

**Prozessentwicklung
zur Produktion von
2-Keto-L-Gulonsäure,
einer Vitamin C-Vorstufe**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Brigitte Osterath

aus

Bedburg

Bonn, Oktober 2009

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Christian Wandrey
2. Referent: Prof. Dr. Jörn Piel

Tag der Prüfung: 22.2.2010

Erscheinungsjahr: 2010

Für meinen Rainer – Danke für alles!

Abstract

In this study a process for the continuous production of 2-keto-L-gulonic acid was developed. This compound is a precursor of vitamin C and therefore of great industrial interest. 2-Keto-L-gulonic acid (2-KLG) was produced from D-glucose in a two-step reaction: Glucose was first oxidized to 2,5-diketo-D-gluconic acid (2,5-DKG) with cells of *Gluconobacter oxydans*, 2,5-DKG was then reduced to 2-KLG with the enzyme 2,5-diketo-D-gluconate reductase. Both reactions were carried out in separate reactors; 2,5-DKG was transferred into the second reactor without any further processing or purification.

Resting cells of *Gluconobacter oxydans* could successfully be applied in batch and continuously stirred tank reactors (CSTR) for the production of 2,5-DKG. In both cases, sufficient supply of oxygen is crucial; in a specially constructed batch reactor the activity of the cells was increased threefold compared to the activity in shaking flasks. Thus, yields of up to 97% were achieved in the batch reactor. In a CSTR, yields of about 80% could be kept for several days, in that case the space-time-yield was $92 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$.

The enzyme 2,5-diketo-D-gluconate reductase (2,5-DKGR) was isolated and purified from recombinant *E. coli* cells in good yields of $0.31 \text{ mg}_{\text{Protein}}/\text{g}_{\text{cells}}$. In kinetic investigations it accepted NADH as a cofactor but showed a much higher preference for NADPH ($K_{M, \text{NADH}} = 500 \cdot K_{M, \text{NADPH}}$). Cofactor regeneration worked best with the alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*. The two enzymes were successfully applied in an enzyme membrane reactor to produce 2-KLG from 2,5-DKG with yields of up to 100%. The highest space-time-yield was $329 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ with product yields of 81%. After coupling the two reactor systems, 2-KLG could be produced continuously from D-glucose with yields of 68% and space-time-yields of $41.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ for more than eight days.

This study showed that the yields in this two-step reaction can be improved if the two steps are carried out in separate reactors. This way, the best reaction conditions for both oxidation and reduction can be adjusted.

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1: Einleitung	1
1.1. Vitamin C in Medizin und Lebensmittelindustrie	1
1.2. Herstellung von Vitamin C – Stand der Technik	2
1.3. Schlussfolgerungen: Produktion von Vitamin C	15
Kapitel 2: Zielsetzung	17
Kapitel 3: Produktion von 2,5-Diketo-D-Gluconat mit <i>Gluconobacter oxydans</i>	19
3.1. Einleitung: Der Organismus <i>Gluconobacter oxydans</i>	19
3.2. Gewinnung des Biokatalysators [Bucerius 2008]	24
3.3. Charakterisierung des Biokatalysators im Satzreaktor	33
3.4. Kontinuierlicher Biotransformationsprozess	56
3.5. Isolierung von 2,5-Diketogluconat als Hemicalciumsalz	73
3.6. Zusammenfassung	77
Kapitel 4: Reduktion von 2,5-Diketo-D-Gluconat zu 2-Keto-L-Gulonat	79
4.1. Einleitung: Das Enzym 2,5-Diketo-D-Gluconatreduktase	79
4.2. Einsatz rekombinanter <i>E. coli</i> -Zellen zur Reduktion von 2,5-DKG	82
4.3. Gewinnung der 2,5-Diketo-D-Gluconatreduktase in reiner Form	87
4.4. Optimierung der Reaktionsbedingungen	94
4.5. Möglichkeiten der Cofaktorregenerierung	97
4.6. Enzymkinetiken	99
4.7. Synthese von 2-Keto-L-Gulonat im Satzreaktor	107
4.8. Kontinuierliche Produktion von 2-KLG im Enzymmembranreaktor	112
4.9. Zusammenfassung	123
Kapitel 5: Produktion von 2-Keto-L-Gulonsäure aus Glucose	125
5.1. Einleitung	125
5.2. Konstruktion der gekoppelten Anlage	126
5.3. Kontinuierliche Produktion von 2-Keto-L-Gulonat aus Glucose	130
5.4. Isolierung reiner 2-Keto-L-Gulonsäure	141
5.5. Zusammenfassung	146
Kapitel 6: Diskussion und Ausblick	147
6.1. Oxidation von Glucose zu 2,5-Diketo-D-Gluconat	147

6.2.	Reduktion von 2,5-Diketo-D-Gluconat zu 2-Keto-L-Gulonat	151
6.3.	Produktion von 2-KLG aus Glucose	153
6.4.	Die Zukunft der Vitamin C-Produktion	157
Kapitel 7: Zusammenfassung		159
Kapitel 8: Materialien und Methoden		161
8.1.	Geräte und Labormaterialien	161
8.2.	Software	163
8.3.	Chemikalien	163
8.4.	Biologische Materialien	164
8.5.	Analytische Methoden	165
8.6.	Allgemeine mikrobiologische Arbeiten	170
8.7.	Gentechnische Arbeiten	175
8.8.	Isolierung des Enzyms 2,5-Diketogluconatreduktase	177
8.9.	Aktivitäts- und Stabilitätsbestimmung von Biokatalysatoren	181
8.10.	Assays zur Stabilitätsbestimmung	183
8.11.	Untersuchungen zur Sauerstofflimitierung bei <i>Gluconobacter oxydans</i> ..	183
8.12.	Messungen und Berechnungen zur Kinetik	184
8.13.	Biotransformationen im Satzreaktor	184
8.14.	Kontinuierliche Biotransformationen	185
8.15.	Produktaufarbeitung	188
Literaturverzeichnis		191
Anhang		199
A.1.	Ergänzungen zu Kap. 3: Produktion von 2,5-DKG mit <i>G. oxydans</i>	199
A.2.	Ergänzungen zu Kap. 4: Reduktion von 2,5-DKG zu 2-KLG	201
A.3.	Scientist-Modelle	211
Curriculum Vitae		214

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Strukturformel von Vitamin C	1
Abbildung 1.2: Synthese von Vitamin C nach Reichstein und Grüssner	3
Abbildung 1.3: Struktur von 2-KLG und seine Umsetzung zu Vitamin C	5
Abbildung 1.4: Mögliche Syntheserouten zur Produktion von Vitamin C	6
Abbildung 1.5: Biotechnologische Synthese von Vitamin C aus Glucose	9
Abbildung 1.6: ΔG -Werte der Verbindungen auf der Syntheseroute von Glucose zu 2-KLG	13
Abbildung 1.7: Racemattrennung von sekundären Alkoholen über eine Entkopplung der Cofaktorpools der Enzyme für Oxidation und Reduktion.....	15
Abbildung 2.1: Kaskade von zwei Reaktoren zur Produktion von 2-KLG.....	17
Abbildung 3.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Gluconobacter oxydans</i>	19
Abbildung 3.2: Oxidation von Glucose durch membrangebundene Enzyme zu 2,5-DKG	21
Abbildung 3.3: Entkopplung von Wachstum und Produktion (Biotransformation) bei <i>Gluconobacter oxydans</i> -Zellen	23
Abbildung 3.4: Wachstum von <i>Gluconobacter oxydans</i> NCIMB 8084 in unterschiedlichen Medien.....	26
Abbildung 3.5: Aktivität der in unterschiedlichen Medien angezogenen <i>Gluconobacter oxydans</i> -Zellen.....	28
Abbildung 3.6: Wachstum von <i>Gluconobacter oxydans</i> in Parallelfementern mit unterschiedlichen mittleren Glucosekonzentrationen.....	30
Abbildung 3.7: Einfluss der Glucosekonzentration während des Wachstums auf die spätere Aktivität in 50 mM Glucose-Lösung	31
Abbildung 3.8: Verlauf der Fermentation von <i>G. oxydans</i> NCIMB 8084 im 20L- Maßstab	32
Abbildung 3.9: Einsatz von <i>G. oxydans</i> NCIMB als ruhende Zellen zur Produktion von 2,5-DKG, in stickstoffreichem Medium (links) und phosphatreichem Medium (rechts).....	34
Abbildung 3.10: Produktion von 2,5-DKG durch ruhende Zellen <i>G. oxydans</i> NCIMB 8084	35

Abbildung 3.11: Einfluss unterschiedlicher Biomassekonzentrationen auf die 2,5-DKG-Produktion durch <i>G. oxydans</i> NCIMB 8084 im Schüttelkolben.....	36
Abbildung 3.12: Vorrichtung zur Begasung von Biotransformationslösungen	36
Abbildung 3.13: Produktion von 2,5-DKG durch <i>G. oxydans</i> NCIMB 8084 im Satzreaktor unter Sauerstoffbegasung	37
Abbildung 3.14: Einfluss der Begasungsart auf die Aktivität von <i>G. oxydans</i> -Zellen ...	37
Abbildung 3.15: Verlauf des pO_2 in Biotransformationslösungen unterschiedlicher Biomassekonzentrationen von <i>Gluconobacter oxydans</i> NCIMB 8084.....	38
Abbildung 3.16: Einfluss der Biomassekonzentration auf die Aktivität der <i>G. oxydans</i> -Zellen.....	39
Abbildung 3.17: Einfluss der Temperatur auf die Aktivität von <i>G. oxydans</i> Zellen NCIMB 8084	40
Abbildung 3.18: Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität von <i>G. oxydans</i> Zellen NCIMB 8084	41
Abbildung 3.19: Einfluss verschiedener Puffersysteme auf die Aktivität von <i>G. oxydans</i> -Zellen NCIMB 8084.....	41
Abbildung 3.20: Beispielhafter Reaktionsverlauf einer Biotransformation im Satzverfahren.....	44
Abbildung 3.21: Ergebnis der Modellierung der dreistufigen Reaktionsfolge als Kaskade von Reaktionen 1. Ordnung nach Formel 3.2.....	46
Abbildung 3.22: Ergebnis der Modellierung der dreistufigen Reaktionsfolge nach Formel 3.3.....	49
Abbildung 3.23: Kinetik von <i>G. oxydans</i> -Zellen NCIMB 8084. Michaelis-Menten-Kinetik	51
Abbildung 3.24: Inhibierung von <i>G. oxydans</i> NCIMB 8084 durch das Produkt 2,5-DKG	52
Abbildung 3.25: Stabilität von <i>G. oxydans</i> NCIMB 8084 bei pH5 und 25°C	54
Abbildung 3.26: Wiederholte Biotransformationen im Satzreaktor.....	54
Abbildung 3.27: Konzentration-Zeit- und Konzentration-Ort-Profile für einen kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor	56
Abbildung 3.28: Anlage zur kontinuierlichen Produktion von 2,5-DKG mit <i>Gluconobacter oxydans</i>	59

Abbildung 3.30: Kontinuierliche Produktion von 2,5-DKG durch <i>G. oxydans</i> NCIMB 8084	60
Abbildung 3.31: Stabilität von <i>G. oxydans</i> im kontinuierlichen Reaktorbetrieb	61
Abbildung 3.32: Kontinuierliche Produktion von 2,5-DKG durch <i>G. oxydans</i> NCIMB 8084	62
Abbildung 3.33: Ausbeuten bei kontinuierlichen Biotransformationen mit <i>G. oxydans</i> NCIMB 8084 in verschiedenen Puffern	63
Abbildung 3.34: Einfluss des pH-Wertes im kontinuierlichen Reaktorbetrieb	64
Abbildung 3.35: Einfluss des pH-Wertes auf die Ausbeute und Raumzeitausbeute bei kontinuierlichen Biotransformationen mit <i>G. oxydans</i> NCIMB mit verschiedenen pH-Werten	64
Abbildung 3.36: Erzielte Produktausbeuten und Raumzeitausbeuten im kontinuierlichen Reaktorbetrieb in Abhängigkeit der Substratkonzentration	65
Abbildung 3.37: Theoretische Ausbeuten und Raumzeitausbeuten bei unterschiedlichen Glucosekonzentrationen	66
Abbildung 3.38: Einfluss der Verweilzeit auf die 2,5-DKG-Bildung im kontinuierlichen Reaktorbetrieb	67
Abbildung 3.39: Einfluss der Verweilzeit auf die 2,5-DKG-Bildung im kontinuierlichen Reaktorbetrieb	69
Abbildung 3.40: Abhängigkeit der Ausbeute von dem Produkt aus Biomassekonzentration und Verweilzeit bei einer Glucosekonzentration von 50 mM	70
Abbildung 3.41: Isoliertes 2,5-Diketogluconat als Hemicalciumsalz $\text{Ca}(\text{2,5-DKG})_2$	74
Abbildung 3.42: HPLC-Chromatogramm des isolierten 2,5-DKG-Calciumsalzes	75
Abbildung 3.43: $^1\text{H-NMR}$ (in D_2O , 600 MHz-Spektrometer) von selbst isoliertem 2,5-DKG	75
Abbildung 3.44: $^{13}\text{C-NMR}$ (in D_2O , 600 MHz-Spektrometer) von selbst isoliertem 2,5-DKG	76
Abbildung 3.45: Struktur von 2,5-DKG in wässriger Lösung	76
Abbildung 4.1: Reduktion von 2,5-DKG zu 2-KLG mit dem Enzym 2,5-Diketo-D-Gluconatreduktase	79

Abbildung 4.2: Struktur des Enzyms 2,5-DKGR A im Komplex mit dem Cofaktor NADPH (schwarz), bestimmt durch Röntgenstrukturanalyse.....	80
Abbildung 4.3: Reduktion von 2,5-DKG zu 2-KLG mittels 2,5-DKGR	80
Abbildung 4.4: Regenerierung des Cofaktors NADPH mit Hilfe eines zweiten Enzyms	81
Abbildung 4.5: Links: Plasmid pEKEX2_fdh bestehend aus Ptac-Promotor (Ptac), Formiatdehydrogenase-Gen (FDH) und Kanamycin-Resistenzgen (KanR). Rechts: Plasmid pDrive-PlacZ-dkgr bestehend aus Gen für die 2,5-Diketo-D-Gluconatreduktase (2,5-DKGR), und Kanamycin-Resistenzgen (KanR) und Ampicillin-Resistenzgen (AmpR)	83
Abbildung 4.6: Ergebnis der Klonierung: Plasmid pDrive_dkgr_fdh.....	83
Abbildung 4.7: Aktivität der Enzyme 2,5-DKGR und FDH, exprimiert in <i>E. coli</i> DH5 α bzw. BL21 DE3 pDrive_dkgr_fdh, pro 1 g Zellen Biofeuchtmasse	84
Abbildung 4.8: Biotransformation im Satzreaktor mit <i>E. coli</i> BL21 DE3 pDrive_dkgr_fdh	85
Abbildung 4.9: Biotransformation im Satzreaktor durch permeabilisierte <i>E. coli</i> BL21 DE3 pDrive_dkgr_fdh	86
Abbildung 4.10: Plasmid pQE82L-dkgr mit 2,5-Diketo-D-Gluconatreduktase-Gen (2,5-DKGR), Hexahistidin-Tag (H6), Ampicillin-Resistenzgen (AmpR) und Lac-Repressor (LacI)	87
Abbildung 4.11: Verlauf der zweiten 20-L-Fermentation von <i>E.coli</i> BL21 DE3 pQE82L-dkgr.....	88
Abbildung 4.12: Isolierung der 2,5-DKGR über Ni-Affinitätschromatographie (Säulenverfahren)	89
Abbildung 4.13: Fraktionen I-IX der 2,5-DKGR, isoliert über das Säulenverfahren	90
Abbildung 4.14: Fraktionen A-R der 2,5-DKGR, isoliert über das Satzverfahren	92
Abbildung 4.15: Aktivität der Enzymfraktionen A-R.....	92
Abbildung 4.16: Einfluss der Temperatur auf die Aktivität der 2,5-DKGR	94
Abbildung 4.17: Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der 2,5-DKGR	95
Abbildung 4.18: Einfluss des Puffersystems auf die Aktivität der 2,5-DKGR.....	96
Abbildung 4.19: Lagerstabilität der 2,5-DKGR bei verschiedenen Temperaturen und pH-Werten	97

Abbildung 4.20: Reduktion von 2,5-DKG im Satzreaktor, <i>Lb</i> -ADH zur Cofaktorregenerierung.....	98
Abbildung 4.21: Reduktion von 2,5-DKG im Satzreaktor, NADP-abhängige FDH zur Cofaktorregenerierung.....	98
Abbildung 4.22: Reduktion von 2,5-DKG im Satzreaktor, NAD-abhängige FDH zur Cofaktorregenerierung.....	98
Abbildung 4.23: Einfluss von Formiat auf die Aktivität der 2,5-DKGR.....	99
Abbildung 4.24: Kinetik der 2,5-DKGR mit NADPH als Cofaktor.....	100
Abbildung 4.25: Kinetik der 2,5-DKGR mit NADPH als Cofaktor.....	100
Abbildung 4.26: Kinetik der 2,5-DKGR mit NADH als Cofaktor.....	101
Abbildung 4.27: Kinetik der 2,5-DKGR mit NADH als Cofaktor.....	102
Abbildung 4.28: Einfluss von Gluconat (links) und 2-KG (rechts) auf die Enzymaktivität.....	103
Abbildung 4.29: Oxidation von Isopropanol durch die <i>Lb</i> -ADH und mit NADP ⁺ als Cofaktor.....	105
Abbildung 4.30: Enzymreaktion im Satzreaktor mit stöchiometrischen Mengen NADPH als Cofaktor.....	108
Abbildung 4.31: Enzymreaktion im Satzreaktor mit stöchiometrischen Mengen NADH als Cofaktor.....	108
Abbildung 4.32 a-c: Enzymreaktionen im Satzreaktor zur Reduktion von 2,5-DKG mit 2,5-DKGR unter Cofaktorregenerierung mit <i>Lb</i> -ADH.....	110
Abbildung 4.33: Enzymreaktionen im Satzreaktor zur Reduktion von 2,5-DKG mit 2,5-DKGR unter Cofaktorregenerierung mit <i>Lb</i> -ADH.....	111
Abbildung 4.34: Lagerstabilität der 2,5-DKGR bei 20°C und pH 6,4 in 50mM KP _i -Puffer.....	113
Abbildung 4.35: Lagerstabilität der <i>Lb</i> -ADH bei 20°C und pH 6,4 in 50mM KP _i -Puffer.....	113
Abbildung 4.36: Enzymmembranreaktor zur kontinuierlichen Reduktion von 2,5-DKG zu 2-KLG.....	114
Abbildung 4.37: Enzymmembranreaktor zur kontinuierlichen Reduktion von 2,5-DKG zu 2-KLG.....	114

Abbildung 4.38: Kontinuierliche Produktion von 2-KLG im Enzymmembranreaktor.	115
Abbildung 4.39: Einfluss der NADP-Konzentration auf die Ausbeute im EMR (Reaktorsimulationen)	117
Abbildung 4.40: Einfluss der Isopropanolkonzentration auf die Ausbeute im EMR nach Reaktorsimulationen.....	118
Abbildung 4.41: Kontinuierliche Produktion von 2-KLG im Enzymmembranreaktor.	119
Abbildung 4.42: Einfluss der Konzentration der <i>Lb</i> -ADH-Konzentration auf die Reaktorausbeute nach Reaktorsimulationen.....	120
Abbildung 4.43: Einfluss unterschiedlicher 2,5-DKG-Konzentration auf die EMR- Ausbeuten nach Modellsimulationen	122
Abbildung 5.1: Anlage zur kontinuierlichen Produktion von 2-KLG aus Glucose	127
Abbildung 5.2: Anlage zur kontinuierlichen Produktion von 2-KLG aus Glucose	128
Abbildung 5.3: Reaktor 1, Konzentrationen und Ausbeuten wurden aus Konzentrationen rekonstruiert, die am Auslauf gemessen wurden.....	132
Abbildung 5.4: Reaktor 2, Konzentrationen und Ausbeuten	132
Abbildung 5.5: Kontinuierliche Produktion von 2-KLG aus Glucose. Reduktion von 2,5-DKG findet in einem einzelnen 10 mL-EMR statt	133
Abbildung 5.6: Reaktor 1, Konzentrationen und Ausbeuten wurden aus Konzentrationen rekonstruiert, die am Auslauf gemessen wurden.....	137
Abbildung 5.7: Reaktor 2+3, Ausbeuten und Konzentrationen	137
Abbildung 5.8: Kontinuierliche Produktion von 2-KLG aus Glucose. Reduktion von 2,5-DKG findet in zwei 10 mL-Enzymmembranreaktoren statt.....	138
Abbildung 5.9: Vorgehensweise bei der Isolierung von 2-KLG aus der Reaktionslösung	141
Abbildung 5.10: Links: 5 Liter 2-KLG-Produktlösung aus der kontinuierlichen Biotransformation mit <i>G. oxydans</i> und 2,5-DKGR. Rechts: Isolierte 2-Keto-L- Gulonsäure.....	142
Abbildung 5.11: HPLC-Chromatogramm von selbst isoliertem 2-KLG	142
Abbildung 5.12: Struktur von 2-KLG in Lösung	143
Abbildung 5.13: ¹³ C-NMR-Spektrum von selbst isoliertem 2-KLG (in D ₂ O, 600 MHz- Spektrometer)	144

Abbildung 5.14: ^1H -NMR-Spektrum von 2-KLG (in D_2O , 600 MHz-Spektrometer).	145
Abbildung 5.15: Massenspektrum von selbst isolierter 2-Keto-L-Gulonsäure.....	146
Abbildung 6.1: Auswahl der optimalen NADP-Konzentration im EMR – Auswirkungen auf Ausbeute und total turnover number nach theoretischen Berechnungen	152
Abbildung 6.2: allmähliche Deaktivierung der Biokatalysatoren im gekoppelten Reaktorsystem: Abnahme der Ausbeute mit der Zeit.....	154
Abbildung 6.3: Voraussichtliche Abnahme der Produktkonzentration mit der Zeit....	155
Abbildung 8.1: HPLC-Chromatogramm von 2,5-DKG, 2-KG, 5-KG und Gluconat auf Rezex ROA Organic Acid H^+	165
Abbildung 8.2: HPLC-Chromatogramm von Gluconat, 5-KG, 2-KG, 2-KLG und 2,5-DKG auf Luna NH_2	167
Abbildung 8.3: Kalibriermethode für 2,5-DKG	168
Abbildung 8.4: Plexiglasschale mit Ni-IDA-Sepharose zur Aufreinigung der 2,5-Diketogluconatreduktase im Satzverfahren.....	180
Abbildung 8.5: Vorrichtung zur Durchführung von Aktivitätstests mit <i>Gluconobacter oxydans</i>	182
Abbildung 8.6: Anlagenaufbau zur kontinuierlichen Produktion von 2,5-DKG	186
Abbildung 8.7: Aufbau zur kontinuierlichen Produktion von 2-KLG aus 2,5-DKG ...	187
Abbildung 8.8: Anlage zur kontinuierlichen Produktion von 2-KLG aus Glucose	189
Abbildung A-1: Ergebnisse der Modellierung als drei Enzymreaktionen mit Michaelis-Menten-Kinetik.....	200
Abbildung A-2: Links: Plasmid pEKEX2_fdh bestehend aus Ptac-Promotor (Ptac), Formiatdehydrogenase-Gen (FDH) und Kanamycin-Resistenzgen (KanR). Rechts: Plasmid pDrive-PlacZ-dkgr bestehend aus Gen für die 2,5-Diketogluconatreduktase (2,5-DKGR), und Kanamycin-Resistenzgen (KanR) und Ampicillin-resistenzgen (AmpR). Eingezeichnet sind jeweils die Schnittstellen für das verwendete Restriktionsenzym Psp 1406I.....	201
Abbildung A-3: Links: Ergebnis der Restriktion von Plasmid pEKEX2_fdh mit Psp1406I	202
Abbildung A-4: Restriktion zur Überprüfung des Klonierungserfolgs.....	203

Abbildung A-5: Ergebnis der Klonierung: Plasmid pDrive_dkgr_fdh, bestehend aus Formiatdehydrogenase-Gen (FDH) mit Ptac-Promotor (Ptac), 2,5-Diketo-gluconatreduktase-Gen (2,5-DKGR) und Kanamycin-Resistenzgen (KanR).....	203
Abbildung A-6: Aufreinigung der 2,5-DKGR über eine Ionenaustauschersäule.....	204
Abbildung A-7: Aufreinigung der 2,5-DKGR über Ionenaustauschersäule: Resultierende Fraktionen und deren Aktivität.....	205
Abbildung A-8: Einfluss von Lyophilisation und Einfrieren auf die Aktivität der 2,5-DKGR.	205
Abbildung A-9: Enzymkinetik der <i>Lb</i> -ADH für die Oxidation von Isopropanol mit NADP als Cofaktor.....	206
Abbildung A-10: Inhibierung der <i>Lb</i> -ADH durch 2-KLG bei der Oxidation von Isopropanol (für alle drei Inhibierungsarten gleich).....	207
Abbildung A-11: Enzymkinetik der <i>Lb</i> -ADH für die Reduktion von Aceton mit NADPH als Cofaktor.....	209
Abbildung A-12: Inhibierung der <i>Lb</i> -ADH durch 2-KLG bei der Reduktion von Aceton (für alle drei Inhibierungsarten gleich).....	209

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Übersicht: Biotechnologische Routen zur Synthese von Vitamin C.....	6
Tabelle 1.2: Aus den Freien Enthalpien ΔG von Substraten und Produkten grob abgeschätzte Freie Reaktionsenthalpien $\Delta\Delta G_R$ für die einzelnen Reaktionsschritte	14
Tabelle 3.1: Einfluss des Hefeextraktgehaltes auf das Wachstum von <i>G. oxydans</i>	25
Tabelle 3.2: Kohlenstoffquellen der getesteten Medien.....	26
Tabelle 3.3: Spezifische Wachstumsgeschwindigkeiten μ und maximal erreichte optische Dichten in verschiedenen Medien.....	27
Tabelle 3.4: Zusammenfassung: Spezifische Wachstumsgeschwindigkeiten μ , maximal erreichte optische Dichten und resultierende Zellaktivitäten	29
Tabelle 3.5: Ergebnisse der 20-L-Fermentation von <i>G. oxydans</i> NCIMB 8084.....	33
Tabelle 3.6: Ergebnisse der Modellierung nach Formel 3.2.	46
Tabelle 3.7: Ergebnisse der Modellierung nach Formel 3.3	50
Tabelle 3.8: Kinetische Konstanten für <i>G. oxydans</i> NCIMB 8084 (Zellen aus 20L- Fermentation)	52
Tabelle 3.9: Optimierte Bedingungen für Biotransformationen im Satzreaktor mit <i>G.</i> <i>oxydans</i> NCIMB 8084	55
Tabelle 3.10: Vergleich der Ergebnisse im Satzreaktor mit in der Literatur erzielten Werten	56
Tabelle 3.11: Kontinuierliche Biotransformationen mit <i>G. oxydans</i> NCIMB 8084 ohne pH-Regulation	60
Tabelle 3.12: Ausbeuten und Raumzeitausbeuten in Abhängigkeit der Verweilzeit....	67
Tabelle 3.13: Vergleich der Reaktorläufe mit 2 % und 8 % Biomasse.....	68
Tabelle 3.14: Erreichte (Raum-Zeit-)Ausbeuten bei kontinuierlichen Biotransformationen mit <i>G. oxydans</i> NCIMB 8084 in 50 mmol/L KP_i -Puffer.	71
Tabelle 3.15: Optimierte Reaktionsbedingungen für die Produktion von 2,5-DKG mit <i>Gluconobacter oxydans</i> im CSTR.....	72
Tabelle 3.16: Vergleich der Ergebnisse im kontinuierlichen Rührkesselreaktor mit in der Literatur angegebenen Werten.....	73

Tabelle 3.17: ^1H -NMR-Verschiebungen und Kopplungskonstanten für selbst isoliertes 2,5-DKG und eine Referenzsubstanz	77
Tabelle 3.18: ^{13}C -NMR-Verschiebungen für isoliertes 2,5-DKG im Vergleich zu Literaturwerten	77
Tabelle 4.1: Zellausbeuten der beiden 20L-Fermentationen von <i>E. coli</i> BL21DE3 pQE82L-dkgr	88
Tabelle 4.2: Isolierte Fraktionen I-IX der 2,5-DKGR (Säulenverfahren)	91
Tabelle 4.3: Isolierte Fraktionen A-R der 2,5-DKGR (Satzverfahren)	92
Tabelle 4.4: Ergebnisse der Enzymaufreinigung im Vergleich mit anderen Arbeiten... 94	
Tabelle 4.5: Ergebnisse der Modellierung nach Formel 4.1	101
Tabelle 4.6: Ergebnisse der Modellierung nach Formel 4.2	102
Tabelle 4.7: Kinetische Konstanten für 2,5-DKGR im Vergleich zu Literaturwerten. 104	
Tabelle 4.8: Kinetische Konstanten der <i>Lb</i> -ADH	106
Tabelle 4.9: Optimierte Bedingungen für die Reduktion von 2,5-DKG mit 2,5-DKGR	107
Tabelle 4.10: Ergebnisse der Biotransformationen ohne Cofaktorregenerierung	108
Tabelle 4.11: Ergebnis der Biotransformationen im Satzreaktor	111
Tabelle 4.12: Kontinuierliche Produktion von 2-KLG im 3-mL-Enzymmembranreaktor	116
Tabelle 4.13: Kontinuierliche Produktion von 2-KLG im 10-mL-Enzymmembranreaktor	120
Tabelle 4.14: Optimale Bedingungen für einen EMR zur Produktion von 2-KLG	122
Tabelle 4.15: Vergleich der Ergebnisse mit Literaturwerten	123
Tabelle 5.1: Ergebnisse aus Kapitel 3 und Kapitel 4 – Optimierte Bedingungen für die kontinuierlich betriebenen Reaktoren 1 und 2.....	125
Tabelle 5.2: Definition wichtiger Begriffe für die Prozesscharakterisierung.....	129
Tabelle 5.3: Einstellungen für den Betrieb der gekoppelten Anlage.....	130
Tabelle 5.4: Flüsse und Verweilzeiten der beiden Reaktoren	130
Tabelle 5.5: Kontinuierliche Produktion von 2-KLG aus Glucose. Reduktion von 2,5-DKG findet in einem einzelnen 10 mL-EMR statt.....	134
Tabelle 5.6: Einstellungen für den Betrieb der gekoppelten Anlage.....	135
Tabelle 5.7: Flüsse und Verweilzeiten der drei Reaktoren.....	135

Tabelle 5.8: Kontinuierliche Produktion von 2-KLG aus Glucose. Reduktion von 2,5-DKG findet in zwei 10 mL-Enzymmembranreaktoren statt.	139
Tabelle 5.9: Vergleich der beiden erfolgreichen Reaktorläufe.....	140
Tabelle 5.10: Ergebnis der Isolierung von 2-KLG	143
Tabelle 5.11: ¹³ C-NMR-Verschiebungen für selbst isoliertes 2-KLG im Vergleich zu Literaturwerten	144
Tabelle 6.1: Mögliche Raumzeitausbeute bei unbegrenztem Sauerstoffangebot.....	148
Tabelle 6.2: Abschätzung des Sauerstoffbedarfs der Lösung	149
Tabelle 6.3: Sauerstofftransferraten in verschiedenen Satzreaktorsystemen	149
Tabelle 6.4: Im Rahmen dieser Arbeit erreichte Sauerstofftransferrate	149
Tabelle 6.5: Abschätzung der Kosten für die Sauerstoffbegasung in einem 50 mL-Reaktor	150
Tabelle 6.6: Abschätzung der maximalen total turnover number	155
Tabelle 8.1: Zusammensetzung Difco Yeast Nitrogen Base 1 x.....	164
Tabelle 8.2: Zusammensetzung M9-Salze 1 x [g/L]	164
Tabelle 8.3: HPLC-Methode für die Reaktion Glucose → 2,5-Diketo-D-Gluconat....	166
Tabelle 8.4: Retentionszeiten der relevanten Substanzen auf Rezex ROA Organic Acid H ⁺ [min].....	166
Tabelle 8.5: HPLC-Methode für die Reaktion 2,5-Diketo-D-Gluconat → 2-KLG	167
Tabelle 8.6: Retentionszeiten der relevanten Substanzen auf Luna NH ₂ [min]	167
Tabelle 8.7: Methode zur Aufnahme von Massenspektren	169
Tabelle 8.8: Zusammensetzung LB-Medium	171
Tabelle 8.9: Zusammensetzung Medium No. 5.....	171
Tabelle 8.10: Medium für Agarplatten	171
Tabelle 8.11: Medium zur Fermentation in Parallelfementern	172
Tabelle 8.12: Zusammensetzung SOC-Medium	175
Tabelle 8.13: 50 x TAE-Puffer (T <u>r</u> is- <u>A</u> acetat- <u>E</u> DTA)	177
Tabelle 8.14: 10 x DNA-Probenpuffer (Alle Prozentangaben v/v).....	177
Tabelle 8.15: Modifiziertes LB-Medium zur Kultivierung von BL21DE3 pQE82L_dkgr	178
Tabelle 8.16: Zusammensetzung der verschiedenen Puffer zur Isolierung der 2,5-DKGR	178

Tabelle 8.17: Methode zur Enzymaufreinigung über FPLC- Ionenaustauschchromatographie (CV = Säulenvolumina).....	181
Tabelle A-1: Ergebnisse der Modellierung nach Formel A-1	201
Tabelle A-2: Kinetische Konstanten der <i>Lb</i> -ADH für die Oxidation von Isopropanol	208
Tabelle A-3: Inhibierung durch 2-KLG.....	208
Tabelle A-4: Kinetische Konstanten der <i>Lb</i> -ADH für die Reduktion von Aceton	210
Tabelle A-5: K_i für 2-KLG bei unterschiedlichen Inhibierungsarten.....	210

Abkürzungsverzeichnis

Abk.	Bedeutung
2-KG	2-Keto-D-Gluconat bzw. -Gluconsäure
2-KGADH	2-Keto-D-Gluconatdehydrogenase
2,5-DKG	2,5-Diketo-D-Gluconat bzw. -Gluconsäure
2,5-DKGR	2,5-Diketo-D-Gluconatreduktase
2-KLG	2-Keto-L-Gulonat bzw. -Gulonsäure
5-KG	5-Keto-D-Gluconat bzw. -Gluconsäure
ADH	Alkoholdehydrogenase
AmpR	Ampicillin-Resistenz
ATP	Adenosintriphosphat
Ausb.	Ausbeute
BFG	Biofeuchtgewicht
bps	Basenpaare
CSTR	kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
EMR	Enzymmembranreaktor
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FDH	Formiatdehydrogenase
FPLC	Fast protein liquid chromatography
GC	Gaschromatographie
GDH	D-Glucosedehydrogenase
GADH	D-Gluconatdehydrogenase
<i>G. oxydans</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i>
H6, His-Tag	Hexahistidin-Tag
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Isoprop	Isopropanol
K	Reaktionskonstante
KanR	Kanamycin-Resistenz
konz.	konzentriert
Konz.	Konzentration

Verzeichnisse

KP _i -Puffer	Kalium-Phosphat-Puffer (K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄)
L-AA	L-Ascorbinsäure = Vitamin C
<i>Lb</i> -ADH	Alkoholdehydrogenase aus <i>Lactobacillus brevis</i>
Lsg.	Lösung
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
n.a.	nicht angegeben
NAD ⁽⁺⁾	Nicotinamidadenindinucleotid
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid, reduzierte Form
NADP ⁽⁺⁾	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, reduzierte Form
n.d.	nicht bestimmt
NEPG	Northeast Pharmaceutical Group
NMR	Kernspinresonanz
OD	optische Dichte
OD 600	optische Dichte bei $\lambda=600$ nm
OTR	Sauerstofftransferrate
P	Produkt
par.	parallel
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PQQ	Pyrrlochinolinchinon
Red.	Reduktase
rek	rekombinant
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
S	Substrat
<i>tert</i>	tertiär
tof	Wechselzahl, turnover frequency
ton	turnover number, Umsatzzahl
ttn	total turnover number
Tyr	Tyrosin
UpM	Umdrehungen pro Minute
z.B.	zum Beispiel

Symbolverzeichnis

Symbol	Bedeutung	übliche Einheit
τ	Verweilzeit	[h]
ΔG	<i>Gibbs</i> freie Standardenthalpie	[kJ/mol]
λ	Wellenlänge	[nm]
μ	spezifische Wachstumsgeschwindigkeit	[h ⁻¹]
δ	chemische Verschiebung	[ppm]
c	Konzentration	[mmol/L]
F_{Verd}	Verdünnungsfaktor	
J	Kopplungskonstante	[Hz]
K_M	Michaelis-Menten-Konstante	[mmol/L]
K_i	Inhibierungskonstante	[mmol/L]
M	Molmasse	[g/mol]
m	Masse	[g]
n	Stoffmenge	[mol]
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute	[mmol*L ⁻¹ *d ⁻¹]
t	Zeit	[s, min, h]
T	Temperatur	[°C]
V	Volumen	[μ L, mL, L]
v	Reaktionsgeschwindigkeit	[U/g]
v_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit	[U/g]
z	Anzahl Elementarladungen	

Kapitel 1: Einleitung

1.1. Vitamin C in Medizin und Lebensmittelindustrie

Im Laufe der Evolution haben Primaten durch einen genetischen Defekt die Fähigkeit verloren, L-Ascorbinsäure (Abbildung 1.1) durch Biosynthese im Körper selbst herzustellen: Sie müssen die lebenswichtige Substanz mit der Nahrung zu sich nehmen. L-Ascorbinsäure (L-AA, auch Vitamin C genannt) zählt somit zu den essentiellen Nahrungsbestandteilen.

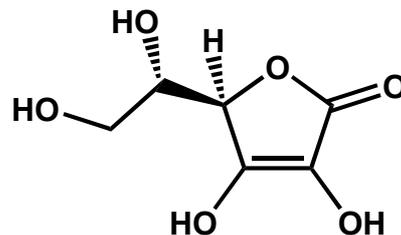


Abbildung 1.1: Strukturformel von Vitamin C

Das wasserlösliche Vitamin katalysiert den Elektronentransfer bei Hydroxylierungsreaktionen und übernimmt damit eine Schlüsselfunktion bei der Kollagenbiosynthese. Aufgrund seiner antioxidativen Wirkung schützt es Gewebe vor schädlichen Radikalen und hilft bei der Entgiftung von toxischen Metaboliten und Medikamenten. Ein Mangel an L-Ascorbinsäure verursacht das Krankheitsbild des Skorbutus.

Vitamin C ist für Pharmazie und Lebensmittelindustrie von großem Interesse. Die pharmazeutische Industrie verarbeitet etwa die Hälfte des jährlich industriell produzierten Vitamins, beispielsweise für Nahrungsergänzungsmittel in Pulver- und Kapselform oder für Präparate zur Behandlung von Verbrennungen. Da L-Ascorbinsäure die Kollagenproduktion anregt, ist die Verbindung auch für kosmetische Produkte wie Antifaltencremes interessant. Die anderen 50 Prozent des jährlich hergestellten Vitamin C gehen in die Nahrungs-, Getränke- und Futterindustrie. In diesen Industriezweigen ist die Substanz aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften begehrt: Vitamin C erhält Geschmack und Aroma von Lebensmitteln [Bauernfeind *et al.* 1970], verlängert deren Haltbarkeit [Chauhan *et al.* 1998] und verbessert Wachstum und Gesundheit bei Nutztieren [Madej *et al.* 2000].

Seit einiger Zeit ist Vitamin C auch als mögliches Krebstherapeutikum im Gespräch. In Tierversuchen schränkte eine tägliche Injektion von Salzen der Ascorbinsäure in die

Bauchhöhle das Tumorwachstum bei Mäusen mit Eierstock-, Bauchspeicheldrüsen- oder Hirnkrebs stark ein [Chen *et al.* 2008]. Die Größe der Krebsgeschwüre reduzierte sich dabei um 41 bis 53 %. Jedoch kommt eine solche Therapie nach Einschätzungen von Experten im besten Falle bei Tumoren in Frage, bei denen keine weitere Therapie hilft, und kann lediglich die Überlebenszeit des Betroffenen verlängern [Kählert 2008]. Umstritten ist die Hypothese, dass die regelmäßige Einnahme von Vitamin-C-Präparaten das Immunsystem stärkt und einer Erkältung vorbeugt. Eine Studie konnte dies 2007 nicht bestätigen. Jedoch reduzierte sich bei prophylaktischer Einnahme von Vitamin C die Dauer einer Erkältung um acht Prozent [Douglas *et al.* 2007].

1.2. Herstellung von Vitamin C – Stand der Technik

Vitamin C wird als typisches Bulkprodukt in großem Maßstab industriell hergestellt. Die Produktion auf dem Weltmarkt wurde im Jahr 2001 mit 110.000 Tonnen pro Jahr angegeben [Macauley *et al.* 2001]. Der jährliche Umsatz lag zu dieser Zeit bei 600 Millionen US\$ pro Jahr mit einer Zuwachsrate von drei bis vier Prozent [Hancock *et al.* 2001]. Der Marktpreis für Vitamin C schwankt zwischen sechs und acht US\$ pro Kilogramm. Marktführer bei der Vitamin C-Produktion war bis zum Jahr 2003 die schweizerische Firma Hoffmann-La Roche. Am 1. Oktober 2003 wurde die Vitaminsparte von Roche Teil des niederländischen Unternehmens DSM, das dadurch zum Marktführer wurde. Weitere bedeutende europäische Produzenten von Vitamin C sind die BASF und Merck. Die Konkurrenz aus der Volksrepublik China wird jedoch zunehmend stärker. Zu den chinesischen Herstellern zählt beispielsweise die Northeast Pharmaceutical Group.

Das industrielle Verfahren zur Produktion von Vitamin C hat keine Beziehung zu dessen Biosynthese. Ein Großteil des Vitamin C wird über die bereits 1934 entwickelte, hauptsächlich chemische Syntheseroute nach Reichstein und Grüssner hergestellt. Jedoch gewinnen biotechnologische Herstellungsverfahren zunehmend an Bedeutung. Solche Verfahren produzieren fast immer Verbindungen, welche Vorstufen von L-Ascorbinsäure im Reichstein-Grüssner-Verfahren darstellen und daher relativ einfach zu Vitamin C weiterverarbeitet werden können.

In China wird Vitamin C ausschließlich biotechnologisch hergestellt [Running *et al.* 2004]. Das entsprechende Verfahren ist in Kapitel 1.2.2 beschrieben. In anderen Teilen

der Welt dominiert noch das Reichstein-Grüssner-Verfahren (Kapitel 1.2.1). Doch die biotechnologische Produktion wird auch in Europa attraktiver: Beispielsweise produziert seit 1999 ein Gemeinschaftsunternehmen von Cerestar, Merck und der BASF biotechnologisch Vitamin C in einer Anlage in Krefeld.

1.2.1 Chemische Synthese nach Reichstein und Grüssner

1934 beschrieben Tadeus Reichstein und Andreas Grüssner eine siebenstufige Syntheseroute, mit der aus D-Glucose Vitamin C hergestellt werden kann [Reichstein *et al.* 1934]. Das Verfahren beinhaltet inzwischen - nach leichter Abwandlung der ursprünglichen Vorgehensweise - folgende Schritte [Boudrant 1990] (Abbildung 1.2):

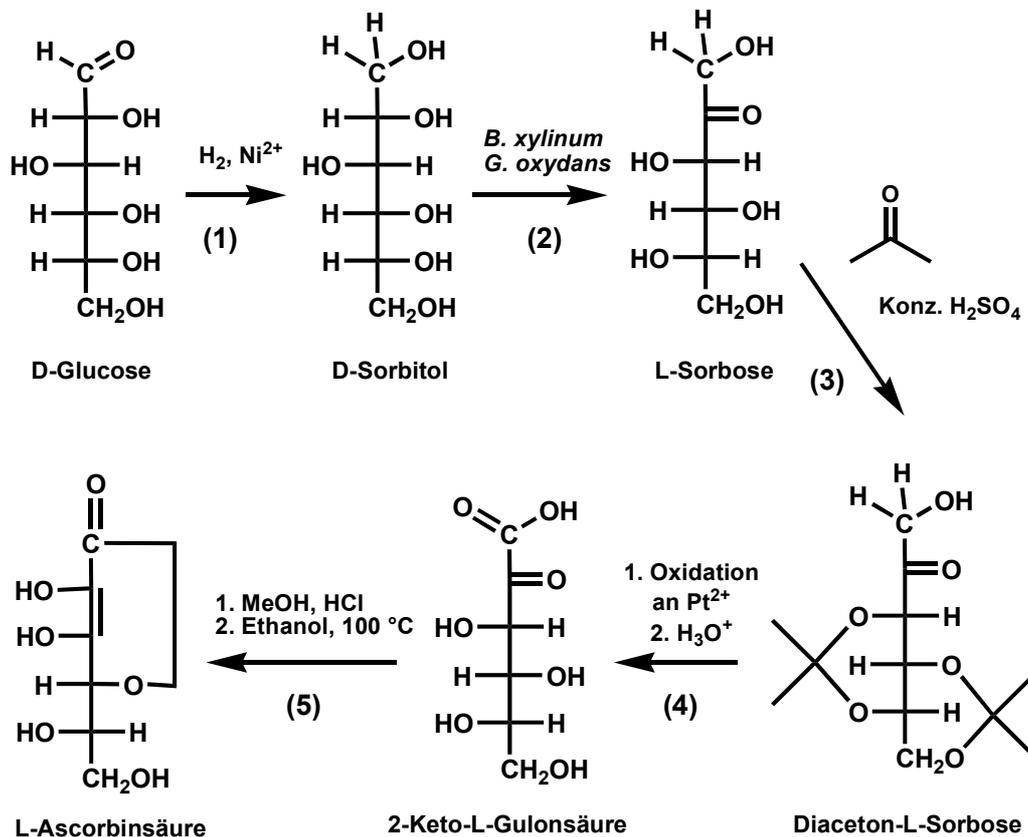


Abbildung 1.2: Synthese von Vitamin C nach Reichstein und Grüssner

(1) Hydrierung von D-Glucose zu D-Sorbitol unter Druck mit Hilfe eines Nickel-Katalysators

- (2) Oxidation von D-Sorbitol zu L-Sorbose über eine Fermentation mit *Bacterium xylinum* oder *Gluconobacter oxydans* (dies ist der einzige biotechnologische Schritt des Verfahrens)
- (3) Schutz der Hydroxylgruppen durch Umsetzung von L-Sorbose mit Aceton zu Diaceton-L-Sorbose
- (4) Oxidation dieser Zwischenstufe zu 2-Keto-L-Gulonsäure an einem Platinkatalysator
- (5) Über Enolisierung und intramolekulare Lactonbildung entsteht aus 2-Keto-L-Gulonsäure das Produkt L-Ascorbinsäure

Für das Verfahren sprechen eine resultierende Gesamtausbeute von etwa 50 % [Chotani *et al.* 2000] sowie das relativ günstige Startmaterial Glucose. Jedoch benötigen einige Schritte hohe Temperaturen und/oder hohe Drücke und verlangen den Einsatz organischer Lösungsmittel oder starker Säuren. Die relativ hohen Energie- und Entsorgungskosten machen das Reichstein-Grüssner-Verfahren teuer und zeitintensiv. Es werden aufwändige Apparaturen benötigt, die hohe Drücke und Temperaturen aushalten.

Ein Produktionsverfahren, das sich ausschließlich auf biotechnologische Techniken stützt, ist umweltfreundlicher und mit weniger Kapitalkosten verbunden. Je nach Ausbeute und Ausgangssubstrat ist es auch wirtschaftlich lohnender.

1.2.2 Biotechnologische Synthese

Fast alle biotechnologischen Syntheserouten, die bislang verfolgt wurden, zielen auf die Produktion von 2-Keto-L-Gulonsäure (2-KLG) ab. 2-KLG (Abbildung 1.3) ist ein Zwischenprodukt des Reichstein-Grüssner-Verfahrens und kann relativ leicht chemisch zur L-Ascorbinsäure umgesetzt werden. Die häufigsten Substrate sind D-Glucose, D-Sorbitol und L-Sorbose.

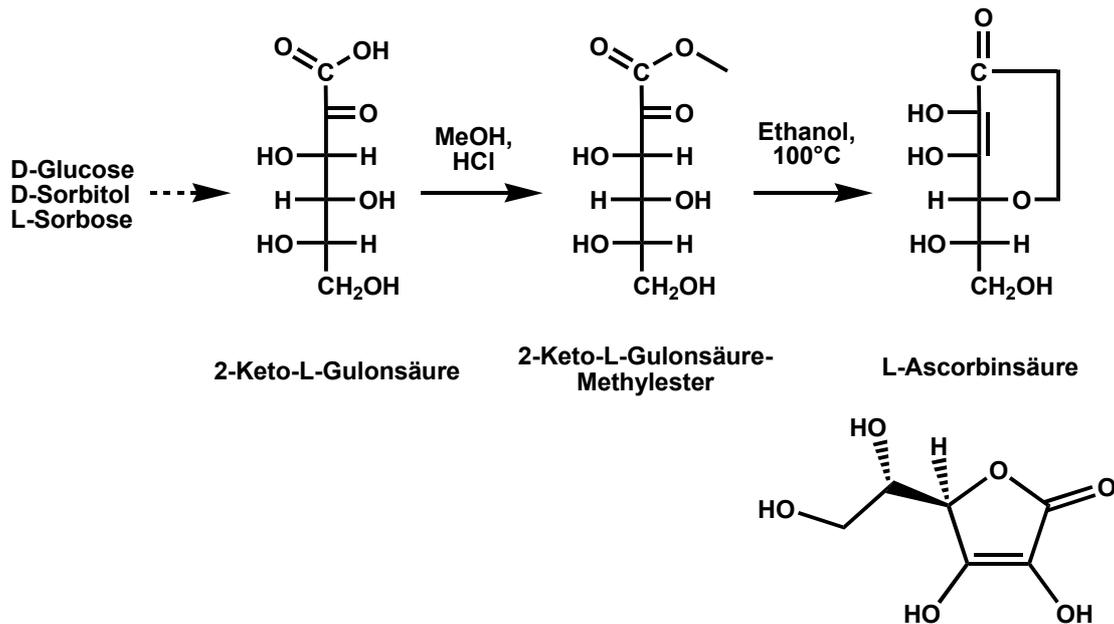


Abbildung 1.3: Struktur von 2-KLG und seine Umsetzung zu Vitamin C

Einige wenige Bakterien produzieren direkt Vitamin C aus Sorbitol oder Sorbosen oder komplizierteren Ausgangsstoffen; die Ausbeuten sind dabei jedoch in den meisten Fällen sehr gering oder das Verfahren ist nicht im großen Maßstab anwendbar. Rao und Sureshkumar berichteten 2000 beispielsweise von Bakterien der Art *Xanthomonas campestris*, die Vitamin C unter oxidativem Stress bei Behandlung mit Hypochloriger Säure bilden [Rao *et al.* 2000].

Zur Synthese von 2-KLG werden Wildtypen oder genetisch veränderte Stämme von Bakterien eingesetzt. Auch einige Arten von Hefezellen und Mikroalgen können L-Ascorbinsäure synthetisieren. Hefezellen produzieren jedoch häufig D-Erythroascorbinsäure, eine Substanz, die bei Hefen die Aufgaben des Vitamin C übernimmt [Huh *et al.* 1998]. Diese antioxidative Substanz kann zwar L-AA in einigen industriellen Anwendungen ersetzen, hilft jedoch beim Menschen nicht als Vorbeugung gegen Skorbut, da es Vitamin C im Körper nicht vertreten kann.

Abbildung 1.4 gibt einen Überblick über die wichtigsten der bisher untersuchten Vorgehensweisen, 2-KLG und L-AA herzustellen. Thema dieser Arbeit ist die Produktion von 2-KLG aus Glucose über 2,5-Diketo-D-Gluconat (rot).

1.2. Herstellung von Vitamin C – Stand der Technik

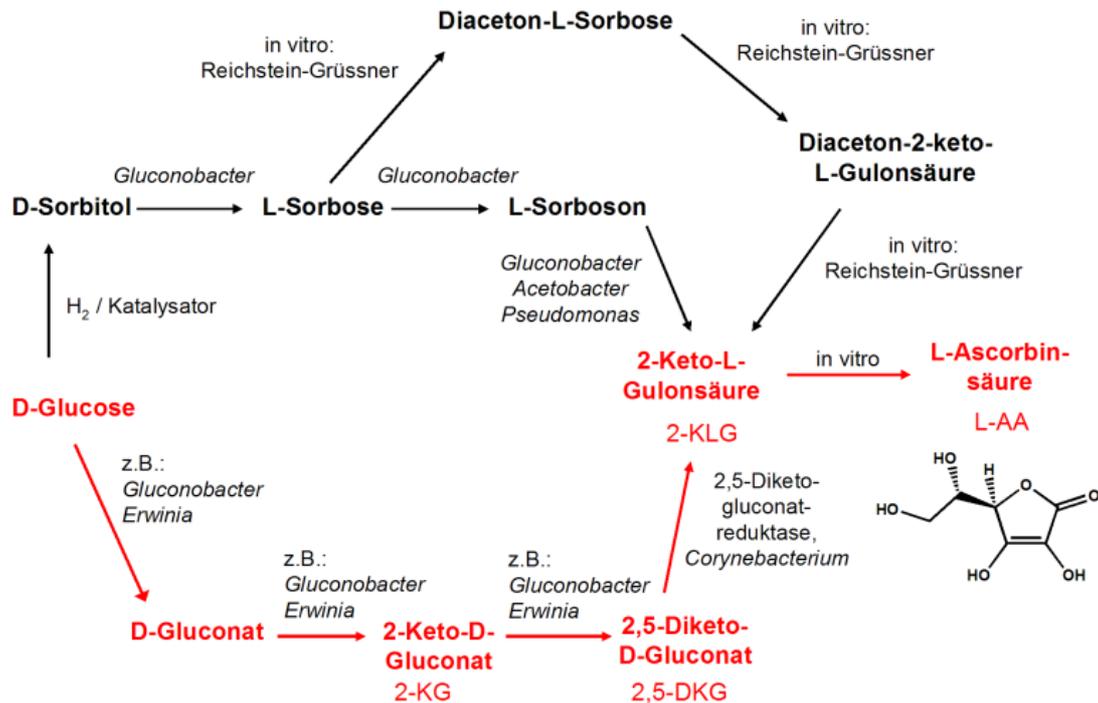


Abbildung 1.4: Mögliche Syntheserouten zur Produktion von Vitamin C. Rot markiert ist die Route, die Thema dieser Arbeit ist.

Tabelle 1.1 fasst die bisher entwickelten biotechnologischen Verfahren zur Produktion von 2-KLG beziehungsweise L-Ascorbinsäure zusammen.

Tabelle 1.1: Übersicht: Biotechnologische Routen zur Synthese von Vitamin C

Syntheseroute	Biokatalysator(en)	Ausbeute [%]	Literatur
Gemischte Bakterienkulturen			
Glucose → 2,5-DKG → 2-KLG	<i>Acetomonas albosesamae</i> / <i>Brevibacterium ketosoreductum</i>	10-15	[Sonoyama <i>et al.</i> 1976]
Glucose → 2,5-DKG → 2-KLG	<i>Erwinia</i> sp / <i>Corynebacterium</i> sp	84,6	[Sonoyama <i>et al.</i> 1982]
Gluconat → 2,5-DKG → 2-KLG	<i>Gluconobacter oxydans</i> / <i>Corynebacterium</i> sp	38,0	[Aiguo <i>et al.</i> 1998]

Syntheseroute	Biokatalysator(en)	Ausbeute [%]	Literatur
Gemischte Bakterienkulturen			
L-Sorbose → 2-KLG	<i>Gluconobacter oxydans</i> + <i>Bacillus megaterium</i>	94,0	[Shujuan <i>et al.</i> 2003]
D-Sorbitol → L-Sorbose → 2-KLG	<i>Gluconobacter o. Acetobacter</i> / <i>Gluconobacter oxydans</i>	89,0	[Hoshino <i>et al.</i> 1992]
D-Sorbitol → L-Sorbose → 2-KLG	<i>Gluconobacter o. Acetobacter</i> / <i>Gluconobacter oxydans</i>	85,5	[Rueckel 2000]
D-Sorbitol → L-Sorbose → 2-KLG	<i>Gluconobacter oxydans</i> / <i>Bacillus thuringiensis</i>	80-85	[Troostembergh <i>et al.</i> 2003]
Prozesse mit einem einzigen Bakterienstamm			
D-Sorbitol → L-AA L-Sorboson → L-AA	<i>Ketogulonicigenium vulgare</i>	0,2 21,3	[Sugisawa <i>et al.</i> 2005]
Glucose → L-AA	<i>Xanthomonas campestris</i>	52,0	[Rao <i>et al.</i> 2000]
D-Sorbitol → 2-KLG L-Sorbose → 2-KLG	<i>Gluconobacter oxydans</i>	56,3 55,6	[Sugisawa <i>et al.</i> 1990]
D-Sorbitol → 2-KLG	<i>Gluconobacter oxydans</i>	36,0	[Bremus 2006]
L-Gulono- γ -lacton → L-AA	<i>Gluconobacter oxydans</i>	15,6	[Sugisawa <i>et al.</i> 1995]
2,5-DKG → 2-KLG	<i>Corynebacterium sp</i>	90,5	[Sonoyama <i>et al.</i> 1987]
Genetisch veränderte Bakterienstämme			
Glucose → 2-KLG	<i>Erwinia herbicola</i>	22,4	[Anderson <i>et al.</i> 1985]
Glucose → 2-KLG	<i>Erwinia citreus</i>	49,4	[Grindley <i>et al.</i> 1988]
Glucose → 2-KLG	<i>Erwinia cypripedii</i>	n.a.	[Wührer <i>et al.</i> 2006]
D-Sorbitol → 2-KLG	<i>Gluconobacter oxydans</i>	81,8	[Saito <i>et al.</i> 1998]
L-Sorboson → 2-KLG L-Sorbose → 2-KLG	<i>Gluconobacter oxydans</i>	83,0 81,0	[Shinjoh <i>et al.</i> 1995]
L-Sorbose → 2-KLG D-Sorbitol → 2-KLG	<i>Pseudomonas putida</i>	21,1 21,8	[Shibata <i>et al.</i> 2000]
L-Sorboson → L-AA	<i>Gluconobacter oxydans</i>	42,1	[Berry <i>et al.</i> 2005]

Syntheseroute	Biokatalysator(en)	Ausbeute [%]	Literatur
Hefezellen			
L-Galaktose → L-AA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40,4	[Sauer <i>et al.</i> 2004]
Mikroalgen			
Glucose → L-AA	<i>Prototheca moriformis</i>	0,26	[Running <i>et al.</i> 2002]
Mikroorganismen in Kombination mit isolierten Enzymen			
Glucose → Gluconat → 2,5-DKG → 2-KLG	Glucosedehydrogenase / <i>Gluconobacter oxydans</i> / 2,5-Diketogluconatreduktase	16,8	[Ji <i>et al.</i> 2001]

In China wird 2-KLG industriell aus L-Sorbose hergestellt. Man verwendet dazu gemischte Bakterienkulturen, bestehend aus den beiden Stämmen *Gluconobacter oxydans* und *Bacillus megaterium* [Shujuan *et al.* 2003]. Dabei produziert nur *Gluconobacter oxydans* 2-KLG; in Anwesenheit von *Bacillus megaterium* erhöhen sich jedoch die Wachstums- und Produktionsraten von *Gluconobacter*. Der genaue Mechanismus, mit dem *B. megaterium* auf *G. oxydans* Einfluss nimmt, ist bis heute unklar [Shujuan *et al.* 2003]. Die Ausbeuten lagen stets bei 75-80 % [Xu *et al.* 2004]. Die Ausbeute durch eine Auswahl geeigneter Mutanten zu erhöhen, ist derzeit Gegenstand der Forschung. Shujuan *et al.* konnten die Ausbeute so auf 94% erhöhen [Shujuan *et al.* 2003].

Das Joint venture aus BASF, Merck und Cerestar produziert 2-KLG aus Sorbitol. Cerestar hält das Patent auf das Verfahren und lizenziert es an das Gemeinschaftsunternehmen [Troostembergh *et al.* 2003]. Sorbitol wird dabei mit *Gluconobacter oxydans*-Zellen zu L-Sorbose umgesetzt. Daraus wird in einer weiteren Fermentation mit *Bacillus thuringiensis* 2-KLG. Die Gesamtausbeute beträgt nach Aufreinigung und Kristallisation des Endproduktes über 80 Prozent.

1.2.3 Biotechnologische Synthese ausgehend von D-Glucose

Glucose ist einer der günstigsten und am besten verfügbaren Ausgangsstoffe. Ein biotechnologisches Produktionsverfahren von Vitamin C, das von Glucose ausgeht, ist daher kommerziell am interessantesten. Sorbitol beispielsweise ist etwa zwei- bis

dreimal teurer als Glucose¹. Zudem kann Glucose nicht nur als Ausgangssubstrat dienen, sondern gleichzeitig als günstige Kohlenstoffquelle für die eventuell beteiligten Mikroorganismen.

Die Syntheseroute von 2-KLG aus Glucose läuft über 2,5-Diketogluconat (2,5-DKG) als Zwischenprodukt:

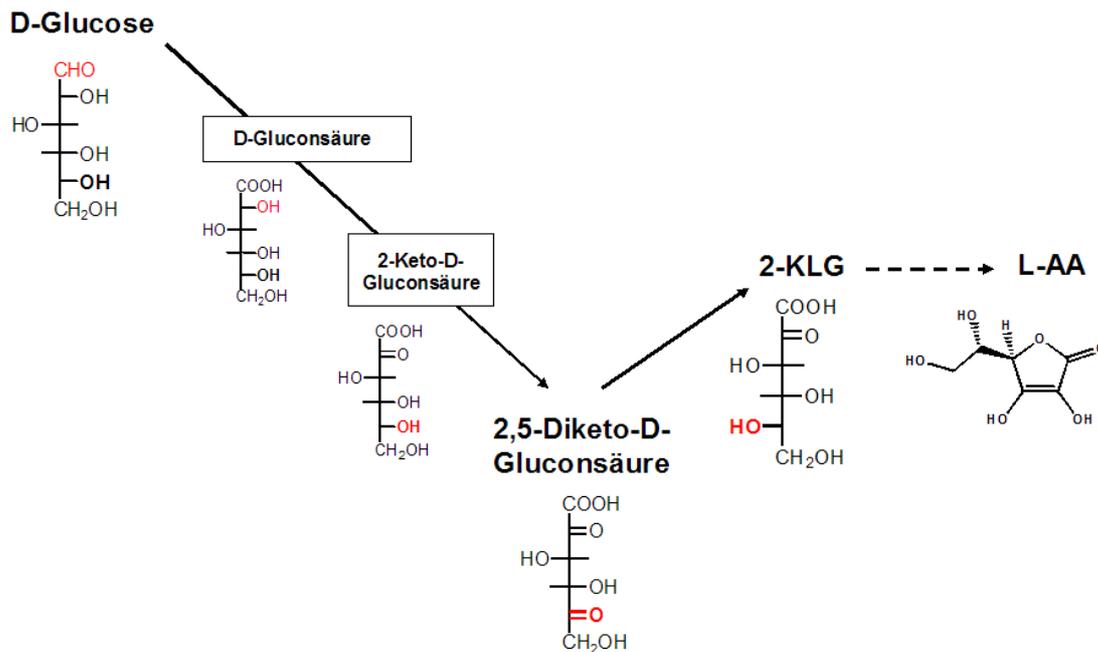


Abbildung 1.5: Biotechnologische Synthese von Vitamin C aus Glucose

Mehrere Bakterienstämme, beispielsweise *Gluconobacter* oder *Erwinia*, oxidieren D-Glucose über eine dreistufige Reaktion zu 2,5-DKG. D-Gluconsäure und 2-Keto-D-Gluconsäure (2-KG) sind die Zwischenstufen dieser Reaktion.

Corynebacterium und *Brevibacterium* enthalten natürlicherweise das Enzym 2,5-Diketo-D-Gluconatreduktase und reduzieren daher 2,5-DKG zu 2-KLG.

Dutzende Verfahren zur Umsetzung von 2-KLG zu L-Ascorbinsäure sind bereits beschrieben. Dazu zählt die ursprünglich im Reichstein-Grüssner-Verfahren angewandte Veresterung mit anschließendem Ringschluß [Reichstein *et al.* 1934]. Auch eine Umsetzung mit Hilfe von Mineralsäuren [Fechtel *et al.* 1998, Honda *et al.* 1998]

¹ Katalogpreise 2008 der Firma Fluka für 99,5 %ige Substanzen

oder in Anwesenheit eines Sulfits ist möglich [Arumugam *et al.* 2003]. Weiterhin gibt es Ansätze, auch diese Reaktion biotechnologisch durchzuführen [Hoshino *et al.* 2005].

1.2.3.1 Zweistufige Synthese

Eine zweistufige Synthese von 2-KLG aus Glucose schlug als erstes Sonoyama vor [Sonoyama *et al.* 1976]. Er verwendete Bakterien der Art *Acetobacter*, *Acetomonas* oder *Gluconobacter* (Stamm A) zur Herstellung von 2,5-DKG. Dieses wurde von Mikroorganismen der Art *Brevibacterium* oder *Corynebacterium* (Stamm B) im gleichen Reaktionsgefäß zu 2-KLG reduziert. Dabei wurde entweder das glucosehaltige Medium mit beiden Stämmen gleichzeitig angeimpft oder Stamm B wurde nach einer gewissen Vorlaufzeit zum Fermenter hinzugegeben. Die Ausbeuten lagen bei 10 bis 15%.

Ein ähnliches Verfahren mit sehr viel höherer Ausbeute beschrieben Sonoyama *et al.* wenige Jahre später [Sonoyama *et al.* 1982]: Hier fanden Oxidation und Reduktion nicht gleichzeitig, sondern nacheinander statt. Für die erste Umsetzung verwendeten sie die *Erwinia*-Mutante SHS 2629001. Diese produzierte 2,5-DKG aus Glucose in einem 10 m³-Fermenter mit einer Ausbeute von 94,5%. Nach abgeschlossener Oxidation wurden die *Erwinia*-Zellen mit Natriumdodecylsulfat abgetötet. Die Lösung wurde anschließend einem anderen 10 m³-Fermenter zudosiert; in diesem reduzierte die *Corynebacterium*-Mutante SHS 52001 das Zwischenprodukt zum 2-KLG. Die Gesamtausbeute betrug im Mittel 84,6%.

Die stark erhöhte Ausbeute wurde unter anderem auf die verwendeten Bakterienstämme zurückgeführt, welche für die jeweilige Reaktion optimiert waren. Sicherlich spielte auch eine Rolle, dass sich bei dieser Verfahrensvariante die Bedingungen für Oxidation und Reduktion separat optimieren und einstellen ließen.

Nachteilig am oben beschriebenen Verfahren ist, dass ein Großteils der 2,5-DKG-haltigen Lösung zwischengelagert wurde: Die Fermentationsbrühe aus dem ersten Schritt wurde über einen Zeitraum von 48 Stunden dem zweiten Fermenter zudosiert. 2,5-DKG ist jedoch instabil und zersetzt sich allmählich in Lösung [Sonoyama *et al.* 1982]. Ein Teil des Zwischenprodukts entgeht so einer weiteren Reduktion, was die Ausbeute verringert. Es wäre wünschenswert, den Zeitraum bis zur weiteren Umsetzung von 2,5-DKG möglichst gering zu halten.

Es wurden Versuche unternommen, den Prozess durch eine Co-Immobilisierung auf eine einzige Biotransformation zu reduzieren: Aiguo und Peiji co-immobilisierten Zellen von *Gluconobacter oxydans* und *Corynebacterium* sp. in einem Calciumalginat-Gel und nutzten sie für eine Produktion von 2-KLG in einem Schritt. Mit Gluconat als Startmaterial erreichten sie dabei im Schüttelkolben jedoch lediglich Ausbeuten von 38% [Aiguo *et al.* 1998].

1.2.3.2 Einstufige Synthese mit genetisch veränderten Mikroorganismen

1985 wurde erstmals ein genetisch veränderter Bakterienstamm vorgestellt, der Glucose direkt zu 2-KLG umsetzte [Anderson *et al.* 1985]. Das Gen für das Enzym 2,5-Diketo-D-Gluconatreduktase (2,5-DKGR) aus *Corynebacterium* war dafür in *Erwinia herbicola* exprimiert worden. *Erwinia herbicola* setzt natürlicherweise Glucose zu 2,5-DKG um; der rekombinante Organismus konnte dieses Zwischenprodukt anschließend mit Hilfe der 2,5-DKGR zu 2-KLG reduzieren. Die Gesamtausbeute lag bei 22,4%. Grund für die geringe Ausbeute war nach Angaben der Autoren die unterschiedlichen Wirkorte der Enzyme: Membrangebundene Enzyme oxidieren Glucose im Periplasma der Zelle, die 2,5-DKGR liegt hingegen im Zytoplasma vor. 2,5-DKG muss somit vom Periplasma ins Zytosol transportiert werden, um zu 2-KLG reduziert zu werden.

Grindley *et al.* gelang es 1988, durch Transformation von *Erwinia citreus* auf dieselbe Weise die Ausbeute auf 49,4 % zu steigern [Grindley *et al.* 1988]. *Erwinia citreus* wächst im Gegensatz zu *Erwinia herbicola* weder in 2,5-DKG- noch 2-KLG-haltigen Medien. Somit werden weder Produkt noch Zwischenprodukt anderweitig verbraucht. Auch ein optimiertes Fermentationsprotokoll und die Auswahl der richtigen Promoter hatten die Ausbeute verbessert. Jedoch wirke weiterhin die Aufnahme von 2,5-DKG in die Zelle limitierend, so die Autoren. Auch die Bereitstellung von Cofaktor sei ein Problem: Das Enzym 2,5-DKGR benötigt NADPH als Cofaktor, welches stets in ausreichender Menge im Zytosol vorhanden sein muss.

Bei einem 2,5-DKG-reduzierenden Mikroorganismus der Gattung *Pantoea citrea* überexprimierten Valle *et al.* das Transporterprotein, welches 2,5-DKG in die Zelle

einschleust. Dadurch erhöhte sich die Ausbeute jedoch lediglich von 45 auf 53 % [Valle *et al.* 2002]. Daher wird die Bedeutung offensichtlich überschätzt, die ein 2,5-DKG-Transport auf die Ausbeute der Reaktion hat. Vielmehr lassen andere Ursachen die Ausbeuten solcher maßgeschneiderter Mikroorganismen bei etwa 50% stagnieren. Bis heute ist zur Produktion von 2-KLG aus Glucose ein zweistufiges Verfahren nach Vorbild Sonoyamas [Sonoyama *et al.* 1982] das ergiebigste.

1.2.3.3 Thermodynamische Betrachtungen

In diesem Kapitel sollen die einzelnen Schritte der Syntheseroute von Glucose zu 2-KLG genauer betrachtet und Rückschlüsse auf die Triebkraft der einzelnen Reaktionen gezogen werden.

Als erstes wird die Aldehydgruppe der Glucose zu einer Säurefunktion oxidiert. Es entsteht Gluconsäure. Daraufhin werden zwei Alkoholgruppen zu Carbonylgruppen oxidiert, zunächst am Kohlenstoff C2 (es entsteht 2-KG), dann an C5 (es entsteht 2,5-DKG). Diese drei aufeinander folgenden Oxidationen werden in fast allen Fällen (vgl. Tabelle 1.1) vom gleichen Mikroorganismus durchgeführt.

Bei der anschließenden Reduktion von 2,5-DKG zu 2-KLG wird die Carbonylfunktion an C5 zurück zu einer Alkoholgruppe reduziert. Von 2-KG zu 2-KLG ändert sich somit lediglich die Chiralität des Kohlenstoffatoms C5 von D zu L: 2-KG und 2-KLG sind Epimere.

Abbildung 1.6 zeigt die mit Hilfe der Software Chem Draw Ultra (Cambridge Soft) grob abgeschätzten Freien Enthalpien (Gibbs-Energien) ΔG der fünf Verbindungen.

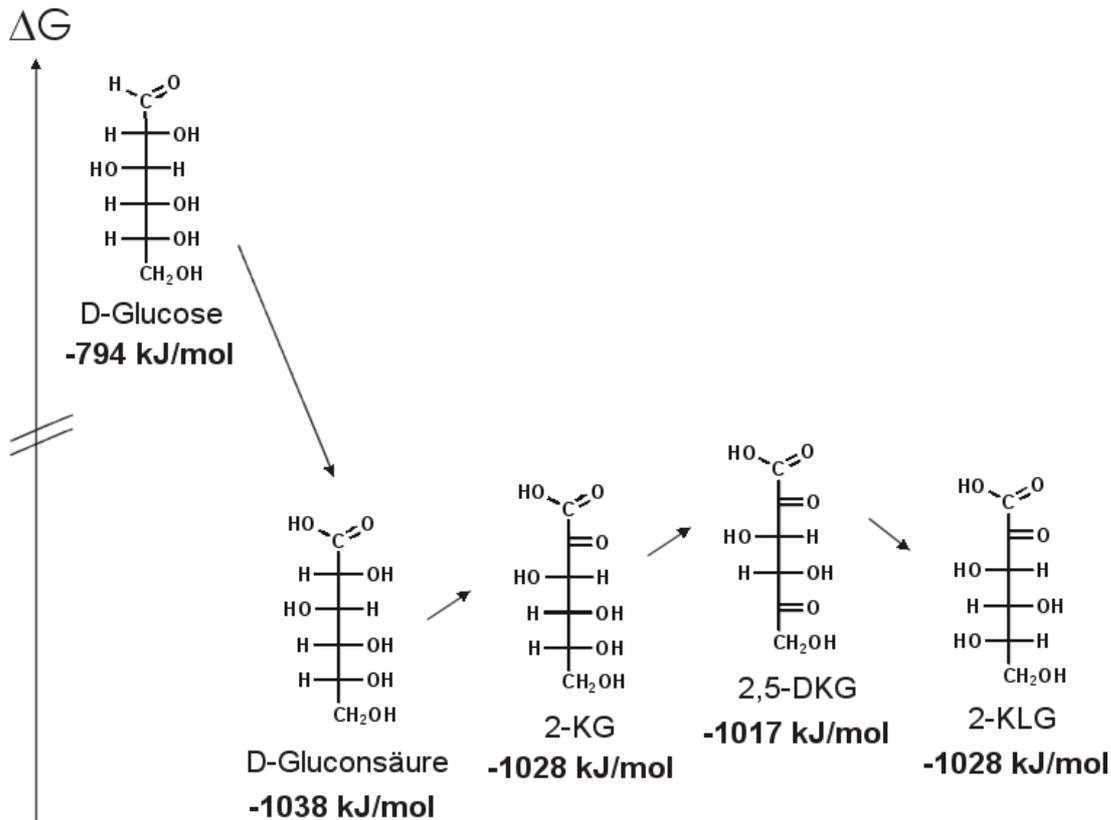


Abbildung 1.6: ΔG -Werte der Verbindungen auf der Syntheseroute von Glucose zu 2-KLG (abgeschätzt mit Cambridge Soft Chem Draw Ultra 8.0; Verteilung der Moleküle auf der ΔG -Achse nicht maßstabsgerecht; nur die offenen Formen der Verbindungen sind berücksichtigt)

Während sich bei der Oxidation von Glucose zu Gluconsäure die Freie Enthalpie des Moleküls stark verringert, besitzen die anderen vier Verbindungen in etwa gleiche „Energiezustände“ ΔG . 2-KG und 2-KLG besitzen sogar exakt gleiche Energiezustände. Gerade die Triebkraft der Redox-Inversion der OH-Gruppe muss daher aus den beteiligten Redoxäquivalenten stammen.

Bei der Oxidation von Gluconsäure und 2-KG ist die Triebkraft die Bildung von Wasser (Tabelle 1.2). Bei der Reduktion von 2,5-DKG zu 2-KLG ist die Triebkraft nur gering; der Redoxfaktor des Enzyms, das die Reaktion katalysiert, spielt hier eine große Rolle. Betrachtet man lediglich die Oxidation mit NADPH als Cofaktor, so ergibt sich grob abgeschätzt eine Freie Reaktionsenthalpie $\Delta\Delta G_R$ von $32,1 \text{ kJ/mol}$. NADP^+ wird sowohl in der Zelle als auch im Reaktor über die Oxidation anderer Substanzen regeneriert. Eine vollständige Betrachtung der Triebkraft dieses Reaktionsschritts ist somit streng genommen nur möglich, wenn auch diese Verbindungen in die Berechnungen mit einbezogen werden.

1.2. Herstellung von Vitamin C – Stand der Technik

Tabelle 1.2: Aus den Freien Enthalpien ΔG von Substraten und Produkten (s. Abbildung 1.6) grob abgeschätzte Freie Reaktionsenthalpien $\Delta\Delta G_R$ für die einzelnen Reaktionsschritte. Literaturwerte: \sim aus P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim 2001; * aus [Miller *et al.* 1990]

Reaktion	ΔG Substrate [kJ/mol]		ΔG Produkte [kJ/mol]		$\Delta\Delta G_R$ [kJ/mol]
$2 \text{ Glucose} + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{ Gluconsäure}$	- 794	0	- 1038		- 244
$2 \text{ Gluconsäure} + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{ 2-KG} + 2 \text{ H}_2\text{O}$	- 1038	0	- 1028	- 237 \sim	- 227
$2 \text{ 2-KG} + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{ 2,5-DKG} + 2 \text{ H}_2\text{O}$	- 1028	0	- 1017	- 237 \sim	- 226
$2,5\text{-DKG} (+ 2 \text{ H}^+ + 2 \text{ e}^-) \rightarrow 2\text{-KLG}$	- 1017		- 1028		- 11
$\text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{H}_2$					- 21,1*
$2,5\text{-DKG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{-KLG} + \text{NADP}^+$					- 32,1

Würde die zweistufige Reaktion von 2-KG zu 2-KLG vom gleichen Enzym mit dem gleichen Cofaktor katalysiert, wäre die Triebkraft gleich Null. Erst über die Bildung von Wasser und über die Entkopplung der beiden Cofaktorpools wird die Chiralitätsumkehr möglich. Die Triebkraft der Reaktion ist sicherlich am höchsten, wenn die Oxidation und die Reduktion vollkommen getrennt voneinander ablaufen, das bedeutet in unterschiedlichen Mikroorganismen mit vollkommen verschiedenen Mechanismen für sowohl Katalyse als auch Cofaktorregenerierung.

Dass ein entkoppelter Cofaktorpool Biotransformationen ermöglichen kann, die ansonsten nicht ablaufen würden, haben Voss und Mitarbeiter am Beispiel einer Racemattrennung bei sekundären Alkoholen gezeigt [Voss *et al.* 2008].

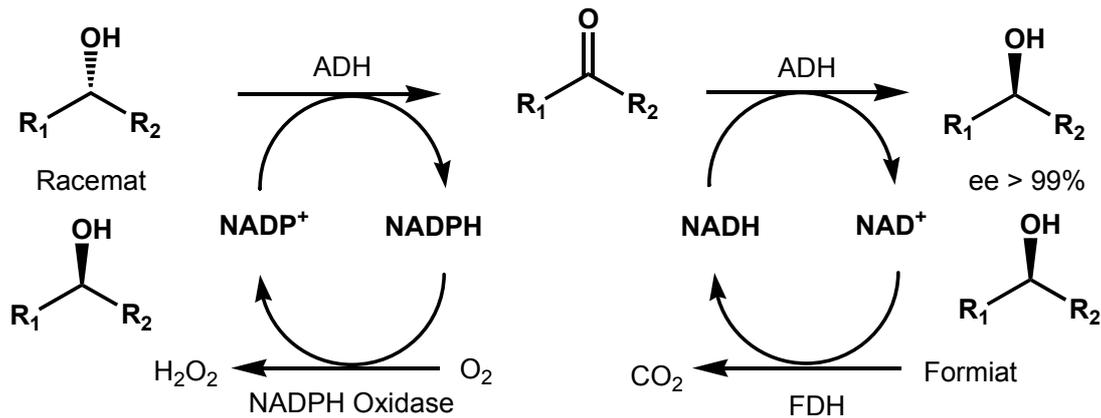


Abbildung 1.7: Racemattrennung von sekundären Alkoholen über eine Entkopplung der Cofaktorpools der Enzyme für Oxidation und Reduktion

Enantioselektive Oxidation des (*S*)-Alkohols mit einer NADP-abhängigen ADH und stereoselektive Reduktion des resultierenden Ketons mit einer NAD-abhängigen ADH entgegengesetzter Enantioselektivität wurden als Eintopfreaktion durchgeführt. Gleichzeitig fand eine enzymgekoppelte Regenerierung der beteiligten Cofaktoren statt. Der (*R*)-Alkohol des Racemats blieb unverändert. Ausbeute und Enantiomerenüberschuss des gewünschten Produktalkohols lagen bei jeweils >99%. Das war nur möglich, weil die thermodynamische Triebkraft für Reduktion und Oxidation wegen der unterschiedlichen Cofaktorpräferenz durch zwei getrennte Regenerationsreaktionen bereitgestellt werden konnte.

1.3. Schlussfolgerungen: Produktion von Vitamin C

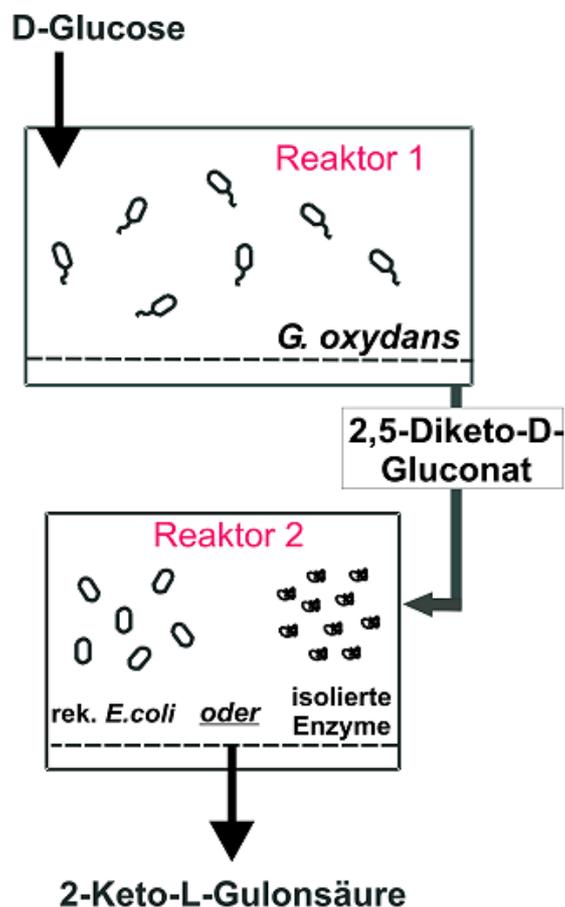
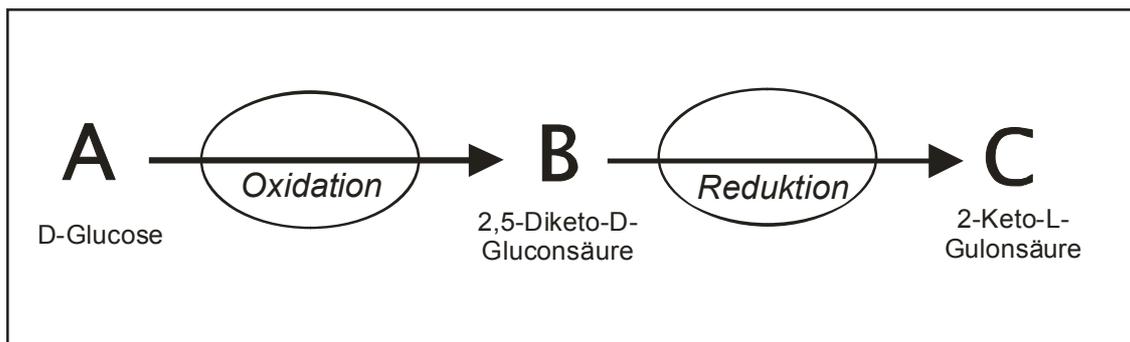
Ein biotechnologisches Verfahren, das Vitamin C beziehungsweise dessen Vorläufer 2-KLG in hoher Ausbeute produziert, ist kommerziell sehr gefragt. Auch wissenschaftlich ist es sehr interessant, zum einen wegen der zugrunde liegenden thermodynamischen Fragestellung, zum anderen wegen der unterschiedlichen verwendbaren Biokatalysatoren und reaktionstechnischen Ansätze. Wie in den vorherigen Abschnitten erläutert wurde, müssen erfolgversprechende Ansätze folgende Voraussetzungen erfüllen:

- Glucose eignet sich am besten als Ausgangssubstrat: Es ist günstig und am besten verfügbar.

- Oxidation und Reduktion sollten in zwei unterschiedlichen Organismen ablaufen. Zwar existieren gentechnisch veränderte Bakterienstämme, die aus Glucose in einem Schritt 2-KLG produzieren. Die Ausbeuten stagnieren jedoch bei rund 50%. Die thermodynamische Triebkraft ist bei solchen „Kombinationsstämmen“ nicht hoch genug (siehe 1.2.3.2 sowie 1.2.3.3).
- Oxidation und eine sich anschließende Reduktion sollten in zwei voneinander getrennten Reaktionsräumen (Reaktoren) stattfinden. Nur so können die optimalen Bedingungen für die jeweilige Reaktion eingestellt werden, um die Ausbeute zu maximieren (siehe 1.2.3.1).
- 2,5-DKG ist ein relativ instabiles Zwischenprodukt. Es kann nur unter starkem Ausbeuteverlust isoliert werden. Der Zeitraum zwischen seiner Entstehung und seiner Weiterreaktion sollte möglichst gering gehalten werden.

Kapitel 2: Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, einen biotechnologischen Prozess zu entwickeln, mit dem kontinuierlich die Vitamin-C-Vorstufe 2-KLG aus Glucose produziert werden kann. Die Umsetzung gliedert sich in zwei Schritte: die dreifache Oxidation von Glucose zu 2,5-Diketo-D-gluconat und die anschließende Reduktion dieser Verbindung zu 2-Keto-L-Gulonsäure.



Für den oxidativen Schritt werden *Gluconobacter oxydans*-Zellen eingesetzt, für den zweiten Schritt isolierte Enzyme (2,5-Diketo-D-Gluconat-reduktase und ein Enzym zur Cofaktorregenerierung) oder rekombinante *E. coli*-Zellen, die beide Enzyme exprimieren.

Oxidation und Reduktion sollen in zwei separaten Reaktorsystemen stattfinden, da so für jeden Reaktionsschritt optimale Bedingungen geschaffen werden können. 2,5-DKG soll ohne Aufreinigung von Reaktor 1 in Reaktor 2 geleitet werden.

Abbildung 2.1: Kaskade von zwei Reaktoren zur Produktion von 2-KLG

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit lässt sich folgendermaßen zusammenfassen:

Oxidative Umsetzung von Glucose zu 2,5-DKG:

- Gewinnung des Biokatalysators: Optimierung des Zellwachstums
- Charakterisierung des Biokatalysators und Optimierung der Reaktionsbedingungen im Satzreaktor, Untersuchung der Reaktionskinetik
- Kontinuierliche Produktion von 2,5-DKG aus Glucose: Reaktordesign, Optimierung der Prozessparameter

Reduktive Umsetzung von 2,5-DKG zu 2-KLG:

- Klonieren eines Plasmids mit Genen für die 2,5-Diketo-D-Gluconat-reduktase und für ein Enzym zur Cofaktorregenerierung
- Gewinnung des Enzyms 2,5-Diketo-D-Gluconatreduktase
- Charakterisierung des Biokatalysators (Enzym und/oder rekombinante *E. coli*-Zellen) und Optimierung der Reaktionsbedingungen im Satzreaktor, Untersuchung der Reaktionskinetiken
- Kontinuierliche Produktion von 2-KLG aus 2,5-DKG: Reaktordesign, Optimierung der Prozessparameter
- Wahl des am besten geeigneten Biokatalysators für die kontinuierliche Umsetzung von 2,5-DKG zu 2-KLG

Produktion von 2-KLG aus Glucose:

- Kopplung beider Reaktorsysteme zu einer Reaktorkaskade, Erreichen möglichst guter Prozessparameter durch geeignete Reaktionsführung
- Aufreinigung des Produktes 2-KLG

Kapitel 3: Produktion von 2,5-Diketo-D-Gluconat mit *Gluconobacter oxydans*

3.1. Einleitung: Der Organismus *Gluconobacter oxydans*

3.1.1 Taxonomie, Vorkommen und industrielle Nutzung

Gluconobacter oxydans ist ein Gram-negatives, obligat aerobes Bakterium aus der Familie der Essigsäurebakterien (*Acetobacteraceae*). Die Gattung *Gluconobacter* trug früher den Namen *Acetobacter oxydans* [Gupta *et al.* 2001].

Die stäbchenförmigen Zellen (Abbildung 3.1) sind zwischen 0,6 x 0,8 µm und 1,5 x 2,0 µm groß und besitzen drei bis acht polare Flagellen; es gibt auch unbewegliche Zellen [Lusta *et al.* 1998]. *Gluconobacter oxydans* lebt auf Früchten und Blüten sowie in Bier und Wein.

Der Organismus zeichnet sich durch eine enorme Säuretoleranz aus: Er wächst auch unterhalb von pH 3,7, in einigen Fällen sogar bei pH 2,5 [Deppenmeier *et al.* 2002]. Die Bakterien verursachen Obstfäule bei Äpfeln und Birnen, sind aber nicht pathogen für Menschen und Tiere. Alle *Gluconobacter oxydans*-Stämme sind von Natur aus resistent gegen das Antibiotikum Cefoxitin.

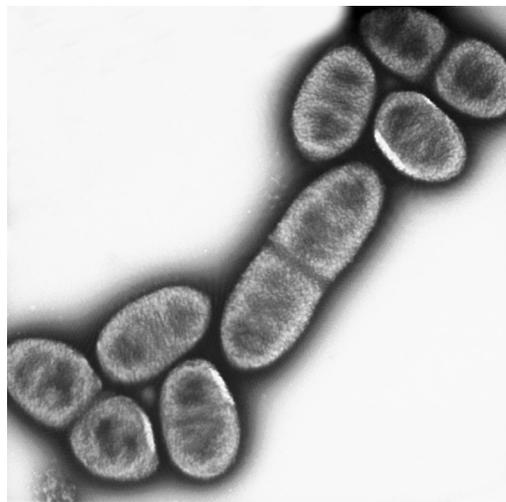


Abbildung 3.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Gluconobacter oxydans* (mit freundlicher Genehmigung von Michael Hoppert und Armin Ehrenreich, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität Göttingen)

Alle Mitglieder der Familie der Essigsäurebakterien oxidieren eine große Bandbreite von Kohlenhydraten und Alkoholen. Die Oxidation verläuft dabei unvollständig, also nicht wie bei anderen aeroben Mikroorganismen bis hin zu CO₂ und Wasser. Stattdessen

entstehen beispielsweise Ketone und organische Säuren – für die Industrie interessante Produkte. Diese Verbindungen werden beinahe vollständig ins Medium abgegeben, was die Aufarbeitung stark vereinfacht. *Gluconobacter oxydans* wird industriell zur biotechnologischen Produktion von beispielsweise Gluconsäure und Dihydroxyaceton eingesetzt. Auch finden die Zellen Anwendung bei der Produktion von 2-Keto-L-Gulonsäure aus Sorbitol (Abschnitt 1.2.2) und werden in Biosensoren genutzt, um Ethanol, Xylose oder andere Zucker zu detektieren.

3.1.2 Stoffwechselphysiologie

Gluconobacter oxydans wird in der Literatur als „Stoffwechselkrüppel“ bezeichnet [Kulhanek 1989]: Ihm fehlen zwei essentielle Enzyme des Citratzyklus (Succinyl-CoA-Synthetase und Succinat-Dehydrogenase) sowie die Phosphofruktokinase der Glykolyse. Beide Stoffwechselwege kann der Organismus daher nicht nutzen. Im Gegensatz zu anderen Essigsäurebakterien kann *Gluconobacter* auch weder Ethanol noch Acetat oder Lactat zu CO₂ oxidieren.

Zwei Wege der Energiegewinnung stehen *Gluconobacter oxydans* zur Verfügung: der Pentosephosphatweg sowie die direkte Oxidation von zahlreichen Substraten über membrangebundene Enzyme. Sämtliches CO₂, das die Zellen abgeben, stammt aus dem Pentosephosphatweg [Kitos *et al.* 1958].

3.1.2.1 Glucoseoxidation über den Pentosephosphatweg

Gluconobacter oxydans nimmt Glucose über spezielle Transporter in die Zelle auf. Dort wird die Verbindung von einer NADP⁺-abhängigen Glucosedehydrogenase im Cytoplasma zu Gluconat oxidiert. Dieses wird anschließend phosphoryliert und über den Pentosephosphatweg verstoffwechselt [Matsushita *et al.* 1994].

Im oxidativen Teil des Pentosephosphatweges entsteht unter CO₂-Abspaltung der C₅-Zucker Ribulose-5-Phosphat und NADPH; im daran anschließenden reversiblen Teil wird die entstandene Pentose zu C₃-, C₄- und C₇-Metaboliten umgewandelt.

Gluconobacter oxydans kann auch Gluconat, welches außerhalb der Zelle durch direkte Oxidation entstanden ist (siehe 3.1.2.2), in die Zelle transportieren und in den Pentosephosphatweg einschleusen [Matsushita *et al.* 1994].

3.1.2.2 Glucoseoxidation über membrangebundene Enzyme

Der so genannte direkte oxidative Weg zur Umsetzung von Glucose umfasst die Oxidation durch membrangebundene Dehydrogenasen. Diese befinden sich an der cytoplasmatischen Membran und sind an die Atmungskette gekoppelt. Ihre aktiven Zentren zeigen ins Periplasma, so dass die Substrate nur die äußere Zellmembran durchqueren müssen. Die Oxidationsprodukte werden über porenformende Transmembranproteine ins Medium abgegeben [Deppenmeier *et al.* 2002]. Diese Reaktionen versorgen *Gluconobacter oxydans*-Zellen mit Energie, vor allem in der stationären Wachstumsphase; um sich zu vermehren, muss der Organismus jedoch zusätzlich den Pentosephosphatweg nutzen [Lusta *et al.* 1998].

Gluconobacter oxydans besitzt drei membrangebundene Enzyme, die für die Verstoffwechslung von Glucose wichtig sind: die D-Glucosedehydrogenase (GDH), die D-Gluconatdehydrogenase (GADH) und die 2-Keto-D-Gluconatdehydrogenase (2-KGADH). Diese oxidieren Glucose nacheinander zu D-Gluconat, 2-Keto-D-Gluconat (2-KG) und 2,5-Diketo-D-Gluconat (2,5-DKG) (Abbildung 3.2).

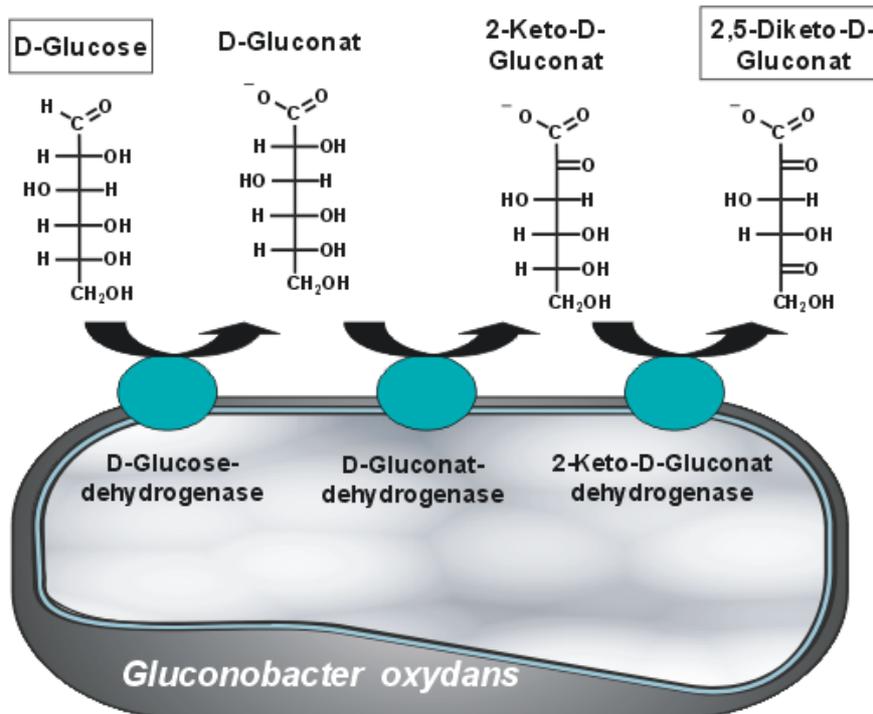
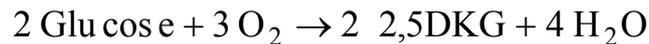


Abbildung 3.2: Oxidation von Glucose durch membrangebundene Enzyme zu 2,5-DKG

Die GDH enthält die prostetische Gruppe Pyrrolochinolinchinon (PQQ). GADH sowie 2-KGADH nutzen Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) und Cytochrom C für den Wasserstoff- und Elektronenübertrag. Da die Enzyme an die Atmungskette gekoppelt sind, werden die Coenzyme letztendlich über Sauerstoff regeneriert. Die gesamte Reaktion ist stark sauerstoffabhängig: Für die Oxidation von zwei Mol Glucose werden drei Mol Sauerstoff benötigt:



Freiwerdende Elektronen werden auf die Atmungskette und schließlich auf Sauerstoff übertragen. Der Elektronentransfer erzeugt einen elektrochemischen Protonengradienten über die Cytoplasmamembran. Das Membranpotential treibt die Bildung von ATP an. Jedoch sind die Verhältnisse zwischen Protonen und Elektronen sehr gering (0,5 bis 1). Der größte Teil der Energie geht somit als Wärme verloren [Deppenmeier *et al.* 2002]. Diese ineffiziente Kopplung zwischen Elektronentransfer und Protonentranslokation ist laut Literatur möglicherweise der Grund für die geringen Wachstumsraten (siehe 3.2).

Pronk *et al.* haben die Aktivitäten der membrangebundenen und der intrazellulären Glucosedehydrogenasen in Zellextrakten untersucht: Die PQQ-abhängige GDH war dabei etwa 27 mal aktiver als die NADP-abhängige im Cytoplasma der Zelle [Pronk *et al.* 1989].

Aus D-Gluconat kann mit Hilfe einer membrangebundenen PQQ-abhängigen D-Gluconat-5-Dehydrogenase auch die Verbindung 5-Keto-D-Gluconat (5-KG) entstehen. Dieses wird jedoch im Gegensatz zu 2-KG nicht zu 2,5-DKG weiteroxidiert [Qazi *et al.* 1991].

3.1.3 Einsatz von *Gluconobacter oxydans* im Rahmen dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Doktorarbeit kommt der *Gluconobacter oxydans*-Stamm NCIMB 8084 zum Einsatz. Dieser Wildtyp oxidiert Glucose mit Hilfe von membrangebundenen Enzymen bis zum 2,5-DKG [Elfari *et al.* 2005]. In der Literatur wird dieser Stamm mehrfach unter anderen Bezeichnungen erwähnt wie ATCC 9937 oder NBIMCC 1043 [Silberbach 2001].

Für die Produktion sollen ruhende Zellen von *Gluconobacter oxydans* eingesetzt werden, das bedeutet, dass die Zellen zunächst in einer Fermentation herangezogen

werden, die auf optimales Wachstum der Zellen ausgerichtet ist. Die Biotransformation mit den ruhenden Zellen schließt sich dann an (Abbildung 3.3).

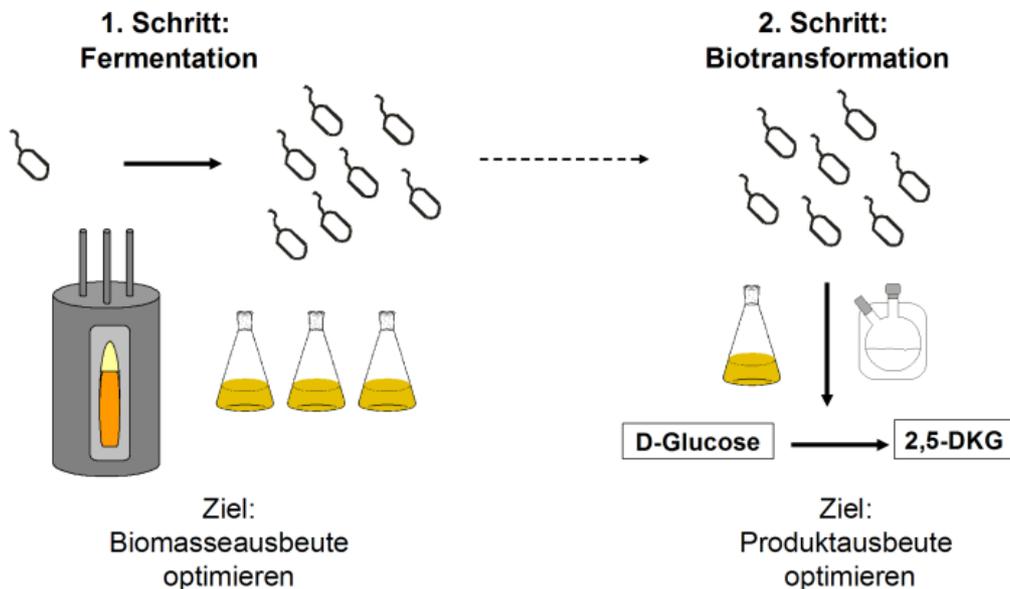


Abbildung 3.3: Entkopplung von Wachstum und Produktion (Biotransformation) bei *Gluconobacter oxydans*-Zellen

Eine Entkopplung von Wachstum und Produktion ist bei *Gluconobacter oxydans* selten, aber nicht völlig neu: Bei der Produktion von Dihydroxyaceton aus Glycerin ist es sogar die bevorzugte Vorgehensweise [Yamada *et al.* 1979]. Auch für die Oxidation von Glucose zu 5-KG wurde das Verfahren bereits erfolgreich eingesetzt [Elfari *et al.* 2005, Herrmann *et al.* 2004].

Die Entkopplung von Wachstum und Produktion bietet mehrere Vorteile:

- Wachstum und Biotransformation können separat optimiert werden. Glucose dient gleichzeitig als C-Quelle für das Biomassewachstum und als Substrat zur Gewinnung des Produktes 2,5-DKG. Die beiden Wege konkurrieren miteinander. Sie separat zu untersuchen und zu optimieren, sollte daher sowohl die Biomasseausbeute als auch die Produktausbeute steigern.
- *Gluconobacter* benötigt Hefeextrakt, um zu wachsen. Hefeextrakt stört jedoch die HPLC-Analytik, mit der die Bildung von 2,5-DKG nachgewiesen wird. Eine Entkopplung löst das Problem.
- Bei der Produktion können höhere Zelldichten eingesetzt werden. Hohe Biomassekonzentrationen von beispielsweise 10% wären sonst unmöglich, da *Gluconobacter oxydans* nur geringes Wachstum zeigt. Durch den Einsatz

vorproduzierter ruhender Zellen kann die Katalysator-Beladung des Reaktors und damit die Produktivität erhöht werden, was die Versuchsdauer verkürzt. Das ist von Vorteil, da das Endprodukt 2,5-DKG relativ instabil ist und schon während der Biotransformation zerfällt, wenn diese zu lange dauert.

- Die Aktivität von Dehydrogenasen in ruhenden Zellen kann größer sein als in einer wachsenden Kultur [Lusta *et al.* 1998]. Beobachtet wurde das beispielsweise bei der Oxidation von Sorbose zu Sorboson. Die Bildungsrate von Ketonen steigt nachweislich in der Phase der Wachstumslimitierung [Claus *et al.* 1975]: Dann bilden sich so genannte intrazytoplasmatische Membranen in den Zellen und die Zahl der membrangebundenen Dehydrogenasen (auch der drei in dieser Arbeit relevanten Enzyme) steigt.

3.2. Gewinnung des Biokatalysators²

Gewöhnlich wird *Gluconobacter oxydans* in Medien herangezogen, die hohe Zucker- oder Polyol-Konzentrationen enthalten sowie Hefeextrakt [Deppenmeier *et al.* 2002]. Hefeextrakt oder ein ähnliches komplexes Supplement ist für das Wachstum der meisten *Gluconobacter oxydans*-Stämme unbedingt erforderlich, da sie Wachstumsfaktoren wie Thiamin oder Pantothensäure benötigen [Gossele *et al.* 1980]. Geeignete Minimalmedien für diesen Organismus sind in der Literatur so gut wie nicht beschrieben. Temperaturen von 25 bis 30°C sowie pH-Werte von 5,5 bis 6 sind für das Wachstum optimal [Deppenmeier *et al.* 2002].

Charakteristisch für den Mikroorganismus ist sein langsames Wachstum selbst in der Anwesenheit aller benötigten Nährstoffe: Es werden stets nur geringe Mengen an Biomasse produziert [Deppenmeier *et al.* 2002, Lusta *et al.* 1998]. Eine der höchsten Biomasseausbeuten erreichten White *et al.* in einem Sorbitol-Medium: Die *Gluconobacter oxydans*-Zellkonzentration betrug $6 \cdot 10^9$ Zellen pro Milliliter, was einer OD von etwa 9,4 entspricht [White *et al.* 1982].

Aufgrund der natürlichen Resistenz aller *Gluconobacter oxydans*-Stämme gegen Cefoxitin wird das Antibiotikum bei allen Fermentationen zugesetzt. So kann verhindert werden, dass die Kultur mit Fremdbakterien kontaminiert wird.

Na-Succinat diente in den folgenden Fermentationen als Puffersubstanz.

² Teile der Ergebnisse sind aus der Diplomarbeit von Roman Bucerius (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2008) [Bucerius 2008]

3.2.1 Optimierung des Wachstums im Schüttelkolben

Zunächst wurde das Zellwachstum in schikanenfreien Schüttelkolben optimiert: in Medien mit verschiedenen Kohlenstoffquellen (Mannitol, Glucose, Glycerin) und mit unterschiedlichen Hefeextraktgehalten.

Das Wachstum von Mikroorganismen in unterschiedlichen Nährmedien lässt sich über die spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten μ miteinander vergleichen. μ kann über die optische Dichte einer Kultur zu zwei verschiedenen Zeitpunkten berechnet werden:

$$\mu = \frac{\ln OD - \ln OD_0}{t}$$

μ : spezifische Wachstumsgeschwindigkeit [h^{-1}]
 OD: Optische Dichte zum Zeitpunkt t_n
 OD₀: Optische Dichte zum Zeitpunkt t_0
 t: Zeit [h]

Formel 3.1: Berechnung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit μ

μ ändert sich im Laufe der Fermentation. Voraussetzung für eine Vergleichbarkeit ist daher, dass bei allen Kulturen μ während der gleichen Wachstumsphase bestimmt wird. Das war in den folgenden Versuchen stets die exponentielle Wachstumsphase.

3.2.1.1 Einfluss des Hefeextraktgehaltes

Tabelle 3.1 zeigt, welchen Einfluss der Gehalt an Hefeextrakt auf das Wachstumsverhalten hat (bei gleicher Kohlenstoffquelle = 10 g/L Glucose).

Tabelle 3.1: Einfluss des Hefeextraktgehaltes auf das Wachstum von *G. oxydans*. Sonstige Medienzusammensetzung: 10 g/L Glucose, 27 g/L Na-Succinat, 0,25 g/L MgSO₄

Hefeextrakt [g/L]	μ [h^{-1}]	maximal erreichte OD (nach 23 Stunden)
2	0,27	1,65
5	0,32	1,85
10	0,38	1,85

Die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ steigt mit Erhöhung des Hefeextraktgehaltes leicht an. Die maximal erreichbare OD lässt sich durch Erhöhung der Konzentration von 2 auf 5 g/L steigern, bleibt jedoch bei weiterer Erhöhung auf 10 g/L konstant.

Hefeextrakt stört die HPLC-Analytik, und seine Konzentration in den verwendeten Medien sollte stets möglichst gering sein. Eine Konzentration von 5 g/L ist für Fermentationen im Rahmen dieser Arbeit daher optimal.

3.2.1.2 Einfluss der Kohlenstoffquelle(n)

Medium	C-Quelle(n)
A	50 g/L D-Mannitol
B	5 g/L D-Glucose · H ₂ O 25 g/L D-Mannitol
C	5 g/L D-Glucose · H ₂ O 5 g/L Glycerin 25 g/L D-Mannitol
D	10 g/L D-Glucose · H ₂ O 5 g/L Glycerin
E	10 g/L D-Glucose · H ₂ O
F	25 g/L D-Glucose · H ₂ O

Mannitol und Glucose kamen jeweils als alleinige oder miteinander kombinierte Kohlenstoffquellen zum Einsatz. Außerdem wurde Glycerin als zusätzliche C-Quelle untersucht. Zwei unterschiedliche Glucosekonzentrationen wurden getestet (10 g/L und 25 g/L) (Tabelle 3.2)

Tabelle 3.2: Kohlenstoffquellen der getesteten Medien

Die resultierenden Wachstumsverläufe zeigt Abbildung 3.4.

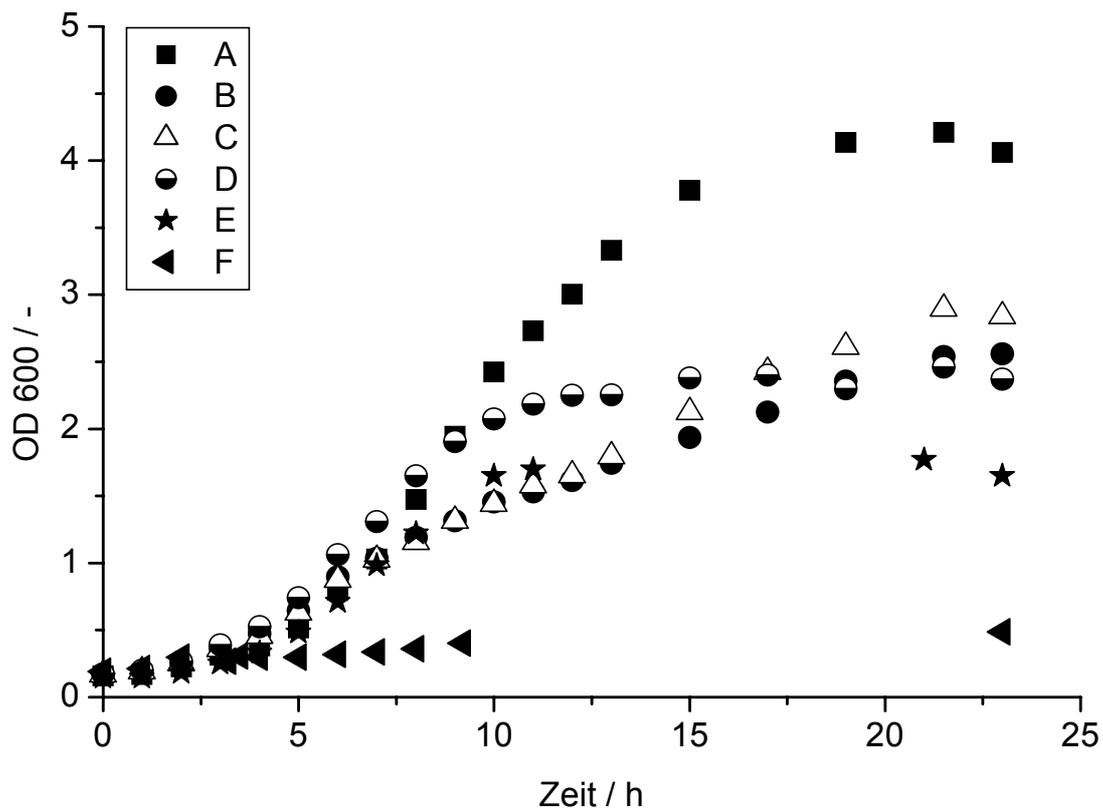


Abbildung 3.4: Wachstum von *Gluconobacter oxydans* NCIMB 8084 in unterschiedlichen Medien. Bedingungen: 30°C, 50 mL Medium in 500 mL schikanenfreien Schüttelkolben, 200 rpm. Siehe Tabelle 3.2.

Die spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten μ in den Nährmedien A-F sind in Tabelle 3.3 protokolliert, ebenso die optischen Dichten, die erreicht wurden.

Tabelle 3.3: Spezifische Wachstumsgeschwindigkeiten μ und maximal erreichte optische Dichten in verschiedenen Medien

Medium	C-Quelle	μ [h ⁻¹]	maximal erreichte OD
A	Mannitol	0,24	4,21
B	Mannitol + Glucose	0,09	2,56
C	Mannitol + Glucose + Glycerin	0,09	2,90
D	Glucose + Glycerin	0,27	2,46
E	Glucose 10 g/L	0,31	1,77
F	Glucose 25 g/L	0,07	0,49

Deutlich erkennbar wuchs *Gluconobacter oxydans* im Medium mit Mannitol als alleiniger Kohlenstoffquelle (Medium A) zu deutlich höherer optischer Dichte heran als in allen übrigen getesteten Medien, nämlich zu einer OD von 4,21. Laut Literatur ist Mannitol auch die Kohlenstoffquelle, auf der *Gluconobacter oxydans* am besten wächst [De Ley *et al.* 1984].

Kombinierte Mannitol-/Glucose-Medien (Medien B, C) hingegen führten zu deutlich geringeren spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten und geringeren optischen Dichten. Die Kulturen in solchen kombinierten Medien erreichten gegen Ende der Kultivierung eine optische Dichte von 2,56 bzw. 2,9. Diese Werte liegen nur knapp über der optischen Dichte, die auch in mannitolfreien Medien erreicht wurden (Medien D, E). Demzufolge bringt es für das Wachstum der Kultur keinerlei Vorteile, Mannitol mit Glucose als Kohlenstoffquelle zu kombinieren. Das bestätigen auch frühere Arbeiten zu dieser Fragestellung [Silberbach 2001].

Die höchste spezifische Wachstumsgeschwindigkeit wurde in einem Medium mit Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle erreicht (Medium E). Jedoch ist die Biomasseausbeute hier geringer: Die Kultur wächst nur zu einer sehr geringen optischen Dichte von 1,77 heran. Durch die Zugabe von Glycerin als zweiter C-Quelle kann dieser Wert aber auf 2,46 gesteigert werden (Medium D). Glucose mit Glycerin als Kohlenstoffquellen zu kombinieren, ist also durchaus vorteilhaft, wie auch die Literatur bestätigt: *Gluconobacter* kann Glycerin zu Dihydroxyaceton oxidieren. Dieses kann in die Zelle aufgenommen und in den Pentosephosphatzyklus eingeschleust werden, was die Biomassebildung fördert [Ohrem 1995].

3.2. Gewinnung des Biokatalysators

So gut wie gar kein Wachstum zeigte *Gluconobacter oxydans* in einem Medium mit einer Glucosekonzentration von 25 g/L. Hohe Glucosekonzentrationen müssen bei der Anzucht der Zellen unbedingt vermieden werden, da sie das Wachstum hemmen. Dieses Phänomen wurde bereits früher beschrieben [Velizarov *et al.* 1994b, Velizarov *et al.* 1998], jedoch wurde eine solche Hemmung meist erst bei höheren Glucosekonzentrationen (ab etwa 90 g/L) beobachtet.

Der Grund für die Wachstumshemmung ist laut Literatur der höhere K_M -Wert der membrangebundenen Glucosedehydrogenase (13 mM, [Träger *et al.* 1992]) im Vergleich zum Glucosetransporter (0,05 mM, [Pronk *et al.* 1989]): Bei niedrigeren Glucosekonzentrationen wird Glucose eher in die Zellen aufgenommen und im Pentosephosphatweg verstoffwechselt – dann kann auch eine hohe Zellmassebildung erfolgen. Je höher die extrazelluläre Glucosekonzentration ist, desto aktiver ist die direkte Oxidation durch membrangebundene Enzyme. Für die Fermentation von *Gluconobacter oxydans* ist somit eine Kultivierung unter Zulaufverfahren besonders gut geeignet, bei der Glucose nach und nach hinzugegeben wird.

3.2.1.3 Einfluss des Mediums auf die spätere Aktivität der Zellen

Die Zellen sollten nach ihrer Anzucht möglichst aktiv sein, also Glucose schnell und in hoher Ausbeute zu 2,5-DKG oxidieren. Daher wurden die in den Medien A-E angezogenen Zellen nach dem Ernten auf ihre Aktivität hin getestet. Der Aktivitätstest ist ausführlich in Abschnitt 8.9.1 beschrieben.

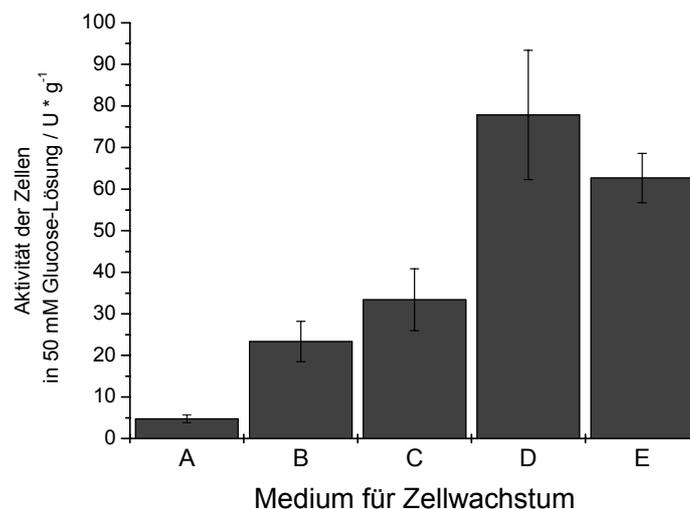


Abbildung 3.5: Aktivität der in unterschiedlichen Medien angezogenen *Gluconobacter oxydans*-Zellen. Bedingungen: 50 mM Glucose, 100 mM Na-Acetat pH5, 25°C, 8 g_{BFG}/L *G. oxydans* NCIMB 8084, Sauerstoffbegasung 10-20 L/h. Medienzusammensetzung siehe Tabelle 3.2. Die Aktivität ist definiert als die Bildungsrate von 2,5-DKG über die Zeit.

In früheren Arbeiten fand sich die Empfehlung, *Gluconobacter oxydans*-Zellen zunächst in Mannitol anzuziehen, um sie als ruhende Zellen für die Oxidation von Glucose einzusetzen [Silberbach 2001]. Das ist eindeutig unvorteilhaft, denn offensichtlich sind Zellen, die in Medium A mit Mannitol als alleiniger Kohlenstoffquelle herangezogen wurden, für eine nachfolgende Oxidation von Glucose zu 2,5-DKG ungeeignet: Ihre Aktivität ist äußerst gering. Vermutlich exprimiert *Gluconobacter oxydans* die membrangebundene Glucosedehydrogenase, die er für die Oxidation der Glucose braucht, in nur sehr geringem Maße, wenn er in glucosefreiem Medium heranwächst. In der Literatur ist dieses Phänomen bisher nicht beschrieben.

Die Aktivität der Zellen, die in kombinierten Medien mit zwei oder drei C-Quellen herangezogen wurden (Medien B, C), ist entsprechend höher, jedoch geringer als in den mannitolfreien Medien D und E. Vermutlich verwertet *Gluconobacter oxydans* Mannitol bevorzugt und bildet die Glucosedehydrogenase daher auch hier in geringerem Maße aus.

Die höchsten Aktivitäten (78 bzw. 63 U/g_{BFG}) erreichen die Zellen aus den mannitolfreien Medien D und E. Die Aktivität der Zellen aus Medium D (Glucose und Glycerin als C-Quelle) ist dabei noch etwas höher, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

3.2.1.4 Optimales Medium für die Anzucht im Schüttelkolben

In Medien mit Mannitol als alleiniger C-Quelle wächst *Gluconobacter oxydans* zwar zu hoher optischer Dichte heran, die spätere Aktivität der Zellen ist jedoch äußerst gering. Mit Glucose und Glycerin als C-Quellen werden zwar geringere optische Dichten erreicht, die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit ist jedoch hoch und insbesondere die Aktivität der Zellen hervorragend. Glucosekonzentrationen von mehr als 20 g/L sind unbedingt zu vermeiden, da sie das Wachstum hemmen.

Tabelle 3.4: Zusammenfassung: Spezifische Wachstumsgeschwindigkeiten μ , maximal erreichte optische Dichten und resultierende Zellaktivitäten

Medium	C-Quelle	μ [h ⁻¹]	maximal erreichte OD	Aktivität [U/g]
A	Mannitol	0,24	4,21	4,73
B	Mannitol + Glucose	0,09	2,56	23,3
C	Mannitol + Glucose + Glycerin	0,09	2,90	33,4
D	Glucose + Glycerin	0,27	2,46	77,9
E	Glucose 10 g/L	0,31	1,77	62,7
F	Glucose 25 g/L	0,07	0,49	n.d.

3.2. Gewinnung des Biokatalysators

Für die Anzucht von *G. oxydans* eignet sich daher am besten folgendes Medium:

- | | | |
|--------------------------------|-----------------------|----------------------|
| • D-Glucose: 10 g/L | • Glycerin: 5 g/L | • Hefeextrakt: 5 g/L |
| • MgSO ₄ : 0,25 g/L | • Na-Succinat: 27 g/L | |

3.2.2 Optimierung des Wachstums in Parallelf fermentern

Die Anzucht von *G. oxydans* in Fermentern bietet den Vorteil, dass Glucose im Zulaufverfahren zudosiert und damit auf einer geringen Konzentration gehalten werden kann. Wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, hemmen hohe Glucosekonzentrationen das Wachstum. Auch kann der Sauerstoffpartialdruck im Medium deutlich erhöht werden. Eine gute Sauerstoffversorgung bei der Anzucht von *G. oxydans* erhöht die Oxidationsfähigkeit des Organismus über eine verstärkte Enzyminduktion [Sharma *et al.* 1992]. Da die Induktion der benötigten Enzyme bei Sauerstoffpartialdrücken von 30 % bereits maximal ist [Buse *et al.* 1992b], wurde dieser Wert in allen Fermentern eingestellt.

Die Glucosekonzentration zu Beginn der Fermentation lag bei 10 g/L. Nach sechs Stunden wurde Glucose aus einer Stammlösung zudosiert, die Menge der zugegebenen Glucoselösung unterschied sich jedoch von Fermenter zu Fermenter. Die Feedrate war nicht konstant und die resultierenden Glucosekonzentrationen der verschiedenen Medien schwankten stark; es wurde hinterher der Durchschnittswert der Glucosekonzentrationen im jeweiligen Fermenter über den gesamten Zeitraum der Fermentation errechnet. Das entsprechende Wachstumsverhalten zeigt Abbildung 3.6.

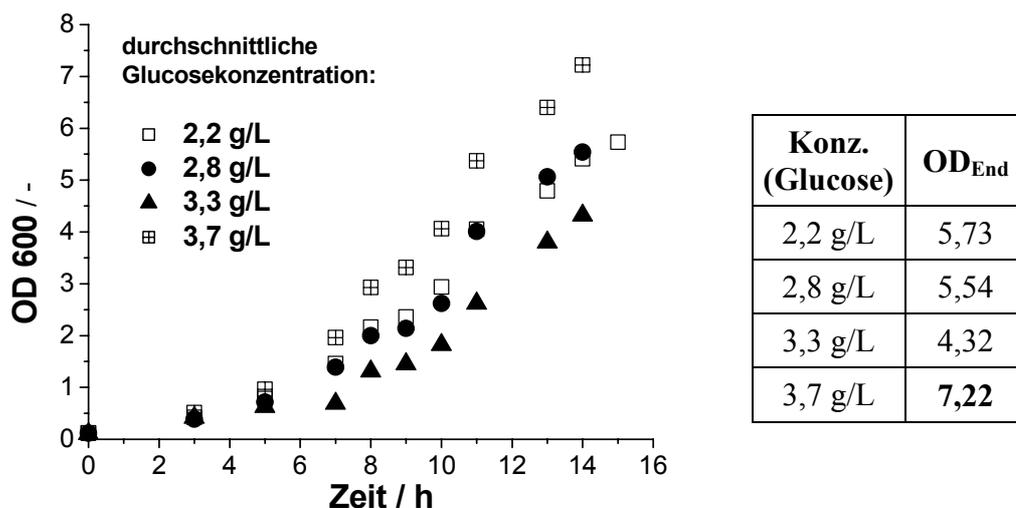


Abbildung 3.6: Wachstum von *Gluconobacter oxydans* in Parallelf fermentern mit unterschiedlichen mittleren Glucosekonzentrationen. Bedingungen: 30°C, pH6, pO₂=30%, Medium: 5g/L Hefeextrakt, 5g/L Glycerin, 0,25g/L MgSO₄, Glucose-Feed: Stammlösung: 600 g/L

Glucose wird dabei stets auch extrazellulär zu 2,5-DKG oxidiert, es reichert sich daher nach einiger Zeit 2,5-DKG im Medium an. Sein Zerfallsprodukt färbt das Medium braun [Bloemsma *et al.* 1963]. Sind die Zellen dem Zerfallsprodukt über einen längeren Zeitraum ausgesetzt, verringert sich ihre Aktivität (Vorversuche, nicht gezeigt). Da sich auch bei diesem Experiment die Medien zunehmend bräunlich verfärbten, wurden die Fermentationen abgebrochen, bevor die stationäre Phase des Wachstums erreicht war. Dennoch wurde eine deutlich höhere optische Dichte erreicht als im Schüttelkolben im vergleichbaren Medium (vgl. Abbildung 3.4): Die OD liegt hier zwischen 4,3 und 7,2. Ein möglicher Grund für das bessere Wachstum im Fermenter ist sicherlich die bessere Versorgung mit Sauerstoff, aber auch die geringeren Glucosekonzentrationen, die die intrazelluläre Oxidation der Glucose fördern.

Abbildung 3.7 zeigt die Aktivität der Zellen nach dem Ernten.

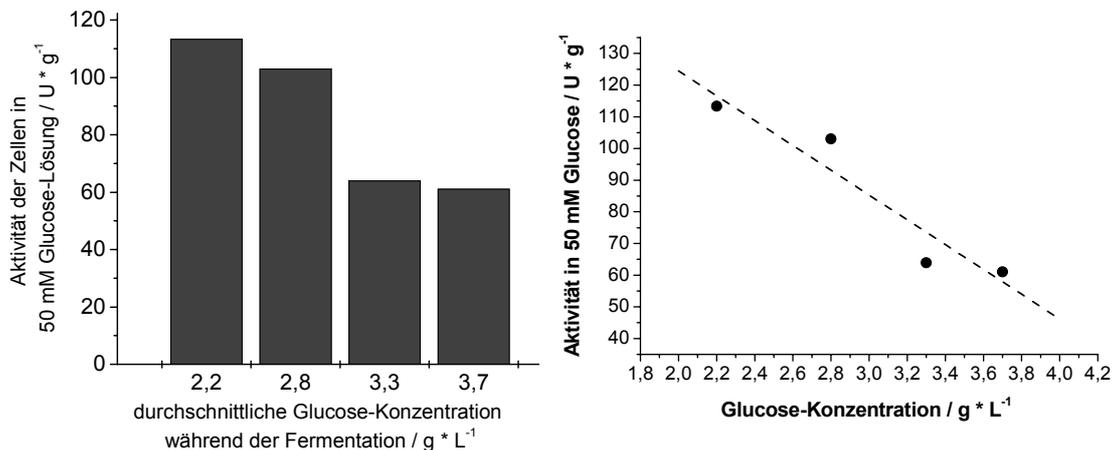


Abbildung 3.7: Einfluss der Glucosekonzentration während des Wachstums auf die spätere Aktivität in 50 mM Glucose-Lösung. Bedingungen: 50 mM Glucose, 100 mM Na-Acetat pH5, 25°C, 8 g_{BFG}/L *G. oxydans* NCIMB 8084, Sauerstoffbegasung 10-20 L/h.

Interessanterweise ist die spätere Aktivität der Zellen umso höher, je geringer die durchschnittliche Glucosekonzentration während der Fermentation war (Abbildung 3.7). Dieses Phänomen ist in der Literatur nicht beschrieben. Offensichtlich exprimiert *Gluconobacter* die membranständige Glucosedehydrogenase besonders stark, wenn nur sehr wenig Glucose im Medium vorhanden ist - möglicherweise um die nur spärlich vorhandene Energiequelle effektiv nutzen zu können. In Medien mit hoher Glucosekonzentration hingegen wird das Enzym in geringerem Maße exprimiert – in diesem Falle besteht für *Gluconobacter* ja auch kein Energiemangel. Eine andere mögliche Erklärung: In Medien mit geringer Glucosekonzentration nutzt *G. oxydans* vermehrt den intrazellulären Pentosephosphatweg zur Verstoffwechslung der Glucose,

weniger die direkte Oxidation. Bei geringerer Glucosekonzentration entsteht daher weniger extrazelluläres 2,5-DKG, dessen Zerfallsprodukt sich über einen bisher unbekanntem Weg negativ auf die Aktivität der Zellen auswirkt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Glucosekonzentration bei der Anzucht der Zellen eine zentrale Bedeutung zukommt. Eine hohe Glucosekonzentration (über 20 g/L) hemmt das Wachstum über eine Inhibierung des Pentosephosphatzyklus. Fehlt Glucose im Medium, ist die Aktivität der geernteten Zellen sehr gering, möglicherweise aufgrund einer fehlender Enzymexpression. Ideal sind möglichst geringe Glucosekonzentrationen während der Anzucht – hohe Konzentrationen verringern die Aktivität über einen noch unbekanntem Weg.

3.2.3 Fermentation des Biokatalysators im 20L-Maßstab

Um eine große Menge einheitlicher Zellen für die nachfolgenden Versuche zu generieren, wurde *G. oxydans* im 20-L-Maßstab kultiviert. Die anfängliche Glucosekonzentration betrug 10 g/L, nach dreieinhalb Stunden wurde mit der Zugabe von Glucoselösung begonnen. Die resultierende Glucosekonzentration im Medium wurde dabei stets unter 2 g/L gehalten, da hohe Glucosekonzentrationen während der Fermentation die spätere Aktivität der Zellen verringern (3.2.2).

Die Wachstumskurve und die Glucosekonzentrationen im Medium zeigt Abbildung 3.8.

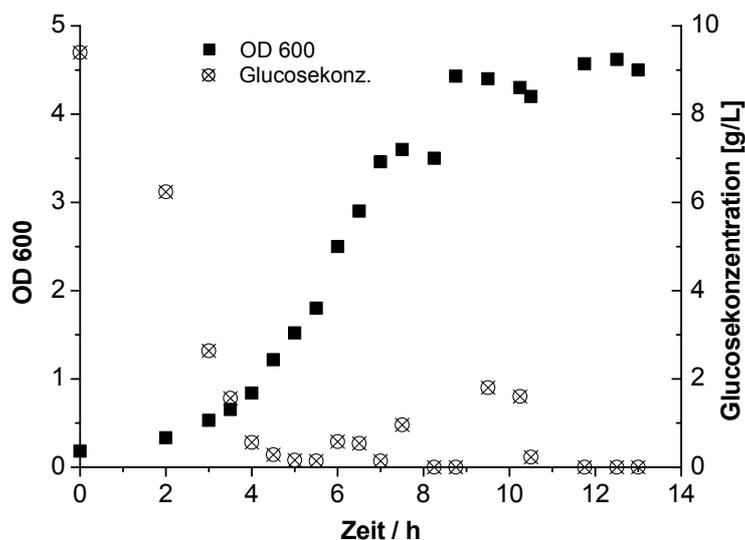


Abbildung 3.8: Verlauf der Fermentation von *G. oxydans* NCIMB 8084 im 20L-Maßstab. Bedingungen: 10 g/L Glucose, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L Glycerin, 0,25 g/L MgSO₄, Cefoxitin 50 µg/mL; Glucose-Feed 15-30 g/h ab t=3,5 h; 30°C; pH 6; pO₂=30%; V=20 L.

Die Zellen wurden geerntet, nachdem die stationäre Wachstumsphase erreicht wurde. Die Zellausbeute und die Aktivität der geernteten Zellen zeigt Tabelle 3.5.

Tabelle 3.5: Ergebnisse der 20-L-Fermentation von *G. oxydans* NCIMB 8084

Erreichte End-OD	4,6
Zellausbeute	82,4 g = 4,1 g/L
Aktivität	61,3 ± 0,84 U/g

3.2.4 Zusammenfassung: Wachstum

Gluconobacter oxydans zeigt relativ geringes Wachstum im Vergleich zu anderen Mikroorganismen. Jedoch lässt sich die Zellausbeute durch das richtige Medium und die richtigen Fermentationsbedingungen steigern. Vor allem aber kann durch optimierte Fermentationsbedingungen die Aktivität der Zellen stark erhöht werden.

Die Anzucht im Schüttelkolben ist problematisch, da *Gluconobacter* einen hohen Sauerstoffbedarf hat. Zudem sind möglichst geringe Glucosekonzentrationen während der gesamten Fermentationszeit ideal, hohe Glucosekonzentrationen hemmen das Wachstum und verringern die Aktivität der Zellen.

Die maximal erreichte optische Dichte im Rahmen dieser Arbeit war in einem glucosehaltigen Medium 7,2 – das ist zwar geringer als die Zellausbeute, die zuvor in einem sorbitolhaltigen Medium erreicht wurde (9,4, [White *et al.* 1982]). Jedoch machen die hohen Zellaktivitäten das wieder wett.

3.3. Charakterisierung des Biokatalysators im Satzreaktor

3.3.1 Einsatz von ruhenden Zellen

Nach ihrer Anzucht werden die Zellen bei -20°C gelagert, um sie später als ruhende Zellen für die Oxidation von Glucose einzusetzen. In Vorversuchen hat sich gezeigt, dass *Gluconobacter oxydans* eine zweimonatige Lagerung als Pellet bei -20°C gut verträgt: Die Aktivität ändert sich dadurch nicht signifikant.

Zuvor geerntete Zellen wurden in zwei verschiedenen Minimalmedien im Schüttelkolben inkubiert und auf ihre Oxidationsfähigkeit hin untersucht. Das stickstoffreiche Medium enthielt Difco Yeast Nitrogen Base, das phosphatreiche Medium M9-Salze (Zusammensetzungen siehe Abschnitt 8.3).

3.3. Charakterisierung des Biokatalysators im Satzreaktor

Abbildung 3.9 zeigt die jeweiligen Wachstumskurven. Da sich die Medien im Laufe der Zeit bräunlich verfärben und sich die optische Dichte dadurch erhöht, wurde jeweils auch die Extinktion des Mediums ohne Zellen bestimmt. Aus der Differenz der beiden Werte kann geschlossen werden, wann es tatsächlich zu einer Erhöhung der Zelldichte kam, also ein Wachstum stattfand. Das ist wichtig zu überprüfen, um sicher zu gehen, ob es sich auch wirklich um ruhende Zellen handelt.

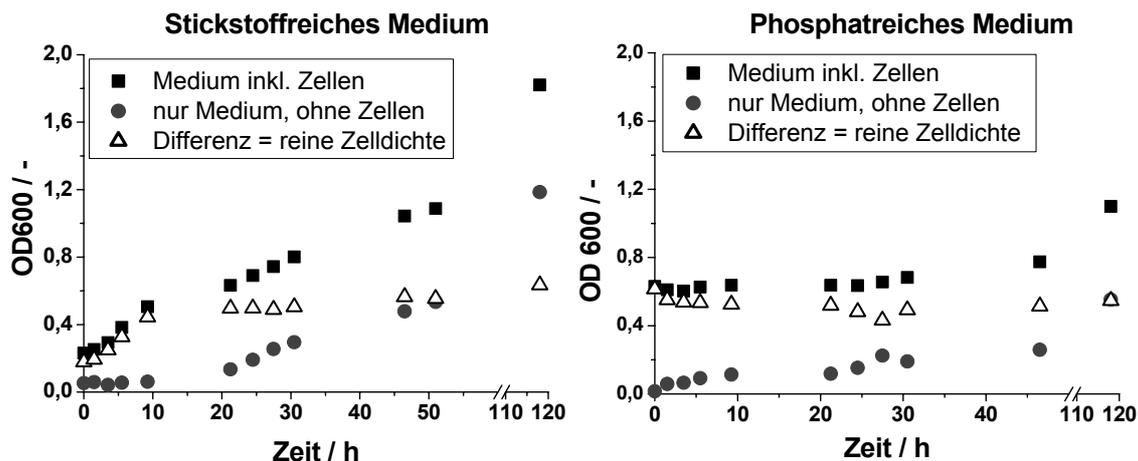


Abbildung 3.9: Einsatz von *G. oxydans* NCIMB als ruhende Zellen zur Produktion von 2,5-DKG, in stickstoffreichem Medium (links) und phosphatreichem Medium (rechts). Bedingungen: 30°C, 200 rpm, 50 mL Lösung in 500 mL schikanefreien Schüttelkolben, 3,2 g_{BFG} / L *G. oxydans* NCIMB 8084. Zusammensetzung stickstoffreiches Medium (links): 50 mM Glucose, 100 mM Na-Succinat, 6,7 g/L Difco Yeast Nitrogen Base. Phosphatreiches Medium (rechts): 50 mM Glucose, 100 mM Na-Succinat, 11,82 g/L M9-Salze (Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, NH₄Cl).

Im stickstoffreichen Medium wuchs *Gluconobacter oxydans* in den ersten zehn Stunden. Anschließend blieb die Zelldichte konstant, die optische Dichte des Mediums erhöhte sich jedoch stark. Im phosphatreichen Medium hingegen fand überhaupt kein Wachstum statt. Doch auch hier erhöhte sich die optische Dichte.

Wenn sich das zellfreie Medium dunkel färbt und seine optische Dichte steigt, ist das ein deutlicher Hinweis darauf, dass 2,5-DKG entstanden ist [Bloemsma *et al.* 1963]. Die Verbindung selbst ist zwar farblos, doch bei ihrer Zersetzung entstehen dunkle Zerfallsprodukte. Es liegt somit nahe, dass in beiden Ansätzen 2,5-DKG gebildet wurde. Die HPLC-Analyse bestätigte dies (Abbildung 3.10). Im phosphatreichen Medium fand kein Wachstum statt, dennoch produzierte *G. oxydans* 2,5-DKG. Es ist demnach möglich, Wachstum und Produktion von 2,5-DKG zu entkoppeln.

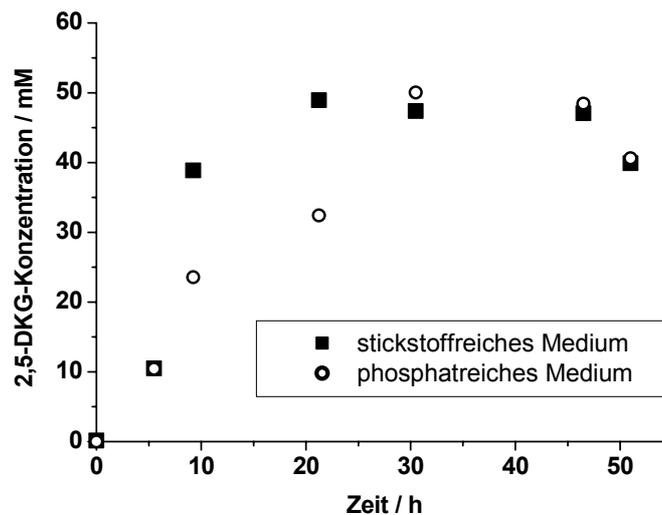


Abbildung 3.10: Produktion von 2,5-DKG durch ruhende Zellen *G. oxydans* NCIMB 8084.
 Bedingungen: 30°C, 200 rpm, 50 mL Lösung in 500 mL schikanefreien Schüttelkolben,
 3,2 g_{BFG} /L *G.oxydans* NCIMB 8084. Zusammensetzung definiertes Medium: 50 mM Glucose,
 100 mM Na-Succinat, 6,7 g/L Difco Yeast Nitrogen Base. Glucose-Medium: 50 mM Glucose, 100
 mM Na-Succinat, 11,82 g/L M9-Salze (Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, NH₄Cl).

3.3.2 Sauerstoffabhängigkeit der Biotransformation

Welchen Einfluss erhöhte Sauerstoffkonzentrationen auf die Oxidation von Glucose zu Ketogluconaten haben, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einige haben die Beobachtung gemacht, dass sich zu hohe Sauerstoffkonzentrationen negativ auf die Produktion auswirken [Buse *et al.* 1992b, Oosterhuis *et al.* 1985], andere berichten das genaue Gegenteil [Buse *et al.* 1992a, Buse *et al.* 1990, Qazi *et al.* 1993].

3.3.2.1 Limitierung im Schüttelkolben

Die Biotransformation wurde zunächst im Schüttelkolben mit zwei unterschiedlichen Biomassekonzentrationen (0,3 und 0,6% m_{BFG}/V) durchgeführt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.11.

Deutlich erkennbar ändert sich die Produktbildungsrate nicht, wenn die Biomassekonzentration im Schüttelkolben von 0,3 auf 0,6% verdoppelt wird. Dabei sollte in diesem Fall die Reaktionsgeschwindigkeit steigen. Die Reaktion im Schüttelkolben ist also stark limitiert – höchstwahrscheinlich durch den Sauerstoffgehalt der Medien.

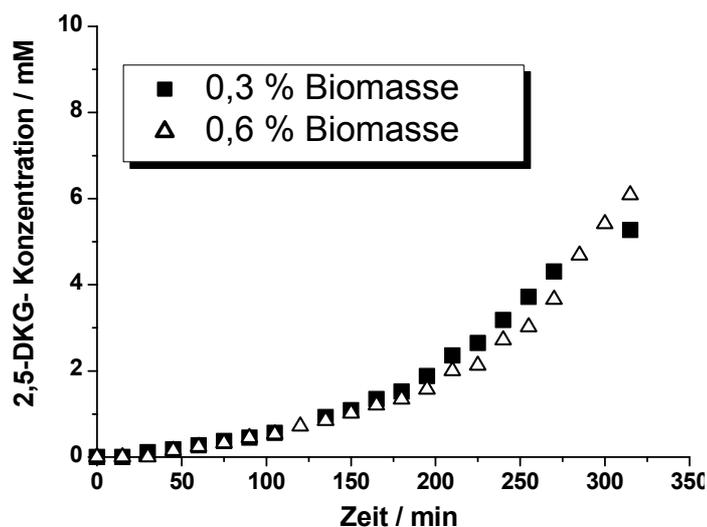


Abbildung 3.11: Einfluss unterschiedlicher Biomassekonzentrationen auf die 2,5-DKG-Produktion durch *G. oxydans* NCIMB 8084 im Schüttelkolben. Bedingungen: 30°C, 50 mL Lösung in 500 mL Schüttelkolben, 200 rpm, 50 mM Glucose, 100 mM Na-Succinat, 11,82 g/L M9-Salze ((Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, NH₄Cl), 3,2 bzw. 6,4 g_{BFG} / L *G. oxydans* NCIMB 8084).

Als Alternative zum Schüttelkolben wurde eine Vorrichtung entworfen, in der die Reaktionslösung wahlweise mit reinem Sauerstoff oder Druckluft begast werden kann (Abbildung 3.12).

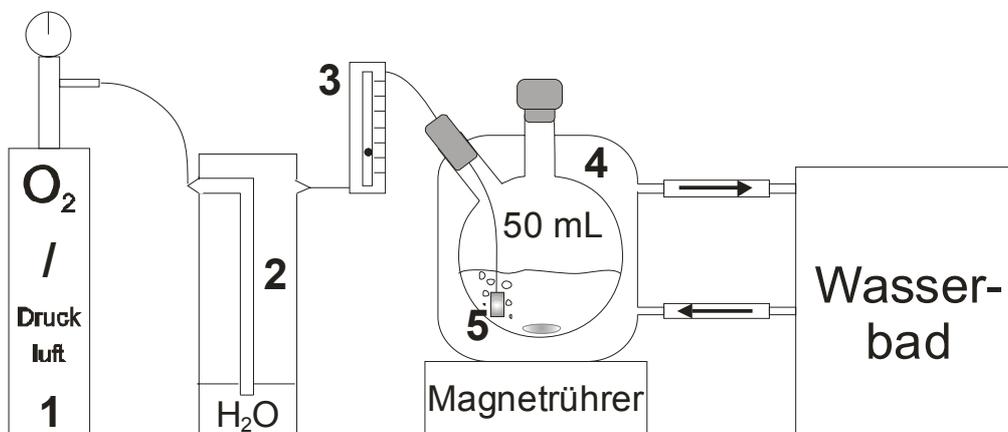


Abbildung 3.12: Vorrichtung zur Begasung von Biotransformationslösungen. 1: Sauerstoff-Druckflasche / Druckluft; 2: Waschflasche mit Fritte; 3: Schwebekörper-Durchflußmesser; 4: 50 mL-Mantelkolben mit zellhaltiger Lösung; 5: Chromatographie-Filterfritte, 2µm Porengröße.

In dieser Begasungsanlage wurde der zuvor beschriebene Versuch unter Begasung mit reinem Sauerstoff wiederholt (Abbildung 3.13). Eine Verdopplung der Zellzahl führte in diesem Fall dazu, dass in der gleichen Zeit doppelt soviel 2,5-DKG gebildet wurde. Eine Begasung mit Sauerstoff steigert somit die Produktivität deutlich.

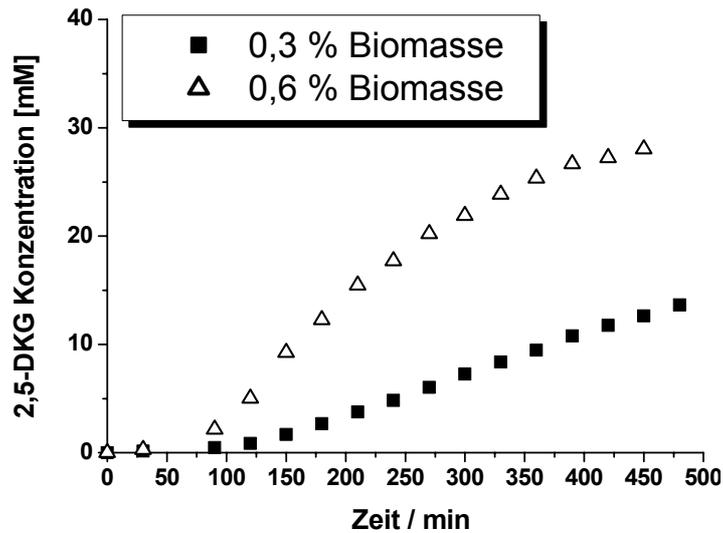


Abbildung 3.13: Produktion von 2,5-DKG durch *G. oxydans* NCIMB 8084 im Satzreaktor unter Sauerstoffbegasung. Bedingungen: V=50 mL, 30°C, 42 mM Glucose, 100 mM Na-Succinat, 11,82 g/L M9-Salze, 3,2 bzw. 6,4 g_{BFG}/L *G. oxydans* NCIMB 8084. Begasung über einen Schlauch.

3.3.2.2 Wahl der Begasungsart

Die Begasung mit reinem Sauerstoff ist in einem laufenden Prozess ein nicht unerheblicher Kostenfaktor. Auch haben andere Forscher die Beobachtung gemacht, dass die Begasung mit reinem Sauerstoff ungünstig ist [Oosterhuis *et al.* 1985]: Reiner Sauerstoff hemmt dort die Oxidation von Glucose zu Gluconat. Eine Begasung mit sauerstoffangereicherter Luft sei empfehlenswerter.

Abbildung 3.14 vergleicht die Aktivität der *G. oxydans*-Zellen bei einer Begasung mit Druckluft und bei einer Begasung mit reinem Sauerstoff. Zum Vergleich ist auch die Aktivität bei Kopfraumbegasung (im Schüttelkolben) gezeigt.

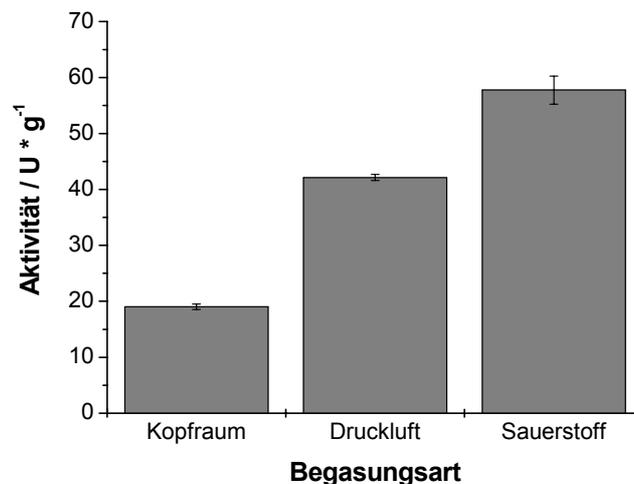


Abbildung 3.14: Einfluss der Begasungsart auf die Aktivität von *G. oxydans*-Zellen. Bedingungen: 25°C, 50 mM Glucose, 100 mM Na-Acetat pH5, V=50 mL, 6,7 g_{BFG}/L *G. oxydans* NCIMB 8084. Kopfraum: 500 mL schikanefreie Schüttelkolben, 200 rpm; Druckluft/Sauerstoff: 10-20 L/h.

Die Aktivität der Zellen ist bei einer Begasung mit reinem Sauerstoff knapp anderthalb mal so hoch wie bei einer Begasung mit Druckluft (57,8 U/g versus 42,1 U/g). Auch wenn die Zellen mehrere Tage mit reinem Sauerstoff begast wurden, waren keine negativen Einflüsse bemerkbar (nicht gezeigt). Das steht im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Forscher [Oosterhuis *et al.* 1985] sowie zum teilweise verbreiteten Irrglauben, reiner Sauerstoff sei ohne Ausnahme schädlich für Mikroorganismen. Für die dreifache Oxidation von Glucose zu 2,5-DKG ist eine Begasung mit Sauerstoff in jedem Fall zu empfehlen. Laut Buse *et al.* ist die erhöhte Produktivität nicht nur auf eine erhöhte Konzentration des Substrates Sauerstoff zurückzuführen, sondern auf eine gesteigerte Aktivität der drei membrangebundenen Dehydrogenasen [Buse *et al.* 1992a].

3.3.2.3 Untersuchungen zur Limitierung bei Sauerstoffbegasung³

Bislang kann nicht ausgeschlossen werden, dass es trotz Begasung mit Sauerstoff zu einer Sauerstofflimitierung kommt. Um das abzuklären, wurden Biotransformationen bei unterschiedlichen Biomassekonzentrationen (von 0,5 bis 10%) durchgeführt. Der Sauerstoffpartialdruck wurde mittels pO_2 -Elektrode entsprechend der in Abschnitt 8.11 beschriebenen Methode überwacht. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.15.

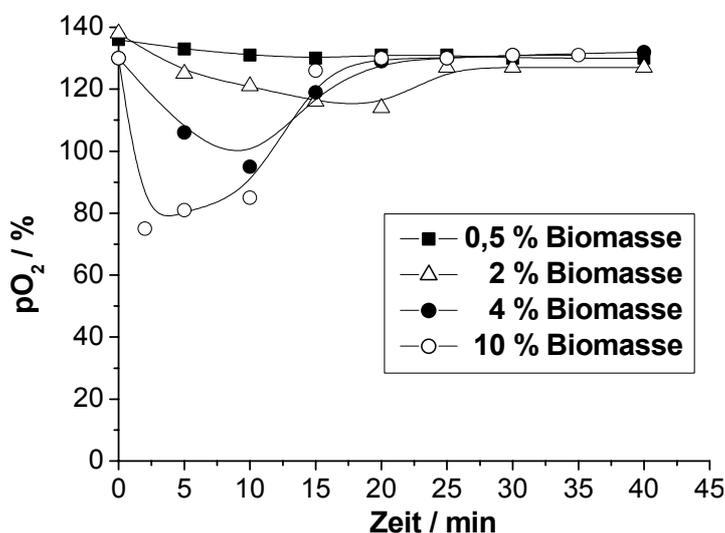


Abbildung 3.15: Verlauf des pO_2 in Biotransformationslösungen unterschiedlicher Biomassekonzentrationen von *Gluconobacter oxydans* NCIMB 8084. Bedingungen: 25°C, 50 mM Glucose, 100 mM Na-Acetat, pH5, V=50mL, Sauerstoffbegasung 10-20 L/h. 140% entspricht dem pO_2 einer sauerstoffgesättigten Lösung; 0% dem einer argongesättigten Lösung. 0,5% Biomasse = 5 g_{BFG}/L ; 2% = 20 g_{BFG}/L usw. Linien lediglich als Orientierungshilfe.

³ Teile der Ergebnisse sind aus der Diplomarbeit von Roman Bucerus (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2008)

Der Sauerstoffpartialdruck fällt im Versuchsverlauf ab und erreicht nach etwa 40 bis 50 Minuten wieder den Ausgangswert. Der Abfall des Sauerstoffpartialdrucks erfolgte umso eher und war umso deutlicher, je mehr Biomasse eingesetzt wurde. Buse *et al.* beobachteten, dass oberhalb eines Sauerstoffpartialdrucks von 30 % relativ zur Luft bei 1 bar die Produktion von 2,5-DKG nicht limitiert wurde [Buse *et al.* 1992a]. Aus Abbildung 3.15 lässt sich zwar zu keiner Zeit ein Abfall des Sauerstoffpartialdrucks unter 30 % erkennen, an dieser Stelle sei jedoch auch auf ein Problem im Zusammenhang mit der Messmethode verwiesen: Das verwendete Gerät ist für die Messung des Sauerstoffpartialdrucks bei Begasung mit Luft ausgelegt. Bei der Begasung mit reinem Sauerstoff ist deshalb zu beachten, dass die gemessenen Werte den Sauerstoffpartialdruck quantitativ nicht exakt widerspiegeln. Bei reiner Sauerstoffbegasung sollte die Sauerstoffsättigung bezogen auf Luftsättigung eigentlich 500 % betragen.

Um beurteilen zu können, ob eine Sauerstofflimitierung vorlag, wurde zusätzlich die Aktivität der Zellen bei unterschiedlichen Biomassekonzentrationen bestimmt.

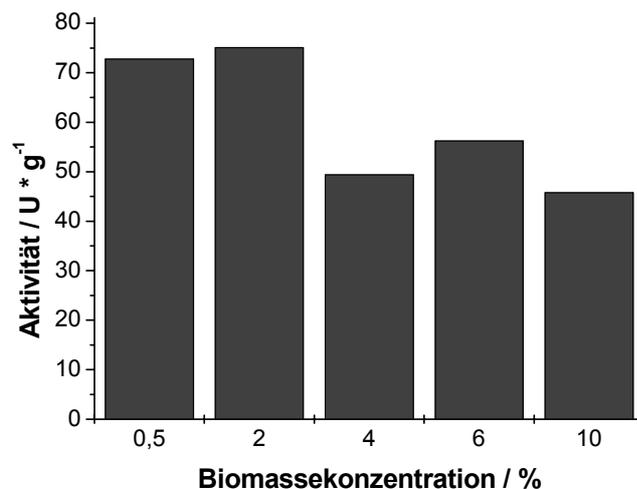


Abbildung 3.16: Einfluss der Biomassekonzentration auf die Aktivität der *G. oxydans*-Zellen.
Bedingungen: 25°C, 50 mM Glucose, 100 mM Na-Acetat, pH5, V=50 mL, Sauerstoffbegasung 10-20 L/h. 0,5% Biomasse = 5g_{BFG}/L; 2% = 20 g_{BFG}/L usw.

Wie Abbildung 3.16 zeigt, nimmt die Zellaktivität bei Biomassekonzentrationen von 4 % und höher deutlich ab. Hier wird der Sauerstoffbedarf offensichtlich so hoch, dass es zu einer Sauerstofflimitierung kommt. Vermutlich ist der Stoffübergang in der Begasungsanlage trotz Dispergiererelement relativ schlecht, was sich bei höheren Biomassekonzentrationen bemerkbar macht. Die Limitierung würde möglicherweise nicht beobachtet, wenn die Begasungsrate erhöht würde. Im Hinblick auf die damit

verbundenen Kosten und Schwierigkeiten (vermehrtes Verdampfen von Flüssigkeit aus der Anlage) wurde darauf jedoch verzichtet.

Die Verwendung einer Biomassekonzentration von 2 % oder weniger führte bei den gewählten Bedingungen nicht zu einer Limitierung, weshalb im Folgenden niemals mehr als 2 % Biomasse (20 g/L) eingesetzt wurde.

3.3.3 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Indem jeweils ein einzelner Parameter variiert und alle anderen Parameter festgesetzt wurden, sollten die optimalen Bedingungen für die Biotransformation gefunden werden.

3.3.3.1 Temperatur

Wie in Abbildung 3.17 zu sehen, steigt die Aktivität der Zellen zunächst mit der Temperatur, fällt aber ab 40°C wieder ab. Bei 35°C ist die Aktivität maximal.

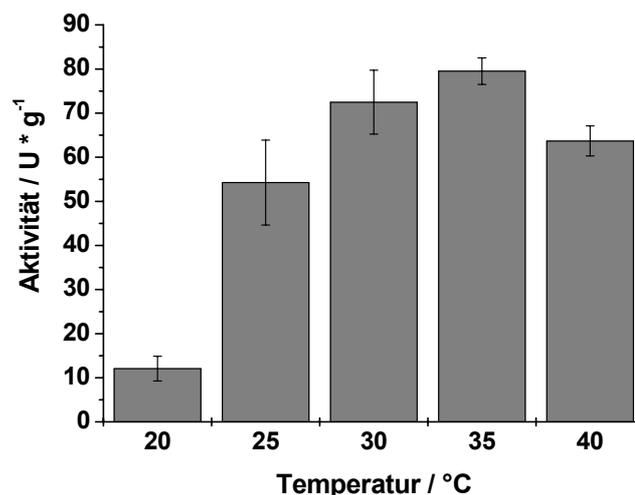


Abbildung 3.17: Einfluss der Temperatur auf die Aktivität von *G. oxydans* Zellen NCIMB 8084. Bedingungen: : 50 mM Glucose, 100 mM Na-Acetat, pH5, V=25 mL, Sauerstoffbegasung 10-20 L/h, 5,2 g_{BFG} / L *G.oxydans* NCIMB 8084.

Die Reaktionstemperatur ist ein Kompromiss zwischen hinreichend hoher Aktivität und zufrieden stellender Stabilität. Die Stabilität von Zellen sinkt im Allgemeinen mit steigender Temperatur. In diesem Fall gibt es ein weiteres Argument gegen zu hohe Temperaturen: 2,5-DKG ist thermolabil [Bloemsma *et al.* 1963]. Auch ist die Sauerstofflöslichkeit des Mediums bei niedrigeren Temperaturen höher. Aus diesem Grund wurde 25°C als optimale Reaktionstemperatur gewählt. Andere setzen *Gluconobacter oxydans* hingegen meist bei 30°C ein [Elfari *et al.* 2005, Silberbach *et al.* 2003]. Dass die Ausbeute an Ketosäuren bei 25°C höher ist, wurde jedoch schon früher berichtet [Stubbs *et al.* 1940].

3.3.3.2 pH-Wert und Puffer

Bei einem pH-Wert von 5 ist die Aktivität der Zellen maximal (Abbildung 3.18).

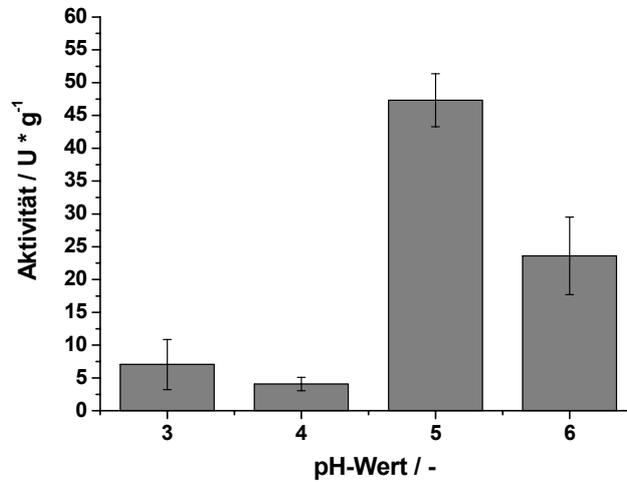


Abbildung 3.18: Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität von *G. oxydans* Zellen NCIMB 8084. Bedingungen: 30°C, 50 mM Glucose, V=50 mL, Sauerstoffbegasung 10-20 L/h, 6,7 g_{BFG} / L *G. oxydans* NCIMB 8084. Titration mit 2N KOH und 2N HCl. Verwendete Puffer: pH 5: 100 mM Na-Acetat; pH6: 100 mM Na-Succinat. pH3 und pH4 ohne zusätzliche Puffersubstanz.

In alternativen Versuchen (Abbildung 3.19) wurde der pH-Wert nicht durch Titration konstant gehalten. Durch die rasche Bildung von Gluconsäure fiel der pH-Wert im Laufe der Reaktion.

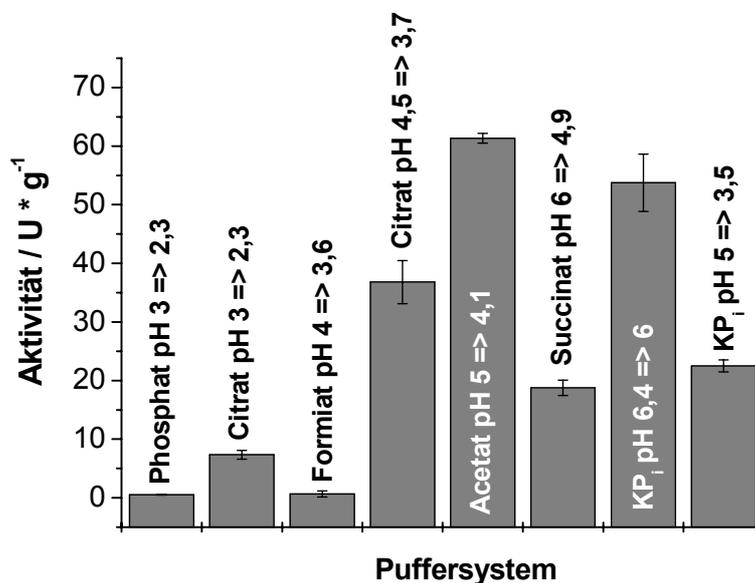


Abbildung 3.19: Einfluss verschiedener Puffersysteme auf die Aktivität von *G. oxydans*-Zellen NCIMB 8084. Bedingungen: 30°C, Pufferkonzentration 100 mM, keine pH-Gegentitration. pH-Wert-Angaben jeweils zu Beginn und zu Ende der Reaktion. 6 g_{BFG}/L *G. oxydans* NCIMB 8084. V=50 mL, Sauerstoffbegasung 10-20 L/h.

Auch hier sind pH-Werte um pH 5 zu Beginn der Reaktion günstig, bei Anfangs-pH-Werten von 4 oder weniger sind die Zellaktivitäten durchweg gering.

Am aktivsten sind die Zellen in einem Acetatpuffer mit dem Anfangs-pH von 5, bei dem der pH-Wert im Laufe der Reaktion auf 4,1 sinkt. Die Zellen sind dann sogar aktiver als in einem vergleichbaren Ansatz, in dem der pH-Wert konstant auf 5 gehalten wurde (Abbildung 3.18): Bei konstantem pH-Wert beträgt die Aktivität 47,3 U/g, bei fallendem pH hingegen 61,3 U/g. Die Erklärung: die pH-Optima der drei membran-gebundenen Dehydrogenasen unterscheiden sich. Qazi *et al.* beschrieben für die Glucosedehydrogenase ein pH-Optimum von 5,5 [Qazi *et al.* 1991], die Gluconat-dehydrogenase ist am aktivsten bei pH-Werten zwischen 4,0 und 5,0 [Matsushita *et al.* 1982], die 2-KG-Dehydrogenase wiederum bei einem pH von 4,0 [Shinagawa *et al.* 1981]. Idealerweise fällt also durch die Bildung der Gluconsäure der pH-Wert von 5 auf 4 ab – dann verlaufen die beiden nachfolgenden Oxidationen schneller, als wenn der pH-Wert konstant 5 beträgt.

Weniger aktiv sind die Zellen in KP_1 -Puffer mit einem Anfangs-pH von 5 (22,5 U/g). Das Puffersystem $\text{H}_2\text{PO}_3^-/\text{HPO}_3^{2-}$ puffert in diesem pH-Bereich nicht gut ($\text{pK}_s = 7,21$), daher fällt der pH-Wert schnell auf 3,5 ab; bei einem so niedrigen pH-Wert ist die Aktivität aller beteiligten Enzyme nur gering.

Die zweithöchste Aktivität mit 53,7 U/g wird in KP_1 -Puffer mit dem Anfangs-pH-Wert von 6,4 erzielt. Dieser pH liegt im Pufferbereich des $\text{H}_2\text{PO}_3^-/\text{HPO}_3^{2-}$ - Systems, der pH fällt daher nur bis auf pH 6. Im Gegensatz dazu ist die Aktivität bei konstant gehaltenem pH 6 mit 12,7 U/g nur gering (Abbildung 3.18). Das liegt daran, dass bei den Versuchen mit konstant gehaltenem pH 6 Na-Succinat als zusätzliche Puffersubstanz eingesetzt wurde. Succinat hemmt aber die 2-KG-Dehydrogenase [Shinagawa *et al.* 1982]. Daher ist auch in Abbildung 3.19 die Aktivität im Succinatpuffersystem relativ gering. Im Citrat-Puffersystem ist die Aktivität 36,8 U/g. Citrat stört jedoch die HPLC-Analytik, weshalb dieses Puffersystem aus praktischen Gründen wenig geeignet ist.

In der Literatur finden sich widersprüchliche Hinweise über den optimalen pH-Wert für die Oxidation von Glucose zu 2,5-DKG. Einige berichten, der pH-Wert müsse zu Beginn der Reaktion größer als 5 sein, damit Gluconat entsteht; für eine Weiteroxidation müsse der pH-Wert dann auf Werte kleiner 4 fallen [Qazi *et al.* 1991]. Bei einem konstanten pH-Wert von 5 entstehe weder 2-KG noch 2,5-DKG. Andere haben

das Gegenteil beobachtet: Der pH-Wert müsse über 5,5 betragen, damit Gluconat weiter oxidiert werden kann [Weenk *et al.* 1984].

Die pH-Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit stehen im Gegensatz zu beiden Schilderungen. Sowohl bei pH-Werten von 6 oder höher (KP_i pH 6,4), bei einem konstanten pH-Wert von 5 als auch bei einem Anfangs-pH-Wert von 5, der auf 4,1 abfällt (Na-Acetat-Puffer), ist die Aktivität der Zellen hoch. Für Biotransformationen im Satzreaktor ist ein Acetatpuffer mit einem Anfangs-pH-Wert von 5 und ohne Gegendotation ideal, die Zellaktivität ist hier am höchsten.

Klassischerweise wird für die Oxidation von Glucose mit *G. oxydans* festes Calciumcarbonat als Puffer verwendet: Es wird dem Medium zugesetzt und geht im Laufe der Reaktion, wenn der pH-Wert fällt, als HCO₃⁻ in Lösung. Laut Literatur fällt 2,5-DKG dann als Calcium-Salz aus, wodurch das Gleichgewicht in Richtung der Bildung von 2,5-DKG verschoben wird. Ohne CaCO₃ werde kaum 2,5-DKG gebildet [Beschkov *et al.* 1995]. Diese These ist hiermit widerlegt. Die Bedeutung des CaCO₃ wird überschätzt: Mit dem richtigen Puffersystem und pH-Wert bildet *G. oxydans* auch ohne Calciumcarbonat 2,5-DKG.

3.3.4 Untersuchung der Reaktionskinetiken

In der Literatur wird die Reaktionskinetik der Biotransformation von Glucose zu 2,5-DKG durch *G. oxydans* nur spärlich behandelt. Meistens untersuchen die Arbeiten lediglich, ob Glucose eine inhibierende Wirkung auf das Wachstum der Zellen und die Produktion von Gluconat ausübt [Velizarov *et al.* 1994b, Velizarov *et al.* 1998]. Beschkov *et al.* modellierten die zweistufige Oxidation von Glucose zu 2-KG durch *Gluconobacter oxydans* NBIMCC 1043 [Beschkov *et al.* 1995]. Eine detaillierte Betrachtung der dreistufigen Oxidation zu 2,5-DKG findet sich lediglich für den Organismus *Erwinia citreus* [Zelic *et al.* 1999].

3.3.4.1 Betrachtung der dreistufigen Reaktion

Abbildung 3.20 zeigt den typischen Reaktionsverlauf bei der Oxidation von Glucose zu 2,5-DKG:

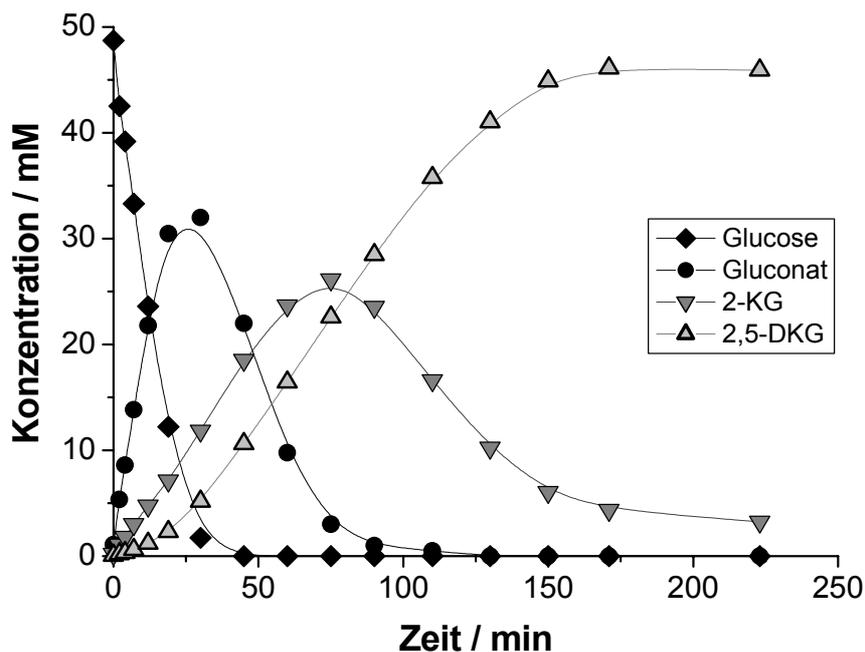


Abbildung 3.20: Beispielhafter Reaktionsverlauf einer Biotransformation im Satzverfahren.
 Bedingungen: 25°C, 50 mM Glucose, 100 mM Na-Acetat pH 5, 6,7 g_{BFG} / L *G.oxydans* NCIMB 8084. V=50 mL, Sauerstoffbegasung 10-20 L/h. Zellcharge aus Parallelferrmentation. Linien lediglich als Orientierungshilfe.

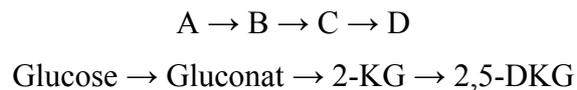
Glucose wird innerhalb kürzester Zeit zu Gluconat oxidiert, die Konzentration von Gluconat steigt schlagartig und erreicht unter den gegebenen Reaktionsbedingungen ein Maximum nach etwa 30 Minuten, um dann wieder steil abzufallen. Schon während Gluconat entsteht, wird dieses weiter zu 2-KG oxidiert: Dessen Konzentration ist hier bei etwa 75 Minuten maximal und sinkt dann wieder als Folge der 2,5-DKG-Bildung. Nach etwa 175 Minuten ist die Reaktion beendet. Die Ausbeute beträgt etwa 92 %; nur wenige mmol/L 2-KG verbleiben unumgesetzt in der Reaktionslösung. Glucose und Gluconat werden vollständig umgesetzt.

Dieses sequentielle Bildungsmuster ist für eine chemische Folgereaktion typisch und wurde für diese Reaktion auch in anderen Arbeiten beobachtet, beispielsweise bei [Qazi *et al.* 1991]. Weenk *et al.* berichteten hingegen, dass die Bildung von Ketogluconaten erst sehr viel später einsetzte [Weenk *et al.* 1984]. Sie schlussfolgerten, dass die Glucosekonzentration zunächst unter einen bestimmten Schwellenwert fallen muss, damit Gluconat zu 2-KG weiteroxidiert werden kann. Abbildung 3.20 hingegen zeigt, dass die Konzentration von 2,5-DKG bereits wenige Minuten nach Reaktionsstart langsam steigt. Auch bei hohen Glucose-Startkonzentrationen von 150 oder sogar 250 mM setzte die 2,5-DKG-Bildung bereits wenige Minuten nach Reaktionsstart ein,

nämlich sobald auch nur geringe Mengen 2-KG vorlagen (nicht gezeigt). Alle drei Enzyme sind somit parallel aktiv. Da es sich um drei Folgereaktionen handelt, setzt die jeweilige Teilreaktion ein, sobald das Edukt für diese Teilreaktion gebildet wurde.

3.3.4.2 Modellierung der dreistufigen Reaktionsfolge als Reaktionen 1. Ordnung

Bei aufeinander folgenden mehrstufigen Reaktionen ist es wichtig, den langsamsten, also geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zu identifizieren, den so genannten „bottle-neck“. Die Reaktionskonstanten K geben darüber Auskunft: je kleiner K desto langsamer der Reaktionsschritt. Um die Reaktionskonstanten zu berechnen, wurde die Oxidation von Glucose zu 2,5-DKG als Reaktionsfolge von drei Einzelschritten betrachtet. Es wurde als Vereinfachung angenommen, bei allen drei Einzelschritten handelte es sich um Reaktionen 1. Ordnung. Das Gleichungssystem setzte sich aus vier Differentialgleichungen zusammen (Formel 3.2):



$$\frac{dc(A)}{dt} = -K_1 \cdot c(A)$$

$$\frac{dc(B)}{dt} = K_1 \cdot c(A) - K_2 \cdot c(B)$$

$$\frac{dc(C)}{dt} = K_2 \cdot c(B) - K_3 \cdot c(C)$$

$$\frac{dc(D)}{dt} = K_3 \cdot c(C)$$

Formel 3.2: Gleichungssystem zur Modellierung der dreistufigen Reaktionsfolge von *G. oxydans*. $c(A, B, C, D)$ = Konzentration von A, B, C, D. $K_{1,2,3}$: Reaktionskonstante für den ersten, zweiten, dritten Reaktionsschritt.

Die mit Hilfe der Software MatLab ermittelten Werte für die Reaktionskonstanten K_1 , K_2 und K_3 zeigt Tabelle 3.6, zum einen für die Zellcharge aus der Parallelermentation (Abschnitt 3.2.2), zum anderen für die Zellen aus der 20-L-Fermentation (Abschnitt 3.2.3). Die dort angegebenen Standardabweichungen wurden über Monte-Carlo-Simulationen berechnet; dabei wurden ein absoluter Fehler von 2 % und ein relativer Fehler von 5 % angenommen.

3.3. Charakterisierung des Biokatalysators im Satzreaktor

Tabelle 3.6: Ergebnisse der Modellierung nach Formel 3.2.

	Zellcharge aus Parallelfertmentation (Abschnitt 3.2.2)	Zellcharge aus 20-L-Fermentation (Abschnitt 3.2.3)
K1 [min ⁻¹]	0,069 ± 0,002	0,030 ± 0,0007
K2 [min ⁻¹]	0,033 ± 0,0007	0,155 ± 0,008
K3 [min ⁻¹]	0,020 ± 0,0006	0,072 ± 0,004

Abbildung 3.21 vergleicht die simulierten Konzentrationsverläufe mit den gemessenen Datensätzen, jeweils für die beiden unterschiedlichen Zellchargen.

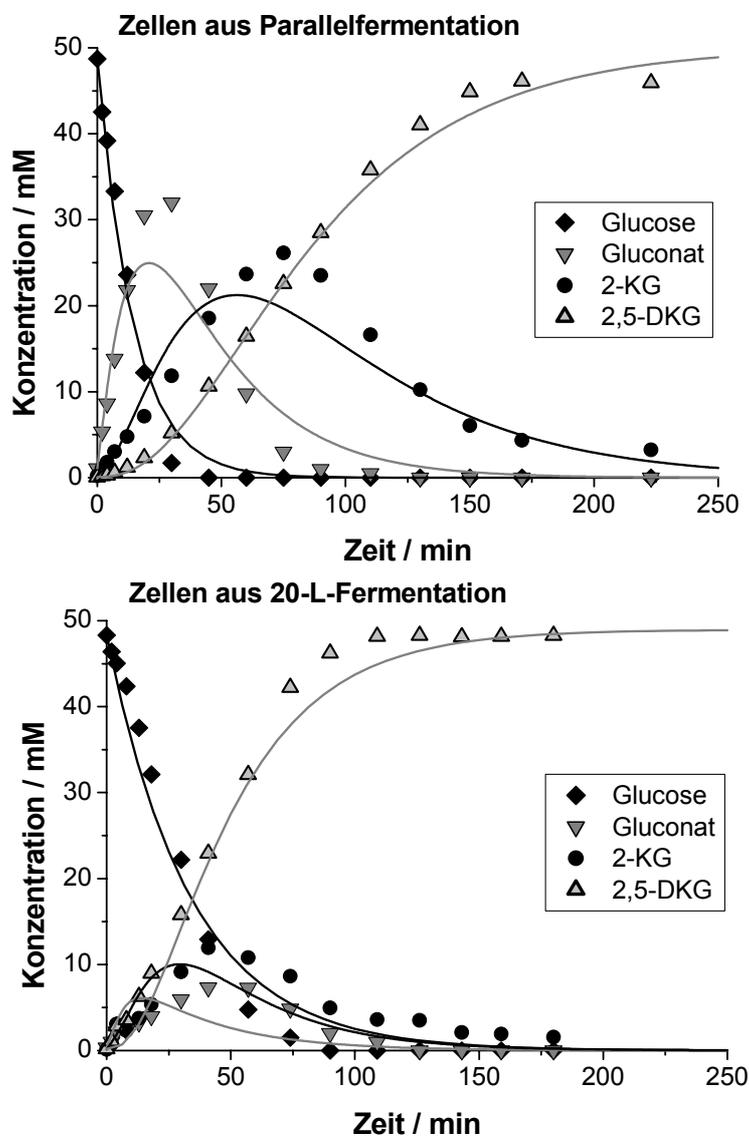


Abbildung 3.21: Ergebnis der Modellierung der dreistufigen Reaktionsfolge als Kaskade von Reaktionen 1. Ordnung nach Formel 3.2. Bedingungen: 25°C, 50 mM Glucose, 100 mM Na-Acetat pH 5,6,7 g_{BFG} / L *G.oxydans* NCIMB 8084. V=50 mL, Sauerstoffbegasung 10-20 L/h.

Der Reaktionsverlauf unterscheidet sich bei beiden Zellchargen stark: Bei den Zellen aus der 20-L-Fermentation (unten) dauert es sehr viel länger, bis Glucose vollständig umgesetzt ist. Trotzdem wird 2,5-DKG schneller gebildet: Die maximale Konzentration wird früher erreicht (nach ca. 110 Minuten statt nach ca. 175 Minuten). Die Konzentration der Intermediate Gluconat und 2-KG bleibt über die gesamte Reaktionszeit durchweg relativ gering. Das spiegelt sich in den Reaktionskonstanten wieder: K_1 für die Glucoseoxidation ist bei der 20-L-Zellcharge etwa halb so groß wie bei der Zellcharge aus der Parallelferrmentation, K_2 und K_3 sind jedoch fast fünf- beziehungsweise viermal so hoch.

Die beiden Zellchargen unterscheiden sich in dem Zeitpunkt ihrer Zellernte: Bei der Parallelferrmentation wurden die Zellen noch in der exponentiellen Phase geerntet, bei der 20-L-Fermentation erst in der stationären (vgl. Abbildung 3.6 und Abbildung 3.8). Dass der Zeitpunkt der Zellernte einen Einfluss auf das Oxidationsverhalten der Zellen hat, wurde bereits vorher berichtet: White und Claus beobachteten, dass Zellen aus der stationären Wachstumsphase Glycerin sehr viel schneller oxidierten als Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase [White *et al.* 1982]. Wenn Zellen in die stationäre Phase eintreten, hört die Zellteilung auf – *Gluconobacter* bildet jedoch weiterhin Plasmamembran aus, die sich daraufhin zu falten beginnt. So entstehen intrazytoplasmatische Membranen. Da an die Membranen Enzyme gebunden sind, steigt damit die Zahl der Dehydrogenasen und damit die Zellaktivität.

Die stationär geernteten Zellen aus der 20-L-Fermentation sind bei diesem Versuch tatsächlich aktiver als die exponentiellen aus der Parallelferrmentation (89 U/g vs. 61 U/g). In anderen Reaktionsansätzen betrug die Aktivität der 20-L-Zellen jedoch stets durchschnittlich 60 U/g (statt wie hier 89 U/g, vgl. Tabelle 3.5). Warum die Aktivität der 20-L-Zellen hier so hoch ist, ist unbekannt. Die Theorie von White und Claus erklärt aber, wieso das Oxidationsverhalten der verschiedenen Zellchargen und damit die Konzentrationsverläufe in Abbildung 3.21 unterschiedlich sind.

Auch das Verhältnis der Reaktionskonstanten variiert je nach Zellcharge: Bei den Zellen aus der Parallelferrmentation ist K_1 etwa doppelt so hoch wie K_2 und dieses wiederum mehr als anderthalb mal so groß wie K_3 . Die Oxidation von 2-KG zu 2,5-DKG ist hier also der langsamste, sprich geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Am schnellsten ist die Oxidation von Glucose zu Gluconat.

Bei den Zellen aus der 20-L-Fermentation ist K2 am höchsten: über fünfmal so groß wie K1 und mehr als doppelt so hoch wie K3. Die Oxidation von Gluconat zu 2-KG ist hier also besonders schnell, weshalb sich nur wenig Gluconat in der Reaktionslösung anhäuft: Sobald es entsteht, wird es gleich weiteroxidiert. Die Oxidation von Glucose zu Gluconat ist am langsamsten, sprich geschwindigkeitsbestimmend.

Möglicherweise ist der Unterschied auf unterschiedliche Enzymkonzentrationen zurückzuführen: Während der Fermentationen wurden die Enzyme in unterschiedlichen Verhältnissen exprimiert.

In der Literatur wurde der Reaktionsschritt von Gluconat zu 2-KG als der geschwindigkeitsbestimmende beschrieben [Buse *et al.* 1992b]. Beschkov *et al.* untersuchten die zweistufige Reaktion von Glucose zu 2-KG; dabei fand die Oxidation von Glucose zu Gluconat etwa 8- bis 36-mal so schnell statt wie die nachfolgende Oxidation von Gluconat zu 2-KG [Beschkov *et al.* 1995].

Die berechneten Konzentrationsverläufe stimmen mit den gemessenen einigermaßen gut überein, zumindest können sie den jeweiligen Trend gut nachbilden. Lediglich bei den Konzentrationen der Zwischenprodukte Gluconat und 2-KG weicht das Modell relativ stark von der Realität ab. Diese Unterschiede rühren möglicherweise daher, dass für alle Reaktionen zu jedem Zeitpunkt eine 1. Ordnung angenommen wurde; der erste Schritt läuft aber zu Beginn der Biotransformation sicher als 0. Ordnung ab, da Glucose dann im Überschuss vorhanden ist. Der Einfluss des Sauerstoffs als Substrat wurde hier komplett vernachlässigt, kann aber durchaus bei der Kinetik der Reaktion eine Rolle spielen. Vor allem aber handelt es sich bei den einzelnen Reaktionsschritten um Enzymreaktionen, die für gewöhnlich über die Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben werden.

3.3.4.3 Modellierung der dreistufigen Reaktionsfolge als Enzymreaktionen mit Michaelis-Menten-Kinetik

Analog zum Vorgehen von Zelić *et al.* für *Erwinia citreus* [Zelic *et al.* 1999] wurde für *Gluconobacter oxydans* ein kinetisches Modell erstellt, das die Einzelschritte als Enzymreaktionen mit Michaelis-Menten-Kinetik beschreibt (Formel 3.3).

$$\frac{dc(A)}{dt} = -\frac{v_{\max 1} \cdot c(A)}{K_M 1 + c(A)}$$

$$\frac{dc(B)}{dt} = \frac{v_{\max 1} \cdot c(A)}{K_M 1 + c(A)} - \frac{v_{\max 2} \cdot c(B)}{K_M 2 + c(B)}$$

$$\frac{dc(C)}{dt} = \frac{v_{\max 2} \cdot c(B)}{K_M 2 + c(B)} - \frac{v_{\max 3} \cdot c(C)}{K_M 3 + c(C)}$$

$$\frac{dc(D)}{dt} = \frac{v_{\max 3} \cdot c(C)}{K_M 3 + c(C)}$$

Formel 3.3: Gleichungssystem zur Modellierung der dreistufigen Reaktion als Enzymreaktionen mit Michaelis-Menten-Kinetik. $c(A, B, C, D)$ = Konzentration von A, B, C, D. $K_{M1,2,3}$ = Michaelis-Menten-Konstante der 1.,2.,3. Reaktion. $v_{\max 1,2,3} = v_{\max}$ der 1.,2.,3. Reaktion

Abbildung 3.22 zeigt die jeweiligen Anpassungen.

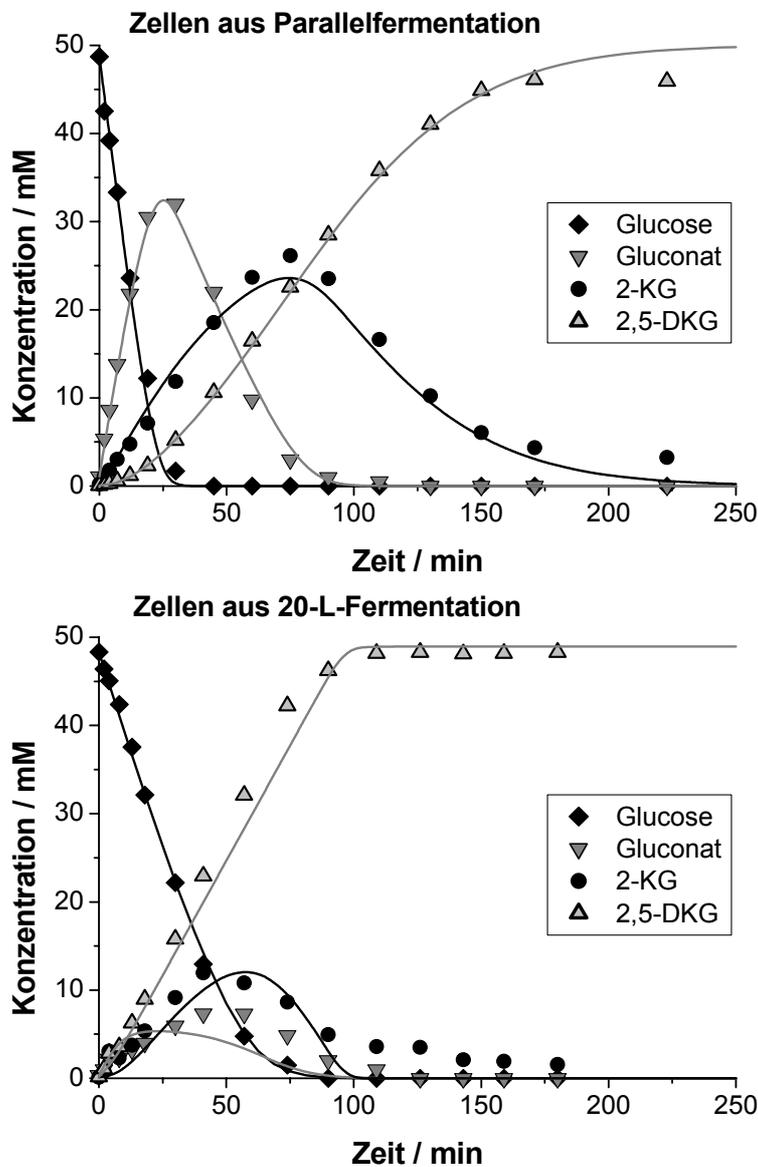


Abbildung 3.22: Ergebnis der Modellierung der dreistufigen Reaktionsfolge nach Formel 3.3.

3.3. Charakterisierung des Biokatalysators im Satzreaktor

Die ermittelten K_M und v_{max} -Werte stimmen für die Zellen aus der Parallelfertmentation recht gut mit den Literaturwerten für die isolierten Enzyme überein (Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7: Ergebnisse der Modellierung nach Formel 3.3. Standardabweichungen sind nicht angegeben, da die Monte-Carlo-Simulation nur eine unsymmetrische Weibull-Verteilung lieferte.

	Zellcharge aus Parallelferm. (Abschnitt 3.2.2)	Zellcharge aus 20-L-Ferm. (Abschnitt 3.2.3)	Literaturwerte für isolierte Enzyme
v_{max1} [$U \cdot g^{-1}$]	406,0	161,1	n.a.
v_{max2} [$U \cdot g^{-1}$]	126,8	8290	n.a.
v_{max3} [$U \cdot g^{-1}$]	140,7	78,7	n.a.
K_{M1} [mM]	3,419	7,97	13,0 [Träger <i>et al.</i> 1992]
K_{M2} [mM]	3,739	349,24	2,3-3,2 [Matsushita <i>et al.</i> 1982]
K_{M3} [mM]	25,04	0,061	50 [Shinagawa <i>et al.</i> 1982]

In einem gekoppelten Ansatz, der die beiden Zellchargen in einem Modell zusammenzufassen versuchte, wurde davon ausgegangen, dass die K_M -Werte der beteiligten Enzyme in den verschiedenen Zellchargen gleich bleiben und sich nur die Maximalgeschwindigkeiten ändern, da unterschiedliche Mengen an Enzymen exprimiert worden sind (siehe Anhang). Auch hier ließen sich die modellierten Konzentrationsverläufe für die Zellen aus der Parallelfertmentation gut an die gemessenen Verläufe anpassen, nicht jedoch für die 20-L-Zellen.

Die 20-L-Zellen verhalten sich durchweg anders als alle anderen Zellchargen, die in der Literatur beschrieben sind und im Rahmen dieser Arbeit beobachtet wurden. Ihr Oxidationsverhalten weicht von dem typischen Muster ab. Womöglich haben sich bei ihrer Anzucht Strukturen ausgebildet, die andere Zellchargen nicht aufweisen: vielleicht spezielle Faltungen der zytoplasmatischen Membran, die es den Intermediaten erlauben, auf besonders kurzem Wege von Enzym 2 zu Enzym 3 zu gelangen. In diesem Falle müsste ein Transportfaktor in das Modell integriert werden. Da jedoch nicht bekannt ist, was wirklich die Ursache für das veränderte Oxidationsverhalten ist, ist eine weitere Anpassung an diesem Punkte nicht sinnvoll.

Für gewöhnliche *Gluconobacter oxydans*-Zellen gilt: Die K_M - und v_{max} -Werte lassen sich über ein Modell ermitteln, das die drei Einzelschritte als Enzymreaktionen mit Michaelis-Menten-Kinetik beschreibt.

3.3.4.4 Bestimmung der kinetischen Konstanten⁴

Um Rückschlüsse auf einen optimalen Reaktorbetrieb zu ziehen, reicht es aus, die reaktionskinetischen Parameter der Gesamtreaktion zu kennen. Immerhin ist es das Ziel, im ersten Reaktor möglichst viel 2,5-DKG zu produzieren. Die Zwischenschritte werden daher im Folgenden vernachlässigt, die Reaktion wie eine einstufige Reaktion betrachtet. So soll die optimale Ausgangsglucosekonzentration für den Reaktorbetrieb ermittelt werden.

Es wurden mögliche Substrat- und Produktinhibierungen untersucht: Die Aktivität der Zellen wurde bei unterschiedlichen anfänglichen Glucosekonzentrationen bestimmt (Abbildung 3.23) sowie bei verschiedenen 2,5-DKG-Konzentrationen (Abbildung 3.24). Untersucht wurden lediglich die Zellen aus der 20-L-Fermentation. Problematisch ist dabei, dass die Reaktion über eine Dauer von mindestens 90 Minuten beobachtet werden muss, um die Aktivität der Zellen zu ermitteln. Innerhalb dieser Zeit werden jedoch schon erhebliche Mengen Substrat verbraucht sowie Intermediate und Produkt gebildet – das kann die Reaktionsgeschwindigkeit natürlich beeinflussen. Da jedoch nicht der Verbrauch an Glucose, sondern die Bildung von 2,5-DKG für den späteren Reaktorbetrieb interessant ist, war keine andere Vorgehensweise möglich.

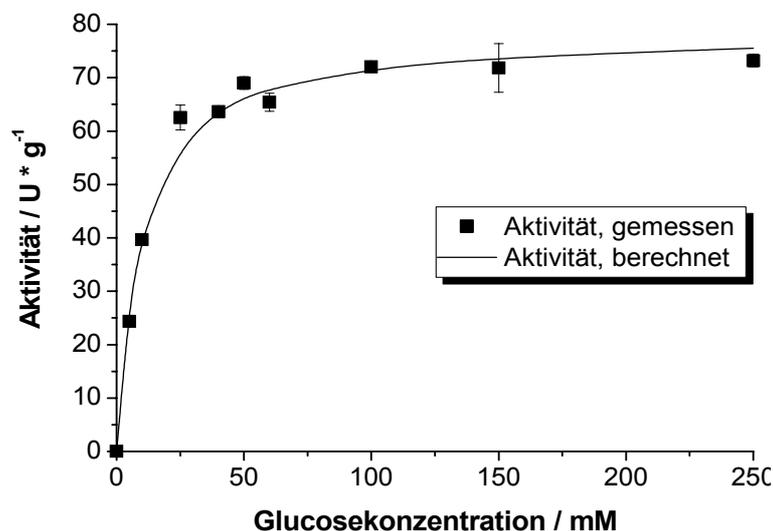


Abbildung 3.23: Kinetik von *G. oxydans*-Zellen NCIMB 8084. Michaelis-Menten-Kinetik. Bedingungen: 25°C, 100 mM Na-Acetat pH 5, 6,7 g_{BFG} / L *G. oxydans* NCIMB 8084. V=30 mL, Sauerstoffbegasung 10-20 L/h. Anpassung der Werte nach Formel 3.4

⁴ Teile der Ergebnisse sind aus der Diplomarbeit von Roman Bucerus (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2008)

3.3. Charakterisierung des Biokatalysators im Satzreaktor

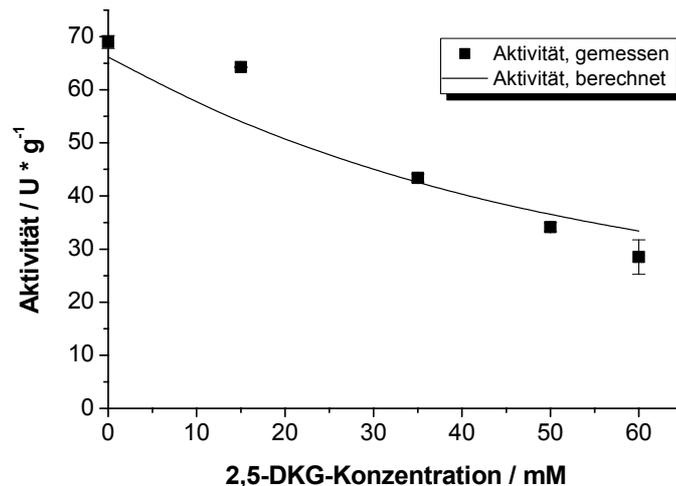


Abbildung 3.24: Inhibition von *G. oxydans* NCIMB 8084 durch das Produkt 2,5-DKG. Bedingungen: 25°C, 50 mM Glucose, 100 mM Na-Acetat pH 5. 6,7 g_{BFG} / L *G.oxydans* NCIMB 8084. V=30 mL, Sauerstoffbegasung 10-20 L/h. Anpassung der Werte nach Formel 3.4.

Die Zellen zeigen eine Michaelis-Menten-Kinetik ohne Substratüberschussinhibition (Abbildung 3.23) und werden durch das Produkt 2,5-DKG inhibiert (Abbildung 3.24). Die entsprechende Formel lautet:

$$v = v_{\max} \cdot \frac{c(\text{Glucose})}{K_M \cdot \left(1 + \frac{c(2,5\text{DKG})}{K_i 2,5\text{DKG}}\right) + c(\text{Glucose})}$$

Formel 3.4: Michaelis-Menten-Kinetik mit Inhibition durch das Produkt 2,5-DKG

Mit der Software Scientist wurden die Messdaten an Formel 3.4 angepasst und die kinetischen Parameter v_{\max} , K_M und K_i 2,5-DKG ermittelt. Das Ergebnis zeigt Tabelle 3.8.

Tabelle 3.8: Kinetische Konstanten für *G. oxydans* NCIMB 8084 (Zellen aus 20L-Fermentation)

$v_{\max} / \text{U} \cdot \text{g}^{-1}$	$78,3 \pm 2,9$
K_M / mM	$9,1 \pm 1,7$
$K_i 2,5\text{-DKG} / \text{mM}$	$9,4 \pm 2,2$

Eine Steigerung der Glucosekonzentration führt bis etwa 50 mM zu signifikanten Erhöhungen der Zellaktivität. Danach steigt die Aktivität nur noch in geringem Maße. Die Produktinhibition durch 2,5-DKG ist relativ stark: Bereits bei 50 mM sinkt die Aktivität auf die Hälfte (von 69 U/g auf 34 U/g).

Ein kontinuierlicher Reaktor arbeitet unter Auslaufbedingungen (siehe Abschnitt 3.4.1). Für den Reaktorbetrieb empfehlen sich daher Glucosekonzentrationen von 25-50 mM. Glucosekonzentrationen höher als 50 mM sind nicht sinnvoll, da die Aktivität ab diesem Wert nur noch langsam steigt und die Produktinhibierung überwiegt. Bei Konzentrationen von weniger als 25 mM hingegen ist die Aktivität der Zellen zu niedrig. Für Reaktionen im Satzreaktor hingegen ist eine Glucosekonzentration von 50 mM ideal, da erst in der zweiten Hälfte der Reaktionszeit die 2,5-DKG-Konzentration signifikant ansteigt (vgl. Abbildung 3.20).

In der Literatur sind kinetische Konstanten für die Gesamtreaktion von Glucose zu 2,5-DKG bisher nicht erwähnt. Auch hat bisher niemand den Einfluss von 2,5-DKG auf die Aktivität der Zellen untersucht. Gefunden haben einige Forscher eine Inhibierung der Oxidation von Glucose zu Gluconat durch zu hohe Glucosekonzentrationen: Dabei nahm die Produktivität der Zellen bei Glucosekonzentrationen von höher als 90 g/L (ca. 450 mM) signifikant ab [Velizarov *et al.* 1994a, Velizarov *et al.* 1994b]. Hierbei scheint es sich jedoch weniger um eine Substratüberschussinhibierung im klassischen Sinne zu handeln: Bei diesen Versuchen fand keine pH-Kontrolle statt, vermutlich nahm die Produktivität der Zellen alleine durch den stark abfallenden pH-Wert ab. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Substratüberschussinhibierung zumindest nicht festgestellt.

3.3.5 Stabilität und Wiederverwendbarkeit der Zellen

Bei Versuchen im Satzreaktor beträgt die Versuchszeit je nach Volumen des Ansatzes lediglich wenige Stunden. Im kontinuierlichen Prozess hingegen muss die Aktivität der Zellen über mehrere Tage hoch bleiben. Die Stabilität der Zellen in Na-Acetat-Puffer bei pH5 und 25°C zeigt Abbildung 3.25.

3.3. Charakterisierung des Biokatalysators im Satzreaktor

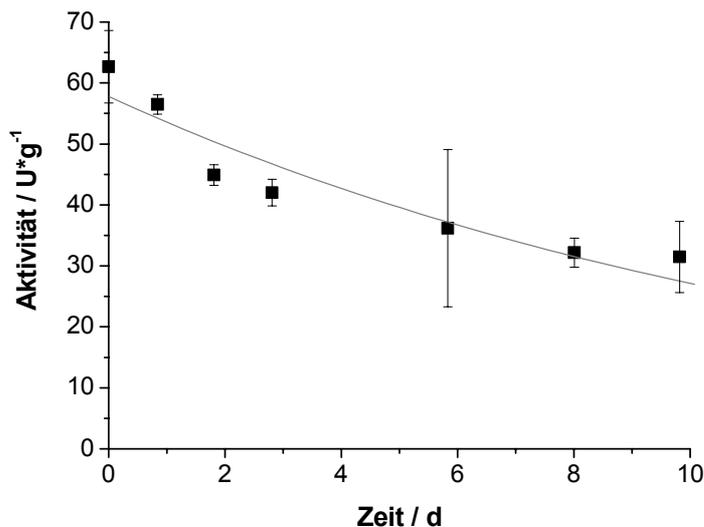


Abbildung 3.25: Stabilität von *G. oxydans* NCIMB 8084 bei pH5 und 25°C. Lagerung: 100 mM Na-Acetat-Puffer pH5, V = 1 mL. Aktivitätstest: 25°C, 50 mM Glucose, 100 mM Na-Acetat pH 5. 8,3 g_{BFG} / L *G. oxydans* NCIMB 8084. V=30 mL, Sauerstoffbegasung 5-10 L/h.

Nach zehntägiger Lagerung beträgt die Aktivität der Zellen noch etwa 50% der Anfangsaktivität (31,2 U/g von 62,7 U/g). Die Halbwertszeit ist 9,2 Tage ($\pm 1,9$ Tage). Abbildung 3.26 zeigt, wie stark die Aktivität von *G. oxydans* bei wiederholten Biotransformationen im Satzreaktor (repetitiver Satzreaktor) abnimmt.

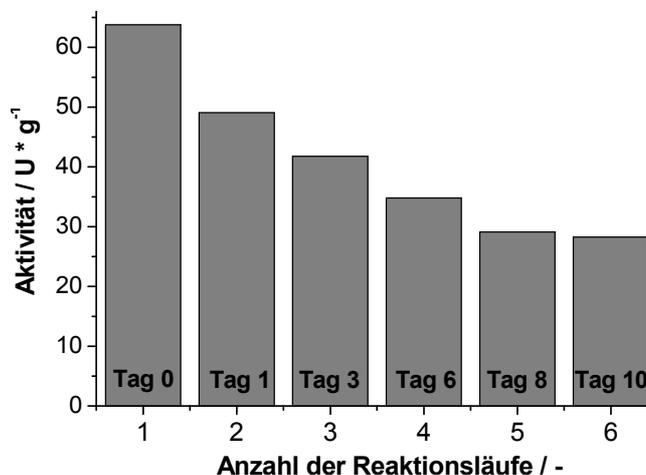


Abbildung 3.26: Wiederholte Biotransformationen im Satzreaktor. Bedingungen: Aktivitätstest: 25°C, 50 mM Glucose, 100 mM Na-Acetat pH 5. 8 g_{BFG} / L *G. oxydans* NCIMB 8084. V=450 mL, Sauerstoffbegasung 10-20 L/h. Lagerung zw. den Reaktionsläufen: 0,9 %ige NaCl-Lösung, 4°C.

Beim sechsten Reaktionslauf war die Zellaktivität auf 44,3% gesunken (Lauf 1: 63,8 U/g, Lauf 6: 28,3 U/g). Die Zellen sind damit jedoch noch immer genügend aktiv, um für Biotransformationen eingesetzt zu werden. Es ist daher zu erwarten, dass sich *Gluconobacter oxydans* unter den optimierten Reaktionsbedingungen (Tabelle 3.9) für einen kontinuierlichen Einsatz eignet.

3.3.6 Zusammenfassung

Für die Biotransformation eignen sich ruhende Zellen von *Gluconobacter oxydans*. Die Produktion im Schüttelkolben ist stark sauerstofflimitiert. Eine Begasung mit reinem Sauerstoff kann dem hohen Sauerstoffbedarf des Organismus am besten nachkommen; allerdings kann in der selbst konstruierten Begasungsanlage auch dann eine Sauerstofflimitierung auftreten, wenn die Biomassekonzentration über 2 % (20 g_{BFG}/L) beträgt.

Die optimierten Reaktionsbedingungen für Biotransformationen im Satzreaktor mit *Gluconobacter oxydans* fasst Tabelle 3.9 zusammen.

Tabelle 3.9: Optimierte Bedingungen für Biotransformationen im Satzreaktor mit *G. oxydans* NCIMB 8084

Temperatur	25°C
Puffer; pH	100 mM Na-Acetat; pH 5; keine Titration
Begasung	Reiner Sauerstoff
Biomassekonzentration	0,5-2 % = 5-20 g _{BFG} /L
Reaktionszeit	1,5-2 h
Glucosekonzentration	50 mM
Aktivität	60-70 U/g _{BFG}
Ausbeute	90-97 %

Im Satzreaktor wurde eine maximale Ausbeute von 97% erzielt, die Zellaktivität lag (mit einer Ausnahme, vgl. 3.3.4.2) bei etwa 60-70 U/g.

Vergleichswerte sind in der Literatur nur schwer zu finden: Zellaktivitäten wurden soweit bekannt zuvor noch nicht beschrieben. Auch wurden bisher keine Arbeiten mit ruhenden *G. oxydans* Zellen zur Produktion von 2,5-DKG durchgeführt.

Die Ausbeuten werden oft nicht den reaktionstechnischen Definitionen gemäß angegeben (beispielsweise für 2-KG und 2,5-DKG zusammengefasst oder lediglich als Glucoseverbrauch, nicht als 2,5-DKG-Ausbeute). Das liegt vermutlich daran, dass eine auswertbare HPLC-Analytik für Gluconat, 2-KG und 2,5-DKG schwer zu entwickeln ist: Die Substanzen sind äußerst schwer zu trennen. Die in der Literatur abgedruckten HPLC-Diagramme lassen vermuten, dass es sich um grobe Schätzwerte handelt.

Einen Vergleich mit dem Stand der Technik zeigt Tabelle 3.10.

Tabelle 3.10: Vergleich der Ergebnisse im Satzreaktor mit in der Literatur erzielten Werten

	Diese Arbeit	[Elfari <i>et al.</i> 2005]	[Buse <i>et al.</i> 1992b]
Stamm	NCIMB 8084	NCIMB 8084	ATCC 9937
Temperatur	25°C	30°C	26°C
pH	5 → 4,1	5	6,8
Begasung	O ₂	O ₂ , CO ₂ , N ₂ pO ₂ = 10%	Luft + O ₂ pO ₂ = 50%
Biomasse	5-20 g _{BFG} /L ruhende Zellen	wachsende Zellen	wachsende Zellen
Reaktionszeit	1,5-2 h	30 h	40 h
Glucosekonz.	50 mM	139 mM	500 mM
Aktivität	60-70 U/g _{BFG}	n.a.	n.a.
Ausbeute	90-97 %	89 % ⁵	80 %

Der Einsatz von ruhenden Zellen war sehr erfolgreich: Im Vergleich zu anderen Arbeiten wurde die Ausbeute gesteigert und die Reaktionszeit stark verkürzt.

3.4. Kontinuierlicher Biotransformationsprozess

3.4.1 Einleitung: CSTR

Bei einem kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor (engl.: continuously operated stirred tank reactor, kurz: CSTR) werden die Reaktanden kontinuierlich in einen Kessel gegeben, der so stark gerührt wird, dass eine homogene Verteilung gewährleistet ist. Die Produktlösung wird gleichzeitig kontinuierlich an anderer Stelle abgezogen. Die Konzentration eines Stoffes sowie die jeweilige Reaktionsgeschwindigkeit sind überall im Kessel gleich. Sie entsprechen den Bedingungen am Reaktorauslauf, man sagt daher, der CSTR arbeitet unter Auslaufbedingungen. Nach Start des Prozesses stellen sich diese Bedingungen ein und bleiben anschließend konstant (steady-state).

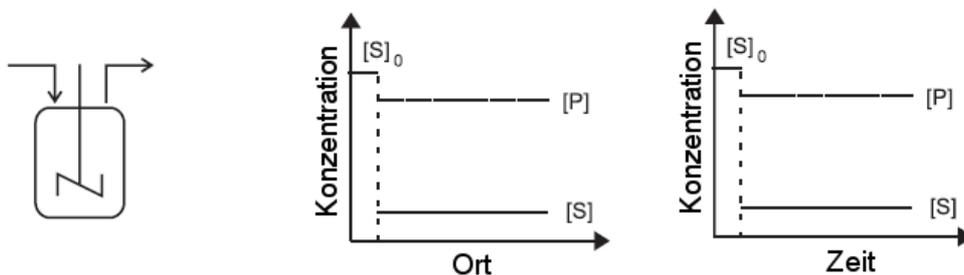


Abbildung 3.27: Konzentration-Zeit- und Konzentration-Ort-Profile für einen kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor (Quelle: [Liese *et al.* 2000]) [S] = Substratkonzentration, [P] = Produktkonzentration

⁵ Angegeben als Summe 2-KG und 2,5-DKG

Die **Verweilzeit** τ ist die Zeit, in der ein definiertes Flüssigkeitsvolumen in dem Reaktor „verweilt“. Sie errechnet sich aus dem Quotienten des Reaktorvolumens zum austretenden Volumenstrom. Wegen der Rückvermischung entsteht eine Verweilzeitverteilung. Die Anzahl der verstrichenen Verweilzeiten in einem Prozess wird als θ bezeichnet.

Neben der Ausbeute, also dem Verhältnis von Produktkonzentration zu Eduktkonzentration, ist die **Raumzeitausbeute** eine wichtige Kenngröße zur Charakterisierung eines Prozesses im CSTR und ein Maß für die Reaktorkapazität. Sie gibt an, wie viel Produkt bei einem Liter Reaktorvolumen an einem Tag gebildet wird (Einheit: $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ oder $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Die **Katalysatorausnutzung** wiederum gibt an, wie viel Gramm Produkt mit einem Gramm Biokatalysator produziert wurden. Im Gegensatz zur Raumzeitausbeute steigt die Katalysatorausnutzung mit längerer Betriebszeit des Reaktors.

3.4.2 Kontinuierliche Produktion von 2,5-Diketo-D-Gluconat mit *Gluconobacter oxydans*⁶

3.4.2.1 Konstruktion einer Anlage zur kontinuierlichen Produktion von 2,5-DKG

In einer Anlage, die kontinuierlich 2,5-DKG mit *Gluconobacter oxydans*-Zellen produziert, muss eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Zellen über eine Begasung sichergestellt sein. Die Anlage darf daher nicht vollkommen geschlossen sein, eine Entlüftung muss möglich sein.

Tramper *et al.* produzierten Gluconat mit Hilfe von *G. oxydans* und immobilisierten die Zellen dafür in Calciumalginat [Tramper *et al.* 1983]. Dabei war jedoch nur ein Teil der Zellen aktiv, die Produktivität wurde durch den Sauerstoffmangel der Zellen stark gedrosselt.

In dieser Arbeit wurden die Zellen mit einem Membranmodul zurückgehalten, während Produktlösung aus der Anlage abgezogen wurde, und wieder zurück in den Reaktorraum gepumpt. Mittels einer Pumpe wurde ein permanenter Querstrom über der Membran im Filtrationsmodul angelegt. Über dem Membranmodul liegt ein hoher

⁶ Teile der Ergebnisse sind aus der Diplomarbeit von Roman Bucerius (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2008)

3.4. Kontinuierlicher Biotransformationsprozess

Druck an, das Einpumpen von Glucoselösung in die Anlage erfolgt hingegen druckfrei. Damit die Anlage nicht leergepumpt wird, wurde die Produktpumpe über einen Füllstandsmesser geregelt.

Den detaillierten Aufbau des CSTR, der zur kontinuierlichen Produktion von 2,5-DKG im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde, zeigen Abbildung 3.28 und Abbildung 3.29.

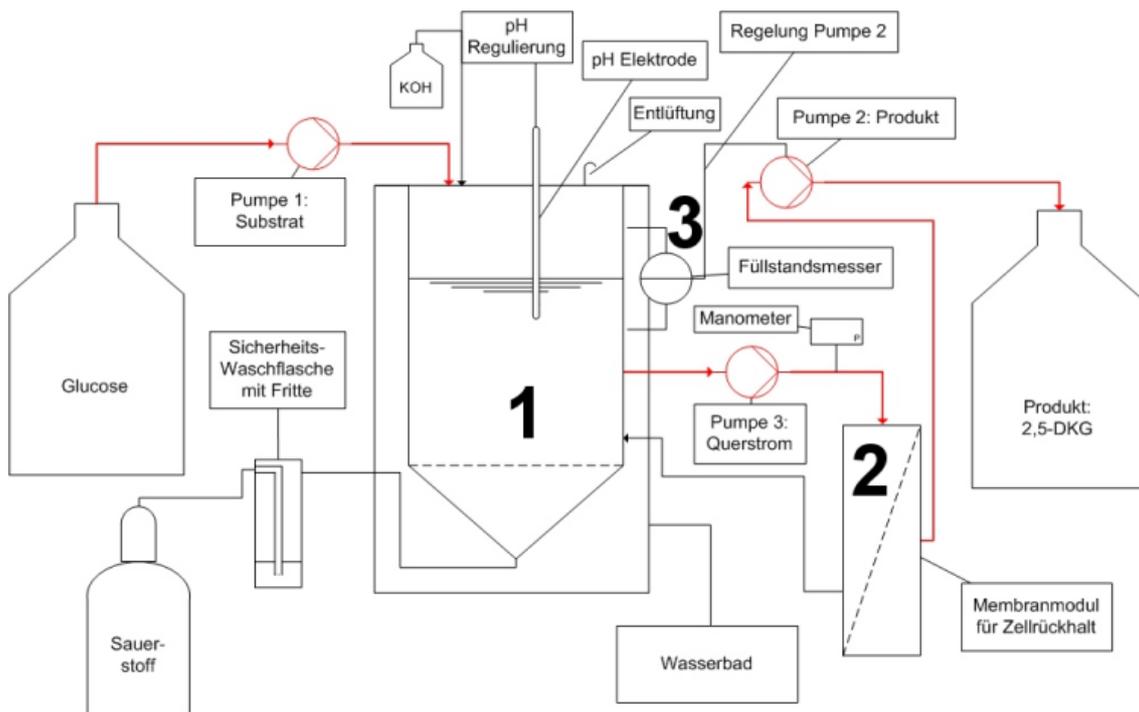


Abbildung 3.28: Anlage zur kontinuierlichen Produktion von 2,5-DKG mit *Gluconobacter oxydans*.
1: Reaktorraum; 2: Membranmodul; 3: Füllstandsregler

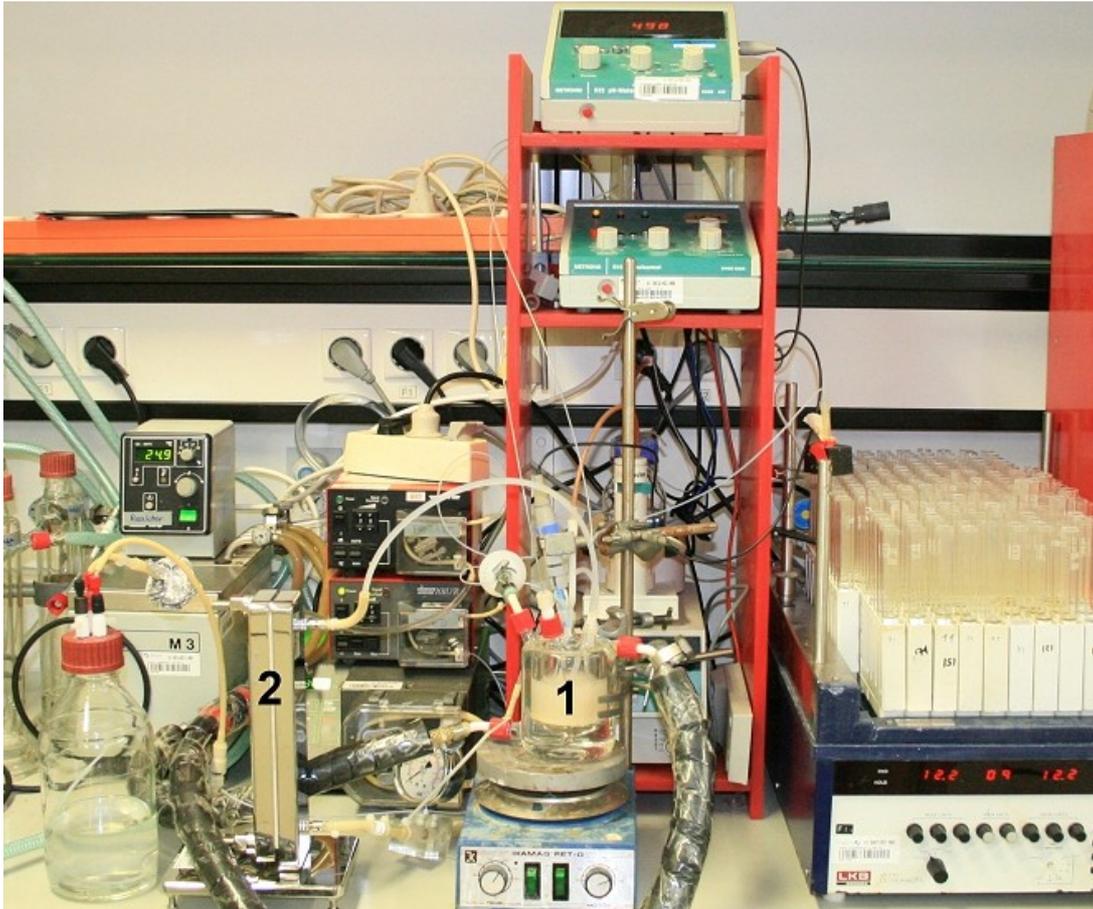


Abbildung 3.29: Anlage zur kontinuierlichen Produktion von 2,5-DKG mit *Gluconobacter oxydans*.
1: Reaktorraum, 2: Membranmodul

3.4.2.2 Stabilität der Zellen im kontinuierlichen Reaktorbetrieb

Für die ersten Reaktorläufe wurden die Bedingungen gewählt, die sich im Satzreaktor als besonders günstig erwiesen hatten (Tabelle 3.9): 25°C, Na-Acetat-Puffer, keine pH-Regulation und eine Biomassekonzentration von 2%. Einen beispielhaften Reaktorlauf unter diesen Bedingungen zeigt Abbildung 3.30.

In den ersten Verweilzeiten steigt die Ausbeute auf zufrieden stellende 74%, fällt dann jedoch innerhalb der nächsten Stunden wieder auf Null ab. Offensichtlich kommt es zu einer schnellen Desaktivierung der Zellen unter den eingestellten Bedingungen.

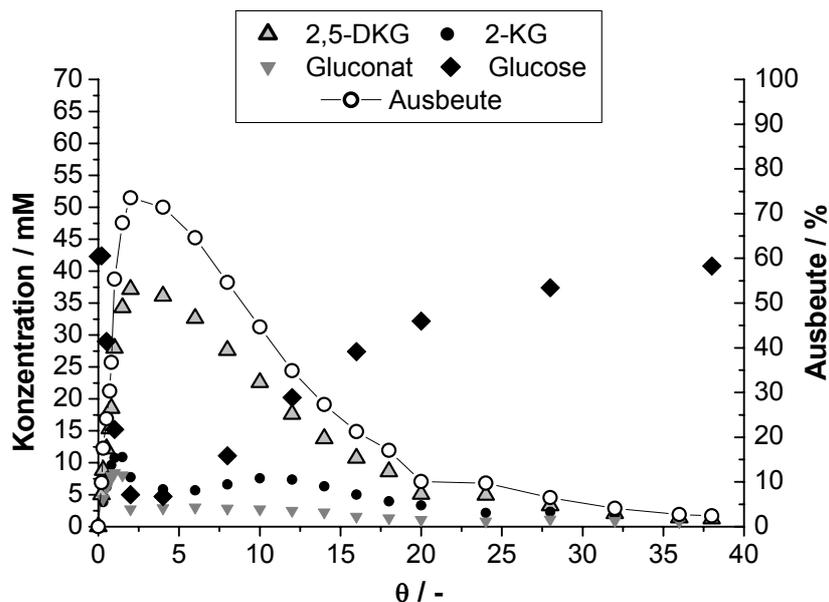


Abbildung 3.30: Kontinuierliche Produktion von 2,5-DKG durch *G. oxydans* NCIMB 8084.
 Bedingungen: $V = 50$ mL, 25°C , 100 mM Na-Acetat, keine Gegentitration, 50 mM Glucose, $\tau = 1$ h,
 20 g_{BFG} / L *G. oxydans* NCIMB 8084.

In den folgenden Reaktorläufen wurde versucht, die Stabilität des Biokatalysators zu erhöhen (Tabelle 3.11). Einwirkende Scherkräfte und mechanische Belastungen wurden durch die Reduzierung des Querstroms gesenkt (Lauf 2). Die Temperatur wurde auf 20°C erniedrigt (Lauf 3). Weiterhin wurde das Puffersystem gewechselt: Neben Na-Acetat-Puffer hatte sich auch KP_i -Puffer im Satzreaktor als günstig erwiesen (Abbildung 3.19). Daher wurde die Stabilität der Zellen in Reaktorläufen mit KP_i -Puffer (Lauf 4) und mit einem kombinierten KP_i -/Na-Acetat-Puffer (Lauf 5) untersucht.

Tabelle 3.11: Kontinuierliche Biotransformationen mit *G. oxydans* NCIMB 8084 ohne pH-Regulation, $\tau=2$ h, Glucosekonzentration 50 mM, 20 g/L_{BFG} Biomasse

Reaktorlauf	1	2	3	4	5
Querstrom [L * h ⁻¹]	6,7	4,5	4,5	6,7	6,7
Temperatur [°C]	25	25	20	25	25
Puffer	100 mM Na-Acetat			50 mM KP_i	50 mM KP_i + 100 mM Na-Acetat

Aus der Abnahme der 2,5-DKG-Konzentration infolge zunehmender Desaktivierung der Zellen wurde die Halbwertszeit des Biokatalysators berechnet (Abbildung 3.31).

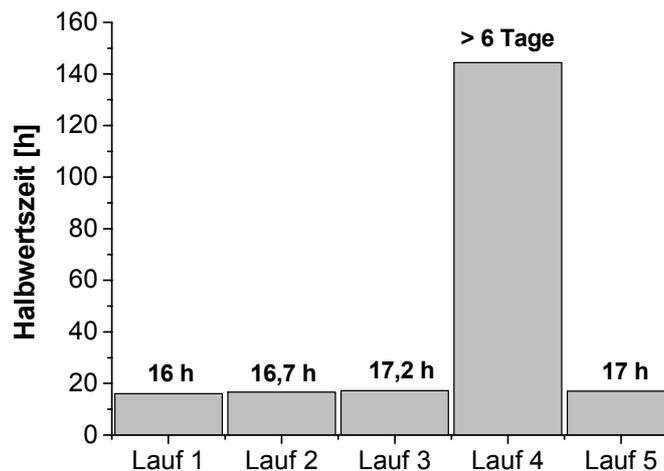


Abbildung 3.31: Stabilität von *G. oxydans* im kontinuierlichen Reaktorbetrieb. Bedingungen: $V = 50$ mL, keine pH-Regulierung, 50 mM Glucose, $\tau = 2$ h, 20 g_{BFG} / L *G. oxydans* NCIMB 8084. Weitere Bedingungen siehe Tabelle 3.11.

Thermische und mechanische Desaktivierungen der Zellen in Lauf 1 können ausgeschlossen werden: Weder bei Reduzierung des Querstroms (Lauf 2) noch bei Verringerung der Temperatur (Lauf 3) stieg die Halbwertszeit der Zellen.

Die Verwendung eines KP_i -Puffers (Lauf 4) hingegen führte zu einer deutlichen Steigerung der Zellstabilität. Offensichtlich hat Na-Acetat einen negativen Einfluss auf die Zellstabilität von *G. oxydans* im kontinuierlichen Prozess – im Satzreaktor und bei Stabilitätsuntersuchungen (vgl. Abbildung 3.25) waren die Zellen in Na-Acetatpuffer hingegen über viele Tage bis Wochen stabil. Dass der Organismus geringe Mengen Kalium- oder Phosphat-Ionen benötigt, die im Satzreaktor als Spuren von Verunreinigungen im gesamten Prozess vorliegen, kann ausgeschlossen werden: Auch bei einem kombinierten Na-Acetat-/ KP_i -Puffer (Lauf 5) trat eine schnelle Zelldesaktivierung ein.

Man könnte vermuten, dass nicht das Puffersystem selbst, sondern zu niedrige pH-Werte im steady-state die Ursache für die Desaktivierung der Zellen sind. Allerdings stellt sich in Na-Acetat-Puffer ein pH-Wert von 4,2 ein, bei KP_i -Puffer ein pH von 3,4. Wenn niedriger pH den Zellen auf lange Sicht schaden würde, wäre die Stabilität in Na-Acetat-Puffer somit höher als in KP_i -Puffer, nicht umgekehrt.

In der Literatur ist beschrieben, dass Acetat das Wachstum von *Gluconobacter oxydans* inhibiert [Poget *et al.* 1994]. Ein negativer Einfluss auf die Zellstabilität wurde bislang noch nicht untersucht, ist aber offensichtlich. Na-Acetat-Puffer eignet sich aus unbekanntem Grund hervorragend für die Produktion von 2,5-DKG im Satzreaktor, aber keinesfalls für einen kontinuierlichen Prozess, möglicherweise wegen der längeren Prozesszeiten. Alle weiteren Reaktorläufe wurden daher mit KP_i -Puffer durchgeführt.

3.4.2.3 Einfluss des pH-Wertes auf die Ausbeute

In einem KP_i -Puffersystem sind die Zellen im kontinuierlichen Prozess über viele Tage stabil, auch ohne pH-Regulierung. Einen solchen Reaktorverlauf zeigt Abbildung 3.32. Eingezeichnet ist auch die theoretische Ausbeute, die man anhand der kinetischen Konstanten in einem Na-Acetat-Puffer erwarten würde.

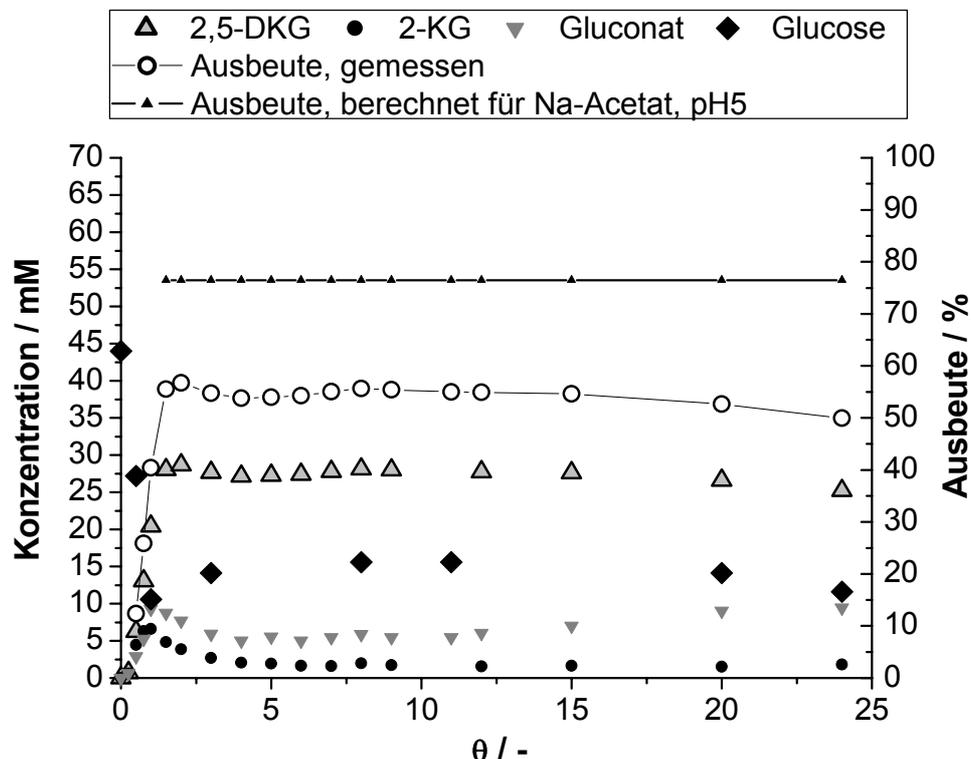


Abbildung 3.32: Kontinuierliche Produktion von 2,5-DKG durch *G. oxydans* NCIMB 8084. Bedingungen: $V = 50$ mL, 25°C , 50 mmol/L KP_i -Puffer, keine pH-Gegentitration, 50 mM Glucose, $\tau = 2$ h, 20 g_{BFG} / L *G. oxydans* NCIMB 8084, Umwälzung $6,7$ L/h.

Die Ausbeute in KP_i -Puffer ist relativ gering, sie beträgt nur etwa 50%. Anhand der kinetischen Konstanten würde man in Na-Acetat-Puffer eine Ausbeute von etwa 77% erwarten. Das ist auch die Ausbeute, die sich in einem kontinuierlichen Prozess in Na-Acetat-Puffer einstellt – bevor die Zellen inaktiv werden (vgl. Abbildung 3.30).

Wie bereits erwähnt, fällt der pH-Wert des KP_i -Puffers im kontinuierlichen Prozess auf 3,4. Bei diesem pH-Wert ist die Aktivität der Zellen jedoch relativ gering (vgl. 3.3.3.2). Um die Ausbeute zu steigern, wurde der pH-Wert daher durch Titration mit KOH auf den konstanten Wert von 5 eingestellt. In diesem Fall ist auch in KP_i -Puffer eine Ausbeute von etwa 80% zu erreichen (Abbildung 3.33).

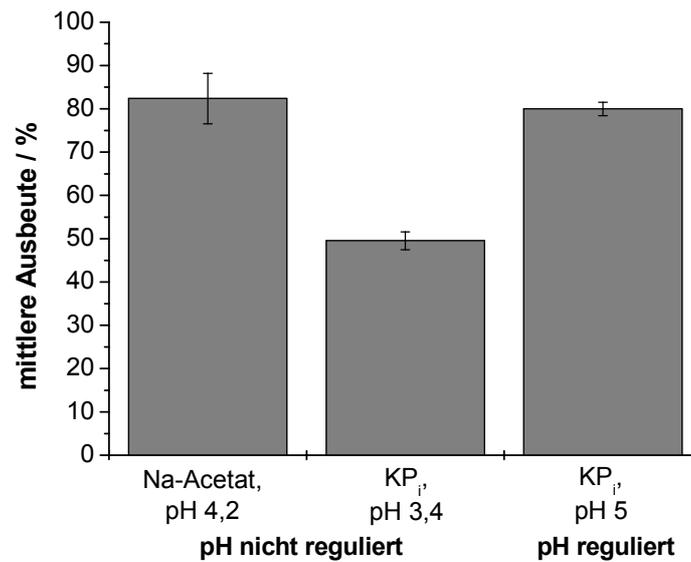


Abbildung 3.33: Ausbeuten bei kontinuierlichen Biotransformationen mit *G. oxydans* NCIMB 8084 in verschiedenen Puffern. Bedingungen: V = 50 mL, 25°C, 50 mmol/L KP_i-Puffer oder 100 mmol/L Na-Acetat-Puffer, u.U. pH-Gegentitration mit 1N KOH, 50 mM Glucose, $\tau = 1-2$ h, 10-20 g_{BFG} / L *G. oxydans* NCIMB 8084, Umwälzung 6,7 L/h.

Wie bereits erläutert, besitzen die drei membrangebundenen Dehydrogenasen unterschiedliche pH-Optima: 5,5 (Glucose-Dehydrogenase), 4,0 bis 5,0 (Gluconat-dehydrogenase) und 4,0 (2-KG-Dehydrogenase). Bei einem pH-Wert von 3,4 ist die Aktivität der Glucosedehydrogenase relativ gering, was die geringe Ausbeute in einem KP_i-Puffer ohne pH-Regulierung erklärt.

In einem CSTR stellt sich ein konstanter pH-Wert ein. Bei diesem müssen alle drei Enzyme hinreichend aktiv sein. In folgenden Reaktorläufen wurde der pH-Wert zwischen 4 und 5,5 variiert (Abbildung 3.34):

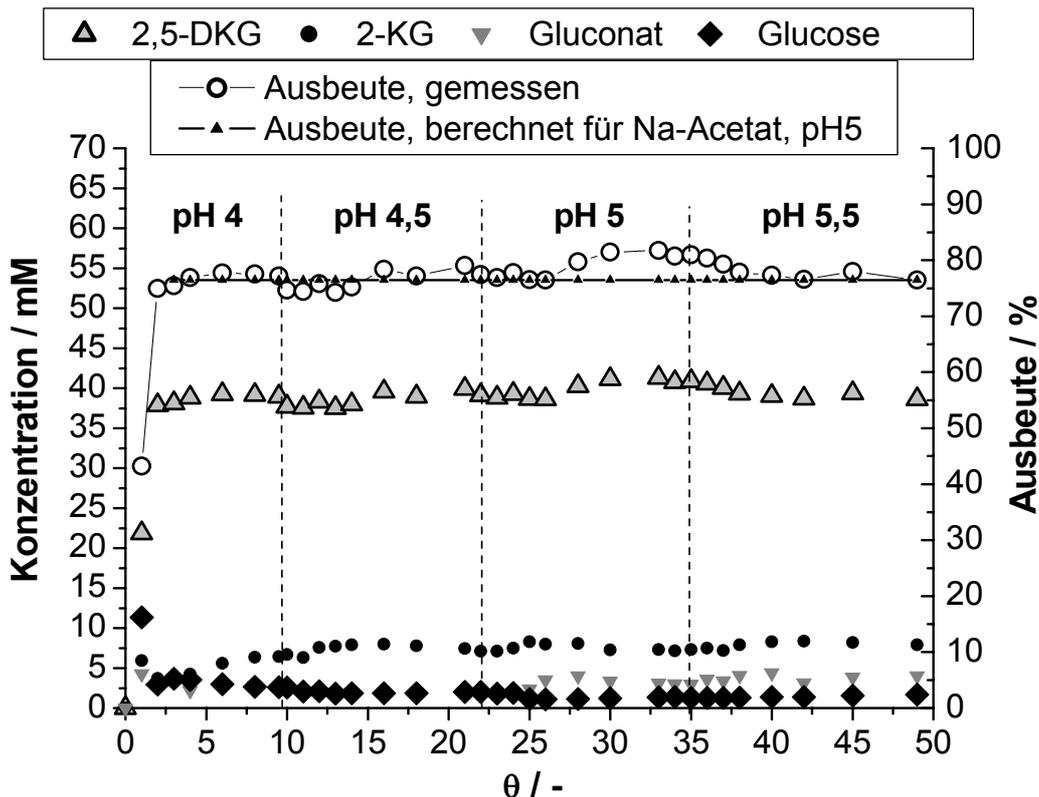


Abbildung 3.34: Einfluss des pH-Wertes im kontinuierlichen Reaktorbetrieb. Bedingungen: $V = 50 \text{ mL}$, 25°C , 50 mM Glucose, 50 mM KPi -Puffer, pH durch Titration mit 2 M KOH eingestellt, $\tau = 2 \text{ h}$, $20 \text{ g}_{\text{BFG}} / \text{L}$ *G. oxydans* NCIMB 8084, Umwälzung $6,7 \text{ L/h}$.

Abbildung 3.35 zeigt den Einfluss unterschiedlicher pH-Werte auf die Ausbeuten und Raumzeitausbeuten.

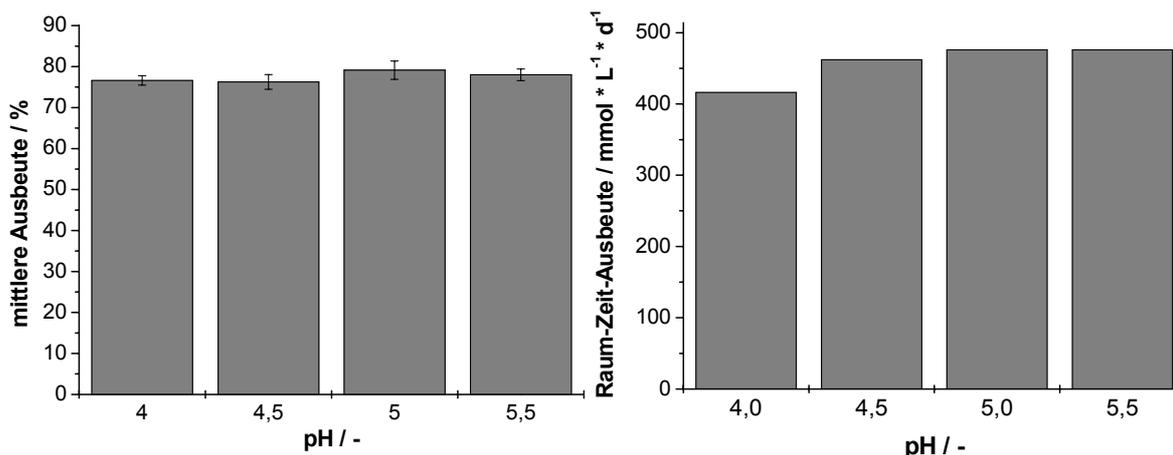


Abbildung 3.35: Einfluss des pH-Wertes auf die Ausbeute und Raumzeitausbeute bei kontinuierlichen Biotransformationen mit *G. oxydans* NCIMB mit verschiedenen pH-Werten. Bedingungen: $V = 50 \text{ mL}$, 25°C , 50 mmol/L KPi -Puffer, pH-Gegentitration mit 1 N KOH, 50 mM Glucose, $\tau = 2 \text{ h}$, $20 \text{ g}_{\text{BFG}} / \text{L}$ *G. oxydans* NCIMB 8084, Umwälzung $6,7 \text{ L/h}$.

Die Aktivität der Zellen ist bei allen pH-Werten zwischen 4 und 5,5 annähernd gleich hoch. Die beobachteten Schwankungen sind nicht signifikant. Da *G. oxydans* bei pH5 hinreichend lange stabil ist (Abbildung 3.25), wurde für alle nachfolgenden Reaktorläufe pH5 gewählt.

Wie aus Abbildung 3.34 ersichtlich ist, eignet sich das theoretische Modell, das auf den kinetischen Konstanten in Na-Acetat-Puffer basiert, dazu, die tatsächlichen Ausbeuten im kontinuierlichen Prozess in KP_i -Puffer voraussagen: Die ermittelten Ausbeuten stimmen sehr gut mit den berechneten überein.

3.4.2.4 Variation der Glucosekonzentrationen

Bei der Wahl der Reaktorparameter steht eine Maximierung der Ausbeute, bei gleichzeitig hoher Raumzeitausbeute im Mittelpunkt. Ein wichtiger Parameter dabei ist die Substratkonzentration. Wie in Abschnitt 3.3.4.4 erläutert, sollte die Glucosekonzentration aufgrund der Reaktionskinetik im Bereich von 25 bis 50 mmol/L liegen. Abbildung 3.36 zeigt, welche Produkt- und Raumzeitausbeuten bei diesen Glucosekonzentrationen erzielt wurden. Zum Vergleich wurden auch Reaktorverläufe mit 100 mM Glucose durchgeführt.

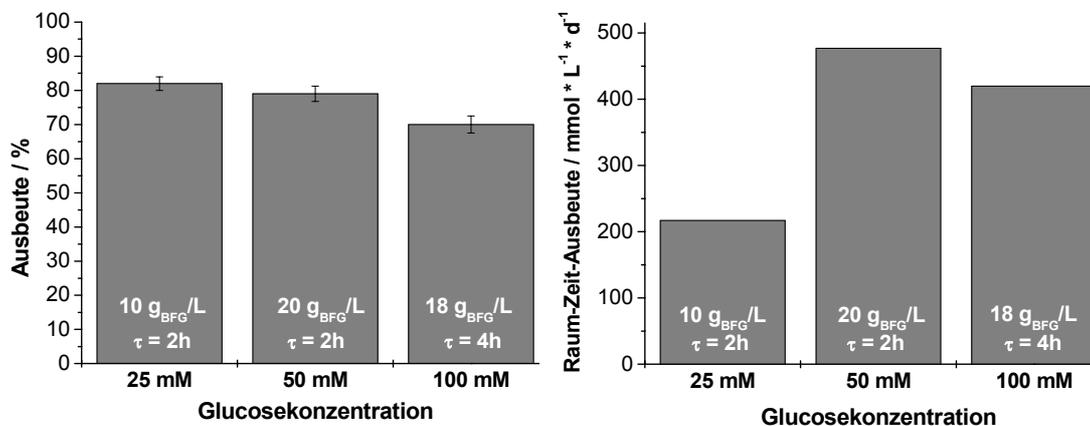


Abbildung 3.36: Erzielte Produktausbeuten und Raumzeitausbeuten im kontinuierlichen Reaktorbetrieb in Abhängigkeit der Substratkonzentration. Bedingungen: V = 50 mL, 25°C, 50 mmol/L KP_i -Puffer, pH-Gegentitration mit 1N KOH auf pH 5, Umwälzung 6,7 L/h.

Die Ausbeute ist bei Glucosekonzentrationen von 25 und 50 mM in etwa gleich hoch (25 mM: 82%; 50 mM: 79%, nicht signifikant). Diese geringen Unterschiede liegen in der Kinetik der Zellen begründet: Ihre Aktivität ist bei 50 mM zwar etwas höher als bei 25 mM (vgl. Abbildung 3.23), bei 50 mM ist jedoch auch die Produktinhibierung durch 2,5-DKG stärker. Diese beiden Effekte dürften sich in etwa ausgleichen. Da bei beiden

3.4. Kontinuierlicher Biotransformationsprozess

Reaktorläufen eine Verweilzeit von zwei Stunden gewählt wurde, ist folglich die Raumzeitausbeute bei 50 mM etwa doppelt so hoch wie bei 25 mM (477 versus $217 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$).

Bei 100 mM Glucose wurde eine Ausbeute von nur 70 % erzielt – und das obwohl die Verweilzeit auf vier Stunden verlängert wurde. Vermutlich ist die Inhibierung durch das Produkt 2,5-DKG der Grund für diese relativ geringe Ausbeute (vgl. Abbildung 3.24): Bei einer Glucosekonzentration von 100 mM ist die 2,5-DKG-Konzentration im Reaktor konstant hoch und hemmt die Zellen.

Eine Glucosekonzentration von 50 mM ist in Bezug auf Zellaktivität, Raum-Zeit-Ausbeute und Kinetik ein guter Kompromiss.

Alle oben gezeigten Ausbeuten sind im Experiment tatsächlich ermittelte Werte. Abbildung 3.37 zeigt hingegen den Verlauf der Ausbeuten und Raum-Zeit-Ausbeuten anhand des kinetischen Modells.

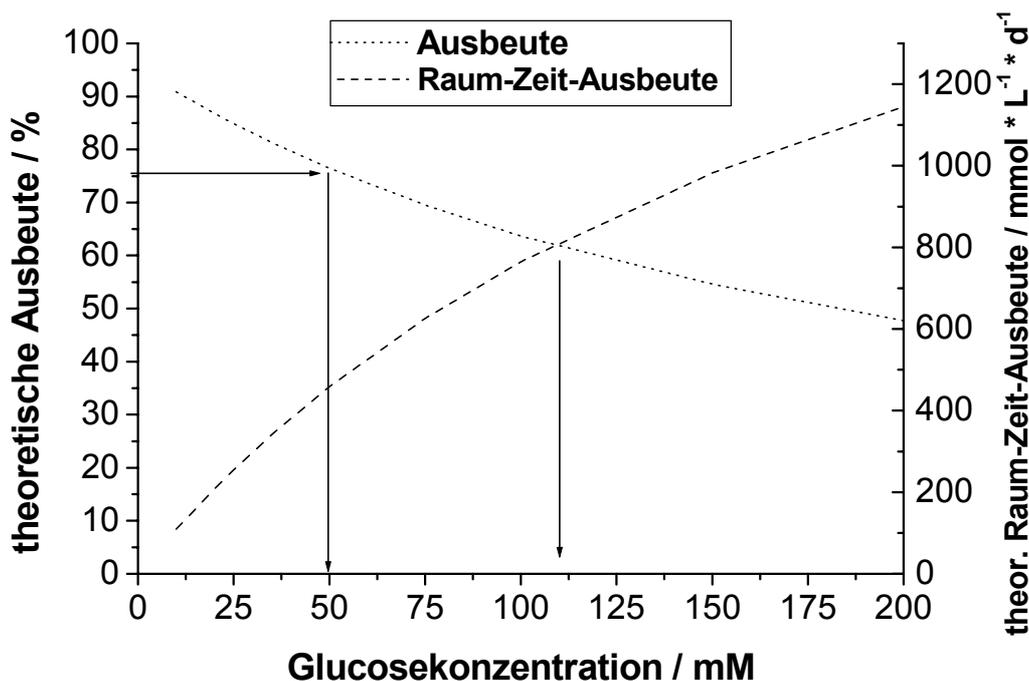


Abbildung 3.37: Theoretische Ausbeuten und Raumzeitausbeuten bei unterschiedlichen Glucosekonzentrationen. Biomassekonzentration = $20 \text{ g}_{\text{BFG}}/\text{L}$, $\tau = 2 \text{ h}$.

Danach wäre eine Glucosekonzentration von etwa 110 mM der beste Kompromiss zwischen Ausbeute und Raumzeitausbeute. Die Ausbeute beträgt dann jedoch nur circa 60% – das ist für eine industrielle Anwendung zu wenig und wegen der schwierigen Abtrennung nicht sinnvoll. 2,5-DKG ist nicht das gewünschte Endprodukt, sondern soll in einem zweiten Reaktor enzymatisch zu 2-KLG reduziert werden. Wie in Abschnitt

4.6.1.3 gezeigt wird, inhibieren sowohl Gluconat als auch 2-KG das Enzym stark. Daher ist eine Glucosekonzentration von 50 mM die beste Lösung: Die Ausbeute beträgt dann theoretisch 76%, die Raumzeitausbeute ist mit $459 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ recht hoch.

3.4.2.5 Einfluss von Verweilzeit und Biomassekonzentration

Reduziert man die Verweilzeit des Substrates, nimmt die Produktausbeute ab einer bestimmten Verweilzeit ab. Wie kurz die Verweilzeit gewählt werden kann, ohne zu einem Verlust der Ausbeute zu führen, ist abhängig von der Aktivität der Zellen.

Abbildung 3.38 zeigt, wie sich eine Reduktion der Verweilzeit auf die 2,5-DKG-Bildung im kontinuierlichen Reaktorbetrieb auswirkt. Die erzielten Ausbeuten und Raumzeitausbeuten gibt Tabelle 3.12 wieder.

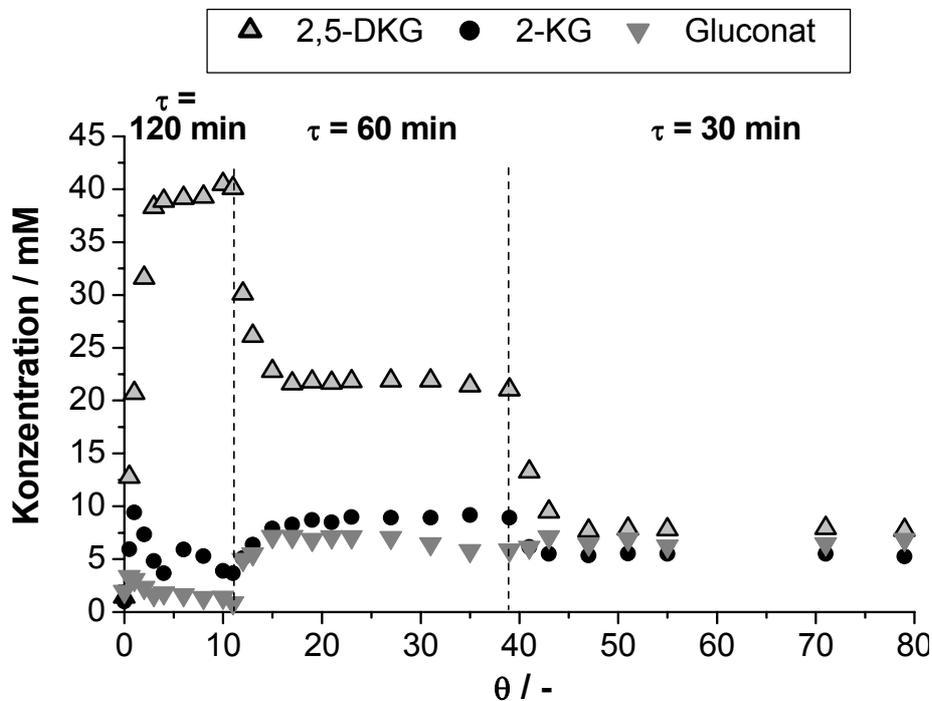


Abbildung 3.38: Einfluss der Verweilzeit auf die 2,5-DKG-Bildung im kontinuierlichen Reaktorbetrieb. Bedingungen: $V=50 \text{ mL}$, 50 mM Glucose, 25°C , 50 mM KP_i -Puffer, pH 5 durch Titration mit 2 M KOH, $20 \text{ g}_{\text{BFG}}/\text{L}$ *G. oxydans* NCIMB 8084.

Tabelle 3.12: Ausbeuten und Raumzeitausbeuten in Abhängigkeit der Verweilzeit. (Biomassekonzentration: $2 \text{ \%} = 20 \text{ g}_{\text{BFG}}/\text{L}$; 50 mM Glucose)

Verweilzeit τ [min]	Ausbeute [%]	Raumzeitausbeute [mmol * L ⁻¹ * d ⁻¹]
120	80	473
60	43	518
30	15	374

3.4. Kontinuierlicher Biotransformationsprozess

Offensichtlich war bei einer Verweilzeit von zwei Stunden die maximale Leistungsfähigkeit des Reaktorsystems unter den gegebenen Bedingungen erreicht. Bei einer weiteren Verringerung der Verweilzeit auf eine Stunde sank die Produktausbeute stark, von etwa 80% auf etwa 42%.

Wenn die Verweilzeit in einem Reaktorsystem erniedrigt wird, sinkt für gewöhnlich die Produktausbeute, die Raumzeitausbeute steigt jedoch. Interessanterweise nehmen hier jedoch sowohl Ausbeute als auch Raumzeitausbeute ab, wenn die Verweilzeit weiter von 60 auf 30 Minuten reduziert wird. Das liegt daran, dass sich die Ausbeute dabei auf weniger als die Hälfte erniedrigt (von 43 auf 15%). Eine solch hohe Ausbeutereducierung ist ungewöhnlich; der Grund ist vermutlich, dass es sich um eine dreistufige Reaktion handelt. Ist die Verweilzeit zu gering, kommt es zu einer Anhäufung der Intermediate Gluconat und 2-KG, da die Verweilzeit nicht ausreicht, um die Oxidation zu 2,5-DKG „abzuschließen“.

Für gewöhnlich kann eine Erhöhung der Biomassekonzentration der Ausbeuteverringering entgegenwirken, die beobachtet wird, wenn die Verweilzeit verringert wird. Daher wurde die Biomassekonzentration von bislang 2 % auf 8 % gesteigert, auch wenn hierbei mit einer Sauerstofflimitierung zu rechnen ist. Tabelle 3.13 gibt die erzielten Produkt- und Raumzeitausbeuten wieder. Abbildung 3.39 zeigt den Verlauf des Reaktorlaufs.

Tabelle 3.13: Vergleich der Reaktorläufe mit 2 % und 8 % Biomasse (20 bzw. 80 g_{BFG}/L). (50 mM Glucose)

	2 % Biomasse	8 % Biomasse	2 % Biomasse	8 % Biomasse
Verweilzeit [min]	Ausbeute [%]		Raumzeitausbeute [mmol * L ⁻¹ * d ⁻¹]	
24	---	21	---	593
30	15	25	374	589
60	43	65	518	773
120	80	---	473	---

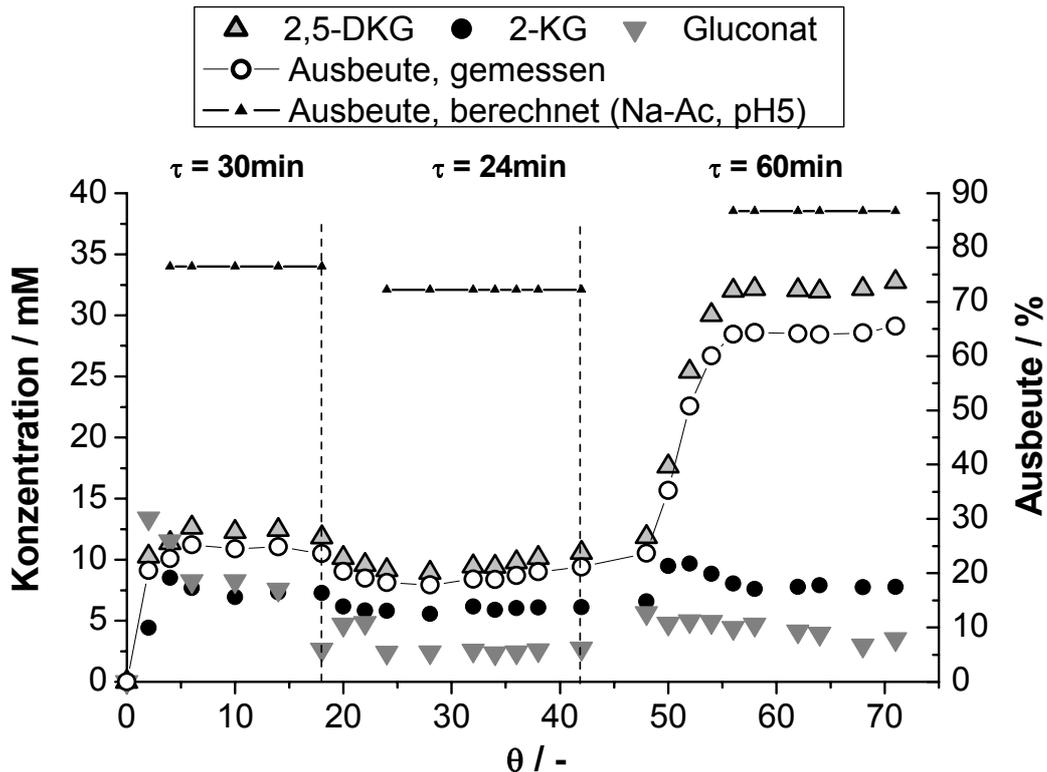


Abbildung 3.39: Einfluss der Verweilzeit auf die 2,5-DKG-Bildung im kontinuierlichen Reaktorbetrieb. Bedingungen: $V=50$ mL, 50 mM Glucose, 25°C, 50 mM KP_i -Puffer, pH 5 durch Titration mit 2 M KOH, 80 g_{BFG}/L *G. oxydans* NCIMB 8084.

Wie erwartet, führt eine Erhöhung der Biomassekonzentration von 2 auf 8% zu einer Steigerung der Produktausbeute bei gleichen Verweilzeiten: Bei einer Verweilzeit von 30 Minuten wurde eine Produktausbeute von 25% erzielt (15% bei 2% Biomasse). Bei 60 Minuten Verweilzeit konnte eine Produktausbeute von 65% erreicht werden (42% bei 2% Biomasse). Auch die maximale Raumzeitausbeute ist mit $773 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ bei 60 Minuten Verweilzeit größer als beim Reaktorbetrieb mit 2% Biomasse ($518 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$).

Dennoch bleiben die beobachteten Ergebnisse hinter den Erwartungen zurück. Eine Steigerung der Biomassekonzentration auf das Vierfache sollte einen deutlicheren Anstieg der Produkt- und Raumzeitausbeuten bewirken.

In Abbildung 3.40 ist gezeigt, wie die Ausbeute ansteigt, wenn das Produkt aus Verweilzeit und Biomassekonzentration erhöht wird. Oben sieht man die theoretischen Ausbeuten, die mithilfe des kinetischen Modells berechnet wurden, unten die real ermittelten Ausbeuten.

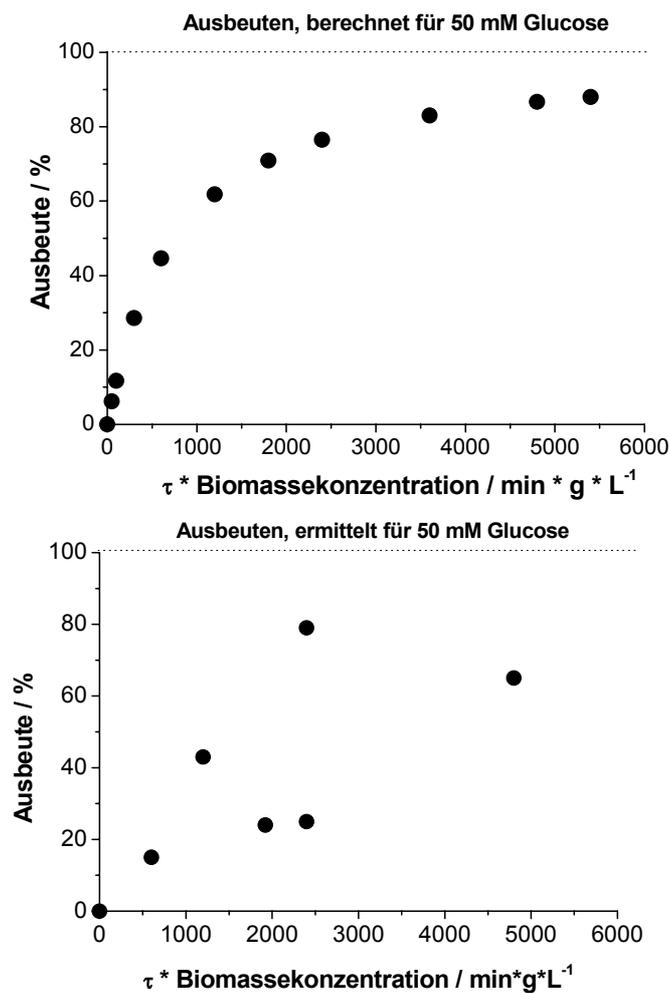


Abbildung 3.40: Abhängigkeit der Ausbeute von dem Produkt aus Biomassekonzentration und Verweilzeit bei einer Glucosekonzentration von 50 mM. Oben: Durch Simulation berechnete Werte. Unten: Im Experiment ermittelte Werte.

Die Simulationsergebnisse (oben) zeigen, dass die Ausbeute zunächst stark ansteigt, wenn Biomasse und/oder Verweilzeit erhöht werden. Anschließend wird die Kurve flacher: Um bedeutende Ausbeutesteigerungen zu erreichen, müssen Verweilzeit und/oder Biomassekonzentration massiv erhöht werden. Die Produktinhibierung durch 2,5-DKG dürfte dazu beitragen, dass eine Ausbeute von 100% so gut wie nicht realisierbar ist. Um eine Ausbeute von 83% zu erreichen, sind beispielsweise Biomassekonzentrationen von 30 g/L und Verweilzeiten von 120 min sinnvoll.

Auch bei den ermittelten Ausbeuten (Abbildung 3.40, unten) steigt im Durchschnitt die Ausbeute, wenn Biomassekonzentration und/oder Verweilzeit erhöht werden. Jedoch wird der flache Abschnitt der Kurve hier sehr viel früher erreicht (real bei etwa 2500 min*g*L⁻¹, theoretisch erst bei etwa 5000 min*g*L⁻¹). Ausbeuten von größer als 80% konnten unter keinen Umständen beobachtet werden. Nach Modellsimulationen

liegt die Ausbeute bei 8% BM und einer Verweilzeit von 30 Minuten bei 76%, tatsächlich beobachtet wurde ein Drittel davon, nämlich 25%.

Die Diskrepanz zwischen Modell und Wirklichkeit ist vermutlich auf die zu starke Verallgemeinerung des Modells zurückzuführen: Das geht von einer einstufigen Reaktion aus, in Wirklichkeit handelt es sich um drei aufeinanderfolgende Schritte. Zudem geht das Modell davon aus, dass stets ausreichend Sauerstoff vorhanden ist, was in Wirklichkeit – besonders bei hohen Biomassekonzentrationen – sicher nicht der Fall ist. Eine stärkere Belüftung des Reaktors könnte der Sauerstofflimitierung zumindest teilweise entgegenwirken. Doch auch bei hohen Begasungsraten ist eine stets ausreichende Sauerstoffversorgung der Zellen nicht unbedingt gewährleistet. Bei zu starker Begasung erniedrigt sich die Kontaktfläche zwischen Gasphase (Blasen) und Flüssigkeit, der tatsächlich gelöste Sauerstoffanteil in der Lösung kann dann sogar weniger werden [Seiskari *et al.* 1985].

Entscheidend wäre es also, den Anteil des gelösten Sauerstoffs im Medium zu steigern. Das ist durch einen erhöhten Reaktorinnendruck möglich oder durch die Zugabe von Perfluorocarbonen, die die Sauerstofflöslichkeit des Mediums erhöhen.

3.4.2.6 Vergleichende Betrachtung & Zusammenfassung

Der entwickelte Reaktor eignet sich hervorragend zur kontinuierlichen Produktion von 2,5-DKG. Einen Überblick über erzielte Produkt- und Raumzeitausbeuten gibt Tabelle 3.14.

Tabelle 3.14: Erreichte (Raum-Zeit-)Ausbeuten bei kontinuierlichen Biotransformationen mit *G. oxydans* NCIMB 8084 in 50 mmol/L KP_i -Puffer.

	A	B	C	D	E	F
Konz. Glucose / mM	50	50	25	100	50	50
Verweilzeit / h	2	2	2	4	1	1
pH	3,4	5	5	5	5	5
Biomasse-konzentration / %	2	2	1	18	2	8
Mittlere Ausbeute / %	54	79	82	70	43	65
Raum-Zeit-Ausbeute / mmol * L⁻¹ * d⁻¹	317	476	217	420	518	773
Raum-Zeit-Ausbeute / g * L⁻¹ * d⁻¹	62	92	42	82	101	150
Katalysatorausnutzung [g_{Produkt}/g_{BFG}]	6,7	24,2	19,9	20,6	10,4	2,3

3.4. Kontinuierlicher Biotransformationsprozess

Die höchste Ausbeute betrug 82% bei einer Glucosekonzentration von 25 mM – hier war die Raumzeitausbeute mit $217 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ jedoch nur sehr niedrig. Die höchste Raumzeitausbeute war $773 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ bei einer Biomassekonzentration von 8%, hier betrug die Ausbeute jedoch nur 65%. Der beste Kompromiss ist eine Glucosekonzentration von 50 mM und eine Biomassekonzentration von 2%: Hier wurde eine Ausbeute von 79% und eine Raumzeitausbeute von $476 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ erzielt. Die Katalysatorausnutzung war unter diesen Bedingungen auch am höchsten, sie wäre generell aber bei längeren Versuchsdauern noch gestiegen.

Die optimierten Reaktionsbedingungen für den Betrieb eines kontinuierlichen Reaktors zur Produktion von 2,5-DKG zeigt zusammengefasst Tabelle 3.15.

Tabelle 3.15: Optimierte Reaktionsbedingungen für die Produktion von 2,5-DKG mit *Gluconobacter oxydans* im CSTR

Temperatur	25°C
Puffer; pH	50 mM KPi ; Titration auf pH5
Begasung	Reiner Sauerstoff
Biomassekonzentration	2 % = 20 $\text{g}_{\text{BFG}}/\text{L}$
Verweilzeit	2 h
Glucosekonzentration	50 mM
Ausbeute	75-80 %
Raum-Zeit-Ausbeute	$\approx 476 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ $\approx 92 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$

In dieser Arbeit wurde das erste Mal eine kontinuierliche Produktion von 2,5-DKG mit ruhenden *G. oxydans* Zellen durchgeführt. In der Literatur wurde bisher lediglich eine kontinuierliche Produktion von Gluconsäure in demselben Reaktorsystem beschrieben [Doneva *et al.* 1999]: Auch dort wurden *G. oxydans* Zellen mit Hilfe eines Membranmoduls im Reaktor zurückgehalten. Allerdings enthielt das Reaktionsmedium Hefeextrakt, so dass die Zellen noch wuchsen. Die Biomassekonzentrationen waren mit 1-3 g/L (0,1-0,3%) sehr viel geringer. Doneva *et al.* konnten einen Umsatz von 99% und eine Raumzeitausbeute von $960 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ erreichen. Allerdings ist für die Produktion von Gluconsäure nur ein Drittel des Sauerstoffeintrags erforderlich wie für die Produktion von 2,5-DKG. Es ist somit nicht verwunderlich, dass dabei höhere Ausbeuten erreicht wurden.

Tabelle 3.16: Vergleich der Ergebnisse im kontinuierlichen Rührkesselreaktor mit in der Literatur angegebenen Werten

	Diese Arbeit	[Doneva <i>et al.</i> 1999]	[Seiskari <i>et al.</i> 1985]	[Buse <i>et al.</i> 1992a]
Kontinuierliche Produktion von	2,5-DKG	Gluconsäure	Gluconsäure	2,5-DKG
Reaktorsystem	CSTR	CSTR	CSTR	Chemostat
Konz. Glucose [mM]	50	400	500	100
Biomasse	ruhende <i>G. oxydans</i> NCIMB 8084	wachsende <i>G. oxydans</i> NBIMCC 1043 (=NCIMB 8084)	immobilisierte, wachsende <i>G. oxydans</i> IFO 3290	wachsende <i>G. oxydans</i> ATCC 9937 (=NCIMB 8084)
Ausbeute [%]	79	99 (Umsatz)	86	60
Raum-Zeit-Ausbeute [mmol * L⁻¹ * d⁻¹]	476	960	1567	312

Desweiteren berichten Seiskari *et al.* von einem CSTR mit immobilisierten, aber wachsenden *G. oxydans* Zellen an Nyloncarriern [Seiskari *et al.* 1985]. Der Reaktor lief über sechs Monate mit einer Ausbeute von 73% und einer Raumzeitausbeute von 649 mmol*L⁻¹*d⁻¹, produzierte jedoch ebenfalls lediglich Gluconsäure und kein 2,5-DKG. Ketogluconsäuren wurden auch gebildet, waren jedoch unerwünscht.

Die einzigen in der Literatur beschriebenen kontinuierlichen Reaktoren zur Produktion von 2,5-DKG mit *Gluconobacter oxydans* sind Chemostat-Bioreaktoren mit wachsenden Zellen [Buse *et al.* 1992a]. Produkt- und Raumzeitausbeuten lagen hier bei 60% bzw. 312 mmol*L⁻¹*d⁻¹, also weit unter den in dieser Arbeit erzielten Werten.

3.5. Isolierung von 2,5-Diketogluconat als Hemicalciumsalz⁷

Zwar soll die 2,5-DKG-Lösung aus dem CSTR ohne weitere Aufarbeitung in den zweiten Reaktor geleitet werden und dort zu 2-KLG reduziert werden – ein Bruchteil des produzierten 2,5-DKG wurde jedoch isoliert und aufgereinigt. 2,5-DKG ist nicht kommerziell verfügbar und die Isolation daher beispielsweise zur Herstellung von Referenzsubstanz für die Analytik interessant.

⁷ Teile der Ergebnisse sind aus der Diplomarbeit von Roman Bucerius (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2008)

3.5. Isolierung von 2,5-Diketogluconat als Hemicalciumsalz

Über die Isolierung und Aufreinigung von 2,5-DKG ist in der Literatur bisher wenig bekannt. Isolierungsversuche führen oft zu signifikanten Verlusten von 30 oder sogar 80% [Sonoyama *et al.* 1982, Stroshane *et al.* 1977]. Vor allem bei höheren Temperaturen und in alkalischer Lösung zersetzt sich die Substanz schnell [Bloemsma *et al.* 1963]: Bereits ab einem pH-Wert von größer 4,5 werde die Verbindung instabil.

Die von Blake *et al.* vorgeschlagene säulenchromatographische Aufreinigungsmethode über ein Kationenaustauscherharz war nicht reproduzierbar [Blake *et al.* 1984]. Auch die Chromatographie über einen starken Anionentauscher, die Udo Kragl zur Aufarbeitung von N-Acetylneuraminsäure entwickelt hatte [Kragl 1992], blieb ohne Erfolg.

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode führte zur Isolierung des 2,5-DKG als Hemicalciumsalz $\text{Ca}(2,5\text{-DKG})_2$. Dafür wurde Calciumcarbonat zu einer essigsauren, 2,5-DKG-haltigen Lösung gegeben; durch Zugabe von Aceton wurde das 2,5-DKG-Calciumsalz ausgefällt.

Abbildung 3.41 zeigt die aufgereinigte, weiße Substanz.



Abbildung 3.41: Isoliertes 2,5-Diketogluconat als Hemicalciumsalz $\text{Ca}(2,5\text{-DKG})_2$

Die mit Hilfe der HPLC-Analytik ermittelte Reinheit betrug 54%. Auch durch Lösen und erneutes Fällen konnte die Reinheit nicht weiter gesteigert werden. Abbildung 3.42 zeigt das HPLC-Chromatogramm nach erneuter Fällung.

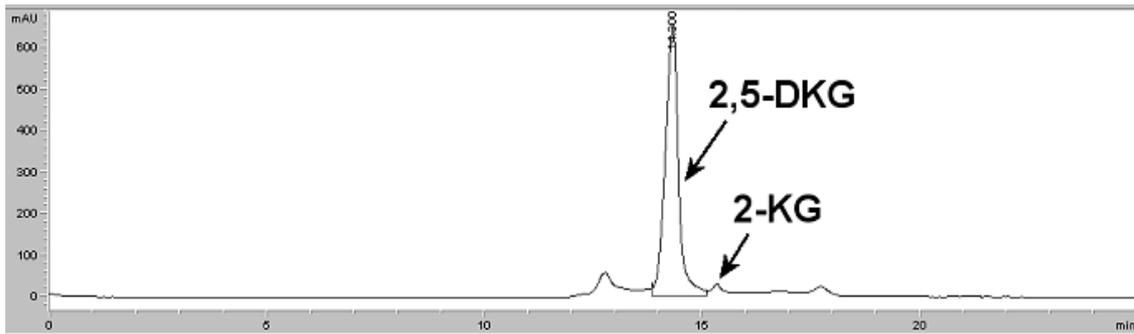


Abbildung 3.42: HPLC-Chromatogramm des isolierten 2,5-DKG-Calciumsalzes

Das Chromatogramm zeigt einen deutlichen Peak bei 14,1 Minuten, der Retentionszeit von 2,5-DKG. Zudem ist eine leichte Verunreinigung durch 2-KG zu erkennen (15,2 Minuten). Ein weiterer Peak bei 12,7 Minuten ist auf ein Zeretzungsprodukt von 2,5-DKG zurückzuführen, das jedoch nicht bestimmt werden konnte. Diese relativ geringen Verunreinigungen erklären nicht die geringe Reinheit des 2,5-DKG von 54%. Den weitaus größten Teil der Verunreinigungen machen höchstwahrscheinlich Puffersalze aus: Sie werden bei der Zugabe von Aceton ebenfalls ausgefällt, sind im HPLC-Chromatogramm jedoch nicht zu sehen.

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren der Verbindung zeigen Abbildung 3.44 und Abbildung 3.44.

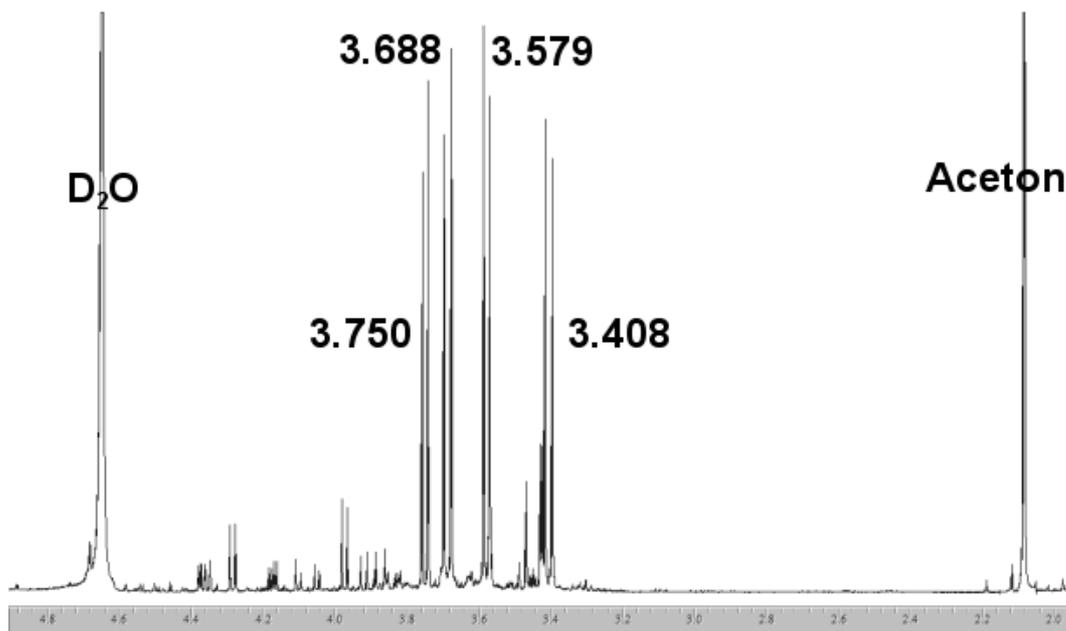


Abbildung 3.43: ^1H -NMR (in D_2O , 600 MHz-Spektrometer) von selbst isoliertem 2,5-DKG

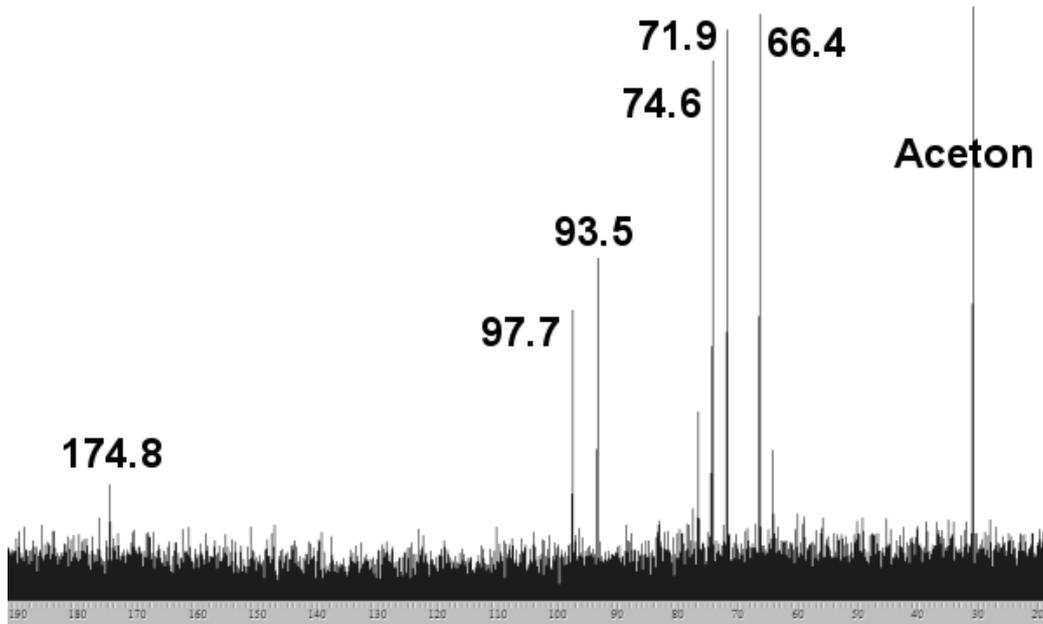


Abbildung 3.44: ^{13}C -NMR (in D_2O , 600 MHz-Spektrometer) von selbst isoliertem 2,5-DKG

2,5-DKG liegt in wässriger Lösung als Sechsrings vor [Crawford *et al.* 1980]:

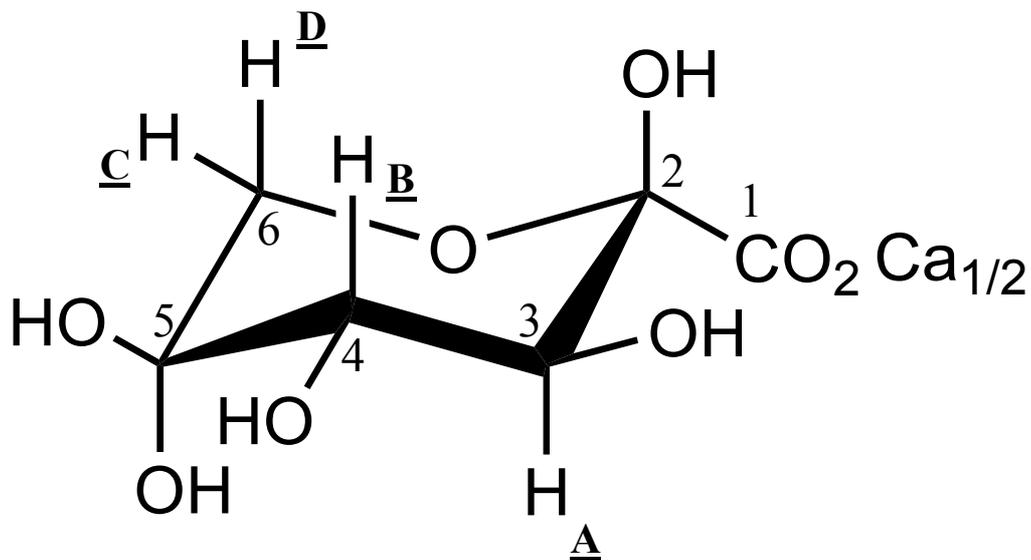


Abbildung 3.45: Struktur von 2,5-DKG in wässriger Lösung

^1H -NMR:

Ein Referenz- ^1H -NMR-Spektrum von 2,5-DKG ist in der Literatur nicht zu finden. Von Prof. Klaus Kulbe aus Wien wurde etwas selbst isoliertes Calcium-2,5-DKG zur Verfügung gestellt. Dessen ^1H -NMR-Spektrum diene als Referenz.

Tabelle 3.17: ^1H -NMR-Verschiebungen und Kopplungskonstanten für selbst isoliertes 2,5-DKG und eine Referenzsubstanz

	δ [ppm] (diese Arbeit)	δ [ppm] (Referenz)	J [Hz] (diese Arbeit)	J [Hz] (Referenz)
H-A	3.579	3.589	$^3J_{\text{HH}} = 9,82$	$^3J_{\text{HH}} = 9,82$
H-B	3.750	3.738	$^3J_{\text{HH}} = 9,82$	$^3J_{\text{HH}} = 9,82$
H-C	3.408	3.418	$^2J_{\text{HH}} = 12,086$	$^2J_{\text{HH}} = 12,086$
H-D	3.688	3.689	$^2J_{\text{HH}} = 12,086$	$^2J_{\text{HH}} = 12,086$

 ^{13}C -NMR:
Tabelle 3.18: ^{13}C -NMR-Verschiebungen für isoliertes 2,5-DKG im Vergleich zu Literaturwerten

	δ [ppm] (diese Arbeit)	δ [ppm] [Crawford <i>et al.</i> 1980]
C1	174.8	175.4
C2	93.5	93.6
C3	71.9	72.2
C4	74.6	74.3
C5	97.7	97.7
C6	66.4	66.7

Aus dem vorliegenden HPLC-Chromatogramm sowie den gemessenen ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren kann geschlossen werden, dass es sich bei der isolierten Substanz um 2,5-DKG handelt (54%, verunreinigt mit Acetonresten, wenig 2-KG und höchstwahrscheinlich Puffersalzen). Die neu entwickelte Methode ist demnach zur Aufreinigung von 2,5-DKG geeignet.

3.6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals ruhende Zellen von *Gluconobacter oxydans* für die Produktion von 2,5-DKG eingesetzt.

Durch eine Optimierung der Wachstumsbedingungen wurde die Biomasseausbeute im Vergleich zu anfänglichen Fermentation stark gesteigert. Vor allem aber konnte die Aktivität der geernteten Zellen stark erhöht werden. Die Kinetik der dreistufigen Reaktion wurde detailliert untersucht und ein kinetisches Modell erstellt, mit dem Reaktorläufe simuliert werden können.

Im Satzreaktor wurden Ausbeuten von 97% erreicht, im kontinuierlichen Prozess Produktausbeuten von 80% und Raumzeitausbeuten von maximal $776 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Es war möglich, diese Ausbeuten im kontinuierlichen Prozess über mehrere Tage zu halten.

Kapitel 4: Reduktion von 2,5-Diketo-D-Gluconat zu 2-Keto-L-Gulonat

4.1. Einleitung: Das Enzym 2,5-Diketo-D-Gluconat-reduktase

In den 1970er Jahren entdeckten Sonoyama *et al.* einen *Corynebacterium*-Stamm, der 2,5-DKG zu 2-KLG umsetzte. Mit den aus dem Erdboden isolierten Zellen erreichten sie jedoch nur Ausbeuten von 20,1% [Sonoyama *et al.* 1976]. Mit einer optimierten Mutante steigerten sie die Ausbeute später auf 90,5% [Sonoyama *et al.* 1987a].

Verantwortlich für die Reduktion ist das Enzym 2,5-Diketo-D-Gluconatreduktase (2,5-DKGR, EC 1.1.1.274) im Cytosol des Bakteriums. Die Reduktase bevorzugt NADPH als Cofaktor und gehört zur Familie der Aldo-Keto-Reduktasen.

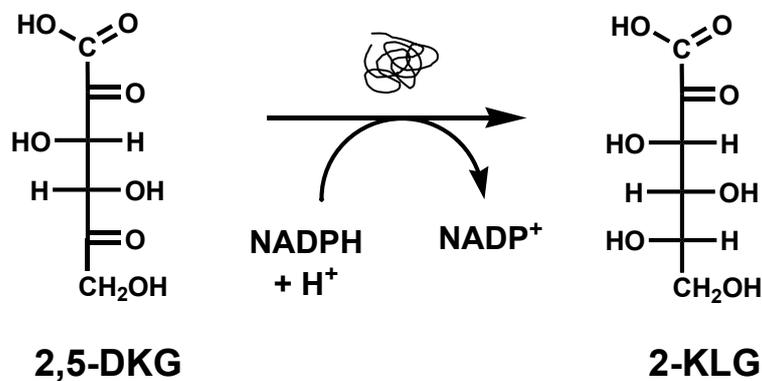


Abbildung 4.1: Reduktion von 2,5-DKG zu 2-KLG mit dem Enzym 2,5-Diketo-D-Gluconatreduktase

Seine Funktion in *Corynebacterium* ist unbekannt: Da das Bakterium nach heutigem Wissen kein 2,5-DKG produziert, ist das physiologische Substrat des Enzyms wahrscheinlich ein anderer Stoffwechselmetabolit [Miller *et al.* 1987].

Sonoyama und Miller gelang unabhängig voneinander im Jahr 1987 erstmals die Isolierung und Aufreinigung des Enzyms [Miller *et al.* 1987, Sonoyama *et al.* 1987b]. Beide schätzten das Molekulargewicht des Enzyms auf 34.000 Dalton.

Sonoyama beschrieb zwei unterschiedliche Formen des Enzyms: Die Variante mit 34.000 Dalton Molekulargewicht wird heutzutage Reduktase A genannt. Die B-Form besitzt ein geringeres Molekulargewicht (29.000 Dalton), eine 33mal höhere Aktivität sowie eine 7,5fache höhere Affinität für 2,5-DKG als die A-Variante [Sonoyama *et al.* 1987b]. Die A-Form ist hingegen stabiler.

Die Struktur der Reduktase A im Komplex mit NADPH lösten 1998 Khurana und seine Mitarbeiter: Sie besteht aus acht α -Helices, acht β -Faltblättern und zwei zusätzlichen

Helices [Khurana *et al.* 1998] (Abbildung 4.2). Der Komplex zwischen NADPH und Enzym wird von 16 Wasserstoffbrücken, 2 ionischen Bindungen und einer aromatischen Ringstapelung stabilisiert. Das Enzym bindet seinen Cofaktor damit weniger fest als andere Aldosereduktasen.

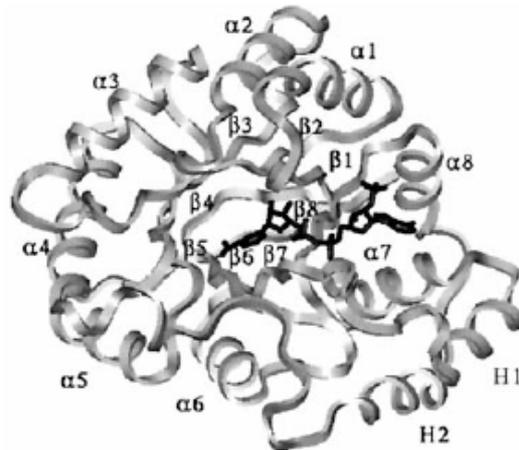


Abbildung 4.2: Struktur des Enzyms 2,5-DKGR A im Komplex mit dem Cofaktor NADPH (schwarz), bestimmt durch Röntgenstrukturanalyse. α 1-8 bezeichnet die α -Helices der Struktur, β 1-8 die β -Faltblätter, H1-2 die zusätzlichen Helices [Khurana *et al.* 1998].

Die Autoren ermittelten auch den zweistufigen Mechanismus, mit dem das Enzym die Reduktion von 2,5-DKG katalysiert (Abbildung 4.3): Dabei tritt erst ein Hydrid-Ion von NADPH auf 2,5-DKG über. Dieses wird stereospezifisch vom vierten Kohlenstoffatom des Nicotinamidrings auf das Carbonyl-C-Atom von 2,5-DKG übertragen. Anschließend erfolgt der Transfer eines Protons von einer Aminosäure des Enzyms zum Sauerstoffanion der früheren Ketogruppe [Khurana *et al.* 1998].

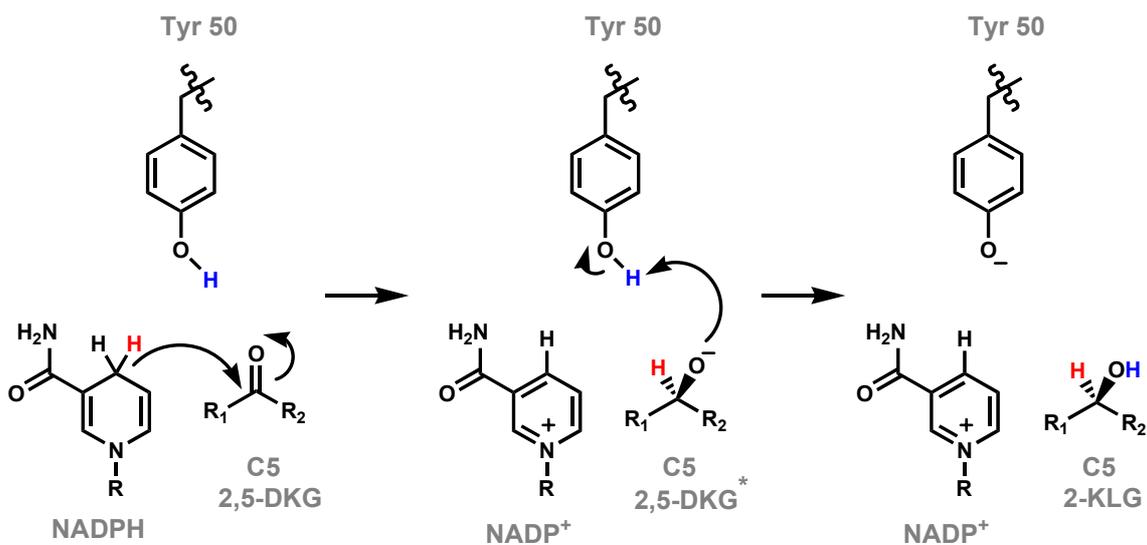


Abbildung 4.3: Reduktion von 2,5-DKG zu 2-KLG mittels 2,5-DKGR [Khurana *et al.* 2000]

Das Enzym ist spezifisch für den phosphorylierten Cofaktor: Laut Literatur bevorzugt es NADPH gegenüber NADH um den Faktor 170 [Miller *et al.* 1987]. NADH ist jedoch günstiger und stabiler. Ein erklärtes Ziel vieler Biotechnologen ist es daher, das Enzym so zu verändern, dass es eine deutlich höhere Affinität für NADH aufweist – beispielsweise mittels gerichteter Mutagenese [Banta *et al.* 2002b].

Unabhängig davon, welcher Cofaktor für die Reduktion verwendet wird, ist eine Cofaktorregenerierung notwendig. NADPH und NADH kosten beide über 10.000 US\$/mol [Wandrey 2004]. Zu einem wirtschaftlich rentablen Prozess können diese Cofaktoren niemals in stöchiometrischer Menge hinzugegeben werden.

Um den oxidierten Cofaktor zu rezyklieren, kommen Enzyme wie die Formiatdehydrogenase (FDH) oder die Alkoholdehydrogenase (ADH) in Frage. Diese oxidieren ein günstiges Substrat, üblicherweise Formiat oder Isopropanol, und reduzieren dabei den oxidierten Cofaktor zurück zur reduzierten Form (Abbildung 4.4). Dabei entstehen als Nebenprodukte lediglich CO₂ oder Aceton.

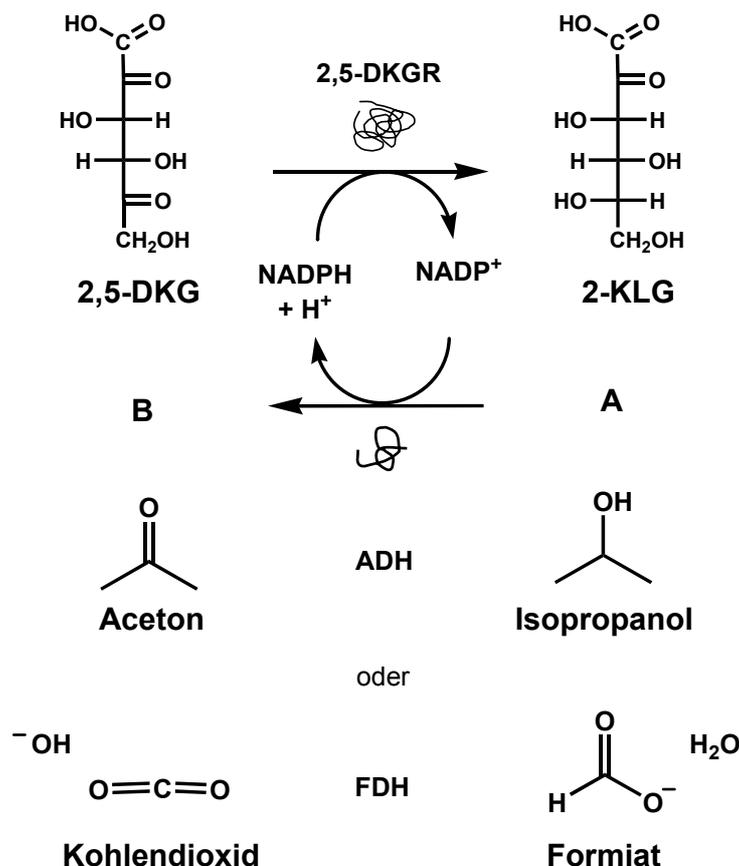


Abbildung 4.4: Regenerierung des Cofaktors NADPH mit Hilfe eines zweiten Enzyms: die Alkoholdehydrogenase (ADH) oxidiert Isopropanol zu Aceton und reduziert dabei NADP⁺, die Formiatdehydrogenase (FDH) oxidiert dafür Formiat zu Kohlendioxid

Um 2,5-DKG zu 2-KLG zu reduzieren, gibt es zwei mögliche Alternativen: Entweder eine Ganzzellbiotransformation oder der Einsatz isolierter Enzyme. Beide Varianten sollen evaluiert werden. Die beste Variante soll dann mit dem im vorherigen Kapitel erarbeiteten Oxidationsschritt zu einer Kaskade gekoppelt werden.

4.2. Einsatz rekombinanter *E. coli*-Zellen zur Reduktion von 2,5-DKG

Zunächst wird im Folgenden die Ganzzellvariante betrachtet. 2,5-DKG soll mit rekombinanten *E. coli*-Zellen zu 2-KLG zu reduziert werden. Diese Bakterien sollen sowohl die 2,5-DKGR exprimieren als auch eine FDH, die Formiat oxidiert und dabei den oxidierten Cofaktor direkt in der Zelle regeneriert.

Formiat ist eine der billigsten Wasserstoffquellen [Wandrey 2004]. Das Gleichgewicht der Reaktion liegt zudem hauptsächlich auf der Seite der CO₂-Bildung. Dieses entweicht aus dem Reaktionsgemisch, was die Oxidation weiter begünstigt. Auch ist die FDH in einem breiten pH-Spektrum aktiv [Seelbach *et al.* 1996].

Die meisten Formiatdehydrogenasen nutzen NAD⁺ als Cofaktor. 1996 wurde über gerichtete Mutagenese eine FDH erhalten, die NADP⁺ benutzt [Seelbach *et al.* 1996]. Dieses Enzym ist als Protein zu kaufen; seine DNA-Sequenz ist jedoch patentrechtlich geschützt. Für die Klonierung eines Plasmids kommt daher nur eine NAD⁺-abhängige FDH in Frage. Zwar bevorzugt laut Literatur die 2,5-DKGR NADPH gegenüber NADH um den Faktor 170 (der K_M-Wert für NADPH ist 10 · 10⁻³ mM) [Miller *et al.* 1987]. Das bedeutet aber, dass das Enzym auch NADH akzeptiert, wenn dieses in hoher Konzentration vorliegt. In den meisten Zellen ist die NADH-Konzentration dreimal so hoch wie die von NADPH [Sanli *et al.* 2004].

Dass die zellinterne Cofaktorregenerierung auch dann mit einer coexprimierten NAD⁺-abhängigen FDH funktioniert, wenn das „Partnerenzym“ NADPH bevorzugt, haben Ernst *et al.* mit einer ADH gezeigt [Ernst *et al.* 2005]. In Anwesenheit von Formiat stieg das intrazelluläre NADH/NAD⁺-Verhältnis auf das Siebenfache. Mit dieser hohen NADH-Konzentration konnte auch die ADH, die ebenso wie die 2,5-DKGR NADPH bevorzugt, diesen Cofaktor nutzen und reduzierte enantioselektiv Ketone in 100%iger Ausbeute.

4.2.1 Klonierung des benötigten Plasmids

Es wurde ein Plasmid konstruiert, welches sowohl die Gene für die 2,5-DKGR sowie für die NAD^+ -abhängige FDH enthält. Ausgangsplasmide waren pEKEX2_fdh (Abbildung 4.5, links) mit dem Gen für die FDH und pDrive-PlacZ-dkgr (Abbildung 4.5, rechts) mit dem Gen für die 2,5-DKGR sowie zwei Genen für eine Ampicillin-beziehungsweise Kanamycin-Resistenz.

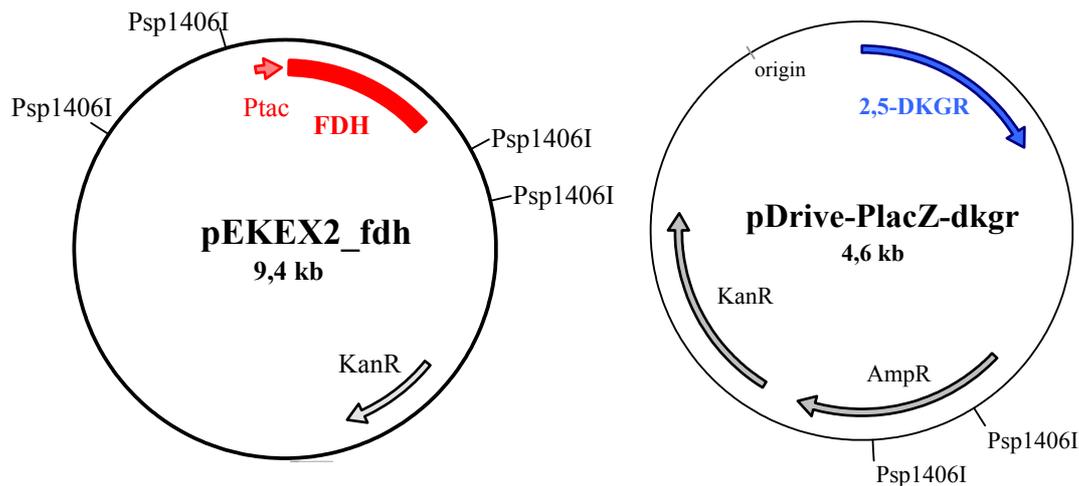


Abbildung 4.5: Links: Plasmid pEKEX2_fdh bestehend aus Ptac-Promotor (Ptac), Formiatdehydrogenase-Gen (FDH) und Kanamycin-Resistenzgen (KanR). Rechts: Plasmid pDrive-PlacZ-dkgr bestehend aus Gen für die 2,5-Diketo-D-Gluconatreduktase (2,5-DKGR), und Kanamycin-Resistenzgen (KanR) und Ampicillin-Resistenzgen (AmpR). Eingezeichnet sind jeweils die Schnittstellen für das Restriktionsenzym Psp 1406I.

Das Gen für die FDH wurde in das Plasmid pDrive-PlacZ-dkgr eingefügt. Die Resistenz gegen Kanamycin blieb dabei erhalten, die gegen Ampicillin ging verloren.

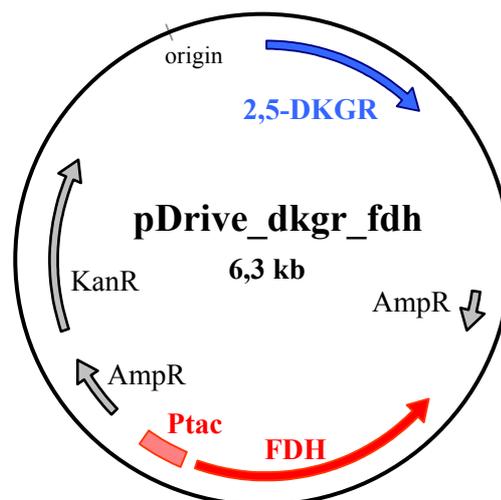


Abbildung 4.6: Ergebnis der Klonierung: Plasmid pDrive_dkgr_fdh, bestehend aus Formiatdehydrogenase-Gen (FDH) mit Ptac-Promotor (Ptac), 2,5-Diketo-D-Gluconatreduktase-Gen (2,5-DKGR) und Kanamycin-Resistenzgen (KanR). Eine Ampicillin-Resistenz ist nicht mehr vorhanden, da das Ampicillin-Resistenzgen (AmpR) unterbrochen ist.

Das Ergebnis – ein Plasmid mit Genen für FDH und 2,5-DKGR – zeigt Abbildung 4.6. Das Plasmid wurde im Bereich des FDH-Gens sequenziert. Die Sequenzierung hat bestätigt, dass die Klonierung erfolgreich war.

Vor der Klonierung war nicht bekannt, um welche Variante der 2,5-DKGR es sich handelte. Nach einer späteren Enzymaufreinigung zeigte sich, dass es das Gen für die 2,5-DKGR A ist (siehe Abschnitt 4.3.2.3).

4.2.2 Einsatz rekombinanter *E. coli*-Zellen im Satzreaktor

Das selbst klonierte Plasmid aus Abschnitt 4.2.1 mit den Genen für die FDH und die 2,5-DKGR wurde in *E. coli*-Zellen der Stämme DH5 α und BL21 DE3 eingebracht. Die Zellen wurden jeweils im Schüttelkolben angezogen, mit IPTG induziert und geerntet. Ein Teil der Zellen beider Stämme wurde anschließend im Ultraschall aufgeschlossen. Der Zellüberstand wurde auf die Aktivität der beiden Enzyme FDH und 2,5-DKGR überprüft und die biomassespezifischen Aktivitäten gemessen (Abbildung 4.7).

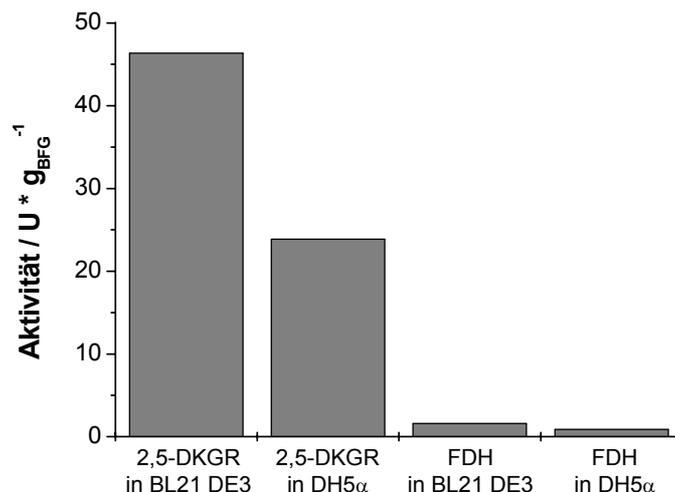


Abbildung 4.7: Aktivität der Enzyme 2,5-DKGR und FDH, exprimiert in *E. coli* DH5 α bzw. BL21 DE3 pDrive_dkgr_fdh, pro 1 g Zellen Biofeuchtmasse. Bedingungen: Aktivitätstest 2,5-DKGR: 0,2 mM NADPH, 7,5 mM 2,5-DKG, 50 mM KP_i-Puffer pH 6,4, 20°C, 340 nm. Aktivitätstest FDH: 0,2 mM NAD, 50 mM Na-Formiat, 50 mM KP_i pH 6,4, 20°C, 340 nm.

Offensichtlich wurde in den *E. coli*-Zellen beider Stämme ausreichend 2,5-DKGR exprimiert: Im Zellüberstand der BL21 DE3-Zellen wurde eine DKGR-Aktivität von 46 U/g_{BFG} gemessen, bei den DH5 α -Zellen von 24 U/g_{BFG}. Dass die Aktivität im Überstand der BL21 DE3-Zellen doppelt so hoch ist, ist nicht erstaunlich, da dieser Stamm speziell für eine hohe Enzymexpression entwickelt wurde.

Im Zellüberstand wurde jedoch durchweg eine nur geringe FDH-Aktivität gemessen (1,6 bzw. 0,9 U/g_{BFG}). Vermutlich wurde die FDH nur in geringer Menge exprimiert, da

ihr Gen auf dem klonierten Plasmid in umgekehrter Leserichtung vorliegt (vgl. Abbildung 4.6). Zudem ist die spezifische Aktivität der FDH für gewöhnlich kleiner, so dass man selbst bei gleicher Expression weniger biomassenspezifische Aktivität findet. Ob die Aktivität der FDH in den *E. coli*-Zellen für eine Ganzzell-Biotransformation ausreicht, wurde im Satzreaktor überprüft. Frisch geerntete und induzierte *E. coli* BL21 DE3 wurden mit Na-Formiat- und 2,5-DKG-Lösung versetzt und für drei Stunden bei 25°C gerührt. Bei einigen Ansätzen wurden die Zellen zuvor mit einprozentiger CTAB-Lösung permeabilisiert. Auch wurde in einigen Fällen Cofaktor zugegeben (NAD⁺ oder NADH).

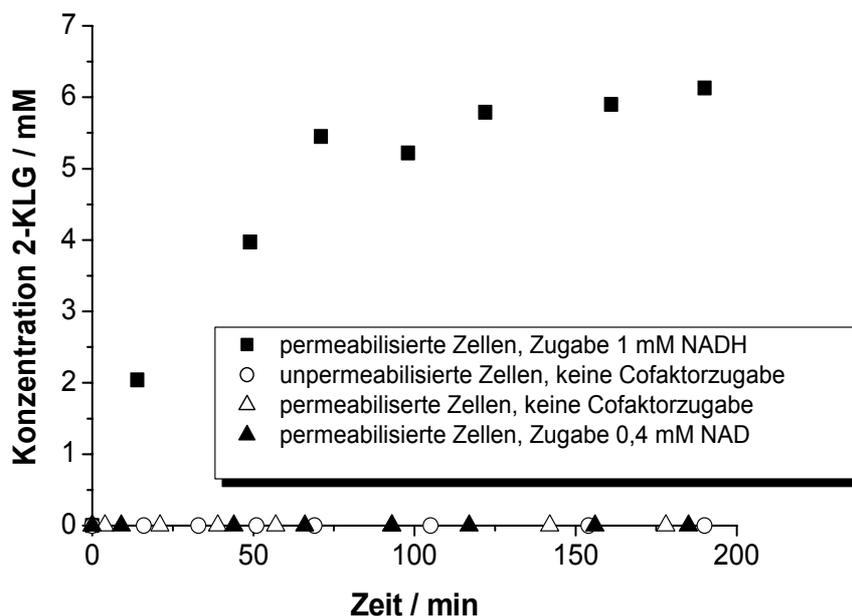


Abbildung 4.8: Biotransformation im Satzreaktor mit *E. coli* BL21 DE3 pDrive_dkgr_fdh. Bedingungen:
 7,4 mM 2,5-DKG, 50 mM Na-Formiat, 50 mM K_P-Puffer pH6,4, 25°C, 10 g/L *E. coli*, V=30 mL.
 Permeabilisierung: 1 % CTAB-Lösung, 25°C, 1h.

Wie Abbildung 4.8 zeigt, produzieren unpermeabilisierte Zellen kein 2-KLG – vermutlich, weil *E. coli*-Zellen keinen Transporter für das Substrat 2,5-DKG besitzen und intakte Zellen diese Substanz daher nicht aufnehmen können. Dieses Phänomen wurde bereits zuvor beschrieben: Yum *et al.* fanden, dass einige *E. coli*-Stämme das Enzym 2,5-DKGR zwar exprimieren, das Substrat jedoch nicht als Kohlenstoffquelle nutzen können – die Autoren vermuteten, dass die Zellen Schwierigkeiten haben, die Verbindung in die Zelle aufzunehmen [Yum *et al.* 1999].

Permeabilisierte Zellen können 2-KLG produzieren – jedoch nur, wenn zusätzlich ausreichend Cofaktor zur Lösung hinzugegeben wird. Der Grund: Bei der Permeabilisierung wird die Membranintegrität gestört und die Konzentration der

4.2. Einsatz rekombinanter *E. coli*-Zellen zur Reduktion von 2,5-DKG

Cofaktoren im Zellinneren erniedrigt sich stark. Eine Zugabe von 0,4 mM NAD^+ reicht jedoch nicht aus, da das Enzym offensichtlich einen zu hohen K_M -Wert für NADH hat. Genaue Werte hierfür finden sich in der Literatur jedoch nicht. Natürlich spielt bei der Zugabe von NAD auch die Effizienz der Cofaktorregenerierung eine Rolle. Bei einer Zugabe von 1 mM NADH können permeabilisierte Zellen 2,5-DKG jedoch vollständig zu 2-KLG reduzieren (Abbildung 4.9).

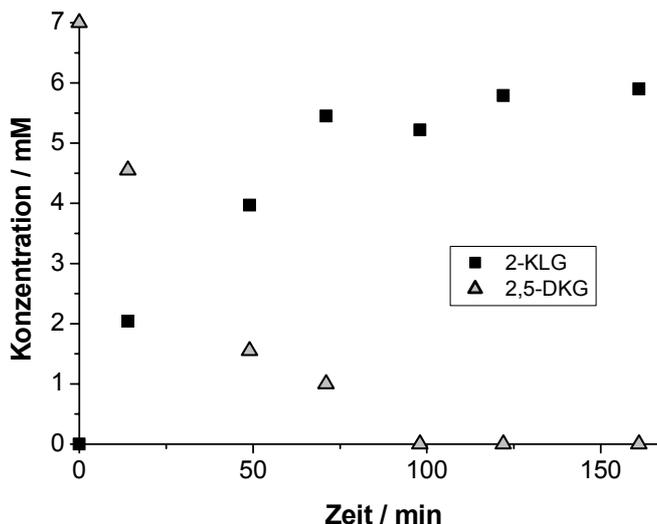


Abbildung 4.9: Biotransformation im Satzreaktor durch permeabilisierte *E. coli* BL21 DE3 pDrive_dkgr_fdh. Bedingungen: 1 mM NADH, 7,4 mM 2,5-DKG, 50 mM Na-Formiat, 50 mM KP_i -Puffer pH6,4, 25°C, 10 g/L *E. coli* BL21 DE3 pDrive_dkgr_fdh, V=30 mL. Permeabilisierung: 1 % CTAB-Lösung, 25°C, 1h.

Obwohl nur 1 mM NADH zur Reaktionslösung gegeben wurde, entstehen etwa 6 mM 2-KLG. Das beweist, dass die FDH-Aktivität ausreicht und die Cofaktorregenerierung funktioniert. Im Satzreaktor kann auf diese Weise 2,5-DKG zu 2-KLG reduziert werden. Somit hat sich gezeigt, dass eine Biotransformation mit rekombinanten *E. coli*-Zellen möglich ist. Für einen kontinuierlichen Prozess ist die Reaktion jedoch schlecht geeignet: Es müsste kontinuierlich Cofaktor zum Reaktormedium hinzugegeben werden – und das in hohen Konzentrationen von 1 mM, da das Enzym bei geringeren Konzentrationen nicht aktiv ist. NADH und NAD^+ sind jedoch sehr teuer und das Verfahren wäre wirtschaftlich äußerst unrentabel.

Für einen industriellen Prozess wären die Zellen nur dann interessant, wenn sie zusätzlich einen Transporter für 2,5-DKG exprimieren würden. Denn dann müssten sie nicht permeabilisiert werden und es müsste kein Cofaktor zugegeben werden. Diese Methode war beispielsweise bei einer analogen Umsetzung von D-Fructose zu D-Mannitol mit Cofaktorregenerierung in rekombinanten *E. coli*-Zellen erfolgreich: Die

Zellen lieferten ursprünglich lediglich 3% Ausbeute, mit der Einführung eines zusätzlichen Transporterproteins konnte die Ausbeute auf 43% gesteigert werden [Kaup *et al.* 2003].

Im Rahmen dieser Arbeit empfiehlt es sich, das Enzym 2,5-DKGR zu isolieren und in einem Enzymmembranreaktor einzusetzen. Dann kann nämlich die käuflich erworbene NADP⁺-abhängige FDH oder eine ADH zur Cofaktorregenerierung eingesetzt werden.

4.3. Gewinnung der 2,5-Diketo-D-Gluconatreduktase in reiner Form

In anderen Arbeiten wurde die 2,5-DKGR aus *Corynebacterium* sp. isoliert, und zwar über einen Zellaufschluss und anschließende Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Sepharose [Maremonti *et al.* 1996, Sonoyama *et al.* 1987b]. In dieser Arbeit wurde das Enzym in *E. coli* BL21 DE3 überexprimiert und mit Hilfe der Nickelaffinitätschromatographie isoliert. Ein solches Vorgehen sollte die Enzymausbeute erhöhen und die Aufreinigung vereinfachen.

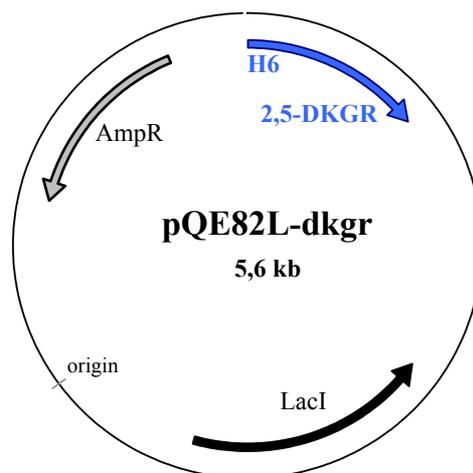


Abbildung 4.10: Plasmid pQE82L-dkgr mit 2,5-Diketo-D-Gluconatreduktase-Gen (2,5-DKGR), Hexahistidin-Tag (H6), Ampicillin-Resistenzgen (AmpR) und Lac-Repressor (LacI)

Das im Rahmen dieser Arbeit vorliegende Plasmid pQE82L-dkgr (Abbildung 4.10) enthält das Gen für die 2,5-DKGR A mit sechs Histidin-Resten (His-Tag). Mit dem Plasmid transformierte *E. coli*-Zellen wurden fermentiert, induziert, geerntet und aufgeschlossen. Der Hexahistidin-Tag der 2,5-DKGR bindet fest an Nickelionen, so dass die 2,5-DKGR aus dem Zellüberstand mit Hilfe eines nickelhaltigen Harzes isoliert werden kann.

4.3.1 Fermentation des rekombinanten *E. coli*-Stammes

Abbildung 4.11 zeigt die Wachstumskurve des mit dem Plasmid pQE82L-dkgr transformierten *E. coli*-Stammes BL21 DE3 in modifiziertem LB-Medium (siehe Abschnitt 8.6.4.3). Die Fermentation fand im 20-L-Maßstab statt.

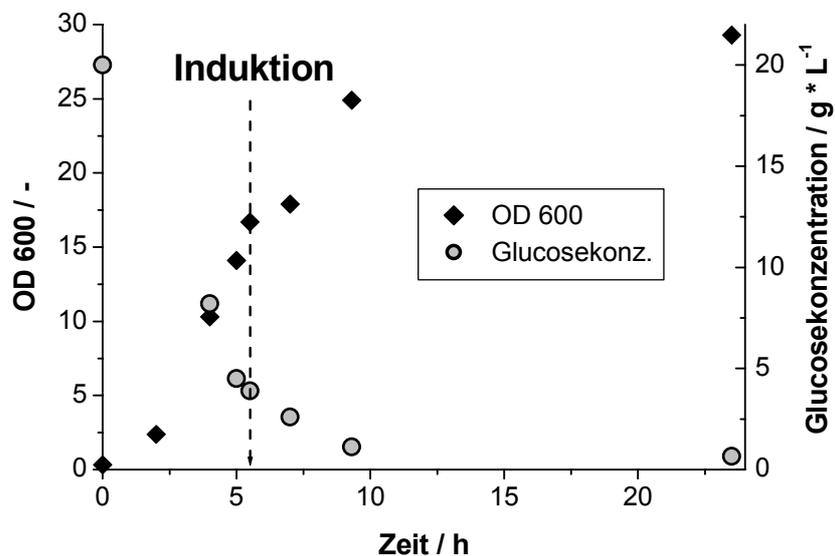


Abbildung 4.11: Verlauf der zweiten 20-L-Fermentation von *E.coli* BL21 DE3 pQE82L-dkgr. Bedingungen: 37°C/25°C (nach Induktion), pH 7, modifiziertes LB-Medium (siehe Abschnitt 8.6.4.3), 20 g/L Glucose, dann Glucose-Zulauf 70-90 g/h ab t=5,5 h. Induktion bei t=5,5 h mit 0,1 mM IPTG.

Bei einer optischen Dichte von 17 wurde die Kultur mit 0,1 mM IPTG induziert, um die Enzymexpression zu starten. Nach weiteren 18 Stunden wurden die Zellen geerntet. Die 20-L-Fermentation wurde insgesamt zweimal durchgeführt, um ausreichende Mengen Enzym zu generieren. Die Zellausbeuten zeigt Tabelle 4.1.

Tabelle 4.1: Zellausbeuten der beiden 20L-Fermentationen von *E. coli* BL21DE3 pQE82L-dkgr

	Erste Fermentation (2006)	Zweite Fermentation (2007)
Erreichte optische Dichte OD 600	27,5	29,3
Zellausbeute [kg] (Feuchtgewicht)	0,962	1,047

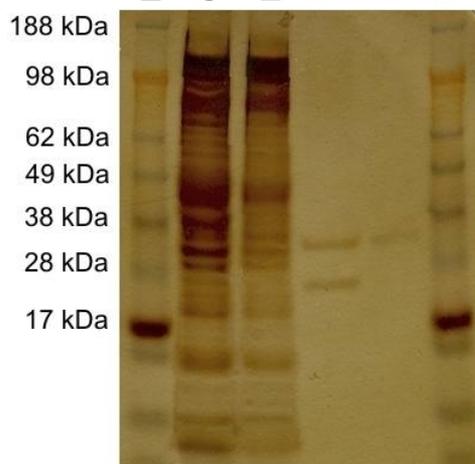
In beiden Fällen wuchs die Kultur zu hohen optischen Dichten heran. Insgesamt wurden etwa 2 kg Zellmasse (Biofeuchtgewicht) gewonnen.

4.3.2 Isolierung des Enzyms über Ni-Affinitätschromatographie

4.3.2.1 Säulenverfahren

Geringe Mengen Enzym wurden über eine Chromatographiesäule aufgereinigt. Abbildung 4.12 verdeutlicht, welche Phasen dabei durchlaufen werden: Die Zellen aus

Abschnitt 4.3.1 wurden im Ultraschall aufgeschlossen und der Überstand (Gesamtprotein) auf eine Säule mit Ni-IDA-Harz gepumpt. Ungebundene Proteine wurden durch Spülen der Säule mit einem Waschpuffer entfernt, der geringe Konzentrationen Imidazol enthielt.



Durch Spülen der Säule mit einer Lösung hoher Imidazolkonzentration wurde das Enzym wieder freigesetzt und als Eluat aufgefangen. Nach einem Puffertausch wurde die 2,5-DKGR-haltige Lösung lyophilisiert.

Die Vorgehensweise ist in Abschnitt 8.8.2.2 detailliert beschrieben.

Abbildung 4.12: Isolierung der 2,5-DKGR über Ni-Affinitätschromatographie (Säulenverfahren). SDS-Gel, 4-12 % Bis-Tris, Silberfärbung.

Wie Abbildung 4.12 zeigt, kann die 2,5-DKGR auf die beschriebene Art isoliert werden: Das SDS-Gel zeigt eine deutliche Bande bei etwa 34.000 Dalton – laut Literatur ist dies das Molekulargewicht der Reduktase A [Miller *et al.* 1987, Sonoyama *et al.* 1987b]. Allerdings ist die Enzymlösung leicht verunreinigt, es ist im Eluat eine zweite Bande bei etwa 20.000-25.000 Dalton zu erkennen. Diese Verunreinigung trat auch in anderen Enzymfraktionen in unterschiedlicher Ausprägung auf. Um welches Protein es sich dabei handelt, ist unklar.

Abbildung 4.13 zeigt ein SDS-Gel aller Enzymfraktionen, die im Säulenverfahren isoliert wurden. In allen Fraktionen ist das Enzym größtenteils frei von Verunreinigungen.

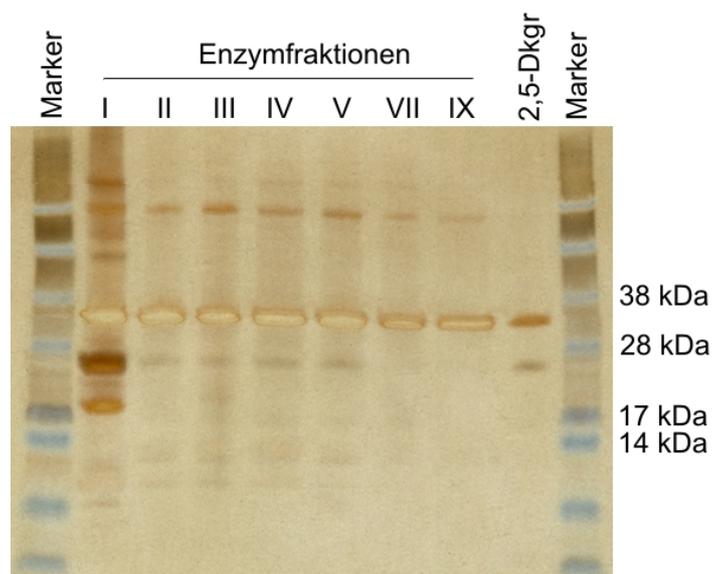


Abbildung 4.13: Fraktionen I-IX der 2,5-DKGR, isoliert über das Säulenverfahren. SDS-Gel, 4-12 % Bis-Tris, Silberfärbung.

Eine Ausnahme macht Enzymfraktion I: Sie ist stark mit Fremdproteinen verunreinigt. Der Grund: Der Waschpuffer enthielt hier nur 20 mM Imidazol, bei allen weiteren Aufreinigungen lag die Konzentration bei 50 mM. Zu wenig Imidazol im Waschpuffer begünstigt die unspezifische Bindung von Proteinen an das Ni-IDA-Harz und führen zu einer Verunreinigung der resultierenden Enzymlösung.

Von allen Enzymfraktionen wurde die Aktivität bestimmt; dafür wurden Lösungen aus der Biotransformation mit *G. oxydans* verwendet (Kapitel 3). Die Konzentration an 2,5-DKG wurde jeweils per HPLC bestimmt, anschließend wurden die Lösungen auf die 2,5-DKG-Konzentration verdünnt, bei denen das Enzym maximale Aktivität zeigt (siehe 4.6.1). Die Enzymaktivität wurde über den Umsatz an NADPH und der Abnahme der Absorption bei 340 nm im Photometer bei 20°C und pH 6,4 bestimmt. Aufgrund der Schwierigkeit, reines 2,5-DKG zu isolieren oder zu kaufen, ist eine ähnliche Vorgehensweise auch in anderen Arbeiten beschrieben [Banta *et al.* 2002a].

Tabelle 4.2 zeigt, dass die Aktivität des Enzyms in den einzelnen Fraktionen zwischen 1,4 und 8,4 U/mg_{Protein} schwankt. Dass die Aktivität der Fraktion I relativ gering ist, verwundert nicht; immerhin enthält sie viele Proteinverunreinigungen, die die Proteinmenge erhöhen und die spezifische Enzymaktivität rechnerisch reduzieren. Doch auch die Fraktionen III, IV und VII zeigen nur relativ geringe Enzymaktivitäten, obwohl sie laut SDS-Gel so gut wie frei von Verunreinigungen sind. Vermutlich reagiert das

Enzym empfindlich auf leichte Variationen im Aufreinigungsverfahren (andere Pumpgeschwindigkeiten, Art und Länge der Ultraschallung, u.ä.).

Tabelle 4.2: Isolierte Fraktionen I-IX der 2,5-DKGR (Säulenverfahren)

Fraktion	Masse Zellen [g]	Masse Lyophilisat [g]	Proteinanteil [%]	Masse Protein [mg]	Aktivität (20°C, 15,8 mM 2,5-DKG) [U/mg _{Protein}]	U Gesamt
I	52,0	0,59	3,0	17,4	2,57	57,3
II	42,0	0,52	1,9	9,8	8,25	148,7
III	42,0	0,53	1,4	7,6	1,43	16,3
IV	50,0	0,70	1,2	8,4	2,48	32,8
V	41,3	0,38	1,2	4,7	6,32	44,8
VII	49,0	0,22	0,5	1,2	1,73	3,6
IX	51,5	0,42	0,6	2,4	8,35	18,0
Gesamt	327,8	3,36		51,5		321,5

Insgesamt wurden 51,5 mg Protein isoliert, mit einer Gesamtaktivität von 322 U. Das Säulenverfahren eignet sich demnach dazu, relativ sauberes und aktives Enzym zu isolieren. Jedoch nimmt das Verfahren sehr viel Zeit in Anspruch und es können in einem Lauf nur geringe Mengen Enzym aufgereinigt werden, da die Kapazität der Säule begrenzt ist.

4.3.2.2 Satzverfahren

Daniel Minör hat in seiner Diplomarbeit ein Satzverfahren entwickelt, mit dem schnell große Mengen des Enzyms Enterokinase über die Ni-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden konnten [Minör 2007]. Dieses Verfahren wurde jetzt auch für das Enzym 2,5-DKGR angewendet.

Dabei befand sich das Ni-IDA-Harz in einer Plexiglasschale mit Nylonnetz am Boden, was einen schnellen Pufferwechsel erlaubte. In Abschnitt 8.8.2.3 ist das Satzverfahren detailliert beschrieben. Das Satzverfahren erlaubte es, den Zellüberstand von bis zu 150 g Zellen gleichzeitig zu behandeln (im Säulenverfahren: 50 g). Dabei dauert das Satzverfahren insgesamt nur etwa drei Stunden (Säulenverfahren: ca. fünf Stunden)

Abbildung 4.14 zeigt ein SDS-Gel der Enzymfraktionen, die im Satzverfahren isoliert wurden.

4.3. Gewinnung der 2,5-Diketo-D-Gluconatreduktase in reiner Form

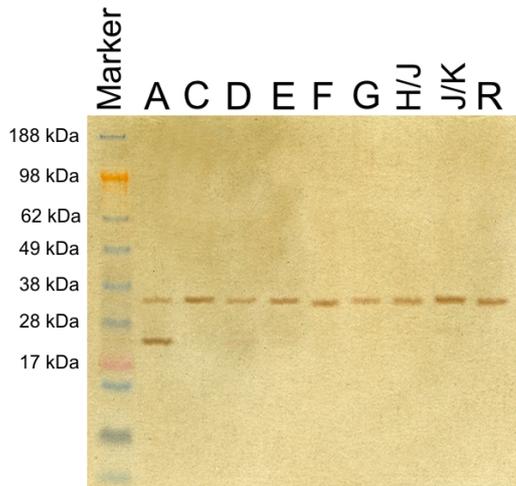


Abbildung 4.14: Fraktionen A-R der 2,5-DKGR, isoliert über das Satzverfahren

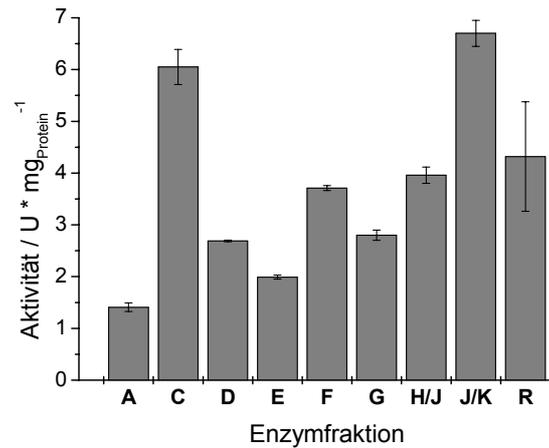


Abbildung 4.15: Aktivität der Enzymfraktionen A-R

Mit einer Ausnahme sind alle Enzymfraktionen relativ frei von Verunreinigungen. Lediglich in Fraktion A taucht als Verunreinigung das bereits erwähnte Protein mit einem Molekulargewicht von 20-25.000 Dalton auf. Auch hier ist A, die erste Fraktion der Reihe, stärker verunreinigt als die späteren Fraktionen, da hier der Imidazolgehalt des Waschpuffers geringer war. Auch bei einer Aufreinigung im Satzverfahren schwankt die Aktivität der isolierten Enzymfraktionen stark (Abbildung 4.15).

Tabelle 4.3 zeigt, dass mit dem Satzverfahren deutlich größere Mengen Enzym in der gleichen Zeit aufgereinigt wurden: Es wurden 417 mg Enzym isoliert (Säulenverfahren: 52 mg) mit einer Gesamtaktivität von 1416 U (Säulenverfahren: 322 U).

Tabelle 4.3: Isolierte Fraktionen A-R der 2,5-DKGR (Satzverfahren)

Fraktion	Masse Zellen [g]	Masse Lyophilisat [mg]	Protein-Anteil [%]	Masse Protein [mg]	Aktivität (15,8 mM 2,5-DKG, 20°C) [U/mg _{Protein}]	U Gesamt
A	99,8	220,4	5,3	11,7	1,41	16,5
C	156,3	330,5	6,2	20,5	6,05	124,0
D	143,0	324,0	8,2	26,6	2,69	71,6
E	137,5	319,7	26,1	83,4	1,99	166,0
F	159,3	329,4	21,9	72,1	3,71	267,5
G	160,4	373,2	25,5	95,2	2,80	266,7
H/J/B	241,3	768,8	10,3	79,2	3,96	314,0
J/K	245,4	2782	1,0	27,8	6,70	186,2
R		229,6	0,3	0,7	4,32	3,0
Gesamt	1343,0	5677,6		417,2		1415,5

Die verschiedenen Enzymfraktionen weisen recht unterschiedliche Aktivitäten auf, das würde einen späteren Vergleich und die Erstellung eines kinetischen Modells schwierig machen. Als Ausweg wurden alle Kinetikuntersuchungen mit der Enzymfraktion J/K durchgeführt (siehe 4.6.1). Wurden später andere Enzymfraktionen für Biotransformationen eingesetzt, wurden so genannte Aktivitätsgehalte berechnet, also der Quotient aus Aktivität der eingesetzten Fraktion und Aktivität der Fraktion J/K gebildet. Dieser Aktivitätsgehalt floss als zusätzlicher Faktor in den Enzymgehalt und die Berechnung von theoretischen Ausbeuten o.ä. ein.

Das unbekannte Protein mit der Masse zwischen 20 und 25 kDa kann durch eine Säulenchromatographie abgetrennt werden (siehe Anhang). Im Folgenden wird aber das per Ni-NTA-Methode gereinigte Proteinpräparat eingesetzt, wie in Tabelle 4.3 aufgeführt. Alle Enzymfraktionen wurden als Lyophilisat gelagert, nachdem Untersuchungen ergeben haben, dass Lyophilisation und Einfrieren in Lösung die Enzymaktivität um die gleiche Prozentzahl reduziert (siehe Anhang).

4.3.2.3 Zusammenfassung

Aus zwei Kilogramm rekombinanten *E. coli*-Zellen konnten mit Hilfe der Ni-Affinitätschromatographie insgesamt knapp 470 mg 2,5-DKGR in 16 Fraktionen isoliert werden. Insgesamt schwankt die Aktivität der einzelnen resultierenden Enzymfraktionen zwischen 1,4 und 8,2 U/mg_{Protein}.

Laut SDS-Gel besitzt das isolierte Enzym ein Molekulargewicht von etwa 34.000 Dalton. Es handelt sich damit um die Variante A, die stabiler, aber weniger aktiv ist [Sonoyama *et al.* 1987b].

Wie Tabelle 4.4 zeigt, lohnt es sich, 2,5-DKGR in rekombinanten *E. coli* überzuexprimieren und dann auf die beschriebene Weise aufzureinigen: Es können sehr viel höhere Mengen Enzym aus einem Gramm Zellen isoliert werden als aus *Corynebacterium* sp. (bis zu 0,31 mg/g anstatt 0,02 mg/g bei Miller *et al.*). Durch das Satzverfahren können sehr große Mengen Enzym in kürzester Zeit isoliert werden (bis zu 95 mg pro Lauf).

Die Aktivität des isolierten Enzyms entspricht in etwa dem, was auch andere Forscher zuvor für die Reduktase A gemessen haben [Sonoyama *et al.* 1987b]. Einige isolierte Enzymfraktionen besitzen jedoch eine Aktivität, die mehr als doppelt so hoch ist wie der Literaturwert.

4.4. Optimierung der Reaktionsbedingungen

Tabelle 4.4: Ergebnisse der Enzymbereinigung im Vergleich mit anderen Arbeiten

	Diese Arbeit		[Miller <i>et al.</i> 1987]	[Maremonti <i>et al.</i> 1996]	[Sonoyama <i>et al.</i> 1987b]
	Säule	Satz			
Isolierung aus	rek. <i>E. coli</i>		<i>Corynebacterium</i> sp.		
Methoden	Ni-Affinitätschrom., Ionenaustauschchrom.		Ionenaustauschchrom., Affinitätschrom., Gelfiltrationschrom.	Ionenaustauschchrom., Affinitätschrom.,	Ionenaustauschchrom., Affinitätschrom.,
Ausbeute [mg _{Protein} /gZellen]	0,16	0,31	0,02	n.a.	0,004 (Red. A) 0,001 (Red. B)
Isoliertes Protein pro Aufreinigungszyklus [mg]	1,2 – 9,8	11,7 – 95,2	5,9	0,5	2,72 (Red. A) 0,91 (Red. B)
spez. Aktivität [U/mg _{Protein}]	1,4 – 6,7	1,4 – 8,4	3,4	2,0	3,05 (Red. A) 101 (Red. B)
Gesamtaktivität isoliertes Protein [U]	322	1416	20,1	1,0	8,3 (Red. A) 92 (Red. B)

4.4. Optimierung der Reaktionsbedingungen

Die Reaktionsbedingungen wurden optimiert, indem jeweils ein einzelner Parameter variiert und alle anderen konstant gehalten wurden.

4.4.1.1 Temperatur

Wie erwartet, nimmt die Enzymaktivität zu, wenn die Temperatur steigt (Abbildung 4.16).

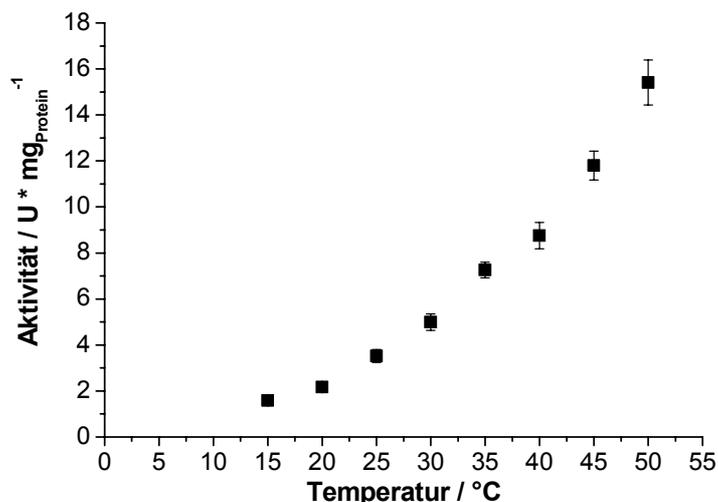


Abbildung 4.16: Einfluss der Temperatur auf die Aktivität der 2,5-DKGR. Bedingungen: 15-50°C, 50 mM KP_i-Puffer pH 6,4, 0,2 mM NADPH, 14,6 mM 2,5-DKG, 340 nm. Enzymcharge IX.

Die Aktivität eines Enzyms steigt exponentiell mit der Temperatur an. Jedoch kann man einen durchgängigen exponentiellen Anstieg nur selten beobachten, da Enzyme ab einer bestimmten Temperatur deaktiviert werden und die Kurve dadurch abflacht. Das trifft auch hier zu: Offensichtlich beginnt die Deaktivierung der 2,5-DKGR bereits bei Temperaturen ab 30°C. Das ist in Übereinstimmung mit der Arbeit von Sanli *et al.*, die für die Reduktase A einen mittleren Schmelzpunkt (melting transition midpoint) von 38°C ermittelt hatten – bei dieser Temperatur ist also die Hälfte aller Enzymmoleküle denaturiert und inaktiviert [Sanli *et al.* 2004].

Die Reaktion sollte somit trotz erniedrigter Aktivität bei möglichst geringen Temperaturen stattfinden, beispielsweise bei 20°C.

4.4.1.2 pH-Wert und Puffer

Das Enzym ist aktiv bei pH-Werten zwischen 5 und 7,6, die Enzymaktivität ist maximal bei pH-Werten zwischen 5,5 und 6 (Abbildung 4.17).

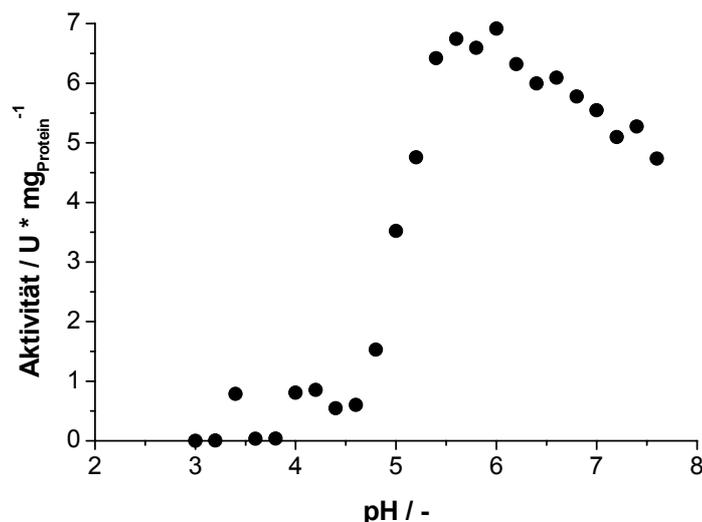


Abbildung 4.17: Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der 2,5-DKGR. Bedingungen: pH 3-7,6, 100 mM KP_i-Puffer, 30°C, 24 mM 2,5-DKG, 0,2 mM NADPH. Enzymcharge II.

Für gewöhnlich werden Reaktionen mit 2,5-DKGR in Bis-Tris-HCl-Puffer durchgeführt [Maremonti *et al.* 1996, Miller *et al.* 1987], wobei die Aktivität des Enzyms mit steigender Pufferkonzentration zunimmt (Abbildung 4.18). Besonders hoch ist die Aktivität in KP_i-Puffer mit einer Konzentration von 10 mM; die Aktivität sinkt hier aber mit steigender Pufferkonzentration.

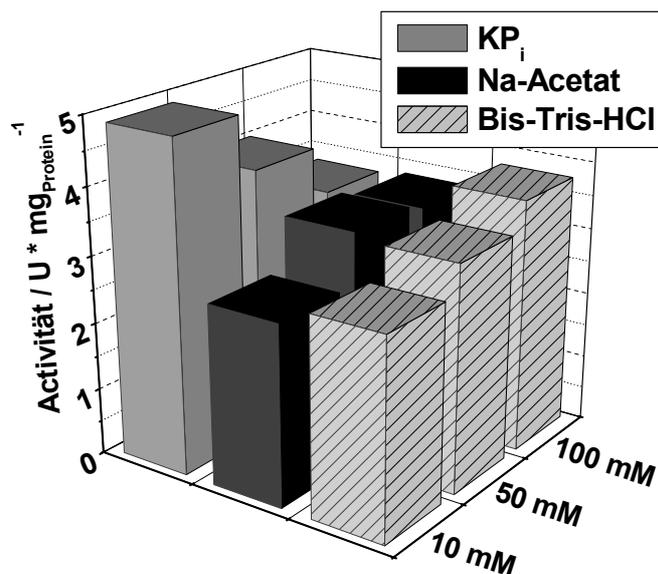


Abbildung 4.18: Einfluss des Puffersystems auf die Aktivität der 2,5-DKGR. Bedingungen: 30°C, pH 6,4, 9,3 mM 2,5-DKG, 0,2 mM NADPH, Enzymcharge III.

50 mM KP_i-Puffer ist optimal: Die Aktivität des Enzyms sowie die Pufferkapazität ist hoch, außerdem wird KP_i-Puffer auch in der kontinuierlichen Produktion von 2,5-DKG mit *Gluconobacter oxydans* eingesetzt (Kapitel 3). Die 2,5-DKG-haltige Lösung aus dem CSTR kann somit direkt in den Enzymmembranreaktor geleitet werden – ein Pufferwechsel ist nicht nötig.

Bei vielen der nachfolgenden Versuche wurden dem Puffer jedoch zusätzlich 100 mM Na-Acetat zugegeben, da dieser Puffer ursprünglich in der kontinuierlichen Produktion von 2,5-DKG benutzt werden sollte – bis sich herausstellte, dass die Zellen darin instabil waren (vgl. Abschnitt 3.4.2.2).

4.4.1.3 Stabilität des Biokatalysators

Abbildung 4.19 zeigt, dass die Lagerstabilität des Enzyms mit steigendem pH-Wert zunimmt, mit steigender Temperatur aber schnell abnimmt. Bei 40°C war das Enzym bereits nach zweistündiger Lagerung komplett inaktiviert.

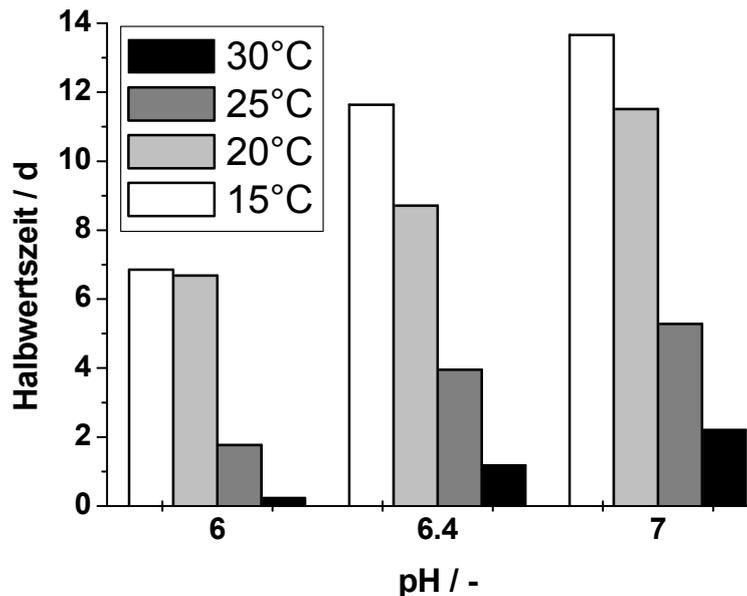


Abbildung 4.19: Lagerstabilität der 2,5-DKGR bei verschiedenen Temperaturen und pH-Werten. Bedingungen: Lagerung in 50 mM KP_i -Puffer. Enzymcharge IX.

Für einen kontinuierlichen Prozess muss der Biokatalysator vor allem hohe Stabilitäten zeigen, hohe Aktivitäten sind weniger entscheidend. pH 7 wäre für einen Enzymmembranreaktor mit 2,5-DKGR daher optimal. Das Substrat 2,5-DKG ist jedoch relativ instabil und zersetzt sich vor allem bei nicht sauren pH-Werten leicht [Bloemsma *et al.* 1963]. Ein geeigneter Kompromiss ist daher pH 6,4. Als Prozesstemperatur wurden 20°C gewählt: Hier beträgt die Halbwertszeit des Enzyms fast 9 Tage, was für einen kontinuierlichen Prozess ausreicht.

4.5. Möglichkeiten der Cofaktorregenerierung

Laut Literatur reduziert das Enzym auch 5-Keto-D-Fructose [Sonoyama *et al.* 1987b] – das konnte jedoch nicht verifiziert werden. Neben 2,5-DKG wurde kein weiteres Substrat gefunden, das vom Enzym oxidiert oder reduziert wird. Daher ist eine substratgekoppelte Cofaktorregenerierung (zum Beispiel mit Isopropanol) nicht möglich.

Für eine enzymgekoppelte Cofaktorregenerierung kommen eine Alkoholdehydrogenase ADH und eine Formiatdehydrogenase FDH in Frage. Letztere ist entweder NAD^+ - oder $NADP^+$ -abhängig. Die ADH aus *Lactobacillus brevis* (*Lb*) akzeptiert gleichzeitig $NADP^+$ und NAD^+ als Cofaktor.

Im Experiment zeigte sich, dass alle drei Möglichkeiten der Cofaktorregenerierung funktionieren: mit einer *Lb*-ADH und $NADP^+$ als Cofaktor (Abbildung 4.20), mit einer $NADP^+$ -abhängigen FDH (Abbildung 4.21) und mit einer NAD^+ -abhängigen FDH (Abbildung 4.22).

4.5. Möglichkeiten der Cofaktorregenerierung

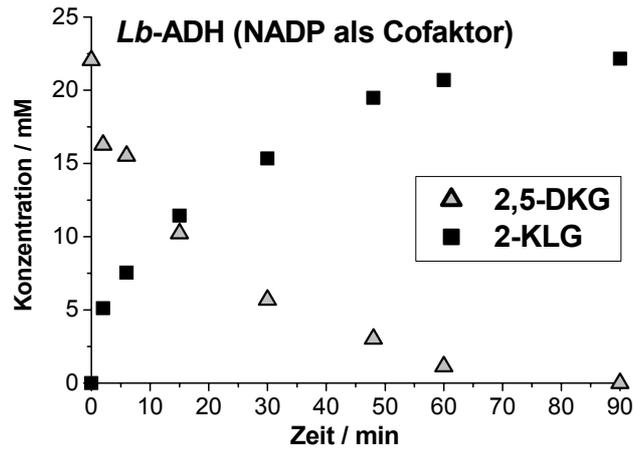


Abbildung 4.20: Reduktion von 2,5-DKG im Satzreaktor, *Lb*-ADH zur Cofaktorregenerierung. Bedingungen: 20°C, 100 mM Na-Acetat, 20-22 mM 2,5-DKG, 50 mM KP_i -Puffer, pH 6,4, V = 1,5 mL, 0,44 mg/mL 2,5-DKGR, Enzymcharge F, 200 mM Isopropanol, 0,2 mM NADP, 1,69 mg/mL *Lb*-ADH.

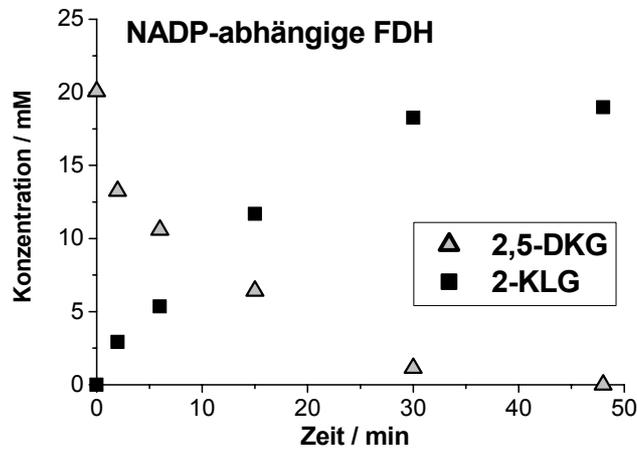


Abbildung 4.21: Reduktion von 2,5-DKG im Satzreaktor, NADP-abhängige FDH zur Cofaktorregenerierung. Bedingungen: 20°C, 100 mM Na-Acetat, 20-22 mM 2,5-DKG, 50 mM KP_i -Puffer, pH 6,4, V = 1,5 mL, 0,44 mg/mL 2,5-DKGR, Enzymcharge F, 200 mM Na-Formiat, 0,2 mM NADP, 5,65 mg/mL FDH (*Pseudomonas sp*)

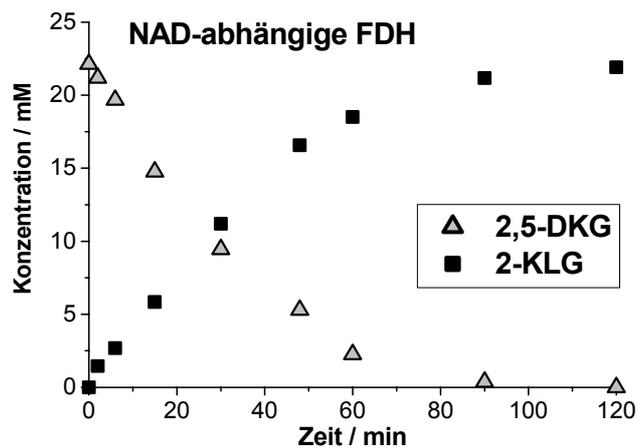


Abbildung 4.22: Reduktion von 2,5-DKG im Satzreaktor, NAD-abhängige FDH zur Cofaktorregenerierung. Bedingungen: 20°C, 100 mM Na-Acetat, 20-22 mM 2,5-DKG, 50 mM KP_i -Puffer, pH 6,4, V = 1,5 mL, 0,44 mg/mL 2,5-DKGR, Enzymcharge F, 200 mM Na-Formiat, 5 mM NAD, 0,44 mg/mL FDH aus *Candida boidinii*.

In allen drei Fällen wurde 2,5-DKG mit einer Ausbeute von etwa 100% zu 2-KLG reduziert. Die Reaktionszeit betrug zwischen 50 und 120 Minuten.

Um zu entscheiden, welches Enzym sich am besten zur Cofaktorregenerierung eignet, wurde untersucht, ob die 2,5-DKGR durch eines der Substrate oder Produkte der ADH oder FDH inhibiert wird, also durch Isopropanol, Aceton oder Formiat.

Weder Isopropanol noch Aceton beeinflussen die Aktivität der 2,5-DKGR (nicht gezeigt). Formiat hingegen inhibiert das Enzym (Abbildung 4.23).

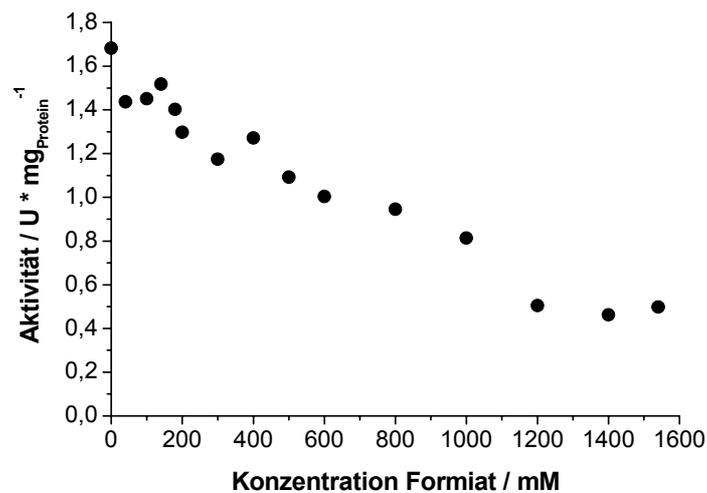


Abbildung 4.23: Einfluss von Formiat auf die Aktivität der 2,5-DKGR. Bedingungen: 0-1550 mM Na-Formiat, 30°C, 0,1 mM NADPH, 4,7 mM 2,5-DKG, 100 mM KP_i-Puffer, pH 6. Enzymcharge II.

Die FDH eignet sich somit weniger gut für eine Cofaktorregenerierung. Die Methode der Wahl ist eine *Lb*-ADH und NADP⁺ als Cofaktor.

4.6. Enzymkinetiken

Um die optimalen Substratkonzentrationen zu ermitteln, wurden die Kinetiken aller beteiligten Enzyme (2,5-DKGR und *Lb*-ADH) untersucht. Anhand der ermittelten Kinetikkonstanten wurde ein theoretisches Modell erstellt, mit dem sich Reaktorläufe simulieren lassen.

4.6.1 Kinetik der Reduktion von 2,5-DKG mit 2,5-Diketo-D-Gluconatreduktase

Die Reduktion von 2,5-DKG zu 2-KLG ist gegenüber der Rückreaktion thermodynamisch bevorzugt [Miller *et al.* 1987]. Dennoch wurde in anderen Arbeiten beobachtet, dass das Enzym auch 2-KLG zu 2,5-DKG oxidieren kann, allerdings bei höheren pH-Werten (8-10,3) und mit sehr viel geringeren Aktivitäten (0,03 U/mg)

[Miller *et al.* 1987]. Diese Rückreaktion wurde im Rahmen dieser Arbeit niemals beobachtet. Bei allen folgenden Kinetikuntersuchungen wurde die Reduktion von 2,5-DKG daher als irreversibel angenommen.

4.6.1.1 NADPH als Cofaktor

2,5-DKGR zeigt eine Michaelis-Menten-Doppelsubstratkinetik für die beiden Substrate 2,5-DKG und NADPH mit leichter Substratüberschussinhibierung für 2,5-DKG (Abbildung 4.24). Am aktivsten ist das Enzym bei etwa 15 mM 2,5-DKG und NADPH-Konzentrationen von mindestens 0,1 mM NADPH.

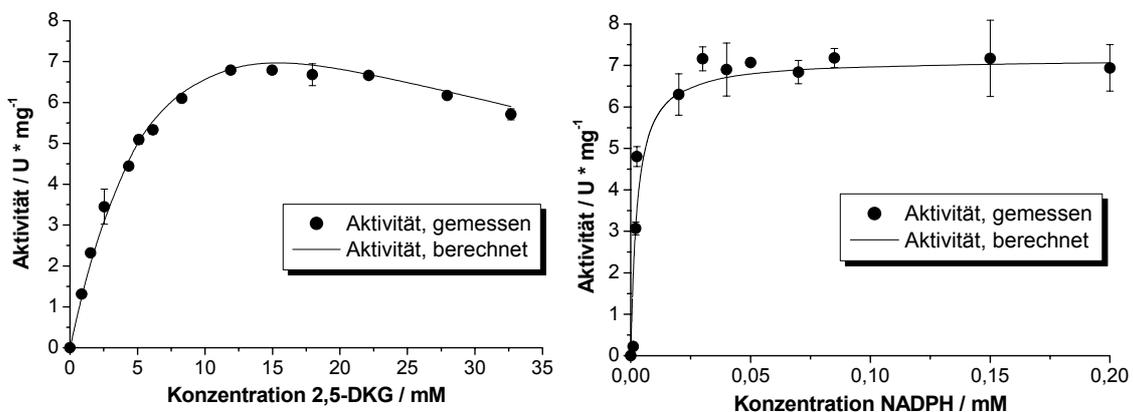


Abbildung 4.24: Kinetik der 2,5-DKGR mit NADPH als Cofaktor. Bedingungen: 20 °C, 100 mM Na-Acetat, 50 mM KP_i -Puffer, pH 6,4. Links: 0,1 mM NADPH, 0-32,7 mM 2,5-DKG; Rechts: 16,6 mM 2,5-DKG, 0-0,2 mM NADPH.

Durch den oxidierten Cofaktor NADP wird das Enzym inhibiert (Abbildung 4.25), das Produkt 2-KLG hat jedoch keinen Einfluss auf die Aktivität (nicht gezeigt).

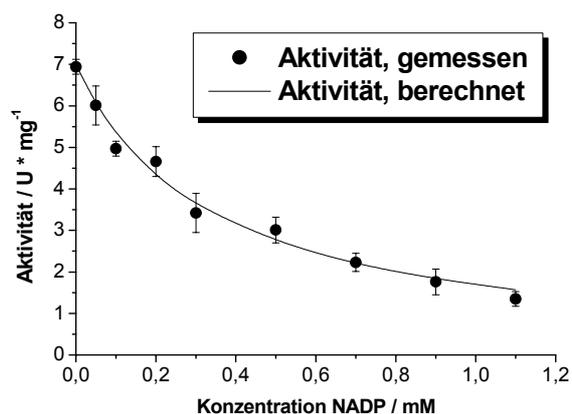


Abbildung 4.25: Kinetik der 2,5-DKGR mit NADPH als Cofaktor. Bedingungen: 20 °C, 100 mM Na-Acetat, 50 mM KP_i -Puffer, pH 6,4, 14,8 mM 2,5-DKG, 0,1 mM NADPH, 0- 1,1 mM NADP. Enzymcharge J/K.

Mit Hilfe von Formel 4.1 konnte ein entsprechendes Modell an die Messwerte angepasst werden.

$$v = \frac{v_{\max} \cdot c_{\text{NADPH}}}{K_M \text{NADPH} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{NADP}}}{K_i \text{NADP}}\right) + c_{\text{NADPH}}} \cdot \frac{c_{2,5\text{DKG}}}{K_M 2,5\text{DKG} + c_{2,5\text{DKG}} \cdot \left(1 + \frac{c_{2,5\text{DKG}}}{K_i 2,5\text{DKG}}\right)}$$

Formel 4.1: Formel zur Modellierung der Enzymkinetik (NADPH-abhängig)

Die so berechneten Kinetikkonstanten zeigt Tabelle 4.5.

Tabelle 4.5: Ergebnisse der Modellierung nach Formel 4.1

v_{\max}	$17,5 \pm 4,8 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$
$K_M \text{NADPH}$	$2,6 \cdot 10^{-3} \pm 0,4 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$
$K_M 2,5\text{-DKG}$	$10,8 \pm 4,3 \text{ mM}$
$K_i \text{NADP}$	$8,1 \cdot 10^{-3} \pm 1,6 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$
$K_i 2,5\text{-DKG}$	$21,0 \pm 10,6 \text{ mM}$

Die Konzentration von 2,5-DKG im Reaktor sollte also nicht zu hoch sein, da das Enzym durch einen Überschuß an Substrat inhibiert wird. Ideal sind 10-25 mM.

4.6.1.2 NADH als Cofaktor

Analog zur Reaktion mit NADPH wurde auch mit NADH als Cofaktor eine Michaelis-Menten-Doppelsubstratkinetik (2,5-DKG, NADH) beobachtet. Auch hier inhibieren hohe Konzentrationen des Substrates 2,5-DKG und des oxidierten Cofaktors NAD^+ (Abbildung 4.26, Abbildung 4.27).

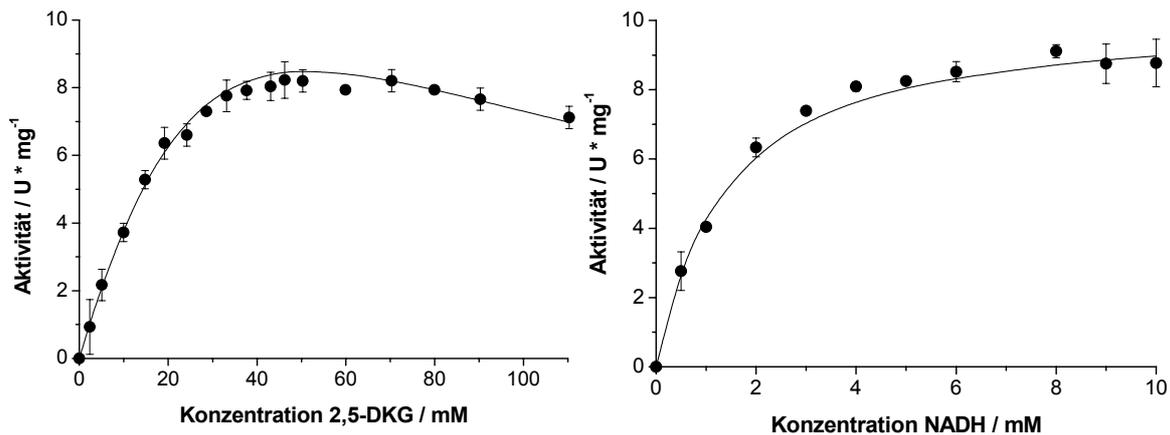


Abbildung 4.26: Kinetik der 2,5-DKGR mit NADH als Cofaktor. Bedingungen: 20 °C, 100 mM Na-Acetat, 50 mM KPi -Puffer, pH 6,4. Links: 6 mM NADH, 0-110,3 mM 2,5-DKG; Rechts: 41,3 mM 2,5-DKG, 0-10 mM NADH. Enzymcharge J/K.

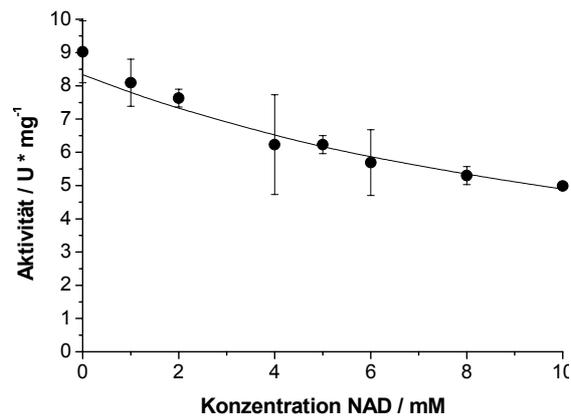


Abbildung 4.27: Kinetik der 2,5-DKGR mit NADH als Cofaktor. Bedingungen: 20 °C, 100 mM Na-Acetat, 50 mM K_2P_i -Puffer, pH 6,4, 41,3 mM 2,5-DKG, 6 mM NADH, 0-10 mM NAD. Enzymcharge J/K.

Auch mit NADH als Cofaktor werden hohe Enzymaktivitäten verzeichnet. Damit eine Reaktion beobachtet wird, sind jedoch sehr hohe Konzentrationen Cofaktor nötig, so wie bei Versuchen mit rekombinanten *E.coli*-Zellen (siehe Seite 86) und den Versuchen zur Cofaktorregenerierung mit einer NAD^+ -abhängigen FDH (4.2.2).

Mit Formel 4.2 wurde ein entsprechendes Modell an die Messwerte angepasst:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot c_{\text{NADH}}}{K_M \text{NADH} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{NAD}}}{K_i \text{NAD}}\right) + c_{\text{NADH}}} \cdot \frac{c_{2,5\text{DKG}}}{K_M 2,5\text{DKG} + c_{2,5\text{DKG}} \cdot \left(1 + \frac{c_{2,5\text{DKG}}}{K_i 2,5\text{DKG}}\right)}$$

Formel 4.2: Formel zur Modellierung der Enzymkinetik (NADH-abhängig)

Die kinetischen Konstanten für die Reduktion von 2,5-DKG mit NADH als Cofaktor zeigt Tabelle 4.6.

Tabelle 4.6: Ergebnisse der Modellierung nach Formel 4.2

v_{\max}	$37,3 \pm 7,9 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$
$K_M \text{NADH}$	$1,3 \pm 0,1 \text{ mM}$
$K_M 2,5\text{-DKG}$	$67,6 \pm 18,5 \text{ mM}$
$K_i \text{NAD}$	$2,5 \pm 0,3 \text{ mM}$
$K_i 2,5\text{-DKG}$	$39,5 \pm 11,8 \text{ mM}$

Wie erwartet, ist der K_M -Wert für NADH recht hoch – auch der K_M -Wert für 2,5-DKG steigt, wenn NADH und nicht NADPH als Cofaktor verwendet wird: Die Aktivität ist hier bei etwa 50 mM 2,5-DKG maximal (mit NADPH: bei ca. 15 mM).

Laut Literatur wechselwirken positiv geladene Aminosäuregruppen des Enzyms mit der 2'-Phosphatgruppe von NADPH [Eschenfeldt *et al.* 2001]. Das Enzym bevorzugt daher diesen Cofaktor. Da die 2,5-DKGR im Vergleich zu anderen Enzymen NADPH aber relativ locker bindet [Khurana *et al.* 1998], akzeptiert sie auch NADH.

4.6.1.3 Inhibierungen durch Zwischenprodukte der Biotransformation mit *Gluconobacter oxydans*

Im CSTR mit *Gluconobacter oxydans* wird Glucose nicht zu 100% zu 2,5-DKG umgesetzt – die maximale Ausbeute liegt bei etwa 80% (vgl. Abschnitt 8.4.2). Im gekoppelten kontinuierlichen Prozess gelangen somit immer auch unumgesetzte Glucose und die Intermediate Gluconat und 2-KG in den Enzymmembranreaktor.

Wie Abbildung 4.28 zeigt, inhibieren Gluconat und 2-KG das Enzym. Glucose hingegen beeinflusst die Aktivität des Enzyms nicht (nicht gezeigt).

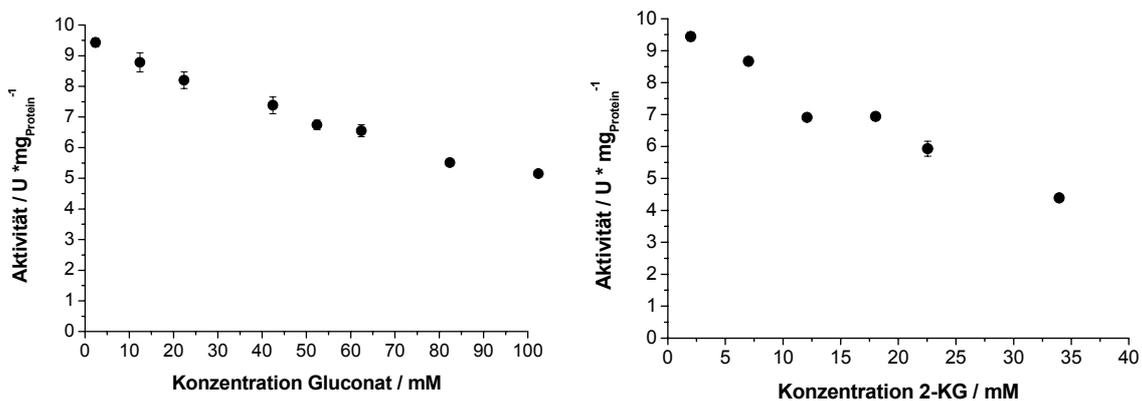


Abbildung 4.28: Einfluss von Gluconat (links) und 2-KG (rechts) auf die Enzymaktivität. Bedingungen: 20°C, 100 mM Na-Acetat, 50 mM KPi-Puffer pH 6,4, 0,1 mM NADPH, 15,9 mM 2,5-DKG, Enzymcharge J/K. Links: 2-102 mM Gluconat; Rechts: 2-34 mM 2-KG

Das Enzym verliert die Hälfte seiner Aktivität bei über 100 mM Gluconat sowie bei etwa 25 mM 2-KG. Letzteres inhibiert somit stärker als Gluconat, wahrscheinlich, weil seine Struktur der des 2,5-DKG ähnlicher ist.

Bei allen nicht-gekoppelten Reaktorversuchen wurde im Weiteren sichergestellt, dass Glucose im Satzreaktor zuvor möglichst vollständig zu 2,5-DKG umgesetzt worden war (vgl. Abschnitt 3.3.6). Im CSTR mit *Gluconobacter* ist die Ausbeute zwar nur maximal 80%, es entstehen unter den optimierten Reaktorbedingungen jedoch nur wenige mmol/L Gluconat und maximal 5-10 mmol/L 2-KG. Auch bei einer späteren Kopplung beider Reaktoren wird das Enzym durch unumgesetzte Intermediate somit nicht gravierend gehemmt, sondern allerhöchstens zu etwa 20%.

In allen theoretischen Reaktorberechnungen wurde im Folgenden ein prozentualer Faktor einbezogen, der berücksichtigt, wie viel Aktivität das Enzym in der jeweiligen Lösung durch die Anwesenheit von Gluconat oder 2-KG verliert.

4.6.1.4 Zusammenfassung: Kinetik der 2,5-DKGR

Die Reduktion von 2,5-DKG mit NADH als Cofaktor ist relativ schlecht untersucht. In vielen Arbeiten wird berichtet, dass keine Reaktion beobachtet wurde und das Enzym NADH daher generell nicht akzeptiert [Sonoyama *et al.* 1987b]. Oft heißt es zwar, dass NADPH um den Faktor 170 vor NADH bevorzugt wird, doch detaillierte kinetische Daten sind nicht angegeben [Miller *et al.* 1987]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Reduktase auch mit NADH aktiv ist, die beobachteten Aktivitäten stehen denen mit NADPH als Cofaktor in nichts nach. Der K_M -Wert für NADH ist jedoch 500mal so hoch; es muss in Konzentrationen von mindestens 1 mmol/L vorliegen, damit eine Reaktion beobachtet wird.

Eine Substratüberschussinhibierung des Enzyms durch hohe Mengen 2,5-DKG wurde bisher noch nicht beschrieben, ist aber offensichtlich. Einen Überblick über alle kinetischen Konstanten gibt Tabelle 4.7.

Tabelle 4.7: Kinetische Konstanten für 2,5-DKGR im Vergleich zu Literaturwerten

	NADPH als Cofaktor		NADH als Cofaktor	
	Diese Arbeit	[Miller <i>et al.</i> 1987]	Diese Arbeit	Literatur
$v_{max} / U \cdot mg^{-1}$	17,5	16,8	37,3	n.a.
$K_M \text{ NAD(P)H} / mM$	$2,6 \cdot 10^{-3}$	$10 \cdot 10^{-3}$	1,3	n.a.
$K_M \text{ 2,5-DKG} / mM$	10,8	26	67,6	n.a.
$K_i \text{ NAD(P)} / mM$	$8,1 \cdot 10^{-3}$	$26 \cdot 10^{-3}$	2,5	n.a.
$K_i \text{ 2,5-DKG} / mM$	21,0	n.d.	39,5	n.a.

Ein industrieller Prozess, in dem Cofaktorkonzentrationen von einigen mmol/L eingesetzt werden müssen, um ein Bulkprodukt wie Vitamin C herzustellen, ist natürlich extrem unrentabel, selbst wenn eine Cofaktorregenerierung stattfindet. Erst wenn es anderen Gruppen gelungen ist, eine 2,5-Diketogluconatreduktase zu finden oder durch Protein Engineering zu erzeugen, deren K_M -Wert für NADH sehr viel kleiner ist, wird ein Prozess mit isolierter 2,5-DKGR und NADH zur Produktion von 2-KLG interessant.

4.6.2 Kinetik der Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis*

Wie sich gezeigt hat, lässt sich verbrauchter Cofaktor mit Hilfe der *Lb*-ADH regenerieren (Abschnitt 4.5): *Lb*-ADH oxidiert Isopropanol zu Aceton und bildet dabei reduzierten Cofaktor NADPH zurück. Die Enzymkinetik dieser Reaktion wurde im Rahmen dieser Arbeit detailliert untersucht (siehe auch Anhang). Die Oxidation von Isopropanol ist reversibel, das heißt, es muss gleichzeitig die Reduktion von Aceton zu Isopropanol betrachtet und im kinetischen Modell berücksichtigt werden.

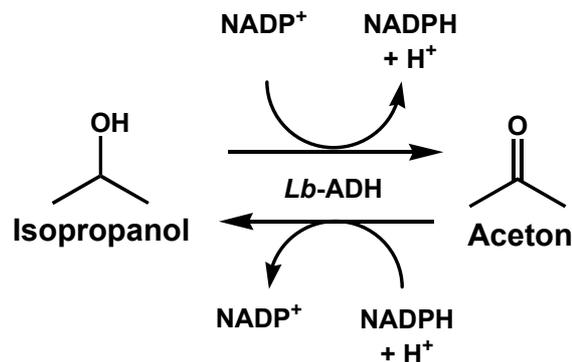


Abbildung 4.29: Oxidation von Isopropanol durch die *Lb*-ADH und mit NADP⁺ als Cofaktor.

Oxidation von Isopropanol zu Aceton:

- Michaelis-Menten-Doppelsubstratkinetik (Isopropanol, NADP⁺), keine Substratüberschussinhibierung
- Inhibierung durch das Produkt Aceton und den reduzierten Cofaktor NADPH

Reduktion von Aceton zu Isopropanol:

- Michaelis-Menten-Doppelsubstratkinetik (Aceton, NADPH), Substratüberschussinhibierung bei hohen Aceton-Konzentrationen
- Inhibierung durch das Produkt Isopropanol und den oxidierten Cofaktor NADP⁺

Außerdem wird die *Lb*-ADH durch 2-KLG inhibiert. 2,5-DKG hat hingegen keinen Einfluss auf die Enzymaktivität.

Wie bei der Erstellung des kinetischen Modells und der Ermittlung der kinetischen Konstanten vorgegangen wurde, ist detailliert im Anhang beschrieben. In Tabelle 4.8 sind die Ergebnisse der Modellierung protokolliert. Die Werte stimmen in ihrer Tendenz mit in der Literatur beschriebenen Werten überein [Schroer 2008]. Unterschiede resultieren beispielsweise aus unterschiedlichen Reaktionstemperaturen (30°C vs. 20°C) und pH-Werten (6,0 vs. 6,4). Für die Oxidation von Isopropanol zu

Aceton hat Kirsten Schroer allerdings eine Substratüberschussinhibierung gefunden, die hier nicht beobachtet werden konnte.

Tabelle 4.8: Kinetische Konstanten der *Lb*-ADH

	Isopropanol + NADP	Aceton + NADPH
$v_{\max} / U \cdot \text{mg}^{-1}$	$1,9 \pm 0,1$	$20,0 \pm 1,0$
$K_M \text{ NADP(H)} / \text{mM}$	$0,01 \pm 0,004$	$0,09 \pm 0,02$
$K_M \text{ Substrat} / \text{mM}$	$9,7 \pm 1,3$	$0,6 \pm 0,1$
$K_i \text{ NADP(H)} / \text{mM}$	$0,1 \pm 0,03$	$0,3 \pm 0,1$
$K_i \text{ Produkt} / \text{mM}$	$0,1 \pm 0,03$	$0,5 \pm 0,1$
$K_i \text{ Substratüberschuß}$	---	$449,3 \pm 134,8$
$K_i \text{ 2-KLG (kompetitive Hemmung)}/\text{mM}$	$2,1 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,2$
$K_i \text{ 2-KLG (unkompetitive Hemmung)}/\text{mM}$	$36,2 \pm 3,7$	$33,8 \pm 4,5$
$K_i \text{ 2-KLG (nichtkompetitive Hemmung)}/\text{mM}$	$34,1 \pm 3,6$	$34,5 \pm 4,5$

Man unterscheidet drei Arten von Inhibierungen: kompetitive, unkompetitive und nichtkompetitive. Bei der kompetitiven Hemmung konkurrieren Inhibitor und Substrat um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum des Enzyms, bei der unkompetitiven bindet der Inhibitor nicht an das freie Enzym, sondern an den Enzym-Substrat-Komplex. Die nichtkompetitive Hemmung beinhaltet beide zuvor beschriebene Arten: Der Inhibitor kann sowohl an das Enzym als auch an den Enzym-Substrat-Komplex binden.

Auf welche Weise 2-KLG die *Lb*-ADH inhibiert, kann an dieser Stelle noch nicht entschieden werden: Die Anpassung ist bei allen drei Inhibierungsarten gleich gut.

Wie aus Tabelle 4.8 ersichtlich wird, ist die Reduktion von Aceton gegenüber der Oxidation von Isopropanol kinetisch begünstigt. Dennoch kann die *Lb*-ADH zur Cofaktorregenerierung benutzt werden: Bei geringen NADPH-Konzentrationen wird nämlich das Gleichgewicht in Richtung Oxidation von Isopropanol verschoben.

4.6.3 Zusammenfassung: Optimale Bedingungen für Enzymreaktionen im Satzreaktor

Eine Temperatur von 20°C und ein pH-Wert von 6,4 sind für die Reduktion von 2,5-DKG optimal. Hohe Substratkonzentrationen wirken inhibierend. Als Cofaktor wird NADPH benutzt, am besten in Konzentrationen von 0,1 mM. Die Cofaktorregenerierung erfolgt durch *Lb*-ADH. Daher muss zusätzlich Isopropanol in Konzentrationen von mindestens 100 mM zur Reaktionslösung gegeben werden.

Tabelle 4.9: Optimierte Bedingungen für die Reduktion von 2,5-DKG mit 2,5-DKGR

Temperatur	20 °C
Puffer / pH	50 mM KPi (+ 100 mM Na-Acetat) pH 6,4
Konzentration Cofaktor NADPH	0,1 mM
Konzentration 2,5-DKG	10-25 mM
Cofaktorregenerierung durch	<i>Lb</i> -ADH
Konzentration Isopropanol	> 100 mM

4.7. Synthese von 2-Keto-L-Gulonat im Satzreaktor

Damit die Katalysatorkosten in einem Prozess möglichst gering ausfallen, sollte der Biokatalysator möglichst leistungsfähig sein. Die Leistungsfähigkeit wird als Umsatzzahl angegeben, in der Literatur besser bekannt als **turnover number (ton)**:

$$\text{turnover number} = \frac{\text{erhaltene Stoffmenge Produkt / mol}}{\text{eingesetzte Stoffmenge Katalysator / mol}}$$

In der Definition fehlt eine Zeitangabe – dennoch ist die turnover number zeitabhängig: Man erhält für gewöhnlich unterschiedliche Werte nach unterschiedlichen Reaktionszeiten. Für Produkte mit geringen Verdienstspannen – dazu gehört auch Vitamin C – sollte die turnover number größer als 20.000 sein [Behr 2008]. Wird ein Katalysator rezykliert und erneut eingesetzt, ist die Summe aller tons der verschiedenen Wiederholungsansätze die **total turnover number (ttn)**.

Eine weitere Kenngröße ist die **turnover number des Cofaktors**. Sie gibt analog zur turnover number des Enzyms an, welche Stoffmenge Cofaktor eingesetzt werden musste, um eine bestimmte Menge Produkt zu erhalten. Die Angabe ist nur sinnvoll bei einer Cofaktorregenerierung (bei stöchiometrischen Mengen ist sie gleich 1).

4.7.1 Enzymreaktion ohne Cofaktorregenerierung

Es wurden Biotransformationen mit stöchiometrischen Mengen Cofaktor durchgeführt, um zu überprüfen, ob das theoretische Modell die Reaktion gut beschreiben kann, also Messwerte und simulierte Werte übereinstimmen. Als Cofaktor diente NADPH (Abbildung 4.30) oder NADH (Abbildung 4.31).

4.7. Synthese von 2-Keto-L-Gulonat im Satzreaktor

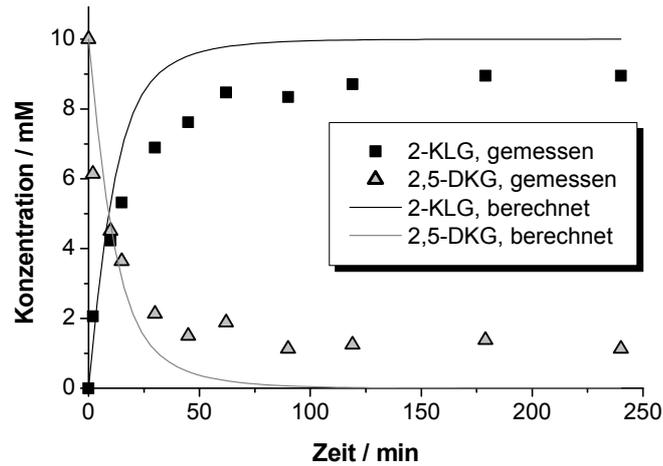


Abbildung 4.30: Enzymreaktion im Satzreaktor mit stöchiometrischen Mengen NADPH als Cofaktor. Bedingungen: 20°C, 100 mM Na-Acetat, 50 mM KP_i -Puffer pH 6,4, 10 mM 2,5-DKG, 11 mM NADPH, 0,05 mg/mL 2,5-DKGR, Enzymcharge F, V = 1 mL.

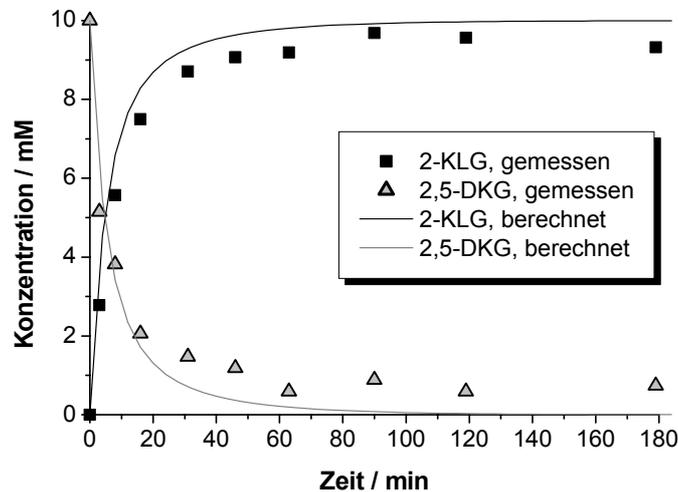


Abbildung 4.31: Enzymreaktion im Satzreaktor mit stöchiometrischen Mengen NADH als Cofaktor. Bedingungen: 20°C, 100 mM Na-Acetat, 50 mM KP_i -Puffer pH 6,4, 10 mM 2,5-DKG, 11 mM NADH, 0,2 mg/mL 2,5-DKGR, Enzymcharge F, V = 1 mL.

In beiden Fällen wird die anfängliche Reaktion durch das Modell gut beschrieben. Allerdings findet trotz eines geringen Cofaktorüberschusses kein voller Umsatz statt, obwohl dies nach Modellsimulationen der Fall sein sollte.

Tabelle 4.10: Ergebnisse der Biotransformationen ohne Cofaktorregenerierung

Cofaktor	Ausbeute [%]	Eingesetzte Menge 2,5-DKGR [mg]	ton 2,5-DKGR
NADPH	90	0,05	6088
NADH	96	0,2	1625

Interessanterweise erreicht die Reaktion eine höhere Ausbeute, wenn NADH als Cofaktor eingesetzt wird (96% statt 90%). Das könnte daran liegen, dass hier eine größere Enzymmenge eingesetzt wurde. Möglicherweise wird die Reduktase durch hohe Cofaktorkonzentrationen gehemmt, in einer Weise, die über die kompetitive Produkthemmung hinausgeht. Vielleicht bindet der oxidierte Cofaktor an das Enzym und inhibiert es irreversibel. Das würde dann auch erklären, warum bei beiden Biotransformationen kein 100%iger Umsatz erreicht werden konnte. Mit höheren Enzymkonzentrationen wäre möglicherweise ein voller Umsatz machbar.

4.7.2 Enzymreaktion mit Cofaktorregenerierung durch *Lb*-ADH

Auf welche Art 2-KLG die *Lb*-ADH inhibiert, konnte über Biotransformationen mit Cofaktorregenerierung festgestellt werden. Der Konzentrationsverlauf von 2,5-DKG und 2-KLG wurde mit den Konzentrationen verglichen, die über die drei verschiedenen kinetischen Modelle berechnet wurden. Das Ergebnis zeigt Abbildung 4.32 a-c.

Wird angenommen, dass 2-KLG die *Lb*-ADH kompetitiv inhibiert, können die tatsächlich beobachteten Konzentrationsverläufe nicht nachvollzogen werden (Abbildung 4.32, oben). 2-KLG inhibiert entweder unkompetitiv oder nicht-kompetitiv – beide Modelle bilden die Realität gleich gut ab (Mitte, unten). Die nicht-kompetitive Inhibierung ist eine Mischung aus kompetitiver und unkompetitiver Hemmung. Da man sich im Zweifel für das einfachere Modell entscheidet, wird für alle weiteren Berechnungen von einer unkompetitiven Hemmung ausgegangen: 2-KLG bindet an den ADH-Substrat-Komplex und hemmt dadurch die Reaktion.

Weitere Biotransformationen im Satzreaktor mit 40 bzw. 25 mM 2,5-DKG zeigt Abbildung 4.33.

4.7. Synthese von 2-Keto-L-Gulonat im Satzreaktor

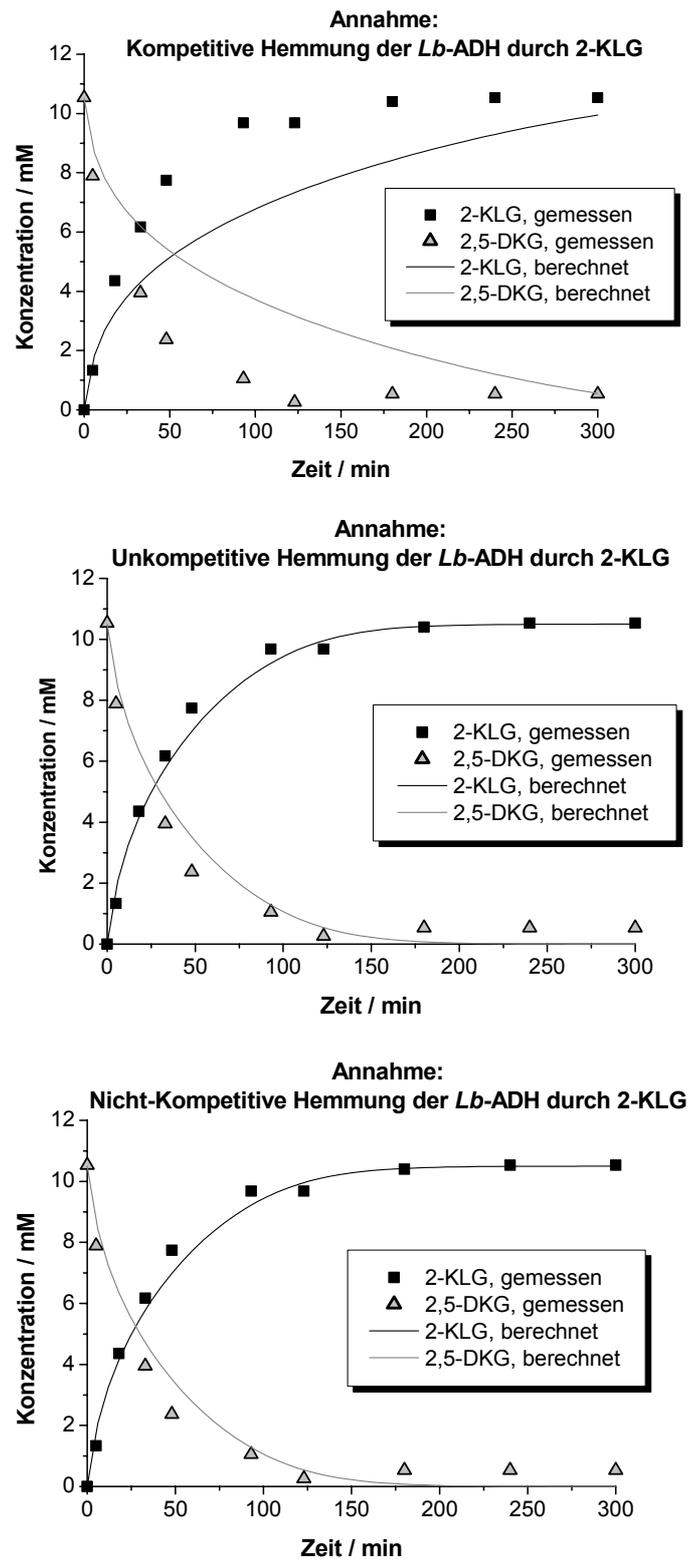


Abbildung 4.32 a-c: Enzymreaktionen im Satzreaktor zur Reduktion von 2,5-DKG mit 2,5-DKGR unter Cofaktorregenerierung mit *Lb*-ADH. Die durchgezogenen Linien zeigen theoretisch berechnete Werte unter der Annahme verschiedener Inhibierungsarten von 2-KLG auf *Lb*-ADH. Bedingungen: 20°C, 100 mM Na-Acetat, 50 mM KP_i -Puffer pH 6,4, 10,5 mM 2,5-DKG, 0,1 mM NADP, 0,1 mg/mL 2,5-DKGR, Enzymcharge F, 0,5 mg/mL *Lb*-ADH, 100 mM Isopropanol, $V=1,5$ mL.

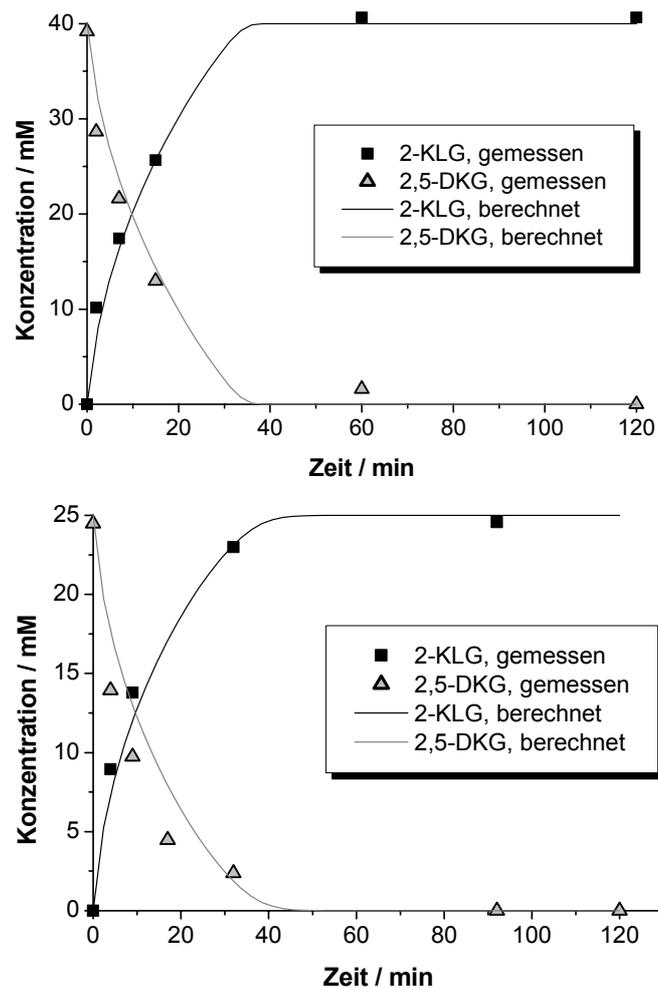


Abbildung 4.33: Enzymreaktionen im Satzreaktor zur Reduktion von 2,5-DKG mit 2,5-DKGR unter Cofaktorregenerierung mit *Lb*-ADH. Die durchgezogenen Linien zeigen theoretisch berechnete Werte unter der Annahme unkompetitiver Inhibition von 2-KLG auf *Lb*-ADH. Bedingungen: 20°C, 100 mM Na-Acetat, 50 mM K_2P_i -Puffer pH 6,4, $V=1,5$ mL, Enzymcharge F. Oben: 40 mM 2,5-DKG, 0,2 mM NADP, 2 mg/mL 2,5-DKGR, 3,5 mg/mL *Lb*-ADH, 600 mM Isopropanol. Unten: 25 mM 2,5-DKG, 0,2 mM NADP, 0,8 mg/mL 2,5-DKGR, 2,6 mg/mL *Lb*-ADH, 300 mM Isopropanol.

Tabelle 4.11: Ergebnis der Biotransformationen im Satzreaktor

Konz. 2,5-DKG [mM]	Ausbeute [%]	Eingesetzte Menge 2,5-DKGR [mg]	voller Umsatz nach [min]	ton 2,5-DKGR	ton NADP(H)
10,5	100	0,15	180	3579	105
25	100	1,2	50	1044	123
40	100	3	38	692	203

Es kann in Satzreaktoren mit Cofaktorregenerierung eine Ausbeute von 100% erreicht werden. Auch hohe 2,5-DKG-Konzentrationen von größer als 25 mM sind innerhalb

kürzester Zeit umsetzbar, wenn die Enzymmenge entsprechend hoch ist. Die turnover numbers sind aufgrund der geringen Menge eingesetzten Eduktes und der recht hohen Enzymmenge sehr niedrig, sollten sich aber im kontinuierlichen Prozess steigern lassen.

4.8. Kontinuierliche Produktion von 2-KLG im Enzymmembranreaktor

4.8.1 Einleitung: EMR

Ein Enzymmembranreaktor (EMR) ist ein kontinuierlich betriebener Reaktor mit Enzymen als Biokatalysatoren: Edukte werden kontinuierlich eingepumpt und die Produkte abgezogen. Eine Ultrafiltrationsmembran hält die Enzyme aufgrund ihres hohen Molekulargewichts im Reaktorraum zurück. Cofaktoren können die Membran hingegen passieren und müssen ebenfalls kontinuierlich zugeführt werden.

Die Leistungsfähigkeit des EMR lässt sich wie bei allen kontinuierlichen Reaktoren über die **Raum-Zeit-Ausbeute** charakterisieren, also über die Menge an Produkt, die pro Zeit und Volumeneinheit des Reaktors gebildet wird.

Die **total turnover number (ttn)** gibt Auskunft über die Lebensdauer des eingesetzten Enzyms. Die Umsatzfrequenz, als **turnover frequency (tof)** bekannt, informiert hingegen über die Katalysatoraktivität. Hat das Enzym nur ein aktives Zentrum, lautet die entsprechende Formel:

$$\text{turnover frequency} = \frac{\text{erhaltene Stoffmenge Produkt} / \text{mol}}{\text{eingesetzte Stoffmenge Katalysator} / \text{mol} \times \text{Zeit} / \text{h}}$$

Sie hat die Einheit „pro Stunde“. Eine hohe tof ermöglicht in einer technischen Anlage einen hohen Durchsatz. Für Produkte mit geringer Verdienstspanne sollte sie mindestens 10.000 h^{-1} betragen [Behr 2008].

4.8.2 Voruntersuchungen

Sanli *et al.* vermuteten aufgrund von Kristallstrukturdaten der 2,5-DKGR, dass Magnesium-Ionen die Enzymstruktur stabilisieren [Sanli *et al.* 2001]. Dieser Effekt konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht nachvollzogen werden: In Anwesenheit von Mg^{2+} ändert sich die Lagerstabilität des Enzyms nicht (Abbildung 4.34). Hohe Isopropanolkonzentrationen von 1 M hingegen reduzieren die Halbwertszeit auf die Hälfte. Sie werden im EMR eingesetzt, um die Oxidation von Isopropanol durch die Lb-ADH und damit die Cofaktorregenerierung kinetisch zu begünstigen.

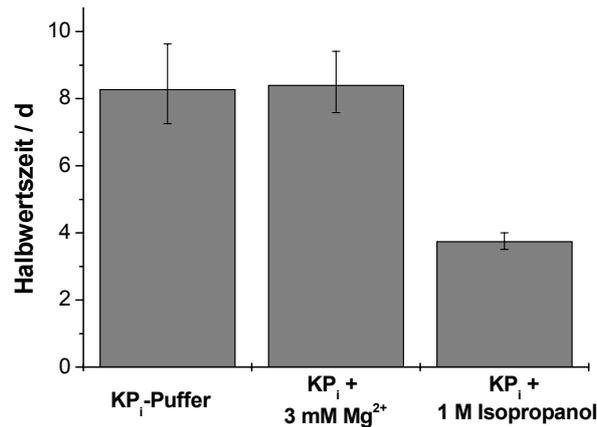


Abbildung 4.34: Lagerstabilität der 2,5-DKGR bei 20°C und pH 6,4 in 50mM KP_i-Puffer, Enzymcharge A. 1. nur Puffer, 2. Puffer + 3mM MgCl₂, 3. Puffer + 1M Isopropanol

Die Lagerstabilität der *Lb*-ADH erhöht sich in Anwesenheit von Mg²⁺-Ionen um das Fünffache (Abbildung 4.35). Auch hohe Isopropanolkonzentrationen haben einen positiven Einfluss.

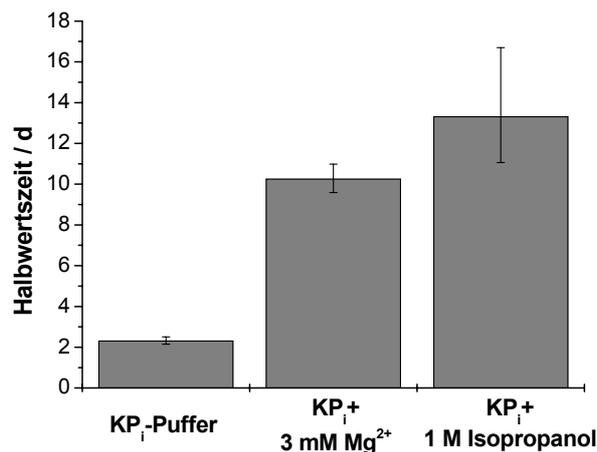


Abbildung 4.35: Lagerstabilität der *Lb*-ADH bei 20°C und pH 6,4 in 50mM KP_i-Puffer. 1. nur Puffer, 2. Puffer + 3 mM MgCl₂, 3. Puffer + 1 M Isopropanol

Da Mg²⁺-Ionen die *Lb*-ADH stabilisieren und der 2,5-DKGR nicht schaden, wurde bei allen kontinuierlichen Reaktorversuchen 3 mM MgCl₂ zur Substratlösung zugegeben. Die Isopropanolkonzentration wurde so hoch gewählt, wie es anhand der kinetischen Modellierung jeweils als sinnvoll erschien.

4.8.3 Produktion im Enzymmembranreaktor

Abbildung 4.36 und Abbildung 4.37 zeigen den Enzymmembranreaktor, der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurde (Eigenbau Forschungszentrum Jülich).

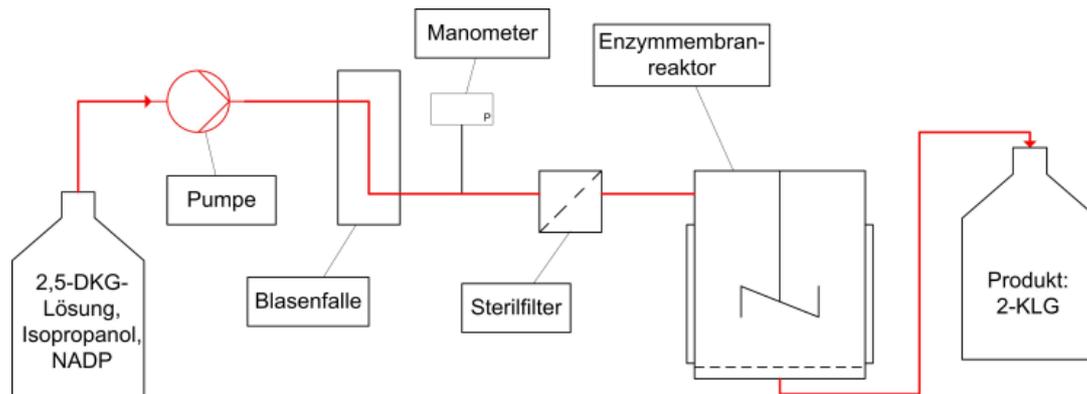


Abbildung 4.36: Enzymmembranreaktor zur kontinuierlichen Reduktion von 2,5-DKG zu 2-KLG

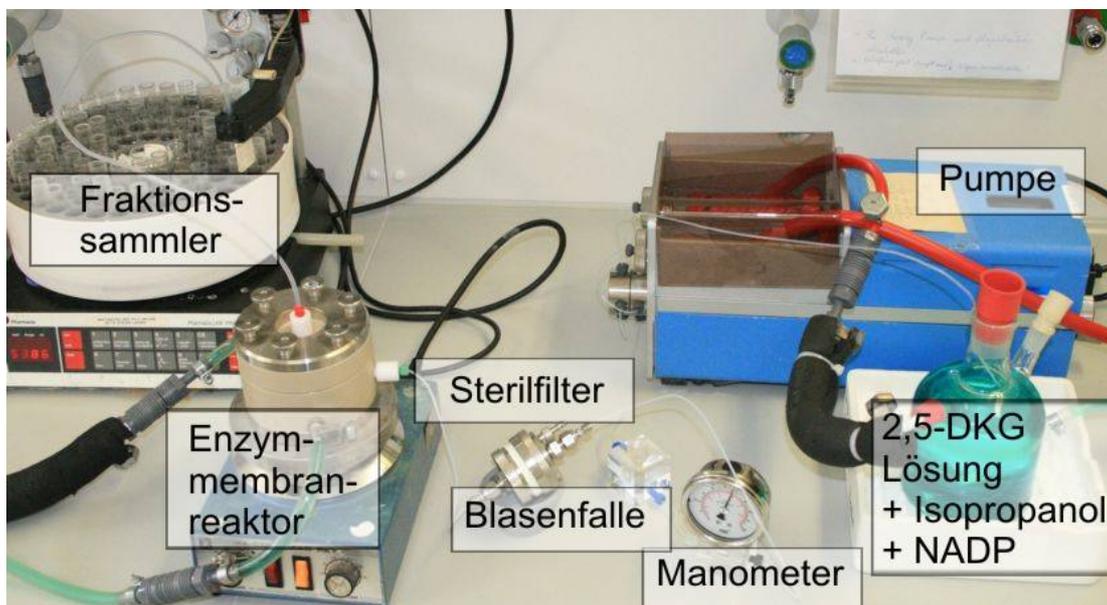


Abbildung 4.37: Enzymmembranreaktor zur kontinuierlichen Reduktion von 2,5-DKG zu 2-KLG

Der Reaktorinhalt wurde über eine magnetische Scheibe permanent gerührt und mittels eines Kryostaten auf 20°C gehalten. Zunächst fand die Produktion in einem Reaktor mit einem Innenvolumen von 3 mL statt, später in einem 10 mL-Reaktor.

Als Substratlösungen wurden 2,5-DKG-haltige Lösungen aus der Biotransformation mit *G. oxydans* verwendet (Kapitel 3). Diese Lösungen (in Volumina von etwa 500 mL) wurden zuvor mit der erforderlichen Menge an Isopropanol und NADP⁺ versetzt und über eine Kolbenpräzisionspumpe in den Reaktorraum gepumpt. Die Substratlösung wurde permanent auf 4°C gekühlt; es wurde in Parallelversuchen überprüft, dass unter diesen Bedingungen keine Zersetzung von NADP⁺ stattfand.

Vor dem Reaktor waren eine Blasenfalle, ein Manometer und ein Sterilfilter zwischengeschaltet. Über die Blasenfalle wurden zu Beginn der Reaktion mit Hilfe

einer Spritze die benötigten Enzyme in das System gegeben. So konnte bei Bedarf im Laufe eines Reaktorversuches auch neues Enzym zugegeben werden.

Normalerweise wird in Enzymmembranreaktoren eine Ultrafiltrationsmembran eingesetzt, die die Enzyme zurückhält, aber Cofaktoren ungehindert passieren lässt. Um die Kosten für den eingesetzten Cofaktor zu senken und seine turnover number zu erhöhen, können Nanofiltrationsmembranen benutzt werden [Seelbach *et al.* 1997]. YM3 ist eine Ultrafiltrationsmembran mit einem Cut-Off von 3000 Dalton, YC500 hingegen eine Nanofiltrationsmembran mit einem Cut-Off von 500 Dalton. NADPH als Tetranatriumsalz hat eine molare Masse von 833 Dalton.

4.8.3.1 3-mL-Reaktor

Einen Reaktorlauf im 3-mL-Reaktor zeigt Abbildung 4.38. Es wurden zwei unterschiedliche Substratkonzentrationen eingestellt (11 und 35 mM 2,5-DKG) mit jeweils zwei verschiedenen Verweilzeiten (1 und 2 bzw. 2 und 4 Stunden). Der Reaktor lief über 110 Verweilzeiten stabil, das waren neun Tage.

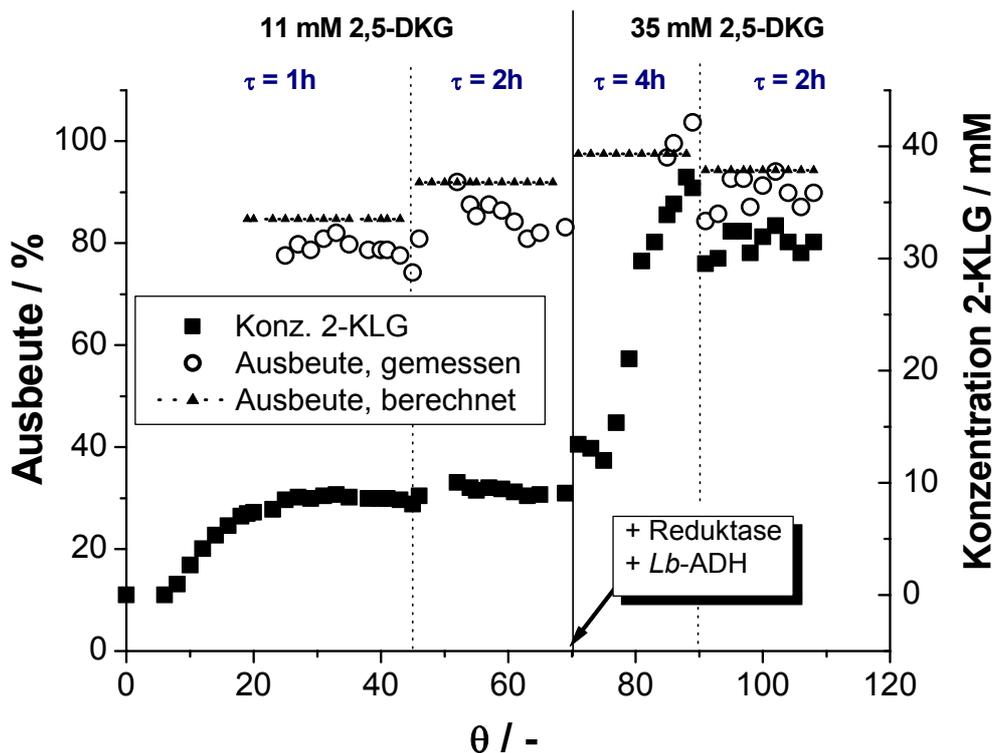


Abbildung 4.38: Kontinuierliche Produktion von 2-KLG im Enzymmembranreaktor. Bedingungen: $V = 3$ mL, YC500-Membran, 20°C , 100 mM Na-Acetat, 50 mM K_2P_i -Puffer, $\text{pH} 6,4$, 11 - 35 mM 2,5-DKG, $0,1$ mM NADP, 100 - 300 mM Isopropanol, $\tau = 1$ - 4 h, 5 - 10 mg/mL *Lb*-ADH, $0,17$ - $0,44$ mg/mL 2,5-DKGR, Enzymcharge C.

Mit entsprechend hohen Verweilzeiten (4 h) war es möglich, Ausbeuten von 100% zu erreichen. Auch bei niedrigeren Verweilzeiten (1 und 2 h) lag die Ausbeute stets bei

4.8. Kontinuierliche Produktion von 2-KLG im Enzymmembranreaktor

mindestens 79%. Die Raumzeitausbeuten betragen zwischen 114 und 378 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Alle Charakteristika des Reaktorlaufs sind in Tabelle 4.12 protokolliert.

Dort sind auch die theoretischen Ausbeuten verzeichnet, die anhand der kinetischen Daten der beiden Enzyme berechnet wurden. Offensichtlich können solche Reaktorsimulationen die tatsächlich erreichten Ausbeuten relativ gut vorhersagen, wenn auch die Ausbeute oft um einige Prozent überschätzt wird. Bei einem solch komplexen Modell sind diese Unterschiede jedoch zu vernachlässigen, vor allem da die HPLC-Analytik Messungenauigkeiten von einigen Prozent bedingt.

Tabelle 4.12: Kontinuierliche Produktion von 2-KLG im 3-mL-Enzymmembranreaktor

	A	B	C	D
Konzentration 2,5-DKG / mM	11		35	
Konzentration Isopropanol / mM	100		300	
Konzentration NADP / mM	0,1			
Konzentration Reduktase / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	0,28		0,58	
Konzentration <i>Lb</i>-ADH / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	5		10	
Membran	YC 500			
Verweilzeit / h	1	2	4	2
Durchschnittliche Ausbeute / %	78,8	83,1	100	90,6
Theoretische Ausbeute/ %	84,7	91,9	97,5	94,3
Raum-Zeit-Ausbeute / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	166,9	114,4	210,0	378,7
Raum-Zeit-Ausbeute / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	32,4	22,2	40,7	73,5
ton 2,5-DKGR	32.947	26.629	24.589	34.968
ttn 2,5-DKGR	119.133			
tof 2,5-DKGR / h^{-1}	845	579	324	920
ton NADP(H)	70	95	222	316
Durchschnittliche ttn NADP(H)	142			

Im Enzymmembranreaktor wurde eine total turnover number von knapp 120.000 für die 2,5-DKGR erreicht; das ist zufrieden stellend hoch und wie erwartet um ein Vielfaches höher als bei der Produktion im Satzreaktor, bei der maximal eine ttn von 6088 erreicht wurde (vgl. Tabelle 4.10 und Tabelle 4.11).

Die total turnover number für den Cofaktor hingegen ist mit maximal 316 vergleichsweise schlecht und auch nicht viel höher als im Satzreaktor (203, vgl. Tabelle 4.11). Seelbach *et al.* erzielten bei der Produktion von L-*tert*-Leucin im EMR mit einer Nanofiltrationsmembran eine ttn von 7900 für den Cofaktor NAD⁺ [Seelbach *et al.* 1997]. Im Rahmen dieser Arbeit war die Menge an eingepumptem NADP⁺ jedoch konstant mit 0,1 mM relativ hoch; in weiteren Versuchen hätte man die Konzentration erniedrigt, um den Wert zu finden, bei dem die Reaktion ohne Einbuße an Ausbeute abgelaufen wäre. Dann hätte sich auch hier die ttn des Cofaktors deutlich erhöht.

Jedoch sei hier auf ein Problem hingewiesen: Der Reaktorinnendruck war wegen der Nanofiltrationsmembran bereits sehr hoch (>5 bar). Daher konnte die Verweilzeit nicht weiter erniedrigt werden, obwohl dies eigentlich nötig gewesen wäre: Bei dem 50 mL-Reaktor mit *Gluconobacter oxydans* (Kapitel 3) beträgt die Verweilzeit 2 Stunden – das bedeutet, dass bei einer gekoppelten Anlage im 10 mL-EMR die Verweilzeit bei 24 Minuten liegt. Der resultierende Druck für die konstruierte Anlage wäre zu hoch. Im Hinblick auf die spätere Kopplung wurde daher bei allen folgenden Reaktorläufen eine Ultrafiltrationsmembran verwendet. Die Konzentration von NADP lag daher auch weiterhin bei 0,1 mM, da Reaktorsimulationen gezeigt haben, dass die Ausbeute dabei maximal ist (Abbildung 4.39):

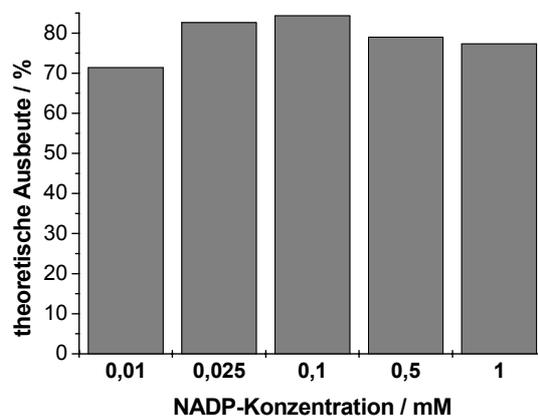


Abbildung 4.39: Einfluss der NADP-Konzentration auf die Ausbeute im EMR (Reaktorsimulationen).
 Bedingungen: 35 mM 2,5-DKG, 300 mM Isopropanol, 1 mg/mL Reduktase, 5 mg/mL *Lb*-ADH, $\tau=1$ h.

Aufgrund der hohen Verweilzeiten ist die turnover frequency des Enzyms mit maximal $920 \cdot \text{h}^{-1}$ relativ gering, sollte sich aber in den folgenden Reaktorläufen noch steigern lassen. Miller *et al.* gaben für die Reduktase im Satzreaktor ohne Cofaktorregenerierung eine turnover frequency von 500 min^{-1} an (30.000 h^{-1} , [Miller *et al.* 1987]). Das war

allerdings bei 25°C – da ist die Aktivität des Enzyms etwa doppelt so hoch (vgl. Abbildung 4.16).

Simulationen zeigen, dass die Konzentration an Isopropanol einen hohen Einfluss auf die Reaktorausbeute hat: Die Ausbeute erhöht sich bei höheren Konzentrationen drastisch und erreicht unter den gewählten Bedingungen erst bei etwa 800 mM Isopropanol ein Maximum (Abbildung 4.40).

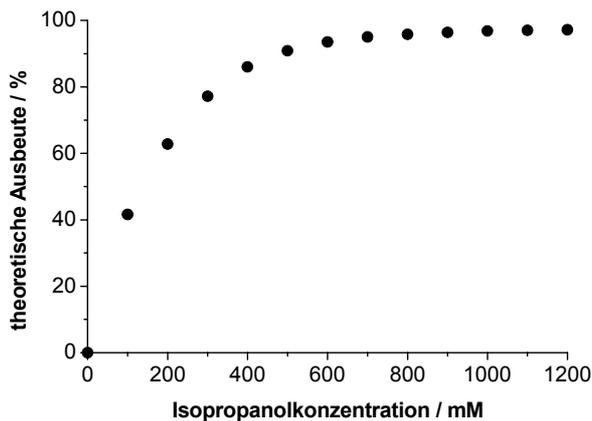


Abbildung 4.40: Einfluss der Isopropanolkonzentration auf die Ausbeute im EMR nach Reaktorsimulationen. Gewählte Bedingungen: 35 mM 2,5-DKG, 0,1 mM NADP, 0,5 mg/mL Reduktase, 5 mg/mL *Lb*-ADH, $\tau=1$ h.

In diesem Reaktorlauf wurde die Isopropanolkonzentration bereits von 100 auf 300 mM erhöht – in späteren Reaktorläufen soll sie bis auf 1000 mM gesteigert werden. Zwar halbiert sich dabei die Halbwertszeit der Reduktase (vgl. Abbildung 4.34), doch um einen hohen Durchsatz mit hoher Ausbeute zu erreichen, ist diese Vorgehensweise notwendig.

Es sei ausdrücklich darauf hingewiesen, dass der Reaktorlauf nach neun Tagen nicht abgebrochen wurde, weil die Produktivität des Reaktors nachließ. Aber die Optimierung der EMR-Kennzahlen steht in dieser Arbeit nicht im Vordergrund. Stattdessen soll das EMR-Verhalten in Bezug auf eine Integration in eine Reaktorkaskade studiert werden.

4.8.3.2 10-mL-Reaktor

Im EMR muss alles 2,5-DKG reduziert werden, welches zuvor im Ganzzell-CSTR mit *Gluconobacter oxydans* (Kapitel 3) entstanden ist. Der Durchsatz ist entsprechend hoch, weshalb im Folgenden auf einen 10-mL-EMR umgestiegen wurde. Die Verweilzeit beträgt in einer späteren Kopplung 24 Minuten.

Abbildung 4.41 zeigt einen Reaktorlauf im 10-mL-EMR. Der Reaktor lief über 115 Verweilzeiten, das waren vier Tage.

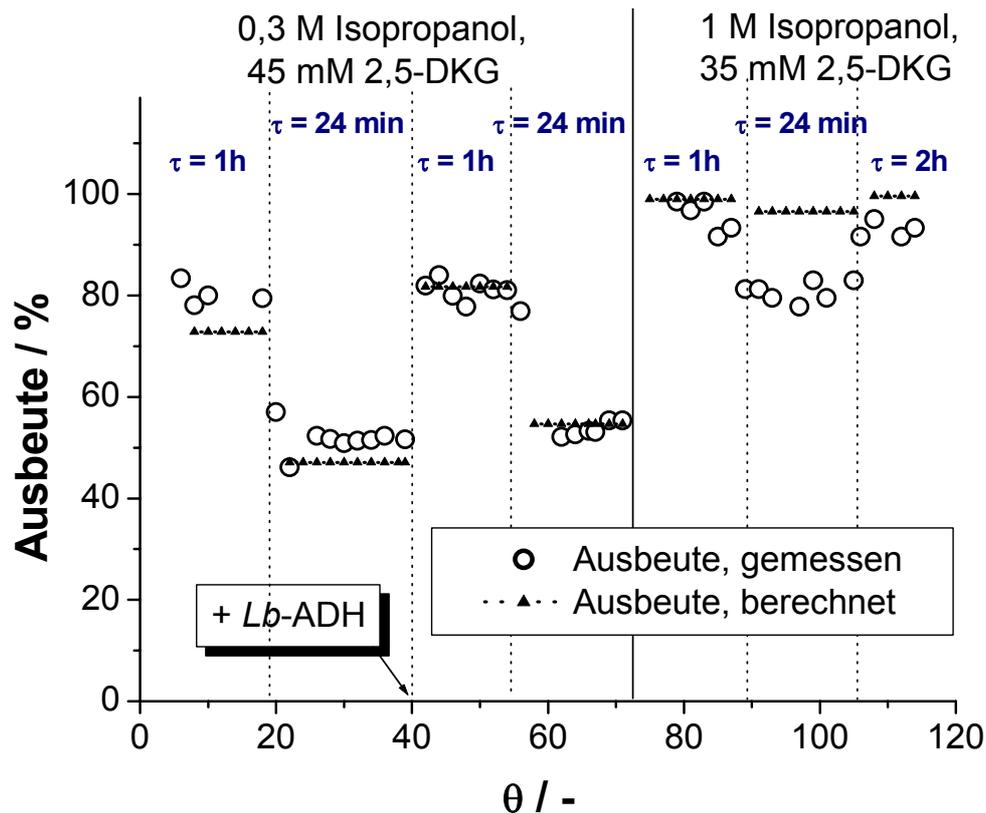


Abbildung 4.41: Kontinuierliche Produktion von 2-KLG im Enzymmembranreaktor. Bedingungen: $V = 10$ mL, YM3-Membran, 20°C , 100 mM Na-Acetat, 50 mM KPi -Puffer, $\text{pH}6,4$, 35 - 45 mM 2,5-DKG, $0,1$ mM NADP, 300 - 1000 mM Isopropanol, $\tau = 0,4$ - 2 h, $5,4$ - $7,95$ mg/mL *Lb*-ADH, $2,22$ mg/mL 2,5-DKGR, Enzymcharge E.

Die erzielten Werte fasst Tabelle 4.13 zusammen.

Eine Ausbeute von über 90% ist möglich – allerdings nur bei Verweilzeiten von einer Stunde oder mehr. Bei einer Verweilzeit von 24 Minuten kann eine Ausbeute von 80% erzielt werden – dafür muss jedoch die Isopropanolkonzentration entsprechend hoch sein. Durch eine Erhöhung der Isopropanolkonzentration von 300 auf 1000 mM erhöht sich die Ausbeute von 53,6% auf 80,8% (allerdings wurde dabei auch die Substratkonzentration von 45 auf 35 mM erniedrigt, so dass der Effekt bei gleich bleibenden Bedingungen möglicherweise weniger stark ausgefallen wäre). Diese Beobachtung bestätigt die obigen Reaktorsimulationen (vgl. Abbildung 4.40).

4.8. Kontinuierliche Produktion von 2-KLG im Enzymmembranreaktor

Tabelle 4.13: Kontinuierliche Produktion von 2-KLG im 10-mL-Enzymmembranreaktor

	A	B	C	D	E	F	G
Konz. 2,5-DKG / mM	45	45	45	45	35	35	35
Konz. Isopropanol / mM	300	300	300	300	1000	1000	1000
Konz. NADP / mM	0,1						
Konz. Reduktase / mg * mL⁻¹	1,49						
Konz. <i>Lb</i>-ADH / mg * mL⁻¹	5,4			7,95			
Membran	YM3						
Verweilzeit / h	1	0,4	1	0,4	1	0,4	2
Durchschnittliche Ausbeute / %	79,7	51,5	81,2	53,6	95,3	80,8	91,6
Theoretische Ausbeute / %	72,8	47,1	81,7	54,7	99,0	96,6	99,6
Raum-Zeit-Ausbeute / mmol * L⁻¹ * d⁻¹	861	1391	877	1447	801	1697	385
Raum-Zeit-Ausbeute / g * L⁻¹ * d⁻¹	167	270	170	281	155	329	75
ton 2,5-DKGR	11496	10612	14222	7731	12219	9712	5872
ttn 2,5-DKGR	71865						
tof 2,5-DKGR / h⁻¹	821	1327	837	1381	764	1619	367
ton NADP(H)	359	232	365	241	334	283	321
Durchschnittliche ttn NADP(H)	302						

Die Zugabe von *Lb*-ADH sollte theoretisch die Ausbeute steigern (Abbildung 4.42).

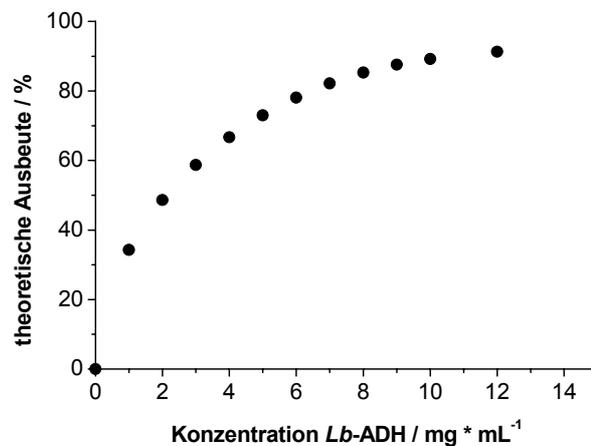


Abbildung 4.42: Einfluss der Konzentration der *Lb*-ADH-Konzentration auf die Reaktorausbeute nach Reaktorsimulationen. Bedingungen: 45 mM 2,5-DKG, 300 mM Isopropanol, 0,1mM NADP, 2,2 mg/mL Reduktase, $\tau=1h$.

Im Reaktorlauf wurde dieser Effekt aber so gut wie nicht beobachtet: Durch Erhöhung der ADH-Konzentration von 5,4 auf 8 mg/mL erhöhte sich die Ausbeute lediglich von 79,7% auf 81,2% (bei einer Verweilzeit von einer Stunde), theoretisch hätte man eine Erhöhung von 72,8% auf 81,7% feststellen müssen. Vielleicht existieren zusätzliche Inhibierungen, die im Modell nicht berücksichtigt sind. Offensichtlich ist das kinetische Modell hier unzulänglich.

Die hier erzielten Raum-Zeit-Ausbeuten waren sehr viel höher als im 3-mL-Reaktor, sie betragen hier bis zu $1697 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Auch die turnover frequencys des Enzyms sind mit bis zu $1619 \cdot \text{h}^{-1}$ höher.

Im Vergleich zum 3-mL-EMR wurde eine geringere total turnover number für die Reduktase erzielt: knapp 72.000 statt wie zuvor knapp 120.000. Das liegt daran, dass hier eine sehr viel höhere Enzymmenge eingesetzt wurde: Das Volumen des Reaktors ist größer und die Verweilzeiten waren sehr viel kürzer. Mit längerer Versuchszeit hätte die ttn aber noch gesteigert werden können.

Allerdings wird zum Ende des Reaktorlaufes eine Desaktivierung sichtbar: Gerade bei den letzten beiden Etappen mit einer Verweilzeit von 24 Minuten und 2 Stunden bleibt die erreichte Ausbeute stärker als zuvor hinter der berechneten zurück. Die Ausbeuteeinbußen lassen sich im Modell nur dann nachvollziehen, wenn die Aktivität der Reduktase innerhalb der vier Tage auf ein Sechstel gesunken wäre. Bei späteren Reaktorversuchen wird man jedoch sehen, dass die 2,5-DKGR im Reaktorbetrieb unter den gegebenen Bedingungen keine solch starke Desaktivierung zeigt (Kapitel 5).

Kinetikuntersuchungen hatten impliziert, dass die 2,5-DKG-Konzentration nicht zu hoch sein darf (vgl. Abbildung 4.24). Im Reaktoreinsatz hat sich diese Inhibierung jedoch nicht negativ bemerkbar gemacht. Reaktorsimulationen bestätigen das (Abbildung 4.43): Unter den hier gewählten Bedingungen hat die Substratüberschussinhibierung keinen großen Effekt. Zwar fällt die theoretische Ausbeute ab einer Substratkonzentration von 30 mM langsam ab, dieser Abfall ist aber nicht drastisch und auch bei 2,5-DKG-Konzentrationen von 50 mM beträgt die Ausbeute noch immer 85%. Die Raumzeitausbeute steigt stetig. Von hohen Substratkonzentrationen größer 25 mM im EMR ist somit doch nicht abzuraten – sie sind sogar besser, da die Ausbeute nur wenig kleiner wird, die Raumzeitausbeute aber bemerkbar steigt.

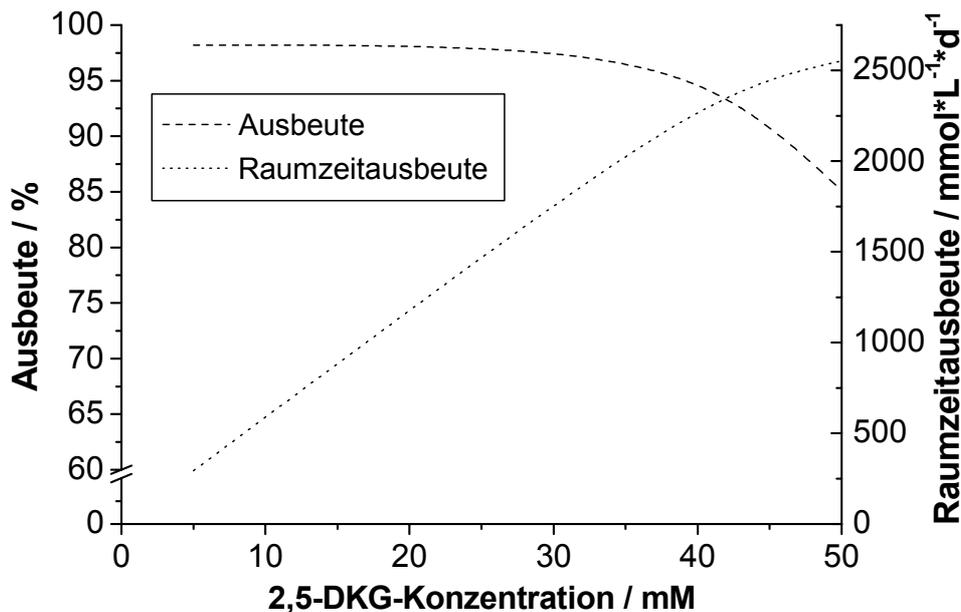


Abbildung 4.43: Einfluss unterschiedlicher 2,5-DKG-Konzentration auf die EMR-Ausbeuten nach Modellsimulationen. Bedingungen: 1000 mM Isopropanol, 1,5 mg/mL Reduktase, 0,1 mM NADP, 7,95 mg/mL Lb-ADH, $\tau=24$ min, $V=10$ mL.

Die optimierten Bedingungen für den Betrieb eines EMRs zur Produktion von 2-KLG mit der 2,5-DKGR sind in Tabelle 4.14 zusammengefasst.

Tabelle 4.14: Optimale Bedingungen für einen EMR zur Produktion von 2-KLG

Temperatur	20 °C
Puffer / pH	50 mM KP _i pH 6,4
Konzentration Cofaktor NADPH	0,1 mM
Konzentration 2,5-DKG	30-50 mM
Cofaktorregenerierung durch	<i>Lb</i> -ADH
Konzentration Isopropanol	1000 mM
Verweilzeit	24 Minuten
Ausbeute	> 80%

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich die 2,5-DKGR für eine kontinuierliche Produktion von 2-KLG im Enzymmembranreaktor eignet. Es können Ausbeuten von über 80% erzielt werden, auch voller Umsatz ist möglich, wenn die Verweilzeit entsprechend gering gewählt wird. Die maximale Raumzeitausbeute betrug $1697 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ($= 329 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). Die Produktion kann über einige Tage und voraussichtlich auch über einige Wochen fortgesetzt werden.

Dies ist das erste Mal, dass ein EMR mit der 2,5-Diketo-D-Gluconatreduktase betrieben wurde. In der Literatur ist lediglich der Einsatz eines 500 mL-Satzreaktor zur Produktion von 2-KLG beschrieben (Tabelle 4.15). Im Vergleich dazu konnten vor allem die Raumzeitausbeuten erheblich gesteigert werden.

Tabelle 4.15: Vergleich der Ergebnisse mit Literaturwerten

	Diese Arbeit	[Wührer <i>et al.</i> 2006]
Reaktor	EMR, 10 mL	Satzreaktor, 500 mL
Cofaktorregenerierung	<i>Lb</i> -ADH	Glucosedehydrogenase
2,5-DKG-Konz [mM]	35	30
Ausbeute	80,8 %	82 %
Raum-Zeit-Ausbeute [g*L⁻¹*d⁻¹]	329,0	33,7

4.9. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden große Mengen reine 2,5-Diketo-D-Gluconatreduktase aus rekombinanten *E. coli*-Zellen isoliert: insgesamt etwa 470 mg. Die Reaktionsbedingungen für die Reduktion von 2,5-DKG wurden optimiert; für die Cofaktorregenerierung eignet sich am besten eine *Lb*-ADH. Die Enzymkinetiken für die Reduktase (mit NADPH und NADH als Cofaktor) und für die *Lb*-ADH wurden detailliert untersucht. Anhand der kinetischen Daten wurde ein Modell erstellt, das es erlaubt, Reaktorläufe zu simulieren und deren Ausbeuten vorauszusagen.

Erstmals wurde ein Enzymmembranreaktor mit 2,5-DKGR und *Lb*-ADH betrieben. Er lief über mehrere Tage stabil und erreichte Raumzeitausbeuten von bis zu 1697 mmol*L⁻¹*d⁻¹. Die Ausbeute betrug dabei 80,8%. Jedoch sind auch Ausbeuten von bis zu 100% möglich, wenn die Verweilzeit entsprechend lang gewählt wird.

Die Arbeiten zu *G. oxydans* (Kapitel 3) und zur 2,5-DKGR (dieses Kapitel) ermöglichen es, im Folgenden die beiden Reaktoren miteinander zu koppeln, um direkt 2-KLG aus Glucose herzustellen.

Kapitel 5: Produktion von 2-Keto-L-Gulonsäure aus Glucose

5.1. Einleitung

In den vorangegangenen Arbeiten (Kapitel 3 und 4) wurden zunächst separat - aber mit Bezug aufeinander - zwei kontinuierlich betriebene Reaktoren entwickelt: Ein CSTR zur Produktion von 2,5-DKG aus Glucose mit *G. oxydans*-Zellen (Reaktor 1) und ein Enzymmembranreaktor, in dem 2,5-DKG zu 2-KLG reduziert wird (Reaktor 2). Tabelle 5.1 fasst die Ergebnisse der Optimierungsarbeiten für die beiden Reaktoren zusammen.

Tabelle 5.1: Ergebnisse aus Kapitel 3 und Kapitel 4 – Optimierte Bedingungen für die kontinuierlich betriebenen Reaktoren 1 und 2

	CSTR <i>G. oxydans</i> Reaktor 1	EMR 2,5-DKGR Reaktor 2
Temperatur	25°C	20°C
Puffer, pH	50 mM KP_i , Titration auf pH5	50 mM KP_i , pH 6,4
Substratkonzentration	50 mM	30-50 mM
Reaktorvolumen, Verweilzeit	50 mL, 2 h	10 mL, 24 Min
Durchfluss	25 mL/h	
Begasung	Sauerstoff, 10 L/h	---
Biokatalysator(en)	2 % = 20 g _{BFG} /L <i>G. oxydans</i> NCIMB 8084	2,5-DKGR (>1 mg/mL) + <i>Lb</i> -ADH (>5 mg/mL)
Substratlösung muss zusätzlich enthalten	50 µL/L Antischaummittel Biospumex 153k	~ 1000 mM Isopropanol, 0,1 mM $NADP^+$, 3 mM $MgCl_2$

Diese beiden Reaktoren sollen im Folgenden miteinander gekoppelt werden, so dass die resultierende Anlage kontinuierlich 2-KLG aus Glucose produziert. Bei einer Kopplung muss Folgendes beachtet werden:

- Beim Übergang von Reaktor 1 zu Reaktor 2 muss der pH-Wert von 5 auf 6,4 erhöht werden. Ein Pufferwechsel ist hingegen nicht nötig.
- Der 2,5-DKG-haltigen Lösung aus Reaktor 1 müssen Isopropanol, $NADP^+$ und $MgCl_2$ zudosiert werden, bevor sie in den EMR gepumpt wird.

- Die Verweilzeit im ersten Reaktor ist festgelegt, die Verweilzeit im EMR daher ebenfalls. Ist die Ausbeute im EMR zu gering, kann sie nicht durch eine höhere Verweilzeit gesteigert werden. Es kann jedoch die Konzentration der Enzyme erhöht werden, was allerdings den Reaktordruck vergrößert. Ist der maximale Druck erreicht und die Ausbeute noch zu gering (< 70-80%), kann als letzte Option ein zweiter EMR hinter den ersten geschaltet werden.
- Die Substratlösung für Reaktor 1 enthält Antischaummittel. In Vorversuchen wurde sichergestellt, dass diese Substanz die Enzyme im EMR nicht inhibiert.

5.2. Konstruktion der gekoppelten Anlage

Nach den oben beschriebenen Vorgaben wurde eine Anlage konstruiert, die kontinuierlich 2-KLG aus Glucose produziert. Ihren detaillierten Aufbau zeigt Abbildung 5.1.

Die Glucoselösung (0) wird in den ersten Reaktor gepumpt – dieser wird so betrieben wie in Tabelle 5.1 und Kapitel 3 beschrieben. Die resultierende 2,5-DKG-haltige Lösung wird in einem Zwischengefäß (1) gesammelt; von dort wird sie druckfrei in ein Mischgefäß (2) gepumpt. Im Mischgefäß wird die Lösung auf die Bedingungen eingestellt, die für den EMR optimal sind: Der pH-Wert wird gemessen und durch Titration mit KOH auf 6,4 eingestellt. Gleichzeitig wird Isopropanol sowie eine gepufferte Lösung von NADP^+ und MgCl_2 zudosiert. Die Flüssigkeit im Mischgefäß wird stets kräftig gerührt.

Die so vorbereitete Substratlösung für den EMR wird anschließend in den zweiten Reaktor gepumpt, der so betrieben wird wie in Tabelle 5.1 protokolliert und in Kapitel 4 beschrieben. Die 2-KLG-Produktlösung wird am Auslauf gesammelt.

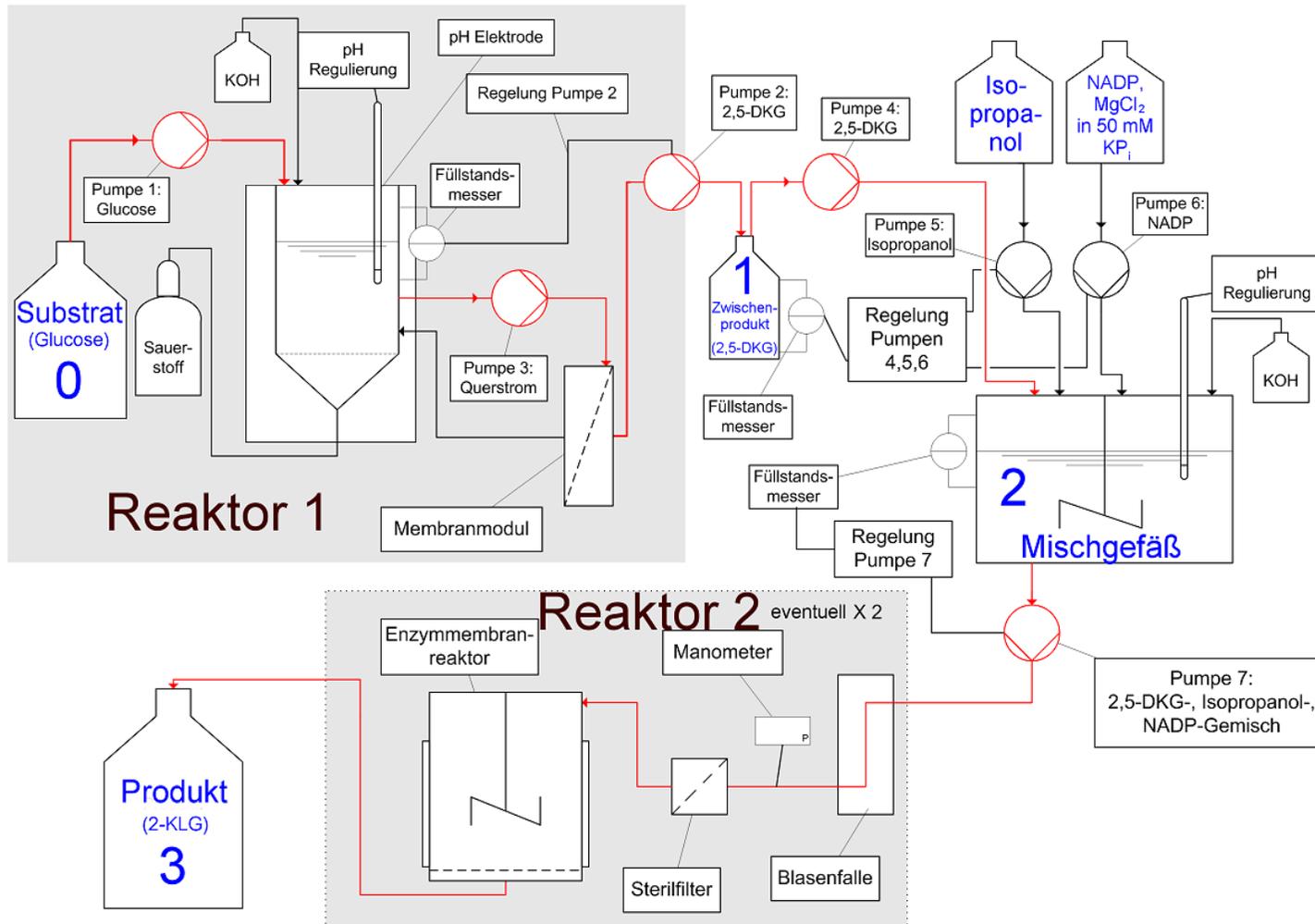


Abbildung 5.1: Anlage zur kontinuierlichen Produktion von 2-KLG aus Glucose. Genauere Erläuterungen siehe Text.

5.2. Konstruktion der gekoppelten Anlage

Besonderheiten, die bei der Konstruktion der Anlage berücksichtigt werden mussten:

- 2,5-DKG ist thermolabil. Sowohl das 2,5-DKG-Sammelgefäß als auch das Mischgefäß sind daher auf 4°C gekühlt, ebenso die NADP-Vorratslösung.
- Damit die Reaktoren und zwischengeschalteten Gefäße weder über- noch leerlaufen, sind alle Pumpen (mit wenigen Ausnahmen) über Füllstandsmesser geregelt. Dadurch wird auch sichergestellt, dass das Verhältnis von 2,5-DKG-Lösung zu Isopropanol sowie NADP⁺-Lösung im Mischgefäß stets gleich bleibt.
- In ersten Versuchen war eine gemeinsame Lösung von NADP, MgCl₂ und Isopropanol angesetzt worden. Der hohe Anteil Isopropanol führte jedoch dazu, dass im Schlauch Puffersalze auskristallisierten und diesen verstopften. Als Folge enthielt die Substratlösung für den EMR nach einiger Zeit kein NADP und kein Isopropanol mehr, woraufhin die Ausbeute rapide sank. Im Folgenden wurde die gepufferte NADP-Lösung daher separat und ohne Isopropanol angesetzt und über eine zusätzliche Pumpe ins Mischgefäß gepumpt, wie in Abbildung 5.1 gezeigt.

Abbildung 5.2 zeigt die im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Anlage im Einsatz.

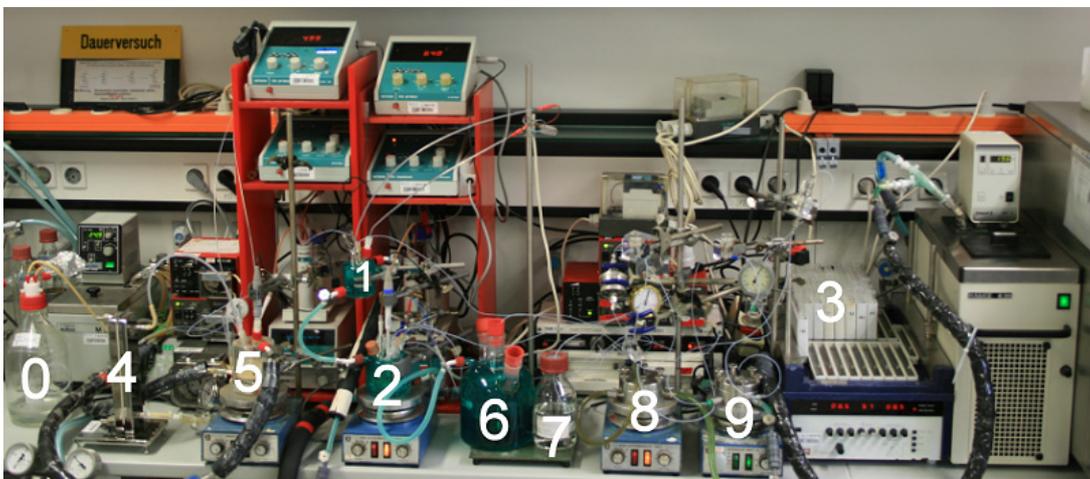


Abbildung 5.2: Anlage zur kontinuierlichen Produktion von 2-KLG aus Glucose. 0: Glucoselösung, 1: Sammelgefäß 2,5-DKG, 2: Mischgefäß, 3: Auslauf, Fraktionssammler, 4: Membranmodul Reaktor 1, 5: Reaktorraum 1, 6: Vorratsgefäß NADP-Lösung, 7: Vorratsgefäß Isopropanol, 8: EMR1, 9: EMR2.

Für eine spätere Prozesscharakterisierung sind die Konzentrationen an folgenden Orten in der Anlage wichtig:

Tabelle 5.2: Definition wichtiger Begriffe für die Prozesscharakterisierung

Station	Name	enthält (hpts.)	Bedeutung für ...		
			Reaktor 1	Reaktor 2	Gesamt-Kaskade
0	Substratlösung	Glucose	Substrat	---	Substrat
1	2,5-DKG-Sammelgefäß	2,5-DKG	Produkt	---	Zwischenprodukt
2	Mischgefäß	2,5-DKG + Isopropanol + NADP + Mg ²⁺	---	Substrat	---
3	Auslauf, Produktlösung	2-KLG	---	Produkt	Produkt

Eine spätere Probennahme konnte im 2,5-DKG-Sammelgefäß (1), im Mischgefäß (2) und am Auslauf (3) erfolgen. Die häufige Entnahme von Proben bei (1) und (2) barg jedoch die Gefahr, die entsprechenden Volumina stark zu verändern und den Anlagenfluss zu stören. Daher wurden regelmäßige Proben lediglich am Auslauf entnommen. Über die dortige Konzentration von 2-KLG und unumgesetztem 2,5-DKG konnte auf alle Ausbeuten im Gesamtprozess geschlossen werden. Bekannt sein muss lediglich der Verdünnungsfaktor F_{Verd} : Er gibt an, wie stark die 2,5-DKG-Lösung im Zwischengefäß durch die Zugabe von Isopropanol und NADP⁺-Lösung verdünnt wird.

$$Ausbeute (CSTR) = \frac{c_1(2,5DKG)}{c_0(Glucose)} = \frac{(c_3(2,5DKG) + c_3(2KLG)) \cdot F_{Verd}}{c_0(Glucose)} \quad \text{Formel 5.1}$$

$$Ausbeute (EMR) = \frac{c_3(2KLG)}{c_2(2,5DKG)} = \frac{c_3(2KLG)}{c_3(2KLG) + c_3(2,5DKG)} \quad \text{Formel 5.2}$$

$$Ausbeute (Kaskade) = \frac{c_3(2KLG) \cdot F_{Verd}}{c_0(Glucose)} = Ausb. (EMR) * Ausb. (CSTR) \quad \text{Formel 5.3}$$

$$F_{Verd} = \frac{V(Isoprop) + V(NADP - Lsg) + V(2,5DKG)}{V(2,5DKG)} \quad \text{Formel 5.4}$$

(Die Indices 0,1,2,3 geben den Ort der Konzentrationsmessung an, siehe Tabelle 5.2)

5.3. Kontinuierliche Produktion von 2-Keto-L-Gulonat aus Glucose

5.3.1 Kopplung des Ganzzell-CSTR mit einem 10-mL-EMR

Zunächst wurden Reaktorläufe in einer Anlage durchgeführt, bei denen Reaktor 1 mit einem 10-mL-EMR gekoppelt war. Reaktor 1 lief über die ganze Zeit so, wie in Tabelle 5.1 angegeben. Die Konzentration von Isopropanol, NADP, MgCl₂ und 2,5-DKG im Mischgefäß (2) wurde über den Fluss eingestellt, mit dem diese Lösungen in das Mischgefäß gepumpt wurden. Die resultierenden Konzentrationen zeigt Tabelle 5.3.

Tabelle 5.3: Einstellungen für den Betrieb der gekoppelten Anlage

	Pumpenfluss [mL/h]	Konzentration in Mischgefäß c₂ (Soll)	Konzentration in Mischgefäß c₂ (Ist)
2,5-DKG-Lsg aus Reaktor 1	22	31 mM (bei 100% Ausbeute)	s. unten
Isopropanol (unverdünnt)	2,8	~ 1000 mM	1048 mM (GC-Messung)
NADP-/ MgCl₂-Lsg	11	0,1 mM 3 mM	n.d.
F_{Verd}	$F_{Verd} = \frac{2,8 + 11 + 22}{22} = 1,63$		

Die tatsächliche Konzentration von Isopropanol im Mischgefäß wurde durch eine gaschromatographische Messung überprüft. Der Verdünnungsfaktor F_{Verd} beträgt 1,63, die aus Reaktor 1 kommende 2,5-DKG-Lösung wird im Mischgefäß (2) also auf 61% verdünnt. Erreicht der erste Reaktor eine Ausbeute von 100%, beträgt die Konzentration von 2,5-DKG im Mischgefäß 31 mM – das ist die maximale Substratkonzentration für den EMR und somit auch die maximale Konzentration von 2-KLG am Auslauf (3).

Tabelle 5.4: Flüsse und Verweilzeiten der beiden Reaktoren

	Fluss	Verweilzeit
Reaktor 1 (50 mL)	25 mL/h	120 Min = 2 h
Reaktor 2 (10 mL)	30 mL/h	20 Min = 0,333 h

Um die Reaktorleistungen einfacher miteinander vergleichen zu können, werden in den folgenden Diagrammen anstelle von Verweilzeiten die jeweiligen Reaktorlaufzeiten in Tagen angegeben.

Es wurden 25 mL/h in den ersten Reaktor gepumpt, über die Füllstandregelung herausgepumpt wurden aber nachweislich stets nur 22 mL/h. Offensichtlich kommt es

durch die Sauerstoffbegasung zu einem Flüssigkeitsverlust im Reaktor – auch wenn der Sauerstoff zuvor durch eine Waschflasche mit Wasser geleitet wurde.

In das Mischgefäß (2) gepumpt wurden insgesamt 35,8 mL/h (2,5-DKG-Lösung, Isopropanol, NADP/MgCl₂-Lösung). In den EMR gepumpt wurden nur 30 mL/h. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass der Volumenstrom durch den EMR stets konstant war und es nicht zu starken Konzentrationsschwankungen am Auslauf kam, die durch unterschiedliche Verweilzeiten im Reaktor 2 bedingt waren. Der Überschuss von 5,8 mL/h wurde verworfen. Eine Flüssigkeitsstand-Regelung stellte sicher, dass der EMR nicht leer lief, falls es zu Problemen weiter vorne in der Anlage kam.

Eine Probennahme fand lediglich am Auslauf (3) statt. Die entsprechenden Konzentrationen c_1 im Sammelgefäß und die Ausbeuten von Reaktor 1 wurden jedoch anhand von Formel 5.1 rekonstruiert. Abbildung 5.3 zeigt diese errechneten Werte für den ersten Reaktor. Die Ausbeuten des zweiten Reaktors konnten hingegen direkt aus den gemessenen Konzentrationen am Auslauf ermittelt werden (Abbildung 5.4).

Für den ersten Reaktor (Abbildung 5.3) errechnen sich durchschnittliche 2,5-DKG-Konzentrationen von ca. 50 mM – in diesem Fall betrüge die Ausbeute 100%. Da jedoch auch noch einige mmol/L Glucose, Gluconat und 2-KG vorliegen, kann dies nicht der Fall sein. Um die Ausbeute zu berechnen, wurde daher die Konzentration von 2,5-DKG nicht wie üblich durch die Substratkonzentration c_0 geteilt, sondern durch die Massenbilanz, also der Summe der Konzentrationen von Glucose, Gluconat, 2-KG und 2,5-DKG; sie liegt bei etwa 60 mM (Soll: 50 mM). So errechnen sich realistische Ausbeuten von 80-90% in Reaktor 1, die mit der theoretischen Ausbeute auch in etwa übereinstimmen. Die neue Ausgangskonzentration für den EMR beträgt dann etwa 25-28 mM.

Der EMR (Abbildung 5.4) erreicht zunächst Ausbeuten von durchschnittlich 58% - durch Nachdosieren von 6 mg Reduktase kann die Ausbeute um wenige Prozent auf durchschnittlich 66% gesteigert werden. Dennoch ist die Ausbeute damit enttäuschend gering und bleibt hinter den theoretischen Erwartungen (>95%) weit zurück. Eine weitere Nachdosierung von Protein war nicht möglich, da der Reaktordruck bereits sein Maximum erreicht hatte. Der Grund für die geringe Ausbeute bleibt unklar. Inhibierungen durch geringe Mengen 2-KG und Gluconat bedingen eine solche Aktivitätseinbuße jedenfalls nicht – dieser Verlust wurde bereits eingerechnet.

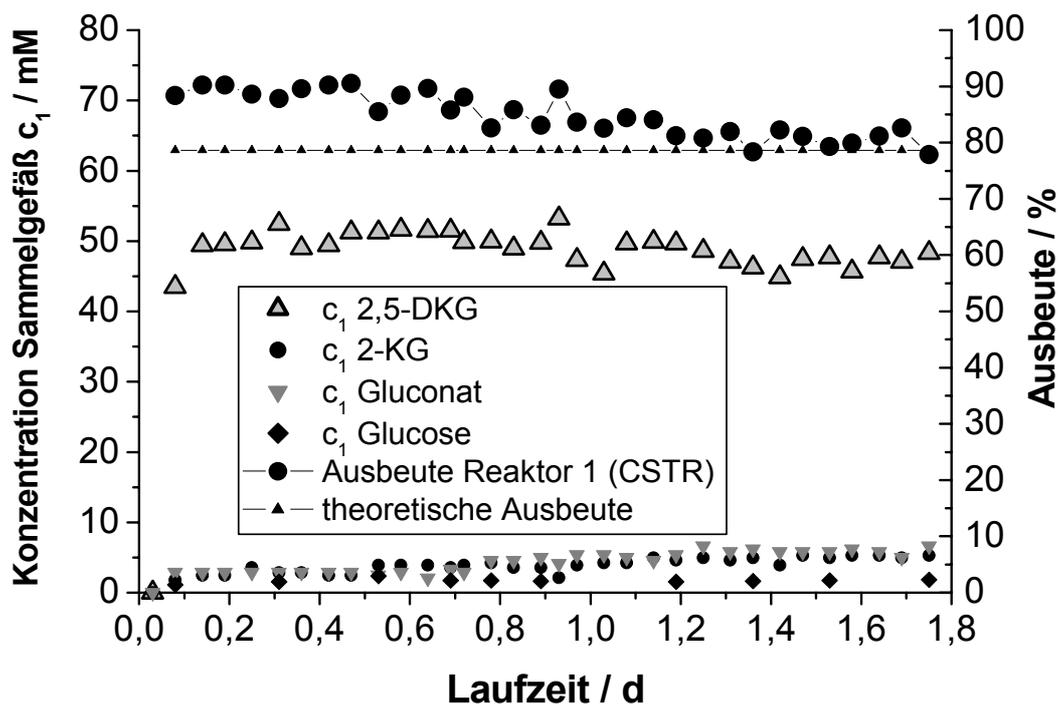


Abbildung 5.3: Reaktor 1, Konzentrationen und Ausbeuten wurden aus Konzentrationen rekonstruiert, die am Auslauf gemessen wurden. Bedingungen: $V = 50$ mL, 25°C , 50 mmol/L Glucose, 50 mmol/L KP_i -Puffer, pH-Titration auf pH 5 mit 1N KOH, $\tau = 2$ h, 20 g_{BFG} *G. oxydans* NCIMB 8084, Umwälzung 67 L/h.

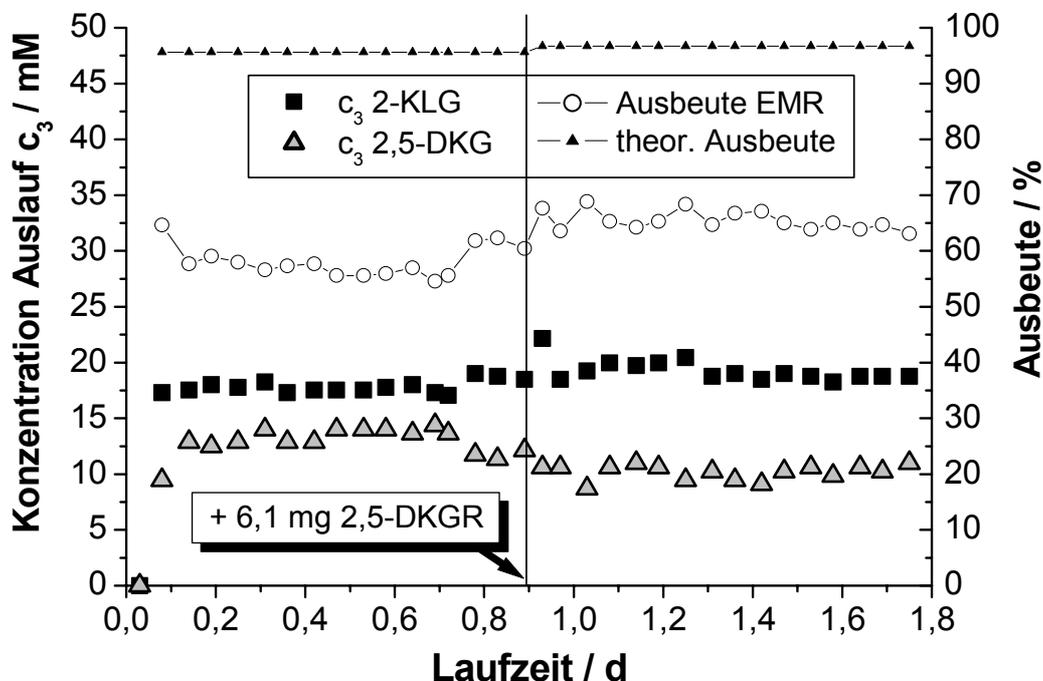


Abbildung 5.4: Reaktor 2, Konzentrationen und Ausbeuten. Bedingungen $V = 10$ mL, 20°C , pH 6,4, $0,1$ mM NADP, 1 M Isopropanol, Verdünnung 2,5-DKG: $61,3$ %, $\tau = 0,33$ h, $1,7$ - $2,3$ mg/mL 2,5-DKGR, $5,43$ mg/mL *Lb*-ADH.

Abbildung 5.5 zeigt die Ausbeuten der beiden Reaktoren im Vergleich zur Ausbeute der gesamten Anlage. Deutlich zu sehen, limitiert der zweite Reaktor die Ausbeute der Gesamtkaskade stark: Sie liegt durchschnittlich bei 58 bzw. 63% (nach Enzymnachdosierung).

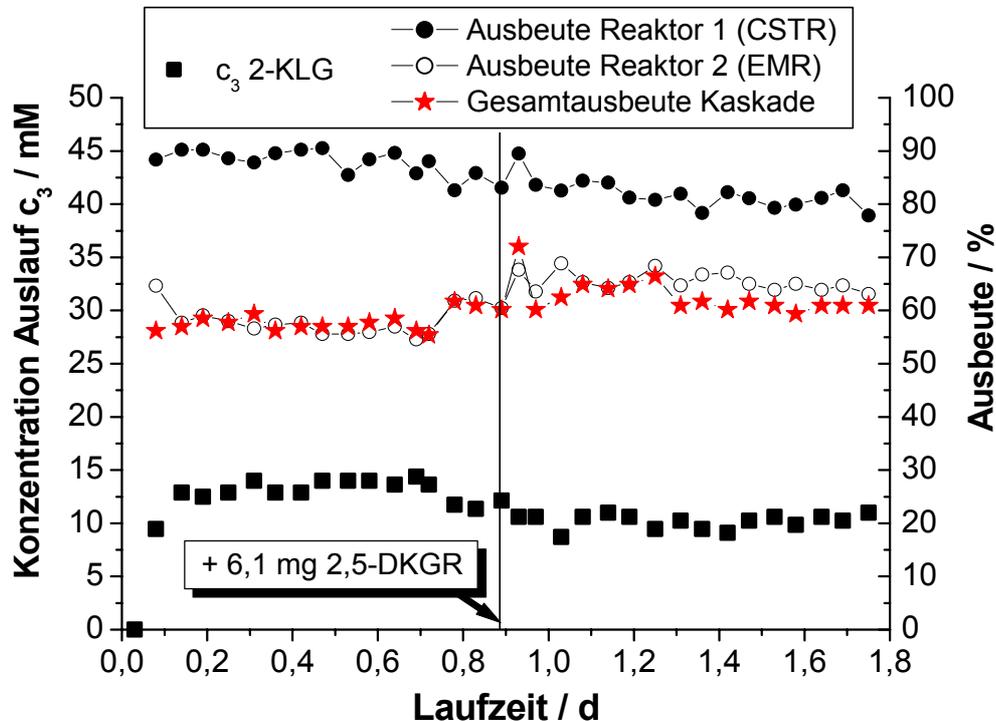


Abbildung 5.5: Kontinuierliche Produktion von 2-KLG aus Glucose. Reduktion von 2,5-DKG findet in einem einzelnen 10 mL-EMR statt. Bedingungen: Oxidation von Glucose zu 2,5-DKG: $V = 50$ mL, 25°C , 50 mmol/L Glucose, 50 mmol/L KPi -Puffer, pH-Titration auf pH 5 mit 1N KOH, $\tau = 2$ h, 20 g_{BFG} *G. oxydans* NCIMB 8084, Umwälzung 67 L/h. Reduktion von 2,5-DKG zu 2-KLG: $V = 10$ mL, 20°C , pH 6,4, $0,1$ mM NADP, 1 M Isopropanol, Verdünnung 2,5-DKG: $61,5\%$, $\tau = 0,33$ h, $1,7$ - $2,3$ mg/mL 2,5-DKGR, $5,43$ mg/mL *Lb*-ADH.

In diesem Zusammenhang muss darauf eingegangen werden, wie die Gesamtausbeute ermittelt wird (Formel 5.3). Sie kann zum einen aus dem Produkt der Ausbeuten von Reaktor 1 und Reaktor 2 berechnet werden. In diesem Lauf läge sie dann bei 51 bzw. 54%. Jedoch wird die Ausbeute des ersten Reaktors nur über Rückrechnungen rekonstruiert – die Konzentrationen werden nicht gemessen. Die Ausbeute für den ersten Reaktor ist damit stets nur eine Abschätzung – immerhin weichen auch die Massenbilanzen um 10-20% vom Soll-Wert ab.

Die Gesamtausbeute wurde daher über die 2-KLG-Konzentration am Auslauf im Verhältnis zur maximal möglichen 2-KLG-Konzentration berechnet. Die maximal

5.3. Kontinuierliche Produktion von 2-Keto-L-Gulonat aus Glucose

mögliche 2-KLG-Konzentration ist das Produkt der Substratkonzentration c_0 mal dem Verdünnungsfaktor F_{Verd} und beträgt in diesem Fall 31 mM (Tabelle 5.3).

In Tabelle 5.5 sind beide Gesamtausbeuten angegeben. Die Tabelle fasst auch alle anderen wichtigen Charakteristika des Reaktorlaufs zusammen.

Tabelle 5.5: Kontinuierliche Produktion von 2-KLG aus Glucose. Reduktion von 2,5-DKG findet in einem einzelnen 10 mL-EMR statt.

Prozessabschnitt	A	B
Zeitspanne / d	0 – 0,9	0,9-1,8
Konzentration Glucose / mM	50	
Verdünnung 2,5-DKG / %	61,5 ($F_{\text{Verd}}=1,63$)	
Konzentration Isopropanol / mM	$\approx 1000 - 1050$	
Konzentration NADP / mM	0,1	
Verweilzeit Reaktor 1 / h	2	
Biomasse Reaktor 1 / %	2 = 20 $\text{g}_{\text{BFG}}/\text{L}$	
Verweilzeit Reaktor 2 (EMR) / h	0,33	
Konzentration 2,5-DKGR / $\text{mg} * \text{mL}^{-1}$	1,7	2,3
Konzentration <i>Lb</i> -ADH / $\text{mg} * \text{mL}^{-1}$	5,43	
Mittlere Ausbeute Reaktor 1 (Rückrechnung) / %	87,8	81,9
Mittlere Ausbeute Reaktor 2 (EMR) / %	58,1	65,5
Mittlere Gesamtausbeute der Kaskade / % = $c(2\text{-KLG}) * F_{\text{Verd}} / c_0(\text{Glucose})$	57,9	62,7
Mittlere Gesamtausbeute der Kaskade / % = Ausbeute Reaktor 1 * Ausbeute Reaktor 2	51,0	53,6
Raum-Zeit-Ausbeute / $\text{mmol} * \text{L}^{-1} * \text{d}^{-1}$	210,6	226,6
Raum-Zeit-Ausbeute / $\text{g} * \text{L}^{-1} * \text{d}^{-1}$	40,9	44,0
Katalysatorausnutzung Reaktor 1 [$\text{g}_{\text{Produkt}}/\text{g}_{\text{BFG}}$]	11,5	
ton 2,5-DKGR	21.382	17.384
ttn 2,5-DKGR	38.766	
tof 2,5-DKGR / h^{-1}	1069	855
ton NADP(H)	178	193
ttn NADP(H)	186	
Laufzeit	1,8 Tage	

Die hier beschriebene Anlage lief über 1,8 Tage (43 Stunden) stabil und produzierte kontinuierlich 2-KLG aus Glucose. Die Raumzeitausbeute betrug bis zu

227 mmol*L⁻¹*d⁻¹. Es wurde eine Total turnover number für die 2,5-DKGR von 38.766 erreicht.

Die Ausbeute der gekoppelten Anlage ist mit maximal 63% noch relativ gering. Ursache ist die geringe Ausbeute des Enzymmembranreaktors, der erste Reaktor erreicht mit bis zu 90% sehr zufrieden stellende Ausbeuten. Der Grund für die geringe Ausbeute im zweiten Reaktor bleibt jedoch unklar.

5.3.2 Kopplung des Ganzzell-CSTR mit zwei 10-mL-EMRs

Um die Ausbeute der Anlage zu steigern, wurde ein zweiter 10-mL-EMR in die Anlage integriert. Wie in Abbildung 5.1 gezeigt, wurde der zweite EMR inklusive Blasenfalle, Sterilfilter und Manometer hinter den ersten EMR geschaltet. Die beiden EMRs bilden eine klassische Rührkesselkaskade und wurden in späteren Berechnungen wie ein einziger Reaktor betrachtet: Zwischen den beiden Reaktoren wurden keine Proben genommen, sondern weiterhin lediglich am Auslauf.

Mit Ausnahme des zusätzlichen EMR fanden alle Reaktorläufe weiterhin so statt wie oben beschrieben.

Tabelle 5.6: Einstellungen für den Betrieb der gekoppelten Anlage

	Pumpenfluss [mL/h]	Konzentration in Mischgefäß c₂ (Soll)	Konzentration in Mischgefäß c₂ (Ist)
2,5-DKG-Lsg aus Reaktor 1	22	31 mM (bei 100% Ausbeute)	siehe unten
Isopropanol (unverdünnt)	2,8	~ 1000 mM	1047 mM (GC-Messung)
NADP/ MgCl₂-Lsg	11	0,1 mM 3 mM	n.d.
F_{Verd}	$F_{Verd} = \frac{2,8 + 11 + 22}{22} = 1,63$		

Tabelle 5.7: Flüsse und Verweilzeiten der drei Reaktoren

	Fluss	Verweilzeit
Reaktor 1 (50 mL)	25 mL/h	120 Min = 2 h
Reaktor 2 (10 mL)	30 mL/h	20 Min = 0,333 h
Reaktor 3 (10 mL)	30 mL/h	20 Min = 0,333 h

Auch hier wurden Konzentrationen und Ausbeuten im ersten Reaktor durch Rückrechnungen ermittelt (Formel 5.1). Das Ergebnis zeigt Abbildung 5.6.

Ausbeuten der Enzymmembranreaktoren sind in Abbildung 5.7 zu sehen.

Die Ausbeuten im ersten Reaktor schwanken relativ stark: In der ersten Hälfte des Reaktorlaufs betragen sie durchschnittlich 74,8% und maximal 83,7%. Nach Verdopplung der Biomassekonzentration von 20 auf 40 g/L_{BFG} erhöhte sich die mittlere Ausbeute auf 76,3% (maximal 88,4%).

Im Vergleich zum oben beschriebenen Lauf verbleibt relativ viel unumgesetztes 2-KG in der Lösung (rund 10 mmol/L).

Die anhand des Verdünnungsfaktor F_{Verd} ermittelte Substratkonzentration für die EMR-Kaskade schwankt zwischen 18 und 25 mM.

Bei einer solch niedrigen Substratkonzentration und zwei hintereinander geschalteten Enzymmembranreaktoren erwartet man nach Simulationen durchgehende Ausbeuten von knapp 100%. Dies ist in der Realität jedoch nicht der Fall. Die Ausbeute der EMR-Kaskade schwankt zwischen 70 und 100%, der durchschnittliche Wert ist 85%. Interessanterweise erreicht die Ausbeute gerade dann Werte von 100%, wenn die Reaktorlösung relativ hohe Konzentrationen an unumgesetztem 2-KG enthält – welches die Reduktase eigentlich inhibiert.

Durch Nachdosieren von Reduktase und *Lb*-ADH konnte die Ausbeute im Laufe des Reaktorlaufs erhöht werden. Eine weitere Proteinzugabe war aufgrund des bereits stark erhöhten Reaktorinnendrucks jedoch nicht möglich.

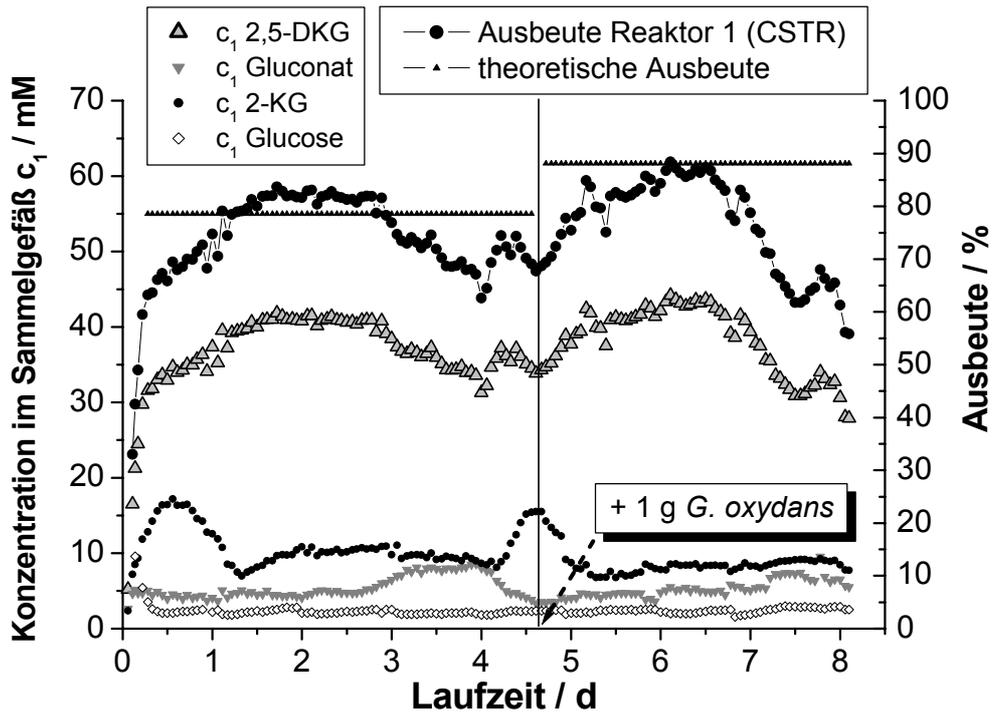


Abbildung 5.6: Reaktor 1, Konzentrationen und Ausbeuten wurden aus Konzentrationen rekonstruiert, die am Auslauf gemessen wurden. Bedingungen: $V = 50 \text{ mL}$, 25°C , 50 mmol/L Glucose, 50 mmol/L KPi -Puffer, pH-Titration auf pH 5 mit 1 N KOH , $\tau = 2 \text{ h}$, $20\text{-}40 \text{ g}_{\text{BFG}} G. \text{oxydans}$ NCIMB 8084, Umwälzung 67 L/h .

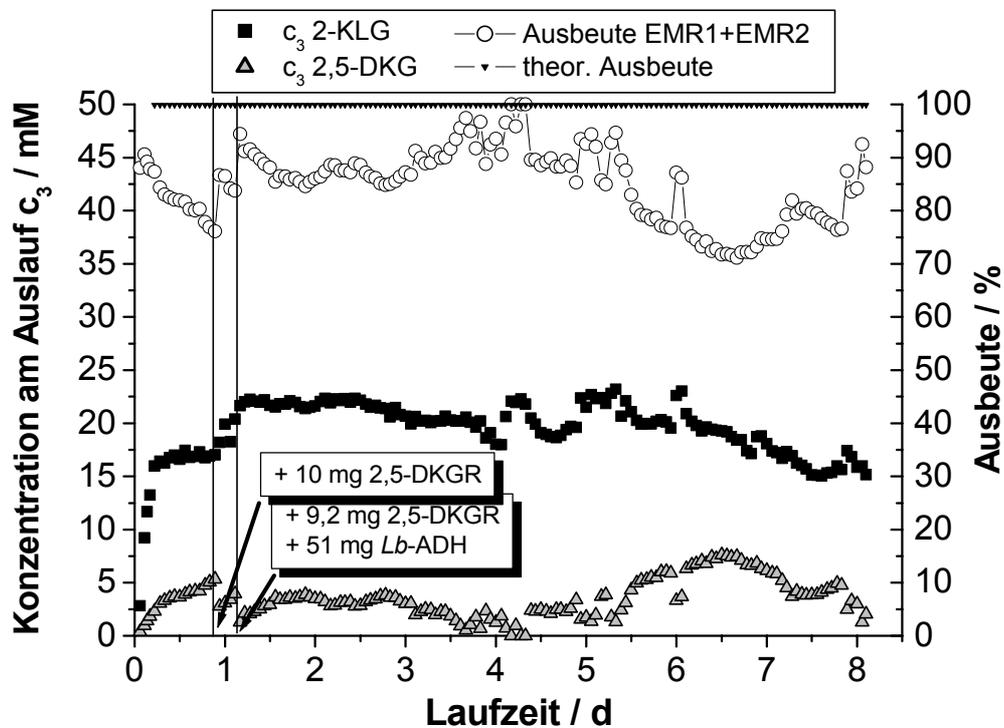


Abbildung 5.7: Reaktor 2+3, Ausbeuten und Konzentrationen. Bedingungen: $V = 2 \cdot 10 \text{ mL}$, 20°C , pH 6,4, $0,1 \text{ mM}$ NADP, 1 M Isopropanol, Verdünnung 2,5-DKG: $61,5 \%$, $\tau = 0,33 \text{ h}$, EMR 1: $2,8 \text{ mg/mL}$ 2,5-DKGR, $5,4 \text{ mg/mL}$ *Lb*-ADH, EMR 2: $0,5\text{-}2,4 \text{ mg/mL}$ 2,5-DKGR, $4,8\text{-}9,9 \text{ mg/mL}$ *Lb*-ADH.

5.3. Kontinuierliche Produktion von 2-Keto-L-Gulonat aus Glucose

Die gekoppelte Anlage lief stabil über mehr als 8 Tage und produzierte durchschnittlich etwa 20-22 mM 2-KLG (Abbildung 5.8). Die Gesamtausbeute schwankte zwischen 50 und 75 %, durchschnittlich betrug sie 63%.

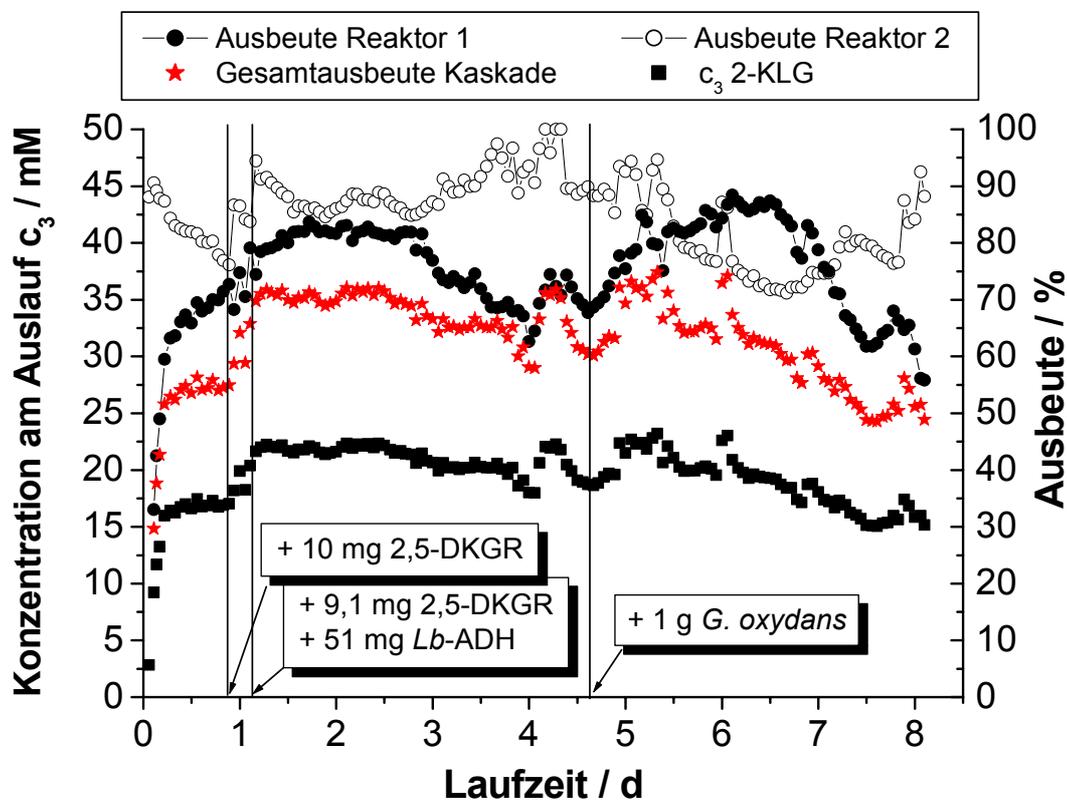


Abbildung 5.8: Kontinuierliche Produktion von 2-KLG aus Glucose. Reduktion von 2,5-DKG findet in zwei 10 mL-Enzymmembranreaktoren statt. Bedingungen: Oxidation von Glucose zu 2,5-DKG: $V = 50 \text{ mL}$, 25°C , 50 mmol/L Glucose, 50 mmol/L KP_i -Puffer, pH-Titration auf pH 5 mit 1N KOH , $\tau = 2 \text{ h}$, $20\text{-}40 \text{ g}_{\text{BFG}}$ *G. oxydans* NCIMB 8084, Umwälzung 67 L/h . Reduktion von 2,5-DKG zu 2-KLG: $V = 2 \cdot 10 \text{ mL}$, 20°C , pH 6,4, $0,1 \text{ mM}$ NADP, 1 M Isopropanol, Verdünnung 2,5-DKG: $61,5 \%$, $\tau = 0,33 \text{ h}$, EMR1: $2,8 \text{ mg/mL}$ 2,5-DKGR, $5,43 \text{ mg/mL}$ *Lb-ADH*, EMR2: $0,5\text{-}2,4 \text{ mg/mL}$ 2,5-DKGR, $4,8\text{-}9,9 \text{ mg/mL}$ *Lb-ADH*.

Die Anlage erreichte Raumzeitausbeuten von maximal $216 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Es wurde eine total turnover number von 75.270 für das Enzym 2,5-DKGR erreicht. Alle für die Prozesscharakterisierung relevanten Werte und Ergebnisse sind in Tabelle 5.8 zusammengefasst.

Tabelle 5.8: Kontinuierliche Produktion von 2-KLG aus Glucose. Reduktion von 2,5-DKG findet in zwei 10 mL-Enzymmembranreaktoren statt.

Prozessabschnitt	A	B	C	D
Zeitspanne / d	0-0,9	0,9-1,2	1,2-4,7	4,7-8,1
Konzentration Glucose / mM	50,5			
Verdünnung 2,5-DKG / %	61,5 ($F_{\text{verd}}=1,63$)			
Konzentration Isopropanol / mM	$\approx 1000 - 1050$			
Konzentration NADP / mM	0,1			
Verweilzeit CSTR / h	2			
Biomasse Reaktor 1 / %	2 = 20 $\text{g}_{\text{BFG}}/\text{L}$			4 = 40 $\text{g}_{\text{BFG}}/\text{L}$
Verweilzeit pro EMR / h	0,33			
EMR 1: Konz. 2,5-DKGR / mg * mL ⁻¹	2,83			
EMR 1: Konz. <i>Lb</i> -ADH / mg * mL ⁻¹	5,43			
EMR 2: Konz. 2,5-DKGR / mg * mL ⁻¹	0,5	1,5	2,4	
EMR 2: Konz. <i>Lb</i> -ADH / mg * mL ⁻¹	4,8		9,9	
Mittlere Ausbeute Reaktor 1 (Rückrechnung) / %	74,8 (max: 83,7)			76,3 (max: 88,4)
Mittlere Ausbeute Reaktor 2+3 (EMRs) / %	80,6	85,3	89,7	80,7
Mittlere Gesamtausbeute Kaskade / % = $c(2\text{-KLG}) \cdot F_{\text{verd}} / c_0$ (Glucose)	54,3	61,9	67,7	60,8
Mittlere Gesamtausbeute Kaskade / % = Ausb. Reaktor 1 * Ausb. Reaktor 2+3	60,3	63,8	67,1	61,6
Raum-Zeit-Ausbeute / mmol * L ⁻¹ * d ⁻¹	169,6	187,1	214,0	193,2
Raum-Zeit-Ausbeute / g * L ⁻¹ * d ⁻¹	32,9	36,3	41,5	37,5
Katalysatorausnutzung Reaktor 1 [$\text{g}_{\text{Produkt}}/\text{g}_{\text{BFG}}$]	20,3			7,6
ton 2,5-DKGR	7796	2727	34.348	30.399
ttn 2,5-DKGR	75.270			
tof 2,5-DKGR / h ⁻¹	508	431	406	381
ton NADP(H)	165	182	208	188
ttn NADP(H)	187			
Laufzeit / d	8,1			

5.3.3 Zusammenfassende Betrachtung

Durch einen zusätzlichen Enzymmembranreaktor konnte die durchschnittliche Ausbeute bei der Reduktion von 2,5-DKG zu 2-KLG von durchschnittlich 65,5 auf 89,7% gesteigert werden. Das ist auch in etwa die Steigerung, die man für eine Rührkessel-

kaskade aus zwei Enzymmembranreaktoren erwarten würde: Erreicht der erste eine Ausbeute von etwa 66 % (18 mM von 28 mM werden umgesetzt), setzt der zweite EMR zwei Drittel des verbliebenen Substrates um (etwa 7 von 10 mM). Die Gesamtausbeute beträgt dann knapp 90%. Nach theoretischen Berechnungen basierend auf den kinetischen Konstanten hätte allerdings eine Ausbeute von über 99% erzielt werden müssen. Das Reaktormodell überschätzt demnach die Produktivität eines Enzymmembranreaktors mit 2,5-DKGR und *Lb*-ADH. Möglicherweise treten zusätzliche Inhibierungen auf, die im Modell nicht erfasst wurden.

Die mittlere Ausbeute für die Umsetzung von Glucose zu 2-KLG erhöhte sich durch einen zusätzlichen EMR lediglich von 63 auf 68%. Die Ausbeute der gesamten Anlage ist jedoch immer auch abhängig von der Ausbeute des CSTR mit *G. oxydans*. Diese Ausbeute war im zweiten Reaktorlauf mit durchschnittlich 76% niedriger als gewöhnlich. Es ist daher zu erwarten, dass die Gesamtausbeute noch weiter gesteigert werden kann.

Tabelle 5.9: Vergleich der beiden erfolgreichen Reaktorläufe

	1 EMR (Abschnitt 5.3.1)	2 EMRs (dieser Abschnitt)
Laufzeit	1,8 Tage	8,1 Tage
beste mittlere Ausbeute EMR(-Kaskade)	65,5 %	89,7 %
beste mittlere Ausbeute Gesamtkaskade	62,7 %	67,7 %
beste Raum-Zeit-Ausbeute Gesamtkaskade [mmol*L⁻¹*d⁻¹]	227	214
Erzielte total turnover number 2,5-DKGR	38.766	75.270
beste turnover frequency 2,5-DKGR / h⁻¹	1069	508
total turnover number Cofaktor NADP(H)	186	187

Die Raumzeitausbeuten waren in beiden Anlagen in etwa gleich hoch: 227 mmol*L⁻¹*d⁻¹ mit einem, 214 mmol*L⁻¹*d⁻¹ mit zwei EMRs. Die turnover frequency des Enzyms 2,5-DKGR hingegen war im zweiten Reaktorlauf mit 508 h⁻¹ nur halb so groß wie im ersten Lauf (1069 h⁻¹). Das ist verständlich, da sich die eingesetzte Enzymmenge verdoppelt, wenn ein zweiter EMR eingesetzt wird.

Die erzielten total turnover numbers sind mit über 38.000 und über 75.000 in beiden Fällen zufrieden stellend hoch. Für industrielle Prozesse, in denen Verbindungen mit geringer Verdienstspanne hergestellt werden, muss die ttn des Biokatalysators mindestens 20.000 erreichen [Behr 2008] – das ist hier der Fall. Die turnover frequency ist allerdings in beiden Läufen mit maximal 1069 für einen industriellen Prozess viel zu gering: Sie sollte mindestens 10.000 h^{-1} betragen [Behr 2008].

Die Substratkonzentration für den EMR lag in den beschriebenen Läufen bei 18 - 28 mM. Ideal für den Betrieb des EMR sind laut theoretischen Berechnungen mindestens 30 mM (Tabelle 5.1). In wie weit das jedoch auf den realen Reaktor zutrifft, ist fraglich – immerhin erreichte die EMR-Kaskade selbst bei so niedrigen Substratkonzentrationen keine durchgängigen Ausbeuten von 100%.

Zusammengefasst ist der Betrieb dieser Anlage ein großer Erfolg. 2-KLG kann damit kontinuierlich direkt aus Glucose produziert werden - mit Ausbeuten von knapp 70% und Raumzeitausbeuten von über $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.

5.4. Isolierung reiner 2-Keto-L-Gulonsäure

Zahlreiche Patente beschreiben, wie 2-Keto-L-Gulonsäure aus ihrer Salzlösung isoliert werden kann. Eine der unkompliziertesten Methoden ist die patentierte Vorgehensweise von Dümpelmann und seinen Mitarbeitern [Dümpelmann *et al.* 2003]. Diese Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet. 2-KLG wird dabei zunächst als Kaliumsalz auskristallisiert und dann in Methanol in die freie Säure überführt (Abbildung 5.9):



Abbildung 5.9: Vorgehensweise bei der Isolierung von 2-KLG aus der Reaktionslösung

Die Intermediate Gluconat, 2-KG und 2,5-DKG stören die Aufreinigung nicht. Um sauberes 2-KLG zu erhalten, ist es daher nicht entscheidend, wie hoch die Ausbeute im Prozess ist.

Im gekoppelten Prozess (Abschnitt 5.3) wurden mehrere Liter einer 2-KLG-haltigen Lösung gewonnen (Abbildung 5.10, links). Ein Teil davon (500 mL) wurde der beschriebene Methode unterzogen. Abbildung 5.9 (rechts) zeigt die aufgereinigte, hellgelbe Substanz.

5.4. Isolierung reiner 2-Keto-L-Gulonsäure

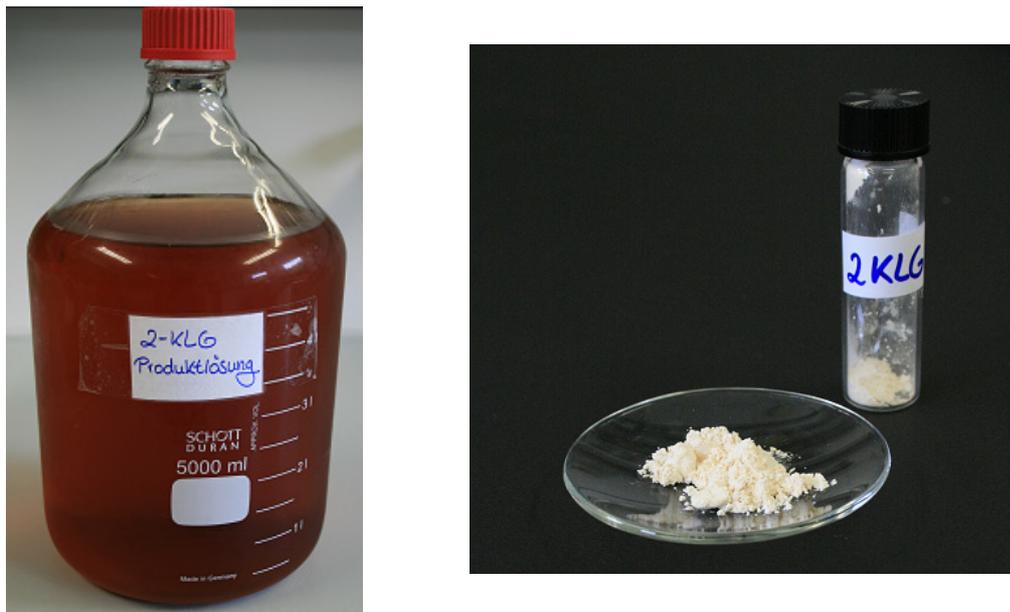


Abbildung 5.10: Links: 5 Liter 2-KLG-Produktlösung aus der kontinuierlichen Biotransformation mit *G. oxydans* und 2,5-DKGR. Rechts: Isolierte 2-Keto-L-Gulonsäure.

Die Identität der Verbindung wurde mittels HPLC, NMR und MS überprüft.

HPLC:

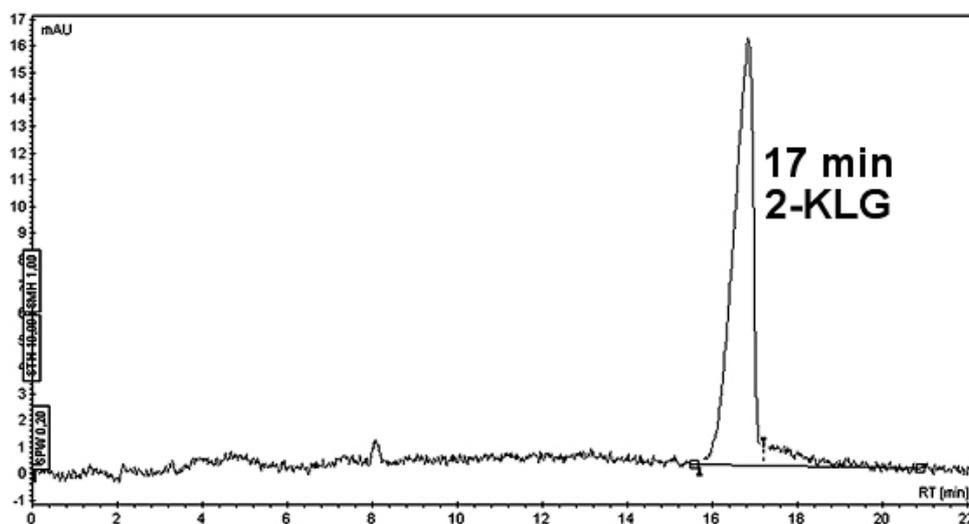


Abbildung 5.11: HPLC-Chromatogramm von selbst isoliertem 2-KLG

Das Chromatogramm zeigt einen deutlichen Peak bei 17 Minuten, der Retentionszeit des 2-KLG. Die mit Hilfe der HPLC-Analytik ermittelte Reinheit beträgt 88,7%, wenn man von einem Molekulargewicht von 194 g/mol ausgeht. Im kristallinen Zustand liegt 2-KLG jedoch immer als Monohydrat vor [Gaspar *et al.* 1959] ($M=212$ g/mol). Die Reinheit beträgt daher **96,9%**.

Allerdings konnten nur etwa 25% des in Lösung erhaltenen 2-KLG als Feststoff gewonnen werden (Tabelle 5.10). Der Aufarbeitungsprozess ist demnach noch stark optimierungsbedürftig.

Tabelle 5.10: Ergebnis der Isolierung von 2-KLG

Konz. 2-KLG-Lösung	25 mM
Masse 2-KLG in Lösung	2,65 g
Masse 2-KLG · H ₂ O isoliert	0,665 g
Ausbeute Aufreinigung	25,1%
Reinheit	96,9%

In Lösung liegt 2-KLG als Sechsring vor [Gaspar *et al.* 1959]. Der pKs-Wert beträgt 2,54 [Los *et al.* 1960], so dass die Verbindung als Anion vorliegt.

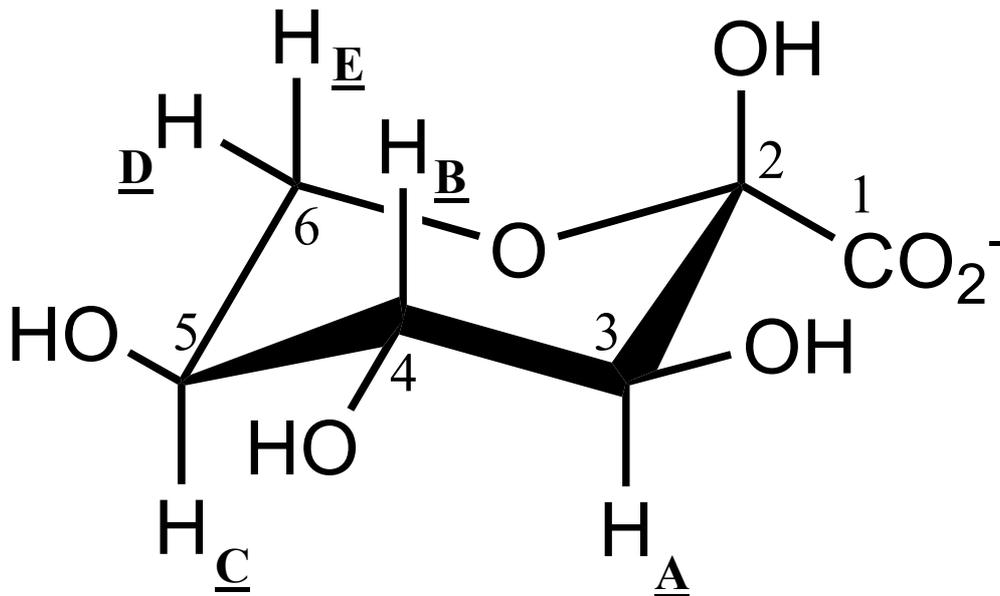


Abbildung 5.12: Struktur von 2-KLG in Lösung

¹³C-NMR:

Abbildung 5.13 zeigt das ¹³C-NMR-Spektrum der Verbindung. Das ¹³C-NMR-Spektrum des 2-KLG ist in der Literatur beschrieben [Crawford *et al.* 1980]. Außerdem diente käuflich erworbenes 2-KLG als Referenzsubstanz.

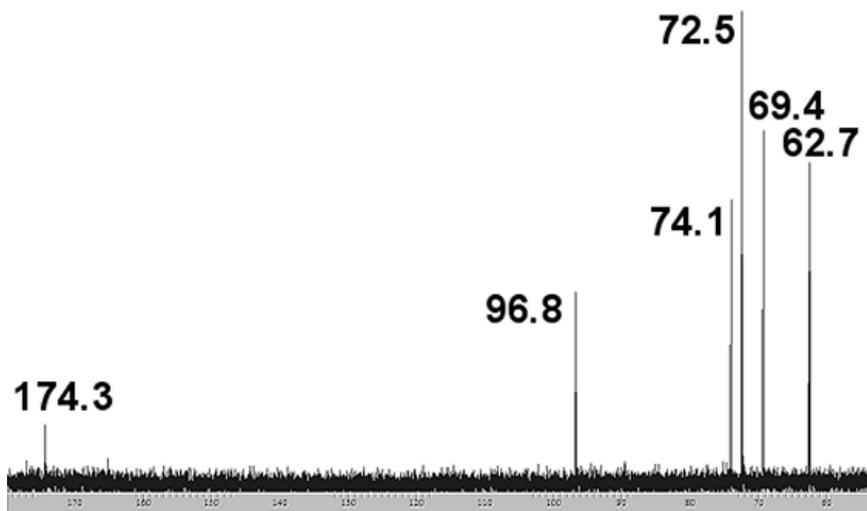


Abbildung 5.13: ^{13}C -NMR-Spektrum von selbst isoliertem 2-KLG (in D_2O , 600 MHz-Spektrometer)

Tabelle 5.11: ^{13}C -NMR-Verschiebungen für selbst isoliertes 2-KLG im Vergleich zu Literaturwerten

	δ [ppm] (diese Arbeit)	δ [ppm] Referenzsubstanz	δ [ppm] [Crawford <i>et al.</i> 1980]
C1	174.3	171.9	172.2
C2	96.8	96.2	96.9
C3	72.5	72.5	73.3
C4	74.1	73.5	74.3
C5	69.4	69.2	70.0
C6	62.7	62.5	63.4

Die Verschiebungen sind in Übereinstimmung mit den Referenzwerten.

^1H -NMR:

Verschiebungen im ^1H -NMR-Spektrum des 2-KLG sind nicht literaturbekannt. Hier diente als Referenz das ^1H -NMR-Spektrum des käuflich erworbenen 2-KLG. Die Verschiebungen und Kopplungen im ^1H -NMR-Spektrum des isolierten 2-KLG wichen jedoch stark von denen der gekauften Substanz ab (Abbildung 5.14), was umso erstaunlicher ist, als die ^{13}C -NMR-Spektren gut übereinstimmen (Tabelle 5.11). pH-Effekte könnten möglicherweise für die Unterschiede verantwortlich sein: Der pH-Wert der Lösung sinkt schnell, wenn gekauftes 2-KLG in Wasser gelöst wird; beim Lösen von selbst isoliertem 2-KLG fällt der pH-Wert bedeutend langsamer. Sowohl selbst isoliertes als auch gekauftes 2-KLG enthält geringe Verunreinigungen (3,1 bzw. 4%), vermutlich auch Puffersalze. Möglicherweise beeinflussen solche Ionen die elektro-

nische Umgebung der Wasserstoffatome im 2-KLG, weshalb die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren unterschiedlich ausfallen.

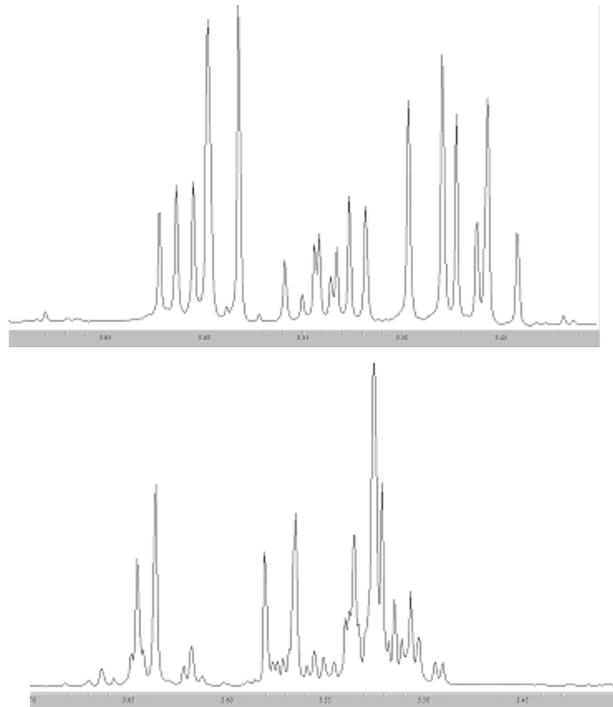


Abbildung 5.14: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 2-KLG (in D_2O , 600 MHz-Spektrometer). Oben: selbst isoliertes 2-KLG; unten: Referenzsubstanz (jeweils Ausschnitt von 3.4-3.7 ppm)

MS:

Um sicher zu gehen, dass es sich bei der isolierten Substanz wirklich um 2-KLG handelt, wurde ein Massenspektrum gemessen (Abbildung 5.15).

Im Massenspektrum ist deutlich der Peak des Molekülions M^{+} bei $m/z=192,6$ amu zu erkennen (2-KLG liegt in Lösung als Anion mit einer Molaren Masse von $193,1$ g/mol vor) sowie ein dimerisiertes Molekülion 2M^{+} bei $m/z = 387,2$ amu und das zweifach positive Molekülion M^{2+} bei $m/z = 96,9$ amu.

Das MS-Spektrum unterscheidet sich so gut wie nicht vom Referenzspektrum des käuflich erworbenen 2-KLG:

MS selbst isoliertes 2-KLG (Auswahl): m/z , (Intensität [%]): 409,1 (21), 387,2 (6, 2M^{+}), 255,1 (15), 192,6 (100, M^{+}), 102,9 (44, $- 2\text{CO}_2$), 96,9 (35, M^{2+}), 88,9 (6, $- \text{CO}_2$, $- 2 \text{CO}$), 76,9 (35), 60,1 (96), 44,8 (18, $\text{C}_2\text{OH}_4^{+}$), 31,7 (6)

MS Referenzsubstanz (Auswahl): m/z (Intensität [%]): 409,2 (12), 387,0 (39, 2M^{+}), 192,5 (99, M^{+}), 102,8 (71, $- 2\text{CO}_2$), 96,9 (27, M^{2+}), 88,9 (12, $- \text{CO}_2$, $- 2 \text{CO}$), 76,9 (55), 61,8 (100), 44,9 (18, $\text{C}_2\text{OH}_4^{+}$), 32,0 (11).

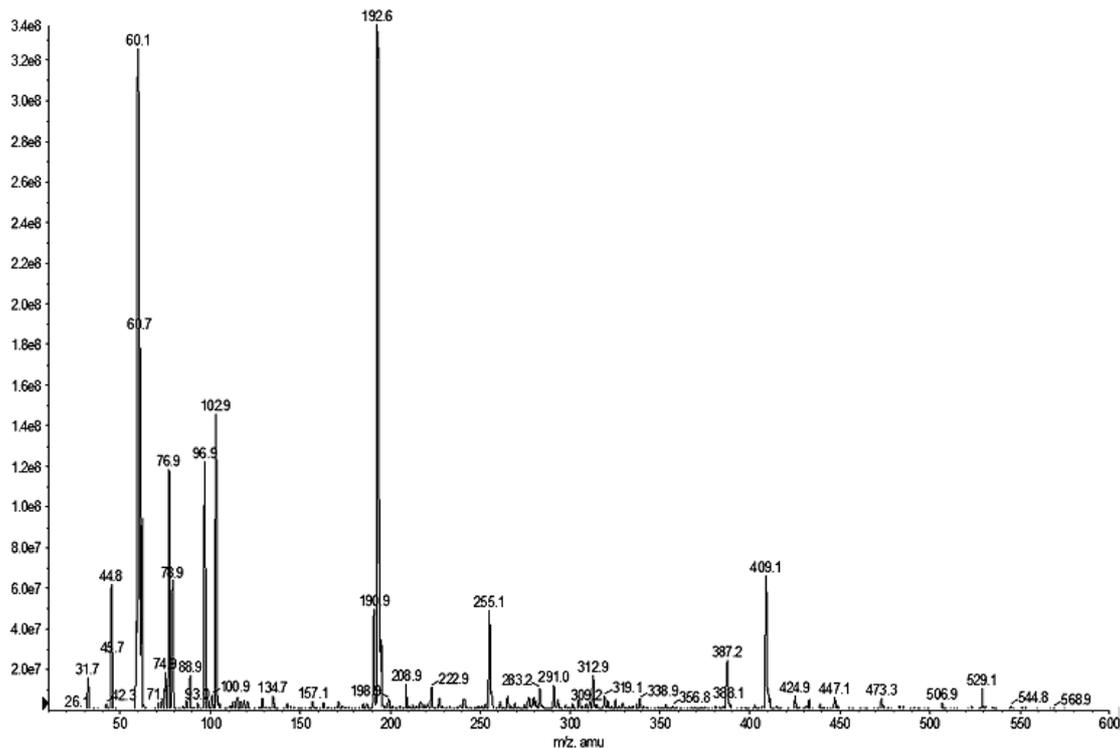


Abbildung 5.15: Massenspektrum von selbst isolierter 2-Keto-L-Gulonsäure

Bei der isolierten Substanz handelt es sich somit um 2-Keto-L-Gulonsäure.

Die Umsetzung von 2-KLG zu Ascorbinsäure ist in der Literatur beschrieben [Reichstein *et al.* 1934]. Zahlreiche verbesserte oder neu entwickelte Methoden sind patentiert [Arumugam *et al.* 2003, Fechtel *et al.* 1998, Fechtel *et al.* 1999, Honda *et al.* 1998, Hoshino *et al.* 2005].

5.5. Zusammenfassung

Die Produktion von 2-KLG in einer gekoppelten Anlage mit einem Oxidations- und einem Reduktionsteil verlief erfolgreich. Die Laufzeit betrug bis zu 8,1 Tage. Die Ausbeute betrug knapp 70%, die Raum-Zeit-Ausbeute maximal $227 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Aus der Produktlösung konnte durch zwei unkomplizierte Ausfällungsschritte 2-KLG mit einer Reinheit von 96,9 % gewonnen werden.

Kapitel 6: Diskussion und Ausblick

Dieses Kapitel betrachtet detailliert die beiden Einzelschritte der Umsetzung von Glucose zu 2-KLG, zeigt Vorteile und Verbesserungspotential auf und vergleicht die Gesamtkaskade mit anderen Verfahren zur Vitamin-C-Herstellung.

6.1. Oxidation von Glucose zu 2,5-Diketo-D-Gluconat

Soweit bekannt, wurde erstmals ein kontinuierlicher Prozess mit ruhenden *G. oxydans*-Zellen zur Produktion von 2,5-DKG etabliert. Die Ausbeuten und Raumzeitausbeuten lagen mit 79% bzw. $476 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (Tabelle 3.14) weit über den Werten, die zuvor in einem Chemostaten mit wachsenden Zellen erreicht wurden (60% bzw. $312 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, [Buse *et al.* 1992a]). Auch im Satzreaktor konnten ruhende Zellen sehr erfolgreich eingesetzt werden, die Ausbeuten lagen hier sogar bei 90-97% (Tabelle 3.10). Andere Arbeitsgruppen erreichten mit wachsenden Zellen lediglich Ausbeuten von 80-89% [Buse *et al.* 1992b, Elfari *et al.* 2005].

Offensichtlich lohnt es sich, Wachstum und Produktion bei *G. oxydans*-Zellen zu entkoppeln. Wie sich im Rahmen dieser Arbeit erstmals gezeigt hat, erniedrigen hohe Glucose-Konzentrationen während des Wachstums die Aktivität der Zellen bezüglich der Oxidationsreaktion (Abbildung 3.7.). Werden wachsende Zellen von *G. oxydans* zur Produktion von 2,5-DKG eingesetzt, ist die Aktivität der Zellen geringer, woraus wahrscheinlich die niedrigeren Ausbeuten im Chemostaten resultieren. Durch eine Optimierung des Glucosezugabeprofils während der Zellanzucht kann vermutlich die Aktivität der Zellen noch weiter erhöht werden.

Die umfangreichen reaktionstechnischen und kinetischen Charakterisierungen waren erst möglich durch eine neu entwickelte Analytikmethode, die 2,5-DKG zuverlässig quantifiziert. Die in anderen Arbeiten publizierten HPLC-Chromatogramme zeigen hingegen eine nur unvollständige Trennung von 2-KG und 2,5-DKG. Manche Arbeitsgruppen können 2-KG und 2,5-DKG per HPLC überhaupt nicht trennen und geben gemeinsame Ausbeuten für die beiden Substanzen an. Viele nutzen nach wie vor den Arsenomolybdattest nach Nelson und Perlman, um die Konzentration an 2,5-DKG zu bestimmen [Perlman 1955, Stroshane *et al.* 1977]. Dieser Färbetest weist 5-KG und 2,5-DKG durch eine starke Blaufärbung nach – die Konzentrationen der Substanzen sollen sich so photometrisch quantifizieren lassen. Klassischerweise wird die Gesamtkonzentration von 5-KG und 2,5-DKG durch den Arsenomolybdattest bestimmt, die

5-KG-Konzentration zusätzlich per HPLC. Die 5-KG-Konzentration wird dann von der 2,5-DKG/5-KG-Konzentration abgezogen und so der Gehalt an 2,5-DKG ermittelt. Dabei wird vorausgesetzt, dass die resultierenden Farbkomplexe mit 5-KG bzw. 2,5-DKG denselben Extinktionskoeffizient besitzen. Dass diese Methode stark mit Fehlern behaftet ist, wurde zuvor bereits gezeigt [Silberbach *et al.* 2003]. Es lässt sich daher mutmaßen, dass viele Arbeitsgruppen ihre 2,5-DKG-Ausbeute falsch einschätzen. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte HPLC-Methode konnte 2,5-DKG hingegen zuverlässig quantifizieren.

2,5-DKG ist instabil und zersetzt sich allmählich in Lösung, das gilt nachweislich auch bei CSTR-Bedingungen von pH5 und 25°C. Für gewöhnlich empfiehlt es sich in solchen Fällen, durch den Einsatz hoher Biomassekonzentrationen die Reaktion stark zu beschleunigen und die Verweilzeit zu verkürzen. Das war hier nicht erfolgreich: Bei Biomassekonzentrationen von 8% und Verweilzeiten von 30 Minuten sank die Ausbeute mit 25% weit unter den erwarteten Wert von >75% (Abbildung 3.39). Dies liegt an einer Sauerstofflimitierung bei Biomassekonzentrationen von mehr als 2%. In dem hier konstruierten Reaktorsystem können Raumzeitausbeuten von mehr als 476 mmol*L⁻¹*d⁻¹ nur dann erreicht werden, wenn eine stark verminderte Ausbeute in Kauf genommen wird.

Um die Reaktorleistung zu steigern, muss der gelöste Sauerstoffanteil vergrößert werden. Das ist durch die Zugabe von teuren Perfluorverbindungen wie Perfluorodecalin möglich [Silberbach 2001] oder aber durch eine Erhöhung des Reaktorinnen-drucks auf mehr als 1 bar Sauerstoffdruck. Tabelle 6.1 zeigt, dass eine viermal so große Raumzeitausbeute erreicht werden könnte, wenn keine Sauerstofflimitierung vorläge.

Tabelle 6.1: Mögliche Raumzeitausbeute bei unbegrenztem Sauerstoffangebot

	sauerstofflimitiert (Realität, gemessen)	nicht sauerstofflimitiert (Theorie, berechnet)
Glucosekonz./ mM	50	50
Verweilzeit	2 h	30 min
Biomassekonz.	2 %	10 %
Ausbeute	79 %	80%
Raumzeitausbeute [mmol*L⁻¹*d⁻¹]	476	1926
Raumzeitausbeute [g*L⁻¹*d⁻¹]	92	374

Für zwei Mol Produkt 2,5-DKG werden drei mol O₂ benötigt. Eine Beispielrechnung (Tabelle 6.2) verdeutlicht, wie hoch die Sauerstofftransfer rate sein müsste, um die theoretische Reaktionslösung (10% Biomasse) mit genügend Sauerstoff zu versorgen.

**Tabelle 6.2: Abschätzung des Sauerstoffbedarfs der Lösung
(10% Biomasse, 50 mM Glucose, $\tau = 30$ min, $V = 50$ mL)**

Produktbildungsrate (theor.)	1,9 mol*L ⁻¹ *d ⁻¹ = 0,08 mol*L ⁻¹ *h ⁻¹
benötigte Sauerstofftransfer rate OTR	0,12 mol*L⁻¹*h⁻¹

In ihrer Diplomarbeit untersuchte Maike Silberbach die maximal erreichbaren Sauerstofftransfer rates bei der Oxidation von Glucose zu 2,5-DKG mit *Gluconobacter oxydans* NCIMB 8084 [Silberbach 2001]:

**Tabelle 6.3: Sauerstofftransfer rates in verschiedenen Satzreaktorsystemen
(jeweils bei 30°C, Quelle: [Silberbach 2001])**

	OTR [mol*L⁻¹*h⁻¹]
250-mL-Schüttelkolben	0,04
2-L-Fermenter	0,096
50-L-Druckfermenter – 4 bar Überdruck	0,225

Wie sich dort gezeigt hat, kann die Sauerstofftransfer rate durch Erhöhung des Reaktorinnendrucks stark gesteigert werden. Es ist daher zu erwarten, dass auf diese Weise auch im hier selbst konstruierten Reaktorsystem der Sauerstoffeintrag und damit letztendlich die Raumzeitausbeute stark erhöht werden könnten.

Tabelle 6.4 zeigt, dass im selbst konstruierten Reaktorsystem lediglich Sauerstofftransfer rates von etwa 0,032 mol*L⁻¹*h⁻¹ erzielt wurden:

**Tabelle 6.4: Im Rahmen dieser Arbeit erreichte Sauerstofftransfer rate
(2 % Biomasse, 50 mM Glucose, $\tau = 120$ min, $V = 50$ mL)**

Produktbildungsrate (erzielt)	0,5 mol*L ⁻¹ *d ⁻¹ = 0,021 mol*L ⁻¹ *h ⁻¹
erreichte Sauerstofftransfer rate OTR	0,032 mol*L⁻¹*h⁻¹

Diese OTR ist relativ gering im Vergleich zu den Raten, die Maike Silberbach im Fermenter erzielen konnte. Das weist darauf hin, dass das Reaktordesign noch stark verbesserungswürdig ist. Der CSTR im Rahmen dieser Arbeit bestand aus einem Glasreaktor, der von unten durch eine Fritte begast wurde. Die Reaktorlösung wurde nicht mehr zusätzlich gerührt, Zellen und Lösung lediglich durch die Umwälzung und den Gasstrom durchmischt. Vermutlich hatte dies erheblichen Einfluss auf die OTR: Die Blasen waren wahrscheinlich sehr groß, das Verhältnis von Blasenoberfläche zu

-volumen ungünstig und der Sauerstoffübergang daher sehr viel schlechter als in den üblichen Reaktoren. Wird das Produktionsverfahren jedoch in einem größeren Maßstab durchgeführt, ist die Sauerstoffbegasung vermutlich sehr viel besser, da große Rührkessel und Fermenter dafür ausgelegt sind, hohe Begasungsraten zu erreichen.

Die Begasung mit reinem Sauerstoff war im Rahmen dieser Arbeit reaktionstechnisch notwendig: Nur so konnte unter den gegebenen überdruckfreien Bedingungen überhaupt annähernd genug Sauerstoff in die Lösung eingebracht werden. Die Aktivität der Zellen war zudem bei einer Begasung mit Sauerstoff fast anderthalb mal so groß wie bei einer Begasung mit Druckluft (Abbildung 3.14). Da reiner Sauerstoff aber teuer ist, empfiehlt es sich, den ungelösten Sauerstoff nicht entweichen zu lassen, sondern aufzufangen und in den Reaktor rückzuführen. Bei der Reaktion entstehen weder Kohlendioxid noch andere Abgase, denkbar ist also ein geschlossenes Reaktorsystem, das unter erhöhtem Sauerstoffdruck steht und bei dem ständig nur die Sauerstoffmenge nachgeführt wird, die in der Reaktion verbraucht wird. So ließen sich die Kosten auf ein Minimum reduzieren (Tabelle 6.5). Für weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet, empfiehlt es sich außerdem, eine pO_2 -Sonde in den CSTR zu integrieren. So lassen sich mögliche Sauerstofflimitierungen sofort feststellen.

Tabelle 6.5: Abschätzung der Kosten für die Sauerstoffbegasung in einem 50 mL-Reaktor (10% Biomasse, 50mM Glucose, $\tau = 30$ min)

	offenes System (bisher)	geschlossenes System (Ausblick)
Sauerstoffverbrauch	0,14 mol/d	
Begasung	10 L/h = 9,81 mol/d	0,14 mol/d
Kosten Sauerstoff- Druckgasflasche	170,50 € (56 L, 200 bar) (Reinheit >99,6%, Sigma-Aldrich Juli 2009)	
Kosten Sauerstoff	0,37 €/mol (Reinheit >99,6%, Sigma-Aldrich Juli 2009)	
Sauerstoffkosten im Prozess (50-mL-Reaktor)	3,63 € pro Tag 190 €/kg 2,5-DKG	0,05 € pro Tag 2,7 €/kg 2,5-DKG

Während im Satzverfahren eine nahezu vollständige Ausbeute erzielt wurde, stagnieren die Ausbeuten im kontinuierlichen Verfahren bei maximal 82% - unabhängig von der Glucose- oder Biomassekonzentration (Tabelle 3.14). Zwar wurde Glucose fast vollständig umgesetzt, die Reaktorlösung enthielt jedoch immer noch relativ hohe Konzentrationen an 2-KG (5-10 mM, vgl. Abbildung 3.34 und 5.6). 10-20% der eingesetzten Glucose werden somit zu 2-KG, aber nicht weiter zu 2,5-DKG umgesetzt. Dieser Reaktionsschritt scheint somit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zu sein -

obwohl kinetische Untersuchungen die Oxidation von Glucose zu Gluconat als den langsamsten identifiziert hatten (Tabelle 3.6). Jedoch fanden die Kinetikuntersuchungen unter anderen Bedingungen statt: Dabei fiel im Laufe der Reaktion der pH von 5 auf 4,2 – im CSTR betrug der pH-Wert kontinuierlich 5. Das pH-Optimum der 2-Ketogluconatdehydrogenase liegt bei 4,0, im CSTR ist dieses Enzym daher weniger aktiv. Der pH-Wert im CSTR ist stets ein Kompromiss zwischen den pH-Optima der drei involvierten Enzyme (5,5; 4,0-5,5; 4,0). Um die Ausbeute an 2,5-DKG im kontinuierlichen Verfahren zu erhöhen, empfiehlt sich eine Kompartimentierung des Reaktors: Im ersten Teil würden bei pH5 ideale Bedingungen für die Oxidation der Glucose zu 2-KG geschaffen, im zweiten Teil bei pH4 die Umsetzung von 2-KG zu 2,5-DKG begünstigt. Möglicherweise ist sogar eine Dreiteilung vorteilhaft, um für jeden Schritt optimale Bedingungen einzustellen.

2-KG ist eine im Rahmen dieser Arbeit als Endprodukt unerwünschte, im Übrigen aber recht wertvolle Verbindung: 2-KG kostet über 13.000 €/mol⁸. Es gibt *G. oxydans*-Stämme, die Glucose lediglich bis zu 2-KG oxidieren. Einen solchen Stamm in den entwickelten Reaktor einzusetzen und kontinuierlich 2-KG aus Glucose zu produzieren, wäre somit ein durchaus lohnender Prozess. 2-KG ist im Gegensatz zu 2,5-DKG nicht instabil und kann daher sehr viel leichter aus der Reaktionslösung isoliert werden.

Trotz seiner Instabilität konnte 2,5-DKG im Rahmen dieser Arbeit aufgereinigt werden. Die Reinheit betrug zwar nur 54%, bei den Verunreinigungen handelte es sich jedoch lediglich um Aceton und vermutlich Puffersalze. Im Rahmen dieser Arbeit wurde somit ein Verfahren entwickelt, mit dem 2,5-DKG in hoher Ausbeute produziert und aufgereinigt werden kann. Die Verbindung ist nicht nur als Zwischenprodukt interessant: Sie ist nicht käuflich erwerbbar und daher von Forschern, die sich mit *G. oxydans* oder 2-KLG beschäftigen, sehr begehrt.

6.2. Reduktion von 2,5-Diketo-D-Gluconat zu 2-Keto-L-Gulonat

Das Enzym 2,5-Diketo-D-Gluconatreduktase wurde im 500-mg-Maßstab verfügbar gemacht und vollständig charakterisiert. Soweit bekannt, wurde es erstmals in einem EMR zur kontinuierlichen Produktion von 2-KLG angewendet.

⁸ Quelle: Katalogpreis Fluka 2007/8

Die größte Schwäche des Prozesses sind die hohen Mengen an NADP, die bisher eingesetzt wurden: In einem 10-mL-Reaktor bei einer Verweilzeit von 24 Minuten sind das 0,15 mmol NADP/Tag; die total turnover number für den Cofaktor lag bei 283 (Tabelle 4.13). NADP ist teuer und 2-KLG die Vorstufe eines günstigen Bulkproduktes. Ein industrieller Prozess, mit dem ein Massenprodukt wie Vitamin C hergestellt wird, muss sehr viel höhere Zyklenzahlen für NADPH haben – er wäre sonst nicht rentabel. Nach Simulationen kann die ttn in dieser Anlage aber um ein Vielfaches gesteigert werden: Abbildung 6.1 zeigt, dass die NADP-Konzentration mit 0,1 mM viel zu hoch gewählt war. Nach theoretischen Simulationen kann die NADP-Konzentration auf ein Fünftel, also 0,02 mM erniedrigt werden, ohne dass es zu Ausbeuteeinbußen kommt. Die ttn für NADPH würde sich dabei auf 1343 mehr als versechsfachen.

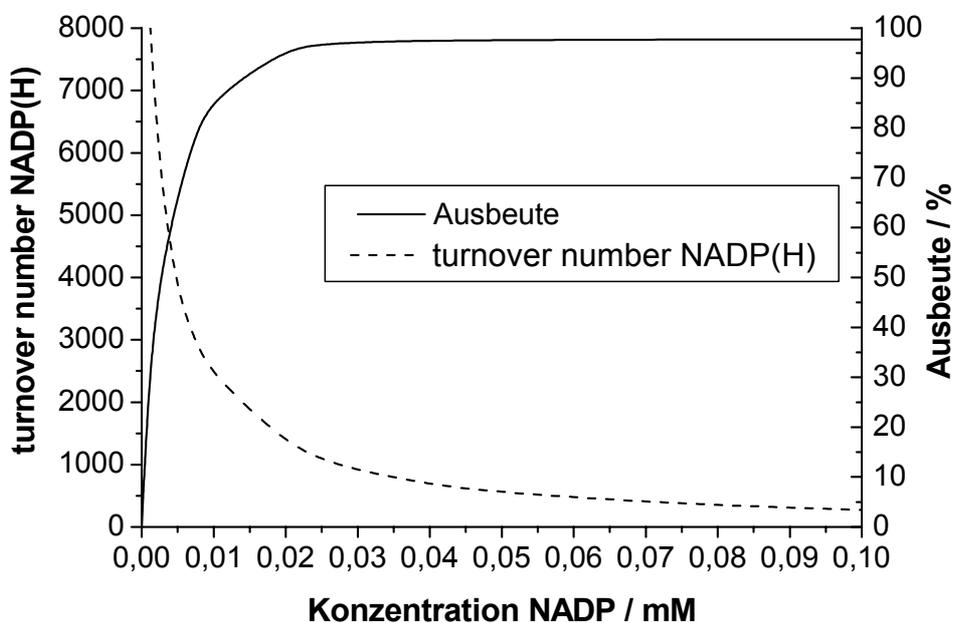


Abbildung 6.1: Auswahl der optimalen NADP-Konzentration im EMR – Auswirkungen auf Ausbeute und total turnover number nach theoretischen Berechnungen. Simulierte Bedingungen: 28 mM 2,5-DKG, 1000 mM Isopropanol, 2,5 mg/mL 2,5-DKGR, 5,5 mg/mL *Lb*-ADH, $\tau = 20$ Minuten, $V = 10$ mL.

Auch der Einsatz einer Nanofiltrationsmembran könnte die total turnover number des Cofaktors noch weiter erhöhen. Im Rahmen dieser Arbeit scheiterte das Vorhaben an zu hohen Reaktorinnendrücken. In einem größeren oder druckstabileren Reaktorsystem lohnt sich jedoch ein weiterer Versuch. Unverbrauchtes NADP kann außerdem rezykliert werden. Auch könnte der Cofaktor durch Bindung an Polyethylenglykol molekulargewichtsvergrößert werden, so dass er auch durch eine Ultrafiltrationsmembran zurückgehalten wird [Kula *et al.* 1987].

Mit dem beschriebenen Satzverfahren lassen sich schnell und unkompliziert große Mengen 2,5-DKGR isolieren. Steht noch mehr Enzym zur Verfügung, ist auch der Einsatz sehr viel größerer Reaktoren möglich. Denkbar wäre ein Umlaufreaktor nach Vorbild des CSTR mit *Gluconobacter oxydans*. In einem solchen Reaktorsystem können auch höhere Konzentrationen an Protein eingesetzt werden, ohne dass es zu Druckproblemen kommt.

Der Kaskadenlauf mit einem einzigen EMR erzielte im Reduktionsteil Ausbeuten von maximal 65,5% (Tabelle 5.5). Durch einen zweiten EMR konnte die Ausbeute auf 89,7% gesteigert werden (Tabelle 5.8). Um die Ausbeute zu steigern, wäre stattdessen auch ein EMR mit einem größeren Volumen in Frage gekommen. Da die Substratüberschussinhibierung nicht groß ist, wäre anstelle eines EMRs auch ein Strömungsrohrreaktor möglich.

Vielversprechend ist auch der Einsatz von rekombinanten *E. coli*-Zellen, die die 2,5-DKGR und ein Enzym zur Cofaktorregenerierung exprimieren. Im Rahmen dieser Arbeit war diese Vorgehensweise nicht erfolgreich, da die Zellen das Substrat nicht aufnehmen konnten (Abbildung 4.8). Gelingt es jedoch, die Zellen einen entsprechenden Transporter exprimieren zu lassen, würde eine entsprechende Ganzzell-Biotransformation mit hoher Wahrscheinlichkeit zufriedenstellende Ergebnisse liefern. Bei einer analogen Umsetzung von D-Fruktose zu D-Mannitol in rekombinanten *E. coli*-Zellen konnte die Ausbeute durch die Einführung eines Transporterproteins von 3% auf 43% gesteigert werden [Kaup *et al.* 2003].

Insgesamt gesehen wurden im Rahmen dieser Arbeit sehr gute Einblicke in die Eigenschaften der 2,5-Diketo-D-Gluconatreduktase und ihr Einsatzpotential gewonnen. Es wurde kontinuierlich 2-KLG im Enzymmembranreaktor produziert, mit guten Raumzeitausbeuten von $1697 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (Tabelle 4.13).

6.3. Produktion von 2-KLG aus Glucose

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals ein Prozess entwickelt, der kontinuierlich 2-KLG aus Glucose produziert. Die Ausbeuten lagen bei 68%, die höchste Raumzeitausbeute war $227 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (Tabelle 5.9). Für eine insgesamt vierstufige Synthese (Glucose \rightarrow Gluconat \rightarrow 2-KG \rightarrow 2,5-DKG) bedeutet eine Ausbeute von 68%, dass jeder Schritt im Durchschnitt eine Ausbeute von ca. 91% aufwies – eine recht zufriedenstellende Zahl.

6.3. Produktion von 2-KLG aus Glucose

Es konnte eine total turnover number für die 2,5-DKGR von über 75.000 erreicht werden. Jedoch hätte diese noch weitaus gesteigert werden können, wenn die Laufzeit erhöht worden wäre. Wie hoch die total turnover number maximal hätte werden können, soll im Folgenden grob abgeschätzt werden.

Ab Tag 5 wird eine langsame Abnahme der Produktkonzentration und Ausbeute deutlich. Mit jedem Tag nimmt die Produktkonzentration durchschnittlich um zehn Prozent ab (Abbildung 6.2):

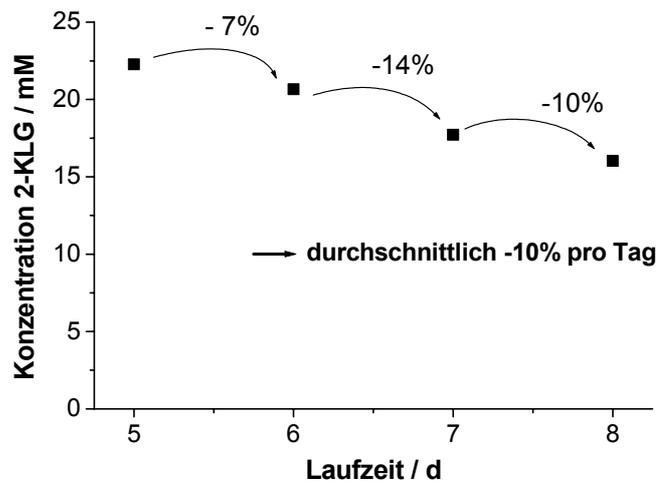


Abbildung 6.2: allmähliche Deaktivierung der Biokatalysatoren im gekoppelten Reaktorsystem: Abnahme der Ausbeute mit der Zeit

Mit Hilfe der Formel

$$\text{Konz. 2KLG (Tag } x) = 0,9^x$$

lassen sich voraussichtliche Produktkonzentration zu späteren Zeitpunkten ermitteln. Nach dieser Rechnung sinkt die 2-KLG-Konzentration nach ca. 50 Tagen auf Werte <0,1 mM ab (Abbildung 6.3).

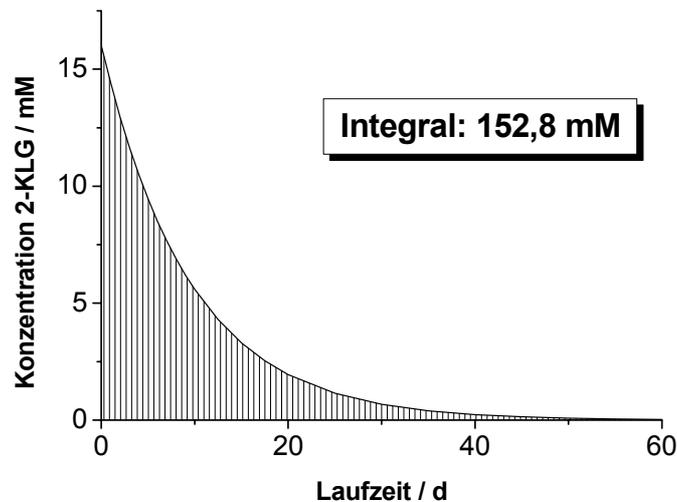


Abbildung 6.3: Voraussichtliche Abnahme der Produktkonzentration mit der Zeit

Aus dem Integral dieser Kurve lässt sich die total turnover number berechnen, die bei diesem Reaktionslauf maximal hätte erreicht werden können: Sie beträgt 146.805 (Tabelle 6.6).

Tabelle 6.6: Abschätzung der maximalen total turnover number

Zusätzliche ttn 2,5-DKGR ab Tag 8	71.535
Bereits erzielte ttn Tag 0-8	75.270
Maximale ttn 2,5-DKGR	146.805
Maximale Katalysatorausnutzung <i>G. oxydans</i> [g_{Produkt}/g_{BFG}]	38,6

Natürlich handelt es sich hier nur um eine grobe Näherung. Dennoch kann man davon ausgehen, dass die total turnover number der 2,5-DKGR etwa anderthalb bis doppelt so hoch hätte werden können, wenn die Anlage bis zur vollständigen Deaktivierung der Biokatalysatoren wäre betrieben worden.

Zwar ist bereits ein anderes Verfahren zur kontinuierlichen Produktion von 2-KLG patentiert, jedoch wird dort das teurere Substrat Sorbitol eingesetzt [Rueckel 2000]. Mehrere Verfahren zur Umsetzung von Glucose zu 2-KLG im Satzreaktor sind beschrieben (siehe Einleitung), dabei handelt es jedoch selten um fertige Prozesse, sondern um Umsetzungen im kleinen Maßstab im Schüttelkolben.

Mit wenigen Ausnahmen handelt es sich bei den beschriebenen Umsetzungen um einstufige Verfahren, bei denen in einem einzigen Organismus direkt Glucose zu 2-KLG umgesetzt wird. Eine der höchsten Ausbeuten erreichten Grindley *et al.* mit

gentechnisch veränderten *Erwinia citreus*; dabei lag die Ausbeute mit 49,4 % weit unter der, die in dieser Arbeit erzielt wurde. Durch die räumliche Trennung von Oxidation und Reduktion im Prozess kann die Ausbeute demnach stark gesteigert werden. Denn so lassen sich die beiden Reaktionen separat optimieren. Auch hat die Reaktion von 2-KG zu 2-KLG in einem einzigen Organismus kaum Triebkraft, wie thermodynamische Betrachtungen ergeben haben (Abschnitt 1.2.3.3).

Das einzige beschriebene Verfahren zur Umsetzung von Glucose zu 2-KLG, bei dem eine höhere Ausbeute erreicht wird als in dieser Arbeit, ist das von Sonoyama *et al.* [Sonoyama *et al.* 1982]. Auch dort fanden Oxidation und Reduktion getrennt voneinander statt: Zunächst wird Glucose mit *Erwinia* sp. zu 2,5-DKG oxidiert, dann dieses durch einen *Corynebacterium*-Stamm zu 2-KLG reduziert. Die Ausbeute betrug 84,6 %. Es ist zu erwarten, dass auch mit dem Verfahren, das in dieser Arbeit entwickelt wurde, eine Ausbeute von 80% erreicht werden kann. Denn für gewöhnlich wurde bei der kontinuierlichen Produktion von 2,5-DKG im CSTR Ausbeuten von 80% erzielt (Tabelle 3.14), im EMR sind Ausbeuten von 100% möglich (Abbildung 5.8). Die Gesamtausbeute läge dann bei 80%. Optimiert man das Reaktordesign weiter (im ersten Reaktor höherer Sauerstoffeintrag und eine Kompartimentierung zur bevorzugten Oxidation von 2-KG zu 2,5-DKG) ist eine Ausbeute von mehr als 80% bei der Gesamtreaktion nicht illusorisch.

Damit das hier entwickelte Verfahren wirtschaftlich rentabel wird, muss zum einen der Sauerstoffeintrag im ersten Reaktor optimiert werden: Eine Rückhaltung des nicht gelösten Sauerstoffs im geschlossenen System hilft dabei, Kosten einzusparen (Tabelle 6.5). Vor allem aber muss der Cofaktorverbrauch im zweiten Reaktor gesenkt werden. Auf lange Sicht ist ein Verfahren mit rekombinanten *E. coli*-Zellen, die 2,5-DKG aufnehmen und reduzieren können, vielversprechend – die Cofaktorregenerierung könnte dann im Inneren der Zellen stattfinden und es müsste kein NADP zugegeben werden. Für ein Satzverfahren im größeren Maßstab wären die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten lysierten Zellen bereits jetzt gut geeignet.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Prozess zur kontinuierlichen Produktion von 2-KLG aus Glucose eignet. Es konnten Ausbeuten von knapp 70% und Raumzeitausbeuten von rund $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ über mehr als eine Woche gehalten werden (Tabelle 5.8).

In dieser Arbeit wurden sowohl für die Oxidations- als auch für die Reduktionsreaktion kinetische Modelle entwickelt, die den Verlauf eines realen Prozesses meist gut simulieren können. Jedoch weichen sie in einigen Fällen von der Realität ab – höchstwahrscheinlich aufgrund der in ihnen gemachten Vereinfachungen. Beispielsweise wurde im Modell der Einfachheit halber angenommen, dass 2-KLG die *Lb*-ADH unkompetitiv hemmt. Doch nach kinetischen Daten wäre auch eine nichtkompetitive Hemmung möglich. Weiterhin wurde nicht genauer untersucht, welche die Einflüsse der Zwischenprodukte aus der ersten Reaktion (2-KG, Gluconat) auf die *Lb*-ADH hat. Mögliche inhibierende Einflüsse sind im Modell nicht berücksichtigt. Durch weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet ließe sich das Modell daher mit Sicherheit noch verfeinern und besser an die Realität anpassen.

6.4. Die Zukunft der Vitamin C-Produktion

Zu den bisher industriell eingesetzten biotechnologischen Verfahren ist der entwickelte Prozess noch nicht konkurrenzfähig. In China wird 2-KLG industriell aus L-Sorbose hergestellt, mit Zellen von *Gluconobacter oxydans* und *Bacillus megaterium* [Shujuan *et al.* 2003]. In der BASF/Merck/Cerestar-Anlage in Krefeld dient Sorbitol als Ausgangssubstrat; die Biokatalysatoren sind *G. oxydans* und *Bacillus thuringiensis*. Zwar handelt es sich dabei stets um Verfahren im Satzreaktor, die von teureren Substraten als Glucose ausgehen; sie erreichen aber Ausbeuten von 75-85% und sind finanziell rentabler, da keine teuren Cofaktoren zugegeben werden müssen. Vitamin C ist ein günstiges Bulkprodukt und für seine Herstellung lohnen sich nur Verfahren, welche die ohnehin geringen Gewinnspannen nicht noch weiter verkürzen.

Denn beim Massenprodukt Vitamin C ist der wirtschaftliche Konkurrenzdruck enorm. Vier chinesische Produzenten, darunter die Northeast Pharmaceutical Group (NEPG), beherrschen inzwischen den Weltmarkt und verkaufen Vitamin C zu Preisen, die für europäische Hersteller nicht mehr wirtschaftlich sind⁹.

Die BASF und die NEPG gründeten 2002 ein Gemeinschaftsunternehmen zur Herstellung und Vermarktung von Vitamin C am Standort Shenyang in China. In Folge schloss die BASF zwei ihrer Vitamin C-Anlagen: in Grenaa (Dänemark) im Dezember 2005 und in Wilmington (North Carolina, USA) im März 2009 – nach eigenen Angaben aufgrund der rückläufigen Preise für Vitamin C und hohen Rohstoffkosten.

⁹ www.nutraingredients.com/Industry/DSM-makes-last-stand-against-Chinese-vitamin-C

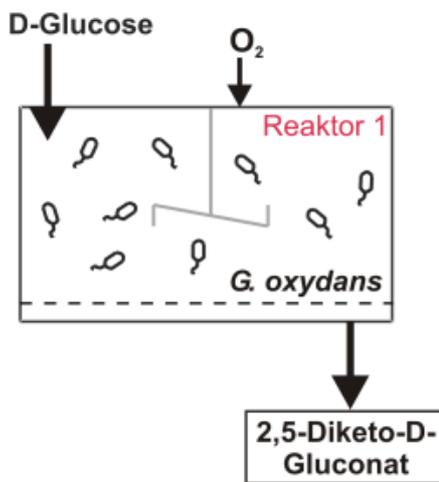
DSM stellte 2005 die Produktion in seiner Anlage im US-amerikanischen Belvidere ein und produziert Vitamin C jetzt nur noch in Asien sowie im schottischen Dalry. Das niederländische Unternehmen gab gleichzeitig bekannt, trotz geringerer Produktionskapazitäten weiterhin eine wichtige Rolle in der weltweiten Vitamin-C-Produktion spielen und konkurrenzfähiger werden zu wollen. Dabei solle ihnen ein neues einstufiges Produktionsverfahren helfen, das sie gerade entwickelten.

Auf dem Vitamin-C-Markt kann in Zukunft nur erfolgreich sein, wer seine Produktionskosten auf ein Minimum reduziert und im Wettlauf mit neuen Prozessen mithalten kann. Chemische Verfahren nach Vorbild von Tadeus Reichstein und Andreas Grüssner können diese Voraussetzungen vermutlich kaum erfüllen. Die Biotechnologie bietet hingegen die idealen Rahmenbedingungen: Vitamin C bzw. sein Vorläufer 2-KLG können schnell, unkompliziert und mit geringen Prozesskosten aus günstigen Ausgangsmaterialien produziert werden. Die umweltfreundliche und energiesparende „grüne“ Seite der Biotechnologie ist ein willkommener Nebeneffekt für das Marketing. Wie auch immer zukünftige Produktionswege zum Vitamin C aussehen werden, ob über 2,5-DKG, über Sorbose oder eine andere Verbindung: Die Zukunft der Vitamin-C-Produktion wird mit großer Wahrscheinlichkeit biotechnologisch sein.

Kapitel 7: Zusammenfassung

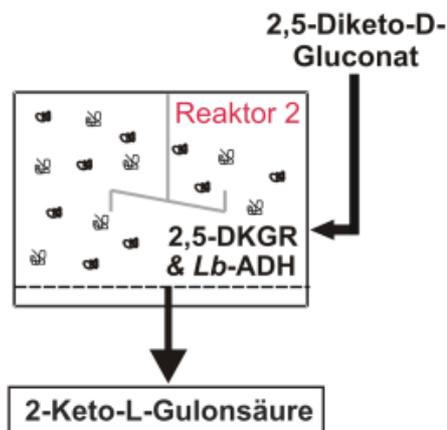
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein biotechnologisches Verfahren entwickelt, mit dem sich kontinuierlich 2-KLG aus Glucose produzieren lässt. 2-KLG ist eine Vorstufe von Vitamin C.

Oxidative Umsetzung von Glucose zu 2,5-DKG mit *Gluconobacter oxydans*:



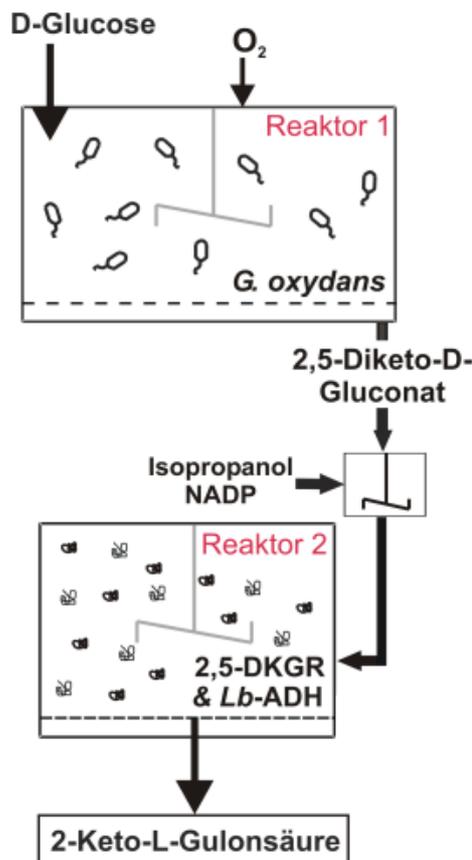
- Es wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen der Anzucht von *G. oxydans* und der späteren Zellaktivität festgestellt: je höher die Glucosekonzentration im Medium desto geringer die Aktivität.
- Die Begasung mit reinem Sauerstoff steigert die Produktivität deutlich. Im Satzreaktor wurden dabei Ausbeuten von bis zu 97% erzielt.
- Es wurden erstmals ruhende *G. oxydans*-Zellen zur kontinuierlichen Produktion von 2,5-DKG eingesetzt. Dabei wurden Ausbeuten von etwa 80% und Raumzeitausbeuten von $92 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ erreicht.
- Die starke Sauerstoffabhängigkeit der Reaktion limitiert die Reaktorleistung.

Reduktive Umsetzung von 2,5-DKG zu 2-KLG:



- Rekombinante *E. coli*-Zellen produzieren 2-KLG nur nach ihrer Permeabilisierung und sind für ein kontinuierliches Verfahren nicht geeignet.
- Das Enzym 2,5-Diketo-D-Gluconatreduktase wurde im 500-mg-Maßstab isoliert und charakterisiert.
- 2,5-DKGR zeigt eine starke Präferenz für NADPH ($K_{M, NADH} = 500 \cdot K_{M, NADPH}$); die *Lb*-ADH eignet sich am besten zur Cofaktorregenerierung
- Es wurde ein EMR mit der 2,5-DKGR betrieben. Dabei wurden Raumzeitausbeuten von bis zu $329 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ erreicht.

Produktion von 2-KLG aus Glucose:



- Es wurde erstmals ein kontinuierliches Verfahren zur Produktion von 2-KLG aus Glucose etabliert.
- Der Prozess lief über 8 Tage stabil und erzielte Ausbeuten von 68% und Raumzeitausbeuten von $41,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.
- Die ttn der 2,5-DKGR betrug über 75.000, die ttn des Cofaktors NADP(H) durchschnittlich 187.
- Das Produkt 2-KLG kann schnell und unkompliziert mit einer Reinheit von 97% aus der Reaktionslösung isoliert werden.

Übergeordnete Erkenntnisse:

- Durch eine räumliche Trennung von Oxidation und Reduktion konnte die Ausbeute der Gesamtreaktion stark gesteigert werden. Sie betrug hier 68% im Vergleich zu 49% bei Reaktionen mit rekombinanten Mikroorganismen, in denen Glucose direkt zu 2-KLG umgesetzt wurde.
- Eine weitere Kompartimentierung könnte die Ausbeute weiter steigern: Auch für die Oxidation von Glucose zu 2,5-DKG bietet sich der Einsatz von zwei oder drei separaten Reaktorsystemen an.
- Der entwickelte Prozess ist unter den Bedingungen, wie er hier eingesetzt wurde, noch nicht konkurrenzfähig zu industriell eingesetzten biotechnologischen Verfahren, die 2-KLG produzieren. Der Grund sind vor allem die hohen Kosten für den Cofaktor NADP sowie für die Sauerstoffbegasung.
- Durch eine weitere Optimierung des ersten Reaktorsystems und den Einsatz verbesserter, rekombinanter *E. coli*-Zellen im zweiten Reaktor könnte das entwickelte Verfahren aber eine interessante und rentable Alternative zur weltweiten Vitamin-C-Produktion werden.

Kapitel 8: Materialien und Methoden

8.1. Geräte und Labormaterialien

Adolf Kühner AG, Birsfelden, CH	Inkubationsschüttler ISF-4-W
Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK	Photometer Ultrospec 3100 pro Präzisionskolbenpumpe P-500 Chromatographiesäulen
Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg	Fotografierkammer Image Master VDS-System
Applied Bioscience, Darmstadt	Kapillarsequenziergerät 3100-Avant Genetic Analyzer
Applied Biosystems, Darmstadt	Massenspektrometer API 4000
B. Braun, Melsungen	Inkubationsschüttler Certomat
Beckman Coulter, Fullerton, USA	Zentrifugen Avanti J25 (Rotoren JA-10 und JA-14) und J-20XP (Rotor JLA-8.1000)
Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA	Spannungsversorgung Power Pac Basic Elektrophoresekammern, Gelgießkammern
Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall	Multiplattenleser Power Wave
Brand, Wertheim	Einmalküvetten PMMA Plastibrand
Branson, Danbury, USA	Sonifier 250 Analog
Bruker Meßtechnik, Rheinstetten	Kernresonanzspektrometer Avance DR X 600
Büchi Laboratoriumstechnik, Essen	Rotationsverdampfer Rotavapor R-114 Vakuum Controller B-721 Wasserbad B-480
Chemap AG, Volketswil, CH	30L-Bioreaktor
Christ, Osterode	Gefriertrockner Alpha 2-4
Consort, Turnhout, BE	Electrophorese-Spannungsversorgung E831
Endress+Hauser, Weil am Rhein	Füllstandsgrenzschalter Nivotester FTW 420
Eppendorf AG, Hamburg	Tischzentrifuge centrifuge 5415D Heizblock Thermostat plus Thermomixer comfort Thermocycler Mastercycler personal Glucose-Analyzer EBIO compact
Fedegari Autoclavi Spa, Albuzzano, IT	Autoklav FOF3
Forschungszentrum Jülich, mechanische Werkstätten	Enzymmembranreaktoren 3 mL und 10 mL, 2-L- Ultrafiltrationszelle
GE Healthcare, München	FPLC-System: Äkta Purifier 10, Fraktions-sammler Frac-950, Monitor pH/C-900, Auto-sampler A-900 Ionenaustauschsäule HiPrep 16/10 QFF
Haake, Karlsruhe	Kryostat K20, DC3
Heidolph Instruments, Schwabach	Taumelschüttler Polymax 1040
Hellma, Müllheim	Quarzküvetten QS 1cm, 0,1 cm, 0,02 cm
Heraeus, Hanau	Zentrifuge Multifuge 3 S-R

8.1. Geräte und Labormaterialien

IKA Labortechnik, Staufen	Schüttler MTS4 Magnetrührer Ikamag RET-Co
Infors, Bottmingen, CH	Parallelfermentersystem Sixfors
Invitrogen, Karlsruhe	Novex Mini-Cell Elektrophoresekammer Gelfärbeschalen
Ismatec, Wertheim-Mondfeld	Analogpumpe Reglo Analog MS-416
Jasco, Gross-Umstadt	HPLC-System: HPLC-Pumpe PU-1580, Gradientenmischer LG-1580-02, Auto Sampler AS- 1550, Multiwavelength Detektor MD-1510, Säulenofen
Kendro, Hanau	Sicherheitswerkbank HeraSafe HS12
Kipp & Zonen, Delft, NL	Linienschreiber BD-41
Knauer, Berlin	Photometer mit Durchflussküvette
Kobold Instruments, Hofheim	Schwebekörper-Durchflussmesser KDG
LKB, Bromma, SE	Fraktionssammler 2070 Ultrorec II
Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach	Brutschränke Modellgrößen 5 und 7
Messer Griesheim, Frankfurt a.M.	Manometer
Metrohm, Filderstadt	pH-Meter 632 und 691 Impulsomat 614 Dosimat 665
Mettler-Toledo, Gießen	Ingold O ₂ Amplifier 170% air mit Sauerstoffelektrode
mgw Lauda, Lauda-Königshofen	Wasserbad M3
Millipore, Billerica, USA	Reinstwasseraufbereitungssystem Milli-Q academic Filtereinheiten Ultrafiltrationszellen und -membranen YM 3, YM5, YC500
MJ Research, Waltham, USA	Peltier Thermo Cycler PTC-200
Nanodrop Technology, Wilmington, USA	UV-Vis Spektralphotometer NanoDrop ND-1000
New Brunswick Scientific, Edison, USA	-80°C-Gefriertruhe
Nordantec, Bremerhaven	pH-Elektrode IJ44
Nunc, Roskilde, DK	Mikrotiterplatten
Oerlikon Leybold Vacuum GmbH, Köln	Membranpumpe Divac 2,4 L
Pharmacia LKB, Freiburg	Fraktionssammler Frac-100 Chromatographiesäulen
Phenomenex, Aschaffenburg	HPLC-Säulen Rezex ROA Organic Acid H ⁺ mit Vorsäulen Carbo-H und Luna NH ₂ mit Vorsäulen NH ₂ Kartuschensystem Analytical KJ0-4282
Roche, Grenzach-Wyhlen	Blutzuckermessgerät & Teststreifen Accu-Chek Aviva
Sartorius, Göttingen	Filtrationsmodul Sartocoon Slice 200 mit Hydrosart 30kD Kassette Glas-Vakuumfiltrationsgerät Sterilfilter, Sterilfilterhalter Analysenwaage Analytic AC 210 P Laborwaage LC 2200 S

Shimadzu Deutschland, Duisburg

Photometer UV-1601
CPS-Controller CPS 240A

Watson-Marlow Ltd., Flamouth, UK

Schlauchpumpen 101U, 101U/R, 505U

8.2. Software

Applied Bioscience, Darmstadt

Sequencing Analysis Software Version 5.1.1

Jasco, Gross-Umstadt

ChromPass Chromatography Data System Version 1.8.6.1

MicroMath Scientific Software, St. Louis, USA

Scientist Version 2.0

Sci-Ed Central, Cary, USA

Clone Manager Version 7.03

Shimadzu Deutschland, Duisburg

UV Probe Version 2.00

The MathWorks Deutschland, Ismaning

MATLAB Version 7.8

8.3. Chemikalien

Applied Biosystems, Darmstadt

BigDye Terminator Kit 3.1

BD, Franklin Lakes, USA

Difco M9-Salze 5x, Difco Yeast Nitrogen Base (siehe Tabelle 8.1 und Tabelle 8.2)

Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Profinity IMAC Resin (IDA-Sepharose)

Carl Roth, Karlsruhe

Carbenicillin Dinatriumsalz, Kanamycinsulfat, IPTG dioxanfrei

Cognis, Monheim am Rhein

Antischaummittel Biospumex 153k

Fermentas, St. Leon-Rot

DNA-Längenstandard λ DNA/Eco130I (StyI)

GE Healthcare, München

Säulenmaterial Sephadex G-25, Chelating Sepharose Fast-Flow (NTA)

Invitrogen, Karlsruhe

Proteinstandard prestained SeeBlue Plus2; SDS-Gele NuPAGE 4-12 % Bis-Tris, NuPAGE Sample Reducing Agent 10x, NuPAGE MES SDS Running Buffer 20x, SilverQuest Silver Staining Kit, NuPAGE LDS Sample Buffer 4x

Jülich Fine Chemicals, Jülich Chiral Solutions, Codexis, Jülich

NADP⁺-abhängige Formiatdehydrogenase aus *Pseudomonas sp.*, β -NADP di-Natriumsalz, β -NADH di-Natriumsalz, NAD, β -NADPH tetra-Natriumsalz, Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis*

KMF Laborchemie, Handels GmbH, Lohmar

37%ige Salzsäure, Ameisensäure, Kaliumhydroxid

Merck KGaA, Darmstadt

Pepton aus Casein, Imidazol, 97%ige Schwefelsäure, 85%ige Phosphorsäure, Eisessig, Dikaliumhydrogenphosphat, Agar-Agar, Natriumchlorid, Magnesiumsulfat-Heptahydrat, Natriumacetat-Trihydrat, Ethidiumbromid 1%ige Lösung, Ethanol abs., Methanol, Natriumdihydrogenphosphat, Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat Zitronensäure-Monohydrat, di-Natriumhydrogencitrat-1,5-Hydrat

Operon Biotechnologies, Köln

Sequenzierprimer

Qiagen, Hilden

Miniprep-Kit, Gel Extraction Kit, Dye Ex Kit

8.4. Biologische Materialien

Riedel-de Haën, Seelze	Natriumdihydrogencitrat
Roche, Grenzach-Wyhlen	T4 DNA Ligase, 10 x Ligasepuffer, Restriktionsendonukleasen Psp1406I, AccI und EcoRI mit Enzympuffer A
Serva Feinbiochemica, Heidelberg	di-Natrium-EDTA
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	Bradford-Reagenz, Kalium-5-Keto-D-Gluconat, 2-Keto-L-Gulonsäure-Hydrat, Glycerin, Cefoxitin di-Natriumsalz, Hefeextrakt, D-Glucose Monohydrat, Pepton aus Casein (tryptisch verdaut), 2-Keto-D-Gluconat Hemicalciumsalz-Hydrat, Albumin aus Rinderserum, Lysozym aus Hühnereiweiß, Natriumformiat, Kaliumdihydrogenphosphat, Dinatriumsuccinat, NAD ⁺ -abhängige Formiatdehydrogenase aus <i>Candida boidini</i> , D-Mannitol, Agarose, Aceton, Bis-Tris, Calciumcarbonat, Deuteriumoxid, Kalium-D-Gluconat, Magnesiumdichlorid-Hexahydrat, 2-Propanol, Na-Benzozat, Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB)

Tabelle 8.1: Zusammensetzung Difco Yeast Nitrogen Base 1 x

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	g/L	Pyridoxin · HCl	40	µg/L
KH ₂ PO ₄	0,1	g/L	ZnSO ₄	40	µg/L
MgSO ₄	0,05	g/L	Thiamin · HCl	40	g/L
NaCl	0,01	g/L	Ca-Pantothenat	40	µg/L
CaCl ₂	0,01	g/L	FeCl ₃	20	µg/L
L-Histidin · HCl	1	mg/L	Na-Molybdat	20	µg/L
LD Methionin	2	mg/L	Riboflavin	20	µg/L
LD Tryptophan	2	mg/L	p-Amino-benzoesäure	20	µg/L
Inositol	0,2	mg/L	KI	10	µg/L
Borsäure	50	µg/L	CuSO ₄	4	µg/L
Niacin	40	µg/L	Folsäure	0,2	µg/L
MnSO ₄	40	µg/L	Biotin	0,2	µg/L
pH	5,4 ± 0,1				

Tabelle 8.2: Zusammensetzung M9-Salze 1 x [g/L]

NaHPO ₄	6,78
KH ₂ PO ₄	3
NaCl	0,5
NH ₄ Cl	1
pH	6,8 ± 0,2

8.4. Biologische Materialien

8.4.1 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Verwendung	Referenz, Quelle
<i>Gluconobacter oxydans</i> NCIMB 8084	Produktion von 2,5-Diketo-gluconat	IBT1, Forschungszentrum Jülich [Elfari <i>et al.</i> 2005, Silberbach <i>et al.</i> 2003]
<i>E. coli</i> DH5α	Plasmid-amplifikation	Invitrogen, Karlsruhe [Hanahan 1983]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Proteinexpression	Invitrogen, Karlsruhe [Studier <i>et al.</i> 1986]

8.4.2 Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz, Quelle
pQE82L_dkgr	Ampicillin-Resistenz, 2,5-Diketogluconatreduktase (Hexahistidin-tagged)	U. Schleyer, IBT1, Forschungszentrum Jülich
pDrive_placZ_dkgr	Ampicillin- und Kanamycin- Resistenzen, 2,5-Diketogluconatreduktase	U. Schleyer, IBT1, Forschungszentrum Jülich
pEKEx2_fdh	Kanamycin-Resistenz, Formiatdehydrogenase	C. Bäumchen, IBT 1, Forschungszentrum Jülich [Bäumchen <i>et al.</i> 2007]
pDrive_placZ_dkgr_fdh	Kanamycin-Resistenz, 2,5-Diketogluconatreduktase, Formiatdehydrogenase	diese Arbeit

8.5. Analytische Methoden

8.5.1 HPLC-Analytik

Um Produkt und Zwischenprodukte der Umsetzung von Glucose zu 2-KLG zu quantifizieren, wurde ein HPLC-System der Firma Jasco eingesetzt.

8.5.1.1 Oxidationsreaktion von Glucose zu 2,5-DKG

Produkt und Zwischenprodukte der Oxidationsreaktion wurden auf einer Ionenausschluss-HPLC-Säule in protonierter Form unter sauren Bedingungen getrennt (Abbildung 8.1). Die genaue Methode beschreibt. Es handelt sich um eine von Lazarus beschriebene Methode in abgewandelter Form [Lazarus *et al.* 1986].

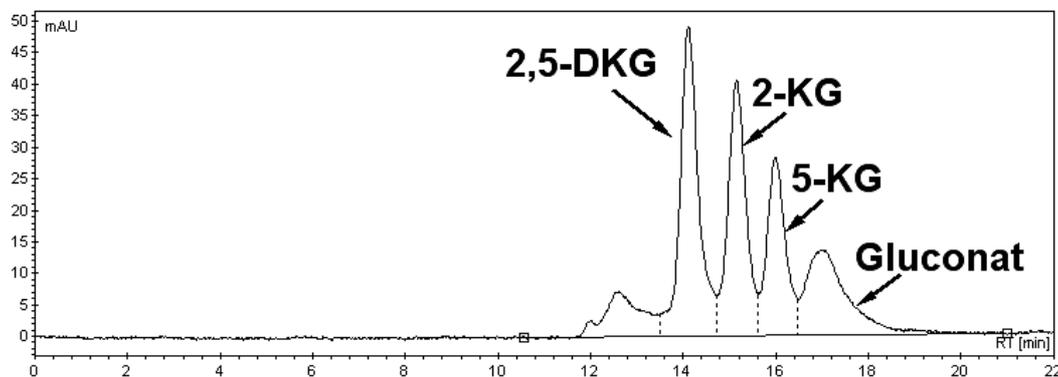


Abbildung 8.1: HPLC-Chromatogramm von 2,5-DKG, 2-KG, 5-KG und Gluconat auf Rezex ROA Organic Acid H⁺

Tabelle 8.3: HPLC-Methode für die Reaktion Glucose → 2,5-Diketo-D-Gluconat

HPLC-Säulen	Rezex ROA Organic Acid H ⁺ 8 μ (Phenomenex) 1. 50 x 7,8 mm 2. 300 x 7,8 mm => Ionenausschluss säule, Material: sulfoniertes Styren-Divinylbenzol-Harz, ionische H ⁺ -Form
HPLC-Vorsäulen	Security Guard Kartuschen Carbo-H: 4 x 3,0 (mm) (Phenomenex)
Säulentemperatur	55°C
Eluent	5 mN H ₂ SO ₄
Flussrate	Isokratisch, 0,4 mL/min
Wellenlänge	210 nm
Injektionsvolumen	10 μ L

Obwohl nicht vollständig basisliniengetrennt, können die einzelnen Keto-Gluconsäuren hinreichend gut quantifiziert werden. Lediglich die ermittelten Gluconatkonzentrationen am Ende einer Biotransformation im Satzreaktor sind mit relativ hohen Fehlern behaftet, da hier regelmäßig Störpeaks auftreten (nicht gezeigt). Die Retentionszeiten der einzelnen Verbindungen zeigt Tabelle 8.4.

Tabelle 8.4: Retentionszeiten der relevanten Substanzen auf Rezex ROA Organic Acid H⁺ [min]

2,5-DKG	14,1
2-KG	15,2
5-KG	16,0
Gluconat	17,0

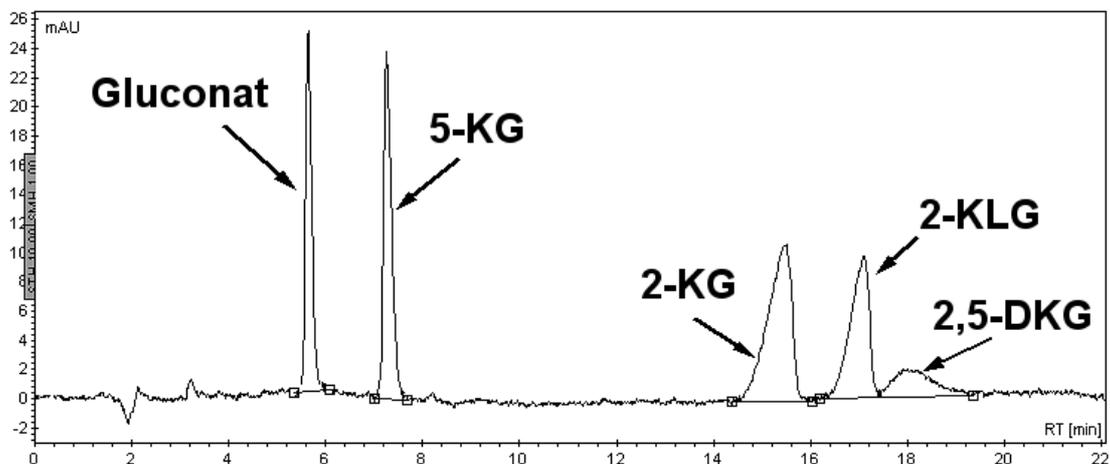
Da Glucose im UV-Bereich nicht aktiv ist, konnte es mit dieser Methode nicht quantifiziert werden. Seine Konzentrationsbestimmung beschreibt Kapitel 8.5.2.

8.5.1.2 Reduktionsreaktion von 2,5-DKG zur 2-Keto-L-Gulonsäure

Hierfür wurde eine HPLC-Kieselgel-Säule mit Aminofunktion unter sauren Bedingungen verwendet. Die genaue Methode beschreibt Tabelle 8.5. Mit dieser Methode wurden alle Keto-Gluconsäuren vollständig basisliniengetrennt. Die Luna-NH₂-Säule besitzt unter den angewendeten Trennbedingungen jedoch nur eine sehr geringe Lebensdauer. Deshalb kam sie nicht zur Untersuchung der Reaktion Glucose → 2,5-DKG zum Einsatz.

Tabelle 8.5: HPLC-Methode für die Reaktion 2,5-Diketo-D-Gluconat → 2-KLG

HPLC-Säule	Luna NH ₂ 5μ, 250 x 4,6 mm (Phenomenex) => Material: Kieselgel mit Aminofunktion
HPLC-Vorsäulen	Security Guard Kartuschen NH ₂ 4 x 3,0 (mm) (Phenomenex)
Säulentemperatur	55°C
Eluent	21 mM H ₃ PO ₄
Flussrate	Isokratisch, 1 mL/min
Wellenlänge	210 nm
Injektionsvolumen	10 μL


Abbildung 8.2: HPLC-Chromatogramm von Gluconat, 5-KG, 2-KG, 2-KLG und 2,5-DKG auf Luna NH₂
Tabelle 8.6: Retentionszeiten der relevanten Substanzen auf Luna NH₂ [min]

Gluconat	5,6
5-KG	7,3
2-KG	15,5
2-KLG	17,1
2,5-DKG	18,0

8.5.1.3 Kalibrierung der HPLC-Säulen auf 2,5-Diketo-D-Gluconat

2,5-DKG ist nicht käuflich erwerblich; eine reine Standardsubstanz lag daher nicht vor. Die HPLC-Säulen wurden folgendermaßen auf 2,5-DKG kalibriert:

- 2,5-DKG-Lösungen unbekannter Konzentration wurden mit Isopropanol und NADP^+ versetzt und mit der HPLC-Methode aus Kapitel 8.5.1.2 vermessen.
- Zu den Lösungen wurde selbst isolierte 2,5-Diketo-D-Gluconatreduktase und Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* gegeben; die Reaktionsgemische wurden bei 20°C für einige Stunden inkubiert.
- Mit Hilfe der HPLC-Analytik wurde der Zeitpunkt ermittelt, zu dem kein 2,5-DKG mehr in der Reaktionslösung vorlag. Die Konzentration von 2-KLG zu Ende der Reaktion wurde bestimmt.
- Unter Annahme eines 100%igen Umsatzes wurde auf die 2,5-DKG-Konzentration zu Beginn der Reaktion zurückgerechnet.
- Da die genauen Konzentrationen der ursprünglichen 2,5-DKG-Lösungen jetzt bekannt waren, wurde mit ihnen eine Kalibrierung durchgeführt.

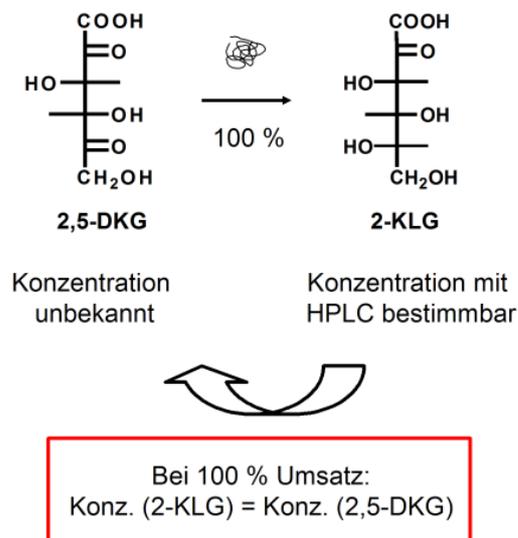


Abbildung 8.3: Kalibriermethode für 2,5-DKG

Eine solche Kalibriermethode für 2,5-DKG wurde in ähnlicher Art bereits von Banta und Mitarbeitern durchgeführt [Banta *et al.* 2002].

8.5.2 NMR

Alle NMR-Spektren wurden bei 600 MHz in einem Kernresonanzspektrometer (Bruker Meßtechnik) mit D_2O als Lösemittel aufgenommen.

8.5.3 Massenspektrometrie

Alle Massenspektren wurden mit einem Triple-Quadrupol-LC-MS/MS-Massenspektrometer (Applied Biosystems) in Wasser als Lösungsmittel mit folgender Methode aufgenommen:

Tabelle 8.7: Methode zur Aufnahme von Massenspektren

Kapillare	0,13'' PEEK (Chromatographie Service, Langerwehe)
Injektionsgeschwindigkeit	10 μL / min
Art des Scans	Negativer Q1-Scan
Ionenquelle	Turbo Spray (ESI)

8.5.4 Bestimmung von Glucosekonzentrationen

Während einer Fermentation wurde die Glucosekonzentration im Medium mit dem Blutzuckermessgerät Accucheck Aviva (Roche) und den entsprechenden Teststreifen ermittelt. Diese Methode ist sehr ungenau und diente nur zur ungefähren Abschätzung des Glucosegehaltes. Der Messbereich lag bei 0,1 bis 6 g/L Glucose.

Während einer Biotransformation mit *Gluconobacter oxydans* wurde die Glucosekonzentration mit dem Gerät EBIO compact (Eppendorf) bestimmt. Der Meßbereich reichte von 0,09 bis 9 g/L.

Vor der Messung wurden die Proben jeweils entsprechend mit Puffer verdünnt.

8.5.5 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford [Bradford 1976]. Der Assay wurde entweder im kleinen Maßstab in Mikrotiterplatten (200 μL Bradford-Reagenz + 5 μL Proteinlösung) oder in 1-mL-Plastikküvetten (980 μL Bradford-Reagenz + 20 μL Proteinlösung) durchgeführt. Bradford-Reagenz und Proteinlösung wurden jeweils gut vermischt und bei 30°C für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Adsorption der Lösungen bei 595 nm in einem Multiplattenleser (Power Wave, Bio-Tek Instruments) oder Photometer (UV-1601, Shimadzu) bestimmt.

8.5.6 Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA

Die Konzentrationen von DNA-Lösungen wurden in einem Photometer der Marke Nanodrop (Nanodrop Technology) aus einem Lösungsvolumen von 1 μL bestimmt.

8.5.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine aufgrund ihrer Molekülgröße aufgetrennt.

Standardgemäß wurden 1,0 mm dicke, vorgegossene Bis-Tris-Gele mit einem Konzentrationsgefälle von 4 bis 12 % (NuPAGE, Invitrogen) verwendet. Proteinproben geeigneter Konzentrationen wurden mit 4 x Probenpuffer (Invitrogen) versetzt. Anschließend wurden die Proteine bei 70°C für 10 Minuten denaturiert und mit dem 0,1fachen Volumen Reducing Agent (Invitrogen) versetzt. Jeweils 10 µL der Proben wurden zügig in die Probenfächer der Gele gegeben. Als Standard dienten jeweils 10 µL eines vorgefärbten Proteinstandards (prestained SeeBlue Plus2, Invitrogen). Die Kammern der Gelelektrophorese-Apparatur wurden mit ausreichend Laufpuffer befüllt (Invitrogen). Die Elektrophorese fand 45 Minuten bei 200 V statt.

Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel in eine Gelfärbeschüssel überführt und gründlich mit Wasser gewaschen. Die Anfärbung der Proteine erfolgte unter leichter Rotation auf einem Schüttler (IKA-Labortechnik) mit Hilfe des Silberfärbekits SilverQuest (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers.

8.6. Allgemeine mikrobiologische Arbeiten

Die Konzentrationen von Antibiotika lagen stets bei 50 µg/mL. Anstelle von Ampicillin wurde, falls nötig, das stabilere Antibiotikum Carbenicillin mit demselben Wirkmechanismus verwendet.

8.6.1 Bestimmung der optischen Dichte; Aufnahme von Wachstumskurven

Die optische Dichte von Zellsuspensionen wurde bei 600 nm mit Hilfe eines Photometers (Ultrospec 3100 pro, Amersham Biosciences) in 1-mL-Plastikküvetten gegen Wasser als Leerwert bestimmt. Bei Fermentationen von *G. oxydans* wurde in einigen Fällen aufgrund der allmählichen Dunkelfärbung des Mediums der Hintergrund durch erneutes Messen der Probe nach Abzentrifugieren der Zellen bestimmt. Dieser Hintergrundwert wurde anschließend vom ersten Wert abgezogen.

8.6.2 Herstellung von Glycerin-Kryokulturen

Glycerin-Kryokulturen wurden aus Übernachtskulturen (*E. coli*: mit LB-Medium, Tabelle 8.8; *G. oxydans*: mit Medium No. 5, Tabelle 8.9) durch Zugabe von sterilem

Glycerin, Durchmischung und Lagerung in 1 mL-Aliquots bei -80°C hergestellt (Glycerinanteil der Kryokulturen: *E. coli* 50 % (v/v), *G. oxydans*: 25 % (v/v)).

Tabelle 8.8: Zusammensetzung LB-Medium

LB-Medium	
Casein Pepton	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	10 g/L

Tabelle 8.9: Zusammensetzung Medium No. 5

Medium No. 5	
Glycerin	0,5 g/L
Hefeextrakt	15 g/L
MgSO ₄	2,5 g/L
Mannitol oder Glucose	50 g/L
Bei Verwendung von Glucose: zusätzlich 100 mM Puffer	

8.6.3 Langzeit- und Kurzzeitlagerung von *G. oxydans*-Zellen

Eine Langzeitlagerung von *Gluconobacter oxydans* erfolgte in Glycerin-Kryokulturen nach Abschnitt 8.6.2. Fermentationsmedien wurden nicht direkt aus den Glycerin-Kryokulturen angeimpft. Stattdessen wurde zunächst eine Vorkultur in Medium No. 5 (Tabelle 8.9) angelegt. Die Zellen wurden auf Agarplatten mit YT-Medium (Tabelle 8.10) ausgestrichen und für 2 Tage bei 30°C im Brutschrank (Memmert) inkubiert. Auf diesen Agarplatten erfolgte bei 4°C die Kurzzeitlagerung von *G. oxydans*. Im Turnus von 4 Wochen wurden Zellen auf neue Agarplatten überstrichen und erneut inkubiert. Alle Vorkulturen wurden direkt von diesen Agarplatten aus angeimpft.

Tabelle 8.10: Medium für Agarplatten

YT-Medium	
Trypton	3 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
Mannitol	50 g/L
Agar-Agar	15 g/L

8.6.4 Fermentationen zur Biomassegewinnung

8.6.4.1 *Gluconobacter oxydans*

Bei Fermentationen mit *G. oxydans* wurde stets das Antibiotikum Cefoxitin eingesetzt, da alle *Gluconobacter oxydans*-Zellen natürlicherweise dagegen resistent sind.

Fermentation im Schüttelkolben

Bei Fermentationen von *Gluconobacter oxydans* wurden stets schikanefreie Schüttelkolben verwendet. Das maximale Füllvolumen mit Medium lag bei 1/10 des

Kolbenvolumens. Inkubation erfolgte immer bei 30°C und 220 UpM. Eine 250 mL-Vorkultur (bezogen auf das Kolbenvolumen) wurde direkt von der Agarplatte angeimpft und über mindestens 6-8 h inkubiert. Anschließend wurden hiermit bei Bedarf Kulturen größerer Volumina angeimpft. Das Verhältnis Medium aus Vorkultur zu frischem Medium lag bei 1 zu 10 (10 mL Vorkultur + 90 mL Hauptkultur-Medium).

Fermentation in Parallelf fermentern

Die sechs Fermenter der Sixfors-Fermentationsanlage (Infors) wurden mit je 500 mL Hefeextraktlösung und Magnesiumsulfat befüllt und autoklaviert. Mit einer Schlauchpumpe wurden anschließend sterile Glucose-/Glycerinlösung, sterile Na-Succinatlösung und je 150 mL Inokulum aus Schüttelkolbenkulturen zugegeben. Cefoxitin wurde in wässriger Lösung durch einen Sterilfilter zudosiert. Das Gesamtvolumen jedes Ansatzes betrug 1,5 L. Das resultierende Medium der Parallelf ermentation zeigt Tabelle 8.11.

Tabelle 8.11: Medium zur Fermentation in Parallelf ermentern

Glucose	10 g/L
Glycerin	5 g/L
Hefeextrakt	10 g/L
Magnesiumsulfat	0,25 g/L
Natriumsuccinat · 6 H ₂ O	27 g/L

Bis zu einer Versuchsdauer von etwa sechs Stunden wurden die Fermenter ohne externe Zugabe von Glucose betrieben. Danach wurde über die Kolbenhubpumpe der Sixfors-Kontrolleinheit sterile Glucoselösung einer Stammkonzentration von 600g_{Glucose}/L zudosiert. Der Sauerstoffpartialdruck wurde mittels Elektrode permanent kontrolliert und durch Einblasen von steriler Luft und Anpassen der Rührerdrehzahl auf einen resultierenden pO₂ von 30% reguliert. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 25%igem Ammoniak zwischen 5,8 und 6 gehalten.

Nach der Fermentation wurden die Zellen bei 8000 UpM (Avanti J-20XP, Rotor JLA-8.1000, Beckman Coulter) zentrifugiert und anschließend zweimal mit 0,9%iger Kochsalzlösung gewaschen. Nach Aliquotierung wurden die Zellen bei -20°C gelagert.

Kultivierung im 30L-Fermenter

Für die Fermentation im 20 L-Maßstab wurde das Medium aus Tabelle 8.11 verwendet.

Sämtliche Medienbestandteile, mit Ausnahme von Glucose und Cefoxitin, in bidest H₂O wurden direkt im 30 L-Fermenter (Chemap) sterilisiert. Anschließend wurde sterile Glucoselösung und 1,8 L Inokulum aus Schüttelkolbenkulturen hinzugefügt. Cefoxitin wurde in wässriger Lösung durch einen Sterilfilter hinzugegeben.

Der Sauerstoffpartialdruck wurde mittels Elektrode permanent überwacht und durch Begasung mit steriler Luft, Anpassen der Rührerdrehzahl und Erhöhung des Fermenterinnendrucks auf bis zu 1,2 bar konstant bei 30% gehalten. Der pH-Wert der Kultur wurde durch die Zugabe von 25%igem Ammoniak zwischen 5,8 und 6 gehalten. Die Temperatur lag konstant bei 30°C.

Ab einer Kultivierungsdauer von etwa vier Stunden wurde sterile Glucoselösung der Stammkonzentration 500g_{Glucose}/L mittels Schlauchpumpe zudosiert. Die Zulauftrate wurde derart angepasst, dass die Glucosekonzentration im Medium 10 mmol/L nicht überstieg. Im Anschluß an die Fermentation wurden die Zellen bei 8000 UpM (Avanti J-20XP, Rotor JLA-8.1000, Beckman Coulter) zentrifugiert und anschließend zweimal mit 0,9%iger Kochsalzlösung gewaschen. Nach Aliquotierung wurden die Zellen bei -20°C gelagert.

8.6.4.2 *Fermentation von E. coli BL21 DE3 pQE 82L_dkgr*

Die Vorgehensweise bei der Fermentation des rekombinanten *E. coli*-Stammes BL21 DE3 pQE 82L_dkgr ist ausführlich in Kap. 8.8 (Isolierung des Enzyms 2,5-Diketogluconatreduktase) beschrieben.

8.6.4.3 *Fermentation von E. coli BL21 DE3 pDrive_dkgr_fdh und DH5α pDrive_dkgr_fdh*

Der *E. coli*-Stamm BL21 DE3 wurde vor der Fermentation mit dem Plasmid pDrive_dkgr_fdh transformiert; die Kultivierung des Stammes DH5α pDrive_dkgr_fdh erfolgte direkt aus der entsprechenden Glycerinkultur.

Von den beiden rekombinanten *E. coli*-Stämmen wurde jeweils eine 50 mL-Vorkultur in 250 mL-Schüttelkolben in LB-Medium (Tabelle 8.8, zusätzlich 0,25 g/L Glucose) bei 33 °C und 180 rpm über Nacht angefertigt. Aus diesen Übernachtskulturen wurden je zwei 200 mL LB-Kulturen in 1-L-Kolben angeimpft. Diese wurden bei 180 rpm und 37°C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von ≈ 0,7 erreicht war. Die Kulturen wurden mit 0,1 mM IPTG induziert und für weitere 15 Stunden bei 25°C und 180 UpM inkubiert.

Anschließend erfolgte die Zellernte mittels Zentrifugation. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung in 0,9%iger NaCl-Lösung bei 4°C gelagert.

8.6.5 Permeabilisierung von *E. coli*-Zellen

Zu permeabilisierende *E. coli*-Zellen wurden in wässriger 1%iger CTAB-Lösung resuspendiert. Mit Hilfe eines Thermomixers (Eppendorf) wurden die Zelllösungen bei Raumtemperatur für eine Stunde bei 600 UpM gut durchmischt. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert und erneut in Puffer aufgenommen.

8.6.6 Herstellung Calcium-kompetenter *E. coli*-Zellen

E. coli-Zellen wurden durch Behandlung mit einer Calciumchlorid-Lösung chemisch kompetent gemacht. Dazu wurden 100 mL LB-Medium (Tabelle 8.8) mit *E. coli*-Zellen aus einer Übernachtskultur angeimpft und bis zum Erreichen einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,6$ bei 37°C und 180 UpM inkubiert. Die Zellen wurden bei 4°C für 20 Minuten bei 4200 UpM in 50 mL-Falcon Tubes zentrifugiert (Multifuge 3 S-R, Heraeus). Die Bakterienpellets wurden in 25 mL eiskalter Magnesiumchloridlösung (0,1 M) resuspendiert, für 5 Minuten auf Eis gelagert und erneut zentrifugiert. Nach Resuspension in 5 mL eiskalter Calciumchloridlösung (0,1 M) wurden die Zellen 20 Minuten auf Eis gelagert und zentrifugiert. Das Pellet wurde zuletzt in 1 mL 0,1 M Calciumchloridlösung mit 14 %igem Glycerinanteil aufgenommen, in 100 µL-Aliquots in vorgekühlte Eppis verteilt und für eine spätere Transformation bei -80°C gelagert.

8.6.7 Transformation von Mikroorganismen

Durch eine Transformation werden Plasmide in *E. coli*-Zellen übertragen.

Zu 100 µl kompetenten *E. coli*-Zellen wurden zwischen 2 und 5 µL Plasmid-DNA pipettiert und 50 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden wurde der Ansatz 5 Minuten auf Eis inkubiert, mit 400 µL sterilem SOC-Medium (Tabelle 8.12) versetzt und eine Stunde bei 37°C und 350 UpM (Thermomixer, Eppendorf) geschüttelt. Der Ansatz wurde auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgebracht und über Nacht bei 37°C im Brutschrank gelagert.

Tabelle 8.12: Zusammensetzung SOC-Medium

SOC-Medium	
Trypton	20 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	10 g/L
KCl	0,2 g/L
+ 1 % einer 1 M MgCl ₂ /MgSO ₄ -Stammlösung	
+ 2 % einer 18 %igen (w/v) Glucose-Lösung	

8.7. Gentechnische Arbeiten

8.7.1 Isolierung von DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus rekombinanten *E. coli*-Zellen erfolgte mit den Lösungen und Anionentauschersäulen des QIAprep Spin Miniprep-Kits (Qiagen) aus 5 mL-LB-Übernachtskulturen nach Angaben des Herstellers.

Zur Isolierung von DNA-Molekülfragmenten nach einer Spaltung mit einem Restriktionsenzym wurden diese zunächst durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die entsprechenden Banden wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell eng ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus dem Gel erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

8.7.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Mit Hilfe des Programms Clone Manager (Sci-Ed Central) wurden die für die jeweiligen Schnittstellen benötigten Restriktionsendonukleasen ermittelt. Die Spaltung erfolgte bei 37 °C und 300 UpM über vier Stunden im einfach konzentrierten Puffer des Herstellers (Puffer A, Roche). Die 20 µL Ansätze waren so gewählt, dass jeweils 5 U Restriktionsenzym und 1 µg Plasmid-DNA vorlagen.

8.7.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die kovalente Verknüpfung geeigneter DNA-Moleküle wurde die Ligase des Phagen T4 (Roche) eingesetzt. Vom Hersteller mitgelieferter Ligasepuffer, Insert-DNA, Vektor-DNA und das 0,1fache Volumen T4-Ligase wurden in einem 10 µL-Reaktionsansatz gemischt. Dabei wurden jeweils zwei verschiedene Ligationsansätze mit verschiedenen molaren Vektor:Insert-Verhältnissen gewählt (Vektor:Insert 25:4 und 5:2). Die Ligation erfolgte über 16 Stunden bei 16 °C.

8.7.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden erfolgte über die Kettenabbruchmethode nach Sanger [Sanger *et al.* 1977]. Es wurde mit dem BigDye Terminator Kit 3.1 (Applied Biosystems) gearbeitet, welcher DNA-Polymerasepuffer, Desoxynukleotide, basenspezifisch mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Didesoxynukleotide sowie eine thermostabile DNA-Polymerase enthält. Der Primer (Operon Biotechnologies) besaß die Sequenz 5'CCGGGCTTATCGACTGCAC3'.

Der Reaktionsansatz wurde in einem 0,2 ml-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert:

Templat-DNA (Konzentration 50 ng/μl)	2 μl
Primer SEQ 002 (Operon, Konzentration 3 pmol/μl)	3 μl
5 x Sequencing Buffer	2 μl
BigDye Terminator ReactionMix	3 μl

Die Kettenabbruchreaktion wurde in einem Thermocycler mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

96°C <i>Vordenaturierung</i>	1 min	

96°C <i>Denaturierung</i>	10 sec	} 25 Zyklen
60°C <i>Annealing/Elongation</i>	4 min	

4 °C <i>Kühlung</i>	∞	

Nach dem Durchlauf von 25 Zyklen wurden zum Reaktionsansatz 10 μL H₂O Bidest gegeben; der verdünnte Reaktionsansatz wurde mit Hilfe des DyeEx-Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gereinigt, mit 18 μL Formamid versetzt und 2 Minuten auf 96°C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 15 μL in die Mikrotiterplatte des Sequencers pipettiert; die Auswertung der Signale der markierten DNA-Fragmente erfolgte über die Sequencing Analysis Software (Applied Bioscience).

8.7.5 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der Überprüfung von isolierten Nukleinsäuren und der Auftrennung von Plasmidfragmentgemischen nach enzymatischer Restriktion. Sie wurde mit einer Agarosekonzentration von 1 % (w/v) in 16,5 x 8 cm großen Gelkammern (Bio-Rad) im 1 x TAE-Puffersystem (Tabelle 8.13) durchgeführt.

Die Proben wurden mit Probenpuffer (Tabelle 8.14) versetzt und in die Probenaschen des Gels gegeben. Als DNA-Längenstandard diente DNA des Phagen λ , die mit den Restriktionsendonukleasen *Eco1301* und *HindIII* gespalten worden ist (Fermentas). Die Auftrennung erfolgte über 75 Minuten bei 60 V und weiteren 15 Minuten bei 75 V. Die aufgetrennte DNA wurde durch Interkalation von Ethidiumbromid und anschließender Fluoreszenzanregung mit Licht bei 302 nm sichtbar gemacht und fotografiert (Image Master VDS-System, Amersham Pharmacia Biotech).

**Tabelle 8.13: 50 x TAE-Puffer
(Tris-Acetate-EDTA)**

Tris	2 mol/L
Na ₂ EDTA	50 mmol/L
Essigsäure	5,71 %
pH	8,0

**Tabelle 8.14: 10 x DNA-Probenpuffer
(Alle Prozentangaben v/v)**

Glycerin	50 %
Bromphenolblau	0,25 %
Xylencyanol	0,25 %
Orange G	0,4 %
Tris	20 mM

8.8. Isolierung des Enzyms 2,5-Diketogluconatreduktase

8.8.1 Anzucht des rekombinanten *E. coli*-Stammes BL21 DE3 Star pQE82L_dkgr

Ein positiver Klon aus der Transformation von BL21 DE3 mit dem Plasmid pQE82L_dkgr wurde in 250 mL LB-Medium bei 37°C und 180 UpM für sieben Stunden inkubiert; anschließend wurden je 200 μ L dieser Vorkultur in sieben 1-L-Kolben mit je 200 mL modifiziertem LB-Medium (Tabelle 8.15) übergeimpft und über Nacht bei 30 °C und 180 UpM inkubiert. Am nächsten Morgen wurde ein 30-L-Chemap-Fermenter, der 20 L modifiziertes LB-Medium enthielt (mit 20 g/L Glucose), mit 1,4 L Inokulum angeimpft. Die Zellen wurden bei 37°C, pH 7, pO₂ > 25 % bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀>16 angezogen und anschließend mit 100 μ M IPTG induziert. Die Produktion des Enzyms fand in den weiteren Stunden bei 25°C und unter einer kontinuierlichen Glucosezugabe von 70-90 g/h statt.

Am nächsten Morgen wurden die Zellen zentrifugiert, einmal mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen und als Pellets in Aliquots zwischen 10 und 20 g bei -20°C gelagert.

Tabelle 8.15: Modifiziertes LB-Medium zur Kultivierung von BL21DE3 pQE82L_dkgr

Trypton	5 g/L
Hefeextrakt	2,5 g/L
NaCl	2,5 g/L
MgSO ₄	0,25 g/L
NaH ₂ PO ₄	1,26 g/L
Glucose	3 g/L
pH 7,2 mit NaOH	

8.8.2 Enzymisolierung über Affinitätschromatographie

8.8.2.1 Zellaufschluss

Die benötigte Menge an Zellen aus den Fermentationen wurde bei 4°C aufgetaut und als 30 %ige Suspension in Lysispuffer (Tabelle 8.16) resuspendiert.

Tabelle 8.16: Zusammensetzung der verschiedenen Puffer zur Isolierung der 2,5-DKGR

	Lysispuffer	Waschpuffer	Elutionspuffer	} pH 7
K₂HPO₄ [mM]	19,34	19,34	19,34	
KH₂PO₄ [mM]	30,66	30,66	30,66	
NaCl [mM]	300	300	300	
Imidazol [mM]	10	20-50	250	

Der Aufschluß erfolgte bei 4°C über Ultraschall.

- Erfolgte die Aufreinigung im kleinen Maßstab über eine Säule, wurden 200 mL Zellsuspension zunächst mit einer Spatelspitze Lysozym bei 4°C gerührt und dann in einem Eisbad-gekühlten Sonifier-Gefäß über dreimal fünf Minuten ultrabeschallt, mit je fünf Minuten Pause zwischen den Beschallungsphasen.
- Bei einer Aufreinigung im großen Maßstab über das Satzverfahren erfolgte der Zellaufschluss in einer 30 mL-Durchlaufzelle, durch die die Zellsuspension mit einem Volumenstrom von 2 mL/min gepumpt wurde. Die Beschallung erfolgte zyklisch mit jeweils 8 Sekunden Beschallung und 4 Sekunden Pause. Vorlagegefäß, Durchlaufzelle und Auffanggefäß wurden ständig über einen Doppelmantel auf 2 °C gekühlt.

Die Zellsuspension wurde bei 4 °C für 30 Minuten bei 13.000 rpm (Avanti J25, Rotor JA-14, Beckman-Coulter) zentrifugiert, das Pellet verworfen und der klare Überstand für die weitere Aufreinigung verwendet.

8.8.2.2 *Aufreinigung über eine Chromatographiesäule:*

Die eingesetzte Chromatographiesäule enthielt etwa 50 mL mit Nickelionen beladenes Sepharose-Harz (Chelating Sepharose Fast-Flow, GE Healthcare). Durch diese wurden mittels einer Schlauchpumpe (101U, Watson-Marlow) die benötigten Puffer gepumpt. Die Proteinkonzentration der Lösung, die jeweils aus der Säule austrat, wurde mit einem Photometer mit Durchflußküvette (Knauer) bei 280 nm erfasst und mit einem Schreiber (Kipp & Zonen) dokumentiert.

Zu Beginn der Aufreinigung wurde die Säule mit fünf Säulenvolumina Lysispuffer (Tabelle 8.16) äquilibriert. Der geklärte Zellüberstand wurde mit einer Pumpgeschwindigkeit von 1 mL/min langsam aufgetragen, so dass das Hexahistidin-markierte Enzym an das Harz binden konnte. Ungebundene Proteine wurden durch Spülen der Säule mit sechs Säulenvolumina Waschpuffer (Tabelle 8.16) entfernt – dieser enthält 20-50 mM Imidazol, um möglichst viele unspezifisch gebundene Verunreinigungen zu verdrängen.

Das gebundene Enzym wurde anschließend mit drei Säulenvolumina Elutionspuffer (250 mM, Tabelle 8.16) vom Harz eluiert. Die aufgefangene Proteinlösung wurde in einer Gelfiltrationssäule (Sephadex G-25, GE Healthcare) entsalzt. Dabei fand ein Puffertausch auf 50 mM KPi -Puffer (pH 6,4) statt (Aufgabe- und Pumpgeschwindigkeit: 10 mL/min). Die Proteinlösung wurde anschließend gefriergetrocknet.

8.8.2.3 *Aufreinigung im Satzverfahren*

Im Satzverfahren konnten sehr viel größere Mengen Enzym in kurzer Zeit aufgereinigt werden, weshalb der Großteil des in dieser Arbeit verwendeten Enzyms über diese Methode isoliert wurde.

Kernstück des Verfahrens war eine 1,4-L-Plexiglasschale, gefüllt mit Nickelionen beladener IDA-Sepharose (Profinity IMAC Resin, Bio-Rad). Die Schale hatte als Boden ein Nylonnetz mit einer Porengröße von 40 μm . Das Netz hielt das Säulenmaterial zurück (Partikelgröße 45 bis 90 μm) und erlaubte einen unkomplizierten Pufferwechsel durch Hochheben der Schale. Die Schale befand sich als Einsatz in einer Kristallisierschale mit einem Volumen von zwei Litern. Für eine ständige

Durchmischung der Sepharose mit dem jeweiligen Puffer in der Schale sorgte ein Taumelschüttler (Heidolph Instruments) mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 50 Upm.



Abbildung 8.4: Plexiglasschale mit Ni-IDA-Sepharose zur Aufreinigung der 2,5-Diketogluconatreduktase im Satzverfahren

Das Ni-IDA-Harz wurde mit dreimal 300 mL Lysispuffer (Tabelle 8.16) für je 20 Minuten äquilibriert. Anbindung des Enzyms erfolgte durch Durchmischung des Harzes mit dem geklärten Zellüberstand (500 ml) über eine halbe Stunde. Die Lösung, die ungebundenes Protein enthielt, wurde entfernt und das Harz in fünf Waschschrinen mit je 250 mL Waschpuffer (Tabelle 8.16) für je 10 Minuten gespült. Der Waschpuffer besaß dabei Imidazol-Konzentrationen von 10 bis 35 mM. Zur Freisetzung des Enzyms wurde das Harz 20 Minuten mit 250 mL Elutionspuffer (Tabelle 8.16) durchmisch. Nach Entfernen der Proteinlösung wurde noch dreimal mit je 250 mL Wasser gespült. Die Eluate aus Elutions- und Wasserspülschritten wurden vereint und in einer 2-L-Ultrafiltrationszelle (Eigenbau Forschungszentrum Jülich) mit einer 5-kDa-Membran (YM5, Millipore) aufkonzentriert. Vor der Lyophilisation erfolgte die Umpufferung auf 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,4.

8.8.3 Enzymaufreinigung über Ionenaustauschersäule

Einige Enzymfraktionen wurden vor ihrer Lyophilisation zusätzlich über ein FPLC-System (Äkta Purifier, GE Healthcare) mit Ionenaustauschersäule aufgereinigt. Benutzt

wurde eine starke Anionenaustauschersäule mit $N^+(CH_3)_3$ -Funktion (HiPrep 16/10 QFF, GE Healthcare) und einem Säulenvolumen von 20 mL. Die genaue Methode beschreibt Tabelle 8.17.

Tabelle 8.17: Methode zur Enzymaufreinigung über FPLC-Ionenaustauschchromatographie (CV = Säulenvolumina)

Säule	HiPrep 16/10 QFF (GE Healthcare)		
Puffer A	20mM Bis-Tris-HCl pH 6,5		
Puffer B	20mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 500 mM NaCl		
Gradient	(1) Äquilibration	0,7 CV	100 % A
	(2) Injektion	1 CV	
	(3) Waschschrift	0,5 CV	100 % A
	(4) Gradient 1	2,5 CV	0 % → 40 % B
	(5) Elution 1	3,7 CV	40 % B
	(6) Gradient 2	2,5 CV	40 % → 100 % B
	(7) Elution 2	2,3 CV	100 % B
Flussrate	1 mL/min (2, 3) 2,5 ml/min (1, 4-7)		
Injektionsvolumen	20 mL		
Temperatur	Raumtemperatur		

Anschließend wurden die enzymhaltigen FPLC-Fractionen vereint, in einer Ultrafiltrationszelle auf 20 mM KP_i -Puffer (pH 6,4) umgepuffert und lyophilisiert.

8.9. Aktivitäts- und Stabilitätsbestimmung von Biokatalysatoren

8.9.1 Bestimmung der Aktivität von *G. oxydans*-Zellen

Die Aktivitätsbestimmung von *Gluconobacter oxydans*-Zellen erfolgte in einer eigens dafür konstruierten Apparatur, in der eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Sauerstoff gewährleistet war. Den genauen Aufbau zeigt Abbildung 8.5: Ein 50-mL-Mantelkolben (4) wurde über ein Wasserbad (mgw Lauda) auf die gewünschte Temperatur gebracht, in einigen Fällen wurde der pH-Wert der Lösung über eine pH-Elektrode (Nordantec) gemessen und mit Hilfe eines Dosimaten (Metrohm) mit 1 M KOH-Lösung und 0,1 N Salzsäure auf dem eingestellten pH-Wert gehalten.

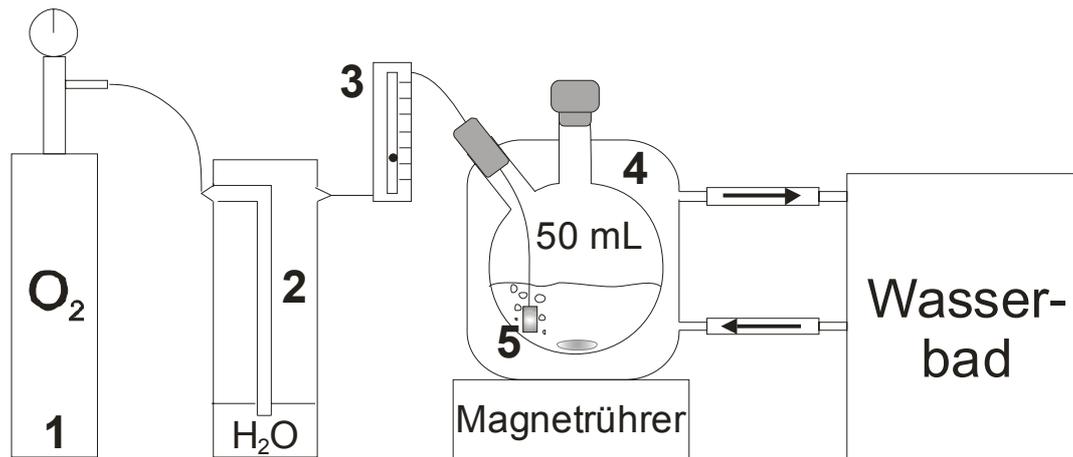


Abbildung 8.5: Vorrichtung zur Durchführung von Aktivitätstests mit *Gluconobacter oxydans*. 1: Sauerstoff-Druckflasche; 2: Waschflasche mit Fritte; 3: Schwebekörper-Durchflußmesser; 4: 50 mL-Mantelkolben mit zellhaltiger Lösung; 5: Chromatographie-Lösungsmittelfilter

Die Lösung wurde stark gerührt und konstant mit reinem Sauerstoff aus einer Druckflasche (1) begast. Das Gas wurde zunächst durch eine wasserhaltige Waschflasche mit Fritte (2) geleitet. Der Sauerstofffluss wurde mit Hilfe eines Schwebekörper-Durchflussmessers (Kobold) (3) gemessen und auf 10 L/h eingestellt. Um eine möglichst feine Blasenverteilung zu gewährleisten, wurde der Sauerstoff über einen Lösungsmittelfilter aus Edelstahl (CS Chromatographie-Service, Langerwehe) mit 2 µm Porengröße (5) in die Reaktorlösung geleitet.

Zu regelmäßigen Zeitpunkten wurden Proben entnommen; diese wurden zentrifugiert, und ihr Überstand wurde für eine Minute auf 99°C erhitzt und dann auf Eis gelagert. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Proben in der HPLC gemessen. Die Aktivität der Zellen wurde aus dem linearen Bereich einer Auftragung der 2,5-DKG-Konzentration gegen die Zeit ermittelt. 1 U wurde dabei als 1 µmol/min gebildetes 2,5-DKG definiert. Biomasseangaben wurden stets als Gewichtsprozent über das Biofeuchtgewicht g_{BFG}/L angegeben.

8.9.2 Bestimmung der Aktivität der 2,5-DKGR

Die Aktivität der 2,5-Diketo-D-Gluconatreduktase wurde über den Umsatz an NADPH und der Abnahme seiner Absorption bei 340 nm im Photometer bestimmt. In einer Quarzglasküvette (Hellma) wurden 2,5-DKG-Lösung, NADPH und Enzymlösung gut vermischt; die Absorption des Gemischs bei 340 nm wurde über 60 Sekunden mit einem Photometer (UV-1601, Shimadzu) aufgezeichnet. Der Durchmesser der

verwendeten Küvette war abhängig von der Konzentration an reduziertem Cofaktor (1 cm bis 0,2 mM; 0,1 cm bis 2 mM; 0,02 cm bis 10 mM). Aus der negativen Steigung der aufgenommenen Adsorptionskurve wurde die Enzymaktivität berechnet, nachdem ein Hintergrundrauschen aus unspezifischem NADPH-Zerfall abgezogen worden war.

8.10. Assays zur Stabilitätsbestimmung

8.10.1 Bestimmung der Stabilität von *Gluconobacter oxydans*-Zellen

G. oxydans-Zellen wurden im Schüttelkolben angezogen, auf ihre Aktivität überprüft und anschließend in Aliquots bei verschiedenen Temperaturen gelagert. Regelmäßig wurden Aliquots auf ihre verbliebene Aktivität hin überprüft. Die Aktivitäten zu verschiedenen Zeitpunkten wurden gegen die Zeit aufgetragen und aus ihrer Abnahme über die Zeit die Halbwertszeit berechnet.

8.10.2 Bestimmung der Enzymstabilität

Um die Stabilität des Enzyms bei verschiedenen Temperaturen und pH-Werten zu bestimmen, wurden Enzymlösungen auf den gewünschten pH-Wert eingestellt, auf ihre Anfangsaktivität überprüft und über Tage oder Wochen im Eppendorf-Tube in einem Thermostat (Eppendorf) bei der gewünschten Temperatur gelagert. In regelmäßigen Abständen wurde Enzymlösung entnommen und im Photometer auf ihre verbliebene Aktivität überprüft. Die Bestimmung der Halbwertszeit erfolgte analog wie bei den Stabilitätsmessungen der *Gluconobacter oxydans*-Zellen.

8.11. Untersuchungen zur Sauerstofflimitierung bei *Gluconobacter oxydans*

Der Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks während einer Biotransformation mit *G. oxydans* wurde mit dem Sauerstoffamplifier Ingold 170% air und einer Sauerstoffelektrode (beides Mettler Toledo) beobachtet. Die Nullpunktkalibrierung erfolgte in Puffer durch Begasung mit Stickstoff. Eine weitere Kalibrierung war bei diesem Gerät nicht möglich. Die Versuche wurden in der in Kapitel 8.9.1 beschriebenen Apparatur durchgeführt. Der Sauerstoffpartialdruck wurde erstmalig direkt nach Zugabe der Zellen aufgenommen und während des Versuchsverlaufs kontinuierlich überwacht. Biomassekonzentrationen lagen bei 0,5 bis 10 %.

Das Gerät ist eigentlich nicht für eine Verwendung bei Begasung mit reinem Sauerstoff geeignet, sondern für eine Messung von Luftsauerstoff vorkalibriert. Die gemessenen Sauerstoffpartialdrücke lagen daher außerhalb des Messbereichs. Dies muss bei der Deutung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

8.12. Messungen und Berechnungen zur Kinetik

8.12.1 Untersuchungen zur Enzymkinetik

Um die Enzymkinetiken von 2,5-DKGR und *Lb*-ADH zu untersuchen, wurde die Enzymaktivität in Quarzglasküvetten (Hellma) im Photometer (Shimadzu) über die Ab- bzw. Zunahme von NADPH oder NADH bei 340 nm bestimmt. Dabei wurden die Konzentrationen von Substraten, Produkten, Cofaktoren oder anderen Substanzen variiert und die resultierende Enzymaktivität gegen die Konzentration der jeweiligen Substanz aufgetragen. Mit der Software Scientist (MicroMath) wurden Kinetikmodelle an die Messdaten angepasst.

8.12.2 Untersuchungen zur Kinetik von *G. oxydans*

8.12.2.1 Bestimmung der kinetischen Parameter

Die Aktivität der Zellen wurde bei unterschiedlichen Glucose- und 2,5-DKG-Konzentrationen nach Abschnitt 8.9.1 bestimmt. Mit der Software Scientist (MicroMath) wurden die Kinetikmodelle an die Messdaten angepasst.

8.12.2.2 Modellierung als Reaktionen 1. Ordnung und als Enzymreaktionen mit Michaelis-Menten-Kinetik

Die jeweiligen Modelle wurden mit der Software MatLab (The MathWorks) an die Messdaten angepasst. Mit Hilfe einer Monte-Carlo-Simulation wurden Standardabweichungen (für die linearen Modelle) und Weibull-Verteilungen (für die Michaelis-Menten-Modelle) berechnet.

8.13. Biotransformationen im Satzreaktor

8.13.1 Ganzzellbiotransformationen

Ganzzellbiotransformationen mit *G. oxydans* fanden analog zur Bestimmung der Zellaktivität statt. Das Verfahren ist ausführlich in Kapitel 8.9.1 beschrieben. Volumina variierten von 25 bis 500 mL Reaktionslösung.

Für repetitive Biotransformationen im Satzreaktor wurden die Zellen nach einer Biotransformation zentrifugiert, in 0,9%iger NaCl-Lösung resuspendiert und bis zur nächsten Biotransformation bei 4°C gelagert. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt.

Bei Ganzzellbiotransformationen mit *E. coli* BL21 DE3 Star pDrive_dkgr_fdh wurden Zellen mit Puffer, Substratlösung und eventuell Cofaktorlösung in einem temperierten Mantelkolben gut durchmischt und regelmäßig auf Produktbildung mittels HPLC überprüft.

8.13.2 Isolierte Enzyme

In einem Eppendorf Tube oder einem Mantelkolben wurden die benötigten Volumina Puffer, Substrate und Cofaktoren vermischt und mit einem Thermostat (Eppendorf) bzw. Wasserbad (mgw-Lauda) auf die geeignete Temperatur gebracht. Durch Zugabe der Enzymlösungen wurde die Reaktion gestartet. Regelmäßig wurden Proben entnommen, für eine Minute auf 99°C erhitzt, zentrifugiert, mit HPLC-Laufmittel verdünnt und in der HPLC gemessen.

8.14. Kontinuierliche Biotransformationen

8.14.1 Kontinuierliche Ganzzellbiotransformationen mit *Gluconobacter oxydans*

Die Anlage für die kontinuierliche Produktion von 2,5-Diketogluconsäure ist in Abbildung 8.6 schematisch gezeigt.

Das Gesamtvolumen des Reaktors (1) betrug 50 mL. Über eine Glasfritte der Porengröße 3 am Boden des Reaktorgefäßes wurde reiner Sauerstoff eingeblasen. Das Gefäß wurde über ein Wasserbad (mgw Lauda) temperiert; die pH-Messung und -Einstellung erfolgte über eine pH-Elektrode (Nordantec) und einen Dosimaten (Metrohm) mit 2 M KOH-Lösung.

Die Zugabe von Glucoselösung erfolgte über eine Schlauchpumpe (101U, Watson-Marlow); das Produkt wurde am Filtratausgang eines Querstrom-Filtrationsmoduls (2) (Sartocon Slice 200, Sartorius) mit einer weiteren Schlauchpumpe abgezogen. Die Membran des Moduls besaß einen Cutoff von 30kD (Hydrosart 30kD, Sartorius). Mittels einer dritten Schlauchpumpe (505U, Watson-Marlow) wurde ein permanenter Querstrom von 2,2 bis 6,7 L/h über der Membran im Filtrationsmodul angelegt.

Über einen Füllstandgrenzschalter (3) (FTW 420, Endress+Hauser) wurde die abziehende Produktpumpe reguliert und der Füllstand im Reaktorraum konstant gehalten. Als Messfühler dienten zwei Edelstahlröhre, zwischen denen eine Wechsellspannung anlag.

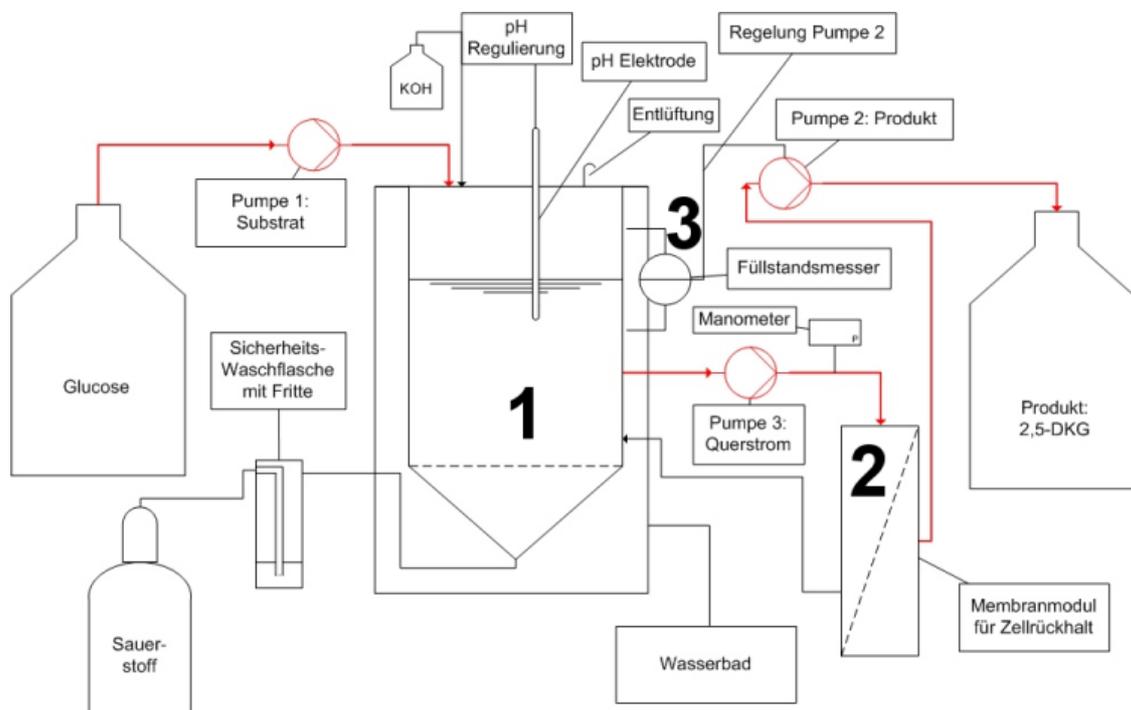


Abbildung 8.6: Anlagenaufbau zur kontinuierlichen Produktion von 2,5-DKG. 1: Reaktorraum; 2: Membranmodul; 3: Füllstandsregler

Die Verweilzeit wurde über die Zulauftrate variiert. Zur Unterdrückung der Schaumbildung wurde die Glucoselösung mit Antischaummittel Biospumex 153k (Cognis) in einer Konzentration von 50 $\mu\text{L/L}$ versetzt.

8.14.2 Isolierte Enzyme

Die kontinuierliche Produktion von 2-KLG aus 2,5-DKG fand im Enzymmembranreaktor statt (3 oder 10 mL, Eigenbau Forschungszentrum Jülich). Den genauen Aufbau zeigt Abbildung 8.7.

Für den Enzymrückhalt sorgte eine YC500 bzw. YM3-Membran (Millipore) mit einem Cutoff von 0,5 bzw. 3 kDa. Der Enzymmembranreaktor wurde kontinuierlich gerührt und mittels eines Kryostaten (DC3, Haake) auf 20°C gehalten. Substratlösung, bestehend aus 2,5-DKG, Puffersubstanzen und NADP^+ , wurde in einem 250 mL-Doppelwandkolben vorgelegt und auf 4°C gekühlt. Die Lösung wurde mit einer Kolbenpräzisionspumpe (P-500, Amersham Biosciences) durch eine Blasenfalle und

einen Sterilfilterhalter (Sartorius, mit Vorfilter und 0,2 µm-Sterilfilter) in den Reaktorraum gepumpt. Die Produktlösung wurde mit einem Fraktionssammler (Frac-100, Pharmacia LKB) aufgefangen.

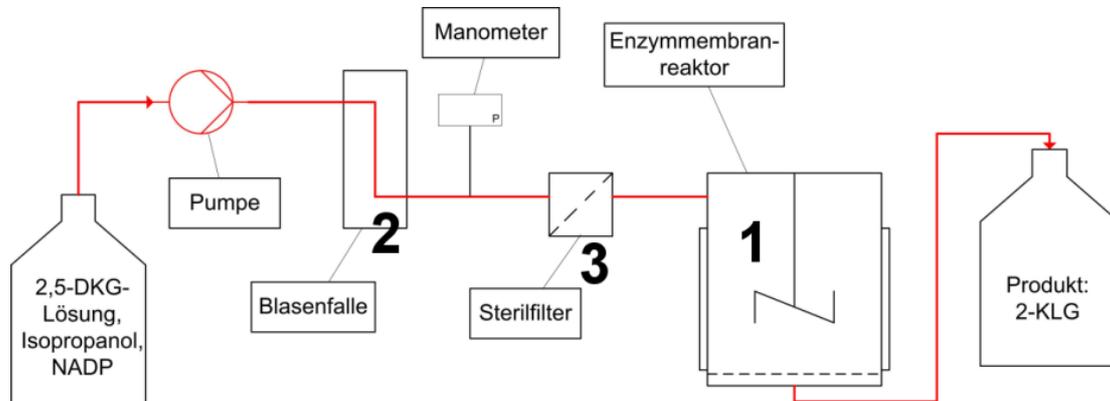


Abbildung 8.7: Aufbau zur kontinuierlichen Produktion von 2-KLG aus 2,5-DKG. 1: Enzymmembranreaktor; 2: Blasenfalle; 3: Sterilfilter

Vor Beginn jeder Biotransformation wurden der EMR sowie zu- und ablaufende Leitungen mit Wasser auf Dichtigkeit überprüft, mit 0,1 %iger Peressigsäurelösung sterilisiert und mit KP_i -Puffer (pH 6,4) gespült. Die Membran wurde mit $1\text{mg/mL}_{\text{Reaktorvolumen}}$ BSA belegt; anschließend wurden über die Blasenfalle die benötigten Enzymmengen über eine sterile Spritze in das System gegeben. Die Reaktion begann mit Einpumpen von Substratlösung in den EMR.

8.14.3 Gekoppelte Reaktion

Zur kontinuierlichen Produktion von 2-KLG aus Glucose wurden die beiden Reaktoren aus den Kapiteln 8.14.1 und 8.14.2 miteinander gekoppelt. Den genauen Aufbau zeigt Abbildung 8.8.

Produktlösung aus der kontinuierlichen Produktion von 2,5-DKG mit *Gluconobacter oxydans* wurde in einem Zwischengefäß gesammelt und mit einer Schlauchpumpe (Watson-Marlow 101U) in das Mischgefäß überführt. Diese Pumpe war über einen Füllstandsgrenzschar (FTW 420, Endress+Hauser) an den Flüssigkeitsstand im Zwischengefäß geregelt. An denselben Flüssigkeitsgrenzschar waren zwei weitere Schlauchpumpen angeschlossen: eine Pumpe für reines Isopropanol aus einem Vorratsgefäß (Watson-Marlow, 101U/R) und eine Pumpe für eine NADP-/MgCl₂-/Pufferlösung (Watson-Marlow 101U). So wurde sichergestellt, dass die drei Lösungen immer im selben Verhältnis im Mischgefäß vermischt wurden. Das

Mischgefäß war ein doppelwandiges Gefäß mit einem Volumen von 150 mL, in das gleichzeitig 2,5-DKG- und NADP-Lösung sowie Isopropanol gepumpt wurden. Über eine pH-Elektrode (Nordantec) und einen Dosimaten (Metrohm) wurde 2 N KOH zutitriert, so dass der pH-Wert der Lösung stets 6,4 betrug. Zwischengefäß, Mischgefäß und das Vorratsgefäß für NADP-Lösung waren auf 8°C über einen Kryostaten (DC3, Haake) temperiert.

Über eine weitere Füllstandsregelung wurde die fertig gemischte und auf pH 6,4 eingestellte Lösung von einer Kolbenpräzisionspumpe (P-500, Amersham Biosciences) durch eine Blasenfalle und einen Sterilfilter in den Enzymmembranreaktor (10 mL, Eigenbau Forschungszentrum Jülich) gepumpt. Die Produktlösung wurde über einen Fraktionssammler aufgefangen oder über eine zweite Blasenfalle und Sterilfilter in einen zweiten Enzymmembranreaktor gepumpt, um eine weitere Umsetzung zu erzielen. Weitere Einzelheiten sind in den Kapiteln 8.14.1 und 8.14.2 beschrieben.

8.15. Produktaufarbeitung

8.15.1 2,5-Diketo-D-Gluconat als Hemicalciumsalz

Eine wässrige 2,5-DKG-Lösung wurde am Rotationsverdampfer (Vac V-513, Büchi) auf ein Sechstel des ursprünglichen Volumens eingengt. Nach Zugabe des dreifachen Volumens konzentrierter Essigsäure wurde die Lösung auf 4°C abgekühlt und mit einer Spatelspitze Calciumcarbonat sowie dem doppelten Volumen Aceton versetzt. Der dabei ausfallende weiße Niederschlag wurde abfiltriert, mit Aceton gewaschen und lyophilisiert. Die Analyse des so gewonnenen 2,5-DKG-Hemicalciumsalzes erfolgte mittels HPLC und NMR.

8.15.2 2-Keto-L-Gulonsäure

Eine wässrige Kalium-2-Keto-L-Gulonat-Lösung aus der kontinuierlichen Produktion wurde am Rotationsverdampfer (Vac V-513, Büchi) auf ein Fünfzigstel seines Volumens eingengt und im Eisbad über Nacht gerührt. Die entstehenden Kristalle wurden zentrifugiert und in wenig bidest H₂O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in Methanol aufgenommen; die entstehende Suspension wurde stark gerührt und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt und der gelbliche Feststoff anschließend am Hochvakuum getrocknet. Die Analyse der so gewonnenen 2-Keto-L-Gulonsäure erfolgte mittels HPLC, NMR und MS.

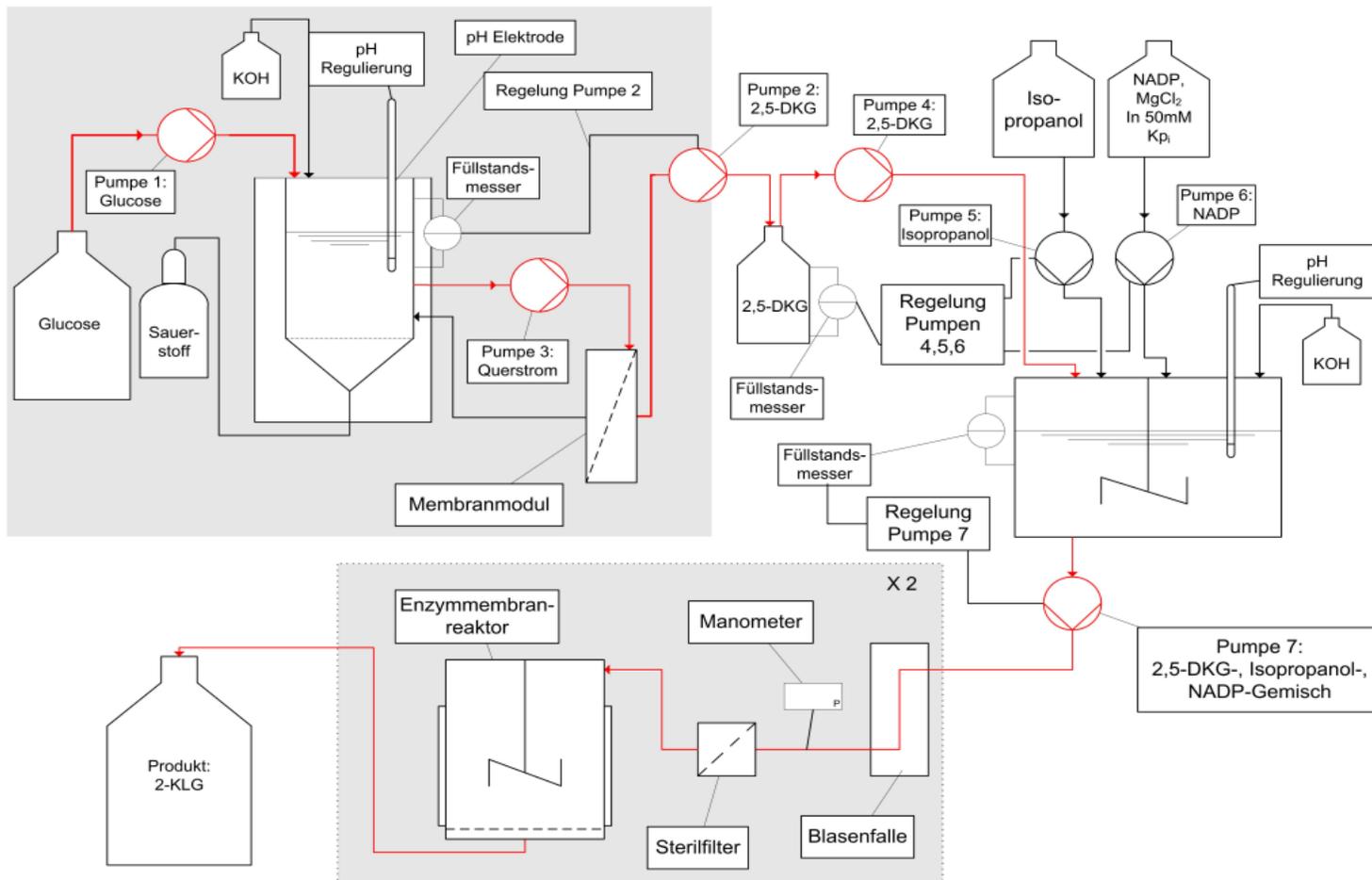


Abbildung 8.8: Anlage zur kontinuierlichen Produktion von 2-KLG aus Glucose

Literaturverzeichnis

- Aiguo J, Peiji G** (1998) Synthesis of 2-keto-L-gulononic acid from gluconic acid by co-immobilized *Gluconobacter oxydans* and *Corynebacterium* sp. *Biotechnol Lett* **20**:939.
- Anderson S, Marks C B, Lazarus R, Miller J, Stafford K, Seymour J, Light D, Rastetter W, Estell D** (1985) Production of 2-keto-L-gulonate, an intermediate in L-ascorbate synthesis, by a genetically modified *Erwinia herbicola*. *Science* **230**:144.
- Arumugam B, Collins N, Boyd B, Perri S, Powell J, Cushman M.** 2003. Process for producing ascorbic acid in the presence of a sulfit. WO02051827.
- Bäumchen C, Bringer-Meyer S** (2007) Expression of glf_{Z.m.} increases D-mannitol formation in whole cell biotransformation with resting cells of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**:545.
- Banta S, Swanson B A, Wu S, Jarnagin A, Anderson S** (2002a) Alteration of the specificity of the cofactor-binding pocket of *Corynebacterium* 2,5-diketo-D-gluconic acid reductase A. *Protein Eng* **15**:131.
- Banta S, Swanson B A, Wu S, Jarnagin A, Anderson S** (2002b) Optimizing an artificial metabolic pathway: Engineering the cofactor specificity of *Corynebacterium* 2,5-diketo-D-gluconic acid reductase for use in vitamin C biosynthesis. *Biochemistry* **41**:6226.
- Bauernfeind J C, Pinkert D M** (1970) Food processing with added ascorbic acid. *Adv Food Res* **18**:219.
- Behr A.** 2008. Angewandte homogene Katalyse. Wiley-VCH, Weinheim.
- Berry A, Lee C, Mayer A F, Shinjoh M.** 2005. Microbial production of L-ascorbic acid. WO2005/017172.
- Beschkov V, Velizarov S, Peeva L** (1995) Some kinetic aspects and modeling of biotransformation of D-glucose to keto-D-gluconates. *Bioprocess Eng* **13**:301.
- Blake J D, Clarke M L, Richards G N** (1984) Determination of D-gluconic, 5-keto-D-gluconic, 2-keto-D-gluconic and 2,5-diketo-D-gluconic acids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **312**:211.
- Bloemsmma B, Ruiter A** (1963) 2,5-Diketogluconsäure als Ursache einer braunen Verfärbung in saurer Umgebung. *Deut Lebensm Rundsch* **8**:234.
- Boudrant J** (1990) Microbial processes for ascorbic acid biosynthesis - a review. *Enzyme Microb Technol* **12**:322.
- Bradford M M** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248.
- Bremus C.** 2006. Untersuchungen zur Bildung der Vitamin C-Vorstufe 2-Keto-L-Gulonsäure mit *Gluconobacter oxydans*. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Bucerius R.** 2008. Produktion von Vitamin C-Intermediaten durch *Gluconobacter oxydans*. Diplomarbeit. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Buse R, Onken U, Qazi G N, Sharma N, Parshad R, Verma V** (1992a) Influence of dilution rate and dissolved oxygen concentration on continuous keto acid production by *Gluconobacter oxydans* subsp *melanogenum*. *Enzyme Microb Technol* **14**:1001.

- Buse R, Qazi G N, Onken U** (1992b) Influence of constant and oscillating dissolved-oxygen concentrations on keto acid production by *Gluconobacter oxydans* subsps *melanogenum*. J Biotechnol **26**:231.
- Buse R, Qazi G N, Trager M, Onken U** (1990) Influence of dissolved oxygen tension on the production rate of 2,5-diketogluconic acid by *Gluconobacter melanogenum*. Biotechnol Lett **12**:111.
- Chauhan A S, Ramteke R S, Eipeson W E** (1998) Properties of ascorbic acid and its applications in food processing: a critical appraisal. J Food Sci Technol **35**:381.
- Chen Q, Espey M G, Sun A Y, Pooput C, Kirk K L, Krishna M C, Khosh D B, Drisko J, Levine M** (2008) Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. Proc Natl Acad Sci USA **105**:11105.
- Chotani G, Dodge T, Hsu A, Kumar M, LaDuca R, Trimbur D, Weyler W, Sanford K** (2000) The commercial production of chemicals using pathway engineering. Biochim Biophys Acta **1543**:434.
- Claus G W, Batzing B L, Baker C A, Goebel E M** (1975) Intracytoplasmic membrane formation and increased oxidation of glycerol during growth of *Gluconobacter oxydans*. J Bacteriol **123**:1169.
- Crawford T C, Andrews G C, Faubl H, Chmurny G N** (1980) The structure of biologically important carbohydrates. A ¹³C nuclear magnetic resonance study of tautomeric equilibria in several hexulosonic acids and related compounds. J Am Chem Soc **102**:2200.
- De Ley J, Swings J.** 1984. Genus II *Gluconobacter*, p. 275. In Krieg N. R., Holt J. G. (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Deppenmeier U, Hoffmeister M, Prust C** (2002) Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. Appl Microbiol Biotechnol **60**:233.
- Doneva T, Vasilieff C, Donev R** (1999) Catalytic and biocatalytic oxidation of glucose to gluconic acid in a modified three-phase reactor. Biotechnol Lett **21**:1107.
- Douglas R, Hemilä H, Chalker E, Treacy B.** 2007. Vitamin C for preventing and treating the common cold CD000980. Cochrane Database System Rev.
- Dümpelmann R, Keglevic T.** 2003. Process for the isolation of 2-keto-L-gulonic acid. EP0805210.
- Elfari M, Ha S W, Bremus C, Merfort M, Khodaverdi V, Herrmann U, Sahn H, Gorisch H** (2005) A *Gluconobacter oxydans* mutant converting glucose almost quantitatively to 5-keto-D-gluconic acid. Appl Microbiol Biotechnol **66**:668.
- Ernst M, Kaup B, Muller M, Bringer-Meyer S, Sahn H** (2005) Enantioselective reduction of carbonyl compounds by whole-cell biotransformation, combining a formate dehydrogenase and a (*R*)-specific alcohol dehydrogenase. Appl Microbiol Biotechnol **66**:629.
- Eschenfeldt W H, Stols L, Rosenbaum H, Khambatta Z S, Quate-Randall E, Wu S, Kilgore D C, Trent J D, Donnelly M I** (2001) DNA from uncultured organisms as a source of 2,5-diketo-D-gluconic acid reductases. Appl Environ Microbiol **67**:4206.
- Fechtel U, Bechmann K, Heinz W, Kuhn W.** 1998. L-ascorbic acid preparation. DE19734086.
- Fechtel U, Wembacher K.** 1999. Method for preparing ascorbic acid. EP0779285.

- Gaspar N J, Los J M** (1959) On the constitution of 2-keto-L-gulononic acid. *Can J Chem* **37**:495.
- Gossele F, Swings J, De Ley J** (1980) Growth factor requirements of *Gluconobacter*. *Zbl Bakt Hyg I C1*:348.
- Grindley J F, Payton M A, Vandepol H, Hardy K G** (1988) Conversion of glucose to 2-keto-L-gulonate, an intermediate in L-ascorbate synthesis, by a recombinant strain of *Erwinia citreus*. *Appl Environ Microbiol* **54**:1770.
- Gupta A, Singh V K, Qazi G N, Kumar A** (2001) *Gluconobacter oxydans*: Its biotechnological applications. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**:445.
- Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557.
- Hancock R D, Viola R** (2001) The use of microorganisms for L-ascorbic acid production: current status and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**:567.
- Herrmann U, Merfort M, Jeude M, Bringer-Meyer S, Sahm H** (2004) Biotransformation of glucose to 5-keto-D-gluconic acid by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**:86.
- Honda H, Yamano T, Yamashita M**. 1998. Process for producing L-ascorbic acid. EP0711764.
- Hoshino T, Kiyasu T, Shinjoh M**. 2005. Enzymatic process for the manufacture of L-ascorbic acid and D-erythorbic acid. US2005019878.
- Hoshino T, Ojima S, Sugisawa T**. 1992. Fermentation process for producing 2-keto-L-gulononic acid. EP0518136.
- Huh W K, Lee B H, Kim S T, Kim Y R, Rhie G E, Baek Y W, Hwang C S, Lee J S, Kang S O** (1998) D-erythroascorbic acid is an important antioxidant molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **30**:895.
- Ji A G, Gao P J** (2001) Substrate selectivity of *Gluconobacter oxydans* for production of 2,5-diketo-D-gluconic acid and synthesis of 2-keto-L-gulononic acid in a multienzyme system. *Appl Biochem Biotechnol* **94**:213.
- Kählert D**. 2008. Vitamin C ist keine Krebstherapie, *Netzeitung online*.
- Kaup B, Bringer-Meyer S, Sahm H** (2003) Metabolic engineering of *Escherichia coli*: construction of an efficient biocatalyst for D-mannitol formation in a whole-cell biotransformation. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**:333.
- Khurana S, Powers D B, Anderson S, Blaber M** (1998) Crystal structure of 2,5-diketo-D-gluconic acid reductase A complexed with NADPH at 2,1-angstrom resolution. *Proc Nat Acad Sci USA* **95**:6768.
- Khurana S, Sanli G, Powers D B, Anderson S, Blaber M** (2000) Molecular modeling of substrate binding in wild-type and mutant *Corynebacteria* 2,5-diketo-D-gluconate reductases. *Protein Struct Funct Genet* **39**:68.
- Kitos P A, Wang C H, Mohler B A, King T E, Cheldelin V H** (1958) Glucose and gluconate dissimilation in *Acetobacter suboxydans*. *J Biol Chem* **233**:1295.
- Kragl U**. 1992. Reaktionstechnik biokatalytischer Prozesse am Beispiel der kontinuierlichen enzymatischen Synthese von N-Acetylneuraminsäure. Dissertation. Universität Bonn.
- Kula M R, Wandrey C** (1987) Continuous enzymatic transformation in an enzyme-membrane reactor with simultaneous NADH regeneration. *Methods Enzymol*. **136**:9.

- Kulhanek M.** 1989. Microbial dehydrogenations of monosaccharides, p. 147. In Seidleman S. L. (ed.), *Advances in applied microbiology*, vol. 34. Academic Press Inc., San Diego.
- Lazarus R, Seymour J** (1986) Determination of 2-keto-L-gulonic and other ketoaldonic and aldonic acids produced by ketogenic bacterial fermentation. *Anal Biochem* **157**:360.
- Liese A, Seelbach K, Wandrey C.** 2000. *Industrial Biotransformations*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Los J M, Gaspar N J** (1960) Kinetics and mechanism of the cyclic hemiacetal ring opening in 2-keto-L-gulonic acid. A polarographic study. *Recl Trav Chim Pays-Bas* **79**:112.
- Lusta K A, Reshetilov A N** (1998) Physiological and biochemical features of *Gluconobacter oxydans* and prospects of their use in biotechnology and biosensor systems (review). *Appl Biochem Microbiol* **34**:307.
- Macauley S, McNeil B, Harvey L M** (2001) The genus *Gluconobacter oxydans* and its applications in biotechnology. *Crit Rev Biotechnol* **21**:1.
- Madej E, Grzeda M** (2000) Properties, effects of insufficient supply and ranges of application of vitamin C in animal therapy. *Med Weter* **56**:627.
- Maremonti M, Greco G, Wichmann R** (1996) Characterisation of 2,5-diketo-D-gluconic acid reductase from *Corynebacterium sp.* *Biotechnol Lett* **18**:845.
- Matsushita K, Shinagawa E, Ameyama M** (1982) D-Gluconate dehydrogenase from bacteria, 2-keto-D-Gluconate-yielding, membrane-bound. *Methods Enzymol* **89**:187.
- Matsushita K, Toyama H, Adachi O** (1994) Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Adv Microb Physiol* **36**:247.
- Miller J V, Estell D A, Lazarus R A** (1987) Purification and characterization of 2,5-diketo-D-gluconate reductase from *Corynebacterium sp.* *J Biol Chem* **262**:9016.
- Miller S L, Smith-Magowan D** (1990) The thermodynamics of the Krebs cycle and related compounds. *J Phys Chem Ref Data* **19**:1049.
- Minör D.** 2007. Fermentative Herstellung von Enterokinase mit rekombinantem *Escherichia coli*. Hochschule Darmstadt.
- Ohrem H L.** 1995. Reaktionstechnische Untersuchung der Glycerinoxidation mit *Gluconobacter oxydans* zur Entwicklung eines kontinuierlichen Fermentationsverfahren. Dissertation. RWTH Aachen.
- Oosterhuis N M G, Kossen N W F, Olivier A P C, Schenk E S** (1985) Scale-down and optimization studies of the gluconic acid fermentation by *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnol Bioeng* **27**:711.
- Perlman D** (1955) Spectrophotometric method for the determination of 5-keto-D-gluconic acid. *J Biol Chem* **215**:353.
- Poget C, Dubuis B, von Stockar U** (1994) Acetate production from lactate and glucose fermentation by *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnol. Lett* **16**:1293.
- Pronk J T, Levering P R, Olijve W, Vandijken J P** (1989) Role of NADP-dependent and quinoprotein glucose dehydrogenases in gluconic acid production by *Gluconobacter oxydans*. *Enzyme Microb Technol* **11**:160.
- Qazi G N, Parshad R, Verma V, Chopra C L, Buse R, Trager M, Onken U** (1991) Diketo-gluconate fermentation by *Gluconobacter oxydans*. *Enzyme Microb Technol* **13**:504.

- Qazi G N, Sharma N, Parshad R** (1993) Role of dissolved oxygen as a regulator for the direct oxidation of glucose by *Erwinia herbicola* and *Gluconobacter oxydans*. *J Ferment Bioeng* **76**:336.
- Rao Y M, Sureshkumar G K** (2000) Direct biosynthesis of ascorbic acid from glucose by *Xanthomonas campestris* through induced free-radicals. *Biotechnol Lett* **22**:407.
- Reichstein T, Grüssner A** (1934) Eine ergiebige Synthese der 1-Ascorbinsäure (C-Vitamin). *Helv Chim Acta* **17**:311.
- Rueckel M**. 2000. Continuous fermentation process. EP0972843.
- Running J A, Peng S, Rosson R A**. 2004. The biotechnology of ascorbic acid manufacture, p. 49. In H. A., May J. M., Smirnoff N. (ed.), *Vitamin C*. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford.
- Running J A, Severson D K, Schneider K J** (2002) Extracellular production of L-ascorbic acid by *Chlorella protothecoides*, *Prototheca* species, and mutants of *P. moriformis* during aerobic culturing at low pH. *J Ind Microbiol Biotechnol* **29**:93.
- Saito Y, Ishii Y, Hayashi H, Yoshikawa K, Noguchi Y, Yoshida S, Soeda S, Yoshida M** (1998) Direct fermentation of 2-keto-L-gulonic acid in recombinant *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnol Bioeng* **58**:309.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A R** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463.
- Sanli G, Banta S, Anderson S, Blaber M** (2004) Structural alteration of cofactor specificity in *Corynebacterium* 2,5-diketo-D-gluconic acid reductase. *Protein Sci* **13**:504.
- Sanli G, Blaber M** (2001) Structural assembly of the active site in an aldo-keto reductase by NADPH cofactor. *J Mol Biol* **309**:1209.
- Sauer M, Branduardi P, Valli M, Porro D** (2004) Production of L-ascorbic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*. *Appl Environ Microbiol* **70**:6086.
- Schroer K**. 2008. Ganzzellbiotransformationen mit rekombinanten *Escherichia coli* zur Synthese chiraler Alkohole. Dissertation. Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, Aachen.
- Seelbach K, Kragl U** (1997) Nanofiltration membranes for cofactor retention in continuous enzymatic synthesis. *Enzyme Microb Technol* **20**:389.
- Seelbach K, Riebel B, Hummel W, Kula M R, Tishkov V I, Egorov A M, Wandrey C, Kragl U** (1996) A novel, efficient regenerating method of NADPH using a new formate dehydrogenase. *Tetrahedron Lett* **37**:1377.
- Seiskari P, Linko Y, Linko P** (1985) Continuous production of gluconic acid by immobilized *Gluconobacter oxydans* cell bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* **21**:356.
- Sharma N, Parshad R, Qazi G N** (1992) Electron-transport system associated with direct glucose oxidation in *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnol Lett* **14**:391.
- Shibata T, Ichikawa C, Matsuura M, Takata Y, Noguchi Y, Saito Y, Yamashita M** (2000) Metabolic engineering study on the direct fermentation of 2-keto-L-gulonic acid, a key intermediate of L-ascorbic acid in *Pseudomonas putida* IFO3738. *J Biosci Bioeng* **90**:223.
- Shinagawa E, Ameyama M** (1982) 2-Keto-D-gluconate dehydrogenase from *Gluconobacter melanogenus*, membrane-bound. *Methods Enzymol* **89**:194.

- Shinagawa E, Matsushita K, Adachi O, Ameyama M** (1981) Purification and characterization of 2-keto-D-gluconate dehydrogenase from *Gluconobacter melanogenus*. *Agr Biol Chem* **45**:1079.
- Shinjo M, Tomiyama N, Asakura A, Hoshino T** (1995) Cloning and nucleotide sequencing of the membrane-bound L-sorbose dehydrogenase gene of *Acetobacter liquefaciens* IFO 12258 and its expression in *Gluconobacter oxydans*. *Appl Environ Microbiol* **61**:413.
- Shujuan L, Jun W, Jianming Y, Zengliang Y** (2003) Study on the effect of mutated *Bacillus megaterium* in two-stage fermentation of vitamin C. *Plasma Sci Technol* **5**:2011.
- Silberbach M**. 2001. Prozessoptimierung der biotechnologischen Synthese von Ketogluconsäuren durch *Gluconobacter oxydans*, RWTH Aachen.
- Silberbach M, Maier B, Zimmermann M, Buchs J** (2003) Glucose oxidation by *Gluconobacter oxydans*: characterization in shaking-flasks, scale-up and optimization of the pH profile. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**:92.
- Sonoyama T, Tani H, Matsuda K, Kageyama B, Tanimoto M, Kobayashi K, Yagi S, Kyotani H, Mitsushima K** (1982) Production of 2-keto-L-gulonic acid from D-glucose by 2-stage fermentation. *Appl Environ Microbiol* **43**:1064.
- Sonoyama T, Kageyama B, Yagi S, Mitsushima K** (1987) Biochemical aspects of 2-keto-L-gulonate accumulation from 2,5-diketo-D-gluconate by *Corynebacterium sp* and its mutants. *Agr Biol Chem* **51**:3039.
- Sonoyama T, Kobayashi K** (1987b) Purification and properties of two 2,5-diketo-D-gluconate reductases from a mutant strain derived from *Corynebacterium sp*. *J Ferment Technol* **65**:311.
- Sonoyama T, Tani H, Kageyama B, Kobayashi K, Honjo T, Yagi S**. 1976. Process for preparing 2-keto-L-gulonic acid. US3998697.
- Sonoyama T, Tani H, Kageyama B, Kobayashi K, Honjo T, Yagi S**. 1976. Process for producing 2-keto-L-gulonic acid. US 3959076.
- Stroshane R M, Perlman D** (1977) Fermentation of glucose by *Acetobacter melanogenus*. *Biotechnol Bioeng* **19**:459.
- Stubbs J J, Lockwood L B, Roe E T, Tabenkin B, Ward G E** (1940) Ketogluconic acids from glucose. *Ind Eng Chem* **32**:1626.
- Studier F W, Moffatt B A** (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**:113.
- Sugisawa T, Hoshino T, Masuda S, Nomura S, Setoguchi Y, Tazoe M, Shinjo M, Someha S, Fujiwara A** (1990) Microbial production of 2-keto-L-gulonic acid from L-sorbose and D-sorbitol by *Gluconobacter melanogenus*. *Agric Biol Chem* **54**:1201.
- Sugisawa T, Miyazaki T, Hoshino T** (2005) Microbial production of L-ascorbic acid from D-sorbitol, L-sorbose, L-gulose, and L-sorbose by *Ketogulonicigenium vulgare* DSM 4025. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**:659.
- Sugisawa T, Ojima S, Matzinger P K, Hoshino T** (1995) Isolation and characterization of a new vitamin C producing enzyme (L-gulonolactone dehydrogenase) of bacterial origin. *Biosci Biotech Biochem* **59**:190.
- Träger M, Qazi G N, Buse R, Onken U** (1992) Comparison of direct glucose oxidation by *Gluconobacter oxydans* subsp. *suboxydans* and *Aspergillus niger* in a pilot scale airlift reactor. *J Ferment Bioeng* **74**:274.

-
- Tramper J, Luyben K C A M, van den Tweel W J J** (1983) Kinetic aspects of glucose oxidation by *Gluconobacter oxydans* cells immobilized in calcium alginate. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* **17**:13.
- Troostembergh J, Peuzet C G, Debonne I A, Obyn W R.** 2003. Process for the manufacture of 2-keto-L-gulonic acid. AU2002331380.
- Valle F, Kumar M, Dartois V, Hoch J A.** 2002. Enhanced 2-keto-L-gulonic acid production. WO0212528.
- Velizarov S, Beschkov V** (1994a) Oxygen transfer and glucose to gluconic acid oxidation by cells of *Gluconobacter oxydans* NBIMCC 1043. *C R Acad Bulgare Sci* **47**:53.
- Velizarov S, Beschkov V** (1994b) Production of free gluconic acid by cells of *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnol Lett* **16**:715.
- Velizarov S, Beschkov V** (1998) Biotransformation of glucose to free gluconic acid by *Gluconobacter oxydans*: substrate and product inhibition situations. *Process Biochem* **33**:527.
- Voss C V, Gruber C C, Faber K, Knaus T, Macheroux P, Kroutil W** (2008) Orchestration of concurrent oxidation and reduction cycles for stereoinversion and deracemisation of sec-alcohols. *J Am Chem Soc* **130**:13969.
- Wandrey C** (2004) Biochemical reaction engineering for redox reactions. *Chem Rec* **4**:254.
- Weenk G, Olijve W, Harder W** (1984) Ketogluconate formation by *Gluconobacter* species. *Appl Microbiol Biotechnol* **20**:400.
- White S A, Claus G W** (1982) Effect of intracytoplasmic membrane development on oxidation of sorbitol and other polyols by *Gluconobacter oxydans*. *J Bacteriol* **150**:934.
- Wührer F, Haltrich D, Pacher C, C. P, Kulbe K D.** 2006. Scientific report: Organic acids by enzymatic redox processes. Research Centre Applied Biocatalysis.
- Xu A, Yao J, Yu L, Lv S, Wang J, Yan B, Yu Z** (2004) Mutation of *Gluconobacter oxydans* and *Bacillus megaterium* in a two-step process of L-ascorbic acid manufacture by ion beam. *J Appl Microbiol* **96**:1317.
- Yamada S, Nabe K, Izuo N, Chibata I** (1979) Enzymatic production of dihydroxy acetone by *Acetobacter suboxydans* ATCC 621. *J Ferment Technol* **57**:221.
- Yum D Y, Lee B Y, Pan J G** (1999) Identification of the yqhE and yafB genes encoding two 2, 5-diketo-D-gluconate reductases in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **65**:3341.
- Zelic B, Pavlovic N, Delic V, Vasic-Racki D** (1999) Kinetic model for the bioconversion of glucose to 2,5-diketo-D-gluconic acid. *Bioproc Eng* **21**:45.

Anhang

A.1. Ergänzungen zu Kap. 3: Produktion von 2,5-DKG mit *G. oxydans*

A.1.1 Modellierung der dreistufigen Reaktionsfolge als Enzymreaktionen mit Michaelis-Menten-Kinetik

Die Kinetik der dreistufigen Reaktion von Glucose zu 2,5-DKG wurde mit einem vereinfachten Modell beschrieben, das die beiden unterschiedlichen Zellchargen (aus Parallelerfermentation und 20-L-Fermentation) in einem gekoppelten Ansatz zusammenfasst. Es wurde davon ausgegangen, dass die K_M -Werte der beteiligten Enzyme in den verschiedenen Zellchargen gleich bleiben und in erster Näherung gleich den apparenten K_M -Werten der gesamten Biomasse sind. Nur die Maximalgeschwindigkeiten bezüglich der Zellmasse sollten sich ändern, da unterschiedliche Mengen an Enzyme exprimiert werden. Die beiden Datensätze werden daher mit einem Modell aus acht Differentialgleichungen beschrieben (Formel A-1):

$$\begin{aligned} \frac{dc(A)_{par}}{dt} &= -\frac{v_{max1_{par}} \cdot c(A)_{par}}{K_M1 + c(A)_{par}} \\ \frac{dc(B)_{par}}{dt} &= \frac{v_{max1_{par}} \cdot c(A)_{par}}{K_M1 + c(A)_{par}} - \frac{v_{max2_{par}} \cdot c(B)_{par}}{K_M2 + c(B)_{par}} \\ \frac{dc(C)_{par}}{dt} &= \frac{v_{max2_{par}} \cdot c(B)_{par}}{K_M2 + c(B)_{par}} - \frac{v_{max3_{par}} \cdot c(C)_{par}}{K_M3 + c(C)_{par}} \\ \frac{dc(D)_{par}}{dt} &= \frac{v_{max3_{par}} \cdot c(C)_{par}}{K_M3 + c(C)_{par}} \\ \frac{dc(A)_{20L}}{dt} &= -\frac{v_{max1_{20L}} \cdot c(A)_{20L}}{K_M1 + c(A)_{20L}} \\ \frac{dc(B)_{20L}}{dt} &= \frac{v_{max1_{20L}} \cdot c(A)_{20L}}{K_M1 + c(A)_{20L}} - \frac{v_{max2_{20L}} \cdot c(B)_{20L}}{K_M2 + c(B)_{20L}} \\ \frac{dc(C)_{20L}}{dt} &= \frac{v_{max2_{20L}} \cdot c(B)_{20L}}{K_M2 + c(B)_{20L}} - \frac{v_{max3_{20L}} \cdot c(C)_{20L}}{K_M3 + c(C)_{20L}} \\ \frac{dc(D)_{20L}}{dt} &= \frac{v_{max3_{20L}} \cdot c(C)_{20L}}{K_M3 + c(C)_{20L}} \end{aligned}$$

Formel A-1: Gleichungssystem zur Modellierung der dreistufigen Reaktion als Enzymreaktionen mit Michaelis-Menten-Kinetik. Ein Modell für zwei Datensätze (Zellcharge aus Parallelerfermentation, Zellcharge aus 20L-Fermentation)

Die simulierten Reaktionsverläufe für beide Zellchargen konnten relativ gut an die realen Messwerte angepasst werden (Abbildung A-1). Die ermittelten K_M -Werte

weichen jedoch stark von den Werten für die isolierten Enzyme ab (Tabelle A-1). Vor allem der K_M -Wert für die Gluconatdehydrogenase (K_{M2}) ist viel geringer. Allerdings handelt es sich bei den ermittelten kinetischen Konstanten auch nicht um Werte für die reinen Proteine, sondern um apparente Werte.

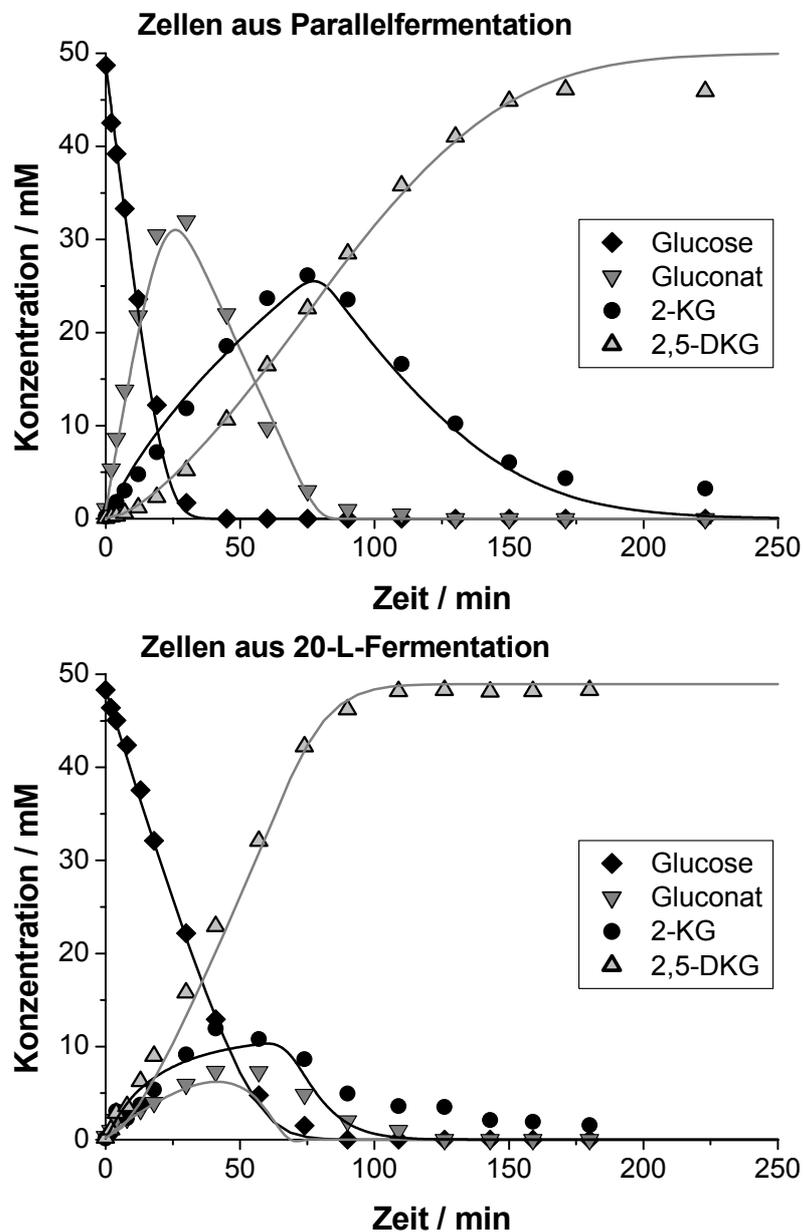


Abbildung A-1: Ergebnisse der Modellierung als drei Enzymreaktionen mit Michaelis-Menten-Kinetik. Oben: Zellcharge aus Parallelfertmentation, unten: Zellcharge aus 20-L-Fermentation.

Tabelle A-1: Ergebnisse der Modellierung nach Formel A-1. Standardabweichungen sind nicht angegeben, da die Monte-Carlo-Simulation lediglich eine unsymmetrische Weibull-Verteilung lieferte.

	Zellcharge aus Parallelferm. (Abschnitt 3.2.2)	Zellcharge aus 20-L-Ferm. (Abschnitt 3.2.3)	Literatur 1: Werte für isolierte Enzyme	Literatur 2: Werte für <i>Erwinia citreus</i> [Zelic <i>et al.</i> 1999]
$v_{\max 1}$ [U]	433,2 (pro g Feuchtmasse)	156,8 (pro g Feuchtmasse)	n.a.	1846 (pro g Trockenmasse)
$v_{\max 2}$ [U]	105,5 (pro g Feuchtmasse)	107,5 (pro g Feuchtmasse)	n.a.	1011 (pro g Trockenmasse)
$v_{\max 3}$ [U]	101,3 (pro g Feuchtmasse)	238,0 (pro g Feuchtmasse)	n.a.	505 (pro g Trockenmasse)
K_{M1} [mM]	5,814		13,0 [Träger <i>et al.</i> 1992]	119,48
K_{M2} [mM]	0,002		2,3-3,2 [Matsushita <i>et al.</i> 1982]	22,83
K_{M3} [mM]	13,79		50 [Shinagawa <i>et al.</i> 1982]	40,18

A.2. Ergänzungen zu Kap. 4: Reduktion von 2,5-DKG zu 2-KLG

A.2.1 Klonierung eines Plasmids

Dieses Kapitel beschreibt die Klonierung des Plasmids pDrive_dkgr_fdh für die Ganzzellenbiotransformation von 2,5-DKG zu 2-KLG (Kapitel 4).

Abbildung A-2 zeigt die beiden ursprünglich vorliegenden Plasmide.

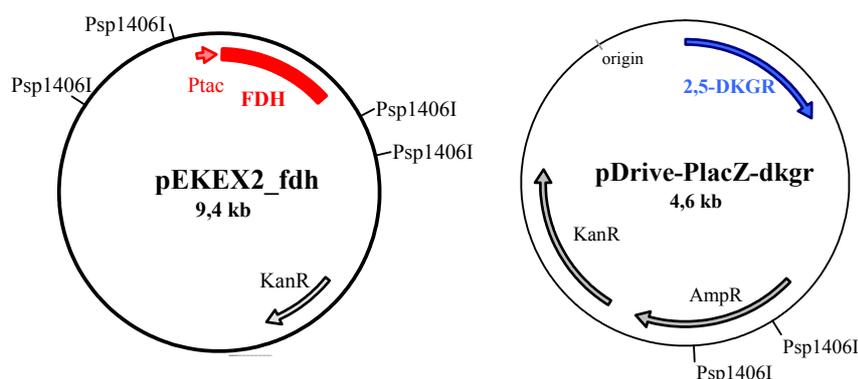


Abbildung A-2: Links: Plasmid pEKEX2_fdh bestehend aus Ptac-Promotor (Ptac), Formiatdehydrogenase-Gen (FDH) und Kanamycin-Resistenzgen (KanR). Rechts: Plasmid pDrive-PlacZ-dkgr bestehend aus Gen für die 2,5-Diketogluconatreduktase (2,5-DKGR), und Kanamycin-Resistenzgen (KanR) und Ampicillinresistenzgen (AmpR). Eingezeichnet sind jeweils die Schnittstellen für das verwendete Restriktionsenzym Psp 1406I.

Das Plasmid pEKEX2_fdh wurde mit dem Restriktionsenzym Psp1406I geschnitten. Die entstehenden Fragmente wurden auf dem Agarosegel getrennt und das relevante Fragment mit dem FDH-Gen isoliert. Das Plasmid pDrive-PlacZ-dkgr wurde mit dem gleichen Enzym geschnitten. Das dabei entstehende größere Fragment wurde vom Agarosegel isoliert. Es enthält das Gen für die 2,5-DKGR sowie für die Kanamycin-Resistenz (Abbildung A-3).

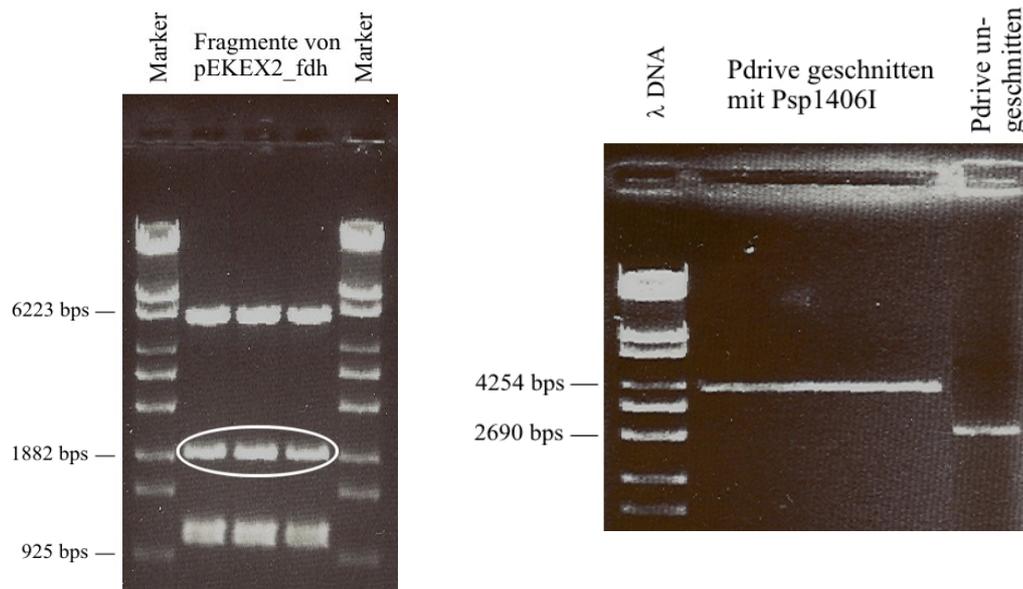


Abbildung A-3:Links: Ergebnis der Restriktion von Plasmid pEKEX2_fdh mit Psp1406I. Eingekreist ist das relevante Fragment mit dem Formiatdehydrogenase-Gen (2026 bp). (Auftrennung über 1%iges Agarosegel, 60 Min. bei 60 V, 45 Min. bei 75 V) Rechts: Ergebnis der Restriktion von pDrive-PlacZ-dkgr mit Psp1406I (links) mit dem relevanten Fragment von 4234 bp. Rechts zum Vergleich das ungeschnittene Plasmid (4607 bp). (Auftrennung über 1%iges Agarosegel, 75 Min bei 60 V, 15 Min bei 75 V)

Die beiden isolierten Fragmente wurden ligiert und anschließend in *E. coli* DH5 α eingebracht. Die Zellen wurden auf Platten mit Kanamycin ausgestrichen. Insgesamt wurden etwa 100-200 Klone erhalten. Positive Klone wachsen nicht mehr auf Ampicillin, aber auf Kanamycin. Positive Klone wurden durch Kontrollverdaus mit verschiedenen Restriktionsenzymen identifiziert. Plasmide aus mehreren Klonen wurden mit AccI und EcoRI (die innerhalb des fdh-Gens schneiden) verdaut. So konnte ein ganz bestimmter Klon als positiv identifiziert werden (Abbildung A-4).

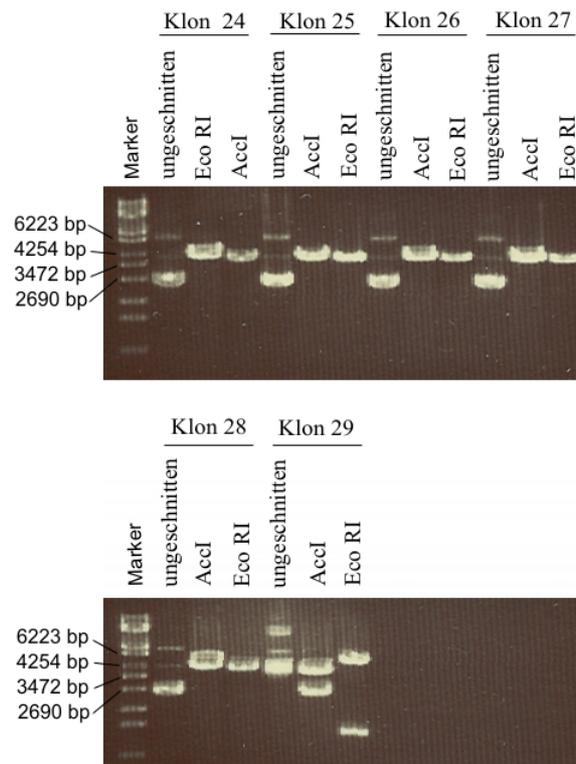


Abbildung A-4: Restriktion zur Überprüfung des Klonierungserfolgs: Zu sehen sind die resultierenden Fragmente eines Verdau von Plasmid-DNA sechs verschiedener Klone mit *AccI* und *EcoRI*. Das Fragmentierungsmuster von Klon 29 weist auf ein positives Klonierungsergebnis hin. (Auftrennung über 1%iges Agarosegel, 40 Min bei 90 V)

Abbildung A-5 zeigt das Ergebnis der Klonierung.

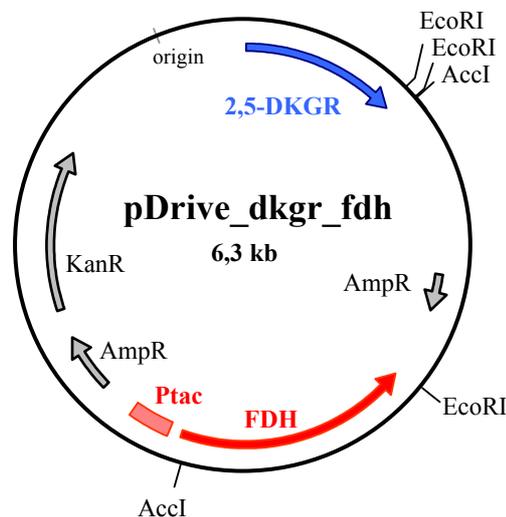
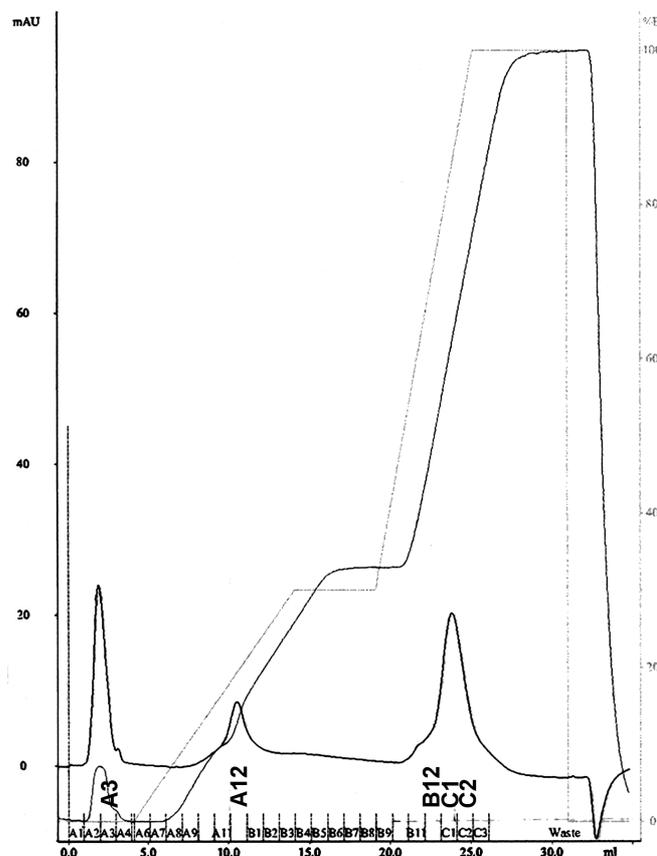


Abbildung A-5: Ergebnis der Klonierung: Plasmid *pDrive_dkgr_fdh*, bestehend aus Formiatdehydrogenase-Gen (FDH) mit *Ptac*-Promotor (*Ptac*), 2,5-Diketogluconatreduktase-Gen (2,5-DKGR) und Kanamycin-Resistenzgen (*KanR*). Eine Ampicillin-Resistenz ist nicht mehr vorhanden, da das Ampicillin-Resistenzgen (*AmpR*) unterbrochen ist. Eingezeichnet sind die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *AccI* und *EcoRI*, mit denen die Kontrollverdau durchgeführt wurden.

A.2.2 Enzymaufreinigung über Ionenaustauschersäule



Um die Sauberkeit der Enzymfraktionen weiter zu erhöhen, wurde eine passende FPLC-Methode entwickelt: Die Enzymlösungen wurden auf eine starke Anionenaustauschersäule mit $N^+(CH_3)_3$ -Funktion aufgegeben, das Enzym wurde über einen Puffer mit hoher Salzkonzentration wieder eluiert. In Abbildung A-6 ist ein solcher Chromatographie-Lauf gezeigt.

Abbildung A-6: Aufreinigung der 2,5-DKGR über eine Ionenaustauschersäule

Dabei können drei verschiedene Fraktionen unterschieden werden: A3 umfasst nicht absorbierte Proteine, Fraktion A12 enthält Proteine, die eluiert werden, sobald der Salzgehalt des Puffers leicht steigt. In B12 bis C2 sind Proteine, die eluiert werden, wenn der Salzgehalt etwa 300 mM (60% Puffer B) erreicht. Für detaillierte Beschreibungen der Methode siehe Abschnitt 8.8.3.

Um die einzelnen Fraktionen eines FPLC-Laufes zu identifizieren, wurden sie auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abbildung A-7, links). Außerdem wurden sie auf Aktivität der 2,5-DKGR hin überprüft (Abbildung A-7, rechts).

Dabei zeigte sich deutlich, dass sich das Enzym 2,5-DKGR über die neu entwickelte Methode aufreinigen lässt: In den Fraktionen B12 bis C2 ist hauptsächlich 2,5-DKGR enthalten (Bande bei 34.000 Dalton und hohe Enzymaktivität), in den Fraktionen A3 und A12 hingegen lediglich Proteinverunreinigungen, darunter auch das unerwünschte Protein mit einem Molekulargewicht von 20.000-25.000 Dalton. Die Fraktionen B12 bis C2 enthalten diese Verunreinigung nicht mehr.

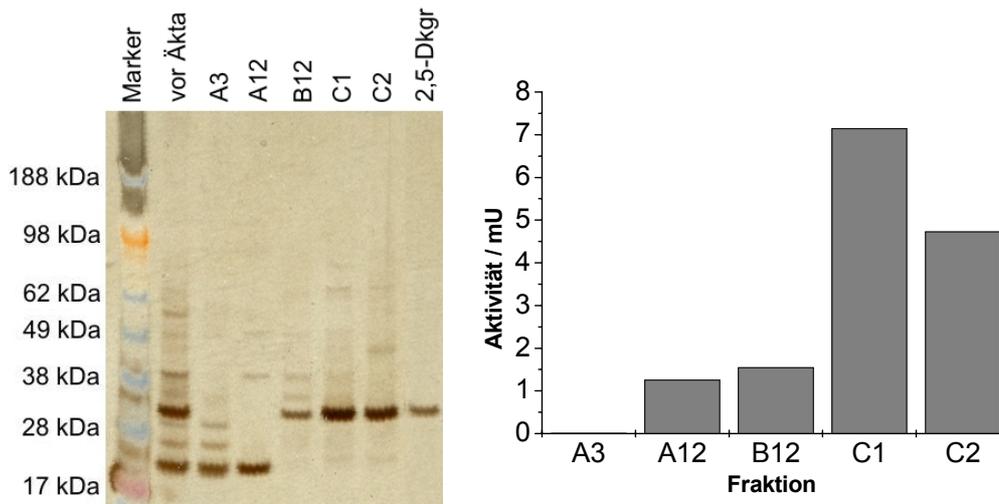


Abbildung A-7: Aufreinigung der 2,5-DKGR über Ionenaustauschersäule: Resultierende Fraktionen und deren Aktivität. Vgl. Abbildung A-6.

Die Aktivität der Enzymfraktionen in $\text{U/mg}_{\text{Protein}}$ kann dadurch stark gesteigert werden (nicht gezeigt). Jedoch wurde diese FPLC-Methode erst in der zweiten Hälfte der Arbeit entwickelt, so dass einige der beschriebenen Versuche mit den ursprünglichen Enzymfraktionen durchgeführt wurden.

A.2.3 Einfluss der Lyophilisation

Einige Enzyme verlieren einen Großteil ihrer Aktivität, wenn sie lyophilisiert werden, beispielsweise die Enterokinase: Dieses Enzym wird besser in Lösung eingefroren [Minör 2007]. Die 2,5-DKGR hingegen verträgt Lyophilisation und Einfrieren in Lösung gleich gut (Abbildung A-8). In beiden Fällen verliert das Enzym etwa 20% seiner Aktivität. Lyophilisiertes Enzym ist praktischer in der Lagerung und im täglichen Umgang, daher wurden alle 2,5-DKGR-Fraktionen lyophilisiert.

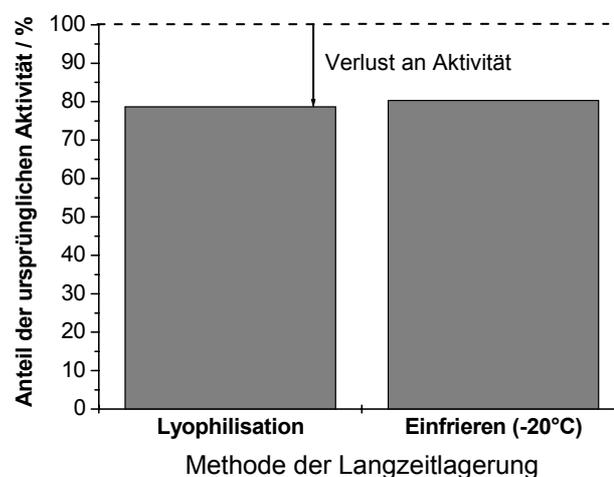


Abbildung A-8: Einfluss von Lyophilisation und Einfrieren auf die Aktivität der 2,5-DKGR.

A.2.4 Kinetik der ADH aus *Lactobacillus brevis*

A.2.4.1 Oxidation von Isopropanol

Die *Lb*-ADH zeigt eine Michaelis-Menten-Doppelsubstratkinetik (Isopropanol, NADP^+) ohne Substratüberschussinhibierung. Sie wird durch das Produkt Aceton und den reduzierten Cofaktor NADPH gehemmt (Abbildung A-9) und durch 2-KLG inhibiert (Abbildung A-10).

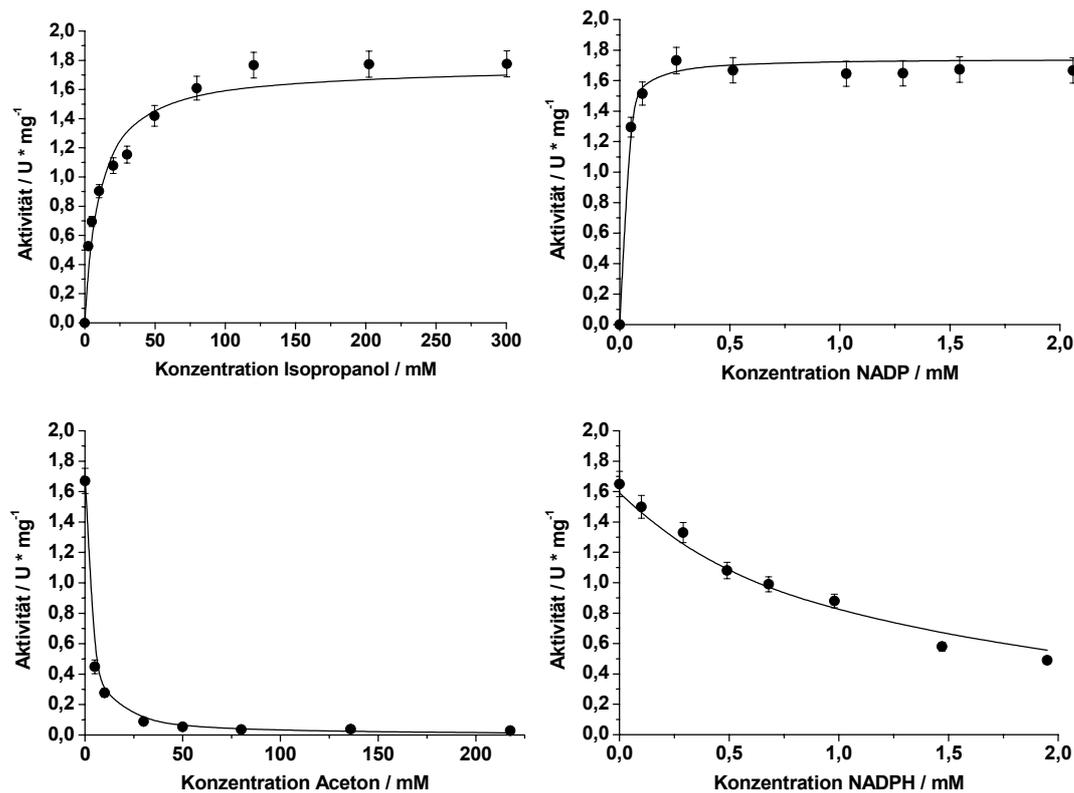


Abbildung A-9: Enzymkinetik der *Lb*-ADH für die Oxidation von Isopropanol mit NADP als Cofaktor. Bedingungen: 20°C, 100 mM Na-Acetat, 50 mM KP_i-Puffer, pH 6,4, 0,1 mg/mL *Lb*-ADH, V=1mL. Oben links: 0,19 mM NADP, 0-300 mM Isopropanol. Oben rechts: 157 mM Isopropanol, 0-2,1 mM NADP. Unten links: 0,4 mM NADP, 157 mM Isopropanol, 0-218 mM Aceton. Unten rechts: 157 mM Isopropanol, 0,1 mM NADP, 0-2 mM NADPH.

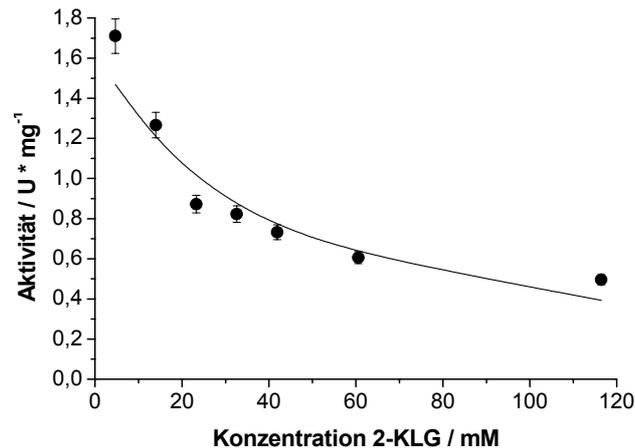


Abbildung A-10: Inhibierung der *Lb*-ADH durch 2-KLG bei der Oxidation von Isopropanol (für alle drei Inhibierungsarten gleich). Bedingungen: 20°C, 100 mM Na-Acetat, 50 mM KP_i-Puffer, pH 6,4, 156,8 mM Isopropanol, 0,2 mM NADP, 4,7-116,4 mM 2-KLG.

Drei Modelle (Formel A-2 bis Formel A-4) wurden mit Hilfe der Software Scientist an die Messdaten angepasst. Die drei Modelle unterschieden sich dabei in der Art von Inhibierung, die 2-KLG auf das Enzym ausübt.

$$v = v_{\max} \cdot \frac{cNADP}{K_M NADP \cdot \left(1 + \frac{cNADPH}{K_i NADPH}\right) + cNADP} \cdot \frac{cIsoprop}{K_M Isoprop \cdot \left(1 + \frac{c2KLG}{K_i KLG}\right) \cdot \left(1 + \frac{cAceton}{K_i Aceton}\right) + cIsoprop}$$

Formel A-2: Kompetitive Hemmung durch 2-KLG

$$v = v_{\max} \cdot \frac{cNADP}{K_M NADP \cdot \left(1 + \frac{cNADPH}{K_i NADPH}\right) + cNADP} \cdot \frac{cIsoprop}{K_M Isoprop \cdot \left(1 + \frac{cAceton}{K_i Aceton}\right) + \left(1 + \frac{c2KLG}{K_i 2KLG}\right) \cdot cIsoprop}$$

Formel A-3: Unkompetitive Hemmung durch 2-KLG

$$v = v_{\max} \cdot \frac{cNADP}{K_M NADP \cdot \left(1 + \frac{cNADPH}{K_i NADPH}\right) + cNADP} \cdot \frac{cIsoprop}{\left(K_M Isoprop \cdot \left(1 + \frac{cAceton}{K_i Aceton}\right) + cIsoprop\right) \cdot \left(1 + \frac{c2KLG}{K_i 2KLG}\right)}$$

Formel A-4: Nichtkompetitive Hemmung durch 2-KLG

Berechnet wurden so die kinetischen Konstanten für die Oxidation von Isopropanol (Tabelle A-2). Auf welche Art 2-KLG das Enzym inhibiert, konnte an dieser Stelle noch nicht festgestellt werden: Die Anpassung war für alle drei Modelle gleich gut (siehe Tabelle A-3). Der erhaltene K_i -Wert für 2-KLG variiert jedoch relativ stark.

Tabelle A-2: Kinetische Konstanten der *Lb*-ADH für die Oxidation von Isopropanol

$v_{\max} / U \cdot \text{mg}^{-1}$	$1,9 \pm 0,1$
$K_M \text{ NADP} / \text{mM}$	$0,01 \pm 0,004$
$K_M \text{ Isopropanol} / \text{mM}$	$9,7 \pm 1,3$
$K_i \text{ NADPH} / \text{mM}$	$0,1 \pm 0,03$
$K_i \text{ Aceton} / \text{mM}$	$0,1 \pm 0,03$

Tabelle A-3: Inhibierung durch 2-KLG

Gleichung	Inhibierungsart	K_i 2-KLG [mM]	Determinationskoeff. R^2
Formel A-2	kompetitiv	$2,1 \pm 0,3$	0,995
Formel A-3	unkompetitiv	$36,2 \pm 3,7$	0,995
Formel A-4	nichtkompetitiv	$34,1 \pm 3,6$	0,995

A.2.4.2 Reduktion von Aceton

Beobachtet wurde eine Michaelis-Menten-Doppelsubstratkinetik (Aceton, NADPH) mit einer Substratüberschussinhibierung durch hohe Konzentrationen Aceton. Außerdem wird die *Lb*-ADH durch das Produkt Isopropanol und den oxidierten Cofaktor NADP gehemmt (Abbildung A-11). Auch 2-KLG inhibiert das Enzym (Abbildung A-12).

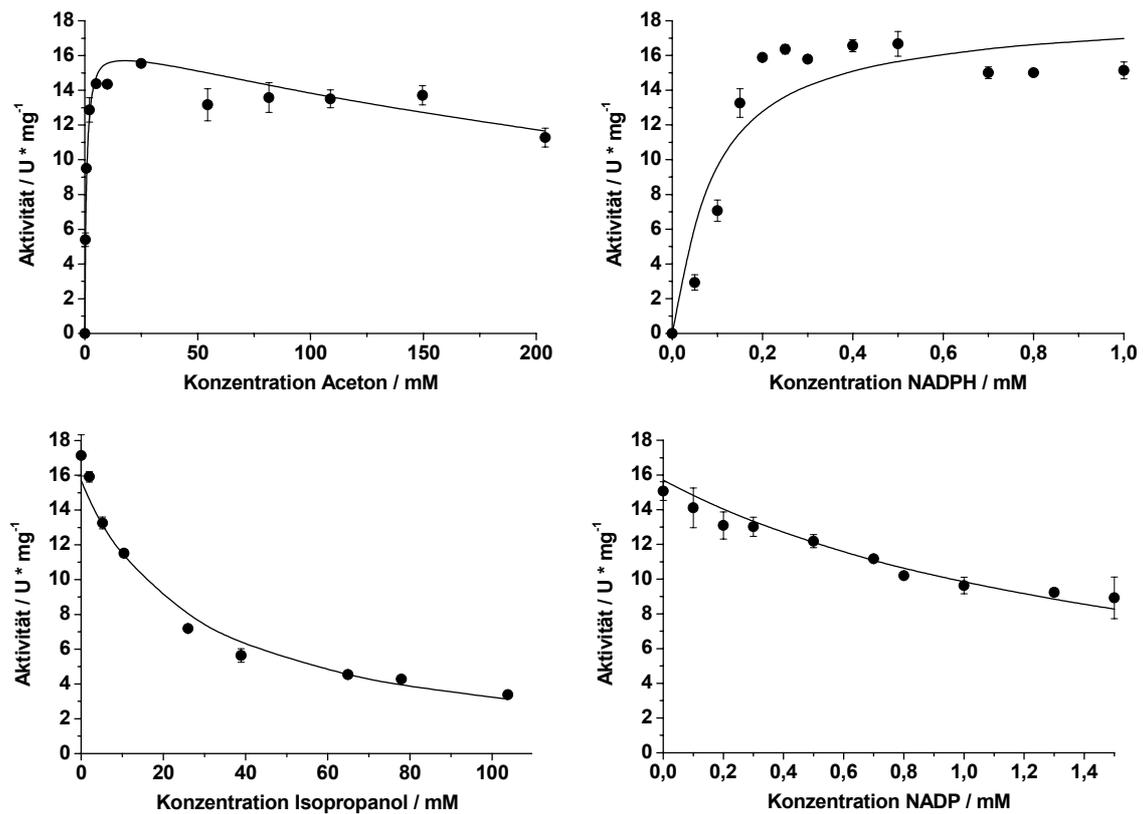


Abbildung A-11: Enzymkinetik der *Lb*-ADH für die Reduktion von Aceton mit NADPH als Cofaktor. Bedingungen: 20°C, 100 mM Na-Acetat, 50 mM KP_i-Puffer, pH 6,4, 0,1 mg/mL *Lb*-ADH, V=1 mL. Oben links: 0,5 mM NADPH, 0-204 mM Aceton. Oben rechts: 0-1 mM NADPH, 27 mM Aceton. Unten links: 27 mM Aceton, 0,5 mM NADPH, 0-104 mM Isopropanol. Unten rechts: 27 mM Aceton, 0,5 mM NADPH, 0-1,5 mM NADP.

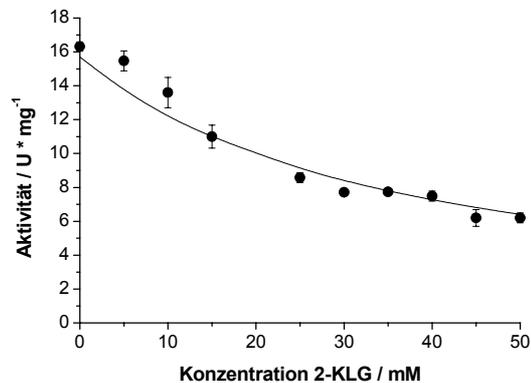


Abbildung A-12: Inhibierung der *Lb*-ADH durch 2-KLG bei der Reduktion von Aceton (für alle drei Inhibierungsarten gleich). Bedingungen: 20°C, 100 mM Na-Acetat, 50 mM KP_i-Puffer, pH 6,4, 27,2 mM Aceton, 0,5 mM NADPH, 0-50 mM 2-KLG.

Mit Hilfe der Software Scientist wurden drei Modelle (Formel A-5 bis Formel A-7) an die Messwerte angepasst.

$$v = v_{\max} \cdot \frac{cNADPH}{K_M NADPH \cdot \left(1 + \frac{cNADP}{K_i NADP}\right) + cNADPH} \cdot \frac{cAceton}{K_M Aceton \cdot \left(1 + \frac{c2KLG}{K_i 2KLG}\right) \cdot \left(1 + \frac{cIsoprop}{K_i Isoprop}\right) + cAceton \cdot \left(1 + \frac{cAceton}{K_i Aceton}\right)}$$

Formel A-5: kompetitive Inhibierung durch 2-KLG

$$v = v_{\max} \cdot \frac{cNADPH}{K_M NADPH \cdot \left(1 + \frac{cNADP}{K_i NADP}\right) + cNADPH} \cdot \frac{cAceton}{K_M Aceton \cdot \left(1 + \frac{cIsoprop}{K_i Isoprop}\right) + \left(1 + \frac{c2KLG}{K_i 2KLG}\right) \cdot cAceton \cdot \left(1 + \frac{cAceton}{K_i Aceton}\right)}$$

Formel A-6: unkompetitive Inhibierung durch 2-KLG

$$v = v_{\max} \cdot \frac{cNADPH}{K_M NADPH \cdot \left(1 + \frac{cNADP}{K_i NADP}\right) + cNADPH} \cdot \frac{cAceton}{\left(K_M Aceton \cdot \left(1 + \frac{c2KLG}{K_i 2KLG}\right) + cAceton \cdot \left(1 + \frac{cAceton}{K_i Aceton}\right)\right) \cdot \left(1 + \frac{cIsoprop}{K_i Isoprop}\right)}$$

Formel A-7: nicht-kompetitive Inhibierung durch 2-KLG

Folgende kinetischen Konstanten für die Reduktion von Aceton wurden erhalten:

Tabelle A-4: Kinetische Konstanten der Lb-ADH für die Reduktion von Aceton

$v_{\max} / \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	$20,0 \pm 1,0$
$K_M \text{ NADPH} / \text{mM}$	$0,09 \pm 0,02$
$K_M \text{ Aceton} / \text{mM}$	$0,6 \pm 0,1$
$K_i \text{ NADP} / \text{mM}$	$0,3 \pm 0,1$
$K_i \text{ Isopropanol} / \text{mM}$	$0,5 \pm 0,1$
$K_i \text{ Aceton} / \text{mM}$	$449,3 \pm 134,8$

Auch hier konnte nicht entschieden werden, auf welche Art 2-KLG das Enzym inhibiert. Die Anpassung war für alle drei Modelle gleich gut. Erst nach Reaktionen im Satzreaktor wurde sich für eine unkompetitive Hemmung entschieden (Abschnitt 4.7.2).

Tabelle A-5: K_i für 2-KLG bei unterschiedlichen Inhibierungsarten

Gleichung	Inhibierungsart	K_i 2-KLG [mM]	Determinationskoeff. R^2
Formel A-5	kompetitiv	$0,7 \pm 0,2$	0,990
Formel A-6	unkompetitiv	$33,8 \pm 4,5$	0,990
Formel A-7	nichtkompetitiv	$34,5 \pm 4,5$	0,990

Vergleiche mit zuvor gemachten Untersuchungen auf diesem Gebiet [Schroer 2008]
siehe Abschnitt 4.6.2.

A.3. Scientist-Modelle

A.3.1 Oxidation von Glucose zu 2,5DKG im CSTR

```
// cDKG      = Konzentration von 2,5-DKG [mM]
// cGlucose  = Konzentration von Glucose [mM]
// t        = Zeit [min]
// v        = Reaktionsgeschwindigkeit [U/L]
// BM       = Biomassekonzentration [g Zellen / L]
// km       = Michaelis-Menten-Konstante [mM]
// kidkg    = Inhibierungskonstante für 2,5-DKG [mM]
// vmax     = Maximalgeschwindigkeit in U/g

// Variables and parameters
IndVars: t
DepVars: cGlucose, cDKG, v, ausbeute
Params: vmax, km, kidkg

//Kinetic equations
//v2 entfällt, da Oxidation von 2,5-DKG nicht reversibel

v=BM*vmax*(cGlucose/(km*(1+(cdkg/kidkg))+cGlucose))

//Mass balance equations
cGlucose'=(50-cGlucose)/tau-(v/1000)
cDKG'=(0-cDKG)/tau+(v/1000)
//durch 1000, weil U in µmol berechnet, c Glucose aber in mM)

ausbeute=cDKG/(cGlucose+cDKG)*100

//Initial conditions
cGlucose=50
cDKG=0
BM=100
t=0

VMAX=78.3
KM=9.1
Kidkg=9.4

//residence time in minutes
tau=30
***
```

A.3.2 Reduktion von 2,5-DKG zu 2-KLG im EMR

// Reduktion von 2,5DKG im EMR, with cofactor NADPH, and cofactor regeneration by isopropanol und Lb-ADH

//unkompetitive Hemmung durch 2-KLG auf Lb-ADH

// cDKG = Konzentration von 2,5-DKG [mM]

// cKLG = Konzentration von 2-KLG [mM]

// cNADPH = Konzentration von NADPH [mM]

// cNADP = Konzentration von NADP [mM]

// t = Zeit [min]

// v = Reaktionsgeschwindigkeit [U/mg]

// red = Konzentration von Reduktase [mg Enzym / ml]

// KmDKG = Michaelis-Menten-Konstante für 2,5-DKG [mM]

// KmNADPH= MichaelisMentenKonstante für NADPH [mM]

// Kinadp = Inhibierungskonstante für NADP [mM]

// Kidkg = Substratüberschußinhibierungskonstante für 2,5-DKG [mM]

// vmax = Maximalgeschwindigkeit in U/mg

//cADH = Konz der ADH [mg/ml]

// Variables and parameters

IndVars: t

DepVars: cDKG, cKLG, cAce, cIso, cNADPH, cNADP, v1, v4, v3, umsatz

Params: vmax1, kmDKG, kidkg, kmNADPH, kinadp, vmax3, km31, kp31, ks31, km32, kp32, vmax4, km41, kp4, km42, kp42, kiklg

//Kinetic equations

//v2 entfällt, da Reduktion von 2,5-DKG nicht reversibel

$$v1 = \text{red} * v_{\text{max}1} * c_{\text{DKG}} * c_{\text{NADPH}} / ((k_{\text{mDKG}} + c_{\text{DKG}} * (1 + (c_{\text{dkg}} / k_{\text{idkg}}))) * (k_{\text{mNADPH}} * (1 + c_{\text{NADP}} / k_{\text{inadp}}) + c_{\text{NADPH}}))$$

$$v3 = v_{\text{max}3} * c_{\text{Ace}} * c_{\text{NADPH}} * c_{\text{ADH}} / ((k_{\text{m}31} * (1 + c_{\text{Iso}} / k_{\text{p}31}) + ((1 + (c_{\text{KLG}} / k_{\text{iklg}})) * c_{\text{Ace}} * (1 + c_{\text{Ace}} / k_{\text{s}31}))) * (k_{\text{m}32} * (1 + c_{\text{NADP}} / k_{\text{p}32}) + c_{\text{NADPH}}))$$

$$v4 = v_{\text{max}4} * c_{\text{Iso}} * c_{\text{NADP}} * c_{\text{ADH}} / (((k_{\text{m}41} * (1 + c_{\text{Ace}} / k_{\text{p}41})) + ((1 + (c_{\text{KLG}} / k_{\text{iklg}})) * c_{\text{Iso}})) * (k_{\text{m}42} * (1 + c_{\text{NADPH}} / k_{\text{p}42}) + c_{\text{NADP}}))$$

//Mass balance equations

$$c_{\text{DKG}}' = (28 - c_{\text{DKG}}) / \tau - v1$$

$$c_{\text{KLG}}' = (0 - c_{\text{KLG}}) / \tau + v1$$

$$c_{\text{Ace}}' = (0 - c_{\text{Ace}}) / \tau - v3 + v4$$

$$c_{\text{Iso}}' = (1000 - c_{\text{Iso}}) / \tau + v3 - v4$$

$$c_{\text{NADPH}}' = -v1 - v3 + v4$$

$$c_{\text{NADP}}' = v1 + v3 - v4$$

$$\text{umsatz} = c_{\text{KLG}} / (c_{\text{DKG}} + c_{\text{KLG}}) * 100$$

//Initial conditions

cDKG=28
cKLG=0
cIso=1000
cAce=0
cNADPH=0
cNADP=0.04
red=2.5
cADH=5.5
t=0

//Reduktase

VMAX1=17.473
KMDKG=10.818
KMNADPH=0.00261
Kinadp=0.0081
Kidkg=21.029

//ADH rueck

VMAX3=19.965
KM31=0.573
KP31=0.503
KS31=449.25
KM32=0.0877
Kp32=0.249
Kiklg=33.798

//ADH hin

VMAX4=1.851
KM41=9.737
KP41=0.1072
KM42=0.0104
KP42=0.0905
kiklg=36.24

//residence time in minutes

tau=20
