kann eine Änderung des pH den Protonierungszustand von Aminosäureresten am aktiven Zentrum beeinflussen, was sich wiederum negativ auf die Aktivität auswirken kann (Castiglione 2018). Zudem ist in Abhängigkeit des pK_S des Edukts, je nach vorhandenem pH eine Änderung des Protonierungszustandes zu erwarten, was dazu führen kann, dass das Edukt nicht mehr umgesetzt wird, was allerdings bei *meso*-Erythritol als Substrat keine Rolle spielt.

Bei den Versuchen unter Verwendung ganzer Zellen wurde der höchste Eduktumsatz zwischen pH 5 und pH 6 erzielt. In der Literatur wurde bei Verwendung der isolierten Sorbitol-Dehydrogenase aus *G. oxydans* IFO3255 zur Oxidation von Sorbitol ein Aktivitätsoptimum bei pH 6 beschrieben. Allerdings erfolgte im sauren Bereich eine Aktivitätsabnahme, wohingegen bei pH 7 noch eine Aktivität von 40 % messbar war (Sugisawa und Hoshino 2002). Somit konnte bei Verwendung ganzer Zellen eine Verschiebung des optimalen pH-Bereichs ins saure Milieu festgestellt werden. Dies könnte auf die Cofaktorregenerierung über die Atmungskette zurückzuführen sein, die aufgrund der Präferenz von *G. oxydans* für das saure Milieu bei einem leicht sauren pH stattfinden muss (Deppenmeier und Ehrenreich 2009; Gupta *et al.* 2001).

Der ermittelte pH Bereich zwischen pH 5 und pH 6 ist somit ähnlich zu L-Erythroseherstellungsprozessen mit wachsenden Zellen, die bei pH 6,0 - 6,2 (Pan *et al.*

2016; Vorlop *et al.* 2009) pH 5 (Moonmangmee *et al.* 2002) beschrieben wurden. Prozesse zur Ermittlung der biokatalytischen Leistungsfähigkeit hinsichtlich der maximalen Produktkonzentration und Raum-Zeit-Ausbeute wurden im Folgenden bei pH 6 durchgeführt.

6.2.3 Biokatalysatorkonzentration

Das Ziel dieser Versuche war die Überprüfung der Abhängigkeit der Produktbildungsrate von der Biokatalysatorkonzentration bei maximaler Sauerstoffeintragsrate OTR_{max} von 110 mM h^{-1} . Hierzu wurde die Biotransformation mit einer initialen Eduktkonzentration von knapp 90 g L^{-1} bei verschiedenen Biokatalysatorkonzentrationen zwischen $0,2 \text{ g L}^{-1}$ und $2,7 \text{ g L}^{-1}$ in Satzprozessen im Liter-Maßstab durchgeführt. Sofern möglich, wurde der Sauerstoffpartialdruck durch Variation der Rührerdrehzahl ($n = 500 - 1200 \text{ rpm}$) auf mindestens 20 % Luftsättigung geregelt, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Darüber hinaus wurden für die Biotransformation optimale Bedingungen mit einer Temperatur von 30 °C und einem pH auf 6 eingestellt. Abbildung 6-12 zeigt die zeitlichen Verläufe der resultierenden *meso*-Erythritolkonzentrationen, des Sauerstoffpartialdrucks sowie der zugehörigen Sauerstoffaufnahmeleistungen.

Erwartungsgemäß erfolgte die Abnahme der *meso*-Erythritolkonzentration schneller mit ansteigender Biotrockenmassekonzentration. Der Zeitpunkt, bei dem die Sauerstoffaufnahmeleistung einen Wert nahe Null sowie der Sauerstoffpartialdruck einen Wert über 90 % Luftsättigung erreichte, entsprach dem Zeitpunkt des vollständigen Substratumsatzes. So fand bei Einsatz von $0,2 \text{ g L}^{-1}$ Biotrockenmassekonzentration innerhalb von 21 h kein vollständiger Umsatz der initialen 89 g L^{-1} *meso*-Erythritol statt. Durch Erhöhung der Biotrockenmassekonzentration auf $0,45 \text{ g L}^{-1}$ konnte nach 19,5 h ein vollständiger Umsatz des Edukts erzielt werden. Durch weitere Steigerungen war es möglich, die Prozesszeiten zu verkürzen: $14,8 \text{ h}$ ($c_{x,0} = 0,8 \text{ g L}^{-1}$), $9,1 \text{ h}$ ($c_{x,0} = 1,2 \text{ g L}^{-1}$), $5,8 \text{ h}$ ($c_{x,0} = 2,1 \text{ g L}^{-1}$) und $4,2 \text{ h}$ ($c_{x,0} = 2,7 \text{ g L}^{-1}$). Mit diesen Prozesszeiten und der Produktausbeute von 99 % konnte die Raum-Zeit-Ausbeute in Abhängigkeit von der eingesetzten Biotrockenmassekonzentration berechnet werden (siehe Abbildung 6-13). Bei Betrachtung der Sauerstoffaufnahmeleistung ist zu erkennen, dass diese bei Biotrockenmassekonzentrationen zwischen $0,2 \text{ g L}^{-1}$ und $1,2 \text{ g L}^{-1}$ zunächst auf eine maximale Rate anstieg und anschließend abflachte. Bei einer initialen Biokatalysatorkonzentration von $2,1 \text{ g L}^{-1}$ wurde die maximale Sauerstoffaufnahmeleistung von 99 mM h^{-1} nach 1,8 h erreicht und fiel dann innerhalb etwa 3 h kontinuierlich ab. Bei weiterer Steigerung der Biotrockenmassekonzentration auf $2,7 \text{ g L}^{-1}$ wurde die maximale Sauerstoffaufnahmeleistung von 109 mM h^{-1} nach 1 h erreicht, ehe sie nach 2,5 h schnell binnen 1 h abfiel. Darüber hinaus konnte bei einer Biotrockenmassekonzentration von $2,7 \text{ g L}^{-1}$

lediglich ein Sauerstoffpartialdruck mit maximaler Röhrehzahl ($n = 1200 \text{ rpm}$) von 2 % während der ersten 2,5 h der Oxidation aufrechterhalten werden, wohingegen bei den geringeren Biokatalysatorkonzentrationen ein Sauerstoffpartialdruck von 20 % gehalten werden konnte.

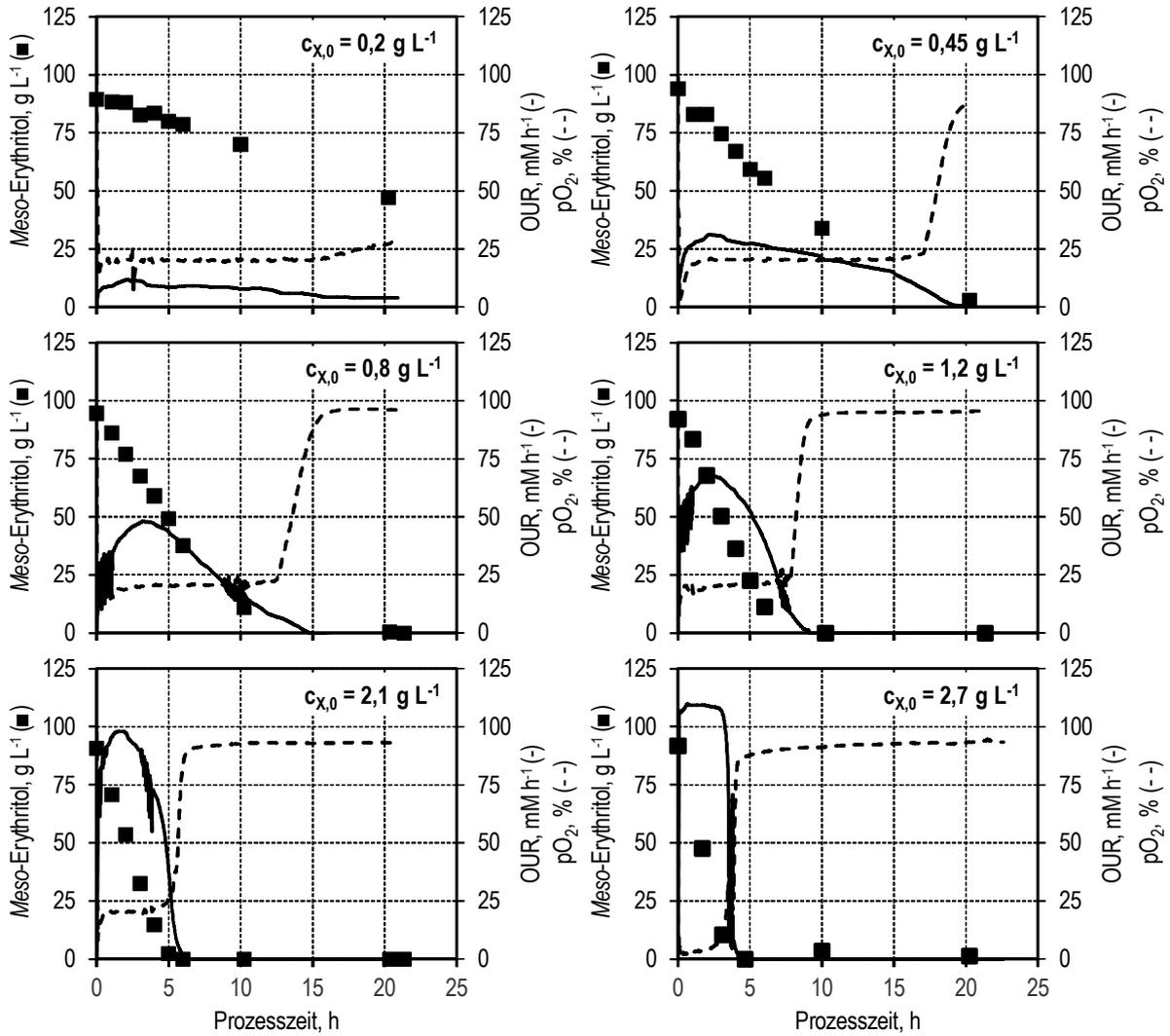


Abbildung 6-12: Verlauf der *meso*-Erythritolkonzentrationen, des Sauerstoffpartialdrucks sowie der Sauerstoffaufnahme rate (OUR) bei verschiedenen Biotrockenmassekonzentrationen zwischen $0,2 \text{ g L}^{-1}$ und $2,7 \text{ g L}^{-1}$ ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $c_{E,0} = 90 \text{ g L}^{-1}$, $\text{pH } 6$; $P V^{-1}_{\text{max}} = 12 \text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, *G. oxydans* 621H BP.8, Medium B).

Mit einer Biokatalysatorkonzentration von $0,2 \text{ g L}^{-1}$ wurde lediglich eine Raum-Zeit-Ausbeute von $2,5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erzielt, wohingegen durch Steigerung der Biokatalysatorkonzentration die Raum-Zeit-Ausbeute deutlich erhöht wurde. So wurden Werte von $4,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($c_{X,0} = 0,45 \text{ g L}^{-1}$), $6,3 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($c_{X,0} = 0,8 \text{ g L}^{-1}$), $10,0 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($c_{X,0} = 1,2 \text{ g L}^{-1}$),

15,5 g L⁻¹ h⁻¹ ($c_{X,0} = 2,1$ g L⁻¹) sowie 21,7 g L⁻¹ h⁻¹ ($c_{X,0} = 2,7$ g L⁻¹) erreicht. Neben der Raum-Zeit-Ausbeute wurde durch lineare Regression des Verlaufs der initialen Eduktkonzentration die spezifische *meso*-Erythritolverbrauchsrate berechnet, welche aufgrund der Selektivität von > 99 % als äquivalent zur spezifischen Produktbildungsrate angesehen werden kann. Die spezifische *meso*-Erythritolverbrauchsrate lag bei einer Biotrockenmassekonzentration von 0,2 g L⁻¹ bei $9,5 \pm 2,4$ g_E g_X⁻¹ h⁻¹ und bei der höchsten Biotrockenmassekonzentration von 2,7 g L⁻¹ bei $9,7 \pm 0,3$ g_E g_X⁻¹ h⁻¹. Für die Biotrockenmassekonzentrationen zwischen 0,2 g L⁻¹ und 2,7 g L⁻¹ wurden spezifische *meso*-Erythritolverbrauchsrate von $14,7 \pm 1,7$ g_E g_X⁻¹ h⁻¹ ($c_{X,0} = 0,45$ g L⁻¹), $11,3 \pm 0,2$ g_E g_X⁻¹ h⁻¹ ($c_{X,0} = 0,8$ g L⁻¹), $12,1 \pm 0,7$ g_E g_X⁻¹ h⁻¹ ($c_{X,0} = 1,2$ g L⁻¹) sowie $9,1 \pm 0,2$ g_E g_X⁻¹ h⁻¹ ($c_{X,0} = 2,1$ g L⁻¹) berechnet (siehe Abbildung 6-13).

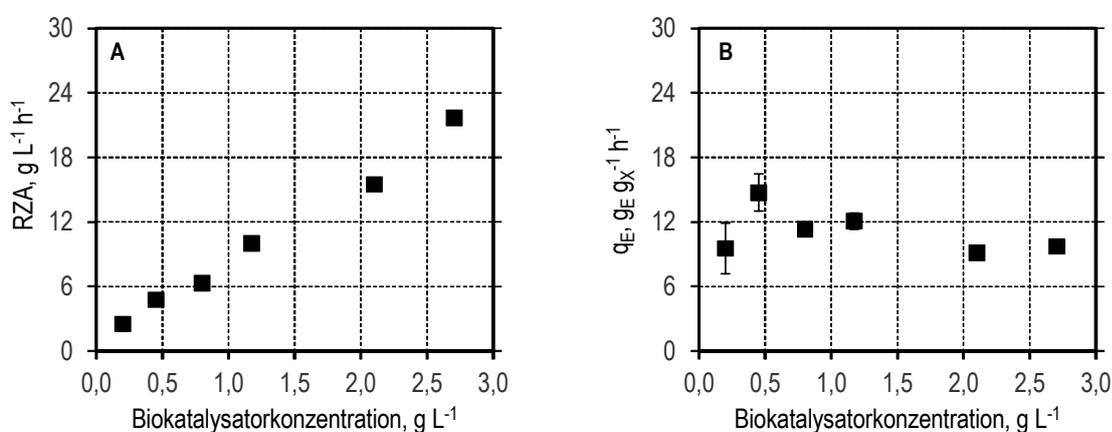


Abbildung 6-13: Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) (A) und spezifische *meso*-Erythritolverbrauchsrate (B) in Abhängigkeit von der eingesetzten Biokatalysatorkonzentration bei Biotransformationen mit ruhenden Zellen ($T = 30$ °C, $c_{E,0} = 90$ g L⁻¹, pH 6; $P V_{\max}^{-1} = 12$ W L⁻¹, $F_{\text{Luft}} = 2$ vvm, $V_R = 0,7$ L, *G. oxydans* 621H BP.8).

Diskussion

Eine Erhöhung der Biokatalysatorkonzentration führte wie erwartet zur Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute. So wurde durch die Erhöhung der Biokatalysatorkonzentration von 0,2 g L⁻¹ auf 2,7 g L⁻¹ eine achtfache Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute auf knapp 22 g L⁻¹ h⁻¹ ermöglicht. Unter den gewählten Bedingungen wurde ein linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten Biokatalysatorkonzentration und der Raum-Zeit-Ausbeute beobachtet, weshalb trotz des geringen Sauerstoffpartialdrucks von 2 % Luftsättigung bei einer Biokatalysatorkonzentration $c_X = 2,7$ g L⁻¹ noch keine Sauerstofflimitierung festzustellen war.

Eine beliebige Steigerung der verwendeten Biokatalysatorkonzentration ist in dem verwendeten Reaktionssystem nicht sinnvoll, da trotz maximalem Sauerstoffeintrag bereits bei $2,7 \text{ g L}^{-1}$ Biokatalysator die Gelöstsauerstoffkonzentration bei knapp 2 % Luftsättigung lag. Für Wachstumsversuche ist in der Literatur ein minimaler Sauerstoffpartialdruck von 15 % Luftsättigung für *G. oxydans* beschrieben, da bei geringeren Sauerstoffkonzentrationen erhebliche Änderungen im Transkriptom erkannt wurden. Dabei wurde gezeigt, dass der mRNA-Gehalt der Quinol-Oxidase sowie der Alkohol-Dehydrogenase bei sauerstofflimitierenden Bedingungen (Sauerstoffpartialdruck von 0 % Luftsättigung) erhöht war (Hanke *et al.* 2012). Daher kann vermutet werden, dass diese metabolische Reaktion von *G. oxydans* auf eine Sauerstofflimitierung zu einer verstärkten Expression der Quinol-Oxidase und der Polyol-Dehydrogenase führte. Somit konnte die spezifische Eduktverbrauchsrate trotz eines Sauerstoffpartialdrucks von 2 % noch aufrechterhalten werden.

Eine weitere Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeuten könnte durch Verwenden eines alternativen Reaktorsystems erreicht werden. So könnte beispielsweise der Rührkesselreaktor mit einer erhöhten Sauerstoffkonzentration begast werden oder ein erhöhter Systemdruck verwendet werden um die Sauerstoffeintragsrate zu steigern.

6.2.4 Eduktkonzentration

In diesem Abschnitt wird der Einfluss des Edukts *meso*-Erythritol auf die Biotransformation hinsichtlich einer möglichen Substratüberschussinhibierung untersucht. Des Weiteren sollte die maximale Eduktkonzentration bestimmt werden, bei der ein vollständiger Umsatz zu L-Erythrose erzielt werden kann. Hierbei die zuvor maximal ermittelte Biotrockenmassekonzentration von knapp 3 g L^{-1} , bei welcher bereits die maximale Sauerstoffeintragsrate ausgeschöpft wurde, nicht überschritten. Die initiale *meso*-Erythritolkonzentration wurde von 10 g L^{-1} bis an die Löslichkeitsgrenze des Edukts im Medium B von 350 g L^{-1} variiert. Die Biotransformationen erfolgten in pH geregelten Satzprozessen im Liter-Maßstab. Abbildung 6-14 zeigt die zeitlichen Verläufe der resultierenden *meso*-Erythritolkonzentrationen bei initialen Konzentrationen unter 80 g L^{-1} .

Anhand der zeitlichen Verläufe der *meso*-Erythritolkonzentrationen ist zu erkennen, dass das Edukt in allen Biotransformationen unmittelbar umgesetzt wurde. Außer bei der Biotransformation mit der initialen *meso*-Erythritolkonzentration von 51 g L^{-1} wurde immer ein vollständiger Umsatz erzielt. Bei diesem Versuch traten Probleme mit der Gaszufuhr auf, weshalb der Versuch nach 5 h abgebrochen werden musste. Allerdings konnte er dennoch zur Berechnung der spezifischen initialen Eduktverbrauchsrate herangezogen werden. Hierfür wurden die volumetrischen Eduktverbrauchsrate durch lineare Regression des Verlaufs der

meso-Erythritol Konzentrationen innerhalb der ersten 2 h ermittelt und durch die Biotrockenmassekonzentration dividiert.

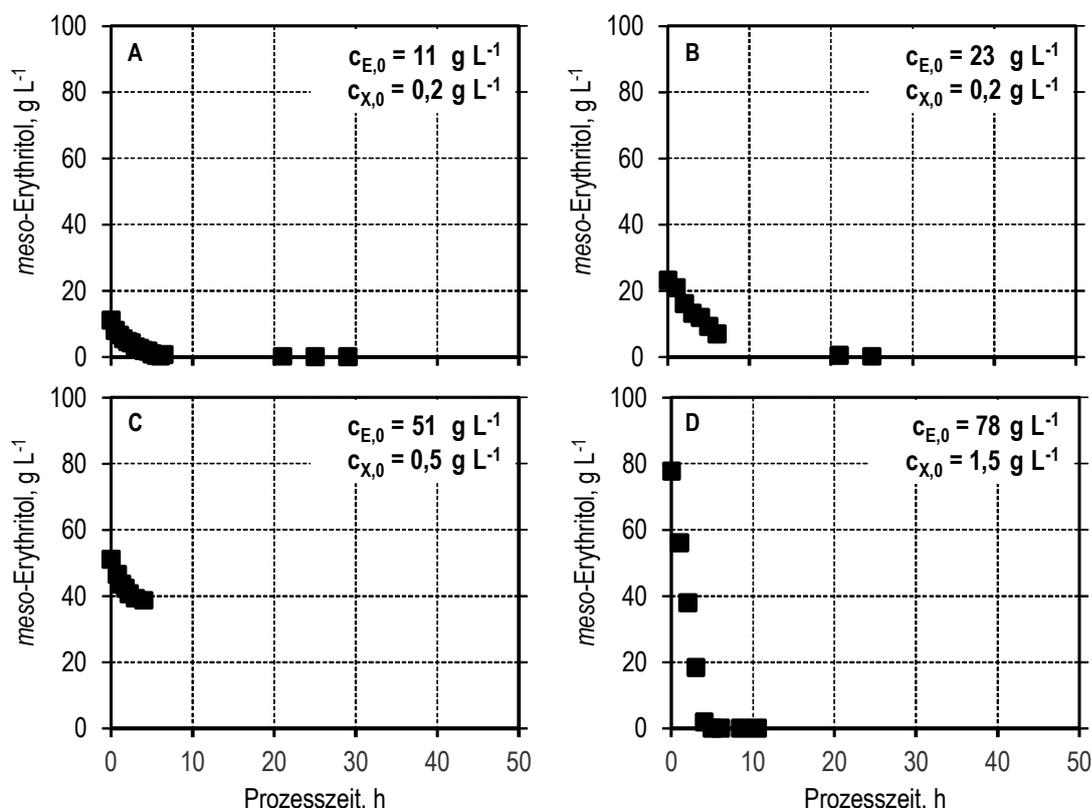


Abbildung 6-14: Verlauf der *meso*-Erythritolkonzentration bei verschiedenen initialen Eduktkonzentrationen zwischen 11 g L⁻¹ und 78 g L⁻¹ bei unterschiedlichen Biotrockenmassekonzentrationen zwischen 0,2 g L⁻¹ und 1,5 g L⁻¹ (T = 30 °C, pH 6; $P V^{-1}_{max} = 12 \text{ W L}^{-1}$, $F_{Luft} = 2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, *G. oxydans* 621H BP.8, Medium B).

Ab einer initialen Eduktkonzentration von 92 g L⁻¹ wurde eine Biotrockenmassekonzentration von 2,8 g L⁻¹ eingesetzt, welche zuvor (siehe Abschnitt 6.2.3) als maximal identifiziert worden war, um nicht durch Sauerstofflimitierung beeinträchtigt zu sein. Abbildung 6-15 zeigt die zeitlichen Verläufe der *meso*-Erythritolkonzentrationen und die zugehörigen Sauerstoffaufnahmeleistungen ab einer initialen *meso*-Erythritolkonzentration von 92 g L⁻¹. Bei initialen *meso*-Erythritolkonzentrationen von 92 g L⁻¹ und 242 g L⁻¹ wurde ein vollständiger Eduktumsatz erreicht. So wurde bei vollständigem Eduktumsatz eine maximale L-Erythrosekonzentration von 242 g L⁻¹ nach 23 h gemessen. Dies entsprach einer Raum-Zeit-Ausbeute von 10,5 g L⁻¹ h⁻¹. Eine initiale *meso*-Erythritolkonzentration von 350 g L⁻¹ wurde hingegen nicht vollständig innerhalb von 46 h umgesetzt. Nach 46 h wurde eine Eduktkonzentration von 79 g L⁻¹ und eine L-Erythrosekonzentration von 272 g L⁻¹ gemessen.

Dies entsprach bei einer Selektivität von 99 % einer Ausbeute von 78 %. Es wurde eine niedrigere Raum-Zeit-Ausbeute von $5,9 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ als bei einer initialen meso-Erythritolkonzentration von 242 g L^{-1} erreicht. Aufgrund des Verbrauchs von Sauerstoff für die Oxidation kann die Sauerstoffaufnahme bei konstanter Biotrockenmassekonzentration als Indikator für die biokatalytische Aktivität herangezogen werden. Diese nahm mit steigender Eduktkonzentration deutlich ab. So lag die maximale Sauerstoffaufnahme bei einer initialen Eduktkonzentration von 92 g L^{-1} bei 109 mM h^{-1} , bei 242 g L^{-1} hingegen nur bei 61 mM h^{-1} und bei 350 g L^{-1} bei 46 mM h^{-1} , was ein Indikator für eine Substratüberschussinhibierung ist.

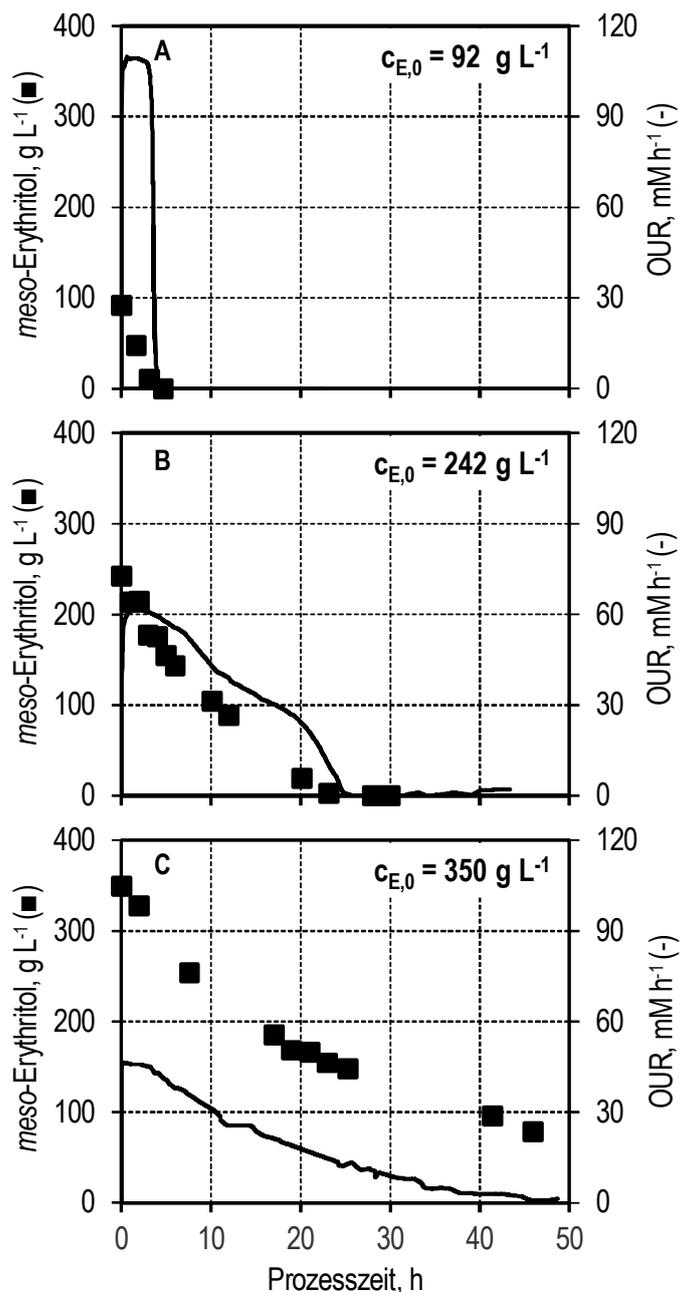


Abbildung 6-15: Verlauf der *meso*-Erythritolkonzentrationen und der Sauerstoffaufnahme-raten (OUR) bei verschiedenen initialen Eduktkonzentrationen von 92 g L^{-1} (A), 242 g L^{-1} (B) und 350 g L^{-1} (C) ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6$; $P V_{\text{max}}^{-1} = 12 \text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_{x,0} = 2,8 \text{ g L}^{-1}$, *G. oxydans* 621H BP.8, Medium B).

Aufgrund der abnehmenden Sauerstoffaufnahme-raten bei steigender initialer *meso*-Erythritolkonzentration wurde eine Substratüberschussinhibierung vermutet. Dies zeigte sich auch in den spezifischen Eduktverbrauchs-raten von $15,2 \pm 6,0 \text{ g}_E \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($c_{E,0} = 11 \text{ g L}^{-1}$), $13,7 \pm 3,1 \text{ g}_E \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($c_{E,0} = 23 \text{ g L}^{-1}$), $13,8 \pm 0,7 \text{ g}_E \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($c_{E,0} = 51 \text{ g L}^{-1}$), $12,2 \pm 0,7 \text{ g}_E \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$

($c_{E,0} = 78 \text{ g L}^{-1}$), $11,1 \pm 1,9 \text{ g}_E \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($c_{E,0} = 92 \text{ g L}^{-1}$) und $4,6 \pm 1,1 \text{ g}_P \text{ g}_X \text{ h}^{-1}$ ($c_{E,0} = 350 \text{ g L}^{-1}$) (siehe Abbildung 6-16). Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Biotransformation wurden zwei unabhängige Prozesse mit einer initialen *meso*-Erythritolkonzentration von 240 g L^{-1} durchgeführt und die zellspezifischen Eduktverbrauchsrate berechnet. Bei den Prozessen konnten zellspezifische Eduktverbrauchsrate von $6,1 \pm 1,9 \text{ g}_E \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ und $6,1 \pm 3,1 \text{ g}_E \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ erzielt und somit die Reproduzierbarkeit der wachstumsentkoppelten Biotransformation gezeigt werden.

Abbildung 6-16 zeigt die spezifische Eduktverbrauchsrate in Abhängigkeit von der initialen *meso*-Erythritolkonzentration mit formalkinetischer Beschreibung einer Substratüberschussinhibierung durch die Gleichung nach Andrews (1968) (siehe Gleichung 3-6). In Tabelle 6-2 sind die formalkinetischen Parameter und die sich daraus ableitenden Zustandsgrößen beschrieben.

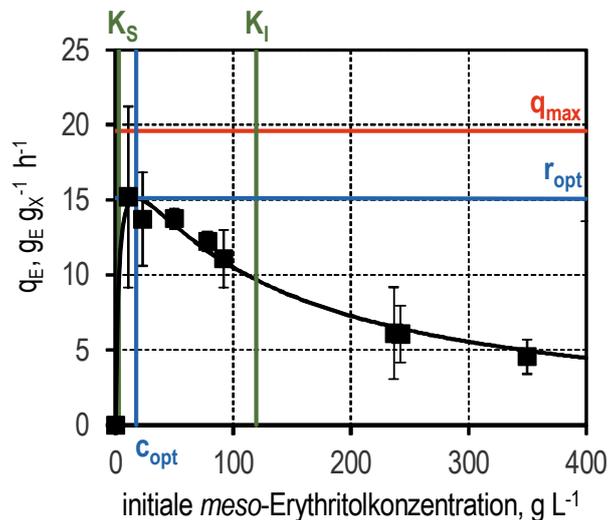


Abbildung 6-16: Spezifische Eduktverbrauchsrate (■) in Abhängigkeit von der initialen *meso*-Erythritolkonzentration mit identifiziertem formalkinetischem Modell nach Andrews (1968) zur Beschreibung einer Substratüberschussinhibierung (schwarze Linie). Berechnete formalkinetische Modellparameter der maximalen Eduktverbrauchsrate $q_{\max} = 19,6 \text{ g}_E \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$, der Halbsättigungskonstante $K_S = 2,6 \text{ g L}^{-1}$ und der Inhibierungskonstante $K_I = 119,3 \text{ g L}^{-1}$ sowie daraus abgeleitete Zustandsgrößen der optimalen Eduktkonzentration $c_{\text{opt}} = 17,6 \text{ g L}^{-1}$ und der optimalen spezifischen Eduktverbrauchsrate $q_{\text{opt}} = 15,1 \text{ g}_E \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6$; $P \text{ V}^{-1}_{\max} = 12 \text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, *G. oxydans* 621H BP.8, Medium B).

Der Wert der Halbsättigungskonstante von $2,6 \pm 2,1 \text{ g L}^{-1}$ verdeutlicht die Affinität des Biokatalysators zum Edukt *meso*-Erythritol. Aus den formalkinetischen Parametern konnte die

vergleichsweise niedrige, optimale Eduktkonzentration von $17,6 \text{ g L}^{-1}$, bei der sich die höchste Eduktverbrauchsrate von $15,1 \text{ g}_E \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ ergab, identifiziert werden (siehe Tabelle 6-2).

Tabelle 6-2: Modellparameter nach Andrews (1968) und daraus abgeleitete Zustandsgrößen maximale Eduktverbrauchsrate (q_{\max}), Halbsättigungskonstante (K_S), Inhibierungskonstante (K_I), optimale Eduktverbrauchsrate (q_{opt}) und optimale Eduktkonzentration (c_{opt}) aus Biotransformationen in unabhängigen Satzprozessen im kontrollierten Rührkesselreaktor ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6$; $P V^{-1}_{\max} = 12 \text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_{X,0} = 2,8 \text{ g L}^{-1}$).

Modellparameter / Zustandsgröße	Wert	Einheit
q_{\max}	19,6	$\text{g}_E \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$
K_S	2,6	g L^{-1}
K_I	119,3	g L^{-1}
q_{opt}	15,1	$\text{g}_E \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$
c_{opt}	17,6	g L^{-1}

Da die Sauerstoffaufnahme ein Indikator für die biokatalytische Aktivität ist, wurden für die Satzprozesse mit initialen Eduktkonzentrationen von 92 g L^{-1} , 242 g L^{-1} sowie 350 g L^{-1} die relative spezifische Sauerstoffaufnahme in Abhängigkeit von der vorliegenden L-Erythrosekonzentration berechnet (siehe Abbildung 6-17). Aufgrund der Substratüberschussinhibierung musste für die Berechnung der relativen spezifischen Sauerstoffaufnahme der Einfluss der Substratüberschussinhibierung über die Modellparameter (siehe Tabelle 6-2) berücksichtigt werden. Aus der maximalen Eduktverbrauchsrate wurde über die Stöchiometrie von verbrauchtem *meso*-Erythritol zu gebildetem O_2 die maximale spezifische Sauerstoffaufnahme von $80,2 \text{ mmol g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ abgeschätzt. Ab L-Erythrosekonzentrationen von mehr als 50 g L^{-1} wurde eine relative spezifische Sauerstoffaufnahme von etwa 66 % der maximalen spezifischen Sauerstoffaufnahme beobachtet. Bei noch höheren L-Erythrosekonzentrationen von 200 g L^{-1} konnte noch etwa ein Viertel der maximalen spezifischen Sauerstoffaufnahme identifiziert werden. Die relative zellspezifische Sauerstoffaufnahme als Funktion der L-Erythrosekonzentration wurde formalkinetisch mit Hilfe des Produktinhibierungsansatzes nach Levenspiel (1980) (siehe Gleichung 3-8) beschrieben und die in Tabelle 6-3 angegebenen formalkinetischen Parameter der maximalen Produktkonzentration $c_{P,\max} = 327,8 \text{ g L}^{-1}$ und des Exponenten $n = 1,6$ ermittelt.

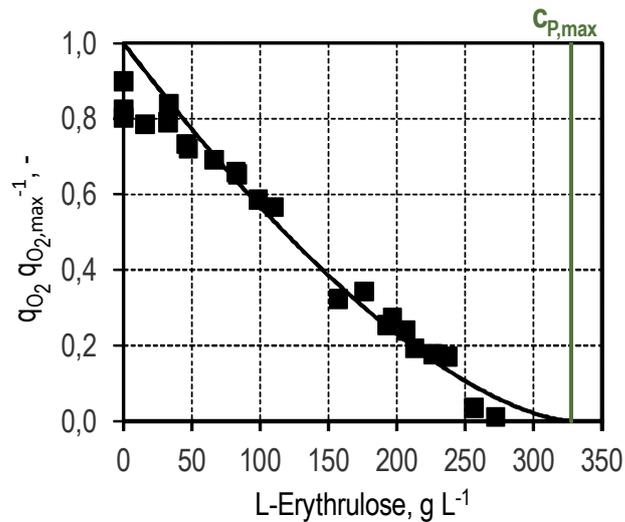


Abbildung 6-17: Berechnete relative spezifische Sauerstoffaufnahme (\blacksquare) in Abhängigkeit von der gegenwärtigen L-Erythrosekonzentration mit identifiziertem formalkinetischem Modell nach Levenspiel (1980) zur Beschreibung einer Produktinhibition (schwarze Linie) mit ermittelten formalkinetischem Modellparameter der maximalen Produktkonzentration $C_{P, \max}$ (grüne Vertikale) ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6$; $P V^{-1}_{\max} = 12 \text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_{X,0} = 2,8 \text{ g L}^{-1}$, *G. oxydans* 621H BP.8, Medium B).

Tabelle 6-3: Modellparameter nach Levenspiel (1980) und daraus abgeleitete Zustandsgrößen maximale Produktkonzentration ($C_{P, \max}$) und Exponent (n) bei Oxidation von 92 g L^{-1} , 242 g L^{-1} sowie 350 g L^{-1} *meso*-Erythritol in Satzprozessen im kontrollierten Rührkesselreaktor ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6$; $P V^{-1}_{\max} = 12 \text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_{X,0} = 2,8 \text{ g L}^{-1}$, *G. oxydans* 621H BP.8).

Modellparameter / Zustandsgröße	Wert	Einheit
$C_{P, \max}$	327,7	$g L^{-1}$
n	1,6	-

Diskussion

Es konnte eine hohe maximale Produktkonzentration von 242 g L^{-1} bei vollständigem Eduktumsatz mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von $10,5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht werden. Im Satzprozess wurde eine maximale Produktkonzentration von 272 g L^{-1} L-Erythulose bei der initialen *meso*-Erythritolkonzentration von 350 g L^{-1} nach 48 h erzielt. Dies entsprach einem Eduktumsatz von 78 % bei einer Raum-Zeit-Ausbeute von $5,9 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Daher wurde bei einer vergleichbaren maximalen Produktkonzentration eine höhere Raum-Zeit-Ausbeute als von Vorlop *et al.* (2009) erreicht. Diese erzielten in einem Zulaufprozess eine Raum-Zeit-Ausbeute von $1,6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Die von Pan *et al.* (2016) erreichte Raum-Zeit-Ausbeute war mit von $6,5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ mit einer L-Erythulosekonzentration von 208 g L^{-1} ebenfalls niedriger als die im Satzprozess erzielte Raum-Zeit-Ausbeute mit einer initialen *meso*-Erythritolkonzentration von 242 g L^{-1} .

Es konnte eine Substratüberschussinhibierung identifiziert werden. Die mit dem Substratüberschussinhibierungsmodell nach Andrews (1968) berechnete Halbsättigungskonstante $K_S = 2,6 \text{ g L}^{-1}$ war vergleichbar zur Halbsättigungskonstante $K_S = 6,3 \text{ g L}^{-1}$ von *G. oxydans* 621H gegenüber dem Substrat Glycerin (Claret *et al.* 1992). Dies steht in Einklang mit den Erkenntnissen von Peters *et al.* (2013b), dass die Polyol-Dehydrogenase eine Affinität gegenüber beiden Substrate aufweist. Die bei Glycerin ermittelte Inhibierungskonstante $K_I = 36 \text{ g L}^{-1}$ (Claret *et al.* 1992) bedeutet, dass bei Glycerin eine Substratüberschussinhibierung bei deutlich niedrigeren Konzentrationen eintritt als bei der Oxidation von *meso*-Erythritol mit einem $K_I = 118 \text{ g L}^{-1}$. Die maximale spezifische Eduktverbrauchsrate wurde für die Oxidation von Glycerin mit $35,6 \text{ g}_E \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ deutlich höher berechnet als die spezifische Eduktverbrauchsrate von *meso*-Erythritol mit $19,6 \text{ g}_E \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Aufgrund der abnehmenden relativen spezifischen Sauerstoffaufnahme ab einer Produktkonzentration von mehr als 50 g L^{-1} L-Erythulose wurde eine einsetzende Produktinhibierung vermutet, welche durch das Inhibierungsmodell nach Levenspiel (1980) beschrieben werden konnte. Aufgrund der chemischen Ähnlichkeit von L-Erythulose und Dihydroxyaceton, von dem eine Inhibierung beschrieben wurde (Bauer *et al.* 2005; Claret *et al.* 1993), wurde im Folgenden die Produktinhibierung durch zusätzliche initiale Zugabe von L-Erythulose zu 90 g L^{-1} *meso*-Erythritol überprüft.

6.2.5 Produktkonzentration

Die Biotransformationen erfolgten in pH geregelten Satzprozessen im Liter-Maßstab. Der Sauerstoffpartialdruck wurde durch Variation der Rührerdrehzahl ($n = 500 - 1200 \text{ rpm}$) auf mindestens 20 % Luftsättigung gehalten, um einen ausreichenden Sauerstoffeintrag zu gewährleisten. Abbildung 6-18 zeigt die resultierende Produktbildung in Form der L-Erythrosekonzentration sowie die zugehörige Sauerstoffaufnahme über die Prozesszeit.

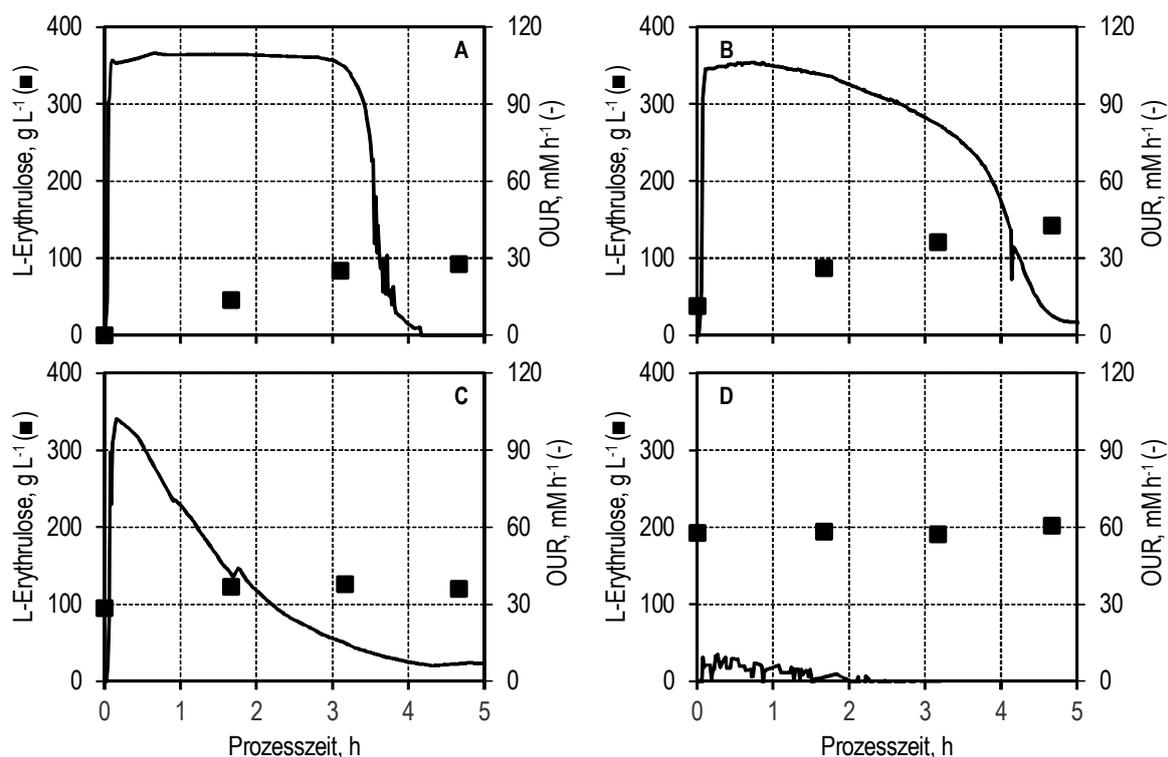


Abbildung 6-18: Verlauf der L-Erythrosekonzentrationen (■) sowie der Sauerstoffaufnahme (OUR) bei 100 g L⁻¹ initialer *meso*-Erythritolkonzentration mit zusätzlich initialer L-Erythrosekonzentrationen zwischen 0 g L⁻¹ (A), 38 g L⁻¹ (B), 95 g L⁻¹ (C) und 192 g L⁻¹ (D) ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6$; $P V^{-1}_{\text{max}} = 12 \text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_{x,0} = 2,7 \text{ g L}^{-1}$, *G. oxydans* 621H BP.8, Medium B).

Sowohl anhand der Sauerstoffaufnahme als auch anhand des Verlaufs der L-Erythrosekonzentration konnte der Einfluss des Produkts auf die Oxidation überprüft werden. Wurde initial keine L-Erythrose zugegeben, so waren innerhalb von 4,7 h 93 g L⁻¹ L-Erythrose messbar. Anhand der Sauerstoffaufnahme, die initial maximal (109 mM h^{-1}) war, konnte gezeigt werden, dass nach 4,1 h ein vollständiger Umsatz des Edukts erreicht

war, da die Sauerstoffaufnahme ab diesem Zeitpunkt nahe Null war. Bei Vorlage von 38 g L^{-1} L-Erythrose war anfänglich eine ähnlich hohe maximale Sauerstoffaufnahme von 106 mM h^{-1} messbar, welche allerdings schneller abnahm als ohne initiale L-Erythrose Zugabe. Auch in diesem Fall wurde nach 4,7 h eine Sauerstoffaufnahme nahe Null erreicht. Bei initialer Vorlage von 95 g L^{-1} L-Erythrose war zu Beginn eine hohe Sauerstoffaufnahme von 102 mM h^{-1} messbar. Allerdings folgte nach 4 h ein schneller Abfall der Sauerstoffaufnahme auf nahe Null. Bis 3,2 h konnte eine Erhöhung der L-Erythrosekonzentration von 95 g L^{-1} auf 126 g L^{-1} gemessen werden, im Anschluss war allerdings keine weitere Produktbildung mehr messbar. Bei einer weiteren Erhöhung der initialen Produktkonzentration auf 192 g L^{-1} war keine Zunahme der Sauerstoffaufnahme mehr zu erkennen, sondern diese blieb bei nahe Null, was in Einklang mit der stationären L-Erythrosekonzentration steht. Analog zu Abschnitt 6.2.4 wurde unter Berücksichtigung der Substratüberschussinhibierung die relative spezifische Sauerstoffaufnahme in Abhängigkeit der L-Erythrosekonzentration ermittelt (siehe Abbildung 6-19). Hierbei war jedoch zu erkennen, dass die relative spezifische Sauerstoffaufnahme bei deutlich geringeren L-Erythrosekonzentrationen von bereits ab 120 g L^{-1} sehr niedrige relative spezifische Sauerstoffaufnahmeraten von 5 % erreicht wurden.

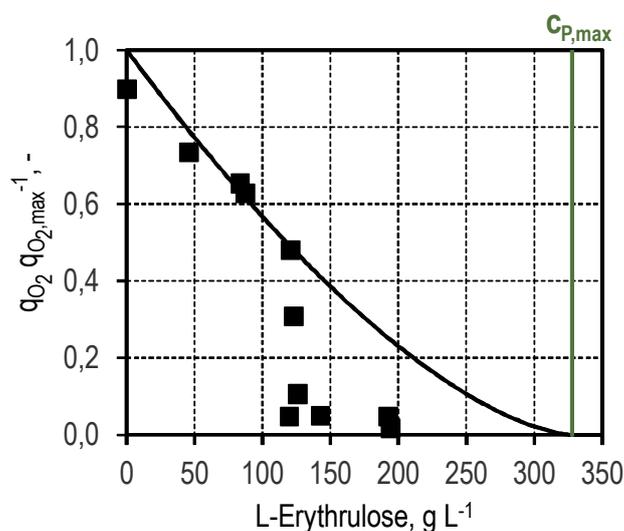


Abbildung 6-19: Berechnete relative spezifische Sauerstoffaufnahmerate (■) in Abhängigkeit der L-Erythrosekonzentration bei initialer Zugabe bis zu 192 g L^{-1} L-Erythrose und dem zuvor identifiziertem formalkinetischem Modell der Produktinhibierung nach Levenspiel (1980) (schwarze Linie) mit der ermittelten maximalen Produktkonzentration $C_{P,max}$ (grüne Vertikale) ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6$; $P V^{-1}_{max} = 12 \text{ W L}^{-1}$, $F_{Luft} = 2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $C_{X,0} = 2,7 \text{ g L}^{-1}$; *G. oxydans* 621H BP.8, Medium B).

Diskussion

Durch initiale Zugabe des Produkts L-Erythrose konnte die Produktinhibierung bestätigt werden. Allerdings war anhand der Reduktion der relativen spezifischen Sauerstoffaufnahme bei deutlich geringeren L-Erythrosekonzentrationen ersichtlich, dass bei initialer Zugabe hoher L-Erythrosekonzentrationen die Produktinhibierung deutlich stärker war als bei der in Abschnitt 6.2.4 identifizierten Produktinhibierung bei fortlaufender L-Erythrosebildung. Dies liegt vermutlich daran, dass bei initialer Zugabe hoher L-Erythrosekonzentrationen die Zellen ab *initio* hohen Konzentrationen ausgesetzt waren und somit irreversibel geschädigt werden. Auch bei der Herstellung von Dihydroxyaceton, welches ebenfalls aufgrund seiner Reaktivität produktinhibierend wirkt (Claret *et al.* 1993), wurde festgestellt, dass die bei initialer Produktzugabe identifizierten inhibierenden Konzentrationen von 96 g L^{-1} (Claret *et al.* 1993) deutlich unter der maximalen Produktkonzentration von 220 g L^{-1} lag (Bauer *et al.* 2005).

6.2.6 Vergleich von Wildtypstamm mit dem Multideletionsstamm

Der Satzprozess mit einer *meso*-Erythritolkonzentration von etwa 240 g L^{-1} im Phosphatpuffer mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (Medium B, Tabelle 4-5) wurde mit dem Wildtypstamm *G. oxydans* 621H durchgeführt, um dessen biokatalytische Aktivität mit der des Multideletionsstamms *G. oxydans* 621H BP.8 direkt zu vergleichen. Die Biotransformationen erfolgten in pH geregelten Prozessen im Liter-Maßstab unter Verwendung von $2,8 \text{ g L}^{-1}$ Biotrockenmasse des jeweiligen Stamms. Abbildung 6-20 zeigt den zeitlichen Verlauf der *meso*-Erythritol-, der L-Erythrosekonzentrationen sowie der zugehörigen Sauerstoffaufnahme bei den gewählten Standardbedingungen ($30 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 6).

Anhand des Verlaufs der Eduktkonzentrationen ist zu erkennen, dass im Gegensatz zum Multideletionsstamm der Wildtypstamm nicht in der Lage war, die vorgelegten 242 g L^{-1} *meso*-Erythritol innerhalb von 30 h vollständig umzusetzen. Nach 30 h wurde mit einer restlichen Eduktkonzentration von 40 g L^{-1} nur ein Umsatz von 83 % erzielt. Zu diesem Zeitpunkt konnte mit dem Multideletionsstamm kein *meso*-Erythritol mehr nachgewiesen werden und somit wurde ein vollständiger Umsatz erzielt. Bei Betrachtung der L-Erythrosekonzentration ist zu erkennen, dass mit dem Multideletionsstamm nach 23 h eine L-Erythrosekonzentration von 242 g L^{-1} erreicht wurde, was einer Raum-Zeit-Ausbeute von $10,5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ entsprach. Demgegenüber wurde mit dem Wildtypstamm nach dieser Prozesszeit eine L-Erythrosekonzentration von 200 g L^{-1} bei einer Raum-Zeit-Ausbeute von $8,6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht.

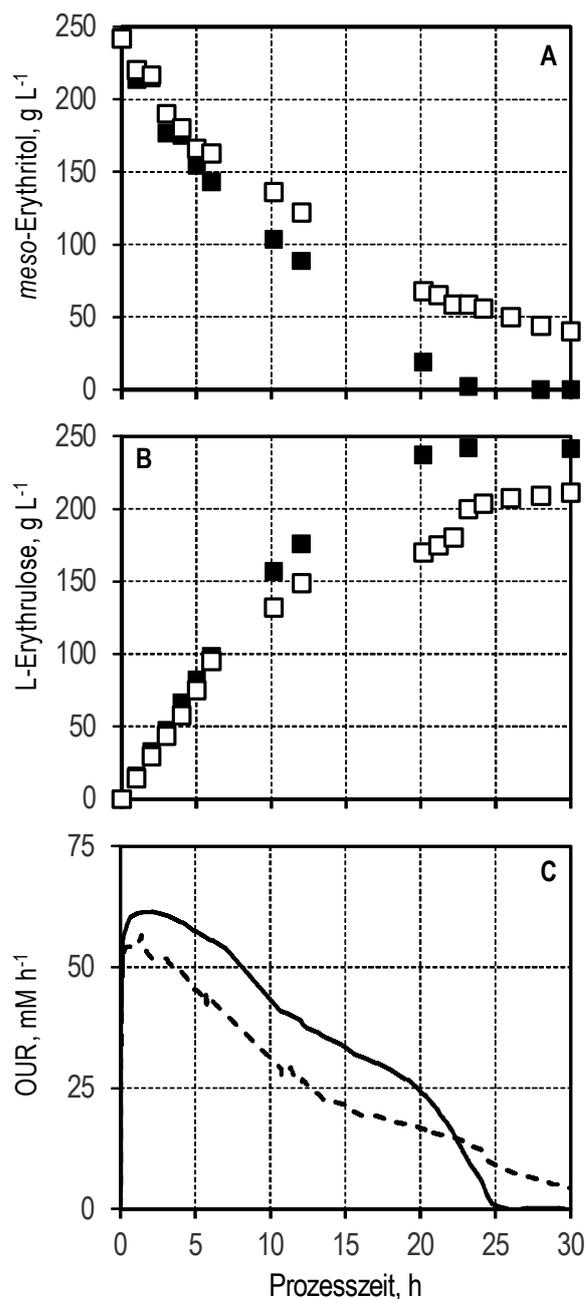


Abbildung 6-20: Verlauf der *meso*-Erythritol- (A), L-Erythrosekonzentrationen (B) sowie der Sauerstoffaufnahme-raten (OUR) (C) bei Biotransformationen mit dem Wildtypstamm *G. oxydans* 621H (□) und dem Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.8 (■) ($T = 30\text{ °C}$, $\text{pH } 6$; $P V^{-1}_{\text{max}} = 12\text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 2\text{ vvm}$, $V_R = 0,7\text{ L}$, $c_{X,0} = 2,8\text{ g L}^{-1}$, Medium B).

Die geringere biokatalytische Aktivität des Wildtyps wurde auch durch die Sauerstoffaufnahme-raten widerspiegelt, da der Multideletionsstamm eine etwas höhere maximale Sauerstoffaufnahme-rates bei gleicher Biotrockenmassekonzentration aufwies

($OUR_{max} = 61 \text{ mM h}^{-1}$ bei *G. oxydans* 621H BP.8 und $OUR_{max} = 57 \text{ mM h}^{-1}$ bei *G. oxydans* 621H). Der vollständige Eduktumsatz wurde durch die Sauerstoffaufnahme rate nahe Null nach knapp 25 h beim Multideletionsstamm angedeutet. Zu diesem Zeitpunkt konnte für den Wildtypstamm noch eine niedrige Sauerstoffaufnahme rate von 9 mM h^{-1} festgestellt werden, weshalb von einem geringen Eduktumsatz ausgegangen werden kann.

Diskussion

Im Gegensatz zu Biotransformationen bei nicht-inhibierenden Bedingungen ($c_{E,0} < 50 \text{ g L}^{-1}$) im Phosphatpuffer (siehe Abschnitt 6.1.2) zeigte der Vergleich zwischen Wildtypstamm und Multideletionsstamm im Liter-Maßstab anhand der 8 % höheren maximalen Sauerstoffaufnahme rate OUR_{max} bei gleicher Biotrockenmassekonzentration und anhand der spezifischen Produktbildungsraten von $5,9 \pm 0,3 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Multideletionsstamm) zu $5,4 \pm 0,1 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Wildtypstamm), dass mit dem Multideletionsstamm eine Erhöhung der biokatalytischen Aktivität erreicht wurde. Der Grund hierfür könnte in der erhöhten Membrankapazität für die Polyol-Dehydrogenase beim Multideletionsstamm aufgrund nicht exprimierter konkurrierender Dehydrogenasen liegen.

6.3 Wachstumsgekoppelte Biotransformation im Satzverfahren

Vergleichend zu den Biotransformationen mit ruhenden Zellen, wurde eine Biokonversion unter Verwendung wachsender Zellen durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Nutzung metabolisierender Zellen einen Vorteil aufweist. Hierzu wurde in Anlehnung an Pan *et al.* (2016) dem Wachstumsmedium (siehe Tabelle 4-3) anstatt Mannitol – der bevorzugten Kohlenstoffquelle für das Wachstum – 100 g L^{-1} meso-Erythritol zugegeben.

Die Biotransformationen erfolgten in pH geregelten Prozessen im Liter-Maßstab. Der Sauerstoffpartialdruck wurde durch Variation der Rührerdrehzahl auf mindestens 20 % Luftsättigung gehalten, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten und der pH auf 6 geregelt. Abbildung 6-21 zeigt die resultierenden Biotrockenmassekonzentrationen, den Sauerstoffpartialdruck sowie die meso-Erythritol- und L-Erythrosekonzentrationen über die Prozesszeit.

Bei Verwendung wachsender Zellen wurde eine maximale Biotrockenmassekonzentration von $1,6 \text{ g L}^{-1}$ nach 21 h bei einer Wachstumsrate von $0,33 \text{ h}^{-1}$ während der exponentiellen Wachstumsphase erreicht. Demgegenüber verblieb die Biotrockenmassekonzentration bei der Nutzung ruhender Zellen nahezu konstant bei $0,6 \text{ g L}^{-1}$. Anhand des Sauerstoffpartialdrucks ist zu erkennen, dass dieser mindestens bei 20 % Luftsättigung lag. Zum Ende der

Biotransformation war dieser jedoch bei der Nutzung wachsender Zellen leicht niedriger (95 % Luftsättigung) als bei der Nutzung ruhender Zellen (99 % Luftsättigung). Sowohl bei Verwendung wachsender als auch ruhender Zellen wurde die initiale Eduktkonzentration von knapp 100 g L^{-1} vollständig umgesetzt. Nach 21 h war eine L-Erythrosekonzentration von $90,4 \text{ g L}^{-1}$ (wachsende Zellen) sowie $97,9 \text{ g L}^{-1}$ (ruhende Zellen) erzielt, was Produktausbeuten von 94 % (wachsende Zellen) und 99 % (ruhende Zellen) entspricht. Bei wachsenden Zellen war eine Reduktion der L-Erythrosekonzentration von $90,4 \text{ g L}^{-1}$ auf $84,5 \text{ g L}^{-1}$ innerhalb von 4,5 h zu erkennen, während bei ruhenden Zellen die L-Erythrosekonzentration mit $96,0 \text{ g L}^{-1}$ konstant blieb.

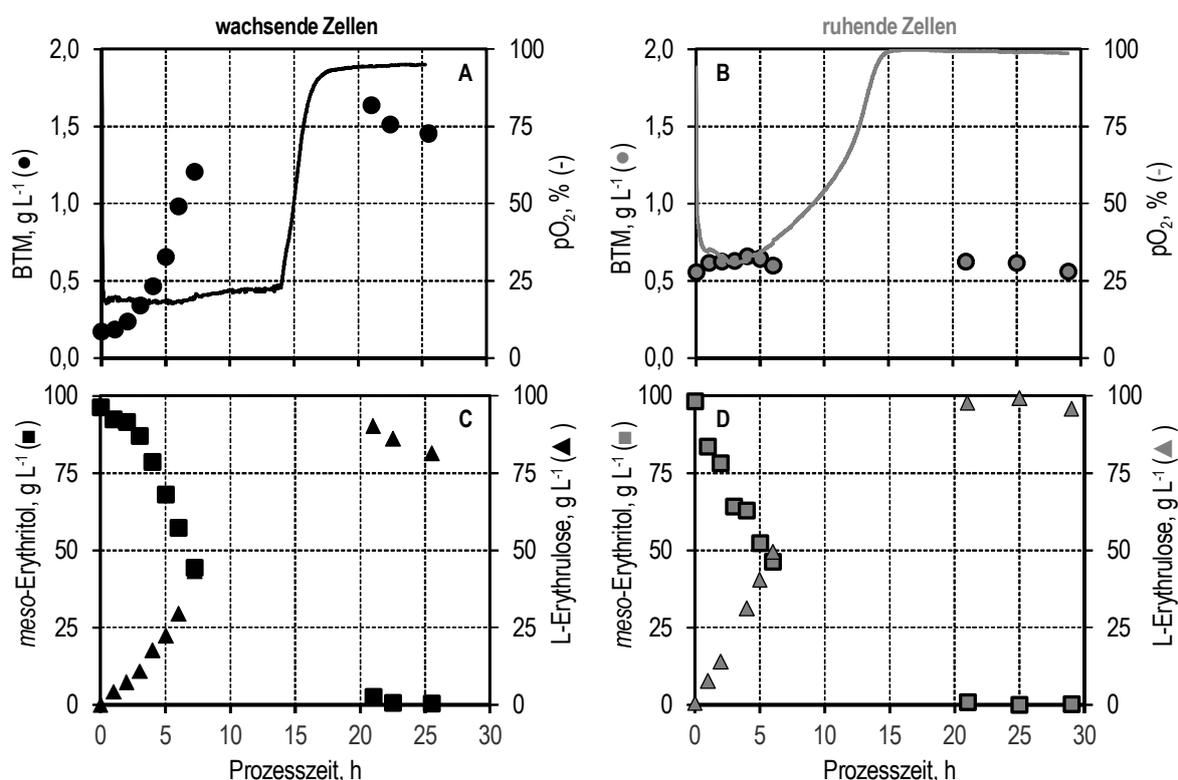


Abbildung 6-21: Verlauf der Biotrockenmassenkonzentrationen (●) und des Sauerstoffpartialdrucks (pO_2) (A / B) sowie der meso-Erythritol (■)- und der L-Erythrosekonzentrationen (▲) (C / D) bei Biotransformation mit wachsenden (schwarz, A / C) und ruhenden Zellen (grau, B / D) ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6$; $P V^{-1}_{\text{max}} = 12 \text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, *G. oxydans* 621H BP.8).

Diskussion

Es wurden ähnliche Produktbildungsraten von $12,4 \pm 1,8 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ (wachsende Zellen – Berechnung durch Differenzenverfahren) und $13,6 \pm 1,8 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ (ruhende Zellen – Berechnung durch lineare Regression des Verlaufs der initialen Konzentrationen). Allerdings konnte bei Verwendung ruhender Zellen keine Abnahme der Produktkonzentration festgestellt werden und die Ausbeute verblieb bei 99 %. Bei wachsenden Zellen wurde hingegen eine Reduktion der L-Erythrosekonzentration beobachtet und die Ausbeute nahm von 94 % auf 85 % ab. Ein möglicher Grund hierfür könnte die Reaktion der L-Erythrose mit Aminogruppen der Komplexmedienbestandteile sein. Des Weiteren wurde auch von Peters *et al.* (2013b) eine Oxidationsaktivität *in vitro* gegenüber L-Erythrose nachgewiesen, weshalb eine Umsetzung denkbar wäre. Allerdings sollte dies in beiden Medien möglich sein, konnte aber im Phosphatpuffer mit Ca^{2+} und Mg^{2+} wegen der konstant hohen Produktkonzentration nicht nachgewiesen werden. Theoretisch wäre auch eine Umwandlung der L-Erythrose in L-Erythrose und eine Verwertung über den Pentose-Phosphat Weg möglich (Mizanur *et al.* 2001). Allerdings ist das für die Reaktion verantwortliche Enzym (L-Ribose Isomerase) nicht für *G. oxydans* 621H annotiert und wurde in entsprechenden L-Erythrose Herstellungsprozessen heterolog exprimiert (Mizanur *et al.* 2001; Zou *et al.* 2017). Aufgrund der beobachteten höheren Stabilität des Produkts im Phosphatpuffer mit Ca^{2+} und Mg^{2+} und daraus folgenden höheren Produktausbeuten, sollte die L-Erythrose Herstellung mit ruhenden Zellen erfolgen.

6.4 Kontinuierliche Biotransformation mit getauchtem Hohlfasermembranmodul

Bei kontinuierlicher Prozessführung mit totaler Zellrückhaltung sollte theoretisch eine Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeuten zu erreichen sein, da mit dieser Prozessführung eine Substratüberschussinhibierung vermieden werden könnte. Gleichzeitig kann durch Wahl der Eduktkonzentration im Zulauf die maximal theoretisch mögliche Produktkonzentration im Fließgleichgewicht eingestellt werden. Um bei Verwendung ruhender Zellen ein Auswaschen der Zellen zu vermeiden, wurde ein kontinuierlicher Prozess mit totaler Zellrückhaltung durchgeführt.

Die Biotransformationen wurden mit initialen Biotrockenmassekonzentrationen zwischen $0,8 - 1 \text{ g L}^{-1}$ bei einer Durchflussrate von $D = 0,067 \text{ h}^{-1}$ ($\tau = 14,9 \text{ h}$) bei drei unterschiedlichen *meso*-Erythritolkonzentrationen von $c_{E,zu} = 30 \text{ g L}^{-1}$, $c_{E,zu} = 75 \text{ g L}^{-1}$ und $c_{E,zu} = 120 \text{ g L}^{-1}$ im Zulauf durchgeführt. Als Medium wurde der Phosphatpuffer mit Mg^{2+} und Ca^{2+} (Medium B,

siehe Tabelle 4-5) und das Wachstumsmedium mit Komplexmedienbestandteilen und einer *meso*-Erythritolkonzentration im Zulauf von $c_{E,zu} = 120 \text{ g L}^{-1}$ verwendet. Mit dem Wachstumsmedium sollte überprüft werden, ob aufgrund der längeren Prozesszeiten im kontinuierlichen Prozess mit Zellrückhaltung eine Verwendung Phosphatpuffer mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (Medium B) möglich ist oder ob eine Nährstofflimitierung der zellspezifischen Verbrauchsrate eintritt. Die Biotransformationen erfolgten in pH geregelten Prozessen im Liter-Maßstab mit getauchten Hohlfasermembranmodul, das zur totalen Zellrückhaltung eingebaut wurde. Abbildung 6-22 zeigt die resultierenden *meso*-Erythritol- sowie L-Erythrosekonzentrationen als Funktion der Prozesszeit.

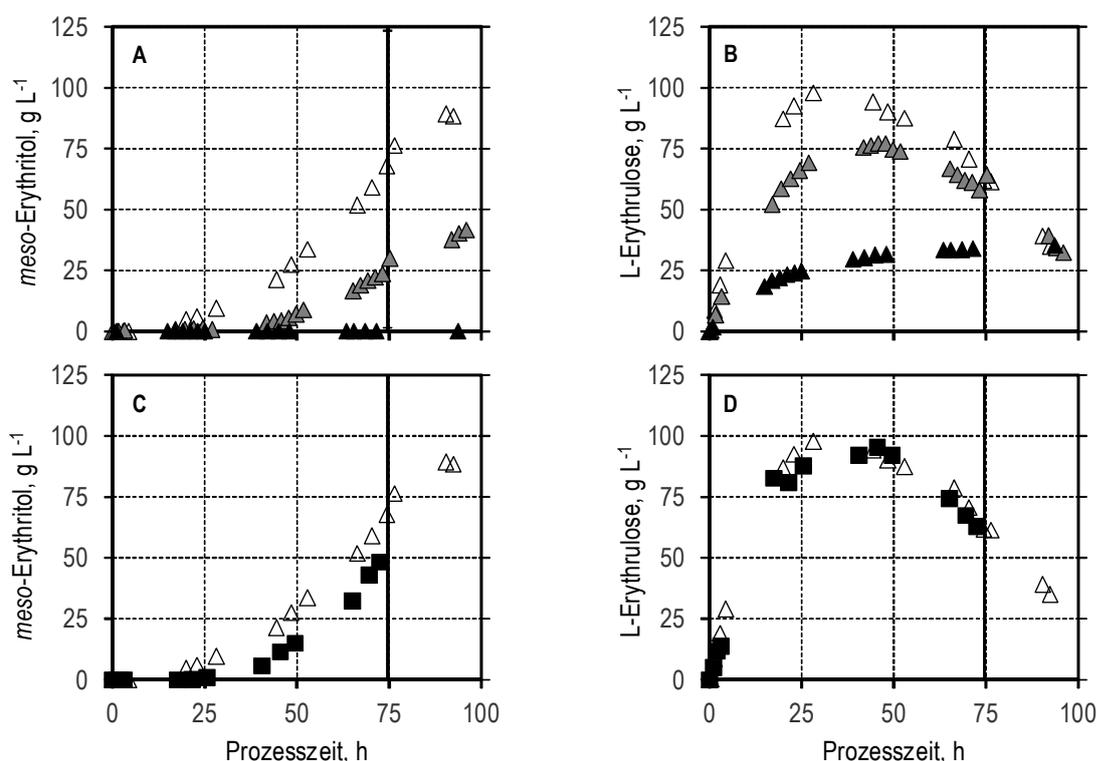


Abbildung 6-22: Verlauf der *meso*-Erythritol- (A / C) sowie der L-Erythrosekonzentrationen (B / D) bei Verwendung des Mediums B mit $c_{E,zu} = 30 \text{ g L}^{-1}$ (▲), $c_{E,0} = 75 \text{ g L}^{-1}$ (▲) und $c_{E,0} = 120 \text{ g L}^{-1}$ (Δ) sowie bei Verwendung des Wachstumsmediums mit Komplexbestandteilen und $c_{E,zu} = 120 \text{ g L}^{-1}$ (■). Das Erreichen von fünf hydraulischen Verweilzeiten (5τ) nach 74,6 h ist durch den vertikalen schwarzen Balken gekennzeichnet ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6$; $P V^{-1} = 28 \text{ W L}^{-1}$, $F_{zu} = 2 \text{ vvm}$, $V_R = 1 \text{ L}$, $c_x = 0,9 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$, *G. oxydans* 621H BP.8).

Bei Betrachtung der *meso*-Erythritolkonzentrationen ist zu erkennen, dass diese ab 41,8 h ($c_{E,zu} = 75 \text{ g L}^{-1}$) sowie ab 19,2 h ($c_{E,zu} = 120 \text{ g L}^{-1}$) anstieg. Demgegenüber wurde bei einer

Eduktkonzentration im Zulauf $c_{E,zu} = 30 \text{ g L}^{-1}$ über die gesamte Prozesszeit von 94 h kein *meso*-Erythritol gemessen. Auch bei der Biotransformation mit dem Komplexmedium führte bei $c_{E,zu} = 120 \text{ g L}^{-1}$ zu einem kontinuierlichen Anstieg des Edukts ab 40,5 h.

Bei $c_{E,zu} = 30 \text{ g L}^{-1}$ wurde mit einer L-Erythrosekonzentration von 30 g L^{-1} nach 39 h ($2,6 \tau$) ein vollständiger Umsatz erreicht. Es erfolgte keine Änderung der Konzentrationen mehr, weshalb ein Fließgleichgewicht erreicht wurde. Dieses konnte über 94 h ($> 6 \tau$) aufrechterhalten werden. Bei $c_{E,zu} = 75 \text{ g L}^{-1}$ wurde innerhalb von 46 h ($3,2 \tau$) ebenfalls ein nahezu vollständiger Umsatz von 94 % erzielt. Anschließend wurde allerdings eine sukzessive Reduktion der L-Erythrosekonzentration auf 32 g L^{-1} nach 96 h beobachtet, was einem Umsatz von 44 % entsprach. Bei $c_{E,zu} = 120 \text{ g L}^{-1}$ war nach 28,2 h ($1,9 \tau$) ein Anstieg der L-Erythrosekonzentration auf 98 g L^{-1} bei einem Umsatz von 92 % zu beobachten. Anschließend fand eine Abnahme der L-Erythrosekonzentration auf 35 g L^{-1} bei einem Umsatz von lediglich 26 % nach 6τ statt.

Bei der Biotransformation mit dem Wachstumsmedium wurde eine L-Erythrosekonzentration von 95 g L^{-1} nach 45,5 h (3τ) bei einem Umsatz von 90 % erzielt. Jedoch nahm auch diese wie bei der Biotransformation im Phosphatpuffer ab. Nach 5τ wurde somit eine L-Erythrosekonzentration von 63 g L^{-1} bei einem Umsatz von nur noch 60 % festgestellt.

Diskussion

Es ist davon auszugehen, dass die jeweiligen maximalen L-Erythrosekonzentrationen von 75 g L^{-1} sowie 98 g L^{-1} , denen die Zellen im kontinuierlichen System ausgesetzt waren, bereits ausreichten, um diese irreversibel zu schädigen, da innerhalb von sechs hydraulischen Verweilzeiten kein Fließgleichgewicht erreicht wurde. Diese Konzentrationen lagen in einem ähnlichen Bereich wie die berichteten 85 g L^{-1} des chemisch vergleichbaren Dihydroxyacetons, ab der eine Produktinhibierung berichtet wurde (Claret *et al.* 1993). Eine hypothetisch mögliche Nährstofflimitierung aufgrund der deutlich längeren Prozesszeiten als im Satzverfahren wurde ausgeschlossen, da auch bei Verwendung des Wachstumsmediums mit 120 g L^{-1} Edukt kein Fließgleichgewicht erreicht wurde.

Mit vollständigem Eduktumsatz bei $c_{E,zu} = 30 \text{ g L}^{-1}$ und einer Durchflussrate von $D = 0,067 \text{ h}^{-1}$ wurde eine Raum-Zeit-Ausbeute von $2 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht. Dies entsprach nur einem Drittel der Raum-Zeit-Ausbeute von bis zu $6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, die im Satzverfahren mit einer ähnlichen Biotrockenmassekonzentration von $0,8 \text{ g L}^{-1}$ erzielt wurde (siehe Abbildung 6-13). Im Folgenden wurde durch Kopplung der Biokatalysatorherstellung und Biotransformation im kontinuierlichen System mit totaler Zellrückhaltung eine höhere Zelldichte bereitgestellt, was

das Einstellen einer höheren Durchflussrate bei einer niedrigen Eduktkonzentration im Zulauf von $c_{E,zu} < 75 \text{ g L}^{-1}$ ermöglichen sollte.

6.5 Kopplung von Biokatalysatorherstellung und Biotransformation im kontinuierlichen System mit totaler Zellrückhaltung

6.5.1 Verwendung des getauchten Hohlfasermembranmoduls

Durch kontinuierliche Prozessführung mit totaler Zellrückhaltung wurde die Zellherstellung mit der Biotransformation gekoppelt. Dies erfolgte zunächst mit getauchtem Hohlfasermembranmodul (siehe Abschnitt 4.3.4). Dazu wurde die Biokatalysatorherstellung mit einer Durchflussrate $D = 0,16 \text{ h}^{-1}$ ($\tau = 6,25 \text{ h}$) unter Nutzung des Komplexmediums zur Biokatalysatorbereitstellung (siehe Tabelle 4-3) mit einer Mannitolkonzentration von 50 g L^{-1} über 27,4 h durchgeführt. Durch Wechsel des Zulaufmediums zum Phosphatpuffer mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (siehe Tabelle 4-5, Medium B) und einer *meso*-Erythritolkonzentration von 50 g L^{-1} wurde die Biotransformation mit einer Durchflussrate $D = 0,16 \text{ h}^{-1}$ bei pH 6 gestartet. Abbildung 6-23 zeigt den zeitlichen Verlauf der resultierenden *meso*-Erythritol-, L-Erythulose- und Biotrockenmassekonzentrationen, der Sauerstoffaufnahme- und CO_2 -Bildungsrate sowie der Raum-Zeit-Ausbeute und des Sauerstoffpartialdrucks.

In der ersten Phase war es möglich, eine Biotrockenmassekonzentration von $7,6 \text{ g L}^{-1}$ bis zu Beginn der Biotransformation nach 27,4 h zu erreichen. Die Biotrockenmassekonzentration stieg in der Folge aufgrund der noch vorhandenen Komplexmedienbestandteile auf $8,4 \text{ g L}^{-1}$ nach 30,4 h an und blieb dann konstant im Verlauf der weiteren Biotransformation. Die weitere Wachstumsphase nach Start der Biotransformation zwischen 27,4 h und 32 h wird nicht nur durch den Anstieg der Biotrockenmassekonzentration verdeutlicht, sondern auch durch die CO_2 -Bildungsrate, da diese ab 32 h einen Wert nahe Null erreichte. Bei dieser Biotransformation wurde ein vollständiger Eduktumsatz erzielt, was anhand der nicht messbaren *meso*-Erythritolkonzentration zu erkennen ist. Gleichzeitig wurde eine maximale L-Erythulosekonzentration von 45 g L^{-1} erhalten. Im Gleichgewichtszustand entsprach dies einer Raum-Zeit-Ausbeute von $7 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Anhand des Sauerstoffpartialdrucks, der durchgehend über 20 % Luftsättigung durch Erhöhung der Rührerdrehzahl gehalten wurde, wurde deutlich, dass bei dieser Biokatalysatorkonzentration und Durchflussrate keine Sauerstofflimitierung auftritt. Aufgrund der Tatsache, dass mit dieser Biokatalysatorkonzentration theoretisch zwar eine deutlich höhere Raum-Zeit-Ausbeute möglich gewesen wäre, was jedoch nicht durch die Steigerung der Eduktkonzentration im

Zulauf aufgrund der sonst eintretenden Produktinhibierung möglich war, musste die Durchflussrate weiter erhöht werden. Da dies bei Verwendung des getauchten Hohlfasermembranmoduls nicht möglich war, wurde ein externes Hohlfasermembranmodul mit einer 8,4-fach größeren spezifischen Membranfläche verwendet.

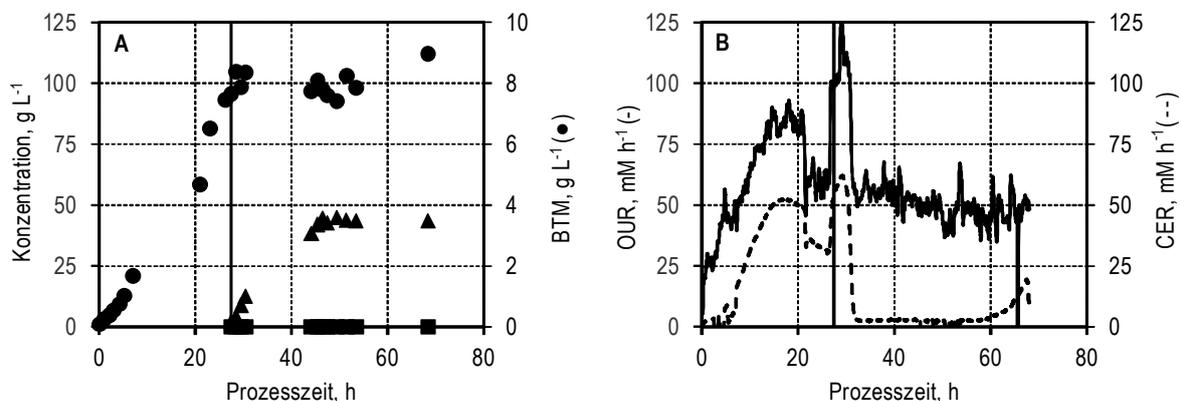


Abbildung 6-23: Kopplung von Biokatalysatorbereitstellung und Biotransformation unter Verwendung eines kontinuierlichen Systems mit totaler Zellrückhaltung mit getauchtem Hohlfasermembranmodul bei einer Durchflussrate $D = 0,16 \text{ h}^{-1}$. **A:** Biotrockenmasse (●), *meso*-Erythritol (■) sowie L-Erythrosekonzentration (▲); **B:** Sauerstoffaufnahme (OUR) (-) und CO₂-Bildungsrate (CER) (- -). Der Beginn der Biotransformation nach 27,4 h ist durch den vertikalen schwarzen Balken gekennzeichnet ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6$; $P V^{-1} = 28 \text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{zu}} = 2 \text{ vvm}$, $V_R = 1 \text{ L}$, $c_{E,\text{zu}} = 50 \text{ g L}^{-1}$, *G. oxydans* 621H BP.8, Medium B).

6.5.2 Verwendung des externen Querstromfiltrationsmoduls

Bei Verwendung des internen getauchten Hohlfasermembranmoduls konnte eine Durchflussrate von $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ bei einer Biotrockenmassekonzentration von 8 g L^{-1} nicht aufrechterhalten werden, sondern es trat eine Verblockung der Membran auf. Daher wurde der Rührkesselreaktor um ein externes Querstromfiltrationsmodul ergänzt, womit aufgrund der 8,4-fach höheren spezifischen Membranfläche höhere Durchflussraten eingestellt werden konnten (siehe Abschnitt 4.3.4). Die Bereitstellung der Zellen erfolgte mit einer Durchflussrate $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ ($\tau = 5,00 \text{ h}$) unter Nutzung des Komplexmediums zur Biokatalysatorbereitstellung (siehe Tabelle 4-3) mit einer Mannitolkonzentration von 50 g L^{-1} für 23 h ($4,6 \tau$). Anschließend wurde mit derselben Durchflussrate die Biotransformation durch Wechsel des Zulaufmediums vom Medium zur Zellherstellung zum Phosphatpuffer mit Ca^{2+} und Mg^{2+} mit 50 g L^{-1} *meso*-Erythritol (siehe Tabelle 4-5) gestartet. Nach $5,9 \tau$ wurde die Durchflussrate auf $D = 0,3 \text{ h}^{-1}$ und nach weiteren 6τ wurde sie auf $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ erhöht. Abbildung 6-24 zeigt den zeitlichen Verlauf der resultierenden *meso*-Erythritol-, L-Erythulose- und Biotrockenmassekonzentrationen, der Sauerstoffaufnahme- und CO_2 -Bildungsrate sowie der Raum-Zeit-Ausbeute und des Sauerstoffpartialdrucks.

Im Rahmen der Biokatalysatorbereitstellung wurde eine Biotrockenmassekonzentration von $12,6 \text{ g L}^{-1}$ nach 23 h erzielt und die Biotransformation wurde mit dieser Biokatalysatorkonzentration gestartet. Im Anschluss fand wie bei Verwendung des getauchten Hohlfasermembranmoduls weiterhin Wachstum statt, was durch die Zunahme der Biotrockenmassekonzentration sowie durch die CO_2 -Bildungsrate, die erst 5 h nach Start der Biotransformation einen Wert nahe Null erreichte, verdeutlicht wurde. Zu diesem Zeitpunkt wurde auch die maximale Biotrockenmassekonzentration von $14,9 \text{ g L}^{-1}$ erreicht, die jedoch im weiteren Verlauf aufgrund der Probenahmen bis zu einer Konzentration von $12,4 \text{ g L}^{-1}$ abnahm. Bei allen drei Durchflussraten von $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$, $D = 0,3 \text{ h}^{-1}$ und $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ während der Biotransformation konnte anhand der *meso*-Erythritolkonzentration von maximal $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ein vollständiger Eduktumsatz erzielt werden. Aufgrund der Eduktkonzentration im Zulauf von 55 g L^{-1} ab einer Durchflussrate von $D = 0,3 \text{ h}^{-1}$ war eine maximale L-Erythulosekonzentration von 54 g L^{-1} messbar. Bei einer Durchflussrate von $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ entspricht dies im Fließgleichgewicht einer Raum-Zeit-Ausbeute von $27 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Die Sauerstoffaufnahme nahm entsprechend mit steigender Durchflussrate zu, blieb aber während der jeweiligen Durchflussrate konstant und nahm nicht ab. So wurden annähernd konstante Sauerstoffaufnahmeleistungen von 55 mM h^{-1} ($D = 0,2 \text{ h}^{-1}$), 75 mM h^{-1} ($D = 0,3 \text{ h}^{-1}$) und 110 mM h^{-1} ($D = 0,5 \text{ h}^{-1}$) erreicht. Anhand des Sauerstoffpartialdrucks von 28 % Luftsättigung bei

maximalem volumetrischem Leistungseintrag war ersichtlich, dass eine weitere Steigerung der Durchflussrate bei maximalen Sauerstoffeintrag möglich wäre. Allerdings konnte die Durchflussrate mit diesem Reaktoraufbau nicht weiter gesteigert werden.

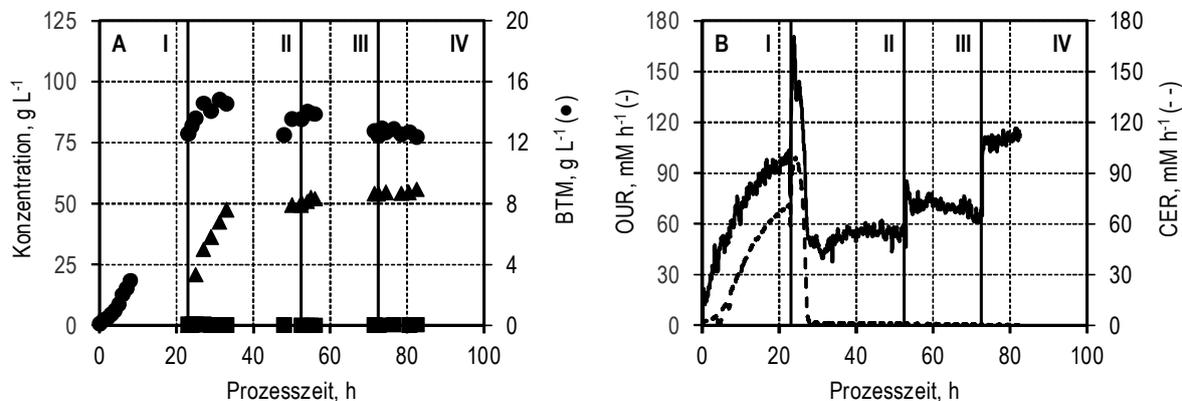


Abbildung 6-24: Kopplung von Biokatalysatorbereitstellung und Biotransformation im kontinuierlichen Betrieb mit totaler Zellrückhaltung unter Verwendung eines externen Hohlfasermembranmoduls. **A:** Biotrockenmasse- (●), *meso*-Erythritol- (■) sowie L-Erythrosekonzentration (▲); **B:** Sauerstoffaufnahme (OUR) (-) und CO₂-Bildungsrate (CER) (- -). Biokatalysatorherstellung mit $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ (I) und Biokonversion erfolgte mit $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ (II), $D = 0,3 \text{ h}^{-1}$ (III) und $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ (IV) ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6$; $P \text{ V}^{-1} = 28 \text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{zu}} = 2 \text{ vvm}$, $V_{\text{R}} = 1 \text{ L}$, $c_{\text{E,zu}} = 50 \text{ -} 55 \text{ g L}^{-1}$, *G. oxydans* 621H BP.8).

Diskussion

Durch Verwendung eines kontinuierlichen Systems mit totaler Zellrückhaltung konnte durch Anlegen einer Durchflussrate von $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ mit einer *meso*-Erythritolkonzentration von 55 g L^{-1} eine Raum-Zeit-Ausbeute von $27 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht werden. Die Raum-Zeit-Ausbeute von $1,6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ der Zulaufprozesse mit *G. oxydans* DSM21030 (Vorlop *et al.* 2009) sowie $6,5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ mit *G. kondonii* (Pan *et al.* 2016) wurde im kontinuierlichen Verfahren mit Zellrückhaltung übertroffen. In einem kontinuierlichen System, bei dem das Enzym Transketolase immobilisiert wurde und die L-Erythrose Herstellung aus den Edukten β -Hydroxypyruvat und Glycolaldehyd erfolgte, war die Raum-Zeit-Ausbeute mit $1,9 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 14-fach niedriger (Bongs *et al.* 1997). Eine höhere Raum-Zeit-Ausbeute konnten Wei *et al.* (2018) mit rekombinanter Expression der nativen Transketolase in *P. pastoris* mit $46,6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreichen. Allerdings wurde eine knapp vierfach höhere Zellkonzentration von $41,8 \text{ g L}^{-1}$ eingesetzt, weshalb der zellspezifische Produktertrag mit $2,2 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1}$ niedriger als der zellspezifische Produktertrag im kontinuierlichen Verfahren mit totaler Zellrückhaltung von

4,4 g_P g_X⁻¹ ist. Neben der hohen Raum-Zeit-Ausbeute im kontinuierlichen Verfahren aufgrund der Überwindung der Substratüberschussinhibierung konnte gezeigt werden, dass die Biotransformation über mindestens 60 h stabil erfolgte und damit weniger Zeitverluste in Folge von Totzeiten wie bei den Satzprozessen während der Rüstphasen auftraten.

7 Reaktionstechnische Charakterisierung der 5-Ketogluconat Herstellung mit *G. oxydans*

7.1 Selektion verschiedener Multideletionsstämmen

7.1.1 Einstufige Biotransformation von Gluconat zu 5-Ketogluconat

Zunächst wurde der zweite Oxidationsschritt von Gluconat zu 5-Ketogluconat mit verschiedenen genetischen Multideletionsstämmen untersucht. Neben dem Wildtypstamm *G. oxydans* 621H wurden Multideletionsstämmen - basierend auf *G. oxydans* 621H BP.9 - eingesetzt, bei welchen die Gene der Polyol-Dehydrogenase plasmidbasiert unter Kontrolle des Promotors der Alkohol-Dehydrogenase exprimiert wurden. Das Gen der membranständigen Glucose-Dehydrogenase wurde entweder unter Kontrolle des nativen Promotors (*G. oxydans* 621H BP.9 pADH:*sldAB*-pGDH:*gdh* und *G. oxydans* 621H BP.9 pADH:*sldAB*-pLGDH:*gdh*) oder unter Kontrolle des Promotors der Gluconat-2-Dehydrogenase (*G. oxydans* 621H BP.9 pADH:*sldAB*-pG2DH:*gdh* und *G. oxydans* 621H BP.9 pADH:*sldAB*-pLG2DH:*gdh*) exprimiert. Darüber hinaus wurden chromosomale Multideletionsstämmen - basierend auf *G. oxydans* 621H BP.8 - untersucht. Bei diesen wurde zum einen die membranassoziierte Glucose-Dehydrogenase chromosomal in den nativen Locus re-integriert (*G. oxydans* 621H BP.8 Δ *gdh*::*gdh*) und zum anderen die Gene der Glucose-Dehydrogenase des Stamms *G. oxydans* DSM 3504 in den Locus der membranständigen Alkohol-Dehydrogenase eingebracht (*G. oxydans* 621H BP.8 Δ *adh*::*gdh*_{DSM3504}).

Die einstufige Biotransformation erfolgte im Milliliter-Maßstab ohne pH-Regelung, da bei dieser Biokonversion in Vorversuchen keine Änderung des pH festgestellt wurde. Hierbei wurde der

in Abschnitt 6.2.1 entwickelte Phosphatpuffer mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (Medium B, siehe Tabelle 4-5) und 8 g L^{-1} Gluconat bei pH 5 verwendet. Die Rührerdrehzahl wurde auf 2.200 rpm eingestellt, um einen ausreichenden Sauerstoffeintrag zu gewährleisten. Abbildung 7-1 zeigt den zeitlichen Verlauf der resultierenden 5-Ketogluconatkonzentrationen, die mit verschiedenen Multideletionsstämmen innerhalb von 24 h erzielt wurden.

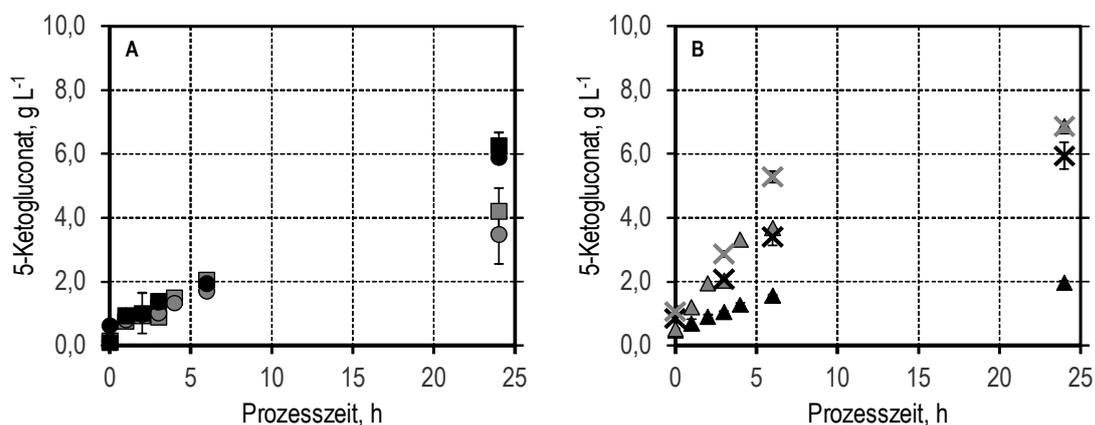


Abbildung 7-1: Zeitlicher Verlauf der 5-Ketogluconatbildung mit verschiedenen Stämmen mit plasmidbasierter Expression der Polyol- und Glucose-Dehydrogenase (A) (*G. oxydans* 621H BP.9 pGDH:*gdh*-pADH:*sldAB* (■), *G. oxydans* 621H BP.9 pLGDH:*gdh*-pADH:*sldAB* (●), *G. oxydans* 621H BP.9 pG2DH:*gdh*-pADH:*sldAB* (■), *G. oxydans* 621H BP.9 pLG2DH:*gdh*-pADH:*sldAB* (●)) und mit chromosomaler (Re-)Integration der Gene der Polyol- und Glucose-Dehydrogenase (B) (*G. oxydans* 621H (▲), *G. oxydans* 621H BP.8 (▲), *G. oxydans* 621H BP.8 $\Delta\text{gdh}::\text{gdh}$ (x), *G. oxydans* 621H BP.8 $\Delta\text{adh}::\text{mgdh}_{3504}$ (x)) (T = 30 °C, initialer pH 5; P V^{-1} = 6,5 W L^{-1} , F_{Luft} = 8,3 vvm, V_{R} = 12 mL, $c_{\text{X},0}$ = 0,2 g L^{-1} , Medium B, drei biologische Replikate).

Die 5-Ketogluconatkonzentrationen im Verlauf der Prozesszeit zeigten, dass Unterschiede hinsichtlich der Oxidation von Gluconat zu 5-Ketogluconat auftraten. So zeigte der Wildtypstamm mit einer 5-Ketogluconatkonzentration von $2,0 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$ nach 24 h die geringste Produktkonzentration. Mit den Multideletionsstämmen *G. oxydans* 621H BP.9 pADH:*sldAB*-pG2DH:*gdh* und *G. oxydans* 621H BP.9 pADH:*sldAB*-pLG2DH:*gdh* wurden Produktkonzentrationen von $4,2 \pm 0,7 \text{ g L}^{-1}$ und $3,5 \pm 0,9 \text{ g L}^{-1}$ nach 24 h und mit den Stämmen *G. oxydans* 621H BP.9 pADH:*sldAB*-pGDH:*gdh* sowie *G. oxydans* 621H BP.9 pADH:*sldAB*-pLGDH:*gdh* wurden Produktkonzentrationen von $6,3 \pm 0,4 \text{ g L}^{-1}$ und $5,9 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$ 5-Ketogluconat erzielt.

Bei Biokonversionen mit den Stämmen, bei welchen die Glucose- und Polyol-Dehydrogenase im Chromosom integriert vorliegen, war es möglich, $5,9 \pm 0,4 \text{ g L}^{-1}$ (*G. oxydans* 621H BP.8 $\Delta\text{gdh}::\text{gdh}$) sowie $6,9 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$ (*G. oxydans* 621H BP.8 $\Delta\text{adh}::\text{gdh}_{\text{DSM3504}}$) 5-Ketogluconat nach 24 h herzustellen. Mit dem Multideletionsstamm ohne Expression der Glucose-Dehydrogenase (*G. oxydans* 621H BP.8) wurden ebenso $6,9 \pm 0,6 \text{ g L}^{-1}$ 5-Ketogluconat nach 24 h erhalten. In Abhängigkeit von der eingesetzten Biotrockenmassekonzentration konnten die zellspezifischen Produkterträge nach 24 h ermittelt werden (siehe Abbildung 7-2). Diese lagen zwischen $10 \pm 0,5 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1}$ (*G. oxydans* 621H) und $31 \pm 1 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1}$ (*G. oxydans* 621H BP.8 $\Delta\text{adh}::\text{gdh}_{\text{DSM3504}}$).

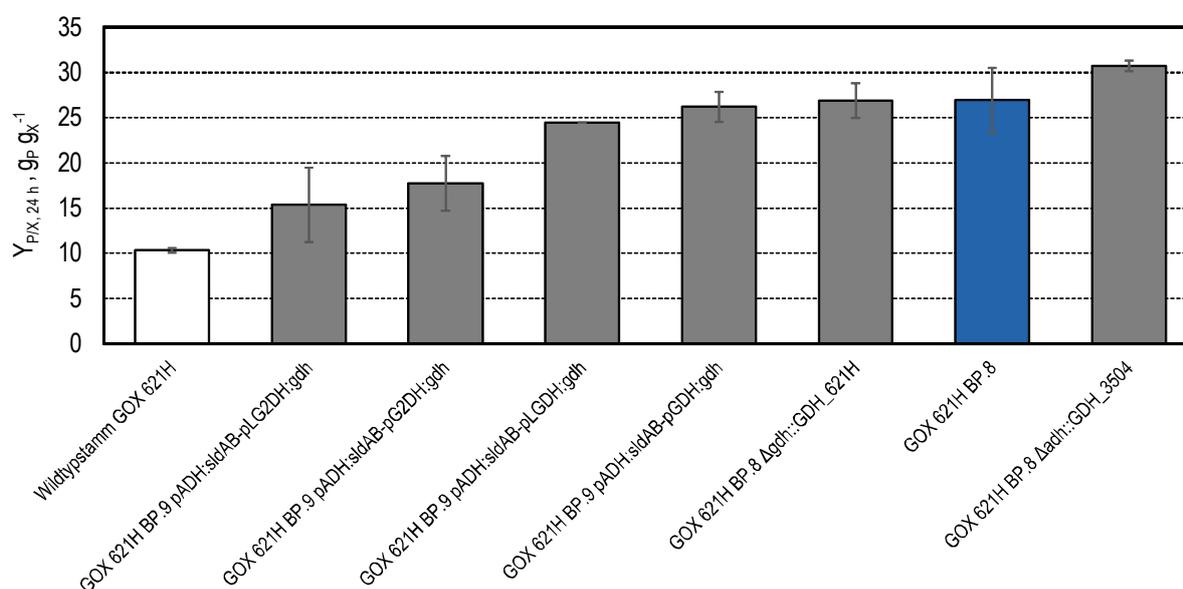


Abbildung 7-2: Zellspezifischen Produkterträge nach 24 h bei einstufiger Oxidation von Gluconat zu 5-Ketogluconat mit verschiedenen Stämmen: Wildtypstamm (weiß), *G. oxydans* 621H BP.8 (blau) und die Multideletionsstämme mit Expression der Glucose- und Polyol-Dehydrogenase (grau) (T = 30 °C, initialer pH 5; P V⁻¹ = 6,5 W L⁻¹, F_{Luft} = 8,3 vvm, V_R = 12 mL, c_{X,0} = 0,2 g L⁻¹, Medium B drei biologische Replikate).

Diskussion

Anhand der gebildeten Produktkonzentrationen sowie der zellspezifischen Produkterträge ist zu erkennen, dass die Expressionskontrolle der Glucose-Dehydrogenase einen Einfluss auf die Oxidation von Gluconat zu 5-Ketogluconat hatte. So waren bei plasmidbasierter Expression der Glucose-Dehydrogenase unter Kontrolle des Promotors Gluconat-2-Dehydrogenase geringere zellspezifische 5-Ketogluconaterträge von $15 \pm 4 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1}$ (*G. oxydans* 621H BP.9 pADH:sldAB-pLG2DH:gdh) sowie $18 \pm 3 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1}$

(*G. oxydans* 621H BP.9 pADH:*sldAB*-pG2DH:*gdh*) zu verzeichnen als mit Stämmen, bei denen die Glucose-Dehydrogenase plasmidbasiert unter Kontrolle des nativen Promotors exprimiert wurde. Mit Letzteren wurden zellspezifische Produkterträge von $24 \pm 1 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1}$ (*G. oxydans* 621H BP.9 pADH:*sldAB*-pGDH:*gdh*) und $26 \pm 2 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1}$ (*G. oxydans* 621H BP.9 pADH:*sldAB*-pLGDH:*gdh*) nach 24 h erzielt. Obwohl bei all diesen Multideletionsstämmen die Expression der Gene der Polyol-Dehydrogenase unter der Kontrolle des Promotors der Alkohol-Dehydrogenase erfolgte, zeigten diese unterschiedliche zellspezifische Produkterträge nach 24 h. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Kontrolle der Expression der Glucose-Dehydrogenase einen indirekten Einfluss hat. So könnte eine veränderte Expression der Glucose-Dehydrogenase das Verhältnis zur Polyol-Dehydrogenase in der Membran verändern und somit die Aktivität gegenüber Gluconat beeinflussen. Dies stimmt insofern mit den Erkenntnissen aus Abschnitt 6.1.1 überein, als dass mit dem rekombinanten Biokatalysator mit dem Promotor der Gluconat-2-Dehydrogenase die höchste zellspezifische L-Erythruloseerträge erreicht wurde. Dies würde bedeuten, dass in eine starke Expression der Glucose-Dehydrogenase erfolgte. Dies könnte eine geringere Expressionsrate der Polyol-Dehydrogenase zur Folge haben und daher zu geringeren 5-Ketogluconatausbeuten führen.

Bei dem Multideletionsstamm *G. oxydans* BP.8 wurde keine Glucose-Dehydrogenase exprimiert, weshalb hypothetisch mit diesem der maximale zellspezifische 5-Ketogluconatertrag von $27 \pm 4 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1}$ erreicht werden sollte. Bei chromosomaler Insertion der Glucose-Dehydrogenase aus *G. oxydans* DSM3504 wurde ein ähnlicher zellspezifischer 5-Ketogluconatertrag von $31 \pm 1 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1}$ erreicht, was möglicherweise dafür spricht, dass diese Dehydrogenase nur in geringerem Maße integriert wurde und aus diesem Grund eine nicht messbare Reduktion der Oxidationsaktivität von Gluconat zu 5-Ketogluconat eintrat. Auffällig ist auch, dass bei der Oxidation von Gluconat zu 5-Ketogluconat erheblich geringere zellspezifische Produkterträge als bei der Oxidation von *meso*-Erythritol zu L-Erythrulose (siehe Abschnitt 6.1) erreicht wurden. So wurde unter vergleichbaren Prozessbedingungen für L-Erythrulose bereits nach 3 h ein zellspezifischer Produktertrag von $30 \pm 5 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1}$ mit *G. oxydans* 621H BP.8 erreicht, während bei Oxidation von Gluconat zu 5-Ketogluconat nach 3 h nur ein zellspezifischer Produktertrag von $9 \pm 1 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1}$ erzielt wurde. Auch Peters *et al.* (2013b) identifizierten unterschiedliche Aktivitäten von *G. oxydans* 621H BP.8 mit 139 μU gegenüber *meso*-Erythritol sowie mit 102 μU gegenüber Gluconat. Im folgenden Abschnitt wird die zweistufige Oxidation ausgehend von Glucose mit den Stämmen mit der höchsten Aktivität durchgeführt.

7.1.2 Zweistufige Biotransformation von Glucose zu 5-Ketogluconat mit Multideletionsstämmen

Die zweistufige Biotransformation von Glucose zu 5-Ketogluconat mit den Multideletionsstämmen *G. oxydans* 621H BP.9 pADH:*sldAB*-pGDH:*gdh*, *G. oxydans* 621H BP.8 Δ *gdh*::*gdh* sowie *G. oxydans* 621H BP.8 Δ *adh*::*gdh*_{DSM3504} wurde mit einer initialen Konzentration von 50 g L⁻¹ Glucose im Phosphatpuffer mit Ca²⁺ und Mg²⁺ (Medium B, siehe Tabelle 4-5) durchgeführt. Der Sauerstoffpartialdruck wurde durch Variation der Rührerdrehzahl (n = 500 – 852 rpm) auf mindestens 20 % Luftsättigung gehalten. Abbildung 7-3 zeigt die resultierenden Glucose-, Gluconat-, 5-Ketogluconat- und Biotrockenmassekonzentrationen sowie den zugehörigen Sauerstoffpartialdruck als Funktion der Prozesszeit.

Glucose wurde bei allen Multideletionsstämmen unmittelbar zu Gluconat oxidiert. Hierbei wurden Gluconatkonzentrationen von 32,1 g L⁻¹ nach 19 h (*G. oxydans* 621H BP.9 pGDH:*gdh*-pADH:*sldAB*) sowie bis zu 34,5 g L⁻¹ nach 6 h (*G. oxydans* 621H BP.8 Δ *gdh*::*mgdh* und *G. oxydans* 621H BP.8 Δ *adh*::*mgdh*₃₅₀₄) gemessen. Gluconat wurde in der Folge zu 5-Ketogluconat oxidiert. So wurden nach 46 h 5-Ketogluconatkonzentrationen zwischen 27 g L⁻¹ und 30 g L⁻¹ erreicht. Dabei wurde jeweils ein vollständiger Glucoseumsatz, allerdings kein vollständiger Gluconatumsatz erzielt. Nach 7,6 h (*G. oxydans* 621H BP.8 Δ *adh*::*gdh*_{DSM3504}) sowie 10 h (*G. oxydans* 621H BP.9 pADH:*sldAB*-pGDH:*gdh* und *G. oxydans* 621H BP.8 Δ *gdh*::*gdh*) war ein Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks zu verzeichnen. Die initiale Biotrockenmassekonzentration stieg von 0,2 g L⁻¹ auf mindestens 0,4 g L⁻¹ nach 20 h an.

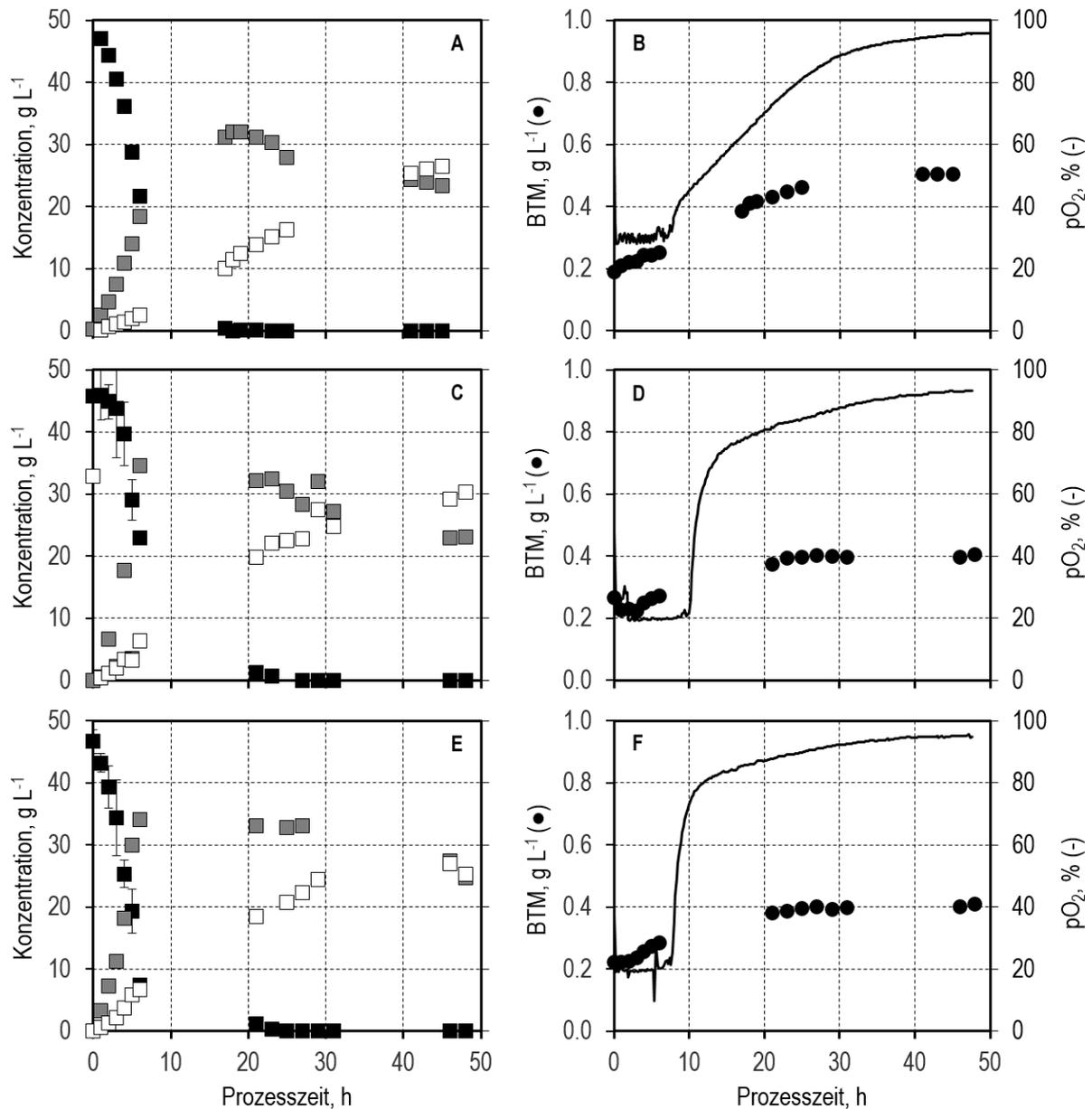


Abbildung 7-3: Zweistufige Oxidation von Glucose (■) zu 5-Ketogluconat (□) über Gluconat (■) mit drei unterschiedlichen Multideletionsstämmen (●): *G. oxydans* 621H BP.9 pGDH:gdh-pADH:sldAB (A / B), *G. oxydans* 621H BP.8 Δgdh::gdh (C / D), *G. oxydans* 621H BP.8 Δadh::mgdh₃₅₀₄ (E / F) (T = 30 °C, pH 4; P V⁻¹_{max} = 5 W L⁻¹, F_{Luft} = 3 vvm, V_R = 0,7 L, c_{E,0} = 50 g L⁻¹, c_{X,0} = 0,2 g L⁻¹, Medium B).

Diskussion

Anhand der Konzentrationsverläufe zeigte sich, dass mit allen Multideletionsstämmen die zweistufige Oxidation erfolgreich war. Hierbei konnten mit einer initialen Konzentration von $0,2 \text{ g L}^{-1}$ Biotrockenmasse 5-Ketogluconatkonzentrationen zwischen 27 g L^{-1} und 30 g L^{-1} erzielt werden. Das Edukt Glucose wurde zwar vollständig umgesetzt, aber das Intermediat Gluconat akkumulierte bis zu 27 g L^{-1} nach 45 h. Daher lag die 5-Ketogluconatausbeute bei den drei Multideletionsstämmen zwischen 50 % und 60 %. Diese Ausbeuten liegen im Bereich der von Merfort *et al.* (2006a) erreichten Ausbeute von 54 %, wobei eine höhere 5-Ketogluconatkonzentration von 54 g L^{-1} nach 90 h erreicht wurde.

Die zellspezifische Glucoseverbrauchsrate wurde durch lineare Regression der Glucosekonzentration nach einer Adaptionphase von 2 h berechnet. Es ergaben sich zellspezifische Eduktverbrauchsrate von $29 \pm 7 \text{ g}_E \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ (*G. oxydans* 621H BP.8 $\Delta adh::mgdh_{3504}$), $24 \pm 7 \text{ g}_E \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ (*G. oxydans* 621H BP.8 $\Delta gdh::gdh$) und $24 \pm 3 \text{ g}_E \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ (*G. oxydans* 621H BP.9 pADH:sldAB-pGDH:gdh). Die zellspezifischen Eduktverbrauchsrate wiesen somit keine signifikanten Unterschiede auf. Daraus wurde geschlossen, dass die Expression der Glucose-Dehydrogenase unabhängig vom Loci der Gene erfolgte. Auch schien die Expression der Glucose-Dehydrogenase aus *G. oxydans* DSM 3504 ebenfalls keinen Vorteil zu bringen.

Aufgrund der vorgeschalteten Gluconatbildung und dadurch verzögerten Bildung von 5-Ketogluconat wurde der Verlauf der 5-Ketogluconatkonzentrationen durch nicht-lineare Regression approximiert. Hierzu wurde eine sigmoidale Ausgleichsfunktion (siehe Gleichung 4-6) verwendet. Mit dem Differential dieser Regressionskurve war es möglich, den Verlauf der volumetrischen Produktbildungsrate zu ermitteln (Abbildung 7-4 D). Die Verläufe der volumetrischen Produktbildungsrate wiesen ein Maximum auf, weshalb die maximale spezifische Produktbildungsrate durch Division mit der Biotrockenmassekonzentration zum Zeitpunkt des Maximums berechnet werden konnte. Die Maxima der volumetrischen Produktbildungsrate lagen bei $1,1 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei Nutzung der Multideletionsstämme mit chromosomaler Integration der Gene für Glucose- und Polyol-Dehydrogenase (*G. oxydans* 621H BP.8 $\Delta gdh::mgdh$ und *G. oxydans* 621H BP.8 $\Delta adh::mgdh_{3504}$). Somit war diese etwa 20 % größer als bei Nutzung des Multideletionsstamms mit plasmidbasiertem Expressionssystem mit einer Rate von $0,9 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (*G. oxydans* 621H BP.9 pGDH:gdh-pADH:sldAB).

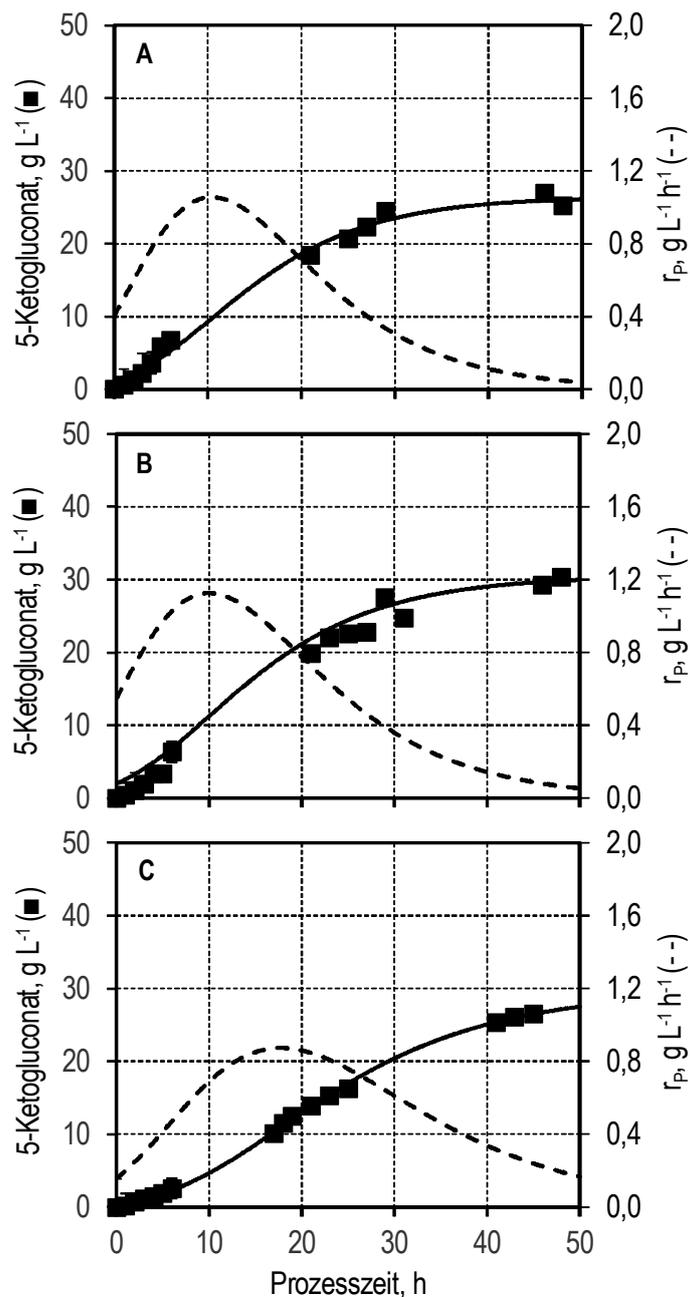


Abbildung 7-4: Verlauf der 5-Ketogluconatkonzentration (■) sowie der volumetrischen 5-Ketogluconatbildungsrate r_P (- -) bei zweistufiger Oxidation mit *G. oxydans* 621H BP.8 $\Delta adh::mgdh_{3504}$ (A), *G. oxydans* 621H BP.8 $\Delta gdh::mgdh$ (B), *G. oxydans* 621H BP.9 pGDH:*gdh*-pADH:*slcAB* (C) im Phosphatpuffer mit Ca^{2+} Zusätzen ($T = 30\text{ }^\circ\text{C}$, pH 4; $P V^{-1}_{max} = 5\text{ W L}^{-1}$, $F_{Luft} = 3\text{ vvm}$, $V_R = 0,7\text{ L}$, $c_{E,0} = 50\text{ g L}^{-1}$, $c_{X,0} = 0,2\text{ g L}^{-1}$, Medium B).

Nach Division durch die Biotrockenmassekonzentration ergaben sich maximale spezifische 5-Ketogluconatbildungsraten von $3,0 \pm 0,5 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ (*G. oxydans* 621H BP.8 $\Delta adh::mgdh_{3504}$), $3,3 \pm 0,6 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ (*G. oxydans* 621H BP.8 $\Delta gdh::mgdh$) sowie $2,1 \pm 0,1 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ (*G. oxydans* 621H BP.9 pGDH:*gdh*-pADH:*sldAB*) (siehe Abbildung 7-5). Somit wurde bei den Multideletionsstämmen mit chromosomaler Genintegration kein signifikanter Unterschied bei der Oxidation von Gluconat zu 5-Ketogluconat festgestellt. Dies stimmt mit den vergleichbaren integralen zellspezifischen Produktausbeuten aus Abschnitt 7.1.1 überein. Der Multideletionsstamm mit plasmidbasierter Genexpression wies mit $2,1 \pm 0,1 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ eine signifikant niedrigere maximale Produktbildungsrate von etwa 65 % der maximalen Rate der Stämme mit chromosomaler Genexpression auf und bestätigte damit die Resultate aus Abschnitt 7.1.1, dass die Herstellung von 5-Ketogluconat mit plasmidbasierender Expression langsamer erfolgte.

Auffällig ist, dass bei allen Stämmen die spezifische Verbrauchsrate von Glucose signifikant höher war als die 5-Ketogluconatbildungsrate. So war diese um den Faktor 7,2 (*G. oxydans* 621H BP.8 $\Delta gdh::mgdh$) bis 11,4 (*G. oxydans* 621H BP.9 pGDH:*gdh*-pADH:*sldAB*) größer als die spezifischen 5-Ketogluconatbildungsraten.

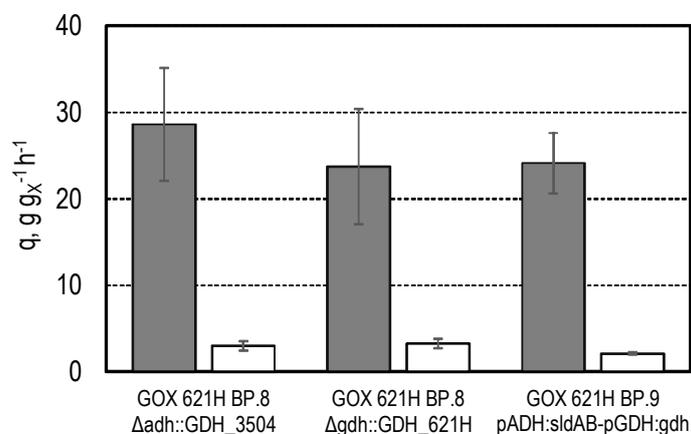


Abbildung 7-5: Durch lineare Regression ermittelte spezifische Glucoseverbrauchsraten (grau) sowie durch nicht-lineare Regression ermittelte spezifische 5-Ketogluconatbildungsrate (weiß) von den Multideletionsstämmen: *G. oxydans* 621H BP.8 $\Delta adh::mgdh_{3504}$, *G. oxydans* 621H BP.8 $\Delta gdh::mgdh$ und *G. oxydans* 621H BP.9 pGDH:*gdh*-pADH:*sldAB* (($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 4$; $P V^{-1}_{\text{max}} = 5 \text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 3 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_{E,0} = 50 \text{ g L}^{-1}$, $c_{X,0} = 0,2 \text{ g L}^{-1}$, Medium B).

7.1.3 Zweistufige Oxidation mit dem Wildtypstamm

Es wurde die 5-Ketogluconatherstellung mit einer initialen Biotrockenmassekonzentration von $0,2 \text{ g L}^{-1}$ des Wildtypstamms *G. oxydans* 621H sowie des Multideletionsstamms *G. oxydans* 621H BP.9 pGDH:*gdh*-pADH:*sldAB* im Liter-Maßstab untersucht. Hierbei wurden initial 24 g L^{-1} Glucose im Phosphatpuffer mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (Medium B, siehe Tabelle 4-5) bei pH 4 vorgelegt. Der Sauerstoffpartialdruck wurde durch Variation der Rührerdrehzahl ($n = 500 - 720 \text{ rpm}$) auf mindestens 20 % Luftsättigung gehalten, um einen ausreichenden Sauerstoffeintrag zu gewährleisten. Abbildung 7-6 zeigt den zeitlichen Verlauf der resultierenden Glucose-, Gluconat- und 5-Ketogluconatkonzentrationen.

Anhand der Konzentrationen ist zu erkennen, dass mit beiden Stämmen ein vollständiger Umsatz von knapp 24 g L^{-1} Glucose erfolgte. Aus dem gebildeten Gluconat erfolgte beim Wildtypstamm eine weitere Oxidation zu 5-Ketogluconat und zu 2-Ketogluconat. So wurden nach 24 h 7 g L^{-1} Gluconat, 8 g L^{-1} 5-Ketogluconat sowie 12 g L^{-1} 2-Ketogluconat gemessen. Demgegenüber war beim Multideletionsstamm keine 2-Ketogluconatbildung messbar und nach 24 h wurde eine 5-Ketogluconatkonzentration von 16 g L^{-1} bei verbleibenden 8 g L^{-1} Gluconat erzielt. Aufgrund der Nebenproduktbildung lag die Produktausbeute beim Wildtypstamm lediglich bei 31 %, während bei der Biotransformation mit *G. oxydans* 621H BP.9 pGDH:*gdh*-pADH:*sldAB* eine nahezu doppelt so hohe Produktausbeute von 61 % erreicht wurde.

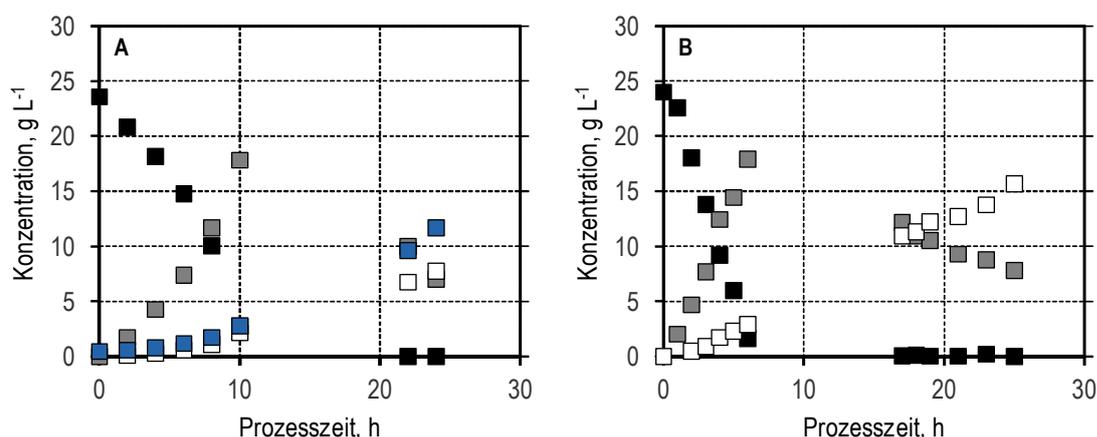


Abbildung 7-6: Zweistufige Oxidation von Glucose (■) zu 5-Ketogluconat (□) und 2-Ketogluconat (■) über Gluconat (■) bei Nutzung des Wildtypstamms *G. oxydans* 621H (A) und des Multideletionsstamms *G. oxydans* 621H BP.9 pGDH:*gdh*-pADH:*sldAB* (B). ($T = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 4; $P V^{-1}_{\text{max}} = 5 \text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 3 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_{E,0} = 24 \text{ g L}^{-1}$, $c_{X,0} = 0,2 \text{ g L}^{-1}$, Medium B).

Diskussion

Beim Wildtypstamm kann aufgrund der vorhandenen Gluconat-2-Dehydrogenase aus Gluconat auch 2-Ketogluconat gebildet werden (Shinagawa *et al.* 1984), was zur Nebenproduktbildung und damit zu einer reduzierten Produktausbeute führt. Daher wurden für die 5-Ketogluconatherstellung bereits verschiedene rekombinante *G. oxydans* Stämme in der Literatur beschrieben, bei welchen die Gluconat-2-Dehydrogenase deletiert wurde, um die Produktausbeute an 5-Ketogluconat zu steigern. So wurden unter optimierten Bedingungen Produktausbeuten von bis zu 84 % erzielt (Elfari *et al.* 2005). Deshalb wurden sämtliche Biotransformationen zur 5-Ketogluconatherstellung im Folgenden mit den Multideletionsstämmen durchgeführt.

7.2 pH

In diesem Abschnitt wird der Einfluss des pH sowohl auf den ersten Oxidationsschritt von Glucose zu Gluconat als auch auf den zweiten Oxidationsschritt von Gluconat zu 5-Ketogluconat untersucht. Die Glucoseoxidation wurde im Liter-Maßstab bei pH 3,5 – pH 6,0 mit einer initialen Glucosekonzentration von 25 g L^{-1} und einer initialen Biokatalysatorkonzentration von $0,2 \text{ g L}^{-1}$ in Medium B (siehe Tabelle 4-5) durchgeführt. Abbildung 7-7 zeigt die resultierenden Glucosekonzentrationen über die Prozesszeit. Die Glucosekonzentrationen im Verlauf der Prozesszeiten zeigten Unterschiede, so lagen diese nach 4 h bei $9,8 \text{ g L}^{-1}$ (pH 3,5), $9,6 \text{ g L}^{-1}$ (pH 4,0), $4,9 \text{ g L}^{-1}$ (pH 4,5), $3,3 \text{ g L}^{-1}$ (pH 5,0), $3,4 \text{ g L}^{-1}$ (pH 5,5) und $3,2 \text{ g L}^{-1}$ (pH 6,0).

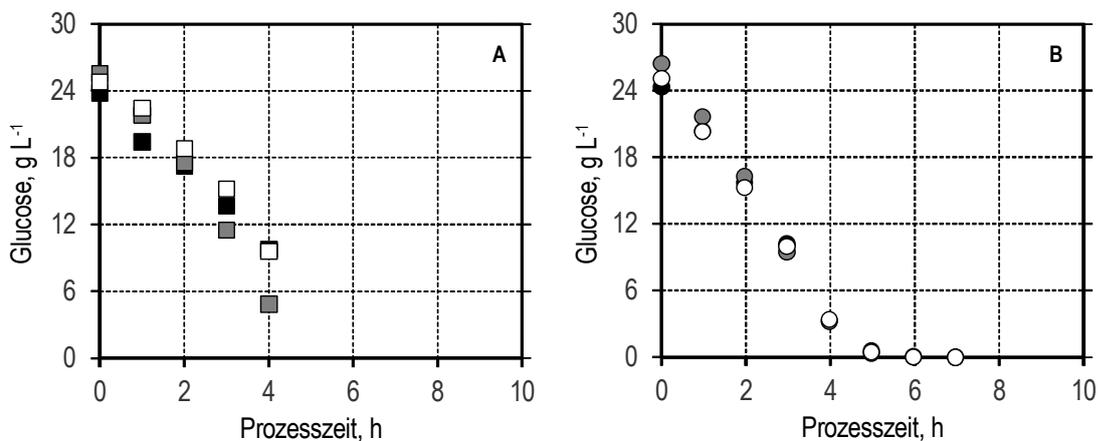


Abbildung 7-7: Oxidation von Glucose mit *G. oxydans* 621H BP.9 pGDH:*gdh*-pADH:*sldAB* bei pH 3,5 (■), pH 4,0 (□), pH 4,5 (▣), pH 5,0 (●), pH 5,5 (○) und pH 6,0 (◐) ($T = 30 \text{ °C}$; $P V^{-1}_{\max} = 5 \text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 3 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_{E,0} = 25 \text{ g L}^{-1}$, $c_{X,0} = 0,2 \text{ g L}^{-1}$, Medium B).

Die Oxidation von Gluconat zu 5-Ketogluconat wurde aufgrund der nicht erforderlichen pH-Regelung im Milliliter-Maßstab bei pH 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 und 7,0 mit einer initialen Gluconatkonzentration von 9 g L^{-1} und einer Biokatalysatorkonzentration von $0,1 \text{ g L}^{-1}$ durchgeführt. Abbildung 7-8 resultierenden Gluconatkonzentrationen als Funktion der Prozesszeit. Wie bereits in Abschnitt 7.1.2 dargelegt, verlief die zweite Oxidation deutlich langsamer. Daher wurden die verbleibenden Gluconatkonzentrationen nach 24 h miteinander verglichen und es konnten deutliche Unterschiede bei der verbleibenden Gluconatkonzentration in Abhängigkeit vom pH festgestellt werden: $5,5 \pm 0,6 \text{ g L}^{-1}$ (pH 3,0), $4,5 \pm 0,8 \text{ g L}^{-1}$ (pH 3,5), $0,8 \pm 0,3 \text{ g L}^{-1}$ (pH 4,0), $0,3 \text{ g L}^{-1}$ (pH 4,5), $1,2 \pm 0,3 \text{ g L}^{-1}$ (pH 5,0), $1,3 \pm 0,3 \text{ g L}^{-1}$ (pH 5,5), $2,2 \pm 0,7 \text{ g L}^{-1}$ (pH 6,0), $7,3 \pm 1,3 \text{ g L}^{-1}$ (pH 6,5) und $8,5 \pm 0,3 \text{ g L}^{-1}$ (pH 7,0).

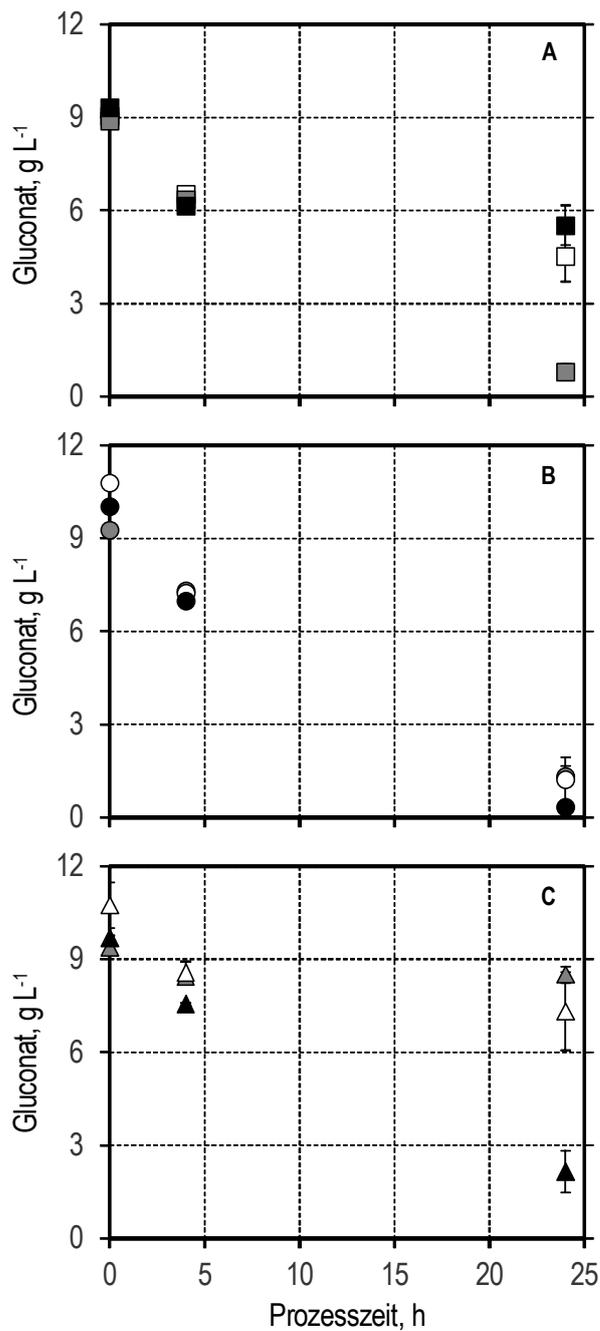


Abbildung 7-8: Oxidation von Gluconat mit *G. oxydans* 621H BP.9 pGDH:*gdh*-pADH:*sl**dAB* bei pH 3,0 (■), pH 3,5 (□), pH 4,0 (■), pH 4,5 (●), pH 5,0 (○), pH 5,5 (●), pH 6,0 (▲), pH 6,5 (Δ) und pH 7,0 (▲) ($T = 30\text{ °C}$; $P\ V^{-1} = 6,5\ \text{W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 8,3\ \text{vvm}$, $V_{\text{R}} = 12\ \text{mL}$, $c_{\text{E},0} = 9\ \text{g L}^{-1}$, $c_{\text{X},0} = 0,1\ \text{g L}^{-1}$, Medium B, drei biologische Replikate).

Diskussion

Bei der Oxidation von Glucose zu Gluconat wurde durch lineare Regression der Glucosekonzentrationen während der ersten 4 h und Division durch die Biotrockenmassekonzentration die zellspezifische Glucoseverbrauchsrate berechnet. Zwischen pH 3,5 und 6,0 wurde eine Zunahme der zellspezifischen Glucoseverbrauchsrate von $18 \pm 3 \text{ g}_E \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ (pH 3,5) auf $25 \pm 5 \text{ g}_E \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ (pH 6,0) beobachtet (siehe Abbildung 7-9 A). Allerdings ist auch ersichtlich, dass mit einem Signifikanzniveau von 95 % der pH keinen signifikanten Einfluss auf die zellspezifische Glucoseverbrauchsrate zwischen pH 4 und pH 6 besitzt. Diese Ergebnisse zeigten somit ein ähnliches pH Aktivitätsspektrum wie von Ameyama *et al.* (1981) mit Membranfraktionen beschrieben wurde. Dieser konnte nachweisen, dass das pH Optimum bei pH 6 lag, aber ein sehr breites Aktivitätsspektrum aufwies. So konnten noch 25 % der maximalen Enzymaktivität bei pH 3 und 8 gemessen werden.

Bezüglich des Gluconatumsatzes mit der Polyol-Dehydrogenase wurden die Umsätze nach 24 h miteinander verglichen und festgestellt, dass der höchste Gluconatumsatz mit nahezu 97 % bei pH 4,5 erreicht wurde. Allerdings wurde zwischen pH 6 mit einem Gluconatumsatz von $78 \pm 7 \%$ und pH 4 mit einem Gluconatumsatz von $91 \pm 3 \%$ ein Bereich identifiziert, innerhalb dessen hohe Umsätze erzielt wurden. Außerhalb dessen sank der Umsatz auf unter $32 \pm 13 \%$ (pH 6,5) sowie $50 \pm 9 \%$ (pH 3,5) (siehe Abbildung 7-9 B). Somit liegt der von Silberbach *et al.* (2003) angegebene optimale pH von pH 4,8 bei Prozessen mit wachsenden Zellen in einem ähnlichen optimalen pH Bereich wie bei Biotransformationen mit ruhenden Zellen im Phosphatpuffer mit Ca^{2+} und Mg^{2+} . Es zeigte sich zwar ein ähnliches Aktivitätsspektrum der Polyol-Dehydrogenase wie gegenüber dem Edukt *meso*-Erythritol (siehe Abschnitt 6.2.2), jedoch lag hier das Optimum bei pH 6. Der pK_S von Gluconsäure liegt bei 3,7 (Ramachandran *et al.* 2006), was ein Grund dafür sein könnte, dass unterhalb pH 3,7 eine Reduktion des Umsatzes erfolgt, da ein größerer Teil des Gluconats protoniert vorliegt. Die weiteren Biotransformationen wurden aufgrund der vergleichsweise hohen Aktivität der Gluconatoxidation bei pH 4 durchgeführt.

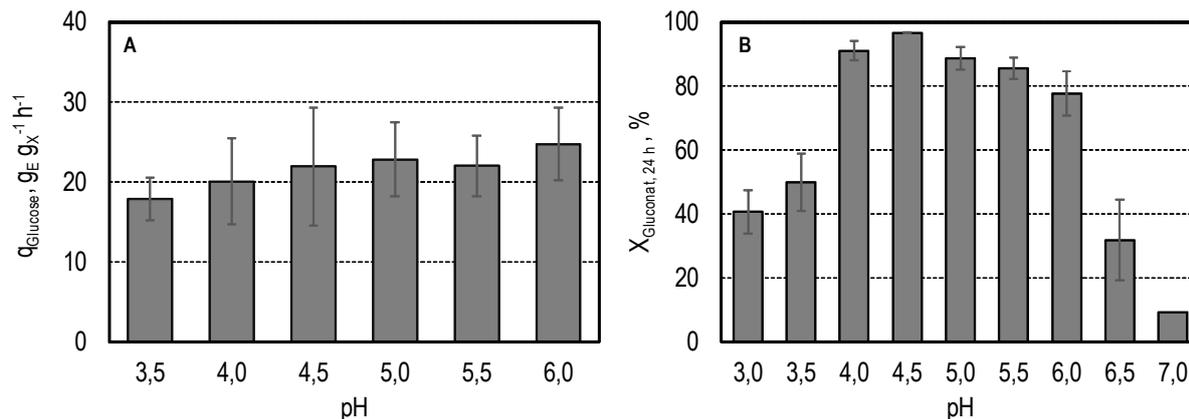


Abbildung 7-9: Abhängigkeit der spezifischen Glucoseverbrauchsrate (A) sowie des Gluconatumsatzes nach 24 h (B) in Abhängigkeit vom pH bei Nutzung von *G. oxydans* 621H BP.9 pGDH:*gdh*-pADH:*sldAB*.

7.3 Eduktkonzentration

Im Folgenden wurde der Einfluss der Glucosekonzentration im Phosphatpuffer mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (Medium B, siehe Tabelle 4-5) bei pH 4 auf die zweistufige Oxidation überprüft. Hierzu wurden verschiedene Glucosekonzentrationen von 25 g L^{-1} , 50 g L^{-1} , 75 g L^{-1} sowie 104 g L^{-1} initial im Satzverfahren vorgelegt und die Biotransformationen erfolgten im Liter-Maßstab. Der Sauerstoffpartialdruck wurde durch Variation der Rührerdrehzahl ($n = 500 - 766 \text{ rpm}$) auf mindestens 20 % Luftsättigung gehalten, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Abbildung 7-10 zeigt die resultierenden Glucose-, Gluconat-, 5-Ketogluconat- und Biotrockenmassekonzentrationen sowie den zugehörigen Sauerstoffpartialdruck und die Rührerdrehzahl über die Prozesszeit.

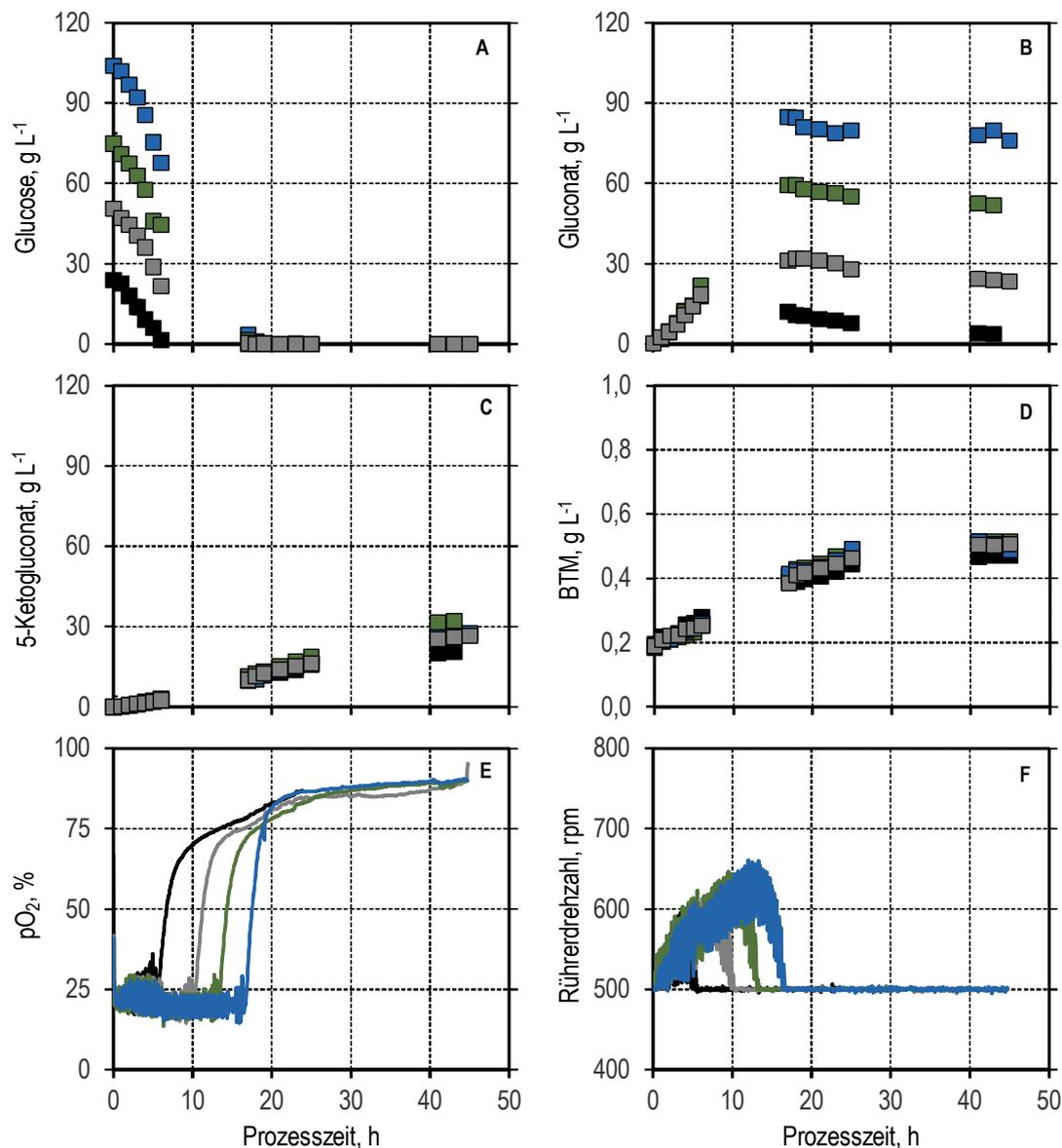


Abbildung 7-10: Zweistufige Oxidation von Glucose (A) zu 5-Ketogluconat (C) über Gluconat (B) bei unterschiedlichen initialen Glucosekonzentrationen von 25 g L^{-1} (■), 50 g L^{-1} (■), 75 g L^{-1} (■) sowie 104 g L^{-1} (■) mit *G. oxydans* 621H BP.9 pGDH:gdh-pADH:s/dAB (D). Der Sauerstoffpartialdruck (E) wurde durch Variation der Rührerdrehzahl (F) auf mindestens 20 % Luftsättigung gehalten ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$; $P V_{\text{max}}^{-1} = 5 \text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 3 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_{X,0} = 0,2 \text{ g L}^{-1}$, Medium B).

Unabhängig von der initialen Konzentration wurde Glucose im Zuge der Biotransformation vollständig umgesetzt, da spätestens nach 17 h ($c_{E,0} = 25 \text{ g L}^{-1}$ und $c_{E,0} = 50 \text{ g L}^{-1}$), 18 h ($c_{E,0} = 75 \text{ g L}^{-1}$) sowie nach 19 h ($c_{E,0} = 104 \text{ g L}^{-1}$) die Glucosekonzentration unterhalb der Nachweisgrenze von $0,5 \text{ g L}^{-1}$ war. Das durch Oxidation der Glucose gebildete Gluconat wurde

teilweise zu 5-Ketogluconat oxidiert. Unabhängig von der initialen Glucosekonzentration wurden ähnliche 5-Ketogluconatkonzentrationen von 21 g L^{-1} ($c_{E,0} = 25 \text{ g L}^{-1}$), 26 g L^{-1} ($c_{E,0} = 50 \text{ g L}^{-1}$), 32 g L^{-1} ($c_{E,0} = 75 \text{ g L}^{-1}$) sowie 28 g L^{-1} ($c_{E,0} = 104 \text{ g L}^{-1}$) nach jeweils 45 h erzielt. Dies führte zur Reduktion der 5-Ketogluconatausbeute mit zunehmender Glucosekonzentration von 84 % ($c_{E,0} = 25 \text{ g L}^{-1}$) auf 47 % ($c_{E,0} = 50 \text{ g L}^{-1}$), 40 % ($c_{E,0} = 75 \text{ g L}^{-1}$) sowie 25 % ($c_{E,0} = 104 \text{ g L}^{-1}$) nach 45 h. Ein Großteil der Glucose akkumulierte zu Gluconat, was anhand der Gluconatkonzentrationen nach 45 h von 4 g L^{-1} ($c_{E,0} = 25 \text{ g L}^{-1}$), 23 g L^{-1} ($c_{E,0} = 50 \text{ g L}^{-1}$), 49 g L^{-1} ($c_{E,0} = 75 \text{ g L}^{-1}$) sowie 76 g L^{-1} ($c_{E,0} = 104 \text{ g L}^{-1}$) erkennbar war. Nur ein geringer Bruchteil der Glucose wurde für den Aufbau von Biotrockenmasse genutzt, da diese während der ersten 25 h von $0,2 \text{ g L}^{-1}$ auf $0,5 \text{ g L}^{-1}$ anstieg.

Der Sauerstoffpartialdruck wurde während der Glucoseoxidation auf 20 % durch Variation der Rührerdrehzahl geregelt. Der Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks führte zu einer Reduktion der Rührerdrehzahl auf das Minimum von 500 rpm. In der Folge stieg der Sauerstoffpartialdruck bei $c_{E,0} = 25 \text{ g L}^{-1}$ nach 5,6 h an. Bei $c_{E,0} = 50 \text{ g L}^{-1}$ war der Anstieg nach 10 h, bei $c_{E,0} = 75 \text{ g L}^{-1}$ nach 13,3 h und bei $c_{E,0} = 104 \text{ g L}^{-1}$ nach 16,7 h zu verzeichnen. Unmittelbar nach diesen Zeitpunkten konnten geringe verbleibende Glucosekonzentrationen gemessen werden. So wurde beispielsweise bei dem Prozess mit $c_{E,0} = 25 \text{ g L}^{-1}$ nach 6 h eine Glucosekonzentration von $1,7 \text{ g L}^{-1}$ bestimmt. Der Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks und die Reduktion der Rührerdrehzahl nach erfolgter Glucoseoxidation verdeutlichen, wie bereits in Abschnitt 7.1.2 gezeigt, den deutlich niedrigeren Sauerstoffbedarf. Die ist ein Hinweis darauf, dass die weitere Oxidation von Gluconat erheblich weniger Sauerstoff benötigt.

Diskussion

Durch lineare Regression des zeitlichen Verlaufs der initialen Glucosekonzentrationen während der ersten 4 h und Division durch die mittlere Biotrockenmassekonzentration wurden die zellspezifischen Glucoseverbrauchsrate ermittelt. Diese sind in Abbildung 7-11 in Abhängigkeit von der initialen Glucosekonzentration dargestellt. Im Bereich der untersuchten initialen Glucosekonzentrationen zwischen 25 g L^{-1} und 104 g L^{-1} wurden zellspezifische Glucoseverbrauchsrate zwischen $17 \pm 3 \text{ g}_E \text{ g}_X^{-1}$ ($c_{E,0} = 25 \text{ g L}^{-1}$) und $22 \pm 4 \text{ g}_E \text{ g}_X^{-1}$ ($c_{E,0} = 104 \text{ g L}^{-1}$) erzielt. Anhand dieser zellspezifischen Glucoseverbrauchsrate kann geschlossen werden, dass kein signifikanter Einfluss der Glucose innerhalb des betrachteten Konzentrationsbereichs auf die zellspezifische Glucoseverbrauchsrate vorlag. Dies steht in Einklang mit Erkenntnissen von Velizarov und Beschkov (1998), welche bei der Glucoseoxidation mit *G. oxydans* NBIMCC 1043 erst ab hohen Konzentrationen von 180 g L^{-1} Glucose eine Substratüberschussinhibierung des Wachstums und damit einhergehend eine

Reduktion der zellspezifischen Gluconatbildungsrate bestimmen konnten. Aufgrund der Akkumulation des Intermediats Gluconat könnte es sein, dass dieses einen inhibierenden Einfluss aufweist, weshalb dies im Folgenden überprüft wurde.

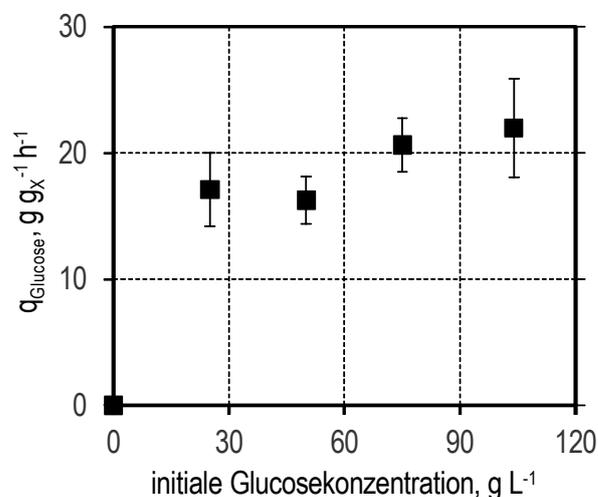


Abbildung 7-11: Durch lineare Regression ermittelte zellspezifische Glucoseverbrauchsrate in Abhängigkeit von der initialen Glucosekonzentration $T = 30\text{ °C}$; $P V^{-1}_{\max} = 5\text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 3\text{ vvm}$, $V_R = 0,7\text{ L}$, $c_{X,0} = 0,2\text{ g L}^{-1}$, Medium B (*G. oxydans* 621H BP.9 pGDH:*gdh*-pADH:*sldAB*).

7.4 Zwischenproduktkonzentration

In den bisherigen Satzprozessen konnte die Akkumulation des Intermediats Gluconat beobachtet werden. Der Grund hierfür ist die etwa um den Faktor zehn schnellere Oxidation von Glucose zu Gluconat im Vergleich zur Oxidation von Gluconat zu 5-Ketogluconat. Um den Einfluss von Gluconat auf den zweiten Oxidationsschritt zu überprüfen, wurden Biotransformationen im Phosphatpuffer mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (Medium B, siehe Tabelle 4-5) mit unterschiedlichen initialen Gluconatkonzentrationen von 9 g L^{-1} , 24 g L^{-1} , 47 g L^{-1} , 56 g L^{-1} und 90 g L^{-1} im Milliliter-Maßstab durchgeführt. Durch eine Rührerdrehzahl von 2.200 rpm wurde ein Sauerstoffpartialdruck von mindestens 20 % Luftsättigung aufrechterhalten. Abbildung 7-12 zeigt den zeitlichen Verlauf der resultierenden 5-Ketogluconatkonzentrationen und die durch lineare Regression ermittelte spezifische Produktbildungsrate in Abhängigkeit von der vorgelegten Gluconatkonzentration.

In Abhängigkeit von der initialen Gluconatkonzentration wurden unterschiedliche 5-Ketogluconatkonzentrationen erzielt. Bei der höchsten initialen Gluconatkonzentration von

90 g L⁻¹ wurde lediglich eine 5-Ketogluconatkonzentration von 1,2 g L⁻¹ nach 4 h erreicht. Bei 9 g L⁻¹ Gluconat wurde hingegen knapp die dreifache Konzentration von 3,2 g L⁻¹ nach 4 h erzielt. Eine ähnliche Konzentration von 3,4 g L⁻¹ 5-Ketogluconat wurde bei einer initialen Gluconatkonzentration von 24 g L⁻¹ erreicht. Ab einer initialen Gluconatkonzentration von 47 g L⁻¹ waren nach 4 h Produktkonzentrationen von weniger als 3 g L⁻¹ vorhanden. Bei der einstufigen Oxidation wurde die spezifische 5-Ketogluconatbildungsrate durch lineare Regression während der ersten 4 h berechnet. Hierbei ergaben sich spezifische 5-Ketogluconatbildungsraten (siehe Abbildung 7-12 B) von $2,6 \pm 0,2 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($c_{E,0} = 9 \text{ g L}^{-1}$), $2,9 \pm 0,4 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($c_{E,0} = 24 \text{ g L}^{-1}$), $2,0 \pm 0,4 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($c_{E,0} = 47 \text{ g L}^{-1}$), $2,0 \pm 0,1 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($c_{E,0} = 56 \text{ g L}^{-1}$) sowie $1,4 \pm 0,1 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($c_{E,0} = 90 \text{ g L}^{-1}$).

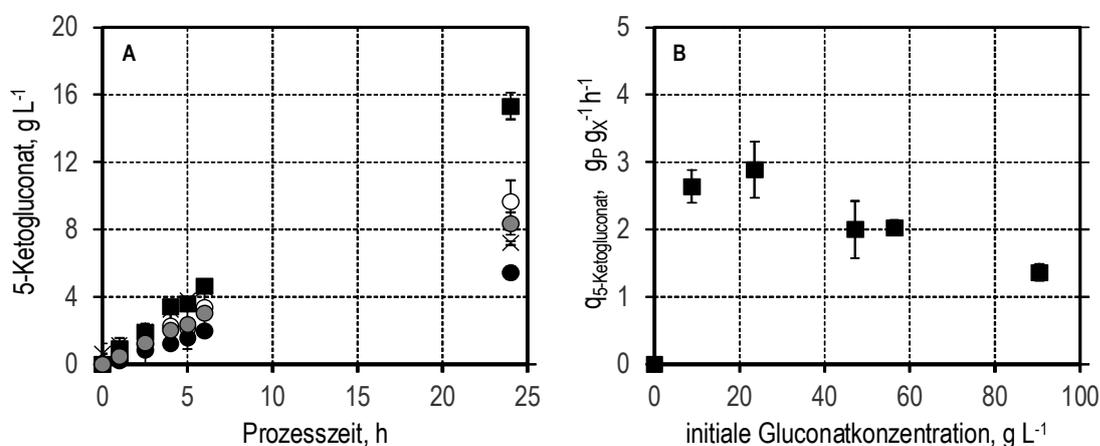


Abbildung 7-12: Zeitlicher Verlauf der 5-Ketogluconatkonzentration (A) bei einstufiger Oxidation im Phosphatpuffer mit Ca²⁺ und Mg²⁺ bei unterschiedlichen initialen Gluconatkonzentrationen von 9 g L⁻¹ (x), 24 g L⁻¹ (■), 47 g L⁻¹ (○), 56 g L⁻¹ (●) und 90 g L⁻¹ (●) und die durch lineare Regression ermittelten initialen spezifischen 5-Ketogluconatbildungsraten (B) in Abhängigkeit der vorgelegten Gluconatkonzentration (T = 30 °C; P V⁻¹ = 6,5 W L⁻¹, F_{Luft} = 8,3 vvm, V_R = 12 mL, c_{X,0} = 0,25 g L⁻¹ *G. oxydans* 621H BP.8 $\Delta adh::mgdh_{3504}$, Medium B, drei biologische Replikate).

Diskussion

Die Ergebnisse der Biotransformationen mit unterschiedlichen initialen Gluconatkonzentrationen zeigten im Gegensatz zu den Versuchen mit unterschiedlicher initialer Glucosekonzentration eine signifikante Inhibierung der Oxidation von Gluconat zu 5-Ketogluconat. So war die maximale spezifische Produktbildungsrate von $2,9 \pm 0,4 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei einer Gluconatkonzentrationen von 24 g L⁻¹ um mehr als den Faktor zwei größer als die

spezifische 5-Ketogluconatbildungsrate von $1,4 \pm 0,1 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei einer Gluconatkonzentration von 90 g L^{-1} . Dies steht in Einklang mit Erkenntnissen von Velizarov und Beschkov (1998), welche bei der Glucoseoxidation mit *G. oxydans* NBIMCC 1043 eine Produktinhibierung durch zu hohe Gluconatkonzentrationen beobachteten. So beschrieben sie eine Reduktion der zellspezifischen Gluconatbildungsrate von $0,76 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf $0,51 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei Erhöhung der initialen Gluconatkonzentration von 3 g L^{-1} auf 94 g L^{-1} . Da sie überdies auch eine Reduktion der spezifischen Wachstumsrate identifizierten, ist davon auszugehen, dass der Organismus als Ganzes eine Inhibierung erfährt, weshalb auch eine Inhibierung der 5-Ketogluconatbildung erfolgen könnte.

Aufgrund der Inhibierung der 5-Ketogluconatbildung bei Gluconatkonzentrationen über 56 g L^{-1} und der zehnfach schnelleren Oxidation von Glucose zu Gluconat als von Gluconat zu 5-Ketogluconat ist eine Prozessführung im Satzbetrieb nicht förderlich, da hierdurch die Akkumulation von Gluconat nicht verhindert werden kann und damit eine Reduktion der Produktivität eintritt. Mit einem Zulaufverfahren könnte eine Erhöhung der Produktivität durch Vermeidung der Gluconatakkumulation zu erreichen sein.

7.5 Medienkomponenten

7.5.1 Vergleich von Phosphatpuffer mit Komplexmedium

Im Folgenden wird der in Abschnitt 6.2.1 entwickelte Ca^{2+} und Mg^{2+} enthaltende Phosphatpuffer (Medium B, siehe Tabelle 4-5) mit dem Medium nach Merfort *et al.* (2006a) (siehe Tabelle 4-7) verglichen. Dieses beinhaltet neben Phosphatsalzen $7,5 \text{ g L}^{-1}$ Komplexmedienbestandteile in Form von Maisquellpaste und 1 g L^{-1} Calciumacetat.

Im Folgenden wurde die Biotransformation im Phosphatpuffer mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (Medium B, siehe Tabelle 4-5) mit zwei initialen Biokatalysatorkonzentrationen von $0,2 \text{ g L}^{-1}$ und $3,3 \text{ g L}^{-1}$ und die Biotransformation mit dem Komplexmedium nach Merfort *et al.* (2006a) mit einer initialen Biotrockenmassekonzentration von $0,2 \text{ g L}^{-1}$ im Liter-Maßstab durchgeführt. Durch Variation der Rührerdrehzahl ($n = 500 - 800 \text{ rpm}$) wurde der minimal erforderliche Sauerstoffpartialdruck von 20 % Luftsättigung gewährleistet. Abbildung 7-13 zeigt die resultierenden Glucose-, Gluconat-, 5-Ketogluconat- und Biotrockenmassekonzentrationen, den zugehörigen Sauerstoffpartialdruck sowie die Rührerdrehzahl über die Prozesszeit.

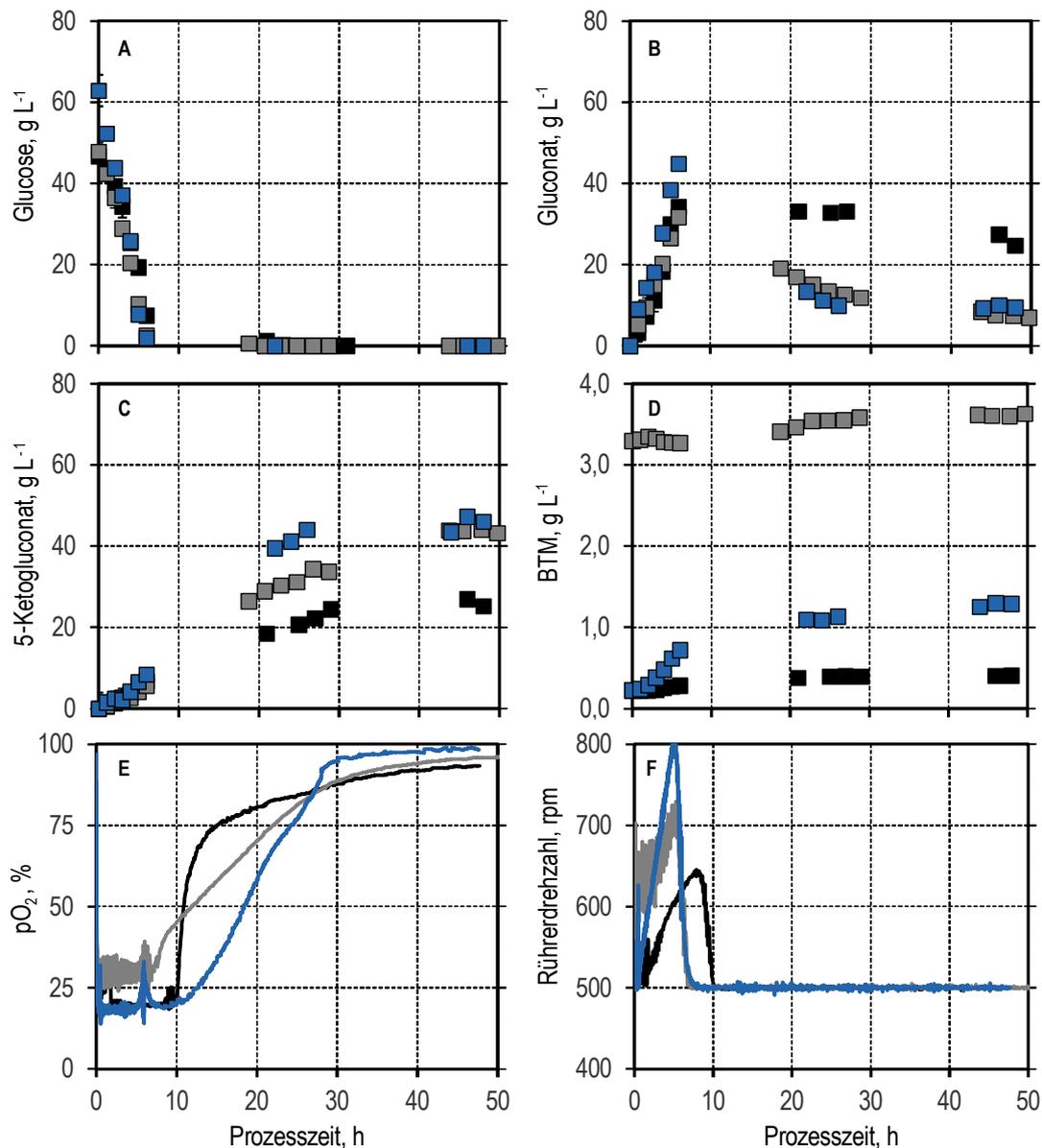


Abbildung 7-13: Zweistufige Oxidation von Glucose (A) zu 5-Ketogluconat (C) über Gluconat (B) bei Verwendung des Phosphatpuffers mit Ca^{2+} und Mg^{2+} Zusätzen mit verschiedenen initialen Konzentrationen von *G. oxydans* 621H BP.8 $\Delta\text{adh}::\text{mgdh}_{3504}$ (D) von $c_{X,0} = 0,2 \text{ g L}^{-1}$ (schwarz) und $c_{X,0} = 3,3 \text{ g L}^{-1}$ (grau) sowie bei Verwendung des Mediums mit Komplexbestandteilen nach Merfort *et al.* (2006a) (blau) mit $c_{X,0} = 0,2 \text{ g L}^{-1}$. Der Sauerstoffpartialdruck (E) wurde durch Variation der Rührerdrehzahl (F) auf mindestens 20 % Luftsättigung gehalten ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$; $P V^{-1}_{\text{max}} = 5 \text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 3 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_{E,0} = 50 - 63 \text{ g L}^{-1}$).

Mit beiden Medien wurde ein vollständiger Umsatz der initialen Glucose erzielt. Bei der weiteren Oxidation von Gluconat zu 5-Ketogluconat wurde im Phosphatpuffer eine höhere Produktkonzentration nach 48 h in Abhängigkeit von der eingesetzten initialen

Biokatalysatorkonzentration festgestellt. So wurde mit der niedrigen initialen Biokatalysatorkonzentration von $0,2 \text{ g L}^{-1}$ eine 5-Ketogluconatkonzentration von $26,9 \text{ g L}^{-1}$ und mit der hohen initialen Biokatalysatorkonzentration von $3,3 \text{ g L}^{-1}$ eine 5-Ketogluconatkonzentration von $44,0 \text{ g L}^{-1}$ erzielt. Bei Verwendung des Mediums mit Komplexbestandteilen nach Merfort *et al.* (2006a) wurde mit einer initialen Biokatalysatorkonzentration von $0,2 \text{ g L}^{-1}$ eine ähnliche 5-Ketogluconatkonzentration von $46,0 \text{ g L}^{-1}$ nach 48 h erreicht. Hinsichtlich der Biokatalysatorkonzentration wurde bei Nutzung des Phosphatpuffers eine Erhöhung von $0,2 \text{ g L}^{-1}$ auf $0,4 \text{ g L}^{-1}$ sowie von $3,3 \text{ g L}^{-1}$ auf $3,6 \text{ g L}^{-1}$ festgestellt. Bei Nutzung des Komplexmediums stieg die Biotrockenkatalysatorkonzentration um das Sechsfache von $0,2 \text{ g L}^{-1}$ auf $1,3 \text{ g L}^{-1}$. Während der Oxidation von Glucose wurde über Erhöhung der Rührerdrehzahl auf maximal 800 rpm der Sauerstoffpartialdruck auf 20 % gehalten. Ab 6 h war es möglich, einen Sauerstoffpartialdruck von 20 % mit einer geringeren Rührerdrehzahl aufrechtzuerhalten, ehe dieser den minimalen Wert der Regelungskaskade von 500 rpm erreichte. Ab diesem Zeitpunkt stieg der Sauerstoffpartialdruck an, wobei dies beim Komplexmedium langsamer als im Phosphatpuffer erfolgte.

Diskussion

Die mit nicht-linearer Regression (siehe Gleichung 4-6) berechneten volumetrischen Produktbildungsraten zeigten maximale 5-Ketogluconatbildungsraten von $r_{P,\max} = 2,7 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ im Medium nach Merfort *et al.* (2006a) und maximale 5-Ketogluconatbildungsraten von $r_{P,\max} = 1,1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($c_{X,0} = 0,2 \text{ g L}^{-1}$) und $r_{P,\max} = 1,7 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($c_{X,0} = 3,3 \text{ g L}^{-1}$) im Phosphatpuffer mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (siehe Abbildung 7-14).

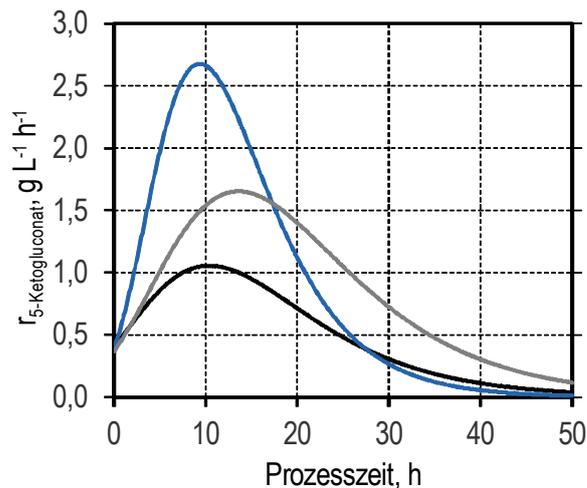


Abbildung 7-14: Zeitlicher Verlauf der volumetrische 5-Ketogluconatbildungsrate r_p bei Verwendung des Phosphatpuffers mit Ca^{2+} und Mg^{2+} bei verschiedenen initialen Konzentrationen von *G. oxydans* 621H BP.8 $\Delta\text{adh}::\text{mgdh}_{3504}$ von $c_{X,0} = 0,2 \text{ g L}^{-1}$ (schwarz) und $c_{X,0} = 3,3 \text{ g L}^{-1}$ (grau) sowie bei Verwendung des Mediums mit Komplexbestandteilen nach Merfort *et al.* (2006a) mit $c_{X,0} = 0,2 \text{ g L}^{-1}$ (blau) ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$; $P V^{-1}_{\text{max}} = 5 \text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 3 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_{E,0} = 50 - 63 \text{ g L}^{-1}$).

Auch andere 5-Ketogluconatherstellungsprozesse wurden mit Medien mit Komplexmedienbestandteilen beschrieben (Elfari *et al.* 2005; Yuan *et al.* 2016a, 2016b), daher sollte überprüft werden, ob mit Komplexmedium im Vergleich zum Medium B eine höhere spezifische Produktbildungsrate erreicht wird. Nach Division durch die jeweilige Biotrockenmassekonzentration wurden die maximalen spezifischen 5-Ketogluconatbildungsrate von $3,0 \pm 0,5 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Komplexmedium nach Merfort *et al.* (2006a)), $3,2 \pm 0,6 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Phosphatpuffer mit $c_{X,0} = 0,2 \text{ g L}^{-1}$) und $2,1 \pm 0,1 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Phosphatpuffer mit $c_{X,0} = 3,3 \text{ g L}^{-1}$) berechnet. Auf einem Signifikanzniveau von 95 % waren die 5-Ketogluconatbildungsrate bei Verwendung des Phosphatpuffers mit $c_{X,0} = 0,2 \text{ g L}^{-1}$ und des Komplexmediums nach Merfort *et al.* (2006a) vergleichbar. Bei erhöhter initialer Biotrockenmassekonzentration im Phosphatpuffer von $c_{X,0} = 3,3 \text{ g L}^{-1}$ nahm die berechnete spezifische Produktbildungsrate ab. Dies könnte eine Limitierung andeuten. Da eine Sauerstofflimitierung wegen des Sauerstoffpartialdrucks von über 20 % Luftsättigung ausgeschlossen werden konnte, wurde eine Nährstofflimitierung bei Verwendung des Phosphatpuffers vermutet. Dies könnten entweder Bestandteile des Komplexmediums oder Ca^{2+} sein. Da Calcium bereits als limitierende Komponente im Phosphatpuffer in Abschnitt 6.2.1 identifiziert wurde, wird im folgenden Abschnitt der Einfluss von Calcium durch Reduktion der Konzentration des Calciumacetats im Komplexmedium nach Merfort *et al.* (2006a) betrachtet.

Bei Nutzung des Multideletionsstamms wurde mit einer spezifischen Produktbildungsrate von $3,0 \pm 0,5 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ eine signifikant höhere Rate als von Merfort *et al.* (2006a) mit $2,2 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ erzielt. Dies spiegelt das Potential des Multideletionsstamms *G. oxydans* 621H BP.8 $\Delta adh::mgdh_{3504}$ wieder, da Merfort *et al.* (2006a) die spezifische Produktbildungsrate mit einem Stamm erzielten, in dem die Polyol-Dehydrogenase rekombinant exprimiert wurde und das Gen der konkurrierende Gluconat-2-Dehydrogenase deletiert wurde.

7.5.2 Variation der Calciumacetatkonzentration

Aufgrund der Tatsache, dass im Medium nach Merfort *et al.* (2006a) (siehe Tabelle 4-7) mit 1 g L^{-1} Calciumacetat, was einer Konzentration von $1,60 \text{ mM Ca}^{2+}$ entspricht, eine um den Faktor 8,6 höhere Calciumkonzentration ($0,19 \text{ mM Ca}^{2+}$) als in Medium B (siehe Tabelle 4-5) vorlag, wurde die Konzentration im Komplexmedium reduziert und die Auswirkung auf die Produktbildung untersucht. Die Biotransformation erfolgte im Liter-Maßstab und der Sauerstoffpartialdruck wurde durch Variation der Rührerdrehzahl ($n = 500 - 848 \text{ rpm}$) auf mindestens 20 % Luftsättigung gehalten, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Abbildung 7-15 zeigt die resultierenden 5-Ketogluconatkonzentrationen einschließlich nicht-linearer Regression (siehe Gleichung 4-6) als Funktion der Prozesszeit. Es ist zu erkennen, dass nach 48 h mit $46,0 \text{ g L}^{-1}$ 5-Ketogluconat ($c_{\text{Calciumacetat}} = 1,0 \text{ g L}^{-1}$; $1,60 \text{ mM Ca}^{2+}$) sowie mit $47,9 \text{ g L}^{-1}$ ($c_{\text{Calciumacetat}} = 0,5 \text{ g L}^{-1}$; $0,80 \text{ mM Ca}^{2+}$) ähnliche Produktkonzentrationen vorlagen. Lediglich bei einer Konzentration von $c_{\text{Calciumacetat}} = 0,1 \text{ g L}^{-1}$ ($0,80 \text{ mM Ca}^{2+}$) war mit einer 5-Ketogluconatkonzentration von $32,9 \text{ g L}^{-1}$ nach 48 h eine deutlich niedrigere Produktkonzentration erzielt worden.

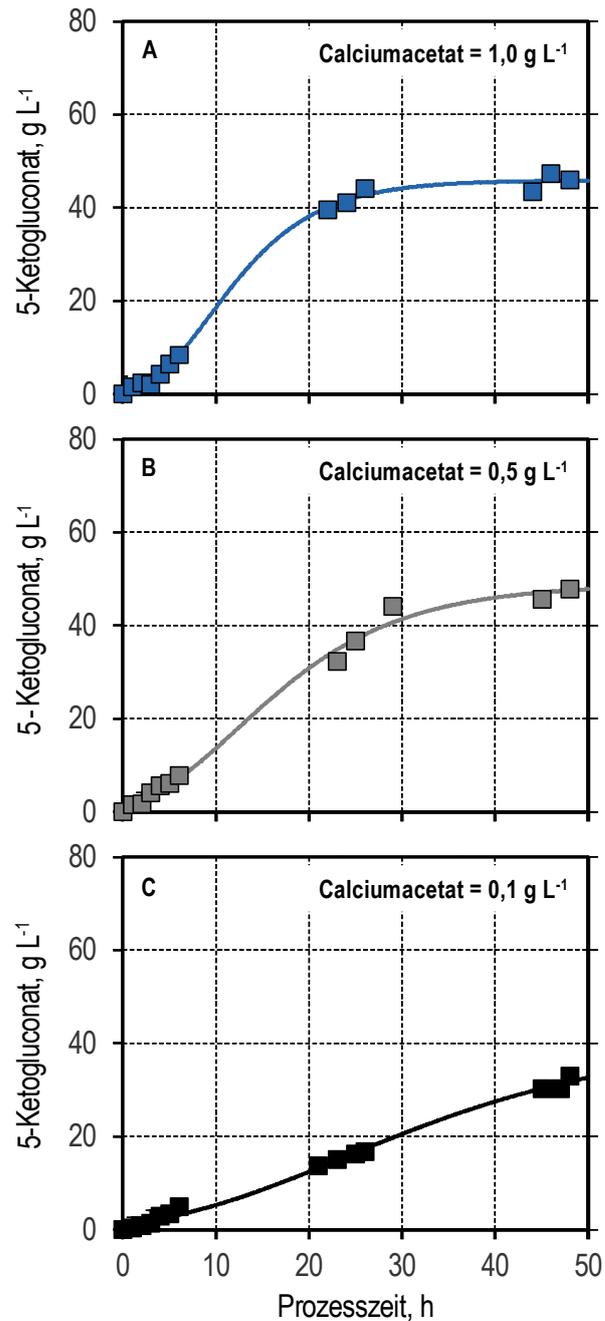


Abbildung 7-15: Verlauf der 5-Ketogluconatkonzentrationen mit sigmoidaler Ausgleichsfunktion bei zweistufiger Oxidation mit *G. oxydans* 621H BP.8 Δ adh::*mgdh*₃₅₀₄ im Medium nach Merfort *et al.* (2006a) (blau) und bei stufenweiser Reduktion des Calciumacetats von 1 g L⁻¹ (blau) auf 0,5 g L⁻¹ (grau) sowie 0,1 g L⁻¹ (schwarz) (T = 30 °C; $P V^{-1}_{\max} = 5 \text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 3 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_{X,0} = 0,25 \text{ g L}^{-1}$, $c_{E,0} = 55 - 63 \text{ g L}^{-1}$).

Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass mit Calciumacetatkonzentrationen von $1,0 \text{ g L}^{-1}$ und $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ähnliche Produktkonzentrationen wie die von Merfort *et al.* (2006a) berichteten 57 g L^{-1} 5-Ketogluconat im Satzverfahren erzielt wurden. Die erzielten Produktausbeuten von bis zu 70 % waren höher als die von Merfort *et al.* (2006a) berichteten Produktausbeuten von 54 %. Aufgrund der Tatsache, dass mit der geringsten Calciumacetatkonzentration von $0,1 \text{ g L}^{-1}$, die ähnlich der Ca^{2+} -Konzentration im Phosphatpuffer mit $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ist, nach 48 h mit $32,9 \text{ g L}^{-1}$ eine 30 % geringere 5-Ketogluconatkonzentration erreicht wurde, zeigte, dass Ca^{2+} bei der 5-Ketogluconatherstellung eine wesentliche Medienkomponente darstellt. Durch das Differential der nicht-linearen Regression wurde die volumetrische Produktbildungsrate ermittelt (siehe Abbildung 7-16). Diese bestätigte, dass je kleiner die vorgelegte Calciumacetatkonzentration ist, desto geringer ist auch die die 5-Ketogluconatbildungsrate. So wurden folgende maximale volumetrische 5-Ketogluconatbildungsraten ermittelt: $2,7 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($c_{\text{Calciumacetat}} = 1,0 \text{ g L}^{-1}$), $1,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($c_{\text{Calciumacetat}} = 0,5 \text{ g L}^{-1}$) sowie $0,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($c_{\text{Calciumacetat}} = 0,1 \text{ g L}^{-1}$). Mit Berücksichtigung der jeweiligen Biotrockenmassekonzentration ergaben sich spezifische Produktbildungsraten von $2,9 \pm 0,6 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($c_{\text{Calciumacetat}} = 1,0 \text{ g L}^{-1}$), $1,9 \pm 0,5 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($c_{\text{Calciumacetat}} = 0,5 \text{ g L}^{-1}$) sowie $1,4 \pm 0,4 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($c_{\text{Calciumacetat}} = 0,1 \text{ g L}^{-1}$).

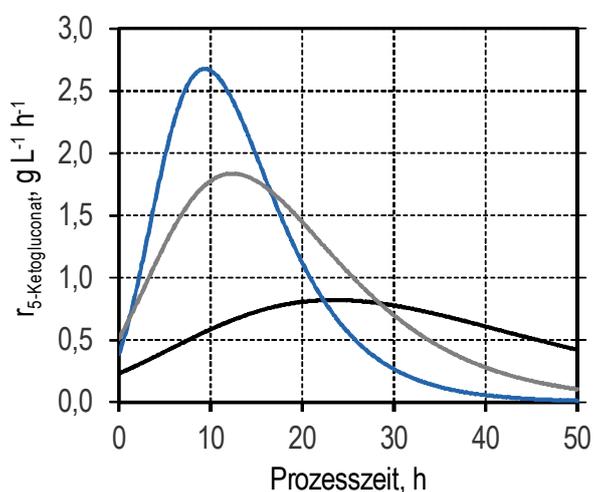


Abbildung 7-16: Verlauf der volumetrischen 5-Ketogluconatbildungsraten (r_P) bei Verwendung des Mediums mit Komplexbestandteilen nach Merfort *et al.* (2006a) (blau) und bei stufenweiser Reduktion des Calciumacetatanteils von 1 g L^{-1} (blau) auf $0,5 \text{ g L}^{-1}$ (grau) sowie $0,1 \text{ g L}^{-1}$ (schwarz) ($T = 30 \text{ °C}$; $P V^{-1}_{\text{max}} = 5 \text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 3 \text{ vvm}$, $V_R = 0,7 \text{ L}$, $c_{X,0} = 0,25 \text{ g L}^{-1}$, $c_{E,0} = 55 - 63 \text{ g L}^{-1}$).

Die Relevanz der Calciumkonzentration wurde bereits in Abschnitt 6.2.1 anhand der L-Erythrulose Bildung gezeigt. Bei der 5-Ketogluconat Herstellung scheint eine ausreichende Calciumkonzentration noch wichtiger zu sein. Ein möglicher Grund für die entscheidende Rolle des Calciums bei der 5-Ketogluconatherstellung könnte sein, dass dieses mit dem Produkt 5-Ketogluconat einen Komplex bildet und präzipitiert. Dies wurde in der Literatur bei der Zugabe von CaCO_3 beobachtet (Kotera *et al.* 1971). Hierdurch wird Ca^{2+} dem Reaktionsmedium entzogen und die Polyol-Dehydrogenase ohne das Coenzym PQQ liegt lediglich als Apoenzym ohne biokatalytische Aktivität vor. Die von Shinagawa *et al.* (1999) beschriebene Möglichkeit der Rekonstitution des Holoenzym durch CaCl_2 Zugabe würde diese Hypothese bestätigen. Diese Ca^{2+} -Limitierung könnte ebenfalls durch einen Zulaufprozess (siehe Abschnitt 7.6) umgangen werden.

7.6 Biotransformation im Zulaufverfahren

Im Folgenden wurden Biotransformationen im Zulaufverfahren durchgeführt, um zum einen die weitere Zuführung von Calcium, das durch Präzipitation mit 5-Ketogluconat dem Reaktionsmedium entzogen wird, zu gewährleisten und zum anderen die Inhibierung aufgrund zu hoher Gluconatkonzentration (siehe Abschnitt 7.4) zu vermeiden.

Die Biotransformationen wurden im Liter-Maßstab im Phosphatpuffer mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (Medium B, siehe Tabelle 4-5) durchgeführt. Dabei betrug die Glucosekonzentration im Zulauf $c_{E,0} = 400 \text{ g L}^{-1}$. Der maximale Zulaufvolumenstrom wird durch die maximale spezifische 5-Ketogluconatbildungsrate von $3,2 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ (siehe Abschnitt 7.5.1) begrenzt, um eine Akkumulation von Gluconat zu verhindern. Es wurden konstante Zulaufvolumenströme von $F_{Zu} = 1,9 \text{ mL h}^{-1}$ (maximaler Zulaufmassenstrom an Glucose von $F_{\text{Glucose}} = 1,5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) sowie $F_{Zu} = 7,6 \text{ mL h}^{-1}$ ($F_{\text{Glucose}} = 6,1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) eingestellt. Aufgrund der Volumenzunahme sank der Zulaufmassenstrom während der Prozesszeit ab und erreichte Raten von $F_{\text{Glucose}} = 1,2 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (bei $F_{Zu} = 1,9 \text{ mL h}^{-1}$) sowie $F_{\text{Glucose}} = 2,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (bei $F_{Zu} = 7,6 \text{ mL h}^{-1}$) nach 76 h. In Abhängigkeit von den anfänglichen Biotrockenmassekonzentrationen $c_{X,0} = 0,5 \text{ g L}^{-1}$ ($F_{Zu} = 1,9 \text{ mL h}^{-1}$) und $c_{X,0} = 3,9 \text{ g L}^{-1}$ ($F_{Zu} = 7,6 \text{ mL h}^{-1}$) ergaben sich initiale (maximale) zellspezifische Zulaufmassenströme von $2,9 \text{ g}_E \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($F_{Zu} = 1,9 \text{ mL h}^{-1}$) sowie $1,6 \text{ g}_E \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($F_{Zu} = 7,6 \text{ mL h}^{-1}$). Diese lagen unter der spezifischen 5-Ketogluconatbildungsrate, weshalb kein 5-Ketogluconat akkumulieren sollte. Durch Variation der Rührerdrehzahl ($n = 500 - 660 \text{ rpm}$) wurde ein Sauerstoffpartialdruck von mindestens 20 % Luftsättigung aufrechterhalten. Abbildung 7-17 zeigt die resultierenden Glucose-, Gluconat-, 5-Ketogluconat- sowie Biotrockenmassekonzentrationen über die Prozesszeit.

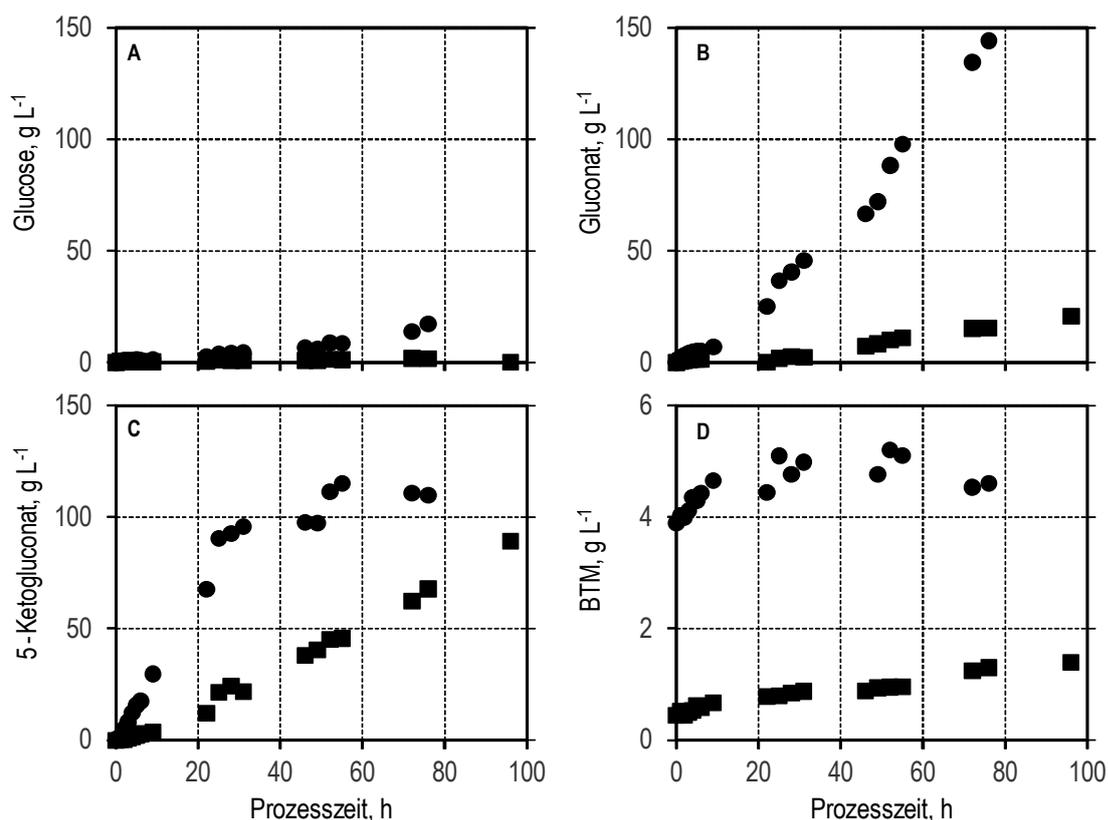


Abbildung 7-17: Zweistufige Oxidation von Glucose (A) zu 5-Ketogluconat (C) über Gluconat (B) bei Verwendung des Phosphatpuffers mit Ca^{2+} und Mg^{2+} unter Einsatz verschiedener initialer Konzentrationen von *G. oxydans* 621H BP.8 $\Delta\text{adh}::\text{mgdh}_{3504}$. (D). Glucosezugabe erfolgte mit konstanten Zulaufvolumenströmen von $1,9 \text{ mL h}^{-1}$ (■) und $7,6 \text{ mL h}^{-1}$ (●) ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$; $P V^{-1}_{\text{max}} = 5 \text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft,min}} = 2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,5 \text{ L}$, Medium B).

Bei dem Zulaufvolumenstrom von $1,9 \text{ mL h}^{-1}$ wurde Glucose zu Gluconat umgesetzt und es wurde eine maximale Glucosekonzentration von $1,8 \text{ g L}^{-1}$ nach 72 h gemessen. Bei dem Zulaufvolumenstrom von $7,6 \text{ mL h}^{-1}$ wurde eine Akkumulation von Glucose beobachtet. So lag eine Konzentration von bis zu $17,3 \text{ g L}^{-1}$ Glucose nach 76 h vor. Obwohl die spezifischen Glucose Zulaufmassenströme unterhalb der spezifischen 5-Ketogluconatbildungsrate lagen, konnte bei beiden Zulaufvolumenströmen eine Akkumulation des Intermediats Gluconat festgestellt werden. So wurden maximale Gluconatkonzentrationen von $20,8 \text{ g L}^{-1}$ ($F_{\text{Zu}} = 1,9 \text{ mL h}^{-1}$) zu Prozessende nach 96 h sowie $144,3 \text{ g L}^{-1}$ ($F_{\text{Zu}} = 7,6 \text{ mL h}^{-1}$) zu Prozessende nach 76 h gemessen. Das Gluconat wurde zu 5-Ketogluconat oxidiert und es wurden 5-Ketogluconatkonzentrationen von bis zu $89,1 \text{ g L}^{-1}$ ($F_{\text{Zu}} = 1,9 \text{ mL h}^{-1}$) nach 96 h sowie bis zu $115,0 \text{ g L}^{-1}$ ($F_{\text{Zu}} = 7,6 \text{ mL h}^{-1}$) nach 55 h erreicht. Es konnte eine Zunahme der

Biotrockenmassekonzentration von $0,5 \text{ g L}^{-1}$ auf $1,4 \text{ g L}^{-1}$ ($F_{\text{zu}} = 1,9 \text{ mL h}^{-1}$) und $3,9 \text{ g L}^{-1}$ auf bis zu $5,1 \text{ g L}^{-1}$ nach 55 h ($F_{\text{zu}} = 7,6 \text{ mL h}^{-1}$) festgestellt werden.

Um zu überprüfen, ob der Anstieg an Gluconat aufgrund fehlender Komplexmedienbestandteile erfolgte, wurden zusätzlich Biotransformationen im Liter-Maßstab mit dem Komplexmedium nach Merfort *et al.* (2006a) (Medium D, siehe Tabelle 4-7) mit einer Glucosekonzentration im Zulauf $c_{\text{E},0} = 400 \text{ g L}^{-1}$ durchgeführt. Abbildung 7-18 zeigt die resultierenden Glucose-, Gluconat-, 5-Ketogluconat- sowie Biotrockenmassekonzentrationen als Funktion der Prozesszeit. In Abhängigkeit von den initialen Biotrockenmassekonzentrationen von $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ($F_{\text{zu}} = 2,0 \text{ mL h}^{-1}$) und $1,9 \text{ g L}^{-1}$ ($F_{\text{zu}} = 7,3 \text{ mL h}^{-1}$) wurden konstante Zulaufvolumenströme von $F_{\text{zu}} = 2,0 \text{ mL h}^{-1}$ (maximaler Zulaufmassenstrom $F_{\text{Glucose}} = 1,6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) und $F_{\text{zu}} = 7,3 \text{ mL h}^{-1}$ ($F_{\text{Glucose}} = 5,9 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) eingestellt. Hieraus ergaben sich wiederum initiale zellspezifische Zulaufmassenströme von $3,2 \text{ g}_E \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($F_{\text{zu}} = 2,0 \text{ mL h}^{-1}$) sowie $3,1 \text{ g}_E \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($F_{\text{zu}} = 7,3 \text{ mL h}^{-1}$).

Bei einem Zulaufvolumenstrom von $F_{\text{zu}} = 2,0 \text{ mL h}^{-1}$ wurde keine Akkumulation von Glucose und einem höheren Zulaufvolumenstrom von $F_{\text{zu}} = 7,3 \text{ mL h}^{-1}$ nur eine geringe Akkumulation von maximal $4,8 \text{ g L}^{-1}$ Glucose nach 48 h gemessen. Bei dem niedrigen Zulaufvolumenstrom war während des Prozesses nur eine geringe Gluconatbildung mit einer maximalen Konzentration von $5,3 \text{ g L}^{-1}$ nach 47 h messbar. Allerdings war bei dem hohen Zulaufvolumenstrom von $7,3 \text{ mL h}^{-1}$ ab einer Prozesszeit von 21 h eine Gluconatkonzentration von 11 g L^{-1} messbar. Diese stieg im weiteren Verlauf kontinuierlich an und erreichte nach 55 h eine maximale Konzentration von $109,5 \text{ g L}^{-1}$. Hinsichtlich der 5-Ketogluconatkonzentration wurde bei einem Zulaufvolumenstrom von $2,0 \text{ mL h}^{-1}$ eine lineare Zunahme über die gesamte Prozessdauer beobachtet und es wurde eine Konzentration von $53,1 \text{ g L}^{-1}$ nach 47 h erreicht. Bei einem Zulaufvolumenstrom von $7,3 \text{ mL h}^{-1}$ wurde bereits nach 23 h eine Konzentration von 73 g L^{-1} erreicht, danach flachte die Produktbildung ab und es wurde eine maximale Konzentration von $83,7 \text{ g L}^{-1}$ nach 47 h erzielt. Es konnte eine Zunahme der Biotrockenmassekonzentration von $0,5 \text{ g L}^{-1}$ auf $2,3 \text{ g L}^{-1}$ ($F_{\text{zu}} = 2,0 \text{ mL h}^{-1}$) nach 47 h und von $1,9 \text{ g L}^{-1}$ auf $4,2 \text{ g L}^{-1}$ ($F_{\text{zu}} = 7,3 \text{ mL h}^{-1}$) nach 55 h festgestellt werden.

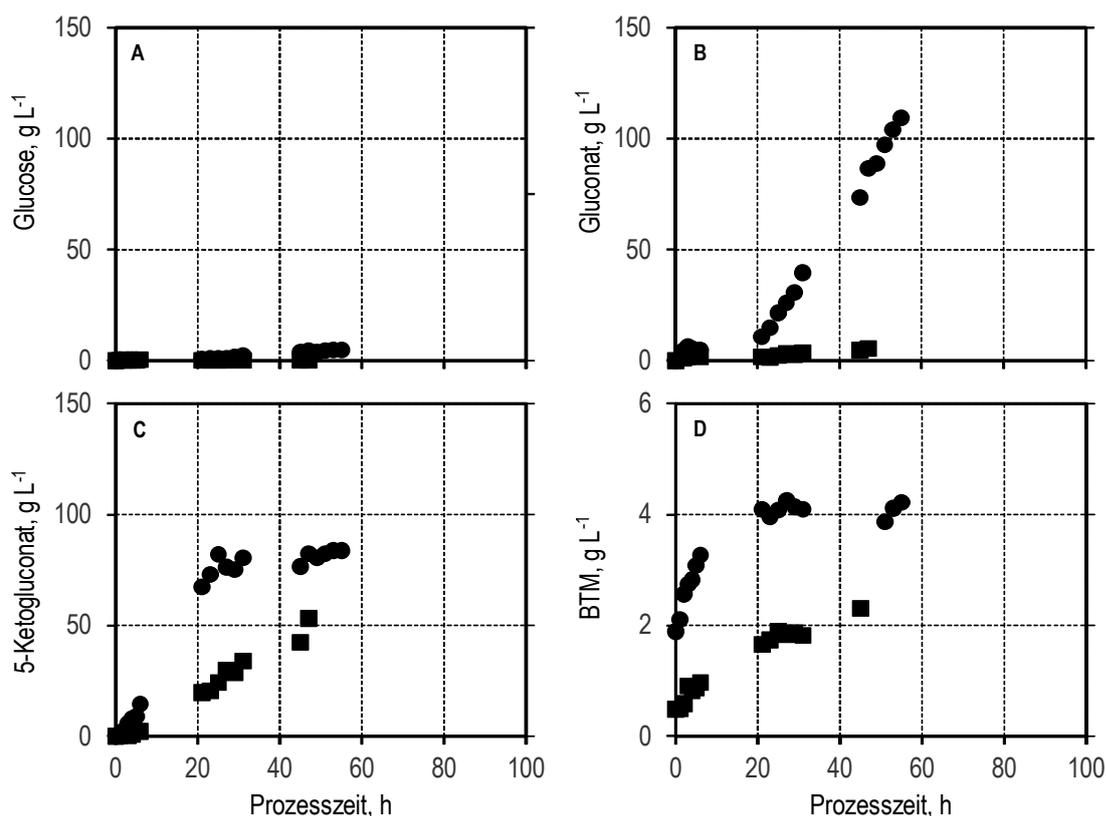


Abbildung 7-18: Zweistufige Oxidation von Glucose (A) zu 5-Ketogluconat (C) über Gluconat (B) bei Verwendung des Mediums D mit Komplexbestandteilen nach Merfort *et al.* (2006a) unter Einsatz verschiedener Konzentrationen von *G. oxydans* 621H BP.8 $\Delta adh::mgdh_{3504}$. (D). Glucosezugabe erfolgte mit konstanten Zulaufvolumenströmen von $2,0 \text{ mL h}^{-1}$ (■) und $7,3 \text{ mL h}^{-1}$ (●) ($T = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 4$; $P V^{-1}_{\text{max}} = 5 \text{ W L}^{-1}$, $F_{\text{Luft,min}} = 2 \text{ vvm}$, $V_R = 0,5 \text{ L}$, Medium D).

Diskussion

Die maximale 5-Ketogluconatkonzentration konnte im Zulaufverfahren mit dem Phosphatpuffer mit Ca^{2+} und Mg^{2+} + (Medium B, siehe Tabelle 4-5) im Vergleich zum Satzverfahren von 47 g L^{-1} auf 115 g L^{-1} nach 55 h gesteigert werden. Dabei wurde eine Produktausbeute von 59 % und eine Raum-Zeit-Ausbeute von $2,1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erzielt. Trotz des Zulaufmassenstroms unterhalb der zellspezifischen 5-Ketogluconatbildungsrate begann Gluconat ab 22 h bei einer 5-Ketogluconatkonzentration von 68 g L^{-1} zu akkumulieren. So wurde eine Gluconatkonzentration von 98 g L^{-1} nach 55 h gemessen. Durch Reduktion des konstanten Zulaufvolumenstroms von $F_{\text{zu}} = 7,6 \text{ mL h}^{-1}$ zu $F_{\text{zu}} = 1,9 \text{ mL h}^{-1}$ wurde eine 5-Ketogluconatkonzentration von 89 g L^{-1} bei einer Gluconatkonzentration von 21 g L^{-1} nach 96 h erzielt. Somit wurden eine Produktausbeute von 78 % und eine Raum-Zeit-Ausbeute von

0,9 g L⁻¹ h⁻¹ erreicht. Die Akkumulation von Gluconat trat auch bei Verwendung des Komplexmediums nach Merfort *et al.* (2006a) mit einem konstanten Zulaufvolumenstrom von 7,3 mL h⁻¹ auf. Es wird daher eine Produktinhibierung vermutet. Dies ist unter Anbetracht der Tatsache, dass auch Gluconat, welches dem 5-Ketogluconat strukturell ähnlich ist, eine inhibierende Wirkung zeigte (Velizarov und Beschkov 1998) möglich und würde den schnellen Anstieg von Gluconat ab 5-Ketogluconatkonzentrationen von etwa 70 g L⁻¹ erklären.

Allerdings wurde von Yuan *et al.* (2016b) eine Produktkonzentration von 118 g L⁻¹ mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 2,1 g L⁻¹ h⁻¹ und einer Produktausbeute von 73 % beschrieben. Aufgrund der vergleichbaren eingesetzten Biotrockenmassekonzentration lag die höhere Raum-Zeit-Ausbeute wahrscheinlich an der heterologen Expression einer membranständigen sekundären Alkohol-Dehydrogenase aus *Xanthomonas campestris* DSM3586, die *in vitro* eine siebenfach höhere Aktivität gegenüber Gluconat als die Polyol-Dehydrogenase aufwies. Mit einem Zulaufprozess waren Yuan *et al.* (2016a) sogar in der Lage die 5-Ketogluconatkonzentration auf 162 g L⁻¹ bei einer Raum-Zeit-Ausbeute von 2,5 g L⁻¹ h⁻¹ zu steigern, wobei die Produktausbeute geringfügig zu 69 % reduziert wurde. In diesem Prozess wurde ein weitreichend gentechnisch modifizierter *G. oxydans* mit gekoppelter rekombinanter homologer Expression der Polyol-Dehydrogenase, der Quinol-Oxidase sowie des Genclusters zur PQQ-Biosynthese verwendet.

Es ist zu folgern, dass zwar hohe Produktausbeuten und zellspezifische Produktbildungsrate mit dem Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.8 $\Delta adh::mgdh_{3504}$ erzielt wurden, allerdings wurden mit einer maximalen 5-Ketogluconatkonzentration von 115 g L⁻¹ nur etwa 71 % der höchsten in der Literatur beschriebenen Produktkonzentration von 162 g L⁻¹ (Yuan *et al.* 2016a) erreicht. Nichtsdestotrotz wurde mit dem Multideletionsstamm die höchste Produktausbeute von 78 % bei einer vergleichsweise hohen Produktkonzentration von 89 g L⁻¹ 5-Ketogluconat erzielt.

8 Zusammenfassung

Der Mikroorganismus *Gluconobacter oxydans* weist ein großes Potential als Ganzzellbiokatalysator in der weißen Biotechnologie auf und wird beispielsweise bereits in der Vitamin C Herstellung mit dem „Reichstein-Grüssner“ Verfahren industriell verwendet (Pappenberger und Hohmann 2014; Reichstein und Grüssner 1934). Der Grund hierfür ist seine metabolische Besonderheit mit den in der Cytoplasmamembran vorhandenen Dehydrogenasen, die diverse Zucker und Alkohole unvollständig im Periplasma oxidieren, sodass die Produkte der Stoffumwandlung im Reaktionsmedium akkumulieren. Gleichzeitig ist die Biotransformation an die Atmungskette gekoppelt und die Cofaktor-Regenerierung erfolgt über die Reduktion von Sauerstoff mit der Quinol-Oxidase (Liebl *et al.* 2014). In den letzten Jahren wurde dieser Mikroorganismus mit Hilfe neuer molekularbiologischer Methoden zu einem Multideletionsstamm, in dem neun membran-assoziierte Dehydrogenasen deletiert wurden, weiterentwickelt (Peters *et al.* 2013b; Peters *et al.* 2013a). Durch Generation eines Expressionsvektorsystems ist es möglich, gezielt die für die Stoffumwandlung benötigte(n) Dehydrogenase(en) in den Mikroorganismus zu (re-)integrieren (Mientus *et al.* 2017).

Bis jetzt wurden diese Multideletionsstämme lediglich in Schüttelkolben untersucht, um das Substratspektrum der membranständigen Dehydrogenasen (Peters *et al.* 2013b) oder verschiedene Expressionssysteme zur homologen Expression der membranständigen Polyol-Dehydrogenase zu charakterisieren (Mientus *et al.* 2017). Eine prozesstechnische Charakterisierung der Multideletionsstämme in Schüttelkolben hat den Nachteil, dass keine pH-Regelung erfolgt, der Sauerstoffeintrag im Vergleich zu Rührkesselreaktoren geringer ist sowie die Prozessführungsstrategien eingeschränkt sind (Büchs 2001; Chmiel und Weuster-Botz 2018). Aufgrund der Nachteile war es das Ziel dieser Arbeit verschiedene Multideletionsstämme in kontrollierten Rührkesselreaktoren anhand von zwei unterschiedlichen Biokonversionen zu charakterisieren. Zum einen wurde die einstufige Oxidation von *meso*-Erythritol zu L-Erythrose, die von der Polyol-Dehydrogenase katalysiert

wird, untersucht. Zum anderen wurde die zweistufige Oxidation von Glucose zu 5-Ketogluconat durchgeführt. Bei dieser Biokonversion wird zunächst Glucose zu Gluconat mit der Glucose-Dehydrogenase und anschließend Gluconat zu 5-Ketogluconat mit der Polyol-Dehydrogenase oxidiert

Bei Durchführung der einstufigen Oxidation von *meso*-Erythritol zu L-Erythrose, zeigte unter anderem *G. oxydans* 621H BP.8 – ein Multideletionsstamm, bei dem die Polyol-Dehydrogenase nicht deletiert wurde – einen vergleichsweise hohen zellspezifischen Produktertragskoeffizienten von $30 \pm 5 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1}$. Somit wurde dieser Stamm für die Etablierung eines Referenzprozesses mit ruhenden Zellen und zur quantitativen Charakterisierung der biokatalytischen Aktivität im Satzverfahren genutzt. Durch Analyse verschiedener Medienkomponenten konnte gezeigt werden, dass für die Biotransformation mit ruhenden Zellen ein Phosphatpuffer mit $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und $0,2 \text{ g L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ bei pH 6 verwendet werden kann und keine weiteren Komplexmedienbestandteile, Vitamine oder Spurenelemente benötigt werden. Unter diesen Bedingungen wurde mit einer initialen Biokatalysatorkonzentration von nur $2,8 \text{ g L}^{-1}$ eine L-Erythrosekonzentration von 242 g L^{-1} nach 23 h bei vollständigem *meso*-Erythritolumsatz und einer Raum-Zeit-Ausbeute von $10,5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erzielt. Mit dem Wildtypstamm *G. oxydans* 621H konnte unter identischen Bedingungen lediglich eine L-Erythrosekonzentration von 200 g L^{-1} nach 23 h bei einem *meso*-Erythritolumsatz von 83 % und einer Raum-Zeit-Ausbeute von $8,6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erzielt werden (siehe Abbildung 8-1). Ebenso wurde festgestellt, dass bei der L-Erythroseherstellung die Verwendung von ruhenden Zellen von Vorteil ist, da höhere Produktausbeuten erreicht wurden. In der Literatur wurden ähnliche maximale L-Erythrosekonzentrationen beschrieben, jedoch war die Raum-Zeit-Ausbeute stets niedriger. So erreichten Vorlop *et al.* (2009) und Willke *et al.* (2009) eine L-Erythrosekonzentration von 235 g L^{-1} mit *G. oxydans* DSM21030 im Zulaufverfahren bei einer Raum-Zeit-Ausbeute von $1,6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Mit *G. kondonii* wurden von Pan *et al.* (2016) im Zulaufverfahren eine L-Erythrosekonzentration von 208 g L^{-1} bei einer Raum-Zeit-Ausbeute von $6,5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erzielt.

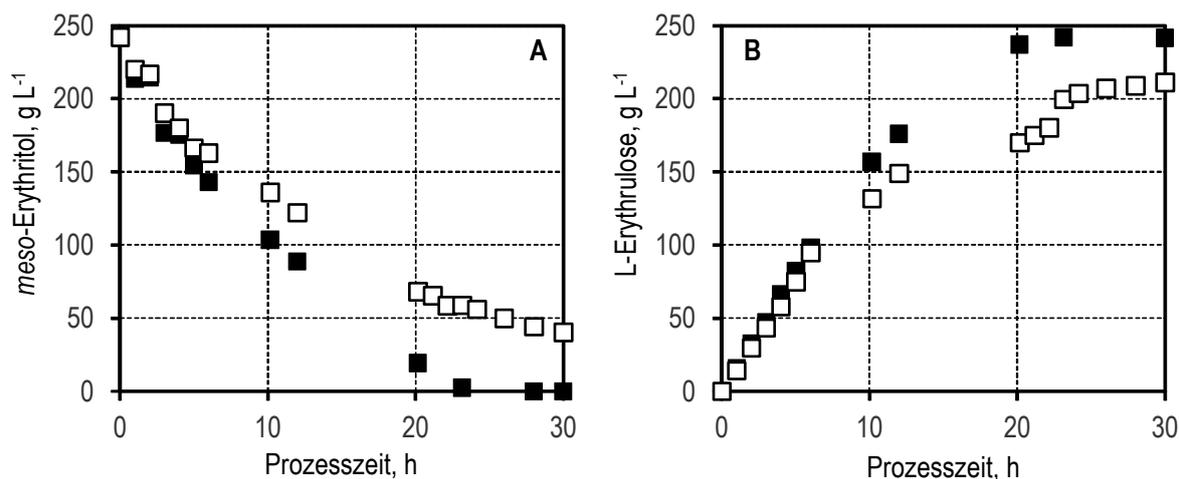


Abbildung 8-1: Oxidation von *meso*-Erythritol (A) zu L-Erythrulose (B) mit dem Wildtypstamm *G. oxydans* 621H (□) und dem Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.8 (■) im Phosphatpuffer mit Ca²⁺ und Mg²⁺ (T = 30 °C, pH 6; P V⁻¹_{max} = 5 W L⁻¹, F_{Luft} = 2 vvm, V_R = 0,7 L, Medium B, c_{X,0} = 2,8 g L⁻¹).

Bei Satzprozessen mit ruhenden Zellen im Phosphatpuffer mit Ca²⁺ und Mg²⁺ bei pH 6 wurde eine Substratüberschussinhibierung identifiziert. Durch Variation der initialen Eduktkonzentration konnte anhand der zellspezifischen Eduktverbrauchsrate die Substratüberschussinhibierung formalkinetisch mit dem Substratüberschussinhibierungsmodell nach Andrews (1968) beschrieben werden. Hierbei wurden eine Halbsättigungskonstante von $K_S = 2,6 \text{ g L}^{-1}$ und eine Inhibierungskonstante von $K_I = 119,3 \text{ g L}^{-1}$ ermittelt. Letztere ist ein Hinweis auf die bei höheren *meso*-Erythritolkonzentrationen einsetzende Inhibierung der Zellen. Aus diesem Modell konnten eine optimale Eduktkonzentration von $c_{E,opt} = 17,6 \text{ g L}^{-1}$ und eine optimale spezifische Eduktaufnahmerate von $15,1 \text{ g}_E \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ abgeleitet werden.

Darüber hinaus wurde eine Produktinhibierung durch L-Erythrulose festgestellt und diese formalkinetisch mit dem Modell nach Levenspiel (1980) beschrieben und eine maximale Produktkonzentration von $c_{P,max} = 328 \text{ g L}^{-1}$ abgeschätzt. Zur Überwindung der Substratüberschussinhibierung wurde eine kontinuierliche Prozessführung gewählt. Da ruhende Zellen verwendet werden sollten, wurde der Rührkesselreaktor um ein externes Querstromfiltrationsmodul erweitert, wodurch eine totale Zellrückhaltung sichergestellt wurde. Zusätzlich war es mit diesem Membranreaktor möglich, die Zellherstellung und die Biotransformation zu koppeln. Nach der Zellherstellung mit Komplexmedium und Mannitol als Kohlenstoffquelle über fünf hydraulische Verweilzeiten, wurde die Biotransformation durch Wechsel des Zulaufmediums zum Phosphatpuffer mit Ca²⁺ und Mg²⁺ sowie *meso*-Erythritol

gestartet. Durch die Zellrückhaltung wurde eine Biokatalysatorkonzentration von bis zu $14,9 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Bei einer Eduktkonzentration von 55 g L^{-1} *meso*-Erythritol im Zulauf wurde ein vollständiger Eduktumsatz bei einer Durchflussrate von $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ erzielt (siehe Abbildung 8-2). Somit konnte eine Raum-Zeit-Ausbeute von $27 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ L-Erythrose bei einem zellspezifischen L-Erythroseertragskoeffizienten von $4,4 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1}$ erreicht werden. Wei *et al.* (2018) erzielten durch homologe Expression der Transketolase in *P.pastoris* zwar eine knapp doppelt so hohe Raum-Zeit-Ausbeute von $47 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ jedoch bei einer Produktausbeute von nur 52 %. Hier wurde darüber hinaus eine höhere Biotrockenmassekonzentration von knapp 42 g L^{-1} eingesetzt, weswegen der zellspezifische Ertragskoeffizient mit $2,2 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1}$ niedriger im Vergleich zu $4,4 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1}$ im kontinuierlichen Membranreaktor war.

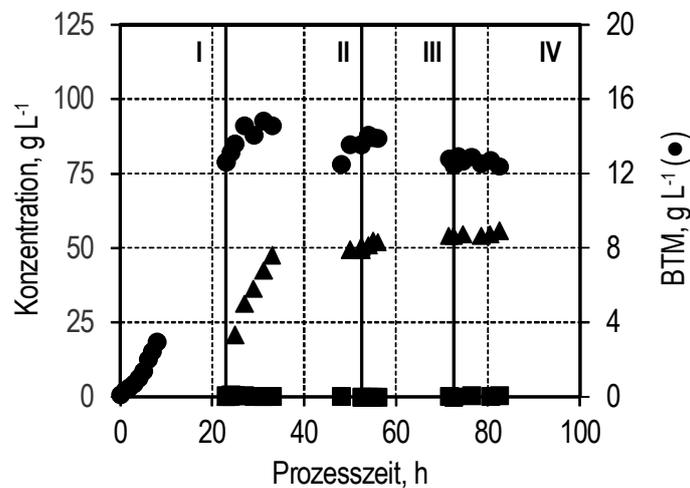


Abbildung 8-2: Oxidation von *meso*-Erythritol (■) zu L-Erythrose (▲) mit *G. oxydans* 621H BP.8 (●) im kontinuierlichen Verfahren mit externem Hohlfasermembranmodul zur totalen Zellrückhaltung. Biokatalysatorherstellung mit $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ (I) und Biokonversion mit $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ (II), $D = 0,3 \text{ h}^{-1}$ (III) und $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ (IV) ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6$; $P V^{-1} = 28 \text{ W L}^{-1}$, $F_{zu} = 2 \text{ vvm}$, $V_R = 1 \text{ L}$, $c_{E,zu} = 50 - 55 \text{ g L}^{-1}$, *G. oxydans* 621H BP.8).

Bei der zweistufigen Oxidation von Glucose zu 5-Ketogluconat über Gluconat wurde bei allen Multideletionsstämmen festgestellt, dass die zellspezifischen Glucoseoxidationsraten zwischen $24 - 29 \text{ g}_E \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ signifikant um Faktor 10 größer waren als die zellspezifischen 5-Ketogluconatbildungsraten zwischen $2,1 - 3,3 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$. Im Vergleich zur Oxidation von *meso*-Erythritol konnte im Satzverfahren gezeigt werden, dass $\text{pH } 4 - \text{pH } 4,5$ gegenüber $\text{pH } 6$ vorzuziehen ist, da der Eduktumsatz um knapp 20 % höher war. In Satzprozessen akkumulierte wegen der unterschiedlichen zellspezifischen Glucoseoxidations- und 5-Ketogluconatbildungsraten das Intermediat Gluconat. Mit steigender Konzentration des Intermediats konnte eine signifikante Reduktion der zellspezifischen Produktbildungsrate von

5-Ketogluconat beobachtet werden. So wurde eine maximale zellspezifische 5-Ketogluconatbildungsrate von $2,9 \pm 0,4 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei $c_{\text{Gluconat},0} = 24 \text{ g L}^{-1}$ ermittelt, während bei einer Gluconatkonzentration von $c_{\text{Gluconat},0} = 90 \text{ g L}^{-1}$ eine zellspezifische Produktbildungsrate von $1,4 \pm 0,1 \text{ g}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ ermittelt wurde. Im Satzprozess wurde daher eine maximale Produktkonzentration von 47 g L^{-1} bei einer Produktausbeute von 70 % mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von $1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht. In Satzprozessen erzielten Merfort *et al.* (2006a) mit einem *G. oxydans* mit deletierter membranständiger Gluconat-2-Dehydrogenase eine Produktausbeute von lediglich 54 % bei einer 5-Ketogluconatkonzentration von 57 g L^{-1} sowie Yuan *et al.* (2016b) mit einem rekombinanten *G. oxydans* mit heterologer Expression einer sekundären Alkohol-Dehydrogenase aus *Xanthomonas campestris* eine Produktausbeute von 73 % bei einer 5-Ketogluconatkonzentration von 118 g L^{-1} .

Um eine Gluconatakkumulation zu verhindern, wurde der Zulaufprozess mit konstantem Zulaufvolumenstrom als geeignete Prozessführungsstrategie gewählt. Bei einem initialen Glucosemassenstrom von $1,5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ wurde eine maximale 5-Ketogluconatkonzentration von $89,1 \text{ g L}^{-1}$ nach 96 h bei einer Produktausbeute von 78 % und einer Raum-Zeit-Ausbeute von $0,9 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erzielt. Durch Erhöhung des Glucosemassenstroms auf $6,1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ wurde nach 55 h eine maximale Produktkonzentration von 115 g L^{-1} bei einer Produktausbeute von 59 % und einer Raum-Zeit-Ausbeute von $2,1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht. Yuan *et al.* (2016a) erzielte im Zulaufverfahren eine deutlich höhere 5-Ketogluconatkonzentration von 162 g L^{-1} bei einer Raum-Zeit-Ausbeute von $2,5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und einer Produktausbeute von 69 %. Dies wurde mit einem *G. oxydans* mit umfänglichem Eingriff in die Atmungskette erreicht. Neben homologer Überexpression der Glucose- und Polyol-Dehydrogenase wurden das Gencluster der Pyrrolochinolinchinon (PQQ)-Biosynthese und die Gene der Quinol-Oxidase homolog überexprimiert. PQQ fungiert als prosthetische Gruppe und wird für den Elektronentransport in der Atmungskette benötigt. Die Quinol-Oxidase dient zur Cofaktorregenerierung durch Sauerstoffreduktion. Die Charakterisierung der Multideletionsstämme in kontrollierten Rührkesselreaktoren verdeutlichte aufgrund der im Vergleich zur Literatur höheren erzielten zellspezifischen Produktbildungsraten und Produktkonzentrationen das Potential der Multideletionsstämme für biotechnologische Anwendungen. Allerdings wurde gerade bei der zweistufigen Biotransformation das Ungleichgewicht der Dehydrogenasen in der Membran durch verschiedene Expressionspromotoren nicht endgültig gelöst. Die im Vergleich zum Wildtypstamm nur um etwa 10 % erhöhte zellspezifische Produktbildungsrate von L-Erythrose könnte bedeuten, dass weitere Bestandteile der Atmungskette, die für den Elektronentransport oder für die Sauerstoffreduktion relevant sind, geschwindigkeitslimitierend werden.

9 Ausblick

Bei der L-Erythroseherstellung konnten sowohl eine Substratüberschussinhibierung als auch eine Produktinhibierung identifiziert werden. Durch ein kontinuierliches System mit totaler Zellrückhaltung wurde die Substratüberschussinhibierung, nicht allerdings die Produktinhibierung überwunden. Die Produktinhibierung der Zellen wurde zwar reduziert, indem die Eduktkonzentration im Zulauf derart eingestellt wurde, dass lediglich eine nicht-inhibierende L-Erythrosekonzentration bei vollständigem Umsatz im Gleichgewicht vorlag. Dies führte jedoch zu einer Reduktion der maximalen Raum-Zeit-Ausbeute. Eine Möglichkeit die Produktinhibierung zu überwinden, wäre eine Membranbioreaktorkaskade. Hier könnte durch Einstellung der mittleren hydraulischen Verweilzeit der Eduktumsatz im ersten Membranbioreaktor so geregelt werden, dass eine nicht-inhibierende Produktkonzentration vorliegt, die dann in den zweiten Membranbioreaktor gelangt. In diesem würde der Umsatz des verbleibenden Edukts erfolgen, sodass eine möglichst hohe Produktkonzentration bei vollständigem Eduktumsatz erzielt wird. Alternativ könnte eine Reaktorkaskade ohne Zellrückhaltung erfolgen, bei denen die Zellen des letzten Reaktors separiert werden und dann für den Zulauf des ersten Reaktors wiederverwendet werden.

Hinsichtlich der 5-Ketogluconatherstellung wäre die Identifikation einer möglichen Produktinhibierung interessant, da auch in den Zulaufprozessen das Intermediat Gluconat akkumulierte. Darüber hinaus sollte durch geeignete molekularbiologische Methoden das Verhältnis der Proteinexpression verändert werden, sodass die spezifische 5-Ketogluconatbildungsrate gesteigert wird. So könnte das Gen der Glucose-Dehydrogenase unter Kontrolle eines schwachen Promotors integriert werden, wodurch die Expression der Glucose-Dehydrogenase reduziert werden könnte. Durch Nutzung eines stärkeren Promotors für die Polyol-Dehydrogenase könnte deren Expression gesteigert und ein größerer Anteil in der Membran integriert werden. Dadurch könnte eine Anpassung des unterschiedlichen

Verhältnisses der spezifischen Raten erfolgen und folglich die Akkumulation von Gluconat vermieden und die zellspezifische 5-Ketogluconatbildungsrate erhöht werden.

Die molekularbiologische Weiterentwicklung der Multideletionsstämme könnte durch rekombinante Genexpression von weiteren Proteinen der Atmungskette erfolgen. So wäre es auch für die Multideletionsstämme äußerst interessant, die Gene der Quinol-Oxidase sowie die PQQ-Biosynthese Gene verstärkt zu exprimieren. Da bei der L-Erythroseherstellung nur eine geringfügig gesteigerte biokatalytische Effizienz der Multideletionsstämme gegenüber dem Wildtypstamm beobachtet wurde, wird vermutet, dass andere Komponenten der Atmungskette und nicht die Anzahl der Polyol-Dehydrogenasen in der cytoplasmatischen Membran die spezifische Produktbildungsrate limitieren. Es wäre ebenso interessant, in die Multideletionsstämme „neue“ Dehydrogenasen aus dem Metagenom zu integrieren und damit ein neuartiges Produktspektrum an Multideletionsstämmen zu generieren.

10 Literaturverzeichnis

- Adachi O, Ano Y, Toyama H, Matsushita K. 2007. Biooxidation with PQQ- and FAD-Dependent Dehydrogenases. In: Schmid RD, Urlacher VB, editors. Modern biooxidation. Enzymes, reactions and applications. Weinheim: WILEY-VCH. p 1–41.
- Adachi O, Fujii Y, Ghaly MF, Toyama H, Shinagawa E, Matsushita K. 2001. Membrane-bound quinoprotein D-arabitol dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans* IFO 3257. A versatile enzyme for the oxidative fermentation of various ketoses. *Biosci Biotechnol Biochem* 65(12):2755–2762.
- Adachi O, Tayama K, Shinagawa E, Matsushita K, Ameyama M. 1978. Purification and Characterization of Particulate Alcohol Dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Agricultural and Biological Chemistry* 42(11):2045–2056.
- Adachi O, Tayama K, Shinagawa E, Matsushita K, Ameyama M. 1980. Purification and Characterization of Membrane-bound Aldehyde Dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Agricultural and Biological Chemistry* 44(3):503–515.
- Adams MR, Moss MO. 2008. Food microbiology. Cambridge: Royal Society of Chemistry. 463 p.
- Ahmed N. 2005. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes research and clinical practice* 67(1):3–21.
- Ameyama M, Matsushita K, Shinagawa E, Adachi O. 1987. Sugar-oxidizing Respiratory Chain of *Gluconobacter suboxydans*. Evidence for a Branched Respiratory Chain and Characterization of Respiratory Chain-Linked Cytochromes. *Agricultural and Biological Chemistry* 51(11):2943–2950.
- Ameyama M, Shinagawa E, Matsushita K, Adachi O. 1981. D -Glucose Dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans*. Solubilization, Purification and Characterization. *Agricultural and Biological Chemistry* 45(4):851–861.
- Andrews JF. 1968. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. *Biotechnol Bioeng* 10(6):707–723.

- Angrick M, Rewicki D. 1980. Die Maillard-Reaktion. *Chem. Unserer Zeit* 14(5):149–157.
- Ano Y, Shinagawa E, Adachi O, Toyama H, YAKUSHI T, Matsushita K. 2011. Selective, high conversion of D-glucose to 5-keto-D-gluconate by *Gluconobacter suboxydans*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 75(3):586–589.
- Anthony C. 2004. The quinoprotein dehydrogenases for methanol and glucose. *Archives of biochemistry and biophysics* 428(1):2–9.
- Badenhorst CPS, Bornscheuer UT. 2018. Getting Momentum. From Biocatalysis to Advanced Synthetic Biology. *Trends in biochemical sciences* 43(3):180–198.
- Bauer R, Katsikis N, Varga S, Hekmat D. 2005. Study of the inhibitory effect of the product dihydroxyacetone on *Gluconobacter oxydans* in a semi-continuous two-stage repeated-fed-batch process. *Bioprocess and biosystems engineering* 28(1):37–43.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. 2014. Der Calvin-Zyklus und der Pentosephosphatweg. In: Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Gatto GJ, editors. *Biochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum. p 592–618.
- Bertau M. 2002. Novel Developments in Biocatalytic Organic Chemistry. *COC* 6(11):987–1014.
- Bongs J, Hahn D, Schörken U, Sprenger GA, Kragl U, Wandrey C. 1997. Continuous production of erythrose using transketolase in a membrane reactor. *Biotechnol Lett* 19(3):213–216.
- Bornscheuer UT, Huisman GW, Kazlauskas RJ, Lutz S, Moore JC, Robins K. 2012. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* 485(7397):185–194.
- Boudrant J. 1990. Microbial processes for ascorbic acid biosynthesis. A review. *Enzyme and Microbial Technology* 12(5):322–329.
- Buchert J, Puls J, Poutanen K. 1988. Comparison of *Pseudomonas fragi* and *Gluconobacter oxydans* for production of xylonic acid from hemicellulose hydrolyzates. *Appl Microbiol Biotechnol* 28(4-5):367–372.
- Büchs J. 2001. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochemical Engineering Journal* 7(2):91–98.
- Burschäpers J, Schustolla D, Schügerl K, Röper H, Troostembergh JC de. 2002. Engineering aspects of the production of sugar alcohols with the osmophilic yeast *Moniliella tomentosa var pollinis*. Part I. Batch and fed-batch operation in stirred tank. *Process Biochemistry* 38(4):497–506.
- Carstensen F, Apel A, Wessling M. 2012. In situ product recovery. Submerged membranes vs. external loop membranes. *Journal of Membrane Science* 394-395:1–36.
- Carvalho CCCR de. 2017. Whole cell biocatalysts. Essential workers from Nature to the industry. *Microbial biotechnology* 10(2):250–263.

- Castiglione K. 2018. Enzymkinetik. In: Chmiel H, Takors R, Weuster-Botz D, editors. Bioprozesstechnik. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- Castiglione K, Weuster-Botz D. 2018. Enzymatische Prozesse. In: Chmiel H, Takors R, Weuster-Botz D, editors. Bioprozesstechnik. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- Chmiel H, Weuster-Botz D. 2018. Bioreaktoren. In: Chmiel H, Takors R, Weuster-Botz D, editors. Bioprozesstechnik. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- Claret C, Bories A, Soucaille P. 1992. Glycerol inhibition of growth and dihydroxyacetone production by *Gluconobacter oxydans*. *Curr Microbiol* 25(3):149–155.
- Claret C, Bories A, Soucaille P. 1993. Inhibitory effect of dihydroxyacetone on *Gluconobacter oxydans*. Kinetic aspects and expression by mathematical equations. *Journal of Industrial Microbiology* 11(2):105–112.
- Claret C, Salmon JM, Romieu C, Bories A. 1994. Physiology of *Gluconobacter oxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol. *Appl Microbiol Biotechnol* 41(3):359–365.
- Deppenmeier U, Ehrenreich A. 2009. Physiology of acetic acid bacteria in light of the genome sequence of *Gluconobacter oxydans*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 16(1-2):69–80.
- Deppenmeier U, Hoffmeister M, Prust C. 2002. Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 60(3):233–242.
- Draxler J, Siebenhofer M. 2014. Verfahrenstechnik in Beispielen. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden.
- Drepper T, Eggert T, Hummel W, Leggewie C, Pohl M, Rosenau F, Jaeger K-E. 2006. Neue Biokatalysatoren für die Weiße Biotechnologie. *Chemie Ingenieur Technik* 78(3):239–248.
- Eikmanns B, Eikmanns M. 2013. Geschichtlicher Überblick. In: Sahm H, Antranikian G, Stahmann K-P, Takors R, editors. Industrielle Mikrobiologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. p 2–17.
- Elfari M, Ha S-W, Bremus C, Merfort M, Khodaverdi V, Herrmann U, Sahm H, Grisch H. 2005. A *Gluconobacter oxydans* mutant converting glucose almost quantitatively to 5-keto-d-gluconic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* 66(6):668–674.
- EI-Mansi EMT, Bryce CFA, Hartley BS, Demain AL. 2006. Fermentation Microbiology and Biotechnology. An Historical Perspective. In: EI-Mansi EMT, Bryce CFA, Demain AL, Allman AR, editors. Fermentation Microbiology and Biotechnology, Second Edition: CRC Press.
- Emig G, Klemm E. 2017. Chemische Reaktionstechnik. 1 Online-Ressource (XI, 600 S. 201 Abb).
- Falke U. 2010. Biotechnologie in Deutschland. 25 Jahre Unternehmensgründungen.
- Flaschel E, Sell D. 2005. Charme und Chancen der Weißen Biotechnologie. *Chemie Ingenieur Technik* 77(9):1298–1312.

- Gaden EL. 1959. Fermentation process kinetics. *Biotechnol. Bioeng.* 1(4):413–429.
- Gao C, Wang X, Ma C, Xu P. 2013. Production of hydroxypyruvate from glycerate by a novel biotechnological route. *Bioresource technology* 131:552–554.
- Gao L, Hu Y, Liu J, Du G, Zhou J, Chen J. 2014. Stepwise metabolic engineering of *Gluconobacter oxydans* WSH-003 for the direct production of 2-keto-L-gulonic acid from D-sorbitol. *Metabolic engineering* 24:30–37.
- García-García I, Cañete-Rodríguez AM, Santos-Dueñas IM, Jiménez-Hornero JE, Ehrenreich A, Liebl W, García-Martínez T, Mauricio JC. 2017. Biotechnologically relevant features of gluconic acid production by acetic acid bacteria. *Acetic Acid Bacteria* 6(1).
- Girot P, Moroux Y, Duteil XP, Nguyen C, Boschetti E. 1990. Composite affinity sorbents and their cleaning in place. *Journal of Chromatography A* 510:213–223.
- Gosselé F, van den Mooter M, Verdonck L, Swings J, Ley J de. 1981. The nitrogen requirements of *Gluconobacter*, *Acetobacter* and *Frateuria*. *Antonie van Leeuwenhoek* 47(4):289–296.
- Graf P, Wirsching S. 2015. Weiße Biotechnologie. Chancen für eine biobasierte Wirtschaft.
- Greenfield S, Claus GW. 1972. Nonfunctional tricarboxylic acid cycle and the mechanism of glutamate biosynthesis in *Acetobacter suboxydans*. *Journal of bacteriology* 112(3):1295–1301.
- Gupta A, Singh VK, Qazi GN, Kumar A. 2001. *Gluconobacter oxydans*: its biotechnological applications. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 3(3):445–456.
- Hagen S, Stahl U, Lelley J, Stahmann K-P. 2013. Lebensmittel. In: Sahm H, Antranikian G, Stahmann K-P, Takors R, editors. *Industrielle Mikrobiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. p 44–71.
- Hanke T, Noh K, Noack S, Polen T, Bringer S, Sahm H, Wiechert W, Bott M. 2013. Combined fluxomics and transcriptomics analysis of glucose catabolism via a partially cyclic pentose phosphate pathway in *Gluconobacter oxydans* 621H. *Appl Environ Microbiol* 79(7):2336–2348.
- Hanke T, Richhardt J, Polen T, Sahm H, Bringer S, Bott M. 2012. Influence of oxygen limitation, absence of the cytochrome bc(1) complex and low pH on global gene expression in *Gluconobacter oxydans* 621H using DNA microarray technology. *Journal of Biotechnology* 157(3):359–372.
- Heidelberg KB, Gilbert JA, Joint I. 2010. Marine genomics. At the interface of marine microbial ecology and biodiscovery. *Microbial biotechnology* 3(5):531–543.
- Hekmat D, Bauer R, Fricke J. 2003. Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone from glycerol with *Gluconobacter oxydans*. *Bioprocess and biosystems engineering* 26(2):109–116.

- Hiller J, Franco-Lara E, Papaioannou V, Weuster-Botz D. 2007. Fast sampling and quenching procedures for microbial metabolic profiling. *Biotechnol Lett* 29(8):1161–1167.
- Ho CW, Lazim AM, Fazry S, Zaki UKHH, Lim SJ. 2017. Varieties, production, composition and health benefits of vinegars. A review. *Food chemistry* 221:1621–1630.
- Hoefel T, Wittmann E, Reinecke L, Weuster-Botz D. 2010. Reaction engineering studies for the production of 2-hydroxyisobutyric acid with recombinant *Cupriavidus necator* H 16. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88(2):477–484.
- Hölscher T, Görisch H. 2006. Knockout and overexpression of pyrroloquinoline quinone biosynthetic genes in *Gluconobacter oxydans* 621H. *Journal of bacteriology* 188(21):7668–7676.
- Hölscher T, Weinert-Sepalage D, Görisch H. 2007. Identification of membrane-bound quinoprotein inositol dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans* ATCC 621H. *Microbiology* 153(Pt 2):499–506.
- Hortsch R. 2011. Miniaturisierte Rührreaktoren zur Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen. Dissertation. München.
- Hortsch R, Krispin H, Weuster-Botz D. 2011. Process performance of parallel bioreactors for batch cultivation of *Streptomyces tendae*. *Bioprocess and biosystems engineering* 34(3):297–304.
- Hutkins RW (editor). 2006. *Microbiology and technology of fermented foods*. Ames, Iowa, Chicago, Illinois: Blackwell Pub; IFT Press. 473 p.
- Isobe K, Nishise H. 1995. A new enzymatic method for glycolaldehyde production from ethylene glycol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 1(1):37–43.
- Janzen NH, Schmidt M, Krause C, Weuster-Botz D. 2015. Evaluation of fluorimetric pH sensors for bioprocess monitoring at low pH. *Bioprocess and biosystems engineering* 38(9):1685–1692.
- Jermann R, Toumiat M, Imfeld D. 2002. Development of an in vitro efficacy test for self-tanning formulations. *International journal of cosmetic science* 24(1):35–42.
- Jeya M, Lee K-M, Tiwari MK, Kim J-S, Gunasekaran P, Kim S-Y, Kim I-W, Lee J-K. 2009. Isolation of a novel high erythritol-producing *Pseudozyma tsukubaensis* and scale-up of erythritol fermentation to industrial level. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83(2):225–231.
- Kantzow C, Mayer A, Weuster-Botz D. 2015. Continuous gas fermentation by *Acetobacterium woodii* in a submerged membrane reactor with full cell retention. *Journal of Biotechnology* 212:11–18.
- Katryniok B, Kimura H, Skrzyńska E, Girardon J-S, Fongarland P, Capron M, Ducoulombier R, Mimura N, Paul S, Dumeignil F. 2011. Selective catalytic oxidation of glycerol. Perspectives for high value chemicals. *Green Chem.* 13(8):1960.

- Kerstens K, Ley J de. 1968. The occurrence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 34(1):393–408.
- Kiefler I, Bringer S, Bott M. 2017. Metabolic engineering of *Gluconobacter oxydans* 621H for increased biomass yield. *Appl Microbiol Biotechnol* 101(13):5453–5467.
- Kitos PA, Wang CH, Mohler BA, King TE, Cheldelin VH. 1958. Glucose and gluconate dissimilation in *Acetobacter suboxydans*. *The Journal of Biological Chemistry* 233(6):1295–1298.
- Klasen R, Bringer-Meyer S, Sahm H. 1992. Incapability of *Gluconobacter oxydans* to produce tartaric acid. *Biotechnology and Bioengineering* 40(1):183–186.
- Kostner D, Luchterhand B, Junker A, Volland S, Daniel R, Buchs J, Liebl W, Ehrenreich A. 2015. The consequence of an additional NADH dehydrogenase paralog on the growth of *Gluconobacter oxydans* DSM3504. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(1):375–386.
- Kotera U, Kodama T, Minoda Y, Yamada K. 1971. Isolation and Chemical Structure of New Oxidation Product of 5-Ketogluconic Acid, and a Hypothetical Pathway from Glucose to Tartaric Acid through this New Compound. *Agricultural and Biological Chemistry* 36(8):1315–1325.
- Krajewski V, Simic P, Mouncey NJ, Bringer S, Sahm H, Bott M. 2010. Metabolic Engineering of *Gluconobacter oxydans* for Improved Growth Rate and Growth Yield on Glucose by Elimination of Gluconate Formation. *Applied and Environmental Microbiology* 76(13):4369–4376.
- Kruger NJ, Schaewen A von. 2003. The oxidative pentose phosphate pathway. Structure and organisation. *Current opinion in plant biology* 6(3):236–246.
- Kulhánek M. 1989. Microbial Dehydrogenations of Monosaccharides. In: Neidleman SL, editor. *Advances in applied microbiology*. San Diego: Academic Press. p 141–182.
- Kulhánek M, Tadra M. 1973. Biochemical dehydrogenations of Saccharides. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Allgemeine, Landwirtschaftliche und Technische Mikrobiologie* 128(1-2):25–30.
- Kusterer A, Krause C, Kaufmann K, Arnold M, Weuster-Botz D. 2008. Fully automated single-use stirred-tank bioreactors for parallel microbial cultivations. *Bioprocess and biosystems engineering* 31(3):207–215.
- La China S, Zanichelli G, Vero L de, Gullo M. 2018. Oxidative fermentations and exopolysaccharides production by acetic acid bacteria. A mini review. *Biotechnology Letters*.

- Levenspiel O. 1980. The monod equation. A revisit and a generalization to product inhibition situations. *Biotechnol. Bioeng.* 22(8):1671–1687.
- Levering PR, Weenk G, Olijve W, Dijkhuizen L, Harder W. 1988. Regulation of gluconate and ketogluconate production in *Gluconobacter oxydans* ATCC 621-H. *Arch. Microbiol.* 149(6):534–539.
- Liebl W, Angelov A, Juergensen J, Chow J, Loeschcke A, Drepper T, Classen T, Pietruszka J, Ehrenreich A, Streit WR, Jaeger K-E. 2014. Alternative hosts for functional (meta)genome analysis. *Appl Microbiol Biotechnol* 98(21):9149.
- Ma C, Gao C, Qiu J, Hao J, Liu W, Wang A, Zhang Y, Wang M, Xu P. 2007. Membrane-bound L- and D-lactate dehydrogenase activities of a newly isolated *Pseudomonas stutzeri* strain. *Appl Microbiol Biotechnol* 77(1):91–98.
- Macauley S, McNeil B, Harvey LM. 2001. The genus *Gluconobacter* and its applications in biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology* 21(1):1–25.
- Matsushita K, Adachi O (editors). 1994. *Respiratory Chains and Bioenergetics of Acetic Acid Bacteria*: Elsevier.
- Matsushita K, Fujii Y, Ano Y, Toyama H, Shinjoh M, Tomiyama N, Miyazaki T, Sugisawa T, Hoshino T, Adachi O. 2003. 5-Keto-D-Gluconate production is catalyzed by a quinoprotein glycerol dehydrogenase, major polyol dehydrogenase, in *Gluconobacter* Species. *Appl Environ Microbiol* 69(4):1959–1966.
- Matsushita K, Nagatani Y, Shinagawa E, Adachi O, Ameyama M. 1989. Effect of extracellular pH on the respiratory chain and energetics of *Gluconobacter suboxydans*. *Agricultural and Biological Chemistry* 53(11):2895–2902.
- Matsushita K, Shinagawa E, Adachi O, Ameyama M. 1987. Purification, characterization and reconstitution of cytochrome o-type oxidase from *Gluconobacter suboxydans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 894(2):304–312.
- Matsushita K, Shinagawa E, Ameyama M. 1982. D-Gluconate dehydrogenase from bacteria, 2-keto-d-gluconate-yielding, membrane-bound. In: Wood WA, editor. *Carbohydrate metabolism*. New York, NY: Acad. Press. p 187–193.
- Matsushita K, Toyama H, Adachi O. 1994. Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Advances in microbial physiology* 36:247–301.
- Matzerath I, Kläui W, Klasen R, Sahn H. 1995. Vanadate catalysed oxidation of 5-keto-D-gluconic acid to tartaric acid. The unexpected effect of phosphate and carbonate on rate and selectivity. *Inorganica Chimica Acta* 237(1-2):203–205.
- Meiberg JBM, Spa HA. 1983. Microbial production of gluconic acid and gluconates. *Antonie van Leeuwenhoek* 49(1):89–90.

- Merfort M, Herrmann U, Bringer-Meyer S, Sahm H. 2006a. High-yield 5-keto-D-gluconic acid formation is mediated by soluble and membrane-bound gluconate-5-dehydrogenases of *Gluconobacter oxydans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 73(2):443–451.
- Merfort M, Herrmann U, Ha S-W, Elfari M, Bringer-Meyer S, Görisch H, Sahm H. 2006b. Modification of the membrane-bound glucose oxidation system in *Gluconobacter oxydans* significantly increases gluconate and 5-keto-D-gluconic acid accumulation. *Biotechnol. J.* 1(5):556–563.
- Meyer M, Schweiger P, Deppenmeier U. 2013. Effects of membrane-bound glucose dehydrogenase overproduction on the respiratory chain of *Gluconobacter oxydans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(8):3457–3466.
- Mientus M, Kostner D, Peters B, Liebl W, Ehrenreich A. 2017. Characterization of membrane-bound dehydrogenases of *Gluconobacter oxydans* 621H using a new system for their functional expression. *Appl Microbiol Biotechnol* 101(8):3189–3200.
- Mizanur RM, Takeshita K, Moshino H, Takada G, Izumori K. 2001. Production of L-erythrose via L-erythrulose from erythritol using microbial and enzymatic reactions. *J Biosci Bioeng* 92(3):237–241.
- Monod J. 1949. The Growth of Bacterial Cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* 3(1):371–394.
- Moonmangmee D, Adachi O, Shinagawa E, Toyama H, Theeragool G, Lotong N, Matsushita K. 2002. L-Erythrulose Production by Oxidative Fermentation is Catalyzed by PQQ-Containing Membrane-bound Dehydrogenase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 66(2):307–318.
- Ng H. 1969. Effect of decreasing growth temperature on cell yield of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 98(1):232–237.
- Nieuwenhuizen PJ, Lyon D. 2011. Anticipating opportunities in industrial biotechnology. Sizing the market and growth scenarios. *J Commer Biotechnol* 17(2):159–164.
- OECD. 2001. Second OECD Ad Hoc Meeting on Biotechnology Statistics.
- Olijve W, Kok JJ. 1979a. An analysis of the growth of *Gluconobacter oxydans* in chemostat cultures. *Arch. Microbiol.* 121(3):291–297.
- Olijve W, Kok JJ. 1979b. Analysis of growth of *Gluconobacter oxydans* in glucose containing media. *Arch. Microbiol.* 121(3):283–290.
- Pagliari M, Ciriminna R, Kimura H, Rossi M, Della Pina C. 2007. From glycerol to value-added products. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 46(24):4434–4440.
- Pan L, Fang Y-k, Zhou P, Jin K-q, Wang G, Liu Y-P. 2016. Strategy of oxygen transfer coefficient control on the L-erythrulose fermentation by newly isolated *Gluconobacter kondonii*. *Electron J Biotechnol* 24:26–31.

- Pappenberger G, Hohmann H-P. 2014. Industrial production of L-ascorbic Acid (vitamin C) and D-isoascorbic acid. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 143:143–188.
- Peters B, Junker A, Brauer K, Mühlthaler B, Kostner D, Mientus M, Liebl W, Ehrenreich A. 2013a. Deletion of pyruvate decarboxylase by a new method for efficient markerless gene deletions in *Gluconobacter oxydans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(6):2521–2530.
- Peters B, Mientus M, Kostner D, Daniel R, Liebl W, Ehrenreich A. 2017. Expression of membrane-bound dehydrogenases from a mother of vinegar metagenome in *Gluconobacter oxydans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 101(21):7901–7912.
- Peters B, Mientus M, Kostner D, Junker A, Liebl W, Ehrenreich A. 2013b. Characterization of membrane-bound dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* 621H via whole-cell activity assays using multideletion strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(14):6397–6412.
- Poget C, Dubuis B, Stockar U von. 1994. Acetate production from lactate and glucose fermentation by *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnol Lett* 16(12):1293–1298.
- Pronk JT, Levering PR, Olijve W, van Dijken P. 1989. Role of NADP-dependent and quinoprotein glucose dehydrogenases in gluconic acid production by *Gluconobacter oxydans*. *Enzyme and Microbial Technology* 11:160–164.
- Prust C, Hoffmeister M, Liesegang H, Wiezer A, Fricke WF, Ehrenreich A, Gottschalk G, Deppenmeier U. 2005. Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Nature biotechnology* 23(2):195–200.
- Puskeiler R, Weuster-Botz D. 2004. Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab. Kultivierung von *Escherichia coli*. *Chemie Ingenieur Technik* 76(12):1865–1869.
- Qi Z, Yang H, Xia X, Quan W, Wang W, Yu X. 2014. Achieving high strength vinegar fermentation via regulating cellular growth status and aeration strategy. *Process Biochemistry* 49(7):1063–1070.
- Ragsdale SW, Pierce E. 2008. Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochimica et biophysica acta* 1784(12):1873–1898.
- Ramachandran S, Fontanille P, Pandey A, Larroche C. 2006. Gluconic Acid: Properties, Applications and Microbial Production. *Food technology and biotechnology* 44(2):185–195.
- Rao R. MR, Stokes JL. 1952. Nutrition of The Acetic Acid Bacteria. *J. Bacteriol.* 65:405–412.
- Raspor P, Goranovic D. 2008. Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology* 28(2):101–124.
- Reichstein T, Grüssner A. 1934. Eine ergiebige Synthese der l-Ascorbinsäure (C-Vitamin). *HCA* 17(1):311–328.
- Richhardt J, Bringer S, Bott M. 2012. Mutational analysis of the pentose phosphate and Entner-Doudoroff pathways in *Gluconobacter oxydans* reveals improved growth of a Δ edd Δ eda mutant on mannitol. *Appl Microbiol Biotechnol* 78(19):6975–6986.

- Richhardt J, Luchterhand B, Bringer S, Büchs J, Bott M. 2013. Evidence for a key role of cytochrome bo₃ oxidase in respiratory energy metabolism of *Gluconobacter oxydans*. *Journal of bacteriology* 195(18):4210–4220.
- Robertson DE, Steer BA. 2004. Recent progress in biocatalyst discovery and optimization. *Current opinion in chemical biology* 8(2):141–149.
- Rogers P, Chen J-S, Zidwick MJ. 2013. Organic Acid and Solvent Production. Acetic, Lactic, Gluconic, Succinic, and Polyhydroxyalkanoic Acids. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F, editors. *The prokaryotes. Applied bacteriology and biotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer. p 3–75.
- Rzechonek DA, Dobrowolski A, Rymowicz W, Mirończuk AM. 2018. Recent advances in biological production of erythritol. *Critical Reviews in Biotechnology* 38(4):620–633.
- Sahm H, Antranikian G, Stahmann K-P, Takors R (editors). 2013. *Industrielle Mikrobiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Saichana N, Matsushita K, Adachi O, Frébort I, Frebortova J. 2015. Acetic acid bacteria. A group of bacteria with versatile biotechnological applications. *Biotechnology advances* 33(6 Pt 2):1260–1271.
- Salusjärvi T, Hvorslev N, Miasnikov AN. 2005. Characterisation of a secondary alcohol dehydrogenase from *Xanthomonas campestris* DSM 3586. *Appl Microbiol Biotechnol* 66(6):664–667.
- Schedel M. 2001. Regioselective Oxidation of Aminosorbitol with *Gluconobacter oxydans*, Key Reaction in the Industrial 1-Deoxynojirimycin Synthesis. In: Rehm H-J, Reed G, editors. *Biotechnology Set*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH. p 295–311.
- Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B. 2001. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409(6817):258–268.
- Schmideder A. 2016. *Kontinuierliche Bioprozessführung in miniaturisierten Rührkesselreaktoren*. Dissertation. München.
- Schmideder A, Severin TS, Cremer JH, Weuster-Botz D. 2015. A novel milliliter-scale chemostat system for parallel cultivation of microorganisms in stirred-tank bioreactors. *Journal of Biotechnology* 210:19–24.
- Schreier T, Jermann R. 2002. Combination of erythulose and a reducing sugar with self-tanning properties. <http://www.freepatentsonline.com/6451293.html>.
- Schumpe A. 1993. The estimation of gas solubilities in salt solutions. *Chemical Engineering Science* 48(1):153–158.
- Sengun IY, Karabiyikli S. 2011. Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control* 22(5):647–656.

- Shinagawa E, Matsushita K, Adachi O, Ameyama M. 1981. Purification and Characterization of D-Sorbitol Dehydrogenase from Membrane of *Gluconobacter suboxydans* var. α . *Agricultural and Biological Chemistry* 46(1):135–141.
- Shinagawa E, Matsushita K, Adachi O, Ameyama M. 1984. D-Gluconate Dehydrogenase, 2-Keto-D-gluconate Yielding from *Gluconobacter dioxyacetonicus*. Purification and Characterization. *Agricultural and Biological Chemistry* 48(6):1517–1522.
- Shinagawa E, Matsushita K, Toyama H, Adachi O. 1999. Production of 5-keto-D-gluconate by acetic acid bacteria is catalyzed by pyrroloquinoline quinone (PQQ) -dependent membrane-bound D-gluconate dehydrogenase. *Journal of Molecular Catalysis B* 6:341–359.
- Sievers M, Swings J. 2006. Family *Acetobacteraceae*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Dordrecht: Springer-Verlag New York Inc. p 41–95.
- Silberbach M, Maier B, Zimmermann M, Büchs J. 2003. Glucose oxidation by *Gluconobacter oxydans*. Characterization in shaking-flasks, scale-up and optimization of the pH profile. *Applied Microbiology and Biotechnology* 62(1):92–98.
- Simpson GLW, Ortwerth BJ. 2000. The non-oxidative degradation of ascorbic acid at physiological conditions. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1501(1):12–24.
- Stadtwerke München. 2018. Münchner Trinkwasser - Analysewerte.
- Sugisawa T, Hoshino T. 2002. Purification and properties of membrane-bound D-sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 66(1):57–64.
- Takors R, Weuster-Botz D. 2018. Prozessmodelle. In: Chmiel H, Takors R, Weuster-Botz D, editors. *Bioprozesstechnik*. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- Tesfaye W, Morales ML, García-Parrilla MC, Troncoso AM. 2002. Wine vinegar. Technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in Food Science & Technology* 13(1):12–21.
- Treu BL, Minter SD. 2008. Isolation and purification of PQQ-dependent lactate dehydrogenase from *Gluconobacter* and use for direct electron transfer at carbon and gold electrodes. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)* 74(1):73–77.
- Tufvesson P, Lima-Ramos J, Nordblad M, Woodley JM. 2011. Guidelines and Cost Analysis for Catalyst Production in Biocatalytic Processes. *Org. Process Res. Dev.* 15(1):266–274.
- Velizarov S, Beschkov V. 1998. Biotransformation of glucose to free gluconic acid by *Gluconobacter oxydans*. Substrate and product inhibition situations. *Process Biochemistry* 33(5):527–534.
- Vidra A, Németh Á. 2018. Bio-produced Acetic Acid. A Review. *Period. Polytech. Chem. Eng.* 62(3):245–256.

- Vorlop K-D, Decker C, Rose T, Willke T, Wach WKM. 2009. Preparing erythulose, useful e.g. in cosmetics as self-tanning lotion, comprises incubating erythrite-containing output substrate with an erythulose-tolerant microorganism of the species *Gluconobacter* and extracting erythulose. <http://www.freepatentsonline.com/DE102008006101.html>.
- Wagner S, Klepsch MM, Schlegel S, Appel A, Draheim R, Tarry M, Högbom M, van Wijk KJ, Slotboom DJ, Persson JO, Gier J-W de. 2008. Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(38):14371–14376.
- Weenk G, Olijve W, Harder W. 1984. Ketogluconate formation by *Gluconobacter* species. *Appl Microbiol Biotechnol* 20(6).
- Wei G, Yang X, Gan T, Zhou W, Lin J, Wei D. 2009. High cell density fermentation of *Gluconobacter oxydans* DSM 2003 for glycolic acid production. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 36(8):1029–1034.
- Wei Y-C, Braun-Galleani S, Henríquez MJ, Bandara S, Nesbeth D. 2018. Biotransformation of β -hydroxypyruvate and glycolaldehyde to l-erythulose by *Pichia pastoris* strain GS115 overexpressing native transketolase. *Biotechnology progress* 34(1):99–106.
- Weisenberger S, Schumpe A. 1996. Estimation of gas solubilities in salt solutions at temperatures from 273 K to 363 K. *AIChE J.* 42(1):298–300.
- Wethmar M, Deckwer W-D. 1999. Semisynthetic culture medium for growth and dihydroxyacetone production by *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnology Techniques* 13(4):283–287.
- Weuster-Botz D, Hekmat D, Puskeiler R, Franco-Lara E. 2007. Enabling technologies. Fermentation and downstream processing. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 105:205–247.
- Weuster-Botz D, Takors R. 2018. Wachstumskinetik. In: Chmiel H, Takors R, Weuster-Botz D, editors. *Bioprozesstechnik*. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- Whistler RL, Underkofler LA. 1938. The production of L-erythulose by the action of *Acetobacter suboxydans* upon erythritol. *J Am Chem Soc* 60(10):2507–2508.
- Willke T, Decker C, Vorlop K-D. 2009. Biotechnische Herstellung von Erythulose. *Chem Ing Tech* 81(8):1211.
- Woodley JM. 2006. Choice of biocatalyst form for scalable processes. *Biochemical Society transactions* 34(Pt 2):301–303.
- Wulf P de, Soetaert W, Vandamme EJ. 2000. Optimized synthesis of L-sorbose by C(5)-dehydrogenation of D-sorbitol with *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnology and Bioengineering* 69(3):339–343.

- Yamada Y, Hosono R, Lisdyanti P, Widyastuti Y, Saono S, Uchimura T, Komagata K. 1999. Identification of acetic acid bacteria isolated from Indonesian sources, especially of isolates classified in the genus *Gluconobacter*. *The Journal of general and applied microbiology* 45(1):23–28.
- Yuan J, Wu M, Lin J, Yang L. 2016a. Combinatorial metabolic engineering of industrial *Gluconobacter oxydans* DSM2343 for boosting 5-keto-D-gluconic acid accumulation. *BMC biotechnology* 16(1):42.
- Yuan J, Wu M, Lin J, Yang L. 2016b. Enhancement of 5-keto-d-gluconate production by a recombinant *Gluconobacter oxydans* using a dissolved oxygen control strategy. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 122(1):10–16.
- Zheng Y-J, Bruice TC. 1997. Conformation of coenzyme pyrroloquinoline quinone and role of Ca^{2+} in the catalytic mechanism of quinoprotein methanol dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(22):11881–11886.
- Zorman S, Botte M, Jiang Q, Collinson I, Schaffitzel C. 2015. Advances and challenges of membrane-protein complex production. *Current opinion in structural biology* 32:123–130.
- Zou X, Lin J, Mao X, Zhao S, Ren Y. 2017. Biosynthesis of L-Erythrose by Assembly of Two Key Enzymes in *Gluconobacter oxydans*. *Journal of agricultural and food chemistry* 65(35):7721–7725.

11 Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
(v/v)	Volumenanteil
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BTM	Biotrockenmasse
CER	Kohlenstoffdioxidentwicklungsrate (<i>Carbon dioxide evolution rate</i>)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
Da	Dalton
DHA	Dihydroxyaceton
EDW	Entner-Doudoroff-Weg
<i>G. oxydans</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i>
H ⁺	Proton
H ₂ O	Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>High performance liquid chromatography</i>)
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduziert)
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidiert)
NADPH/H ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
NMWC	Porengröße (<i>Nominal Molecular Weight Cutoff</i>)
O ₂	Sauerstoff
OD ₆₀₀	Optische Dichte (Wellenlänge 600 nm)
OUR	Sauerstoffaufnahme (Oxygen uptake rate)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
P _i	Phosphat
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PPW	Pentose-Phosphat-Weg
PQQ	Pyrrlochinolinchinon
R ²	Bestimmtheitsmaß
rcf	Relative Zentrifugalkraft (<i>Relative centrifugal force</i>)
2-KLG	2-Keto-L-Gluconsäure
RI	Brechungsindex
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>Revolutions per minute</i>)
U	Enzymeinheit <i>Unit</i> (μmol s ⁻¹)
UQ	Ubiquinon
UQH ₂	Ubiquinol
VE-H ₂ O	Vollentsalztes Wasser

Symbol	Beschreibung
μ	spezifische Wachstumsrate, h^{-1}
μ_{max}	maximale spezifische Wachstumsrate, h^{-1}
C_i	Konzentration der Komponente i, $g L^{-1}$
$C_{i,ein}$	Konzentration der Komponente i im Zulaufvolumenstrom, $g L^{-1}$
$C_{i,aus}$	Konzentration der Komponente i im Ablaufvolumenstrom, $g L^{-1}$
C_P	Produktkonzentration, $g L^{-1}$
$C_{P,max}$	maximale Produktkonzentration, $g L^{-1}$
C_S	Substratkonzentration, $g L^{-1}$
$C_{S,0}$	Substratkonzentration zum Zeitpunkt $t = 0$, $g L^{-1}$
$C_{S,Ende}$	Substratkonzentration zum Prozessende, $g L^{-1}$
C_X	Biomassekonzentration, $g L^{-1}$
$C_{X,0}$	Biomassekonzentration zu Zeitpunkt $t = 0$, $g L^{-1}$
D	Durchflussrate, h^{-1}
F_{ein}	Zulaufvolumenstrom, $L h^{-1}$
F_{aus}	Ablaufvolumenstrom, $L h^{-1}$
$F_{P,aus}$	Ausgangsvolumenstrom Permeat, $L h^{-1}$
K_S	Sättigungskonstante, $g L^{-1}$
K_I	Inhibierungskonstante, $g L^{-1}$
m_i	Masse der Komponente i, $g L^{-1}$
q_P	zellspezifische Produktbildungsrate, $g g^{-1} h^{-1}$
r_P	volumetrische Produktbildungsrate, $g L^{-1} h^{-1}$
q_S	zellspezifische Substrataufnahmerate, $g g^{-1} h^{-1}$
r_S	volumetrische Substrataufnahmerate, $g L^{-1} h^{-1}$
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute, $g L^{-1} h^{-1}$
t	Zeit, h
t_0	Zeit Prozessstart, h
t_{Ende}	Zeit Prozessende, h
V_R	Reaktionsvolumen, L
V_R	Reaktionsvolumen, L
X	Umsatz, %
$Y_{P/S}$	Produktausbeute, $g g^{-1}$
$Y_{P/X}$	zellspezifische Produktertrag, $g g^{-1}$
$Y_{X/S}$	Biomasseertragskoeffizient, $g g^{-1}$
τ	Tau, mittlere hydraulische Verweilzeit, h

12 Anhang

12.1 Puffer und Medien

Phosphatgepufferte Salzlösung

Tabelle A 1: Zusammensetzung der verwendeten phosphatgepufferten Salzlösung (PBS).

Komponente	Konzentration, g L⁻¹
KCl	0,20
KH ₂ PO ₄	0,24
Na ₂ HPO ₄	1,44
NaCl	8,00

Vitaminlösungen

Tabelle A 2: Vitaminlösung für semi-definiertes Medium nach Wethmar und Deckwer (1999).

Komponente	Konzentration, mg L⁻¹
Nicotinsäure	3,0
D-Calciumpantothenat	2,0
p-Aminobenzoessäure	2,0

Tabelle A 3: Zusammensetzung der Vitaminlösung DSMZ 141.

Komponente	Konzentration, mg L⁻¹
Biotin	2,0
Folsäure	2,0
Pyridoxin-HCl	10,0
Thiamin-HCl · 2 H ₂ O	5,0
Riboflavin	5,0
Nicotinsäure	5,0
D-Calciumpantothenat	5,0
p-Aminobenzoessäure	5,0
Vitamin B12	0,1
Liponsäure	5,0

Spurenelemente DSMZ 144

Tabelle A 4: Zusammensetzung der verwendeten Spurenelementelösung.

Komponente	Konzentration, g L⁻¹
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,10
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,17
CuCl ₂	0,020
FeCl ₂ · 4H ₂ O	0,20
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,10
H ₃ BO ₃	0,010
Na ₂ MoO ₄ · 4H ₂ O	0,010
NiCl ₂ · 4H ₂ O	0,026
Na ₂ SeO ₃ · 6H ₂ O	0,020
NaCl	1,00
Nitilotriessigsäure	12,8
Vitamin B12	0,1
ZnCl ₂	0,10

Stammlösungen

Die in Tabelle A 5 angegebenen Konzentrationen wurden in VE-H₂O unter Rühren gelöst und bei 121 °C für 21 min autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert. Die

Kanamycinsulfatstammlösung wurde nicht autoklaviert, sondern nach Lösen filtriert (0,22 µm) und in sterile Eppendorf-Reagenzgefäße aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Tabelle A 5: Zusammensetzung der benötigten Stammlösungen.

Stammlösung	Konzentration
Antischaum AF204	10 % (v/v)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	250 g L ⁻¹
Kanamycinsulfat	30 g L ⁻¹
Mannitol	100 g L ⁻¹
MgSO ₄ · 7H ₂ O	250 g L ⁻¹
Thymidin	10 g L ⁻¹

12.2 Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Geräte

Tabelle A 6: Komponenten und Software der parallelisierten Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Bioreaktorblock	bioREACTOR 48	2mag, München, Deutschland
Steuergerät	---	2mag, München, Deutschland
optische Sensorriegel für pH- und pO ₂ -Messung	MCR 8pH-8oxygen	PreSens, Regensburg, Deutschland
Einwegbioreaktoren	---	2mag, München, Deutschland
Laborroboter mit Pipettier- und Roboterarm	Genesis RSP 150	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Gasmischstation	Brooks 0254	Brooks, Dresden, Deutschland
Wasserbad	Haake W 15	PSL, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland
Reaktortemperierung		
Durchlaufkühler	DLK	Fryka-Kältetechnik, Esslingen, Deutschland
Kopfraumkühlung		
Reinigungsflüssigkeit	Set Up Clean	LVL, Crailsheim, Deutschland
Software für Laborroboter	Gemini V4.2.17.304	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Software für Prozesssteuerung	Fedbatch-XP 1.0.248	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle A 7: Komponenten und Software der parallelisierten Rührkesselreaktoren im Liter-Maßstab.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Steuereinheit mit Reaktortemperierung und Abluftkühlung	CWD 4	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rührkesselreaktor mit Seitenarmen und oben eintauchender Rührwelle mit zwei 6-Blatt Scheibenrührern	SR0700ODSS	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rührerantrieb	RE40, Maxon Motor	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Gasmischstation	MX4/4	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Regelungsmodul für Temperatur und Rührer	TC4SC4	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
pH- und pO ₂ -Sensormodul	PH4PO4	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mehrkanalschlauchpumpen Modul	MP8	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
pO ₂ -Sonde	Visiform	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
pH-Elektrode	405-DPAS-SC-K8S/225	Mettler-Toledo, Columbus, USA
Temperatursensor	Pt100/0	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Antischaumsonde	Pt100/0	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Abgasanalytik	EL2030	ABB, Zürich, Schweiz
Software für Prozesssteuerung	DASGIP Control V4.5	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle A 8: Komponenten und Software des Rührkesselreaktors im Liter-Maßstab.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Steuereinheit	103748	Infors, Bottmingen, Schweiz
3,6 L Rührkesselreaktor mit Schikanesieb und oben eintauchender Rührwelle mit zwei 6-Blatt Scheibenrührern	Labors 2	Infors, Bottmingen, Schweiz
pO ₂ -Elektrode	InPro6800	Mettler-Toledo, Columbus, USA
pH-Elektrode	405-DPAS-SC-K85/425	Mettler-Toledo, Columbus, USA
Waage	QC35EDE-S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Abgasanalytik	EL2030	ABB, Zürich, Schweiz
Schlauchpumpe Zulauf	REGLO digital	Ismatec, Wertheim, Deutschland
Schlauchpumpe Permeat	Reglo analog	Ismatec, Wertheim, Deutschland
Schlauchpumpe Umlauf	BVP Standard	Ismatec, Wertheim, Deutschland
externes Querstromfiltrationsmodul	UFP-750-E-4A	GE Healthcare, Chicago, USA
getauchtes Hohlfasermembranmoduls	Umbau von CFP-4-E-2U	GE Healthcare, Chicago, USA
Software für Prozesssteuerung	Iris V5	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle A 9: Komponenten und Software der HPLC.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Entgaser	1100 Series G1322A	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Pumpe	1100 Series G1311A	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Probengeber	1100 Series G1313A	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Säulenofen	Mistral	Spark-Holland, VE Emmen, Niederlande
RI-Detektor	1200 Series G1362A	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
UV-Detektor	S3300	SYKAM, Fürstenfeldbruck, Deutschland
Software	ChemStation B.04.03	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

Chemikalien

Tabelle A 10: Verwendete Chemikalien mit Artikelnummer und Hersteller.

Name	Artikelnummer	Hersteller
2-Keto-D-Gluconsäure Hemicalciumsalz Monohydrat	MK03802	Carbosynth, Berkshire, UK
5-Keto-D-Gluconsäure Kaliumsalz	MK00321	Carbosynth, Berkshire, UK
Ammoniaklösung (NH ₄) ₂ SO ₄	6774.2 LC-5931.3	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland
Antifoam 204	A6426-1KG	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Biotin	3822	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Borsäure	1.00165	Merck, Darmstadt, Deutschland
CaCl ₂ · 2H ₂ O	T885.2	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumacetat Hydrat	0260.1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Corn Steep Liquor	---	T.T. Baits, Forchheim, Deutschland

CoCl ₂ · 6H ₂ O	1.02539	Merck, Darmstadt, Deutschland
D-Glucose Monohydrat	4957,5	neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland
D-Fructose	4981.6	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
D-Mannit	LC-6225.4	neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0268.3	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
K ₂ HPO ₄	5494,5	neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	A1372,9010	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
FeCl ₂ · 4H ₂ O	1.03965	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol, vergällt	-	CLN, Freising, Deutschland
Folsäure	T912	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Gluconsäure Natriumsalz	2622.1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	1040921000	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt, mikrogranuliert	2904.2	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
KH ₂ PO ₄	LC-4508.1	neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland
Kanamycinsulfat	T832.3	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
KOH	LC-7900.3	neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland
CuCl ₂	1.0279	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Cystein-HCl	3468	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Erythrose	BCBQ3809	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Liponsäure	6229	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>meso</i> -Erythritol	1678938AKE	Biosynth, Bratislava
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	T888.2	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.05941	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl	3957	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaOH	6771.2	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Na ₂ MoO ₄ · 4H ₂ O	274	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Na ₂ SeO ₃ · 6H ₂ O	10102-18-8	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Nikotinsäure	1.06817	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nitilotriessigsäure	1.084	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>ortho</i> -Phosphorsäure	6366.2	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Oxalsäure	194131-250G	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

p-Aminobenzoesäure	8.22312	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pyridoxin-HCl	T914	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pepton aus Casein	8986.1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Perchlorsäure	1.00519.1001	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pyridoxin-HCl	T914	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Riboflavin	R-4500	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Thymidin	3005,3	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Vitamin B12	T915	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
ZnCl ₂	7646-85-7	Merck, Darmstadt, Deutschland

Verbrauchsmaterialien

Tabelle A 11: Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
Abluftfilter	Acro 50, PTFE, 0,2 µm	Pall, New York, USA
Deckgläschen	24 x 32 mm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Einwegkanülen	Sterican (0,6 x 30 mm, 0,9 x 40 mm, 0,9 x 70 mm)	B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Einwegpritzen	1 mL; 10 mL; 20 mL; 50 ml	B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
HPLC-Rollrandflasche mit Bördelverschluss	ND11, Bördelkappen mit Septum	VWR, Radnor, USA
Küvetten	Halbmikro PS	Ratiolab, Dreieich, Deutschland
Mikroeinsätze für HPLC- Rollrandflaschen	---	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mikrotiterplatten, transparent	F96 200µL	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Parafilm	M PM996	Pechiney, Paris, Frankreich
Petrischalen		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen	200 – 1000 µL	Brand, Wertheim, Deutschland

Pipettenspitzen	10 mL	Brand, Wertheim, Deutschland
Pumpschläuche (Marprene)	verschiedene	Watson-Marlow, Rommerskirchen, Deutschland
Pumpschläuche (PharMed)	SC0736/SC0735	Cole-Parmer, Wertheim, Deutschland
Reaktionsgefäße	1 – 2 mL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße	15 – 50 mL	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Spritzenvorsatzfilter	Chromafil RC-20/15 MS	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Sterilfilter	Minisart, 0,2 µm	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zentrifugenbecher	1000 mL	Nalgene Nunc International, Rochester, USA
Zuluftfilter	Midisart 2000, 0,2 µm	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zweikomponentenkleber	TFC Silikon Kautschup 6	Troll Factory, Riede, Deutschland

12.3 Prozesskontrolle

Algorithmus zur Regelung des minimalen Sauerstoffpartialdrucks im kontinuierlich betriebenen Membranbioreaktor

```
#0, initial_settings, 5
```

```
Stirrer.sp=400
```

```
Temp.sp=30
```

```
Flow.sp=2
```

```
Pumpe-Neu.sp=20
```

```
Weight.sp=0.00
```

```
seq=1;
```

```
#1, Messung1, 5 //Abweichung
```

```
//Der pO2 wird oberhalb von etwa 20 % gehalten
```

```
if (pO2.v<20 AND Stirrer.sp<1200) {Stirrer.sp=Stirrer.sp+50}
```

```
if (Stirrer.sp>1200) {Stirrer.sp=1200}
```

```
seq=2;
```

```
#2, Warten, 5
```

```
seq=3;
```

```
#3, Messung2, 5 //Zweite Überprüfung
```

```
if (Weight.v>=0.00) {seq=4}
```

```
if (Weight.v<0.00) {seq=5}
```

```
#4, Hoch, 5 //Ablauf erhöhen
```

```
Pumpe-Neu.sp=Pumpe-Neu.sp+35
```

```
if (Pumpe-Neu.sp>35) {Pumpe-Neu.sp=35}
```

```
seq=7
```

```
#5, Runter, 5 //Ablauf reduzieren
```

```
Pumpe-Neu.sp=0
```

```
seq=7;
```

```
#7, Warten, 5
```

```
if(seq_time>time(00:01)) {seq=1}
```