Schlussbericht

Verbundvorhaben

Einsatz von Hefen zur Gewinnung natürlicher Wertstoffe für die Spezialchemie aus nachwachsenden Rohstoffen

Ausführende Stellen mit dem jeweiligen Förderkennzeichen:

DECHEMA e. V., Karl-Winnacker-Institut, Frankfurt (KWI)	22008803
Degussa GmbH, Hanau (Degussa)	22022403 (03NR224)
Johann-Wolfgang-Goethe Universität Frankfurt, Institut für molekulare Biowissenschaften. Molekulare Genetik und Zelluläre Mikrobiologie (Uni FFM)	22022403
Scientific Research and Development GmbH, Oberursel (SRD)	22022203

Inhalt

I.1 AUFGABENSTELLUNG 4
I.2 VORAUSSETZUNGEN 4
I.3 PLANUNG UND ABLAUF DES VORHABENS 4
I.4 WISSENSCHAFTLICHER UND TECHNISCHER STAND ZU PROJEKTBEGINN 5
I.5 ZUSAMMENARBEIT MIT ANDEREN STELLEN 6
II.1 ERZIELTE ERGEBNISSE 6
Herstellung von Einfach- und Mehrfachdeletionsmutanten der Gene des Ehrlichstoffwechsels 6
Δaro8 und Δaro9 Deletionsstämme 8
Δgap1, Δmup1 und Δmup3 Deletionsstämme 9
Herstellung von Überexpressionsmutanten der Gene des Ehrlichstoffwechsels 10
Genomisch integrierte Überexpressionsmutanten 11
ARO8 und ARO9 Überexpressionsmutanten 12
Plasmidkodierte Überexpressionsmutanten 13
Plasmidkodierte ARO8 und ARO9 Überexpressionen 14
Plasmidkodierte ADH6 und ADH7 Überexpressionen 15
Transkriptomanalyse des Ehrlich-Stoffwechsels mit Micro-Arrays (Uni FFM) 16
Entwicklung analytischer Methoden 18
Screening und Optimierung der in-situ Produktabtrennung 18
Organophile Pervaporation 19
Zweiphasenkultivierung 19
Pertraktion 20
Adsorption 22
Charakterisierung der verwendeten Hefestämme 22
Screening von Wildtypen 22
Screening von Deletions- und Überexpressionsmutanten 23
Produktinihibierung 25
Prozessoptimierung zur Produktion von Methioninderivaten im Labormaßstab am KWI 27
Abhängigkeit der Produktbildung von der Zelldichte und der Glucose-Fütterungsstrategie 27
Temperaturabhängigkeit der Produktbildung bei S. cerevisiae CEN.PK 834-1C 32
Schlussfolgerungen aus der Prozessoptimierung zur Produktion von Methioninderivaten 34
Prozessoptimierung zur Produktion von Phenylalaninderivaten im Labormaßstab bei der Degussa 35
Scale-up in den Technikumsmaßstab 36

II.2 VORAUSSICHTLICHER NUTZEN DER FORSCHUNGSERGEBNISSE - VERWERTUNGSPLAN 37
Wirtschaftlichkeitsbetrachtung..... 37
2-Phenylethanol 38
Methionol..... 38
Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten 39
II.3 FORTSCHRITT AUF DEM FORSCHUNGSGEBIET BEI ANDEREN STELLEN 40
II.4 VERÖFFENTLICHUNGEN 40
II.5 LITERATUR..... 40

I.1 Aufgabenstellung

Das Gesamtziel des Vorhabens war die Entwicklung einer Plattformtechnologie zur Biokonversion von Glucose und Aminosäuren aus nachwachsenden Rohstoffen zu natürlichen Wertstoffen für die Spezialchemie, insbesondere von Riech- und Aromastoffen. Basis des Verfahrens war der Ehrlich-Stoffwechselweg, mit dem viele Hefen wachstumsgekoppelt Aminosäuren in die korrespondierenden Alkohole und Acetatester umsetzen. Durch eine intensive Verzahnung von molekularbiologischer Modulation und gleichzeitiger verfahrenstechnische Optimierung sollte ein leistungsfähiger Bioprozess entwickelt werden.

I.2 Voraussetzungen

Am Karl-Winnacker-Institut der Dechema e.V. (KWI) wurden in einem vorangegangenen Projekt verfahrenstechnische Aspekte des Ehrlich-Stoffwechselweges optimiert (Etschmann, M.M.W. 2004). Die Arbeitsgruppe verfügt über umfangreiche bioverfahrenstechnische Erfahrung sowie über die notwendige apparative Ausstattung hinsichtlich Kultivierung von Mikroorganismen und Analytik für Duft- und Aromastoffe (GC, GC/MS, HPLC).

Im verfahrenstechnischen Servicebereich der Degussa GmbH besteht umfangreiche Expertise in der Aminosäurefermentation und bei der Produktion von Duft- und Aromastoffen sowie über die Marktsituation im Bereich Aminosäuren und Duft- und Aromastoffen. Auf technologischem Gebiet besitzt er hohe bioverfahrenstechnische Kompetenz in der Umsetzung von Laborexperimenten in den Technikums- und Produktionsmassstab, insbesondere in der Fermentations- und Aufarbeitungstechnik biotechnologischer Produkte, sowie über geeignete Werkzeuge für Wirtschaftlichkeitesabschätzungen.

Die Scientific Research and Development GmbH (SRD) hat ihren Forschungsbereich hauptsächlich in der Stammkonstruktion für biotechnologische Verfahren und der Entwicklung neuer Expressions-/Screeningsysteme. Ferner besteht der Serviceschwerpunkt von SRD in der Hochdurchsatz DNA-Sequenzierung in Publikationsqualität.

Gemeinsam mit dem Institut für Molekulare Biowissenschaften der Universität Frankfurt (Uni FFM) unterhält sie eine der grössten *S. cerevisiae* Sammlungen (EUROSCARF, http://www.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf).

Die Arbeitgruppe von Prof. Dr. K.-D. Entian am Institut für Molekulare Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe Universität (Uni FFM) beschäftigt sich seit Jahren schwerpunktmässig mit der Genomfunktionsanalyse der Hefe *S. cerevisiae*. Ein besonderer Focus der Arbeiten liegt auf der Analyse des Kohlenhydrat- und Aminosäure-Stoffwechsels.

I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Nach der Entwicklung der analytischen Methoden bei KWI und Degussa zum Nachweis und zur Quantifizierung der verschiedenen Substrate und Produkte mussten bei beiden Partnern die Laborbioprozesse etabliert werden. Dann war mit einem Screening am KWI zu prüfen, welche der gewünschten Duft- und Aromastoffe nach Biokonversion mit Wildtypstämmen von *S. cerevisiae* nachzuweisen sind. Durch *in-situ* Produktabtrennung (ISPR) der inhibierenden Produkte wird eine Ausbeutesteigerung erreicht; dazu waren geeignete Extraktionsmittel für die verschiedenen Kombinationen aus Mikroorganismen und Substraten zu ermitteln.

Parallel zu diesen Arbeiten wurden von SRD und Uni FFM Einfach- und Mehrfachdeletionsmutanten der Gene des Ehrlichstoffwechsels hergestellt, die anschliessend am KWI kultiviert und analysiert wurden.

Ein Kennzeichen des Projektes war der Aufbau eines integrierten Bioprozesses durch Kopplung von Bioreaktor und ISPR-Modul. Bei der Degussa lag dabei der Fokus auf der Pertraktion, daher wurden verschiedene kommerziell erhältliche Membranen auf ihre Eignung für das vorliegende Trennproblem untersucht. Am KWI wurden in analoger Weise Variationen der ISPR-Methoden flüssig-flüssig Extraktion (Zweiphasenkultur) und Pervaporation hinsichtlich ihrer Eignung für die angestrebten Biokonversionssysteme/Produkte gescreent und optimiert. Während der Arbeiten wurden die Ergebnisse der Partner KWI und Degussa ständig verglichen, so dass am Ende dieses Arbeitspaketes die ISPR-Methode der Wahl festgelegt werden konnte.
Aufbauend auf den Erkenntnissen der Untersuchung der Deletionsmutanten stellten SRD und Uni FFM Einfach- und Mehrfachüberexpressionsmutanten der Gene des Ehrlichstoffwechsels her, die anschliessend am KWI kultiviert und analysiert wurden. Für die vielversprechendsten Stämme wurde die Kultivierung in verfahrenstechnischer Hinsicht optimiert. Am KWI lag der Schwerpunkt dabei auf der Untersuchung der ISPR-Methoden Pervaporation und Extraktion im Labormaßstab, während die Degussa auf die Pertraktion und das Scale-up in den Technikumsmaßstab fokussiert war.

I.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Projektbeginn

Viele Hefen, wie z.B. *Saccharomyces cerevisiae*, setzen wachstumsgekoppelt Aminosäuren in die korrespondieren Alkohole um. Als metabolisches Folgeprodukt können zusätzlich die Acetatester gebildet werden (Abbildung 1).

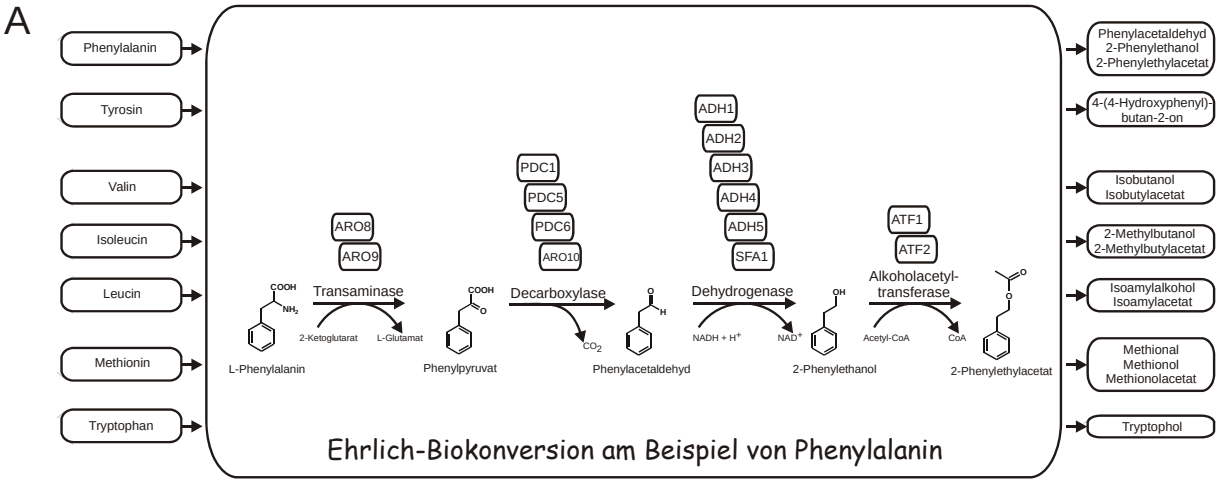


Abb.1: Schematische Darstellung des Ehrlich-Stoffwechselweges und der beteiligten Gene

Zucker in Form von Saccharose oder Glucose dient als Kohlenstoff- und Energiequelle des Biokonversionsprozesses. Aus der Vielzahl der interessanten Substrate - die Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin, Valin, Isoleucin, Leucin, Methionin und Tryptophan sowie Glucose - die alle den Ehrlich-Stoffwechselweg durchlaufen bzw. in diesen einmünden, ergibt sich eine grosse Zahl an Produkten (z.B. Methional, Methionol, 2-Phenylethanol, Phenylacetaldehyd, 2-Phenylethylacetat, Isobutanol, Isobutylacetat, 2-Methylbutanol, 2-Methylbutylacetat, Isoamylalkohol, Isoamylacetat, Tryptophol, Tyrosol) welche auf Basis desselben biotechnologischen Grundprinzips gewonnen werden können. Allen Produkten gemein ist ihre Qualität als Duft- und Aromastoffe. Sie finden breite Anwendung in der Parfüm-, Kosmetik-, Lebensmittel- und pharmazeutischen Industrie.
Durch ihre Hydrophobizität sind Duft- und Aromastoffe jedoch schon in geringen Konzentrationen wachstumshemmend für Mikroorganismen, Deshalb ist die Einbindung einer in-situ Produktabtrennung (in-situ product removal „ISPR“) in den Produktionsprozess essentiell, vor allem wenn es gelingen sollte, durch molekularbiologische Methoden verbesserte Hochleistungsstämme zu

erzeugen (Etschmann, M.M. et al. 2002). Der Vorteil integrierter Bioprozesse ist die direkte Beeinflussung der biotechnologischen Produktion durch online-Produktabtrennung: Inhibierende Einflüsse der Produkte werden weitestgehend umgangen und so die Produktivität deutlich erhöht.
Waren es bisher zumeist Wildtyp-Hefen, die zu Synthesezwecken eingesetzt wurden, haben sich durch die inzwischen komplett aufgeklärte Genomsequenz von *Saccharomyces cerevisiae* völlig neue Wege für eine gezielte Optimierung von Produktionsstämmen eröffnet. Durch gezielte Überexpression des *ATF1* Gens, einer Alkoholacetyltransferase, in *S. cerevisiae* konnte die Ausbeute der aromaintensiver Fruchtester bis > 10fach erhöht werden (Lilly, M. et al. 2000). Kürzlich wurde sogar der Katabolismus von Aminosäuren zu ihren korrespondierenden Alkoholen über den Ehrlichweg in *S. cerevisiae* molekularbiologisch aufgeklärt (Dickinson, J.R. et al. 2003).

I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Abbildung 2 veranschaulicht schematisch die Kooperation der Projektpartner und die jeweiligen Arbeitsschwerpunkte im Forschungsverbund über das gesamte Vorhaben

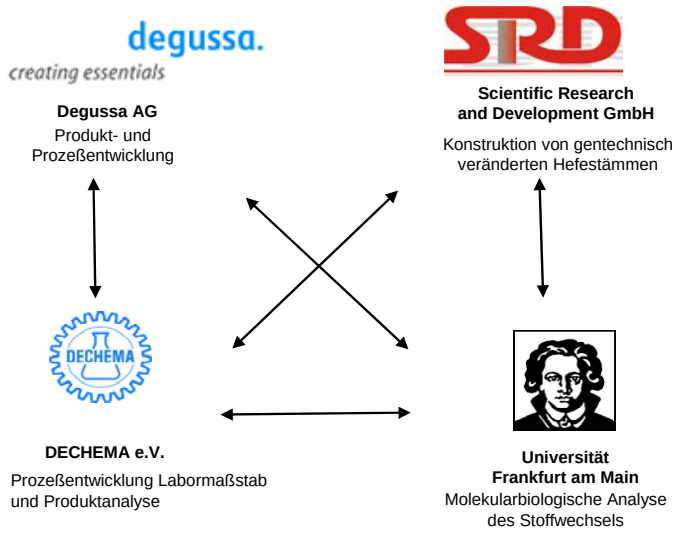


Abb. 2: Kooperation der Projektpartner

II.1 Erzielte Ergebnisse

Herstellung von Einfach- und Mehrfachdeletionsmutanten der Gene des Ehrlichstoffwechsels

Die Mutanten wurden mit der Methode der so genannten Einschritt-Gendeletion hergestellt, die es erlaubt präzise einen bestimmten Bereich (z.B. den kodierenden Bereich) eines *GENX* aus dem Genom zu entfernen und durch ein Markergen zu ersetzen und somit eine nicht revertierbare Nullmutation zu erzeugen.
Das Prinzip der Gendeletion basiert auf homologer Rekombination zwischen der chromosomalen Kopie eines *GENX* und einem *in vitro* hergestelltem Konstrukt (Deletions-Kassette). Dazu wird ein DNA Fragment, dessen Enden homolog sind zum *GENX*, das aber zwischen den Enden statt des offenen Leserahmens für *GENX* ein selektierbares Markergen trägt, in die zu deletierende Hefezelle transformiert. Die Transformation wurde generell in dem diploiden und prototrophen CEN.PK122

Stamm durchgeführt. Die erhaltenen Transformanten wurden zur Sporulation (Meiose) gebracht. Anschliessend wurden die erhaltenen Tetraden mittels Mikromanipulator separiert und die einzelnen Segreganten phänotypisch charakterisiert um die WT-Stämme von den Deletions-Stämmen zu unterscheiden (siehe Abb. 3).

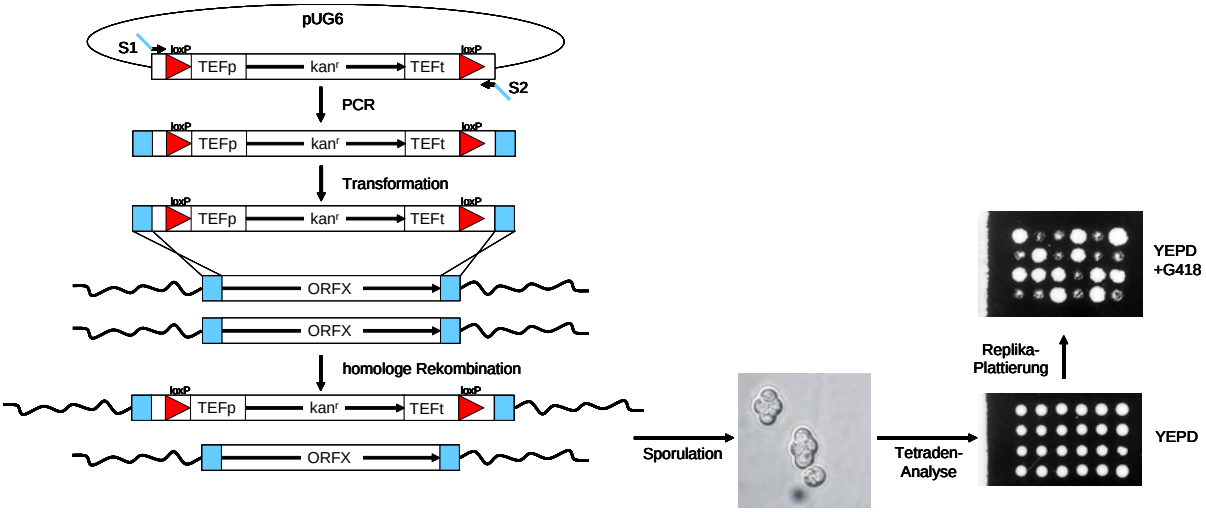


Abb. 3: Schematische Darstellung der Herstellung von Deletionsmutanten mittels homologer Rekombination.

Um eine erfolgreiche Deletion nachzuweisen und damit eindeutig von illegitimen Rekombinations-ereignissen zu unterscheiden, wurde der Genotyp G418-resistenter Transformanten bzw. Segreganten mittels diagnostischer PCR am *GENX* Locus bestimmt.
Die Deletions-Kassette (kanMX-Modul) mit kurzen (40bp) homolgen Bereichen wurde mittels PCR an dem Plasmid pUG6 als Template erzeugt (Güldener et al., 1996). In diesem Versuch ist das zwischen die homologen Enden inserierte Markergen das prokaryotische Antibiotika-Resistenz Gen *kan*^{r} aus dem Transposon Tn903, das die Selektion auf Platten mit dem Aminoglykosid-Antibiotikum Geneticin (G418) erlaubt. Damit das *kan*^{r} Gen in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert wird, ist es von Promoter und Terminator Sequenzen des stark exprimierten *TEF* Gens des Pilzes *Ashbya gossypii* flankiert.

Doppel- bzw. Mehrfachdeletionsmutanten wurden durch Kreuzung von Einfachdeletionsmutanten hergestellt. Dazu wurden die entsprechenden Stämme gepaart und mittels Mikromanipulator Zygoten isoliert. Diese wurden wie bei der Herstellung von Deletionsmutanten zur Sporulation gebracht und durch Analyse von nicht-parentalen Dityp Tetraden die entsprechenden Segreganten, die eine Doppel- oder Mehrfachdeletion besitzen, identifiziert.

Die Herstellung von Deletionsmutanten und deren anfängliche Charakterisierung ihrer Eigenschaften in Bezug auf den Ehrlichstoffwechsel wurde von SRD in enger Zusammenarbeit mit Uni FFM durchgeführt. Geeignete Deletionsmutanten wurden für detaillierte Analysen ans KWI übergeben.

Für die einzelnen Schritte des Ehrlich-Stoffwechsels von der Aufnahme bis zur Alkoholacethyltransferase-Reaktion wurden die verschiedensten Einfach- und Mehrfachdeletions-mutanten hergestellt (siehe Tab. 1).

Tab. 1: Übersicht der von SRD und Uni FFM hergestellten Deletionsstämme

Transport	*Δgap1* *Δmup1* *Δmup3* *Δmup1 Δmup3* *Δgap1 Δmup1 Δmup3*
Transaminierung	*Δaro8* *Δaro9* *Δaro8 Δaro9* *Δbat1* *Δbat2* *Δbat1 Δbat2*
Decarboxylierung	*Δpdc1* *Δpdc5* *Δpdc6* *Δpdc1 Δpdc5 Δpdc6* *Δpdc1 Δpdc5 Δpdc6 Δaro10 Δthi3*
Dehydrogenierung	*Δadh1* *Δadh2* *Δadh3* *Δadh1 Δadh2* *Δadh1 Δadh3* *Δadh2 Δadh3*
Alkoholacetyltransfer	*Δatf1* *Δatf2* *Δatf1 Δatf2*

Exemplarisch werden die Wachstumsanalysen für einige Deletionsstämme ausführlicher dargestellt.

Δaro8 und Δaro9 Deletionsstämme

Um den Einfluss der Transaminasen Aro8 und Aro9 im Ehrlich-Stoffwechsel bei der Transaminierung von Phenylalanin bzw. Methionin zu analysieren, wurden von den entsprechenden Genen Einzel- und Doppeldeletionsstämme hergestellt. Die Wachstumsanalyse der entsprechenden Stämme ist in Abb. 4 dargestellt. Auf SCD+ARO Medium (Ammoniumsulfat als N-Quelle und Zusatz der drei aromatischen Aminosäuren) können sowohl der Wildtyp als auch alle Deletionsstämme wachsen. Im Gegensatz dazu kann ein *Δaro8 Δaro9* Doppeldeletionsstamm auf dem gleichen Medium ohne ARO nicht wachsen und der *Δaro8* Stamm zeigt bereits ein verlangsamtes Wachtum im Vergleich zum Wildtyp. Dies zeigt bereits, dass Aro8 eine wichtigere Rolle bei der Transaminierung von aromatischen Aminosäuren spielt als Aro9. Auf SCD+Phe(ARO) Medium können *Δaro8 Δaro9* Doppeldeletionsmutanten nicht wachsen, obwohl ihnen die drei aromatischen Aminosäuren in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Da bei diesem Medium Phenylalanin als N-Quelle dient, ist daraus eindeutig abzuleiten, dass für das Wachstum auf Phenylalanin die durch Aro8 und Aro9 katalysierte Transaminierung essentiell ist. Beim Wachstum mit Methionin als N-Quelle (SCD+Met(ARO)) spielen diese beiden Transaminasen keine wichtige Rolle. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass für eine Steigerung des Ehrlich-Stoffwechsels bei der Verwertung von Phenylalanin eine Überproduktion von Aro8 und Aro9 sinnvoll erscheint (siehe unten).

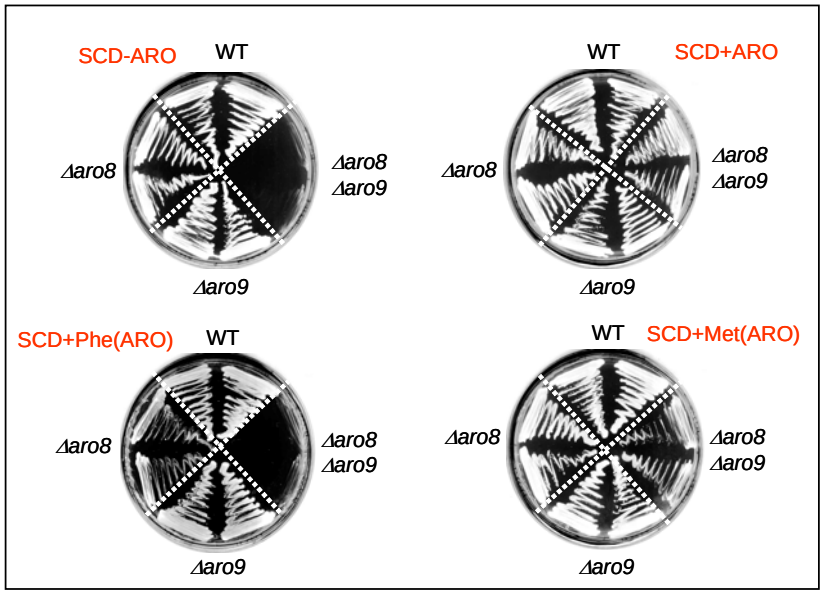


Abb. 4: Wachstumsanalyse von Δaro8 und Δaro9 Einfach- und Doppeldeletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp. Jeweils zweimal wurden die verschiedenen Stämme auf den 4 verschiedenen Medien ausgestrichen und für 7 Tage bei 30°C inkubiert. SCD-ARO bzw. SCD+ARO enthalten $(NH_4)_2SO_4$ als Stickstoffquelle. SCD+Phe(ARO) bzw. SCD+Met(ARO) enthalten Phenylalanin bzw. Methionin (je 7g/l) als Stickstoffquelle und zusätzlich die drei aromatischen Aminosäuren in den normalerweise zum Wachstum notwendigen Konzentrationen.

Δgap1, Δmup1 und Δmup3 Deletionsstämme

Von den bisher 45 beschriebenen Transportern, die am Aminosäure-Tranport in der Hefe *S. cerevisiae* beteiligt sind, wurden nach Literatur-Recherche 11 Transporter ausgesucht, deren Einfluss in Bezug auf Phenylalanin bzw. Methionin im Ehrlich-Stoffwechsel eine Rolle spielen (siehe Tab. 2).

Tab. 2: Aminosäure-Transporter, die für die Aufnahme von Phenylalanin und Methionin verantwortlich sein könnten

GENE	DESCRIPTION
BAP2	Broad-specificity amino-acid permease - inductible by most neutral amino acids
TAT1	Broad-specificity amino-acid permease
AGP1	Broad-specificity, relatively-low-affinity, amino-acid permease - inducible by most neutral amino acids
BAP3	Broad-specificity amino-acid permease - inductible by most neutral amino acids
GNP1	Broad-specificity amino-acid permease
AGP3	Protein of the amino-acid permease family - unknown biological function
MUP1	High affinity methionine permease
MUP3	Low-affinity methionine permease
GAP1	General amino acid permease
ALP1	Protein of the amino-acid permease family - unknown biological function
TAT2	Broad-specificity amino-acid permease - inductible by most neutral amino acids

Um den Einfluss der Aminosäure-Transporter in Bezug auf die Umsetzung von Methionin im Ehrlich-Stoffwechsel näher zu analysieren wurden von den Genen *GAP1*, *MUP1* und *MUP3* Einfach- bzw. Mehrfachdeletionsstämme erzeugt und phänotypisch analysiert (siehe Abb. 5).

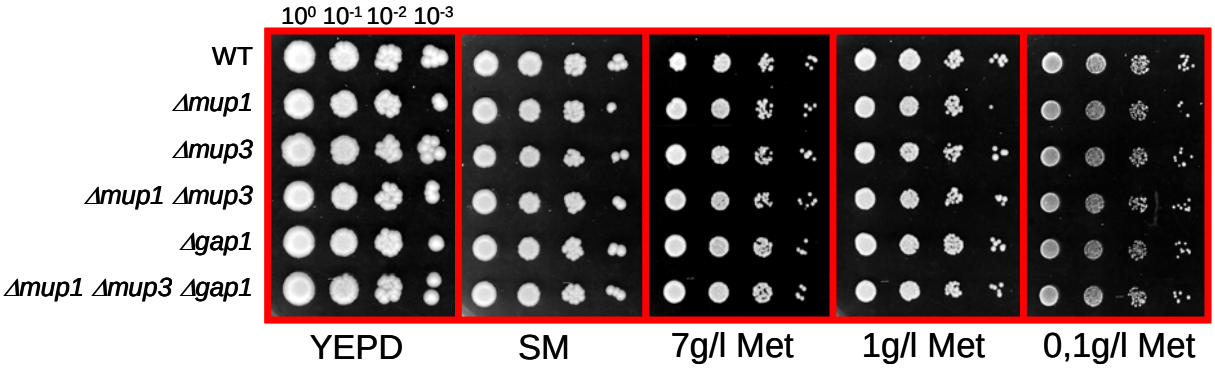


Abb. 5: Wachstumsanalyse von *Δmup1*, *Δmup3* und *Δgap1* Einfach- und Mehrfachdeletionsstämmen im Vergleich zum Wildtyp mittels serieller Verdünnungsreihen. Zellen wurden bis zu einer OD_{600} von 1 angezogen und unverdünnt bzw. in drei Schritten jeweils 1:10 seriell verdünnt und auf die entsprechenden Agarplatten getropft. Die Platten wurden für 3 Tage bei 30°C inkubiert. YEPD: Vollmedium, SM: Minimal-Medium mit Ammoniumsulfat als N-Quelle, Met: Minimalmedium mit Methionin in den angegebenen Konzentrationen als N-Quelle.

Auf Grund der durchgeführten phänotypischen Analysen konnte für keinen der drei untersuchten Aminosäure-Transporter eine signifikante Beteiligung am Methionin-Transport in Bezug auf den Ehrlich-Stoffwechsel beobachtet werden, da sich alle Mutanten im Wachstum nicht vom Wildtyp unterscheiden. Es ist aber nicht ganz auszuschliessen, dass eine Überproduktion dieser Transporter dennoch einen stimulierenden Einfluss auf die Aroma-Produktion haben könnten.

Herstellung von Überexpressionsmutanten der Gene des Ehrlichstoffwechsels

Auf Grund der Ergebnisse der Deletionsmutanten (SRD, Uni FFM, KWI) wurden für ausgewählte Gene des Ehrlichstoffwechsels Überexpressionsmutanten hergestellt. Hier kann prinzipiell zwischen genomisch integrierten und plasmidkodierten Überexpressionsmutanten unterschieden werden. Die genomisch integrierten Überexpressionsmutanten bieten den Vorteil, dass auf Grund der stabilen Integration bei der Wahl des Kulturmediums nicht gesondert auf die Ansprüche der Selektionsmarker Rücksicht genommen werden muss. Die Überexpression ist aber hierbei durch die Wahl des jeweiligen Promoters begrenzt. Die plasmidkodierten Überexpressionen bieten den Vorteil, dass sie leichter von einem Stamm auf einen anderen übertragen werden können und zusätzlich die Stärke der Überexpression nicht nur von der Promoterstärke des verwendeten Promoters abhängt, sondern auch von der Kopienzahl des jeweiligen Vektors. Dies erlaubt demnach bei der Verwendung von multi-copy Vektoren auch einen Überexpression unter der Verwendung des endogenen Promoters. Plasmidkodierte Überexpression haben aber den Nachteil, dass sie nicht zu 100% stabil sind und zusätzliche Anforderungen an das Kulturmedium gestellt werden.

Aus diesen Gründen wurden bei der Herstellung von Überexpressionsmutanten beide Strategien verfolgt.

Genomisch integrierte Überexpressionsmutanten

Die genomisch integrierten Überexpressionsmutanten wurden nach der gleichen Methode wie die Gen-Deletionen (siehe Abb. 3) durchgeführt. Dazu war es nötig ein Plasmid zu konstruieren, bei dem die Deletions-Kassette des Plasmids pUG6 (siehe Abb. 3) um einen entsprechenden Promoter erweitert wurde. Zunächst sollte der konstitutive und stark exprimierte *TPI1*-Promoter verwendet werden. *TPI1* kodiert für das glykolytische Enzym Triosephosphatisomerase. Dazu wurde das Plasmid pPK261 hergestellt und als Template für die Amplifizierung der Selektions-Kassette+*TPI1*-Promoter mit kurzen homologen Bereichen eingesetzt werden. Bei der anschliessenden Transformation wird der Promoter des Ziel-Gens gegen die Selektions-Kassette+ *TPI1*-Promoter mittels homologer Rekombination ausgetauscht (siehe Abb. 6). Alle anderen Schritte wurden wie bei den Gen-Deletionen beschrieben durchgeführt. Die ersten Analysen von Überexpressionsmutanten haben aber in einigen Fällen ergeben, dass der *TPI1*-Promoter nicht immer zu einer ausreichenden Überexpression führte. Daher wurde ein zusätzliches Plasmid (pPK421) konstruiert bei dem der *TPI1*-Promoter von Plasmid pPK261 durch den *TDH3*-Promoter ersetzt wurde. *TDH3* kodiert für das Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.

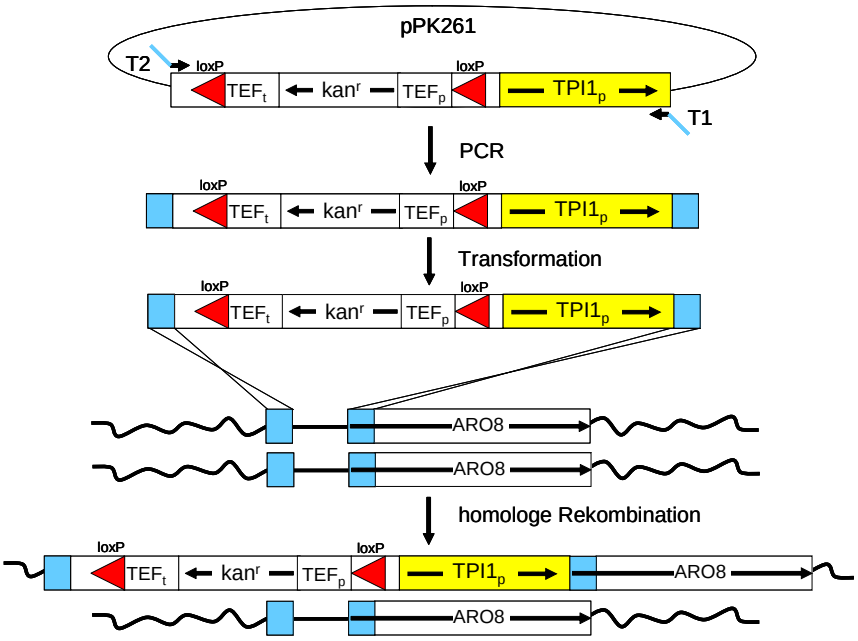


Abb. 6: Schematische Darstellung der Herstellung von genomisch integrierten Überexpressions-mutanten mittels homologer Rekombination.

Die Herstellung von Überexpressionsmutanten und deren anfängliche Charakterisierung ihrer Eigenschaften in Bezug auf den Ehrlichstoffwechsel wurde von SRD in enger Zusammenarbeit mit Uni FFM durchgeführt. Geeignete Überexpressionsmutanten wurden für detaillierte Analysen ans KWI übergeben (siehe Tab. 2)

Tab. 2: Übersicht der von SRD und Uni FFM hergestellten Überexpressionsmutanten

Gen	Promoter
ARO8 *ARO9* *ARO8 ARO9* *ATF1* *ATF2* *ATF1 ATF2*	*TPI1*
ARO8 *ARO9* *ADH6* *MUP1* *MUP3* *MUP3 ATF1* *ATF1*	*TDH3*

Exemplarisch werden die Analysen für einige Überexpressionsmutanten ausführlicher dargestellt.

ARO8 und ARO9 Überexpressionsmutanten

Um die Überexpression von ARO8 und ARO9 bewerten zu können, wurden die relativen Phenylpyruvat-Transaminase Aktivitäten in Rohextrakten bestimmt. Die Aktivitäten wurden vom Wildtyp mit denen von den enstprechenden *ARO8* und *ARO9* Deletions- bzw. Überexpressionsmutanten verglichen. Eine *Δaro9* Mutante zeigt annähernd gleiche Aktivitäten wie der Wildtyp. Im Gegensatz dazu ist in einer *Δaro8* Mutanten nur noch eine sehr geringe Aktivität messbar, vergleichbar mit einer *Δaro8 Δaro9* Mutante. Dies ist in guter Korrelation zu den Wachstumsdaten der *Δaro8* und *Δaro9* Mutanten, die auch eindeutig zeigten, das für den Ehrlich-Stoffwechsel Aro8 das wichtigere Enzym darstellt.

Nur die Überexpression von *ARO8* führte zu einer signifikanten Erhöhung der Enzymaktivität im Vergleich zum Wildtyp mit einer Steigerung um den Faktor 2 (siehe Abb. 7). Die Aktivitäten der Konstrukte mit dem *TDH3* Promoter wurden aus Zeitgründen mit mehr bestimmt und die Konstrukte wurden direkt ans KWI übergeben zur Analyse der Aroma-Produktion.

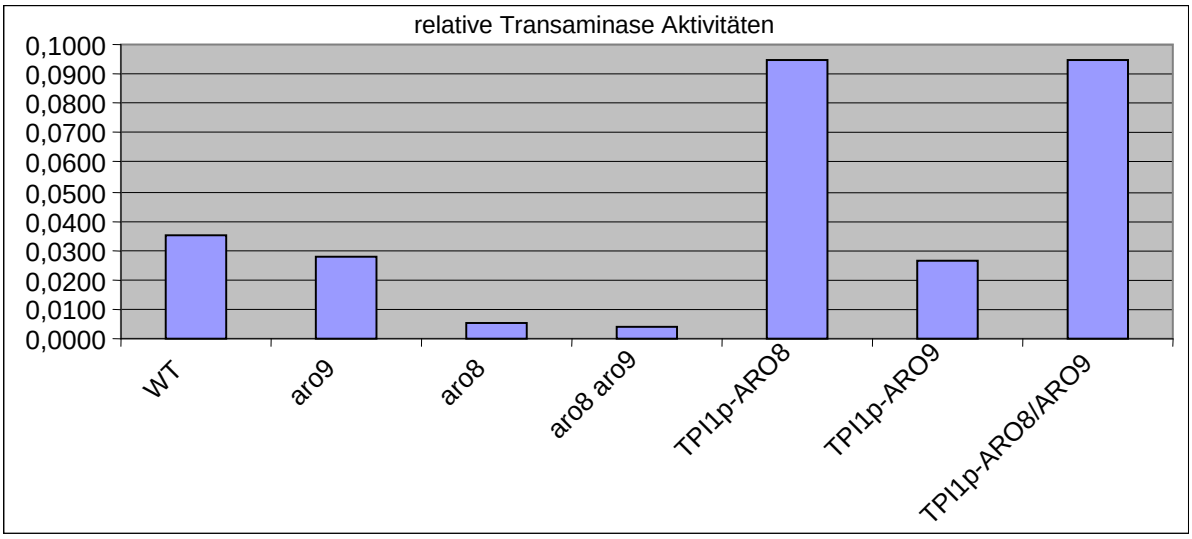


Abb. 7: Relative Phenylalanin-Transaminase Aktivitäten. Die Transaminierung von Phenylalanin zu Phenylpyruvat wurde in Rohextrakten der verschiedenen Deletions- bzw. Überexpressionsmutanten gemessen. Das gebildete Phenylpyruvat wurde photometrisch bestimmt und die relative Aktivität auf die eingesetzt Menge Rohextrakt normiert.

Plasmidkodierte Überexpressionsmutanten

Für die plasmidkodierte Überexpression von Gene des Ehrlich Stoffwechsels mussten erst entsprechende *E. coli/S. cerevisiae* Shuttle-Vektoren hergestellt werden. Dazu wurden in die entsprechenden *E. coli/S. cerevisiae* Shuttle-Vektoren der pRS-Serie der *TDH3*-Promoter-Terminator Bereich kloniert (siehe Abb. 8). Bei den hier verwendeten *E. coli/S. cerevisiae* Shuttle-Vektoren handelt es ich um solche, die den Hefe 2µm Replikationsursprung besitzen und daher in der Hefe in hoher Kopienzahl (20-50) vorliegen. Es wurden vier verschiedene Vektoren hergestellt, die sich nur durch den entsprechenden Hefe-Selektions-Marker (*URA3, LEU2, HIS3* oder *TRP1*) unterscheiden. Diese Variabilität in den Selektions-Markern ist notwendig, wenn mehr als ein Gen des Ehrlich-Stoffwechsels gleichzeitig plasmidkodiert überexprimiert werden soll. Zwischen dem *TDH3*-Promoter-Terminator wurden nun die entsprechenden Zielgene inseriert.

In analoger Weise wurden Vektoren mit dem *TPI1*-Promoter und Terminator hergestellt.

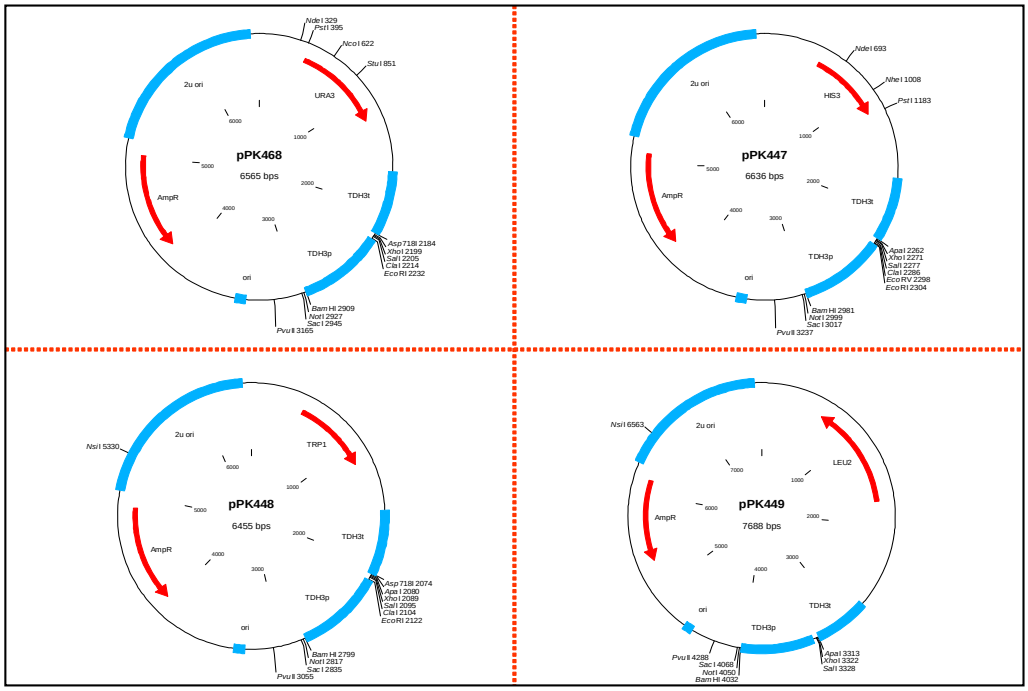


Abb. 8: Plasmid-Karten, der für die Plasmid-kodierte Überexpression unter Verwendung des *TDH3*-Promoters und Terminators verwendeten Vektoren.

Tab. 3: Übersicht der von SRD und Uni FFM hergestellten Überexpressions-Plasmide

Gen	Promoter
ARO8 *ARO9* *ATF1* *ATF2* *ATF1*	*TPI1*
ARO8 *ARO9* *ADH6* *ADH7* *ATF1* *ARO10*	*TDH3*

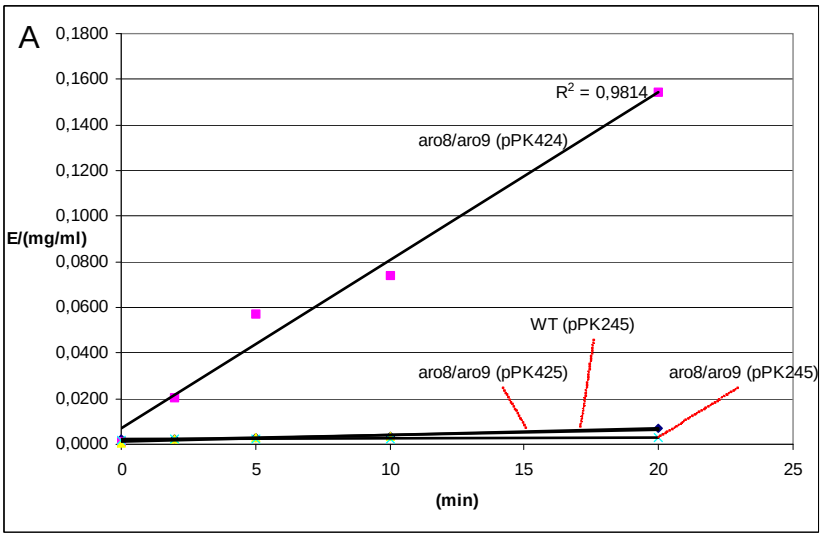
Exemplarisch werden die Analysen für einige Plasmid-kodierte Überexpressionen ausführlicher dargestellt.

Plasmidkodierte ARO8 und ARO9 Überexpressionen

Um die Phenylalanin-Transaminase Aktivität im Vergleich zu den durch genomische Integration erzielten Aktivitäten zu steigern, wurden die Gene *ARO8* bzw. *ARO9* unter der Kontrolle des TPI1 Promoters plasmidkodiert überexprimiert. Dazu wurde das entsprechende Gen jeweils in den Vektor pPK245 inseriert. Die resultierenden Plasmide pPK424 (*ARO8*) und pPK425 (*ARO9*) wurden in den Wildtyp bzw. in die *Δaro8 Δaro9* Doppeldeletionsmutante transformiert. Als Kontrolle wurde in beide Stämme jeweils der leere Vektor pPK245 transformiert.

Eine Überexpression von *ARO9* in der *Δaro8 Δaro9* Doppeldeletionsmutante führt zu einer vergleichbaren Phenylalanin-Transaminase Aktivität wie im Wildtyp mit dem leeren Vektor. Diese geringe Aktivität reicht aber aus, dass die Transformaten auf Medium ohne aromatische Aminosäuren

wachsen können. Die Überexpression von *ARO8* führte hingegen zu einer mindestens 25-fach höheren Aktivität (siehe Abb. 9). Die weitere Analyse dieser Mutanten in Bezug auf die Aroma-Produktion wurde am KWI durchgeführt.



B

Stamm	vorhandene Transaminase-Akt.	Wachstum ohne aromatische AS
WT (pPK245)	Aro8 Aro9	+
aro8 aro9 (pPK424)	Aro8⇑	+
aro8 aro9 (pPK425)	Aro9⇑	+
aro8 aro9 (pPK245)	-	-

Abb. 9: (A) Relative Phenylalanin-Transaminase Aktivitäten aufgetragen als E/mg.ml^{-1} in Abhängigkeit von der Zeit. WT-Zellen bzw. *Δaro8 Δaro9* Doppeldeletionsmutanten wurden entweder mit dem leeren Ausgangs-Vektor (pPK245) oder den Überexpressionplasmiden pPK424 (*ARO8*) bzw. pPK425 (*ARO9*) transformiert. Die Transaminase-Aktivitäten wurden, wie in Abb. 7 beschrieben, bestimmt. (B) Wachstumsverhalten der in (A) verwendeten Stämme auf Medium ohne aromatische Aminosäuren.

Plasmidkodierte ADH6 und ADH7 Überexpressionen

Das Substratspektrum der sehr gut charakterisierten Alkohol-Dehydrogenasen Adh1, Adh2 und Adh3 umfasst eher die kurzkettigen Alkohole wie Ethanol. Längerkettige Alkohole bzw. verzweigtkettige Alkohole werden nur mit geringen Raten bzw. überhaupt nicht umgesetzt. Daher spielen diese Adhs für die Aroma-Produktion über den Ehrlich-Stoffwechsel keine wichtige Rolle. Die Hefe *S. cerevisiae* besitzt aber eine Vielzahl weiterer Adhs mit deutlich anderen Substartspektren, u.a. Adh6 und Adh7. Aus diesem Grund wurden die beiden Gene unter der Kontrolle des *TDH3*-Promoters plasmidkodiert überexprimiert. Dafür würden die Plasmide pPK461 (*ADH7*) und pPK462 (*ADH6*) erzeugt und in Wildtyp-Zellen bzw. in verschiedene *adh1* bis *adh3* Mutanten transformiert und die Alkohol-Dehydrogenase Aktivitäten mit verschiedenen Substraten bestimmt (siehe Abb. 10).

Auf Grund der leichteren Messbarkeit wurde die Rückreaktion mit den Substraten 1-Hexanol, 1-Butanol und 2-Phenylethanol gemessen.

Die Überexpression von *ADH6* zeigte eine bis zu 200-fach höhere Enzymaktivität mit 1-Hexanol als Substrat. Auch mit 1-Butanol und 2-Phenylethanol waren signifikante Enzymaktivitäten messbar. Die Enzymaktivitäten mit 2-Phenylethanol werden theoretisch deutlich höher liegen, aber auf Grund der schlechten Löslichkeit von 2-Phenylethanol in Wasser musste der Enyzmtest deutlich unter Substratsättigung durchgeführt werden.

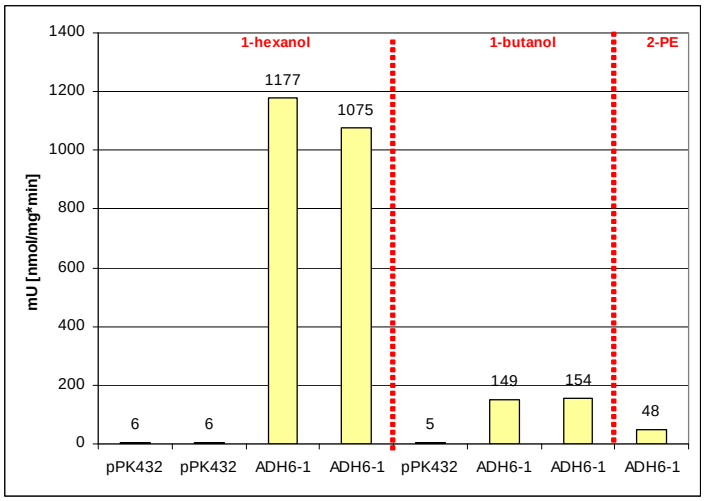


Abb. 10: Spezifische Alkohol-Dehydrogenase Aktivitäten von plasmidkodierten Überexpressionen. WT-Zellen transformiert mit dem leeren Vektor (pPK432) oder dem Überexpressionsplasmid pPK462 (ADH6-1) wurden in SCD-ura Medium angezogen und nach Zellaufschluss die Alkohol-Dehydrogenase Aktivität im Rohextrakt mit den Substraten 1-Hehanol, 1-Butanol und 1-Phenylethanol bestimmt.

Transkriptomanalyse des Ehrlich-Stoffwechsels mit Micro-Arrays (Uni FFM)

Mittels Trankriptom-Analyse sollte die Aroma-Produktion über den Ehrlich-Stoffwechsel begleitend untersucht werden. Dazu sollten nicht nur das Transkriptom von Wildtyp-Zellen sondern auch von ausgesuchten Deletions- bzw. Überexpressionsmutanten mit Hilfe von Micro-Arrays analysiert werden, um daraus Rückschlüsse ziehen zu können mit der Absicht die Aroma-Produktion zu verbessern.

Auf Grund der Mittelkürzung konnte nicht wie vorgesehen ein Micro-Array mit ca. 1000 Genen erstellt werden, sondern nur ein sehr spezifischer mit ca. 100 Genen (siehe Tab. 4). Dazu wurden von Uni FFM die Zielgene zur Herstellung eines stoffwechselspezifischen Micro-Arrays bioinformatisch bestimmt und die entsprechenden Primer-Paare bestellt. Von den Zielgenen wurden die entsprechenden Bereiche mittels PCR amplifiziert und mit Hilfe eines Spotting-Roboters auf Glas-Objektträger gespottet. Die RDNA wurde aus den entsprechenden Zellen isoliert und über einen Reverse Transkriptase Schritt in cDNA übersetzt. Dabei wurde die cDNA mit Cy3 bzw. Cy5 Fluoreszenz markiert und zur Hybridisierung eingesetzt. Anschliessend wurden die Micro-Arrays mit einem Micro-Array Scanner analysisiert und ausgewertet.

Schwierigkeiten bei der reproduzierbaren Prozessführung resultierten in ersten Transkriptomanalysen bisher zu nur schwer interpretierbaren bzw. widersprüchlichen Ergebnissen. Die Prozessführung wurde daraufhin am KWI optimiert. Ferner zeigten Kontrollexperimente (siehe Abb. 11), dass für einige Ziel-Gene zusätzliche PCR-Produkte erforderlich sind, damit zwischen den einzelnen Genen einer Genfamilie (z.B. *ADH*-Gene) besser diskriminiert werden kann.

Die Transkriptom-Analyse konnten bis jetzt nicht vollständig durchgeführt werden, da in der entsprechenden Abteilung an der Uni FFM die entsprechenden Geräte in den letzten Monaten durch neuere ersetzt werden mussten. Die ausstehenden Arbeiten werden aber über die Projektlaufzeit hinaus weiter durchgeführt und beendet.

Tab 4: Ausgewählte Gene für den Ehrlich-Stoffwechsel-spezifischen Microarray

ADH1	YOL086c
ADH2	YMR303c
ADH3	YMR083w
ADH4	YGL256w
ADH5	YBR145w
ADH6	YMR318c
AHD7	YCR105w
SOR1	YJR159w
SFA1	YDL168w
PDC1	YLR044c
PDC5	YLR134w
PDC6	YGR087c
THI3	YDL080c
ARO10	YDR380w
ATF1	YOR377w
ATF2	YGR177c
ARO8	YGL202w
ARO9	YHR137w
BAT1	YHR208w
BAT2	YJR148w
BAP2	YBR068c
TAT1	YBR069c
AGP1	YCL025c
BAP3	YDR046c
GNP1	YDR508c

AGP3	YFL036w
MUP1	YGR055w
MUP3	YHL036w
GAP1	YKR039w
ALP1	YNL270c
TAT2	YOL020w
CDC19	YAL038w
NRG2	YBR066c
PGI1	YBR196c
PYC2	YBR218c
PDB1	YBR221c
GLK1	YCL040w
PGK1	YCR012w
ADH7	YCR105w
TPI1	YDR050c
ACN9	YDR511w
SAK1	YER129w
PDA1	YER178w
HXK1	YFR053c
PYC1	YGL062w
HXK2	YGL253w
TDH3	YGR192c
PDX1	YGR193c
PFK1	YGR240c
AGP3	YFL036w

ENO1	YGR254w
ENO2	YHR174w
PFK26	YIL107c
TDH1	YJL052w
SIP4	YJL089w
FBP26	YJL155c
TDH2	YJR009c
FBA1	YKL060c
PGM1	YKL127w
GPM1	YKL152c
	YKR043c
PCK1	YKR097w
FBP1	YLR377c
PGM2	YMR105c
PFK2	YMR205c
CAT8	YMR280c
	YNL134c
GCR2	YNL199c
ZWF1	YNL241c
MDH2	YOL126c
PFK27	YOL136c
PYK2	YOR347c
GCR1	YPL075w

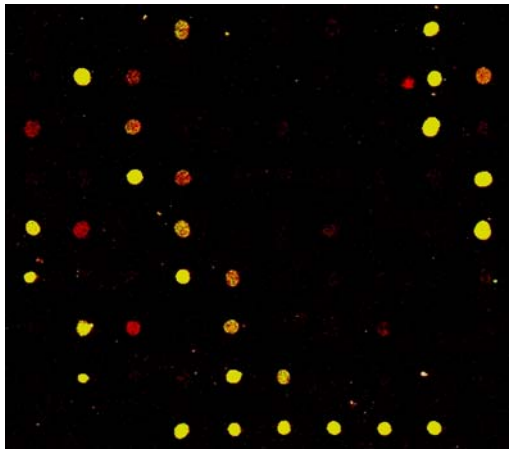


Abb. 11: Ehrlich-Stoffwechsel spezifischer Micro-Array. WT-Zellen wurden in SCD-Medien angezogen und die daraus isolierte RNA wurde mit Cy3 und Cy5 markiert. Beide RNA-Proben wurden anschliessend zur Hybridisierung eingesetzt.

Alternativ zu den Micro-Array Experimenten wurde die Promotoren der Gene *ARO8*, *ARO9*, *BAT1* und *BAT2* mit einem Reportergen fusioniert, um die transkriptionelle Regulation dieser Transaminase-Gene unter Biokonversions-Bedingungen zu analysieren. Keines der vier untersuchten Gene zeigte eine Regulation auf transkriptioneller Ebene bei den untersuchten Bedingungen.

Entwicklung analytischer Methoden

Für die Analyse der Alkohole und Acetate, die aus den Aminosäuren Isoleucin, Leucin, Valin und Methionin entstehen, wurden am KWI verschiedene Analyseverfahren getestet. Die Fuselalkohle und –acetate 2-Methyl-1-butanal, 2-Methyl-1-butanol, 2-Methylbutylacetat (aus Isoleucin), Isopentanal, Isoamylalkohol, Isoamylacetat (aus Leucin), Isobutanal, Isobutanol, Isobutylacetat (aus Valin) sowie Methionol (aus Methionin) sind als Standards per GC gut nachzuweisen. Da die Produkte aus Kulturbrühen extrahiert werden müssen, wurden Ethylacetat und Hexan als Extraktionsmittel getestet, die Wiederfindungsrate war jedoch unbefriedigend.
Als Standard-Analysenverfahren wurde daher auf HPLC zurückgegriffen. Die bestehenden Methoden mit der Säule Alltima C18 10µ 250 x 4,6 mm (Alltech, Worms) für Phenylalanin, 2-Phenylethanol und 2-Phenylethylacetat wurden weiterentwickelt und erlauben die routinemässige Quantifizierung von Methionin, Methionol und 3-Methylthiopropylacetat (3-MTPA). Weitere Stoffwechselmetabolite wie die Transaminierungsprodukte der Aminosäuren sowie Ethanol, Glycerin und organische Säuren werden mittels einer Aminex-Säule HPX 87 H (Bio-Rad, München) nachgewiesen. Das KWI übernahm auch die Analyse der Proben aus den Kultivierungsversuchen der Degussa.

Screening und Optimierung der in-situ Produktabtrennung

Als Musterprodukte wurden für dieses Projekt die Derivate des Phenylalanins und des Methionins gewählt, Phenylethanol und dessen Derivate aufgrund der Marktgrösse und –relevanz, Methionol und dessen Derivate aufgrund der Neuartigkeit des Produkts. Daher wurden die Produktabtrennungs-

massnahmen am KWI und bei der Degussa auf die Alkohole 2-Phenylethanol und Methionol sowie auf die Acetatester 2-Phenylethylacetat und 3-Methylthiopropylacetat beschränkt.

Organophile Pervaporation

Aus früheren Arbeiten am KWI war bekannt, dass 2-Phenylethanol und 2-Phenylethylacetat mittels organophiler Pervaporation über eine Polyoctylmethylsiloxan (POMS)-Membran auf Polyetherimid (PEI)-Träger gut aus Kulturbrühen abgetrennt werden können und Anreicherungsfaktoren von 37 (2-PE) bzw. >400 (2-PEAc) zu erreichen sind (Etschmann, M.M.W. 2004).
Die Effektivität der Abtrennung von Methionol und 3-Methylthiopropylacetat über die gleiche POMS/PEI-Membran wurde anhand der Kultivierung von *S. cerevisiae* CEN.PK 834-1C überprüft.
Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt.

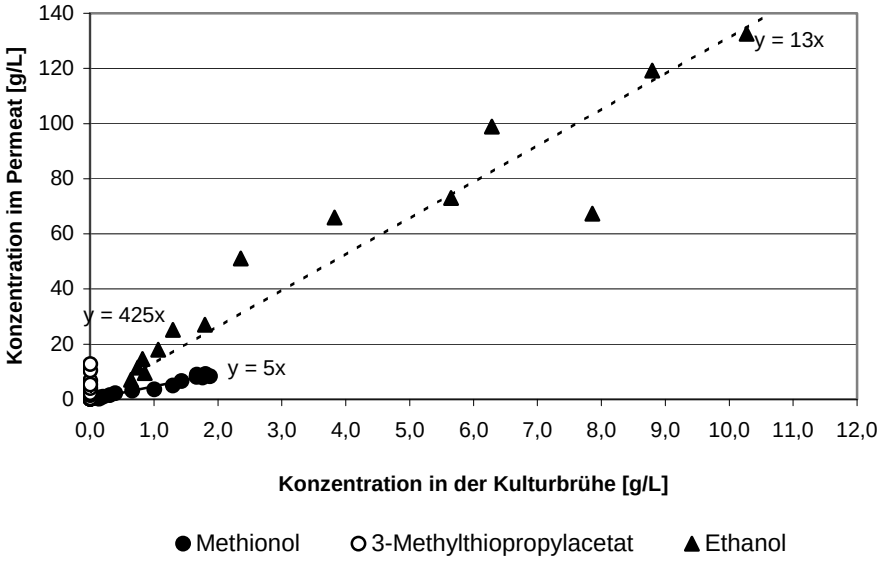


Abb. 12 Permeatkonzentrationen der Hauptprodukte in Abhängigkeit von ihren Konzentrationen in der Kulturbrühe bei der Kultivierung bei 32°C
S. cerevisiae CEN.PK 834-1C wurde im Labor-Bioreaktor in 1,4 L Medium bei 32°C und einer Begasungsrate von 1 vvm. Die Rührerdrehzahl wurde so geregelt, dass pO2 ≥ 30% der Sättigung mit Luft war. Die Produktabtrennung erfolgte durch zwei parallel angeordnete Pervaporationsmodule mit je 0,099 m² Membranfläche und einem permeatseitigen Druck < 6 x 10^{-4} bar.
Bei jedem Kühlfallenwechsel wurde auch eine Probe der Kultursuspension entnommen. Die Produktkonzentrationen in der Kultursuspension und im Permeat wurden per HPLC bestimmt. Die Steigung der Ausgleichsgeraden entspricht dem Anreicherungsfaktor β und ist ein Mass für die Effektivität des Pervaporationsprozesses.

Der Vergleich der aktuellen und früheren Ergebnisse zeigt, dass die Pervaporation zur Abtrennung von Methionol (β=5) deutlich schlechter geeignet ist als für 2-Phenylethanol (β=37). 3-Methylthiopropylacetat hingegen ist deutlich hydrophober als Methionol und wird ähnlich gut abgetrennt (β=425) wie 2-Phenylethylacetat (β=431).

Zweiphasenkultivierung

Für die ISPR-Techniken „Zweiphasen-Fermentation“ und „Pertraktion“ wurde bei der Degussa ein Screening verschiedener Extraktionsmittel durchgeführt.

Als erster Schritt wurden die Verteilungskoeffizienten der Aromastoffe in verschiedenen binären Systemen bestimmt.

Tab. 5: Verteilungskoeffizienten K nach Nernst (in [g/g]) ausgewählter Aromastoffe in verschiedenen Systemen Lösungsmittel/Wasser bei 35°C

	1-Butanol	Cykolhexan	Oleylalkohol	Polypropylenglycol (PPG)
2-Phenylethanol	20	1,0	13	24
2-Phenylethylacetat	80	100		
Phenylacetaldehyd	40	10		
Methionol			1,2	

Alle getesteten Systeme zeigten ein ideales Verhalten, d.h. der Verteilungskoeffizient K war unabhängig von der Konzentration. Wie erwartet hing der Verteilungskoeffizient sehr stark von der Polarität der Aromastoffe und Lösungsmittel ab. Für die Derivate des Phenylalanins zeigte 1-Butanol durchgehend hohe Verteilungskoeffizienten, während Cyklohexan aufgrund der höheren Hydrophobizität für Phenylethanol weniger geeignet war. Oleylalkohol und PPG zeigten für 2-Phenylethanol gute K-Werte. Der Verteilungskoeffizient von 2-Phenylethanol in Oleylalkohol korrespondierte gut mit publizierten Werten (Etschmann, M.M. und Schrader, J. 2006). Methionol als Metabolit war deutlich polarer als Phenylethanol, daher auch schwerer zu extrahieren.
1-Butanol und Cyklohexan kamen nur für die Pertraktion in Frage, während PPG und Oleylalkohol für Zweiphasen-Fermentationen geeignet waren.
In einer weiteren Versuchsserie wurde der Einfluss der gescreenten Extraktionsmittel auf das Wachstum des Stamms überprüft. Dazu wurde der Stamm (*Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK 113-7D) in geeignetem wässrigen Kulturmedium, jeweils mit 1-Butanol oder Cyclohexan gesättigt (aber keine organische Phase bildend), fermentiert und als Mass für die inhibierende Wirkung die Wachstumsrate gemessen. Während in cyklohexan-gesättigter Kulturbrühe das Wachstum nicht inhibiert wurde, fand bei 1-Butanol-gesättigter Kulturbrühe kein Wachstum statt. Der Grund dafür ist die deutlich höhere Löslichkeit des 1-Butanols (ca. 90g/kg) gegenüber der des Cyklohexans (<1g/kg). Daher ist 1-Butanol für die Pertraktion ungeeignet.
Desweiteren wurde der Einfluss von Oleylalkohol und PPG auf das Wachstum des *S. cerevisiae*-Stamms in einer 2-Phasen-Kultivierung untersucht. Dabei zeigte sich, dass mit beiden Systemen eine Kultivierung möglich war, PPG aber deutlich weniger inhibierte als Oleylalkohol. Darüber hinaus zeigte sich im Verlauf mehrerer Experimente, dass die kommerziell verfügbaren Chargen Oleylalkohols stark unterschiedliche Inhibitionseigenschaften zeigten, was für einen industriellen Produktionsprozess nicht akzeptabel ist.

Pertraktion

Für die ISPR-Technologie „Pertraktion“ wurden kommerziell verfügbare Membranen charakterisiert. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Tab. 6: Ergebnisse des Membranscreenings (Kompositmembranen aus Polydimethylsiloxan (PDMS), Polyoctylmethylsiloxan (POMS) und eine UF-Membran (Solsep, MWCO = 500 – 1000 D)), Membranfläche 558cm^2.

	Solsep	**PDMS**	**POMS**
Lösemittelbeständigkeit (Cyklohexan)	+	+	+
Autoklavierbarkeit	- (Risse)	- (Braunfärbung)	+
$ß_{Cyc}$ [g h^{-1}] (Membran nicht autoklaviert)	0,94	1,11	0,96
$ß_{Cyc}$ [g h^{-1}] (Membran autoklaviert)	-	0,68	0,79
$ß_{Oleylalkohol}$ [g h^{-1}] (Membran autoklaviert)	-	-	0,23
$ß_{PPG}$ [g h^{-1}] (Membran autoklaviert)	-	-	0,13

Eine für die Pertraktion geeignete Membran darf durch Autoklavieren nicht beschädigt werden und darf aufgrund der verwendeten Lösungsmittel keine Veränderungen aufweisen. Ein weiteres entscheidendes Kriterium für die Verwendung bei der Pertraktion ist ein möglichst hoher Stoffübergangskoeffizient.

Anhand der dargestellten Ergebnisse lässt sich als geeignete Membran für die Pertraktion die POMS-Membran definieren. Die beiden anderen getesteten Membranen weisen durch das Autoklavieren entweder mechanische Veränderungen (Solsep) auf, oder der bestimmte Stoffübergangskoeffizient ist niedriger (PDMS, autoklaviert) im Vergleich zur POMS Membran (Vgl. Tab. 6).

Im Vergleich zur nicht autoklavierten POMS Membran (ß=0,96 h^{-1}) ist der Stoffübergangskoeffizient bei der autoklavierten Membran (ß=0,79 h^{-1}) etwas geringer. Dies lässt sich auf den Prozess des Autoklavierens zurückführen, da sich hierbei Bestandteile der Membran strukturell verändern können.

Im Vergleich zur Verwendung anderer Lösungsmittel (Oleylalkohol und PPG) ist deutlich erkennbar, dass der Stoffübergangskoeffizient in diesem Fall sehr niedrig ist. Dies lässt sich durch die deutlich höheren Viskositäten von Oleylalkohol und PPG erklären, da hierdurch die lösemittelseitige Grenzschicht an der Membran dicker, und somit der Stofftransport eingeschränkt wird. Hierbei ist der Stofftransportkoeffizient nicht nur von der Diffusion durch die Membran, sondern auch von der Diffusion durch die Grenzschicht abhängig.

Adsorption

Als weitere Möglichkeit der Produktabtrennung wurde am KWI die Adsorption, die ebenfalls als gängige Technik zur Gewinnung von Aromastoffen gilt, (Krings, U. und Berger, R.G. 1995) untersucht.

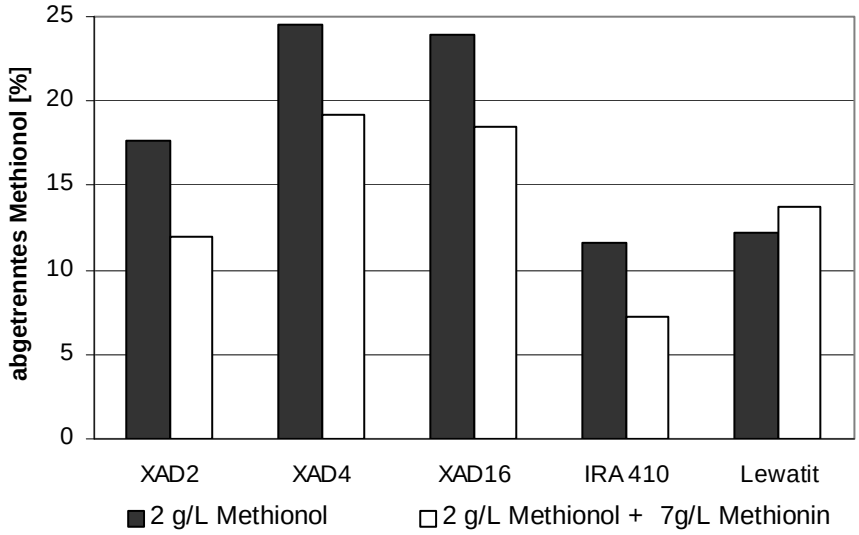


Abb. 13 Prozentsatz des abgetrennten Methionols bei der Adsorption an Adsorber- bzw. Ionenaustauscherharze aus synthetischem Medium mit 2 g/L Methionol bzw. 2 g/L Methionol und 7 g/L Methionin.
Es wurden jeweils 4 g Harz pro g Produkt eingesetzt.

Abbildung 13 zeigt das Ergebnis eines Versuches der Abtrennung von Methionol mit verschiedenen Adsorber- und Ionenaustauscherharzen aus synthetischem Medium ohne Mikroorganismen. Es ist zu erkennen, dass maximal 25% der eingesetzten 2 g/L Methionol abgetrennt werden. Bei zusätzlicher Anwesenheit von Methionin sinkt bei den meisten getesteten Harzen die Adsorptionsleistung.

Charakterisierung der verwendeten Hefestämme

Screening von Wildtypen

Beim Screening diverser Wildtypstämme von *Saccharomyces cerevisiae* auf die Produktion von Ehrlich-Intermediaten am KWI wurde der von der Uni FFM bereitgestellte *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D als derjenige Stamm identifiziert, der künftig als Referenz für die erzeugten Mutanten dienen soll. für die erzeugten Mutanten dienen soll. Der *S. cerevisiae* Stamm CEN.PK113-7D ist im Gegensatz zu den anderen Wildtypstämmen prototroph, was eine Kultivierung in Minimal-Medien ohne Zusatz von Aminosäuren und Nukleobasen ermöglicht. Die anderen Wildtypstämme hätten erst durch aufwendige Verfahren prototrophe und isogene Derivate erzeugt werden müssen. Ferner zeichnen sich die CEN.PK-Derivate, insbesondere der Stamm CEN.PK113-7D, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Entian (Uni FFM) hergestellt wurden, durch ihre guten genetischen und physiologischen Eigenschaften aus (van Dijken et al., 2000).

In S. cerevisiae CEN.PK 113-7D konnte die Synthese der entsprechenden höheren Alkohole aus den Aminosäuren Phenylalanin, Methionin, Isoleucin, Leucin und Valin nachgewiesen werden.

Screening von Deletions- und Überexpressionsmutanten

Folgende Mutanten wurden von SRD und Uni FFM erzeugt und dem KWI zur weiteren Untersuchung übergeben. Am KWI wurden die Stämme jeweils mit Methionin bzw. Phenylalanin im Schüttelkolben oder im Multifermenter kultiviert und die Wachstums- bzw. Produktbildungskinetik aufgenommen. Bei den Versuchen mit Phenylalanin wurde jeweils Oleylalkohol bzw. Polypropylenglycol 1200 zur *in-situ* Produktabtrennung eingesetzt.

Tab 7: Von SRD und Uni FFM erzeugte Mutanten von S. cerevisiae CEN.PK 113-7D, die am KWI weiter untersucht wurden

Stammbezeichnung	Verändertes Gen
CEN.PK 487-1B	Δcat8
CEN.PK 776-1D	Δatf1
CEN.PK 777-2C	Δatf2
CEN.PK 778-6A	Δatf1 Δatf2
CEN.CP1-1A	Δaro9
CEN.JM1-3A	Δaro8
CEN.CP3-2A	Δaro8 Δaro9
CEN.PK 794-2C	ATF1↑
CEN.PK 797-2D	ATF2↑
CEN.PK 801-18A	ATF1 ATF2↑
CEN.PK 499-6D	Δadh1 Δadh2
CEN.PK 501-5B	Δadh1 Δadh3
CEN.PK 803-2C	Δadh2 Δadh3
CEN.PK 805-2C	ARO8 ↑
CEN.PK 806-2B	ARO9 ↑
CEN.PK 807-1A	ARO8 ARO9 ↑
CEN.PK 828-5D	Leeres Plasmid
CEN.PK 829-7A	ARO8/9 pPK424(D4)
CEN.PK 830-7A	ARO8/9 pPK425(A7)
CEN.PK 882-4C	Δmup Δmup3 Δgap1
CEN.PK 884-11B	MUP3 ATF1 ↑
CEN.PK 860-1B	MUP3↑
CEN.PK 862-2A	Δgap1
CEN.PK 885-5D	ADH6-1↑
CEN.PK 483-1A	Δadh1
CEN.PK 909-1B	ATF1 ADH6↑
CEN.PK 910-3A	ATF1 ADH6 ARO10↑

Die in Tabelle 7 aufgelisteten Mutanten wiesen ein Wachstums- und Produktbildungsverhalten auf, das dem Wildtyp *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D ähnlich oder unterlegen war.

Die Mutante CEN.PK 834-1C, bei der das Gen ATF1 unter Kontrolle des TDH3 Promotors überexprimiert wurde, war dem Wildtyp bei der Produktion von Methionol und 3-Methylthiopropylacetat deutlich überlegen, wie aus Abbildung 16 abzulesen ist.

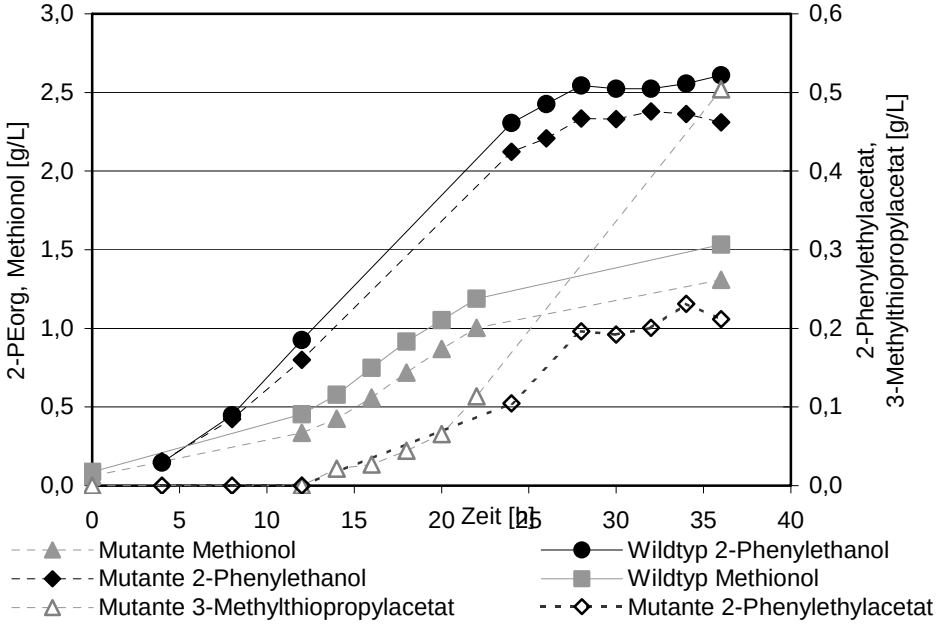


Abb.14 Produktbildungskinetiken des Wildtypstammes *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D und der Mutante CEN.PK 834-1C
Die Stämme wurden bei 30°C im Erlenmeyerkolben in synthetischem Medium mit Methionin bzw. Phenylalanin als Stickstoffquelle kultiviert. Den Ansätzen mit Phenylalanin wurde Oleylalkohol im Verhältnis 1:1 zur ISPR zugegeben und die Produktkonzentration in der organischen Phase bestimmt.

Abbildung 14 zeigt, dass die ATF1-Überexpressionsmutante *S. cerevisiae* CEN.PK 834-1C im Schüttelkolben jeweils ähnliche Mengen des höheren Alkoholes bildet wie der Wildtypstamm, nämlich etwa 1,5 g/L Methionol bzw. 2,5 g/L 2-Phenylethanol. Durch die Überexpression der Alkoholacetyltransferase synthetisiert die Mutante jeweils zusätzlich den Acetatester, nämlich 0,2 g/L 3-Methylthiopropylacetat bzw. 0,5 g/L 2-Phenylethylacetat. Diese Konzentrationen sind als erheblich einzustufen, da die Acetatesterbildung des Wildtyps unterhalb der Nachweisgrenze der HPLC von 50 mg/L liegt.

Produktinihibierung

Im Zusammenhang mit der Optimierung der *in-situ* Produktabtrennung wurde der inhibierende Einfluss der verschiedenen Produkte auf die Mikroorganismen überprüft und in Abbildung 15 dargestellt.

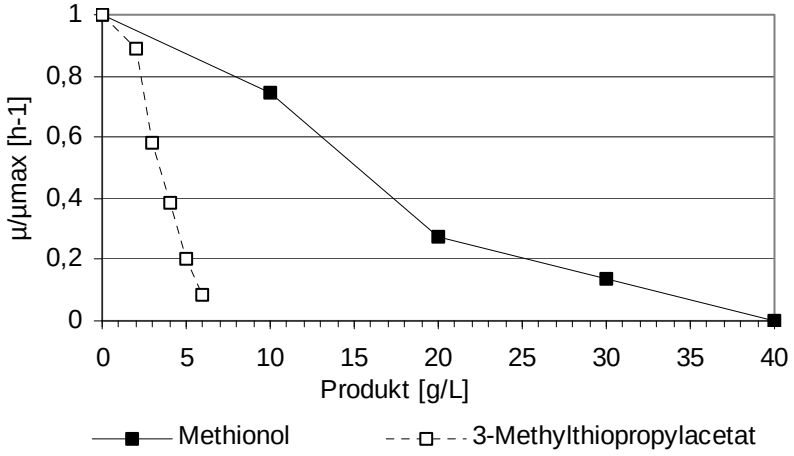


Abb. 15 Relative Wachstumsrate von *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7C in Abhängigkeit von der Produktkonzentration bei 30°C in synthetischem Medium mit $(NH_4)_2SO_4$ als Stickstoffquelle.
Die Hefe wurde in 50 mL synthetischem Medium ohne Aminosäure im Schüttelkolben kultiviert und das Wachstum anhand der optischen Dichte und Korrelation mit der Biotrockenmasse verfolgt. Die Produktkonzentration wurde vor Kultivierungsbeginn auf den gewünschten Wert eingestellt. Die Wachstumsrate wurde aus dem Zuwachs an Biomasse in Intervallen von einer Stunde ermittelt. Die maximale Wachstumsrate μ_{max} betrug 0,55 h^{-1}.

Abbildung 15 verdeutlicht, dass Methionol erst bei Konzentrationen ab 10 g/L eine nennenswerte inhibierende Wirkung auf die Hefen hat. Eine vollständige Einstellung des Wachstums tritt bei 40 g/L auf. Da 3-Methylthiopropylacetat wesentlich hydrophober ist, ist die Inhibierung stärker und bereits ab 3 g/L messbar. Erst ab den genannten Konzentrationen ist eine Abtrennung der Methioninderivate tatsächlich erforderlich. Für 3-Methylthiopropylacetat bietet sich dabei die organophile Pervaporation an (vgl. Abb. 12). Für Methionol eigenen sich weder die Pervaporation noch ein Zweiphasenprozess. Für den Fall, dass nach weiteren Optimierungsmaßnahmen Produktkonzentrationen von 10 g/L und mehr erricht würen, bietet sich hier am ehesten die Adsorption an (vgl. Abb 13). Über die Menge and Adsorberharz können Defizite in der Bindekapazität in gewissen Grenzen ausgeglichen werden. Eine Schaltung von wechselseitig beschickten Adsorbersäulen im Bypass des Bioreaktors liesse sich leicht realisieren und könnte für eine intervallartige Reduktion der Produktkonzentration eingesetzt werden, so dass diese permament unterhalb der Inhibitionsgrenze von 8-10 g/L läge.
Für Produktkonzentrationen < 10 g/L wird die ISPR nicht zwingend benötigt.

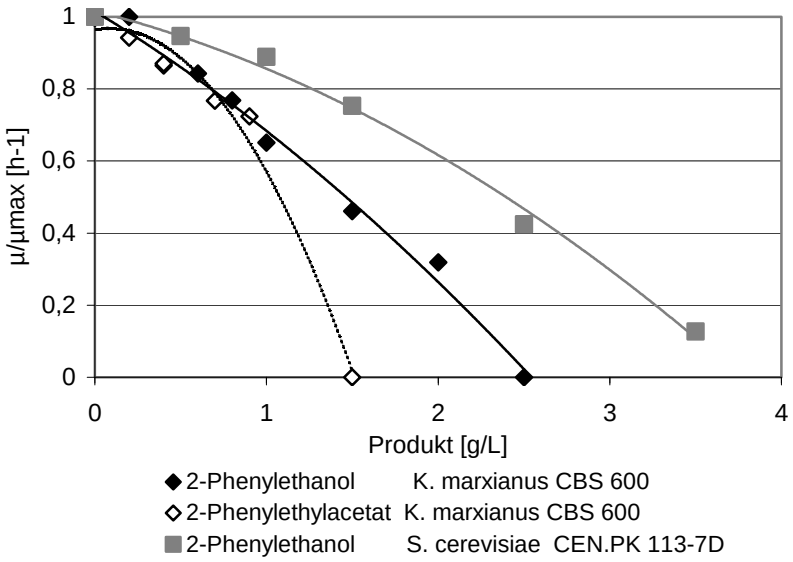


Abb. 16 Relative Wachstumsrate von *K. marxianus* CBS 600 und *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7C in Abhängigkeit von der Produktkonzentration bei 30°C in synthetischem Medium mit $(NH_4)_2SO_4$ als Stickstoffquelle.
Die Hefe wurde in 50 mL synthetischem Medium ohne Aminosäure im Schüttelkolben kultiviert und das Wachstum anhand der optischen Dichte und Korrelation mit der Biotrockenmasse verfolgt. Die Produktkonzentration wurde vor Kultivierungsbeginn auf den gewünschten Wert eingestellt. Die Wachstumsrate wurde aus dem Zuwachs an Biomasse in Intervallen von einer Stunde ermittelt. Die maximale Wachstumsrate μ_{max} betrug 0,49 h^{-1}.

Abbildung 16 zeigt die Inhibierungskinetik der Phenylalaninderivate. Es wird deutlich, dass diese insgesamt sehr viel toxischer sind als die Produkte des Methionins. Das sehr hydrophobe 2-Phenylethylacetat führt bei *K. marxianus* CBS 600 schon bei einer Konzentration von 1,5 g/L zu einer vollständigen Wachstumseinstellung. Weiterhin verdeutlicht die Grafik die Stammspezifität der inhibierenden Wirkung. Während bei *K. marxianus* CBS 600 2,5 g/L 2-Phenylethanol zur vollständigen Inhibierung ausreichen, sind bei *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D mehr als 3,5 g/L derselben Substanz für die Inhibierung notwendig. Dieser Stamm ist also deutlich resistenter als *K. marxianus*, so dass die ISPR erst ab höheren Konzentrationen notwendig ist.

Prozessoptimierung zur Produktion von Methioninderivaten im Labormaßstab am KWI

Aufgrund der Ergebnisse der Untersuchung der Mutanten wurden die weiteren Untersuchungen zur Prozessoptimierung am KWI mit dem Wildtypstamm CEN.PK 113-7D und der Mutante CEN.PK 834-1C durchgeführt und in Absprache mit der Degussa auf Methionin als Stickstoffquelle fokussiert.

Abhängigkeit der Produktbildung von der Zelldichte und der Glucose-Fütterungsstrategie

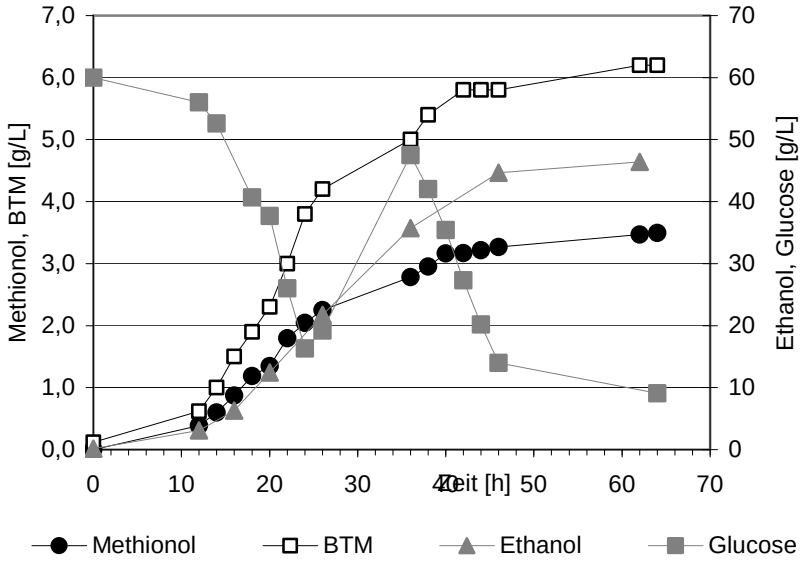


Abb. 17 Kinetiken des Wildtypstammes *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D bei Kultivierung im Multifermenter
Die Hefe wurde bei 30°C und einer Belüftungsrate von 1vvm im Multifermenter in 0,2 L synthetischem Medium mit Methionin als Stickstoffquelle kultiviert. Glucose wurde während des Prozesses ein Mal manuell nachdosiert

Abbildung 17 zeigt eine typische Wachstums- und Produktbildungskinetik des Wildtypstammes *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D. Aufgrund der hohen Glucosekonzentration zu Beginn kommt es durch den Crabtree-Effekt zur Bildung grosser Mengen Ethanol. Von den eingesetzten 10 g/L Methionol wurden in 64 Stunden 7,6 g/L verbraucht und zu 3,5 g/L Methionol konvertiert, was einer Raum-Zeit-Ausbeute von 0,05 g/Lh und einem Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/S}$ von 0,64 mol/mol entspricht.

Wie aus der Inhibierungskinetik hervorgeht, liegt bei einer Konzentration von 3,5 g/L Methionol noch keine nennenswerte hemmende Wirkung vor, es müssten also theoretisch höhere Konzentrationen erreichbar sein. Es wurde deshalb eine Kultivierung mit sehr hoher initialer Biotrockenmassekonzentration durchgeführt. Die Biomasse wurde in Komplexmedium im Bioreaktor hergestellt, abzentrifugiert und zur Biotransformation in synthetisches Medium überführt.

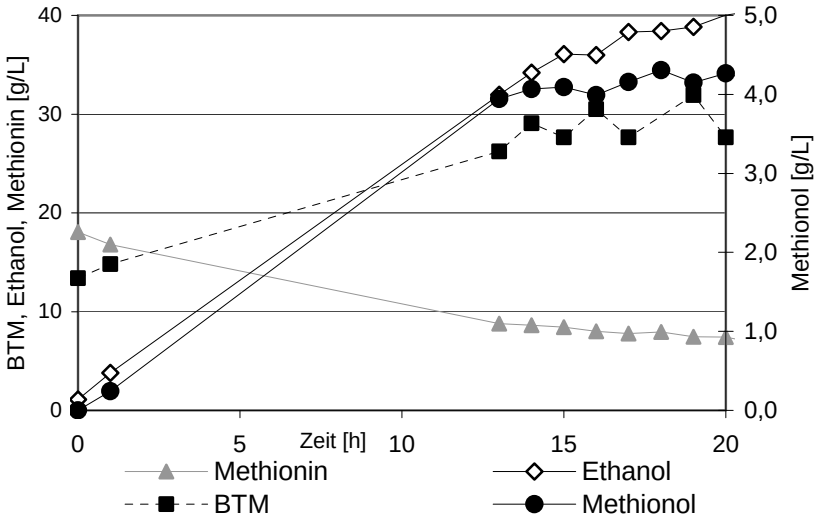


Abb. 18 Wachstums- und Produktbildungskinetik von S. cerevisiae CEN.PK 113-7D bei der Kultivierung im Bioreaktor bei hoher Zelldichte.
Die Hefe wurde bei 30°C und einer Belüftungsrate von 1vvm im Bioreaktor in 0,5 Liter synthetischem Medium mit Methionin als Stickstoffquelle kultiviert. Die Glucosezufuhr wurde so eingestellt, dass die Konzentration im Reaktor stets >2 g/L war.

In Abbildung 18 sind die Ergebnisse der Hochzelldichtekultivierung dargestellt. Ausgehend von einer Biotrockenmassekonzentration von 13 g/L wurden in 14 Stunden 4,0 g/L Methionol mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 0,29 g/Lh und $Y_{P/S}$ = 0,44 mol/mol gebildet.
Im Vergleich zum Prozess mit der Standard-Zelldichte steigt die Raum-Zeit-Ausbeute fast um den Faktor Sechs und die Produktkonzentration um 14%. Gleichzeitig sinkt die Produktausbeute um 30%.

Da 3-Methylthiopropylacetat ebenfalls als ein potentielles Produkt identifiziert wurde, folgten weitere Optimierungsexperimente mit der ATF1-Überexpressionsmutante CEN.PK 834-1C.

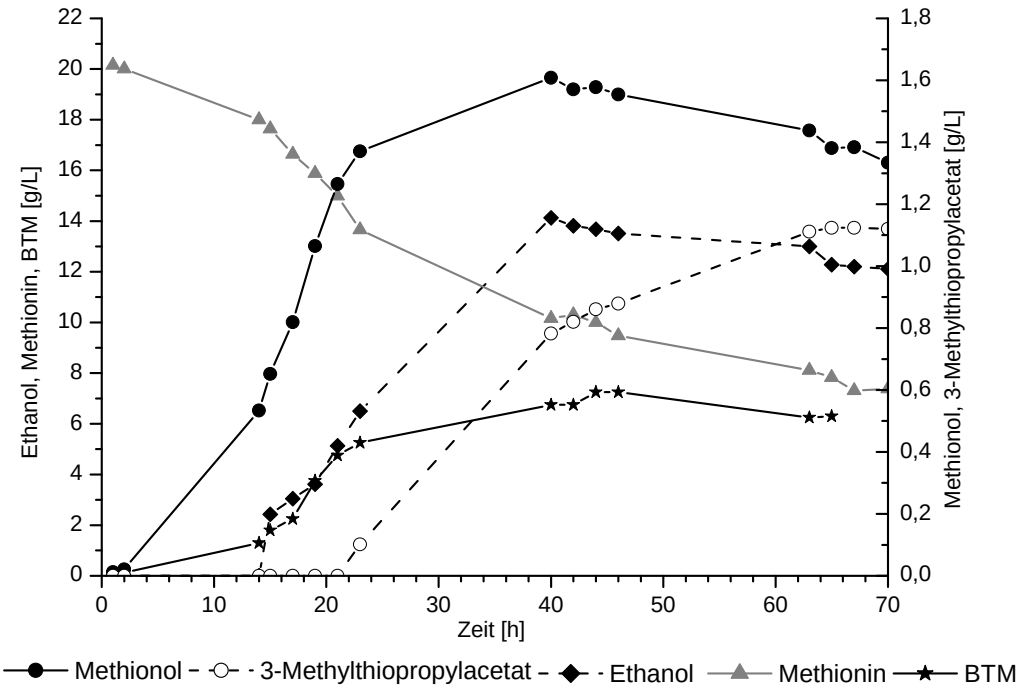


Abb. 19 Produktbildungskinetiken der ATF1-Überexpressionsmutante *S. cerevisiae* CEN.PK 834-1C bei der Kultivierung im Bioreaktor mit konstanter Glucosekonzentration
Die Hefe wurde bei 30°C und einer Belüftungsrate von 1vvm im Bioreaktor in 0,5 Liter synthetischem Medium mit Methionin als Stickstoffquelle kultiviert. Die Glucosekonzentration wurde durch automatische auf Konzentrationen von 1-2 g/L eingeregelt.

Abbildung 19 zeigt dass die ATF1-Überexpressionsmutanten *S. cerevisiae* CEN.PK 834-1C die maximale Methionolkonzentration von 1,6 g/L nach etwa 40 Stunden erreicht hat. Die Bildung des Acetatesters findet etwa 20 Stunden phasenversetzt statt und erreicht ein Maximum von 1,1 g/L.

Um die Ethanolbildung durch den Crabtree-Effekt zu verhindern wurde ein Versuch im Bioreaktor durchgeführt, bei dem die Glucosekonzentration im Medium unterhalb des Grenzwertes von 0,14 g/L eingeregelt wurde. In diesem Ansatz war das Wachstum stark verzögert, es wurden innerhalb von 120 Stunden 5 g/L Biomasse gebildet. Eine Produktbildung war nicht zu beobachten.

Im nächsten Versuch wurde daher überprüft, ob der Stamm das gebildete Ethanol wieder abbauen und als Kohlenstoffquelle nutzen kann.

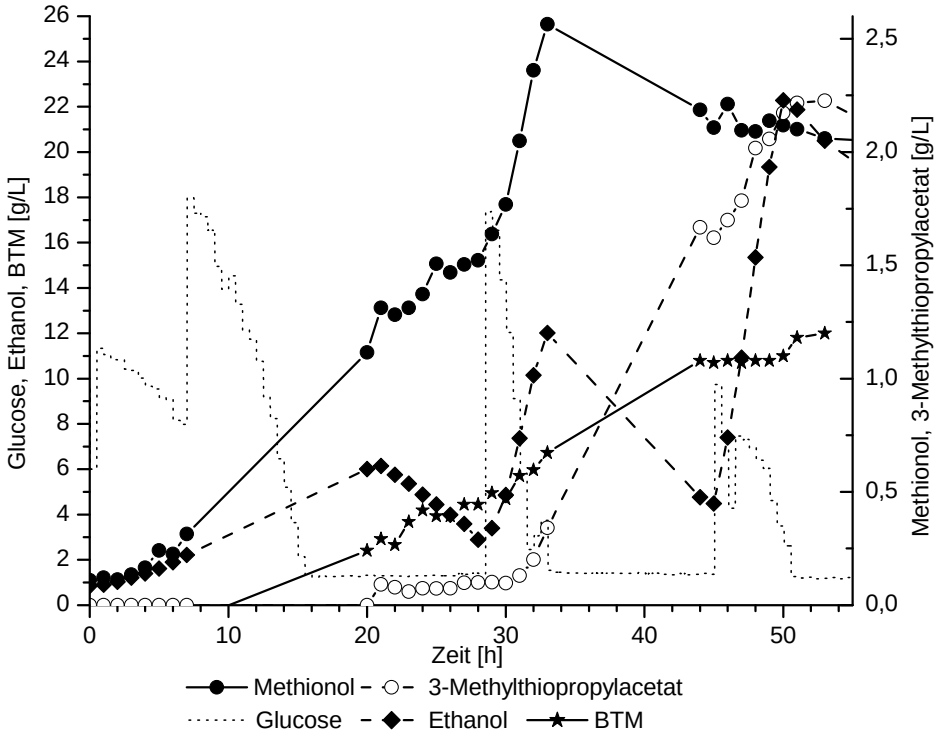


Abb. 20 Produktbildungskinetiken der ATF1-Überexpressionsmutante *S. cerevisiae* CEN.PK 834-1C bei der Kultivierung im Bioreaktor mit stossweiser Glucosedosierung
Die Hefe wurde bei 30°C und einer Belüftungsrate von 1vvm im Bioreaktor in 0,5 Liter synthetischem Medium mit Methionin als Stickstoffquelle kultiviert. Die Glucose wurde manuell zudosiert, die Konzentration im Reaktor durch das Online-Analysensystem ProcessTrace (Trace Analytics GmbH, Braunschweig) bestimmt.

Abbildung 20 zeigt, dass *S. cerevisiae* CEN.PK 834-1C die initial vorhandenen 18 g/L Glucose in etwa 6 g/L Ethanol konvertiert. Das Ethanol wird abgebaut und während dieser Phase signifikante Mengen an Biomasse und Methionol gebildet. Ein Glucosepuls bei t=28 Stunden führt zu weiterem Biomassezuwachs in unveränderter Geschwindigkeit, die Methionol- und Ethanolbildungsrate steigen jedoch beim Glucoseabbau sehr stark an. Die Methionolbildung stagniert bei einem Maximum von 2,5 g/L Methionol als der Glucosevorrat aufgebraucht ist, gleichzeitig setzt die Bildung von 3-Methylthiopropylacetat ein. Während des Abbaus der gebildeten 12 g/L Ethanol und des nächsten Glucosepulses werden insgesamt 2,25 g/L 3-Methylthiopropylacetat gebildet. Während einer Gesamtversuchsdauer von 53 Stunden werden 12 g/L Biotrockenmasse synthetisiert.

Zur Überprüfung des Effektes einer *in-situ* Produktabtrennung wurde der Stamm im Bioreaktor kultiviert und die Produkte mittels organophiler Pervaporation abgetrennt.

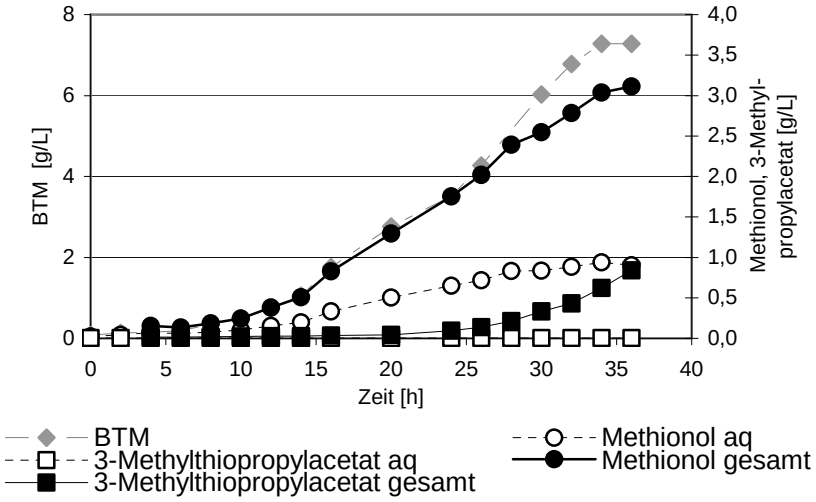


Abb. 21 Produktbildungskinetiken der ATF1-Überexpressionsmutante *S. cerevisiae* CEN.PK 834-1C bei der Kultivierung im Bioreaktor mit organophiler Pervaporation zur ISPR
Die Hefe wurde im Labor-Bioreaktor in 1,4 L Medium bei 32°C und einer Begasungsrate von 1 vvm. Die Rührerdrehzahl wurde so geregelt, dass pO2 ≥ 30% der Sättigung mit Luft war, die Glucosekonzentration wurde durch automatische Zudosierung > 10 g/L gehalten. Die Produktabtrennung erfolgte durch zwei parallel angeordnete Pervaporationsmodule mit je 0,099 m² Membranfläche und einem permeatseitigen Druck < 6 x 10^{-4} bar. Bei jedem Kühlfallenwechsel wurde auch eine Probe der Kultursuspension entnommen. Die Produktkonzentrationen in der Kultursuspension (Index aq) und im Permeat wurden per HPLC bestimmt. Der Index ges bezeichnet die Summe der Produktmenge in der Kultursuspension und die kumulierte Produktmenge im Permeat, bezogen auf das Fermentationsvolumen.

Abbildung 21 zeigt, dass 3-Methylthiopropylacetat sehr gut durch organophile Pervaporation abzutrennen ist, da das Produkt in der wässrigen Phase nicht nachweisbar ist. Dagegen akkumuliert nahezu 1 g/L Methionol im Medium, weil es unter den vorliegenden Bedingungen nur mässig pervaporiert. Weitere Details zur Pervaporation sind in Abbildung 12 dargestellt. Obwohl die 3-Methylpropylacetatproduktion im Ansteigen begriffen war wurde der Versuch nach 36 Stunden abgebrochen, da an der fallenden CO_2-Konzentration in der Abluft das Absterben der Mikroorganismen erkennbar war.

Tab. 8: Zusammenfassung der Kennzahlen einiger wichtiger Kultivierungsexperimente
Alle Experimente wurden mit pH- und pO_2-Regelung sowie Glucosefütterung entweder im Multifermenter oder im Bioreaktor durchgeführt.

Stamm	CEN.PK 834-1C						CEN.PK 113-7D	
Kultivierungsart	Konstante Glucosekonzentration		Stossweise Glucosezufuhr		ISPR durch Pervaporation		Standard-Zelldichte	Hoch-zelldichte
Produkt	Methionol	3-Methyl-thiopropyl-acetat	Methionol	3-Methyl-thiopropyl-acetat	Methionol	3-Methyl-thiopropyl-acetat	Methionol	Methionol
Betrachteter Zeitraum [h]	40	65	33	53	36	36	64	14
Konzentration [g/L]	1,6	1,1	2,5	2,2	3,1	0,84	3,5	4,0
Raum-Zeit-Ausbeute [g/Lh]	0,04	0,02	0,07	0,04	0,09	0,02	0,05	0,29
$y_{P/X}$ [g/g BTM]	0,22	0,18	0,37	0,19	0,43	0,12	0,50	0,14
$y_{P/S}$ [mol/mol]	0,21	0,09	0,35	0,15	0,87	0,17	0,64	0,44

Tabelle 8 fasst die Ergebnisse der Kultivierungsexperimente zur Prozessoptimierung zusammen. Die höchste Methionolkonzentration und die höchste Raum-Zeit-Ausbeute wurde bei der Hochzelldichtekultivierung des Wildtypstammes *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D erreicht. Hier ist jedoch der Zeitaufwand für die Produktion der Biotrockenmasse zu berücksichtigen, der der Prozesszeit zugerechnet werden müsste. Die Kultivierung mit Standardzelldichte dauert zwar länger, erreicht aber eine ähnlich hohe Produktkonzentration und ein deutlich höhere Produktausbeute.

Bei den Kultivierungen der ATF1-Überexpressionsmutante CEN.PK 834-1C werden bei konstanter, niedriger Glucosekonzentration deutlich niedrigere Produktkonzentrationen und Produktausbeuten erreicht als wenn dem Stamm nur stossweise Glucose zudosiert wird und das gebildete Ethanol ebenfalls als Energiequelle dient. Die höchste Methionolkonzentration wurde im Prozess mit ISPR durch Pervaporation erreicht, wegen der kurzen Dauer wurde in dieser Kultivierung jedoch nur wenig 3-Methylthiopropylacetat gebildet. Die in-situ Produktabtrennung führte zur höchsten Methionolausbeute pro Biomasse und ebenso zur höchsten Methionolausbeute pro mol Methionin. Letzterer Wert von 0,87 mol/mol ist kritisch zu bewerten, da sich zusammen mit der 3-Methylthiopropylacetatausbeute von 0,17 mol/mol eine Gesamtausbeute von > 100% ergibt. Ursache dafür sind sich aufsummierende Fehler in der Analytik.

Temperaturabhängigkeit der Produktbildung bei S. cerevisiae CEN.PK 834-1C

Frühere Experimente mit der thermotoleranten Hefe *Kluyveromyces marxianus* CBS 600, die die Fähigkeit zur Bildung von Acetatestern besitzt, hatten gezeigt, dass die Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 30°C auf 45°C zu einer Umkehrung des Verhältnisses von 2-Phenylethanol und 2-Phenylethylacetat führen (Etschmann, M.M.W. 2004). Es sollte überprüft werden, ob eine derartige Steuerung des Produktverhältnisses auch bei *S. cerevisiae* CEN.PK 834-1C möglich ist.

In einem Vorversuch wurden zunächst die Temperaturobergrenze für die Kultivierung des Stammes als 38°C identifiziert.

Der Versuch wurde in einem Multifermentationssystem (Dasgip GmbH, Jülich) durchgeführt, das die gleichzeitige Kultivierung von vier verschiedenen Ansätzen á 0,2 Litern mit pH- und pO_2-Regelung sowie feeding ermöglicht.

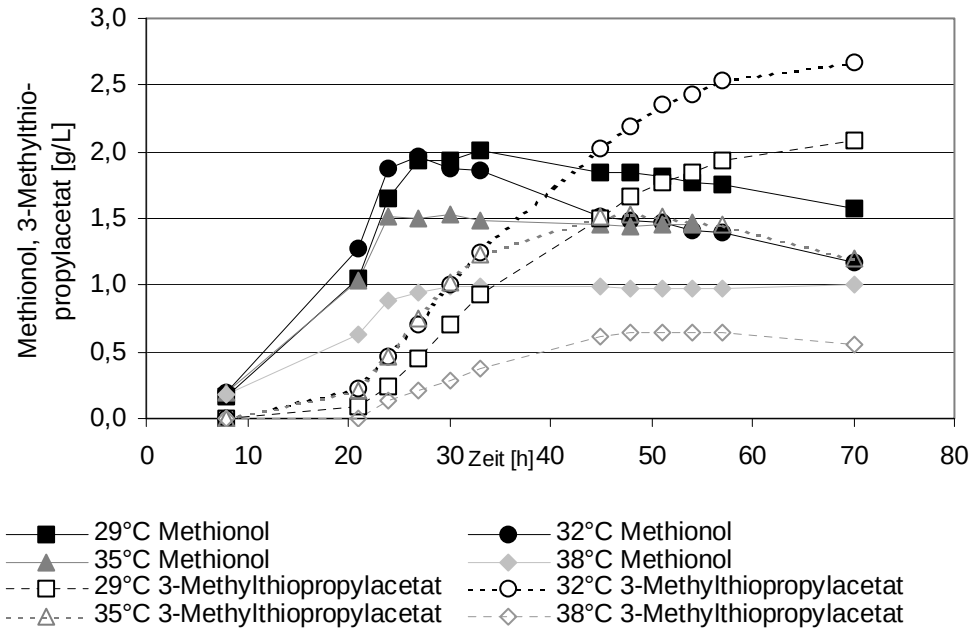


Abb. 22 Produktbildungskinetiken der ATF1-Überexpressionsmutante *S. cerevisiae* CEN.PK 834-1C bei der fed-batch Kultivierung im Dasgip-Multifermenter in Abhängigkeit von der Temperatur
Die Hefe wurde bei der angegebenen Temperatur und einer Belüftungsrate von 1vvm im Multifermenter in 0,2 L synthetischem Medium mit Methionin als Stickstoffquelle kultiviert. Die Glucosezufuhr wurde so eingestellt, dass die Konzentration im Reaktor 10-20 g/L betrug.

Abbildung 22 zeigt, dass die Methionolbildungskinetik von *S. cerevisiae* CEN.PK 834-1C bei 29°C und 32°C identisch verläuft und ihr Maximum nach 27 Stunden bei 2,0 g/L erreicht. Die Synthese von 3-Methylthiopropylacetat hingegen geht bei 32°C schneller und zu einer höheren Endkonzentration (2,7 g/L) vonstatten als bei 29°C (2,1 g/L). Höhere Temperaturen als 32°C haben einen deutlich negativen Einfluss auf die Bildung beider Produkte.

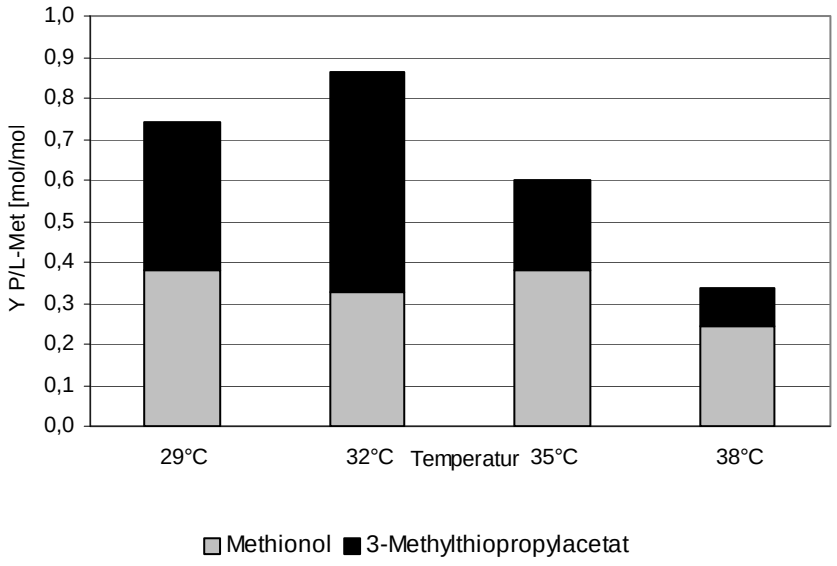


Abb. 23 Ausbeutekoeffizienten Y P/S der ATF1-Überexpressionsmutante *S. cerevisiae* CEN.PK 834-1C bei der Kultivierung im Multifermenter in Abhängigkeit von der Temperatur zum Zeitpunkt t = 70 Stunden.
Der absolute Methioninverbrauch betrug zwischen 33 und 39 mmol/L.

Die Betrachtung der Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/S}$ in Abbildung 23 macht deutlich, dass 32°C die optimale Kultivierungstemperatur für *S. cerevisiae* CEN.PK 834-1C ist, da hier mit 0,85 mol/mol in Summe am meisten Produkt gebildet wird. Die Methionolanausbeute ist von 29°C bis 35°C mit etwa 0,35 mol/mol nahezu konstant, während bei 35°C schon deutlich weniger 3-Methylthiopropylacetat gebildet wird als bei niedrigeren Temperaturen. Der negative Einfluss von Temperaturstress lässt sich daran ablesen, dass bei 38°C die Gesamtausbeute nur noch wenig mehr als 50% der Gesamtausbeute bei 35°C beträgt.

Schlussfolgerungen aus der Prozessoptimierung zur Produktion von Methioninderivaten

Nach diversen Massnahmen zur Prozessoptimierung wurde eine Konzentration von 4 g/L Produkt (Methionol + 3-MTPA) erreicht. Da aus der Inhibierungskinetik hervorgeht, dass bei dieser Konzentration noch keine nennenswerte Inhibierung zu erwarten ist, muss es andere Ursachen für diesen Grenzwert geben. Die Transaminierungsprodukte des L-Methionins, 4-Methylthio-2-oxobutyrat und 4-Methylthio-2-hydroxybutyrat, sind in nennenswerter Konzentration im Kulturmedium vorhanden, haben jedoch keine inhibierende Wirkung, wie durch die Aufnahme einer Inhibierungskinetik nachgewiesen wurde. Auch Ethanol tritt nicht in Grössenordnungen auf, die zu einer Einstellung des Wachstums führen würden, ebenso wurde eine synergistische Wirkung von Methionol und Ethanol experimentell ausgeschlossen.

Eine mögliche Ursache ist an der Schnittstelle zwischen Ehrlich-Stoffwechselweg und Citratzyklus zu suchen, die in Abbildung 24 dargestellt ist.

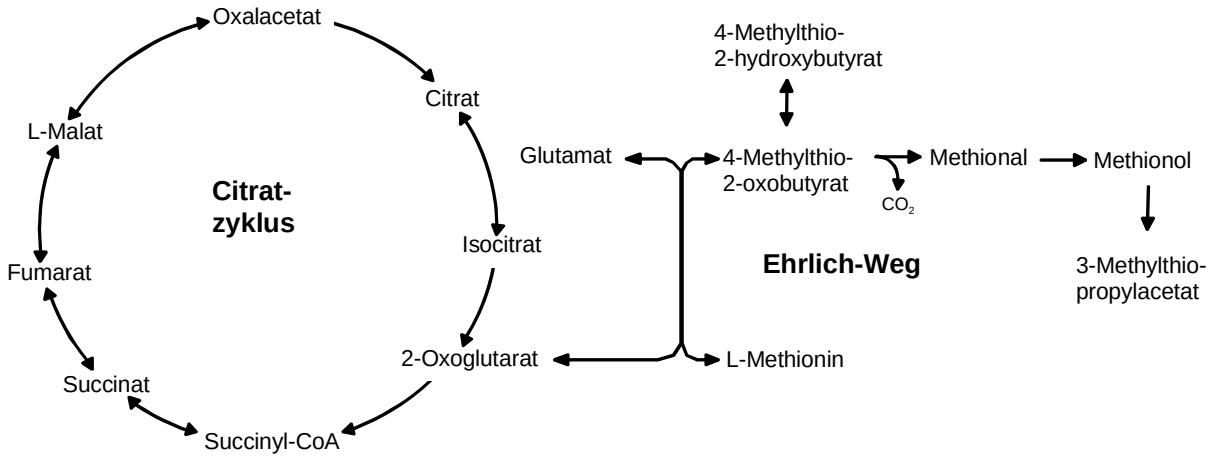


Abb. 24. Schematische Darstellung der Schnittstelle zwischen dem Ehrlich-Stoffwechselweg und dem Citratzyklus *in Saccharomyces cerevisiae*.

Bei der Auswertung der HPLC-Chromatogramme fiel auf, dass gegen Ende aller Kultivierungen grosse Peaks auftreten, die mit hoher Wahrscheinlichkeit den Intermediaten des Citratzyklus Citrat, Isocitrat und 2-Oxoglutarat zuzuordnen sind. Die Peaks sind mit der vorhandenen Chromatographietechnik nicht zu trennen und können daher nicht einzeln quantifiziert werden. Für 2-Oxoglutarat wurde mit dem Wildtypstamm *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D eine Inhibierungskinetik aufgenommen die zeigte, dass eine 2-Oxoglutaratkonzentration von 2 g/L zu einer vollständigen Wachstumseinstellung führt. Weiterführende molekularbiologische Arbeiten sollten daher, nach eindeutiger Identifikation der akkumulierenden Intermediate, in die Richtung gehen, diese Akkumulation zu verhindern.

Prozessoptimierung zur Produktion von Phenylalaninderivaten im Labormaßstab bei der Degussa

Die Erkenntnisse aus den Voruntersuchungen zum ISPR führten dazu, dass bei der Degussa die Pertraktion mit Cyklohexan untersucht wurde. Dazu wurde im Labormaßstab ein integrierter Bioprozess etabliert (2L Bioreaktor + 558 cm^2 Pertraktionsmodul), als Ausgangsstamm für die Prozessentwicklung wurde der Wildstamm *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D gewählt. Es zeigte sich, dass der Membranflux nicht in der Lage war, das 2-PE wirksam aus dem Fermentationsmedium abzureichern, so dass beim gegebenem experimentellen Setup über 90% der Wertstoffe in der Kulturbrühe verblieben. Entsprechend schlecht waren die erzielten Fermentationsdaten (2,1g/L 2-PE in 46h).

Bei der Zweiphasen-Fermentation stellte sich in Verlauf einer Reihe von Experimenten heraus, dass mit Oleylalkohol als *in-situ*-Extraktionsmittel keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielbar waren. Der Grund dafür waren Schwankungen in der Produktqualität der verschiedenen Chargen Oleylalkohols. Dies ist für einen industriellen Produktionsprozess nicht akzeptabel, daher scheidet diese Kombination aus praktischen Erwägungen aus.

Die Zweiphasen-Fermentationen mit PPG wurden im Labormaßstab untersucht und optimiert. Folgende Erkenntnisse konnten dabei gewonnen werden:

- Da das Extraktionsmittel leicht inhibierend auf die Hefen wirkt, ist es von Vorteil, dieses erst nach ca. 15h Kultivierungszeit zur Fermentation hinzuzufügen, anstatt von t=0h im Zweiphasen-System zu fermentieren.
- Eine Erhöhung der Eduktkonzentration (Phenylalanin) führt zu etwa gleichbleibenden Ausbeuten an 2-PE ($Y_{2\text{-PE/Phe}}$), allerdings sinken die Produktivitäten signifikant.
- Eine Medienoptimierung ergab, dass das Ausgangsmedium, in dem der Stamm kultiviert wurde, insbesondere bei längerer Kultivierungszeit, einen Mangel an komplexen Medienbestandteilen aufwies, was durch Zugabe eines komplexen Medienzusatzes (Yeast Nitrogen Base w/o amino acids, DIFCO) behoben werden konnte.

Die charakteristischen Werte einer 2-Phasen-Fermentation im 2L Labormaßstab sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Tab. 9: Charakteristische Fermentationsdaten für die Produktion von 2-PE im Labormaßstab

Fermentationszeit [h]	[2-PE] Org. Phase [g/kg]	[2-PE] [g/kg Arbeitsvol. Ferm.]	($Y_{2\text{-PE/Phe}}$) [g/g]
53	10,88	2,48	0,62

Die im Rahmen dieses Projekts erreichten Produktkonzentrationen liegen deutlich unter bereits publizierten Werten aus Fermentationen mit *K. marxianus* (Etschmann, M.M. und Schrader, J. 2006).

Scale-up in den Technikumsmaßstab

Das Scale-up des Laborprozesses wurde in einer Technikumsanlage der Degussa durchgeführt, der Scale-up-Faktor betrug 150 (von 2L auf 300L). Die volumetrische Begasungsrate wurde konstant gehalten, für die Rührerdrehzahl wurden für diesen Maßstab typische Werte verwendet. Wie sich bei Charakterisierung des Prozesses ergab, waren keine Stoff- und Wärmetransportprobleme in diesem Prozess beobachtbar, die hohe Viskosität des PPG im Originalzustand wurde durch die intensive Emulgierung und Vermischung mit der wässrigen Phase ausreichend reduziert. Das Scale-up konnte erfolgreich durchgeführt werden, die typischen Daten einer Scale-up-Fermentation sind in folgender Tabelle dargestellt:

Tab. 10: Charakteristische Fermentationsdaten für die Produktion von 2-PE im Technikumsmaßstab

Fermentationszeit [h]	[2-PE] Org. Phase [g/kg]	[2-PE] [g/kg Arbeitsvol. Ferm.]	($Y_{2\text{-PE/Phe}}$) [g/g]
65	10,31	2,61	0,7

Da sich die molekularbiologischen Arbeiten aufwendiger gestalteten als ursprünglich geplant, konnte eine für den industriellen Einsatz geeignete Mutante (einsetzbar in teilkomplexen Medien, nicht lizenzpflichtiger Stamm) nicht in einem Zeitrahmen fertiggestellt werden, der eine Charakterisierung des Stammes im Labor und Technikum gemäss des Projektzeitplans zugelassen hätte. Deshalb wurde für das Scale-up ebenfalls der Stamm *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D verwendet.

Für die Umwandlung von Methionin zu Methionol und 3-Methylthiopropylacetat wurden als Datengrundlage für einen industriellen Produktionsprozess die Daten aus dem 2L-Maßstab verwendet. Wie oben ausgeführt ist bei dieser Produktion kein ISPR notwendig (was den Prozess technisch vereinfacht und damit auch verbilligt), darüber hinaus sind keine Stoff- oder Wärmetransportlimitationen beobachtet worden, so dass dieser Prozess in einem „klassischen“ Rührreaktor bis in den Kubikmetermaßstab durchführbar erscheint.

II.2 Voraussichtlicher Nutzen der Forschungsergebnisse - Verwertungsplan

Das Marktpotential biotechnologisch erzeugter Duft- und Aromastoffe ist nur schwer zu beziffern. Die biotechnologisch gebildeten Produkte haben den Vorteil, als „natürlich“ deklarierbare Stoffe einen deutlich höheren Preis gegenüber ihren chemischen Analogen zu besitzen. Mit den entwickelten Verfahren soll aber nicht nur dieses Marktsegment der natürlichen Produkte adressiert werden, sondern mittelfristig auch Marktanteile der mengenmäßig dominierenden chemisch synthetisierten Substanzen substituiert werden. Allerdings wird dieser Verdrängungsprozeß nur Erfolg haben, wenn die gegebenen Produktivitäten und Ausbeuten so gut sind, dass man auch preislich in Konkurrenz zu den nicht-natürlichen Duft- und Aromastoffen treten kann. Für die Wirtschaftlichkeitsbetrachtung bedeutet dies: Der Prozeß muß von Beginn an (im Hochpreissegment) ökonomisch tragfähig sein. Durch Prozeßverbesserung (Stichwort: Erfahrungskurve) und „Economy of Scale“ kann dann ein Substitutionsprozeß eingeleitet werden.

Wirtschaftlichkeitsbetrachtung

Als erste Größenordnung für das Marktvolumen der herzustellenden Aromastoffe wird für die Wirtschaftlichkeitsberechnung ein Markt von 1000 kg/Jahr 2-Phenylethanol bzw. 500 kg/Jahr Methionol vorausgesetzt. 2-Phenylethanol als marktgängiges Produkt mit mehreren Tausend Jahrestonnen in nicht-natürlicher Qualität hat daher den größeren Startmarkt als Methionol.
Kennzeichnend für natürliche Aromastoffe in Nischenmärkten sind sehr hohe Preise, was auch für diese beiden Produkte vorausgesetzt wurde. Die Kosten für die Biokonversion wurden maßstabsabhängig pauschal pro Fermentationslauf aus Erfahrungswerten taxiert und beinhalten alle relevanten Kostenarten (Personal, Abschreibung, Kosten für Standard-Medienbestandteile, Entsorgung…). Für die Konfektionierung des produzierten Duft-und Aromastoffs wurde ebenfalls ein Pauschalbetrag verwendet. Als weitere signifkante Kostenquelle wurde der Precursor (Aminosäure) berücksichtigt. Dabei ist zu bedenken, dass dieser natürlichen Ursprungs sein muß, um den Label „natürlicher Duft- und Aromastoff“ zu erhalten, des weiteren sollte er den Anforderungen „halal“ und „kosher“ genügen, so dass fermentativ, auf pflanzlicher Kohlenhydratbasis, hergestellte Aminosäuren als geeignet angesehen werden können. Da diese Precursors ein entscheidender Kostenfaktor sind, wurde als wichtigste Benchmark für die Biokonversion die Ausbeute $Y_{P/S}$ (Masse Aromastoff pro Masse Precursor) verwendet.

Die Basisdaten der entwickelten Bioprozesse ergeben sich aus den im Rahmen dieses Projektes erzielten Ergebnissen und sind folgender Tabelle zusammengefasst:

Tab. 11: Basisdaten der Bioprozesse für die Wirtschaftlichkeitsbetrachtung

	Fermentationszeit	Produktkonzentration	$Y_{P/S}$
	[h]	[kg/m^3]	[g/g]
2-Phenylethanol	65	2,61	0,7
Methionol	64	3,5	0,52

2-Phenylethanol

Für Phenylethanol wurde eine Marktgröße von 1000kg/Jahr und 10 Jahrestonnen betrachtet. Die Kosten des Precursors (L-Phe) waren 50 €/kg. Der Gewinn/Verlust pro Masseneinheit Produkt ist in folgender Grafik dargestellt:

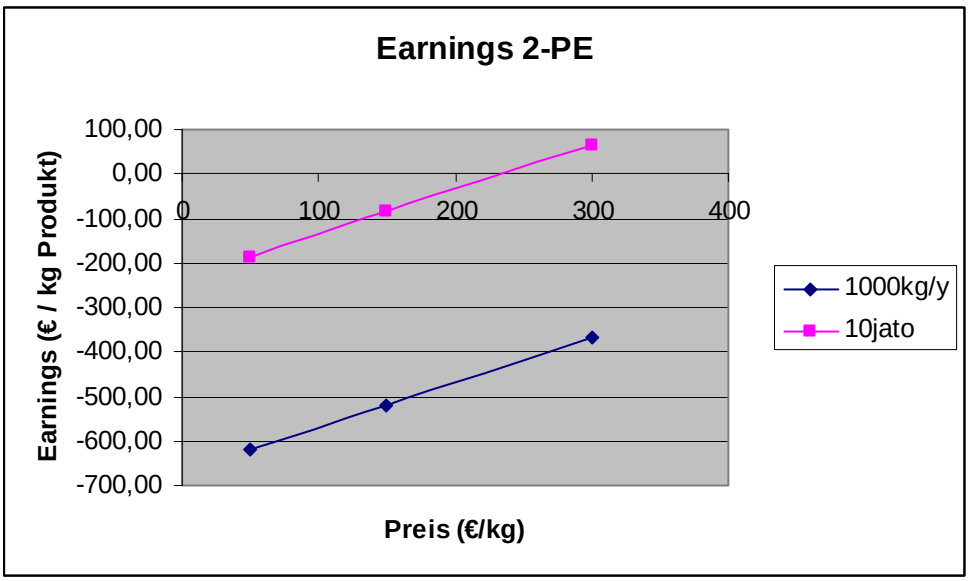


Abb. 25: Gewinn/Verlust bei der Produktion von 2-PE

Es zeigt sich deutlich, dass die im Projekt erreichten Ergebnisse keine wirtschaftliche Produktion von 2-PE ermöglichen. Selbst mit einem hohen Anfangspreis (300€/kg) ist kein Gewinn erwirtschaftbar. Die Precursorkosten betragen bei kleiner Produktionsmenge ca. 10%, beim höhervolumigen Szenario 30% der Gesamtkosten. Sollte es möglich sein, das geplante Marktvolumen zu verzehnfachen (auf 10jato), bewegt sich bei einem hohen Preis von 300€/kg der Prozeß grenzwertig in der Gewinnzone, allerdings fallen üblicherweise mit steigenden Mengen die Preise, so dass dann wahrscheinlich nur Preise deutlich unter 300€/kg realisierbar sind (break-even bei einem Preis von ca. 230€/kg).

Der Weg zu einem wirtschaftlichen Prozeß führt hier über deutlich höhere Produktivitäten der Biokonversion. Die Ausbeute $Y_{P/S}$ liegt mit 0,7 g/g schon nahe an dem theoretischen Maximalwert des Stoffwechselwegs (0,74 g/g). Hier wäre ein weiterer Weg zur ökonomischen Optimierung die Umlenkung von *in-vivo*-hergestelltem L-Phe in den Ehrlich-Stoffwechselweg. Eine metabolische Flussanalyse bei einer anderen 2-PE produzierenden Hefe (Wittmann C. et al., 2002) zeigte, dass diese Umlenkung im Metabolismus so nicht vorkommt, somit wäre dies ein interessantes Potential für weitergehende Stammoptimierung.

Methionol

Für Methionol wurde eine Marktgröße von 500kg/y und 5 Jahrestonnen betrachtet, halb so groß wie der für 2-PE. Die Kosten des Precursors (L-Met) waren 100€/kg. Der Gewinn/Verlust pro Masseneinheit Produkt ist in folgender Grafik dargestellt:

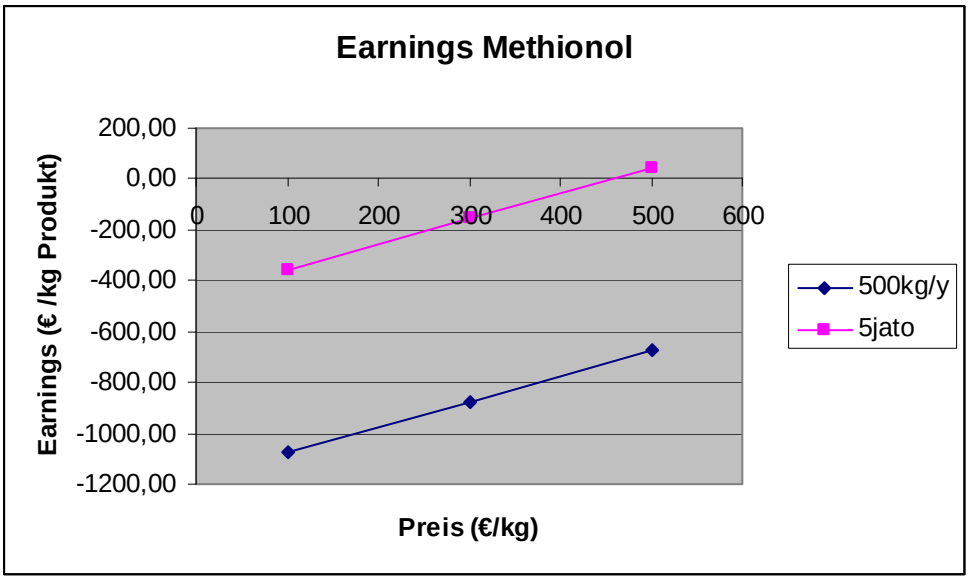


Abb. 26: Gewinn/Verlust bei der Produktion von 2-PE

Es zeigt sich auch hier deutlich, dass die im Projekt erreichten Ergebnisse keine wirtschaftliche Produktion von Methionol ermöglichen. Selbst mit einem hohen Anfangspreis (500€/kg) ist kein Gewinn erwirtschaftbar. Die Precursorkosten betragen bei kleiner Produktionsmenge ca. 16%, beim höhervolumigen Szenario 42% der Gesamtkosten, bedingt durch das deutlich teurere L-Methionin. Sollte es möglich sein, das geplante Marktvolumen zu verzehnfachen (auf 5 jato), bewegt sich bei einem hohen Preis von 500€/kg der Prozeß knapp in der Gewinnzone, allerdings gilt auch hier die Regel, dass steigende Mengen fallende Preise nach sich ziehen, so dass dann wahrscheinlich nur Preise deutlich unter 500€/kg realisierbar sind (break-even bei einem Preis von ca. 470€/kg).
Der Weg zu einem wirtschaftlichen Prozeß führt hier sowohl über deutlich höhere Produktivitäten als auch Ausbeuten der Biokonversion. Die Ausbeute $Y_{P/S}$ liegt mit 0,52 g/g noch deutlich unter dem theoretischen Maximalwert des Stoffwechselwegs (0,82 g/g). Hier wäre die Umlenkung von *in-vivo*-hergestelltem L-Met in den Ehrlich-Stoffwechselweg noch lohnender, somit ein gentechnischer Ansatz noch vielversprechender.

Aufgrund der hier gezeigten groben Wirtschaftlichkeitsabschätzung haben die in diesem Projekt erreichten Biokonversionsleistungen noch nicht den Status erreicht, damit einen ökonomisch kompetetiven Produktionsprozeß aufzubauen. Es wird weitere Optimierung, insbesondere in Richtung Produktivität, notwendig sein, um Entsprechendes zu erreichen. Aufgrund der publizierten Datenlage (Etschmann, M.M. und Schrader, J. 2006) sollte aber das Potential vorhanden sein, entsprechende Umsatzraten und Titer zu erreichen. Der große prozeßtechnische Vorteil der Bäckerhefe *S. cerevisiae*, nämlich die höhere Toleranz gegenüber lösungsmittel-ähnlichen Stoffen (wie 2-PE), kann durch ein leistungsfähigeres, kostengünstiges ISPR für weniger tolerante Hefen wie *K. marxianus* kompensiert werden.

Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten

Durch die zentrale Rolle der DECHEMA als Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie e.V. ist sie ein idealer Multiplikator für die kurzfristige Verbreitung der wissenschaftlichen Ergebnisse innerhalb der wissenschaftlich-technischen Gemeinde in Deutschland und international. Aufgrund der interdisziplinären Ausrichtung der DECHEMA können Ergebnisse aus Verbundforschungsprojekten z.B. über die Internetseiten einer breiten Interessensgemeinschaft zugänglich gemacht werden. Die Darstellung der Ergebnisse in einzelnen Arbeitsausschüssen (z.B. „Technik biologischer Prozesse“,

„Lebensmittelbiotechnologie“) innerhalb des Forschungsausschusses Biotechnologie oder im Rahmen von DECHEMA-Kolloquien oder –Tagungen ermöglicht ebenfalls eine gezielte, unmittelbare Information der Entscheidungsträger in Hochschule und Industrie. Durch diesen Austausch ist es wahrscheinlich, dass die neuen Ergebnisse oder die übergeordneten methodischen Lösungskonzepte Eingang in andere Hochschul- und Industrieforschungsprojekte finden, in denen vergleichbare Fragestellungen zu lösen sind.

II.3 Fortschritt auf dem Forschungsgebiet bei anderen Stellen

Auf dem Gebiet des Ehrlich Stoffwechselweges wird nur wenig Forschung betrieben. Üblicherweise werden dann Prozesse in physiologischen Medien, wie z.B. Traubenmost, untersucht (Garavaglia, J. et al. 2007). Neue Erkenntnisse anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls hohe Aminosäure-konzentrationen vorlegen, sind während des Projektes nicht bekannt geworden.

Organophile Pervaporation und Pertraktion sind ebenfalls Nischenthemen, zumal in der Kopplung mit biologischen Prozessen (Schafer, T. et al. 2006) (Heerema, L. et al. 2006). Deshalb werden die hier vorgestellten Ergebnisse lediglich am Rande von diesen Entwicklungen beeinflusst.

II.4 Veröffentlichungen

Die bisherigen Ergebnisse wurden auf dem Symposium Biokonversion der FNR am 12.10.2005 in Frankfurt am Main sowie beim Symposium ’50 Years of Microbiology’ der Universität Frankfurt am Main vom 2.-3.12.2005 vorgestellt.

Eine Publikation für wissenschaftliche Fachzeitschriften (Applied Microbiology and Biotechnology) wird zurzeit erarbeitet. Weitere Vorträge auf Fachtagungen sowie Veröffentlichungen in Fachzeitschriften sind in Planung.

II.5 Literatur

Dickinson, J. R., Salgado, L. E. und Hewlins, M. J. (2003). The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 278 (10): 8028-34.

Etschmann, M. M., Bluemke, W., Sell, D. und Schrader, J. (2002). Biotechnological production of 2-phenylethanol. Appl Microbiol Biotechnol 59 (1): 1-8.

Etschmann, M. M. und Schrader, J. (2006). An aqueous-organic two-phase bioprocess for efficient production of the natural aroma chemicals 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate with yeast. Appl Microbiol Biotechnol 71 (4): 440-443.

Etschmann, M. M. W. (2004). Entwicklung eines integrierten Verfahrens zur biotechnologischen Produktion von 2-Phenylethanol. Norderstedt., Books on Demand.

Garavaglia, J., Hickmann Flores, S., Pizzolato, T. M., do Carmo Peralba, M. und Zachia Ayub, M. A. (2007). Bioconversion of L-phenlyalanine into 2-phenylethanol by Kluyveromyces marxianus in grape must cultures. World Journal of Microbiology & Biotechnology 23 (9): 1273-1279.

Heerema, L., Roelands, M., Hanemaaijer, J. H., de Bont, J. und Verdoes, D. (2006). In-situ phenol removal from fermentation broth by pertraction. Desalination 200 (1-3): 485-487.

Krings, U. und Berger, R. G. (1995). Porous polymers for fixed bed adsorption of aroma compounds in fermentation processes. Biotechnology Techniques 9 (1): 19-24.

Lilly, M., Lambrechts, M. G. und Pretorius, I. S. (2000). Effect of Increased Yeast Alcohol Acetyltransferase Activity on Flavor Profiles of Wine and Distillates. Applied and Environmental Microbiology 66 (2): 744-753.

Schafer, T., Serrano-Santos, M. B., Rocchi, S. und Fuoco, R. (2006). Pervaporation membrane separation process for enhancing the selectivity of an artificial olfactory system ("electronic nose"). Anal Bioanal Chem 384 (4): 860-6.

van Dijken, J.P., Bauer, J., Brambilla, L., Duboc, P., Francois, J.M., Gancedo, C., Giuseppin, M.L., Heijnen, J.J., Hoare, M., Lange, H.C., Madden, E.A., Niederberger, P., Nielsen, J., Parrou, J.L., Petit, T., Porro, D., Reuss, M., van Riel, N., Rizzi, M., Steensma, H.Y., Verrips, C.T., Vindelov, J., Pronk, J.T. (2000). An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. Enzyme Microb Technol 26 (9-10): 706-714.

Wittmann, C., Hans, M., Bluemke, W. (2002). Metabolic physiology of aroma producing *Kluyveromyces marxianus*. Yeast 19, 1351-1363.