

**Untersuchungen zum biotechnologischen Potenzial des fakultativ  
photosynthetischen Bakteriums *Rhodospirillum rubrum*  
und dessen Zentralstoffwechsel**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl.-Biochem. Christiane Rudolf  
geb. am 26. Juli 1983 in Merseburg

Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Marwan  
Prof. Dr. Marco Oldiges

eingereicht am: 09.07.2012

verteidigt am: 15.10.2013



Christiane Rudolf  
Woltersdorferstr. 64  
39175 Biederitz

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zu dem Thema

Untersuchungen zum biotechnologischen Potenzial des  
fakultativ photosynthetischen Bakteriums  
*Rhodospirillum rubrum* und dessen Zentralstoffwechsel

selbstständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, 6. Dezember 2013

.....

Christiane Rudolf





*Auch aus Steinen, die einem in den Weg gelegt werden, kann man etwas schönes bauen.*

Johann Wolfgang von Goethe

*für den kleinen Bär*



# Inhaltsverzeichnis

Danksagung	v
Abstract	vii
Zusammenfassung	ix
Abkürzungsverzeichnis	xi
Symbolverzeichnis	xv
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Rhodospirillum rubrum</i> . . . . .	1
1.1.1 Allgemeines . . . . .	1
1.1.2 Aufbau und Funktionsweise photosynthetischer Membranen . . . . .	3
1.1.3 Aufnahme von Kohlenstoffsubstraten . . . . .	6
1.1.4 Aufnahme von nicht-Kohlenstoff Substraten . . . . .	10
1.1.5 Zentralstoffwechsel in <i>R. rubrum</i> . . . . .	12
1.2 Grundlagen der Prozessführung . . . . .	22
1.2.1 Batch-Verfahren . . . . .	22
1.2.2 Fedbatch-Verfahren . . . . .	23
1.2.3 2-Stufen-Prozess . . . . .	23
1.2.4 Kontinuierliche Kultivierung unter Zellrückhaltung . . . . .	24
1.3 Bildung und Anwendung biotechnologisch interessanter Produkte . . . . .	25
1.3.1 Biosynthese von Carotinoiden . . . . .	25
1.3.2 Bacteriochlorophyll a und Porphyrine aus <i>R. rubrum</i> . . . . .	28
1.3.3 Biosynthese von Coenzym Q <sub>10</sub> . . . . .	33
1.3.4 Biosynthese von Polyhydroxybutyrat . . . . .	34
1.3.5 Bildung von molekularen Wasserstoff . . . . .	36
1.3.6 Bildung von organischen Säuren . . . . .	39
1.4 Motivation . . . . .	40
<b>2 Materialien und Methoden</b>	<b>43</b>
2.1 Stämme und Stammhaltung . . . . .	43
2.2 Medien . . . . .	44
2.3 Feedlösungen . . . . .	46
2.4 Kultivierungen . . . . .	49
2.4.1 Vorkulturen . . . . .	49
2.4.2 Schüttelkolbenversuche . . . . .	49
2.4.3 Fermentationen DASGIP-Anlage . . . . .	50
2.4.4 Fermentationen Braun Biostat C . . . . .	53
2.4.5 Kultivierung unter Zellrückhaltung (Perfusion) . . . . .	55
2.4.6 Probennahme intrazelluläre Metabolite und Produkte . . . . .	57
2.4.7 Berechnung intrazelluläre Metabolite . . . . .	58

2.5	Analytische Methoden . . . . .	59
2.5.1	Bestimmung der optischen Dichte und Biotrockenmasse . . . . .	59
2.5.2	Ganzzellspektren . . . . .	60
2.5.3	Bestimmung der organischen Säuren mit HPLC . . . . .	60
2.5.4	Bestimmung intrazellulärer Metabolite mit LC-MS/MS . . . . .	62
2.5.5	Bestimmung von Fructose . . . . .	63
2.5.6	Bestimmung von Ammonium . . . . .	63
2.5.7	Bestimmung von Phosphat . . . . .	63
2.5.8	Bestimmung von PHB . . . . .	64
2.5.9	Bestimmung von Bacteriochlorophyll . . . . .	65
2.5.10	Bestimmung von Lycopin . . . . .	66
2.5.11	Bestimmung von Coenzym Q <sub>10</sub> . . . . .	67
2.5.12	Bestimmung von Vitamin B <sub>12</sub> . . . . .	68
2.5.13	Bestimmung von NAD(P)H/NAD(P) <sup>+</sup> . . . . .	68
2.5.14	Proteinbestimmung . . . . .	71
2.6	Bestimmung von enzymatischen Aktivitäten . . . . .	71
2.6.1	Bestimmung der Crotonyl-CoA Carboxylase/Reduktase-Aktivität . . . . .	71
2.6.2	Bestimmung der Citramalatsynthase-Aktivität . . . . .	72
2.6.3	Bestimmung der Malat-Dehydrogenase-Aktivität . . . . .	72
2.7	Beurteilung der Produktbildung . . . . .	72
2.8	Modellierung . . . . .	75
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>77</b>
3.1	Optimierung verschiedener Parameter für das aerobe Wachstum . . . . .	77
3.1.1	Optimierung einzelner Nährstoffbestandteile . . . . .	77
3.1.2	Sauerstoffpartialdruck . . . . .	86
3.1.3	CO <sub>2</sub> -Zufuhr für das aerobe Wachstum . . . . .	87
3.2	Aerobe Fedbatch-Kultivierungen . . . . .	89
3.2.1	Fructose als Einzelsubstrat . . . . .	89
3.2.2	Acetat/Fructose als Mischsubstrat . . . . .	93
3.2.3	Succinat/Fructose als Mischsubstrat . . . . .	94
3.3	2-Stufen-Prozesse als Batch-Prozesse . . . . .	99
3.3.1	Einfluss der Vorkultur . . . . .	100
3.3.2	Einfluss des Substrates . . . . .	103
3.3.3	Einfluss der Sauerstoffzufuhr . . . . .	105
3.3.4	Optimierung der CO <sub>2</sub> -Zufuhr . . . . .	108
3.3.5	Bacteriochlorophyll- und Carotinoid-Deletionsmutanten . . . . .	114
3.4	2-Stufen-Prozess als Fedbatch-Prozess . . . . .	122
3.4.1	Photosynthetische Membranen . . . . .	122
3.4.2	Molekularer Wasserstoff . . . . .	124
3.4.3	Organische Säuren . . . . .	125
3.4.4	PHB . . . . .	127
3.4.5	Coenzym Q <sub>10</sub> . . . . .	128
3.5	Kontinuierliche Kultivierung unter Zellrückhaltung . . . . .	130
3.6	Maximale Produktivitäten . . . . .	133

3.7	Untersuchung von zentralen Stoffwechselwegen unter Wachstums- und Produktionsbedingungen . . . . .	136
3.7.1	Intrazelluläre Metabolitenkonzentrationen . . . . .	138
3.7.1.1	Aerobe Wachstumsbedingungen mit verschiedenen Substraten . . . . .	138
3.7.1.2	Intrazelluläre Metabolite der PHB-Bildung . . . . .	141
3.7.1.3	Mikroaerobe und anaerobe Produktionsbedingungen . . . . .	144
3.7.1.4	Intrazelluläre Precursor-Konzentrationen . . . . .	150
3.7.2	Stöchiometrische Modellierung des Zentralstoffwechsels . . . . .	153
3.7.3	<sup>13</sup> C-Stoffflussanalyse in Abhängigkeit vom Substrat und Sauerstoffkonzentration . . . . .	160
3.7.4	Acetatstoffwechsel . . . . .	166
<b>4</b>	<b>Abschließende Diskussion</b>	<b>175</b>
<b>5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>183</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>191</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>196</b>
	<b>Anhang A1: Übersicht gemessene Metabolite mit LC-MS/MS</b>	<b>197</b>
	<b>Anhang A2: Übersicht gemessene <sup>13</sup>C-markierte Metabolite mit LC-MS/MS</b>	<b>199</b>
	<b>Anhang B: Reaktionen des metabolischen Netzwerkes</b>	<b>201</b>
	<b>Anhang C: PCR und Sequenzierungsdaten des Rru_A0324 Gens in <i>R. rubrum</i> G-9</b>	<b>207</b>
	<b>Anhang D: Verwendete Substanzen und Chemikalien</b>	<b>211</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>215</b>



# Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2007 bis Februar 2012 am Max-Planck-Institut für komplexe dynamische Systeme in Magdeburg in der Abteilung Systembiologie angefertigt.

Eine enge Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Marco Oldiges des IBG-1 im Forschungszentrum Jülich ermöglichte eine Erweiterung des Dissertationsthemas und führte zu interessanten neuen Erkenntnissen des zentralen Stoffwechsels in *Rhodospirillum rubrum*.

An erster Stelle möchte ich bei **Prof. Dr. Marwan** für die Übernahme des Erstgutachtens bedanken.

Bei **Prof. Dr. Marco Oldiges** für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein weiterer Dank gilt **Prof. Dr. Hartmut Grammel** für die Betreuung während der wissenschaftlichen Arbeiten am Max-Planck-Institut in Magdeburg.

Bei **Prof. Dr. Wolfgang Wiechert** und **Prof. Dr. Marco Oldiges** für die Möglichkeit zur Kooperation mit dem Forschungszentrum Jülich. Bei **Bianca Klein** und **Petra Geilenkirchen** für die Hilfe bei den Messungen der zentralen Stoffwechselmetabolite mit LC-MS/MS.

Bei **Tanja Buch**, **Sebastian Handt**, **Dominique Zander** und **Beate Buse** für die Hilfe als wissenschaftliche Hilfsarbeiter und die Anfertigung ihrer Studienarbeiten.

Bei **Klaus-Dieter Stoll**, **Detlef Franz** und **Rainer Könning** und den Teams der mechanischen und elektrischen Wertstatt für zahlreiches Helfen und Reparieren kleinerer und größerer Schäden.

Bei **Melanie Säger** und **Ruxandra Rehner** für die Unterstützung bei der Analytik und Probennahme.

Bei **Oliver Hädicke** für die Übernahme der Modellierungsarbeit.

Bei **Dr. Tobias Erb** für zur Verfügung gestellten Intermediate des EM-CoA Weges und Unterstützung bei der Bestimmung der CCR-Aktivität.

Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe Grammel, der *E.coli*-Gruppe und des gesamten Max-Planck-Institutes in Magdeburg für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre.





# Abstract

The high biotechnological potential of *Rhodospirillum rubrum* for the production of photosynthetic pigments like bacteriochlorophyll and carotenoids, the biopolyester polyhydroxybutyrate, different vitamins, molecular hydrogen, and organic acids has been recognized for years. However, high productivities within photobiological cultivation systems are dependent on the availability of light which is always the limiting factor to produce high biomass concentrations and for this reason high product yields. In this study, the fact that *Rhodospirillum rubrum* is also able to produce photosynthetic membranes under oxygen-depleted conditions in the dark was very important and the main subject of the present contribution.

A suitable and efficient process strategy has been developed for high cell density cultivation under respiratory dark conditions concerning optimal nutrient feeding and various process parameters (e.g., carbon dioxide supply, pH and  $pO_2$ ). Subsequently, an aerobic/anaerobic dual-phase process has been developed with increasing cell densities at the switching time point. A very strong inhibitory effect on photosynthetic membrane synthesis has been observed, which decreases the production of pigments at cell densities above  $A_{660} = 20$  dramatically. But, the production of photosynthetic membranes and succinate were inversely correlated, resulting in high succinate amounts at high cell densities (280 mM).

In addition to the optimisation of external cultivation process parameters, the quantification of intracellular metabolite pool sizes and  $^{13}C$ -metabolic flux analysis were tools to have a closer view inside the cell. Intracellular pool sizes are correlated with growth rates controlled by the substrate. It could be shown, that the demand of intracellular precursor (acetyl-CoA, succinyl-CoA and dihydroxyacetonephosphate/glyceraldehyde-3-phosphate) is of major importance for high productivities and is dependent on substrate, oxygen concentration and phase of production. Nevertheless, a residual concentration of precursor was always available.

Of special interest was the pathway for acetate assimilation in isocitrate lyase-negative *Rhodospirillum rubrum* because of the question how metabolites of the TCA cycle are replenished without the glyoxylate cycle with  $C_2$ -substrates as carbon source. This work demonstrates, that the ethylmalonyl-CoA pathway is responsible for acetate assimilation in *Rhodospirillum rubrum*. Furthermore, the crotonyl-CoA carboxylase/reductase, which is the key enzyme of this pathway, is regulated by oxygen. Relatively low activities were found under anaerobic phototrophic conditions whereas high activities could be detected under the highest oxygen concentrations.



# Zusammenfassung

Das hohe biotechnologische Potenzial des fakultativ photosynthetischen Bakteriums *Rhodospirillum rubrum* für die Bildung zahlreicher Produkte, wie zum Beispiel photosynthetischen Membranen, Bacteriochlorophyll, Carotinoiden, Polyhydroxybutyrat, Coenzym Q<sub>10</sub>, Vitaminen, molekularem Wasserstoff und organischen Säuren, ist bereits seit vielen Jahren bekannt. In Photobioreaktoren verhindert jedoch oft eine unzureichende Versorgung der Zellen mit Licht das Erreichen hoher Biomasse- und Produktkonzentrationen.

*Rhodospirillum rubrum* ist in der Lage, auch im Dunkeln photosynthetische Membranen auszubilden. Dafür ist eine Limitation der Sauerstoffzufuhr essenziell. Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen daher die Untersuchung und Charakterisierung des Wachstums und der Produktbildung für mikroaerobe und anaerobe Bedingungen im Dunkeln. Die Entwicklung und Optimierung eines geeigneten Fedbatch-Prozesses für das Erreichen hoher Zelldichten bildete unter Berücksichtigung der effizienten Zuführung von Substraten und der Optimierung verschiedener externer Prozessparameter wie O<sub>2</sub>-Zufuhr, CO<sub>2</sub>-Zufuhr und pH-Wert und einen Schwerpunkt dieser Arbeit.

Darüber hinaus dienten Methoden der Metabolomanalyse, wie die Bestimmung intrazellulärer Metabolitenkonzentrationen und <sup>13</sup>C-Stoffflussanalysen, zur genaueren Charakterisierung zellulärer Kohlenstoffflüsse. So ist zum Beispiel die intrazelluläre Precursor-Verfügbarkeit der einzelnen Produkte entscheidend für deren Produktivität. Intrazelluläre Metabolitenkonzentrationen korrelierten mit der Wachstumsrate, welche durch das Substrat bestimmt werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Verfügbarkeit der Precursor vom eingesetzten Substrat, der Sauerstoffkonzentration und der Produktionsphase abhängig ist. Es konnte dennoch stets eine Restkonzentration an Precursor nachgewiesen werden.

Besonderes Interesse galt der Untersuchung der Acetatassimilation im Isocitratlyase-negativen Bakterium *Rhodospirillum rubrum*, welches im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien somit keinen Glyoxylat-Zyklus aufweist und alternative Wege zur Auffüllung des Citratzyklus' bei Wachstum auf C<sub>2</sub>-Substraten besitzen muss. In diesem Zusammenhang konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der für andere Bakterien etablierte Ethylmalonyl-CoA-Weg von *Rhodospirillum rubrum* genutzt wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des Schlüsselenzymes dieses Stoffwechselweges, die Crotonyl-CoA Carboxylase/Reduktase, durch Sauerstoff reguliert wird. Während unter anaeroben, phototrophen Bedingungen nur geringe Aktivitäten vorhanden waren, fanden sich unter aeroben Bedingungen im Dunkeln die höchsten Aktivitäten.



# Abkürzungsverzeichnis

<i>p</i> -ABA	para-Aminobenzoic acid (para-Aminobenzoessäure)
Ace (nur in Formeln)	Acetat
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
$\delta$ -ALA	$\delta$ -Aminolävulinsäure
Bchl (nur in Formeln)	Bacteriochlorophyll
Bchl $a_{Gg}$	Bacteriochlorophyll a Geranylgeranyl
1,3-bPG	1,3-bis-Phosphoglycerat
BTM	Biotrockenmasse
CBB-Zyklus	Calvin-Benson-Bassham-Zyklus
CCR	Crotonyl-CoA Carboxylase/Reduktase
<i>C. glutamicum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
CCCP	Carbonylcyanid- <i>m</i> -chlorophenylhydrazon
<i>CTR</i>	<i>carbon dioxide transfer rate</i> (CO <sub>2</sub> -Abgaberate)
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DOXP-Weg	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat
DPOR	dunkel-aktive Pchlide-Oxidoreduktase
DRAG	Dinitrogenase Reduktase-aktivierende Glycohydrolase
DRAT	Dinitrogenase Reduktase ADP-ribosyltransferase
E4P	Erythrose-4-phosphat
ELISA	<i>enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
EMP-Weg	Embden-Meyerhof-Parnas Weg
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FAD <sup>+</sup> /FADH <sub>2</sub>	Flavinadenindinukleotid
FHL	Formiat-Wasserstoff-Lyase
F1P	Fructose-1-phosphat
F6P	Fructose-6-phosphat
FBP	Fructose-1,6-phosphat
G6P	Glucose-6-phosphat
GA	Glycerinaldehyd
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GDP	Guanosindiphosphat

GS	Glutaminsynthetase
GOGAT	Glutamin Oxoglutarat Aminotransferase (Glutamatsynthase)
GTP	Guanosintriphosphat
HFCS	<i>high fructose corn syrup</i>
3-HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
HPLC	high-performance liquid chromatography
IPP	Isopentenylidiphosphat
KDPG	2-Keto-3-desoxy-phosphogluconatweg
$\alpha$ -KG	$\alpha$ -Ketoglutarat
LC	<i>liquid chromatography</i> (Flüssigchromatographie)
LH-Komplex	<i>light-harvesting</i> -Komplex (Lichtsammelkomplex)
Lsg.	Lösung
M2A	Acetat-haltiges Medium
M2F	Fructose-haltiges Medium
M2S	Succinat-haltiges Medium
M2AF	Acetat/Fructose-haltiges Medium
M2SF	Succinat/Fructose-haltiges Medium
MalE	Malatenzym
MDH	Malat-Dehydrogenase
Mg-PPIXMe	Magnesium-Protoporphyrin-Monomethylester
Mg-PPIXMe-C	Magnesium-Protoporphyrin IX Monomethylester Cyclase
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP <sup>+</sup> /NADPH	Nicotinamidadenindinukleodidphosphat
Odx	Oxaloacetat-Decarboxylase
6-PG	6-Phosphogluconat
PCC	Propionyl-CoA Carboxylase
PChlid	Protochlorophyllid
Pck	PEP-Carboxykinase
PCR	<i>polymerase-chain-reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PDT	Photodynamische Tumorthherapie
PEP	Phosphoenolpyruvat
PES	5-Ethylphenazinium-ethyl-sulfat
1-PFK	1-Phosphofruktokinase
PFL	Pyruvat-Formiat-Lyase
2-/3-PG	2-/3-Phosphoglycerat
3-PG	3-Phosphoglycerat

PHB	Poly- $\beta$ -hydroxybutyrat
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PM	photosynthetische Membranen
Ppc	PEP-Carboxylase
PPIX	Protoporphyrin IX
Mg-PPIX	Magnesium-Protoporphyrin IX
PPP	Pentosephosphatweg
Prop (nur in Formeln)	Propionat
PSU	Photosynthetic Unit (photosynthetische Einheit)
PTS	Phosphotransferasesystem
Pyc	Pyruvat-Carboxylase
Pyk	Pyruvatkinase
RC	<i>reaction center</i> (Reaktionszentrum)
Q <sub>10</sub>	Coenzym Q <sub>10</sub>
<i>R. eutropha</i>	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>R. rubrum</i>	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
<i>Rb. sphaeroides</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
<i>Rb. capsulatus</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>
<i>Rps. acidophila</i>	<i>Rhodopseudomonas acidophila</i>
<i>Rps. palustris</i>	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
RuBP	Ribulose-1,5-bisphosphat
Ribu5P	Ribulose-5-phosphat
R5P	Ribose-5-phosphat
Rubisco	Ribulose-1,5-diphosphat Carboxylase-Oxygenase
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute
S7P	Sedoheptulose-7-phosphat
SAM	S-Adenosylmethionin
Succ (nur in Formeln)	Succinat
TCA-Zyklus	<i>tricarboxylic acid cycle</i> (Citratzyklus)
THF	Tetrahydrofolat
vvm	<i>volume per volume per minute</i> (Gasvolumenstrom pro Flüssigvolumen und Minute)
WT	Wildtyp
Xylu5P	Xylulose-5-phosphat





# Symbolverzeichnis

Symbol	Erläuterung	Einheit
$A_{660}$	Absorption bei 660 nm (optische Dichte)	–
$A_{880}$	Absorption bei 880 nm (LH-1)	–
$\frac{A_{880}}{A_{660}}$	Verhältnis aus $A_{880}$ zu $A_{660}$	–
$c_S$	Feedkonzentration	g/L
$CTR$	CO <sub>2</sub> -Produktionsrate	$\frac{mol_{CO_2}}{g_{BTM} \cdot h}$
$K_s$	Monod-Konstante	g/L bzw. mM
$\mu_{exp}$	exponentielle Wachstumsrate	h <sup>-1</sup>
$\mu_{\varnothing}$	durchschnittliche Wachstumsrate	h <sup>-1</sup>
$\mu_{max}$	maximale Wachstumsrate	h <sup>-1</sup>
$\mu_{set}$	gesetzte Wachstumsrate	h <sup>-1</sup>
$m_f$	Massenfluss	g/min
$m_S$	Erhaltungskoeffizient	$\frac{g_{Substrat}}{g_{BTM} \cdot h}$
P	Produkt	g bzw. mol
$q_C$	spezifische Kohlenstoffaufnahme	$\frac{mol_C}{g_{BTM} \cdot h}$
$q_P$	spezifische Produktbildungsrate	$\frac{g_{Produkt}}{g_{BTM} \cdot h}$ bzw. $\frac{mol_{Produkt}}{g_{BTM} \cdot h}$
$q_S$	spezifische Substrataufnahmerate	$\frac{g_{Substrat}}{g_{BTM} \cdot h}$ bzw. $\frac{mol_{Substrat}}{g_{BTM} \cdot h}$
$RZA$	Raum-Zeit-Ausbeute	$\frac{mol}{L \cdot h}$
$\rho_S$	Dichte der Feedlösung	g/L
S	Substrat	g bzw. mol
t	Zeit	h
V	Volumen	L
$Y_{(X/S)}$	Biomasseausbeutekoeffizient	$\frac{g_{BTM}}{g_{Substrat}}$
$Y_{(P/S)}$	Produkt/Substrat-Ausbeutekoeffizient	$\frac{g_{Produkt}}{g_{Substrat}}$ bzw. $\frac{mol_{Produkt}}{g_{Substrat}}$
$Y_{(P/X)}$	Produkt/Biomasse-Ausbeutekoeffizient	$\frac{g_{Produkt}}{g_{BTM}}$ bzw. $\frac{mol_{Produkt}}{g_{BTM}}$
X	Biomasse	$g_{BTM}$

Für die Indizes P und S werden in der Arbeit u.a. die einzelnen Produkte und deren Produkt-abkürzungen verwendet bzw. die einzelnen Substrate und deren Abkürzungen (s.a. Abkürzungsverzeichnis).



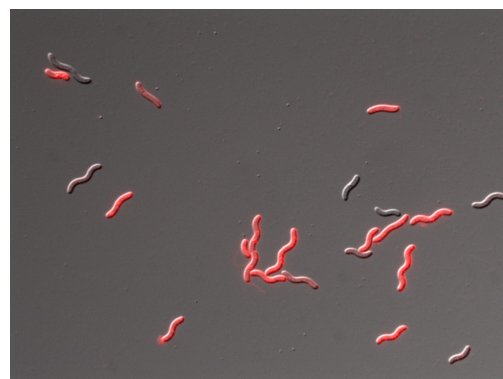
# 1 Einleitung

Das hohe biotechnologische Potenzial des fakultativ photosynthetischen Bakteriums *Rhodospirillum rubrum* ist bereits seit vielen Jahren bekannt [Ramana and Sasikala, 1995a,b; Sandmann, 2001; Hallenbeck and Benemann, 2002]. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Ausbildung photosynthetischer Membranen (PM) unter O<sub>2</sub>-limitierenden Bedingungen im Dunkeln [Schön and Ladwig, 1970]. Die in Photobioreaktoren bestehende Wachstumslimitation durch eine unzureichende Lichtversorgung bei hohen Zelldichten [Lee, 2001; Pulz, 2001] ist nicht vorhanden und hohe Biomassekonzentrationen sind in gängigen Rührkesselreaktoren erreichbar. Damit steht ein System für die Herstellung photosynthetischer Produkte im industriellen Maßstab zur Verfügung.

## 1.1 *Rhodospirillum rubrum*

### 1.1.1 Allgemeines

*R. rubrum* gehört zu den fakultativ photosynthetischen  $\alpha$ -Proteobakterien, ist spiralförmig, zwischen 0,8-10  $\mu\text{m}$  lang (s.a. Abb. 1.1) und zählt als Gram-negatives schwefelfreies Purpurbakterium zur Familie der *Rhodospirillaceae*. *R. rubrum* ist durch das Vorhandensein von bipolaren Flagellen zur Motilität befähigt [Imhoff et al., 2005; Imhoff, 1995; Pfennig, 1978].

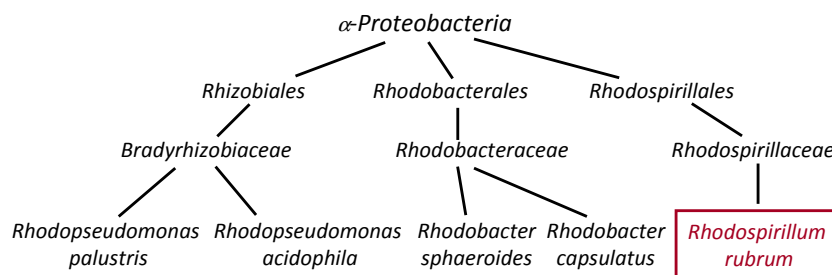


**Abb. 1.1:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *R. rubrum* S1 Wildtyp (links) und mit Nilrot angefärbte Polyhydroxybutyrat-Granula in *R. rubrum* S1 Wildtyp (rechts). Linke Abbildung: <http://genome.jgi-psf.org/rhoru/rhoru.home.html>, 25.06.2012.

In dem aquatischen Ökosystem See, dem natürlichen Vorkommen von *R. rubrum* und anderen photosynthetisch-aktiven Mikroorganismen, treten verschiedenartige vertikale Schichten auf, denen unterschiedliche Gelöstsauerstoffkonzentrationen und Lichtin-

tensitäten zugeschrieben werden können. Im unteren Bereich des Sees tritt der Prozess des anaeroben Abbaus unter weitgehend dunklen Bedingungen auf, wohingegen im oberen Bereich aerobe Bedingungen mit hohen Lichtintensitäten sind. Hier findet man Algen und Cyanobakterien, die eine oxygene Photosynthese betreiben. Zwischen diesen beiden Zonen befindet sich unter der so genannten Chemokline ein Bereich, in dem die anoxygenen Photosynthesebakterien leben. Abnehmende Lichtintensitäten und verschiedenen hohe Gelöstsauerstoffkonzentrationen in dieser Zone des Sees haben im Zuge der Evolution zu einer großen Stoffwechselvielfalt und Adaptationsmechanismen an diese wechselnden Bedingungen in *R. rubrum* und anderen photosynthetischen Bakterien geführt [Pfennig, 1978].

Neben *R. rubrum* gibt es eine Reihe weiterer Bakterien, die sich in die Gruppe der schwefelfreien Purpurbakterien befinden und Gegenstand intensiver Forschung sind. Dazu gehören, in der Familie der *Rhodobacteraceae*, *Rhodobacter sphaeroides* und *Rhodobacter capsulatus*. Eine weitere Familie innerhalb der schwefelfreien Purpurbakterien bildet die Familie der *Bradyrhizobiaceae*, in der *Rhodopseudomonas palustris* und *Rhodopseudomonas acidophila* einzuordnen sind (s.a. Abb. 1.2). Die einzelnen Bakterien unterscheiden sich zum einen durch ihre Morphologie und zum anderen durch ihre Art und Weise der Zellteilung, auf die an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden soll.



**Abb. 1.2:** Phylogenetische Systematik ausgewählter photosynthetischer Bakterien, die aufgrund ihrer Verwandtschaft zu *R. rubrum* im Rahmen dieser Arbeit zum Vergleich herangezogen werden.

Im Gegensatz zu den grünen Bakterien besitzen die meisten Purpurbakterien, darunter auch *R. rubrum*, Flagellen und sind in der Lage auf photo- und chemotaktische Reize zu reagieren. Diese Motilität ist ein weiterer Adaptationsmechanismus an die wechselnden Umweltbedingungen in der Gewässerschicht der Chemokline [Pfennig, 1978].

Als photosynthetischer Mikroorganismus ist *R. rubrum* in der Lage im Licht unter Ausschluss von Sauerstoff zu wachsen. Im Gegensatz zu Algen, höheren Pflanzen und Cyanobakterien entsteht bei der Photosynthese von *R. rubrum* kein molekularer Sauerstoff (anoxygene Photosynthese). Bezüglich der Kohlenstoffquelle wird zwischen photoautotrophen und photoheterotrophen Bedingungen unterschieden. Photoautotrophes Wachstum erfolgt ohne organische Kohlenstoffquelle in Anwesenheit von CO<sub>2</sub>, molekularem Wasserstoff und molekularem Stickstoff (Stickstofffixierung) oder einer anderen anorga-

nischen Stickstoffkomponente [Fuller, 1978]. Zur CO<sub>2</sub>-Fixierung unter diesen Bedingungen verwendet *R. rubrum* den unter Abschn. 1.1.5 detaillierter beschriebenen reduktiven Pentosephosphatweg (Calvin-Benson-Bassham-Zyklus, CBB-Zyklus). Für das Wachstum unter photoheterotrophen Bedingungen müssen geeignete organische Kohlenstoffquellen, z.B. in Form organischer Säuren wie Malat, Succinat oder Acetat, zur Verfügung stehen. Organische Substrate werden zum einen direkt für den Zellaufbau assimiliert, zum anderen zur Bildung von Reduktionsäquivalenten für die Reduktion von CO<sub>2</sub> innerhalb des CBB-Zyklus', wobei der Reduktion von NAD(P)<sup>+</sup> zu NAD(P)H jedoch nur eine untergeordnete Rolle zugeschrieben wird [Sojka, 1978].

In fakultativ photosynthetischen Bakterien wird die Biosynthese von Bacteriochlorophyll nicht nur durch die Anwesenheit von Licht, sondern auch durch Sauerstoff reguliert [Klug, 1993; Drews, 1965]. Die Regulation beruht auf der Derepression der Synthese der Enzyme des Bacteriochlorophyll-Biosyntheseweges unter O<sub>2</sub>-limitierenden Bedingungen und ist in *Rb. sphaeroides* gut beschrieben. Die betroffenen Enzyme sind die  $\delta$ -ALA-Synthase, die Mg-Protoporphyrin-Methyltransferase und die Mg-PPIX-Chelatase, die den Einbau von Mg<sup>2+</sup> in Protoporphyrin katalysiert [Lascelles, 1978; Burnham and Lascelles, 1963]. Der Transfer von aeroben Zellen zu O<sub>2</sub>-limitierten Bedingungen erfordert demnach eine *de-novo*-Synthese dieser Enzyme [Gorchein, 1973; Lascelles, 1959].

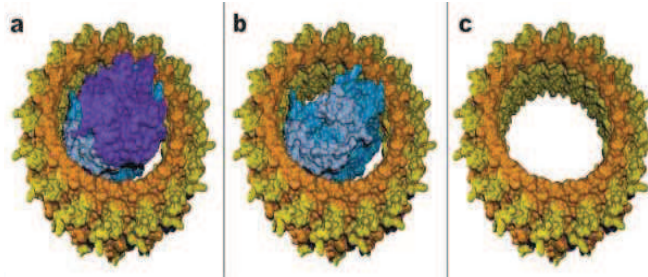
Im Vergleich zu anderen photosynthetischen Bakterien (Schwefelpurpurbakterien, Grüne Schwefelbakterien) kann *R. rubrum* als fakultativ photosynthetisches Bakterium auch in Abwesenheit von Licht unter aeroben Bedingungen im Dunkeln wachsen [Anderson and Fuller, 1967a]. Für die Endoxidation der aus dem Citratzyklus (TCA-Zyklus) gebildeten Reduktionsäquivalente muss dabei ausreichend Sauerstoff ( $pO_2 > 5\%$ ) anwesend sein [Grammel et al., 2003]. Als Substrate kommen organische Säuren und Fructose als Zucker in Frage (s.a. Abschn. 1.1.3). Die Ausbildung photosynthetischer Membranen ist hierbei inhibiert und die Zellen haben einen pigmentlosen, weiß-rosa Phänotyp [Kaplan, 1978].

### 1.1.2 Aufbau und Funktionsweise photosynthetischer Membranen

*R. rubrum* besitzt, lokalisiert in den intracytoplasmatischen Membranen, eine so genannte Photosynthetische Einheit (PSU), die aus dem Reaktionszentrum (RC oder B800) und dem umgebenden Lichtsammelkomplex LH-1 (B880) besteht [Karrasch et al., 1995; Drews, 1985]. Das Reaktionszentrum besteht aus 3 Untereinheiten: L, M und H, wobei H aus der Membran herausragt. Die L- und M-Untereinheit sehen sich strukturell ähnlich und befinden sich innerhalb der Membran (s.a. Abb. 1.3).

Die Pigment-bindenden Proteine der photosynthetischen Membran werden durch das *puf*-Operon (LH $\alpha$ , LH $\beta$ , L-Untereinheit und M-Untereinheit) und durch das *puhA*-Gen

(H-Untereinheit) codiert [Cheng et al., 2000]. Zellen, bei denen das *puf*-Operon deletiert worden ist, können keine photosynthetischen Membranen mehr ausbilden und daher auch nicht mehr im Licht wachsen [Hessner et al., 1991].



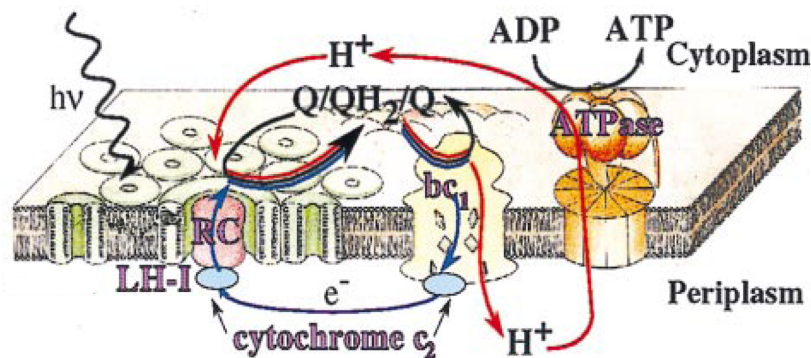
**Abb. 1.3:** Der RC-LH-1 Komplex in *R. rubrum* nach Fotiadis et al. [2004]. Violett: RC-H-Untereinheit. Türkis: L-Untereinheit. Grau: M-Untereinheit. Orange und gelb:  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten des LH-1 Komplexes. a: kompletter RC-LH-1 Komplex. b: Komplex ohne RC-H Untereinheit. c: nur  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten des LH-1 Komplexes.

*R. rubrum* besitzt im Gegensatz zu anderen photosynthetischen Bakterien nur einen LH-Komplex, den LH-1-Komplex. Das System zur Photosynthese ist damit sehr einfach aufgebaut und erlaubt überdies die Quantifizierung der photosynthetischen Membranen durch Messung einer einzelnen Absorption bei 880 nm [Brunisholz et al., 1984]. Andere Purpurbakterien wie z.B. *Rps. acidophila* bilden neben dem LH-1 noch weitere Lichtsammelkomplexe, die des Typs LH-2 (B800-B850) und LH-3 (B800-B820), die sich von dem LH-1-Komplex unterscheiden. Der LH-3 Komplex in *Rps. acidophila* wird unter verschiedenen Stressbedingungen gebildet, wie z.B. geringe Lichtintensitäten oder niedrige Temperaturen ( $< 30$  °C) [McLuskey et al., 2001]. *Rb. sphaeroides* bildet ebenfalls neben dem LH-1 Komplex einen weiteren Lichtsammelkomplex aus, den LH-2 Komplex [Walz et al., 1998]. *Rps. palustris* weist ein low-light-B800 LH-2 auf, das einen erhöhten Bacteriochlorophyll-Anteil und unterschiedliche Absorptions- und Circular Dichroismus-Eigenschaften im Vergleich zu dem normalen LH-2 in *Rps. palustris* aufweist [Hartigan et al., 2002].

Abb. 1.4 zeigt den Aufbau der photosynthetischen Membran in *R. rubrum*. Das Reaktionszentrum (RC, rot) ist von dem Lichtsammelkomplex LH-1 (grün) umgeben. Der LH-1-Komplex besteht aus ringförmig angeordneten 16 $\alpha$ - und 16 $\beta$ -Polypeptid-Untereinheiten [Karrasch et al., 1995].

Schon Cogdell et al. [1982] hatten durch Pigmentanalysen festgestellt, dass der LH-1-Komplex in *R. rubrum* pro Paar Polypeptid-Ketten 2 Moleküle Bacteriochlorophyll und 1 Molekül Carotinoid enthält. Insgesamt ergeben sich so 32 Moleküle Bacteriochlorophyll und 16 Carotinoidmoleküle, die in einem Lichtsammelkomplex enthalten sind [Cogdell et al., 1982]. Das Reaktionszentrum von *R. rubrum* ähnelt dem von *Rb. sphaeroides* und enthält ein so genanntes "special pair" Bacteriochlorophyll ( $P_A$  und  $P_B$ ) sowie zwei ak-

zessorische Bacteriochlorophyll ( $B_A$  und  $B_B$ ). Der LH-1-Komplex in *R. rubrum* ist beweglich und kann sich kreisförmig oder elliptisch um das Reaktionszentrum anordnen. Dieser Flexibilität kommt eine entscheidende Bedeutung zu, da *R. rubrum* im Gegensatz zu *Rb. sphaeroides* und *Rb. capsulatus* kein PufX-Polypeptid besitzt, das den Transfer von reduzierten Quinon vom RC auf den Cytochrom  $bc_1$ -Komplex bewerkstelligt [Fotiadis et al., 2004]. Eine Konformationsänderung des LH-1-Komplex könnte die Weiterleitung der Elektronen ermöglichen. Im Licht werden Photonen von diesem LH-1-Komplex absorbiert und das RC in einen angeregten Zustand versetzt. RC reduziert Quinon ( $Q_B$ ) zu Hydroquinon ( $Q_BH_2$ ).  $Q_BH_2$  überträgt die Elektronen auf den Cytochrom  $bc_1$ -Komplex, der die freiwerdende Energie nutzt, um Protonen über die Membran ins Periplasma zu pumpen. Über den membranassoziierten Cytochrom  $c_2$ -Komplex können Elektronen vom Cytochrom  $bc_1$ -Komplex zurück zum RC geleitet werden. Der Gesamtprozess wird als zyklischer Elektronentransport bezeichnet. Die ATPase nutzt den Protonenrückfluss ins Cytoplasma zur Bildung von ATP [Hu et al., 1998].



**Abb. 1.4:** Schema des Photosynthese-Apparates in Purpurbakterien (nach Hu et al. [1998]). RC: Reaktionszentrum. LH-1: Lichtsammelkomplex-1. Q: Coenzym  $Q_{10}$ .  $bc_1$ : Cytochrom  $bc_1$ .

Ein Teil der Elektronen wird vom reduzierten Hydroquinon  $Q_BH_2$  auf  $NAD(P)^+$  übertragen, so dass reduziertes  $NAD(P)H$  entsteht. Damit ist der Elektronenfluss nicht mehr zyklisch, er wird als rückläufiger Elektronentransport bezeichnet. Für den rückläufigen Elektronentransport wird Energie in Form von ATP benötigt.  $NAD(P)H$  wird anschließend zur Fixierung von  $CO_2$  innerhalb des CBB-Zyklus' genutzt.

Die photosynthetischen Membranen enthalten Pigmente wie Carotinoide und Bacteriochlorophyll. Auch das hydrophobe Coenzym  $Q_{10}$  befindet sich in der Membran. Darüber hinaus können sie auch als Expressionssystem für membranständige Proteine angewendet werden. Butzin et al. [2010] berichten in diesem Zusammenhang über die Produktion des rekombinanten Membranproteins MscL aus *Pseudomonas aeruginosa*, welches, exprimiert in *Escherichia coli*, *inclusion bodies* bildet. Auf die Bildung von Carotinoiden, Bacteriochlorophyll u.a. Produkte wird unter Abschn. 1.3 eingegangen werden.

### 1.1.3 Aufnahme von Kohlenstoffsubstraten

Mitglieder der Familie der *Rhodospirillaceae* können ein breites Spektrum organischer Kohlenstoffquellen zum Wachstum nutzen, darunter: Fettsäuren, Aminosäuren, Alkohole, Intermediate des TCA-Zyklus, Zucker, CO, CO<sub>2</sub>, Acetat oder Pyruvat [Sojka, 1978]. Die folgenden Abschnitte sollen die von *R. rubrum* und weiteren Vertretern der schwefelfreien Purpurbakterien verwendbaren Kohlenstoffquellen detaillierter erläutern. Ein Überblick für *R. rubrum* ist in Tab. 1.1 zu finden.

Im Gegensatz zu *Rb. capsulatus*, ein anderer Vertreter der *Rhodospirillaceae*, wächst *R. rubrum* nicht auf Glucose als C-Quelle, sondern nur auf Fructose [Conrad and Schlegel, 1974; Gibson and Wang, 1968]. Fructose wird durch ein Phosphoenolpyruvat-abhängiges Phosphotransferase-System als Fructose-1-phosphat in die Zelle transportiert, das sich allerdings vom PTS-System anderer Bakterien wie *E. coli* unterscheidet. So sind lediglich zwei Proteinfractionen für den Transport nötig, die beide Membran-assoziiert vorkommen und es gibt keinen Hinweis auf die Existenz eines HPr-Moleküls als Phosphatcarrier [Saier et al., 1971; Roseman, 1969].

*R. rubrum* zeigt Wachstum unter anaeroben Bedingungen im Licht und unter aeroben Bedingungen im Dunkeln auf D- und L-Glutamat, das in erster Linie innerhalb des TCA-Zyklus verstoffwechselt wird [Gibson and Wang, 1968]. In zellfreien Extrakten wurde jedoch auch eine Vitamin B<sub>12</sub>-abhängige Glutamatmutase-Aktivität festgestellt, die über  $\beta$ -Methylaspartat, Mesaconat und Citramalat Acetyl-CoA und Pyruvat bildet [Ohmori et al., 1974]. In *Rb. sphaeroides* konnte nur ein sehr geringer Unterschied der Glutamatmutase-Aktivität zwischen anaeroben Bedingungen im Licht (1304 cps Mesaconat) und aeroben Bedingungen im Dunkeln (1130 cps Mesaconat) (beide: Glutamat/Malat-Medium) festgestellt werden. Die Aktivität ist allerdings mit Glutamat als alleinige C-Quelle unter anaeroben Bedingungen im Licht stark erhöht (2190 cps Mesaconat) und spiegelt die Bedeutung der Glutamatmutase unter anaeroben Wachstumsbedingungen auf Glutamat wieder, wie sie auch schon für andere Bakterien wie *Clostridium tetanomorphum* bekannt ist [Ohmori et al., 1974; Neil et al., 1992].

Die meisten photosynthetischen Bakterien sind nicht in der Lage Citrat als Kohlenstoffquelle zu verwerten. Jedoch konnte Giffhorn et al. [1972] für *Rhodopseudomonas gelatinosa* ein Citratlyase-abhängiges Wachstum unter photosynthetischen Bedingungen feststellen. Die Citratlyase wird bei Anwesenheit von O<sub>2</sub> schnell inhibiert, daher erfolgt das Wachstum von *Rps. gelatinosa* auf Citrat lediglich unter anaeroben Bedingungen. Die Citratlyase ist ein Enzym des reduktiven TCA-Zyklus. Auf Untersuchungen der Enzyme dieses Zyklus' in *R. rubrum* wird unter Abschn. 1.1.5 detaillierter eingegangen werden.

Glycerin wird von den photosynthetischen Bakterien *Rb. sphaeroides* und *Rps. palustris*



verwertet. *Rb. sphaeroides* zeigt dabei ein diauxisches Wachstumsverhalten beim Wachstum auf Malat/Glycerin-Mischsubstrat unter kataboler Repression der Glycerinaufnahme solange Malat vorhanden ist [Pike and Sojka, 1975].

Glycerin als C-Quelle hat für einen biotechnologischen Einsatz als Substrat einige Vorteile. Glycerin kann im Gegensatz zu Zuckern zusammen mit Ammonium- und Phosphatsalzen hitzesterilisiert werden, ohne dass es zu einer Zersetzung kommt. Darüber hinaus erfordert der Einsatz konzentrierter Glycerinlösungen keine Erwärmung der Vorratsbehälter und Zuleitungen wie bei Zuckerlösungen  $> 600$  g/L [Cooper, 2009].

**Tab. 1.1:** Übersicht über Kohlenstoff- und Elektronenquellen, die von *R. rubrum* unter anaeroben, phototrophen Bedingungen genutzt werden können. +: Wachstum in den meisten Stämmen vorhanden. -: Wachstum in den meisten Stämmen nicht vorhanden. +/-: zwischen den verschiedenen Stämmen unterschiedlich [Imhoff et al., 2005].

Kohlenstoffquellen	
Acetat	+
Aspartat	+
Butyrat	+
Citrat	-
Ethanol	+
Formiat	-
Fructose	+/-
Fumarat	+
Glucose	-
Glutamat	+
Glycerin	-
Lactat	+
Malat	+
Methanol	+/-
Propionat	+
Pyruvat	+
Succinat	+
Elektronenquellen	
Wasserstoff	+
Sulfid	+
Schwefel	-
Thiosulfat	-

Glycerin könnte außerdem eine geeignete C-Quelle speziell für die Carotinoid-Produktion sein. So wurde für den Hefepilz *Rhodotorula lactosa* eine gesteigerte Produktion von Biomasse und  $\beta$ -Carotin auf Glycerin als C-Quelle berichtet [Martelli et al., 1992], was vermutlich darin begründet ist, dass Glycerin als Glycerin-3-phosphat in den Embden-

Meyerhof-Parnas-(EMP)-Weg (vgl.a. Abschn. 1.1.5) eingeht und damit den DOXP-Weg (1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Weg) für die Carotinoidbiosynthese füllt, der unter Abschn. 1.3.1 genauer beschrieben wird. Für die Aufnahme von Glycerin in *E. coli* gibt es keinen aktiven Transportmechanismus wie das PTS-System, vielmehr erfolgt der Transport von Glycerin in die Zelle durch erleichterte Diffusion [Dills et al., 1980; Lin, 1976].

Neben Zuckern und organischen Säuren können Mitglieder der *Rhodospirillaceae* auf Alkoholen wie Ethanol wachsen. *R. rubrum* besitzt eine induzierbare Alkohol-Dehydrogenase für die Aufnahme von Ethanol [Sojka, 1978]. *R. rubrum* zeigt hier eine Adaptation an das Leben in einer ökologischen Nische, da er in der Lage ist, die unter anaeroben Bedingungen akkumulierenden Ausscheidungsprodukte von anderen Bakterien (wie Ethanol, Succinat, Malat, Acetat) zu verwerten.

### Industriell eingesetzte Kohlenstoffquellen

In großtechnischen, mikrobiologischen Produktionsverfahren werden vorwiegend Kohlenhydrate als Kohlenstoffquellen eingesetzt [Teuber et al., 1994]. Zwei wesentliche Rohstoffe stellen Zucker (Sucrose oder Saccharose) und Stärke dar. Als pflanzliche Quellen für Sucrose werden in erster Linie Zuckerrübe, Zuckerrohr und Zuckerhirse verwendet. Nach Extraktion, Aufreinigung und Raffination erhält man 93-96 % rohen Zuckersirup, der anschließend zu > 99 % reinen, weißen Zucker weiterverarbeitet wird. Der aus dem letzten Schritt verbleibende Rest ist Abfall. Er wird als Melasse bezeichnet und enthält noch 40-60 % Zucker [Peters, 2006]. Zuckerhirse besteht zu 63 % aus Sucrose, zu 21 % aus Glucose und zu 16 % aus Fructose [Kaltschmitt et al., 2009].

**Tab. 1.2:** Durchschnittlicher Preis für verschiedene Kohlenhydrate. Wenn nicht anders angegeben aus: Peters [2006].

Kohlenhydratquelle	Gehalt an fermentierbaren Kohlenhydraten [%]	Preis [\$/kg]
Saccharose	100	0,20 – 0,30
Melasse	40 – 60	0,15 – 0,25
Maisstärke	85	0,25 – 0,60
HFCS-42	42	0,25 – 0,46 <sup>1</sup>
HFCS-55	55	0,38 – 0,50 <sup>1</sup>
Fructose	100	1,00
Bernsteinsäure	(100)	57,5 (43,3 €/kg) <sup>2</sup>
Na-Succinat	(100)	282,9 (213,0 €/kg) <sup>2</sup>
Eisessig	(100)	22,4 (16,9 €/kg) <sup>2</sup>

---

<sup>1</sup>Farris [2009]

<sup>2</sup>Roth [2011]

Stärke besteht zu 10-30 % aus Amylose und zu 70-90 % aus Amylopektin, beide Bestandteile sind aus Glucose-Monomeren aufgebaut. Hauptquelle für Stärke sind Pflanzen, die Stärke akkumulieren, wie Weizen, Mais und Reis. Die meisten Bakterien sind nicht in der Lage Stärke direkt zu verwerten. Aus diesem Grund muss Stärke als Feedstock enzymatisch oder mit Säure vorbehandelt werden und führt zu einem Gemisch, bestehend aus Maltodextrinen, Maltose, Glucose und Isoglucose.

Letztendlich entscheidet der Preis der Feedstock-Lösungen über die Anwendbarkeit jedes biotechnologischen Prozesses. Aus diesem Grund sind in Tab. 1.2 die Preise für verschiedene Kohlenhydrate aufgelistet, welche als Feedstock für einen industriellen Prozess in Frage kommen würden. Eisessig weist mit 17,5 M gegenüber Bernsteinsäure (0,5 M) eine weitaus höhere Löslichkeit auf. Natriumsuccinat lässt sich bis 2 M lösen, ist jedoch um ein vielfaches kostenintensiver als Bernsteinsäure. Maximal lösliche Fructoselösungen erreichen ohne Erwärmen der Feedgefäße und Zuleitungen 3,3 M (600 g/L).

Für biotechnologische Anwendungen sind in den letzten Jahren verstärkt alternative Kohlenstoffquellen zu Stärke- und Sucrose-Feedstocks Gegenstand intensiver Untersuchungen geworden. Pflanzliche Biomasse (Lignocellulose wie z.B. Holz, Stroh) muss zunächst durch Hydrolyse zu Pentosen und Hexosen gespalten werden, welche für Mikroorganismen verwertbar sind. Abhängig von der Lignocellulose-Quelle erhält man dadurch Substrate unterschiedlicher Zusammensetzung. Der Hauptbestandteil ist Glucose (ca. 30 %), 20 % sind Xylose und Arabinose. In lediglich geringen Mengen sind Mannose, Galactose und Uronsäuren vorhanden. Die restlichen Komponenten sind Lignin und andere Rückstände, welche keine Kohlenstoffquellen darstellen [Lynd, 1996]. Die Pentosen Xylose und Arabinose können nur von wenigen Mikroorganismen verwertet werden. So wurde zum Beispiel *Saccaromyces cerevisiae* genetisch optimiert, so dass eine Aufnahme dieser Substrate ermöglicht wird. Entwickelt wurde der Stamm IMS0003 zur Bioethanol-Herstellung [Wisselink et al., 2009].

Neben der direkten Verwendung von Lignocellulose-Hydrolysaten besteht auch die Möglichkeit der Vergasung von Biomasse zu Synthesegas. Die Hauptprodukte sind dabei CO und H<sub>2</sub> (Nebenprodukte: CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> und N<sub>2</sub>). *R. rubrum* ist neben verschiedenen *Clostridien* und thermophilen Mikroorganismen (z.B. *Moorella thermoacetica*) in der Lage, CO über eine CO-Dehydrogenase und CO-induzierbare Hydrogenase zu verwerten [Do et al., 2007]. Dies könnte von spezieller Bedeutung für zukünftige biotechnologische Anwendungen von *R. rubrum* sein, da Synthesegas gegenüber Zucker-basierten Feedstocks etliche Vorteile aufweist [Munasinghe and Khanal, 2010].

Auch Methanol kommt als Kohlenstoffsubstrat, begünstigt durch steigende Zuckerpreise, in Frage und wird bereits zur Kultivierung methylotropher Bakterien zur Produktion von Feinchemikalien eingesetzt [Schrader et al., 2008]. Es ist nicht bekannt, ob

*R. rubrum* zur Methanol-Verwertung in der Lage ist.

### 1.1.4 Aufnahme von nicht-Kohlenstoff Substraten

Für die Gewährleistung eines optimalen Wachstums ist nicht nur die Betrachtung der Kohlenstoffquelle von entscheidender Bedeutung. Neben Spurenelementen und Vitaminen spielt Stickstoff für die Synthese von Aminosäuren, Nukleinsäuren und Cofaktoren und Phosphat für die Bildung von Nukleinsäuren und Phospholipide eine bedeutende Rolle für das bakterielle Wachstum [Fuchs, 2007a].

#### Ammonium

Die Stickstoffquelle ist ein wesentlicher Bestandteil des Nährmediums. Ammonium wird für die Biosynthese von Aminosäuren benötigt und ist damit für die Proteinbiosynthese und somit für den gesamten zellulären Stoffwechsel essenziell. Bei Schön [1968] wird darüber hinaus beschrieben, dass das Vorhandensein von Ammonium essenziell für die Induktion photosynthetischer Membranen auf Fructose unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln ist.

Die Ammoniumaufnahme erfolgt in *R. rubrum* mit Hilfe der ubiquitär vorkommenden AmtB-Transporter (Methylammonium Permease) als  $\text{NH}_3$ . Bei diesem Prozess wird  $\text{NH}_4^+$  als gasförmiges  $\text{NH}_3$  aufgenommen, wobei ein Proton abgespalten wird, das im Medium verbleibt. AmtB stellt dabei einen passiven Gaskanal dar, kein aktives Transportsystem [Khademi et al., 2004].

In der Zelle wird  $\text{NH}_3$  entweder über das GS/GOGAT- oder GDH-System weiter verstoffwechselt [Carlberg and Nordlund, 1991; Nordlund et al., 1985; Yelton and Yoch, 1981; Bachofen and Neeracher, 1968]. GlnD (*glnD*-Genprodukt) stellt den primären Stickstoff-Sensor dar, ein Enzym, welches das  $\text{P}_{II}$ -Protein (auch GlnB, *glnB*-Genprodukt) uridyliert bzw. deuridyliert. Unter Stickstoff-limitierenden Bedingungen uridyliert GlnD  $\text{P}_{II}$  zu  $\text{P}_{II}$ -UMP.  $\text{P}_{II}$ -UMP wiederum führt zur spezifischen Regulation von Genen, die an der Stickstoffassimilation beteiligt sind, wie z.B. *glnA* (Glutaminsynthetase), *glnK* ( $\text{P}_{II}$  Signaltransduktionsprotein) oder *nifA* (Transkriptionsfaktor für Gene der Stickstofffixierung). Die Uridylierung von  $\text{P}_{II}$  führt dazu, dass  $\text{P}_{II}$ -UMP nicht mit dem Sensor des 2-Komponentensystems Ntr, NtrB, interagieren kann. NtrB ist dadurch in der Lage NtrC (*response*-Regulator) zu phosphorylieren. NtrC-P wiederum ist nun in der Lage als Transkriptionsfaktor zu fungieren. Wenn hohe Mengen Stickstoff vorhanden ist, wird  $\text{P}_{II}$  durch GlnD wieder deuridyliert,  $\text{P}_{II}$  bindet an NtrB und blockiert dadurch die Genaktivierung [Zhang et al., 2006].

Der intrazelluläre Stickstoffstatus in *R. rubrum* wird durch die intrazelluläre Kon-

zentration von  $\alpha$ -Ketoglutarat ( $\alpha$ -KG) festgelegt, im Gegensatz zu *E. coli*, wo der intrazelluläre Glutaminlevel ausschlaggebend ist. Vielmehr wird die Deuridylierung durch Glutamin und  $Mn^{2+}$ -Ionen stimuliert [Jonsson and Nordlund, 2007]. In *R. rubrum* existieren 3 paraloge  $P_{II}$ -Proteine, *glnB*, *glnK* und *glnJ* [Zhang et al., 2001]. Allerdings ist nur uridyliertes *glnB* in der Lage die Nitrogenase-Expression über den Transkriptionsfaktor NifA zu regulieren.

## Phosphataufnahme

Der genaue Aufnahmemechanismus von Phosphat wurde bisher für *R. rubrum* nicht detaillierter beschrieben. Es ist zu vermuten, dass, ähnlich wie in *E. coli*, Phosphat entgegen eines Gradienten aktiv aufgenommen werden muss. In *E. coli* existieren 2 Aufnahmesysteme für Phosphat, ein *low-affinity* (Pit-System) und *high-affinity* (Pst-System). Dabei wird das Pit-System konstitutiv exprimiert und das Pst-System durch anorganisches Phosphat ( $P_i$ ) induziert bzw. reprimiert [Jansson, 1988].

Darüber hinaus konnte für *R. rubrum* und *Rb. sphaeroides* das Vorkommen kondensierter Phosphate (Polyphosphate) als Speicherform für  $P_i$  gezeigt werden. Die Bildung von Polyphosphaten erfolgte dabei sowohl unter phototrophen als auch unter chemoheterotroph, aeroben Bedingungen im Dunkeln. Rund die Hälfte des aufgenommenen Phosphats wird in *R. rubrum* für die Synthese von Polyphosphaten verwendet [Weber, 1965]. Shadi et al. [1976] zeigten darüber hinaus, dass die Bildung von hochmolekularen Polyphosphaten unter phototrophen Bedingungen in den Chromatophoren in *R. rubrum* stattfindet und abhängig ist von ATP, aber nicht von Pyrophosphat. Pyrophosphat kann in einem Energie-abhängigen Mechanismus in *R. rubrum* zur Synthese von ATP genutzt werden, indem durch eine Phosphotransferase  $P_i$  von  $PP_i$  auf ADP übertragen wird [Keister and Minton, 1971]. Polyphosphat-akkumulierende Bakterien finden Anwendung in der Entfernung von Phosphat aus Abwässern zur Wiederaufarbeitung von Trinkwasser [Kuroda and Ohtake, 2005; Mino, 2000].

## *p*-Aminobenzoessäure

*p*-Aminobenzoessäure (*p*-ABA) ist eine aromatische Carbonsäure mit einer Aminogruppe in para-Stellung zur Carboxylfunktion. *p*-ABA ist Bestandteil der Folsäure (Vitamin B<sub>9</sub>), das essenziell bei der Übertragung von C<sub>1</sub>-Gruppen, wie z.B. bei Methylierungsreaktionen ist [Stokstad and Koch, 1967]. In *R. rubrum* wird *p*-ABA auch zur Biosynthese von Coenzym Q<sub>10</sub> verwendet (s.a. Abschn. 1.3.3). Hansen and Veldkamp [1973] zeigten, dass *p*-ABA ein wichtiger Wachstumsfaktor für *Rhodopseudomonas sulfidophila* und *Rps. palustris* ist. Hutner [1946] untersuchte ebenfalls *R. rubrum* und fand keine

unbedingte Abhängigkeit des Wachstums von *R. rubrum* von *p*-ABA.

## Vitamine und Spurenelemente

Hansen and Veldkamp [1973] konnten zeigen, dass Biotin (Vitamin B<sub>7</sub>) und Calcium essenzielle Wachstumsfaktoren für *R. rubrum* darstellen. Darüber hinaus sind die Spurenelemente Eisen, Zink, Mangan, Cobalt, Vanadium, Molybdän, Nickel, Iridium und Rhenium vorteilhaft für das Wachstum, jedoch nicht zwingend notwendig [Hutner, 1946].

### 1.1.5 Zentralstoffwechsel in *R. rubrum*

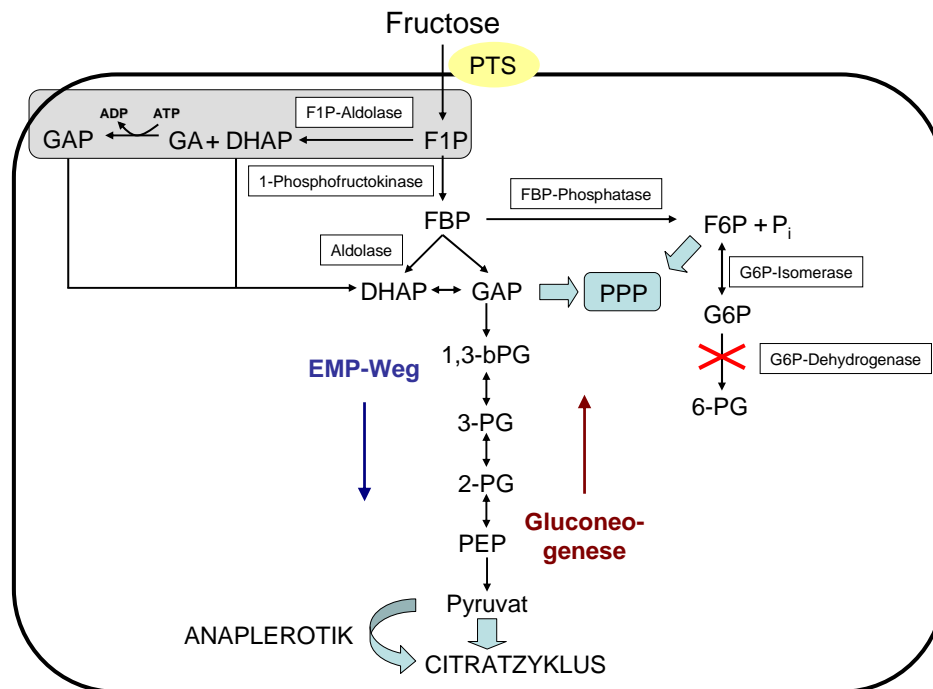
Der zentrale Kohlenstoffwechsel in *R. rubrum* ist im Grundprinzip dem bereits etablierter und gut charakterisierter Modellorganismen wie *E. coli* oder *Corynebacterium glutamicum* ähnlich. Der zelluläre Stoffwechsel in *R. rubrum* ist jedoch in Abhängigkeit von extrazellulären Umweltfaktoren vielfältiger und weist einige Besonderheiten auf.

Im Folgenden soll der Zentralstoffwechsel in *R. rubrum* unter aeroben Bedingungen im Dunkeln detaillierter beschrieben werden. In Abhängigkeit der Umgebungsbedingungen verwertet *R. rubrum* verschiedene C-Quellen (s.a. Abschn. 1.1.3). Abhängig von der Kohlenstoffquelle ist der zentrale Stoffwechsel unterschiedlich organisiert und reguliert.

### Embden-Meyerhof-Parnas-Weg und Gluconeogenese

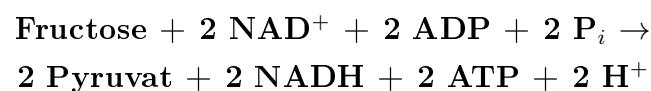
Bei Wachstum auf Fructose erfolgt die Substrataufnahme über ein spezifisches PTS-System (s.a. Abschn. 1.1.3). Anschließend erfolgt der Abbau von Fructose-1-phosphat (F1P) zu Pyruvat innerhalb des EMP-Weges. Dieser EMP-Weg sowie dessen Umkehrung sind in Abb. 1.5 schematisch dargestellt. Wichtiges Enzym im ersten Teil dieses EMP-Weg ist die 1-Phosphofruktokinase (1-PFK), die in einer ATP-abhängigen Reaktion F1P zu Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) phosphoryliert [Conrad and Schlegel, 1974]. In *Rb. capsulatus* ist die Aktivität der 1-PFK unter aeroben Bedingungen um das 2-fache höher als unter phototrophen Bedingungen (beide Fructose als C-Quelle) und wird dabei durch Fructose in hohem Maße induziert (um das 10-fache höhere Aktivität in induzierten Zellen), jedoch nicht durch Glucose. Die Aktivität der 1-PFK wurde in *R. rubrum* mit 18 nmol/mg<sub>Protein</sub> · min unter phototrophen Bedingungen mit Fructose als C-Quelle gemessen [Conrad and Schlegel, 1974].

Anschließend erfolgt die Spaltung von FBP in Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) durch eine Aldolase. Über eine Trioseisomerase besteht ein Gleichgewicht zwischen DHAP und GAP und beide Formen können ineinander übergehen, wobei das Gleichgewicht der Reaktion auf der Seite von DHAP liegt. Im nächsten Schritt wird aber GAP unter Phosphorylierung und NADH-Bildung oxidiert und es



**Abb. 1.5:** Schema des Embden-Meyerhof-Parnas-Weges und der Gluconeogenese, sowie die Reaktion der F1P-Aldolase. Außerdem sind die Abzweigungen in den oxidativen Zweig des Pentosephosphatweges verzeichnet. PTS: Phosphotransferase-System, F1P: Fructose-1-phosphat, GAP: Glycerinaldehyd-3-phosphat, GA: Glycerinaldehyd, FBP: Fructose-1,6-bisphosphat, DHAP: Dihydroxyacetonphosphat, F6P: Fructose-6-phosphat, G6P: Glucose-6-phosphat, 1,3-bPG: 1,3-bis-Phosphoglycerat, 3-PG: 3-Phosphoglycerat, 2-PG: 2-Phosphoglycerat, PEP: Phosphoenolpyruvat, 6-PG: 6-Phosphoglycerat.

entsteht 1,3-bis-Phosphoglycerat (1,3-bPG). Unter ATP-Bildung wird im nächsten Schritt 3-Phosphoglycerat (3-PG) generiert. Eine Isomerisierung von 3-PG zu 2-PG ist nötig, um anschließend durch Wasserabspaltung Phosphoenolpyruvat (PEP) zu bilden. Die Pyruvatkinase bildet schließlich unter ATP-Bildung aus PEP Pyruvat. Die Gesamtgleichung für den EMP-Weg ist:



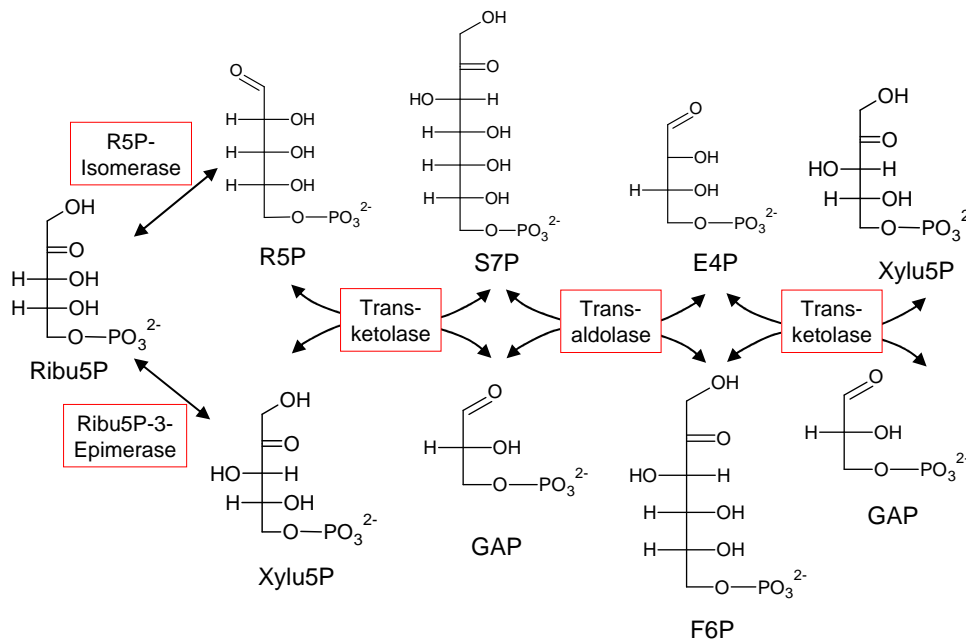
Für die Metabolisierung von F1P gibt es noch eine weitere Möglichkeit: Die Spaltung von F1P in DHAP und Glycerinaldehyd (GA) durch die F1P-Aldolase. GA wird unter ATP-Verbrauch zu GAP phosphoryliert, so dass beide Metabolite in den EMP-Weg eingehen. Allerdings ist die F1P-Aldolase bisher lediglich für humane Leberzellen beschrieben, wo eine F1P-Aldolase-Defizienz zu Fructoseintoleranz führen kann [Froesch et al., 1963].

### Pentosephosphatweg und KDPG-Weg

In Bakterien, wie z.B. *E. coli* oder *C. glutamicum*, die auf Glucose wachsen, wird durch die Glucoseaufnahme Glucose-6-phosphat (G6P) gebildet, das über eine nachfol-

gende Isomerisierung zu Fructose-6-phosphat (F6P) und anschließender Phosphorylierung durch die 6-Phosphofruktokinase als FBP in den EMP-Weg eintritt. G6P ist auch Ausgangspunkt des Pentosephosphatweges (PPP), der sich in einen oxidativen und einen nicht-oxidativen Zweig gliedert. Des Weiteren kann G6P innerhalb des KDPG-Weg (oder Entner-Doudoroff-Weg) verstoffwechselt werden. *R. rubrum* bildet G6P aus FBP durch die FBP-Phosphatase-Reaktion, eine gluconeogenetische Reaktion, die zu F6P führt. F6P kann über eine Isomerisierung in G6P umgewandelt werden (vgl.a. Abb. 1.5).

Der KDPG-Weg stellt eine Alternativroute zum EMP-Weg dar und wandelt Glucose in Pyruvat und GAP um. Die G6P-Dehydrogenase oxidiert G6P unter NADPH-Bildung in einem ersten Schritt zu 6-Phosphoglucono- $\delta$ -lacton, das nachfolgend durch eine Lactonase in 6-Phosphogluconat (6-PG) gespalten wird. Die Phosphogluconatdehydratase bildet aus 6-PG 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat (KDPG), das anschließend durch die KDPG-Aldolase in Pyruvat und GAP gespalten wird. Für *R. rubrum* konnte jedoch gezeigt werden, dass weder G6P-Dehydrogenase noch KDPG-Aldolase-Aktivität vorhanden sind [Grammel et al., 2003].



**Abb. 1.6:** Schema des nicht-oxidativen Zweiges des Pentosephosphatweges. Ribul5P: Ribulose-5-phosphat, R5P: Ribose-5-phosphat, S7P: Sedoheptulose-7-phosphat, E4P: Erythrose-4-phosphat, Xylu5P: Xylulose-5-phosphat, GAP: Glycerinaldehyd-3-phosphat, F6P: Fructose-6-phosphat. Schema modifiziert nach [Fuchs, 2007b] und [Yikrazuul, 2009].

Der oxidative Zweig des PPP-Weges entspricht dem KDPG-Weg in seinen ersten zwei Reaktionen. Jedoch wird hier 6-PG mit der 6-PG-Dehydrogenase unter NADPH-Bildung zu Ribulose-5-phosphat (Ribul5P) oxidiert und decarboxyliert. In der Gesamtbilanz werden aus G6P, 2 NADP<sup>+</sup> und H<sub>2</sub>O: Ribul5P, 2 NADPH, 2 H<sup>+</sup> und CO<sub>2</sub> gebildet. Ribul5P kann in Ribose-5-phosphat (R5P) umgewandelt werden. Die Reduktions-



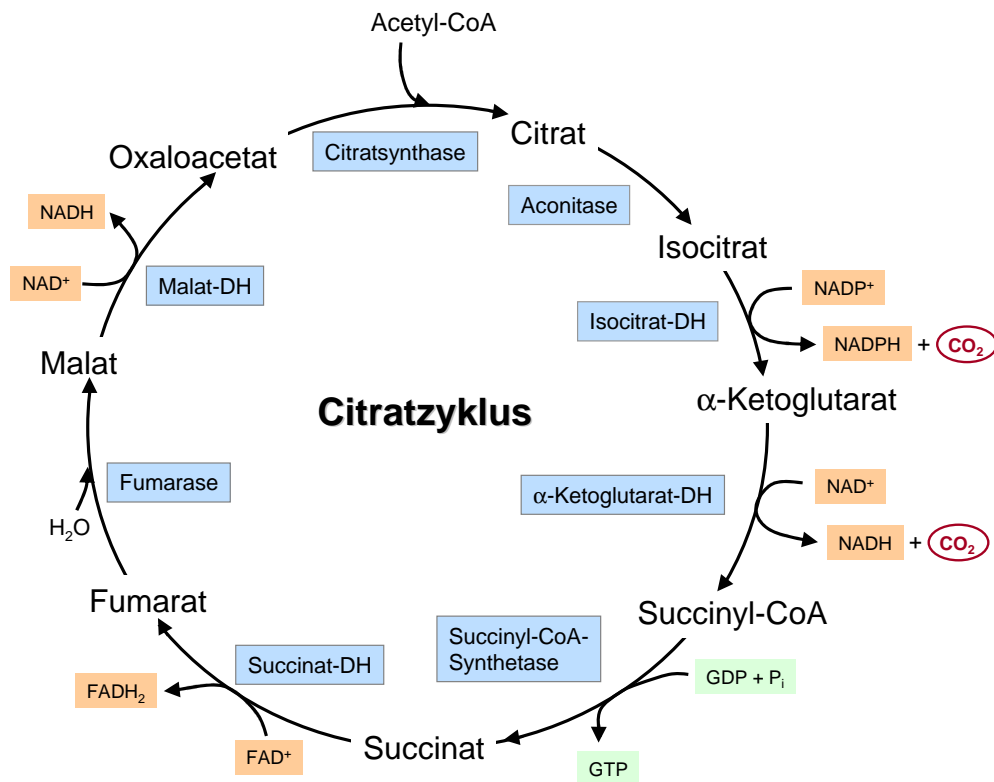
äquivalente werden für Biosynthesereaktionen verwendet, Ribose-5-phosphat wird in DNA und RNA sowie verschiedenen Cofaktoren benötigt (NADH/NAD<sup>+</sup>, NADPH/NADP<sup>+</sup>, ATP, ADP, AMP oder Coenzym A). Der nicht-oxidative Teil des PPP besteht aus reversiblen Transaldolase- und Transketolase-Reaktionen. Damit ist die Umwandlung von Rib5P in Intermediate des EMP-Weges möglich. Umgekehrt besteht jedoch ebenso die Möglichkeit der Biosynthese von R5P über die reversiblen Reaktionen des nicht-oxidativen PPP aus Intermediaten des EMP-Weges. Trotz des Fehlens der G6P-Dehydrogenase in *R. rubrum* ist es somit möglich, das für schnell wachsende Zellen nötige Ribose-5-phosphat zu bilden. In Abb. 1.6 sind die einzelnen Reaktionen ersichtlich [Fuchs, 2007b].

Stoffflussanalysen in *C. glutamicum* haben gezeigt, dass bei Wachstum auf Glucose > 50 % des Kohlenstoffes über den PPP-Weg verstoffwechselt werden, um Vorstufen für Biosynthesen zu bilden. Bei Wachstum auf Fructose dagegen spielt der PPP-Weg nur eine untergeordnete Rolle und etwa 80 % der Fructose werden über den Embden-Meyerhof-Parnas Weg verstoffwechselt. Darüber hinaus war das Wachstum geringer ( $\mu = 0,48 \text{ h}^{-1}$ ) als auf Glucose ( $\mu = 0,59 \text{ h}^{-1}$ ) und ging mit der Produktion von sogenannten *overflow*-Metaboliten wie Lactat und DHAP einher [Dominguez et al., 1998].

## TCA-Zyklus

Das innerhalb des EMP-Weges gebildete Pyruvat wird durch den Pyruvat-Dehydrogenase Komplex (PDH) oxidativ zu Acetyl-CoA decarboxyliert. Bei der Reaktion werden NADH und CO<sub>2</sub> gebildet. Der Nachweis und die Charakterisierung eines membrangebundenen PDH-Komplexes in *R. rubrum* erfolgte durch Lüderitz and Klemme [1977]. Die PDH weist eine *feedback*-Inhibierung durch NADH ( $K_i = 5 \mu\text{M}$ ) und Acetyl-CoA auf ( $K_i = 40 \mu\text{M}$ ) auf. Keine Effekte hatten Zuckerphosphate, PEP und Intermediate des TCA-Zyklus.

Das in der oxidativen Decarboxylierung gebildete Acetyl-CoA wird innerhalb des TCA-Zyklus vollständig zu CO<sub>2</sub> und Wasser abgebaut. Zusammen mit Oxaloacetat wird zunächst durch die Citratsynthase Citrat gebildet. Die Citratsynthase wird in *R. rubrum* durch KCl aktiviert, durch ATP und NADH jedoch inhibiert [Massarini et al., 1976]. Anschließend erfolgt die Isomerisierung von Citrat über Aconitat als Intermediat zu Isocitrat. Die Isocitrat-Dehydrogenase decarboxyliert Isocitrat unter NADPH-Bildung zu  $\alpha$ -KG. Dhillon and Silver [1972] reinigten die NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase teilweise auf. Eine negative Regulation kann durch Glyoxylat, Oxaloacetat, ATP oder Orthophosphat erfolgen. Als nächster Schritt erfolgt die oxidative Decarboxylierung von  $\alpha$ -KG zu Succinyl-CoA. Der die Reaktion katalysierende  $\alpha$ -KG-Dehydrogenase-Komplex ist ähnlich wie die PDH aufgebaut. Succinyl-CoA wird anschließend durch die Succinyl-CoA-Synthetase zu Succinat umgewandelt. Bei der Reaktion wird GTP gebildet, das



**Abb. 1.7:** Allgemeines Schema des TCA-Zyklus und die dazugehörigen Enzyme, Energiemetabolite, Reduktionsäquivalente sowie abgegebenes CO<sub>2</sub>. DH: Dehydrogenase, NADP<sup>+</sup>/NADPH: Nicotinamidadenindinukleodidphosphat, NAD<sup>+</sup>/NADH: Nicotinamidadenindinukleotid, GTP: Guanosintriphosphat, GDP: Guanosindiphosphat, FAD<sup>+</sup>/FADH<sub>2</sub>: Flavinadenindinukleotid, P<sub>i</sub>: anorganisches Phosphat.

aber durch Nukleosiddiphosphatkinasen zu ATP umgewandelt werden kann. Nachfolgend wird Succinat zu *trans*-Fumarat unter FADH<sub>2</sub>-Bildung oxidiert. Die Enzymreaktion wird durch die membranständige Succinat-Dehydrogenase katalysiert und ist in *R. rubrum* gut charakterisiert [Carithers et al., 1977; Davies et al., 1977; Hatefi et al., 1972]. Die Fumarase hydratisiert Fumarat stereospezifisch zu L-Malat in einer *trans*-Additionsreaktion. Anschließend kann L-Malat unter NADH-Bildung zu Oxaloacetat oxidiert werden. Die Reaktion wird durch die Malat-Dehydrogenase katalysiert. Der vollständige Zyklus ist in Abb. 1.7 ersichtlich. Die Gesamtgleichung für den Citratzyklus ist:



Tab. 1.3 gibt alle Aktivitäten der Enzyme des Citratzyklus' unter aeroben Bedingungen im Dunkeln im Vergleich zu phototrophen Bedingungen wieder. Bis auf die  $\alpha$ -KG-Dehydrogenase sind alle Enzymaktivitäten unter aeroben Bedingungen höher als unter phototroph, anaeroben Bedingungen, bedingt durch die Anwesenheit von Sauerstoff für die Oxidation der im Citratzyklus gebildeten Reduktionsäquivalente in der Atmungskette.

**Tab. 1.3:** Übersicht über die Aktivitäten verschiedener Enzyme des TCA-Zyklus auf Malat als C-Quelle im Dunkeln und im Licht mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  als Stickstoffquelle. Alle Angaben in  $\text{nmol}/\text{mg}_{\text{Protein}} \cdot \text{min}$  [Anderson and Fuller, 1967c].

Enzym	Aerob, dunkel	Anaerob, phototroph
Citratsynthase	140	35
Aconitase	170	110
Isocitrat-Dehydrogenase	459	225
$\alpha$ -KG-Dehydrogenase	5,6	6,6
Succinyl-CoA-Synthetase	96	66
Succinat-Dehydrogenase	2220	1510
Fumarase	800	510
Malat-Dehydrogenase	2350	1390

## Fixierung von $\text{CO}_2$

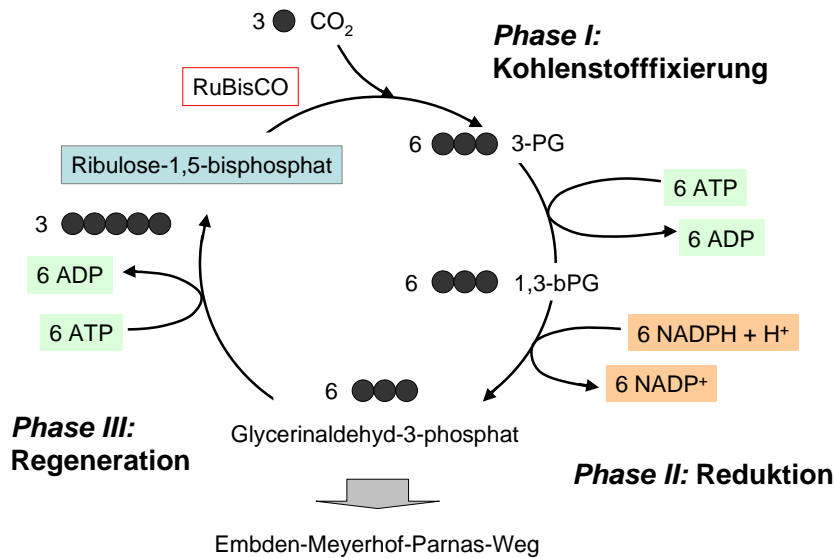
Die Fixierung von  $\text{CO}_2$  spielt in *R. rubrum* zum einen für das Wachstum unter photoautotrophen Bedingungen [Anderson and Fuller, 1967a] und zum anderen für die Bildung photosynthetischer Membranen oder organischen Säuren im Dunkeln eine große Rolle [Schultz and Weaver, 1982]. Aus diesem Grund sollen an dieser Stelle die Möglichkeiten der  $\text{CO}_2$ -Fixierung in *R. rubrum* beschrieben werden.

## Calvin-Benson-Bassham-Zyklus

Gut charakterisiert und untersucht ist die Rolle von  $\text{CO}_2$  für das Wachstum unter photoautotrophen Wachstumsbedingungen in *R. rubrum*. Der unter diesen Bedingungen aktive CBB-Zyklus fixiert 1 Molekül  $\text{CO}_2$  mit 1 Molekül Ribulose-1,5-diphosphat unter Bildung von 2 Molekülen 3-PG. Die Reaktion wird von der Ribulose-1,5-diphosphat Carboxylase-Oxygenase (RuBisCO) katalysiert [Sirevag et al., 1977; Anderson and Fuller, 1967a]. Das instabile  $\text{C}_6$ -Zwischenprodukt zerfällt in zwei  $\text{C}_3$ -Moleküle 3-PG, welches anschließend unter ATP- und NADPH-Verbrauch zu Glycerinaldehyd-3-phosphat reduziert wird, ein Zwischenprodukt des Embden-Meyerhof-Parnas-Weges (vgl.a. Abb. 1.8). Die RuBisCO wird von drei Metaboliten negativ reguliert: Citrat, anorganischen Phosphat und 3-PG, das Endprodukt der RuBisCO [Anderson and Fuller, 1969].

## Reduktiver Citratzyklus

Noch nicht vollständig aufgeklärt wurde bisher der Beitrag der reduktiven Kohlenstoffdioxid-Fixierung über die RuBisCO unter photoheterotrophen Bedingungen im Licht. Bei Anderson and Fuller [1967b] führten  $^{14}\text{C}$ -Markierungsstudien unter photoautotrophen und photoheterotrophen Bedingungen mit L-Malat als C-Quelle zu unterschiedlichen  $^{14}\text{C}$ -



**Abb. 1.8:** Calvin-Benson-Bassham-Zyklus in *R. rubrum*. 3-PG: 3-Phosphoglycerat, 1,3-bPG: 1,3-bis-Phosphoglycerat. ATP: Adenosintriphosphat, ADP: Adenosindiphosphat, NADP<sup>+</sup>/NADPH: Nicotinamidadenindinukleodidphosphat.

Verteilungen in den isolierten Produkten. So wurde ein 210-mal höherer Einbau von  $^{14}\text{C}$  in Phosphatester (darunter PEP) unter photoheterotrophen Bedingungen ( $^{14}\text{C}$ -Malat) beobachtet als unter photoautotrophen Bedingungen ( $^{14}\text{CO}_2$ ), was darauf hin deutet, dass der reduktive PPP-Weg unter photoheterotrophen Bedingungen nur eine untergeordnete Rolle spielt. Höhere RuBisCO-Aktivitäten (35-mal höher) unter photoautotrophen Bedingungen bestätigen diese  $^{14}\text{C}$ -Markierungsversuche [Anderson and Fuller, 1967c].

Es wurde jedoch auch die Rolle eines reduktiven TCA-Zyklus zur  $\text{CO}_2$ -Fixierung in photosynthetischen Bakterien diskutiert [Buchanan et al., 1967; Evans et al., 1966; Buchanan et al., 1964]. Dieser 1966 für *Chlorobium thiosulfatophilum* vorgestellte Zyklus fixiert in einem kompletten Umlauf 4 Moleküle  $\text{CO}_2$  zu einem Molekül Oxaloacetat. Ein Jahr später wurde dieser neue Zyklus der Ferredoxin-abhängigen Kohlenstoffdioxid-Fixierung auch in *R. rubrum* unter photosynthetischen Bedingungen nachgewiesen [Buchanan et al., 1967].

Die Pyruvatsynthase setzt unter  $\text{CO}_2$ -Fixierung Acetyl-CoA zu Pyruvat um. Das gebildete Pyruvat kann anschließend zur Alaninbiosynthese verwendet werden oder weiter zu Oxaloacetat carboxyliert werden. Die weiteren Schritte werden durch reversible Enzyme des TCA-Zyklus bewerkstelligt. Die  $\alpha$ -KG-Synthase fixiert erneut 1 Molekül  $\text{CO}_2$  unter Bildung von  $\alpha$ -KG, welches durch die Isocitrat-Dehydrogenase reduktiv zu Isocitrat decarboxyliert wird. Ausgehend von Oxaloacetat und  $\alpha$ -KG können 2 weitere Aminosäuren synthetisiert werden: Aspartat und Glutamat. Eine besondere Rolle kommt dabei reduzierten Ferredoxin zu, das für die Reaktion der Pyruvatsynthase und der  $\alpha$ -KG-Synthase im re-

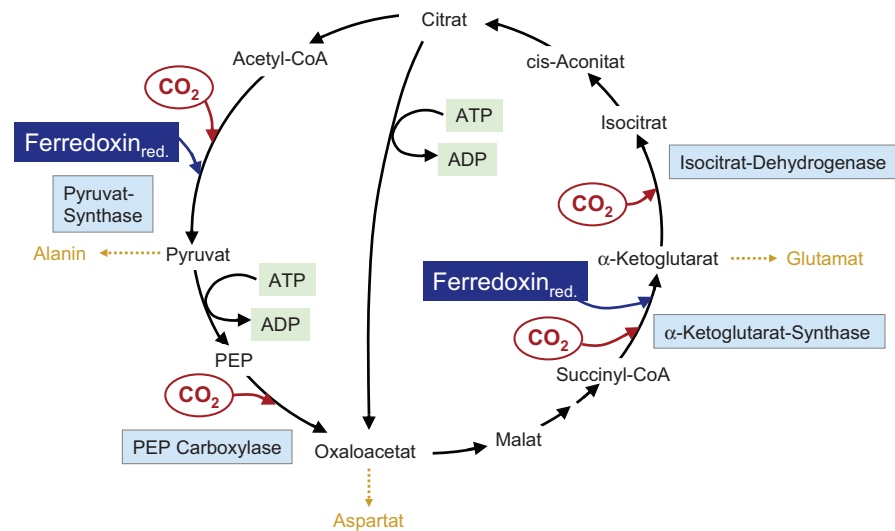


Abb. 1.9: Reduktive TCA-Zyklus in *R. rubrum* (modifiziert nach Evans et al. [1966]).

duktiven TCA-Zyklus benötigt wird. Abb. 1.9 zeigt die einzelnen Reaktionen des reduktiven TCA-Zyklus. In Tab. 1.4 sind einzelne Enzymaktivitäten des reduktiven TCA-Zyklus nach Buchanan et al. [1967] aufgelistet. Bis auf die Citratlyase wurden alle Aktivitäten für photoheterotrophe (Succinat als C-Quelle) Zellen bestimmt. Die Citratlyase-Aktivität wurde lediglich unter phototroph, autotrophen Bedingungen ( $H_2/CO_2$ ) gefunden.

Unterstützt wird dieses Ergebnis durch  $^{14}C$ -Markierungsexperimente.  $1,5-^{14}C$ -Citrat wird nach Zugabe von ATP und CoA zu  $^{14}C$ -Aspartat, das Produkt der Citratlyase-Reaktion, umgesetzt. In photoheterotroph mit Succinat gewachsenen Zellen wurde kein markiertes Aspartat gefunden [Buchanan et al., 1967]. Obwohl die Citratlyase-Aktivität von Buchanan et al. [1967] in *R. rubrum* gemessen worden ist, sind spätere Arbeiten von Ivanovsky et al. [1980]; Beuschner and Gottschalk [1972] entstanden, welche eindeutig die Abwesenheit der ATP-abhängigen Citratlyase-Reaktion zeigen. Übereinstimmend wurde allerdings das Fehlen der Citratlyase-Aktivität unter photoheterotrophen Bedingungen gefunden, so dass zumindest für diese Bedingungen angenommen werden kann, dass keine Citratlyase-Aktivität vorhanden ist.

## Acetatassimilation

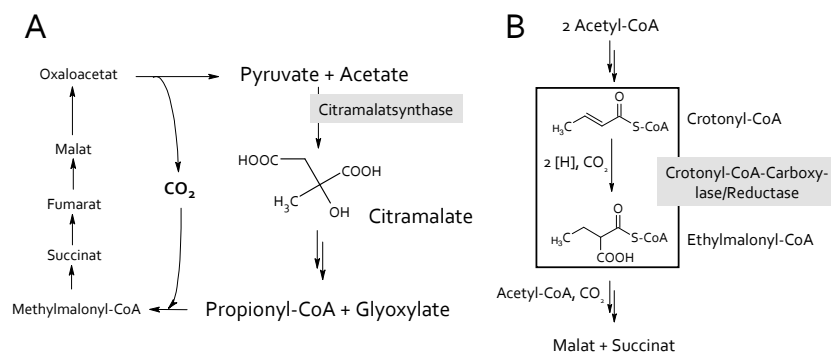
Bereits seit vielen Jahren ist bekannt, dass *R. rubrum* neben Succinat als C-Quelle Acetat unter photoheterotrophen Bedingungen in zelluläres Material einbauen kann [Cutinelli et al., 1951; Glover et al., 1952]. Im Gegensatz zu anderen Bakterien, die auf Acetat wachsen können, besitzt *R. rubrum* keinen funktionellen Glyoxylatzyklus, da das essen-

**Tab. 1.4:** Aktivitäten von Enzymen des reduktiven TCA-Zyklus in *R. rubrum* unter phototrophen Bedingungen [Buchanan et al., 1967]. Außer Citratlyase (autotroph) alle Enzymaktivitäten mit Succinat als C-Quelle und in nmol/mg<sub>Protein</sub> · min.

Enzym	Aktivität in nmol/mg <sub>Protein</sub> · min
Acetoacetyl-CoA Synthetase	400
Pyruvat-Synthase	1,0
PEP-Synthetase	11,67
PEP-Carboxylase	100
Malat-Dehydrogenase	2650
Fumarase	2133
Succinat-Dehydrogenase	20,0
Succinyl-CoA Synthetase	55
α-KG-Synthase	0,20
Isocitrat-Dehydrogenase	1167
Aconitase	121,7
Citratlyase	2,83

zielle Enzym Isocitratlyase fehlt [Kornberg and Lascelles, 1960]. Ivanovsky et al. [1997] schlugen den Citramalatweg zur Assimilation von Acetat in *R. rubrum* vor, der ausgehend von Acetyl-CoA und Pyruvat Citramalat als Zwischenprodukt aufweist, das über Mesaconat, Mesoconyl-CoA und β-Methylmalyl-CoA in Glyoxylat und Propionyl-CoA umgesetzt wird. Propionyl-CoA wird dann in weiteren Schritten zu Succinat umgewandelt, das den TCA-Zyklus auffüllt. Glyoxylat kondensiert mit einem weiteren Molekül Acetyl-CoA zu Malat (s.a. Abb. 1.10/A).

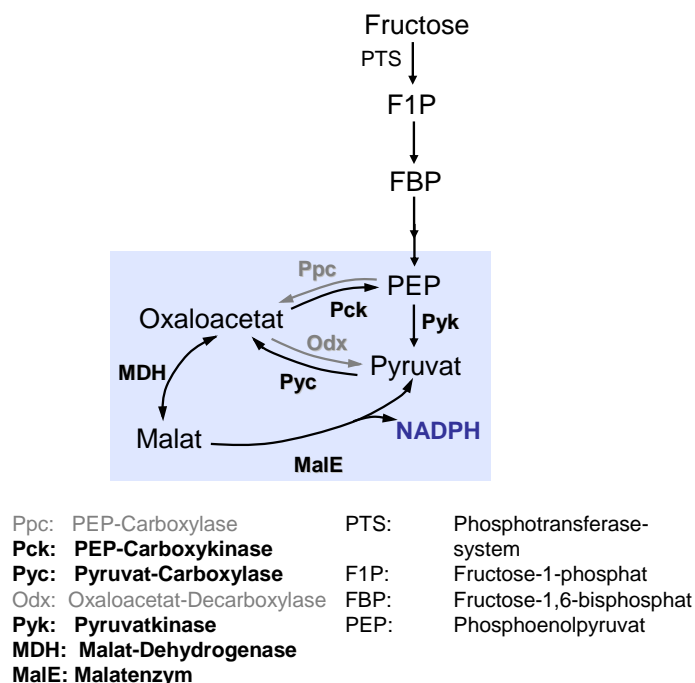
Erst vor kurzem wurde von Erb et al. [2007] der Ethylmalonyl-CoA-Weg für *Methylobacterium extorquens* vorgeschlagen, der ausgehend von 2 Molekülen Acetyl-CoA und einer reduktiven Fixierung von CO<sub>2</sub> mit der Bildung von Malat und Succinat den TCA-Zyklus auffüllt. Schlüsselenzym in diesem metabolischen Weg ist die Crotonyl-CoA Carboxylase/Reduktase (CCR), die in einem Schritt Crotonyl-CoA zu Ethylmalonyl-CoA unter NADPH-Verbrauch carboxyliert (s.a. Abb. 1.10/B). Der Ethylmalonyl-CoA-Weg weist neue ungewöhnliche Moleküle als Intermediate auf ((2*R*)-/(2*S*)-Ethylmalonyl-CoA, (2*S*)-Methylsuccinyl-CoA oder Mesoconyl-CoA). Die entsprechenden Enzyme könnten unter Umständen neue und unkonventionelle Reaktionen katalysieren und als Biokatalysatoren Verwendung finden [Alber, 2011]. Da für *R. rubrum* homologe DNA-Abschnitte zur CCR aus *Methylobacterium extorquens* gefunden worden sind, ist es sehr wahrscheinlich, dass *R. rubrum* ebenfalls den Ethylmalonyl-CoA-Weg für die Acetatassimilation nutzt. Eine detaillierte Untersuchung der Acetatassimilation in *R. rubrum* wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt und findet sich unter Abschn. 3.7.4.



**Abb. 1.10:** Schematische Übersicht der beiden vorgeschlagenen Wege für die Acetatassimilation in Isocitratlyase-negativen Bakterien. A: Citramalatweg, von Ivanovsky et al. [1997] für *R. rubrum* vorgeschlagen. B: Ethylmalonyl-CoA-Weg, von Erb et al. [2007] für *R. rubrum* vorgeschlagen.

### Anaplerotische Reaktionen

Neben dem CBB-Zyklus und dem reduktiven TCA-Zyklus besitzt *R. rubrum* Enzyme für anaplerotische, CO<sub>2</sub>-fixierende Reaktionen, die in Abb. 1.11 aufgezeigt werden. Die reversible Carboxylierung von PEP zu Oxaloacetat durch die PEP-Carboxylase wurde in *R. rubrum* unter phototrophen Bedingungen nachgewiesen und das entsprechende Enzym wurde aufgereinigt. Die Reaktion ist GTP (ITP)-abhängig und wird durch ATP reguliert [Klemme, 1976; Cooper and Benedict, 1968].



**Abb. 1.11:** Anaplerotische Reaktionen im Zentralstoffwechsel. Die grau gekennzeichneten Enzyme sind noch nicht für *R. rubrum* beschrieben. Die schwarz gekennzeichneten Enzyme besitzt *R. rubrum* nachweislich.

Das Biotin-abhängige Enzym Pyruvat-Carboxylase ist nicht detailliert für *R. rubrum* beschrieben, jedoch wurde die Aktivität im Rahmen der Untersuchung des Acetatstoffwechsels von Berg and Ivanovsky [2009] in *R. rubrum* gemessen. Auf Malat als C-Quelle unter phototrophen Bedingungen beträgt die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität demnach  $52 \text{ nmol/mg}_{\text{Protein}} \cdot \text{min}$ . Genauer untersucht wurde die Pyruvat-Carboxylase in *Rb. capsulatus*, wo das Enzym durch Intermediate des TCA-Zyklus inhibiert und durch Pyruvat aktiviert wird [Yakunin and Hallenbeck, 1997]. Das Malatenzym setzt Malat reversibel zu Pyruvat unter Bildung von NADPH um. Malatenzym-Aktivität wurde in *R. rubrum* nachgewiesen [Hoover and Ludden, 1984; Iwakura et al., 1978].

## 1.2 Grundlagen der Prozessführung

Ein wesentlicher Aspekt eines biotechnologischen Fermentationsverfahrens ist die Wahl der Betriebsweise des Bioreaktors. Die Prozessführung hat zum Beispiel einen Einfluss auf die Umsatzrate von Substrat und die Produktausbeute, aber auch der apparative Aufwand und die Zuverlässigkeit des Prozesses müssen in die Überlegungen mit einbezogen werden. Im Fall einer Produktinhibierung kann die störende Substanz durch einen kontinuierlichen Prozess unter Zellrückhaltung aus dem Prozess entfernt werden.

Grundsätzlich können zwei Arten der Prozessführung unterschieden werden: nicht-kontinuierliche Prozesse (Batch und Fedbatch) sowie kontinuierliche Verfahren (Chemostat, Turbidostat oder Perfusion mit Zellrückhaltung).

### 1.2.1 Batch-Verfahren

Beim Satzverfahren (Batch) wird der Bioreaktor vollständig mit Substraten befüllt. Es findet kein zusätzlicher Eintrag von Substraten zu einem späteren Zeitpunkt mehr statt. Der Batch-Prozess kann trotzdem nicht als geschlossenes System betrachtet werden, da in aeroben Prozessen  $\text{O}_2$ , aber auch Säure bzw. Base zur pH-Wertregelung und ggf. Antischaum zur Unterdrückung der Schaumbildung zugeführt werden.

Nach Inokulation des Reaktors nimmt die Substratkonzentration durch Wachstum der Zellen ab. Gleichzeitig können Metabolite des Zellstoffwechsels ausgeschieden werden. Während dieser Zeit muss in aeroben Prozessen die Versorgung mit ausreichend  $\text{O}_2$  gewährleistet sein, da sonst eine frühzeitige Limitation des Wachstums durch Sauerstoffmangel eintritt. Sind die Substrate verbraucht oder wird das Wachstum durch akkumulierende Metabolite inhibiert, tritt ein Wachstumsstopp ein. Damit ist in einem Batch-Prozess die maximale Produktkonzentration erreicht und die Fermentation kann zu diesem Zeitpunkt abgebrochen werden [Pörtner, 2006a].



Diese Art der Betriebsführung eines Bioreaktors ist einfach und zuverlässig, sie hat aber auch Nachteile. Die Anfangskonzentrationen der Substrate ist durch die Konzentration limitiert, bei der eine Inhibierung des Zellwachstums auftritt. Die maximal erreichbare Biomasse ist dadurch gering und die Produktbildungsphase meistens kurz. Aus diesem Grund werden in einem Batch-Prozess auch nur begrenzte volumenspezifische Produktivitäten erreicht [Stanbury et al., 1999].

### 1.2.2 Fedbatch-Verfahren

Eine Weiterentwicklung des Batch-Prozesses, um die Produktbildungsphase zu verlängern und höhere Biomassen zu erreichen, ist der Fedbatch-Prozess. Dabei erfolgt eine Zufütterung von Substrat, wenn die vorgelegte Substratkonzentration im Medium weitgehend verbraucht ist oder wachstumslimitierende Werte erreicht. Die Zufütterung kann nach verschiedenen Strategien erfolgen. Eine einfache Möglichkeit ist ein linearer Feed mit konstanter Zufütterungsrate. Dem gegenüber steht ein exponentieller Feed, bei dem die Rate exponentiell im Verlauf der Fermentation ansteigt. Auf diese Weise ist es möglich, die unvermeidbar eintretende Wachstumslimitation bei einem linearen Feed zu überwinden, wenn die Zufütterungsrate bei steigender Biomasse die spezifische Substratverbrauchsrate übersteigt. In bestimmten Fällen ist es aber auch erforderlich eine limitierende Substratkonzentration einzustellen [Krahe, 2003].

Insgesamt bedeutet ein Fedbatch-Prozess immer einen höheren apparativen Aufwand, da zumindest ein Behälter mit Feedlösung und entsprechende Vorrichtungen zur Dosierung und deren Steuerung vorhanden sein muss.

### 1.2.3 2-Stufen-Prozess

Ein 2-Stufen-Prozess könnte für *R. rubrum* von Vorteil sein, da eine Reihe von Produkten wie photosynthetische Membranen und die damit assoziierten Produkte wie Porphyrine,  $\delta$ -Aminolävulinsäure ( $\delta$ -ALA), Coenzyme oder Vitamin B<sub>12</sub> oder organische Säuren unter O<sub>2</sub>-limitierten Bedingungen gebildet werden. Da unter diesen Bedingungen im Vergleich zu aeroben Bedingungen geringere Wachstumsraten erreicht werden können, ist eine gleichzeitige Produktion von Biomasse nicht von Vorteil. Wesentlich höhere Wachstumsraten werden mit *R. rubrum* unter aeroben Bedingungen ( $pO_2 > 5\%$ ) erzielt [Grammel et al., 2003]. Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit die Eignung von 2-Stufen-Prozesse untersucht werden. Innerhalb dieser Prozessform wird in einer aeroben Wachstumsphase zunächst Biomasse gebildet werden. Anschließend kann durch Absenken des Sauerstoffpartialdrucks die Produktbildung induziert werden, was entweder durch die Einstellung mikroaerober oder anaerober Bedingungen erfolgen kann. Es entsteht so-

mit eine Entkopplung von Wachstum und Produktbildung. Der 2-Stufen-Prozess kann als Batch-Prozess oder als Fedbatch-Prozess durchgeführt. Lu et al. [2009] wendeten z.B. einen 2-Stufen-Prozess zur Produktion von Succinat mit *E. coli* an. Nachdem die Zellen aerob bis zu einer Zelldichte von  $A_{600} = 20$  kultiviert worden waren, wurde die Succinatbildung durch Umschalten auf anaerobe Bedingungen mit 0,5 L/min  $\text{CO}_2$  induziert.

Im Dunkeln ist aufgrund der  $\text{O}_2$ -abhängigen Regulation die Bildung photosynthetischer Membranen unter  $\text{O}_2$ -limitierenden Bedingungen wie mikroaeroben oder anaeroben Bedingungen möglich. Der bei Grammel et al. [2003] beschriebene mikroaerobe Kultivierungsprozess führt zur Ausbildung photosynthetischer Membranen im Dunkeln. Dabei werden die C-Quellen Fructose und Succinat aus dem von Ghosh et al. [1994] entwickelten Mediums (M2SF-Medium) simultan von *R. rubrum* aufgenommen. Die Prozessführungsstrategie folgt einer pH- $p\text{O}_2$ -gekoppelten Regelung des mikroaeroben Zustandes. Unter anaeroben Sauerstoffbedingungen sinkt der pH-Wert durch die Produktion organischer Säuren. Unter aeroben Sauerstoffbedingungen steigt der pH-Wert durch die simultane Aufnahme von Succinat mit  $\text{H}^+$  [Gutowski and Rosenberg, 1975]. Entsprechend wurde im Prozess die Zufuhr von  $\text{O}_2$  bei sinkendem pH erhöht und bei steigenden pH-Wert verringert und so eine Einstellung mikroaerober Sauerstoffbedingungen erzielt [Grammel et al., 2003].

#### 1.2.4 Kontinuierliche Kultivierung unter Zellrückhaltung

Im Gegensatz zum Batch-, Fedbatch- und 2-Stufen-Prozess wird bei kontinuierlichen Verfahren fortlaufend frisches Medium in den Bioreaktor gepumpt und gleichzeitig Kulturbrühe abgepumpt. Bei einer kontinuierlichen Kultivierung unter Zellrückhaltung wird darüber hinaus ein Verlust der Zellen über den Ablauf durch ein geeignetes Rückhaltesystem verhindert. Somit können höhere volumetrische Produktivitäten als ohne Zellrückhaltung erreicht werden. Die Zellrückhaltung lässt sich durch verschiedene Techniken realisieren. Rührkesselreaktoren lassen sich mit Filtrationseinheiten, Zentrifugen oder Sedimentern koppeln [Pörtner, 2006b].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine kontinuierliche Kultivierung unter Zellrückhaltung für *R. rubrum* entwickelt werden, um lösliche Substanzen, welche durch das Bakterium in das extrazelluläre Medium ausgeschieden werden, aus der Kulturbrühe zu entfernen. Damit sollte eine Ausbildung maximaler Level an photosynthetischen Membranen im Dunkeln ermöglicht werden, da durch Experimente mit Mediumsüberständen gezeigt werden konnte, dass sich derselbige inhibitorisch auf die Produktion der Photosynthesemembranen auswirkt. Eine Maximierung der Biomassekonzentration, was beispielsweise bei der kontinuierlichen Kultivierung von tierischen Zellen angestrebt wird [Pörtner, 2006b], stand dabei nicht im Vordergrund. Vielmehr sollte gezeigt werden, dass durch

eine gezielte Anreicherung der inhibitorischen Substanzen eine höhere Produktivität an Photosynthesemembranen in *R. rubrum* im Dunkeln erzielt werden kann.

## 1.3 Bildung und Anwendung biotechnologisch interessanter Produkte

### 1.3.1 Biosynthese von Carotinoiden

Carotinoide werden in Bakterien, Algen, Pilzen und grünen Pflanzen gebildet, von denen die C<sub>40</sub>-Carotinoide am häufigsten vertreten sind. Vor allem die bakteriellen Carotinoide unterscheiden sich von denen der Algen, Pilze und Pflanzen und sind strukturell sehr vielfältig [Sandmann, 2001; Schmidt, 1978].

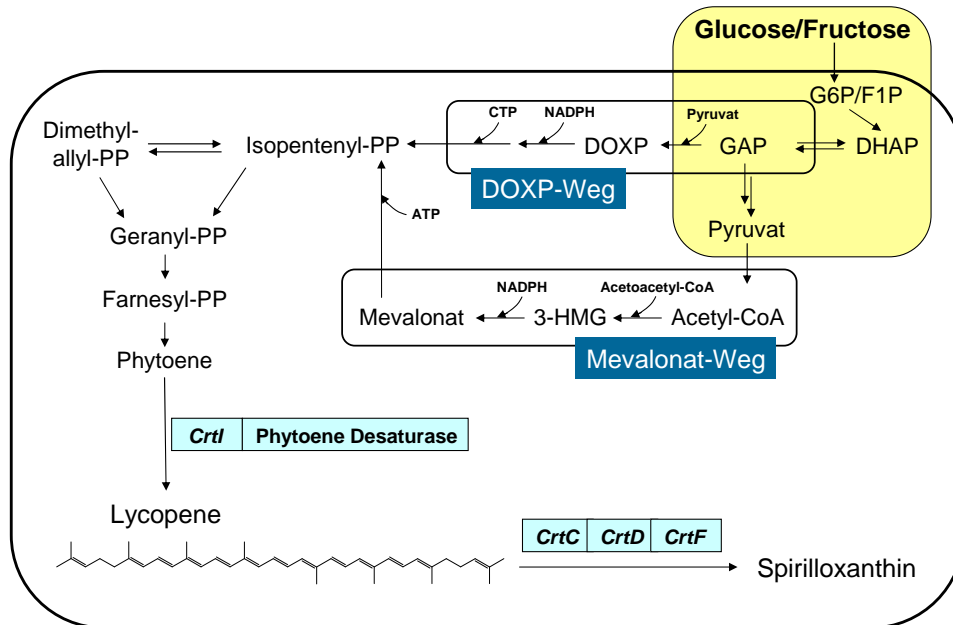
Des Weiteren sind sie wertvolle Produkte, die zum Beispiel als Farbstoffe in der Kosmetikindustrie, Geflügelhaltung und Fischhaltung eingesetzt werden. Auch in Lebensmitteln werden Carotinoide wie  $\beta$ -Carotin oder Lycopin als Farbstoffe verwendet [Ausich, 1997]. Darüber hinaus werden Carotinoiden positive Wirkungen im Hinblick auf verschiedene chronische Erkrankungen zugeschrieben, darunter kardiovaskuläre Erkrankungen, Krebserkrankungen und Makuladegeneration des Auges [Cooper, 2004; Ausich, 1997].

Das vorherrschende Carotinoid in *R. rubrum*-Zellen der stationären Wachstumsphase ist Spirilloxanthin [Goodwin and Osman, 1953; Polgár et al., 1944; van Niel and Smith, 1935]. Es kommt als fester Bestandteil des Lichtsammelkomplexes LH-1 vor, wo Spirilloxanthin das einfallende Licht „einfängt“ und die Elektronen zum Reaktionszentrum weiterleitet, wo die Ladungstrennung und Weiterleitung der Elektronen erfolgt [Siefertmann-Harms, 1985]. Evans et al. [1988] fanden heraus, dass Spirilloxanthin immer in einem bestimmten Verhältnis zu Bacteriochlorophyll im LH-1-Komplex (B880) enthalten ist, das 2:1 (Bacteriochlorophyll:Carotinoid) beträgt. Darüber hinaus kommt den Carotinoiden im Lichtsammelkomplex eine wichtige Rolle zum Schutz des Photosyntheseapparates vor Photooxidation in Anwesenheit von Sauerstoff zu. Die photochemische Reaktion verläuft über einen angeregten Zustand des Bacteriochlorophylls (Triplet-Zustand), das nachfolgend mit Sauerstoff zu Singulett-Sauerstoff (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) reagiert. Singulett-Sauerstoff ist sehr reaktiv und führt in der Regel zu irreparablen Zellschäden. Carotinoide verhindern die Entstehung von Singulett-Sauerstoff [Glaeser and Klug, 2005; Cogdell et al., 2000].

### DOXP-und Mevalonat-Weg in *R. rubrum*

Die Biosynthese von Isoprenoiden erfolgt aus Precursor-Molekülen des Zentralstoffwechsels. Grundsätzlich sind zwei Wege bekannt, die beide zunächst zu Isopentenylidi-

phosphat (IPP) führen: der DOXP-Weg und der Mevalonat-Weg. Ausgehend von IPP werden verschiedene Metabolite wie Steroide (Cholesterin), Sesquiterpene, Carotinoide, Coenzyme und Isoprene abhängig vom jeweiligen Organismus gebildet. In Abb. 1.12 sind beide Wege zum IPP in der Zelle und die weiterführenden Schritte zur Spirilloxanthin-Bildung zu sehen.



**Abb. 1.12:** Allgemeines Schema des DOXP-Weges und Mevalonat-Weges in der Zelle. Gelb unterlegt ist der Ausschnitt des Zentralstoffwechsels, von dem Precursor für die Biosynthese von IPP ausgehen. G6P: Glucose-6-phosphat, DHAP: Dihydroxyacetophosphat, GAP: Glycerinaldehyd-3-phosphat, DOXP: 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat, NADP<sup>+</sup>/NADPH: Nicotinamidadenindinukleodidphosphat, CTP: Cytosintriphosphat, PP: Pentenylphosphat, 3-HMG: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA.

Ausgehend von GAP und Pyruvat wird beim DOXP-Weg durch die Thiamin-abhängige DOXP-Synthase (*dxs*-Genprodukt) 2-Keto-desoxy-xylulose-5-phosphat gebildet, das anschließend zu 2-C-Methylethritol-4-phosphat reduziert wird (DOXP-Reduktase). In weiteren Reaktionen wird, unter Verbrauch von CTP, IPP gebildet [Schwender, 1999].

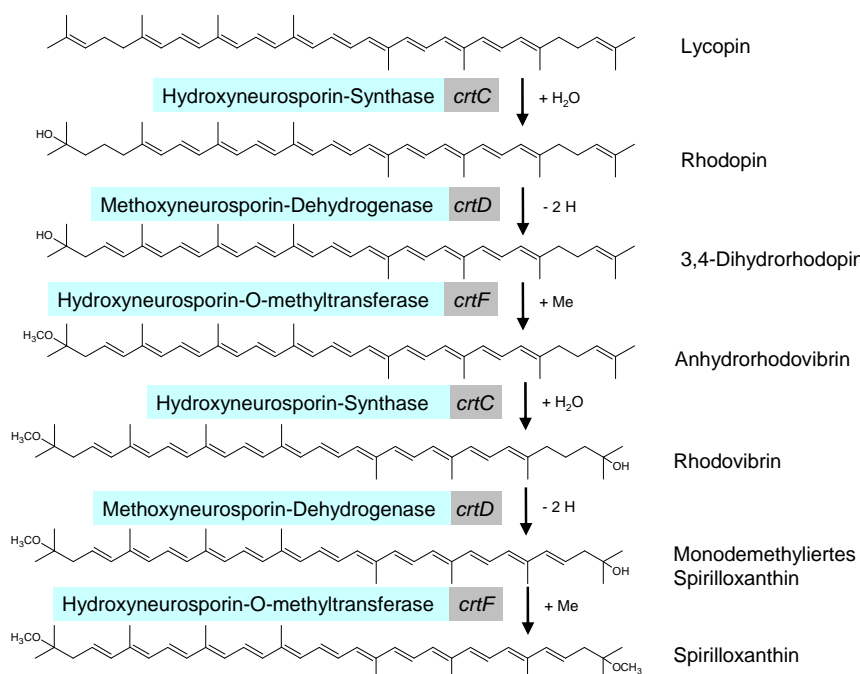
Beim Mevalonat-Weg wird Acetyl-CoA mit Acetoacetyl-CoA zu 3-Hydroxymethylglutaryl-CoA (3-HMG-CoA) umgesetzt. Katalysiert wird diese Reaktion durch die 3-HMG-CoA Synthase. Acetoacetyl-CoA wird durch eine Thiolase aus 2 Molekülen Acetyl-CoA synthetisiert. 3-HMG-CoA wird anschließend mit NADPH zu Mevalonat durch die HMG-CoA-Reduktase reduziert. Unter ATP-Verbrauch und CO<sub>2</sub>-Abspaltung wird dann in zwei Schritten IPP gebildet [Rohmer, 1999].

Beide Wege, DOXP- und Mevalonat-Weg, sind unter Prokaryonten unabhängig taxonomischer Zugehörigkeiten weit verbreitet. In *R. rubrum* wird IPP über den DOXP-Weg gebildet [Takaichi, 2009]. Widersprüchlich dazu wird bei Baltscheffsky et al. [1997] beschrieben, dass *R. rubrum* auf Mevalonat als C-Quelle unter phototrophen Bedingun-

gen wachsen kann. Das Enzym HMG-CoA-Lyase, das 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG) zu Acetyl-CoA und Acetoacetat spaltet, wurde zwar in *R. rubrum* nachgewiesen, allerdings nur bei Wachstum auf Leucin als alleinige C-Quelle. Bei Wachstum auf Mevalonat wurde keine HMG-CoA-Lyase-Aktivität gefunden [Baltscheffsky et al., 1997]. Darüber hinaus berichten Davies and Goodwin [1959], dass [2-<sup>14</sup>C]Mevalonat im Gegensatz zu [2-<sup>14</sup>C]Acetat nicht in isolierte Chromatophoren eingebaut wird. Auch die Metabolisierung von [2-<sup>14</sup>C]Mevalonat (0,1-0,2 %) ist im Vergleich zu [2-<sup>14</sup>C]Acetat (6-7 %) deutlich geringer. Zusammenfassend lässt sich nicht ausschließen, dass neben dem DOXP-Weg auch der Mevalonatweg in *R. rubrum* vorkommt, wahrscheinlicher jedoch ist das Vorhandensein des DOXP-Weges für die intrazelluläre Bildung von IPP in *R. rubrum*.

### Biosynthese von Spirilloxanthin in *R. rubrum*

Das Carotinoid-Spektrum in *R. rubrum* variiert abhängig von der Wachstumsphase. In wachsenden *R. rubrum*-Zellen finden sich große Mengen Lycopin, Rhodopin, Anhydrorhodopin, Rhodovibrin und Spirilloxanthin. Im Gegensatz dazu macht Spirilloxanthin mit 95 % aller Carotinoide den Hauptanteil in der späten exponentiellen bzw. stationären Wachstumsphase aus [Schwerzmann and Bachofen, 1989; Lozano et al., 1989; Schmidt, 1978].



**Abb. 1.13:** Biosynthese von Spirilloxanthin ausgehend von Lycopin in *R. rubrum*. A: Hydroxylierung, B: Dehydrierung, C: Methylierung. Angegeben sind auch die beteiligten Enzyme und die entsprechenden codierenden Gene.

Die Biosynthese von Spirilloxanthin erfolgt in *R. rubrum* ausgehend von Lycopin. Die Biosynthese von Spirilloxanthin beinhaltet grundsätzlich 3 verschiedene Reaktionstypen:

Hydroxylierung (A), Dehydrierung (B) und Methylierung (C) (s.a. Abb. 1.13). Die Hydroxylierung erfolgt durch Addition von Wasser an die Doppelbindung unter Bildung eines tertiären Alkohols. Die Dehydrierung führt unter Abspaltung von 2 H-Atomen eine zusätzliche Doppelbindung in Konjugation zu den bereits bestehenden konjugierten Doppelbindungen ein. Der anschließende Methylierungsschritt erfolgt an derselben tertiären Hydroxylgruppe, die durch die Hydroxylierung im ersten Schritt eingeführt worden ist. Für die Methylierung wird die Methyl-Gruppe von S-Adenosylmethionin (SAM) benutzt, die durch eine entsprechende Methyltransferase übertragen wird [Benedict and Beckman, 1964]. Dieses Reaktionsschema wiederholt sich noch ein zweites Mal und führt schließlich zur Bildung von Spirilloxanthin [Jensen and Cohen-Bazire, 1961].

### 1.3.2 Bacteriochlorophyll a und Porphyrine aus *R. rubrum*

Porphyryne bestehen aus 4 Pyrrolringen (Tetrapyrrol), die über Methingruppen zyklisch miteinander verbunden sind. Von der Grundstruktur des Porphyrins leiten sich eine Vielzahl weiterer Strukturen ab, wie Protoporphyrin, Chlorophyll und Häm (in Hämoglobin oder Cytochromen), die essenzielle biologische Funktionen in der Zelle übernehmen.

Darüber hinaus stellen sie interessante Produkte für industrielle und medizinische Anwendungen dar [Yamagata et al., 1998]. So eignen sich Porphyryne als Katalysatoren für chemische Reaktionen, wie z.B. Fe-Porphyrin für die Olefin-Epoxidierung mit Iodosylbenzol [Groves and Nemo, 1983]. Bedeutend ist auch die Anwendung von Porphyrynen für die Photodynamische Tumorthherapie (PDT). Bei der PDT werden Photosensibilisatoren wie z.B. Porphyrin, Porphyrinderivate (Protoporphyrin IX) oder die Vorstufe  $\delta$ -ALA verwendet, die spezifisch von den Tumorzellen aufgenommen werden und sich dadurch im Tumorgewebe anreichern. Durch eine nachfolgende Lichteinstrahlung erfolgt die Bildung von Singulett-Sauerstoff aus im Gewebe vorhandenen Sauerstoff, wodurch das Tumorgewebe zerstört wird [Ackroyd et al., 2001; Klyashchitsky et al., 1994]. Da die Lichtpenetration durch Gewebe umso größer ist, je höher die Wellenlänge des Lichts ist, kommt Infrarot/nahes Infrarotlicht bei der PDT zur Anwendung. Aus diesem Grund ist die Photodynamische Tumorthherapie nur für bestimmte Tumorarten im Frühstadium anwendbar, wie z.B. Hauttumore oder endoskopisch zugängliche Tumore [Plaetzer et al., 2005]. Weiterhin wird die Photodynamische Therapie in der Augenheilkunde für die Behandlung von Gefäßneubildungen unter der Netzhaut (chorioidalen Neovaskularisationen) eingesetzt [Azab et al., 2005].

Photosensibilisatoren können auch zur Tumordiagnose eingesetzt werden, wo die fluoreszenten Eigenschaften des eingesetzten Photosensibilisators im Tumorgewebe zur Bildgebung genutzt wird.  $\delta$ -ALA wird z.B. beim Urothelialkarzinom verwendet [Inoue et al., 2009; Denziger and Burger, 2008; Fritsch et al., 1998].

Ein weiteres interessantes Produkt ist Vitamin B<sub>12</sub> (Cobalamin), das sich von Uroporphyrinogen III, einer Vorstufe von Protoporphyrin IX, ableitet. Strukturell weist Vitamin B<sub>12</sub> keine Porphyrin-Ringstruktur auf, sondern ein Corrin-System, dessen Zentralion ein Cobalt-Ion (Co<sup>+</sup>) ist (vgl. a. Abschn. 1.15). In der Medizin wird Vitamin B<sub>12</sub> zur Behandlung von Anämien und Neuritis bei Vitamin B<sub>12</sub>-Mangel (perniziöse Anämie bei Fehlen des *intrinsic factor*) eingesetzt. Darüber hinaus findet Vitamin B<sub>12</sub> Anwendung in Cremes gegen Schuppenflechte und Neurodermitis [Sasaki et al., 2005].

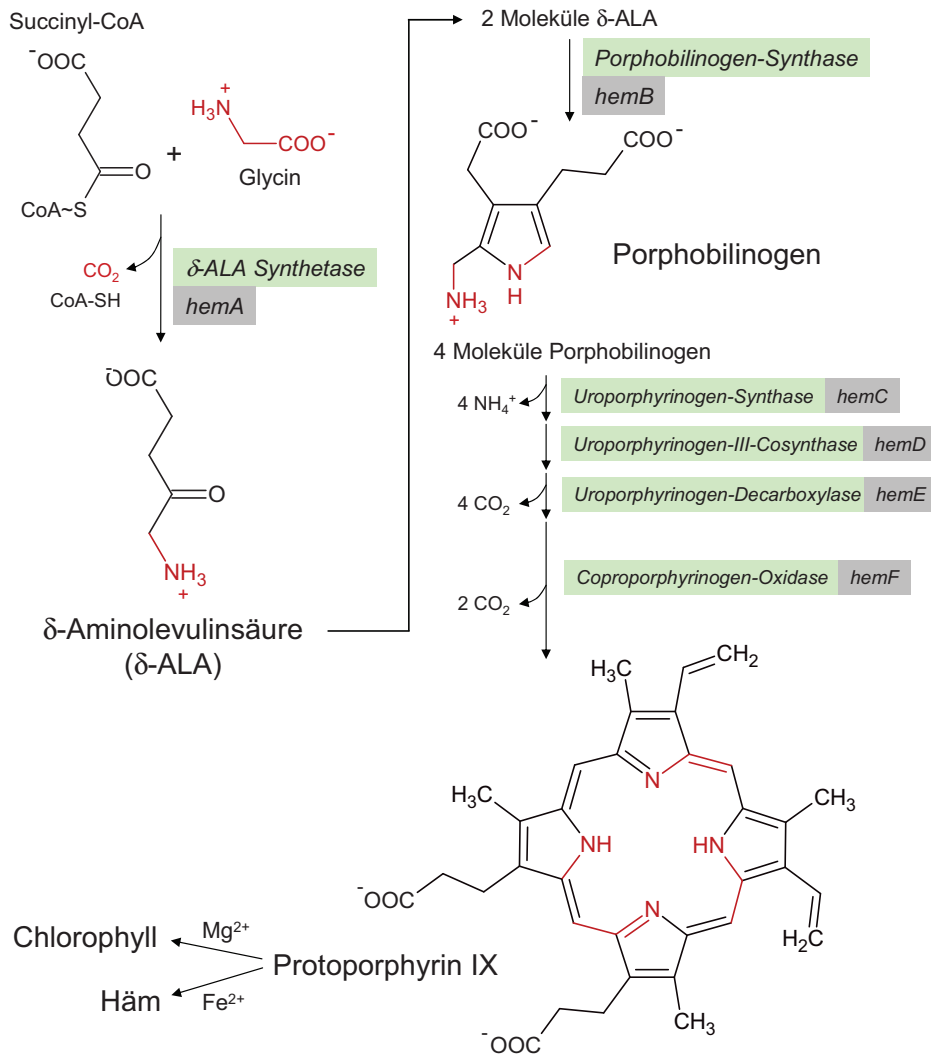
Es sind eine Reihe, zum Teil genetisch bedingter, Erkrankungen bekannt, die durch die Akkumulation von Vorstufen der Hämbiosynthese gekennzeichnet sind. Je nachdem welches Enzym der Hämbiosynthese betroffen ist, reichern sich verschiedene Porphyrin-Strukturen in den Organen an und führen zu den entsprechenden Symptomen. Durch einen verminderten Einbau von Eisen (verminderte Aktivität der Ferrochelatase) reichert sich bei der Erythropoetischen Protoporphyrurie der Vorläuferstoff Protoporphyrin IX im Gewebe und in der Haut an, das zu schmerzhaften Symptomen gegenüber (Sonnen)licht führt [Todd, 1994].

### Biosynthese von Protoporphyrin IX in *R. rubrum*

Die Biosynthese der Vorstufe Protoporphyrin IX erfolgt in *R. rubrum* aus dem Precursor Succinyl-CoA des zentralen Kohlenstoffwechsels. Das Enzym  $\delta$ -Aminolävulin-Synthetase ( $\delta$ -ALA-Synthetase) bildet aus Glycin und Succinyl-CoA  $\delta$ -Aminolävulinsäure [Jones, 1978; Shemin and Kikuchi, 1958; Shemin and Russel, 1953]. Die Regulation der  $\delta$ -ALA-Synthetase wurde in *Rb. sphaeroides* untersucht, wo ein starker Anstieg der spezifischen Aktivität der  $\delta$ -ALA-Synthetase bei Adaptation von aeroben auf anaeroben Bedingungen zu beobachten war. Bei anschließender Begasung mit Sauerstoff verminderte sich die Aktivität wieder. Darüber hinaus findet eine *feedback*-Inhibierung durch Protohäm, Polysulfide und durch ATP statt [Burnham and Lascelles, 1963]. Für *Rb. capsulatus* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die  $\delta$ -ALA-Synthetase durch Sauerstoff reguliert wird. In Anwesenheit von Sauerstoff ist die Akkumulation von Protoporphyrin in einem *bchH*-defizienten Stamm auch in Anwesenheit von extrazellulären  $\delta$ -ALA gehemmt, das darauf hindeutet, dass die  $\delta$ -ALA-Synthetase in Anwesenheit von Sauerstoff inhibiert ist [Biel, 1992].

Anschließend werden 2 Moleküle  $\delta$ -Aminolävulinsäure durch die Porphobilinogen-Synthase (*hemB*) zu Porphobilinogen umgewandelt. In *Rb. capsulatus* konnten Biel et al. [2002] zeigen, dass auch die intrazelluläre Konzentration an Porphobilinogen durch Sauerstoff reguliert wird. Jedoch findet keine transkriptionelle Inhibierung von *hemB* oder *feedback*-Inhibierung der Porphobilinogen-Synthase durch Sauerstoff oder Protoporphyrin IX statt. Vielmehr führt die Existenz der NADPH-abhängigen  $\delta$ -ALA-Dehydrogenase zu ei-

ner Konkurrenzsituation um das vorhandene  $\delta$ -ALA. Die  $\delta$ -ALA-Dehydrogenase reduziert  $\delta$ -ALA zu  $\delta$ -Amino- $\gamma$ -Hydroxyvalerat, das über mehrere nachfolgende Reaktionen zu  $\alpha$ -KG und Glutamat umgewandelt werden kann. In *Rb. capsulatus* wurden unter aeroben Bedingungen sehr viel höhere  $\delta$ -ALA-Dehydrogenase-Aktivitäten gefunden als unter phototroph, anaeroben Bedingungen.  $\delta$ -ALA stellt somit einen Zweigpunkt der Tetrapyrrol-Biosynthese dar, an dem der Kohlenstofffluss in Abhängigkeit der Sauerstoffbedingungen reguliert werden kann. Die Aktivität der  $\delta$ -ALA-Dehydrogenase konnte für *R. rubrum* ebenfalls gezeigt werden [Shigesada, 1972].



**Abb. 1.14:** Biosynthese von Protoporphyrin IX aus Succinyl-CoA und Glycin in *R. rubrum*. Rot gekennzeichnet ist die Transition des Glycin innerhalb des Protoporphyrin IX-Biosyntheseweges.

Die Uroporphyrinogen-Synthase (*hemC*) und Uroporphyrinogen-III-Cosynthase (*hemD*) bilden unter Ammoniumabspaltung Uroporphyrinogen III. Zwei nachfolgende Decarboxylierungs-Schritte durch die Uroporphyrinogen-Decarboxylase und -Oxidase bilden unter Abspaltung von insgesamt 6 Molekülen  $\text{CO}_2$  Protoporphyrin IX. Ausgehend von Protopor-



phyrin IX erfolgt die Biosynthese von (Bacterio)chlorophyll bzw. Häm (vgl.a. Abb. 1.14).

### Biosynthese von Bacteriochlorophyll a in *R. rubrum*

Chlorophylle werden in der Lebensmittelindustrie verwendet und sind, im Gegensatz zu Grün S (Triphenylmethanfarbstoff), natürliche Farbstoffe. Darüber hinaus können Chlorophylle aufgrund ihrer Porphyrinstruktur als Photosensibilisatoren eingesetzt werden [Urakami and Yoshida, 1993; Henderson et al., 1991].

Die Biosynthese von Bacteriochlorophyll a verläuft über mehrere Zwischenstufen, die für *R. rubrum* noch nicht alle vollständig charakterisiert sind. In *Chlorella* tritt Magnesium-Protoporphyrin-Monomethylester (Mg-PPIXMe), das über Magnesium-Protoporphyrin IX (Mg-PPIX) gebildet wird, als Zwischenprodukte auf [Granick, 1961]. Der Wildtyp *Rb. sphaeroides* scheidet unter normalen phototrophen Wachstumsbedingungen Mg-PPIXMe in das extrazelluläre Medium aus. Durch einen Mangel an Eisen wird verstärkt Mg-PPIXMe ins Medium abgegeben [Jones, 1963]. Auch für *Rb. capsulatus* wurde die Fe-abhängige Ausscheidung von Mg-PPIXMe beobachtet [Cooper, 1963].

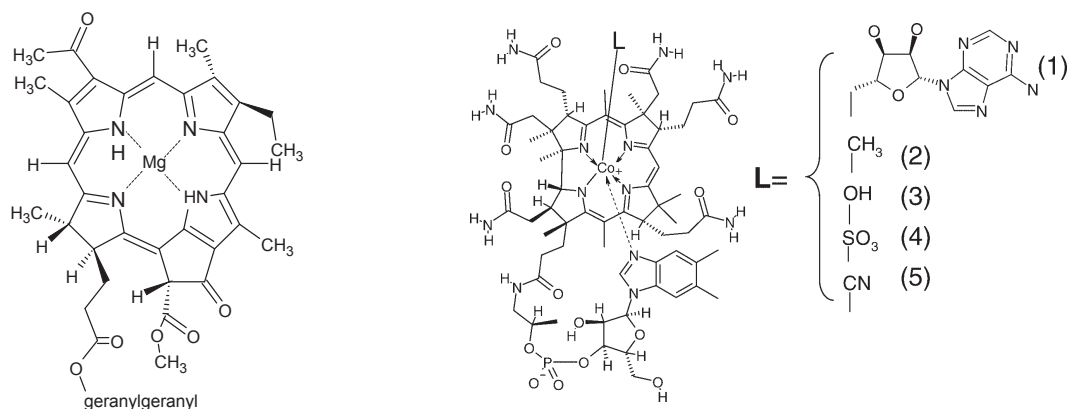
Der erste Schritt der Bacteriochlorophyll a-Biosynthese bildet den Einbau von  $Mg^{2+}$  in Protoporphyrin IX durch die Mg-PPIX-Chelatase (*bchIDH*). Durch die Reaktion entsteht Magnesium-Protoporphyrin IX (Mg-PPIX). Der zweite Schritt ist die Veresterung der Carboxylgruppe der Propionyl-Seitenkette (C-13) von Mg-PPIX, wodurch Mg-PPIXMe gebildet wird. Die Reaktion wird durch die S-Adenosylmethionin(SAM)-Mg-PPIX-Methyltransferase (*bchM*) katalysiert, welche SAM zur Übertragung der Methylgruppe nutzt. Es wird angenommen, dass beide Enzyme in einem Multienzymkomplex organisiert sind. Die Existenz beider Enzyme wurde für *Rb. capsulatus* [Bollivar et al., 1994] und für *Rb. sphaeroides* [Gorchein et al., 1993] gezeigt.

Anschließend erfolgt die Bildung des isozyklischen Rings an der 13-Methylpropionat-Seitenkette des Mg-PPIXMe. Verantwortlich für diese komplexe Reaktion ist die Magnesium-Protoporphyrin IX Monomethylester Cyclase (Mg-PPIXMe-C) (*bchE*). Unter Hydroxylierung und Oxidation erfolgt die Ligation einer neu gebildeten 13-oxo-Methylpropionat-Seitenkette an das C-15-Brückenatom des Mg-PPIXMe unter Ringschluss zwischen den Pyrrol-Ringen C und D [Bollivar and Beale, 1996]. Die gebildete Struktur heißt [3,8-Divinyl]-Protochlorophyllid (PChlid) a. In höheren Pflanzen erfolgt die Bildung der Carbonyl-Gruppe durch molekularen Sauerstoff, in den anoxygenen Bakterien dagegen aus einem Wassermolekül unter Bildung von NADPH. In *Rb. capsulatus* konnte gezeigt werden, dass die Reaktion Vitamin B<sub>12</sub>-abhängig ist [Gough et al., 2000]. In *R. rubrum* wurde ebenfalls die Existenz der Mg-PPIXMe-C nachgewiesen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass für die Biosynthese des unteren Liganden des Vitamin B<sub>12</sub> (5,6-Dimethylbenzimidazol) das Protein Blu B benötigt wird. In Blu B-defizienten Stämmen konnte

kein Ringschluss zur Bildung von PChlid a und kein Wachstum unter anoxygenen photosynthetischen Bedingungen mehr erfolgen. Die Supplementation von DMB oder Vitamin B<sub>12</sub> konnte den Effekt beheben, so dass davon ausgegangen werden kann, dass auch in *R. rubrum* die Mg-PPIXMe-C Vitamin B<sub>12</sub>-abhängig ist [Gray and Escalante-Semerena, 2007].

Anschließend erfolgt die Reduktion der 8-Vinyl-Gruppe zu einer 8-Ethylgruppe unter Verbrauch von NADPH. Katalysiert wird die Reaktion durch die 8-Vinyl-Reduktase (*bchJ*) und führt zur Bildung von 3-Vinyl-4-ethyl-PChlid a. Ein weiterer Reduktionsschritt ist nötig, um aus PChlid a Chlorophyllid a zu bilden. Im Gegensatz zu höheren Pflanzen (in der Regel Angiospermen), die Chlorophyll a und b nur in Anwesenheit von Licht synthetisieren, bilden photosynthetische Bakterien, Algen oder Gymnospermen Chlorophyll a auf einem Licht-unabhängigen Weg aus. Katalysiert wird diese Reaktion von der DPOR (dunkel-aktive Pchlido-Oxidoreduktase). Für *Rb. capsulatus* konnte gezeigt werden, dass die DPOR aus 3 Untereinheiten besteht, die durch die Gene *bchl*, *bchN* und *bchB* codiert werden. Überraschend zeigten die Aminosäure-Sequenzen der daraus abzuleitenden Proteine große Ähnlichkeiten zu den Untereinheiten der Nitrogenase (NifH, NifD und NifK). Das könnte darauf hin deuten, dass ähnlich der Nitrogenase (s.a. Abschn. 1.3.5) reduziertes Ferredoxin in einer ATP-abhängigen Reaktion als Elektronendonator fungiert [Fujita and Bauer, 2000].

Eine Veresterung stellt den letzten Schritt der Bacteriochlorophyll-Biosynthese dar. Es konnte nachgewiesen werden, dass in *R. rubrum* im Gegensatz zu *Rb. sphaeroides* eine Veresterung mit *all-trans*-Geranylgeraniol stattfindet (Bchl a<sub>Gg</sub>) und nur in geringen Mengen Bchl a<sub>P</sub> (Phytol-Veresterung) gebildet wird. Bchl a<sub>P</sub> stellt das Hauptbacteriochlorophyll in *Rb. sphaeroides* und *C. vinosum* dar [Brockmann et al., 1973]. In Abb. 1.15 ist die Struktur des Bacteriochlorophyll a<sub>Gg</sub> und Vitamin B<sub>12</sub> aus *R. rubrum zu sehen.*



**Abb. 1.15:** Strukturformel von Bacteriochlorophyll a<sub>Gg</sub> (links) und Vitamin B<sub>12</sub> (rechts) in *R. rubrum*. Vitamin B<sub>12</sub> aus [Watanabe, 2007].

### 1.3.3 Biosynthese von Coenzym Q<sub>10</sub>

Das auch als Ubiquinon bezeichnete Coenzym Q<sub>10</sub> stellt nicht nur für die Biotechnologie ein interessantes Produkt dar, es ist auch essenziell für den respiratorischen und photosynthetischen Elektronentransport [Imhoff, 1984]. Neben Q<sub>10</sub> sind Q<sub>6</sub>, Q<sub>7</sub>, Q<sub>8</sub> und Q<sub>9</sub> unter Bakterien verbreitete, wobei sich die Ziffer auf die Länge der Polyisoprenoid-Seitenkette bezieht, welche sich in Stellung 6 am Benzol-Ring befindet (s.a. Abb.1.16).

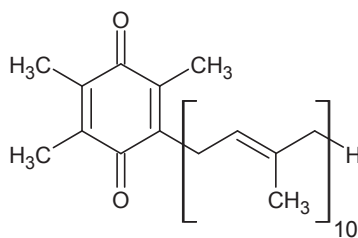


Abb. 1.16: Strukturformel von Coenzym Q<sub>10</sub>.

Die Biosynthese von Q<sub>10</sub> in *R. rubrum* umfasst eine Reihe von verschiedenen, komplexen Reaktionen, auf die an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden soll. Im Gegensatz zu anderen Bakterien erfolgt die Biosynthese des Benzolrings nicht ausgehend von Tyrosin, sondern direkt von *p*-Hydroxybenzoat, das entweder als Bestandteil des Nährmediums metabolisiert wird oder aus PEP und Erythrose-4-phosphat über den Shikimatweg synthetisiert wird. Untersuchungen haben gezeigt, dass weder D,L-Tyrosin-3-<sup>14</sup>C, noch Shikimat-<sup>14</sup>C in das Q<sub>10</sub> von *R. rubrum* eingebaut werden. Hingegen konnte gezeigt werden, dass komplett <sup>14</sup>C-markiertes *p*-Hydroxybenzaldehyd und *p*-Hydroxybenzoat in wachsenden Zellen in Q<sub>10</sub> und Rhodoquinon eingebaut werden [Parson and Rudney, 1965]. Das Enzym *p*-Hydroxybenzoat-Polyprenylpyrophosphat-Transferase katalysiert schließlich die Bildung von Polyprenyl-4-hydroxybenzoat.

Coenzym Q<sub>10</sub> wird im medizinischen Bereich eingesetzt bei der Behandlung von kongestiver Herzinsuffizienz bzw. Herzversagen. Dabei kommt die essenzielle Rolle von Q<sub>10</sub> bei der ATP-Generierung zum Tragen. Darüber hinaus findet Q<sub>10</sub> als Supplement in Statinen Einsatz. Dem bei der Einnahme von Statinen als Cholesterinsenker auftretende Q<sub>10</sub>-Mangel wird so entgegengewirkt [Mortensen et al., 1989]. Als antioxidative Substanz wird Q<sub>10</sub> eingesetzt, um z.B. den LDL-Cholesteringehalt im Blut zu senken. Auch als Additiv in Kosmetika wird Q<sub>10</sub> verwendet [Hoppe et al., 1999].

Für Q<sub>10</sub> ist eine stereoselektiver chemischer Syntheseprozess etabliert. Eine Ausbeute von nur 26 % bei hoher Stereoselektivität (98 %) und 9 einzelne Schritte fordern jedoch Optimierung und Verbesserung [Negishi et al., 2002].

### 1.3.4 Biosynthese von Polyhydroxybutyrat

Bereits seit 1989 ist die Bildung von Polyester-Speicherstoffen in Form von Poly- $\beta$ -hydroxybutyrat (PHB) (s.a. Abb. 1.17) in *R. rubrum* bekannt [Anderson and Dawes, 1990; Brandl et al., 1989]. Die Umwandlung von Kohlenstoff-Substraten in PHB kann durch Limitation von Stickstoff, Sulfat, Phosphat, Kalium oder Magnesium und gleichzeitigem Überangebot des Kohlenstoff-Substrats erfolgen [Trotsenko and Belova, 2000].

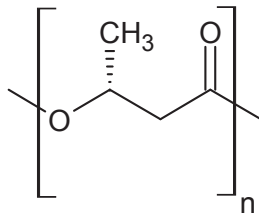


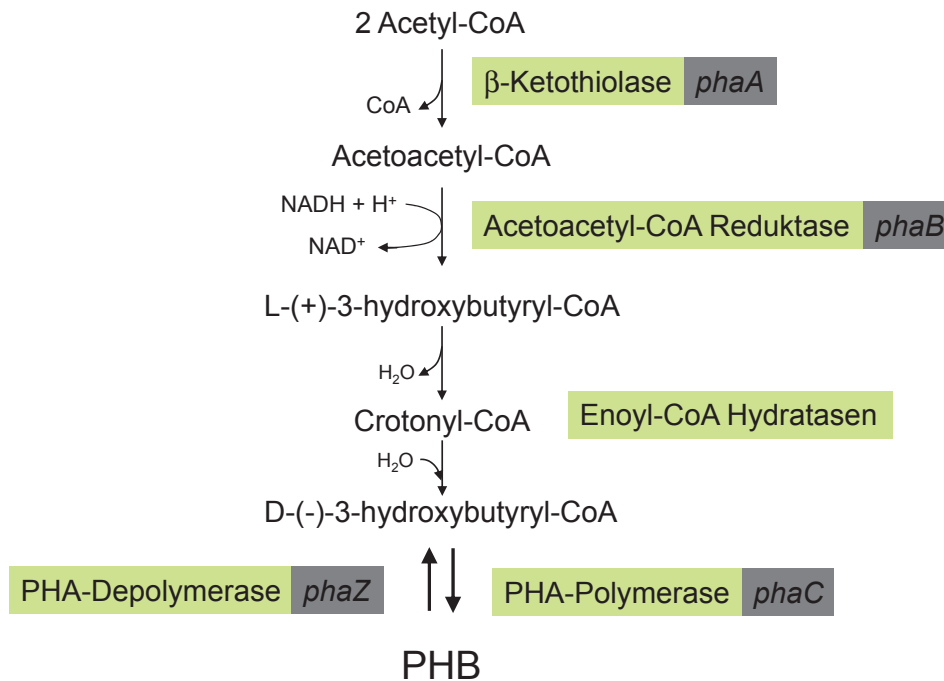
Abb. 1.17: Strukturformel von PHB mit  $n$ -Kettenlängen.

Der Biosyntheseweg von PHB in *R. rubrum* ist in Abb. 1.18 ersichtlich. Ausgehend von 2 Molekülen Acetyl-CoA wird durch die  $\beta$ -Ketothiolase Acetoacetyl-CoA gebildet. Anschließend erfolgt in einem reduktiven Schritt unter NADH-Verbrauch die Bildung des L-(-)-Enantiomers von 3-Hydroxybutyryl-CoA. Durch eine stereospezifisch arbeitende Enoyl-CoA Hydratase wird L-(-)-3-Hydroxybutyryl-CoA mit H<sub>2</sub>O zu Crotonyl-CoA umgewandelt. Eine zweite stereospezifische Enoyl-CoA Hydratase bildet aus Crotonyl-CoA D-(+)-3-hydroxybutyryl-CoA, das durch die PHB-Polymerase zu Polyhydroxybutyrat polymerisiert wird. Über eine PHB-Depolymerase existiert neben dem Aufbau auch der Abbau von PHB. Der Abbau wird zumeist durch das Beheben der Limitation initiiert, welche die PHB-Akkumulation hervorgerufen hat [Moskowitz and Merrick, 1969].

Bei Ramana and Sasikala [1995a] wird der PHB-Gehalt in *R. rubrum* unter photoheterotrophen Bedingungen auf Acetat als C-Quelle mit maximal 41,2 % (g PHB pro g Biotrockenmasse) angegeben. Dabei besteht das Biopolymer zu 95,8 % aus 3-Hydroxybutyrat und 4,2 % aus 3-Hydroxyvalerat.

Eine entscheidende Rolle zur Bildung von PHB in *R. rubrum* hat die C-Quelle. So führt unter photoheterotrophen Bedingungen Acetat, D,L- $\beta$ -hydroxybutyrat und  $n$ -Butyrat zu einem PHB-Gehalt zwischen 21-23 %. Die Substrate Pyruvat, D,L-Malat, Succinat und Propionat dagegen nur bis maximal 3 %. Die zuletzt genannten Substrate führen bei ihrer Assimilation zur Bildung von Reduktionsäquivalenten und können direkt durch gluconeogenetische Schritte zu Polysacchariden (wie z.B. Glycogen) umgewandelt werden [Stanier et al., 1959].

Eine Glucose-verwertende Mutante von *Ralstonia eutropha* produziert mit bis zu 80 % die höchsten PHB-Mengen [Trotsenko and Belova, 2000]. Die PHB-Bildung wird in

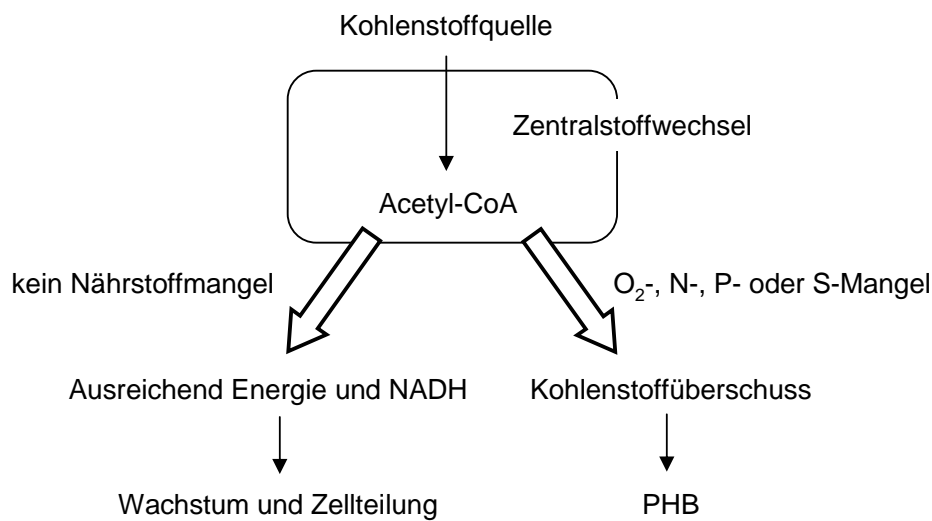


**Abb. 1.18:** Biosynthese von PHB in *R. rubrum*. Modifiziert nach [Moskowitz and Merrick, 1969].

*R. eutropha* und vermutlich einer Reihe weiterer PHB-akkumulierender Bakterien durch eine Regulation der  $\beta$ -Ketothiolase, Pyruvat-Dehydrogenase und Citratsynthase, welche Acetyl-CoA als Substrat oder Produkt haben, bewerkstelligt. Alle 3 Enzyme werden in *R. eutropha* konstitutiv exprimiert und sind deshalb unabhängig vom physiologischen Zustand der Zellen vorhanden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass keine transkriptionelle oder translationelle Regulation der PHB-Bildung vorliegt [Mansfield et al., 1995; Haywood et al., 1988a,b].

Bisher am besten untersucht ist die Regulation der PHB-Bildung in *Azotobacter beijerinckii*. In *Azotobacter beijerinckii* hat Sauerstoff einen großen Einfluss auf die intrazelluläre PHB-Akkumulation. Durch Sauerstoffmangel erhöht sich das intrazelluläre  $\frac{\text{NADH}}{\text{NAD}^+}$ -Verhältnis, wodurch die Enzyme des TCA-Zyklus, Citratsynthase und Isocitrat-Dehydrogenase, inhibiert werden. Das führt dazu, dass Acetyl-CoA nicht mehr über den TCA-Zyklus verstoffwechselt werden kann, sondern stattdessen in die PHB-Biosynthese eingehen kann und zu einer gesteigerten PHB-Akkumulation führt [Trotsenko and Belova, 2000; Anderson and Dawes, 1990; Senior and Dawes, 1973].

Zellwachstum und PHB-Bildung stellen konkurrierende Prozesse um Acetyl-CoA dar. Steht der Zelle ausreichend Energie in Form von ATP zur Verfügung, werden Zellwachstum und -teilung die dominierenden Prozesse sein. Acetyl-CoA wird in diesem Fall oxidativ über den TCA-Zyklus verstoffwechselt. Ist die Bildung von ATP aufgrund eines Nährstoffmangels nur unzureichend möglich, tritt ein Energiemangel und Änderung des intrazellulären Dinukleotid-Redoxstatus ein. Infolgedessen dieses Mangels ist kein Wachs-



**Abb. 1.19:** Regulation und Kontrolle der Energieproduktion, Wachstum und PHB-Bildung in *R. rubrum*. Modifiziert nach [Fuller, 1995].

tum möglich ist und die Bildung von PHB wird favorisiert [Fuller, 1995]. Die Zusammenhänge der PHB-Regulation für *R. rubrum* sind noch einmal in Abb. 1.19 schematisch zusammengefasst.

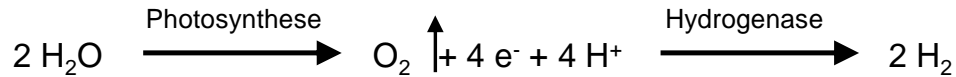
### 1.3.5 Bildung von molekularem Wasserstoff

Molekularer Wasserstoff ist aufgrund der Begrenztheit fossiler Brennstoffe ein interessanter Treibstoff, der z.B. in Brennstoffzellen, Verbrennungsmotoren oder Gasturbinen zum Einsatz kommen kann. Hinzu kommt, dass bei der Verbrennung von Wasserstoff kein CO<sub>2</sub> freigesetzt wird, womit der fortschreitenden Erderwärmung durch den Treibhauseffekt Rechnung getragen werden würde.

Die industrielle Herstellung von Wasserstoff erfolgt hauptsächlich aus Kohlenwasserstoffen. Insbesondere werden Erdgas und Erdöl genutzt, aber auch Kohle, Methan und Biomasse kommen zur Anwendung. Ca. 90 % des molekularen Wasserstoffs werden durch Steam-Reforming gewonnen; ein technisches Verfahren, das sehr hohe Temperaturen von 800-1100 °C und extreme Drücke von 1-40 bar erfordert. In der Wassergas-Shift-Reaktion wird Synthesegas gebildet, das für wichtige Syntheseverfahren wie Methanolsynthese, Ammoniaksynthese, Fischer-Tropsch-Synthese verwendet wird [Borgschulte et al., 2008].

Gegenüber thermischen oder elektrochemischen Verfahren weist die biologische Wasserstoffproduktion mehrere Vorteile auf. So findet die Herstellung unter sehr milden Reaktionsbedingungen statt, bei Raumtemperatur oder 30 °C und bei Umgebungsdruck. Bei der photobiologischen Wasserstofferzeugung mit Hilfe von Grünalgen oder Cyanobakterien kann die Wasserstofferzeugung aus den natürlichen Ressourcen Sonnenlicht und Wasser erfolgen. Der so gewonnene Wasserstoff ist reiner als der aus Vergasungsverfahren er-

zeugte  $H_2$  und enthält weniger  $H_2S$ , Alkalien und Staub [Happe and Müller, 2004]. Für die photobiologische Wasserstofferzeugung kommt sehr oft die Mikroalge *Chlamydomonas reinhardtii* zum Einsatz.



**Abb. 1.20:** Reaktionsgleichung für die Bildung von molekularem Wasserstoff  $H_2$  in Grünalgen und Cyanobakterien.

Der bei der Photosynthese dieser Grünalgen entstehende Sauerstoff (s.a. Abb. 1.20) stellt allerdings ein Problem für die großtechnische Anwendung dieses System dar. Die  $H_2$ -bildenden Hydrogenasen sind  $O_2$ -empfindlich, was unter anhaltender  $O_2$ -Bildung zu einem raschen Aktivitätsverlust und Wiederaufnahme des gebildeten  $H_2$  führt. Diesem Problem kann durch eine zeitliche Trennung der photosynthetischen  $O_2$ -Bildung und  $H_2$ -Bildung durch Schwefel-Mangel entgegen getreten werden. Unter Schwefel-Mangel ist ein Rückgang der Photosyntheserate zu verzeichnen, wodurch weniger  $O_2$  gebildet wird. Fällt die Photosyntheserate unter die Respirationsrate wird die Algenkultur anaerob und die  $H_2$ -Bildung durch die Hydrogenase setzt ein. Der Mechanismus dient der Alge zur Aufrechterhaltung der ATP-Produktion unter Stressbedingungen. Nachteilig wirkt sich diese Prozessführung auf die Biomassebildung aus. Die Zellen sterben zum Teil unter Schwefellimitation, so dass die  $H_2$ -Produktion nur über einen begrenzten Zeitraum erfolgen kann [Kosourov et al., 2007; Melis and Happe, 2001].

Eine zweite Möglichkeit ist die Nutzung phototropher Bakterien für die biologische  $H_2$ -Erzeugung unter Einsatz von organischen Substraten, die z.B. aus der Abwasseraufarbeitung stammen können. Die Elektronen für die  $H_2$ -Bildung stammen aus den jeweiligen Kohlenhydraten und werden über Ferredoxin und Nitrogenasereaktion zu  $H_2$  umgewandelt.

Eine dritte Möglichkeit ist die fermentative Erzeugung von  $H_2$  durch Gärungsprozesse, welche unabhängig von Licht stattfinden. Diese biotechnologischen Prozesse beschränken sich daher nicht auf photosynthetisch-aktive Mikroorganismen. Die Vorteile fermentativer Verfahren liegen in höheren  $H_2$ -Bildungsraten und konstanten Produktivitäten aus organischen Substraten unabhängig von der Tageszeit [Das and Veziroğlu, 2001]. Auch *R. rubrum* ist in der Lage, mit Fructose als C-Quelle unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln zu gären und dabei  $H_2$  zu produzieren [Schultz and Weaver, 1982].

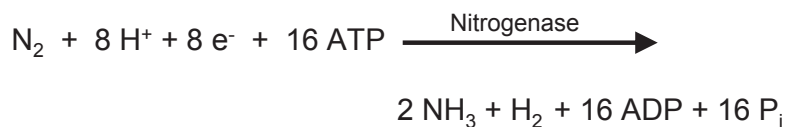
### $H_2$ -bildende Enzyme in *R. rubrum*

In *R. rubrum* gibt es verschiedene Enzyme, die in der Lage sind  $H_2$  zu bilden: Hydrogenasen, der Nitrogenasekomplex, die CO-Dehydrogenase und das System aus Pyruvat-

Formiat-Lyase (PFL) und Formiat-Wasserstoff-Lyase (FHL).

Bei Maness and Weaver [2001] werden drei verschiedene Hydrogenasen aus *R. rubrum* beschrieben. Eine Hydrogenase für H<sub>2</sub>-Aufnahme (Hup), deren Aktivität maximal unter photoautotrophen Bedingungen im Licht ist. Eine Formiat-gekoppelte Hydrogenase, welche primär im Dunkeln aktiv ist. Und eine CO-gekoppelte Hydrogenase, die durch CO induziert wird. Abhängig von den Bedingungen können die Hydrogenasen einzeln oder zusammen exprimiert werden. Allgemein katalysieren Hydrogenasen die Bildung von H<sub>2</sub> aus 2 e<sup>-</sup> und 2 H<sup>+</sup> stets reversible und sind in vielen Bakterien und Algen vorhanden. Die Existenz verschiedener Hydrogenasen erlaubt eine hohe Flexibilität und Anpassung an die jeweilige Umweltbedingung.

Der Nitrogenasekomplex katalysiert in *R. rubrum* die Reduktion von molekularem N<sub>2</sub> zu Ammoniak [Kamen and Gest, 1949]. In einer Nebenreaktion entsteht molekularer Wasserstoff. Ein hoher Energiebeitrag muss in Form von 16 ATP bereitgestellt werden sowie Protonen in Form von 8 H<sup>+</sup>. Da die Reaktion der Nitrogenase so energieaufwendig ist, wird ihre Aktivität strikt reguliert. Die Gesamtgleichung der Nitrogenasereaktion ist in Abb. 1.21 dargestellt.



**Abb. 1.21:** Reaktionsgleichung für die Nitrogenase-Reaktion in *R. rubrum*.

Eine Reihe von Effektoren zur Regulierung sind bekannt. In Anwesenheit von Ammonium, Glutamin und Asparagin erfolgt eine reversible Inhibierung der Nitrogenase, sowohl unter anaerob, phototrophen als auch unter aeroben Bedingungen im Dunkeln [Schultz et al., 1985; Kanemoto and Ludden, 1984]. Dieser Vorgang wird als Nitrogenase-*switch-off* bezeichnet. Wohingegen Glutamat in Kombination mit organischen Säuren wie L-Malat eine Expression und Aktivität der Nitrogenase erlaubt [Hoover and Ludden, 1984]. Wie die Hydrogenasen ist auch das Nitrogenase System O<sub>2</sub>-empfindlich. Bereits in geringen Mengen Sauerstoff findet eine Inhibierung statt. Darüber hinaus ist auch Licht ein Effektor für die Aktivität der Nitrogenase; im Dunkeln findet eine Inhibierung statt, im Licht ist die Nitrogenase aktiv [Kanemoto and Ludden, 1984; Schick, 1971]. Weiterhin haben Entkoppler der Atmungskette wie CCCP (Carbonylcyanid-*m*-chlorophenylhydrazon) oder Phenazinmethosulfat einen negativen Effekt auf die Aktivität der Nitrogenase, da hier die Bildung von ATP unterbunden wird und die für die Reaktion benötigten hohen Mengen ATP nicht bereitgestellt werden können.

Auf molekularer Ebene erfolgt der *switch-off* der Nitrogenase durch eine reversible ADP-Ribosylierung der Dinitrogenase Reduktase. Die Modifikation wird von DRAT (Di-



nitrogenase Reduktase ADP-ribosyltransferase, *draT*) katalysiert und führt zur Inaktivierung. Das Enzym DRAG (Dinitrogenase Reduktase-aktivierende Glycohydrolase, *draG*) aktiviert die Nitrogenase wenn die Inhibitoren nicht mehr vorhanden sind [Ludden and Roberts, 1989].

Uffen [1984] beschrieb die CO-Dehydrogenase für *R. rubrum*. Die CO-Dehydrogenase ist ein Nickel-Eisen-Schwefel-Enzym, welche die reversible Oxidation von CO zu CO<sub>2</sub> unter Wasserstoffbildung katalysiert. Dabei wurde Wasserstoff nur in Anwesenheit von CO produziert [Heo et al., 2001].

Unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln sind die Enzyme Pyruvat-Formiat-Lyase und Formiat-Wasserstoff-Lyase für die H<sub>2</sub>-Bildung in *R. rubrum* verantwortlich. Die PFL setzt Pyruvat, das aus dem anaeroben Fructoseabbau gebildet wird, zu Acetyl-CoA und Formiat um. Das pH-Optimum liegt bei 7,3 bis 7,5. Anschließend spaltet die FHL Formiat zu H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> [Voelskow and Schön, 1981; Gorrell and Uffen, 1977; Schön and Voelskow, 1976].

### 1.3.6 Bildung von organischen Säuren

*R. rubrum* ist in der Lage unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln organische Säuren im Zuge einer gemischten Säuregärung mit Fructose als C-Substrat zu bilden. Als Produkte werden Succinat, Acetat, Propionat, Formiat, H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> gebildet. Im Gegensatz dazu bildet *Rb. capsulatus* kein Propionat, dafür aber Lactat. In Anwesenheit geeigneter nicht-natürlicher e<sup>-</sup>-Akzeptoren (Dimethylsulfoxid oder Trimethylaminoxid) können anaerob jedoch auch nicht-fermentierbare Substrate wie Succinat, Malat oder Acetat verwertet werden [Schultz and Weaver, 1982].

Schultz and Weaver [1982] untersuchten das Wachstum von *R. rubrum* unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln. Verdopplungszeiten von 24 h konnten mit Fructose erzielt werden. Optimale Bedingungen zur Fermentation wurden für *R. rubrum* mit 11 mM Fructose, 0,05 % Bicarbonat und mit einem pH = 7,2 erreicht. Die Zucker Glucose, Sucrose, Ribose und Xylose können von *R. rubrum* nicht fermentiert werden. Schultz and Weaver [1982] beschreiben, ähnlich wie Uffen et al. [1971] für Pyruvat als C-Quelle, eine deutliche Abnahme der Pigmentierung und der Konzentration an Bacteriochlorophyll a nach einer Langzeitkultivierung unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln mit Fructose (100 h). Diese Abnahme ist durch die Bildung von mutierten Stämmen von *R. rubrum* begründet, welche eine orange-Färbung aufweisen, das auf einen hohen Gehalt an Cytochromen hindeutet. Auf den genauen Mechanismus für die Entstehung der Mutanten wurde nicht eingegangen. Ebenso sind keine Informationen über Ausscheideraten, Ausbeuten oder Konzentrationen der einzelnen organischen Säuren in *R. rubrum* vorhanden.

Bernsteinsäure (Succinat) hat vielfältige Anwendungen in der chemischen, pharmazeutischen sowie landwirtschaftlichen Industrie. Darüber hinaus fixieren eine Reihe von Bakterien für die Biosynthese von Succinat  $\text{CO}_2$ , das Vorteile hinsichtlich der Verringerung des Treibhauseffektes hätte. In der chemischen Industrie wird Bernsteinsäure für die Herstellung von 1,4-Butandiol, Tetrahydrofuran,  $\gamma$ -Butyrolacton oder Adipinsäure eingesetzt [Zeikus et al., 1999]. Weiterhin wird Bernsteinsäure als Zusatz in Lebensmitteln, als Tensid, Streckmittel für Detergenzien oder als Chelator verwendet [Zhang et al., 2009; Lee et al., 2005; Lin et al., 2005].

## 1.4 Motivation

Das Hauptziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung und Optimierung eines mikrobiellen Produktionsprozesses zur biotechnologischen Nutzung des fakultativ photosynthetisch-aktiven Bakteriums *R. rubrum* im Dunkeln. Im Gegensatz zu Algen und Cyanobakterien könnte somit mit *R. rubrum* auf den Einsatz von Photobioreaktoren und die damit verbundenen Nachteile und Probleme verzichtet werden. Produkte, die mit der Ausbildung photosynthetischer Membranen assoziiert sind, wie zum Beispiel Carotinoide, Bacteriochlorophyll, Porphyrine oder auch Coenzym  $\text{Q}_{10}$  und Membranproteine könnten im industriellen Maßstab in gängigen Bioreaktoren hergestellt werden. Darüber hinaus ist *R. rubrum* in der Lage, weitere interessante Produkte zu produzieren, darunter Polyhydroxybutyrat, molekularer Wasserstoff und organische Säuren (Acetat, Propionat und Succinat).

Im besonderen Maße sollte im Rahmen dieser Arbeit die Zufuhr von Nährstoffen untersucht und festgelegt werden, zum einen für das Erreichen hoher Zelldichten, zum anderen um eine optimale Produktbildung zu gewährleisten. Realisiert werden sollte der Prozess durch eine Entkopplung von Wachstum und Produktbildung innerhalb eines 2-Stufen-Prozesses. An die aerobe Wachstumsphase sollte sich die  $\text{O}_2$ -limitierte Produktionsphase anschließen. Zusätzlich sollten für beide Prozessstufen alle prozessrelevanten Parameter wie beispielsweise  $p\text{O}_2$ , pH-Wert und  $\text{CO}_2$ -Zufuhr aufgezeigt und entsprechend optimiert werden. Abschließend sollte eine Beurteilung potenzieller Produkte im Vergleich zu bereits etablierten mikrobiellen Verfahren erfolgen.

Darüber hinaus sollte ein weiteres Ziel die Untersuchung und Charakterisierung des Zentralstoffwechsels in *R. rubrum* sein. Besonderer Augenmerk lag hier in der Bestimmung von Kohlenstoffflüssen und Aufdeckung eventueller Engpässe zu den einzelnen Produkten. Zudem ist ein besseres Verständnis des Zentralstoffwechsels für eine spätere Stammkonstruktion und -optimierung wichtig. Für eine präzise Stoffflussanalyse sollten konventionelle Methoden der metabolischen Flussanalyse und  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen eingesetzt

werden. Weiterhin sollte auch die intrazelluläre Precursor-Verfügbarkeit für die Produktbildung untersucht werden. Das für *R. rubrum* aufgestellte stöchiometrische Netzwerk mit bekannten metabolischen Reaktionen sollte theoretisch analysiert werden.

Eine besondere Herausforderung stellte die Untersuchung des in *R. rubrum* bis jetzt unvollständig aufgeklärten Acetatstoffwechsels an die Methoden der Metabolomanalyse. *R. rubrum* besitzt Malat-Synthase-Aktivität, jedoch keine Isocitratlyase. Für einen vollständigen Glyoxylat-Weg müssen demnach alternative Wege zur Glyoxylatbildung existieren. Aus diesem Grund sollte die Untersuchung der Acetatassimilation in *R. rubrum* im Rahmen dieser Arbeit erfolgen.

Bis zur Gegenwart sind keine vergleichbaren systematischen und umfangreichen Arbeiten über die Anwendung von *R. rubrum* oder anderen fakultativ photosynthetischen Bakterien für biotechnologische Prozesse im Dunkeln vorhanden. Daher war die Erschließung neuartiger Verfahren zur biotechnologischen Anwendung von photosynthetischen Bakterien eines der wichtigsten Ziele, um das hohe Potenzial dieser Mikroorganismen ohne die Limitationen von Photobioreaktoren zu nutzen. Die Übertragung der für *R. rubrum* entwickelten Prozessstrategien auf weitere fakultativ photosynthetische Bakterien wäre ebenfalls denkbar. Somit sollten diese Arbeiten entscheidende Grundlagen für nachfolgende Projekte mit photosynthetischen Bakterien schaffen und wegbereitend für die künftige Forschung sein.



# 2 Materialien und Methoden

## 2.1 Stämme und Stammhaltung

Die verwendeten Stämme und genetischen Veränderungen sind in Tab. 2.1 aufgelistet. *R. rubrum* Pigment<sup>-</sup> ist ein spontan aufgetretener komplett pigmentloser Stamm, der genetisch bislang nicht charakterisiert wurde. Es kann jedoch aufgrund des Phänotyps vermutet werden, dass bei diesem *R. rubrum* Stamm das *puf*-Operon auf irgendeine Weise nicht mehr vorhanden ist oder nicht richtig transkribiert werden kann. Hessner et al. [1991] haben beschrieben, dass durch die Deletion des *puf*-Operons keine Ausbildung intracytoplasmatischer Membranen erfolgt und damit kein Wachstum unter phototrophen Bedingungen.

Die Lagerung aller Stämme erfolgte in Glycerin-Kryokulturen in M2SF-Medium. Dazu wurden 50 mL des jeweiligen Mediums in 500 mL Schüttelkolben (3 Schikanen) mit einer Kolonie einer LB-Agarplatte des jeweiligen Stammes angeimpft. Nach Erreichen einer optischen Dichte  $A_{660} \approx 5$  wurde 50 mL Glycerin (100 %) zugegeben, die Bakteriensuspension in einzelne 2 mL Kryovials aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

**Tab. 2.1:** Übersicht über die untersuchten Stämme und Referenzen (soweit vorhanden)

Stamm	Referenz
<i>R. rubrum</i> S1	ATCC 11170
<i>R. rubrum</i> SLYC18 ( $\Delta CrtC \Delta CrtD$ )	R. Ghosh, Universität Stuttgart
<i>R. rubrum</i> G-9	DSM 468
<i>R. rubrum</i> Pigment <sup>-</sup>	diese Arbeit

Vorkulturen für Schüttelkolben-Versuche und Fermentationen wurden aus Kühlschrankskulturen angeimpft. Zur Anfertigung von Kühlschrankskulturen wurden 50 mL Medium in einem 500 mL Schüttelkolben (3 Schikanen) mit 1 mL Kryoaliquot angeimpft und ein weiteres Mal im gleichen Medium überimpft, um restliches Glycerin und tote Zellen aus der Kultur zu entfernen. Die Bakteriensuspension wurde in ein steriles Zellkultur-Gefäß überführt und bei 4 °C gelagert.

Aerobe Kühlschrankskulturen wurden für alle verwendeten Medien (s.a. 2.2) angefertigt. Mikroaerobe Kühlschrankskulturen wurden in M2F- und M2SF-Medium angelegt. Phototrophe Kühlschrankskulturen wurden in M2A- und M2S-Medium angefertigt und in Pyrexflaschen bei 4 °C gelagert. Nach ca. 3 Monaten wurden die Kühlschrankskulturen

erneuert.

## 2.2 Medien

Zur Kultivierung unter aeroben und mikroaeroben Bedingungen von *R. rubrum* wurden sogenannte M2-Medien mit verschiedenen C-Quellen verwendet. Dafür wurde Succinat, Fructose und Acetat als Einzelsubstratmedium sowie Succinat/Fructose und Fructose/Acetat als Mischsubstratmedium eingesetzt.

**Tab. 2.2:** Zusammensetzung der verwendeten Einzelsubstrat-Medien. Angaben in g/L. Für *p*-ABA: mg/L.

Substanz	M2S-Medium	M2F-Medium	M2A-Medium
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,96	2,96	2,96
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,44	4,44	4,44
NH <sub>4</sub> Cl	3,74	3,74	3,74
NaCl	0,12	0,12	0,12
<i>p</i> -ABA	2,85	2,85	2,85
HEPES	9,5	9,5	9,5
Bernsteinsäure	4,72	-	-
Kaliumacetat	-	-	1,96
Fructose	-	10	-
Vitaminlösung (100-fach)	10 mL/L	10 mL/L	10 mL/L

**Tab. 2.3:** Zusammensetzung der verwendeten Mischsubstrat-Medien. Angaben in g/L. Für *p*-ABA: mg/L.

Substanz	M2SF-Medium	M2AF-Medium
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,96	2,96
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,44	4,44
NH <sub>4</sub> Cl	3,74	3,74
NaCl	0,12	0,12
<i>p</i> -ABA	2,85	2,85
HEPES	9,5	9,5
Bernsteinsäure	4,72	-
Kaliumacetat	-	1,96
Fructose	3	10
Vitaminlösung (100-fach)	10 mL/L	10 mL/L

HEPES wurde nur bei Vorkulturen und Kultivierungen im Schüttelkolben verwendet. Da bei Fermentationen der pH-Wert geregelt wurde, konnte hier auf HEPES verzichtet

werden. Der pH-Wert der Medien wurde mit 4 M KOH-Lösung auf pH = 6,80 eingestellt. Alle Substanzen bis auf Fructose und Vitaminlösung wurden autoklaviert (20 min, 121 °C). Fructoselösung (600 g/L) wurde separat hergestellt, bei 121 °C für 20 min autoklaviert und anschließend den jeweiligen Medien wie in Tab. 2.2, 2.3 angegeben hinzugefügt. Die nachfolgend beschriebene Vitaminlösung wurde sterilfiltriert und ebenfalls dem zuvor autoklavierten Medium zugefügt.

Für die Kultivierung des SLYC18-Stammes wurde den Medien 25 µg/mL Kanamycinsulfat hinzugefügt.

## Vitaminlösung

Tab. 2.4 zeigt die Zusammensetzung der Vitamine. Die einzelnen Substanzen wurden in der angegebenen Reihenfolge nacheinander gelöst. CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O wurde separat gelöst und anschließend zur Vitaminlösung hinzugefügt. Danach wurde der pH-Wert mit 4 M KOH-Lösung auf 6,80 eingestellt und die Vitaminlösung sterilfiltriert. Die Lagerung fand bei 4 °C im Dunkeln statt.

**Tab. 2.4:** Zusammensetzung der Vitaminlösung (100-fach).

Substanz	Konzentration in g/L
Nitrilotriessigsäure	20
Asparaginsäure	4
Glutaminsäure	10
KOH-Plätzchen	22
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	58,97
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2
Nicotinsäure	0,1
Thiamin	0,05
Biotin	0,002
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	6,6
Spurenelementelösung	20 mL/L

## Spurenelementelösung

Tab. 2.5 zeigt die Zusammensetzung der Spurenelementelösung nach Hutner [1946]. Die Lösung wurde unsteril bei 4 °C gelagert.

**Tab. 2.5:** Zusammensetzung der Spurenelementlösung (50-fach).

Substanz	Konzentration in g/L
EDTA	50
ZnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	22
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,4
MnCl <sub>3</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	5,1
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	5
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1,6
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	1,1
2(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · H <sub>2</sub> O	1,1

## 2.3 Feedlösungen

Für Fedbatch- und 2-Stufen-Prozesse wurden verschiedene Substanzen in konzentrierten Feedlösungen zugefüttert, deren Zusammensetzung nachfolgend im Detail beschrieben wird.

Da die Zufütterung mit Hilfe von Waagen realisiert wurde, musste zur Volumensbilanzierung eine Bestimmung der Dichte der jeweiligen Feedlösungen und pH-Korrekturmitteln erfolgen. Dazu wurden in einer 10-fach Bestimmung jeweils 1000 µL mit einer Mikropipette (Gilson, Inc.) auf einer Analysenwaage (Mettler-Toledo) ausgewogen.

**Tab. 2.6:** Ermittelte Dichten der für Fedbatch- und 2-Stufen-Prozessen verwendeten Feedlösungen.

Feedlösung	Konzentration	Dichte in g/cm <sup>3</sup>
Fructose	600 g/L	1,2854 <sup>3</sup>
NH <sub>4</sub> Cl	214 g/L	1,0668
Acetatfeed	525 g/L	1,0670
C-Feed Succinat/Fructose	s.unten	1,1119
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	400 g/L	1,2200
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	200 g/L	1,1230
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100 g/L	1,0600
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	45 %	1,2540 <sup>3</sup>
Vitaminlösung	100-fach (s.a. Tab. 2.4)	1,0616
Vitaminlösung + <i>p</i> -ABA	100-fach + 2,85 g/L	1,0585
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 M	1,2333
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5 M	1,4957

<sup>3</sup>entnommen aus: Dichtetabelle Mettler-Toledo



## Kohlenstoff-Feedlösungen

Essenziell für ein optimales Wachstum von *R. rubrum* ist die geeignete Zufütterung der jeweiligen Kohlenstoffquelle. Untersucht wurde die Zufütterung einer Mischung aus Succinat/Fructose, wie auch Fructose und Acetat als alleinige C-Quelle. Dabei variierte die Zusammensetzung der einzelnen Feeds je nach Kultivierungsziel.

Tab. 2.7 gibt die Zusammensetzung der Acetatfeed-Lösung an. Der pH-Wert wurde mit 33 %iger Ammoniumhydroxid-Lösung auf  $\text{pH} = 2,00$  eingestellt. Anschließend wurde der Feed sterilfiltriert (Millipore,  $0,2 \mu\text{m}$ ). Der Feed diente durch den Zusatz von Ammoniumhydroxid damit gleichzeitig als Stickstoffquelle.

**Tab. 2.7:** Zusammensetzung der Einzelsubstrat-Feedlösungen für die Zufütterung von Acetat.

Substanz	Konzentration in g/L
Eisessig (100 %)	525
<i>p</i> -ABA	0,0285
Vitaminlösung	260 mL/L

**Tab. 2.8:** Fructosefeedlösung für die Zufütterung von Fructose.

Substanz	Konzentration in g/L
Fructose	600

Für die gleichzeitige Zuführung von Acetat und Fructose wurde zusätzlich zum Acetatfeed eine 600 g/L Fructoselösung verwendet. Diese Lösung kam ebenfalls bei der Zufuhr von Fructose als alleinige Kohlenstoffquelle zum Einsatz. Die Fructoselösung wurde 20 min bei  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  autoklaviert. Die Zugabe von Vitaminen und *p*-ABA führte allerdings hier zu einem weißen Niederschlag, weshalb diese Nährstoffkomponenten getrennt, in Form einer Vitamin/*p*-ABA-Lösung (s. weiter unten), zugeführt worden sind.

Die Zusammensetzung des Kohlenstoff-Feeds für Succinat/Fructose ist in Tab. 2.9 ersichtlich. Der pH-Wert wurde mit KOH-Plätzchen auf 4,5 eingestellt. Die Succinat/Fructose C-Feedlösung wurde sterilfiltriert (Millipore, Porengröße:  $0,2 \mu\text{m}$ ).

**Tab. 2.9:** Kohlenstoff-Feedlösung für die Zufütterung von Succinat/Fructose.  $\text{pH} = 4,50$ .

Substanz	Konzentration in g/L
Bernsteinsäure	150
Fructose	100
<i>p</i> -ABA	0,3
Vitaminlösung (100-fach)	260 mL/L

## Feedlösung für Kultivierungen unter Zellrückhaltung

Die Zusammensetzung der für die Kultivierungen unter Zellrückhaltung verwendeten Feedlösungen ist in Tab. 2.10 ersichtlich. Die eingesetzten Fructosekonzentrationen richteten sich nach der Modellierung der Perfusion für das 3-Feed Modell (s.a. Handt [2011]). Die restlichen Mediumsbestandteile wurden entsprechend der gesteigerten Fructosekonzentration gewählt.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  wurde anstelle von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  verwendet, da durch die Verwendung der entsprechenden Mengen  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ein weißer Niederschlag aufgetreten war.

**Tab. 2.10:** Feedlösungen für mikroaerobe Kultivierungen unter Zellrückhaltung mit Fructose als alleinige C-Quelle.

Substanz	Feed I	Feed II	Feed III
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	3,58	5,79	18,41
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5,37	8,69	27,62
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,51	4,05	9,18
<i>p</i> -ABA	0,0034	0,0057	0,0177
NaCl	0,144	0,240	0,744
Fructose	12,14	19,16	44,44
Vitaminlösung	17 mL/L	20 mL/L	62 mL/L

## N/P-Feedlösung

Stickstoff und Phosphat wurde in Form von Diammoniumhydrogenphosphat  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  zugeführt. Für Kultivierungen im 3,5 L-Maßstab kamen 100-200 g/L Lösungen zum Einsatz, für Kultivierungen im 10 L-Maßstab 400 g/L, um unnötige Verdünnungen der Kultivierungsbrühe zu vermeiden. Der pH-Wert wurde mit  $\text{H}_3\text{PO}_4$  auf  $\text{pH} = 6,80$  eingestellt [Zeiger and Grammel, 2010; Zeiger, 2008]. Für die Fedbatch-Kultivierung mit Succinat/Fructose im Mischsubstrat wurde sterilfiltrierte 4 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung verwendet. Die Zufuhr von Phosphat erfolgte über die in der Batch-Phase dosierte Menge Phosphorsäure ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ).

## Vitamin/*p*-ABA-Feedlösung

Für Einmalförderungen in Kombination mit der Fructose-Feedlösung wurde Vitamin/*p*-ABA-Lösung verwendet. In die oben bereits beschriebene Vitaminlösung wurden 0,285 g/L *p*-ABA eingewogen.

## Acetatzufuhr im DASGIP-System

Für die Untersuchung des Acetatstoffwechsels von *R. rubrum* in der DASGIP-Anlage wurde eine einfache pH-Stat Kultivierung mit Essigsäure über die pH-Regelung angewendet. Die Essigsäure stellte dabei gleichzeitig pH-Korrekturmittel und Kohlenstoffeed-Lösung dar. Verwendet wurden 0,43 bis 0,75 M Essigsäure, deren pH-Wert auf 1,0 mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eingestellt wurde (s.a. Buch [2009]).

## 2.4 Kultivierungen

### 2.4.1 Vorkulturen

#### Vorkulturen für Fermentationen und Schüttelkolbenversuche

Für aerobe Vorkulturen wurden Kultivierungen in 500 mL bis 1000 mL Schüttelkolben mit 3 Schikanen durchgeführt. Die Schüttelkolben wurden mit maximal 10 % Kulturmedium gefüllt, um eine ausreichende Belüftung zu gewährleisten. Die Kultivierung erfolgte im Dunkeln in Schüttelschränken der Firma B. Braun Biotech International (Certomat<sup>®</sup> BS-1) bei 30 °C und 100 rpm.

In Schüttelkolbenversuchen und Fermentationen in der DASGIP-Anlage wurde die optische Dichte beim Animpfen auf einen Wert zwischen 0,1 und 0,2 eingestellt. Dazu wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen abzentrifugiert (15 min, 5.000 rpm, 4 °C, Thermo Scientific, HERAEUS Biofuge Stratos) und in steriler NaCl-Lösung (0,98 %) resuspendiert, so dass mit einem Animpfvolumen von 1 mL die entsprechende Zelldichte erreicht werden konnte. Für Fermentationen im Braun Biostat C Fermenter wurde die optische Dichte nicht eingestellt.

#### Phototrophe Vorkulturen in Pyrexflaschen

Für phototrophe Vorkulturen kamen Pyrexflaschen zwischen 100 mL und 500 mL zum Einsatz. Die Pyrexflaschen wurden komplett mit Medium gefüllt und auf einer Rührplattform (300 rpm) unter Glühlampen (25 Watt, Wolfram) mit Leuchtdichten zwischen 1,5 und 3,5  $\frac{\mu\text{mol}}{\text{m}^2 \cdot \text{s}}$  (Lichtmessgerät LI-COR Typ: LI-250A, Abstand ca. 20 cm) kultiviert.

### 2.4.2 Schüttelkolbenversuche

In aeroben Schüttelkolbenversuchen wurden Einflüsse verschiedener Bestandteile des Nährmediums auf das Wachstum untersucht. Zum Einsatz kamen hier 500 mL Schüttelkolben (3 Schikanen) mit je 50 mL Medium. Die Zusammensetzung des Mediums va-

rierte und ist bei den entsprechenden Versuchen zu finden. Die Inokulation wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in Schüttelschränken der Firma Certomat<sup>®</sup> BS-1 bei 100 rpm und 30 °C. Während der Kultivierung wurde in regelmäßigen Abständen Proben unter sterilen Bedingungen entnommen. Dabei wurde die optische Dichte bei 660 nm ( $A_{660}$ ) und das Verhältnis  $A_{880}/A_{660}$  gemessen. Darüber hinaus wurde die Probe abzentrifugiert (13.000 rpm, 10 min, 4 °C, Thermo Scientific, HERAEUS Fresco 17) und der Kulturüberstand zur Bestimmung von Substraten bei -20 °C eingefroren.

### 2.4.3 Fermentationen DASGIP-Anlage

Parallele Fermentationen wurden in der Fedbatch-pro Anlage der Firma DASGIP im 500 mL-Maßstab durchgeführt. Zur Verfügung standen 4 Glasreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von jeweils 200 mL. Neben einem magnetischen Rührwerk mit Rührfischen standen ebenfalls ein System zur Temperaturkontrolle (Heizblock), pH-Regelung,  $pO_2$ -Regelung, eine Gasmischstation mit Anschlüssen für  $O_2$ ,  $N_2$  und  $CO_2$ , zwei Pumpsysteme zur Zudosierung von pH-Korrekturmitteln und Substraten sowie ein Abgasanalyse-system für  $O_2$  und  $CO_2$  zur Verfügung. Der Aufbau der Anlage ist in Abb. 2.1 ersichtlich.



**Abb. 2.1:** DASGIP Kultivierungssystem der Firma DASGIP. Links: Redoxtransmitter der Firma BBI Braun Systems. Im Vordergrund: Photobioreaktor, bestehend aus hexagonalem Aluminiumgestell mit 3 Glühlampen und Rührwerk.

Die Temperatur wurde mittels einem Heizblock konstant bei 30 °C gehalten. Die Rührerdrehzahl betrug stets 250 rpm.

Die pH-Messung erfolgte in allen Reaktoren mittels pH-Elektrode (Mettler-Toledo). Der pH-Wert wurde, wenn nicht anders angegeben, auf  $pH = 6,80$  mit 1 M KOH bzw. 1 M  $H_2SO_4$  geregelt. Eine Ausnahme bildeten Kultivierungen mit Acetat als alleinige C-Quelle, wo statt  $H_2SO_4$  Essigsäure verwendet worden ist (s.a. Abschn. 2.3). Die Kalibrierung der pH-Elektrode erfolgte in pH-Puffern bei  $pH = 4,00$  und  $pH = 7,00$ . Eine vorhandene

Messungengenauigkeit der pH-Elektrode nach dem Autoklavieren wurde durch eine Nachjustierungsfunktion in der Fedbatch-pro Software behoben.

Der Sauerstoffpartialdruck  $pO_2$  wurde mit Hilfe von  $pO_2$ -Elektroden (Mettler-Toledo) gemessen. Der  $pO_2$ -Wert konnte über eine Gasmischstation präzise auf einen bestimmten  $pO_2$ -Wert geregelt werden und wurde, wenn nicht anders angegeben, auf  $pO_2 = 5\%$  (aerobe Bedingungen, [Grammel et al., 2003]) durch Mischung von  $N_2$  und  $O_2$  eingestellt. Zur Kalibrierung der  $pO_2$ -Elektrode wurde unter Kultivierungsbedingungen Druckluft (100 %-Wert) und Stickstoff (0 %-Wert) eingesetzt. In einigen Fällen wurde eine konstante Zufuhr von  $CO_2$  in der Gasmischstation eingestellt. Dabei wurde die  $pO_2$ -Regelung mit einem reduzierten Gesamtgasfluss durchgeführt, wobei jedoch die Regelung nicht beeinträchtigt war. Der Gesamtgasfluss betrug stets 5 L/h (0,42 vvm).

Die Verdunkelung wurde mittels lichtundurchlässiger Folie realisiert, die um den oberen Teil des Glasreaktors gelegt wurde.

In mikroaeroben Versuchen wurde zusätzlich eine Redoxelektrode (Mettler-Toledo) in den Reaktor eingebaut, um einen mikroaeroben Zustand einzustellen [Srinivas et al., 1988]. Da bei der Fedbatch-pro Anlage jedoch keine Möglichkeit bestand, das Redoxpotenzial über die Gasmischstation zu regeln, wurde das Signal der Redoxelektrode über einen Redoxtransmitter (BBI Braun Systems) an das Prozessleitsystem PSC7 (Siemens) weitergeleitet. So war der zeitliche Verlauf des Redoxpotenzials im DASGIP-Reaktor über die PCS7 Software visuell zu verfolgen und manuell über die Gasmischstation auf einen bestimmten Wert einstellbar. Auch eine Datenspeicherung war auf diese Weise möglich.

Für phototrophe Kultivierungsbedingungen wurde ein sechseckiges Gestell konstruiert, in dessen Mitte sich der Reaktor auf einem separaten Rührwerk befand. An dem Gestell wurden 3 höhenverstellbare Halterungen für Glühlampen angebracht, sowie ein Gerät zur Dimmung der Lampen, um unterschiedliche Lichtintensitäten zu erzeugen. Der Aufbau des Photobioreaktors ist in Abb. 2.1 ersichtlich. Da sich der Reaktor außerhalb des Heizblocks der DASGIP-Anlage befand, konnte keine Regelung der Temperatur erfolgen. Die Wärme der Halogenlampen (Megaman Dimmerable, 9 W, 2700 K) genügte jedoch, um die Temperatur bei  $\approx 28\text{ °C}$  zu halten. Die Lichtstärke pro Fläche (Leuchtdichte) wurde mit einem Lichtmessgerät (LI-COR Typ: LI-250A) gemessen. Sie betrug in der Mitte der Anlage ohne Reaktor durchschnittlich  $7,80 \frac{\mu\text{mol}}{\text{m}^2 \cdot \text{s}}$ . Beim Durchgang des Lichts durch den mit Wasser gefüllten Reaktor wird die Leuchtdichte um ca. 30 % ( $2,49 \frac{\mu\text{mol}}{\text{m}^2 \cdot \text{s}}$ ) geschwächt.

Für alle phototrophen Kultivierungen wurde mit einer  $N_2/CO_2$ -Begasung gearbeitet (95 %  $N_2/5\%$   $CO_2$  bzw. 99 %  $N_2/1\%$   $CO_2$  bei 5 L/h Gesamtgasfluss). Eine Einstellung der anaeroben Bedingungen mit 100 %  $N_2$  führte zu Zellverklumpungen und Zellsterben.

Zum Autoklavieren wurden die Reaktoren mit entionisiertem Wasser gefüllt, die Elektroden abgedeckt, Zugänge zu Dosierstrecken und Zu- und Abluftfilter abgeklemmt und

mit Alufolie abgedeckt. Die Autoklavierzeit betrug 20 min bei 121 °C.

Zur Analyse des Bioreaktorabgases standen Bluesens-Sensoren zur Messung von O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> zur Verfügung. Die Kalibrierung der Abgassensoren erfolgte mittels Luft (20,94 % O<sub>2</sub> und 0,033 % CO<sub>2</sub>) und Kalibriergas der Firma Westfalen Gas (1,00 % O<sub>2</sub> und 10,0 % CO<sub>2</sub>).

Die Aufzeichnung der Prozessdaten wie Temperatur, pH-Wert, *p*O<sub>2</sub>-Wert, Rührerdrehzahl, Begasungsrate, Abgaswerte, Zudosierung von Säure oder Lauge erfolgte mit der Software Fedbatch-pro (DASGIP). Darüber hinaus legt die Software eine Ablaufdatei an, in der Änderungen der Regelparameter, Sollwerte und andere Ereignisse festgehalten wurden.

Während der Fermentation wurde in regelmäßigen Abständen Proben aus den Reaktoren entnommen. Daraus wurde die optischen Dichte (A<sub>660</sub>) gemessen sowie das Verhältnis photosynthetischer Membranen bestimmt (A<sub>880</sub>/A<sub>660</sub>). Der durch Zentrifugation erhaltene Kulturüberstand (13.000 rpm, 4 °C, 10 min, Thermo Scientific, HERAEUS Fresco 17) wurde für HPLC-Analysen und zur Bestimmung von Fructose bei -20 °C eingefroren.

Alle Kultivierungen für die <sup>13</sup>C-Stoffflussanalysen (s.a. 2.8) wurden im DASGIP-Kultivierungssystem durchgeführt. Der *p*O<sub>2</sub>, pH, die Temperatur, Begasungsrate und die Rührerdrehzahl in <sup>13</sup>C-Markierungsexperimenten waren identisch mit unmarkierten Vorversuchen bzw. wie oben bereits dargelegt. Vorversuche und <sup>13</sup>C-Markierungsexperimente wurden für aerobe Wachstumsbedingungen (*p*O<sub>2</sub> = 5 %) mit Fructose, Succinat und Succinat/Fructose als Substrate sowie anaerobe Bedingungen (95 % N<sub>2</sub>/5 % CO<sub>2</sub>-Begasung) mit Fructose als C-Quelle durchgeführt. Bei aeroben Versuchen mit Fructose als C-Quelle war ebenfalls eine Begasung mit 5 % CO<sub>2</sub> in der Zuluft vorgesehen.

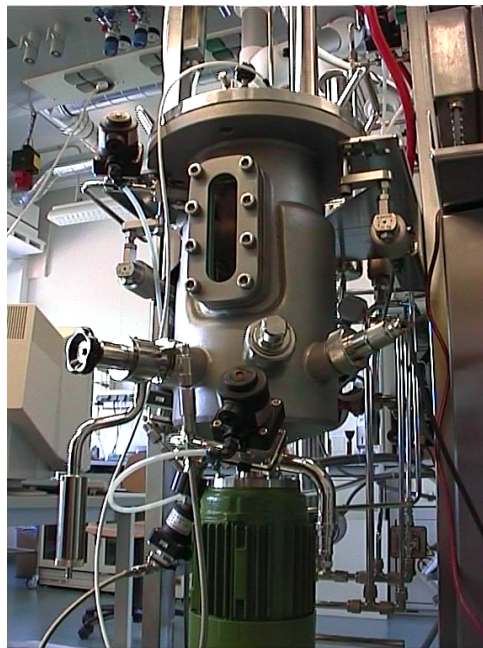
**Tab. 2.11:** Zusammensetzung der <sup>13</sup>C-Substrate für die <sup>13</sup>C-Markierungsexperimente. Angabe der Konzentration in g/L. U: Uniformly (komplett <sup>13</sup>C-markiert).

Medium	1,4- <sup>13</sup> C-Succinat	1- <sup>13</sup> C-Fructose	U- <sup>13</sup> C-Fructose	U- <sup>13</sup> C-Acetat
M2S	4,72	–	–	–
M2F	–	9,0	1,0	–
M2SF	4,72	2,7	0,3	–
M2AF	–	2,7	0,3	2,94

In Tab. 2.11 ist die Zusammensetzung der einzelnen <sup>13</sup>C-Substrate für die verwendeten Medien zu sehen. Die <sup>13</sup>C-Substrate wurden zum Teil von Campro Scientific und zum Teil von euroiso-top bezogen. Alle Substanzen wiesen jedoch eine Reinheit von 99 atom-% <sup>13</sup>C auf.

## 2.4.4 Fermentationen Braun Biostat C

Fermentationen wurden in Rührkesselreaktoren des Typs Biostat CT5-2 (Sartorius Stedim Biotech GmbH) im 5 L-Maßstab durchgeführt. Das Arbeitsvolumen betrug 3,5 L. Daneben stand ein 22 L Rührkesselreaktor des Typs Biostat C15-2K (Sartorius Stedim Biotech GmbH) mit einem Arbeitsvolumen von 10 L zur Verfügung. Der nachfolgend beschriebene Aufbau und die Durchführung von Kultivierungen gelten für beide Bioreaktoren. Die Reaktoranlagen wurden durch die Software PCS7 (Siemens) gesteuert, was die Einbindung und Definition eigener Regelstrukturen und deren Aufbau und Eigenschaften beinhaltet. Daneben standen pH-Messung und -Regelung,  $pO_2$ -Messung und -Regelung, Redoxpotenzial-Messung und -Regelung, Temperaturkontrolle, Druckkontrolle und eine Gasmischstation zur Verfügung, auf die nachfolgend detaillierter eingegangen wird.



**Abb. 2.2:** Braun Biostat C Fermentationsanlage der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH.

Für eine schonende Durchmischung wurde der Internig-Rührer der Firma EKATO eingesetzt. Die Rührerdrehzahl betrug 250-600 rpm.

Der pH-Wert wurde mit einer pH-Elektrode (Mettler-Toledo) gemessen und durch Zudosierung von 4 M KOH und 1 M  $H_2SO_4$  konstant, wenn nicht anders angegeben, bei  $pH = 6,80$  gehalten. In einigen Fällen wurde 4 M KOH durch 2 bis 5 M  $K_2CO_3$  ersetzt und der pH-Wert zwischen 6,80 und 7,50 variiert. Soweit nicht anders angegeben wurde der pH-Wert bei  $pH = 6,80$  konstant gehalten. Die pH-Elektrode wurde mit pH-Pufferlösungen bei  $pH = 4,00$  und  $pH = 7,00$  kalibriert. Eine eventuell vorhandene Ungenauigkeit der pH-Elektrode wurde durch eine externe pH-Wert-Bestimmung und anschließender Sollwertkorrektur behoben.

Der  $pO_2$ -Wert wurde mit einer  $pO_2$ -Elektrode (Mettler-Toledo) gemessen und konnte auf verschiedene Arten geregelt werden. Der  $pO_2$  wurde im aeroben Kultivierungen  $> 5\%$  geregelt [Grammel et al., 2003]. Zur Einstellung eines bestimmten Sauerstoffpartialdrucks konnte zum Beispiel eine Gasmischstation (Massflowcontroller der Firma Bronkhorst) benutzt werden. Mit dieser Gasmischstation bestand die Möglichkeit Sauerstoff, Stickstoff, Kohlendioxid, Luft und Argon in bestimmten Anteilen miteinander zu mischen (Steuerung über Siemens Software). Auf diese Weise wurden zum einen  $pO_2$ -Regelungen entweder mit einer Mischung von Luft/ $N_2$  oder  $O_2$ / $N_2$  realisiert, es war aber auch eine konstante Begasung mit einer vorgegebenen Gasmischung möglich. So wurde in einigen Kultivierungen mit einer konstanten Rate  $CO_2$  begast.

Darüber hinaus bestand die Möglichkeit den  $pO_2$ -Wert durch Variation der Zulufrate mittels Druckluft und/oder der Rührerdrehzahl zu regeln. Dafür stand beim Bioreaktor des Typs Braun C15-2K eine kaskadenartigen Begasungs-Rührer- $pO_2$ -Regelung zur Verfügung, die eine Variation der Zuluft im unteren Bereich zwischen 0 und maximal 15 L/min vorsah und eine Variation der Rührerdrehzahl im oberen Bereich von 250 bis maximal 600 rpm.

Für die Einstellung eines bestimmten Redoxpotenzials in der Flüssigphase wurde eine Mischung von Luft mit Stickstoff mit der Gasmischstation bei einer Begasungsrate von 1,5 L/min favorisiert. Mikroaerobe Sauerstoffbedingungen liegen zwischen aeroben Verhältnissen ( $pO_2 > 5\%$ ) und anaeroben Verhältnissen ( $N_2$ -Begasung) und sind durch polarographische  $O_2$ -Elektroden nur unzureichend zu messen. Aus diesem Grund wurde das Redoxpotenzial der Redoxelektrode benutzt, um mikroaerobe Bedingungen einzustellen [Srinivas et al., 1988]. Je nach Redoxpotenzial ist es möglich verschiedene mikroaerobe  $O_2$ -Verhältnisse einzustellen. In dieser Arbeit wurde mit Redoxpotenzialen für mikroaerobe Zustände zwischen -300 mV und -350 mV gearbeitet.

Für die Zufuhr von Substraten und pH-Korrekturmitteln standen Pumpen der Firma Ismatec und Waagen (Mettler-Toledo) zur Verfügung. Für die geregelte Zufütterung stand ein Feedregler zur kontinuierlichen Durchflussregelung sowie für die Einmalförderung einer definierten Menge Feed zur Verfügung. Eine kontinuierliche Durchflussregelung konnte linear oder exponentiell, mit Hilfe einer Exponentialfunktion, erfolgen, welche im Prozessleitsystem hinterlegt war.

$$m_f = \frac{\rho_S}{60} \cdot \left( \frac{\mu_{set}}{Y_{(X/S)}} + m_S \right) \cdot \frac{V \cdot X_0}{c_S} \cdot \exp\left(\frac{\mu_{set} \cdot t}{3600}\right) \quad (2.1)$$

Die Formel 2.1 ergibt den Massenfluss  $m_f$  in g/min, der stetig den Sollwert des Feedreglers aktualisierte. Als gegebene Größen wurden die Dichte des Feeds  $\rho_S$ , die Wachstumsrate  $\mu_{set}$ , der Biomasseausbeutekoeffizient  $Y_{(X/S)}$ , der Erhaltungskoeffizient  $m_S$ , das



Startvolumen  $V$ , die Startbiotrockenmasse  $X_0$  sowie die Substratkonzentration  $c_S$  in die Funktion eingetragen (s.a. Zeiger and Grammel [2010]).

Zur Analyse des Abgases stand das VARIAN Micro Gas Chromatograph CP-4900 (Micro GC) zur Messung von  $H_2$ ,  $O_2$ ,  $N_2$ ,  $CO$  und  $CO_2$  zur Verfügung. Es bestand aus 2 Säulen, wobei eine Säule (Kanal 2) ausschließlich für die Messung von  $CO_2$  diente und eine zweite Säule (Kanal 1) für die Messung von  $H_2$ ,  $O_2$ ,  $CO$  und  $N_2$ . Als Trägergas kam Argon zum Einsatz. Die Aufzeichnung der Chromatogramme erfolgte mit der Software CP-Maitre Elite (Version 3.2). Die unterschiedlichen Messparameter werden aus Tab. 2.12 ersichtlich.

**Tab. 2.12:** Spezifikationen und Parameter des verwendeten Micro-GC Systems zur Messung des Fermenterabgases.

Parameter	Kanal 1	Kanal 2
Säulentemperatur	110 °C	80 °C
Injektortemperatur	50 °C	50 °C
Säulendruck	200 kPa	100 kPa
Injektionszeit	200 msec	200 msec

Die Kalibrierung des Micro-GC wurde mit Kalibriergas (Westfalen AG) durchgeführt. Es enthielt  $H_2$  (209 ppm),  $CO$  (204 ppm) und synthetische Luft ( $O_2$ : 20,983 %,  $N_2$ : 77,937 %,  $CO_2$ : 395,0 ppm).

Während der Fermentation wurde in regelmäßigen Abständen Proben aus den Reaktoren entnommen. Daraus wurde die optischen Dichte ( $A_{660}$ ) gemessen sowie das Verhältnis photosynthetischer Membranen bestimmt ( $A_{880}/A_{660}$ ). Der durch Zentrifugation erhaltene Kulturüberstand (13.000 rpm, 4 °C, 10 min, Thermo Scientific, HERAEUS Fresco 17) wurde für HPLC-Analysen und zur Bestimmung von Fructose bei -20 °C eingefroren. Zur Unterdrückung der Schaumbildung wurde das Antischaummittel Antifoam 204 (Sigma-Aldrich) in einer 1:100 Verdünnung (5 L Reaktor, CT5-2) und 1:50 Verdünnung (22 L Reaktor, C15-2K) eingesetzt. Das Volumen wurde nach Bedarf festgelegt und mit einer sterilen Spritze/Kanüle über ein Septum in den Fermenter gegeben.

### 2.4.5 Kultivierung unter Zellrückhaltung (Perfusion)

Kultivierungen unter Zellrückhaltung und kontinuierlichem Austausch des Mediums (Perfusion) wurden im Braun Biostat C im 3 L-Maßstab durchgeführt (s.a. 2.4.4). Für die Zellrückhaltung wurde das Cross-Flow System Sartocoon Slice 200 (Sartorius Stedim Biotech GmbH) verwendet. Es bestand aus einem Einspannmodul aus Edelstahl und der Cross-Flow Membran Hydrosart® mit einer Porengröße von 0,2  $\mu m$ . Abb. 2.3 zeigt die

Einzelteile des Cross-Flow Systems.

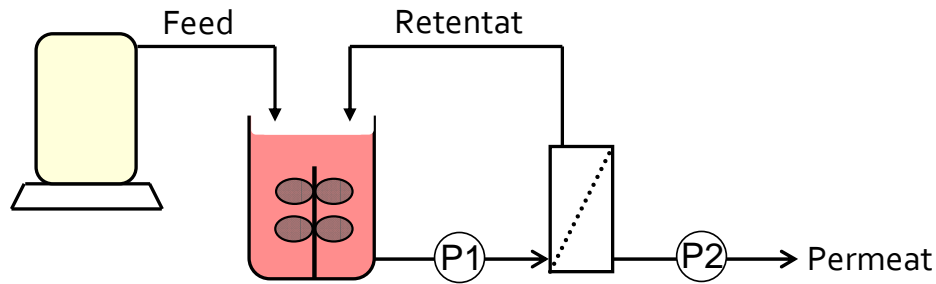
Am Einspannmodul waren Luer-Lock-Anschlüsse für den Zulauf, das Retentat und das Permeat vorhanden. Drucksensoren zeigten den Druck an den jeweiligen Stellen im System an. Abb. 2.4 zeigt den schematischen Aufbau der Cross-Flow Filtration. Der Zulauf wurde mittels einer Ismatec-Pumpe aus dem Fermenter gepumpt und in einem tangentialen Fluss auf die Membran geleitet. Zelluläre Bestandteile wurden vom Filter zurückgehalten und gelangten als Retentat zurück in den Reaktor. Das Permeat enthielt die löslichen Substanzen des Mediums und wurde verworfen. Um ein *fouling* der Cross-Flow-Membran zu verhindern, wurde der Druck hinter der Filtermembran stets  $> 0$  bar gehalten. Der Druck, der über der Membran durch die Pumpe P1 aufgebaut wurde, richtete sich nach der angestrebten Austauschrate und dem *fouling*-Grad der Membran und variierte daher. Feedraten zwischen 75 mL/h bis 300 mL/h wurden mit zwei verschiedenen Pumpen realisiert (Watson Marlow Typ 40 1U/D1 und Tandem 1082 Pumpe, Sartorius).



**Abb. 2.3:** Cross-Flow Sartocon Slice 200 Einspannvorrichtung (links) und Hydosart<sup>®</sup> Cross-Flow Membran (rechts).

Gleichzeitig zum Abzug wurde frisches Medium als Feed mit einer definierten Rate in den Fermenter gepumpt. Dafür wurden Feedlösungen mit M<sub>2</sub>F-Medium verwendet. Um den gesteigerten Bedarf höherer Zelldichten zu decken, fand in definierten Abständen ein Feedwechsel mit konzentrierteren Medium statt. Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Feedlösungen ist in Tab. 2.10 ersichtlich. Die einzelnen Wechselzeitpunkte richteten sich nach der erreichten Zelldichte und wurden im Vorfeld mit Hilfe eines unstrukturierten, unsegregierten Modells simuliert (s.a. Handt [2011]).

Da das Perfusionssystem nicht autoklaviert werden konnte, wurde das System chemisch desinfiziert werden. Hierfür wurde das System zunächst für 30 min mit 500 mL 70 %igem Ethanol gespült. Anschließend folgte für 1 h ein 1 M KOH (1 L). Dann wurde noch einmal für 30 min mit 70 %igem Ethanol gespült (500 mL). Schließlich folgte eine letzte, einstündige Spülung mit 1 L sterilem entionisiertem Wasser. Zum Schluss einer Perfusionsfermentation wurde die Membran zunächst mit einem Liter 0,98 %iger Kochsalzlösung gespült. Anschließend folgte die oben bereits beschriebene Desinfizierung.



**Abb. 2.4:** Schematischer Aufbau der kontinuierlichen Kultivierungen unter Zellerückhaltung. P1 und P2: Pumpe 1 und Pumpe 2.

## 2.4.6 Probennahme intrazelluläre Metabolite und Produkte

Zur Bestimmung von intrazellulären Metaboliten, der Messung der  $^{13}\text{C}$ -markierten Isotopomere und des Coenzym  $\text{Q}_{10}$ -Redoxstatus ( $\text{Q}_{10}\text{H}_2/\text{Q}_{10}$ ) zu einem definierten Zeitpunkt ist ein rasches Abstoppen des Zellstoffwechsels im Millisekundenbereich nötig (*metabolic quenching*). Dazu wurden 5 mL Zellsuspension in 15 mL 60 %igen Methanol/5 mM Tricin ( $-50\text{ }^\circ\text{C}$ ) gegeben und anschließend für 5 min zentrifugiert (10.000 rpm,  $-19\text{ }^\circ\text{C}$ , Thermo Scientific, HERAEUS Biofuge Stratos) [de Koning and van Dam, 1992]. Die Probennahme erfolgte in einer Dreifachbestimmung. Das sofortige Stoppen aller zellulären Stoffwechselaktivitäten ist notwendig, da eine Reihe von Enzymreaktionen einen hohen *turnover* haben. So beträgt zum Beispiel der Umsatz von Glucose zu Glucose-6-phosphat in aerob kultivierten *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen 1 mM/s [de Koning and van Dam, 1992].

Für den Zellaufschluss zur Bestimmung intrazellulärer Metabolite mittels LC/MS-MS wurde das Pellet in 1 mL 100 %igem Methanol ( $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ) und 1 mL TE-Puffer (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH = 7,0,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ) resuspendiert und danach mit 2 mL Chloroform versetzt. Anschließend wurden die Proben für mind. 2 h bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  mit Hilfe eines Überkopfmischers (Windaus Labortechnik) aufgeschlossen. Durch die nachfolgende Zentrifugation für 10 min (10.000 rpm,  $-19\text{ }^\circ\text{C}$ , Thermo Scientific, HERAEUS Biofuge Stratos) bildeten sich zwei Phasen. Die obere Phase (gepufferte Methanolphase, gelöste Zellmetabolite) wurde abgenommen und für die LC-MS/MS-Analyse filtriert ( $0,2\text{ }\mu\text{m}$ ), um restliche Zelltrümmer abzutrennen. Zusätzlich wurden 2 mL-Proben der Quenching-Überstände aliquotiert. Alle Proben wurden bis zur Messung bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

Die Proben für die Bestimmung des Coenzym  $\text{Q}_{10}$ -Redoxstatus' wurden sofort nach Probennahme weiter aufgearbeitet. Die Prozedur ist unter 2.5.11 detaillierter beschrieben.

Zur Bestimmung der intrazellulären Produktkonzentrationen wie PHB (s.a. Abschn. 2.5.8), Coenzym  $\text{Q}_{10}$  (s.a. Abschn. 2.5.11), Vitamin  $\text{B}_{12}$  (s.a. Abschn. 2.5.12), Bacteriochlorophyll

(s.a. Abschn. 2.5.9) und, im Fall von dem SLYC18-Stamm, Lycopin (s.a. Abschn. 2.5.10) wurden Zell-Aliquots zwischen 2-10 mL, abhängig von der Zelldichte, in Glasröhrchen abzentrifugiert (5.000 rpm, 4 °C, 15 min, Thermo Scientific, HERAEUS Biofuge Stratos). Die Zellpellets wurden einmal mit je 5 mL 0,98 % NaCl gewaschen und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert. Die Probennahme für die Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) verlief analog, jedoch erfolgte nach dem Waschschrift die Trocknung der Proben im Trockenschrank (s.a. Abschn. 2.5.1).

Für die Bestimmung der intrazellulären NADH- und NAD<sup>+</sup>-Konzentration (s. Abschn. 2.5.13) wurden je 2 mL in 2 mL-Eppendorf-Gefäße bei 4 °C, 13.000 rpm für 10 min (Thermo Scientific, HERAEUS Fresco 17) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets bis zur Extraktion und Messung bei -80 °C gelagert.

## 2.4.7 Berechnung intrazelluläre Metabolite

Bereits seit mehreren Jahren ist bekannt, dass Zellen durch das kalte Methanol-Quenching einem *leakage*-Effekt unterliegen, der dazu führt, dass ein Großteil der Metabolite (> 60 %) aus der Zelle in den Quenching-Überstand austreten [Bolten et al., 2007; Wittmann et al., 2004]. Aus diesem Grund ist es nicht nur wichtig das Zellpellet aufzuschließen und die Metabolite zu extrahieren, sondern auch Proben der methanologischen Quenching-Überstände zu vermessen. Darüber hinaus wurde auch der bei 4 °C abzentrifugierte Überstand vermessen, der intrazelluläre Metabolite aufgrund von lysierten Zellen enthalten kann. In ersten Versuchen zur Bestimmung intrazellulärer Metabolite wurde festgestellt, dass auch für *R. rubrum* der *leakage*-Effekt mit allgemein > 90 % Verlust auftritt. In Tab. 2.13 sind die prozentualen Verluste durch das *metabolic quenching* in *R. rubrum* auf M2SF-Medium unter aeroben Bedingungen dargestellt. Eine verringertes *leakage* scheinen lediglich CoA-Derivate und Energiemetabolite aufzuweisen (s.a. Tab. 2.13).

Für die Bestimmung der intrazellulären Metabolitenkonzentrationen im Rahmen dieser Arbeit wurde daher der Verlust beim kalten Methanol-Quenching mit eingerechnet. Die Berechnung der intrazellulären Metabolitenkonzentrationen erfolgte aus diesem Grund mit nachfolgender Gleichung: mit  $[Q\ddot{U}b]_{20mL}$  als Konzentration des jeweiligen Metaboliten im Quenching-Überstand,  $[QEx]_{2mL}$  als Konzentration des Extraktes und  $[W\ddot{U}b]_{5mL}$  als Konzentration des bei 4 °C abzentrifugierten Warmüberstandes.

$$c_{Metabolit} [\mu mol/g_{BTM}] = \frac{[Q\ddot{U}b]_{20mL} - [W\ddot{U}b]_{5mL}}{g_{BTM/5mL}} + \frac{[QEx]_{2mL}}{g_{BTM/5mL}} \quad (2.2)$$

**Tab. 2.13:** Prozentuale Verluste beim *metabolic quenching* mit -50 °C Methanol in *R. rubrum* bei aeroben Wachstum auf M2SF-Medium. DASGIP Fermentationsparameter.

Metabolit	<i>leakage</i> in %
G6P	95,2
F6P	97,9
FBP	82,9
F1P	99,2
DHAP	98,4
2,3-PG	93,4
PEP	97,9
Acetyl-CoA	72,7
S7P	96,0
Citrat	94,3
Isocitrat	96,3
$\alpha$ -KG	97,1
Succinyl-CoA	56,9
Propionyl-CoA	73,9
Fumarat	72,3
Malat	94,9
AMP	90,9
ADP	74,4
ATP	73,9

## 2.5 Analytische Methoden

### 2.5.1 Bestimmung der optischen Dichte und Biotrockenmasse

Zur Bestimmung der Zelldichte wurde die optische Dichte ( $A_{660}$ ) mit einem Photometer (Jasco V-670 Spektrophotometer) bei 660 nm gemessen. Als Referenz wurde 0,98 %ige NaCl-Lösung verwendet. Die Zellsuspension wurde mit 0,98 %iger NaCl-Lösung zwischen eine OD von 0,1 und 0,6 verdünnt. Die Bestimmung der OD erfolgte mindestens in einer Doppelbestimmung.

Darüber hinaus wurde auch die Absorption bei 880 nm gegen NaCl (0,98 %) gemessen ( $A_{880}$ ). Bei dieser Wellenlänge absorbiert der LH-1-Komplex von *R. rubrum* und erlaubt eine Quantifizierung der intracytoplasmatischen Photosynthesemembranen, da LH-1 als einziger Lichtsammelkomplex in *R. rubrum* vorliegt [Drews, 1985].

Die Bestimmung der BTM wurde in 10 mL-Glasröhrchen durchgeführt, die zuvor bis zur Gewichtskonstanz im Trockenschrank (105 °C) getrocknet wurden und auf einer Analysenwaage (Mettler-Toledo) ausgewogen worden waren. Jeweils 10 mL, bei höheren Zelldichten ( $A_{660} > 30$ ) nur 5 mL, wurden 10 min (5.000 rpm, 4 °C, Thermo Scientific, HERA-

EUS Biofuge Stratos) abzentrifugiert und einmal mit 0,98 %iger NaCl-Lösung gewaschen, im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und anschließend erneut ausgewogen. Die Bestimmung erfolgte als Dreifachbestimmung.

Für die Berechnung der BTM aus gemessenen optischen Dichten  $A_{660nm}$  wurde der Faktor  $\frac{g_{BTM}}{A_{660}}$  ermittelt. Dieser Faktor ist abhängig vom eingesetzten Substrat und der Sauerstoffzufuhr und wird wesentlich durch den intrazellulären PHB-Anteil mitbestimmt. Tab. 2.14 gibt einen Überblick über die ermittelten Faktoren. Darüber hinaus wurde die BTM um eventuell gebildetes PHB korrigiert, was die BTM verfälschen würde. Damit sind zum Beispiel die Biomasseausbeuten verschiedener Kohlenstoffquellen besser vergleichbar, da hier zum Teil der PHB-Gehalt unterschiedlich war (vgl.a. Abschn. 3.1.1).

**Tab. 2.14:** Faktor  $\frac{g_{BTM}}{A_{660nm}}$  für verschiedene Kohlenstoff-Substrate und Sauerstoffbedingungen (aerob, mikroaerob und anaerob) für *R. rubrum* im Dunkeln.

Bedingung	Faktor	Anzahl der Messungen
M2SF/M2S/M2F aerob	$0,34122 \pm 0,01558$	95
M2AF aerob	$0,28942 \pm 0,02853$	108
M2A aerob	$0,29723 \pm 0,02353$	26
M2SF mikroaerob	$0,35938 \pm 0,02259$	51
M2F anaerob	$0,31179 \pm 0,03753$	80

Für phototrophe Kultivierungen mit M2S- bzw. M2A-Medium wurde kein Unterschied zum jeweils unter aeroben Bedingungen ermittelten Faktor festgestellt. Aus diesem Grund gilt der Faktor aus Tab. 2.14 für das jeweilig verwendete Medium.

## 2.5.2 Ganzzellspektren

Vergleichende Ganzzellspektren wurden über einen Bereich von 200 bis 1000 nm mit dem Spektrophotometer V-670 (Jasco) aufgenommen. Zur Reduzierung von störenden Streueffekten wurde die Probe 1:2 mit 100 %igem Glycerin verdünnt. Als Referenz wurde 100 % Glycerin/0,98 % NaCl (1:2, v/v) verwendet.

## 2.5.3 Bestimmung der organischen Säuren mit HPLC

Die Bestimmung von Formiat, Malat, Acetat, Fumarat, Succinat und Propionat erfolgte durch Auftrennung und Analyse mittels HPLC. Zur Vorbereitung der Proben auf die Messung wurden die Fermentationsüberstände filtriert (0,2  $\mu$ m) und gegebenenfalls verdünnt. Zur Quantifizierung wurde mit den entsprechenden Standards eine Einpunktkalibrierung durchgeführt. Tab. 2.15 zeigt die, für die Kalibrierung eingesetzten Konzentrationen und Retentionszeiten.

**Tab. 2.15:** Konzentrationen der Standards zur Bestimmung der organischen Säuren Formiat, Malat, Acetat, Fumarat, Succinat und Propionat mit HPLC.

Standard	Konzentration in mM	Retentionszeit in min
Formiat	10	4,07
Malat	10	5,20
Acetat	10	7,21
Fumarat	1	12,33
Succinat	10	13,60
Propionat	10	20,77

Zur Untersuchung der Citramalat-Stabilität wurden Citramalat-Lösungen in H<sub>2</sub>O und Methanol (60 %)/Tricin (5 mM) angesetzt und diese bei -80 °C eingefroren. Nach 12 h, 24 h und 36 h wurden jeweils 100 µL mit dem in Tab. 2.15 angegebenen HPLC-System vermessen. Zum Vergleich erfolgte auch eine Messung vor dem Einfrieren (Zeitpunkt t<sub>0</sub>).

Die Retentionszeit kann aufgrund von Säulenwechsel oder Pufferwechsel und pH-Wert-Schwankungen variieren. Tab. 2.16 gibt einen Überblick über das verwendete HPLC-System. Die Aufzeichnung der Messdaten erfolgte mit der Software ChemStation (for LC 3D systems).

**Tab. 2.16:** Spezifikationen und Parameter der HPLC zur Bestimmung der organischen Säuren.

Gerät	Agilent Series 1100
Autosampler	ALS G1329A
Injektionsvolumen	10 µL
Säule	GL Sciences Inertsil 100A ODS-3 5 µm 250 x 4.6 mm
Mobile Phase	0,1 M NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH = 2,60)
Elution	isokratisch
Flussrate	1,0 mL/min
Detektor	UV/vis-Detektor mit Diodenarray λ = 210 nm

In einigen Fällen wurde Formiat, Malat, Acetat und Succinat durch ein enzymatisches Testkit der Firma Boehringer Mannheim (Roche) bestimmt. Besonders in höheren Zelldichten konnte zum Teil keine eindeutige Zuordnung der Substanzpeaks erfolgen und eine enzymatische Bestimmung der extrazellulären Konzentration der organischen Säuren bedingen.

Auch die Bestimmung der extrazellulären Konzentration *p*-ABA erfolgt mit HPLC. Dafür wurden die in Tab. 2.16 angegebenen Parameter nach der Methode von Khan et al. [2002] modifiziert. Als Elutionspuffer wurde Methanol/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> verwendet (7,5 % Methanol, 46,25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 3,60). Die Flussrate wurde auf 1,5 mL/min heraufgesetzt

und die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm. *p*-ABA-Standards wurden in Konzentrationen zwischen 0,001 g/L und 1 g/L eingesetzt.

## 2.5.4 Bestimmung intrazellulärer Metabolite mit LC-MS/MS

Metabolite des EMP-, des PPP-Weges und des TCA-Zyklus wurden mit LC-MS/MS bestimmt. Bei dieser Methode werden die einzelnen Substanzen zunächst durch Ionenaarchromatographie mit einem binären Gradientensystem aufgetrennt und anschließend mit vorangegangener Ionisierung mit Ionensprayionisation (ESI) im Massenspektrometer (Tripelquadrupol) analysiert. Dabei wird das Mutterion ( $[M-H]^-$ ) in zum Teil mehrere Bruchstücke fragmentiert, von denen das mit der höchsten Intensität für die Detektion verwendet wird. Mit diesem MRM-Modus (*multiple reaction monitoring*) wird sowohl die Selektivität als auch die Empfindlichkeit der Detektion erhöht. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Analyst 1.5. Der lineare Bereich liegt abhängig vom Metaboliten zwischen 25 nM und 100  $\mu$ mol [Luo et al., 2007]. Eine Übersicht über die gemessenen Metaboliten, die dazugehörigen Retentionszeiten sowie Fragmentierungen sind im Anhang A1 bzw. A2 zu finden.

**Tab. 2.17:** Übersicht über die Spezifikationen und Parameter des verwendeten LC-MS/MS-Systems.

Chromatographie-Teil	
Gerät	Agilent 1200 Series
Autosampler	ALS G1367B
Injektionsvolumen	10 $\mu$ L
Säule	Synergy Hydro-C18 150 $\times$ 2.1 mm, 4 $\mu$ m (Phenomenex)
Flussrate	200 $\mu$ L/min
Eluent A	Tributylamin (10 mM) } pH = 4,95
Eluent B	Essigsäure (15 mM)
	Methanol
Massenspektrometer-Teil	
Gerät	Applied Biosystems/MDS Sciex API4000
Ionisierung	Ionensprayionisation
Ionisierungsmodus	negativ

Auch  $^{13}\text{C}$ -markierte Metabolite wurden mit LC-MS/MS gemessen. Für die Bestimmung der Isotopomere der einzelnen  $^{13}\text{C}$ -markierten Metabolite mussten zusätzlich zum unmarkierten Übergang ( $m+0$ ) die markierten Übergänge ( $m+1$ ,  $m+2$ ,  $m+3$ ...) gemessen werden. Die Anzahl der Übergänge richtet sich nach der Anzahl der Kohlenstoffatome



im Metabolit. So ist im Zustand  $m+1$  beispielsweise 1 C-Atom im Molekül vorhanden, das  $^{13}\text{C}$ -markiert und somit eine Masseneinheit schwerer ist. Die genaue Position des  $^{13}\text{C}$ -markierten C-Atoms ist für die  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse nicht relevant.

Im Gegensatz zur Konzentrationsbestimmung war bei der Messung der  $^{13}\text{C}$ -Markierungen in den Metaboliten die Mitführung eines externen Standards nicht nötig, da in der späteren  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse lediglich die  $^{13}\text{C}$ -Markierungsverteilungen eingehen (s.a. Abschn. 2.8).

### **2.5.5 Bestimmung von Fructose**

Die Bestimmung von Fructose im Fermentationsüberstand erfolgte mit dem enzymatischen Testkit zur Bestimmung von Glucose/Fructose von Boehringer Mannheim (Roche).

### **2.5.6 Bestimmung von Ammonium**

Die Bestimmung des Ammonium-Gehalts in Kulturüberständen erfolgte mit einem Analysegerät der Firma Ortho-Clinical Diagnostics (Johnson & Johnson). Das Gerät nutzt gebrauchsfertige Plättchen, auf die 10  $\mu\text{L}$  Probe aufgetragen werden. In der Probe enthaltener Ammoniak diffundiert zunächst durch eine semipermeable Membran und reagiert anschließend mit Bromphenolblau zu einem Farbkomplex. Störende Substanzen können die Membran nicht passieren. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wird die Reflektionsdichte bei einer Wellenlänge von 605 nm gemessen. Die Kalibrierung erfolgte mit Ammonium-Standards zwischen 0 und 6 mg/L (Kalibrierlösung: Merck).

Nach einem Defekt des Analysegerätes der Firma Ortho-Clinical Diagnostics (Johnson & Johnson) wurde die Ammoniumkonzentration im Überstand mit Hilfe eines enzymatischen Testkits der Firma Boehringer Mannheim (Roche) bestimmt.

### **2.5.7 Bestimmung von Phosphat**

Die Messung des Gehalts an Orthophosphat wurde durch Umsetzung des Orthophosphates zu Phosphormolybdänblau und Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 750 nm erreicht. Orthophosphat reagiert unter saurem pH-Wert mit Natriummolybdat zu Phosphormolybdänsäure und wird mit einer Reduktionslösung zu Molybdänblau umgesetzt. Tab. 2.18 gibt einen Überblick über die verwendeten Reagenzien und Lösungen.

Für die Phosphatmessung wurde ein Phosphatstandard im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 750 mg/L verwendet. Die Proben wurden entsprechend verdünnt. Der Ab-

**Tab. 2.18:** Übersicht über die verwendeten Reagenzien und Lösungen zur Phosphatbestimmung in Kulturüberständen von *R. rubrum*.

Reagenz	Konzentration in g/L
<u>Bisulfit-Borat-Lösung:</u>	
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	18,05
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	19,83
<u>Molybdatlösung:</u>	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	24,2
Konz. Schwefelsäure	71,8 mL/L
<u>Reduktionslösung:</u>	
<i>p</i> -Methylaminophenolsulfat	10
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	30,4
<u>Sulfit-Carbonat-Lösung:</u>	
$\text{Na}_2\text{SO}_3$	6,9
$\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	114,0

lauf einer Messung wird im nachfolgenden Pipettierschema deutlich. Die Bestimmung erfolgte in 96-Well Mikrotiterplatten. Die Absorption wurde bei 750 nm mittels eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts (Biotek, PowerWave XS) gemessen.

**Tab. 2.19:** Schema über den Ablauf der Phosphatmessung in Kulturüberständen von *R. rubrum*.

	Volumen Reagenz in $\mu\text{L}$
Probe/Blank/Standard	10
Bisulfit-Borat-Lsg.	100
Molybdatlsg.	20
Reduktionslsg.	20
15 min bei Raumtemperatur inkubieren	
Sulfit-Carbonat-Lsg.	200
Mischen und 15 min bei Raumtemperatur inkubieren	
Messung bei 750 nm	

## 2.5.8 Bestimmung von PHB

Für die Extraktion wurden die abzentrifugierten Pellets lyophilisiert (Lyophilisator Christ-Alpha 1-2). Die Extraktion erfolgte durch Zugabe von 2 mL Dichlormethan und Kochen für 10 min bei 100 °C im Wasserbad. Anschließend wurden die Proben im Eisbad gekühlt und abzentrifugiert (5.000 rpm, 10 min, 4 °C, Thermo Scientific, HERAEUS

Biofuge Stratos). Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt. Der Extraktionsschritt wurde insgesamt dreimal durchgeführt und die einzelnen Überstände gesammelt. Überschüssiges Dichlormethan wurde durch Abdampfen entfernt.

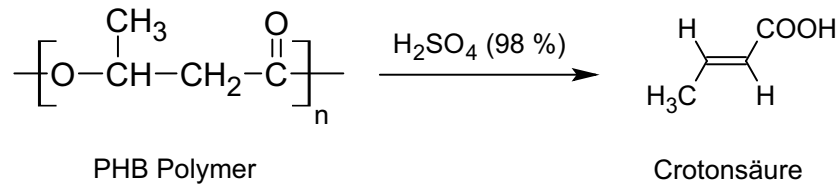


Abb. 2.5: Saure Hydrolyse durch  $\text{H}_2\text{SO}_4$  von PHB zu Crotonsäure.

Für die Hydrolyse des extrahierten PHB wurden 2 mL Schwefelsäure (98 %) zugeben und die Proben im siedenden Wasserbad für 30 min gekocht. Die bei der sauren Hydrolyse mit Schwefelsäure entstehende Crotonsäure zeigt bei 235 nm ein Absorptionsmaximum. Die Absorption kann photometrisch erfasst werden (Jasco Spectrophotometer V-560). Durch die Mitführung eines PHB-Standards über die Extraktionsschritte und die Hydrolyse ist eine Quantifizierung möglich [Law and Slepecky, 1961]. Der gemessene Gehalt an PHB wird stets in % (g PHB pro g Biotrockenmasse) angegeben.

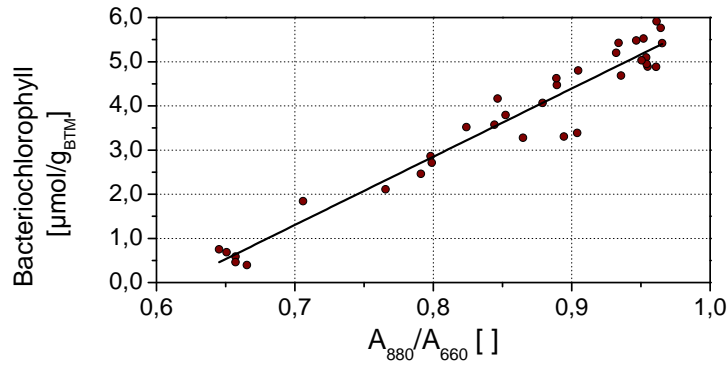
### 2.5.9 Bestimmung von Bacteriochlorophyll

Die Bestimmung des Bacteriochlorophyll-Gehalts erfolgte mit der Methode nach Cohen-Bazire et al. [1957] mit 2 mL Methanol:Aceton (2:7, v/v). Dabei wurden die Proben abgedunkelt, mit  $\text{N}_2$  überschichtet und für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 772 nm mittels einem Spektrophotometer (Jasco V-670) gemessen. Die Bacteriochlorophyll-Konzentration wurde mit dem Extinktionskoeffizienten von Bacteriochlorophyll in Methanol:Aceton (2:7, v/v) von  $75 \frac{\text{L}}{\text{cm} \cdot \text{mmol}}$  bestimmt [Clayton, 1966].

Für eine Berechnung der Bacteriochlorophyll-Konzentration aus  $A_{880}/A_{660}$ -Werten wurden alle gemessenen Bacteriochlorophyll-Konzentrationen in  $\mu\text{mol}/\text{g}_{BTM}$  gegen  $A_{880}/A_{660}$  aufgetragen und die Korrelation bestimmt.

Aus der Gleichung der linearen Regression (Regressionsfaktor: 0,9424) lässt sich somit relativ einfach und schnell der Bacteriochlorophyll-Anteil ( $\mu\text{mol}/\text{g}_{BTM}$ ) aus der während der Kultivierung gemessenen Absorption  $A_{880}/A_{660}$  bestimmen:

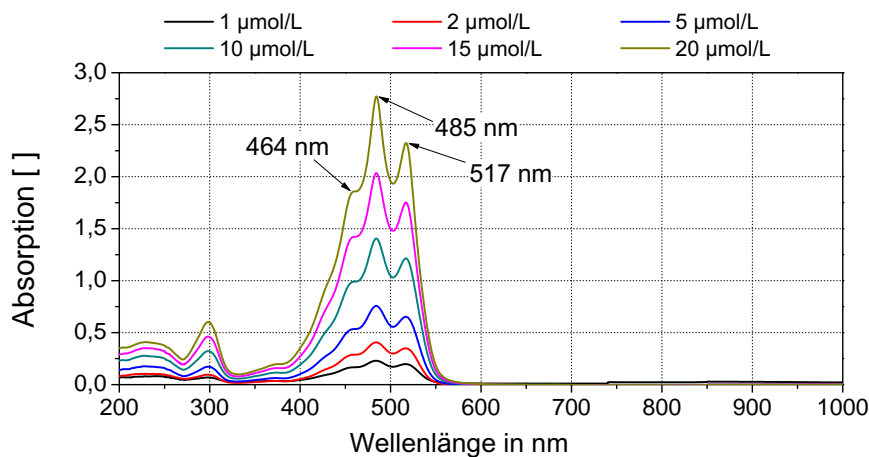
$$Bchl = 15,4467 \cdot \frac{A_{880}}{A_{660}} - 9,5091 \quad (2.3)$$



**Abb. 2.6:** Lineare Korrelation zwischen der gemessenen Absorption  $\frac{A_{880}}{A_{660}}$  und des Bacteriochlorophyll-Gehalts in  $\mu\text{mol/g}_{BTM}$ .

### 2.5.10 Bestimmung von Lycopin

Zur Entfernung von Bacteriochlorophyll und zum Zellaufschluss wurde eine 2-fache Extraktion mit je 2 mL 100 % Methanol durchgeführt. Durch die Zugabe von 2 mL Chloroform wurde das Lycopin extrahiert. Anschließend erfolgte nach Zentrifugation (15 min, 5.000 rpm, 4 °C, Thermo Scientific, HERAEUS Biofuge Stratos) eine spektrophotometrische Untersuchung durch Aufnahme eines Absorptionsspektrums. Zur Verringerung von Degradationsprozessen wurden die Proben während der Extraktionsschritte im Dunkeln und unter einer Stickstoff-Atmosphäre gelagert.



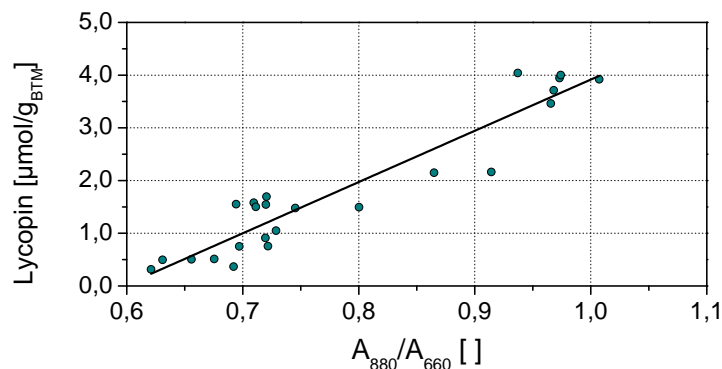
**Abb. 2.7:** Absorptionsspektren von Lycopin in Chloroform in verschiedenen Konzentrationen.

Abb. 2.7 zeigt Absorptionsspektren von Lycopinlösungen in verschiedenen Konzentrationsbereichen (1 bis 20  $\mu\text{mol/L}$ ) in Chloroform (Lycopin aus Tomate, Sigma-Aldrich, > 90 % Reinheit). Lycopin besitzt hier drei Absorptionsmaxima: bei 464 nm, 485 nm und bei 517 nm. Da bei 485 nm der Peak im Vergleich zu den Peaks bei 464 nm und 517 nm die größte Intensität besitzt, wurde der Extinktionskoeffizient für diese Wellenlänge bestimmt und für die Berechnung der Lycopinkonzentration verwendet. Der molare Extinktionskoeff-

fiziert beträgt für 485 nm  $139,66 \frac{L}{cm \cdot mmol}$ . Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten wurde die Lycopinkonzentration der Proben ermittelt.

Da Carotinoide in *R. rubrum* stets in einem bestimmten stöchiometrischen Verhältnis im LH-1 Komplex vorliegen, lässt sich auch der Lycopin-Anteil mit der gemessenen Absorption  $A_{880}/A_{660}$  linear korrelieren (Regressionsfaktor: 0,8977).

$$Lycopin = 9,7206 \cdot \frac{A_{880}}{A_{660}} - 5,8044 \quad (2.4)$$



**Abb. 2.8:** Lineare Korrelation zwischen der gemessenen Absorption  $\frac{A_{880}}{A_{660}}$  und des Lycopin-Gehalts in  $\mu\text{mol/g}_{BTM}$ .

### 2.5.11 Bestimmung von Coenzym Q<sub>10</sub>

Coenzym Q<sub>10</sub> (Ubiquinon) kann als reduzierte (Q<sub>10</sub>H<sub>2</sub>) und oxidierte (Q<sub>10</sub>) Form vorliegen. Beide Formen können mit Flüssigchromatographie (LC) bestimmt werden [Grammel and Ghosh, 2008]. Die Extraktion erfolgte 2-fach in Dichlormethan/Methanol (2:1, v/v). Die Extrakte wurden vereinigt und unter einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre eingedunstet. Der vollständig getrocknete Extrakt wurde in 1 mL Methanol/Isopropanol (4:1, v/v) aufgenommen und für die Messung filtriert (0,2 µm). Alle Proben wurden unverdünnt gemessen.

Tab. 2.20 gibt einen Überblick über das verwendete System. Die Quinone wurden mittels UV-vis DAD-Detektor bei 275 nm gemessen. Gleichzeitig wurden für die einzelnen Quinone charakteristische Spektren aufgezeichnet, anhand dessen neben der Retentionszeit eine eindeutige Zuordnung erfolgte. Die Retentionszeit für die reduzierte Form lag bei 4,40 min, die der oxidierten Form bei 6,17 min.

Der verwendete Q<sub>10</sub>-Standard (0,128 mg/mL) wurde in Methanol/Isopropanol (4:1) hergestellt und bei -20 °C gelagert. Für die Bestimmung der reduzierten Form wurde 1 mL des oxidierten Standards mit einer Spatelspitze KBH<sub>4</sub> versetzt. KBH<sub>4</sub> führte zur vollständigen Reduktion von Q<sub>10</sub> zu Q<sub>10</sub>H<sub>2</sub>.

**Tab. 2.20:** Spezifikationen der LC-Methode zur Bestimmung von oxidiertem und reduziertem Coenzym Q<sub>10</sub>.

Gerät	Agilent Series 1100
Autosampler	ALS G1329A (4 °C)
Injektionsvolumen	100 µL
Säule	Agilent Eclipse XD8-C8, 4,6×150 mm, 5 µm gekühlt auf 20 °C
Mobile Phase	Methanol/Isopropanol (4:1) mit 10 mM NH <sub>4</sub> Acetat
Elution	isokratisch
Flussrate	1,0 mL/min
Detektor	UV/vis-Detektor mit Diodenarray G1315B λ = 275 nm

### 2.5.12 Bestimmung von Vitamin B<sub>12</sub>

Vitamin B<sub>12</sub> wurde mit Hilfe eines Testkits von RIDASCREEN®FAST bestimmt, bei dem ein kompetitiver Immunoassay (ELISA) zur Anwendung kommt. Freies und enzymmarkiertes Vitamin B<sub>12</sub> konkurrieren um die spezifischen Vitamin B<sub>12</sub>-Antikörperbindstellen. Nach einem Waschschrift erfolgt die Zugabe von Substrat/Chromogenlösung, das durch gebundenes Enzymkonjugat in ein blaues Endprodukt (λ = 450 nm) umgewandelt wird. Die Extinktion der Lösung ist damit umgekehrt proportional zur Vitamin B<sub>12</sub>-Konzentration in der Probe [Manual].

### 2.5.13 Bestimmung von NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>

Für die Bestimmung der intrazellulären NAD(P)H- und NAD(P)<sup>+</sup>-Konzentration erfolgte zunächst die Extraktion von NAD(P)H und NAD(P)<sup>+</sup> aus getrennt abzentrifugierten Pellets (s.a. 2.4.6). NAD(P)H wurde basisch mit 0,2 M NaOH extrahiert, NAD(P)<sup>+</sup> wurde sauer mit 0,2 M HCl extrahiert. Das zugegebene Volumen richtete sich nach der vorliegenden BTM in der Probe. 500 µL wurden jeweils für 1 g<sub>BTM</sub>/L (Biomassekonzentration der Ausgangssuspension) verwendet. Anschließend wurden die Proben für 1 min bei 95 °C gekocht. Nach Abkühlen auf Eis wurden die Proben zentrifugiert (4 °C, 13.000 rpm, 10 min, Thermo Scientific, HERAEUS Fresco 17) und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 100 µL 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer für die basische Extraktion bzw. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer für die saure Extraktion, wurden die Proben neutralisiert.

Die Messung der NADH- bzw. NAD<sup>+</sup>-Konzentration erfolgte in Mikrotiterplatten mit Hilfe der Alkohol-Dehydrogenase vermittelten Umsetzung von Ethanol zu Acetaldehyd. NAD<sup>+</sup> wird dabei zu NADH reduziert. NADH wird nachfolgend durch die Reaktion mit

oxidierten PES<sub>oxid.</sub> (5-Ethylphenazinium-ethyl-sulfat) zu NAD<sup>+</sup> regeneriert und PES<sub>red.</sub> reduziert. Das reduzierte PES reagiert wiederum mit der oxidierten Form von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT), die dadurch reduziert wird. Dadurch findet ein Farbumschlag von gelb (MTT<sub>oxid.</sub>) auf violett (MTT<sub>red.</sub>) statt, der photometrisch bei 570 nm erfasst werden kann.

NADPH bzw. NADP<sup>+</sup> wurde mit Hilfe der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase Reaktion gemessen. NADP<sup>+</sup> wird durch die G6P-DH (Roche, 140 U/mg) zu NADPH reduziert. Die nachfolgenden Schritte sind analog zur Bestimmung von NADH/NAD<sup>+</sup> (s.a. Tab. 2.21). Die Methode wurde nach Bernofsky and Swan [1973] und Zerez et al. [1987] modifiziert.

Das nachfolgende Schema verdeutlicht den Ablauf der Messung. Der Puffer bestand aus 0,1 M HEPES und 2 mM EDTA und wurde mit NaOH auf pH = 7,6 eingestellt. HEPES/EDTA-Puffer, MTT, PES und ADH wurden als Master-Mix zur Probe/Blank/Standard pipettiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 5 min bei 30 °C im Thermo-Mixer bei 650 rpm. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µL Ethanol (10 %) gestartet und die Zunahme der Absorption bei 570 nm aufgezeichnet (Biotek, PowerWave XS).

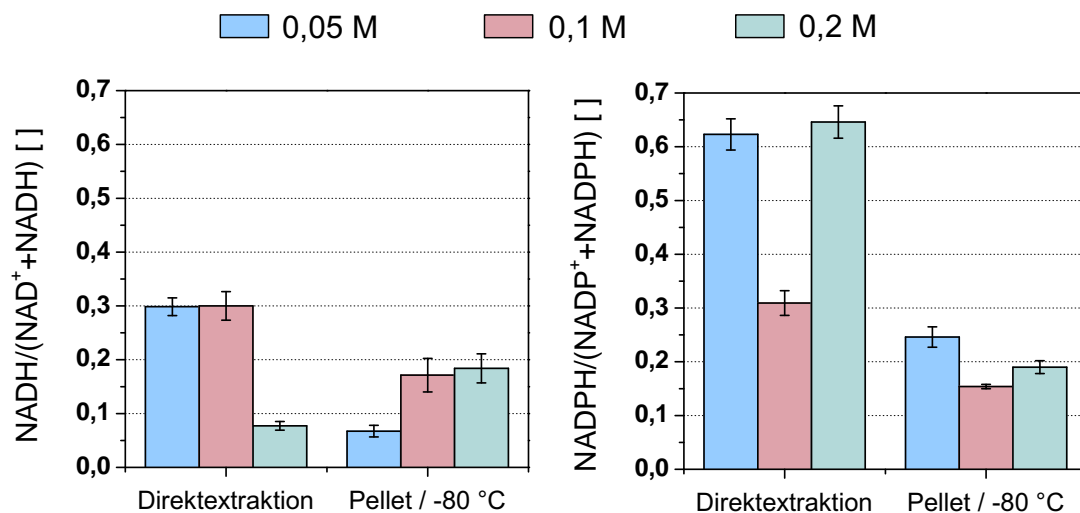
Die Notwendigkeit einer Quenching-Prozedur im Zuge einer Direktextraktion mit HCl bzw. NaOH zur Bestimmung von NAD(P)<sup>+</sup> und NAD(P)H wurde untersucht, da die Direktextraktion die sofortige Messung im Anschluss an die Probennahme erfordert. Die Möglichkeit einer Lagerung bis zur Extraktion und Messung dagegen wäre besonders bei einer größeren Anzahl von Proben von Vorteil. Die Probennahme würde in diesem Fall durch Abzentrifugieren einer 2 mL-Probe bei 4 °C, Verwerfen des Überstandes und Einfrieren des Pellets bei -80 °C erfolgen (s.a. 2.4.6).

**Tab. 2.21:** Pipettierschema der Messung von NAD<sup>+</sup>/NADH mit ADH für die 96-Well-Mikrotiterplatte.

Substanz	Volumen in µL
HEPES/EDTA-Puffer	60
MTT (3,48 mg/mL)	9
PES (11,1 mg/mL)	9
ADH (300 U/mg)	2
Probe/Blank/Standard	100

Die Ergebnisse sind in Abb. 2.9 zu sehen. Die Bestimmung von NADH und NAD<sup>+</sup> erfolgte hierbei als 6-fache Bestimmung bei einer einzigen Probennahme. Die Cofaktoren der Direktextraktion wurden sofort nach Probennahme gemessen. Die Pellets wurden bei

-80 °C eingefroren und nach 6 Tagen extrahiert und gemessen.



**Abb. 2.9:** NADH- und NADPH-Verhältnisse bei verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Extraktionsmittels bei Direktextraktion und bei -80 °C eingefrorenen Pellets.

Zu beobachten ist ein generell niedrigeres NADH-Verhältnis, wenn die Proben als Pellets bei -80 °C eingefroren werden, das auf eine geringere Konzentration von NADH und eine geringfügig geringere Konzentration von  $NAD^+$  zurückzuführen ist. Möglich ist z.B. eine Weiterstoffwechslung von NADH durch das Abzentrifugieren bei 4 °C oder eine Degradation von NADH. Eine Oxidation zu  $NAD^+$  durch eine leichte Acidität des Pellets ist möglich, obwohl die Konzentration von  $NAD^+$  im Vergleich zur Direktextraktion nicht erhöht war. Dem gegenüber steht ein bei 0,05 M und 0,1 M konstant gemessenes Verhältnis ( $\frac{NADH}{NADH+NAD^+} = 0,30$  [ ]) bei der direkten Extraktion. Wird die Konzentration allerdings auf 0,2 M erhöht findet sich ein vielfach geringeres NADH-Verhältnis wieder ( $\frac{NADH}{NADH+NAD^+} = 0,08$  [ ]). Dieser Effekt tritt bei der Pellet-Methode nicht auf. Hier sind jedoch 0,05 M wahrscheinlich zu gering, um vor allem NADH effektiv zu extrahieren. Es werden nur etwa 13 % der NADH-Konzentration der Direktextraktion gemessen. Da beide Methoden Vor- und Nachteile aufweisen, der zeitliche Aufwand bei der Pellet-Methode jedoch erheblich reduziert werden kann, wurde für alle NADH- und  $NAD^+$ -Bestimmungen die Pellet/-80 °C-Methode angewandt. Für die Auswertung wurde dabei ein  $NAD^+$ -Verlust von  $39,07 \pm 9,76$  % und ein NADH-Verlust von  $67,45 \pm 3,75$  % eingerechnet und damit die falsch-niedrigen NADH-Verhältnisse korrigiert. Für  $NADP^+$ -Konzentrationen aus eingefrorenen Pellets wurden dagegen um ca. 84,73 % höhere Werte bei 0,2 M Extraktion gemessen im Vergleich zur Direktextraktion, bei ähnlichen NADPH-Konzentrationen ergeben sich somit für die Direktextraktionen sehr viel höhere  $NADPH/NADP^+$ -Verhältnisse (s.a. Tab. 2.9). Da der fehlende Quenching-Schritt bei der Pellet/-80 °C-Methode die wahrscheinlichste Ursache für den oxidierten  $NADP^+$ -Pool ist, wurden auch für die Be-



stimmung der NADPH-Verhältnisse aus Pelletproben die errechneten Werte um die Differenz der NADPH-Verhältnisse (bei 0,2 M durchgeführte Direktextraktion) korrigiert.

### 2.5.14 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde für Bestimmungen von Enzymaktivitäten benötigt und mittels Bradford bestimmt. Die Zusammensetzung des Bradford-Reagenzes ist in Tab. 2.22 ersichtlich.

**Tab. 2.22:** Zusammensetzung des Bradford-Reagenz.

Substanz	Menge in mL
Coomassie brilliant blue G-250	100 mg/L
95 % Ethanol	50
85 % Phosphorsäure	100
Milli-Q Wasser	auf 1 auffüllen

Dazu wurde der Zellaufschluss zunächst zentrifugiert (5.000 rpm, 4 °C, 10 min, Thermo Scientific, HERAEUS Biofuge Stratos) und der Überstand abgenommen. Anschließend wurden 5 µL des Überstandes mit 250 µL Bradford-Reagenz in einer 96-Well-Mikrotiterplatte gemischt und die Absorption bei 595 nm gemessen (Biotek, PowerWave XS). Als Standard diente BSA (Bovines Serum Albumin) zwischen 25-750 mg/L. Die Proteinbestimmung wurde nach Angaben von Bradford [1976] durchgeführt.

## 2.6 Bestimmung von enzymatischen Aktivitäten

### 2.6.1 Bestimmung der Crotonyl-CoA

#### Carboxylase/Reduktase-Aktivität

Die Bestimmung der CCR-Aktivität erfolgte nach Erb et al. [2007]. Der Zellaufschluss wurde in 100 mM Tris-HCl-Puffer (pH = 7,90) mittels Ultraschall (Bandelin-SONOPULS Homogenisator HD2200) durchgeführt. Dazu wurde die Zellprobe zunächst abzentrifugiert (5.000 rpm, 4 °C, 15 min, Thermo Scientific, HERAEUS Biofuge Stratos) und in 5 mL Tris-HCl-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte der Aufschluss mit 10 Durchläufen (30 s, Power 25-30 %, 5x10 % Zyklen).

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte in 500 µL-Küvetten mit einer Schichtdicke von 0,2 cm. Im Reaktionsansatz befanden sich 4 mM NADPH, 2 mM Crotonyl-CoA, 100 mM Tris-HCl (pH = 7,90), 33 mM NaHCO<sub>3</sub> und das entsprechende Volumen Zellysat.

Die Proteinmenge im Ansatz lag je nach Zellaufschluss zwischen 0,04-0,8 mg Protein. Das Gesamtvolumen von 400  $\mu\text{L}$  wurde durch Auffüllen mit Milli-Q Wasser hergestellt. Die Absorptionsabnahme wurde gegen einen Referenzansatz gemessen, der kein Crotonyl-CoA enthielt, um unspezifische NADPH-verbrauchende Reaktionen abzuziehen.

### 2.6.2 Bestimmung der Citramalatsynthase-Aktivität

Die Aktivität der Citramalatsynthase wurde nach Filatova et al. [2005] bestimmt und erfolgte durch die Pyruvat-abhängige Umsetzung von Acetyl-CoA in Gegenwart von 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)(DTNB). Der Farbstoff DTNB reagiert mit frei werdenden SH-Gruppen des Coenzym A und kann bei 412 nm quantifiziert werden.

Für die Reaktion wurden die Zellen anaerob in einem mit  $\text{N}_2$  durchströmten Plastikzelt geerntet und aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgte mit 50 mM MOPS-Puffer (pH = 8,0) und wurde wie unter Abschn. 2.6.1 beschrieben mit Ultraschall durchgeführt.

Der Reaktionsansatz enthielt 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM  $\text{MnCl}_2$ , 1 mM Acetyl-CoA und 0,5 mg/mL Protein enthalten. Das Gesamtvolumen betrug 500  $\mu\text{L}$ . Beim Referenzansatz wurde auf Acetyl-CoA verzichtet, so dass unspezifische Hintergrundreaktionen mit DTNB automatisch von der Absorption des Reaktionsansatzes abgezogen wurden. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 20 mM Pyruvat gestartet. Alle 5 min wurden 50  $\mu\text{L}$  des Reaktions- und Referenzansatzes in je 1 mL Tris/HCl-Puffer mit 0,4 mM DTNB (pH = 7,8) gegeben und sofort die Absorption bei 412 nm gemessen. Die Messung erfolgte in Standardküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm in einem Spektrophotometer (Jasco, V-670).

### 2.6.3 Bestimmung der Malat-Dehydrogenase-Aktivität

Die Aktivität der Malat-Dehydrogenase wurde nach Angaben von Bergmeyer and Bernt [1974] durchgeführt.

## 2.7 Beurteilung der Produktbildung

Um die Entwicklung und Verbesserungen der Prozesse zu charakterisieren und zu vergleichen, wurde verschiedene Raten und Ausbeutekoeffizienten berechnet.

$\mu_{exp}$  - Die Wachstumsrate  $\mu$  beschreibt die Geschwindigkeit des Wachstums einer Bakterienpopulation und wurde nach folgender Gleichung aus der exponentiellen Wachstumsphase berechnet:

$$\mu = \frac{\ln X_1 - \ln X_0}{t_1 - t_0} \quad (2.5)$$

$q_P$  - ist die spezifische Produktbildungsrate. Sie gibt an, welche Menge Produkt pro Biomasse in einem definierten Zeitraum produziert wird.

$$q_P = \frac{P_1 - P_0}{(X_1 - X_0)(t_1 - t_0)} \quad (2.6)$$

$q_S$  - ist die spezifische Substrataufnahmerate. Sie gibt an, welche Menge Substrat pro Biomasse und Zeit aufgenommen worden ist.

$$q_S = \frac{S_1 - S_0}{(X_1 - X_0)(t_1 - t_0)} \quad (2.7)$$

**RZA** - ist die volumetrische Produktivität (Raum-Zeit-Ausbeute). Sie gibt an, welche Menge Produkt pro Volumen in einem definierten Zeitraum produziert wird. P kann hierbei sowohl ein extrazellulär ausgeschiedenes oder intrazellulär vorkommendes Produkt als auch die Produktion von Biomasse sein.

$$RZA = \frac{P_1 - P_0}{(V)(t_1 - t_0)} \quad (2.8)$$

$Y_{(X/S)}$  - stellt die Biomasse X bezogen auf die Menge an verbrauchtem Substrat S dar (Biomasseausbeutekoeffizient).

$$Y_{(X/S)} = \frac{X_1 - X_0}{S_1 - S_0} \quad (2.9)$$

$Y_{(P/S)}$  - gibt die produzierte Produktmenge bezogen auf die verbrauchte Menge Substrat an (Produkt/Substrat-Ausbeutekoeffizient).

$$Y_{(P/S)} = \frac{P_1 - P_0}{S_1 - S_0} \quad (2.10)$$

$Y_{(P/X)}$  - beschreibt die produzierte Produktmenge bezogen auf die produzierte Biomasse (Produkt/Biomasse-Ausbeutekoeffizient).

$$Y_{(P/X)} = \frac{P_1 - P_0}{X_1 - X_0} \quad (2.11)$$

Die Bestimmung von Biomasse/Substrat-Ausbeutekoeffizienten im Rahmen dieser Arbeit erfolgte durch lineare Regression der am Ende der exponentiellen Wachstumsphase erreichten Biomassekonzentration und der eingesetzten Substratkonzentration. Für die lineare Regression wurden jeweils mindestens 5 Versuche herangezogen.

X	Biomasse in $g_{BTM}$
S	Substrat
P	Produkt
t	Zeit in h
V	Volumen in L

### Bestimmung von *CTR*-Werten

Berechnung der volumenbezogenen CO<sub>2</sub>-Abgabe:

$$CTR \left[ \frac{mmol}{L \cdot h} \right] = \frac{Begasungsrate \left[ \frac{L}{h} \right]}{V [L] \cdot 22,414 \left[ \frac{L}{mol} \right]} \cdot \frac{CO_2\_off [\%]}{100} \cdot 1000 \quad (2.12)$$

Berechnung der biomassebezogenen CO<sub>2</sub>-Abgabe:

$$CTR \left[ \frac{mmol}{g_{BTM} \cdot h} \right] = \frac{Begasungsrate \left[ \frac{L}{h} \right]}{X \left[ \frac{g_{BTM}}{L} \right] \cdot V [L] \cdot 22,414 \left[ \frac{L}{mol} \right]} \cdot \frac{CO_2\_off [\%]}{100} \cdot 1000 \quad (2.13)$$

### Monod-Kinetik und Lineweaver und Burk

Mit Hilfe der Monod-Kinetik und Lineweaver und Burk wurden die kinetische Parameter  $\mu_{max}$ ,  $K_s$  für Ammonium und Phosphat bestimmt. Die Monod-Kinetik lautet:

$$\mu(S) = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_s + S} \quad (2.14)$$

S	Substrat in g/L bzw. mM
$K_s$	Monod-Konstante in g/L bzw. mM
$\mu$	Wachstumsrate in $h^{-1}$
$\mu_{max}$	Maximale Wachstumsrate in $h^{-1}$

Die Bestimmung von  $\mu$  erfolgte durch lineare Regression der logarithmisch aufgetragenen Biomassekonzentrationen über der Zeit während der exponentiellen Wachstumsphase. Anschließend erfolgte die reziproke Auftragung von  $\mu$  gegen S und, durch die Anlegen einer Asymptote, die Bestimmung von  $\mu_{max}$  aus dem Schnittpunkt der y-Achse bzw.  $K_s$  aus dem Anstieg (s.a. Gl. 2.15).

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{max}} \quad (2.15)$$

## 2.8 Modellierung

### CellNetAnalyzer

Mit Hilfe des mathematischen Tools *CellNetAnalyzer* lassen sich metabolische Netzwerke definieren und anschließend in einer Anwender-freundlichen Umgebung strukturell und funktionell analysieren. Der *CellNetAnalyzer* ist dabei als Paket in Matlab eingebunden [Klamt et al., 2007, 2003]. Es erlaubt die Bestimmung von intrazellulären Stoffflüssen unter stationären Bedingungen sowie deren Optimierung und metabolische Pfadanalyse durch die Berechnung von Elementarmoden (stöchiometrische Netzwerkanalyse). So ist zum Beispiel die Bestimmung einer theoretisch maximalen Produktausbeute eines bestimmten Stoffwechselmetaboliten möglich. Darüber hinaus ist auch die Identifizierung von Abflussengpässen im Stoffwechsel möglich. Auch die Einflüsse und Auswirkungen einer entsprechende Deletionsmutante können vorhergesagt werden.

Als Grundlage wurde das von Hädicke et al. [2011] aufgestellte Stoffwechselnetzwerk verwendet, das für ein Großteil der theoretischen Untersuchungen auf den Fructose-Metabolismus im Dunkeln reduziert wurde (s.a. Abschn. 3.7.2). Die Analysen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe: „Analysis and Redesign of biological networks“ am Max-Planck-Institut für komplexe dynamische Systeme, Magdeburg durchgeführt.

Lineare Optimierungen wurden durchgeführt, um theoretische Produktausbeutekoeffizienten zu ermitteln. Zur Lösung linearer Optimierungen wurde innerhalb des *CellNetAnalyzers* GLPKMEX verwendet. GLPKMEX stellt dabei das Matlab MEX-Interface für die GLPK-Bibliothek dar (GLPK: GNU linear programming kit). Die Zielfunktion stellte die zu maximierende Funktion bzw. die zu optimierende Stoffwechselreaktion dar.

Die Elementarmoden stöchiometrischen Netzwerkes von *R. rubrum* [Hädicke et al., 2011] wurden zum einen berechnet, um die theoretisch maximalen Ausbeuten aus der linearen Optimierung zu bestätigen und zum anderen, um eventuell vorhandene Alternativrouten zu den Produkten zu identifizieren. Auch unter Umständen vorhandene essenzielle Reaktionen für die Maximierung eines bestimmten Produkts können so aufgezeigt werden.

### <sup>13</sup>C-Stoffflussanalyse

<sup>13</sup>C-Stoffflussanalysen wurden mit Hilfe des Software Toolkits 13CFLUX bewerkstelligt. Dafür wurde ein Atomtransitionsnetzwerk speziell für *R. rubrum* aufgestellt und extrazelluläre Aufnahme- und Ausscheideraten bestimmt (vgl.a. Abschn. 3.1.1, 3.7.1.3). Mit Hilfe dieser beiden Informationen und gemessenen intrazellulären <sup>13</sup>C-Markierungsdaten ist die Quantifizierung intrazellulärer Kohlenstoffflüsse möglich [Wiechert et al.,

2001]. Für die intrazellulären Markierungsdaten wurden intrazelluläre Quenching-Proben wie in Abschn. 2.4.6 genommen und nach der Aufarbeitung die  $^{13}\text{C}$ -Markierungen mit LC-MS/MS gemessen (s.a. Abschn. 2.5.4). Die so erhaltenen  $^{13}\text{C}$ -Markierungsverhältnisse der einzelnen Isotopomere wurden direkt für die Modellierung der intrazellulären Stoffflüsse verwendet. Die Modellierung der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe: „Analysis and Redesign of biological networks“ am Max-Planck-Institut für komplexe dynamische Systeme, Magdeburg durchgeführt.

Für die Fluss schätzung kam ein iteratives Verfahren zur Anwendung, womit die Differenz zwischen gemessenen und simulierten Daten minimiert wurde (Methode der kleinsten Fehlerquadrate). Das Residuum stellt die Summe dieser Fehlerquadrate dar (vgl.a. Gl. 2.16). Die Gleichung ist Wiechert et al. [1997] entnommen. Je kleiner das Residuum, um so kleiner die Abweichung zwischen Messdaten und Modell. Die Methode wird im Detail bei Wiechert and de Graaf [1997]; Wiechert et al. [1997] beschrieben. Für die Berechnung von Standardabweichungen ist eine etablierte Methode die lineare Abschätzung des nichtlinearen Gleichungssystems unter der Voraussetzung normalverteilter Messungen zur Fluss schätzung [Wiechert et al., 1997].

$$Residuum = \left\| w - (M_w, -M_w) \cdot \Phi \circ \Phi_{\beta}^{[0,1]} \circ \Phi(n^{frei}) \right\|_{\sum w}^2 + \left\| y - M_y \cdot \Gamma \circ \Phi \circ \Phi_{\beta}^{[0,1]} \circ \Phi(n^{frei}) \right\|_{\sum y}^2 \quad (2.16)$$

w	Vektor der gemessenen Nettoflüsse
y	Vektor der gemessenen $^{13}\text{C}$ -Markierungen
$M_w$	Matrix der Nettoflüsse
$M_y$	Matrix der $^{13}\text{C}$ -Markierungen

Zur Visualisierung biochemischer Netzwerke und Stoffflüsse in *R. rubrum* wurde das Programm Omix 1.3.4 benutzt [Droste et al., 2010].

# 3 Ergebnisse und Diskussion

## 3.1 Optimierung verschiedener Parameter für das aerobe Wachstum

Für das Wachstum unter aeroben Bedingungen im Dunkeln sollte zunächst das von Ghosh et al. [1994] entwickelte Batch-Medium hinsichtlich der Kohlenstoff- und Stickstoffquelle sowie des Phosphat-, Vitamin- und *p*-Aminobenzoesäure-Bedarfs optimiert werden. Ziel war es, geeignete Zufütterungsstrategien für Fedbatch-Kultivierungen zu finden. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Gelöstsauerstoffkonzentration sowie der CO<sub>2</sub>-Zufuhr untersucht. Für das schnelle Erreichen hoher Zelldichten und der damit verbundenen Raum-Zeit-Ausbeuten (*RZA*) ist eine geeignete Festlegung der genannten Prozessparameter essenziell.

### 3.1.1 Optimierung einzelner Nährstoffbestandteile

Ausgehend vom optimierten Sistrohm-Medium (Ghosh et al. [1994]) erfolgte die Optimierung einzelner Nährstoffbestandteile für aerobe Fedbatch-Kultivierungen. Dazu gehörten die Kohlenstoffquelle (Succinat, Fructose, Acetat), die Stickstoffquelle (Ammonium, Glutamat, Aspartat), die Phosphatmenge sowie der Bedarf an Vitaminen und *p*-Aminobenzoesäure. Ziel war es zum einen die Zusammensetzung des Batch-Mediums zu verbessern und zum anderen inhibitorische Konzentrationen zu finden, welche sich im Fedbatch-Prozess durch eine Verringerung der Wachstumsrate und damit einer geringeren Biomassebildung äußern würden.

#### Kohlenstoffquellen

Für die aerobe Kultivierung von *R. rubrum* ist der Einsatz verschiedener C-Quellen denkbar. Als Einzelsubstrate eignen sich Succinat, Acetat und Fructose. Als Mischsubstrate wurden Succinat/Fructose und Acetat/Fructose untersucht. In Tab. 3.1 sind die wachstumsbeschreibenden Parameter, Wachstumsrate, Substrataufnahmerate sowie Biomasseausbeutekoeffizient, für die genannten Einzelsubstrate angegeben.

Beim Wachstum auf Acetat bzw. Fructose ist die Zufuhr von CO<sub>2</sub> notwendig. Ohne CO<sub>2</sub> war kein Wachstum zu verzeichnen (s.a. Abschn. 3.1.3). Beim Vergleich der Wachstumsraten fällt auf, dass das Wachstum auf Acetat mit  $\mu_{exp} = 0,052 \text{ h}^{-1}$  nur sehr langsam

war. Im Vergleich dazu waren die Wachstumsraten für Succinat und Fructose höher. Die höchste Wachstumsrate der Einzelsubstrate erzielte Succinat mit  $\mu_{exp} = 0,123 \text{ h}^{-1}$ .

Allerdings war die Biomasseausbeute bei Fructose als C-Quelle mit  $Y_{(X/S)} = 0,437 \frac{g_{BTM}}{g_{Substrat}}$  am höchsten. Der Grund für die hohe Biomasseausbeute im Vergleich zu Succinat bei gleicher Wachstumsrate lag bei höheren  $\text{CO}_2$ -Ausscheideraten beim Wachstum auf Succinat. Der  $\text{CO}_2$ -Abgaberate (*carbon dioxide transfer rate, CTR*) war mit  $CTR = 4,36 \frac{mmol_{\text{CO}_2}}{g_{BTM} \cdot h}$  1,7-mal höher als auf Fructose ( $CTR = 2,51 \frac{mmol_{\text{CO}_2}}{g_{BTM} \cdot h}$ ) (vgl.a. Tab. 3.1). Somit ging ein Großteil des aufgenommenen Kohlenstoffs in Form von  $\text{CO}_2$  verloren und wurde nicht für die Bildung von Biomasse verwendet. Im Gegensatz dazu fiel die  $\text{CO}_2$ -Abgaberate von Acetat mit  $0,74 \frac{mmol_{\text{CO}_2}}{g_{BTM} \cdot h}$  sehr gering aus, was vermutlich an der geringen Wachstumsrate ( $\mu = 0,052 \text{ h}^{-1}$ ) auf Acetat lag.

**Tab. 3.1:** Wachstumsraten, Substrataufnahmeraten und Biomasseausbeutekoeffizienten für die Einzelsubstratmedien M2A, M2S und M2F unter aeroben Sauerstoffbedingungen im Dunkeln (5 %  $p\text{O}_2$ ). Bei Acetat und Fructose: 5 %  $\text{CO}_2$ . Alle Ergebnisse aus jeweils 3 unabhängigen Kultivierungen. DASGIP-Fermentationsparameter.

	Acetat	Succinat	Fructose
Wachstumsrate $\mu_{exp} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$0,052 \pm 0,017$	$0,123 \pm 0,001$	$0,109 \pm 0,001$
$q_S \left( \frac{mmol_{Substrat}}{g_{BTM} \cdot h} \right)$	$1,58 \pm 0,23$	$2,65 \pm 0,34$	$1,35 \pm 0,12$
$q_C \left( \frac{mmol_C}{g_{BTM} \cdot h} \right)$	$3,26 \pm 0,49$	$10,60 \pm 1,53$	$8,30 \pm 0,75$
$Y_{(X/S)} \left( \frac{g_{BTM}}{g_{Substrat}} \right)$	$0,137 \pm 0,001$	$0,350 \pm 0,024$	$0,437 \pm 0,022$
$Y_{(X/S)} \left( \frac{g_{BTM}}{mmol_{Substrat}} \right)$	$0,014 \pm 0,000$	$0,041 \pm 0,003$	$0,079 \pm 0,004$
$CTR \left( \frac{mmol_{\text{CO}_2}}{g_{BTM} \cdot h} \right)$	$0,74 \pm 0,08$	$4,36 \pm 0,36$	$2,51 \pm 0,03$

Für Fedbatch-Kultivierungen mit Einzelsubstraten eignet sich daher Fructose am besten als C-Quelle. Die Wachstumsrate war mit  $\mu_{exp} = 0,109 \text{ h}^{-1}$  nur geringfügig kleiner als auf Succinat ( $\mu_{exp} = 0,123 \text{ h}^{-1}$ ) und die Biomasseausbeute war deutlich höher mit Fructose als C-Quelle.

In Tab. 3.2 sind die wachstumsbeschreibenden Parameter für die Mischsubstrate Succinat/Fructose bzw. Acetat/Fructose zu sehen. Auch für die Kultivierung auf Acetat/Fructose-Mischsubstrat war die Supplementation von  $\text{CO}_2$  notwendig. Mit 5 %  $\text{CO}_2$  in der Zuluft wurde eine Wachstumsrate von  $\mu_{exp} = 0,122 \text{ h}^{-1}$  erreicht. Mit Succinat/Fructose war allerdings ohne die Zuführung von  $\text{CO}_2$  mit  $\mu_{exp} = 0,156 \text{ h}^{-1}$  eine höhere Wachstumsrate möglich. Auch die Biomasseausbeute war auf Succinat/Fructose-Mischsubstrat mit  $Y_{(X/S)} = 0,432 \frac{g_{BTM}}{g_{Substrat}}$  höher als auf Acetat/Fructose-Mischsubstrat ( $Y_{(X/S)} = 0,299 \frac{g_{BTM}}{g_{Substrat}}$ ). Der Grund hierfür ist die vermehrte PHB-Bildung bei Acetat/Fructose. Auf Acetat/Fructose wurde, im Vergleich zu 1,5 % bei Succinat/Fructose, 10,1 % ge-



bildet. Die erhöhte PHB-Akkumulation führt zu der Verminderung der Biomasseausbeute. Zusätzlich negativ auf die Biomasseausbeute auf Acetat/Fructose wirkt sich die relativ hohe CO<sub>2</sub>-Abgaberate ( $4,77 \frac{\text{mmolCO}_2}{\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h}}$ ) im Vergleich zu Succinat/Fructose ( $3,96 \frac{\text{mmolCO}_2}{\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h}}$ ) aus.

Im Gegensatz zu *C. glutamicum* ging das Wachstum auf Fructose in *R. rubrum* nicht mit der Ausscheidung von *overflow*-Metaboliten wie Lactat oder DHAP einher [Dominguez et al., 1998].

**Tab. 3.2:** Wachstumsraten, Substrataufnahmeraten und Biomasseausbeutekoeffizienten für die Mischsubstratmedien M2SF und M2AF unter aeroben Bedingungen im Dunkeln (5 % pO<sub>2</sub>). Bei Acetat/Fructose: 5 % CO<sub>2</sub>. Alle Ergebnisse aus jeweils 3 unabhängigen Kultivierungen. DASGIP-Fermentationsparameter.

	Succinat/Fructose	Acetat/Fructose
Wachstumsrate $\mu_{exp}$ (h <sup>-1</sup> )	0,156 ± 0,007	0,122 ± 0,002
$q_{\text{Succinat}}$ ( $\frac{\text{mmol}_{\text{Succ}}}{\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h}}$ )	2,004 ± 0,152	–
$q_{\text{Fructose}}$ ( $\frac{\text{mmol}_{\text{Fruc}}}{\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h}}$ )	0,729 ± 0,097	0,576 ± 0,094
$q_{\text{Acetat}}$ ( $\frac{\text{mmol}_{\text{Ace}}}{\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h}}$ )	–	1,905 ± 0,453
$q_{\text{C}}$ ( $\frac{\text{mmol}_{\text{C}}}{\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h}}$ )	12,39 ± 0,76	7,81 ± 0,66
$Y_{(X/S)}$ ( $\frac{\text{g}_{\text{BTM}}}{\text{g}_{\text{Substrat}}}$ )	0,432 ± 0,015	0,299 ± 0,016
$Y_{(X/S)}$ ( $\frac{\text{g}_{\text{BTM}}}{\text{mmol}_{\text{Substrat}}}$ )	0,054 ± 0,004	0,036 ± 0,004
$CTR$ ( $\frac{\text{mmolCO}_2}{\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h}}$ )	3,96 ± 0,37	4,77 ± 0,46

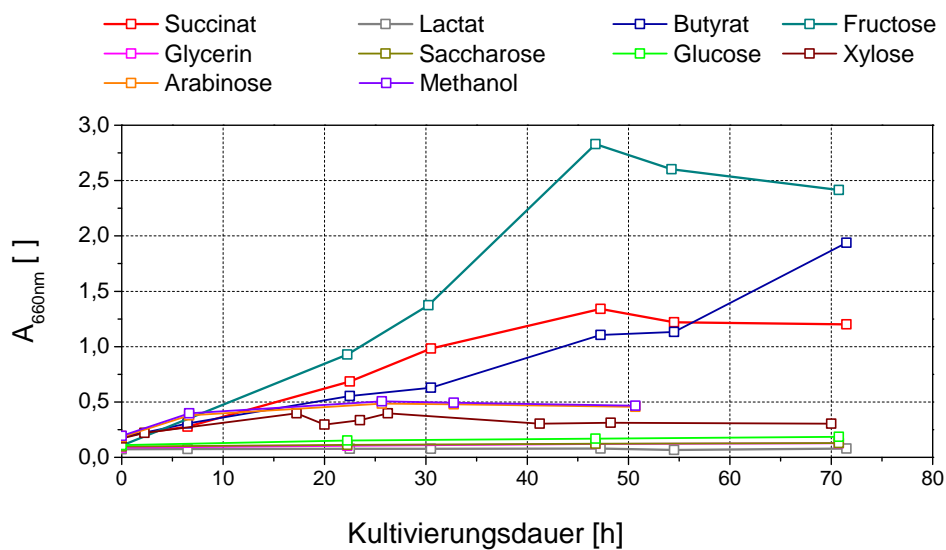
Als Kohlenstoffquellen wären demnach Fructose als Einzelsubstrat und Succinat/Fructose im Mischsubstrat am besten für aerobe Fedbatch-Kultivierungen geeignet. Diese Substrate erzielten hohe Wachstumsraten mit hohen Biomasseausbeuten ( $\mu_{exp} = 0,156 \text{ h}^{-1}$  bzw.  $Y_{(X/S)} = 0,437 \frac{\text{g}_{\text{BTM}}}{\text{g}_{\text{Substrat}}}$ ).

Im Vergleich zu bereits etablierten Mikroorganismen in der Biotechnologie muss allerdings festgestellt werden, dass *R. rubrum* ein vergleichsweise langsames Wachstum aufweist. *E. coli* beispielsweise weist, abhängig von der C-Quelle, Wachstumsraten zwischen  $\mu_{exp} = 0,3 \text{ h}^{-1}$  bis  $\mu_{exp} = 0,89 \text{ h}^{-1}$  auf [Andersen and von Meyenburg, 1980]. Auch *C. glutamicum*, das für die Produktion von verschiedenen Aminosäuren verwendet wird [Binder and Hanke, 2011], wächst auf Glucose mit  $\mu_{exp} = 0,35 \text{ h}^{-1}$  und auf Acetat mit  $\mu_{exp} = 0,30 \text{ h}^{-1}$  schneller als *R. rubrum* [Netzer et al., 2004]. Besonders auffällig ist der große Unterschied in der Wachstumsrate bei ausschließlicher Verwendung von Acetat. Hier weist *R. rubrum* eine 7-fach geringere Wachstumsrate im Vergleich zu *E. coli* und *C. glutamicum* auf. Gleichzeitig wird mit 34,3 % die höchste Menge PHB akkumuliert. Die Ursachen dafür liegen vermutlich in einem komplett anders organisierten Zentralstoffwechsel beim Wachstum auf Acetat, da *R. rubrum* im Gegensatz zu *E. coli* und *C. glutamicum*

keine Isocitratlyase und demzufolge auch keinen Glyoxylat-Zyklus aufweist [Berg and Ivanovsky, 2009; Ensign, 2006; Ivanovsky et al., 1997].

### Alternative Kohlenstoffquellen

Neben den für *R. rubrum* etablierten Kohlenstoffquellen Succinat, Acetat und Fructose wurden alternative C-Quellen untersucht. Für biotechnologische Anwendungen in Frage kommen, wie bereits unter 1.1.3 erläutert, Glycerin, Glucose, Methanol, Saccharose, Xylose, Arabinose. Darüber hinaus wurden Butyrat, Lactat und Citrat als weitere Kohlenstoffsubstrate untersucht. In Abb. 3.1 sind die Wachstumskurven aller untersuchten C-Quellen abgebildet.



**Abb. 3.1:** Wachstum von *R. rubrum* auf verschiedenen alternativen Kohlenstoffquellen unter aeroben Bedingungen im Schüttelkolben. Kohlenstoffquellen jeweils 10 mM. Fructose und Succinat als Kontrolle. Daten aus jeweils 1 Kultivierung.

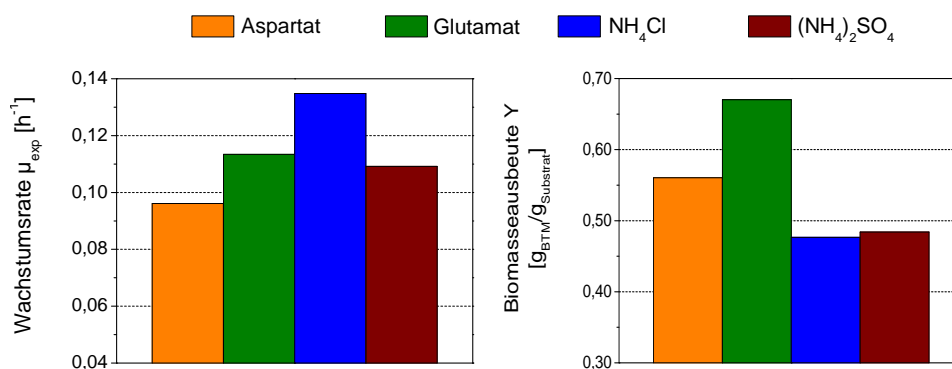
In Abb. 3.1 ist zu erkennen, dass *R. rubrum* neben den bereits bekannten C-Quellen Fructose und Succinat lediglich auf Butyrat ein signifikantes Wachstum aufwies. Die Wachstumsrate war jedoch mit  $\mu_{exp} = 0,04 \text{ h}^{-1}$  nur sehr gering. Die getesteten C-Quellen stellen somit keine alternativen Kohlenstoffquellen zu den bereits bekannten C-Quellen Succinat, Acetat und Fructose dar. Insbesondere das Unvermögen von *R. rubrum*, auf Glucose und Saccharose zu wachsen, schränken die Anwendung etablierter Zucker-Feedstocks, wie z.B. Melasse [Drawert et al., 1994], für die Kultivierung von *R. rubrum* für biotechnologische Anwendungen ein. Denkbar wäre die Nutzung von HFCS (*high fructose corn syrup*), das bisher als Süßungsmittel für die Getränkemittelindustrie produziert wird. HFCS ist in verschiedenen Reinheiten erhältlich, HFCS-55 beispielsweise besteht zu 55 % aus Fructose [Hanover and White, 1993; Takasaki et al., 1969]. Allerdings existiert bisher keine biotechnologische Anwendung mit HFCS als Kohlenstoffquelle.

Auch das fehlende Wachstum auf Arabinose und Xylose wirkt sich nachteilig auf spätere Anwendung aus. Verstärkt gewinnen in den letzten Jahren Feedstock-Lösungen an Bedeutung, die auf Lignocellulose-Hydrolysaten basieren; begründet durch steigende Zuckerpreise. Diese Hydrolysate bestehen aus einer Mischung von Kohlenhydraten, darunter 20 % Xylose und Arabinose (s.a. Abschn. 1.1.3).

Für das Wachstum auf Methanol fehlt *R. rubrum* vermutlich das Enzym Methanol-Dehydrogenase, welche in methylotrophen Bakterien den ersten Schritt der Methanol-Assimilation katalysiert [Arfman et al., 1989]. Eine Suche nach homologen Sequenzen der Methanol-Dehydrogenase von *Methylobacterium extorquens* AM1 im Genom von *R. rubrum* blieb ergebnislos. Es ist demnach davon auszugehen, dass *R. rubrum* kein Wachstum auf Methanol aufweist, da dieses wichtige Enzym des Methanolabbaus fehlt. Den für die Regenerierung des Glyoxylats benötigten Ethylmalonyl-CoA-Weg besitzt *R. rubrum* höchstwahrscheinlich [Erb et al., 2007]. Wachstum auf Methanol wurde für phototrophe Mikroorganismen bisher nur für *Rhodospseudomonas acidophila* berichtet [Sahm et al., 1976]. Ebenfalls kein Wachstum war bei den C-Quellen D-Lactat, L-Lactat und Citrat unter aeroben Bedingungen im Dunkeln zu beobachten.

## Stickstoffquelle

Die Stickstoffquelle ist ein wesentlicher Bestandteil des Nährmediums (s.a. Abschn. 1.1.4). Aus diesem Grund wurde die Eignung verschiedener Stickstoffquellen für das aerobe Wachstum in Schüttelkolbenversuchen untersucht. In Abb. 3.2 sind die Wachstumsraten und die Biomasseausbeutekoeffizienten für die Stickstoffquellen Aspartat, Glutamat,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  und  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dargestellt.



**Abb. 3.2:** Wachstumsraten und Biomasseausbeutekoeffizienten der exponentiellen Phase auf M2SF-Medium mit verschiedenen Stickstoffquellen im Schüttelkolben (alle 20 mM, bis auf  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 10 mM). Die Biomasseausbeutekoeffizienten beziehen sich auf die Summe der Kohlenstoffquellen Fructose und Succinat. Daten aus jeweils 1 Kultivierung.

Die maximale Wachstumsrate war mit  $\mu_{exp} = 0,135 \text{ h}^{-1}$  mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  am größten. Überraschend war die geringere Wachstumsrate von  $\mu_{exp} = 0,109 \text{ h}^{-1}$  mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Es ließ sich

jedoch mit einer Verdopplung der  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Menge von 10 mM auf 20 mM eine höhere Wachstumsrate von  $\mu_{exp} = 0,129 \text{ h}^{-1}$  erreichen. Aspartat wies mit  $\mu_{exp} = 0,096 \text{ h}^{-1}$  die geringste Wachstumsrate auf. Auch das Wachstum auf Glutamat war mit  $\mu_{exp} = 0,113 \text{ h}^{-1}$  geringer als mit den Ammoniumquellen. Eine Stickstoffquelle in Form von Ammoniumsalzen ist für eine schnelle Produktion von Biomasse unter aeroben Bedingungen somit am besten geeignet.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  hätte zusätzlich den Vorteil, dass es in Konzentrationen höher als 30 mM zusammen mit 10 g/L Fructose nicht zu einem unlöslichen weißen Niederschlag ausfällt, was mit Ammoniumchlorid der Fall war. Es wurde festgestellt, dass sich  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bis zu 70 mM mit 44 g/L Fructose lösen lässt. Die restlichen Bestandteile des M2SF-Mediums behielten ihre normale Konzentration bei.

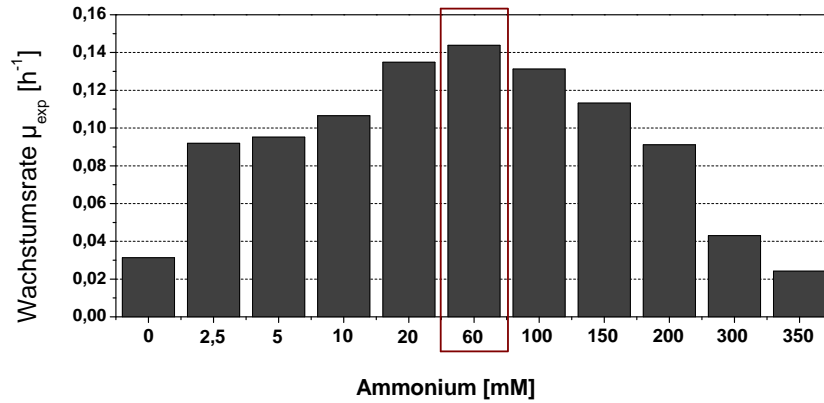
Die auf die C-Quelle bezogenen Ausbeutekoeffizienten der beiden Ammoniumsalze waren mit  $Y_{(X/S)} = 0,48 \frac{g_{BTM}}{g_{Substrat}}$  vergleichbar. Die Biomasseausbeutekoeffizienten von Aspartat und Glutamat waren deutlich höher (für Glutamat:  $Y_{(X/S)} = 0,67 \frac{g_{BTM}}{g_{Substrat}}$ ) (s.a. Abb. 3.2). Das deutet darauf hin, dass Glutamat bzw. Aspartat nicht nur in Transaminierungsreaktionen unter Abgabe der Aminogruppe verwendet werden, sondern auch in Form ihrer Ketosäuren Oxaloacetat und  $\alpha$ -KG den TCA-Zyklus auffüllen und zu einer gesteigerten Biomassebildung führen, die sich in einem erhöhten Biomasseausbeutekoeffizient für Succinat und Fructose äußert. Die dafür nötigen Enzyme Glutamat-Dehydrogenase und Aspartat-Transaminase besitzt *R. rubrum* [Bachofen and Neeracher, 1968; Cutinelli et al., 1951]. Die zwei Ammoniumsalze können nicht als zusätzliche C-Quelle dienen und gehen ausschließlich in die Umwandlung von  $\alpha$ -KG zu Glutamat ein.

## Ammoniumkonzentration

Die höchsten Wachstumsraten lieferte Ammoniumchlorid als Stickstoff-Quelle ( $\mu_{exp} = 0,135 \text{ h}^{-1}$ ).  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sollte deshalb auch für Fedbatch-Kultivierungen verwendet werden. Für die effiziente Zuführung von Ammonium ist die Kenntnis des Ammoniumbedarfs und limitierender bzw. inhibitorischer Konzentrationen essenziell. In Schüttelkolbenversuchen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ammonium wurde das Wachstum von *R. rubrum* ausgehend vom M2SF-Medium untersucht.

In Abb. 3.3 wird ersichtlich, dass Ammonium für *R. rubrum* sowohl wachstumslimitierende als auch -inhibitorische Konzentrationen annehmen kann. Die optimale Ammoniumkonzentration liegt bei 60 mM. Eine maximale Wachstumsrate von  $\mu_{exp} = 0,144 \text{ h}^{-1}$  wurde damit erzielt. Bereits mit 150 mM Ammonium verringerte sich die Wachstumsrate um fast 25 %. Auch Konzentrationen, welche kleiner als 60 mM sind wirkten sich negativ auf das Wachstum von *R. rubrum* aus. Bei 5 mM Ammonium betrug die Wachstumsrate nur noch  $\frac{2}{3}$  der maximal möglichen Wachstumsrate. In Abb. 3.3 wird darüber hinaus er-

sichtlich, dass selbst mit 0 mM ein geringfügiges Wachstum möglich war ( $\mu_{exp} = 0,03 \text{ h}^{-1}$ ). Der Grund hierfür könnte im Vorhandensein von restlichem intrazellulären freien Aminosäuren liegen, die noch für die Proteinbiosynthese verwendet werden können.



**Abb. 3.3:** Wachstumsraten aus der exponentiellen Wachstumsphase von *R. rubrum* unter aeroben Bedingungen auf M2SF-Medium mit variierten Ammoniumkonzentrationen im Schüttelkolben. Ammoniumkonzentrationen von 0 bis 350 mM. Daten aus jeweils 1 Kultivierung. Roter Kasten kennzeichnet die Ausgangskonzentration im M2SF-Medium von Ghosh et al. [1994].

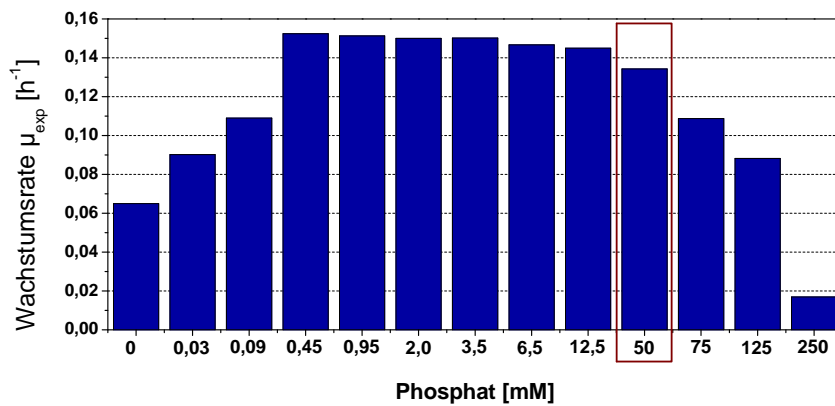
Für Fedbatch-Kultivierungen sollte daher 60 mM im Start-Kultivierungsmedium vorgelegt werden. Diese Konzentration entspricht dem von Ghosh et al. [1994] optimierten Sistrof-Medium. In der Zufütterung sollten  $\approx 20$  mM Ammonium nicht unterschritten bzw.  $\approx 100$  mM nicht deutlich überschritten werden. Aus den erreichten Zelldichten der limitierenden Schüttelkolben lässt sich der Biomasseausbeutekoeffizient für Ammonium berechnen. Er beträgt  $Y_{(X/S)} = 0,155 \frac{g_{BTM}}{mmol_{NH_4^+}}$ . Die wachstumsbeschreibenden Parameter für Ammonium sind noch einmal in Tab. 3.3 zusammengefasst.

### Phosphatkonzentration

Auch der Bedarf an Phosphat wurde für *R. rubrum* unter aeroben Bedingungen im Dunkeln bestimmt. Wie für Ammonium zeigte *R. rubrum* auch für Phosphat limitierende und inhibitorische Konzentrationen. Über einen Konzentrationsbereich von 0,45 bis 12,5 mM  $PO_4^{3-}$  war die Wachstumsrate mit  $\mu_{exp} \approx 0,15 \text{ h}^{-1}$  konstant. Allerdings ist in Abb. 3.4 zu sehen, dass die Phosphatkonzentration im M2SF-Standardmedium mit 50 mM  $PO_4$  zu einer leicht verringerten Wachstumsrate von  $\mu_{exp} = 0,134 \text{ h}^{-1}$  führte. Mit 75 mM  $PO_4$  kam es dagegen bereits zu einer 25 % verringerten maximalen Wachstumsrate ( $\mu_{exp} = 0,109 \text{ h}^{-1}$ ). Auch mit 0 mM Phosphat war ein Wachstum von  $\mu_{exp} = 0,062 \text{ h}^{-1}$  möglich. Der Grund hierfür liegt höchstwahrscheinlich in der Fähigkeit von *R. rubrum*, Polyphosphate als Phosphatspeicher zu bilden, welche aus einer phosphat-haltigen Vor-kultivierung stammen [Weber, 1965].

Die wachstumsbeschreibenden Parameter  $\mu_{max}$ ,  $K_s$  und  $Y_{(X/S)}$  wurden berechnet und

sind Tab. 3.3 zu entnehmen. Für aerobe Fedbatch-Kultivierungen sollte eine Phosphatkonzentration von 12,5 mM nicht deutlich überschritten werden.



**Abb. 3.4:** Wachstumsraten aus der exponentiellen Wachstumsphase von *R. rubrum* unter aeroben Bedingungen auf M2SF-Medium mit variierten Phosphatkonzentrationen im Schüttelkolben. Phosphatkonzentrationen von 0 bis 250 mM. Daten aus jeweils 1 Kultivierung. Roter Kasten kennzeichnet die Ausgangskonzentration im M2SF-Medium von Ghosh et al. [1994].

Die geringfügig unterschiedlich hohen, maximalen Wachstumsraten in den Schüttelkolbenversuchen für Ammonium und Phosphat (Tab. 3.3) liegen innerhalb der Fehlerbereiche für Schüttelkolbenversuche und werden daher nicht eingehender diskutiert. Auffallend ist jedoch die vielfach höhere Biomasseausbeute für Phosphat ( $Y_{(X/S)} = 2,273 \frac{g_{BTM}}{mmol_{PO_4^{3-}}}$ ) im Vergleich zu Ammonium ( $Y_{(X/S)} = 0,155 \frac{g_{BTM}}{mmol_{NH_4^+}}$ ). Der molare Biomasseausbeutekoeffizient für Phosphat war ca. 15-mal höher als der für Ammonium, was den geringen Bedarf der Zellen für Phosphat widerspiegelt (vgl.a. Abschn. 1.1.4). Berücksichtigt werden muss außerdem, dass es bereits bei Phosphatkonzentrationen  $> 12,5$  mM zu einer Inhibierung des Zellwachstums durch Phosphatüberschuss kam. Für Fedbatch-Kultivierungen stellte diese geringe Inhibierungskonzentration eine Herausforderung dar und erforderte die Notwendigkeit einer präzisen Feedzufuhr.

**Tab. 3.3:** Wachstumsbeschreibende Parameter für Ammonium und Phosphat in M2SF-Medium unter aeroben Bedingungen im Schüttelkolben.  $\mu_{max}$  und  $K_s$  nach Monod-Kinetik bestimmt (s.a. Abschn. 2.7). Die Bestimmung der Ausbeutekoeffizienten erfolgte in Mehrfachbestimmung ebenfalls wie unter Abschn. 2.7 beschrieben. Daten aus jeweils 1 Kultivierung.

	Ammonium	Phosphat
Wachstumsrate $\mu_{max}$ ( $h^{-1}$ )	0,1352	0,1536
$K_s$ (g/L)	0,0410	0,0022
$K_s$ (mmol/L)	2,28	0,0232
$Y_{(X/S)} \left( \frac{g_{BTM}}{g_{Substrat}} \right)$	8,585	23,94
$Y_{(X/S)} \left( \frac{g_{BTM}}{mmol_{Substrat}} \right)$	0,155	2,273

## Vitamine und *p*-Aminobenzoesäure

Essenziell für optimales Wachstum unter aeroben Bedingungen im Dunkeln ist auch die Zufuhr von Vitaminen und *p*-Aminobenzoesäure. In aeroben Schüttelkolbenversuchen wurde der Bedarf an Vitaminlösung und *p*-ABA bestimmt, sowie inhibitorische und limitierende Konzentrationen untersucht.

In limitierenden Schüttelkolbenversuchen wurde der Vitaminbedarf für das aerobe Wachstum in M2SF-Medium untersucht. Die maximal erreichten Zelldichten und die eingesetzten Mengen an Vitamine ließen sich mit Hilfe einer linearer Regression korrelieren und ergaben die folgende Gleichung (Regressionsfaktor: 0,9994):

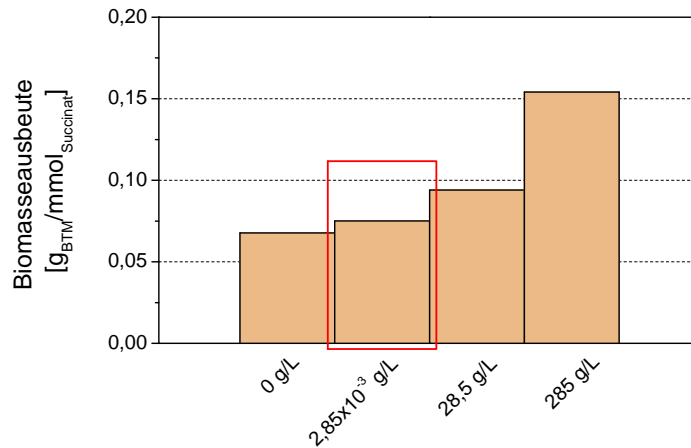
$$\text{Vitaminlösung} \left( \frac{\text{mL}}{L_{\text{Medium}}} \right) = \frac{\text{BTM} \left( \frac{\text{g}_{\text{BTM}}}{\text{L}} \right) - 0,0268}{1,7101} \quad (3.1)$$

Die Gl. 3.1 ermöglichte die Berechnung des einzusetzenden Volumens an Vitaminlösung (s.a. Tab. 2.4), die für eine angestrebte BTM nötig war.

In Abwesenheit von Vitaminen war kein Wachstum zu beobachten. Bis zur 10-fachen Menge ( $100 \text{ mL}/L_{\text{Medium}}$ ) der üblicherweise eingesetzten Mengen war keine Inhibierung des Wachstums zu verzeichnen. Eine Erhöhung der Vitaminmenge im Batch-Medium von  $10 \text{ mL}/L_{\text{Medium}}$  auf  $100 \text{ mL}/L_{\text{Medium}}$ , um auf die Zufuhr von Vitaminen während der Fedbatch-Phase verzichten zu können, resultierte jedoch im Auftreten eines weißen, unlöslichen Niederschlags. Aus diesem Grund wurde im Batch-Medium keine Veränderung der Vitaminmenge vorgenommen und in der C-Feed-Vorlage für spätere aerobe Fedbatch-Kultivierungen  $260 \text{ mL}/L_{\text{Feed}}$  Vitaminlösung eingesetzt (s.a. Abschn. 2.3).

Auch der Einfluss unterschiedlicher *p*-ABA-Konzentrationen auf das Wachstum wurde genauer untersucht. Dabei fiel auf, dass das Wachstum zu keiner Zeit beeinträchtigt war, unabhängig von der eingesetzten Menge *p*-ABA. Auch in Abwesenheit von *p*-ABA war *R. rubrum* in der Lage zu wachsen. Die Wachstumsrate lag mit  $\mu_{\text{exp}} = 0,12 \text{ h}^{-1}$  nur geringfügig niedriger im Vergleich zur üblicherweise eingesetzten *p*-ABA-Konzentration ( $\mu_{\text{exp}} = 0,13 \text{ h}^{-1}$ ). Auch mit 1000-fach erhöhten Konzentrationen ( $2,85 \text{ g/L}$ ) ließ sich keine Inhibierung des Wachstums feststellen (Daten nicht gezeigt).

In Abb. 3.5 sind Biomasseausbeutekoeffizienten für verschiedene *p*-ABA-Konzentrationen dargestellt. Ausgehend von der üblicherweise eingesetzten Konzentration ( $2,85 \text{ mg/L}$ ) erhöhte sich die Biomasseausbeute bis auf das 2-fache bei  $285 \text{ g/L}$  ( $Y_{(X/S)} = 0,154 \frac{\text{g}_{\text{BTM}}}{\text{mmol}_{\text{Succinat}}}$ ). Das lässt den Schluss zu, dass *R. rubrum* *p*-ABA unter aeroben Bedingungen im Dunkeln für den Einbau in zelluläres Material nutzen kann. Weiterhin scheint *R. rubrum* auch zur *de-novo*-Synthese befähigt zu sein, da ebenfalls Wachstum in Abwesenheit von *p*-ABA zu beobachten war. Eine Erhöhung der *p*-ABA Konzentration im Batch-Medium auf  $2,85 \text{ g/L}$  führte ähnlich wie bei der Erhöhung der Vitamin-



**Abb. 3.5:** Biomasseausbeutekoeffizienten  $\frac{g_{BTM}}{mmol_{Succinat}}$  bei verschiedenen hohen Konzentrationen an *p*-ABA. Roter Kasten: Ausgangskonzentration in dem von Ghosh et al. [1994] optimierten M2SF-Medium. Daten aus jeweils 1 Kultivierung.

Konzentration zum Auftreten eines weißen, schwer löslichen Niederschlags. Aus diesem Grund wurde die Batch-Konzentration *p*-ABA bei 2,85 mg/L belassen. *p*-ABA wurde mit 0,3 g/L<sub>Feed</sub> bei aeroben Fedbatch-Kultivierungen eingesetzt (s.a. Abschn. 2.3).

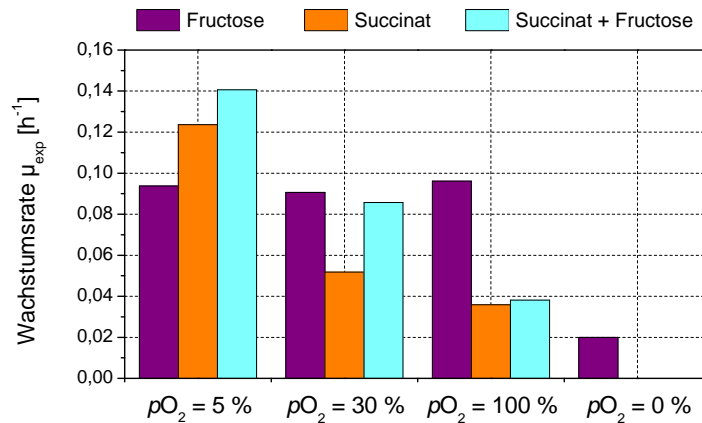
Insgesamt sind *p*-ABA und Vitamine als unkritische Nährstoffkomponenten einzustufen. Keine Inhibierung des Wachstums wurde bei *p*-ABA-Konzentrationen bis 285 g/L und 100 mL/L<sub>Medium</sub> Vitaminlösung beobachtet. Für einen späteren Fedbatch-Prozess muss daher lediglich sicher gestellt werden, dass stets ausreichende Mengen vorhanden sind und nicht unnötig Substrat eingesetzt wird.

### 3.1.2 Sauerstoffpartialdruck

Der Sauerstoffpartialdruck hat nicht nur in der O<sub>2</sub>-limitierten Produktionsphase (vgl.a. Abschn. 3.3.3) einen großen Einfluss auf das Wachstum und die Substrataufnahme von *R. rubrum*. Auch für das aerobe Wachstum wurde ein Effekt der Gelöstsauerstoffkonzentration in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle festgestellt.

Abb. 3.6 zeigt deutlich, dass die aerobe Wachstumsrate von *R. rubrum* vom Substrat und der Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium abhängig ist. Die höchsten Wachstumsraten wurden auf Fructose/Succinat bei einem *p*O<sub>2</sub>-Wert von 5 % erzielt ( $\mu_{exp} = 0,141 \text{ h}^{-1}$ ). Mit zunehmender Gelöstsauerstoffkonzentration sank die Wachstumsrate und betrug bei 100 % lediglich noch  $\mu_{exp} = 0,038 \text{ h}^{-1}$ . Ähnlich verhielt sich die Wachstumsrate bei Succinat als C-Quelle. Hier war das Wachstum ebenfalls bei einem *p*O<sub>2</sub>-Wert von 5 % am höchsten ( $\mu_{exp} = 0,124 \text{ h}^{-1}$ ) und nahm mit zunehmender O<sub>2</sub>-Konzentration ab. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine gleich hohe, durchschnittliche Wachstumsrate  $\mu_{\emptyset} = 0,09 \text{ h}^{-1}$  mit Fructose als alleinige C-Quelle; unabhängig von der





**Abb. 3.6:** Wachstumsraten von *R. rubrum* auf verschiedenen C-Quellen in Abhängigkeit vom  $pO_2$ . Für Fructose: 2 %  $CO_2$ -Begasung. Alle Kultivierungen wurden für die jeweilige Substratzusammensetzung in der DASGIP-Anlage parallel aus jeweils einer Vorkultur durchgeführt. Jeweils 1 Kultivierung, Succinat: 2 Kultivierungen. DASGIP-Kultivierungsparameter.

Gelöstsauerstoffkonzentration. Die C-Quellen Acetat und Acetat/Fructose wurden nicht untersucht.

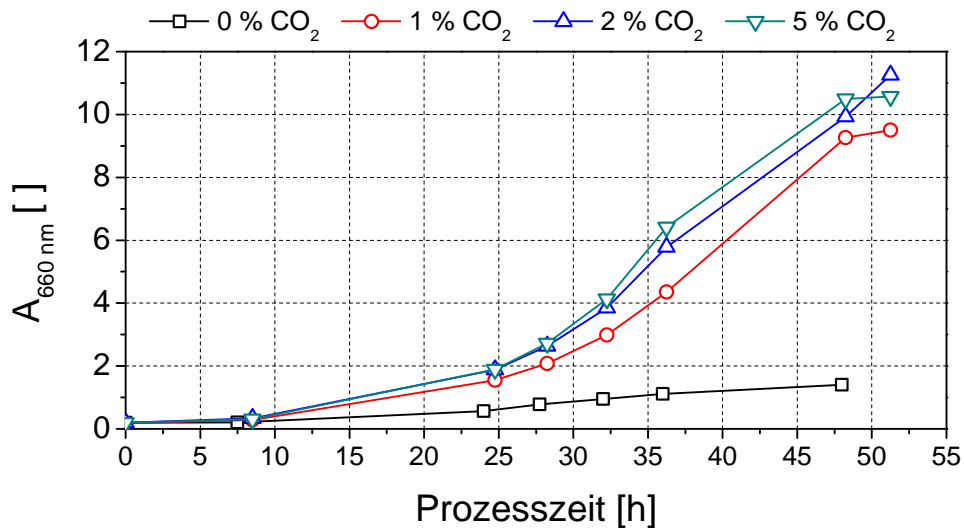
In Abwesenheit von Sauerstoff ( $pO_2 = 0\%$ ) konnte auf Fructose/Succinat sowie Succinat als alleinige C-Quelle kein Wachstum beobachtet werden. Lediglich auf Fructose konnte ein geringes Wachstum ( $\mu_{exp} = 0,02 h^{-1}$ ) beobachtet werden (vgl. Abb. 3.6). Das fehlende Wachstum auf dem Succinat/Fructose-Mischsubstrat lässt sich durch die Abwesenheit einer externen  $CO_2$ -Zufuhr erklären, welche essenziell für anaerobes Wachstum ist (s.a. Abschn. 3.3.4). Succinat kann von *R. rubrum* im Dunkeln nur in Anwesenheit eines artifiziellen Elektronenakzeptors wie z.B. Dimethylsulfoxid oder Trimethylaminoxid verwendet werden [Schultz and Weaver, 1982].

Für aerobe Fedbatch-Kultivierungen mit Succinat/Fructose muss der  $pO_2$ -Wert präzise auf 5 % geregelt werden, um maximal mögliche Wachstumsraten zu gewährleisten. Beim Einsatz von Fructose als alleinige C-Quelle kann auf eine präzise  $pO_2$ -Regelung verzichtet werden. Der  $pO_2$ -Wert muss für aerobe Bedingungen lediglich  $> 5\%$  gehalten werden. Hinsichtlich späterer biotechnologischer Anwendungen würde die Notwendigkeit einer  $pO_2$ -Regelstruktur beim Einsatz von Succinat oder Succinat/Fructose als C-Quelle ein Nachteil im Gegensatz zu Fructose darstellen. Dem entgegen steht eine um 30 % geringere Wachstumsrate mit Fructose als alleinige C-Quelle.

### 3.1.3 $CO_2$ -Zufuhr für das aerobe Wachstum

Unter Abschn. 3.1.1 wurde bereits die Notwendigkeit der  $CO_2$ -Zufuhr für das aerobe Wachstum auf Fructose, Acetat und Acetat/Fructose angedeutet. Im Folgenden soll nun detaillierter auf die Problematik des  $CO_2$ -Bedarfs unter aeroben Bedingungen in gerührten und begasten Systemen im Vergleich zu Schüttelkolben-Kultivierungen eingegangen

werden.



**Abb. 3.7:** Wachstum von *R. rubrum* unter aeroben Bedingungen im Dunkeln auf M2F-Medium mit unterschiedlicher CO<sub>2</sub>-Zufuhr (0 %, 1 %, 2 % und 5 % CO<sub>2</sub>-Anteil Begasung.). Begasungsrate: 5 L/h. Alle Kultivierungen wurden einmal, in der DASGIP-Anlage jedoch parallel aus jeweils einer Vorkultur durchgeführt. DASGIP-Fermentationsparameter.

In Abb. 3.7 ist der Verlauf der optischen Dichte  $A_{660}$  bei der Kultivierung von *R. rubrum* mit Fructose als alleinige C-Quelle im DASGIP-System in Abhängigkeit unterschiedlich hoher CO<sub>2</sub>-Konzentrationen dargestellt. Deutlich zu erkennen ist das verlangsamte Wachstum ohne die externe CO<sub>2</sub>-Zufuhr (Abb. 3.7). Zwischen den CO<sub>2</sub>-Konzentrationen 1 bis 5 % CO<sub>2</sub> war kein großer Unterschied mehr hinsichtlich des Wachstums ersichtlich. Jedoch wurde durch höhere CO<sub>2</sub>-Konzentrationen das aerobe Wachstum auf Fructose weiter gefördert. So erhöhten sich mit zunehmender CO<sub>2</sub>-Zufuhr die Wachstumsrate, die Fructoseaufnahme, aber auch die Ausscheidung von CO<sub>2</sub>. Tab. 3.4 fasst Wachstumsraten, Fructoseaufnahme, aber auch die Ausscheidung von CO<sub>2</sub>. Tab. 3.4 fasst Wachstumsraten, Fructoseaufnahme, aber auch die Ausscheidung von CO<sub>2</sub> nochmals für die einzelnen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen zusammen.

**Tab. 3.4:** Wachstumsraten, Fructoseaufnahme und CO<sub>2</sub>-Ausscheideraten von *R. rubrum* beim Wachstum auf M2F-Medium als alleinige C-Quelle unter aeroben Bedingungen im Dunkeln. Alle Daten aus der exponentiellen Wachstumsphase. Alle Kultivierungen wurden einmal, in der DASGIP-Anlage jedoch parallel aus jeweils einer Vorkultur durchgeführt. DASGIP-Fermentationsparameter.

CO <sub>2</sub> -Zufuhr	$\mu_{exp}$	$q_{Fruc}$	$CTR$
	$h^{-1}$	$\frac{mmol}{g_{BTM} \cdot h}$	$\frac{mmol}{g_{BTM} \cdot h}$
1 %	0,099	1,009	1,766
2 %	0,103	1,085	1,955
5 %	0,109	1,166	2,623

Analog zu Fructose wurde auch eine Abhängigkeit des Wachstums von der CO<sub>2</sub>-Zufuhr bei den Substraten Acetat (s.a. Abschn. 3.7.4 und Acetat/Fructose beobachtet (Daten nicht gezeigt)). Für spätere Fedbatch-Kultivierungen bedeuten diese Ergebnisse, dass bei Verwendung von Fructose und Acetat als Einzelsubstrat sowie Acetat/Fructose im Mischsubstrat die Supplementation von Kohlendioxid im Zuluftstrom nötig ist. Festzuhalten ist außerdem, dass eine Kultivierung im Schüttelkolben keine externe Zufuhr von Carbonat für das Wachstum erfordert. Vermutlich verursacht die konstante Begasung in Rührkesselreaktoren die Abhängigkeit des Wachstums vom CO<sub>2</sub> durch Entfernung desselben.

Für das aerobe Wachstum von *R. rubrum* im Dunkeln wurden verschiedene Parameter optimiert; darunter Nährstoffkomponenten (C-Quelle, N-Quelle, Phosphat, *p*-ABA und Vitamine) und prozessrelevante Größen wie Gelöstsauerstoffkonzentration und CO<sub>2</sub>-Zufuhr. Für maximale Wachstumsraten eignen sich Ammoniumsalze am besten, Aminosäuren wie Aspartat und Glutamat führten zu geringeren Wachstumsraten. Für ein ökonomisches biotechnologisches Verfahren ist der Einsatz von Fructose zweckmäßig, Succinat hingegen stellt ein sehr kostenintensives Substrat dar. Zur Anwendung von Fructosehaltigen Feedstock-Lösungen ist eine effiziente Zufuhr von CO<sub>2</sub> nötig, ohne die in begasteten Kultivierungssystemen kein Wachstum unter aeroben Bedingungen möglich war.

## 3.2 Aerobe Fedbatch-Kultivierungen

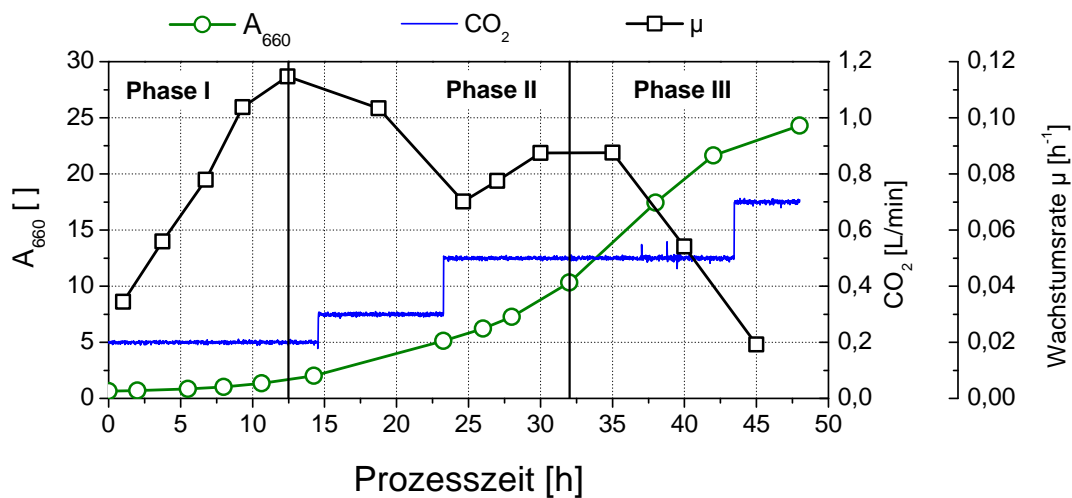
Die unter Abschn. 3.1 optimierten Parameter für das aerobe Wachstum wurden anschließend in aeroben Fedbatch-Kultivierungen verwendet. Für Fructose als Einzelsubstrat und Acetat/Fructose als Mischsubstrat kam vor allem der effizienten Zufuhr von Kohlendioxid eine entscheidende Bedeutung zu. Im Nachfolgenden sollen Fedbatch-Kultivierungen mit dem Einzelsubstrat Fructose und den Mischsubstraten Acetat/Fructose und Succinat/Fructose gezeigt werden. Eine abschließende Beurteilung hinsichtlich der Produktivität soll die Eignung der einzelnen Substrate für einen biotechnologischen Prozess mit *R. rubrum* im Dunkeln darlegen.

### 3.2.1 Fructose als Einzelsubstrat

Aus ökonomischen Gründen wurde zunächst trotz geringerer Wachstumsraten die Eignung von Fructose für Fedbatch-Kultivierungen untersucht. Eine besondere Bedeutung hatte dabei, wie bereits im vorangegangenen Kapitel dargelegt, die effiziente Zufuhr von externem CO<sub>2</sub>. Für spätere Anwendungen könnte Fructose dann durch HFCS ersetzt werden.

Begasung mit CO<sub>2</sub>

Die Zuführung von CO<sub>2</sub> im Zuluftgasstrom bedarf einer Anpassung der CO<sub>2</sub>-Begasungsrate mit steigender Zelldichte. Für die Kultivierungen im Bioreaktor Biostat CT5-2 wurde daher der CO<sub>2</sub>-Anteil im Begasungsstrom entsprechend des Bedarfs der Kultivierungen mit dem DASGIP-System angepasst, wo 0,004 vvm CO<sub>2</sub> für eine  $A_{660} \approx 2$  ausreichend waren. In einer Fermentation im 3,5 L Maßstab sollte untersucht werden, inwieweit sich eine Begasung mit steigender CO<sub>2</sub>-Zufuhr für aerobe Bedingungen mit Fructose als C-Quelle für Zelldichten  $A_{660} > 2,0$  eignet.



**Abb. 3.8:** Verlauf von  $A_{660nm}$ , Wachstumsrate und CO<sub>2</sub>-Begasung innerhalb eines aeroben Fedbatch-Prozesses. Daten aus 1 Kultivierung, Biostat CT5-2 Fermentationsparameter, 3,5 L Arbeitsvolumen.

In Abb. 3.8 ist der Verlauf von  $A_{660}$ , der Wachstumsrate und der Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Begasung zu sehen. Zunächst war ein Anstieg der Wachstumsrate auf maximal  $\mu = 0,115 \text{ h}^{-1}$  bis Stunde 12,5 zu beobachten (Phase I). Danach blieb die Wachstumsrate für ca. 19,5 h relativ konstant (Phase II). Nach ca. 32 h trat jedoch eine deutliche Verlangsamung des Wachstums ein bei einer optischen Dichte von  $A_{660} = 10,3$  (Phase III). Eine Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Begasung nach 43,5 h brachte keine Verbesserung des Wachstums. Bei Stunde 45 lag die Wachstumsrate nur noch bei lediglich  $\mu = 0,019 \text{ h}^{-1}$ . Zu diesem Zeitpunkt war erst eine OD von  $A_{660} = 24,3$  erreicht. Fructose wurde mit Hilfe von Gl. 2.1 und den zuvor aus Batch-Fermentationen ermittelten Parametern exponentiell zugefüttert und war zu keinem Zeitpunkt limitierend für das Wachstum (Daten nicht gezeigt). Für Fedbatch-Kultivierungen mit *R. rubrum* ist eine Begasung mit steigenden CO<sub>2</sub>-Zuluftanteilen daher aufgrund der stetigen Verringerung der Wachstumsrate als ungeeignet zu betrachten.

## CO<sub>2</sub>-Zufuhr über pH-Regelung mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

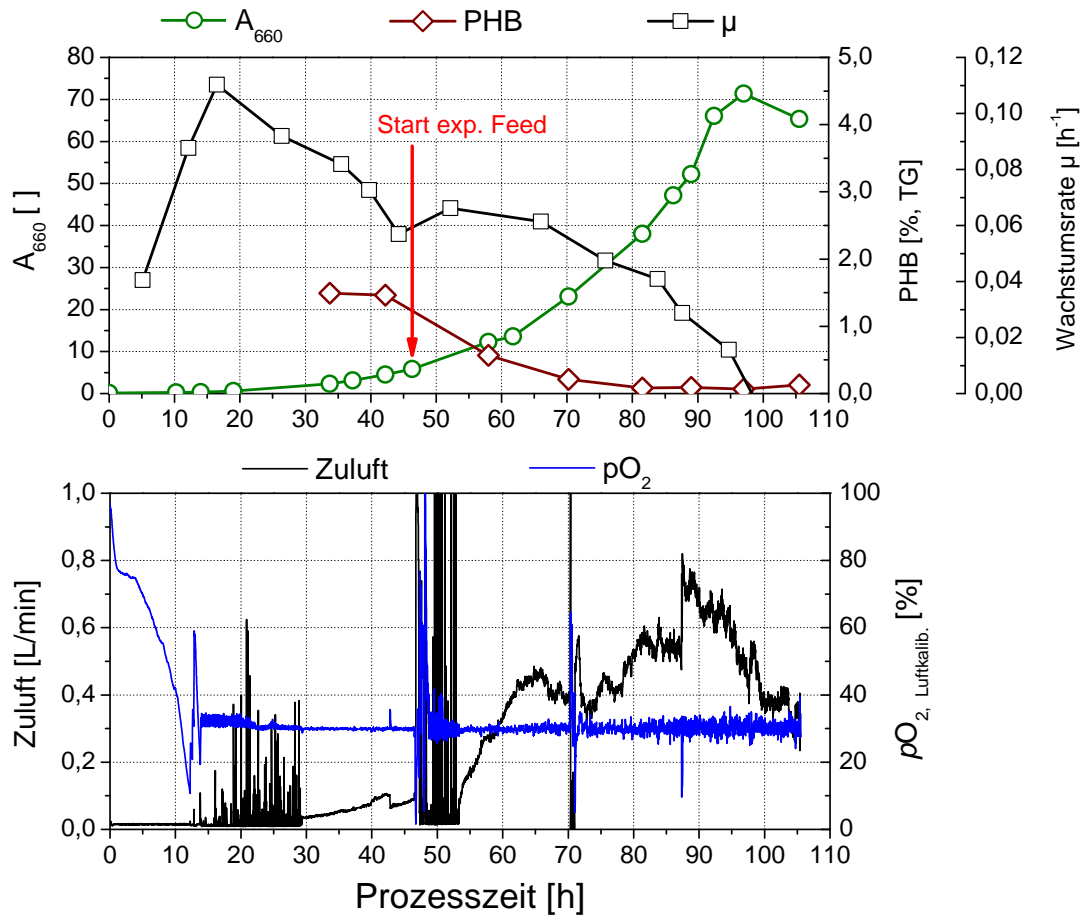
Neben dem Einsatz einer Gasmischstation zur Begasung mit Kohlendioxid existiert auch die Möglichkeit CO<sub>2</sub> über die pH-Regelung in Form von K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zuzuführen. Bei aeroben Kultivierungen mit Fructose als alleinige C-Quelle sinkt der pH-Wert im Verlauf der Kultivierung, da durch die Aufnahme von Ammonium 1 H<sup>+</sup> freigesetzt wird [Khademi et al., 2004]. CO<sub>2</sub> löst sich pH-Wert-abhängig im Medium und kann durch die entsprechenden Löslichkeitsgleichgewichte für Kohlensäure (Hägg-Diagramm) beschrieben werden. So liegt zum Beispiel bei einem pH-Wert von pH = 8,3 ca. 98 % der Kohlensäure als HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> vor. Da die Löslichkeit von CO<sub>2</sub> stark vom pH-Wert abhängig ist, wurde der pH-Wert von 6,80 auf 7,30 erhöht, um die Löslichkeit von CO<sub>2</sub> zu erhöhen. Innerhalb von Batch-Kultivierungen im DASGIP-System wurde festgestellt, dass unter diesen Bedingungen das aerobe Zellwachstum nicht durch den erhöhten pH-Wert beeinträchtigt war (Daten nicht gezeigt).

Bei dieser Methode sollte ein schnelles Austreiben von Kohlendioxid durch eine Verringerung der Begasungsrate und den Einsatz eines Edelstahlspargers zur Gasverteilung minimiert werden (s.a. Abschn. 2.4.4). Daher wurde die Gelöstsauerstoffkonzentration nicht wie üblich, durch Variation der N<sub>2</sub>- und Luft-Anteile in einem konstanten Gasstromgemisch, geregelt, sondern nur noch durch den Einsatz von Druckluft. Dabei wurde zu Beginn auf eine Begasung verzichtet. Erst nachdem durch das Wachstum der Zellen der *p*O<sub>2</sub>-Wert von 100 % auf 30 % abgesunken war, setzte die *p*O<sub>2</sub>-Regelung über die Begasung mit Druckluft ein (vgl.a. Abb. 3.9). Um zu Beginn der Kultivierung ausreichend CO<sub>2</sub> zur Verfügung zu stellen, wurde kurz vor der Inokulation 25 mM sterilfiltriertes KHCO<sub>3</sub> in den Bioreaktor gegeben. Im Folgenden wird gezeigt werden, dass mit Hilfe dieses Verfahrens auf eine Gasmischstation komplett verzichtet werden konnte.

In Abb. 3.9 ist der Verlauf einer solchen aeroben Fedbatch-Kultivierung mit Fructose als Einzelsubstrat zu sehen. Nach 97 h war eine maximale Zelldichte von A<sub>660</sub> = 71,4 bzw. ca. 24,4 g<sub>BTM</sub>/L erreicht. Das entspricht einer *RZA* von 0,25  $\frac{\text{g}_{\text{BTM}}}{\text{L} \cdot \text{h}}$ .

Kennzeichnend war auch hier eine abnehmende Wachstumsrate im Verlauf der Kultivierung nach 16,5 h, was in einem Wachstumsstopp bei Stunde 97 h kulminiert. Eine Nährstoff-Limitation durch Fructose, Ammonium, Phosphat, *p*-ABA oder Vitaminen konnte zu diesem Zeitpunkt ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Insgesamt wurden 103 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> während der Kultivierung durch die pH-Regelung zugeführt. Da jedoch ein Teil in Form von CO<sub>2</sub> über das Abgas verloren ging, konnte eine genaue Angabe der vorhandenen Kohlendioxid-Konzentration in der Flüssigphase hier nicht getroffen werden.

Auffallend jedoch war der Verlauf von PHB während der Kultivierung, der nach ≈ 80 h von anfänglich noch 1,5 % auf 0 % zurückging. Ein analoger Verlauf konnte auch in einer zweiten Kultivierung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Somit könnte unter



**Abb. 3.9:** Aerobe Fedbatch-Kultivierung mit *R. rubrum* mit Fructose als alleinige C-Quelle und Zuführung von  $CO_2$  durch eine pH-Regelung mit  $K_2CO_3$ . Oben: Verlauf von  $A_{660}$ , PHB und Wachstumsrate  $\mu$ . Roter Pfeil kennzeichnet Start des exponentiellen Fructose-Feds. Unten: Verlauf von Zuluft und  $pO_2$ . Die Daten sind repräsentativ für 2 Kultivierungen. Biostat CT5-2 Fermentationsparameter. 3,5 L Arbeitsvolumen.

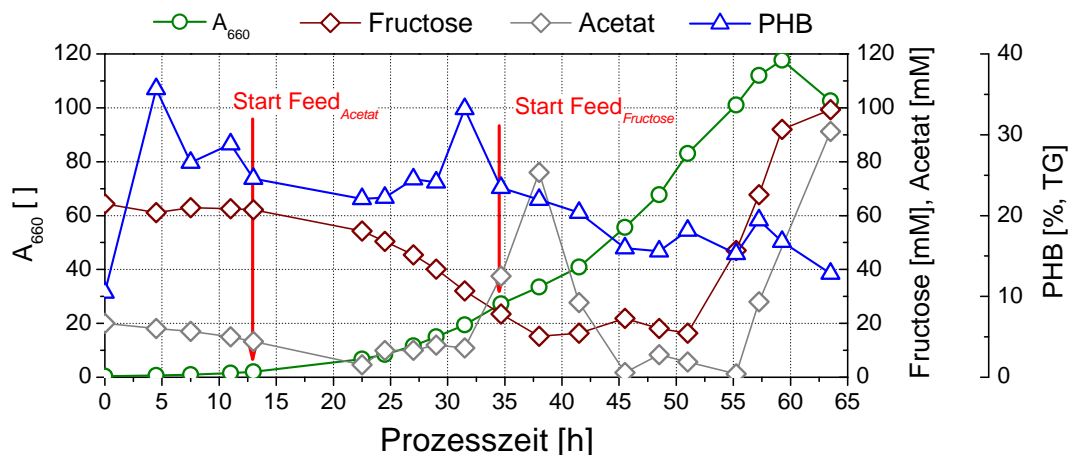
Umständen das Fehlen eines Energiespeichers für die Abnahme der Wachstumsrate nach 80 h verantwortlich sein. Es wäre möglich, dass sich auch der Glycogenspeicher ähnlich wie der PHB-Gehalt verhält und eine Verlangsamung bis Wachstumsstopp durch einen Mangel an ATP bewirkt. Eine Bestimmung von Glycogen während der aeroben Wachstumsphase bei Zelldichten  $A_{660} < 20$  ergab ein Glycogengehalt von  $\approx 7,0$  %. Allerdings war eine rasche Abnahme des Glycogenspeichers nach Umschalten auf anaerobe Bedingungen (auf 2,2 %) zu beobachten (s.a. Abschn. 3.3). Dawes and Senior [1973] berichten in diesem Zusammenhang über die Rolle von Reservestoffen in verschiedenen Bakterien als Kohlenstoff- und Energiespeicher und deren Aufgabe für die Zellerhaltung (osmotische Regulation, intrazelluläre pH-Aufrechterhaltung und Motilität). Auffallend in diesem Zusammenhang waren die erhaltenen intrazellulären Metabolitenkonzentrationen, welche in Abschn. 3.7.1 detaillierter dargestellt werden. Hier wurde festgestellt, dass im Gegensatz zum aeroben Wachstum auf Succinat, beim aeroben Wachstum auf Fructose die Detektion der Metabolite des TCA-Zyklus Succinat, Malat und Fumarat nicht gelang. Auch

Citrat/Isocitrat,  $\alpha$ -KG und Succinyl-CoA waren nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden (vgl.a. Abschn. 3.7.1). Das könnte auf eine Limitation an Vorläufermolekülen aus dem TCA-Zyklus hindeuten, welche sich durch einen Mangel an Acetyl-CoA in hohen Zelldichten noch verschärfen könnte.

Interessant in diesem Zusammenhang sind Arbeiten von van Gernerden [1968a,b,c] über *Chromatiaceae*, obligate photosynthetische Mikroorganismen, wo unter phototrophen Bedingungen Kohlenstoffspeicherstoffe akkumulieren und im Dunkeln wieder abgebaut werden. Eventuell unterliegen Akkumulation und Abbau intrazellulärer Kohlenstoffspeicher in *R. rubrum* im Dunkeln bislang unverstandene Regulationsmechanismen.

### 3.2.2 Acetat/Fructose als Mischsubstrat

Acetat und Fructose im Mischsubstratmedium wiesen bereits in Batch-Kultivierungen vergleichbare Wachstumsraten ( $\mu_{exp} = 0,122 \text{ h}^{-1}$ ) zu Succinat/Fructose auf und könnten daher eine vielversprechende, kostengünstige Alternative zum Einsatz von Succinat darstellen (vgl.a. Tab. 1.2).



**Abb. 3.10:** Aerobe Fedbatch-Kultivierung mit *R. rubrum* auf Acetat/Fructose-Mischsubstrat. Die Daten sind repräsentativ für 2 Kultivierungen. Biostat CT5-2 Fermentationsparameter. 3,5 L Arbeitsvolumen.

In Abb. 3.10 ist der Verlauf einer aeroben Fedbatch-Kultivierung ausgehend von M2AF-Medium (s.a. Abschn. 2.2) dargestellt. Nach 13 h wurde der Acetatfeed gestartet, nach 35 h der Fructosefeed. Eine maximale Zelldichte von  $A_{660} = 117$  ( $38,8 \text{ g}_{BTM}/\text{L}$ ) wurde nach 59,3 h erzielt. Das entsprach einer  $RZA$  von  $0,66 \frac{\text{g}_{BTM}}{\text{L} \cdot \text{h}}$ . Die  $RZA$  des Acetat/Fructose-Fedbatch war somit mehr als doppelt so hoch als mit Fructose als alleinige C-Quelle ( $0,25 \frac{\text{g}_{BTM}}{\text{L} \cdot \text{h}}$ ).

In Abb. 3.10 ist auch der Verlauf der extrazellulären Acetat- und Fructosekonzentration zu sehen. Bei Stunde 38 wurde der exponentielle Acetatfeed gestoppt, da mit 76 mM Ace-

tat eine inhibitorisch-wirkende Menge akkumulierte. Nach 4 h jedoch konnte der Feed wieder gestartet werden. Die weitere Zufütterung von Acetat verlief ohne eine Akkumulation von Acetat. Die Zufuhr von Fructose erfolgte ohne Unterbrechung. Allerdings ist in Abb. 3.10 eine Akkumulation von Fructose bis zu 100 mM bei Stunde 63,5 zu sehen. Diese Konzentration stellt für *R. rubrum* keine inhibitorische Konzentration dar [Zeiger and Grammel, 2010]. Ammonium, Phosphat, *p*-ABA und Vitamine waren zu keinem Zeitpunkt für das Wachstum limitierend (Daten nicht gezeigt).

Vielmehr konnte im weiteren Verlauf der Kultivierung visuell eine Art Verklumpung der Zellen beobachtet werden, welche sich in einer schleimigen Konsistenz der Zellbrühe äußerte, die sich nicht mehr in isotonischer Kochsalzlösung (0,98 %) verdünnen ließ. Gleichzeitig war auch ein Rückgang der optischen Dichte  $A_{660}$  ab Stunde 59,3 zu verzeichnen (Abb. 3.10). Dieses Verhalten der Zellen könnte sich auf eine zu hohe Zufuhr von Antischaummittel gründen, die besonders nach ca. 50 h aufgrund vermehrter Schaumbildung nötig war. Die Kultivierung musste aus diesem Grund nach rund 65 h beendet werden.

In Abb. 3.10 ist ebenfalls der Verlauf des PHB-Gehalts dargestellt. Obwohl die Zellen exponentiell wuchsen ( $\mu_{\varnothing} = 0,098 \text{ h}^{-1}$ ), nicht durch Ammonium oder Phosphat limitiert, und ausreichend Kohlenstoff vorhanden war, wurden im Durchschnitt  $\approx 23 \%$  gebildet. Im Vergleich zu Kultivierungen mit Fructose als alleinige C-Quelle war dies eine 15-fach höhere Menge PHB bei vergleichsweise schnellerem Wachstum.

Der Verlauf des PHB-Gehalts in Abb. 3.10 zeigt eine leichte Abnahme von 26,6 % (7,5 h) auf 19,5 % (57,3 h). Nach 57,3 h war auch die maximale PHB-Konzentration von 4,86  $\text{g}_{\text{PHB}}/\text{L}$  erreicht. Gleichzeitig wurden 33,7  $\text{g}/\text{L}$  Fructose und 74,7  $\text{g}/\text{L}$  Acetat bis Stunde 57,3 aufgenommen. Das entsprach einer Produktausbeute von  $Y_{(P/S)} = 0,045 \frac{\text{g}_{\text{PHB}}}{\text{g}_{\text{Substrat}}}$ . Die *RZA* für PHB betrug  $0,085 \frac{\text{g}_{\text{PHB}}}{\text{L} \cdot \text{h}}$ . Im Vergleich zu dem etablierten Mikroorganismus *R. eutropha* sind diese Produktkonzentrationen als eher gering einzuschätzen. Mit  $Y_{(P/S)} = 0,7 \frac{\text{g}_{\text{PHB}}}{\text{g}_{\text{Glucose}}}$  und  $0,41 \frac{\text{g}_{\text{PHB}}}{\text{L} \cdot \text{h}}$  werden hier deutlich höhere Ausbeuten erreicht [Koutinas et al., 2007]. Erst kürzlich wurde ein Prozess für die PHB-Produktion mit *R. eutropha* unter Einsatz von Palmöl und Harnstoff vorgestellt, welcher eine *RZA* von sogar  $1,0 \frac{\text{g}_{\text{PHB}}}{\text{L} \cdot \text{h}}$  lieferte [Riedel et al., 2011].

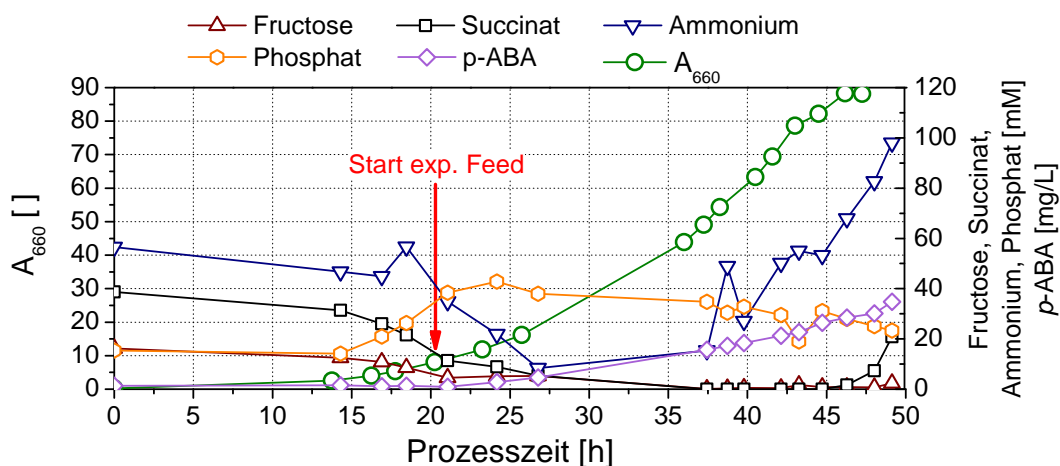
### 3.2.3 Succinat/Fructose als Mischsubstrat

Der Einsatz von Succinat und Fructose im Mischsubstrat lieferte in Batch-Kultivierungen die höchsten Wachstumsraten ( $\mu_{exp} = 0,156 \text{ h}^{-1}$ ) und Biomasseausbeuten ( $Y_{(X/S)} = 0,439 \frac{\text{g}_{\text{BTM}}}{\text{g}_{\text{Substrat}}}$ ) (vgl.a. Abschn. 3.1.1). Aus diesem Grund wurden auch Fedbatch-Kultivierungen mit Succinat und Fructose als C-Quellen angestrebt.

In diesen Kultivierungen waren, im Gegensatz zur Kultivierung mit Fructose als allei-



nige C-Quelle, *p*-ABA und Vitamine im Kohlenstoff-Feed enthalten (vgl.a. Abschn. 2.3). Alle unter Abschn. 3.1 optimierten Parameter sollten dabei zur Anwendung kommen. Dazu sollte der  $pO_2$ -Wert auf 5 % geregelt werden und die Phosphatkonzentration im Batch-Medium wurde auf 12,5 mM heruntergesetzt. Gleichzeitig sollte die pH-Regelung mit Phosphorsäure erfolgen und somit Phosphat in Form von Phosphorsäure anstelle des N/P-Feeds zugeführt werden. Die Zufuhr von Ammonium sollte mit  $NH_4Cl$  als Feedlösung erfolgen. Der pH-Wert des Feeds wurde nicht auf  $pH = 6,80$ , sondern auf  $pH = 4,5$  eingestellt. Zeiger and Grammel [2010] konnten zeigen, dass auf diese Weise der Kohlenstoff-Feed gleichzeitig zur pH-Korrektur dienen und darüber hinaus eine Akkumulation von Succinat über inhibitorische Konzentrationen hinaus verhindert werden konnte. Da Succinat zusammen mit Protonen im Symport aufgenommen wird, kennzeichnen ein ansteigender pH-Wert die Batch-Kultivierungen. Durch die Ansäuerung des C-Feeds wurde diesem Säurebedarf zur pH-Regelung Rechnung getragen. Gleichzeitig würde eine Übersäuerung der Kulturbrühe eintreten, sollte Succinat nicht verstoffwechselt werden können. Das könnte zum Beispiel der Fall sein, wenn eine andere Nährstoffkomponente limitierend für das Wachstum gewesen wäre. Im Prozessleitsystem PCS7 ließen sich pH-Schranken integrieren, welche die Zufütterung stoppten, sollte ein bestimmter pH-Wert unterschritten werden und erst wieder angestellt werden, wenn wieder ein bestimmter pH-Wert erreicht worden ist. Als pH-Toleranzbereich wurde eine pH-Wert-Differenz von  $\Delta pH = 0,10$  gewählt. Darüber hinaus wurde die Kultivierung in einen größeren Maßstab mit 10 L Arbeitsvolumen überführt (Biostat C15-2K).



**Abb. 3.11:** Aerobe Fedbatch-Kultivierung mit *R. rubrum* auf Succinat/Fructose-Mischsubstrat. Dargestellt ist der Verlauf von  $A_{660}$  sowie der Verlauf der Nährstoffe Fructose, Succinat, Ammonium, Phosphat und *p*-ABA. Die Daten sind repräsentativ für mind. 3 Kultivierungen. Biostat C15-2K Fermentationsparameter. 10 L Arbeitsvolumen.

In Abb. 3.11 ist der Verlauf einer Fedbatch-Kultivierung sowie die zugehörigen Nährstoffe Fructose, Succinat, Ammonium, Phosphat und *p*-ABA aufgezeigt. Nach 20,5 h wur-

de der exponentielle Feed nach Gl. 2.1 und den unter Abschn. 3.1 ermittelten Parametern gestartet. Allerdings wurde die zum Zeitpunkt des Feedstarts gemessene Wachstumsrate ( $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$ ) für die Exponentialfunktion gewählt. Im nachfolgenden Prozessverlauf war aufgrund einer Verringerung des Wachstums eine dreimalige Anpassung der Wachstumsrate nötig (nach Stunde 23,3:  $\mu = 0,12 \text{ h}^{-1}$ , nach Stunde 36,3:  $\mu = 0,10 \text{ h}^{-1}$  und nach Stunde 37,7:  $\mu = 0,08 \text{ h}^{-1}$ ). Demzufolge war auch bei Fedbatch-Kultivierungen mit Succinat/Fructose eine Abnahme der Wachstumsrate (sehr deutlich nach Erreichen von  $A_{660} = 54,3$ ) in höheren Zelldichten, wie bei Fructose, zu beobachten.

Trotzdem kann festgehalten werden, dass die Nährstoffkonzentrationen während des gesamten Kultivierungsverlaufs keine inhibitorischen Konzentrationen annahmen. Einzig Ammonium akkumulierte zum Ende der Fermentation auf ca. 80 mM, allerdings war das Wachstum zu diesem Zeitpunkt schon stark verlangsamt ( $\mu = 0,04 \text{ h}^{-1}$ ). Als Grund für das verlangsamte Wachstum könnte eventuell die limitierte Zufütterung von Succinat und Fructose angegeben werden, deren extrazelluläre Konzentration nach 36 h 0 betrug. Dazu muss allerdings erwähnt werden, dass in weiteren Kultivierungen unter weniger stark limitierenden Bedingungen zugefüttert wurde. Es zeigte sich aber auch dort eine stetige Abnahme der Wachstumsrate nach Erreichen der optischen Dichte  $A_{660} \approx 30$ . Die limitierte Zufütterung von Succinat und Fructose in diesem Versuch führte mit  $Y_{(X/S)} = 0,074 \frac{\text{g}_{BTM}}{\text{mmol}_{\text{Substrat}}}$  zu einer höheren Biomasseausbeute als in den Batch-Vorversuchen ( $Y_{(X/S)} = 0,054 \frac{\text{g}_{BTM}}{\text{mmol}_{\text{Substrat}}}$ ) (vgl.a. 3.1.1).

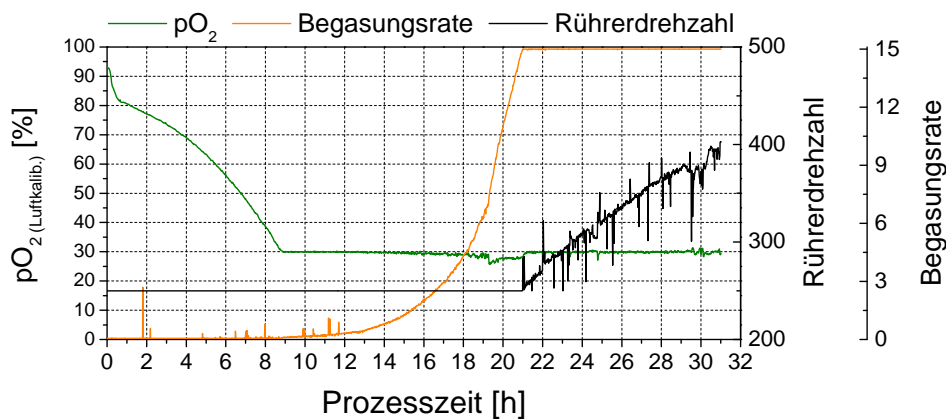
Insgesamt wurden in Fedbatch-Kultivierungen mit Succinat und Fructose als C-Substrate Raum-Zeit-Ausbeuten von  $0,65 \frac{\text{g}_{BTM}}{\text{L} \cdot \text{h}}$  erreicht, die etwas höher als die Ausbeuten von Zeiger and Grammel [2010] und vergleichbar mit dem M2AF-Prozess waren ( $0,66 \frac{\text{g}_{BTM}}{\text{L} \cdot \text{h}}$ ). Allerdings lieferte ein Fedbatch-Prozess mit Succinat/Fructose die höchsten Wachstumsraten ( $\mu_{max.} = 0,187 \text{ h}^{-1}$ ) und höchsten durchschnittlichen Wachstumsraten ( $\mu_{\emptyset} = 0,113 \text{ h}^{-1}$ ) sowie die höchsten Biomasseausbeuten ( $Y_{(X/S)} = 0,074 \frac{\text{g}_{BTM}}{\text{g}_{\text{Substrat}}}$ ). Die erreichte maximale BTM war mit  $30,1 \text{ g}_{BTM}/\text{L}$  etwas geringer als beim Acetat/Fructose-Fedbatch ( $38,8 \text{ g}_{BTM}/\text{L}$ ).

## Begasungs-Rührer-Kaskade zur $pO_2$ -Regelung

Für die Kultivierung im 10 L-Maßstab wurde eine kaskadenartige  $pO_2$ -Regelung mit Hilfe der Begasung und Rührerdrehzahl angestrebt, die unabhängig vom Vorhandensein einer Gasmischstation eingesetzt werden kann. Das Ergebnis ist in Abb. 3.12 für die Anfangsphase eines Fedbatch-Prozesses bei einem  $pO_2$ -Sollwert von  $pO_2 = 30 \%$  zu sehen. Der Sollwert wurde abweichend von den optimierten Parametern aus dem DASGIP-System auf  $pO_2 = 30 \%$  geändert, da im Zuge einer Batch-Kultivierung im Biostat C15-2K

ein verzögertes Wachstum bei 5 % festgestellt wurde. Ebenfalls schwierig gestaltete sich die  $pO_2$ -Regelung bei 5 % nach einer Antischaumzugabe. Hier sank der  $pO_2$  zwischenzeitlich auf 0 % ab, was das Wachstum zusätzlich beeinträchtigte. Aus diesem Grund wurde trotz der im DASGIP-System optimierten  $pO_2$ -Konzentration von 5 % ein  $pO_2$ -Wert von 30 % eingestellt.

In Abb. 3.12 wird ersichtlich, dass zunächst im gerührten System ohne Begasung der  $pO_2$ -Wert durch das Wachstum der Mikroorganismen von 100 % auf 30 % sank (nach 8,9 h). Zum selben Zeitpunkt setzte eine Steigerung der Begasungsrate bis auf maximal 15 L/min Druckluft ein. War dieser Maximalwert erreicht, erfolgte die Aufrechterhaltung des  $pO_2$ -Sollwertes durch eine Zunahme der Rührerdrehzahl bis auf maximal 600 rpm. Im Rahmen der Fedbatch-Kultivierungen mit Succinat/Fructose im Mischsubstrat konnte festgestellt werden, dass keine höheren Rührerdrehzahlen bzw. weitere Maßnahmen zur Aufrechterhaltung des  $pO_2$ -Wertes nötig waren. Zumeist war das Wachstum nach ca. 60 h in solchem Maß reduziert, dass der Sauerstoffverbrauch sogar wieder rückläufig war.

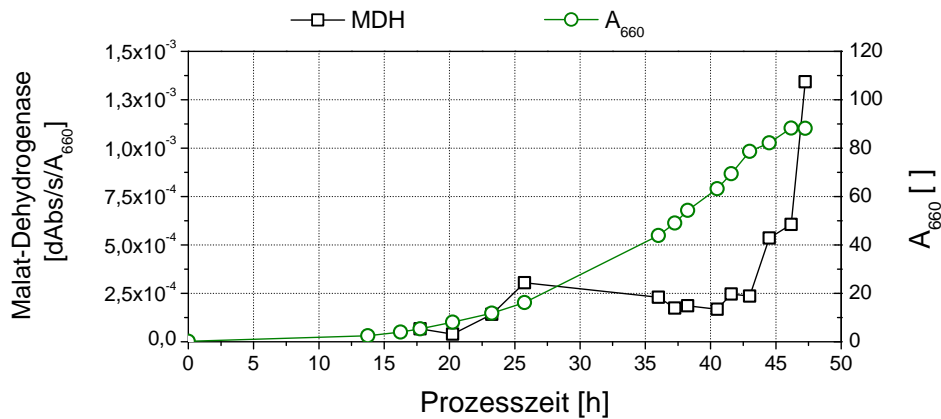


**Abb. 3.12:** Darstellung der kaskadenartigen Begasungs-Rührer- $pO_2$ -Regelung in der Regelung der Gelöstsaauerstoffkonzentration beim Biostat C15-2K Reaktor bis Stunde 31. Die Daten sind repräsentativ für mind. 3 Kultivierungen. Biostat C15-2K Fermentationsparameter. 10 L Arbeitsvolumen.

### Bestimmung von Malat-Dehydrogenase als Indikator für Zellyse

Gegen Ende der Kultivierung (nach 45 h) trat ein Wachstumsstopp bzw. ein leichtes Absterben der Zellen auf (s.a. Abb. 3.11). Ähnlich wie beim Fedbatch mit Fructose als alleinige C-Quelle war hier auch der PHB-Gehalt der Zellen bis auf 0,5 % abgesunken. Ein Nährstoffmangel konnte ausgeschlossen werden, da Fructose gegen Stunde 47 bis zu 2,2 mM und Succinat am Ende mit 20,8 mM vorlag. Ammonium, Phosphat und *p*-ABA waren ausreichend vorhanden (s.a. Abb. 3.11). Es bestand jedoch auch die Möglichkeit, dass aufgrund der hohen Zelldichte und erhöhten Rührerdrehzahlen (500 rpm) und Begasungsraten (15 L/min) (1,5 vvm) ein höherer Scherstress für die Zellen bestand und dadurch vermehrt Zellyse stattfand. Durch Messung der ausschließlich im Cytosol

vorkommenden Malat-Dehydrogenase-Aktivität im Mediums-Überstand wurde diese Vermutung zum Teil bestätigt. In Abb. 3.13 ist der Verlauf der biomassebezogenen Aktivität der Malat-Dehydrogenase zu sehen. Zwischen Stunde 23,3 und 41,6 blieb die Aktivität der Malat-Dehydrogenase mit durchschnittlich  $1,73 \times 10^3 \frac{\Delta Abs}{s \cdot A_{660}}$  relativ konstant. Nach 41,6 h jedoch fand sich ein starker Anstieg der Aktivität auf das 5,5-fache des nach 41,6 h gemessenen Wertes. Das deutet darauf hin, dass es zu diesem Zeitpunkt zu einer verstärkten Zelllyse durch das verlangsamte Wachstum kam.



**Abb. 3.13:** Aktivität der Malat-Dehydrogenase im Mediums-Überstand bezogen auf die jeweils vorliegende optische Dichte  $A_{660}$  und der Verlauf derselbigen in einer Fedbatch-Kultivierung mit Succinat/Fruktose. Daten aus 1 repräsentativen Kultivierung. Biostat C15-2K Fermentationsparameter. 10 L Arbeitsvolumen.

## Zusammenfassung der aeroben Fedbatch-Kultivierungen

Im folgenden sollen die durchgeführten Fedbatch-Kultivierungen abschließend zusammengefasst und verglichen werden. Die erreichten Zelldichten von  $24,4 \text{ g}_{BTM}/\text{L}$  mit Fructose als alleinige C-Quelle lagen weit unter den von Zeiger and Grammel [2010] publizierten Daten für eine aerobe Hochzelldichte-Kultivierung für *R. rubrum* mit Succinat/Fruktose als Substrat ( $59 \text{ g}_{BTM}/\text{L}$ ). Es ist somit offen, aus welchem Grund nach 97 h das Wachstum zum Erliegen kam, da die maximal mögliche Zelldichte für *R. rubrum* nicht erreicht wurde. Die Produktivitäten der anschließenden  $\text{O}_2$ -limitierten Phase dieses Prozesses unter diesen Bedingungen werden unter Abschn. 3.4 eingehender beschrieben. Auch die bei Acetat/Fruktose- und Succinat/Fruktose-Mischsubstraten erzielten Zelldichten waren mit  $38,8 \text{ g}_{BTM}/\text{L}$  und  $30,1 \text{ g}_{BTM}/\text{L}$  geringer, verglichen mit den von Zeiger and Grammel [2010] publizierten Daten. In Tab. 3.5 sind verschiedene wachstumsbeschreibende Parameter noch einmal zusammengefasst. Der aerobe Prozess mit Acetat/Fruktose lieferte, verglichen mit Succinat/Fruktose und Fructose als alleinige C-Quelle, die höchsten PHB-Mengen ( $\approx 23 \%$ ). Mit Fructose als alleinige C-Quelle wurde kein PHB intrazellulär akkumuliert, mit Succinat/Fruktose maximal  $0,5 \%$ . Nur Acetat als alleinige C-Quelle lieferte

mit 34,3 % einen höheren PHB-Gehalt, kommt allerdings aufgrund der geringen Wachstumsrate als alleinige C-Quelle für Fedbatch-Kultivierungen nicht in Frage (s.a. 3.1.1). Acetat und Fructose im Mischsubstrat würden demnach geeignete C-Quellen für die aerobe PHB-Produktion in *R. rubrum* darstellen.

**Tab. 3.5:** *RZA*, maximale BTM, Biomasseausbeutekoeffizienten sowie maximale und durchschnittliche Wachstumsraten der Fedbatch-Kultivierungen mit Fructose als alleinige C-Quelle und Acetat/Fructose bzw. Succinat/Fructose als Mischsubstrat. Für Acetat/Fructose: 1 Kultivierung, für Fructose bzw. Succinat/Fructose sind die Daten repräsentativ für mind. 2 Kultivierungen. Biostat CT5-2 Fermentationsparameter und Biostat C15-2K Fermentationsparameter.

	<i>RZA</i>	$BTM_{max.}$	$Y_{(X/S)}$	$\mu_{max.}$	$\mu_{\emptyset}$
	$\frac{g_{BTM}}{L \cdot h}$	$g_{BTM}/L$	$\frac{g_{BTM}}{mmol_{Substrat}}$	$h^{-1}$	$h^{-1}$
Fructose	0,25	24,4	0,072	0,111	0,062
Acetat/Fructose	0,66	38,8	0,033	0,144	0,098
Succinat/Fructose	0,65	30,1	0,074	0,187	0,113

### 3.3 2-Stufen-Prozesse als Batch-Prozesse

Batch-Versuche wurden im Dunkeln als 2-Stufen-Prozesse durchgeführt, wobei die 1. Phase eine aerobe Wachstumsphase darstellte, an die sich die 2. Phase, eine  $O_2$ -limitierte Produktionsphase anschloss. In Fedbatch-Kultivierungen sollte später die gleiche Strategie angewendet werden, das Umschalten von aerobe auf  $O_2$ -limitierenden Bedingungen sollte dann bei höheren Zelldichten erfolgen. Der Grund hierfür lag in einer höheren Wachstumsrate unter aeroben Bedingungen im Vergleich zu  $O_2$ -limitierenden Bedingungen. Höhere Zelldichten waren somit schneller unter aeroben Wachstumsbedingungen zu erreichen (vgl.a. Abschn. 3.1.1, 3.2). Durch das Umschalten auf  $O_2$ -limitierte Bedingungen wurde dann die Produktbildung induziert. Mit Ausnahme von PHB und Coenzym  $Q_{10}$  traten photosynthetische Membranen, molekularer Wasserstoff und organische Säuren ausschließlich unter  $O_2$ -limitierenden Bedingungen auf.

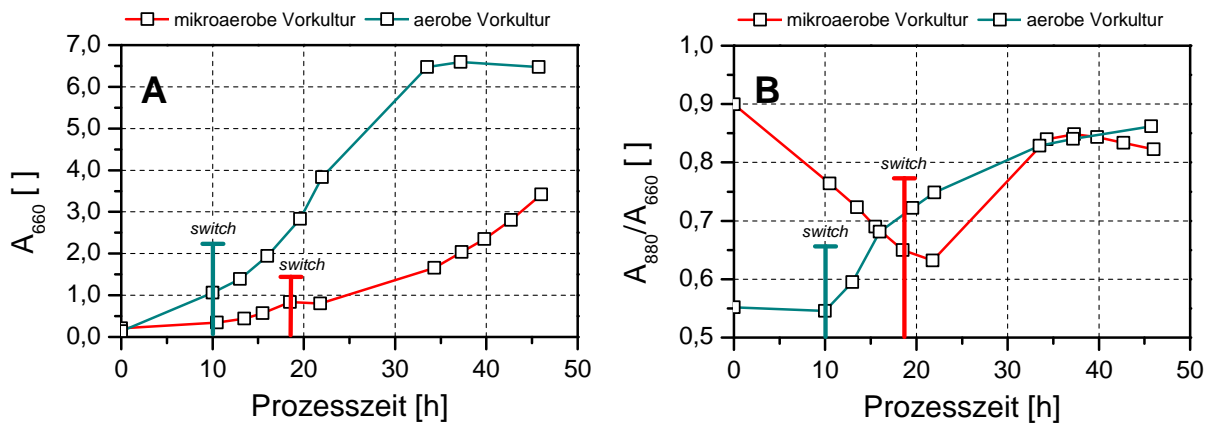
Unter  $O_2$ -limitierenden Bedingungen werden zwei verschiedene Zustände verstanden. Zum einen den mikroaeroben Zustand, der durch eine  $O_2$ -Zufuhr gekennzeichnet ist, die unterhalb des aeroben Zustandes ( $pO_2 < 5\%$ ) und oberhalb des anaeroben Zustandes (Be-gasung mit  $N_2$ ) liegt. Wachstum findet durch die Oxidation von Reduktionsäquivalenten in der Endoxidation statt. Eingestellt wurde dieser mikroaerobe Zustand mit Hilfe des Redoxpotenzials in der Flüssigphase [Srinivas et al., 1988] und einer entsprechenden Redox-elektrode (s.a. Abschn. 2.4.4).

Der zweite O<sub>2</sub>-limitierende Zustand, der untersucht wurde, war der anaerobe Zustand, bei dem keine O<sub>2</sub>-Zufuhr mehr erfolgte, sondern vielmehr eine Begasung mit N<sub>2</sub>. Hier erfolgt nur ein sehr geringes Wachstum durch die Oxidation von Reduktionsäquivalenten bei der Bildung fermentativer Produkte wie z.B. Acetat, Succinat oder Propionat. Beide Bedingungen stellten eine Reduzierung der O<sub>2</sub>-Zufuhr im Vergleich zu aeroben Bedingungen dar und induzierten die Produktbildung.

In Batch-Kultivierungen wurden die für die Bildung einzelner Produkte wichtigen Prozessparameter wie Kohlenstoffquelle, Sauerstoffzufuhr und den Einfluss der CO<sub>2</sub>-Zufuhr bestimmt. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Vorkultur auf den Hauptprozess untersucht.

### 3.3.1 Einfluss der Vorkultur

Grammel et al. [2003] beschreiben ein 2-Stufen-Prozess zur Produktion maximaler photosynthetischer Membranen im Dunkeln ausgehend von einer phototrophen Vorkultur. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der Starterkultur (aerob/mikroaerob) auf das Wachstum und die Produktbildung für den mikroaeroben Zustand mit M2SF-Medium untersucht. Eine mikroaerobe Vorkultur wurde anstelle der phototrophen Vorkultur aufgrund der Dauer ( $\approx 7$  Tage) der Vorkultivierung gewählt. Aus dem selben Grund wurde auch der Einfluss einer anaerob/dunklen Vorkultur nicht untersucht ( $\mu_{exp} = 0,02 \text{ h}^{-1}$ ) (vgl.a. Abschn. 3.3.3).



**Abb. 3.14:** Verlauf von A<sub>660</sub> (A) und  $\frac{A_{880}}{A_{660}}$  (B) bei einem aerob/mikroaeroben 2-Stufen-Prozess auf M2SF-Medium mit aerober und mikroaerober Starterkultur. Die farbigen Balken kennzeichnen den Umschalt-Zeitpunkt (*switch*) von aerob auf mikroaerob (Redoxpotenzial = -350 mV) für die jeweiligen Vorkulturen. Daten sind repräsentativ für mind. 3 Kultivierungen. Biostat CT5-2 Fermentationsparameter.

In Abb. 3.14 wird ersichtlich, dass der Verlauf der Biomassekonzentration und die Bildung photosynthetischer Membranen stark von der Vorkultur abhängen. Eine aerobe Vorkultivierung ermöglichte optimales Wachstum ( $\mu_{exp} = 0,19 \text{ h}^{-1}$ ) während der aeroben

Wachstumsphase im Bioreaktor. Bei einer mikroaeroben Vorkultur war das Wachstum zunächst langsamer ( $\mu_{exp} = 0,13 \text{ h}^{-1}$ ), da die Zellen in der Vorkultur an geringere  $\text{O}_2$ -Konzentrationen adaptiert waren. Der hohe Sauerstoffpartialdruck im Bioreaktor könnte zu oxidativem Stress der Zellen führen haben und das verlangsamte Wachstum gegenüber aerob angepassten Zellen erklären. Nach dem Umschalten auf mikroaerobe Sauerstoffbedingungen verringerten sich die Wachstumsraten unabhängig von der Vorkultur um etwas mehr als die Hälfte. Die Wachstumsrate lag bei der aeroben Vorkultur bei  $\mu_{exp} = 0,11 \text{ h}^{-1}$  und bei der mikroaeroben Vorkultur bei  $\mu_{exp} = 0,07 \text{ h}^{-1}$  (s.a. Tab. 3.6).

Succinat und Fructose wurde in beiden Fällen gleichzeitig aufgenommen, sowohl unter aeroben als auch unter mikroaeroben Bedingungen. Es erfolgte kein diauxischer Wachstumsverlauf. Die Substrataufnahmeraten und Biomasseausbeutekoeffizienten für die mikroaerobe Wachstumsphase sind in Tab. 3.6 dargestellt. Die wachstumsbeschreibenden Parameter für die aeroben Wachstumsphasen beider Vorkulturen wurden aufgrund der kurzen Phase bei relativ niedrigen Zelldichten nicht berechnet.

**Tab. 3.6:** Wachstumsbeschreibende Parameter für die mikroaerobe Phase in Abhängigkeit von der Vorkultur. Die Größen wurden über den gesamten Zeitraum der mikroaeroben Phase berechnet. Die angegebenen Standardabweichungen beziehen sich auf jeweils 3 unabhängig voneinander durchgeführten Kultivierungen. Biostat CT5-2 Fermentationsparameter.

Parameter	Aerobe Vorkultur	Mikroaerobe Vorkultur
Wachstumsrate $\mu_{exp}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$0,110 \pm 0,014$	$0,071 \pm 0,015$
$q_{Succ}$ ( $\frac{\text{mmol}_{Succinat}}{\text{g}_{BTM} \cdot \text{h}}$ )	$0,517 \pm 0,076$	$0,628 \pm 0,087$
$q_{Fruc}$ ( $\frac{\text{mmol}_{Fructose}}{\text{g}_{BTM} \cdot \text{h}}$ )	$1,093 \pm 0,142$	$0,749 \pm 0,183$
$q_C$ ( $\frac{\text{mmol}_C}{\text{g}_{BTM} \cdot \text{h}}$ )	$8,59 \pm 0,75$	$7,00 \pm 0,75$
$Y_{(X/S)}$ ( $\frac{\text{g}_{BTM}}{\text{g}_{Substrat}}$ )	$0,42 \pm 0,04$	$0,50 \pm 0,09$
$Y_{(X/S)}$ ( $\frac{\text{g}_{BTM}}{\text{mmol}_{Substrat}}$ )	$0,070 \pm 0,007$	$0,065 \pm 0,009$
$Y_{(X/S)}$ ( $\frac{\text{g}_{BTM}}{\text{mol}_C}$ )	$13,21 \pm 1,50$	$12,05 \pm 1,29$

Auch der Verlauf der photosynthetischen Membranlevel war unterschiedlich (Abb. 3.14/B). In der aeroben Wachstumsphase der aeroben Vorkultur ist das Level photosynthetischer Membranen  $\frac{A_{880}}{A_{660}} = 0,550$ . Die Zellen enthielten keine photosynthetischen Membranen, da bei Sauerstoffpartialdrücken von  $p\text{O}_2 > 5 \%$  die Ausbildung photosynthetischer Membranen im Dunkeln reprimiert ist [Kaplan, 1978]. Mit mikroaerob vorkultivierten *R. rubrum*-Zellen hingegen war zum Zeitpunkt 0 h bereits ein Membranlevel von  $\frac{A_{880}}{A_{660}} = 0,901$  vorhanden. Durch die aeroben Kultivierungsbedingungen zu Beginn der Kultivierung nahm der Gehalt an photosynthetischen Membranen zunächst ab. Erst durch Absenkung der Sauerstoffzufuhr auf mikroaerobe Bedingungen (nach 18,5 h) wurde

die Membranbildung induziert und das PM-Level stieg wieder bis auf  $\frac{A_{880}}{A_{660}} = 0,849$  an. Dazu muss allerdings bemerkt werden, dass die vorgelegte Menge Fructose von 3 g/L bereits nach ca. 27,5 h aufgebraucht war. Der Anstieg des  $\frac{A_{880}}{A_{660}}$ -Levels nach 27,5 h erfolgte nur noch auf Succinat als C-Quelle, dessen Konzentration zu diesem Zeitpunkt ca. 31 mM betrug. In dem aeroben/mikroaeroben Versuch mit aerober Vorkultivierung stieg das Membranverhältnis nach 35,8 h bis auf  $\frac{A_{880}}{A_{660}} = 0,862$  an.

Aus den  $\frac{A_{880}}{A_{660}}$ -Verhältnissen lassen sich, wie unter Abschn. 2.5.9 beschrieben, spezifische Bacteriochlorophyll-Konzentrationen berechnen. Die maximalen Bacteriochlorophyll-Mengen, Raum-Zeit-Ausbeuten und Produktausbeuten sind in Tab. 3.7 zusammengefasst.

**Tab. 3.7:** Bacteriochlorophyllkonzentrationen, *RZA* und Produktausbeuten in Abhängigkeit von der Vorkultur in 2-Stufen-Batch-Prozessen unter mikroaeroben Sauerstoffbedingungen (Redoxpotenzial = -350 mV) im Dunkeln auf M2SF-Medium. Die *RZA* und Produktausbeuten wurden für die mikroaerobe Produktionsphase bis zum Erreichen der maximalen spezifischen Bacteriochlorophyll-Konzentration bestimmt. Daten sind repräsentativ für mind. 3 Kultivierungen. Biostat CT5-2 Fermentationsparameter.

Parameter	Aerobe Vorkultur	Mikroaerobe Vorkultur
$Bchl_{maximal}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	8,85	2,64
$Bchl_{maximal}$ ( $\mu\text{mol/g}_{BTM}$ )	3,81	3,60
<i>RZA</i> ( $\frac{\mu\text{mol}}{\text{L} \cdot \text{h}}$ )	0,343	0,163
$\frac{A_{880}}{A_{660}}$ maximal	0,862	0,849
$Y_{(P/S)}$ ( $\frac{\mu\text{mol}_{Bchl}}{\text{g}_{Substrat}}$ )	1,33	1,83

Es wird ersichtlich, dass Unterschiede lediglich in den dynamischen Größen wie Wachstumsrate, Substrataufnahmeraten und Raum-Zeit-Ausbeuten auftraten. Bei den verschiedenen Ausbeutekoeffizienten fiel auf, dass keine großen Unterschiede vorhanden waren. Die Biomasseausbeute war mit  $Y_{(X/S)} = 0,42 \frac{\text{g}_{BTM}}{\text{g}_{Substrat}}$  bei Verwendung einer aeroben Vorkultur etwas geringer als bei einer mikroaeroben Vorkultur ( $Y_{(X/S)} = 0,50 \frac{\text{g}_{BTM}}{\text{g}_{Substrat}}$ ). Auch die spezifisch gebildeten Bacteriochlorophyll-Mengen waren mit 3,81  $\mu\text{mol/g}_{BTM}$  und 3,60  $\mu\text{mol/g}_{BTM}$  vergleichbar. Eine Ausnahme bildete der Bacteriochlorophyll-Ausbeutekoeffizient.  $Y_{(P/S)} = 1,33 \frac{\mu\text{mol}_{Bchl}}{\text{g}_{Substrat}}$  wurden durch eine aerobe Vorkultivierung erzielt, im Gegensatz zu  $Y_{(P/S)} = 1,83 \frac{\mu\text{mol}_{Bchl}}{\text{g}_{Substrat}}$  bei der mikroaeroben Vorkultur. Der Grund hierfür könnte im Abbau der zur Beginn bereits vorhandenen photosynthetischen Membranen und der damit verbundenen Gewinnung von zusätzlichem Kohlenstoff und Energie liegen.

Für Fedbatch-Kultivierungen im Rahmen eines 2-Stufen-Prozesses ist der Einsatz einer mikroaeroben Vorkultur nicht von Vorteil. Geringere Wachstumsraten und Raum-Zeit-Ausbeuten würden einen biotechnologischen Prozess verschlechtern. Für Fedbatch-Kultivierungen sollte eine aerobe Vorkultur zum Einsatz kommen, welche zunächst in einer



aeroben Wachstumsphase unter optimalen Bedingungen zu möglichst hohen Zelldichten wachsen kann.

In Tab. 3.8 wird deutlich, dass trotz leicht unterschiedlicher Wachstumsraten die CO<sub>2</sub>-Ausscheideraten bei beiden Vorkulturen während der mikroaeroben Phase identisch waren. Ein großer Unterschied fand sich allerdings für die H<sub>2</sub>-Bildung in der mikroaeroben Phase. Die mikroaerobe Vorkultivierung lieferte während der mikroaeroben Produktionsphase eine fast 5-fach gesteigerte maximale H<sub>2</sub>-Produktionsrate ( $0,043 \frac{\text{mmol}}{\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h}}$ ) und größere H<sub>2</sub>-Gesamtmengen bezogen auf den gesamten Prozess (21,7 mL H<sub>2</sub>).

**Tab. 3.8:** Abgaszusammensetzung im mikroaeroben 2-Stufen-Prozess in Abhängigkeit von der Vorkultivierung hinsichtlich H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub>. Für H<sub>2</sub> sind die maximalen spezifischen Raten dargestellt. CO<sub>2</sub>-Ausscheideraten für die mikroaerobe Phase, je eine Kultivierung. Biostat CT5-2 Fermentationsparameter.

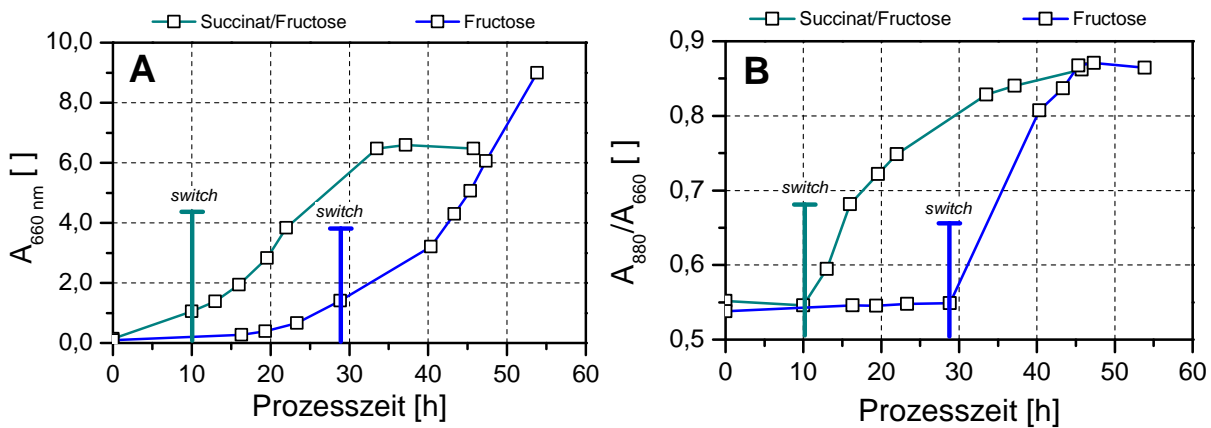
	CO <sub>2</sub>		H <sub>2</sub>	
	$\frac{\text{mmol}}{\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h}}$	$\frac{\text{mmol}}{\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h}}$	mL	Gesamt
Aerobe Vorkultur	1,096	0,009	5,4	
Mikroaerobe Vorkultur	1,055	0,043	21,7	

### 3.3.2 Einfluss des Substrates

Das unter mikroaeroben Bedingungen im Dunkeln bei Grammel et al. [2003] vorgeschlagene M2SF-Medium enthält neben Fructose die Dicarbonsäure Succinat. Mikroaerobe Sauerstoffbedingungen erlauben die gleichzeitige Aufnahme von Fructose und Succinat. Die simultane Aufnahme dieser beiden Substrate könnte durch die Bereitstellung der intrazellulären Precursor Acetyl-CoA aus Fructose und Succinyl-CoA aus Succinat die erhöhte Produktion photosynthetischer Membranen erklären. Jedoch ist Succinat wesentlich kostenintensiver als Fructose (vgl.a. Abschn. 1.1.3). Darüber hinaus ist *R. rubrum* in der Lage selbst unter anaeroben Bedingungen Succinat als Gärungsprodukt ins Medium auszuscheiden [Schultz and Weaver, 1982].

In Batch-Kultivierungen mit aeroben Vorkulturen wurde daher untersucht, ob auf Succinat als Substrat unter mikroaeroben Bedingungen verzichtet werden kann. Für die Versuche wurde für Fructose mit einer konstanten CO<sub>2</sub>-Begasung von 0,2 L/min (0,06 vvm) gearbeitet (s.a. Abschn. 3.1.3).

In Abb. 3.15 sind die zeitlichen Verläufe des Wachstums und der Bildung photosynthetischer Membranen zu sehen. Deutlich wird, neben den oben bereits dargelegten Ergebnissen, das schnellere Wachstum bei Succinat/Fructose-Mischsubstrat während der aeroben Phase im Vergleich zu Fructose als alleinige C-Quelle (vgl.a. Abschn. 3.1.1), was in



**Abb. 3.15:** Verlauf von  $A_{660}$  (A) und  $\frac{A_{880}}{A_{660}}$  (B) bei einem aerob/mikroaeroben 2-Stufen-Prozess mit Succinat/Fructose bzw. Fructose. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für jeweils 2 Kultivierungen. In beiden Fällen: aerobe Starterkulturen. Die farbigen Balken kennzeichnen den jeweiligen Umschalt-Zeitpunkt (*switch*) von aerob auf mikroaerob (Redoxpotenzial = -350 mV), Biostat CT5-2 Fermentationsparameter.

einem späteren Umschalt-Zeitpunkt (ca. 20 h später) beim Einsatz von Fructose resultierte. Für einen besseren Vergleich erfolgte hier das Umschalten von aerob auf mikroaerob bei der gleichen Zelldichte, da diese einen entscheidenden Einfluss auf die Bildung von photosynthetischen Membranen im Dunkeln hat (s.a. Abschn. 3.4).

**Tab. 3.9:** Bacteriochlorophyllkonzentrationen,  $RZA$  und Produktausbeuten in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle unter mikroaeroben Sauerstoffbedingungen (Redoxpotenzial = -350 mV) im Dunkeln. Die  $RZA$  und Produktausbeuten wurden für die mikroaerobe Produktionsphase bis zum Erreichen der maximalen Bacteriochlorophyll-Konzentration bestimmt. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für jeweils 2 Kultivierungen. Biostat CT5-2 Fermentationsparameter.

Parameter	Succinat/Fructose	Fructose
$Bchl_{maximal}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	8,85	8,59
$Bchl_{maximal}$ ( $\mu\text{mol/g}_{BTM}$ )	3,81	3,95
$RZA$ ( $\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}\cdot\text{h}}$ )	0,343	0,638
$\frac{A_{880}}{A_{660}}$ maximal	0,862	0,871
$Y_{(P/S)}$ ( $\frac{\mu\text{mol}_{Bchl}}{\text{g}_{Substrat}}$ )	1,33	1,63

In Tab. 3.9 wird deutlich, dass mit Fructose als alleinige C-Quelle nahezu identische Bacteriochlorophyll-Mengen erzielt werden konnten wie mit Succinat/Fructose-Mischsubstrat. Die maximalen spezifischen Konzentrationen lagen bei 3,95 bzw. 3,81  $\mu\text{mol Bchl/g}_{BTM}$ .

Auffallend war die fast doppelt so hohe  $RZA$  für Bacteriochlorophyll mit Fructose als C-Quelle (0,638  $\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}\cdot\text{h}}$ ) im Vergleich zu Succinat/Fructose (0,343  $\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}\cdot\text{h}}$ ). Photosynthetische Membranen wurden somit mit M2F-Medium schneller als mit M2SF-Medium gebildet, bei gleichen maximalen spezifischen Bacteriochlorophyll-Konzentrationen. Über genauere

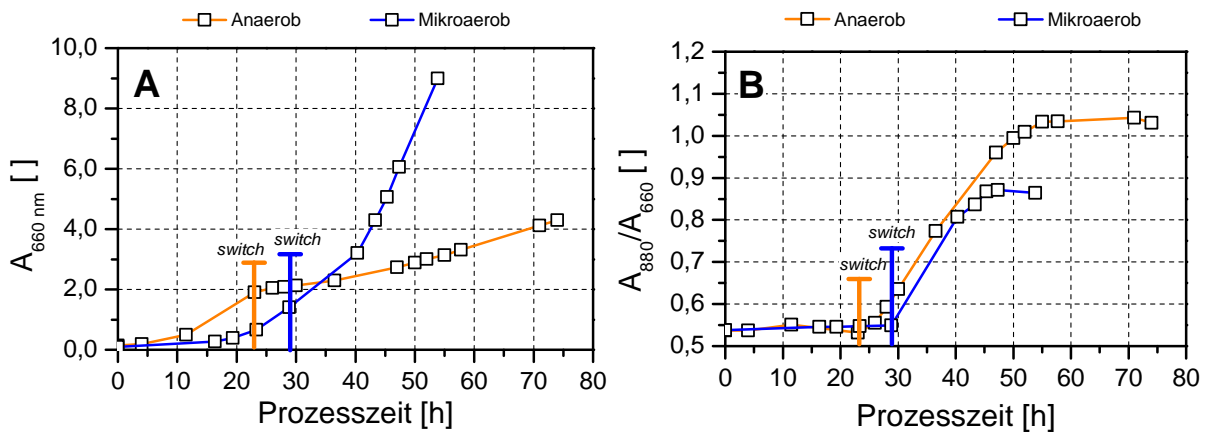
Ursachen dieser Beobachtung kann jedoch nur spekuliert werden. Berücksichtigt werden muss der Einfluss der CO<sub>2</sub>-Begasung hinsichtlich CO<sub>2</sub>-fixierender, anaplerotischer Reaktionen beim M2F-Versuch, da mit M2SF-Medium keine CO<sub>2</sub>-Begasung notwendig war. Auffällig war darüber hinaus, dass während der Bildung intracytoplasmatischer Membranen unter mikroaeroben Bedingungen mit M2F keine organischen Säuren ins Medium ausgeschieden worden sind. Erst das Erreichen stationärer Membranlevel ging mit einer Exkretion der organischen Säuren Succinat (max. 4,4 mM), Acetat (max. 19,4 mM), Propionat (max. 8,0 mM) und Fumarat (max. 0,3 mM) einher. Im Gegensatz dazu wurde unter Verwendung von M2SF-Medium keine Ausscheidung organischer Säuren beobachtet. Eine Ausnahme bildete Fumarat, das jedoch bereits unter aeroben Bedingungen mit 0,05 mM (erreichte Konzentration vor dem Umschalten) gebildet worden ist. Bei dem von Grammel et al. [2003] vorgestellten mikroaeroben Prozess wurden zwar Acetat und Formiat gebildet, jedoch wurden für diesen Prozess die mikroaeroben Bedingungen nicht über das Redoxpotential eingestellt, sondern mit Hilfe einer pH-abhängigen Sauerstoffzufuhr. Aus diesem Grund lassen sich die beiden mikroaeroben Prozesse nicht direkt miteinander vergleichen.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass beim mikroaeroben Prozess mit Fructose als alleiniger C-Quelle, Succinat sehr effizient bis zum Erreichen der maximaler Membranlevel als Succinyl-CoA zur Bacteriochlorophyll-Biosynthese abgezogen wird. Ist das Level photosynthetischer Membranen stationär, wird weniger Succinyl-CoA für die Bacteriochlorophyll-Biosynthese benötigt und Succinat wird in das extrazelluläre Medium ausgeschieden. Sowohl mit M2SF als auch mit M2F konnten in etwa gleiche Wachstumsraten (beide  $\mu_{exp} \approx 0,11 \text{ h}^{-1}$ ) und gleich Fructoseaufnahmeraten (beide  $q_{Fruc} \approx 1,0 \frac{\text{mmol}_{Fructose}}{\text{g}_{BTM} \cdot \text{h}}$ ) für die mikroaerobe Sauerstoffphase gefunden werden.

### 3.3.3 Einfluss der Sauerstoffzufuhr

In den Abschnitten 3.3.1 und 3.3.2 wurden jeweils das Wachstum und die Produktion photosynthetischer Membranen unter mikroaeroben Sauerstoffbedingungen vorgestellt. Neben mikroaeroben Bedingungen besteht jedoch auch die Möglichkeit, die Produktbildung durch Umschalten auf komplett anaerobe Bedingungen zu induzieren [Schön and Ladwig, 1970; Schön, 1968; Biedermann et al., 1967]. Aus diesem Grund wurden mikroaerobe und anaerobe Sauerstoffbedingungen in Batch-Kultivierungen verglichen. Auch für diese Versuche wurde mit einer konstanten CO<sub>2</sub>-Begasung von 0,2 L/min (0,06 vvm) gearbeitet.

In Abb. 3.16 sind das Wachstum und die Bildung photosynthetischer Membranen für mikroaerobe und anaerobe Bedingungen mit Fructose als C-Quelle dargestellt. Deutliche Unterschiede sind im Verlauf der optischen Dichte  $A_{660nm}$  und  $\frac{A_{880}}{A_{660}}$  erkennbar. Das völlige



**Abb. 3.16:** Verlauf von  $A_{660}$  (A) und  $\frac{A_{880}}{A_{660}}$  (B) bei einem aerob/mikroaeroben und aerob/anaeroben 2-Stufen-Prozess mit Fructose als alleinige C-Quelle. In beiden Fällen: aerobe Starterkulturen. Die farbigen Balken kennzeichnen den jeweiligen Umschalt-Zeitpunkt von aerob auf mikroaerob (Redoxpotenzial = -350 mV) bzw. anaerob ( $N_2$ ). Beide:  $CO_2 = 0,2 \text{ L/min}$ . Die dargestellten Daten sind repräsentativ für jeweils 2 Kultivierungen. Biostat CT5-2 Fermentationsparameter.

Fehlen von Sauerstoff bewirkt eine rapide Verlangsamung des Wachstums im Vergleich zu mikroaeroben Sauerstoffbedingungen. Die Wachstumsrate betrug durchschnittlich nur noch  $\mu_{exp} = 0,02 \text{ h}^{-1}$  und damit noch etwa 20 % der Wachstumsrate unter mikroaeroben Bedingungen auf Fructose als alleinige C-Quelle ( $\mu_{exp} = 0,10 \text{ h}^{-1}$ ).

Auch die Bildung photosynthetischer Membranen verlief unterschiedlich. In Abb. 3.16 wird ersichtlich, dass das maximale Verhältnis mit  $\frac{A_{880}}{A_{660}} = 1,034$  unter anaeroben Bedingungen deutlich höher war als mikroaerob ( $\frac{A_{880}}{A_{660}} = 0,862$ ). Das verlangsamte Wachstum in Verbindung mit höheren spezifischen Produktivitäten hat Auswirkungen auf Konzentration,  $RZA$  und Ausbeutekoeffizient von Bacteriochlorophyll. Eine Zusammenfassung dieser Werte findet sich in Tab. 3.10.

Trotz der höheren spezifischen Produktion photosynthetischer Membranen führte die starke Stagnation des Wachstums zu geringeren Raum-Zeit-Ausbeuten ( $\approx 43 \%$  geringer) und geringeren Konzentrationen ( $\approx 30 \%$  geringer) an Bacteriochlorophyll (s.a. Tab. 3.10). Die geringere Produktionsrate lässt sich durch die starke Umstellung des Stoffwechsels von aerobe auf anaerobe Bedingungen erklären. Unter aeroben Bedingungen ist der TCA-Zyklus oxidativ. Die Stoffwechselreaktionen gehen „im Uhrzeigersinn“ in Richtung NADH/FADH<sub>2</sub>-Synthese und ATP-Produktion in der oxidativen Phosphorylierung. In Abwesenheit von Sauerstoff können diese Reaktionen nicht mehr ablaufen und die Aktivität der oxidativen Enzyme des TCA-Zyklus wird, zumeist durch NADH-Überschuss, inhibiert [Gray et al., 1966]. Im Gegenzug werden jetzt die Enzyme des reduktiven TCA-Zyklus aktiv, was zu einem reversen TCA-Zyklus „gegen den Uhrzeigersinn“ führt (vgl.a. Abschn. 1.1.5 und 1.1.5). Die Inhibierung und Aktivierung bzw. *de-novo*-Synthese von Enzymen erfordert eine enorme Stoffwechselleistung der Zelle und benötigt entsprechende Zeit. Die Umstellung auf mikroaerobe Sauerstoffbedingungen hingegen stellt eine

weniger drastische Änderung der Sauerstoffverhältnisse dar und kann deshalb schneller erfolgen.

**Tab. 3.10:** Bacteriochlorophyllkonzentrationen, *RZA* und Produktausbeuten in Abhängigkeit von der Sauerzufuhr auf Fructose als alleinige C-Quelle im Dunkeln. Die *RZA* und Produktausbeuten wurden für die mikroaerobe/anaerobe Produktionsphase bis zum Erreichen der maximalen Bacteriochlorophyll-Konzentration bestimmt. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für jeweils 2 Kultivierungen. Biostat CT5-2 Fermentationsparameter.

Parameter	Mikroaerob	Anaerob
$Bchl_{maximal}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	8,85	6,31
$Bchl_{maximal}$ ( $\mu\text{mol/g}_{BTM}$ )	3,81	6,46
$RZA$ ( $\frac{\mu\text{mol}}{L \cdot h}$ )	0,343	0,197
$\frac{A_{880}}{A_{660}}$ maximal	0,862	1,034
$Y_{(P/S)}$ ( $\frac{\mu\text{mol}_{Bchl}}{g_{Substrat}}$ )	1,33	1,57

Bisher noch nicht detailliert untersucht ist die genaue Stoffflusslage unter mikroaeroben Bedingungen (z.B. des TCA-Zyklus) und wird aus diesem Grund unter Abschn. 3.7.3 im Rahmen der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse und der Bestimmung von intrazellulären Metabolitenkonzentrationen genauer untersucht.

Zusätzlich zur Produktion photosynthetischer Membranen erlauben anaerobe Bedingungen die Bildung von organischen Säuren und höheren Mengen  $\text{H}_2$  [Das and Veziroğlu, 2001]. In Tab. 3.11 sind daher die Succinat-Konzentrationen nach 24 h Produktionsphase und die gebildeten  $\text{H}_2$ -Mengen der zwei Kultivierungen dargestellt.

In Tab. 3.11 wird ersichtlich, dass unter anaeroben Bedingungen wesentlich höhere Succinatmengen (16,5 mM nach 24 h) erzielt werden konnten als unter mikroaeroben Bedingungen (0,3 mM nach 24 h). Kennzeichnend für das Umschalten auf mikroaerobe Sauerstoffbedingungen ist zudem, dass die Succinatbildung erst eingesetzt hat nachdem das Verhältnis  $\frac{A_{880}}{A_{660}}$  konstant war. Beim Umschalten auf anaerobe Bedingungen begann sofort die Bildung organischer Säuren. Neben Succinat wurden Acetat (12,8 mM), Propionat (3,5 mM) und in geringen Mengen Fumarat (0,04 mM) und Formiat (2,2 mM) gebildet (alle Werte nach 24 h). Die Endkonzentration an Succinat betrug 26,2 mM mit einem Ausbeutekoeffizient von  $Y_{(P/S)} = 0,732 \frac{\text{mol Succinat}}{\text{mol Fructose}}$ . Im Gegensatz dazu wurden unter mikroaeroben Bedingungen nach 24 h Produktionsphase nur sehr geringe Mengen organische Säuren gebildet. Insgesamt wurden nur 4,6 mM organische Säuren produziert (gegenüber 35 mM unter anaeroben Bedingungen). Auffällig ist auch, dass im Verhältnis ca. 10-fach höhere Mengen Acetat im Vergleich zu Succinat gebildet wurden als unter anaeroben Bedingungen. Auch diese Werte spiegeln die unterschiedliche Organisation des TCA-Zyklus unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen wider, worauf unter Abschn. 3.7.3 genauer eingegangen wird.

**Tab. 3.11:** Gebildete Mengen Succinat und H<sub>2</sub> unter mikroaeroben und anaeroben Sauerstoffbedingungen mit Fructose als alleinige C-Quelle. Succinatkonzentrationen nach 24 h Produktionsphase. Maximale H<sub>2</sub>-Bildungsraten und Gesamtvolumen an gebildeten H<sub>2</sub>, jeweils 1 Kultivierung. Biostat CT5-2 Fermentationsparameter.

	Succinat <sub>24 h</sub>	H <sub>2</sub>	
	mmol/L	$\frac{mmol}{g_{BTM} \cdot h}$	mL Gesamt
Mikroaerob	0,3	0,07	5,11
Anaerob	16,5	0,273	422,5

Auch die H<sub>2</sub>-Bildung war unter anaeroben Bedingungen sehr viel höher als unter mikroaeroben Bedingungen im Dunkeln. Die maximale H<sub>2</sub>-Bildungsrate war mit 0,273  $\frac{mmol}{L \cdot h}$  ca. 4-mal so hoch als unter mikroaeroben Sauerstoffbedingungen (0,07  $\frac{mmol}{L \cdot h}$ ). Die Gesamtwasserstoffbildung war mit 422,5 mL (nach 2 d) ebenfalls um ein vielfaches höher als unter mikroaeroben Sauerstoffbedingungen (5,11 mL).

Trotz geringerer RZA und volumetrischer Produktivität bei der Bildung photosynthetischer Membranen erlaubte der aerob/anaerobe 2-Stufen-Prozess neben der Produktion von Bacteriochlorophyll die Bildung von höheren Mengen Succinat und molekularem Wasserstoff. Darüber hinaus lassen sich höhere spezifische Bacteriochlorophyll-Konzentrationen erzielen. Würde der Prozess durch eine verlängerte aerobe Wachstumsphase bei höheren Zelldichten durchgeführt werden, ließen sich so höhere Bacteriochlorophyll-Konzentrationen erzielen. Berücksichtigt werden muss außerdem, dass eine mikroaerobe Prozessführung anhand des Redoxpotenzials mittels Redoxelektrode in industriellen Maßstäben kaum möglich ist. Die Einstellung anaerober Bedingungen (durch Begasung mit N<sub>2</sub>) ist im Gegenzug sehr einfach einzustellen.

### 3.3.4 Optimierung der CO<sub>2</sub>-Zufuhr

*R. rubrum* benötigt für das Wachstum und die Produktion photosynthetischer Membranen unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln Carbonat [Schultz and Weaver, 1982]. Auch die Bildung organischer Säuren, darunter Succinat, hängt wesentlich von der Verfügbarkeit von CO<sub>2</sub> ab [Schultz and Weaver, 1982; Schön and Jank-Ladwig, 1972]. Bei der Bildung von Succinat über die anaplerotischen Reaktionen wird CO<sub>2</sub> fixiert, so dass hohe theoretische Produktausbeuten ( $> 1 \frac{mol_{Succinat}}{mol_{Fructose}}$ ) möglich sind [Jantama et al., 2008].

#### Begasung mit CO<sub>2</sub>

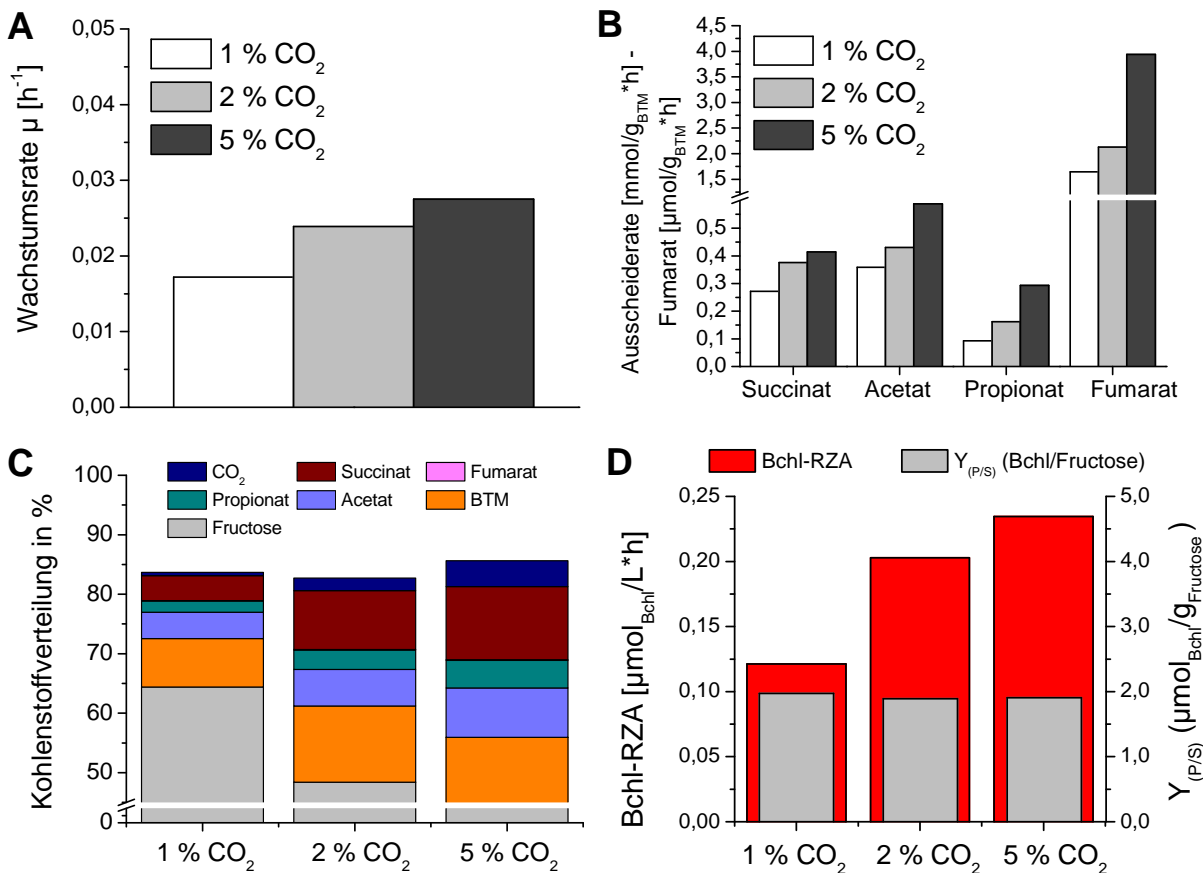
Aus den vorangegangenen Untersuchungen zu Vorkultur, Substrat und Sauerstoffzufuhr sind Fructose als Substrat unter anaeroben Bedingungen und eine aerobe Vorkultivierung

als optimierte Parameter für eine biotechnologische Anwendung von *R. rubrum* hervorgegangen (s.a. Abschn. 3.3.1, 3.3.2, 3.3.3). Für eine effiziente CO<sub>2</sub>-Zufuhr unter anaeroben Bedingungen mit Fructose wurden parallele Batch-Kultivierungen im DASGIP-System durchgeführt. Dabei wurde die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Zuluft zwischen 1 %, 2 % und 5 % (5 L/h Gesamtgasfluss) variiert. Die Umschalt-Zelldichte lag in allen Fällen bei A<sub>660</sub> = 2. 0 % CO<sub>2</sub> wurde nicht untersucht, da in Abschn. 3.1.3 bereits die CO<sub>2</sub>-Abhängigkeit für das aerobe Wachstum auf Fructose ermittelt wurde und in bisherigen Publikationen eine Abhängigkeit des anaeroben Wachstums im Dunkeln von Carbonat bereits beschrieben ist [Schultz and Weaver, 1982].

In Abb. 3.17 sind die Ergebnisse für den Einfluss der CO<sub>2</sub>-Konzentration auf das Wachstum, die Bildung photosynthetischer Membranen und organischer Säuren zusammengefasst dargestellt. Deutlich zu erkennen ist der positive Einfluss steigender CO<sub>2</sub>-Konzentrationen auf die Wachstumsrate, die sich ungefähr um das 1,6-fache bei 5 % CO<sub>2</sub> ( $\mu_{exp} = 0,028 \text{ h}^{-1}$ ) im Vergleich zu 1 % CO<sub>2</sub> ( $\mu_{exp} = 0,017 \text{ h}^{-1}$ ) erhöhte (Abb. 3.17/A). Ähnlich verhielt es sich mit den Bildungsraten für Succinat, Acetat, Propionat und Fumarat, die mit zunehmender CO<sub>2</sub>-Konzentration signifikant anstiegen (Abb. 3.17/B). Unbeeinflusst davon blieb allerdings die spezifische Bildung der organischen Säuren. Am Ende der Kultivierung lagen bei allen 3 untersuchten CO<sub>2</sub>-Konzentrationen  $\approx 5,9 \frac{\text{mmol}}{\text{gBTM}}$  Succinat,  $\approx 8,8 \frac{\text{mmol}}{\text{gBTM}}$  Acetat,  $\approx 3,0 \frac{\text{mmol}}{\text{gBTM}}$  Propionat und  $\approx 55 \frac{\mu\text{mol}}{\text{gBTM}}$  Fumarat vor.

In Abb. 3.17/C ist die Kohlenstoffbilanz nach 30 h Produktionsphase zu sehen. Auch hier wird der Einfluss von CO<sub>2</sub> zum einen auf das Wachstum und auf die Bildung organischer Säuren deutlich, zum anderen aber auch auf die Fructoseaufnahme und die CO<sub>2</sub>-Bildung, denn auch unter anaeroben Bedingungen wurde ein kleiner Teil des Kohlenstoffs zu CO<sub>2</sub> umgewandelt. Der Anteil von Fructose am Gesamtkohlenstoff nach 30 h Produktionsphase bei 5 % CO<sub>2</sub> war mit 46 % wesentlich geringer als bei 1 % CO<sub>2</sub> (76 %). Das bedeutet, dass eine Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Konzentration von 1 auf 5 % zu einer gesteigerten Fructoseaufnahme geführt hat, infolgedessen auch das Wachstum, die Bildung aller organischer Säuren (Succinat, Acetat, Propionat und Fumarat) und die CO<sub>2</sub>-Abgabe anstieg. Bei 5 % CO<sub>2</sub> hatte Succinat mit 14,3 % von den organischen Säuren den größten Anteil.

Auch die Bildung photosynthetischer Membranen wurde anaerob mit Fructose als C-Quelle durch die CO<sub>2</sub>-Verfügbarkeit beeinflusst. In Abb. 3.17/D sind die Raum-Zeit-Ausbeuten und die Substratausbeuten für Bacteriochlorophyll dargestellt. Im Gegensatz zur Ausbeute wurde nur die RZA von der CO<sub>2</sub>-Konzentration positiv beeinflusst. Durch die gesteigerte Verfügbarkeit von CO<sub>2</sub> wurden  $\approx 2$ -fach höhere Raum-Zeit-Ausbeuten für Bacteriochlorophyll bei 5 % CO<sub>2</sub> im Vergleich zu 1 % CO<sub>2</sub> erzielt, was hauptsächlich mit der schnelleren Bildung von Biomasse unter anaeroben Bedingungen zusammenhing.



**Abb. 3.17:** Wachstumsraten und Bildungsrate für die organischen Säuren Succinat, Acetat, Propionat und Fumarat (gesamter Zeitraum der anaeroben Produktionsphase) sowie Kohlenstoffbilanzen und Bacteriochlorophyll/Raum-Zeit-Ausbeuten und Bacteriochlorophyll/Substrat-Ausbeuten (nach  $\approx 30$  h) für anaerobe Produktionsbedingungen mit Fructose als alleinige C-Quelle. Alle Kultivierungen wurden einmal, in der DASGIP-Anlage jedoch parallel aus jeweils einer Vorkultur durchgeführt. DASGIP-Fermentationsparameter.

Allerdings muss an dieser Stelle bemerkt werden, dass bereits unter mikroaeroben Sauerstoffbedingungen ein positiver Effekt auf die Raum-Zeit-Ausbeute für Bacteriochlorophyll mit Fructose als alleinige C-Quelle beobachtet werden konnte. Unter Umständen kommt den  $\text{CO}_2$ -fixierenden Reaktionen der Anaplerotik hier eine entscheidende Bedeutung zu. Succinyl-CoA, der Precursor von Bacteriochlorophyll, wird über diese Reaktionen durch einen reduktiven TCA-Zyklus gebildet (vgl.a. Abschn. 3.3.2).

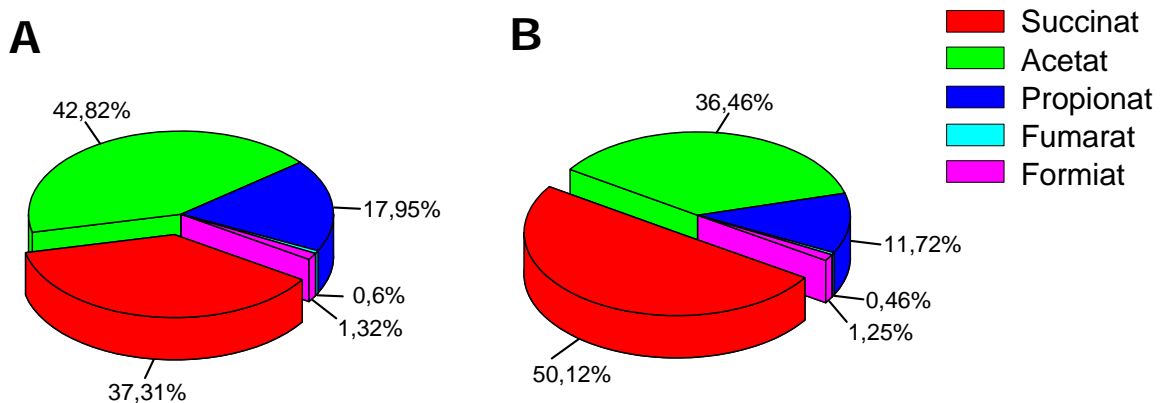
### $\text{CO}_2$ -Zufuhr über pH-Regelung mit $\text{K}_2\text{CO}_3$

Unter Abschn. 3.1.3 wurde festgestellt, dass eine Steigerung der  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Zuluftstrom nicht den steigenden Biomassekonzentrationen eines Fedbatch-Prozesses ab  $A_{660} \approx 20$  Rechnung tragen konnte. Darüber hinaus müsste eine stufenförmige Anpassung der  $\text{CO}_2$ -Begasung erfolgen, was eine Automatisierung des biotechnologischen Prozesses erschweren würde. Eine alternative Möglichkeit zur  $\text{CO}_2$ -Begasung stellt die Zufuhr von Carbonat über eine pH-Regelung mit  $\text{K}_2\text{CO}_3$  dar (s.a. Abschn. 3.1.3). Die Anwendbar-



keit dieser Form der CO<sub>2</sub>-Zufuhr wurde für die aerobe Kultivierung mit Fructose bereits gezeigt. Nun sollte die pH-Regelung mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> auch unter anaeroben Bedingungen eingesetzt werden. In Batch-Kultivierungen bei Umschalt-Zelldichten von A<sub>660</sub> = 2 wurden beide Methoden unter anaeroben Sauerstoffbedingungen miteinander verglichen und hinsichtlich Wachstum und Produktivität charakterisiert.

Es konnte kein Unterschied hinsichtlich der Biomassebildung unter anaeroben Bedingungen festgestellt werden. Nach Umschalten auf anaerob lag die Wachstumsrate mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Fütterung ( $\mu_{exp} = 0,018 \text{ h}^{-1}$ ) geringfügig höher als mit CO<sub>2</sub>-Begasung ( $\mu_{exp} = 0,015 \text{ h}^{-1}$ ). Jedoch zeigten sich einige Unterschiede in der Bildung organischer Säuren. In Abb. 3.18 ist die Verteilung der einzelnen organischen Säuren Succinat, Acetat, Propionat, Fumarat und Formiat nach 24 h Produktionszeit zu sehen. Im Gegensatz zur Begasung mit CO<sub>2</sub> war der Anteil Succinat bei K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/pH-Regelung mit 37,3 % geringer. Nach 24 h lagen nur 10,1 mM Succinat im Gegensatz zu 16,5 mM vor. Auch die Gesamtproduktion war mit 29,6 mM ca. 16 % geringer als bei CO<sub>2</sub>-Begasung (35,0 mM).



**Abb. 3.18:** Verteilung der organischen Säuren unter anaeroben Bedingungen und verschiedener CO<sub>2</sub>-Zufuhr nach 24 h Produktionszeit. A: K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/pH-Regelung und B: Begasung mit CO<sub>2</sub>=0,2 L/min (0,06 vvm). Jeweils 1 Kultivierung. Biostat CT5-2 Fermentationsparameter.

Überraschend positiv beeinflusst durch eine pH-Regelung mit K<sub>2</sub>CO<sub>2</sub> war die Bildung von Wasserstoff. Mit maximal  $0,41 \frac{\text{mmol}}{\text{g}_{BTM} \cdot \text{h}}$  war die H<sub>2</sub>-Bildungsrate um das 1,6-fache höher als mit 0,2 L/min CO<sub>2</sub>-Begasung. Auch die Gesamtwasserstoffbildung war mit 939,8 mL H<sub>2</sub> (nach ca. 6 d) höher (423 mL). Ebenfalls geringfügig verbessert hatte sich die Bildung photosynthetischer Membranen. Die maximale Bacteriochlorophyll-Konzentration war mit 10,2  $\mu\text{mol/L}$  bei K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/pH-Regelung höher als bei CO<sub>2</sub>-Begasung (6,3  $\mu\text{mol/L}$ ). Auch die Raum-Zeit-Ausbeuten für Bacteriochlorophyll waren durch eine pH-Regelung mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> höher. Dadurch konnten  $0,262 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L} \cdot \text{h}}$  Bacteriochlorophyll im Gegensatz zu  $0,197 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L} \cdot \text{h}}$  bei CO<sub>2</sub>-Begasung erzielt werden. Hingegen haben sich die spezifischen Bacteriochlorophyll-Konzentrationen nur geringfügig verändert (7,74 bzw. 6,46  $\mu\text{mol/g}_{BTM}$ ).

Tab. 3.12 fasst die unterschiedliche Produktbildung durch die verschiedenen Strategien der CO<sub>2</sub>-Zufuhr noch einmal zusammen.

**Tab. 3.12:** Bildung von Succinat, Bacteriochlorophyll und H<sub>2</sub> bei verschiedenen Strategien zur CO<sub>2</sub>-Zufuhr (0,2 L/min CO<sub>2</sub>-Begasung und pH-Regelung/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Jeweils 1 Kultivierung. Biostat CT5-2 Fermentationsparameter.

	Succinat <sub>24 h</sub>	Bchl- <i>RZA</i>	H <sub>2</sub>	
	mmol/L	$\frac{\mu\text{mol}}{\text{L} \cdot \text{h}}$	$\frac{\text{mmol}}{\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h}}$	mL Gesamt
CO <sub>2</sub> -Begasung (0,2 L/min)	16,5	0,197	0,27	422,5
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /pH-Regelung	10,1	0,262	0,41	939,8

In Tab. 3.13 sind alle Ergebnisse der Batch-Kultivierungen zusammenfassend dargestellt. Die höchsten volumetrischen und spezifischen Bacteriochlorophyll-Mengen wurden demnach unter anaeroben Bedingungen mit Fructose als alleiniger C-Quelle unter einer pH-Regelung mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> erzielt. So konnten maximal 10,2 μmol/L und 7,74 μmol/g<sub>BTM</sub> erzielt werden. Die höchste RZA wurde dagegen unter mikroaeroben Bedingungen mit Fructose als alleiniger C-Quelle erreicht (0,638  $\frac{\mu\text{mol}_{\text{Bchl}}}{\text{L} \cdot \text{h}}$ ). Molekularer Wasserstoff und Succinat wurden maximal unter anaeroben Bedingungen produziert. Die nach 24 h erreichten extrazellulären Konzentrationen an Succinat waren unter anaeroben Bedingungen ca. 55-mal höher als unter mikroaeroben Bedingungen (vgl.a. Tab. 3.13).

Für spätere Fedbatch-Prozesse eignet sich die CO<sub>2</sub>-Zufuhr durch eine pH-Regelung mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> für eine Kultivierung unter anaeroben Bedingungen am besten für die Produktbildung in höheren Zelldichten. Bis auf Succinat ließ sich durch den Einsatz von K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> die Produktivität von Bacteriochlorophyll und H<sub>2</sub> deutlich erhöhen. Da die Bildung von Porphyrinen, Coenzym Q<sub>10</sub> und Vitamin B<sub>12</sub> höchstwahrscheinlich mit der Ausbildung photosynthetischer Membranen korreliert, wäre auch für diese Produkte eine gesteigerte Bildung bei CO<sub>2</sub>-Zufuhr durch pH-Regelung mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zu erwarten.

Darüber hinaus kann durch diese Art der CO<sub>2</sub>-Zufuhr auf den Einsatz einer Gasmischstation zur Zumischung von CO<sub>2</sub> verzichtet werden. Im Gegensatz zu einer CO<sub>2</sub>-Begasung besteht die Möglichkeit die CO<sub>2</sub>-Zufuhr anzupassen und automatisch zu regulieren. So kann der bei höheren Zelldichten unter aeroben Bedingungen erhöhten Abgabe von Protonen (durch die Ammoniumaufnahme) bzw. der unter anaeroben Bedingungen gesteigerten Ausscheidung von organischen Säuren Rechnung getragen werden. Damit muss kein Wechsel des pH-Korrekturmittels beim Umschalten von aerobe auf anaerobe Bedingungen erfolgen. In der aeroben Phase würde das Succinat/Fructose-Medium im Vergleich zu Fructose zwar höhere Wachstumsraten liefern ( $\mu_{\text{exp}} = 0,15 \text{ h}^{-1}$ ), die Erhöhung des pH-Wertes im Gegenzug würde jedoch den Einsatz einer Säure in der aeroben Wachstums-

**Tab. 3.13:** Zusammenfassung der Ergebnisse aus Batch-Kultivierungen mit *R. rubrum* im Dunkeln auf M2SF- und M2F-Medium unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen (mikroaerob und anaerob). Für anaerobe Bedingungen wurden zwei verschiedene Strategien der CO<sub>2</sub>-Zufuhr (wie angegeben) untersucht. Biostat CT5-2 Fermentationsparameter. 3,5 L Arbeitsvolumen.

Medium	M2SF			M2F		
	mikroaerob	mikroaerob	mikroaerob	mikroaerob	anaerob	anaerob
Bedingung	mikroaerob	mikroaerob	mikroaerob	mikroaerob	anaerob	anaerob
Vorkultur	aerob	mikroaerob	aerob	aerob	aerob	aerob
CO <sub>2</sub> -Zufuhr	-	-	0,2 L/min CO <sub>2</sub>	0,2 L/min CO <sub>2</sub>	0,2 L/min CO <sub>2</sub>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /pH
Bchl (μmol/L)	8,85	2,64	8,59	6,31	10,2	
Bchl (μmol/g <sub>BTM</sub> )	3,81	3,60	3,95	6,46	7,74	
RZA ( $\frac{\mu\text{mol}_{Bchl}}{L \cdot h}$ )	0,343	0,163	0,638	0,197	0,262	
Y (P/S) ( $\frac{\mu\text{mol}_{Bchl}}{g_{S_{substrat}} \cdot h}$ )	1,33	1,83	1,63	1,57	1,86	
H <sub>2</sub> ( $\frac{mmol}{g_{BTM} \cdot h}$ )	0,01	0,04	0,07	0,27	0,41	
Succinat <sub>24 h</sub> in mM	-	-	0,3	16,5	10,1	

phase und somit einen Wechsel des pH-Korrekturmittels beim Umschalten auf anaerobe Produktionsbedingungen erfordern.

### 3.3.5 Bacteriochlorophyll- und Carotinoid-Deletionsmutanten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 3 genetisch veränderte Stämme von *R. rubrum* untersucht und hinsichtlich ihrer Produktivitäten für photosynthetische Membranen/Pigmente, organische Säuren, PHB, Coenzym Q<sub>10</sub> sowie Vitamin B<sub>12</sub> mit Hilfe von Batch-Kultivierungen unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln mit Fructose als alleinige C-Quelle charakterisiert (s.a. Abschn. 2.4.3).

#### Phänotypische Erscheinung und Pigmentbildung

In Abb. 3.19/links sind mikroaerobe Schüttelkolben-Kulturen der Stämme zu sehen. SLYC18 ist ein Stamm, der aufgrund von Deletionen in den Genen *crtC* und *crtD* als einziges Carotinoid Lycopin produziert. Lycopin hat eine bräunliche Färbung, die Kultur erschien daher gelb-braun. Es wurde analog zum Wildtyp-Carotinoid (Spirilloxanthin) unter mikroaeroben bzw. anaeroben Sauerstoffbedingungen gebildet. Auch die Bacteriochlorophyll-Biosynthese war nicht beeinflusst. Aus diesem Grund zeigte SLYC18 hinsichtlich des  $\frac{A_{880}}{A_{660}}$ -Signals kein Unterschied zum Wildtyp S1 (s.a. Abb. 3.19/rechts).

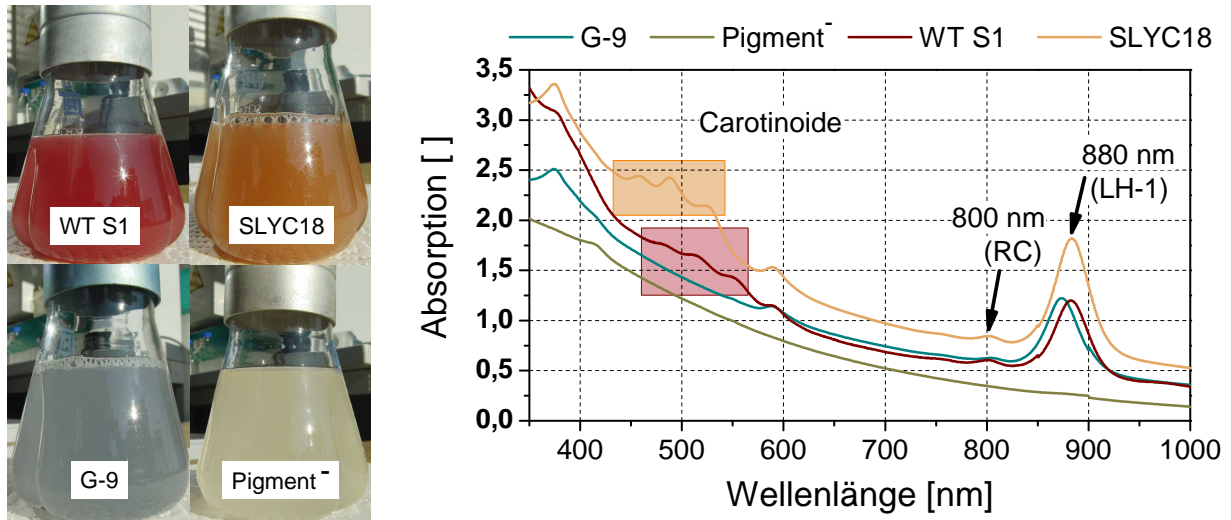
G-9 war ein weiterer Stamm, der im Gegensatz zum Wildtyp und SLYC18 überhaupt keine Carotinoide bildete, sondern lediglich Bacteriochlorophyll produzierte. Der genaue Lokus der genetischen Veränderung ist nicht bekannt.

Ein dritter Stamm ist spontan aus Routinekultivierungen, vermutlich aufgrund vermehrten Überimpfens, hervorgegangen und zeigte einen komplett pigmentlosen Phänotyp unter anaeroben und mikroaeroben Bedingungen im Dunkeln (Pigment<sup>-</sup>). Weder Carotinoide noch Bacteriochlorophyll wurden in diesem Stamm produziert. Der Stamm erschien daher weiß, analog zu aerob kultivierten Zellen, bei denen die Pigmentsynthese reprimiert war.

Abb. 3.19/rechts zeigt Ganzzellspektren der jeweiligen Stämme. Die Absorptionsmaxima spiegeln die jeweilige Pigmentierung der Stämme und Färbung wider.

Im SLYC18-Stamm sind die Absorptionsmaxima der Carotinoide im Vergleich zum Wildtyp S1 verschoben. Die Absorptionsmaxima der Carotinoide für den Lycopin-produzierenden Stamm waren  $\lambda = 525$  nm,  $\lambda = 488$  nm und  $\lambda = 457$  nm. Die Carotinoidmaxima im Wildtyp waren  $\lambda = 551$  nm,  $\lambda = 512$  nm und  $\lambda = 479$  nm. Hingegen waren die Absorptionsmaxima des Bacteriochlorophyll a im Lichtsammelkomplex und Reaktionszentrum die gleichen ( $\lambda = 880$  nm,  $\lambda = 800$  nm bzw.  $\lambda = 590$  nm und  $\lambda = 375$  nm) [Pfennig, 1978].

Der Stamm G-9 produzierte keine Carotinoide. Aus diesem Grund zeigten sich kei-



**Abb. 3.19:** Phänotypische Erscheinung (links) und Ganzellspektren (rechts) der Stämme SLYC18, G-9 und Pigment<sup>-</sup> im Vergleich zum Wildtyp WT S1.

ne Absorptionsmaxima zwischen  $\lambda = 450\text{-}550\text{ nm}$ . Im Gegenzug waren die Maxima des Bacteriochlorophyll a im LH-1-Komplex und Reaktionszentrum vorhanden ( $\lambda = 880\text{ nm}$ ,  $\lambda = 800\text{ nm}$  bzw.  $\lambda = 590\text{ nm}$  und  $\lambda = 375\text{ nm}$ ). Eine detaillierte Analyse zeigte die von Brunisholz et al. [1984] bereits beschriebene, leichte Verschiebung der 880-nm-Bande zu  $\lambda = 870\text{ nm}$  in G-9 (s.a. Abb. 3.19/rechts).

Der pigmentlose Stamm Pigment<sup>-</sup> erscheint trotz  $\text{O}_2$ -Limitation weiß. Lediglich bei  $\lambda = 412\text{ nm}$  wies dieser Stamm eine geringe Absorption auf. Schick and Drews [1969] untersuchten die Mutante M 46 von *R. rubrum*. M 46 bildet keine ungesättigten Carotinoide und Bacteriochlorophyll a und im Gegensatz zum Wildtyp S1 zeigte sich ein Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 412\text{ nm}$ , das die Autoren einer neuen Tetrapyrrol-Komponente zuschreiben. Bei 412 nm befindet sich die von Jacques-Louis Soret zum ersten Mal beschriebene Soret-Bande. Sie ist die intensivste Bande von Chlorophyllen und anderen Porphyrinen [Soret, 1883].

Tab. 3.14 gibt noch einmal einen Überblick über die verwendeten Stämme hinsichtlich ihrer Bacteriochlorophyll- und Carotinoid-Produktion sowie Angaben über gebildeten Mengen derselbigen. Der Wildtyp bildete mit  $6,74\ \mu\text{mol/g}_{BTM}$  die höchsten spezifischen Bacteriochlorophyll-Mengen. Die Stämme G-9 und SLYC18 bildeten zwar auch Bacteriochlorophyll, jedoch in geringeren Mengen ( $4,56$  bzw.  $5,25\ \mu\text{mol/g}_{BTM}$ ). Das im Wildtyp vorhandene Spirilloxanthin wurde nicht quantifiziert. Der Stamm G-9 bildet keine Carotinoide. Das im SLYC18 vorhandene Lycopin wurde, wie unter Abschn. 2.5.10 beschrieben, bestimmt und betrug maximal  $3,48\ \mu\text{mol/g}_{BTM}$  unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln auf Fructose als alleinige C-Quelle.

Wie bereits unter Abschn. 1.3.1 erwähnt, liegt im LH-1 Komplex Bacteriochlorophyll immer in einem bestimmten Verhältnis zu Carotinoid vor (2:1). Werden die 4 Bacterio-

chlorophyll-Moleküle aus dem Reaktionszentrum mitgezählt, erhöht sich das Verhältnis auf 2,25:1. Berechnet man dieses Verhältnis in dem Lycopin-überproduzierenden Stamm SLYC18 so ergibt sich mit 1,5:1 (Bchl:Lycopin) ein niedrigeres Verhältnis im Vergleich zum Wildtyp S1. Das bedeutet, dass pro Molekül Lycopin im Verhältnis weniger Bacteriochlorophyll im SLYC18-Stamm vorhanden sind.

**Tab. 3.14:** Übersicht der einzelnen Stämme hinsichtlich ihrer Pigmentbildung und Bacteriochlorophyll-Mengen für WT S1, G-9 und SLYC18 bzw. Lycopin-Mengen im SLYC18-Stamm. 5 % CO<sub>2</sub>. + : vorhanden, - : nicht vorhanden. Jeweils 1 Kultivierung. DASGIP-Kultivierungsparameter.

Stamm	Bildung von Bacteriochlorophyll	Bildung von Carotinoiden	Bacteriochlorophyll $\mu\text{mol/g}_{BTM}$	Lycopin $\mu\text{mol/g}_{BTM}$
WT S1	+	+	6,74	-
G-9	+	-	4,56	-
SLYC18	+	+	5,25	3,48
Pigment <sup>-</sup>	-	-	-	-

### Phototrophes Wachstum von SLYC18

Das Wachstum und die Bildung von Bacteriochlorophyll bzw. Lycopin wurden für den Wildtyp S1 und SLYC18 unter phototroph, anaeroben Bedingungen auf M2S-Medium im DASGIP-Photoreaktorsystem untersucht (s.a. Abschn. 2.4.3). Untersucht wurde, ob Lycopin die Funktion von Spirilloxanthin ersetzen kann. Allerdings zeigte sich unter phototrophen Bedingungen ein 5-fach verringertes Wachstum des Lycopin-produzierenden Stammes ( $\mu_{exp} = 0,003 \text{ h}^{-1}$ ) im Vergleich zum Wildtyp ( $\mu_{exp} = 0,017 \text{ h}^{-1}$ ). Auch die maximalen  $\frac{A_{880}}{A_{660}}$ -Verhältnisse unterschieden sich stark. Der Wildtyp erzielte mit maximal  $\frac{A_{880}}{A_{660}} = 1,076$  ein deutlich höheres Verhältnis als der Lycopin-produzierende Stamm SLYC18 (maximal  $\frac{A_{880}}{A_{660}} = 0,897$ ).

Auch unter phototrophen Bedingungen betrug das Verhältnis Bchl:Lycopin 1,49:1; analog zu anaeroben Bedingungen im Dunkeln mit Fructose. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Lycopin in SLYC18 das im Wildtyp vorhandene Spirilloxanthin nicht in gleicher Weise ersetzen kann und es daher zu der beobachteten Beeinträchtigung der Bacteriochlorophyll-Mengen und damit auch des Wachstums kam. Hingegen war das aerobe und mikroaerobe Wachstum des SLYC18-Stammes im Dunkeln nicht beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt).

Für den Fall, dass artifiziell-exprimierte Pigmente das phototrophe Wachstum beeinträchtigen, könnte somit der Produktion unter O<sub>2</sub>-limitierenden Bedingungen im Dunkeln eine entscheidende Bedeutung zukommen. Unter anaeroben Bedingungen mit Fructose

als C-Quelle war das Wachstum der Stämme G-9 und SLYC18 vergleichbar mit dem Wildtyp S1 ( $\mu_{exp} = 0,024 \text{ h}^{-1}$ ). Die pigmentlose Mutante wies mit  $\mu = 0,033 \text{ h}^{-1}$  ein geringfügig schnelleres Wachstum auf. Somit wäre eine Produktion von Lycopin unter  $\text{O}_2$ -limitierenden Bedingungen im Dunkeln zu favorisieren.

### Produktion von organischen Säuren, PHB, Coenzym $\text{Q}_{10}$ und Vitamin $\text{B}_{12}$

Abb. 3.20/A zeigt die extrazellulären Succinat/Acetat-Verhältnisse der Stämme nach 24 h Produktionsphase. Auffällig sind die höheren Verhältnisse der pigmentlosen Mutante und des G-9 Stammes ( $\frac{Succ}{Ace} = 0,818$  bzw.  $\frac{Succ}{Ace} = 0,900$ ) im Gegensatz zum Wildtyp ( $\frac{Succ}{Ace} = 0,561$ ). Der Lycopin-produzierende Stamm zeigte identische Verhältnisse mit dem Wildtyp ( $\frac{Succ}{Ace} = 0,521$ ). Der Grund für die im Verhältnis zu Acetat erhöhte Succinatproduktion könnte die fehlende Carotinoid-Biosynthese in G-9 und dem pigmentlosen Stamm sein. Die Carotinoid-Biosynthese erfolgt ausgehend von Pyruvat/Acetyl-CoA (vgl.a. Abschn. 1.3.1). Ausgehend von Acetyl-CoA erfolgt aber ebenfalls die Ausscheidung von Acetat über die Phosphotransacetylase/Acetatkinase-Reaktionen [Heider, 2007; Grammel et al., 2003]. Die Acetatausscheidung spiegelt somit zu einem gewissen Teil die intrazelluläre Acetyl-CoA-Verfügbarkeit wider. In *R. rubrum*-Stämmen, die keine Carotinoide bilden, könnte eine Verminderung der Acetatausscheidung die Folge der blockierten Carotinoidproduktion sein und Pyruvat kann zu Oxaloacetat in Richtung Succinat carboxyliert werden.

Das könnte ebenfalls die Erklärung für die erhöhte Succinatausscheidung von G-9 und der pigmentlosen Mutante im Gegensatz zum Wildtyp und SLYC18 sein. Die Succinatkonzentrationen aller Stämme nach 24 h sind in Tab. 3.15 zu sehen. Die Umschaltzell-dichte lag bei allen Versuchen bei  $A_{660} \approx 2$ . Demnach bildete G-9 nach 24 h mit 8,99 mM die höchsten Succinatmengen. Der Wildtyp S1 und SLYC18 bildeten mit 5,74 und 5,28 mM geringere Mengen Succinat, wobei der Ausbeutekoeffizient für Succinat bezogen auf die verbrauchte Menge Fructose im pigmentlosen Stamm mit  $0,468 \frac{\text{mol Succinat}}{\text{mol Fructose}}$  am höchsten war. Auch die Succinat-Produktionsrate war mit  $0,600 \frac{\text{mmol Succinat}}{\text{gBTM} \cdot \text{h}}$  im pigmentlosen Stamm Pigment<sup>-</sup> am höchsten (s.a. Tab. 3.15). Dieser spontan aufgetretene Stamm besitzt aus diesem Grund ein hohes Potenzial für die Produktion von Succinat.

Der unter Umständen veränderte intrazelluläre Kohlenstofffluss könnte auch die unterschiedliche Produktivität von Coenzym  $\text{Q}_{10}$  und Vitamin  $\text{B}_{12}$  in den Stämmen G-9 und Pigment<sup>-</sup> erklären. In Abb. 3.20/B,C sind die spezifischen Vitamin  $\text{B}_{12}$  sowie die Coenzym  $\text{Q}_{10}$ -Level der verschiedenen Stämme dargestellt. Deutlich wird, dass sowohl Vitamin  $\text{B}_{12}$  als auch Coenzym  $\text{Q}_{10}$  mit den  $\frac{Succ}{Ace}$ -Verhältnissen der Stämme korreliert ist. In dem Stamm G-9 und der pigmentlosen Mutante wurden fast doppelt so hohe Vitamin  $\text{B}_{12}$ -

**Tab. 3.15:** Extrazelluläre Succinat-Akkumulation, -Ausbeutekoeffizient und -Ausscheideraten nach 24 h in den Stämmen WT S1, SLYC18, G-9 und Pigment<sup>-</sup>. Jeweils 1 Kultivierung. DASGIP-Kultivierungsparameter.

Stamm	Succinat <sub>24 h</sub> in mM	$Y_{(P/S)}$ ( $\frac{\text{mol}_{\text{Succinat}}}{\text{mol}_{\text{Fructose}}}$ )	$q_{\text{Succ-Ex}}$ ( $\frac{\text{mmol}_{\text{Succ}}}{\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h}}$ )
WT S1	5,74	0,379	0,253
SLYC18	5,28	0,268	0,249
G-9	8,99	0,386	0,339
Pigment <sup>-</sup>	7,23	0,468	0,600

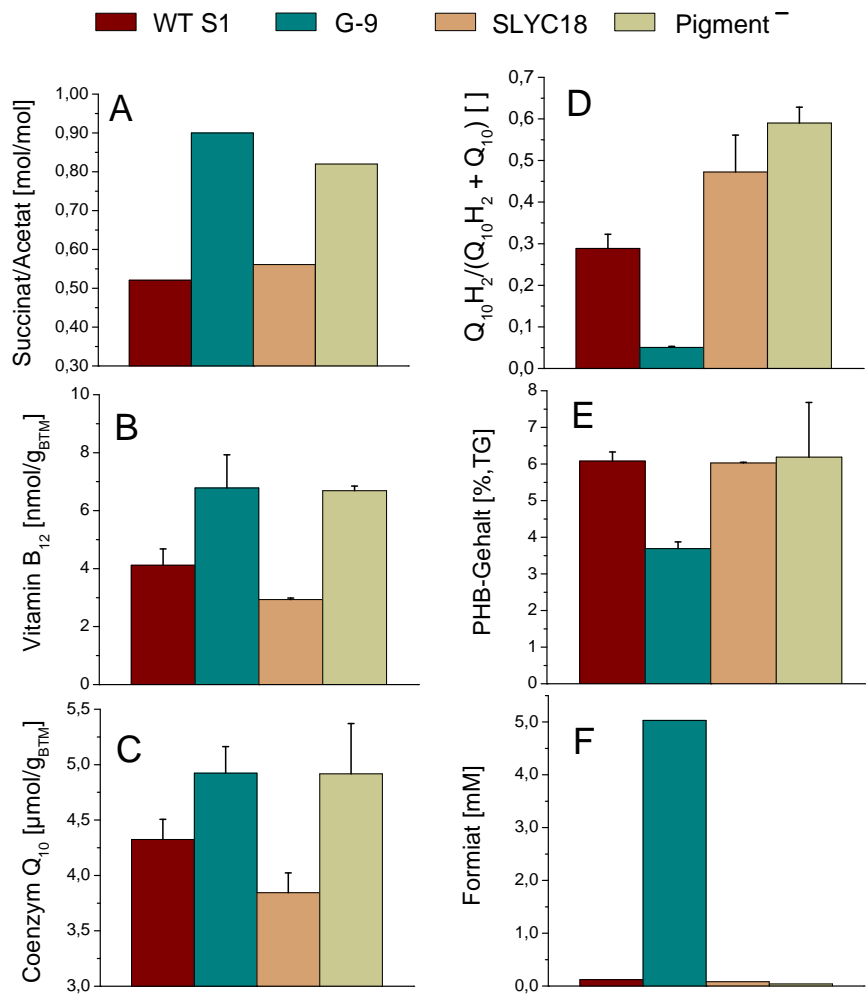
Mengen (G-9: 6,78 nmol/g<sub>BTM</sub> bzw. Pigment<sup>-</sup>: 6,69 nmol/g<sub>BTM</sub>) als im Wildtyp S1 und SLYC18 (4,1 nmol/g<sub>BTM</sub> bzw. 2,9 nmol/g<sub>BTM</sub>) gebildet. Die Coenzym Q<sub>10</sub>-Mengen lagen bei G-9 und der pigmentlosen Mutante bei  $\approx$  4,9 nmol/g<sub>BTM</sub>. Beim WT S1 und SLYC18 dagegen etwas geringer bei 4,3 nmol/g<sub>BTM</sub> bzw. 3,8 nmol/g<sub>BTM</sub> (s.a. Abb. 3.20/B,C).

Die Produktion von Vitamin B<sub>12</sub> lässt sich anhand der erhöhten  $\frac{\text{Succ}}{\text{Ace}}$ -Verhältnisse leicht erklären, da die Biosynthese von Vitamin B<sub>12</sub> ausgehend von Succinyl-CoA aus dem Zentralstoffwechsel erfolgt (vgl.a. Abschn. 1.3.1). Aufgrund der erhöhten Succinatproduktion könnte auch ein erhöhter Fluss zum Succinyl-CoA vorhanden sein, welcher zu einer gesteigerten Vitamin B<sub>12</sub>-Bildung führt. Widersprüchlich dagegen ist das ähnliche Ergebnis für Coenzym Q<sub>10</sub> (vgl.a. Abb. 3.20/C). Auch hier korreliert ein erhöhtes  $\frac{\text{Succ}}{\text{Ace}}$ -Verhältnis mit einer gesteigerten Produktbildung (Coenzym Q<sub>10</sub>). Die Coenzym Q<sub>10</sub>-Biosynthese nutzt jedoch, neben *p*-Hydroxybenzoat, die Terpenoid-Biosynthese, wo kein Succinyl-CoA benötigt wird. Unter Umständen ist hier eine Umstellung des Gesamt-Kohlenstoffflusses zu berücksichtigen, da durch das Fehlen der Carotinoid-Biosynthese ein wichtiger Konkurrenzweg im Stoffwechsel, der Pyruvat und Acetyl-CoA „abzieht“, ausgeschaltet ist. Auf diese Weise kann eine höhere Konzentration Precursor für die Terpene der Coenzym Q<sub>10</sub>-Biosynthese bereitgestellt werden.

Für eine spätere Herstellung von Vitamin B<sub>12</sub> und Coenzym Q<sub>10</sub> mit *R. rubrum* im Dunkeln können G-9 und die spontan aufgetretene Mutante vielversprechende Alternativen gegenüber dem Wildtyp S1 darstellen und könnten hinsichtlich der Vitamin B<sub>12</sub>- und Coenzym Q<sub>10</sub>-Produktion weiter optimiert werden.

In Abb. 3.20/E sind die PHB-Anteile der einzelnen Stämme dargestellt. Bis auf *R. rubrum* G-9 bildeten alle anderen Stämme mit  $\approx$  6,1 % ähnliche Mengen PHB. G-9 bildete mit 3,7 % nur etwa die Hälfte. Wie jedoch bereits unter Abschn. 3.2 beschrieben, eignet sich Fructose im Gegensatz zu Medien, die Acetat enthalten, nur bedingt für die Produktion von PHB mit *R. rubrum*. Aus diesem Grund soll an dieser Stelle nicht weiter auf die PHB-Bildung der genetisch veränderten Stämme eingegangen werden.





**Abb. 3.20:** Produktbildung der verschiedenen Stämme sowie extrazelluläre Succinat/Acetat-Verhältnisse, Formiatkonzentrationen und Q<sub>10</sub>-Redoxzustände. A: Extrazelluläre Succinat/Acetat-Verhältnisse. B: Vitamin B<sub>12</sub>. C: Coenzym Q<sub>10</sub>. D: PHB. E: Coenzym Q<sub>10</sub>-Redoxzustände,  $\frac{Q_{10}H_2}{Q_{10}H_2+Q_{10}}$ . F: Extrazelluläre Formiatkonzentrationen nach 24 h. Jeweils 1 Kultivierung. DASGIP-Kultivierungsparameter.

Im Rahmen der LC-Analyse von Coenzym Q<sub>10</sub> (vgl.a. Abschn. 2.5.11) lassen sich aus der getrennten Messung von reduzierten und oxidierten Q<sub>10</sub> auch die Redoxzustände des Q<sub>10</sub> in den einzelnen Stämmen bestimmen, welche wertvolle Informationen zur Charakterisierung der Stämme aufzeigten. Interessanterweise war der Q<sub>10</sub>-Pool des Stammes G-9 zu fast 100 % oxidiert ( $\frac{Q_{10}H_2}{Q_{10}H_2+Q_{10}} = 0,05$ ), wohingegen der Pigment<sup>-</sup>, SLYC18 und der Wildtyp reduziertere Q<sub>10</sub>-Level aufwiesen (s.a. Abb. 3.20/D). Den reduziertesten Q<sub>10</sub>-Pool zeigte die pigmentlose Mutante, deren Q<sub>10</sub> zu  $\approx 60$  % reduziert war.

Zusammenfassend lässt sich somit für den Quinon-Redoxstatus unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln feststellen, dass das Fehlen von Bacteriochlorophyll- und Carotinoid-Produktion zu hoch reduzierten Q<sub>10</sub>-Pools führte (60 %, Pigment<sup>-</sup>). In Stämmen, die keine Carotinoide produzieren, sind die Q<sub>10</sub>-Pools dagegen oxidiert. In Stämmen, die zur Bacteriochlorophyll- und Carotinoid-Biosynthese befähigt waren, lag das Verhältnis

$\frac{Q_{10}H_2}{Q_{10}H_2+Q_{10}}$  zwischen  $\frac{Q_{10}H_2}{Q_{10}H_2+Q_{10}} = 0,29$  (WT S1) und  $\frac{Q_{10}H_2}{Q_{10}H_2+Q_{10}} = 0,47$  (SLYC18).

Für die Biosynthese von Bacteriochlorophyll und Carotinoiden werden Reduktionsäquivalente benötigt (vgl.a. Abschn. 1.3.1). Fallen diese Reaktionen aufgrund von Defekten aus, würde man reduziertere Redoxpools erwarten. Das trifft aber nur für den pigmentlosen Stamm zu, der zu rund 60 % und damit am stärksten reduziert war. Allerdings hätte dann der Stamm G-9 ebenfalls reduzierter als der Wildtyp sein müssen, was nicht der Fall war. Der Coenzym  $Q_{10}$ -Pool war hier stark oxidiert. Dieser hochoxidierte Quinon-Pool könnte damit auch der Grund für den reduzierteren PHB-Gehalt in G-9 sein (Abb. 3.20/E), da dieser Weg Reduktionsäquivalente in Form von NADH benötigt (vgl.a. Abschn. 1.3.4).

Weiterhin aufgefallen war die extrazelluläre Formiatakkumulation in den einzelnen Stämmen. Bei vergleichbaren Biomassekonzentrationen zeigte der G-9 Stamm mit 5,0 mM Formiat im extrazellulären Medium eine signifikante Formiatakkumulation im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Stämmen, wo die extrazelluläre Formiatkonzentration nur gering war (s.a. Abb. 3.20/F). Der Grund für diese Beobachtung ist unklar. Vermutet werden könnte ein verringerter Umsatz von Formiat zu  $H_2$  und  $CO_2$  durch die Formiat-Wasserstoff-Lyase. Ebenso möglich ist aber auch ein *overflow* von Pyruvat aufgrund der blockierten Carotinoidbiosynthese. Erschwert wird die Interpretation, weil nicht genau bekannt ist, wodurch genau *R. rubrum* G-9 nicht mehr in der Lage ist, Carotinoide zu bilden bzw. welcher Gendefekt vorliegt.

## Produktion von Wasserstoff

Der unterschiedliche Quinon-Redoxstatus könnte auch die Bildung von molekularem Wasserstoff beeinflussen. Im pigmentlosen Stamm könnte zum Beispiel ein Überfluss an Reduktionsäquivalenten zu einer gesteigerten Bildung von  $H_2$  führen.

Tab. 3.16 zeigt daher die volumetrischen und spezifischen Wasserstoff-Produktionsraten sowie die Gesamt-Wasserstoffbildung der Stämme Wildtyp S1, G-9 und Pigment<sup>-</sup>. Die Wasserstoffbildung der pigmentlosen Mutante war mit  $0,51 \frac{mmol_{H_2}}{g_{BTM} \cdot h}$  geringfügig höher als beim WT ( $0,41 \frac{mmol_{H_2}}{g_{BTM} \cdot h}$ ). Allerdings fiel die Gesamtproduktion mit 544,3 mL deutlich geringer aus als beim WT (939,8 mL). Der Grund hierfür liegt in einer kürzeren  $H_2$ -Produktionsphase (77 h) im Vergleich zum WT (148 h).

Überraschend war die sehr geringe  $H_2$ -Bildung bei dem Stamm *R. rubrum* G-9. Die maximale  $H_2$ -Bildungsrate betrug nur lediglich  $0,02 \frac{mmol_{H_2}}{g_{BTM} \cdot h}$ . Die gebildete Gesamtmenge  $H_2$  war mit 38,3 mL ebenfalls vergleichsweise gering. Der Grund hierfür ist nicht vollständig geklärt. Auffallend bei dem Stamm G-9 war die hohe extrazelluläre Formiatakkumulation (fast 5 mM) im Vergleich zu den anderen untersuchten Stämmen (vgl.a. Abb. 3.20/F). Das zeigt eine unzureichende Umsetzung in Richtung  $H_2$  durch die Formiat-Wasserstoff-

**Tab. 3.16:** Maximale H<sub>2</sub>-Bildungsraten und Gesamt-Wasserstoffproduktion in den Stämmen WT S1, G-9 und Pigment<sup>-</sup> von *R. rubrum* unter anaeroben Bedingungen mit Fructose als alleinige C-Quelle. Die spezifischen H<sub>2</sub>-Bildungsraten beziehen sich auf die BTM zum Zeitpunkt des Umschaltens von aerob auf anaerob. Jeweils 1 Kultivierung, Biostat CT5-2 Fermentationsparameter, 3,5 L Arbeitsvolumen.

	H <sub>2</sub>		mL Gesamt
	$\frac{mmol}{L \cdot h}$	$\frac{mmol}{g_{BTM} \cdot h}$	
WT S1	0,45	0,41	939,8
G-9	0,02	0,02	38,3
Pigment <sup>-</sup>	0,42	0,51	544,3

Lyase innerhalb des PFL/FHL-Systems an, wodurch Formiat akkumuliert. Ein möglicher Defekt der FHL in *R. rubrum* G-9 kann nicht bestätigt, aber auch nicht ausgeschlossen werden. Durch Amplifizierung des entsprechenden Gens Rru\_A0324 und zugehörigen Promoterabschnitts (200 bp vor dem Genabschnitt) (NCBI Datenbank) und Sequenzierung konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch gezeigt werden, dass das entsprechende Gen in *R. rubrum* G-9 vorhanden ist und keine Punktmutationen aufweist. Die Ergebnisse der PCR und der Sequenzierung sind im Anhang C zu finden.

Aufgrund der geringen H<sub>2</sub>-Bildung eignet sich *R. rubrum* G-9 nicht für die H<sub>2</sub>-Produktion mit *R. rubrum* unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln mit Fructose als alleinige C-Quelle. Aber auch die pigmentlose Mutante zeigt trotz eines stark reduzierten Coenzym Q<sub>10</sub>-Pools keine erhöhte H<sub>2</sub>-Bildung gegenüber dem Wildtyp. Reduzierte Coenzym Q<sub>10</sub>-pools zeigen daher nicht zwangsläufig einen Überfluss von Reduktionsäquivalenten an.

Zusammenfassend lassen sich folgende Bedingungen für eine optimale Produktion von photosynthetischen Membranen mit *R. rubrum* im Dunkeln feststellen: Eine aerobe Vorkultivierung ermöglichte optimales Wachstum von Beginn an und mit  $0,343 \frac{\mu mol}{L \cdot h}$  eine 2-fach höhere RZA für Bacteriochlorophyll als mit einer mikroaeroben Vorkultivierung. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auf den Einsatz von Succinat unter mikroaeroben Bedingungen durch eine geeignete CO<sub>2</sub>-Zufuhr verzichtet werden kann und die RZA für Bacteriochlorophyll weiter gesteigert werden konnte ( $0,638 \frac{\mu mol}{L \cdot h}$ ). Die höchsten spezifischen Bacteriochlorophyll-Mengen wurden unter anaeroben Bedingungen erzielt ( $7,74 \mu mol/g_{BTM}$ ). Aufgrund der sehr geringen Wachstumsrate ( $\mu = 0,015 h^{-1}$ ) konnte jedoch keine weitere Steigerung der RZA erreicht werden. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass eine Begasung mit CO<sub>2</sub> diverse Nachteile gegenüber einer CO<sub>2</sub>-Zufuhr durch eine pH-Regelung mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aufwies. So erfordert die CO<sub>2</sub>-Begasung beispielsweise den Aufbau einer Gasmischstation. Durch eine pH-Regelung mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> kann

ten darüber hinaus im Vergleich höhere Konzentrationen, Raum-Zeit-Ausbeuten sowie Substratausbeuten für Bacteriochlorophyll und höhere H<sub>2</sub>-Mengen erzielt werden. Eine detaillierte Charakterisierung bereits vorhandener Bacteriochlorophyll und Carotinoid-Deletionsmutanten zeigte interessante und neue Einblicke in den zellulären Stoffwechsel. So wurde gezeigt, dass das komplette Fehlen einer Pigmentbildung zu einer erhöhten Succinatproduktion in *R. rubrum* führt. Überraschend war darüber hinaus die stark reduzierte Wasserstoffbildung in der Carotinoid-Deletionsmutante G-9, die mit einer erhöhten Formiatakkumulation in das extrazelluläre Medium einherging.

### 3.4 2-Stufen-Prozess als Fedbatch-Prozess

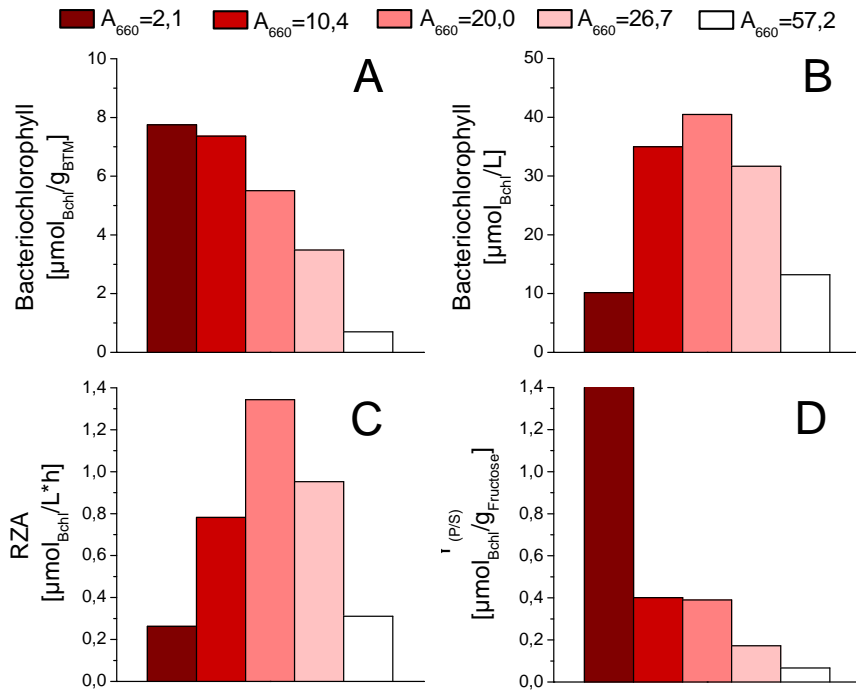
Zur Steigerung der Biomassekonzentration wurden aerobe Fedbatch-Kultivierungen mit Fructose als Einzelsubstrat sowie Succinat/Fructose und Acetat/Fructose als Mischsubstrate durchgeführt (s.a. Abschn. 3.2). Ziel war es maximale Biomassekonzentrationen zu erzielen, welche in einer anschließenden O<sub>2</sub>-limitierten Produktionsphase zur Produktbildung genutzt werden konnten. Durch den Einsatz von Succinat/Fructose mit *R. rubrum* wurden höhere Raum-Zeit-Ausbeuten und Wachstumsraten als mit Fructose erzielt. Trotzdem wurde zunächst ein Prozess basierend auf Fructose angestrebt, da Zucker-basierte Substrate aus ökonomischen Gründen verstärkt für biotechnologische Prozesse eingesetzt werden [Teuber et al., 1994]. Darüber hinaus konnte in vorangegangenen Batch-Kultivierungen gezeigt werden, dass ein anaerober Produktionsprozess gegenüber einem mikroaeroben Prozess mehrere Vorteile aufweist (vgl.a. Abschn. 3.3). Für anaerobe Bedingungen wäre der Einsatz von Succinat/Fructose ungeeignet. Ähnliche Argumente lassen sich für den Einsatz von Acetat/Fructose anführen.

Im Folgenden soll die Produktbildung unter anaeroben Bedingungen mit Fructose als alleinige C-Quelle detaillierter erläutert werden. Insbesondere wurden dabei verschieden hohe Umschalt-Zelldichten untersucht. Zum Vergleich wird bei den nachfolgenden Darstellungen auch der Batch-Versuch bei Umschalt-Zelldichten von  $A_{660} = 2,1$  diskutiert werden.

#### 3.4.1 Photosynthetische Membranen

In Abb. 3.21 sind verschiedene Größen zur Beurteilung der Bacteriochlorophyll-Produktion bei verschiedenen Umschalt-Zelldichten dargestellt. Abb. 3.21/A zeigt die spezifische Bacteriochlorophyll-Bildung, die mit zunehmender Umschalt-Zelldichte kontinuierlich abnahm. So ließ die spezifische Produktion bei einer Umschalt-Zelldichte von  $A_{660} = 57,2$  um ca. 90 % verglichen mit  $A_{660} = 2,1$  nach. Die maximale volumetrische Produktivi-

tät für Bacteriochlorophyll lag bei einer Umschalt-Zelldichte von  $A_{660} = 20,0$  und betrug  $40,5 \mu\text{mol Bchl/L}$  (Abb. 3.21/B). Absolut wurden innerhalb dieses Prozesses  $178,4 \mu\text{mol}$  Bacteriochlorophyll produziert (3,5 L-Maßstab).



**Abb. 3.21:** Maximale spezifische (A) und volumetrische (B) Bacteriochlorophyll-Konzentrationen sowie  $RZA$  (C) und Ausbeutekoeffizienten  $Y_{(P/S)}$  (D) für verschiedene Umschalt-Zelldichten im anaeroben Prozess mit Fructose als alleinige C-Quelle. Die Raum-Zeit-Ausbeuten und Ausbeutekoeffizienten wurden vom Zeitpunkt des Umschaltens bis zum Erreichen der maximalen spezifischen Bacteriochlorophyll-Konzentration berechnet. Jeweils 1 Kultivierung. Biostat CT5-2 Fermentationsparameter. 3,5 L Arbeitsvolumen.

Auch die Raum-Zeit-Ausbeuten waren bei einer Umschalt-Zelldichte von  $A_{660} = 20,0$  mit  $1,34 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L} \cdot \text{h}}$  am höchsten (s.a. Abb. 3.21/C). Aufgrund der geringeren Zelldichten bei Umschalt-Zelldichten zwischen  $A_{660} = 2,1$  und  $A_{660} = 10,4$  ergaben sich hier trotz höherer spezifischer Produktivitäten geringere Raum-Zeit-Ausbeuten und ebenfalls geringere Konzentrationen (s.a. Abb. 3.21/B,C). Bei Zelldichten oberhalb von  $A_{660} = 20,0$  wurden geringere volumetrische und spezifische Mengen Bacteriochlorophyll produziert, weshalb auch die  $RZA$  wieder abnimmt.

Die Bacteriochlorophyll/Substrat-Ausbeute war bei  $A_{660} = 2,1$  mit  $Y_{(P/S)} = 1,86 \frac{\mu\text{mol}_{\text{Bchl}}}{\text{g}_{\text{Fructose}}}$  am höchsten. Bereits ab einer Zelldichte von  $A_{660} = 10,4$  war eine drastische Abnahme der Ausbeute um ca. 80 % auf  $Y_{(P/S)} = 0,07 \frac{\mu\text{mol}_{\text{Bchl}}}{\text{g}_{\text{Fructose}}}$  zu beobachten. Der Grund hierfür könnte in einem höheren Bedarf an Zellerhaltungsstoffwechsel bei höheren Zelldichten liegen. Eine andere Möglichkeit ist die verstärkte Bildung anderer Produkte, wie zum Beispiel organische Säuren oder auch Speicherstoffe, wie Glycogen oder PHB. Der aufgenommene Kohlenstoff würde somit bevorzugt in die Produktion dieser Stoffe eingehen und weniger für die Biosynthese von Bacteriochlorophyll.

Die Zelldichte beim Umschalten von aeroben Wachstumsbedingungen auf anaerobe Produktionsbedingungen beeinflusste entscheidend die Produktivität für Bacteriochlorophyll in *R. rubrum* unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln. In einem späteren Produktionsprozess würde die Kultivierung zu Zelldichten  $> A_{660} = 20,0$  zu keiner zusätzlichen Erhöhung der Bacteriochlorophyll-Konzentration und Raum-Zeit-Ausbeute führen. Der Fedbatch-Prozess sollte daher aerob nur bis zu Zelldichten von  $A_{660} = 20,0$  geführt werden. Die Abnahme der Bacteriochlorophyll-Produktion in höheren Zelldichten würde mit hoher Wahrscheinlichkeit auch die Carotinoid-Produktion betreffen. Der Grund hierfür liegt in dem stöchiometrischen Einbau von Bacteriochlorophyll und Carotinoide in den photosynthetischen Apparat [Cogdell et al., 1982]. Der Grund für die abnehmende Bildung photosynthetischer Membranen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht detaillierter untersucht, ein Mangel der Nährstoffe Fructose,  $\text{NH}_4$ ,  $\text{PO}_4$ , *p*-ABA und Vitaminsubstanzen konnte jedoch zum einen durch Konzentrationsbestimmungen, zum anderen durch Vorversuche im Schüttelkolben (s.a. Abschn. 3.1.1) ausgeschlossen werden. Demnach waren Fructose, Ammonium, Phosphat und *p*-ABA zu keinem Zeitpunkt limitierend. Vitamine wurden entsprechend der vorhandenen Zelldichte nach Gl. 3.1 zugegeben und sollten daher ausreichend vorhanden gewesen sein.

In Abschn. 3.7.2 wird auf die Abhängigkeit der intrazellulären Bacteriochlorophyll-Bildung von Biosynthese-Reaktionen eingegangen werden. Im Rahmen der stöchiometrischen Modellierung des zentralen Kohlenstoffwechsels wird gezeigt werden, dass eine Biosynthese von Bacteriochlorophyll nur bei gleichzeitigem Wachstum erfolgen kann. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass bei Umschalt-Zelldichten von  $A_{660} > 26,7$  kein signifikantes Wachstum mehr zu beobachten war. Im Gegensatz dazu konnten in der Batch-Kultivierung bei einer Umschalt-Zelldichte von  $A_{660} > 2,1$  zwei Verdopplungen innerhalb der Kultivierungszeit verzeichnet werden ( $\mu_{exp} = 0,018 \text{ h}^{-1}$ ). Diese Beobachtung wirft erneut die Frage auf, ob eventuell vorhandene Limitationen durch Nährstoffe als Ursache für die ausbleibende Bildung photosynthetischer Membranen anzuführen sind.

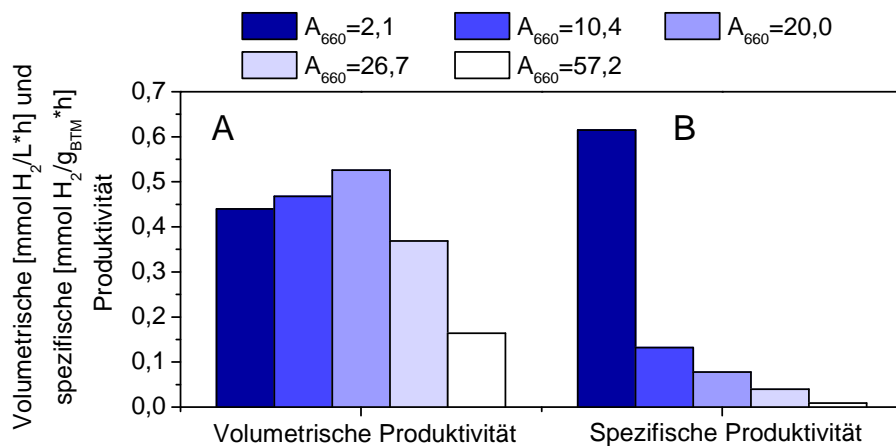
### 3.4.2 Molekularer Wasserstoff

Neben der Bildung photosynthetischer Membranen wird auch die Produktion von molekularem Wasserstoff durch die Umschalt-Zelldichte beeinflusst. In Abb. 3.22 sind die volumetrischen und spezifischen Produktbildungsraten für die Bildung von  $\text{H}_2$  unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln bei unterschiedlichen Umschalt-Zelldichten dargestellt.

Zwischen  $A_{660} = 2,1$  bis  $20,0$  fanden sich leicht ansteigende  $\text{H}_2$ -Produktionsraten (bei  $A_{660} = 20,0$  maximal:  $0,53 \frac{\text{mmol}_{\text{H}_2}}{\text{L} \cdot \text{h}}$ ). Bei Umschalt-Zelldichten  $A_{660} > 20$  geht die volumetrische  $\text{H}_2$ -Produktionsrate zurück und lag bei einer Umschalt-Zelldichte von  $A_{660} = 57,2$  nur noch bei  $0,16 \frac{\text{mmol}_{\text{H}_2}}{\text{L} \cdot \text{h}}$  (s.a. Abb. 3.22/A). In Abb. 3.22/B sind die spezifischen  $\text{H}_2$ -

Bildungsraten, bezogen auf die Umschalt-Zelldichten, aufgezeigt. Demnach fiel bereits bei Umschalt-Zelldichten von  $A_{660} = 10,4$  die spezifische  $H_2$ -Produktion dramatisch ab (um  $> 90 \%$ ) und betrug bei  $A_{660} = 57,1$  lediglich noch  $0,01 \frac{mmol_{H_2}}{g_{BTM} \cdot h}$ .

Das bedeutet, dass in höheren Zelldichten ( $> A_{660} = 20$ ) die Bildung von molekularem Wasserstoff stark zurückging. Hingegen konnten hohe Produktivitäten in niedrigeren Zelldichten ( $< A_{660} = 20$ ) erzielt werden. Mit insgesamt 939,8 mL war der Repeated-Batch-Prozess, unter wiederholter Zugabe von 10 g/L Fructose, bei  $A_{660} = 2,1$  hinsichtlich der gebildeten Menge Wasserstoff am produktivsten.



**Abb. 3.22:** Maximal volumetrische und maximal spezifische Produktivitäten für die Bildung von molekularem Wasserstoff in *R. rubrum* unter anaeroben Bedingungen mit Fructose bei verschiedenen Umschalt-Zelldichten. Jeweils 1 Kultivierung. Biostat CT5-2 Fermentationsparameter, 3,5 L Arbeitsvolumen.

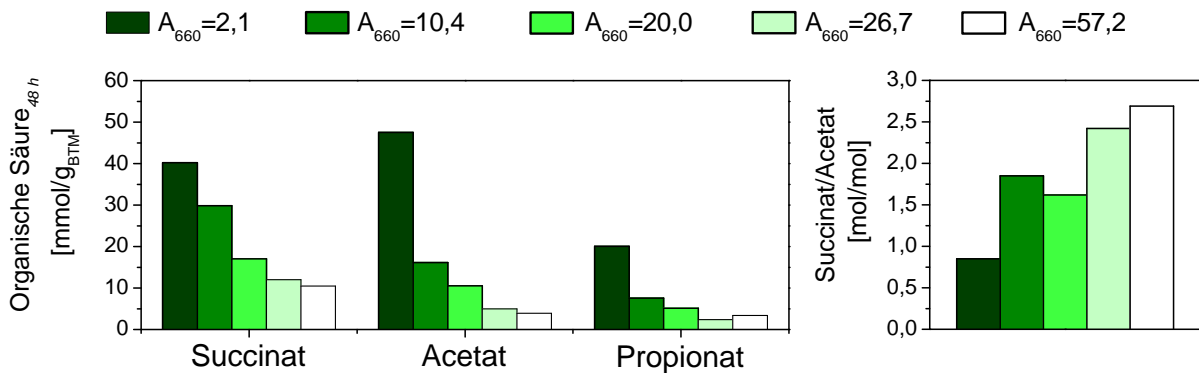
### 3.4.3 Organische Säuren

Ein weiteres interessantes Produkt, das *R. rubrum* bildet, ist Succinat (vgl.a. Abschn. 1.3.6). Die Dicarbonsäure wird, wie bereits unter Abschn. 3.3.3 erläutert wurde, im Zuge des anaeroben Gärprozesses im Gemisch mit Acetat, Propionat, Fumarat, Malat und Formiat gebildet. Da die letzten drei genannten organischen Säuren nur in minimalen Mengen auftraten, wurden sie in den nachfolgenden Darstellungen vernachlässigt.

In Abb. 3.23 sind die extrazellulären Konzentrationen der organischen Säuren Succinat, Acetat und Propionat nach 48 h Produktionsphase bezogen auf die Umschalt-Zelldichte (linke Abbildung) für unterschiedliche Umschalt-Zelldichten  $A_{660}$  abgebildet. Die Werte nach 48 h wurden ausgewählt um eine bessere Vergleichbarkeit bei unterschiedlich langen Kultivierungszeiten zu gewährleisten.

Es war eine deutliche Abnahme der Produktivität aller organischen Säuren mit zunehmender Umschalt-Zelldichte zu sehen. So wurde Succinat bei  $A_{660} = 2,1$  mit  $40,2 \frac{mmol}{g_{BTM}}$ , jedoch bei  $A_{660} = 57,2$  nur noch mit  $10,5 \frac{mmol}{g_{BTM}}$  gebildet. Das entsprach einer nachlassenden Produktivität von  $\approx 75 \%$ . Für alle organischen Säuren war ein ähnlicher Verlauf bei

den untersuchten Umschalt-Zelldichten zu beobachten (s.a. Abb. 3.23/links).



**Abb. 3.23:** Spezifische Produktivität der organischen Säuren Succinat, Acetat und Propionat unter anaeroben Bedingungen mit Fructose als C-Quelle bei verschiedenen Umschalt-Zelldichten nach 48 h Produktionsphase (links). Extrazelluläres molares Verhältnis  $\frac{Succ}{Ace}$  nach 48 h Produktionsphase bei verschiedenen Umschalt-Zelldichten (rechts). Jeweils 1 Kultivierung, Biostat CT5-2 Fermentationsparameter, 3,5 L Arbeitsvolumen.

Abb. 3.23/rechts gibt das molare Verhältnis  $\frac{Succ}{Ace}$  für unterschiedliche Umschalt-Zelldichten A<sub>660</sub> nach 48 h Produktionszeit an. Das Verhältnis stieg von  $\frac{Succ}{Ace} = 0,85$  bei A<sub>660</sub> = 2,1 auf  $\frac{Succ}{Ace} = 2,69$  bei A<sub>660</sub> = 57,2 an. Das bedeutet, dass bei höheren Umschalt-Zelldichten im Verhältnis mehr Succinat als Acetat gebildet wurde. Möglicherweise lässt sich diese Verschiebung des  $\frac{Succ}{Ace}$ -Verhältnisses mit der zurückgehenden Bildung photosynthetischer Membranen erklären. In Abb. 3.21/A ist die spezifische Bacteriochlorophyll-Konzentration zu sehen, welche mit steigender Zelldichte abnahm. Da Bacteriochlorophyll aus Succinyl-CoA gebildet wird (vgl.a. Abb. 1.14), könnte somit eine verringerte Bacteriochlorophyll-Bildung die Ursache für die verstärkte Succinat-Ausscheidung in höheren Zelldichten sein. Ähnliche Effekte wurden bereits bei der pigmentlosen Mutante Pigment<sup>-</sup> beobachtet, welche weder Carotinoide noch Bacteriochlorophyll produzierte (vgl.a. Abschn. 3.3.5). Auch hier war die Succinat-Ausscheidung im Vergleich zum *R. rubrum* Wildtyp erhöht.

Da Succinat in den letzten Jahren ein interessantes Produkt aus fermentativen Prozessen geworden ist, sind in Tab. 3.17 die einzelnen Konzentrationen und Raum-Zeit-Ausbeuten für Succinat zusammengefasst. Mit steigenden Umschalt-Zelldichten in einem 2-Stufen-Prozess wurden stetig höhere Endkonzentrationen an Succinat erzielt. Bei einer Umschalt-Zelldichte von A<sub>660</sub> = 57,2 wurden mit 286,7 mM die bisher höchsten Konzentrationen für *R. rubrum* erzielt. Die spezifische RZA war bei der höchsten untersuchten Umschalt-Zelldichte mit  $0,26 \frac{mmol}{g_{BTM} \cdot h}$  geringer als bei A<sub>660</sub> = 2,1 ( $0,84 \frac{mmol}{g_{BTM} \cdot h}$ ). Die RZA für Succinat verhielt sich damit ebenso wie die RZA für Bacteriochlorophyll und Wasserstoff. Diese Beobachtung traf nicht auf die erreichten Konzentrationen zu. Während die Bacteriochlorophyll-Konzentration bei A<sub>660</sub> > 20 stetig abnahm, stieg die Succinat-



konzentration weiter an (s.a. Tab. 3.17).

**Tab. 3.17:** Produktion von Succinat in *R. rubrum* unter anaeroben Bedingungen mit Fructose bei verschiedenen Umschalt-Zelldichten. Dargestellt sind die Succinatkonzentrationen nach 48 h Produktionsphase, die maximale Succinatkonzentration sowie die *RZA* nach 48 h Produktionsphase. Jeweils 1 Kultivierung. Biostat CT5-2 Fermentationsparameter. 3,5 L Arbeitsvolumen.

Umschalt-Zelldichte $A_{660}$ [ ]	Succinat <sub>48 h</sub>		Succinat <sub>48 h</sub>	
	Succinat <sub>48 h</sub>	Succinat <sub>maximal</sub>	$\frac{mmol}{L \cdot h}$	$\frac{mmol}{g_{BTM} \cdot h}$
2,1	28,8	56,6	0,60	0,84
10,4	106,3	106,3	2,21	0,62
20,0	155,6	145,0	3,24	0,48
26,7	221,2	172,2	4,61	0,51
57,1	233,2	286,7	4,86	0,26

### 3.4.4 PHB

Die PHB-Bildung unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln mit Fructose als C-Quelle scheint in *R. rubrum* nicht negativ von der Umschalt-Zelldichte beeinflusst zu sein. Bei den untersuchten Zelldichten fanden sich steigende PHB-Mengen von 7,6 % ( $A_{660} = 2,1$ ) bis auf 13,1 % ( $A_{660} = 57,2$ ). Auch die PHB-Konzentrationen stiegen kontinuierlich mit höheren Umschalt-Zelldichten (maximal: 2254,0 mg/L PHB bei  $A_{660} = 57,2$ ). Das bedeutet eine über 10-fach höhere Konzentration als bei  $A_{660} = 2,1$  (197,5 mg/L PHB). Einzig bei der Kultivierung mit einer Umschalt-Zelldichte von  $A_{660} = 20$  fanden sich geringere PHB-Mengen und Raum-Zeit-Ausbeuten. Hier wurde Fructose zu Beginn der anaeroben Produktionsphase stark limitierend (Fructose  $\approx 1$  g/L) zugefüttert, wohingegen bei den anderen Fedbatch-Kultivierungen Fructose in höheren Konzentrationen während der anaeroben Produktionsphase vorlag (Fructose  $> 19$  g/L). An dieser Stelle lässt sich spekulieren, ob die extrazelluläre Fructosekonzentration einen Einfluss auf die PHB-Bildung in *R. rubrum* hat. Es ist durchaus vorstellbar, dass bei Überfluss der entsprechenden Kohlenstoffquelle verstärkt Speicherstoffe gebildet werden, um den Vorrat später unter Kohlenstoffmangel wieder nutzen zu können.

Bei einem Vergleich der unter anaeroben Bedingungen erzielten PHB-Konzentrationen mit der aeroben Fedbatch-Kultivierung mit Acetat/Fructose fällt auf, dass bei der letzteren genannten Kultivierung deutlich höhere PHB-Mengen erzielt werden konnten. Mit 4860 mg/L wurden ca. doppelt so hohe Konzentrationen und mit  $85 \frac{mg_{PHB}}{L \cdot h}$  ungefähr 6,5-fach höhere Raum-Zeit-Ausbeuten erreicht (vgl.a. Abschn. 3.2.2). Zur Produktion von PHB mit *R. rubrum* scheinen daher die Sauerstoffbedingungen ausschlaggebend zu sein,

**Tab. 3.18:** Produktion von PHB in *R. rubrum* unter anaeroben Bedingungen mit Fructose bei verschiedenen Umschalt-Zelldichten. Aufgezeigt werden der Anteil PHB an der BTM, die maximale Konzentration sowie die RZA. Die RZA wurde für die gesamte anaerobe Produktionsphase berechnet. Jeweils 1 Kultivierung. Biostat CT5-2 Fermentationsparameter. 3,5 L Arbeitsvolumen.

Umschalt-Zelldichte $A_{660}$ [ ]	PHB		
	in %	mg/L	$\frac{mg}{L \cdot h}$
2,1	7,60	197,5	1,61
10,4	7,52	450,9	4,58
20,0	3,71	338,5	2,01
26,7	10,72	1093,0	11,8
57,1	13,06	2254,0	13,0

denn Acetat wird von *R. rubrum* unter anaeroben Bedingungen gebildet, so dass unter anaeroben Bedingungen ebenfalls eine Art Acetat/Fructose-Substrat zur Verfügung steht. Trotzdem waren unter anaeroben Bedingungen geringere PHB-Konzentrationen zu verzeichnen, so dass für einen Prozess zur PHB-Produktion aerobe Sauerstoffbedingungen unter Einsatz von Acetat/Fructose als Substrat gewählt werden sollten.

### 3.4.5 Coenzym Q<sub>10</sub>

Auch die Bildung von Coenzym Q<sub>10</sub> wurde in *R. rubrum* in Abhängigkeit von der Umschalt-Zelldichte untersucht. In Tab. 3.19 sind die Ergebnisse dargestellt. Hinsichtlich der spezifischen Produktivität war kein eindeutiger Trend in den maximal spezifischen Q<sub>10</sub>-Mengen zu erkennen. Zwar wurde bei einer Umschalt-Zelldichte von  $A_{660} = 2,1$  mit maximal  $5,70 \mu\text{mol}/g_{BTM}$  die höchste spezifische Konzentration gemessen, jedoch sank die Produktivität bei  $A_{660} = 26,1$  mit maximal  $3,94 \mu\text{mol}/g_{BTM}$  um ca. 30 %. Das ist eine wesentlich geringere Abnahme als bei den vorher gezeigten Produkten Bacteriochlorophyll, Wasserstoff und Succinat. Es muss jedoch kritisch bemerkt werden, dass zwischen  $A_{660} = 10,4$  und  $A_{660} = 20$  die Q<sub>10</sub>-Menge mit  $\approx 2,7 \mu\text{mol}/g_{BTM}$  geringer ausfiel als bei  $A_{660} = 2,1$  bzw.  $A_{660} = 26,7$ , wofür eine einsichtige Erklärung bisher fehlt. Vermutet werden könnte, dass Varianzen in der Messgenauigkeit für die unterschiedlichen Werte verantwortlich sind und daher ein Mittelwert von  $\approx 3,8 \mu\text{mol}/g_{BTM}$  als konstante spezifische Produktivität für alle Umschalt-Zelldichten angenommen werden kann.

Weiterhin ist in Tab. 3.19 ersichtlich, dass mit steigenden Zelldichten höhere volumetrische Produktivitäten erreicht werden können. Der maximal gemessene Wert für die Produktion von Q<sub>10</sub> mit *R. rubrum* beträgt demnach  $37,6 \mu\text{mol}/L$ . Auch die Raum-Zeit-

Ausbeuten stiegen mit höheren Zelldichten (auf maximal  $0,445 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}\cdot\text{h}}$ ). Ein Vergleich der gemessenen Coenzym Q<sub>10</sub>-Mengen mit bereits etablierten Verfahren wird in Abschn. 4 erfolgen.

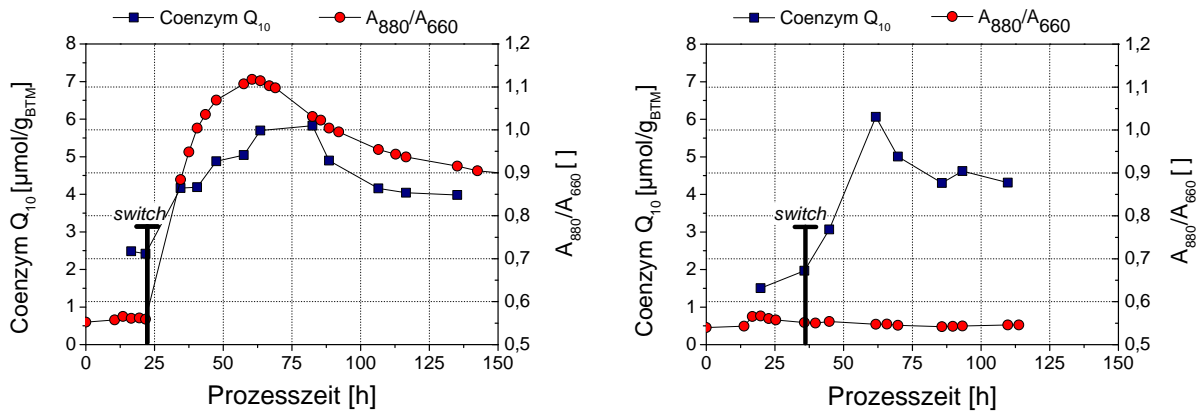
**Tab. 3.19:** Intrazelluläre Coenzym Q<sub>10</sub>-Produktivitäten in *R. rubrum* unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln. Aufgezeigt werden die spezifischen und volumetrischen Produktivitäten sowie die *RZA*. Die *RZA* wurde bis zum Erreichen der maximalen spezifischen Produktivität berechnet. n.b.: nicht bestimmt. Jeweils 1 Kultivierung. Biostat CT5-2 Fermentationsparameter, 3,5 L Arbeitsvolumen.

Umschalt-Zelldichte A <sub>660</sub> [ ]	Coenzym Q <sub>10</sub>		
	$\mu\text{mol}/\text{g}_{\text{BTM}}$	$\mu\text{mol}/\text{L}$	$\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}\cdot\text{h}}$
2,1	5,70	7,96	0,125
10,4	2,68	13,36	0,124
20,0	2,84	24,19	0,275
26,7	3,94	37,63	0,445
57,1	n.b.	n.b.	n.b.

In Abb. 3.24 ist der Verlauf der spezifischen Coenzym Q<sub>10</sub>-Menge innerhalb eines aerob/anaeroben-Umschaltprozesses des *R. rubrum* Wildtyps und der Mutante Pigment<sup>-</sup> dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, dass der spezifische Coenzym Q<sub>10</sub>-Gehalt sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante Pigment<sup>-</sup> nach dem Umschalten auf anaerob deutlich anstieg (von aerob:  $\approx 2 \mu\text{mol}/\text{g}_{\text{BTM}}$  auf anaerob:  $\approx 5 \mu\text{mol}/\text{g}_{\text{BTM}}$ ). Weiterhin ist in Abb. 3.24/A zu sehen, dass nur im *R. rubrum* Wildtyp das Verhältnis A<sub>880</sub>/A<sub>660</sub> nach Umschalten auf anaerobe Bedingungen anstieg, was durch die Ausbildung photosynthetischer Membranen und die purpurne Färbung widerspiegelt wurde. In der Mutante bleibt das Verhältnis auch nach dem Umschalten bei A<sub>880</sub>/A<sub>660</sub>  $\approx 0,55$  (s.a. Abb. 3.24/B).

Durch die Membransynthese erhöhen sich die Kapazitäten für das lipophile Coenzym Q<sub>10</sub> und damit auch die spezifischen Mengen [Cluis et al., 2007]. In Abb. 3.24 ist jedoch ersichtlich, dass auch in der pigmentlosen Mutante der Anteil Coenzym Q<sub>10</sub> nach dem Umschalten auf anaerob ansteigt. Das deutet darauf hin, dass die Neusynthese und Inagination der Membran auch in der Mutante Pigment<sup>-</sup> stattfindet, welche zum Anstieg des Coenzym Q<sub>10</sub>-Anteils führt. Im Gegensatz zum Wildtyp werden jedoch keine Pigmente in die Membran eingebaut.

Im aerob/anaeroben Fedbatch-Verfahren mit Fructose als alleiniger C-Quelle (pH-Regelung mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) konnte eine deutliche Abnahme der spezifischen Produktivitäten für photosynthetische Membranen (Bacteriochlorophyll und Carotinoide), molekularen Wasserstoff und organische Säuren mit steigender Zelldichte beobachtet werden. Für



**Abb. 3.24:** Spezifische Coenzym Q<sub>10</sub>-Produktion und A<sub>880</sub>/A<sub>660</sub>-Verhältnis in *R. rubrum* Wildtyp S1 (A) und der spontan aufgetretenen Mutante Pigment<sup>-</sup> (B) beim aerob/anaeroben Umschaltprozess mit Fructose als alleiniger C-Quelle (*switch*: Zeitpunkt des Umschaltens). pH-Regelung mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Daten sind repräsentativ für mind. 2 Kultivierungen. Biostat CT5-2 Fermentationsparameter.

Bacteriochlorophyll und Wasserstoff war eine Abnahme von > 90 % bei einer Umschalt-Zelldichte von A<sub>660</sub> = 57,2 im Vergleich zu A<sub>660</sub> = 2,1 zu verzeichnen. Bei den organischen Säuren fiel auf, dass in höheren Zelldichten das Verhältnis von extrazellulärem Succinat zu extrazellulärem Acetat steigt. Hier verursacht der ausbleibende Abzug von Succinyl-CoA als Precursor durch den Rückgang der Bacteriochlorophyllbildung eine erhöhte Succinatproduktion. Die Produktion von PHB und Coenzym Q<sub>10</sub> bleibt hingegen auch in höheren Zelldichten konstant.

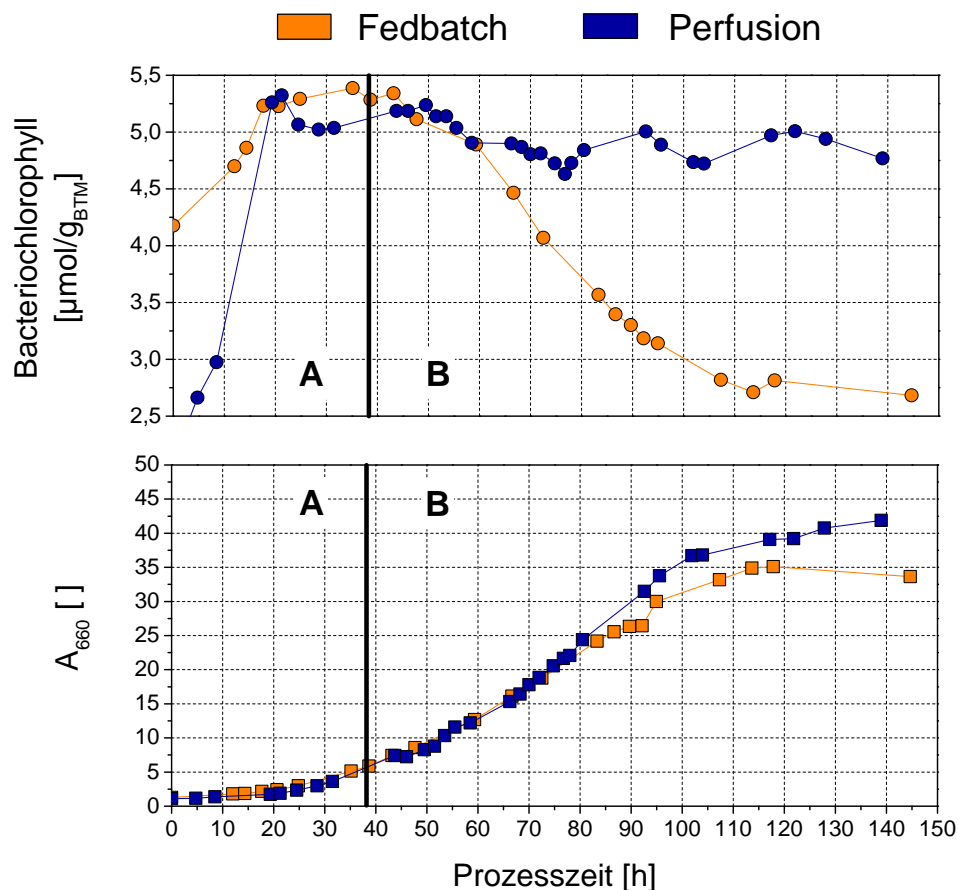
### 3.5 Kontinuierliche Kultivierung unter Zellrückhaltung

Durch den Einsatz einer kontinuierlichen Kultivierung unter Zellrückhaltung sollte die Inhibierung der Ausbildung photosynthetischer Membranen in hohen Zelldichten verhindert werden. Erste Hinweise auf das Vorliegen eines sogenannten *quorum sensing*-Phänomens gab es durch Experimente mit zellfreiem Kultivierungsüberständen. Durch die Zugabe dieser Überstände auf Membran-bildende Zellen wurde diese Membranbildung signifikant inhibiert (Ergebnisse innerhalb der Arbeitsgruppe, MPI Magdeburg, Daten nicht gezeigt). Durch den kontinuierlichen Austausch des extrazellulären Mediums und der gleichzeitigen Zellrückhaltung sollte eine Abreicherung der potentiell störenden Substanzen bei gleichzeitigem Wachstum der Zellen erzielt werden.

Für die erste Kultivierung unter Zellrückhaltung kam eine Watson-Marlow Pumpe (Typ 40 1U/D1) in Verbindung mit einem Silikonschlauch (Durchmesser 2,79 mm) für die Umwälzung zur Anwendung. Die Begrenztheit der Pumpenleistung dieser Art Pumpe wurde nach kurzer Zeit deutlich und führte zu einem relativ unsteten Volumen sowie wechselnder Feed- und Permeatraten. Trotzdem war dieser erste Versuch ein erfolgversprechender Ansatz und soll nun im Folgenden detaillierter beschrieben werden.

## Bacteriochlorophyllbildung unter kontinuierlichem Mediumswechsel

Durch den kontinuierlichen Austausch des Mediums unter Zellrückhaltung sollten inhibitorische Substanzen aus der Kulturbrühe abgereichert und damit eine Ausbildung photosynthetischer Membranen auch in hohen Zelldichten ermöglicht werden. Abb. 3.25 zeigt den Verlauf der spezifischen Bacteriochlorophyll-Konzentration unter komplett mikroaeroben Bedingungen einer Fedbatch- und der Perfusionskultivierung mit Fructose als alleiniger C-Quelle. In beiden Fällen wurde kein 2-stufiger Prozess durchgeführt, wie unter den Abschn. 3.3, 3.4 beschrieben, sondern es wurden von Beginn an mikroaerobe Sauerstoffbedingungen (Redoxpotential = -300 mV) eingestellt. Dies sollte zum einen ein Wachstum neben der Produktbildung erlauben, zum anderen sollte die Prozessführung einfach gehalten werden.



**Abb. 3.25:** Bacteriochlorophyllbildung im Fedbatch-Prozess und Perfusionsprozess mit Fructose als alleiniger C-Quelle unter mikroaeroben Sauerstoffbedingungen (Redoxpotential = -300 mV). A: Batch-Phase. B: Fedbatch- bzw. Perfusionsphase. Austauschrate:  $\approx 0,075$  L/h. Perfusion: 1 Kultivierung. Fedbatch: 2 Kultivierungen. Biostat CT5-2 Fermentationsparameter. 3,5 L Arbeitsvolumen.

In Abb. 3.25 wird der positive Effekt auf die Bacteriochlorophyllproduktion durch den

Austausch des Mediums deutlich. Nach ca. 120 h lag der spezifische Bacteriochlorophyll-Anteil im Perfusionsprozess bei  $5,01 \mu\text{mol}/g_{BTM}$ . Wohingegen im Fedbatch-Prozess der Bacteriochlorophyll-Anteil bereits nach 43,2 h abnahm und nach 118 h nur noch bei  $2,81 \mu\text{mol}/g_{BTM}$  lag (s.a. Abb. 3.25/oben).

Weiterhin ist in Abb. 3.25/unten der Verlauf der Biomasseproduktion zu sehen. Sowohl im Fedbatch-Prozess als auch im Perfusionsbetrieb wurden ähnliche Wachstumsraten erreicht (Fedbatch:  $\mu_{exp} = 0,031 \text{ h}^{-1}$  bzw. Perfusion:  $\mu_{exp} = 0,038 \text{ h}^{-1}$ ). Nach 80 h Fermentationszeit war das Wachstum im Perfusionsprozess sogar etwas erhöht, so dass die erreichte End-Biomasse mit  $A_{660} = 41,9$  etwas höher war als beim Fedbatch-Prozess ( $A_{660} = 33,6$ ). Diese Daten zeigen, dass das Wachstum von *R. rubrum* nicht durch den Perfusionsbetrieb (Erhöhung von Scherkräften durch das Abpumpen und die Filtration) beeinträchtigt wurde. Darüber hinaus konnte deutlich der positive Effekt des Austausches auf die Ausbildung photosynthetischer Membranen, durch eine Verdopplung der spezifischen Bacteriochlorophyll-Mengen, aufgezeigt werden. Um das System auch in hohen Zelldichten ( $A_{660} > 40$ ) anwenden zu können, sind weitere Optimierungsschritte nötig. Der Prozess sollte auf einen 2-Stufen-Prozess übertragen werden, um eine schnelle Biomasseproduktion während der aeroben Wachstumsphase zu gewährleisten. Darüber hinaus sollte die Filterfläche vergrößert werden ( $> 200 \text{ cm}^3$ ), um auch in Zelldichten von  $A_{660} > 42$  effizient zu filtrieren. Jedoch kann diese erste Kultivierung durchaus als ein erster Schritt zur Überwindung der inhibitorischen Effekte bei der Produktion photosynthetischer Membranen unter  $\text{O}_2$ -limitierenden Bedingungen im Dunkeln angesehen werden.

## Einfluss der Austauschrate

Da eine genaue Kinetik der inhibitorischen Substanzen fehlte, wurden im Rahmen der kontinuierlichen Kultivierungen unter Zellrückhaltung verschieden hohe Austauschraten angewendet und deren Effekt auf die Bildung photosynthetischer Membranen untersucht. Eine apparativ vorteilhaftere Lösung bot sich durch den Einsatz einer peristaltischen Tandempumpe (Tandem 1082, Sartorius) im Gegensatz zur leistungsschwächeren Watson-Marlow-Pumpe an. Damit konnten definierte Austauschraten realisiert werden.

In Tab. 3.20 wird der Effekt einer Erhöhung der Austauschrate deutlich. Bei allen 3 Austauschraten (0,1-0,3 L/h) konnte eine deutliche Abnahme des  $A_{880}/A_{660}$ -Verhältnisses verzeichnet werden. Einzig bei der ersten Perfusionskultivierung mit  $\approx 0,075 \text{ L/h}$  blieb die Membranbildung in etwa konstant (vgl.a. Abb. 3.25). Interessant hierbei war, dass bei Austauschraten zwischen 0,1-0,3 L/h die Austauschrate direkt mit der Membranabnahmerate korrelierte. Mit zunehmender Austauschrate nahm die Rate der Membranabnahme zu. Das Biomassewachstum blieb unter der Variation der Austauschrate ungefähr gleich ( $\mu_{exp} \approx 0,032 \text{ h}^{-1}$ ). Das bedeutet zum einen, dass durch eine Erhöhung der Austauschrate, bei gleichbleibenden Feedzusammensetzungen nach Tab. 2.10, keine Wachstumslimitation

auftrat, zum anderen aber auch, dass nicht Zellyse durch erhöhte Scherkräfte der Grund für den Rückgang der Membranbildung war.

**Tab. 3.20:** Membranabnahmeraten und exponentielle Wachstumsraten bei verschiedenen Austauschraten des Perfusion-Prozesse im Vergleich zum Fedbatch-Verfahren. Die Membranabnahmeraten und die Wachstumsraten wurden mind. über einen Zeitraum von 10 h berechnet. Daten jeweils aus 1 Kultivierung, Fedbatch: 2 Kultivierungen. Biostat CT5-2 Fermentationsparameter, 3,5 L Arbeitsvolumen.

Austauschrate L/h	Membranabnahmerate $\frac{\Delta A_{880}}{\Delta A_{660} \cdot h}$	Wachstumsrate $\mu$ in $\text{h}^{-1}$
$\approx 0,075$	–	0,038
0,10	0,0019	0,031
0,20	0,0039	0,029
0,30	0,0058	0,035
Fedbatch	0,0037	0,031

Ein Grund für den Rückgang des  $A_{880}/A_{660}$ -Verhältnisses könnte in einer verringerten  $\text{CO}_2$ -Verfügbarkeit bei höheren Austauschraten begründet sein. Die Bedeutung von Kohlendioxid für die Bildung photosynthetischer Membranen im Dunkeln wurde bereits unter Abschn. 3.3.4 verdeutlicht. Endogenes und extern zugeführtes  $\text{CO}_2$  löst sich in einem Gleichgewicht im Kultivierungsmedium und führt zur Bildung der wasserlöslichen Zwischenstufen  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{CO}_3^{2-}$ .  $\text{HCO}_3^-$  und Carbonat würden bei einer Erhöhung des Mediumswechsels auch vermehrt ausgewaschen und stünden der Zelle somit nicht mehr zur Verfügung.

### 3.6 Maximale Produktivitäten

Im 2-Stufen-Prozess hat die Zelldichte zum Zeitpunkt des Umschaltens einen großen Einfluss auf die nachfolgende anaerobe Produktivität mit Fructose als C-Quelle. So konnten stark abnehmende spezifische Produktivitäten für die Bildung photosynthetischer Membranen (Bacteriochlorophyll), molekularen Wasserstoffs und organischer Säuren (z.B. Succinat) mit steigender Zelldichte beobachtet werden. Konstant hingegen blieb die spezifische Bildung von PHB und Coenzym  $\text{Q}_{10}$ . Die einzelnen maximalen Werte zur Charakterisierung der Produktbildung sind in Tab. 3.21 zusammengefasst. Bacteriochlorophyll wurde mit maximal  $7,74 \mu\text{mol}/\text{g}_{\text{BTM}}$  und  $40,5 \mu\text{mol}/\text{L}$  gebildet. Die maximale Wasserstoff-Bildungsrate betrug  $0,53 \frac{\text{mmol}}{\text{L} \cdot \text{h}}$ . Diese maximalen Produktkonzentrationen wurden bei Umschalt-Zelldichten von  $A_{660} = 20$  erreicht. Bacteriochlorophyll wurde mit

**Tab. 3.21:** Zusammenfassung maximaler Produktivitäten der einzelnen Produkte Bacteriochlorophyll, Lycopin, PHB, Coenzym Q<sub>10</sub>, Succinat sowie H<sub>2</sub>. Bei extrazellulär gelösten Produkten und H<sub>2</sub> bezieht sich die Biomassenspezifische Konzentration auf die Umschalt-Zelldichte im 2-Stufen-Prozess. Biostat C/T5-2 Fermentationsparameter. 3,5 L Arbeitsvolumen.

Produkt	Biomassenspezifische Konzentration	Volumenspezifische Konzentration	Ausbeute $Y_{(P/S)}$ ( $\frac{\text{Produkt}}{\text{Substrat}}$ )	Raum-Zeit-Ausbeute
Bacteriochlorophyll	7,74 <sup>b</sup> $\mu\text{mol/g}_{BTM}$	40,5 <sup>b</sup> $\mu\text{mol/L}$	0,0003 <sup>b</sup> $\frac{\text{mol}}{\text{mol}}$	1,34 <sup>a</sup> $\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}\cdot\text{h}}$
Lycopin	3,48 <sup>c</sup> $\mu\text{mol/g}_{BTM}$	24,5 <sup>c</sup> $\mu\text{mol/L}$	0,014 <sup>c</sup> $\frac{\text{mol}}{\text{mol}}$	0,058 <sup>c</sup> $\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}\cdot\text{h}}$
PHB	34,3 <sup>e</sup> %	4,86 <sup>d</sup> g/L	0,045 <sup>d</sup> $\frac{\text{g}}{\text{g}}$	0,085 <sup>d</sup> $\frac{\text{g}}{\text{L}\cdot\text{h}}$
Coenzym Q <sub>10</sub>	5,7 $\mu\text{mol/g}_{BTM}$	37,63 $\mu\text{mol/L}$	0,0002 $\frac{\text{mol}}{\text{mol}}$	0,445 $\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}\cdot\text{h}}$
Succinat	40,2 <sup>a</sup> mmol/g <sub>BTM</sub>	286 <sup>f</sup> mM	0,732 <sup>a</sup> $\frac{\text{mol}}{\text{mol}}$	0,537 <sup>a</sup> $\frac{\text{mmol}}{\text{L}\cdot\text{h}}$
H <sub>2</sub>	17,31 <sup>a</sup> mmol/g <sub>BTM</sub>	12,39 <sup>a</sup> mM	0,45 <sup>a</sup> $\frac{\text{mol}}{\text{mol}}$	0,52 <sup>a</sup> $\frac{\text{mmol}}{\text{L}\cdot\text{h}}$

<sup>a</sup> Daten aus Fedbatch 2-Stufen-Prozess mit einer Umschalt-Zelldichte von A<sub>660</sub> = 2

<sup>b</sup> Daten aus Fedbatch 2-Stufen-Prozess mit einer Umschalt-Zelldichte von A<sub>660</sub> = 20

<sup>c</sup> Daten aus Batch 2-Stufen-Prozess mit Umschalt-Zelldichte von A<sub>660</sub> = 2

<sup>d</sup> Daten aus aeroben Fedbatch-Kultivierung mit Acetat/Fructose

<sup>e</sup> Daten aus aeroben Batch-Kultivierung mit Acetat

<sup>f</sup> Daten aus Fedbatch 2-Stufen-Prozess mit einer Umschalt-Zelldichte von A<sub>660</sub> = 57,2



maximal  $7,74 \mu\text{mol}/g_{BTM}$  und  $40,5 \mu\text{mol}/\text{L}$  gebildet. Die maximale Wasserstoff-Bildungsrate betrug  $0,53 \frac{\text{mmol}}{\text{L}\cdot\text{h}}$ . Diese maximalen Produktkonzentrationen wurden bei Umschalt-Zelldichten von  $A_{660} = 20$  erreicht. Bei höheren Zelldichten ging die Produktivität zurück. Hingegen war bei der Bildung von organischen Säuren eine stetige Abnahme der spezifischen Produktivität zu beobachten, die extrazelluläre Produktkonzentration im Mediumsüberstand nahm jedoch kontinuierlich zu. So wurden bei Umschaltzelldichten von  $A_{660} = 57,2$  maximal  $286,73 \text{ mM}$  Succinat gebildet. Ein vielversprechender Ansatz zur Ausbildung photosynthetischer Membranen im Dunkeln stellt der kontinuierliche Prozess unter Zellrückhaltung dar. In einer ersten mikroaeroben Cross-Flow-Kultivierung konnte so die Membranbildung von  $2,81 \mu\text{mol}/g_{BTM}$  auf maximale  $5,01 \mu\text{mol}/g_{BTM}$  bei vergleichbaren Zelldichten nahezu verdoppelt werden.

Im Gegensatz zu Bacteriochlorophyll, Wasserstoff und organische Säuren bleiben die spezifischen Mengen von PHB und Coenzym  $Q_{10}$  zwischen Umschalt-Zelldichten von  $A_{660} = 2,1$  und  $A_{660} = 57,2$  relativ konstant. Bei der Bildung von PHB findet sich sogar ein leichter Anstieg der spezifischen PHB-Konzentration auf maximal  $13,1 \%$  und  $2254 \text{ mg}_{PHB}/\text{L}$ . Diese Mengen sind allerdings vergleichsweise gering gegenüber den auf Acetat/Fructose-Mischsubstrat festgestellten Konzentrationen unter aeroben Bedingungen (maximal  $33 \%$  und  $4860 \text{ mg}_{PHB}/\text{L}$ ). Coenzym  $Q_{10}$  wurde mit durchschnittlich  $3,94 \mu\text{mol}/g_{BTM}$  gebildet. Die maximal erreichte Konzentration betrug  $37,6 \mu\text{mol}/\text{L}$ .

Für die klassische Verfahrensentwicklung und -optimierung sind an dieser Stelle die Möglichkeiten zur Steigerung der Produktbildung ausgeschöpft. Dazu gehörten u.a. die Optimierung des Basismediums hinsichtlich verschiedener Mediumskomponenten und die Entwicklung geeigneter Zufütterungsstrategien. Darüber hinaus wurden externe, prozessrelevante Parameter wie die Gelöstsauerstoffkonzentration und die  $\text{CO}_2$ -Zufuhr untersucht und optimiert. Die erhaltenen, maximalen Produktmengen für diese optimierten Bedingungen wurden bestimmt und sind in Tab. 3.21 zusammengefasst. Ein detaillierter Vergleich mit bereits existierenden mikrobiellen Produzenten wird in Abschn. 4 erfolgen.

Um die Produktbildung an dieser Stelle weiter zu steigern, müsste der *R. rubrum* Wildtyp genetisch und metabolisch optimiert werden. Mit Hilfe von Deletionsmutanten und der Überexpression bestimmter Stoffwechselwege oder Enzymen ist es möglich deutlich höhere Produktmengen und Raum-Zeit-Ausbeuten zu erzielen, als mit Wildtyp-Stämmen (*metabolic engineering*) [Stephanopoulos et al., 1998]. Aus diesem Grund wurde neben den klassischen Verfahren der Prozessoptimierung der Zentralstoffwechsel in *R. rubrum*, über den zum Teil noch recht wenig bekannt ist, untersucht. Dazu wurden intrazelluläre Metabolite des zentralen Kohlenstoffwechsels in Abhängigkeit vom Substrat, der Sauerstoffzufuhr und im zeitlichen Verlauf der Membranbildung bestimmt. Des Weiteren erfolgte



Abb. 3.26 zeigt den Zentralstoffwechsel sowie einzelne Produkte und deren Precursor in *R. rubrum* unter chemoheterotrophen Bedingungen im Dunkeln. Da die Charakterisierung des Wachstums und der Produktbildung hauptsächlich für diese Bedingungen erfolgte, wurden phototrophe Reaktionen, wie der CBB-Zyklus, nicht abgebildet. Die G6P-Dehydrogenase konnte in *R. rubrum* nicht nachgewiesen werden und ist daher entsprechend gekennzeichnet [Grammel et al., 2003].

Die Biosynthese von Bacteriochlorophyll, anderen Porphyrinstrukturen und Vitamin B<sub>12</sub> beginnt mit Succinyl-CoA aus dem TCA-Zyklus. Die Produktion von Wasserstoff aus dem PFL/FHL-System unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln erfolgt hingegen aus intrazellulärem Pyruvat [Gorrell and Uffen, 1977; Schön and Voelskow, 1976].

Für die Biosynthese von Terpenoiden für Carotinoide kommen mehrere Precursor in Frage, zum Teil bedingt durch die zwei theoretisch möglichen Wege: dem Mevalonatweg (Acetyl-CoA) und dem DOXP-Weg (Pyruvat und GAP). Da der DOXP-Weg für *R. rubrum* bestätigt werden konnte [Takaichi, 2009], wurden in Abb. 3.26 nur die Precursor dieses Weges berücksichtigt. Das betrifft auch die Biosynthese der Polyisoprenoid-Seitenkette von Coenzym Q<sub>10</sub> und der Geranylgeranyl-Seitenkette vom Bacteriochlorophyll. Aus Übersichtlichkeitsgründen wurden Pyruvat und GAP als Precursor für die Bacteriochlorophyll-Biosynthese nicht dargestellt. Die Biosynthese des Benzolrings erfolgt in *R. rubrum* ausgehend von PEP und E4P (vgl.a. Abb. 1.3.3).

Die Bildung von Carotinoiden und Bacteriochlorophyll ist eng mit der Bildung intracytoplasmatischer Membranen verknüpft. Das weitreichende Membransystem erfordert die Biosynthese von Proteinen und Lipiden, insbesondere von Phospholipiden [Schröder and Drews, 1968]. Für die Produktion von Bacteriochlorophyll oder Carotinoiden sind aus diesem Grund nicht nur Pyruvat, GAP und/oder Acetyl-CoA entscheidend, sondern zum Beispiel auch die Biosynthese der einzelnen Aminosäuren und Lipidgrundgerüste (Zusammenhänge sind nicht abgebildet).

Für die Biosynthese von PHB wiederum wird Acetyl-CoA benötigt. Wichtig ist darüber hinaus, dass Reduktionsäquivalente in Form von NADH bereitgestellt werden. Die Bedeutung von NADH und die Regulation der Precursor-Verfügbarkeit für die PHB-Synthese werden später eingehender beschrieben (s.a. Abschn. 3.7.1.2).

Im Folgenden sollen die Konzentrationen intrazellulärer Metabolite des Zentralstoffwechsels in *R. rubrum* in Abhängigkeit vom Substrat und der O<sub>2</sub>-Zufuhr aufgezeigt werden. Dabei wird sowohl auf das gesamte Metabolitenspektrum eingegangen werden als auch auf einzelne Metabolite spezieller Biosynthesewege (z.B. PHB-Biosynthese). Darüber hinaus wird ein zeitlicher Verlauf der in Abb. 3.26 aufgezeigten Precursor während der Bildung photosynthetischer Membranen gezeigt werden. Damit können direkte Rückschlüsse auf eventuelle Limitationen im Hinblick auf die Produktbildung gezogen werden.

### 3.7.1 Intrazelluläre Metabolitenkonzentrationen

Die quantitative Erfassung von Poolgrößen wichtiger intrazellulären Intermediate des zentralen Kohlenstoffwechsels kann wertvolle Hinweise auf Stoffwechsellagen und die Verfügbarkeit von Precursoren liefern. Einige wachstumscharakterisierende Parameter wurden bereits in Abschn. 3.1 genauer beschrieben und sollen an dieser Stelle im Zusammenhang mit den Metabolomdaten neu diskutiert werden. Im Einzelnen werden intrazelluläre Konzentrationen beim Wachstum auf den Einzelsubstraten Acetat, Succinat und Fructose sowie den Mischsubstraten Succinat/Fructose und Acetat/Fructose gezeigt. Die Konzentration einzelner intrazellulärer Metabolite des PHB-Biosyntheseweges wurden gemessen. Zum Schluss sollen Veränderungen in Poolgrößen beim 2-Stufen-Prozess aerob/mikroaerob mit M2SF-Medium und aerob/anaerob mit M2F-Medium deutlich gemacht werden. Im Folgenden soll zunächst auf Metabolitenkonzentrationen beim aeroben Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffsubstraten eingegangen werden.

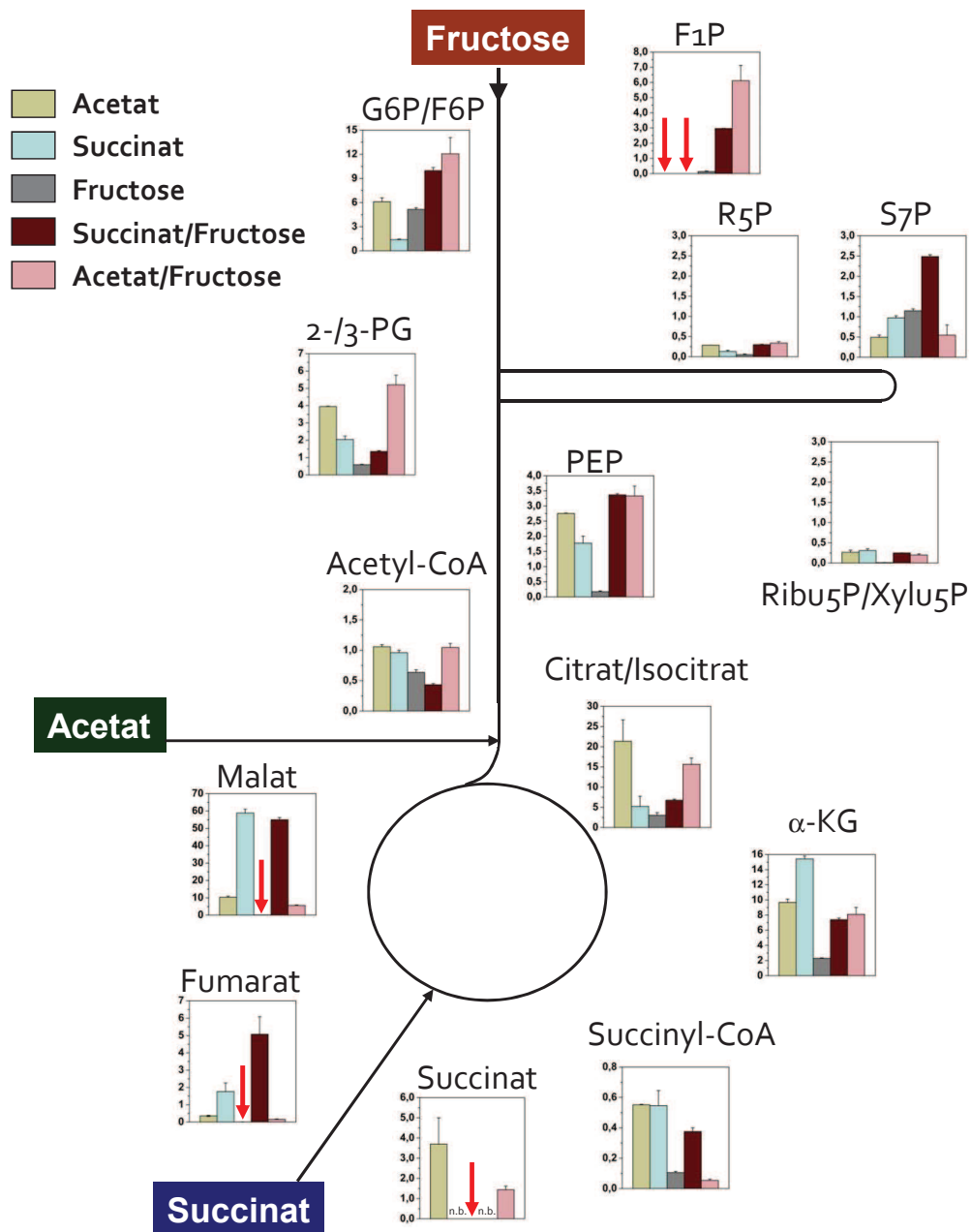
#### 3.7.1.1 Aerobe Wachstumsbedingungen mit verschiedenen Substraten

Die aerobe Wachstumsphase von *R. rubrum* auf verschiedenen Kohlenstoffsubstraten ist gekennzeichnet durch verschieden hohe Wachstumsraten, Substrataufnahmeraten sowie CO<sub>2</sub>-Abgaberaten (vgl.a. Abschn. 3.1). Intrazelluläre Stoffwechselintermediate können Hinweise auf einzelne Stoffwechselrouten geben oder entschlüsseln. Die intrazelluläre Precursor-Verfügbarkeit unter aeroben Bedingungen könnte unter Umständen für die anschließende Produktbildungsphase unter O<sub>2</sub>-limitierenden Bedingungen entscheidend sein. Aus diesem Grund wurden zunächst die aeroben Poolgrößen verschiedener Intermediate (s.a. Anhang A1) des Stoffwechsels bestimmt. In Abb. 3.27 sind ausgewählte Stoffwechselintermediate des zentralen Kohlenstoffstoffwechsels in *R. rubrum* dargestellt.

Abhängig von der eingesetzten Kohlenstoffquelle traten unterschiedlich hohe intrazelluläre Konzentrationen auf. So führte zum Beispiel die Verwendung von Fructose zum Auftreten von F1P, wohingegen auf gluconeogenetischen Substraten, wie Acetat und Succinat, F1P als Stoffwechselintermediat nicht auftrat (s.a. Abb. 3.27). Die Verhältnisse der Metabolitenpools von F6P/G6P der einzelnen Substrate fanden sich auch bei Intermediaten des EMP-Weges (2-/3-PG, PEP), wobei niedrigere glycolytische Poolgrößen bei M2F und M2S und höhere bei den Mischsubstraten M2SF und M2AF, und auch überraschend mit Acetat (M2A), als alleinige C-Quelle auftraten.

Im Vergleich zu glycolytischen Intermediaten waren die intrazellulären Konzentrationen der Metabolite des PPP-Weges R5P und Ribü5P/Xylü5P für alle Substrate vergleichsweise niedrig. Mit Ausnahme von M2SF galt das auch für S7P. R5P bzw. Ribü5P/Xylü5P stiegen in *R. rubrum* beim aeroben Wachstum auf den betrachteten Substraten nicht

über  $0,3 \mu\text{mol/g}_{BTM}$  an. Beim Wachstum auf Fructose war die Konzentration des Pools 2-/3-PG  $> 50$ -fach höher als der des Ribulose-5P/Xylulose-5P-Pools. Für M2S lagen die Pools von 2-/3-PG um das 6,6-fache und für M2A um das 14,8-fache höher als die jeweiligen Pools von Ribulose-5P/Xylulose-5P (s.a. Abb. 3.27). 6-Phosphogluconat, das Produkt der



**Abb. 3.27:** Intrazelluläre Metabolitenkonzentrationen des Zentralstoffwechsels in *R. rubrum* unter aeroben Bedingungen mit verschiedenen C-Quellen. ■ : Acetat. ■ : Succinat. ■ : Fructose. ■ : Succinat/Fructose. ■ : Acetat/Fructose. Angaben in  $\mu\text{mol/g}_{BTM}$  mit Standardabweichungen aus je 3 technischen Replikaten. Für Acetat, Fructose und Acetat/Fructose: 5 %  $\text{CO}_2$ . n.b.: nicht bestimmt. Roter Pfeil: nicht detektiert. F1P: Fructose-1-phosphat. G6P: Glucose-6-phosphat. F6P: Fructose-6-phosphat. 2-/3-PG: 2-/3-Phosphoglycerat. R5P: Ribose-5-phosphat. Ribulose-5P: Ribulose-5-phosphat. Xylulose-5P: Xylulose-5-phosphat. PEP: Phosphoenolpyruvat. DASGIP-Kultivierungsparameter.

G6P-Dehydrogenase Reaktion des oxidativen Zweiges des PPP-Weges, konnte bei allen verwendeten Substraten nicht detektiert werden. Das bestätigt die Untersuchungen von Grammel et al. [2003], wonach keine G6P-Dehydrogenase-Aktivität in *R. rubrum* festgestellt werden konnte. Ebenso schlug eine Genannotierung der G6P-Dehydrogenase fehlt [Grammel et al., 2003]. Durch das Fehlen der G6P-Dehydrogenase kann eine Limitation des oxidativen PPP-Weges vermutet werden. Somit könnte zum Beispiel NADPH nicht ausreichend zur Verfügung gestellt werden. Das Fehlen des oxidativen Zweiges des PPP-Weges könnte auch die im Vergleich zu anderen etablierten Mikroorganismen geringeren Wachstumsraten unter aeroben Bedingungen erklären (vgl.a. Abschn. 3.1.1). Die Biosynthese von R5P für DNA-/RNA- oder Cofaktor-Synthesen erfolgt in *R. rubrum* ausschließlich aus F6P und GAP über die reversiblen Reaktionen von Transaldolase und Transketolase (s.a. Abb. 1.6).

Bei den Intermediaten des TCA-Zyklus fällt auf, dass Substrate mit Succinat als C-Quelle (M2S bzw. M2SF) hohe intrazelluläre Konzentrationen an Malat (bis zu  $58,9 \mu\text{mol/g}_{BTM}$ ) und Fumarat (bis zu  $5,07 \mu\text{mol/g}_{BTM}$ ) im Gegensatz zu Medien, die Acetat oder Fructose enthalten (Fumarat  $< 0,36 \mu\text{mol/g}_{BTM}$ ), aufweisen. Eine hohe Succinataufnahmerate könnte beim Wachstum auf M2S bzw. M2SF dazu führen, dass Fumarat, und vor allem Malat, als *overflow*-Metaboliten auftreten. In aeroben Batch-Kultivierungen mit M2S-Medium wurde darüber hinaus eine Ausscheidung von Fumarat und Malat in das extrazelluläre Medium beobachtet (maximal  $0,32 \text{ mM}$  Fumarat bzw.  $1,31 \text{ mM}$  Malat).

Beim Wachstum auf Fructose als alleinige C-Quelle konnten die Metabolite des TCA-Zyklus Malat, Fumarat und Succinat nicht detektiert werden. Bei Luo et al. [2007] werden die Nachweisgrenzen für die angewandte Methode (s.a. Abschn. 2.5.4) für Malat mit  $250 \text{ nM}$ , für Fumarat mit  $25 \text{ nM}$  und für Succinat mit  $50 \text{ nM}$  angegeben. Die Konzentration der Metabolite in den Extraktionen müsste demnach unterhalb dieser Werte liegen. Hingegen konnten die Metabolite Succinyl-CoA,  $\alpha$ -KG und Citrat/Isocitrat beim Wachstum auf Fructose detektiert werden, obwohl die intrazellulären Konzentrationen vergleichsweise gering ausfielen. So war beispielsweise die intrazelluläre  $\alpha$ -KG-Konzentration auf M2S-Medium mit  $15,4 \mu\text{mol/g}_{BTM}$  um das 6,6-fache höher als mit Fructose als Substrat. Die intrazelluläre Citrat/Isocitrat-Konzentration mit Acetat als alleinige C-Quelle war um das 7,1-fache höher als beim Wachstum auf Fructose. Weiterhin auffällig war, dass die Verhältnisse der Metabolitenpools von Acetyl-CoA mit denen von Citrat/Isocitrat weitgehend ähnlich waren (s.a. Abb. 3.27). So waren die höchsten Citrat/Isocitrat-Konzentrationen und die höchsten Acetyl-CoA-Konzentrationen beim Wachstum auf Acetat (Citrat/Isocitrat:  $21,4 \pm 5,3 \mu\text{mol/g}_{BTM}$  und Acetyl-CoA:  $0,89 \pm 0,08 \mu\text{mol/g}_{BTM}$ ) und Acetat/Fructose (Citrat/Isocitrat:  $15,7 \pm 1,5 \mu\text{mol/g}_{BTM}$  und Acetyl-CoA:  $1,05 \pm 0,07 \mu\text{mol/g}_{BTM}$ )

zu finden. Dieser Zusammenhang wird in Verbindung mit den intrazellulären Pools des PHB-Biosyntheseweges im nachfolgenden Abschnitt detaillierter diskutiert.

### 3.7.1.2 Intrazelluläre Metabolite der PHB-Bildung

Die PHB-Bildung wird in Bakterien durch Limitation von nicht-Kohlenstoff-Substraten bei gleichzeitigem Überschuss an C-Quelle gebildet. In *R. eutropha* regulieren NADH und CoA die Aktivität der PDH,  $\beta$ -Ketothiolase und Citratsynthase unter PHB-bildenden Bedingungen [Trotsenko and Belova, 2000]. Für *R. rubrum* ist die Rolle des Substrats unter photoheterotrophem Wachstum für die Art der gebildeten Speicherform (PHB bzw. Glycogen) beschrieben (vgl.a. Abschn. 1.3.4). Eine detaillierte Untersuchung der Bildung und Regulation von PHB unter chemotrophen Bedingungen im Dunkeln fehlt bislang. Aus diesem Grund sollten intrazelluläre Metabolite des PHB-Biosyntheseweges sowie die Bestimmung von intrazellulären Redoxpools (NAD(H), NADP(H) und Coenzym Q<sub>10</sub>) und ATP, ADP und AMP (Energy Charge) die Produktion und Regulation von PHB in *R. rubrum* genauer aufzeigen. Der Energy Charge stellt den Energiestatus der Zelle dar und berechnet sich aus dem Verhältnis von  $\text{ATP} + \frac{1}{2} \text{ADP}$  zur Summe aller Adenosylnukleotide. Würde ausschließlich ATP vorliegen, hätte der Energy Charge den Maximalwert 1.

In Tab. 3.22 sind die Ergebnisse der einzelnen Messungen zusammengefasst. Als intrazelluläre Intermediate des PHB-Syntheseweges wurden die Konzentrationen von Acetyl-CoA, Acetoacetyl-CoA,  $\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA und Crotonyl-CoA bestimmt. Die zwei Enantiomere von  $\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA konnten mit der verwendeten LC-MS/MS-Methode nicht einzeln aufgelöst werden.

Ausgangspunkt war die Beobachtung, dass bereits unter nicht-limitierenden Bedingungen auf verschiedenen C-Quellen unterschiedlich hohe PHB-Anteile vorhanden waren, wobei mit 34,3 % der höchste PHB-Gehalt mit Acetat auftrat. Auf den Substraten Fructose und Succinat/Fructose wurden hingegen nur sehr geringe PHB-Mengen bestimmt (1,52 bzw. 1,49 %) (s.a. Tab. 3.22). Selbst in Kultivierungen unter Ammonium-limitierten, aeroben Bedingungen wurden die maximalen PHB-Konzentrationen bereits vor einer induzierten Stickstoff-Limitation erreicht (M2AF-Medium, Daten nicht gezeigt). Gleichzeitig ließ sich mit steigendem PHB-Gehalt eine Abnahme der exponentiellen Wachstumsrate feststellen. Demnach wies M2A mit  $\mu_{exp} = 0,052 \text{ h}^{-1}$  die niedrigste Wachstumsrate und M2SF mit  $\mu_{exp} = 0,156 \text{ h}^{-1}$  die höchste Wachstumsrate unter den verwendeten Medien auf (s.a. Tab. 3.22). Trotzdem wurden auf M2AF-Medium mit 10,62 % maximale Wachstumsraten von  $\mu_{exp} = 0,122 \text{ h}^{-1}$  erreicht.

Auffällig bei der Analyse dieser Metabolite des PHB-Stoffwechselweges waren höhere Poolgrößen der Intermediate bei Medien, welche Acetat enthielten (M2A bzw. M2AF) im Vergleich zu M2SF, M2F oder auch M2S. Acetoacetyl-CoA beispielsweise war 8,8-fach hö-

**Tab. 3.22:** Wachstumsraten, intrazelluläre Intermediate des PHB-Biosyntheseweges, Energy Charge, NAD(P)H- und Coenzym Q<sub>10</sub>-Redoxstatus sowie der PHB-Gehalt in Abhängigkeit vom Substrat unter aeroben Bedingungen im Dunkeln. Angaben der intrazellulären Metabolite in  $\mu\text{mol/gBTM} \cdot p\text{O}_2 = 5\%$ . Für M2A, M2F und M2AF: 5 % CO<sub>2</sub>. n.b.: nicht bestimmt. DASGIP-Kultivierungsparameter.

	M2A	M2S	M2F	M2SF	M2AF
Wachstumsrate <sup>a</sup> $\mu_{exp}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,052 ± 0,017	0,123 ± 0,001	0,109 ± 0,001	0,156 ± 0,007	0,122 ± 0,002
Acetyl-CoA <sup>a</sup>	1,06 ± 0,03	0,96 ± 0,04	0,64 ± 0,04	0,43 ± 0,02	1,05 ± 0,07
Acetoacetyl-CoA <sup>a</sup>	0,808 ± 0,015	n.b.	0,078 ± 0,002	0,092 ± 0,002	0,175 ± 0,006
$\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA	0,625 ± 0,075	n.b.	0,084 ± 0,009	0,082 ± 0,005	0,499 ± 0,042
Crotonyl-CoA <sup>a</sup>	0,312 ± 0,024	n.b.	0,038 ± 0,000	0,035 ± 0,000	0,175 ± 0,006
Energy Charge <sup>a</sup>	0,942 ± 0,025	0,636 ± 0,013	0,718 ± 0,012	0,482 ± 0,025	0,822 ± 0,008
$\frac{NADH}{NADH+NAD^+}$ <sup>b</sup>	0,052 ± 0,007	0,171 ± 0,017	0,216 ± 0,018	0,243 ± 0,029	0,136 ± 0,011
$\frac{NADPH}{NADPH+NADP^+}$ <sup>b</sup>	0,045 ± 0,013	0,188 ± 0,035	0,148 ± 0,035	0,225 ± 0,019	0,341 ± 0,057
$\frac{Q_{10}H_2}{Q_{10}H_2+Q_{10}}$ <sup>b</sup>	0,360 ± 0,012	0,517 <sup>4</sup>	n.b.	0,505 <sup>4</sup>	0,447 ± 0,020
PHB <sup>a</sup> (%)	34,25 ± 3,29	6,78 ± 0,80	1,52 ± 0,41	1,49 ± 0,54	10,62 ± 0,46

<sup>4</sup> Grammel and Ghosh [2008]

<sup>a</sup> 3 technische Replikate

<sup>b</sup> 6 technische Replikate



her in M2A ( $0,808 \mu\text{mol}/g_{BTM}$  gegen  $0,092 \mu\text{mol}/g_{BTM}$ ) und 4,6-fach höher konzentriert in M2AF-Medium im Vergleich zu M2SF. Weitere Beispiele sind Tab. 3.22 zu entnehmen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Acetat als Substrat eine höhere Precursor-Konzentration für die intrazelluläre Bildung von PHB bereitstellt. Aus diesem Grund fanden sich auf Acetat-haltigen Medien auch höhere Mengen von akkumuliertem PHB (s.a. Tab. 3.22). Überraschend ist diese Beobachtung in dem Zusammenhang, dass mit 34,3 % bereitsunter nicht-limitierten Bedingungen für *R. rubrum* sehr hohe PHB-Mengen vorliegen, die nicht durch eine Limitation von zum Beispiel Ammonium oder Phosphat hervorgerufen worden ist. Das entspricht einer Substrat-abhängigen Bildung von PHB in *R. rubrum* unter chemotroph, aeroben Bedingungen im Dunkeln.

Das von Fuller [1995] aufgestellte Schema zur Regulation von PHB in *R. rubrum* kann mit den Beobachtungen nicht vollständig in Einklang gebracht werden, da dort Acetyl-CoA unter nicht-limitierten Bedingungen (ausreichend NADH- und Energie) zur Kohlenstoff- und Energiegewinnung innerhalb des TCA-Zyklus' verwendet wird. In diesem Fall wird kein PHB gebildet, sondern Biomasse. Trotzdem weist *R. rubrum* mit Acetat als Substrat einen Energy Charge von  $EC = 0,92$  bei gleichzeitiger PHB-Akkumulation von 34,3 % und einem sehr geringen Wachstum ( $\mu_{exp} = 0,052 \text{ h}^{-1}$ ) auf (Tab. 3.22).

In Tab. 3.22 ist der Energy Charge und die Verhältnisse der reduzierten Dinukleotide  $\frac{NADH}{NADH + NAD^+}$  und  $\frac{NADPH}{NADPH + NADP^+}$  sowie Coenzym  $Q_{10}$   $\frac{Q_{10}H_2}{(Q_{10}H_2 + Q_{10})}$  für die einzelnen Kohlenstoffsubstrate dargestellt. Auffällig war der stark oxidierte NADH-Pool beim Wachstum auf Acetat ( $\frac{NADH}{NADH + NAD^+} = 0,052$ ). Wohingegen reduziertere Pools auf Succinat oder Fructose zu beobachten waren ( $\frac{NADH}{NADH + NAD^+} = 0,171$  bzw.  $\frac{NADH}{NADH + NAD^+} = 0,216$ ). Der reduzierteste Pool war mit  $\approx 24,3$  % auf den Substraten Succinat/Fructose zu finden (vgl.a. Tab. 3.22). Ähnliche Verhältnisse fanden sich auch für das  $\frac{NADPH}{NADPH + NADP^+}$ -Verhältnis. Wobei hier der reduzierteste Pool bei Acetat/Fructose auftrat ( $\frac{NADPH}{NADPH + NADP^+} = 0,341$ ). Ebenfalls am oxidiertesten war hier der  $\frac{NADPH}{NADPH + NADP^+}$ -Pool mit  $\frac{NADPH}{NADPH + NADP^+} = 0,045$  beim Wachstum auf Acetat.

Die Verhältnisse von reduzierten Redoxpoolgrößen setzen sich auch für Coenzym  $Q_{10}$  fort. Auch hier war der  $Q_{10}$ -Pool beim Wachstum auf Acetat mit  $\frac{Q_{10}H_2}{Q_{10}H_2 + Q_{10}} = 0,360$  am oxidiertesten. Reduziertere Pools traten dahingegen beim Wachstum auf Succinat und Succinat/Fructose-Medium auf ( $\frac{Q_{10}H_2}{Q_{10}H_2 + Q_{10}} = 0,517$  bzw.  $\frac{Q_{10}H_2}{Q_{10}H_2 + Q_{10}} = 0,505$ ).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl Wachstumsraten als auch die verschiedenen Redoxpoolgrößen mit dem PHB-Gehalt korrelierten. Das äußerte sich in einer Substrat-abhängigen Bildung von PHB unter aeroben Bedingungen im Dunkeln. Der höchste PHB-Gehalt wurde auf Acetat als C-Quelle festgestellt (34,3 %). Ein sehr stark oxidiertes NADH-Pool ( $\frac{NADH}{NADH + NAD^+} = 0,052$ ) lässt weiterhin eine Limitation von NADH für die Biosynthese von PHB vermuten.

### 3.7.1.3 Mikroaerobe und anaerobe Produktionsbedingungen

Die Organisation des Zentralstoffwechsels unter mikroaeroben Bedingungen im Dunkeln in *R. rubrum* wurde bisher hauptsächlich durch die Bestimmung verschiedener Enzymaktivitäten untersucht [Grammel et al., 2003]. Einige Enzyme des oxidativen TCA-Zyklus waren dabei unter mikroaeroben Bedingungen in ihrer Aktivität herabgesetzt (z.B.  $\alpha$ -KG-Dehydrogenase, Isocitrat-Dehydrogenase und Succinat-Dehydrogenase). Wohingegen andere Enzyme in ihrer Aktivität hochreguliert waren, wie zum Beispiel die Pyruvat-Dehydrogenase oder Fumarat-Reduktase [Grammel et al., 2003]. Komplette anaerobe Bedingungen im Dunkeln mit Fructose als C-Quelle wurden nicht untersucht.

In Abb. 3.28 sind die Konzentrationen ausgewählter Intermediate des EMP-Weges, des TCA-Zyklus und des PPP-Weges im zentralen Kohlenstoffwechsel von *R. rubrum* unter (A): mikroaeroben (M2SF) und (B): anaeroben (M2F) Bedingungen dargestellt. Zum Vergleich sind auch die Poolgrößen unter den jeweilig aeroben Bedingungen, vor dem Umschalten, abgebildet.

### Extrazelluläre Raten

Beim Umschalten von aerobe auf mikroaerobe bzw. anaerobe Bedingungen veränderten sich die extrazellulären Raten wie Substrataufnahmeraten, Wachstumsraten oder *CTR*-Werte. Tab. 3.23 gibt einen Überblick über die extrazellulären Raten für den 2-Stufen-Prozess aerob/mikroaerob mit M2SF als Medium und aerob/anaerob mit M2F als Medium. Sie werden in die Interpretation und Beurteilung der Metabolitenmuster in Abb. 3.28 einbezogen.

Beim Umschalten von aerob auf  $O_2$ -limitierte Bedingungen reduzierten sich sowohl unter mikroaeroben, als auch unter anaeroben Bedingungen die Wachstumsraten (vgl.a. Abschn. 3.3.3). Die Wachstumsrate unter mikroaeroben Bedingungen verringerte sich um  $\approx 22,4 \%$  und unter anaeroben Bedingungen um  $\approx 73,4 \%$  jeweils im Vergleich zur aerob erreichten Wachstumsrate. Die Aufnahme von Succinat halbierte sich unter mikroaeroben Bedingungen auf  $0,872 \frac{mmol_{Succ}}{g_{BTM} \cdot h}$ , wohingegen die Fructoseaufnahme um  $\approx 49,8 \%$  stieg. Beim Umschalten auf anaerobe Bedingungen fand sich eine leicht verringerte Fructoseaufnahme ( $1,036 \frac{mmol_{Fruc}}{g_{BTM} \cdot h}$ ) im Vergleich zu aeroben Bedingungen ( $1,352 \frac{mmol_{Fruc}}{g_{BTM} \cdot h}$ ). Unter anaeroben Bedingungen fand ebenfalls die Ausscheidung der organischen Säuren Succinat, Acetat und Propionat, in sehr geringen Mengen auch Fumarat, Malat und Formiat ( $< 1$  mM maximal) statt. Die Ausscheiderate von Acetat war mit  $0,553 \frac{mmol_{Ace}}{g_{BTM} \cdot h}$  die höchste. Die Ausscheiderate von Propionat war mit  $0,226 \frac{mmol_{Prop}}{g_{BTM} \cdot h}$  die geringste.

Die Gesamtkohlenstoff-Aufnahmerate verändert sich abhängig von der Wachstumsrate,

**Tab. 3.23:** Extrazelluläre Raten der 2-Stufen-Prozesse aerob/mikroaerob auf M2SF-Medium und aerob/anaerob auf M2F-Medium. Die Werte sind Mittelwerte aus je 3 unabhängigen Kultivierungen mit Standardabweichungen. Die Werte wurden mind. für einen Zeitraum von 8 h berechnet. DASGIP-Kultivierungsparameter.

	Succinat/Fructose		Fructose	
	Aerob	Mikroaerob	Aerob	Anaerob
Wachstumsrate $\mu_{exp}$ ( $h^{-1}$ )	$0,156 \pm 0,007$	$0,121 \pm 0,028$	$0,109 \pm 0,001$	$0,029 \pm 0,001$
$q_{Succinat}$ ( $\frac{mmol_{Succ}}{g_{BTM} \cdot h}$ )	$2,004 \pm 0,152$	$0,872 \pm 0,027$	–	–
$q_{Fructose}$ ( $\frac{mmol_{Fruc}}{g_{BTM} \cdot h}$ )	$0,729 \pm 0,097$	$1,092 \pm 0,094$	$1,352 \pm 0,124$	$1,036 \pm 0,105$
$q_{Succ-ex}$ ( $\frac{mmol_{Succ}}{g_{BTM} \cdot h}$ )	–	–	–	$0,416 \pm 0,063$
$q_{Ace-ex}$ ( $\frac{mmol_{Ace}}{g_{BTM} \cdot h}$ )	–	–	–	$0,553 \pm 0,117$
$q_{Prop-ex}$ ( $\frac{mmol_{Prop}}{g_{BTM} \cdot h}$ )	–	–	–	$0,226 \pm 0,034$
$q_C$ ( $\frac{mmol_C}{g_{BTM} \cdot h}$ )	$12,39 \pm 0,76$	$10,12 \pm 0,46$	$8,11 \pm 0,75$	$6,22 \pm 0,63$

wobei höhere Aufnahme­raten zu höheren Wachstumsraten führen. Die höchste molare Gesamtkohlenstoff-Aufnahmerate fand sich daher unter aeroben Bedingungen mit M2SF als Medium ( $12,39 \frac{mmol_C}{g_{BTM} \cdot h}$ ).

### Metabolite des EMP-Weges und Pentosephosphatweges

Die Veränderungen der extrazellulären Raten fanden sich auch als veränderte Poolgrößen in den intrazellulären Metabolitenkonzentrationen wieder. Metabolite des EMP-Weges (F1P, DHAP, 2,3-PG und PEP) stiegen unter anaeroben Bedingungen im Vergleich zu aeroben Bedingungen, wohingegen sie unter mikroaeroben Bedingungen sanken (s.a. Abb. 3.28). DHAP zum Beispiel stieg beim Umschalten von aerob auf anaerob um das 7-fache, beim Umschalten von aerob auf mikroaerob sank DHAP dagegen um das 3,7-fache. Die intrazelluläre Konzentration von F6P, G6P und S7P nahmen dagegen unter anaeroben Bedingungen ab, jedoch unter mikroaeroben zu.

Das spiegelt das allgemeine Schema des Zentralstoffwechsels aus Abb. 3.26 wider, wonach in *R. rubrum* nach Fructoseaufnahme F1P zu FBP phosphoryliert und anschließend über GAP/DHAP, 2,3-PG und PEP zu Pyruvat abbaut wird. F6P und G6P gehören in *R. rubrum* nicht, wie in anderen Bakterien (z.B. *E. coli* oder *C. glutamicum*), zu den Reaktionen des EMP-Weges, sondern zum oxidativen Zweig des PPP-Weges. Die Metabolitenverhältnisse von F6P und G6P passen daher zu S7P und nicht zu den Metabolitenverhältnisse des EMP-Weges. Es muss dabei aber kritisch bemerkt werden, dass diese Verhältnisse bei der Untersuchung des Zentralstoffwechsels bei unterschiedli-



chen Substraten nicht zu beobachten war. Vermutlich kam hier dem Einfluss des Substrates an den verschiedenen Eingangspunkten in den Stoffwechsel eine größere Bedeutung zu.

Auffällig war die stark erhöhte Konzentration an intrazellulärem Alanin unter anaeroben Bedingungen mit Fructose ( $2,59 \mu\text{mol}/g_{BTM}$ ) im Vergleich zu aeroben Bedingungen ( $0,12 \mu\text{mol}/g_{BTM}$ ). Alanin ist über eine Transaminierungsreaktion im Gleichgewicht mit Pyruvat verknüpft und kann daher auch als Indikator für den Pyruvat-Pool herangezogen werden. Die Messung und Interpretation von intrazellulärem Pyruvat gestaltete sich aufgrund unerwartet hoher Poolgrößen und Abwesenheit von Pyruvat in den Quenching-Überständen schwierig. Die intrazelluläre Konzentration kann darüber hinaus durch den spontanen Zerfall von Oxaloacetat bei der Lagerung der Proben bzw. dem Transport verfälscht gewesen sein. Aus diesem Grund wurde der Alanin-Pool abgebildet. Der starke Anstieg von Alanin/Pyruvat unter anaeroben Bedingungen könnte in einem reduzierten Fluss des TCA-Zyklus aufgrund des  $\text{O}_2$ -Mangels gelegen haben. In Abwesenheit von Sauerstoff läuft in einer Reihe von Mikroorganismen der TCA-Zyklus nicht mehr in die oxidative Richtung („im Uhrzeigersinn“), sondern reduktiv („gegen den Uhrzeigersinn“) [Inui et al., 2007; Gray et al., 1966]. Pyruvat wird vorwiegend zur Regeneration von Reduktionsäquivalenten innerhalb des PFL/FHL-Systems zu Acetat,  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2$  umgesetzt. Im Gegensatz zu anaeroben Sauerstoffbedingungen zeigte sich keine Veränderung des Alaninpools unter mikroaeroben Bedingungen. Hier kann vermutet werden, dass ausreichend Sauerstoff vorhanden war, um eine oxidative Richtung des TCA-Zyklus zu ermöglichen. Diese Vermutung wurde durch eine für mikroaerobe Bedingungen noch recht hohe Wachstumsrate ( $\mu_{exp} = 0,121 \text{ h}^{-1}$ ) im Vergleich zu anaeroben Bedingungen ( $\mu_{exp} = 0,029 \text{ h}^{-1}$ ) bestätigt, welche hohe Mengen an ATP erforderlich machen. Im Gegensatz zum Gärungsstoffwechsel können hohe Mengen an ATP (32 ATP) nur aus der Atmungskette in der Endoxidation von Reduktionsäquivalenten gebildet werden.

### Metabolite des TCA-Zyklus

Die Metabolite des TCA-Zyklus stellen eine weitere Gruppe Zentralstoffwechselintermediate dar, die sich beim Umschalten von aerob auf mikroaerob im Vergleich zum Umschalten von aerob auf anaerob unterschiedlich verhalten. Auffällig ist, wie oben bereits diskutiert, dass weder Malat, Fumarat noch Succinat unter aeroben Bedingungen auf Fructose als alleiniger C-Quelle nachgewiesen werden konnten; Citrat, Isocitrat,  $\alpha$ -KG, Succinyl-CoA dagegen sehr deutlich (vgl.a. Abb. 3.28/B). Beim Wachstum auf Succinat/Fructose hingegen konnten die Pools aller Intermediate des TCA-Zyklus bestimmt werden. Beim Umschalten auf mikroaerobe Bedingungen mit M2SF-Medium zeigten alle Pools bis auf Malat und Fumarat abnehmende Konzentrationen. Ci-

trat, zum Beispiel, verringerte sich um die Hälfte unter mikroaeroben Bedingungen (auf  $3,42 \mu\text{mol/g}_{BTM}$ ). Auch  $\alpha$ -KG verringerte sich von  $7,4 \mu\text{mol/g}_{BTM}$  auf  $5,2 \mu\text{mol/g}_{BTM}$ . (vgl.a. Abb. 3.28/A).

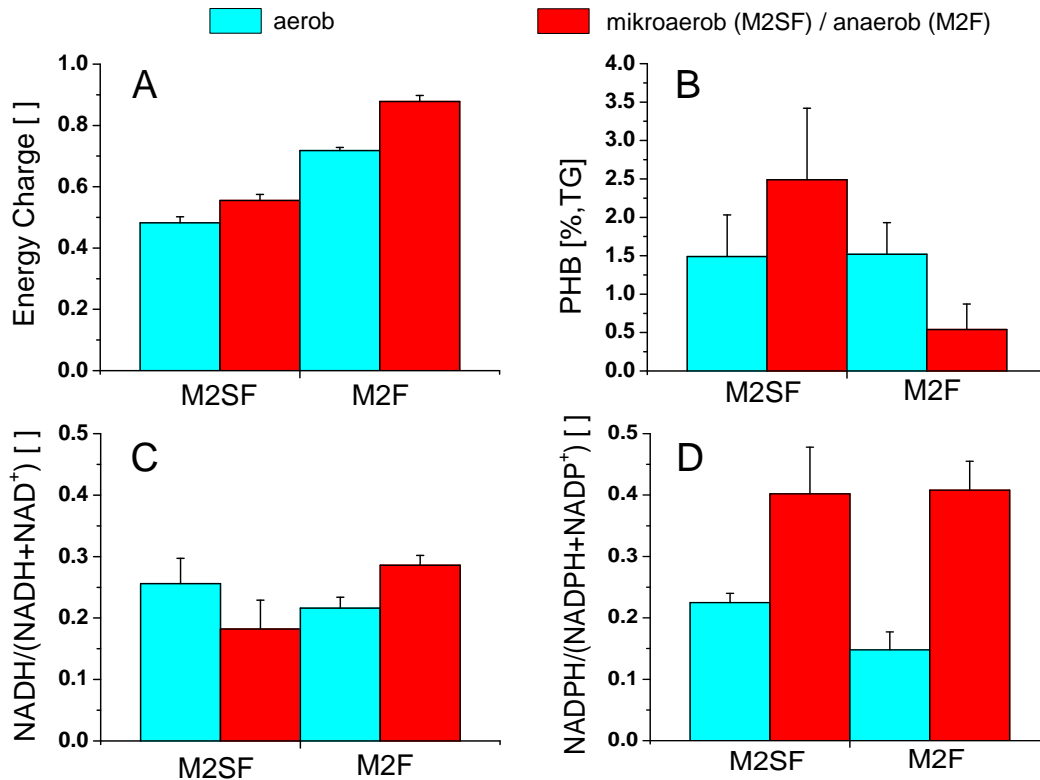
Ein völlig umgekehrtes Bild erhält man in Abb. 3.28/B. Die Pools von Citrat, Isocitrat und  $\alpha$ -KG veränderten sich beim Umschalten von aerobe auf anaerobe Bedingungen kaum oder nur sehr geringfügig. Hingegen erhöhte sich die Konzentration von Malat, Fumarat, Succinat und auch Succinyl-CoA stark. Der Grund hierfür lag sehr wahrscheinlich in der unter Abschn. 3.3.3 bereits angesprochenen Reorganisation des TCA-Zyklus, wonach der Zyklus nicht mehr oxidativ, sondern reduktiv („gegen den Uhrzeigersinn“) unter Einbeziehung der anaplerotischen Reaktionen zur  $\text{CO}_2$ -Fixierung verlief. Die Ausscheidung von Succinat ins extrazelluläre Medium implizierte, dass die nachfolgenden Reaktionen unter anaeroben Bedingungen nicht mehr abliefen, obwohl zumindest die Bildung von Succinyl-CoA aus Succinat möglich gewesen sein musste, da ansonsten keine Bildung photosynthetischer Membranen beobachtbar gewesen wäre. Obwohl der reduktive TCA-Zyklus für *R. rubrum* unter phototroph, anaeroben Bedingungen gezeigt wurde, konnten, allein aus den Metabolitendaten, keine Rückschlüsse auf ein Operieren dieses Zyklus' zur  $\text{CO}_2$ -Fixierung geschlossen werden. Deutlich wurde jedoch in den einzelnen Metabolitenpools, dass der Zentralstoffwechsel sich mikroaerob anders als anaerob umorganisierte; zum Beispiel im Vergleich zu aeroben Sauerstoffverhältnissen. Eine genaue Bestimmung der Flusslagen sollte durch  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente erfolgen und wird unter Abschn. 3.7.3 genauer beschrieben.

Auch die Bildung von Propionat über Methylmalonyl-CoA und Propionyl-CoA aus Succinyl-CoA unter anaeroben Bedingungen wurde anhand der Metabolitenmuster deutlich. Ebenso wie Succinyl-CoA wurden beim Umschalten auf mikroaerobe Bedingungen mit M2SF-Medium die Poolgrößen von Methylmalonyl-CoA (um  $\approx 65,3 \%$ ) und Propionyl-CoA (um  $\approx 68,7 \%$ ) kleiner. Im Gegensatz zu anaeroben Bedingungen, wo sich die intrazelluläre Konzentration von Succinyl-CoA (um das 2,4-fache), Methylmalonyl-CoA (um das 1,3-fache) und Propionyl-CoA (um das 4,2-fache) erhöhten. Unter mikroaeroben Bedingungen wurde keine Ausscheidung von Propionat beobachtet.

### Energy Charge, PHB-Gehalt und Dinukleotid-Redoxstatus

In Abb. 3.29 sind der Energy Charge, der PHB-Gehalt sowie die Verhältnisse der reduzierten Dinukleotide  $\frac{NADH}{NADH + NAD^+}$  und  $\frac{NADPH}{NADPH + NADP^+}$  dargestellt. Für ein besseres Verständnis der zwei Sauerstoffzustände mikroaerob und anaerob soll an dieser Stelle kurz auf diese intrazellulären Redoxpoolgrößen eingegangen werden. In *R. rubrum* war der Energy Charge mit  $EC = 0,48$  in M2SF-Medium unter aeroben Bedingungen am geringsten; mit M2F-Medium hingegen bei  $EC = 0,82$ . Nach Umschalten auf mikroaero-

be/anaerobe Bedingungen stieg der Energy Charge, mikroaerob um  $\approx 15\%$  auf  $EC = 0,56$  bzw. anaerob um  $\approx 22\%$  auf  $EC = 0,88$ , leicht an. Das legt den Schluss nahe, dass die Zellen durch die  $O_2$ -Limitation nicht unter ATP-Mangel litten. Es ist überraschend, dass ausgerechnet unter anaeroben Bedingungen, wo allein der Gärungsstoffwechsel zur ATP-Gewinnung dient, den höchsten Energy Charge aufwies.



**Abb. 3.29:** Energy Charge (A), PHB-Gehalt (B), NADH (C)- und NADPH (D)-Verhältnisse im 2-Stufen-Prozess beim Umschalten von aerob auf mikroaerob (M2SF) bzw. aerob auf anaerob (M2F). Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 technischen Replikaten. Jeweils 1 repräsentative Kultivierung. DASGIP-Kultivierungsparameter.

Auch der PHB-Gehalt wurde zumindest leicht von den Sauerstoffbedingungen beeinflusst. Während der PHB-Gehalt unter mikroaeroben Bedingungen zunahm (von 1,5 % auf 2,5 %), war unter anaeroben Bedingungen eine Abnahme zu verzeichnen (von 1,5 % auf 0,5 %). Die Bedeutung und der Einfluss der Reservestoffe beim Übergang von aeroben zu anaeroben Bedingungen haben Schön [1969] sowie Schön and Drews [1966] ausführlich dargelegt. Demnach wird der ATP-Spiegel unter anaeroben Bedingungen durch den Abbau von Reservestoffen aufrecht gehalten. Das könnte sowohl den hohen Energy Charge unter anaeroben Bedingungen als auch den Anstieg bei mikroaeroben Bedingungen erklären.

Bei der Untersuchung der Dinukleotide  $NADH/NAD^+$  und  $NADPH/NADP^+$  fällt auf, dass mit Ausnahme des aerob/mikroaeroben Umschaltprozesses die Pools unter  $O_2$ -limitierenden Bedingungen reduzierter werden als unter den jeweilig aeroben Bedingun-

gen. Dabei findet jedoch nur eine leichte Erhöhung des  $\frac{NADH}{NADH+NAD^+}$ -Verhältnisses von 0,216 auf 0,286 durch das Umschalten auf anaerobe Bedingungen statt. Stärker steigt hingegen das  $\frac{NADPH}{NADPH + NADP^+}$ -Verhältnis. Beim Umschalten von aerobe auf mikroaerobe Bedingungen (M2SF-Medium) steigt das Verhältnis um das 1,8-fache, beim Umschalten auf anaerobe Bedingungen um das 2,8-fache (vgl.a. Abb. 3.29/C,D).

### 3.7.1.4 Intrazelluläre Precursor-Konzentrationen

In Tab. 3.24 sind die intrazellulären Konzentrationen von DHAP/GAP, Alanin, Acetyl-CoA und Succinyl-CoA aus Abb. 3.28 zusammengefasst. Diese Metabolite stellen Precursor für die verschiedenen Produkte in *R. rubrum* dar (vgl.a. Abb. 3.26). Bis auf Acetyl-CoA war beim Umschalten von aerobe auf anaerobe Bedingungen eine Zunahme der Precursor DHAP/GAP, Alanin und Succinyl-CoA zu beobachten. Am stärksten war der Anstieg bei den Precursorkonzentrationen aus dem EMP-Weg; DHAP/GAP und Alanin (Pyruvat). So stieg DHAP unter anaeroben Bedingungen um das 4,5-fache auf  $1,26 \mu\text{mol/g}_{BTM}$  und Alanin um mehr als das 20-fache auf  $2,59 \mu\text{mol/g}_{BTM}$  im Vergleich zu aeroben Sauerstoffbedingungen an.

Hingegen war eine Abnahme fast aller betrachteten Vorläufermoleküle beim aerob/mikroaeroben Umschaltprozess zu verzeichnen. So sank DHAP um das 3,7-fache und Succinyl-CoA um das 2,2-fache im Vergleich zu aeroben Sauerstoffbedingungen an. Lediglich die Konzentrationen von Acetyl-CoA und Alanin (Pyruvat) änderte sich durch die O<sub>2</sub>-Limitation kaum.

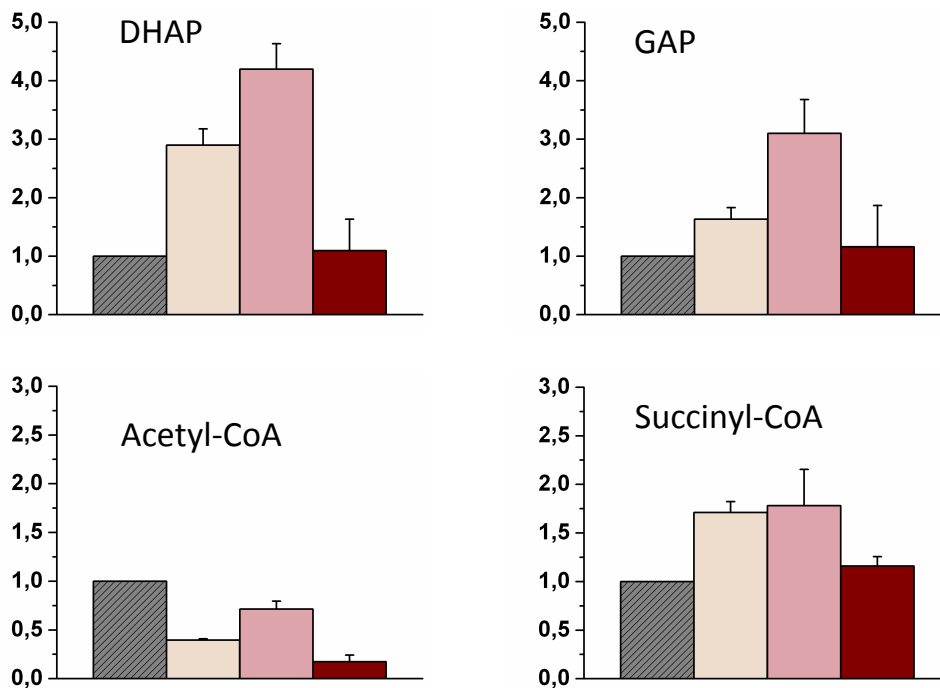
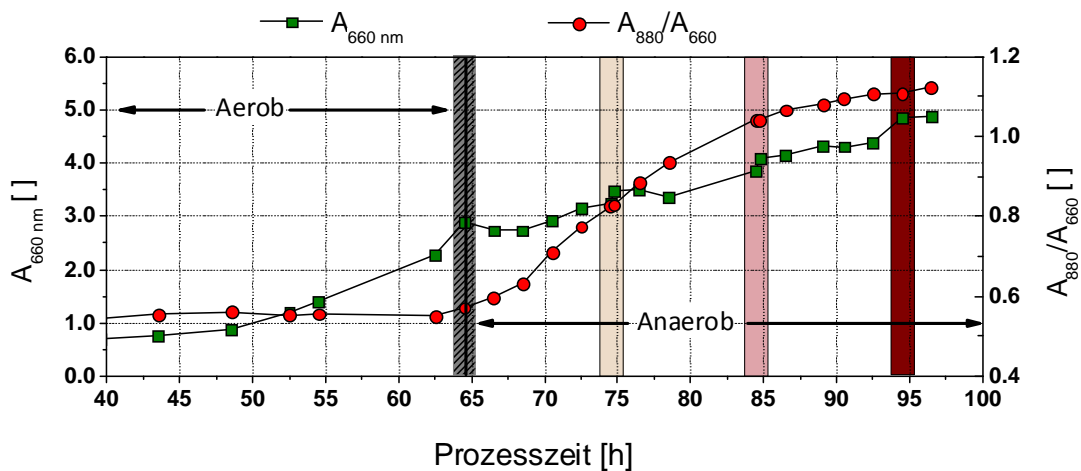
**Tab. 3.24:** Intrazelluläre Precursor-Konzentrationen bei den 2-Stufen-Prozessen aerob/mikroaerob mit Succinat/Fructose und aerob/anaerob mit Fructose als C-Quelle. Daten jeweils aus der mittleren Phase der Membranbildung. Standardabweichungen aus 3 technischen Replikaten. DASGIP-Kultivierungsparameter.

	Succinat/Fructose		Fructose	
	Aerob	Mikroaerob	Aerob	Anaerob
DHAP	$3,86 \pm 0,09$	$1,03 \pm 0,08$	$0,18 \pm 0,07$	$1,26 \pm 0,39$
GAP	$1,49 \pm 0,03$	$0,61 \pm 0,00$	$0,33 \pm 0,02$	$0,39 \pm 0,06$
Alanin	$0,10 \pm 0,06$	$0,14 \pm 0,04$	$0,12 \pm 0,02$	$2,59 \pm 0,17$
Acetyl-CoA	$0,43 \pm 0,02$	$0,38 \pm 0,02$	$0,64 \pm 0,04$	$0,54 \pm 0,02$
Succinyl-CoA	$0,38 \pm 0,02$	$0,17 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,01$

Die in Tab. 3.24 dargestellten Precursor-Konzentrationen bilden die intrazellulären Poolgrößen während des Wachstums und der Produktbildung ab. Für eine präzise Aussage



über die Verfügbarkeit von Vorläufermolekülen im Verlauf der Produktbildung wurde die Konzentration der Precursor zu verschiedenen Zeitpunkten der Produktbildung bestimmt. Da die Produktbildung unter anaeroben Bedingungen mit Fructose als alleinige C-Quelle im Laufe der Prozessentwicklung und -optimierung diverse Vorteile gegenüber mikroaeroben Produktionsbedingungen aufzeigte, sollte der Verlauf der Precursor-Konzentrationen nur für anaerobe Produktionsbedingungen aufgezeigt werden. E4P konnte als einziger Precursor nicht detektiert werden. Auch bei anderen Experimente gelang der Nachweis dieses Metaboliten nicht. Luo et al. [2007] berichten, passend zu diesem Ergebnis, geringere MS-Intensitäten von E4P gegenüber den übrigen Zuckerphosphaten.



**Abb. 3.30:** Relative intrazelluläre Metabolitenkonzentrationen in *R. rubrum* unter aeroben Wachstumsbedingungen und anaeroben Produktionsbedingungen im Dunkeln (Abb. unten). Die relativen Konzentrationen beziehen sich auf die unter aeroben Bedingungen gemessene Metabolitenkonzentration (graue Balken). Farbliche Balken kennzeichnen den Zeitpunkt der Probenahme aus einer typischen aerob/anaeroben Kultivierung (Abb. oben). Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus 3 technischen Replikaten.

In Abb. 3.30 ist der Verlauf der optischen Dichte  $A_{660}$ , das Verhältnis  $\frac{A_{880}}{A_{660}}$  sowie der relative Verlauf der Precursor Succinyl-CoA, DHAP, GAP und Acetyl-CoA zu sehen. Die Precursor-Konzentrationen sind alle auf den aeroben Ausgangswert bezogen. So nahm Succinyl-CoA im Verlauf der Membranbildung um das  $\approx 1,8$ -fache zu, fiel aber zum Ende der Produktbildungsphase wieder leicht und erreichte fast wieder Ausgangsniveau. Ein ähnlicher Verlauf konnte auch für die Precursor GAP und DHAP beobachtet werden. Hier war der Anstieg allerdings stärker (3 bis 4-fache). Auch PEP zeigte einen ähnlichen charakteristischen Verlauf. Eine Ausnahme bildete Acetyl-CoA, dass mit Ausnahme des Zeitpunktes nach 85 h, während der Produktbildungsphase kontinuierlich um  $> 80\%$  abnahm.

Insbesondere die Werte in der mittleren Phase der Produktbildung (Zeitpunkt 75 h und 85 h) lassen darauf schließen, dass ausreichend Precursor für die Bildung der einzelnen Produkte vorhanden war. Einzig Acetyl-CoA zeigte stark abnehmende Tendenzen vom Beginn der Produktbildung bis zur Phase nachlassender Produktbildung. Da nach 95 h maximale photosynthetische Membranlevel erreicht werden ( $\frac{A_{880}}{A_{660}} = 1,124$ ), kann Acetyl-CoA jedoch nicht limitierend für die Produktbildung sein. Allerdings könnte die sehr geringe intrazelluläre Konzentration für die nur mäßig ausgeprägte PHB-Bildung unter anaeroben Bedingungen mit Fructose als alleinige C-Quelle verantwortlich gewesen sein. Sowohl im Batch- als auch im Fedbatch-Prozess waren die Mengen gebildeten PHB vergleichsweise gering (vgl.a. Abschn. 3.2.1, 3.2.3, 3.4).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass charakteristische Metabolitenprofile für *R. rubrum* gefunden worden sind. Diese sind unter aeroben Bedingungen abhängig vom eingesetzten Substrat und führen daher zu unterschiedlichen intrazellulären Konzentrationen. Das spiegelt sich zum Beispiel bei den Intermediaten des PHB-Biosyntheseweges wider. Ebenfalls einen großen Einfluss hat die Sauerstoffzufuhr. Betrachtet wurden mikroaerobe und anaerobe Bedingungen, wo sich charakteristische Änderungen beim Umschalten von aerobe auf die jeweils  $O_2$ -limitierte Bedingung zeigte. Weiterhin interessant war der Verlauf intrazellulärer Precursor während der Produktion photosynthetischer Membranen unter anaeroben Bedingungen Dunkeln. Hier zeigte sich sowohl eine Zunahme von Precursoren (DHAP, GAP) als auch eine Abnahme von Precursoren (Acetyl-CoA). Succinyl-CoA dagegen stieg zu Beginn der Produktbildung leicht an und ging danach wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Die Untersuchungen der intrazellulären Metabolite in *R. rubrum* leistet somit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des Stoffwechsels und zur Anwendbarkeit moderner Methoden der Metabolomanalyse hinsichtlich der bislang noch relativ unerforschten schwefelfreien Purpurbakterien.

### 3.7.2 Stöchiometrische Modellierung des Zentralstoffwechsels

Die stöchiometrische Modellierung des Zentralstoffwechsels in *R. rubrum* wurde durchgeführt, um theoretische Ausbeutekoeffizienten der einzelnen Produkte mit Fructose als alleinige C-Quelle zu ermitteln. So sollte ein Vergleich mit real gemessenen Ausbeuten unter den gleichen Bedingungen ermöglicht werden. Dazu wurde das, ursprünglich von Hädicke et al. [2011]; Klamt et al. [2007] veröffentlichte, stöchiometrische Netzwerk entsprechend angepasst, da eine Reihe von Stoffwechselreaktionen nur unter phototrophen Bedingungen stattfinden bzw. unter Verwendung von Fructose nicht aktiv sind (s.a. Anhang B). Außerdem wurde der Einfluss möglicher Deletionen auf die Produktausbeute vorhergesagt. Darüber hinaus konnten maximal mögliche Produktausbeuten des gesamten Stoffwechselnetzwerkes ermittelt werden. Für die stöchiometrische Modellierung wurde sowohl das Optimierungspaket GLPKMEX als auch die Methode mit Hilfe der Bestimmung der Elementarmoden verwendet (s.a. Abschn. 2.8). Die Produkte Lycopin und Coenzym Q<sub>10</sub> wurden nicht untersucht.

Für die stöchiometrische Modellierung des metabolischen Netzwerkes mit Hilfe des *CellNetAnalyzer* wurde zunächst die Biomassezusammensetzung für aerob, im Dunkeln gewachsene Zellen und, ausgehend davon, für anaerob, im Dunkeln gewachsene Zellen mit Fructose als C-Quelle festgelegt. In Tab. 3.25 sind die berücksichtigten Komponenten sowie deren Anteile für die jeweiligen Bedingungen zu sehen. Der Anteil von Bchl, Glycogen und PHB wurde nach den Ergebnissen dieser Arbeit festgelegt (s.a. Tab. 3.25). Schröder and Drews [1968] berichten einen 70 %igen Anstieg der Lipidbildung durch die Bildung von photosynthetischen Membranen im Vergleich zu aeroben Zellen, bei denen die Ausbildung photosynthetischer Membranen inhibiert war. Um diese Veränderungen der Biomassezusammensetzung für die anaeroben Sauerstoffbedingungen zu realisieren, mussten die Anteile von Protein, DNA, RNA, Peptidoglycan, LPS und Polyphosphate entsprechend geringfügig angepasst (s.a. Tab. 3.25).

#### Succinatproduktion

Für die stöchiometrische Modellierung der Succinatproduktion unter anaeroben Gärungsbedingungen wurden die in Tab. 3.23 ermittelten extrazellulären Raten verwendet. Als Zielfunktion für das Optimierungspaket GLPKMEX wurde die Succinatausscheidung („Succ\_ex“) ausgewählt. Unter verschiedenen Ausscheide- und Wachstumsbedingungen wurde mit Hilfe des *CellNetAnalyzer* die Succinatausbeute berechnet.

In Tab. 3.26 sind die Succinatausbeuten unter verschiedenen Bedingungen hinsichtlich der Ausscheidung der organischen Säuren Acetat und Propionat sowie des Wachstums dargestellt. Eine beträchtliche Steigerung der Succinatausbeute würde sich durch das

**Tab. 3.25:** Biomassezusammensetzung (in %) für die theoretische Modellierung in *R. rubrum* unter aeroben und anaeroben Bedingungen mit Fructose als C-Quelle. DNA und RNA aus [Lengeler et al., 2009]. Lipide nach [Bishop and Bermingham, 1973; Schröder and Drews, 1968]. Bacteriochlorophyll, Glycogen und PHB: diese Arbeit.

Komponente	aerob	anaerob
Proteine	51,7	49,0
Glycogen	7,0	2,0
Bacteriochlorophyll	0,0	1,0
PHB	2,0	1,0
Lipide	6,2	15,7
Peptidoglycan	5,2	4,9
LPS	4,1	3,9
DNA	3,1	2,9
RNA	16,5	15,7
Polyphosphate	4,1	3,9

Ausschalten der Acetat- und Propionatproduktion erzielen lassen. Die Succinatausbeute könnte sich auf diese Weise um ca. 36 % (von 0,76 auf  $1,32 \frac{\text{mol}_{\text{Succinat}}}{\text{mol}_{\text{Fructose}}}$ ) steigern lassen. In gleicher Weise hatte auch das Wachstum einen Einfluss auf die Succinatausbeute. Mit  $\mu_{exp} = 0,029 \text{ h}^{-1}$  war das Wachstum unter anaeroben Bedingungen zwar vergleichsweise gering, hatte jedoch einen entscheidenden Einfluss auf die Succinatausbeute. So ließ sich eine weitere Steigerung der theoretischen Succinatausbeute von  $1,32 \frac{\text{mol}_{\text{Succinat}}}{\text{mol}_{\text{Fructose}}}$  auf  $1,71 \frac{\text{mol}_{\text{Succinat}}}{\text{mol}_{\text{Fructose}}}$  erzielen. Dieser Wert war auch der theoretisch maximale Wert für *R. rubrum* im stöchiometrischen Netzwerk unter anaeroben Bedingungen mit Fructose als alleinige C-Quelle im Dunkeln (s.a. Anhang B).

Der maximale theoretische Wert entspricht nicht  $Y_{(P/S)} = 2,0$ , da für die Bildung von 2 mol Succinat aus 1 mol Fructose 2 [H] zu wenig Reduktionsäquivalente über den reduktiven Ast des TCA-Zyklus gebildet werden. Diese Lücke wird zum Teil durch den oxidativen Ast des TCA-Zyklus geschlossen, welcher die NADH-bildenden Reaktionen Isocitrat-Dehydrogenase und  $\alpha$ -KG-Dehydrogenase beinhaltet. Jedoch wird bei diesen Reaktionen  $\text{CO}_2$  gebildet, welches nun nicht mehr für die Succinatbildung zur Verfügung steht und somit die Ausbeute verringert.

Eine Auswertung der Elementarmoden zeigte, dass die maximale Succinatausbeute sowohl mit den metabolischen Wegen des CBB-Zyklus' als auch mit der Reaktion der Anaplerotik (vgl.a. Abschn. 1.1.5) möglich gewesen wäre; oder mit beiden zusammen. Der Einfluss der RuBisCO im Dunkeln und in Anwesenheit einer Kohlenstoffquelle wird

**Tab. 3.26:** Theoretische Modellierung der Succinatausbeute in *R. rubrum* mit dem *CellNetAnalyzer*. +: vorhanden, -: nicht vorhanden. Extrazelluläre Raten wie in Tab. 3.23 angegeben verwendet.

Acetat- ausscheidung	Propionat- ausscheidung	Wachstum $\mu$	Ausbeute $Y_{(P/S)}$ $\left(\frac{\text{mol}_{\text{Succinat}}}{\text{mol}_{\text{Fructose}}}\right)$
+	+	+	0,76
-	+	+	1,10
+	-	+	0,97
+	+	-	1,19
-	-	+	1,32
-	-	-	1,71

allerdings im Vergleich zu photoautotrophen Bedingungen als gering eingeschätzt [Anderson and Fuller, 1967c].

Real erzielte Ausbeuten bei 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung im DASGIP-System zeigten Werte von  $Y_{(P/S)} = 0,42 \frac{\text{mol}_{\text{Succinat}}}{\text{mol}_{\text{Fructose}}}$ . Diese Ausbeute ist deutlich geringer als die mit Hilfe des stöchiometrischen Modells bestimmte theoretische Ausbeute (alle gemessenen Aufnahme- und Ausscheideraten als Nebenbedingungen gesetzt). Eine erhöhte Bildung von Speicherstoffen wie PHB und Glycogen konnte durch entsprechende Messungen ausgeschlossen werden. Im Gegenteil, unter anaeroben Bedingungen war sogar ein Rückgang der Speicherstoffe zu verzeichnen (vgl.a. Abschn. 3.2.1, 3.7.1.3). In die Argumentation muss miteinbezogen werden, dass die Bestimmung der einzelnen extrazellulären Raten zum Teil stark fehlerbehaftet war. Der relative Fehler lag zum Beispiel bei der Acetatausscheiderate bei 21,1 %, bei der Fructoseaufnahmerate bei 10,1 % und bei der Propionatausscheidung bei 14,9 %. Der Fehler ergab sich aus 3 biologisch unabhängigen Fermentationen. Ein Herabsetzen der Fructoseaufnahmerate auf den unteren Fehlerbereich und Heraufsetzen der Acetat- bzw. Propionatausscheidung auf den oberen Fehlerbereich beispielsweise würde in einer theoretischen Ausbeute von  $Y_{(P/S)} = 0,42 \frac{\text{mol}_{\text{Succinat}}}{\text{mol}_{\text{Fructose}}}$  resultieren, welche dem experimentell bestimmten Wert entsprechen würde.

Die Ergebnisse der theoretischen Modellierung zeigen dennoch, dass für eine Optimierung der Succinatausbeute mit *R. rubrum* eine gezielte Stammoptimierung durch Eliminierung der Acetat- und Propionatausscheidung vorgenommen und wenn möglich das zelluläre Wachstum unter anaeroben Bedingungen weiter eingeschränkt werden muss. Dies könnte prozesstechnisch durch gezielte Limitation einer Mediumskomponente (z.B. Ammonium oder Phosphat) am Umschalt-Zeitpunkt vorgenommen werden.

## Bacteriochlorophyll-Produktion

Zur Bestimmung der theoretischen Bacteriochlorophyll-Ausbeuten mit dem *CellNetAnalyzer* wurde eine theoretische Ausscheidereaktion für Bacteriochlorophyll mit *bchla\_ex* als externer Metabolit definiert. Diese Reaktion („Bacteriochlorophyll-Ausscheidung“: 1 *bchla* = 1 *bchla\_ex*) wurde dann als Zielfunktion der Optimierung gesetzt. Da Bacteriochlorophyll als Bestandteil der Biomasse von *R. rubrum* die Optimierung jederzeit an das Wachstum koppeln würde, wurde Bacteriochlorophyll aus der Biomassezusammensetzung herausgenommen und der Proteinanteil von 49 % auf 50 % erhöht. Auf welchen Teil der Biomasse die 1 % Bacteriochlorophyll dazu gezählt wurden, führte zu keiner signifikanten Beeinträchtigung des Ergebnisses (Daten nicht gezeigt). Als Ausgangswerte wurden wieder die in Tab. 3.23 angegebenen Raten verwendet.

Die Optimierung lieferte mit den experimentell ermittelten extrazellulären Raten eine Bacteriochlorophyll-Ausbeute von  $Y_{(P/S)} = 0,0019 \frac{\text{mol}_{Bchl}}{\text{mol}_{Fructose}}$ . Auch die Verhinderung der Ausscheidung von Acetat, Propionat und/oder Succinat änderte an diesem Wert nichts.

Bezogen auf die molare Kohlenstoffausbeute fiel auf, dass die Ausbeute für Bacteriochlorophyll ( $0,017 \text{ mol}_{C,Bchl}/\text{mol}_{C,Fructose}$ ) um einiges niedriger als die Succinatausbeute ( $1,14 \text{ mol}_{C,Bchl}/\text{mol}_{C,Fructose}$ ) war. Der Grund hierfür liegt in der Biosynthesereaktion von einem Molekül Bacteriochlorophyll, wofür insgesamt 6 verschiedene Precursor in zum Teil mehrfacher Menge vorliegen müssen (s.a. Gl. 3.2). Zum Beispiel müssen bereits 2 Moleküle Fructose aufgebracht werden, um 4 Moleküle Pyruvat bilden zu können, was die Ausbeute bereits um die Hälfte reduziert. Der im Experiment bestimmte Wert lag bei  $Y_{(P/S)} = 0,0003 \frac{\text{mol}_{Bchl}}{\text{mol}_{Fructose}}$  und war somit ungefähr 6,3-fach geringer als der theoretisch bestimmte Wert. Als Gründe können die gleichen wie bei der Bewertung der realen Succinatausbeute angeführt werden.



Weiterhin bemerkenswert war nun, dass, trotz der Herausnahme von Bacteriochlorophyll aus der Biomasse, Bacteriochlorophyll nicht ohne Wachstum („mue“) gebildet werden konnte. Wurde die Rate „mue“ im *CellNetAnalyzer* auf 0 gesetzt, so ließ sich das Optimierungsproblem zwar lösen, die Ausbeute  $Y_{(P/S)}$  war jedoch stets 0.

Zwei Herausforderungen waren charakteristisch für die Modellierung der Bacteriochlorophyll-Ausbeute. Die erste war die Bildung von 4 Molekülen  $\text{NH}_4^+$ , welche nur in Richtung Biomassebildung verstoffwechselt werden konnten. Somit war die Bacteriochlorophyll-Bildung wieder an die Bildung von Biomasse gekoppelt. Durch eine zwischen-

zeitig gesetzte, theoretische Ausscheidung von  $\text{NH}_4^+$ , ergab sich allerdings nach wie vor eine Ausbeute von 0 bei „ $\mu$ “ = 0. Das zweite Problem stellte die Biosynthesereaktion der Aminosäure Glycin dar, welche durch die Bildung von Methyltetrahydrofolat stets an Wachstum gekoppelt ist. Methyltetrahydrofolat kann nur über Reaktionen, die zur Biomassebildung führen, weiterverstoffwechselt werden. Eine theoretische, temporär eingeführte Glycinaufnahme behob das Problem der Wachstum-gekoppelten Bacteriochlorophyll-Bildung vollständig und erlaubte auch ohne Wachstum die Synthese von Bacteriochlorophyll. Da bislang keine natürliche  $\text{NH}_4^+$ - bzw. Glycinausscheidung bei *R. rubrum* beobachtet worden ist, lässt sich festhalten, dass die Bacteriochlorophyll-Bildung in *R. rubrum* direkt an das Wachstum gekoppelt ist.

Durch eine Elementarmoden-Analyse ohne Einbeziehung der extrazellulären Raten konnte eine theoretisch maximal erreichbare Ausbeute für Bacteriochlorophyll von  $Y_{(P/S)} = 0,0061 \frac{\text{mol}_{\text{Bchl}}}{\text{mol}_{\text{Fructose}}}$  ermittelt werden. Diese Ausbeute wäre allerdings nur bei gleichzeitigem Wachstum von  $\mu = 0,0943 \text{ g}_{\text{BTM}}/\text{mol}_{\text{Fructose}}$  möglich, was unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln weit außerhalb der gemessenen Werte ( $0,023 \text{ g}_{\text{BTM}}/\text{mol}_{\text{Fructose}}$ ) liegt. Somit würde sich die Bacteriochlorophyll-Ausbeute durch eine Erhöhung der Wachstumsrate steigern lassen.

Der Zusammenhang zwischen Wachstum und Bacteriochlorophyll-Bildung könnte auch im Kontext der fehlenden Ausbildung photosynthetischer Membranen in hohen Zelldichten von Bedeutung sein. Gleichzeitig mit dem Rückgang der spezifischen Bacteriochlorophyll-Mengen war bei  $A_{660} = 57,2$  im Vergleich zu  $A_{660} = 2,1$  eine nachlassende Wachstumsrate um über 80 % zu verzeichnen. Somit könnte ein Grund für das Fehlen der Ausbildung photosynthetischer Membranen in dem stark reduzierten Wachstum liegen. Aus welchem Grund das Wachstum in hohen Zelldichten stagnierte ist nicht näher ermittelt worden, da im Rahmen der Vorversuche der Nährstoffbedarf präzise festgelegt und innerhalb der Kultivierungen realisiert worden ist (vgl.a. Abschn. 3.1.1).

## PHB-Produktion

Die theoretische Ausbeute von PHB wurde analog zur Ermittlung der Bacteriochlorophyll-Ausbeute durch Definition einer PHB-Ausscheidereaktion („PHB\_Ex“) durch die theoretische Ausscheidung von Hydroxybutyrat, dem Monomer von PHB, bestimmt. Anschließend wurden die Auswirkungen verschiedener Bedingungen auf die theoretische PHB-Ausbeute untersucht. Als Ausgangswerte wurden wieder die in Tab. 3.23 angegebenen Raten verwendet. In Tab. 3.27 sind die Ergebnisse der stöchiometrischen Modellierung zur PHB-Produktion zu sehen.

Bei gleichzeitiger Produktion von organischen Säuren und Biomasse lag die theoretische PHB-Ausbeute bei lediglich  $Y_{(P/S)} = 0,181 \frac{\text{mol}_{\text{Hydroxybutyrat}}}{\text{mol}_{\text{Fructose}}}$ . Fiel die Produktion organi-

scher Säuren weg, stieg die Ausbeute auf  $Y_{(P/S)} = 0,757 \frac{\text{mol}_{\text{Hydroxybutyrat}}}{\text{mol}_{\text{Fructose}}}$  an. Die zugleich maximale theoretische Ausbeute lag bei  $Y_{(P/S)} = 1,000 \frac{\text{mol}_{\text{Hydroxybutyrat}}}{\text{mol}_{\text{Fructose}}}$  und wurde erreicht, wenn sowohl die Produktion der organischen Säuren als auch das Wachstum auf 0 gesetzt wurde. Eine höhere Ausbeute war mit Fructose als Substrat nicht möglich, da zur Bildung von Acetyl-CoA aus Pyruvat  $\text{CO}_2$  abgespalten werden mussten, welches somit verloren ging. Aus 2 Molekülen Acetyl-CoA konnte dann nur 1 Molekül Hydroxybutyrat gebildet werden. Auch über die Pyruvat-Formiat-Lyase wurde keine höhere Ausbeute erzielt, da das entstehende Formiat nicht zur Acetyl-CoA Bildung genutzt werden konnte und somit Kohlenstoff verloren ging. Für die Beurteilung der tatsächlichen PHB-Ausbeute musste zusätzlich berücksichtigt werden, dass zur Bildung des Polymers PHB mehrere Monomere Hydroxybutyrat eingesetzt werden mussten, welche äquivalent zur benötigten Menge Fructose waren (pro Molekül Hydroxybutyrat wird 1 Molekül Fructose benötigt).

**Tab. 3.27:** Theoretische Modellierung der Hydroxybutyrat-Produktion in *R. rubrum* mit dem *CellNetAnalyzer* [Klamt et al., 2007, 2003]. +: vorhanden. -: nicht vorhanden. Extrazelluläre Raten wie in Tab. 3.23 angegeben verwendet.

Acetat- ausscheidung	Succinat- ausscheidung	Propionat- ausscheidung	Wachstum $\mu$	Ausbeute $Y_{(P/S)}$ $\left(\frac{\text{mol}_{\text{Hydroxybutyrat}}}{\text{mol}_{\text{Fructose}}}\right)$
+	+	+	+	0,181
-	+	+	+	0,447
+	-	+	+	0,381
+	+	-	+	0,290
+	+	+	-	0,423
-	-	-	+	0,757
-	-	-	-	1,000

Auch bei der PHB-Produktion wurden mit  $Y_{(P/S)} = 0,020 \frac{\text{mol}_{\text{Hydroxybutyrat}}}{\text{mol}_{\text{Fructose}}}$  geringere reale Ausbeuten erzielt, als mit Hilfe des biochemischen Netzwerkes vorhergesagt worden waren. Als mögliche Ursachen können ähnliche Gründe angeführt werden, wie sie bereits bei der Succinat- und Bacteriochlorophyll-Produktion diskutiert worden sind. Essenziell bei einer Optimierung der PHB-Produktion mit *R. rubrum* ist die Ausschaltung des Wachstums und der Produktion von organischen Säuren. Weitaus wichtiger jedoch ist die Substrat-abhängige Bildung von PHB in *R. rubrum*, die dazu führte, dass mit 34,3 % der höchste PHB-Gehalt mit Acetat als C-Quelle vorlag. Mit Fructose wurden dagegen lediglich 1,5 % erreicht. Eine Optimierung würde auf dieser Basis keinen Sinn ergeben, da die gebildeten Mengen PHB auf Fructose zu gering sind (s.a. Tab. 3.22).



## Wasserstoff-Produktion

Ebenfalls untersucht wurde die theoretisch maximal mögliche Wasserstoffproduktion von *R. rubrum* unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln mit Fructose. Da die Uptake-Hydrogenase nur unter photoautotrophen Bedingungen maximale Aktivität zeigte [Maness and Weaver, 2001], wurde die Uptake-Hydrogenase auf 0 gesetzt.

Die theoretische Wasserstoffausbeute lag unter Anwendung aller in Abschn. 3.7.1 bestimmten Raten (s.a. Tab. 3.23) bei  $Y_{(P/S)} = 0,89 \frac{\text{mol}_{H_2}}{\text{mol}_{Fructose}}$ . Da Wasserstoff im verwendeten DASGIP-System nicht bestimmt werden konnte (vgl.a. Abschn. 2.4.3), konnten für einen Vergleich lediglich Wasserstoffproduktionsraten aus dem Braun Biostat C herangezogen werden. Hier lag die Wasserstoff-Ausbeute unter vergleichbaren Bedingungen zum DASGIP-System zwischen  $Y_{(P/S)} = 0,25 \frac{\text{mol}_{H_2}}{\text{mol}_{Fructose}}$  und  $Y_{(P/S)} = 0,45 \frac{\text{mol}_{H_2}}{\text{mol}_{Fructose}}$  und war damit nur halb so groß wie der theoretisch berechnete Wert. Der Grund dafür liegt höchstwahrscheinlich, wie schon bei den Ergebnissen zur Succinatproduktion diskutiert, in den Fehlerbereichen der für die im Modell eingesetzten, experimentell ermittelten, extrazellulären Raten.

Die maximal mögliche Wasserstoff-Ausbeute unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln mit Hilfe des PFL/FHL-Systems ist  $Y_{(P/S)} = 1,33 \frac{\text{mol}_{H_2}}{\text{mol}_{Fructose}}$ .

## Maximale Produktausbeuten des gesamten stöchiometrischen Netzwerkes

Um das biotechnologische Potenzial des gesamten stöchiometrischen Netzwerkes von *R. rubrum* für die einzelnen Produkte und Substrate abschätzen zu können, wurde das komplette, von Hädicke et al. [2011]; Klamt et al. [2007] publizierte, stöchiometrische Netzwerk verwendet. Darunter waren auch die zuvor ausgeschalteten Reaktionen der RuBisCO, die Photosynthesereaktion, Sauerstoffaufnahme und für das Substrat Acetat, die Reaktionen des Ethylmalonyl-CoA-Weges. Auch die Reaktionen der Pyruvatsynthese und  $\alpha$ -KG-Synthese wurden freigegeben. Im Folgenden werden die Ergebnisse der linearen Optimierung für die theoretische Berechnung der Ausbeuten des gesamten stöchiometrischen Netzwerkes im Detail erläutert.

In Tab. 3.28 sind die jeweiligen Produktausbeuten für verschiedene Kohlenstoffquellen dargestellt. Neben dem molaren Ausbeutekoeffizient ist auch der Ausbeutekoeffizient bezogen auf die Anzahl der C-Atome der jeweiligen C-Quelle angegeben. Somit kann unterschieden werden, ob eine Ausbeute nur deshalb erhöht ist, weil das Substrat eine höhere Anzahl an C-Atome aufweist, oder ob eine erhöhte Ausbeute aufgrund günstigerer Stoffwechsellleistungen vorliegt.

Zunächst ist auffällig, dass Fructose zu den höchsten molaren Ausbeutekoeffizienten bei allen Produkten führte. Der Grund hierfür liegt, wie bereits oben erwähnt, in der Anzahl

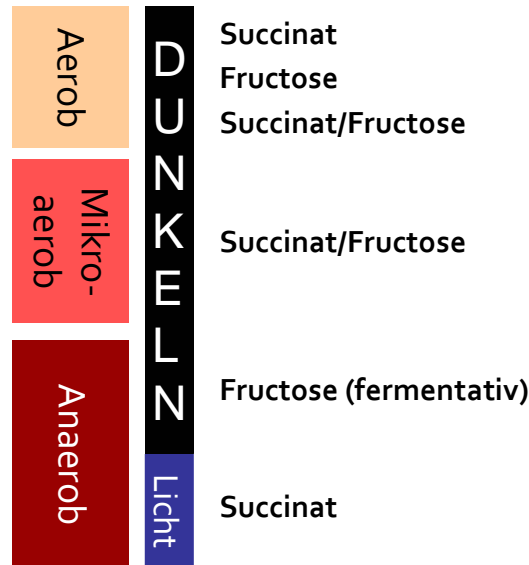
**Tab. 3.28:** Maximale Produktausbeuten des gesamten stöchiometrischen Netzwerkes auf verschiedenen Einzelsubstraten mit dem *CellNetAnalyzer* [Klamt et al., 2007, 2003].  $\text{mol}_S$ :  $\text{mol}_{\text{Substrat}}$ .  $\text{mol}_C$ :  $\text{mol}_{\text{Kohlenstoff}}$  (bezogen auf die Anzahl der C-Atome der jeweiligen Produkte und Kohlenstoffquellen.)

Substrat	Succinat		Bacteriochlorophyll		Hydroxybutyrat (PHB)		H <sub>2</sub>	
bezogen auf	$\text{mol}_S$	$\text{mol}_C$	$\text{mol}_S$	$\text{mol}_C$	$\text{mol}_S$	$\text{mol}_C$	$\text{mol}_S$	$\text{mol}_C$
Fructose	1,714	1,143	0,0073	$6,69 \times 10^{-2}$	1,333	0,889	12,0	–
Succinat	–	–	0,0043	$5,91 \times 10^{-2}$	0,778	0,778	7,0	–
Acetat	0,571	1,142	0,0024	$6,00 \times 10^{-3}$	0,444	0,888	4,0	–
Propionat	1,000	1,333	0,0043	$7,88 \times 10^{-2}$	0,778	1,037	7,0	–
Malat	0,857	0,857	0,0037	$5,09 \times 10^{-2}$	0,667	0,667	6,0	–

der C-Atome, die bei Fructose mit 6 C-Atomen am höchsten ist. Wurde die Ausbeute auf die Anzahl der C-Atome bezogen, wird ersichtlich, dass Propionat zu den höchsten Ausbeuten aller Produkte führte. Der Grund hierfür liegt in der Carboxylierung von Propionyl-CoA zu Methylmalonyl-CoA, wodurch Kohlenstoff fixiert wird. Somit hat Propionat ein hohes Potenzial zur Eignung als Substrat. Es könnte für einen späteren Prozess aus der Aufarbeitung von Stärke-haltigen Abwässern als Feedstock-Lösung zum Einsatz kommen. Diese Feedstock-Lösungen bestehen zu 60-80 % aus Acetat, zu 10-30 % aus Propionat und zu 5-40 % aus Butyrat und wurden bereits erfolgreich für die PHA-Produktion mit *R. eutropha* eingesetzt [Yu, 2001]. Da *R. rubrum* in der Lage ist, alle diese Substrate zu verwerten, könnte die von Yu [2001] eingesetzte Substratlösung auch für die Produktion mit *R. rubrum* erfolgsversprechend sein.

### 3.7.3 <sup>13</sup>C-Stoffflussanalyse in Abhängigkeit vom Substrat und Sauerstoffkonzentration

Zur genauen Charakterisierung des Stoffwechsels von *R. rubrum* sowie Feststellung der Anwendbarkeit der <sup>13</sup>C-Methodik in *R. rubrum* wurden <sup>13</sup>C-Markierungsexperimente zur Bestimmung intrazellulärer Kohlenstoffflüsse durchgeführt. Die <sup>13</sup>C-Markierungsexperimente wurden in Batch-Kultivierungen (Prinzip des *pseudo-steady-state*) auf den Substraten Fructose, Succinat, Succinat/Fructose und Acetat/Fructose unter aeroben, dunklen Bedingungen durchgeführt. Zusätzlich wurden Experimente unter mikroaeroben Bedingungen (Succinat/Fructose) und anaeroben Bedingungen (Fructose) im Dunkeln durchgeführt. Zuletzt sollten auch die Stoffflüsse unter anaeroben, phototrophen Bedingungen bestimmt. Der experimentelle Aufbau entspricht den Versuchen zur Bestimmung der intrazellulären Precursor (s.a. Abschn. 2.4.3). Eine Übersicht der durchgeführten <sup>13</sup>C-Stoffflussanalysen findet sich in Abb. 3.31.



**Abb. 3.31:** Übersicht über die durchgeführten  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente.

Zur Bestimmung der extrazellulären Raten (Wachstumsrate, Substrataufnahmerate und  $\text{CO}_2$ -Bildungsrate) wurden zunächst jeweils mindestens 3 unabhängige Batch-Kultivierungen auf unmarkiertem Substrat durchgeführt. Für das  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiment wurde dann das unmarkierte Substrat durch das jeweilige  $^{13}\text{C}$ -markierte Substrat ersetzt (s.a. Abschn. 2.4.3). Intrazelluläre  $^{13}\text{C}$ -markierte Metabolite wurden, wie unter Abschn. 2.4.6 beschrieben, extrahiert und mit Hilfe von LC-MS/MS bestimmt (s.a. 2.5.4). Die Anpassung der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflüsse erfolgte mit dem Programm 13CFLUX wie in Abschn. 2.8 beschrieben.

Die Ergebnisse für Fructose, Succinat und Succinat/Fructose (aerob) sind in den Abbildungen 3.32/A,B,C zu sehen. Die  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse für Fructose (anaerob) wird in Abb. 3.33/A,B ersichtlich. Zum Vergleich wird hier das Ergebnis der aeroben Kultivierung mit Fructose noch einmal abgebildet.

In Abb. 3.32 ist der Einfluss des Substrates auf die intrazellulären Kohlenstoffflüsse in *R. rubrum* unter aeroben Bedingungen deutlich zu sehen. Während Fructose bzw. Succinat/Fructose zu glycolytischen Flüssen (EMP-Weg) in Richtung TCA-Zyklus führte, traten gluconeogenetische Flüsse mit Succinat als alleinige C-Quelle auf. Bei Succinat/Fructose teilte sich der aufgenommene Gesamtkohlenstoff auf. So wurden 31,1 % des Gesamtkohlenstoffes als Fructose, hingegen 68,9 % des Gesamtkohlenstoffes als Succinat aufgenommen.

Bei einem Vergleich der Flüsse des TCA-Zyklus fiel auf, dass der Kohlenstofffluss des TCA-Zyklus mit Succinat als C-Quelle am höchsten war ( $114,7 \% \pm 2,4 \%$ ). Ähnlich hoch war der Fluss mit  $107,3 \% \pm 10,3 \%$  auch beim Mischsubstrat Succinat/

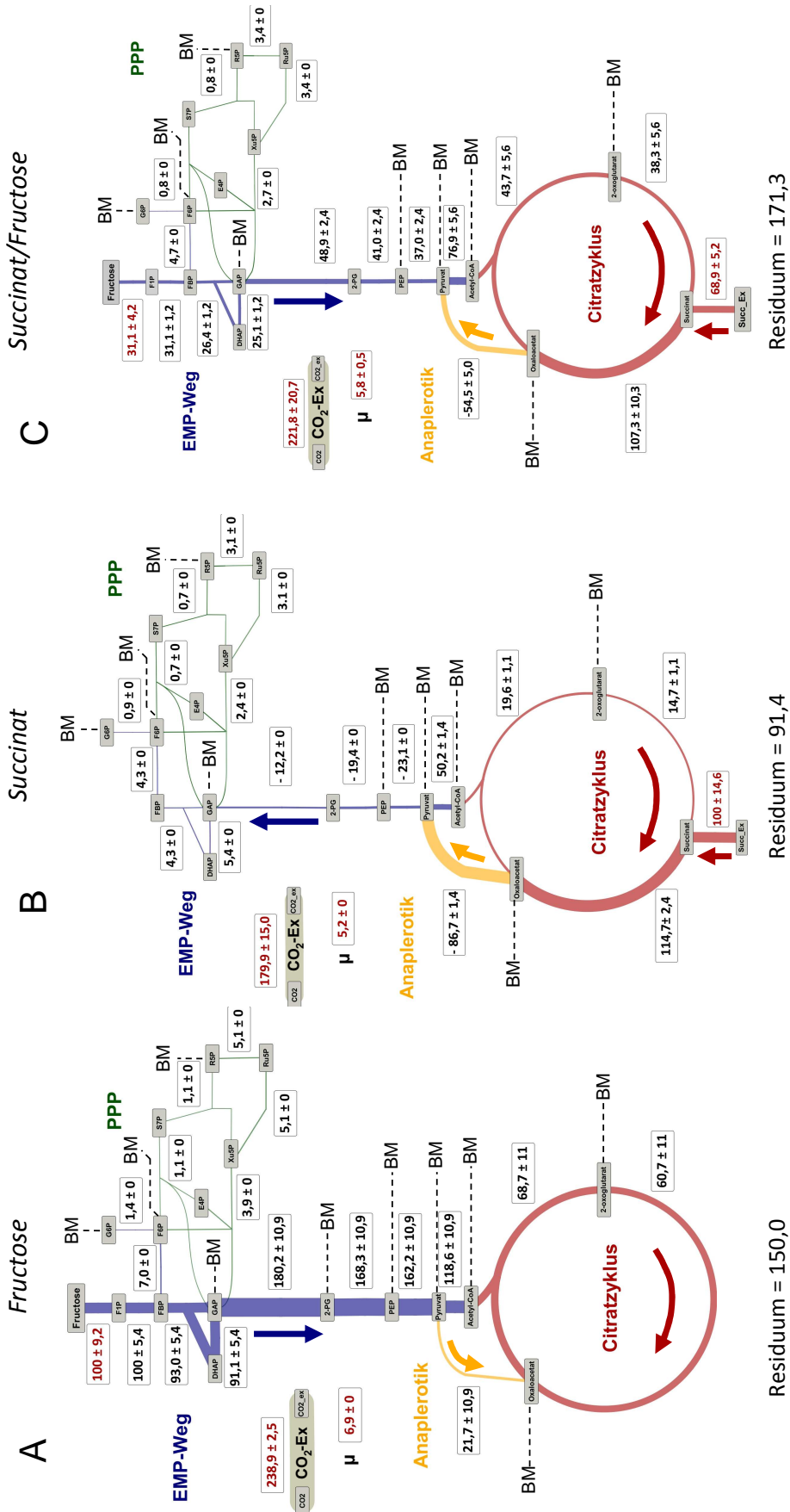
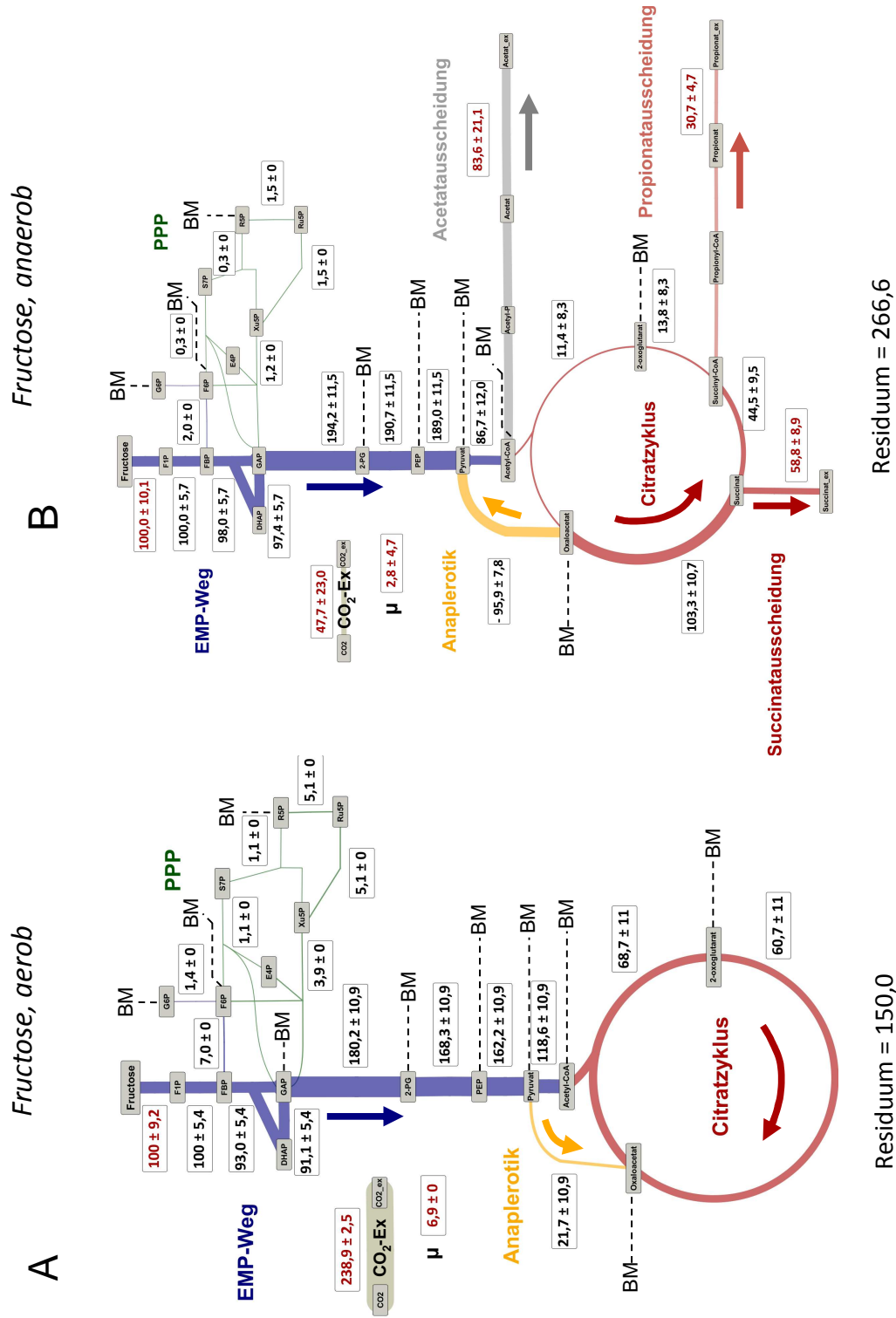


Abb. 3-32: <sup>13</sup>C-Stoffflussanalyse mit Fructose (A), Succinat (B) und Succinat/Fructose (C) als C-Quellen. Bei Fructose mit 5 % CO<sub>2</sub>. BM: Biomasseabfluss. CO<sub>2</sub>-Ex: CO<sub>2</sub>-Ausscheidung. PPP: Pentosephosphat-Weg. EMP-Weg: Embden-Meyerhof-Parnas-Weg. Einfache Standardabweichungen (66 % Konfidenzintervall). Software zur Darstellung der <sup>13</sup>C-Stoffflussanalyse: Omix v.1.3.4. DASGIP-Kultivierungsparameter.



**Abb. 3.33:** <sup>13</sup>C-Stoffflussanalyse mit Fructose als alleinige C-Quelle unter A: aeroben Sauerstoffbedingungen und B: anaeroben Sauerstoffbedingungen. Beide mit 5 % CO<sub>2</sub>. BM: Biomasseabfluss. CO<sub>2</sub>-Ex: CO<sub>2</sub>-Ausscheidung. PPP: Pentosephosphat-Weg. EMP-Weg: Embden-Meyerhof-Parnas-Weg. Einfache Standardabweichungen (66 % Konfidenzintervall). Software zur Darstellung der <sup>13</sup>C-Stoffflussanalyse: Omix v.1.3.4. DASGIP-Kultivierungsparameter.

Fructose. Am geringsten war der Fluss des TCA-Zyklus bei Fructose als alleinige C-Quelle (60,7 %  $\pm$  11 %). Dieser geringere Kohlenstofffluss wurde bereits bei der Bestimmung von intrazellulären Metaboliten des TCA-Zyklus vermutet, wo die Metabolite Succinat, Fumarat und Malat mit Fructose unter aeroben Bedingungen nicht detektiert werden konnten. Auf Succinat-haltigen Medien konnten dagegen alle Metabolite des TCA-Zyklus in ihrer Konzentration bestimmt werden (vgl.a. Abschn. 3.7.1.1).

Die verschiedenen Flüsse der Anaplerotik wurden als eine einzige Reaktion (von Pyruvat zu Oxaloacetat) zusammengefasst. Auf diese Weise konnte den reversiblen Reaktionen der Anaplerotik ein definierter Fluss mit Standardabweichung zugeordnet werden (Abb. 3.32/gelb gekennzeichnet). Der Anaplerotik-Fluss war für Succinat mit 86,7 %  $\pm$  1,4 % am höchsten. Dieses Ergebnis spiegelt die Bedeutung der Anaplerotik beim Wachstum auf gluconeogenetischen Substraten wider. Passend dazu war der Fluss über die Anaplerotik bei Fructose am geringsten (21,7 %  $\pm$  10,9 %) und darüber hinaus in entgegengesetzter Richtung. Mit Succinat/Fructose wurde ein Anaplerotik-Fluss von 54,5 %  $\pm$  5,0 % in Richtung Pyruvat berechnet.

Die Kohlenstoffflüsse des PPP-Weges waren erwartungsgemäß sehr gering, da benötigter Kohlenstoff lediglich für die Biomassebildung in Richtung R5P-Biosynthese abgezogen wurde. In *R. rubrum* kann die NADPH-Bildung nicht über den PPP-Weg erfolgen, da die G6P-Dehydrogenase fehlt [Grammel et al., 2003]. NADPH kann von *R. rubrum* nur über die Reaktion der Isocitrat-Dehydrogenase bzw. über das Malatenzym gebildet werden [Hoover and Ludden, 1984; Iwakura et al., 1978].

In Abb. 3.33 sind die  $^{13}\text{C}$ -Stoffflüsse für aerobe (A) und anaerobe (B) Bedingungen mit Fructose als alleiniger C-Quelle aufgezeigt. Der anaerobe Zustand wies im Vergleich zum aeroben Zustand eine vielfach geringere Wachstumsrate auf ( $\mu_{exp} = 0,029 \text{ h}^{-1}$ ). Das spiegelte sich in sehr geringen PPP-Flüssen (max. 1,5 %  $\pm$  0 %) und geringen  $\text{CO}_2$ -Abgaberraten (47,7 %  $\pm$  23,0 %) wider. Die glycolytischen Flüsse gehen in Richtung TCA-Zyklus. Mit 194,2 %  $\pm$  11,5 % betraf das nahezu den gesamten, aufgenommenen Kohlenstoff (theoretisch maximal 200 %). Durch die  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse konnte außerdem gezeigt werden, dass ein reduktiver TCA-Zyklus in Richtung Succinyl-CoA-Bildung unter anaeroben Gärungsbedingungen vorlag. Der Fluss durch diesen reduktiven „Ast“ betrug 103,3 %  $\pm$  10,7 %. Nur ein sehr geringer Teil (11,4 %  $\pm$  8,3 %) floss über den oxidativen „Ast“ des TCA-Zyklus in Richtung  $\alpha$ -KG-Bildung zur Biomassebildung. Diese Flüsse entsprachen somit zum größten Teil den für *E. coli* bereits beschriebenen Flüssen für anaerobe Bedingungen [Schmidt et al., 1998]. Ausgehend vom TCA-Zyklus erfolgt die Ausscheidung von Succinat und Propionat. Die jeweiligen Kohlenstoffflüsse betrugen 58,8 %  $\pm$  8,9 % und 30,7 %  $\pm$  4,7 %. Die Produktion von Acetat in das extrazelluläre Medium war mit 86,6 %  $\pm$  21,1 % am höchsten.

Bei der Beurteilung der Güte von  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen kam der sogenannte  $\chi^2$ -Anpassungstest zur Anwendung. Damit kann berechnet werden, ob die Anpassung eines vorgegeben Stoffwechselnetzwerkes mit den gemessenen  $^{13}\text{C}$ -Daten abgelehnt werden muss oder die Bestimmung der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflüssen mit ausreichender Güte erfolgen kann. Der Wert des kritischen Residuums (kritischer Wert) ist dabei abhängig von der Anzahl der Messungen und Freiheitsgraden des Netzwerkes [Wiechert et al., 1997]. Die Ergebnisse dieser Signifikanzprüfung sind in Tab. 3.29 zu sehen.

Wurden alle gemessenen  $^{13}\text{C}$ -Daten (s.a. Anhang A2) in die Modellierung einbezogen, ergab sich für alle betrachteten Zustände eine Ablehnung des Modells aufgrund der Überschreitung des kritischen Residuums. Für Fructose (aerob) beispielsweise musste der Wert des Residuums kleiner als 68,8 sein. Unter Einbeziehung aller Messdaten lag das Endresiduum jedoch bei 150,0 (s.a. Tab. 3.29). Auffällig dabei war jedoch, dass der größte Fehler durch die m+0-Spur (unmarkierter Teil des jeweiligen Metabolitenpools) entstand. Wurden die m+0-Messwerte für alle Metabolite aus der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussmodellierung herausgenommen, konnten die Anpassungen der Daten an das Modell mit ausreichender Güte angenommen werden. So sank das Residuum für die Kultivierung mit Fructose (aerob) auf 53,7, was deutlich unterhalb des kritischen Residuums von 64,3 lag. Ähnlich konnten damit auch gültige Anpassungen der anderen beiden aeroben Zustände mit Succinat und Succinat/Fructose erreicht werden (vgl.a. Tab. 3.29). Lediglich bei der anaeroben Kultivierung mit Fructose als alleiniger C-Quelle muss die Anpassung weiterhin signifikant abgelehnt werden. Hier ergab sich ein Residuum von 82,5 bei einem kritischen Residuum von 63,2.

**Tab. 3.29:** Residuen der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse im Vergleich zum berechneten Residuum des  $\chi^2$ -Anpassungstests ( $\alpha$ -Kriterium: 10 %). Residuum I:  $^{13}\text{C}$ -Modell mit allen gemessenen Daten (s.a. Anhang A2). Residuum II:  $^{13}\text{C}$ -Modell mit Daten aus Anhang A2, allerdings ohne m+0.

Kultivierung	Kritischer Wert	Residuum I alle Daten	Kritischer Wert	Residuum II ohne m+0
	$\chi^2$ -Test		$\chi^2$ -Test	
M2F – aerob	68,8	150,0	64,3	53,7
M2S – aerob	55,2	91,4	50,7	29,9
M2SF – aerob	68,8	171,3	56,4	30,0
M2F – anaerob	67,7	266,6	63,2	82,5

Für die  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen Acetat/Fructose (aerob), Succinat/Fructose (mikroaerob) und Succinat (phototroph) konnten keine zufriedenstellenden Anpassungen an das Modell erreicht werden. Hier lagen die Endresiduen  $> 1200$ . Der Grund für diese Schwierigkeiten ist bislang unklar. Bei der Acetat/Fructose-Kultivierung könnte der bislang nicht

vollständig aufgeklärte Acetatstoffwechselweg eine Rolle spielen. In Abschn. 3.7.4 wird zwar gezeigt werden, dass unter aeroben Bedingungen der Ethylmalonyl-CoA-Weg für die Assimilation von Acetat von *R. rubrum* genutzt wird, es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass noch weitere bislang unbekannte Wege existieren. Da diese Wege im bisherigen Netzwerk nicht berücksichtigt werden konnten, könnte sich durch Aufklärung unbekannter Stoffwechselwege eine Verbesserung der Anpassung erzielen lassen.

Allgemein festzuhalten war eine starke Verschlechterung der Anpassung bei der Betrachtung sauerstofflimitierter Zustände. Bereits der anaerobe Zustand zeigte mit einem Residuum von 266,6 eine weitaus schlechtere Anpassung als die anderen modellierten Zustände (171,3 maximal). Zu vermuten wären hier eventuell bislang unbekannte, und daher unberücksichtigte Reaktionen, die zu einem unvollständigen stöchiometrischen Netzwerk führen. Ebenfalls denkbar wäre ein Zusammenhang mit der Produktion photosynthetischer Membranen, da diese ausschließlich unter sauerstofflimitierten Bedingungen gebildet werden. Der quasi-stationäre Zustand, welcher konstante extrazelluläre Auf- und Ausscheideraten als Voraussetzung hat, könnte durch die Produktion von photosynthetischen Membranen gestört sein. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass über den Zeitraum der Probennahme und der Berechnung der extrazellulären Auf- und Ausscheideraten die Membranbildungsrate konstant war. In zwei voneinander unabhängigen <sup>13</sup>C-Experimenten konnten ähnliche Membranbildungsraten ermittelt werden (s.a. Tab. 3.30).

**Tab. 3.30:** Gemittelte Membranbildungsraten von zwei unabhängigen mikroaeroben Kultivierungen für <sup>13</sup>C-Stoffflussanalysen. Die einzelnen Messpunkte (Messungen alle 1,5 h) wurden über den angegebenen Zeitpunkt gemittelt und die Standardabweichungen berechnet.

Kultivierung	Membranbildungsrate $\frac{\Delta A_{880}}{\Delta A_{660} \cdot h}$	Zeitraum [h]
1	0,081 ± 0,006	5,92
2	0,076 ± 0,005	5,58

### 3.7.4 Acetatstoffwechsel

Der Acetatstoffwechsel wurde aufgrund des Fehlens der Isocitratlyase in *R. rubrum* untersucht. Die Isocitratlyase ist ein essenzielles Enzym in dem für das Wachstum auf C<sub>2</sub>-Substraten weit verbreiteten Glyoxylatweges. Da dieser Weg ohne Isocitratlyase nicht möglich ist, müssen alternative Wege für die Assimilation von Acetat zum Auffüllen des TCA-Zyklus vorhanden sein, da *R. rubrum* in der Lage ist, auf Acetat als alleinige C-Quelle zu wachsen [Sojka, 1978]. Unter Abschn. 1.1.3 wurden der Citramalatweg und der Ethylmalonyl-CoA-Weg als mögliche Alternativen vorgestellt. Im Folgenden soll



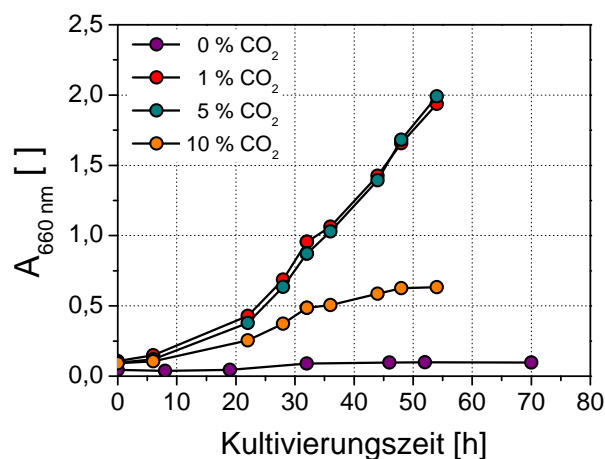
nun auf einzelne Untersuchungen zu diesen beiden Wegen eingegangen werden.

### Analyse von homologen und annotierten Genen

Eine Analyse des Genoms auf Sequenzhomologien, mittels Blast, zeigte, dass die CCR, Schlüsselenzym des Ethylmalonyl-CoA-Weges auch in *R. rubrum* annotiert ist (Rru\_A3063). Dagegen konnte kein Gen gefunden werden, welches für die Citramalatsynthase, das Schlüsselenzym des Citramalatweges, codiert. Auch Sequenzhomologievergleiche mit Bakterien, welche definitiv ein Gen für die Citramalatsynthase besitzen (z.B. *leuA* von *Leptospira interrogans*, MJ\_1392 von *Methanocaldococcus jannaschii* DSM 2661 [Howell et al., 1999]), führten zu keinem Ergebnis.

### Wachstum unter aeroben Bedingungen

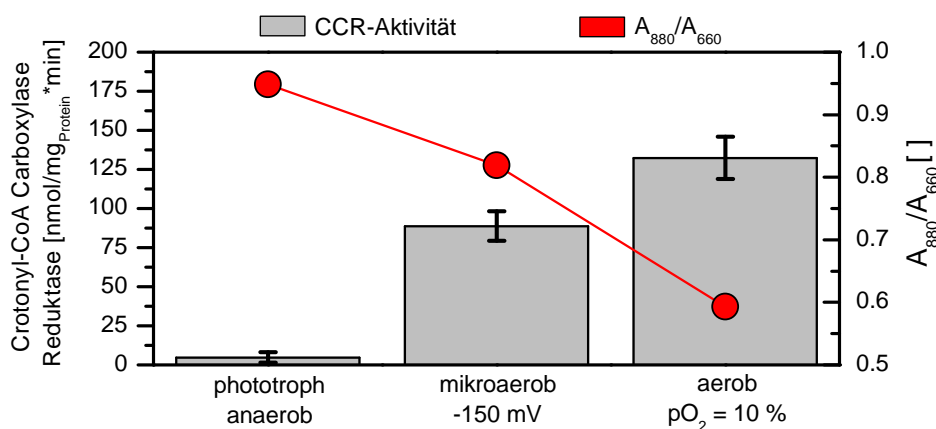
Nach Kornberg and Lascelles [1960] ist das Wachstum von *R. rubrum* auf Acetat unter anaeroben, phototrophen Bedingungen abhängig von der Zugabe von Bicarbonat. Aus diesem Grund wurde das Wachstum von *R. rubrum* in Abhängigkeit von der Zufuhr von CO<sub>2</sub> für aerobe Bedingungen im Dunkeln untersucht. In Abb. 3.34 ist der Verlauf von A<sub>660</sub> bei verschiedenen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen zu sehen. Sehr deutlich ist zu erkennen, dass ohne die Zufuhr von externen CO<sub>2</sub> kein Wachstum erfolgte. Hingegen war Wachstum mit einer exponentiellen Wachstumsrate von  $\mu_{exp} = 0,052 \text{ h}^{-1}$  zwischen 2 % und 5 % CO<sub>2</sub> möglich. Mit 10 % CO<sub>2</sub> erfolgte wieder ein verlangsamtes Wachstum. CO<sub>2</sub> wirkt hier offenbar inhibitorisch, was bereits in der Literatur für andere Bakterien beschrieben ist [Haas et al., 1989; Dixon and Kell, 1989].



**Abb. 3.34:** Wachstum von *R. rubrum* auf Acetat als alleinige C-Quelle unter aeroben Bedingungen ( $p_{O_2} = 10 \%$ ) mit verschiedenen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen (1 %, 2 %, 5 % und 10 %). Alle Kultivierungen wurden einmal, in der DASGIP-Anlage jedoch parallel aus jeweils einer Vorkultur durchgeführt. DASGIP-Kultivierungsparameter.

## Bestimmung von Enzymaktivitäten

Abb. 3.35 zeigt CCR-Aktivitäten in *R. rubrum* unter verschiedenen Sauerstoff- und Lichtbedingungen. Unter allen untersuchten Bedingungen konnte CCR-Aktivität nachgewiesen werden. Jedoch war die Aktivität unterschiedlich hoch. Am geringsten war die Aktivität unter phototroph, anaeroben Bedingungen ( $4,7 \frac{\text{nmol}}{\text{mg}_{\text{Protein}} \cdot \text{min}}$ ). Steigende Aktivitäten konnten unter mikroaeroben und aeroben Sauerstoffbedingungen verzeichnet werden (mikroaerob:  $88,8 \frac{\text{nmol}}{\text{mg}_{\text{Protein}} \cdot \text{min}}$ , aerob:  $132,4 \frac{\text{nmol}}{\text{mg}_{\text{Protein}} \cdot \text{min}}$ ). Im Vergleich zu *R. rubrum* sind die gemessenen CCR-Aktivitäten in *Rb. sphaeroides* mit  $700 \frac{\text{nmol}}{\text{mg}_{\text{Protein}} \cdot \text{min}}$  unter phototroph, anaeroben Bedingungen wesentlich höher [Erb et al., 2007].

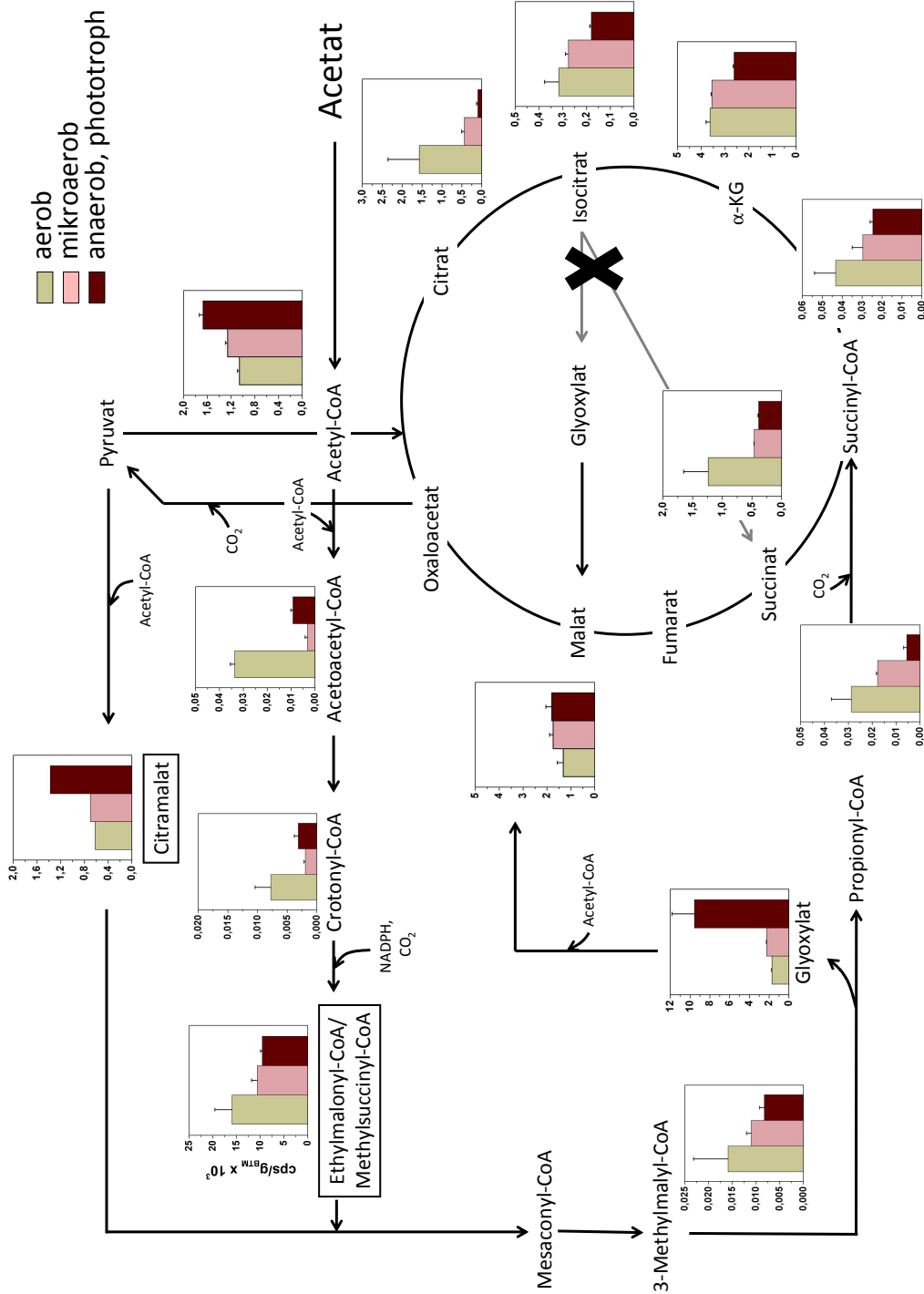


**Abb. 3.35:** CCR-Aktivitäten unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen bei 1 %  $CO_2$  auf Acetat als alleinige C-Quelle. Standardabweichungen aus jeweils 3 biologisch unabhängigen Kultivierungen. Maximales  $\frac{A_{880}}{A_{660}}$ -Verhältnis unter den verschiedenen Bedingungen zum Vergleich. DASGIP-Kultivierungsparameter.

Die Messung der Citramalatsynthese ergab lediglich unter phototroph, anaeroben Bedingungen eine Aktivität von  $< 3 \frac{\text{nmol}}{\text{mg}_{\text{Protein}} \cdot \text{min}}$ . In Anwesenheit von Sauerstoff (aerobe und mikroaerobe Bedingungen) konnte keine Aktivität der Citramalatsynthese detektiert werden.

## Bestimmung intrazellulärer Metabolite

Zur weiteren Untersuchung des Acetatstoffwechsels in *R. rubrum* wurden Daten zu intrazellulären Metabolitenkonzentrationen unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen (anaerob/phototroph, mikroaerob und aerob) erhoben. Zusätzlich zu den bei Luo et al. [2007] etablierten Metaboliten wurden Citramalat, Acetoacetyl-CoA, Crotonyl-CoA, Ethylmalonyl-CoA, Methylsuccinyl-CoA, Propionyl-CoA und 3-Methylmalyl-CoA bestimmt. Ethylmalonyl-CoA und Methylsuccinyl-CoA sind nicht kommerziell erhältlich. Aus diesem Grund kann hier nur die Intensität ( $\text{cps}/g_{\text{BTM}}$ ) verglichen werden.



**Abb. 3-36:** Intrazelluläre Konzentrationen von Metaboliten des zentralen Kohlenstoffwechsels beim Wachstum auf Acetat in Abhängigkeit von der Sauerstoffzufuhr und Illumination. ■ : aerob, phototroph. ■ : mikroaerob, ■ : anaerob, phototroph. Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 technischen Replikaten. 1 % CO<sub>2</sub> bei allen Kultivierungen. Bis auf Ethylmalonyl-CoA/Methylsuccinyl-CoA (cps/g<sub>BTM</sub> · 10<sup>3</sup>) alle Konzentrationen: μmol/g<sub>BTM</sub> · α-KG: α-Ketoglutarat. Standardabweichungen aus 3 technischen Replikaten. DASGIP-Kultivierungsparameter.

In Abb. 3.36 sind die Ergebnisse dieser LC-MS/MS-Messungen zu sehen. Bei den Metaboliten des Ethylmalonyl-CoA-Weges fiel auf, dass unter aeroben Bedingungen höhere Poolgrößen vorhanden waren. So war Ethylmalonyl-CoA/Methylsuccinyl-CoA um das 1,7-fache, Crotonyl-CoA um das 2,5-fache und Acetoacetyl-CoA sogar um das 3,6-fache erhöht. Interessanterweise fanden sich allerdings die höchsten Acetyl-CoA-Pools unter phototroph, anaeroben Bedingungen ( $1,67 \mu\text{mol/g}_{BTM}$ ). Bemerkenswert muss allerdings, dass Acetoacetyl-CoA und Crotonyl-CoA auch Metabolite der PHB-Biosynthese in *R. rubrum* und nicht spezifisch für den Weg der Acetatassimilation sind (vgl.a. Abschn. 1.3.4).

Bei der Messung von Citramalat konnte eine Instabilität dieses Metaboliten in der Quenching-Lösung beobachtet werden (60 %iges Methanol, 5 mM Tricin), was dazu führte, dass nach 12 h kein Citramalat mehr nachzuweisen war. Diese Degradation wurde nicht bei einer wässrigen Lösung beobachtet (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund konnte sowohl im Extrakt als auch im Quenching-Überstand kein Citramalat detektiert werden. In Abb. 3.35 ist deshalb die spezifische „extrazelluläre“ Citramalatkonzentration gezeigt. Sie war in der phototroph, anaeroben Kultivierung rund 2,2-fach höher gewesen als in der aeroben Kultivierung. Unklar ist jedoch, aus welchem Grund *R. rubrum* Citramalat in das extrazelluläre Medium ausscheiden sollte.

Beide alternative Routen für die Acetatassimilation führen über 3-Methylmalyl-CoA zu Malat und Succinat. Bei Propionyl-CoA ließen sich, ebenso wie im gesamten TCA-Zyklus, unter aeroben Bedingungen höhere Poolgrößen feststellen als unter mikroaeroben und phototroph, anaeroben Bedingungen (s.a. Abb. 3.36). So war die Konzentration von intrazellulärem Propionyl-CoA unter aeroben Bedingungen um das 5,1-fache gegenüber phototroph, anaeroben Bedingungen erhöht. Succinat war um das 3,2-fache höher konzentriert. Ausnahmen bildeten neben Citramalat noch Glyoxylat, Malat und Acetyl-CoA, welche unter phototroph, anaeroben Bedingungen höhere Konzentrationen aufwiesen als unter aeroben Bedingungen im Dunkeln. Glyoxylat beispielsweise war unter phototroph, anaeroben Bedingungen um das 5,6-fache erhöht ( $9,55 \mu\text{mol/g}_{BTM}$ ) im Vergleich zu aeroben Bedingungen ( $1,71 \mu\text{mol/g}_{BTM}$ ) (vgl.a. Abb. 3.36).

Die Analyse der zentralen Stoffwechselintermediate und der Enzymaktivitäten zeigt, dass der Ethylmalonyl-CoA-Weg von *R. rubrum* für die Assimilation von Acetat genutzt wird. Keine CCR-Aktivität konnte in Succinat-gewachsenen Zellen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Die CCR-Aktivität ist somit ein spezifischer Indikator für den Weg der Acetatassimilation.

Aus den Daten lässt sich weiterhin schließen, dass der Ethylmalonyl-CoA-Weg bevorzugt unter aeroben Sauerstoffbedingungen im Dunkeln verwendet wird (Abb. 3.35). Weiter offen bleibt der Weg der Acetatassimilation unter phototroph, anaeroben Bedingungen,

da hier sowohl die CCR als Enzym des Ethylmalonyl-CoA-Weges als auch die Citramalatsynthase als Enzym des Citramalatweges mit  $4,7 \frac{\text{nmol}}{\text{mgProtein} \cdot \text{min}}$  bzw.  $< 3 \frac{\text{nmol}}{\text{mgProtein} \cdot \text{min}}$  sehr geringe Aktivitäten aufwiesen. Hier muss vermutet werden, dass neben diesen beiden Wegen weitere Möglichkeiten der Assimilation von Acetat zur Auffüllung des TCA-Zyklus existieren.

### Modellierung zum Acetat-Stoffwechselweg

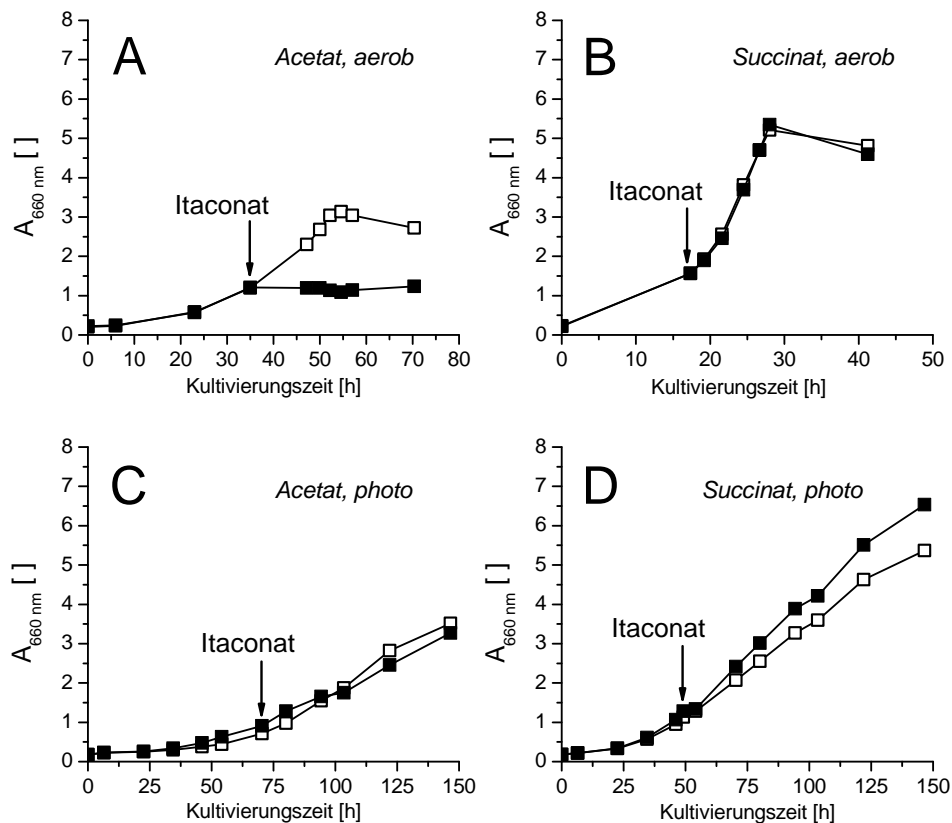
Die Propionyl-CoA-Carboxylase (PCC) ist bei der Acetatassimilation über den Citramalatweg und den Ethylmalonyl-CoA-Weg beteiligt [Ivanovsky et al., 1997; Erb et al., 2007]. Zur Untersuchung des Acetatstoffwechselweges wurden die theoretischen Auswirkungen einer Inhibierung der PCC mit Hilfe des stöchiometrischen Netzwerkes von *R. rubrum* analysiert (s.a. Anhang B). Entscheidend dabei sind die sauerstoffempfindlichen Enzyme RuBisCO, Pyruvatsynthase und  $\alpha$ -KG-Synthase, welche ausschließlich in Abwesenheit von Sauerstoff aktiv sind. Dadurch verändert sich das theoretische Stoffwechselnetzwerk entscheidend im Hinblick auf die Acetatassimilation unter aeroben im Vergleich zu anaeroben, phototrophen Bedingungen. PCC ist ein essenzielles Enzym bei der Propionatassimilation und ließ sich im Experiment durch die Zugabe von Itaconat inhibieren [Berg et al., 2002] (vgl.a. Abschn. 3.7.4).

Für aerobe Bedingungen wurden im Netzwerk die Reaktionen der RuBisCO, Pyruvatsynthase und  $\alpha$ -KG-Synthase aufgrund ihrer Sauerstoffsensitivität aus dem Netzwerk herausgenommen. Das führte dazu, dass PCC unter aeroben Bedingungen essenziell für das Wachstum wurde. Die Verwendung des linearen Optimierungsalgorithmus' GLPKMEX mit der Zielfunktion Wachstum („mue“) zeigte, dass unter diesen Bedingungen bei gleichzeitiger Lösbarkeit des Optimierungsproblems kein Wachstum mehr möglich war. Die Rate „mue“ war gleich 0.

Unter anaeroben Bedingungen im Licht war die Situation anders, da hier die Reaktionen der RuBisCO, Pyruvatsynthase und  $\alpha$ -KG-Synthase berücksichtigt werden mussten und als aktiv angenommen wurden [Sarles Cook and Tabita, 1988; Buchanan et al., 1967; Evans et al., 1966; Anderson and Fuller, 1967b]. Unter diesen Bedingungen war Wachstum, unabhängig vom Citramalatweg und unabhängig vom Ethylmalonyl-CoA-Weg, möglich und es konnte eine maximale Rate „mue“ von  $\mu = 0,063 \text{ h}^{-1}$  erzielt werden. Dabei waren die Reaktionen der Pyruvatsynthase und RuBisCO für sich essenziell.  $\alpha$ -KG-Synthase konnte nicht als einziges Enzym für die Acetatassimilation dienen und führte zu einer Rate „mue“ von 0. Zwischen Pyruvatsynthase und RuBisCO dagegen konnte flexibel gewählt werden. Jede Enzymreaktion für sich erlaubte maximales Wachstum von  $\mu = 0,063 \text{ h}^{-1}$ .

### Effekt von extrazellulärem Itaconat

Die Propionyl-CoA-Carboxylase kann in *R. rubrum in-vivo* durch Itaconat, eine organische Dicarbonsäure, gehemmt werden [Berg et al., 2002]. Berg et al. [2002] konnten eine starke Hemmung der *in-vitro*-Aktivität mit 20 mM Itaconat feststellen (um 77 %). Mit der Zugabe von extrazellulärem Itaconat konnte allerdings nicht das Wachstum unter anaeroben, phototrophen Bedingungen gehemmt werden. Berg et al. [2002] führen diese Beobachtung auf das Unvermögen der Itaconat-Aufnahme durch *R. rubrum* oder Möglichkeiten zum Abbau zur Detoxifikation zurück. Itaconat ist als Hemmstoff der Isocitratlyase in methylo trophen Mikroorganismen bekannt und führt dort auch zu einer Hemmung des Wachstums nach Zugabe von Itaconat [Bellion and Kelley, 1979].



**Abb. 3.37:** Effekt von extrazellulärem Itaconat auf das aerobe und anaerob, phototrophe Wachstum von *R. rubrum* im Schüttelkolben bzw. Pyrexflaschen. A: Acetat, aerob. B: Succinat, aerob. C: Acetat, phototroph. D: Succinat, phototroph. Gefüllte Symbole: mit Itaconat. Leere Symbole: ohne Itaconat. Pfeile: kennzeichnen den Zeitpunkt der Itaconatzugabe (20 mM). Die Daten sind repräsentativ für jeweils 2 unabhängige Kultivierungen im Schüttelkolben bzw. Pyrexflasche.

In Abb. 3.37 ist der Effekt von extrazellulärem Itaconat auf das Wachstum von *R. rubrum* unter aeroben Bedingungen im Dunkeln und phototroph, anaeroben Bedingungen mit Acetat und Succinat als C-Quelle zu sehen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Berg et al. [2002] wurde kein hemmender Effekt auf das Wachstum unter phototrophen Bedingungen gefunden, weder mit Acetat noch mit Succinat als C-Quelle

(vgl.a. Abb. 3.37/C,D). Allerdings wurde eine sehr starke Hemmung des Wachstums unter aeroben Bedingungen auf Acetat, jedoch nicht auf Succinat als Substrat, festgestellt (vgl.a. Abb. 3.37/A,B). Das zeigt zum einen, dass Itaconat, im Widerspruch zu den Argumentationen von Berg et al. [2002], von *R. rubrum* aufgenommen werden kann, denn andernfalls wäre das Wachstum der Zellen nicht beeinträchtigt. Zum anderen zeigen diese Versuche deutlich, dass nur das aerobe Wachstum von der PCC-Aktivität abhängig ist und dass sich der phototrophe Weg der Acetatassimilation von dem Weg der aeroben Acetatassimilation unterscheidet.

Anhand der erhaltenen Daten ist es sehr wahrscheinlich, dass der phototrophe Weg der Acetatassimilation in *R. rubrum* nicht über den Citramalatweg verläuft. Es konnte kein homologes Gen, welches für die Citramalatsynthase codiert, gefunden werden. Darüber hinaus sind die spezifischen Aktivitäten mit  $< 3 \frac{\text{nmol}}{\text{mg}_{\text{Protein}} \cdot \text{min}}$  nur sehr gering. Allerdings ist auch das alleinige Operieren des Ethylmalonyl-CoA-Weges keine echte Alternative, da die Aktivitäten des der CCR als Schlüsselenzym ebenfalls sehr gering ausfielen ( $4,7 \frac{\text{nmol}}{\text{mg}_{\text{Protein}} \cdot \text{min}}$ ). Im Gegensatz dazu waren die CCR-Aktivitäten unter aeroben Sauerstoffbedingungen sehr hoch ( $132,4 \frac{\text{nmol}}{\text{mg}_{\text{Protein}} \cdot \text{min}}$ ) und das Wachstum sensitiv gegenüber der Zugabe von Itaconat. Da diese Hemmung unter phototrophen Bedingungen nicht zu beobachten war, ist es sehr wahrscheinlich, dass neben dem Citramalatweg und dem Ethylmalonyl-CoA-Weg weitere Wege der Assimilation von Acetat in *R. rubrum* existieren. Das können zum Beispiel die Reaktionen der RuBisCO und/oder die Reaktionen von Pyruvat-/ $\alpha$ -KG-Synthase sein. Anderson and Fuller [1967c] konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass die RuBisCO-Aktivität mit Acetat als C-Quelle ca. 8,6-fach höher als mit Malat als C-Quelle unter phototrophen Bedingungen ist. Ebenso denkbar ist die Existenz eines bisher komplett unbekanntes Weges für die Acetat-Assimilation in *R. rubrum* und anderen Isocitratlyase-negativen Bakterien.





## 4 Abschließende Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das biotechnologische Potenzial des fakultativ photosynthetischen Bakteriums *R. rubrum* im Dunkeln aufgezeigt und beurteilt. Dabei wurden Verfahren der klassischen Prozessentwicklung und -optimierung mit Methoden zur Analyse des mikrobiellen Stoffwechsels kombiniert.

Mit Hilfe von Batch-Kultivierungen konnte gezeigt werden, dass durch eine geeignete Zufuhr von CO<sub>2</sub> auf den Einsatz von Succinat unter mikroaeroben Bedingungen verzichtet werden kann. So konnten mit Fructose als alleiniger C-Quelle ähnlich hohe spezifische Bacteriochlorophyll-Mengen erzielt werden (3,95 μmol/g<sub>BTM</sub>) wie unter Einsatz von Succinat und Fructose (3,81 μmol/g<sub>BTM</sub>). Noch weiter steigern lässt sich die Bacteriochlorophyll-Bildung durch die Einstellung anaerober Sauerstoffbedingungen. Auf diese Weise lassen sich 6,46 gegenüber 3,95 μmol/g<sub>BTM</sub> Bacteriochlorophyll erzielen. Die Bacteriochlorophyll-Ausbeute ist unter anaeroben Bedingungen sogar etwas höher ( $Y_{(P/S)} = 1,57 \frac{\mu\text{mol}_{Bchl}}{\text{g}_{Substrat}}$ ) gegenüber  $Y_{(P/S)} = 1,33 \frac{\mu\text{mol}_{Bchl}}{\text{g}_{Substrat}}$ ). Fructose wird hierzu aber nur zu einem geringen Anteil für die Bildung von Bacteriochlorophyll benötigt. Ein Gesamtanteil von lediglich 0,7 % Bacteriochlorophyll an der BTM bestätigte diese Beobachtung.

Darüber hinaus wies eine anaerobe Prozessführung mehrere Vorteile gegenüber einem mikroaeroben Kultivierungsverfahren auf. So wurde unter anaeroben Gärungsbedingungen ein breiteres Produktspektrum abgedeckt als unter mikroaeroben Bedingungen. Das betraf zum Beispiel die Bildung molekularen Wasserstoffs und organischer Säuren (u.a. Succinat). So wurden unter mikroaeroben Bedingungen nur geringe Mengen Succinat gebildet (nach 24 h: 0,3 mM) im Gegensatz zu anaeroben Sauerstoffbedingungen (nach 24 h: 16,5 mM). Der Grund dafür liegt höchstwahrscheinlich in einem reduktiven TCA-Zyklus, der jedoch nicht vollständig ist. So konnten <sup>13</sup>C-Stoffflussanalysen zeigen, dass die Reaktion der α-KG-Synthase (von Succinyl-CoA zu α-KG) in Richtung CO<sub>2</sub>-Fixierung unter diesen Bedingungen nicht abläuft. Als Folge davon wird Succinat ausgeschieden.

Des Weiteren konnte eine Zelldichte-abhängige Abnahme der Produktivitäten festgestellt werden, welche sich in einer starken Verringerung der spezifischen Produktkonzentrationen von photosynthetischen Membranen (A<sub>880</sub>/A<sub>660</sub> bzw. Bacteriochlorophyll) (um ≈ 91 %), Wasserstoff (um ≈ 98 %) und organischen Säuren (um ≈ 87 %) in Zelldichten von A<sub>660</sub> > 20 äußerte. Lediglich PHB und Coenzym Q<sub>10</sub> können von dieser Beobachtung ausgenommen werden. Der PHB-Gehalt stieg sogar leicht von 7,6 auf 13,1 %. Die maximale Konzentration für Bacteriochlorophyll betrug 40,5 μmol/L und für

Succinat 286 mM. Die Wasserstoffbildungsrate betrug maximal  $0,53 \frac{\text{mmol H}_2}{\text{L} \cdot \text{h}}$ ; insgesamt konnte ein Volumen von 940 mL H<sub>2</sub> produziert werden.

Im Vergleich zu einer Reihe anderer photosynthetischer Bakterien wie *Rb. sphaeroides*, *Rb. capsulatus* oder *Rps. palustris* weist *R. rubrum* einen höheren spezifischen Bacteriochlorophyll-Gehalt ( $7,74 \mu\text{mol/g}_{BTM}$ ) bei vergleichbaren Zelldichten auf. So wird bei Urakami and Yoshida [1993] der Bacteriochlorophyll-Gehalt von beispielsweise *Rb. sphaeroides* TK 5112 mit  $3,23 \mu\text{mol/g}_{BTM}$  angegeben. *Rb. capsulatus* TK 5102 bildet  $4,61 \mu\text{mol/g}_{BTM}$ . Eine Ausnahme bildet anscheinend *Rhodovulum sulfidophilum* (*Rhodobacter sulfidophilus*), welcher mit  $14,6 \mu\text{mol/g}_{BTM}$  die doppelte Menge zu *R. rubrum* bildet.

Als nicht-photosynthetisches Bakterium wurde *E. coli* für die Protoporphyrin-Bildung optimiert. Hier erzielte ein entsprechender Stamm nach Expression verschiedener Gene aus *Rb. capsulatus*, *Synechocystis sp.* und *Bacillus subtilis*  $89 \mu\text{mol/L}$  [Kwon et al., 2003]. Im Vergleich dazu wies der Wildtyp *E. coli* einen Protoporphyrin-Gehalt von nur  $0,2 \mu\text{mol/L}$  auf. Eine besondere Bedeutung kommt hierbei der Abnahme der spezifischen Bacteriochlorophyll-Bildung in höheren Zelldichten in *R. rubrum* zu. Theoretische könnten mit maximaler Membranausbildung in Zelldichten von  $A_{660} = 100: > 250 \mu\text{mol/L}$  Bacteriochlorophyll oder andere Tetrapyrrol-Komponenten gebildet werden.

Für den SLYC18-Stamm werden darüber hinaus die erreichten Lycopin-Konzentrationen diskutiert. Maximal wurden spezifische Mengen von  $3,48 \mu\text{mol/g}_{BTM}$  erzielt. Im Vergleich zu rekombinanten *E. coli*-Stämmen fällt dieser Wert nur sehr gering aus. So wurde durch Überexpression der Phosphoenolpyruvat-Synthase (*pps*-Genprodukt) eine spezifische Lycopin-Konzentration von  $46,6 \mu\text{mol/g}_{BTM}$  erreicht [Farmer and Liao, 2001]. Durch die Zugabe von Arabinose wurden in Fedbatch-Kultivierungen maximale Konzentrationen von  $59,6 \mu\text{mol/g}_{BTM}$  und  $2,51 \text{ mM}$  erzielt [Kim et al., 2011].

Im Vergleich zu anderen Produktionsorganismen ist die PHB-Produktion in *R. rubrum* als eher gering einzuschätzen. Mit 78-83 % bildet *R. eutropha* KCTC 2662 mehr als das doppelte der von *R. rubrum* produzierten PHB-Menge [Park and Kim, 2011]. Auch die bisher beobachtete maximale Raum-Zeit-Ausbeute ist mit  $1,0 \frac{\text{g}_{PHB}}{\text{L} \cdot \text{h}}$  ca. 11-fach höher als die bei *R. rubrum* ( $0,085 \frac{\text{g}_{PHB}}{\text{L} \cdot \text{h}}$ ) [Riedel et al., 2011]. Dabei muss zudem berücksichtigt werden, dass die maximalen PHB-Mengen mit *R. rubrum* (34,3 %) auf Acetat-haltigen Medium beobachtet worden ist, dass sich aufgrund der sehr geringen Wachstumsrate von  $\mu_{exp} = 0,052 \text{ h}^{-1}$  nicht für Fedbatch-Kultivierungen eignet. Fedbatch-Kultivierungen werden bevorzugt eingesetzt, um die Produktmengen von Batch-Kultivierungen zu steigern.

Die Wasserstoffbildungsrate in *R. rubrum* unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln ist verglichen mit anderen H<sub>2</sub>-bildenden Bakterien dagegen niedrig. Abhängig vom Aus-

gangsmaterial bilden photosynthetische Bakterien unter phototrophen Bedingungen zwischen 0,1 und 133  $\frac{\text{mmol H}_2}{\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h}}$  [Das and Veziroğlu, 2001]. *R. rubrum* befindet sich mit dem in dieser Arbeit bestimmten Maximalwert von 0,5  $\frac{\text{mmol H}_2}{\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h}}$  im unteren Bereich, obwohl die Wasserstoff-Bildungsrate bei Das and Veziroğlu [2001] für *R. rubrum* unter phototrophen Bedingungen mit 3  $\frac{\text{mmol H}_2}{\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h}}$  angegeben wird. Auch sind mittlerweile genetisch optimierte *E. coli* Stämme konstruiert worden, die mit 13,4  $\frac{\text{mol H}_2}{\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h}}$  (entspricht 300  $\frac{\text{L H}_2}{\text{L} \cdot \text{h}}$ ) wesentlich höhere Mengen H<sub>2</sub> bilden können als andere Bakterien [Yoshida et al., 2005]. Generell werden unter anaeroben, fermentativen Bedingungen höhere H<sub>2</sub>-Bildungsraten beobachtet als unter photosynthetischen Bedingungen [Das and Veziroğlu, 2001]. Aus diesem Grund ist die Eignung von *R. rubrum* als Wasserstoff-Produzent unter den untersuchten Bedingungen fraglich, da die in dieser Arbeit festgestellten H<sub>2</sub>-Bildungsraten unter anaeroben, fermentativen Bedingungen deutlich niedriger sind als zum Beispiel bei *E. coli* und für phototrophe Bedingungen keine höheren Raten zu erwarten sind.

Ein ähnliches Problem ergibt sich auch für die Produktion von Succinat mit *R. rubrum*. Auch hier sind inzwischen erfolgreich genetisch optimierte *E. coli*-Stämme konstruiert worden, welche hohe Titer Succinat produzieren können. Dennoch zeigt *R. rubrum* hier ein erstaunlich hohes Potenzial zur Succinatbildung, welches bisher noch nicht vollständig untersucht ist. Denn verglichen mit dem Wildtyp produziert *R. rubrum* mit Ausbeuten von bis zu  $Y_{(P/S)} = 0,73 \frac{\text{mol Succinat}}{\text{mol Fructose}}$  deutlich höhere Ausbeuten als *E. coli* ( $Y_{(P/S)} = 0,2 \frac{\text{mol Succinat}}{\text{mol Fructose}}$ ) [Chatterjee et al., 2001; Gokarn et al., 1998]. Zusätzlich bildet *E. coli* neben Succinat noch Lactat, Formiat, Acetat und Ethanol. Im Gegensatz dazu bildet *R. rubrum* mit Acetat und Propionat nur zwei Nebenprodukte in signifikanten Konzentrationen. Auch für *C. glutamicum* Wildtyp liegt die Succinatausbeute mit  $Y_{(P/S)} = 0,2 \frac{\text{mol Succinat}}{\text{mol Fructose}}$  geringer als in *R. rubrum*. Hier werden außerdem mit 205 mM sehr hohe Mengen Lactat gebildet (aus 200 mM Glucose) [Inui et al., 2004]. Auch im Vergleich zu *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, einem aus dem Rinderpannen isolierten Bakterium, produziert *R. rubrum* vergleichbar höhere Konzentrationen. Die maximale Succinatkonzentration lag hier bei rund 93 mM Succinat [Lee et al., 2006]. Wie aber bereits bei der Wasserstoffproduktion gezeigt, wurden in den letzten Jahren gezielte genetische Modifikationen in beispielsweise *E. coli* vorgenommen, die zu einer vielfach gesteigerten Succinatproduktion im Vergleich zum Ausgangsstamm führten. So konnten Sánchez et al. [2005] unter anaeroben Bedingungen rund 350 mM mit dem Stamm SBS550MG, der keine Alkoholdehydrogenase ( $\Delta adhE$ ), Lactatdehydrogenase ( $\Delta ldhA$ ) und keine Acetatsynthase/Phosphotransacetylase ( $\Delta ack-pta$ ) mehr besitzt, erzielen. Darüber hinaus wurde der Glyoxylatweg in Anwesenheit von Glucose durch Inaktivierung des Repressorproteins iclR aktiviert, um die NADH-Verfügbarkeit zu erhöhen. Zwischen 622-733 mM Succinat

konnten bisher mit *E. coli* maximal unter aeroben Bedingungen erzielt werden [Jantama et al., 2008].

Die Coenzym Q<sub>10</sub>-Produktivität in *R. rubrum* liegt, verglichen mit alternativen Systemen, im unteren Bereich. Die maximale Coenzym Q<sub>10</sub>-Konzentrationen in *R. rubrum* betrug 5,70  $\mu\text{mol/g}_{BTM}$ . Abhängig vom jeweiligen Mikroorganismus werden in bakteriellen Systemen zwischen 0,33 bis 37,6  $\mu\text{mol/g}_{BTM}$  Coenzym Q<sub>10</sub> erzielt [Jeya et al., 2010]. Hier scheint *E. coli* kein geeigneter Wirtsorganismus zu sein, da selbst durch verschiedene Optimierungen (heterologe Expression des Mevalonatweges aus *Streptococcus pneumoniae*) eine spezifische Konzentration von 2,81  $\mu\text{mol/g}_{BTM}$  Coenzym Q<sub>10</sub> nicht überschritten werden konnte [Zahiri et al., 2006]. Neben *E. coli* weist *Agrobacterium tumefaciens* ein hohes Potenzial zur Coenzym Q<sub>10</sub>-Produktion auf. Mit Hilfe eines definierten Saccharosefeeds konnten maximal spezifische Mengen von 10,7  $\mu\text{mol/g}_{BTM}$  und 725,7  $\mu\text{mol/L}$  erreicht werden [Ha et al., 2007]. Für *R. rubrum* konnte eine erhöhte Q<sub>10</sub>-Produktion unter Verwendung von Tabakhydrolysaten gezeigt werden. Unter Einsatz von 25 % Tabakhydrolysat konnte so die spezifische Q<sub>10</sub>-Menge um das 1,6-fache gesteigert werden (auf 9,27  $\mu\text{mol/g}_{BTM}$ ) [Tian et al., 2010].

Bei der Beurteilung der Produktivitäten muss berücksichtigt werden, dass Fedbatch-Kultivierungen mit Fructose als alleinige C-Quelle nur bis zu Zelldichten von  $A_{660} = 57,2$  durchgeführt worden sind. Zeiger and Grammel [2010] konnten eine maximale Zelldichte von  $A_{660} = 160$  mit *R. rubrum* erreichen. Daher kann vermutet werden, dass das biotechnologische Potenzial von *R. rubrum* vermutlich noch deutlich größer ist. Allerdings wurde in diesen Hochzelldichte-Kultivierungen ein Succinat/Fructose Mischsubstrat verwendet, welches zum einen, durch Succinat, ein kostenintensives Substrat darstellt und zum anderen für die Produktion von Succinat unter anaeroben Bedingungen nicht geeignet ist. Mit Fructose als alleinige C-Quelle könnte das Wachstum auf Zelldichten  $A_{660} < 160$  beschränkt sein, da in jeweils zwei unabhängigen Kultivierungen keine Zelldichte  $A_{660} > 57,2$  erzielt werden konnte. Eine mögliche Ursache könnte in dem niedrigen Gehalt an PHB als Acetyl-CoA-Quelle liegen, was das Wachstum in hohen Zelldichten vermindern könnte. Bekräftigt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass das Wachstum auf einem Acetat/Fructose Mischsubstrat schneller stattfindet als mit Fructose als alleiniger C-Quelle ist (s.a. Abschn. 3.1.1), sowie einer höheren Zelldichte, die mit einem Acetat/Fructose-Mischsubstrat erzielt werden konnte (s.a. Abschn. 3.2.2).

Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit betrifft die Interpretation der gemessenen Verhältnisse  $A_{880}/A_{660}$  und der spektrophotometrischen Vermessung von Bacteriochlorophyll. Es kann aus den  $A_{880}/A_{660}$ -Werten allein nicht direkt geschlussfolgert werden, ob

eine Ausbildung und Invagination photosynthetischer Membranen vorliegt oder nicht. Es wäre denkbar, dass in höheren Zelldichten lediglich eine fehlende Bildung von Bacteriochlorophyll und Carotinoiden vorliegt und sozusagen eine „pigmentlose“ Membran gebildet wird. Das wäre durch Messung des  $A_{880}/A_{660}$ -Verhältnisses nicht festzustellen. Für das Vorliegen einer solchen „pigmentlosen“ Membran spricht die Messung des Coenzym  $Q_{10}$ -Anteils in hohen Zelldichten und die Untersuchung der spontan aufgetretenen, pigmentlosen Mutante Pigment<sup>-</sup>. Es ist nahezu ausgeschlossen, dass das lipophile Molekül außerhalb der Lipiddoppelschicht vorkommt. In beiden Fällen konnte gezeigt werden, dass die Coenzym  $Q_{10}$ -Bildung unabhängig von den Mengen photosynthetischer Membranen ist.

Für die Charakterisierung der Bildung der verschiedenen Produkte in *R. rubrum* spielt der Zentralstoffwechsel eine wesentliche Rolle. Da dieser bisher noch wenig in *R. rubrum* untersucht worden ist, sollte die Bestimmung von intrazellulärer Metabolitenpools, Enzymaktivitäten sowie Kohlenstoffflüssen mittels  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse dazu beitragen, den Stoffwechsel und die Produktbildung in *R. rubrum* besser zu verstehen.

Die Bestimmung intrazellulärer Precursor zeigte großer Veränderungen in Abhängigkeit vom Substrat, Gelöstsauerstoffkonzentration und Phase der Produktbildung. So führte beispielsweise die Substrat-abhängige intrazelluläre Bereitstellung von Acetyl-CoA zu einer unterschiedlichen PHB-Akkumulation unter aeroben Sauerstoffbedingungen, wobei Acetat mit  $1,06 \text{ mmol/g}_{BTM}$  Acetyl-CoA zum höchsten PHB-Anteil führte (34,3 %). Wo hingegen eine starke Abnahme von Acetyl-CoA (um ca. 80 %) nach dem Umschalten von aerobe auf anaerobe Bedingungen mit Fructose als C-Quelle zu beobachten war (nach 30 h Produktionszeit). Hier hat Acetyl-CoA nicht nur für die PHB-Bildung Bedeutung, sondern vor allem für die Neubildung von Lipiden zur Produktion photosynthetischer Membranen und die darin enthaltenen Carotinoide. Auch die Konzentrationen anderer intrazellulärer Metaboliten änderte sich bei einem solchen Umschaltprozess. Während Succinyl-CoA, Succinat, Fumarat und Malat unter aeroben Bedingungen mit Fructose als Kohlenstoffquelle nicht detektierbar waren, stiegen die Konzentrationen dieser Metabolite unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln stark an. Im Gegensatz zu Citrat/Isocitrat und  $\alpha$ -KG, deren Konzentrationen sich unabhängig vom Prozess des Umschaltens nicht veränderten.

Die  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln zeigte nur noch sehr geringe Kohlenstoffflüsse von Citrat zu  $\alpha$ -KG in oxidativer Richtung, während von Malat zu Succinat das Operieren eines reduktiven TCA-Zyklus gezeigt werden konnte. Zwischen Succinyl-CoA und  $\alpha$ -KG wurde ein signifikanter Kohlenstofffluss mit 0 % modelliert, was eine Aktivität der von Buchanan et al. [1967] unter phototrophen Be-

dingungen beobachteten  $\alpha$ -KG-Synthase unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln ausschließt. Auch die  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen unter aeroben Bedingungen (Fructose, Succinat, Succinat/Fructose) konnten zufriedenstellend mit den angewendeten Methoden aufgelöst werden. Es konnte somit erstmalig ein  $^{13}\text{C}$ -Modellierungsalgorithmus in *R. rubrum* zur Erstellung von  $^{13}\text{C}$ -Stoffflusskarten erfolgreich angewendet werden. Innerhalb der Gruppe der Nicht-Schwefel Purpurbakterien wurde dies bisher nur für *Rps. palustris* gezeigt [McKinlay and Harwood, 2011].

Neben dem biotechnologischen Aspekt bot eine Analyse des Zentralstoffwechsels die Möglichkeit die Assimilation von Acetat in *R. rubrum* näher zu charakterisieren. Durch das Fehlen der Isocitratlyase gibt es in *R. rubrum* keinen Glyoxylatweg wie er beispielsweise für *E. coli* und *C. glutamicum* bekannt ist. Es müssen daher alternative Routen für die Verstoffwechslung von Acetat zum Auffüllen des TCA-Zyklus existieren.

Für diese Isocitratlyase-negativen Bakterien (neben *R. rubrum* auch *Rb. sphaeroides*, *Methylobacterium extorquens* und *Streptomyces coelicolor*) wurden in den vergangenen Jahren zwei Wege vorgestellt. Von diesen beiden konnte der Ethylmalonyl-CoA-Weg für *R. rubrum* unter verschiedenen Bedingungen im Rahmen dieser Arbeit durch die Messung der Aktivität der Crotonyl-CoA-Reduktase/Carboxylase gezeigt werden. Dabei konnte eine sauerstoff-abhängige Regulation der Aktivität dieses Schlüsselenzyms festgestellt werden, wobei unter phototroph, anaeroben Bedingungen die Aktivität  $< 5 \frac{\text{nmol}}{\text{mg}_{\text{Protein}} \cdot \text{min}}$  lag und damit ca. 28-fach geringer als die Aktivität bei 10 %  $p\text{O}_2$  unter aeroben Bedingungen. Im Vergleich zu den in *Rb. sphaeroides* gemessenen Werten ( $700 \frac{\text{nmol}}{\text{mg}_{\text{Protein}} \cdot \text{min}}$ , [Erb et al., 2007]) sind die Aktivitäten der Crotonyl-CoA-Reduktase/Carboxylase in *R. rubrum* somit wesentlich geringer (rund Faktor 150). Außerdem konnten Schlüsselmetabolite wie Ethylmalonyl-CoA und Methylsuccinyl-CoA ausschließlich beim Wachstum auf Acetat detektiert werden. Beim Wachstum auf Succinat schlug sowohl die Messung der Aktivität der Crotonyl-CoA-Reduktase/Carboxylase als auch der Nachweis der Metabolite Ethylmalonyl-CoA und Methylsuccinyl-CoA fehl.

Die zweite, von Ivanovsky et al. [1997] vorgeschlagene Route zur Acetatassimilation, der Citramalatweg, konnte für *R. rubrum* nicht bestätigt werden. Unter aeroben und mikroaeroben Bedingungen konnte in beiden Fällen keine Aktivität gemessen werden. Lediglich für phototrophe Bedingungen wurde eine sehr geringe Aktivität von  $< 3 \frac{\text{nmol}}{\text{mg}_{\text{Protein}} \cdot \text{min}}$  festgestellt.

Offen ist allerdings, ob der Ethylmalonyl-CoA-Weg eine annehmbare Alternative darstellt, da die Aktivität der Crotonyl-CoA-Reduktase/Carboxylase unter anaeroben, phototrophen Bedingungen mit  $< 5 \frac{\text{nmol}}{\text{mg}_{\text{Protein}} \cdot \text{min}}$  ebenfalls vergleichsweise gering ausfiel. Hier könnten die beiden Ferredoxin-abhängigen Reaktionen der Pyruvatsynthase und  $\alpha$ -KG-

Synthese bzw. der RuBisCO eine Rolle spielen, welche in dieser Arbeit allerdings nicht weiter untersucht wurden. Eine Messung der Aktivität dieser hoch sauerstoffempfindlichen Enzyme gestaltet sich im Experiment schwierig, da die Enzyme in Anwesenheit von Sauerstoff schnell inaktiviert werden.

Für einen Acetatassimilations-Weg, der unabhängig vom Ethylmalonyl-CoA-Weg und Citramalatweg ist, können die Ergebnisse der extrazellulären Itaconatzugabe angeführt werden. Durch Itaconat wird in *R. rubrum* ein essenzielles Enzym des Ethylmalonyl-CoA-Weges und Citramalatweges, die Propionyl-CoA-Carboxylase, gehemmt. Das in Anwesenheit von Itaconat vorhandene Wachstum unter anaeroben, phototrophen Bedingungen, zeigt sehr deutlich, dass alternative Wege zum Ethylmalonyl-CoA-Weg und zum Citramalatweg in *R. rubrum* existieren müssen. Unter aeroben Bedingungen konnte eine sehr deutliche Hemmung des Wachstums auf Acetat nach Itaconatzugabe beobachtet werden. Für eine vollständige Aufklärung der Acetatassimilation müssen jedoch weitere Untersuchungen erfolgen.





## 5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das biotechnologische Potenzial des fakultativ photosynthetischen Bakteriums *R. rubrum* unter Sauerstoff-limitierenden Bedingungen im Dunkeln untersucht. Diese Untersuchungen wurden mit Methoden der modernen Metabolomanalyse zur Charakterisierung des zentralen Kohlenstoffwechsels kombiniert.

Eine genaue Analyse der Gründe, die zur Inhibierung der Bildung photosynthetischer Membranen in hohen Zelldichten führen, ist für biotechnologische Anwendungen von *R. rubrum* ausschlaggebend. Die mit der Ausbildung photosynthetischer Produkte assoziierten Produkte besitzen das größte Potential für eine zukünftige industrielle Anwendung. Diese reichen von der biotechnologischen Herstellung von Pigmenten für die Nahrungsmittelindustrie (Bacteriochlorophyll, Carotinoide) bis hin zur Produktion von Coenzym Q<sub>10</sub> und rekombinanten Membranproteinen im medizinischen Bereich.

Eine Möglichkeit der Aufklärung der Inhibierung ist der Ausschluss eventueller Limitationen durch Vitamine oder Spurenelemente aufgrund eines veränderten Bedarfs in hohen Zelldichten. So könnte eine mögliche Ursache der fehlenden Ausbildung von Membranen und der in diesem Zusammenhang beobachteten rückläufigen Wachstumsrate in einer veränderten Nährstoffkombination liegen. Aus Gründen des Aufwands war es nicht möglich, alle einzelnen Spurenelemente des Nährmediums in ihrer Konzentration zu bestimmen. Es sollte überprüft werden, ob eventuell eine Überfütterung einzelner Elemente vorliegt. Ein Überangebot von Magnesium beispielsweise könnte die von Zeiger and Grammel [2010] beobachtete Bildung von Mg-PPIXMe in Hochzelldichte-Kultivierungen bewirken. Eine erhöhte Bildung dieser Vorstufe könnte verschiedenste *feedback*-Regulationen weiterer Enzyme hervorrufen, die an der Biosynthese von Bacteriochlorophyll beteiligt sind. Für *Rb. sphaeroides* ist dagegen für normale Wachstumsbedingungen die Ausscheidung von Mg-PPIXMe in der Literatur beschrieben [Jones, 1963]. Der genaue Grund für diese Beobachtung ist bislang nicht Gegenstand detaillierter Untersuchungen gewesen. Es sollte jedoch eine exakte Messung der verschiedenen Vorstufen mittels HPLC-MS erfolgen, um die Vorstufen in *R. rubrum* während der Hochzelldichte-Kultivierung zu charakterisieren.

Darüber hinaus sollte eine Validierung des Aufbaus von Bioreaktor und Begasung erfolgen. Aufgrund der festgestellten Abhängigkeit des Wachstums und der Bildung photosynthetischer Membranen von der CO<sub>2</sub>-Zufuhr, muss in hohen Zelldichten eine ausreichende Versorgung mit Bicarbonat oder Begasung mit CO<sub>2</sub> gewährleistet werden. Das könnte beispielsweise mit Hilfe einer pCO<sub>2</sub>-Elektrode überprüft und entsprechend optimiert wer-

den.

Des Weiteren deuten aktuelle Ergebnisse der Arbeitsgruppe darauf hin, dass die Ausbildung photosynthetischer Membranen in hohen Zelldichten durch die Bildung von verschiedenen Homoserinlactonen im Sinne eines *quorum sensing*-Phänomens verhindert wird. Ein entsprechender kontinuierlicher Prozess unter Zellrückhaltung zeigte dahingehend erste vielversprechende Ergebnisse, muss jedoch hinsichtlich Zelldichte und Austauschrate weiter optimiert werden. Für das Erreichen höherer Zelldichten sollte ein System mit einer vergrößerten Filterfläche ( $> 200 \text{ cm}^2$ ) verwendet werden. Auch sollte in ein autoklavierbares Einspannmodul investiert werden, das im Vergleich zur Flüssigdesinfektion einen zeitsparenden Aufbau ermöglicht und das Risiko einer Kontamination bei längeren Kultivierungszeiten verringert. Eine zweite Möglichkeit die Bildung von Homoserinlactonen zu verhindern, könnte in der Deletion der Homoserinlacton-Synthase bzw. der Überexpression einer Homoserinlactonase bestehen. Die vorgeschlagenen Maßnahmen führen zur Entfernung, Unfähigkeit zur Produktion bzw. zum Abbau der Homoserinlactone.

Im Detail aufgeklärt werden sollte, ob in der pigmentlosen Mutante Pigment<sup>-</sup> und bei Zellen in hohen Zelldichten eine Invagination von Membranen erfolgt. Tatsächlich wird durch die Messung der Absorption bei  $A_{880}$  nur der Lichtsammelkomplex (B880) detektiert. Dabei kann keine konkrete Aussage über das Vorhandensein von Membraninvaginationen getroffen werden. Demnach wäre es auch möglich, dass lediglich die Biosynthese von Bacteriochlorophyll a und Carotinoiden inhibiert ist. Das Vorhandensein von Membraninvaginationen könnte durch eine elektronenmikroskopische Aufnahme der Zellen nachgewiesen werden, wo Invaginationen der Zellmembran visuell sichtbar werden würden. Wäre dies der Fall, so könnte zumindest das Potenzial des *R. rubrum* Wildtyps für die Produktion von Coenzym Q<sub>10</sub> und Membranproteinen in hohen Zelldichten genutzt werden.

Als Produktionsorganismus für PHB eignet sich *R. rubrum* nicht. Hier würde auch eine Optimierung des Stammes durch *metabolic engineering* keinen Sinn ergeben, da die PHB-Bildung in *R. rubrum* stark durch das Substrat kontrolliert wird. Mit Acetat konnten zwar die höchsten PHB-Anteile (34,3 %) erreicht werden, jedoch eignet sich Acetat aufgrund des nur sehr langsamen Wachstums ( $\mu_{exp} = 0,052 \text{ h}^{-1}$ ) nicht für Fedbatch-Kultivierungen. Eine Optimierung der PHB-Produktion würde aus diesem Grund nicht erfolversprechend sein.

Die Konstruktion diverser Stoffwechselmutanten führte in den letzten Jahren zu einer enormen Optimierung der Succinatproduktion mit *E. coli*. Der Wildtyp *E. coli* bildet neben Succinat noch Lactat, Formiat, Acetat und Ethanol. *R. rubrum* scheidet dagegen nur Acetat und Propionat als zusätzliche organische Säuren aus. Die Verhinderung dieser Nebenproduktbildung könnte daher mit einer einfachen Doppelmutante bewerkstelligt

werden (z.B. Deletion von Acetatkinase und Methylmalonyl-CoA Mutase). Würde es in *R. rubrum* gelingen die Bildung der Nebenprodukte Acetat (max. 107 mM) und Propionat (max. 68 mM) zu verhindern, ließe sich die maximalen Succinatkonzentrationen deutlich steigern (bis auf 462 mM). Würde der Prozess darüber hinaus zu Zelldichten von  $A_{660} > 57,2$  geführt, wäre die Succinatbildung konkurrenzfähig zu etablierten Prozessen mit *E. coli* (622-733 mM maximal).

Die Produktion von Succinat in *R. rubrum* könnte weiter durch eine Limitation des Wachstums unter anaeroben Bedingungen gesteigert werden. Somit würde weniger Kohlenstoff in die Bildung von Biomasse fließen und könnte stattdessen zur Succinatbildung verwendet werden. Darüber hinaus könnte auch eine externe Zufuhr von Reduktionsäquivalenten, z.B. in Form von  $H_2$ , in Betracht gezogen werden. Durch stöchiometrische Modellierung konnte gezeigt werden, dass dadurch die Succinatausbeute von  $Y_{(P/S)} = 1,71 \frac{\text{mol}_{\text{Succinat}}}{\text{mol}_{\text{Fructose}}}$  auf  $Y_{(P/S)} = 2,0 \frac{\text{mol}_{\text{Succinat}}}{\text{mol}_{\text{Fructose}}}$  angehoben werden kann.

Bei der Modellierung der  $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen traten Probleme bei der Anpassung der Markierungsdaten bei der Acetat/Fructose-Kultivierung unter aeroben Bedingungen, der mikroaeroben Kultivierung mit Succinat/Fructose und des anaeroben, phototrophen Experimentes mit Succinat auf. In allen drei Fällen konnte keine zufriedenstellende Anpassung der  $^{13}\text{C}$ -Markierungsverhältnisse mit dem aufgestellten Stoffwechselnetzwerk erreicht werden. Hier könnten bisher noch nicht etablierte Stoffwechselrouten und -reaktionen die Ursache für die Probleme bei der Anpassung darstellen. Offenkundig sind Reaktionen betroffen, die mit mikroaeroben und anaeroben, phototrophen Bedingungen bzw. mit Acetat als Substrat zusammenhängen. Diese Zusammenhänge geben erste Hinweise an welcher Stelle das Stoffwechselnetzwerk überprüft werden sollte.

Ebenfalls nicht vollständig aufgeklärt werden konnte der Weg der Acetatassimilation in *R. rubrum* unter anaeroben, phototrophen Bedingungen. Sowohl der Ethylmalonyl-CoA-Weg als auch der Citramalatweg konnten aufgrund sehr geringer Aktivitäten der jeweiligen Schlüsselenzyme nicht als Assimilationsrouten für Acetat bestätigt werden. Die Aktivität der alternativen Enzyme Pyruvatsynthase und  $\alpha$ -KG-Synthase können aufgrund ihrer Sauerstoffsensitivität nur unzuverlässig bestimmt werden. Hier sollte in zukünftigen Projekten durch die Konstruktion verschiedener Deletionsmutanten herangezogen werden, um den Weg der Acetatassimilation in *R. rubrum* definitiv aufzuklären.



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von <i>R. rubrum</i> S1 Wildtyp (links) und mit Nilrot angefärbte Polyhydroxybutyrat-Granula in <i>R. rubrum</i> S1 Wildtyp (rechts). . . . .	1
1.2	Phylogenetische Systematik ausgewählter photosynthetischer Bakterien. . .	2
1.3	Der RC-LH-1 Komplex in <i>R. rubrum</i> nach Fotiadis et al. [2004]. . . . .	4
1.4	Schema des Photosynthese-Apparates in Purpurbakterien nach Hu et al. [1998]. . . . .	5
1.5	Schema des Embden-Meyerhof-Parnas-Weges und der Gluconeogenese, sowie die Reaktion der F1P-Aldolase. . . . .	13
1.6	Schema des nicht-oxidativen Zweiges des Pentosephosphatweges. . . . .	14
1.7	Allgemeines Schema des TCA-Zyklus. . . . .	16
1.8	Calvin-Benson-Bassham-Zyklus in <i>R. rubrum</i> . . . . .	18
1.9	Reduktive TCA-Zyklus in <i>R. rubrum</i> . . . . .	19
1.10	Schematische Übersicht der beiden vorgeschlagenen Wege für die Acetatasimilation in Isocitratlyase-negativen Bakterien. . . . .	21
1.11	Anaplerotische Reaktionen im Zentralstoffwechsel. . . . .	21
1.12	Allgemeines Schema des DOXP-Weges und Mevalonat-Weges in der Zelle. .	26
1.13	Biosynthese von Spirilloxanthin ausgehend von Lycopin in <i>R. rubrum</i> . . . .	27
1.14	Biosynthese von Protoporphyrin IX aus Succinyl-CoA und Glycin in <i>R. rubrum</i> . . . . .	30
1.15	Strukturformel von Bacteriochlorophyll $a_{Gg}$ (links) und Vitamin B <sub>12</sub> (rechts) in <i>R. rubrum</i> . Vitamin B <sub>12</sub> aus [Watanabe, 2007]. . . . .	32
1.16	Strukturformel von Coenzym Q <sub>10</sub> . . . . .	33
1.17	Strukturformel von PHB mit <i>n</i> -Kettenlängen. . . . .	34
1.18	Biosynthese von PHB in <i>R. rubrum</i> . Modifiziert nach [Moskowitz and Merrick, 1969]. . . . .	35
1.19	Regulation und Kontrolle der Energieproduktion, Wachstum und PHB-Bildung in <i>R. rubrum</i> . Modifiziert nach [Fuller, 1995]. . . . .	36
1.20	Reaktionsgleichung für die Bildung von molekularem Wasserstoff H <sub>2</sub> in Grünalgen und Cyanobakterien. . . . .	37
1.21	Reaktionsgleichung für die Nitrogenase-Reaktion in <i>R. rubrum</i> . . . . .	38
2.1	DASGIP Kultivierungssystem der Firma DASGIP. . . . .	50

2.2	Braun Biostat C Fermentationsanlage der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH. . . . .	53
2.3	Cross-Flow Sartocoen Slice 200 Einspannvorrichtung (links) und Hydrosart Cross-Flow Membran, 0,2 $\mu\text{m}$ (rechts). . . . .	56
2.4	Schematischer Aufbau der kontinuierlichen Kultivierungen unter Zellrückhaltung. . . . .	57
2.5	Saure Hydrolyse durch $\text{H}_2\text{SO}_4$ von PHB zu Crotonsäure. . . . .	65
2.6	Lineare Korrelation zwischen der gemessenen Absorption $\frac{A_{880}}{A_{660}}$ und des Bacteriochlorophyll-Gehalts in $\mu\text{mol/g}_{BTM}$ . . . . .	66
2.7	Absorptionsspektren von Lycopin in Chloroform in verschiedenen Konzentrationen. . . . .	66
2.8	Lineare Korrelation zwischen der gemessenen Absorption $\frac{A_{880}}{A_{660}}$ und des Lycopin-Gehalts in $\mu\text{mol/g}_{BTM}$ . . . . .	67
2.9	NADH- und NADPH-Verhältnisse bei verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Extraktionsmittels bei Direktextraktion und bei $-80^\circ\text{C}$ eingefrorenen Pellets. . . . .	70
3.1	Wachstum von <i>R. rubrum</i> auf verschiedenen alternativen Kohlenstoffquellen unter aeroben Bedingungen im Schüttelkolben. . . . .	80
3.2	Wachstumsraten und Biomasseausbeutekoeffizienten der exponentiellen Phase auf M2SF-Medium mit verschiedenen Stickstoffquellen im Schüttelkolben. . . . .	81
3.3	Wachstumsraten aus der exponentiellen Wachstumsphase von <i>R. rubrum</i> unter aeroben Bedingungen auf M2SF-Medium mit variierten Ammoniumkonzentrationen im Schüttelkolben. . . . .	83
3.4	Wachstumsraten aus der exponentiellen Wachstumsphase von <i>R. rubrum</i> unter aeroben Bedingungen auf M2SF-Medium mit variierten Phosphatkonzentrationen im Schüttelkolben. . . . .	84
3.5	Biomasseausbeutekoeffizienten $\frac{g_{BTM}}{\text{mmol}_{\text{Succinat}}}$ bezogen auf Succinat bei verschieden hohen Konzentrationen an <i>p</i> -ABA. . . . .	86
3.6	Wachstumsraten von <i>R. rubrum</i> auf verschiedenen C-Quellen in Abhängigkeit vom $p\text{O}_2$ . . . . .	87
3.7	Wachstum von <i>R. rubrum</i> unter aeroben Bedingungen im Dunkeln auf M2F-Medium mit unterschiedlicher $\text{CO}_2$ -Zufuhr. . . . .	88
3.8	Verlauf von $A_{660nm}$ , Wachstumsrate und $\text{CO}_2$ -Begasung innerhalb eines aeroben Fedbatch-Prozesses. . . . .	90
3.9	Aerobe Fedbatch-Kultivierung mit <i>R. rubrum</i> mit Fructose als alleinige C-Quelle und Zuführung von $\text{CO}_2$ durch eine pH-Regelung mit $\text{K}_2\text{CO}_3$ . . .	92

3.10	Aerobe Fedbatch-Kultivierung mit <i>R. rubrum</i> auf Acetat/Fructose-Mischsubstrat. . . . .	93
3.11	Aerobe Fedbatch-Kultivierung mit <i>R. rubrum</i> auf Succinat/Fructose-Mischsubstrat. Dargestellt ist der Verlauf von $A_{660}$ sowie der Verlauf der Nährstoffe Fructose, Succinat, Ammonium, Phosphat und <i>p</i> -ABA. . . . .	95
3.12	Darstellung der kaskadenartigen Begasungs-Rührer- $pO_2$ -Regelung in der Regelung der Gelöstsauerstoffkonzentration beim Biostat C15-2K Reaktor bis Stunde 31. . . . .	97
3.13	Aktivität der Malat-Dehydrogenase im Mediums-Überstand bezogen auf die jeweils vorliegende optische Dichte $A_{660}$ und der Verlauf derselbigen in einer Fedbatch-Kultivierung mit Succinat/Fructose. . . . .	98
3.14	Verlauf von $A_{660}$ (A) und $\frac{A_{880}}{A_{660}}$ (B) bei einem aerob/mikroaeroben 2-Stufen-Prozess auf M2SF-Medium mit aerober und mikroaerober Startkultur. . . . .	100
3.15	Verlauf von $A_{660}$ (A) und $\frac{A_{880}}{A_{660}}$ (B) bei einem aerob/mikroaeroben 2-Stufen-Prozess mit Succinat/Fructose bzw. Fructose. . . . .	104
3.16	Verlauf von $A_{660}$ (A) und $\frac{A_{880}}{A_{660}}$ (B) bei einem aerob/mikroaeroben und aerob/anaeroben 2-Stufen-Prozess mit Fructose als alleinige C-Quelle. . . . .	106
3.17	Wachstumsraten und Bildungsraten für die organischen Säuren Succinat, Acetat, Propionat und Fumarat sowie Kohlenstoffbilanzen und Bacteriochlorophyll/Raum-Zeit-Ausbeuten und Bacteriochlorophyll/Substrat-Ausbeuten für anaerobe Produktionsbedingungen mit Fructose als alleinige C-Quelle. . . . .	110
3.18	Verteilung der organischen Säuren unter anaeroben Bedingungen und verschiedener $CO_2$ -Zufuhr nach 24 h Produktionszeit. . . . .	111
3.19	Phänotypische Erscheinung (links) und Ganzzellspektren (rechts) der Stämme SLYC18, G-9 und Pigment <sup>-</sup> im Vergleich zum Wildtyp WT S1. . . . .	115
3.20	Produktbildung der verschiedenen Stämme sowie extrazelluläre Succinat/Acetat-Verhältnisse, Formiatkonzentrationen und $Q_{10}$ -Redoxzustände. . . . .	119
3.21	Maximale spezifische (A) und volumetrische (B) Bacteriochlorophyll-Konzentrationen sowie <i>RZA</i> (C) und Ausbeutekoeffizienten $Y_{(P/S)}$ (D) für verschiedene Umschalt-Zelldichten im anaeroben Prozess mit Fructose als alleinige C-Quelle. . . . .	123
3.22	Maximal volumetrische und maximal spezifische Produktivitäten für die Bildung von molekularem Wasserstoff in <i>R. rubrum</i> unter anaeroben Bedingungen mit Fructose bei verschiedenen Umschalt-Zelldichten. . . . .	125

---

3.23	Spezifische Produktivität der organischen Säuren Succinat, Acetat und Propionat unter anaeroben Bedingungen mit Fructose als C-Quelle bei verschiedenen Umschalt-Zelldichten nach 48 h Produktionsphase (links). Extrazelluläres molares Verhältnis $\frac{Succ}{Ace}$ bei verschiedenen Umschalt-Zelldichten (rechts). . . . .	126
3.24	Spezifische Coenzym Q <sub>10</sub> -Produktion und A <sub>880</sub> /A <sub>660</sub> -Verhältnis in <i>R. rubrum</i> Wildtyp S1 (A) und der spontan aufgetretenen Mutante Pigment <sup>-</sup> (B) beim aerob/anaeroben Umschaltprozess mit Fructose als alleiniger C-Quelle.	130
3.25	Bacteriochlorophyllbildung im Fedbatch-Prozess und Perfusionsprozess mit Fructose als alleiniger C-Quelle unter mikroaeroben Sauerstoffbedingungen.	131
3.26	Reaktionen des zentralen Kohlenstoffwechsels in <i>R. rubrum</i> . . . . .	136
3.27	Intrazelluläre Metabolitenkonzentrationen des Zentralstoffwechsels in <i>R. rubrum</i> unter aeroben Bedingungen mit verschiedenen C-Quellen. . . . .	139
3.28	Intrazelluläre Metabolitenkonzentrationen des Zentralstoffwechsels in <i>R. rubrum</i> beim Umschalten von aerob auf mikroaerob mit M2SF-Medium (A) und von aerob auf anaerob mit M2F-Medium (B). . . . .	146
3.29	Energy Charge, PHB-Gehalt sowie NADH- und NADPH-Verhältnisse im 2-Stufen-Prozess beim Umschalten von aerob auf mikroaerob (M2SF) bzw. aerob auf anaerob (M2F) . . . . .	149
3.30	Relative intrazelluläre Metabolitenkonzentrationen in <i>R. rubrum</i> unter aeroben Wachstumsbedingungen und anaeroben Produktionsbedingungen im Dunkeln. . . . .	151
3.31	Übersicht über die durchgeführten <sup>13</sup> C-Markierungsexperimente. . . . .	161
3.32	<sup>13</sup> C-Stoffflussanalyse mit Fructose (A), Succinat (B) und Succinat/Fructose (C) als C-Quellen. . . . .	162
3.33	<sup>13</sup> C-Stoffflussanalyse mit Fructose als alleinige C-Quelle unter A: aeroben Sauerstoffbedingungen und B: anaeroben Sauerstoffbedingungen. . . . .	163
3.34	Wachstum von <i>R. rubrum</i> auf Acetat als alleinige C-Quelle unter aeroben Bedingungen ( <i>p</i> O <sub>2</sub> = 10 %) mit verschiedenen CO <sub>2</sub> -Konzentrationen (1 %, 2 %, 5 % und 10 %). . . . .	167
3.35	CCR-Aktivitäten unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen bei 1 % CO <sub>2</sub> auf Acetat als alleinige C-Quelle. . . . .	168
3.36	Intrazelluläre Konzentrationen von Metaboliten des zentralen Kohlenstoffwechsels beim Wachstum auf Acetat in Abhängigkeit von der Sauerstoffzufuhr und Illumination. . . . .	169
3.37	Effekt von extrazellulärem Itaconat auf das aerobe und anaerob, phototrophe Wachstum von <i>R. rubrum</i> im Schüttelkolben bzw. Pyrexflaschen. . . .	172



5.1 PCR des Rru\_A0324 Gens (Länge: 2141) mit zugehörigen Promoterabschnitt (+200 bp) von *R. rubrum* S1 (links) und *R. rubrum* G9 (rechts).  
Gesamtlänge des amplifizierten Genabschnitts: 2241 bp. . . . . 207



# Tabellenverzeichnis

1.2	Durchschnittlicher Preis für verschiedene Kohlenhydrate. Wenn nicht anders angegeben aus: Peters [2006]. . . . .	8
1.3	Übersicht über die Aktivitäten verschiedener Enzyme des TCA-Zyklus auf Malat als C-Quelle im Dunkeln und im Licht mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als Stickstoffquelle. . . . .	17
1.4	Aktivitäten von Enzymen des reduktiven TCA-Zyklus in <i>R. rubrum</i> unter phototrophen Bedingungen [Buchanan et al., 1967]. . . . .	20
2.1	Übersicht über die untersuchten Stämme und Referenzen. . . . .	43
2.2	Zusammensetzung der verwendeten Einzelsubstrat-Medien. . . . .	44
2.3	Zusammensetzung der verwendeten Mischsubstrat-Medien. . . . .	44
2.4	Zusammensetzung der Vitaminlösung. . . . .	45
2.5	Zusammensetzung der Spurenelementelösung . . . . .	46
2.6	Ermittelte Dichten der für Fedbatch- und 2-Stufen-Prozessen verwendeten Feedlösungen. . . . .	46
2.7	Zusammensetzung der Einzelsubstrat-Feedlösungen für die Zufütterung von Acetat. . . . .	47
2.8	Fructosefeedlösung für die Zufütterung von Fructose. . . . .	47
2.9	Kohlenstoff-Feedlösung für die Zufütterung von Succinat/Fructose. . . . .	47
2.10	Feedlösungen für mikroaerobe Kultivierungen unter Zellrückhaltung mit Fructose als alleinige C-Quelle. . . . .	48
2.11	Zusammensetzung der $^{13}\text{C}$ -Substrate für die $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente. . . . .	52
2.12	Spezifikationen und Parameter des verwendeten Micro-GC Systems zur Messung des Fermenterabgases. . . . .	55
2.13	Prozentuale Verluste beim <i>metabolic quenching</i> mit $-50\text{ }^\circ\text{C}$ Methanol in <i>R. rubrum</i> bei aeroben Wachstum auf M2SF-Medium. . . . .	59
2.14	Faktor $\frac{gBTM}{A_{660nm}}$ für verschiedene Kohlenstoff-Substrate und Sauerstoffbedingungen für <i>R. rubrum</i> im Dunkeln. . . . .	60
2.15	Konzentrationen der Standards zur Bestimmung der organischen Säuren Formiat, Malat, Acetat, Fumarat, Succinat und Propionat mit HPLC. . . . .	61
2.16	Spezifikationen und Parameter der HPLC zur Bestimmung der organischen Säuren. . . . .	61

2.17	Übersicht über die Spezifikationen und Parameter des verwendeten LC- MC/MS-Systems. . . . .	62
2.18	Übersicht über die verwendeten Reagenzien und Lösungen zur Phosphat- bestimmung in Kulturüberständen von <i>R. rubrum</i> . . . . .	64
2.19	Schema über den Ablauf der Phosphatmessung in Kulturüberständen von <i>R. rubrum</i> . . . . .	64
2.20	Spezifikationen der LC-Methode zur Bestimmung von oxidiertem und re- duziertem Coenzym Q <sub>10</sub> . . . . .	68
2.21	Pipettierschema der Messung von NAD <sup>+</sup> /NADH mit ADH für die 96-Well- Mikrotiterplatte. . . . .	69
2.22	Zusammensetzung des Bradford-Reagenz. . . . .	71
3.1	Wachstumsraten, Substrataufnahmeraten und Biomasseausbeutekoeffizi- enten für die Einzelsubstratmedien M2A, M2S und M2F unter aeroben Sauerstoffbedingungen im Dunkeln. . . . .	78
3.2	Wachstumsraten, Substrataufnahmeraten und Biomasseausbeutekoeffizi- enten für die Mischsubstratmedien M2SF und M2AF unter aeroben Be- dingungen im Dunkeln. . . . .	79
3.3	Wachstumsbeschreibende Parameter für Ammonium und Phosphat in M2SF-Medium unter aeroben Bedingungen im Schüttelkolben. . . . .	84
3.4	Wachstumsraten, Fructoseaufnahmeraten und CO <sub>2</sub> -Ausscheideraten von <i>R. rubrum</i> beim Wachstum auf M2F-Medium als alleinige C-Quelle un- ter aeroben Bedingungen im Dunkeln. . . . .	88
3.5	<i>RZA</i> , maximale BTM, Biomasseausbeutekoeffizienten sowie maximale und durchschnittliche Wachstumsraten der Fedbatch-Kultivierungen mit Fru- ctose als alleinige C-Quelle und Acetat/Fructose bzw. Succinat/Fructose als Mischsubstrat. . . . .	99
3.6	Wachstumsbeschreibende Parameter für die mikroaerobe Phase in Abhän- gigkeit von der Vorkultur. . . . .	101
3.7	Bacteriochlorophyllkonzentrationen, <i>RZA</i> und Produktausbeuten in Ab- hängigkeit von der Vorkultur in 2-Stufen-Batch-Prozessen unter mikroae- roben Sauerstoffbedingungen (Redoxpotenzial = -350 mV) im Dunkeln auf M2SF-Medium. . . . .	102
3.8	Abgaszusammensetzung im mikroaeroben 2-Stufen-Prozess in Abhängig- keit von der Vorkultivierung hinsichtlich H <sub>2</sub> und CO <sub>2</sub> . . . . .	103
3.9	Bacteriochlorophyllkonzentrationen, <i>RZA</i> und Produktausbeuten in Ab- hängigkeit von der Kohlenstoffquelle unter mikroaeroben Sauerstoffbedin- gungen (Redoxpotenzial = -350 mV) im Dunkeln. . . . .	104

3.10	Bacteriochlorophyllkonzentrationen, <i>RZA</i> und Produktausbeuten in Abhängigkeit von der Sauerzufuhr auf Fructose als alleinige C-Quelle im Dunkeln. . . . .	107
3.11	Gebildete Mengen Succinat und H <sub>2</sub> unter mikroaeroben und anaeroben Sauerstoffbedingungen mit Fructose als alleinige C-Quelle. . . . .	108
3.12	Bildung von Succinat, Bacteriochlorophyll und H <sub>2</sub> bei verschiedenen Strategien zur CO <sub>2</sub> -Zufuhr. . . . .	112
3.13	Zusammenfassung der Ergebnisse aus Batch-Kultivierungen mit <i>R. rubrum</i> im Dunkeln auf M2SF- und M2F-Medium unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen (mikroaerob und anaerob). . . . .	113
3.14	Übersicht der einzelnen Stämme hinsichtlich ihrer Pigmentbildung und Bacteriochlorophyll-Mengen für WT S1, G-9 und SLYC18 bzw. Lycopin-Mengen im SLYC18-Stamm. . . . .	116
3.15	Extrazelluläre Succinat-Akkumulation, -Ausbeutekoeffizient und -Ausscheiderraten nach 24 h in den Stämmen WT S1, SLYC18, G-9 und Pigment <sup>-</sup> . . .	118
3.16	Maximale H <sub>2</sub> -Bildungsraten und Gesamt-Wasserstoffproduktion in den Stämmen WT S1, G-9 und Pigment <sup>-</sup> von <i>R. rubrum</i> unter anaeroben Bedingungen mit Fructose als alleinige C-Quelle. . . . .	121
3.17	Produktion von Succinat in <i>R. rubrum</i> unter anaeroben Bedingungen mit Fructose bei verschiedenen Umschalt-Zelldichten. . . . .	127
3.18	Produktion von PHB in <i>R. rubrum</i> unter anaeroben Bedingungen mit Fructose bei verschiedenen Umschalt-Zelldichten. . . . .	128
3.19	Intrazelluläre Coenzym Q <sub>10</sub> -Produktivitäten in <i>R. rubrum</i> unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln. . . . .	129
3.20	Membranabnahmeraten und exponentielle Wachstumsraten bei verschiedenen Austauschraten des Perfusions-Prozesse im Vergleich zum Fedbatch-Verfahren. Die Membranabnahmeraten und die Wachstumsraten wurden mind. über einen Zeitraum von 10 h berechnet. Daten jeweils aus 1 Kultivierung. Fedbatch: 2 Kultivierungen. Biostat CT5-2 Fermentationsparameter. 3,5 L Arbeitsvolumen. . . . .	133
3.21	Zusammenfassung maximaler Produktivitäten der einzelnen Produkte Bacteriochlorophyll, Lycopin, PHB, Coenzym Q <sub>10</sub> , Succinat sowie H <sub>2</sub> . . . . .	134
3.22	Wachstumsraten, intrazelluläre Intermediate des PHB-Biosyntheseweges, Energy Charge, NAD(P)H- und Coenzym Q <sub>10</sub> -Redoxstatus sowie der PHB-Gehalt in Abhängigkeit vom Substrat unter aeroben Bedingungen im Dunkeln. . . . .	142

3.23 Extrazelluläre Raten der 2-Stufen-Prozesse aerob/mikroaerob auf M2SF-Medium und aerob/anaerob auf M2F-Medium. . . . .	145
3.24 Intrazelluläre Precursor-Konzentrationen bei den 2-Stufen-Prozessen aerob/mikroaerob mit Succinat/Fructose und aerob/anaerob mit Fructose als C-Quelle. . . . .	150
3.25 Biomassezusammensetzung (in %) für die theoretische Modellierung in <i>R. rubrum</i> unter aeroben und anaeroben Bedingungen mit Fructose als C-Quelle. . . . .	154
3.26 Theoretische Modellierung der Succinatausbeute in <i>R. rubrum</i> mit dem <i>CellNetAnalyzer</i> . . . . .	155
3.27 Theoretische Modellierung der Hydroxybutyrat-Produktion in <i>R. rubrum</i> mit dem <i>CellNetAnalyzer</i> [Klamt et al., 2007, 2003]. . . . .	158
3.28 Maximale Produktausbeuten des gesamten stöchiometrischen Netzwerkes auf verschiedenen Einzelsubstraten mit dem <i>CellNetAnalyzer</i> [Klamt et al., 2007, 2003]. . . . .	160
3.29 Residuen der $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalyse im Vergleich zum berechneten Residuum des $\chi^2$ -Anpassungstests. . . . .	165
3.30 Gemittelte Membranbildungsraten von zwei unabhängigen mikroaeroben Kultivierungen für $^{13}\text{C}$ -Stoffflussanalysen. . . . .	166
5.1 Abkürzung, Übergang im MS/MS und Retentionszeit der gemessenen Metabolite nach der Methode von Luo et al. [2007] für Bestimmung intrazellulärer Metabolitenkonzentrationen. . . . .	197
5.2 Abkürzung, Übergang im MS/MS und Retentionszeit der nicht in [Luo et al., 2007] gemessenen Metabolite. . . . .	198
5.3 Abkürzung, Übergang im MS/MS und Retentionszeit der $^{13}\text{C}$ -markierten Metabolite nach der Methode von Luo et al. [2007]. . . . .	199
5.4 Abkürzung, Übergang im MS und Retentionszeit der nicht in [Luo et al., 2007] gemessenen $^{13}\text{C}$ -markierten Metabolite. . . . .	200

# Anhang A1: Übersicht gemessene Metabolite mit LC-MS/MS

**Tab. 5.1:** Abkürzung, Übergang im MS und Retentionszeit der gemessenen Metabolite nach der Methode von Luo et al. [2007] für Bestimmung intrazellulärer Metabolitenkonzentrationen. Es erfolgte eine externe Kalibrierung.

Metabolit	Abkürzung	Übergang [m/z]	Retentionszeit in min
Glucose-6-phosphat	G6P	259,0/97,0	7,2
Fructose-6-phosphat	F6P	259,0/97,0	7,5
Fructose-1,6-bisphosphat	FBP	339,0/96,8	16,0
Glycerinaldehyd-3-phosphat	GAP	169,1/97,0	7,6
Dihydroxyacetonphosphat	DHAP	169,1/96,9	9,9
2-/3-Phosphoglycerat	2-/3-PG	185,0/78,9	15,6
Phosphoenolpyruvat	PEP	167,0/78,9	16,1
Pyruvat	Pyr	87,0/43,2	8,9
Acetyl-CoA	AceCoA	808,3/78,8	16,5
Citrat/Isocitrat	CitIso	191,0/110,0	16,1
Citrat	Cit	190,8/86,8	16,1
Isocitrat	Iso	190,9/72,9	16,1
Aconitat	Aco	173,0/85,0	16,2
$\alpha$ -Ketoglutarat	$\alpha$ -KG	145,1/101,1	15,5
Succinyl-CoA	SuccCoA	866,3/79,0	16,5
Succinat	Succ	117,1/73,0	13,4
Fumarat	Fum	115,0/71,0	15,8
Malat	Mal	133,0/73,0	14,6
6-Phosphogluconat	6-PG	275,0/79,0	15,8
Sedoheptulose-7-phosphat	S7P	289,0/96,8	7,4
Xylulose-5-phosphat/ Ribulose-5-phosphat	Xylu5P/ Ribu5P	229,1/97,0	8,0
Ribose-5-phosphat	R5P	229,1/96,8	7,4
Erythrose-4-phosphat	E4P	199,0/96,8	7,7
Glyoxylat	Glyox	73,2/45,0	6,5
Glyoxylat+H <sub>2</sub> O	GlyoxH <sub>2</sub> O	91,7/72,9	6,5
AMP	-	346,2/78,9	13,1
ADP	-	426,1/78,9	16,2
ATP	-	506,2/79,0	16,4

Xylulose-5-phosphat und Ribulose-5-phosphat können nicht getrennt gemessen werden und stellen somit einen gemeinsamen Pool dar. Die Retentionszeiten sind beispielhaft für

eine Einzelmessung, können aber abhängig von der LC-Säule und der mobilen Phase auch schwanken. Durch die Mitführung von externen Standards war die eindeutige Identifizierung des Metaboliten jedoch gesichert.

**Tab. 5.2:** Abkürzung, Übergang im MS/MS und Retentionszeit der nicht in [Luo et al., 2007] gemessenen Metabolite.

Metabolit	Abkürzung	Übergang [m/z]	Retentionszeit in min
Fructose-1-phosphat	F1P	259,1/96,9	8,76
Acetoacetyl-CoA	Acace-CoA	849,6/78,8	16,51
3-Hydroxybutyryl-CoA	3OH-but-CoA	851,8/78,8	16,52
Propionyl-CoA	PropCoA	821.7/79.0	16,65
Methylmalonyl-CoA	MetmalCoA	866.0/821.7	16,52
Ethylmalonyl-CoA	EthmalCoA	880.2/810.1	16,50
Methylsuccinyl-CoA	MethsuccCoA	880.2/800.3	16,50
Crotonyl-CoA	CrotCoA	834.2/78.9	16,57
Butyryl-CoA	ButCoA	836.2/78.9	16,60
Citramalat	Citmal	146.9/86.8	14,34
Ribulose-1,5-bisphosphat	RBP	308.6/96.8	16,09

Ethylmalonyl-CoA und Methylsuccinyl-CoA sind nicht kommerziell erhältlich. Eine Konzentrationsbestimmung ist damit nicht möglich gewesen.



# Anhang A2: Übersicht gemessene <sup>13</sup>C-markierte Metabolite mit LC-MS/MS

**Tab. 5.3:** Abkürzung, Übergang im MS/MS und Retentionszeit der <sup>13</sup>C-markierten Metabolite nach der Methode von Luo et al. [2007].

Metabolit	Abkürzung	Übergang [m/z]	Retentionszeit <sup>13</sup> C- markierte Metabolite
Glucose-6-phosphat	G6P	259,0/97,0	12,4
Fructose-6-phosphat	F6P	259,0/97,0	16,9
Fructose-1,6-bisphosphat	FBP	339,0/96,8	38,6
Glycerinaldehyd-3-phosphat	GAP	169,1/97,0	18,4
Dihydroxyacetonphosphat	DHAP	169,1/96,9	18,4
2-/3-Phosphoglycerat	2-/3-PG	185,0/78,9	37,1
Phosphoenolpyruvat	PEP	167,0/78,9	38,7
Pyruvat	Pyr	87,0/43,2	19,1
Citrat/Isocitrat	CitIso	191,0/110,0	39,5
Citrat	Cit	190,8/86,8	39,5
Isocitrat	Iso	190,9/72,9	39,5
Aconitat	Aco	173,0/85,0	40,3
α-Ketoglutarat	α-KG	145,1/101,1	35,8
Succinat	Succ	117,1/73,0	28,8
Fumarat	Fum	115,0/71,0	36,3
Malat	Mal	133,0/73,0	39,5
Sedoheptulose-7-phosphat	S7P	289,0/96,8	14,6
Xylulose-5-phosphat/	Xylu5P/	229,1/97,0	17,3
Ribulose-5-phosphat	Ribu5P		
Ribose-5-phosphat	R5P	229,1/96,8	14,2
Erythrose-4-phosphat	E4P	199,0/96,8	12,4

**Tab. 5.4:** Abkürzung, Übergang im MS und Retentionszeit der nicht in [Luo et al., 2007] gemessenen <sup>13</sup>C-markierten Metabolite.

Metabolit	Abkürzung	Übergang [m/z]	Retentionszeit <sup>13</sup> C- markierte Metabolite
Fructose-1-phosphat	F1P	259,1/96,9	25,5
Citramalat	Citmal	146,9/86,8	25,0
Ribulose-1,5-bisphosphat	RBP	308,6/96,8	48,4

# Anhang B: Reaktionen des metabolischen Netzwerkes

Reaktion 1:  $\text{mue} : 20.869 \text{ ATP} + 0.48779 \text{ Ala} + 0.07909 \text{ Cys} + 0.20818 \text{ Asp} + 0.24935 \text{ Glu} + 0.16 \text{ Phe} + 0.5291 \text{ Gly} + 0.08182 \text{ His} + 0.25091 \text{ Ile} + 0.29636 \text{ Lys} + 0.38909 \text{ Leu} + 0.13273 \text{ Met} + 0.20818 \text{ Asn} + 0.19091 \text{ Pro} + 0.22728 \text{ Gln} + 0.25545 \text{ Arg} + 0.41318 \text{ Ser} + 0.21909 \text{ Thr} + 0.36545 \text{ Val} + 0.04909 \text{ Trp} + 0.11909 \text{ Tyr} + 0.38198 \text{ rATP} + 0.15844 \text{ rGTP} + 0.098298 \text{ rCTP} + 0.10615 \text{ rUTP} + 0.017903 \text{ dATP} + 0.030483 \text{ dGTP} + 0.030483 \text{ dCTP} + 0.017903 \text{ dTTP} + 0.22682 \text{ Glyc3P} + 0.45363 \text{ avg\_FS} + 0.013853 \text{ UDPGlc} + 0.020735 \text{ CDPEth} + 0.020735 \text{ OH\_myr\_ac} + 0.020735 \text{ C14\_0\_FS} + 0.020735 \text{ CMP\_KDO} + 0.020735 \text{ NDPHep} + 0.013853 \text{ TDPGlc} + 0.02208 \text{ UDP\_NAG} + 0.02208 \text{ UDP\_NAM} + 0.02208 \text{ di\_am\_pim} + 0.1232 \text{ ADPGlc} + 0.581 \text{ hydr\_butyCoA} + 0.01145 \text{ bchla} \implies 20.869 \text{ ADP} + 20.869 \text{ Pi} + 0.581 \text{ CoA}$

Reaktion 2:  $\text{Fruc\_up\_pts} : \text{PEP} + \text{Fruc\_ex} \implies \text{F1P} + \text{Pyr}$

Reaktion 3:  $\text{O2\_up} : \text{O2\_ex} \implies \text{O2}$

Reaktion 4:  $\text{N\_up} : \text{NH4\_ex} \implies \text{NH4}$

Reaktion 5:  $\text{CO2\_ex} : \text{CO2} \iff$

Reaktion 6:  $\text{Succ\_up\_aer} : \text{Hp} + \text{Succ\_ex} \implies \text{Succ}$

Reaktion 7:  $\text{S\_up} : 4 \text{ ATP} + 4 \text{ NADPH} + \text{S\_ex} \implies \text{S} + 4 \text{ ADP} + 4 \text{ Pi} + 4 \text{ NADP}$

Reaktion 8:  $\text{Ac\_up} : \text{Ac\_ex} \implies \text{Ac}$

Reaktion 9:  $\text{Prop\_ex} : \text{Prop} \implies \text{Prop\_ex}$

Reaktion 10:  $\text{Form\_ex} : \text{Form} \implies$

Reaktion 11:  $\text{F6P}::\text{G6P} : \text{F6P} \iff \text{G6P}$

Reaktion 12:  $\text{F16P}::\text{F6P} : \text{F16P} \implies \text{F6P} + \text{Pi}$

Reaktion 13:  $\text{F16P}::\text{T3P} : \text{F16P} \iff \text{G3P} + \text{DHAP}$

Reaktion 14:  $\text{G3P}::\text{13PDG} : \text{G3P} + \text{Pi} + \text{NAD} \iff \text{NADH} + \text{13PDG}$

Reaktion 15:  $\text{2PG}::\text{PEP} : \text{2PG} \iff \text{PEP}$

Reaktion 16:  $\text{PEP}::\text{Pyr} : \text{PEP} + \text{ADP} \implies \text{Pyr} + \text{ATP}$

Reaktion 17:  $\text{Pyr}::\text{AcCoA} : \text{Pyr} + \text{CoA} + \text{NAD} \implies \text{AcCoA} + \text{CO2} + \text{NADH}$

Reaktion 18:  $\text{AcCoA}::\text{Cit} : \text{AcCoA} + \text{OxA} \implies \text{Cit} + \text{CoA}$

Reaktion 19:  $\text{alKG}::\text{SuccCoA} : \text{alKG} + \text{CoA} + \text{NAD} \implies \text{SuccCoA} + \text{CO2} + \text{NADH}$

Reaktion 20:  $\text{SuccCoA}::\text{Succ} : \text{SuccCoA} + \text{ADP} + \text{Pi} \iff \text{ATP} + \text{Succ} + \text{CoA}$

Reaktion 21:  $\text{Succ}::\text{Fum} : \text{Succ} + \text{Q} \implies \text{Fum} + \text{QH2}$

Reaktion 22:  $\text{Fum}::\text{Mal} : \text{Fum} \iff \text{Mal}$

Reaktion 23:  $\text{Mal}::\text{OxA} : \text{Mal} + \text{NAD} \iff \text{OxA} + \text{NADH}$

Reaktion 24:  $\text{G6P}::\text{PGlac} : \text{G6P} + \text{NADP} \iff \text{NADPH} + \text{PGlac}$

Reaktion 25:  $\text{Rl5P}::\text{X5P} : \text{Rl5P} \iff \text{X5P}$

Reaktion 26:  $\text{Rl5P}::\text{R5P} : \text{Rl5P} \iff \text{R5P}$

Reaktion 27:  $\text{Transket1} : \text{R5P} + \text{X5P} \iff \text{G3P} + \text{S7P}$

Reaktion 28:  $\text{Transaldo} : \text{G3P} + \text{S7P} \iff \text{F6P} + \text{E4P}$

Reaktion 29:  $\text{Transket2} : \text{E4P} + \text{X5P} \iff \text{F6P} + \text{G3P}$

Reaktion 30: R15P::R115P : ATP + R15P <==> R115P + ADP  
Reaktion 31: S17PSynth : E4P + DHAP <==> S17P  
Reaktion 32: OxA::PEP : OxA + ATP ==> PEP + CO2 + ADP  
Reaktion 33: AcCoA::AcP : AcCoA + Pi <==> AcP + CoA  
Reaktion 34: Pyr::Form : Pyr + CoA ==> AcCoA + Form  
Reaktion 35: Photo : 2 c2\_red + Q + 2 pho\_ex ==> QH2 + 2 c2\_vox  
Reaktion 36: bc1 : QH2 + 2 c2\_ox ==> 2 c2\_red + 4 Hp + Q  
Reaktion 37: NADHDehydro : NADH + Q <==> QH2 + 4 Hp + NAD  
Reaktion 38: c2\_Oxidase : 0.5 O2 + 2 c2\_red ==> 2 Hp + 2 c2\_ox  
Reaktion 39: TransHydro : NADH + NADP <==> NADPH + NAD  
Reaktion 40: ATPSynth : 3 Hp + ADP + Pi <==> ATP  
Reaktion 41: ATPdrain : ATP ==> ADP + Pi  
Reaktion 42: Chor\_Synth : PEP + ATP + Shiki ==> Chor + ADP + 2 Pi  
Reaktion 43: PRPP\_Synth : R5P + ATP ==> PRPP + AMP  
Reaktion 44: MTHF\_Synth2 : Gly + NAD + THF ==> CO2 + NH4 + NADH + MTHF  
Reaktion 45: Ala\_Synth : Pyr + NH4 + NADH ==> Ala + NAD  
Reaktion 46: Val\_Synth : Glu + Valerate ==> alKG + Val  
Reaktion 47: Leu\_Synth : AcCoA + NH4 + Valerate ==> CO2 + Leu + CoA  
Reaktion 48: Asn\_Synth : NH4 + Asp <==> Asn  
Reaktion 49: Asp\_Synth : OxA + Glu ==> alKG + Asp  
Reaktion 50: Lys\_Synth : di\_am\_pim ==> CO2 + Lys  
Reaktion 51: Met\_Synth : AcCoA + NADPH + MTHF + Cys + HSer ==> Pyr + Ac + NH4 + Met + CoA + NADP + THF  
Reaktion 52: Thr\_Synth : ATP + HSer ==> Thr + ADP + Pi  
Reaktion 53: Ile\_Synth : Pyr + NADPH + Glu + Thr ==> alKG + CO2 + NH4 + Ile + NADP  
Reaktion 54: His\_Synth : ATP + CO2 + PRPP + Gln + 2 NAD ==> alKG + 2 NADH + His + 2 PPi + AMP  
Reaktion 55: Glu\_Synth : alKG + NH4 + NADH ==> Glu + NAD  
Reaktion 56: Gln\_Synth : ATP + NH4 + Glu ==> Gln + ADP + Pi  
Reaktion 57: Pro\_Synth : ATP + 2 NADPH + Glu ==> Pro + ADP + Pi + 2 NADP  
Reaktion 58: Arg\_Synth : ATP + CO2 + 2 NH4 + Asp + Pro ==> Fum + Arg + PPi + AMP  
Reaktion 59: Trp\_Synth : Chor + PRPP + Gln + Ser ==> Pyr + G3P + CO2 + Glu + Trp + PPi  
Reaktion 60: Tyr\_Synth : Chor + Glu + NAD ==> alKG + CO2 + NADH + Tyr  
Reaktion 61: Phe\_Synth : Chor + Glu ==> alKG + CO2 + Phe  
Reaktion 62: Ser\_Synth : 3PG + Glu + NAD ==> alKG + NADH + Ser + Pi  
Reaktion 63: Gly\_Synth : Ser + THF <==> MTHF + Gly  
Reaktion 64: Cys\_Synth : AcCoA + S + Ser ==> Ac + Cys + CoA  
Reaktion 65: rATP\_Synth : 3 ATP + Asp + IMP ==> Fum + rATP + 3 ADP + Pi  
Reaktion 66: rGTP\_Synth : 3 ATP + Gln + NAD + IMP ==> NADH + Glu + rGTP + 2 ADP + PPi + AMP  
Reaktion 67: rCTP\_Synth : ATP + NH4 + rUTP ==> rCTP + ADP + Pi  
Reaktion 68: rUTP\_Synth : 4 ATP + PRPP + Asp + Gln ==> Glu + rUTP + 4 ADP + Pi + PPi

Reaktion 69: dATP\_Synth : NADPH + rATP ==> dATP + NADP  
 Reaktion 70: dGTP\_Synth : NADPH + rGTP ==> dGTP + NADP  
 Reaktion 71: dCTP\_Synth : NADPH + rCTP ==> dCTP + NADP  
 Reaktion 72: dTTP\_Synth : NADPH + MTHF + dCTP ==> dTTP + NADP + THF  
 Reaktion 73: DHAP::Glyc3P : NADH + DHAP ==> Glyc3P + NAD  
 Reaktion 74: avg\_FS\_Synth : 8.481 AcCoA + 7.481 ATP + 14.21 NADPH ==> avg\_FS + 7.481 ADP + 7.481 Pi + 8.481 CoA + 14.21 NADP  
 Reaktion 75: UDPGlc\_Synth : G6P + rATP ==> UDPGlc  
 Reaktion 76: CDPEth\_Synth : ATP + Ac + NH4 + rATP + NAD ==> NADH + CDPEth + ADP + PPi  
 Reaktion 77: OH\_myr\_ac\_Synth : 7 AcCoA + 6 ATP + 11 NADPH ==> OH\_myr\_ac + 6 ADP + 6 Pi + 7 CoA + 11 NADP  
 Reaktion 78: C14\_0\_FS\_Synth : 7 AcCoA + 6 ATP + 12 NADPH ==> C14\_0\_FS + 6 ADP + 6 Pi + 7 CoA + 12 NADP  
 Reaktion 79: CMP\_KDO\_Synth : R5P + PEP + 2 ATP ==> CMP\_KDO + 2 ADP + Pi  
 Reaktion 80: NDPHep\_Synth : 1.5 G6P + ATP + 4 NADP ==> 4 NADPH + NDPHep + ADP + Pi  
 Reaktion 81: TDPGlcS\_Synth : F6P + 2 ATP + NH4 ==> TDPGlcS + 2 ADP + 2 Pi  
 Reaktion 82: UDP\_NAG\_Synth : F6P + AcCoA + ATP + Gln ==> Glu + UDP\_NAG + ADP + Pi + CoA  
 Reaktion 83: UDP\_NAM\_Synth : PEP + NADPH + UDP\_NAG ==> UDP\_NAM + NADP  
 Reaktion 84: di\_am\_pim\_Synth : Pyr + SuccCoA + NADPH + Glu + AspSald ==> alKG + Succ + di\_am\_pim + CoA + NADP  
 Reaktion 85: ADPGlc\_Synth : G6P + ATP ==> ADPGlc + ADP + Pi  
 Reaktion 86: bchla\_Synth : 4 Pyr + 4 G3P + 8 SuccCoA + 3 NADPH + 8 Gly + ADP + Pi ==> ATP + 18 CO2 + 4 NH4 + bchla + 8 CoA + 3 NADP  
 Reaktion 87: Succ\_ex : Succ ==> Succ\_ex  
 Reaktion 88: SuccCoA::alKG : SuccCoA + CO2 + Fd\_red ==> alKG + CoA + Fd\_ox  
 Reaktion 89: AcCoA::Pyr : AcCoA + CO2 + Fd\_red ==> Pyr + CoA + Fd\_ox  
 Reaktion 90: Cit::Aco : Cit <==> Aconitate  
 Reaktion 91: ICit::alKG : ICit + NADP <==> alKG + CO2 + NADPH  
 Reaktion 92: Ac\_ex : Ac ==> Ac\_ex  
 Reaktion 93: Rubisco : CO2 + R15P ==> 2 3PG  
 Reaktion 94: F6P::F16P : F6P + ATP ==> F16P + ADP  
 Reaktion 95: F1P::F16P : F1P + ATP ==> F16P + ADP  
 Reaktion 96: PGlac::PGluc : PGlac ==> PGluc  
 Reaktion 97: 3PG::2PG : 3PG <==> 2PG  
 Reaktion 98: 13PDG::3PG : 13PDG + ADP <==> 3PG + ATP  
 Reaktion 99: Fum::Succ : Fum + QH2 ==> Succ + Q  
 Reaktion 100: AcP::Ac : AcP + ADP <==> ATP + Ac  
 Reaktion 101: Glyox::Mal : AcCoA + Glyox ==> Mal + CoA  
 Reaktion 102: PropCoA::MMalCoA : ATP + CO2 + PropCoA <==> MMalCoA + ADP + Pi  
 Reaktion 103: Mal::Pyr : Mal + NADP ==> Pyr + CO2 + NADPH

Reaktion 104: Pyr::OxA : Pyr + ATP + CO2 <==> OxA + ADP + Pi  
 Reaktion 105: CitLyase : Cit ==> OxA + Ac  
 Reaktion 106: S17P::S7P : S17P ==> S7P + Pi  
 Reaktion 107: Prop::PropCoA : ATP + Prop + CoA <==> PropCoA + ADP + Pi  
 Reaktion 108: MMalCoA::SuccCoA : MMalCoA <==> SuccCoA  
 Reaktion 109: Pyr::PEP : Pyr + ATP + Pi ==> PEP + PPi + AMP  
 Reaktion 110: DHAP::G3P : DHAP <==> G3P  
 Reaktion 111: Asp::AspSald : ATP + NADPH + Asp ==> AspSald + ADP + Pi + NADP  
 Reaktion 112: AspSald::HSer : NADPH + AspSald ==> HSer + NADP  
 Reaktion 113: CitMal\_synth : Pyr + AcCoA ==> CitMal + CoA  
 Reaktion 114: AcCoA::AcAcCoA : 2 AcCoA ==> CoA + AcAcCoA  
 Reaktion 115: MetCoA::Glyox : MetCoA <==> Glyox + PropCoA  
 Reaktion 116: CitMal::MesCoA : CitMal + CoA ==> MesCoA  
 Reaktion 117: Shiki\_synth : PEP + E4P + NADPH ==> 2 Pi + NADP + Shiki  
 Reaktion 118: Aco::Icit : Aconitate <==> ICit  
 Reaktion 119: AcLac\_synth : 2 Pyr ==> CO2 + AcLac  
 Reaktion 120: Valerate\_synth : NADPH + AcLac ==> NADP + Valerate  
 Reaktion 121: IMP\_synth : 5 ATP + CO2 + PRPP + 2 MTHF + Asp + Gly + 2 Gln + 2 NADP ==> Fum + 2 NADPH + 2 Glu + 5 ADP + 5 Pi + PPi + 2 THF + IMP  
 Reaktion 122: AcAcCoA::HyBuCoA : NADPH + AcAcCoA ==> hydr\_butCoA + NADP  
 Reaktion 123: PPi::Pi : PPi <==> Hp + 2 Pi  
 Reaktion 124: AMP::ATP : ATP + AMP <==> 2 ADP  
 Reaktion 125: P\_up : ==> Pi  
 Reaktion 126: MesCoA::MetCoA : MesCoA ==> MetCoA  
 Reaktion 127: Hydrogenase : Q + H2 <==> QH2  
 Reaktion 128: KDPG::PyrG3P : KDPG ==> Pyr + G3P  
 Reaktion 129: KDPG : PGluc ==> KDPG  
 Reaktion 130: Prop\_up : Prop\_ex ==> Prop  
 Reaktion 131: Mal\_up : Mal\_ex ==> Mal  
 Reaktion 132: H2\_up : H2\_ex ==> H2  
 Reaktion 133: H2\_ex : H2 ==> H2\_ex  
 Reaktion 134: Nitrogenase : 16 ATP + N2\_ex + 8 Fd\_red ==> 2 NH4 + 16 ADP + 16 Pi + H2 + 8 Fd\_ox  
 Reaktion 135: QH2\_oxidase : 0.5 O2 + QH2 ==> 2 Hp + Q  
 Reaktion 136: NADH::Fd : NADH + Fd\_ox <==> NAD + Fd\_red  
 Reaktion 137: HyBuCoA::CrotCoA : hydr\_butCoA ==> CrotCoA  
 Reaktion 138: CrotCoA::EthyCoA : CO2 + NADPH + CrotCoA ==> NADP + Ethy-CoA  
 Reaktion 139: EthyCoA::MesCoA : Q + EthyCoA ==> QH2 + MesCoA  
 Reaktion 140: Nitrogenase2 : 4 ATP + Fd\_red ==> 4 ADP + 4 Pi + H2 + Fd\_ox  
 Reaktion 141: PGluc::Rl5P : PGluc + NADP ==> Rl5P + CO2 + NADPH  
 Reaktion 142: ICit::SuccGlyox : ICit ==> Succ + Glyox  
 Reaktion 143: PEP : PEP + CO2 <==> OxA

Biosynthese von Makromolekülen:

Prot = 39.9455 ATP + 0.88727 Ala + 0.15818 Cys + 0.41636 Asp + 0.45455 Glu + 0.32 Phe + 1.0582 Gly + 0.16364 His + 0.50182 Ile + 0.59273 Lys + 0.77818 Leu + 0.26546 Met + 0.41636 Asn + 0.38182 Pro + 0.45455 Gln + 0.51091 Arg + 0.37273 Ser + 0.43818 Thr + 0.73091 Val + 0.09818 Trp + 0.23818 Tyr + -39.9455 ADP + -39.9455 Pi  
RNA = 1.2488 ATP + 0.80488 rATP + 0.99024 rGTP + 0.61436 rCTP + 0.66341 rUTP + -1.2488 ADP + -1.2488 Pi  
DNA = 4.4129 ATP + 0.59677 dATP + 1.0161 dGTP + 1.0161 dCTP + 0.59677 dTTP + -4.4129 ADP + -4.4129 Pi  
Lip = 2.8352 ATP + 1.4176 Ser + 1.4176 Glyc3P + 2.8352 avg\_FS + -2.8352 ADP + -2.8352 Pi  
LPS = 0.46176 UDPGlc + 0.69118 CDPEth + 0.69118 OH\_myr\_ac + 0.69118 C14\_0\_FS + 0.69118 CMP\_KDO + 0.69118 NDPHep + 0.46176 TDPGlc  
PepGly = 5.52 ATP + 2.208 Ala + 1.104 Glu + 1.104 UDP\_NAG + 1.104 UDP\_NAM + 1.104 di\_am\_pim + -5.52 ADP + -5.52 Pi  
Glyc = 6.16 ADPGlc  
PHB = 11.62 hydr\_butCoA + -11.62 CoA  
PolyP = 12.66 rATP  
Bchl = 1.145 bchla

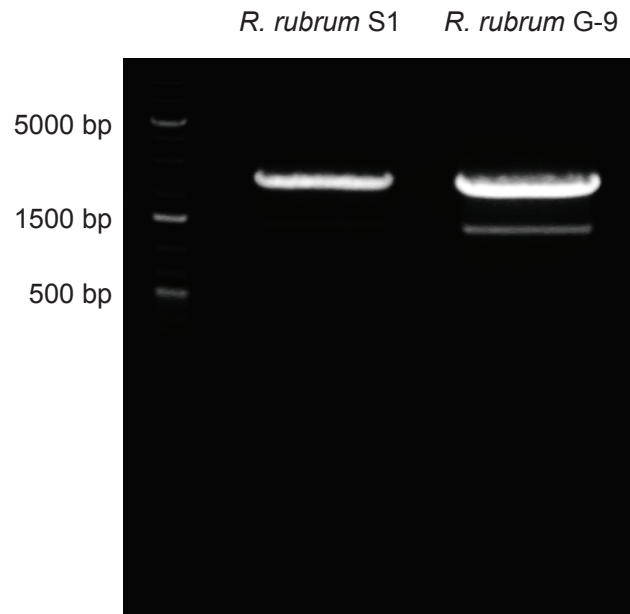
Reaktionen, die unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln mit Fructose nicht berücksichtigt worden sind:

Reaktion 24: G6P::PGLac : G6P + NADP <==> NADPH + PGLac  
Reaktion 141: PGLuc::R15P : PGLuc + NADP ==> R15P + CO2 + NADPH  
Reaktion 106: S17P::S7P : S17P ==> S7P + Pi  
Reaktion 93: Rubisco : CO2 + R115P ==> 2 3PG  
Reaktion 129: KDPG : PGLuc ==> KDPG  
Reaktion 128: KDPG::PyrG3P : KDPG ==> Pyr + G3P  
Reaktion 3: O2\_up : O2\_ex ==> O2  
Reaktion 35: Photo : 2 c2\_red + Q + 2 pho\_ex ==> QH2 + 2 c2vox  
Reaktion 132: H2\_up : H2\_ex ==> H2  
Reaktion 134: Nitrogenase : 16 ATP + N2\_ex + 8 Fd\_red ==> 2 NH4 + 16 ADP + 16 Pi + H2 + 8 Fd\_ox  
Reaktion 140: Nitrogenase2 : 4 ATP + Fd\_red ==> 4 ADP + 4 Pi + H2 + Fd\_ox  
Reaktion 89: AcCoA::Pyr : AcCoA + CO2 + Fd\_red ==> Pyr + CoA + Fd\_ox  
Reaktion 105: CitLyase : Cit ==> OxA + Ac  
Reaktion 8: Ac\_up : Ac\_ex ==> Ac  
Reaktion 142: ICit::SuccGlyox : ICit ==> Succ + Glyox  
Reaktion 131: Mal\_up : Mal\_ex ==> Mal  
Reaktion 88: SuccCoA::alKG : SuccCoA + CO2 + Fd\_red ==> alKG + CoA + Fd\_ox  
Reaktion 130: Prop\_up : Prop\_ex ==> Prop  
Reaktion 138: CrotCoA::EthyCoA : CO2 + NADPH + CrotCoA ==> NADP + EthyCoA  
Reaktion 113: CitMal\_synth : Pyr + AcCoA ==> CitMal + CoA





# Anhang C: PCR und Sequenzierungsdaten des Rru\_A0324 Gens in *R. rubrum* G-9



**Abb. 5.1:** PCR des Rru\_A0324 Gens (Länge: 2141) mit zugehörigen Promoterabschnitt (+200 bp) von *R. rubrum* S1 (links) und *R. rubrum* G9 (rechts). Gesamtlänge des amplifizierten Genabschnitts: 2241 bp.

Ergebnisse der Primer Walking Sequenzierung (Eurofins MWG):

Rru\_A0324 + Promoter bei G-9:

```

ctgtatcgacgcctgtccgaccaaatcccttcacatcttgatcgatcgagcgggttcagga
ggtgctgcgcaagcgccagctccaggccgacctcgacgcctcgggcatgtccctctgagc
gcgacaagcacatccatcgccctaaaggagtagagaagatggaaaaggttttgaccgtctg
cccgtattgctggctcggggtgcaagatcaacctgctcgtcgagaacgatcaggtgattgg
cgctgaaccggcccaggcgctgaccaaccaggcgcaattgtgccttaaaggctattacgg
ctgggacttcctgaatgatcccaagctgctgaccccgcgctcgcaagccgctgatccg
ccggaccgctgactcggccttcgaggaggtgtcgttggtacgaggcgatcaacttcgccc
caccgcttgcaagagatcaagcataagtacggcccggattcgatcatgctgaccggttc
ggcccgggggcccgggcaacgaagccaactacgtgatgcagaagttcgcccgcgctggtt
cggaaccaacaacatcgaccattgcccgcgtctgcccacggccccagcgtcgccggtct
gcaggtgaccctgggcaatggcgccatgagcaattcggctcaggagatcgaaaacaccaa
atgcgttttctgtcttcggctataacgcgcttttccatccgatcgtcggccgctgat
cctcaaggccaaggagaaggggcgccaagatcatcgtctgtgacccgcgcttcacgagac

```

cgcgcgcatcgccgatctgtggttgcgctgaagaacggcaccaacatggccctgggtcaa  
cgccttcgcccattgtgctgcttgaagaaaacctttacgacaaggatttcgtggcgaagta  
caccgaaggcctggatgactacaaggcgacggtggccaaatacaccgggaatacgcga  
aaagatcaccggcggttcccgcccagcagatccgcgaagccatgcggatgtacgccggggc  
cgagacggcgaccgtcatgtggggcatgggcgtcaccagtggtccaggccgtcgtatgt  
ggtcaaggggctgtcgggtctggccttgctgacgggcaatctgggcaagccgtcgtgtgg  
cgtcgccccggcgcgggacaaaacaacgtccaggggcgctcgatcatggcgcgctgcc  
caacatgctgcccgggctatcagccggtgaccgatgcggcgggcgggccaagttcgagaa  
ggcctgggggggtgagcaatcttccgacaagcccggcgctcgtcctgaccgaagtgccaa  
gatggttaaggccggcaagctcaaggcctattacatcttcggcgaagacccgcccagac  
cgatcccgatctgcatgaagtctgtaatccatgcgcgatctggaattcgtcatctgcca  
ggaaatcttcatgaccaagacggcgatgatggccgacgtggtcttccggccacctcgtg  
ggcgagcagcagggcgcttattccagctgcgaccgtggcttccagcgttctacaaggc  
gatcgaaccgcagggcgacgtcaagcccactgggagatcatctcgtgatggcgacggc  
catgggctatcccataagctacagcaataaccaggagatctgggacgagctgcgcgagct  
ttgcccgatctattacggagcagctacgagaagatggccggcctgggctatatccagtg  
gccttgcggcgatctcgaccatcccggcacgccttatctctatgcggacaagaagttcca  
gacgccttcgggcaagggttctgttgcctgcgagtgggcgcccgccgatggaaaaggt  
cgatgcccctatccgctgattctcagcacggtgcgcgaggtcggctactattctgccc  
gacgatgacgggcaactgtcacgcccctgcagaccctggccgacgagccgggctatatcag  
catgcacagcaaggacgccaaggcgtgggcatcagtgaccagcatctggtgtcgtatctc  
atcgcgtcgggcaagatcatcgcccgtgcccgatatcgacgaccgatcaacgaaggcgc  
cgtttacatgacctaccagtggtgggttggcgccctgcaacgaactgaccgcccagcacct  
cgatccgatctccaagacccgggaatacaagtattccgcccgtcaaggtcgaggccatcgc  
cgatcaggcctgggcccgaacc

Referenzsequenz: Rru\_A0324 + Promoter bei S1:

ctgtatcgacgcctgtccgaccaaattcccttcatcttctgctcgcgagcgggttcagga  
ggtgctgcgcaagcgccagctccaggccgcccctcgcgacctcgggcatgtccctctgagc  
gcgacaagcacatccatcgcctaaaggagtagagaagatggaaaagggttttgaccgtctg  
cccgtattgcggtcgggggtgcaagatcaacctgctcgtcgagaacgatcaggtgattgg  
cgctgaaccggcccaggcggtgaccaaccaggcgcaattgtgcccataaggctattacgg  
ctgggacttctgaaatgatcccaagctgctgaccccgccctgcgcaagccgtgatccg  
ccggaccctgactcggccttcgaggaggtgtcgtggtacgaggcgatcaacttcgccc  
caccgcttgcgaagatcaagcataagctacggcccggattcgatcatgctgaccggttc  
ggcccggggggcgggcaacgaagccaactacgtgatgcagaagttcgcccgcgcccgtggt  
cggaaccaacaacatcgaccattgcgcccgcgtctgccacggccccagcgtcgcgggtct  
gcaggtgaccctgggcaatggcgccatgagcaattcggctcaggagatcgaaaacaccaa  
atgcgttttctgcttctggctataacgcccgtttccatccgatcgtcgcggccgcat  
cctcaaggccaaggagaaggcgccaagatcctgctgtgaccgcttcatcgagac  
cgcgcgcatcgccgatctgtggttgcgctgaagaacggcaccaacatggccctgggtcaa  
cgccttcgcccattgtgctgcttgaagaaaacctttacgacaaggatttcgtggcgaagta  
caccgaaggcctggatgactacaaggcgacggtggccaaatacaccgggaatacgcga  
aaagatcaccggcggttcccgcccagcagatccgcgaagccatgcggatgtacgccggggc  
cgagacggcgaccgtcatgtggggcatgggcgtcaccagtggtccaggccgtcgtatgt  
ggtcaaggggctgtcgggtctggccttgctgacgggcaatctgggcaagccgtcgtgtgg

cgtcgccccgggtgcgcggaacaaaacaacgtccagggcgccctgcatcatggcgcgctgcc  
caacatgctgccgggctatcagccgggtgaccgatgacggcgccggcgccgggccaagtgcgagaa  
ggcctgggggggtgagcaatcttcccgacaagccggcgctctgcctgaccgaagtgccaa  
gatggttaaggccggcaagctcaaggcctattacatcttcggcgaagaccccgccagac  
cgatcccgatctgcatgaagttcgtgaatccatgacgcatctggaattcgtcatctgcca  
ggaaatcttcatgaccaagacggcgtgatggccgacgtggtcttcccggccacctctgtg  
ggcgagcacgagggcgcttattccagctgacgaccgtggcttccagcgcttctacaaggc  
gatcgaaccgcagggcgacgtcaagccgactgggagatcatctcgtgatggcgacggc  
catgggctatcccatgaagtacagcaataccaggagatctgggacgagctgacgagct  
ttgccgatctattacggagcgacctacgagaagatggccggcctgggctatatccagtg  
gccttgccccgatctcgaccatcccggcacgccttatctctatgacggacaagaagttcca  
gacgccttcgggcaagggtgctgttcgcctgacgagtgccgcccggatggaaaagg  
cgatgccgcctatccgctgattctcagcacgggtgacgaggtcgggtcactattctgccc  
gacgatgacgggcaactgtcacgccctgacacccctggccgacgagccgggctatatcag  
catgcacagcaaggacgccaaggcgctgggcatcagtgaccagcatctgggtgctgatctc  
atcgctcgccgcaagatcatcgccgtgcccgatatcgacgaccgcatcaacgaaggcgc  
cgtttacatgacctaccagtggtgggtggcgccctgcaacgaactgaccgcccagcacct  
cgatccgatctccaagacccggaatacaagtattccgccgtcaaggctcagggccatcgc  
cgatcaggcctgggcccgaaccca



# Anhang D: Verwendete Substanzen und Chemikalien

Substanz/Chemikalie	Hersteller	Molare Masse in g/mol
U- <sup>13</sup> C-Acetat	Campro Scientific	84,0
Acetoacetyl Coenzym A	Sigma-Aldrich	971,60
Acetonitril	Roth ROTISOLV <sup>®</sup> HPLC	
Acetyl Coenzym A	Sigma-Aldrich	809,57
Agarose	Sigma-Aldrich	
Alkohol-Dehydrogenase	Roche	–
<i>p</i> -Aminobenzoesäure	Merck	154,12
<i>p</i> -Methylaminophenolsulfat	Roth	151,16
Ammoniumacetat	Riedel-deHaën	77,08
Ammoniumchlorid	Riedel-deHaën	53,49
Ammoniumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich	115,03
Ammoniumheptamolybdat Tetrahydrat	Fluka	1235,8
Ammoniumhydroxid (33 %ig)	Sigma-Aldrich	35,1
Ammoniumsulfat	Roth	132,14
Äpfelsäure	Fluka	134,09
D(+)-Arabinose	Merck	150,13
Asparaginsäure	Fluka	133,10
Bernsteinsäure	Fluka	118,09
Biotin	Fluka	244,31
Borsäure	Merck	61,83
Butyryl Coenzym A	Sigma-Aldrich	837,63
Calciumchlorid Dihydrat	Merck	147,02
Chloroform	Roth	119,38
Cobalt(II)chlorid Hexahydrat	Merck	237,93
Coenzym Q <sub>10</sub>	Sigma-Aldrich	863,34
Coomassie brilliant blue G-250	Merck	854,02
Crotonsäure	Merck	86,09
Crotonyl Coenzym A	Sigma-Aldrich	835,61
Diammoniumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich	132,05
Dichlormethan	Roth ROTISOLV <sup>®</sup> HPLC	84,93
Dichlorphenolindophenol	Sigma-Aldrich	268,1
Dikaliumhydrogenphosphat	Fluka	174,18
Dimethylthiozoly-Diphenyl-	Sigma-Aldrich	414,0
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth	141,96
Dinatriumdisulfit	Roth	190,11
(5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoesäure))	Sigma-Aldrich	396,35

(DTNB)		
Eisensulfat Heptahydrat	Fluka	278
Eisessig	Merck	60,05
Ethanol	Roth	46,07
Ethylendiammintetraessigsäure (EDTA)	Fluka	292,24
Ethylmalonyl Coenzym A	–	881,63
5-Ethylphenazinium Ethosulfat	Sigma-Aldrich	334,42
D(+)-Fructose	Fluka	180,16
U- <sup>13</sup> C-Fructose	euroiso-top	186,16
1- <sup>13</sup> C-Fructose	Campro Scientific	181,16
Fructose-1-phosphat	Sigma-Aldrich	304,1
Fumarsäure	Fluka	116,07
G6P-Dehydrogenase	Roche	–
D(+)-Glucose Monohydrat	Merck	198,17
Glutaminsäure	Fluka	147,13
Glycerin	Roth	92,09
HEPES	Sigma-Aldrich	238,31
3-Hydroxybutyryl Coenzym A	Sigma-Aldrich	853,62
$\beta$ -Hydroxybutyrat	Merck	103,10
Kaliumacetat	Roth	98,15
Kaliumborhydrid	Merck	53,94
Kaliumcarbonat	Sigma-Aldrich	138,20
Kaliumchlorid	Roth	74,55
Kaliumcitramalat	Fluka	242,31
Kaliumcyanid	Merck	65,12
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth	136,09
Kaliumhydrogencarbonat	Roth	100,12
Kaliumhydroxid	Fluka	56,11
Kanamycinsulfat	Merck	582,58
Kupfer(II)sulfat Pentahydrat	Merck	249,68
Lycopin (aus Tomate)	Sigma-Aldrich	536,9
Isopropanol	Roth ROTISOLV <sup>®</sup> HPLC	60,10
Magnesium(II)chlorid	Roth	95,21
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Fluka	246,48
Mangan(III)chlorid Tetrahydrat	Fluka	197,91
Methanol	Roth ROTIPURAN <sup>®</sup> ≥ 99,9 %	32,04
Methylmalonyl Coenzym A	Sigma-Aldrich	891,34
Methylsuccinyl Coenzym A	–	881,63
NADH, NAD <sup>+</sup>	Roche	–
NADPH, NADP <sup>+</sup>	Roche	–
Natriumacetat	Merck	82,03
Natriumborat	Merck	381,4
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich	84,01
Natriumcarbonat Decahydrat	Roth	286,14
Natriumchlorid	Roth	58,44

Natriumformiat	Fluka	68,01
Natriumglyoxylat	Sigma-Aldrich	114,03
Natriumhydrogencarbonat	Roth	84,01
Natriumdihydrogenphosphat	Roth	119,98
Natriumlactat	Merck	112,06
Natriummolybdat Dihydrat	Sigma-Aldrich	241,95
Natriumpropionat	Riedel-deHaën	96,06
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich	110,04
Natriumsuccinat	Sigma-Aldrich	162,05
Natriumsulfit	Sigma-Aldrich	126,04
Nicotinsäure	Fluka	123,11
Nitrilotriessigsäure (Titriplex III)	Fluka	372,24
(3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS))	Merck	209,26
<i>n</i> -Propionyl Coenzym A	Sigma-Aldrich	823,60
Phenazinmethosulfat	Sigma-Aldrich	306,34
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth	
<i>o</i> -Phosphorsäure	Roth ROTIPURAN® ≥ 85 %,p.a.	98,00
Ribulose-1,5-bisphosphat	Sigma-Aldrich	310,09
D(+)-Saccharose	Roth	342,30
Salzsäure, 37 %, reinst	Roth	36,46
Schwefelsäure	Roth, 96 %ig, tech.	98,08
1,4- <sup>13</sup> C-Succinat	Campro Scientific	120,09
Tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich	414,32
Thiamin	Fluka	337,27
Triethanolamin (TEA)	Merck	149,19
Tris Ultra Qualität	Roth	121,14
Tricin	Sigma-Aldrich	179,17
Vitamin B <sub>12</sub>	Sigma-Aldrich	1579,58
D(+)-Xylose	Roth	150,13
Zink(II)sulfat Monohydrat	Merck	179,45

---





# Literaturverzeichnis

- Ackroyd, R.; Kelty, C.; Brown, N., and Reed, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 74:656–669, 2001.
- Alber, B.E. Biotechnological potential of the ethylmalonyl-CoA pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89:17–25, 2011.
- Andersen, K.B. and von Meyenburg, K. Are growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration? *Journal of Bacteriology*, 144:114–123, 1980.
- Anderson, A.J. and Dawes, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, 54:450–472, 1990.
- Anderson, L. and Fuller, R.C. Photosynthesis in *Rhodospirillum rubrum* I. Autotrophic carbon dioxide fixation. *Plant Physiology*, 42:487–490, 1967a.
- Anderson, L. and Fuller, R.C. Photosynthesis in *Rhodospirillum rubrum* II. Photoheterotrophic carbon dioxide fixation. *Plant Physiology*, 42:491–496, 1967b.
- Anderson, L. and Fuller, R.C. Photosynthesis in *Rhodospirillum rubrum* III. Metabolic control of reductive pentose phosphate and tricarboxylic acid cycle enzymes. *Plant Physiology*, 42:497–502, 1967c.
- Anderson, L.E. and Fuller, R.C. Photosynthesis in *Rhodospirillum rubrum*: IV. Isolation and characterization of ribulose 1,5-diphosphate carboxylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 244:3105–3109, 1969.
- Arfman, N.; Watling, E.M.; Clement, W.; van Oosterwijk, R.J.; de Vries, G.E.; Harder, W.; Attwood, M.M., and Dijkhuizen, L. Methanol metabolism in thermotolerant methylotrophic *Bacillus* strains involving a novel catabolic NAD-dependent methanol dehydrogenase as a key enzyme. *Archives of Microbiology*, 152:280–288, 1989.
- Ausich, R.L. Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. *Pure and Applied Chemistry*, 69:2169–2173, 1997.
- Azab, M.; Boyer, D.S.; Bressler, N.M.; Bressler, S.B.; Cihelkova, I.; Hao, Y.; Immonen, I.; Menchini, U.; Naor, J.; Potter, M.J.; Reaves, A.; Rosenfeld, P.J.; Slakter, J.S.; Soucek, P.; Strong, H.A.; Wenkstern, A.; Su, X.Y., and Yang, Y.C. Verteporfin therapy of subfoveal minimally classic choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: 2-year results of a randomized clinical trial. *Archives of Ophthalmology*, 123:448–457, 2005.
- Bachofen, R. and Neeracher, H. Glutamatdehydrogenase im photosynthetischen Bakterium *Rhodospirillum rubrum*. *Archiv für Mikrobiologie*, 60:235–245, 1968.

- Baltscheffsky, M.; Brosché, M.; Hultman, T.; Lundvik, L.; Nyrén, P.; Sakai-Nore, Y.; Severin, A., and Strid, A. A 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase gene in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1337: 113–122, 1997.
- Bellion, E. and Kelley, R.L. Inhibition by itaconate of growth of methylotrophic bacteria. *Journal of Bacteriology*, 138:519–522, 1979.
- Benedict, C.R. and Beckman, L.D. Biosynthesis of the methoxylated carotenoids in *Rhodospirillum rubrum*. *Plant Physiology*, 39:726–730, 1964.
- Berg, I. A and Ivanovsky, R. N. [Enzymes of the citramalate cycle in *Rhodospirillum rubrum*]. *Mikrobiologiya*, 78:22–31, 2009.
- Berg, I.A.; Filatova, L.V., and Ivanovsky, R.N. Inhibition of acetate and propionate assimilation by itaconate via propionyl-CoA carboxylase in isocitrate lyase-negative purple bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *FEMS Microbiology Letters*, 216:49–54, 2002.
- Bergmeyer, H.U. and Bernt, E. *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, 1974.
- Bernofsky, C. and Swan, M. An improved cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotide. *Analytical Biochemistry*, 53:452–458, 1973.
- Beuschner, N. and Gottschalk, G. Lack of citrate lyase - the key enzyme of the reductive carboxylic acid cycle - in *Chlorobium thiosulfatophilum* and *Rhodospirillum rubrum*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 27b:967–973, 1972.
- Biedermann, M.; Drews, G.; Marx, R., and Schröder, J. Der Einfluss des Sauerstoffpartialdruckes und der Antibiotika Actinomycin und Puromycin auf das Wachstum, die Synthese von Bacteriochlorophyll und die Thylakoidmorphogenese in Dunkelkulturen von *Rhodospirillum rubrum*. *Archiv für Mikrobiologie*, 56:133–147, 1967.
- Biel, A.J. Oxygen-regulated steps in the *Rhodobacter capsulatus* tetrapyrrole biosynthetic pathway. *Journal of Bacteriology*, 174:5272–5274, 1992.
- Biel, A.J.; Canada, K.; Huang, D.; Indest, K., and Sullivan, K. Oxygen-mediated regulation of porphobilinogen formation in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology*, 184:1685–1692, 2002.
- Binder, T.P. and Hanke, P.D. Production of amino acids from sucrose in *Corynebacterium glutamicum*. Patent: US 08048649., 2011.
- Bishop, E. A. and Bermingham, M. A. C. Lipid composition of Gram-negative bacteria, sensitive and resistant to streptomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 4: 378–379, 1973.
- Bollivar, D.W. and Beale, S.I. The chlorophyll biosynthetic enzyme Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester (oxidative) cyclase (characterization and partial purification from *Chlamydomonas reinhardtii* and *Synechocystis* sp. PCC 6803). *Plant Physiology*, 112: 105–114, 1996.

- Bollivar, D.W.; Suzuki, J.Y.; Beatty, J.T.; Dobrowolski, J.M., and Bauer, C.E. Directed mutational analysis of bacteriochlorophyll a biosynthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Molecular Biology*, 237:622–640, 1994.
- Bolten, C.J.; Kiefer, P.; Letisse, F.; Portais, J.-C., and Wittmann, C. Sampling for metabolome analysis of microorganisms. *Analytical Chemistry*, 79:3843–3849, 2007.
- Borgschulte, A.; Züttel, A., and Wittstatt, U. *Hydrogen as a Future Energy Carrier*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008.
- Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254, 1976.
- Brandl, H.; Knee, E.J. Jr; Fuller, R.C.; Gross, R.A., and Lenz, R. W. Ability of the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* to produce various poly ( $\beta$ -hydroxyalkanoates): potential sources for biodegradable polyesters. *Int. Journal of Biol. Macromol.*, 11:49–55, 1989.
- Brockmann, H.; Knobloch, G. jr.; Schweer, I., and Trowitzsch, W. Die Alkoholkomponente des Bacteriochlorophyll a aus *Rhodospirillum rubrum*. *Archiv für Mikrobiologie*, 90:161–164, 1973.
- Brunisholz, R.A.; Suter, F., and Zuber, H. The light-harvesting polypeptides of *Rhodospirillum rubrum* I. The amino-acid sequence of the second light-harvesting polypeptide B880- $\beta$  (B870- $\beta$ ) of *Rhodospirillum rubrum* S1 and the carotenoidless mutant G-9<sup>+</sup>. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 365:675–688, 1984.
- Buch, Tanja. Systembiologische Untersuchungen des Acetatstoffwechsels in *Rhodospirillum rubrum* in Abhängigkeit von Sauerstoffkonzentration und Illumination. Studienarbeit, Universität Magdeburg, 2009.
- Buchanan, B. B.; Evans, M.C.W., and Arnon, D.I. Ferredoxin-dependent carbon assimilation in *Rhodospirillum rubrum*. *Archiv für Mikrobiologie*, 59:32–40, 1967.
- Buchanan, B.B.; Bachofen, R., and Arnon, D.I. Role of ferredoxin in the reductive assimilation of CO<sub>2</sub> and acetate by extracts of the photosynthetic bacterium, *Chromatium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA (PNAS)*, 52:839–847, 1964.
- Burnham, B.F. and Lascelles, J. Control of porphyrin biosynthesis through a negative-feedback mechanism. *Biochemical Journal*, 87:462, 1963.
- Butzin, N.C.; Owen, H.A., and Collins, M.L.P. A new system for heterologous expression of membrane proteins: *Rhodospirillum rubrum*. *Protein Expression and Purification*, 70:88–94, 2010.
- Carithers, R.P.; Yoch, D.C., and Arnon, D.I. Isolation and characterization of bound ion-sulfur proteins from bacterial photosynthetic membranes. II. Succinate dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *The Journal of Biological Chemistry*, 252:7461–7467, 1977.

- Carlberg, I. and Nordlund, S. Purification and partial characterization of glutamate synthase from *Rhodospirillum rubrum* grown under nitrogen-fixing conditions. *Journal of Biochemistry*, 279:151–154, 1991.
- Chatterjee, R.; Sanville Millard, C.; Champion, K.; Clark, D.P., and Donnelly, M.I. Mutation of the *ptsG* gene results in increased production of succinate in fermentation of glucose by *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:148–154, 2001.
- Cheng, Y.S.; Brantner, C.A.; Tsapin, A., and Collins, M.L.P. Role of the H protein in assembly of the photochemical reaction center and intracytoplasmic membrane in *Rhodospirillum rubrum*. *Journal of Bacteriology*, 182:1200–1207, 2000.
- Clayton, R.K. Relations between photochemistry and fluorescence in cells and extracts of photosynthetic bacteria. *Photochemistry and Photobiology*, 5:807–821, 1966.
- Cluis, C.P.; Burja, A.M., and Martin, V.J.J. Current prospects for the production of coenzyme Q10 in microbes. *TRENDS in Biotechnology*, 25:514–521, 2007.
- Cogdell, R.J.; Lindsay, J.G.; Valentine, J., and Durant, I. A further characterisation of the B890 light-harvesting pigment-protein complex from *Rhodospirillum rubrum* strain S1. *FEBS Letters*, 150:151–154, 1982.
- Cogdell, R.J.; Howard, T.D.; Bittl, R.; Schlodder, E.; Geisenheimer, I., and Lubitz, W. How carotenoids protect bacterial photosynthesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 355:1345–1349, 2000.
- Cohen-Bazire, G.; Sistrom, W.R., and Stainer, R.Y. Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 49: 25–68, 1957.
- Conrad, R. and Schlegel, H.G. Different pathways for fructose and glucose utilization in *Rhodopseudomonas capsulata* and demonstration of 1-phosphofructokinase in phototrophic bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 358:221–225, 1974.
- Cooper, B. Glycerin als Feedstock für die industrielle Enzymherstellung. In *Neue Kohlenstoffquellen für die Biotechnologie, Dechema-Tagung, Frankfurt a.M.*, 2009.
- Cooper, D.A. Carotenoids in health and disease: Recent scientific evaluations, research recommendations and the consumer. *The Journal of Nutrition*, 134:221S–224S, 2004.
- Cooper, R. The biosynthesis of coporphyrinogen, magnesium monomethylester protoporphyrin and bacteriochlorophyll by *Rhodopseudomonas capsulata*. *Biochemical Journal*, 89:100–108, 1963.
- Cooper, T.G. and Benedict, C.R. PEP-carboxykinase exchange reaction in photosynthetic bacteria. *Plant Physiology*, 43:788–792, 1968.
- Cutinelli, C.; Ehrensvärd, G.; Reio, L.; Saluste, E., and Stjernholm, R. Acetic acid metabolism in *Rhodospirillum rubrum* under anaerobic conditions II. *Arkiv for Kemi*, 2:315–361, 1951.

- Das, D. and Veziroğlu, T.N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26:13–28, 2001.
- Davies, B. H. and Goodwin, T.W. Preliminary observations on the incorporation of [2-<sup>14</sup>C]acetate and [2-<sup>14</sup>C]mevalonate into the unsaponifiable matter of isolated chromophores of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemical Journal*, 73:10–10, 1959.
- Davies, K.A.; Hatefi, Y.; Crawford, I.P., and Baltscheffsky, H. Purification, molecular properties, and amino acid composition of the subunits of *Rhodospirillum rubrum* succinate dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 180:459–464, 1977.
- Dawes, E.A. and Senior, P.J. *Advances in Microbial Physiology, Volume 10*. Academic Press Inc. (London) Ltd., 1973.
- de Koning, W. and van Dam, K. A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. *Analytical Biochemistry*, 204:118–123, 1992.
- Denziger, S. and Burger, M. Photodynamic diagnosis of bladder tumors. *Current Urology Reports*, 9:101–105, 2008.
- Dhillon, D.S. and Silver, M. The NADP-specific isocitrate dehydrogenase of *Rhodospirillum rubrum*. *Plant Cell Physiology*, 13:261–272, 1972.
- Dills, S.S.; Apperson, A.; Schmidt, M.R., and Saier, M. H. Jr. Carbohydrate transport in bacteria. *Microbiological Reviews*, 44:385–418, 1980.
- Dixon, N.M. and Kell, D.B. The inhibition by CO<sub>2</sub> of the growth and metabolism of microorganisms. *Journal of Applied Bacteriology*, 67:109–1036, 1989.
- Do, Y.S.; Smeenk, J.; Broer, K.M.; Kisting, C.J.; Brown, R.; Heindel, T.J.; Bobik, T.A., and DiSpirito, A.A. Growth of *Rhodospirillum rubrum* on synthesis gas: Conversion of CO to H<sub>2</sub> and Poly-β-hydroxyalkanoate. *Biotechnology and Bioengineering*, 97:279–286, 2007.
- Dominguez, H.; Rollin, C.; Guyonvarch, A.; Guerquin-Kern, J.-L.; Cocaign-Bousquet, M., and Lindley, N.D. Carbon-flux distribution in the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on fructose. *European Journal of Biochemistry*, 254:96–102, 1998.
- Drawert, F.; Hagen, W.; Klisch, W.; Postel, W., and Sommer, G. *Handbuch der Biotechnologie*. R. Oldenbourg Verlag GmbH München, 1994.
- Drews, G. Untersuchungen zur Regulation der Bacteriochlorophyll-Synthese bei *Rhodospirillum rubrum*. *Archiv für Mikrobiologie*, 51:186–198, 1965.
- Drews, G. Structure and functional organization of light-harvesting complexes and photochemical reaction centers in membranes of phototrophic bacteria. *Microbiological Reviews*, 49:59–70, 1985.
- Droste, P.; von Lieres, E.; Wiechert, W., and Nöh, K. Customizable visualization on demand for hierarchically organized information in biochemical networks. *Lecture Notes in Computer Science*, 6026:163–174, 2010.

- Ensign, S.A. Revisiting the glyoxylate cycle: alternative pathways for microbial acetate assimilation. *Molecular Microbiology*, 61:274–276, 2006.
- Erb, T.J.; Berg, I.A.; Brecht, V.; Müller, M.; Fuchs, G., and Alber, B.E. Synthesis of C<sub>5</sub>-dicarboxylic acids from C<sub>2</sub>-units involving crotonyl-CoA carboxylase/reductase: The ethylmalonyl-CoA pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA (PNAS)*, 104:10631–10636, 2007.
- Evans, M.B.; Cogdell, R.J., and Britton, G. Determination of the bacteriochlorophyll:carotenoid ratios of the B890 antenna complex of *Rhodospirillum rubrum* and the B800-850 complex of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 935:292–298, 1988.
- Evans, M.C.W.; Buchanan, B.B., and Arnon, D.I. A new ferredoxin-dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium. *Journal of Biochemistry*, 55:928–934, 1966.
- Farmer, W.R. and Liao, J.C. Precursor balancing for metabolic engineering of lycopene production in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 17:57–61, 2001.
- Farris, P.L. *Starch - Chemistry and Technology*. Food Science and Technology, International Series, 2009.
- Filatova, L.V.; Berg, I.A.; Krasil'nikova, E.N., and Ivanovsky, R.N. [A study of the mechanism of acetate assimilation in purple nonsulfur bacteria lacking the glyoxylate shunt: enzymes of the citramalate cycle in *Rhodobacter sphaeroides*]. *Mikrobiologiya*, 74:319–328, 2005.
- Fotiadis, D.; Qian, P.; Philippsen, A.; Bullough, P.A.; Engel, A., and Hunter, C.N. Structural analysis of the reaction center light-harvesting complex I photosynthetic core complex of *Rhodospirillum rubrum* using atomic force microscopy. *The Journal of Biological Chemistry*, 279:2063–2068, 2004.
- Fritsch, C.; Lang, K.; Neuse, W.; Ruzicka, T., and Lehmann, P. Photodynamic diagnosis and therapy in dermatology. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 11: 358–373, 1998.
- Froesch, E.R.; Wolf, H.P.; Baitsch, H.; Prader, A., and Labhart, A. Hereditary fructose intolerance: An inborn defect of hepatic fructose-1-phosphate splitting aldolase. *The American Journal of Medicine*, 34:151–167, 1963.
- Fuchs, G. *Allgemeine Mikrobiologie*, chapter Biosynthesen, pages 234–242. Georg Thieme Verlag, 2007a.
- Fuchs, G. *Allgemeine Mikrobiologie*, chapter Zentrale Stoffwechselwege, page 205. Georg Thieme Verlag, 2007b.
- Fujita, Y. and Bauer, C.E. Reconstitution of light-independent protochlorophyllide reductase from purified Bch1 and BchN-BchB subunits - In vitro confirmation of nitrogenase-like features on a bacteriochlorophyll biosynthesis enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 275:23583–23588, 2000.
- Fuller, R. *The Photosynthetic Bacteria*. Plenum Press: New York and London, 1978.

- Fuller, R.C. *Anoxygenic photosynthetic bacteria*. Kluwer Acad. Publ., 1995.
- Ghosh, R.; Hardmeyer, A.; Thoenen, I., and Bachofen, R. Optimization of the Sistrom medium for large-scale batch cultivation of *Rhodospirillum rubrum* under semiaerobic conditions with maximal yield of photosynthetic membranes. *Applied and Environmental Microbiology*, 60:1698–1700, 1994.
- Gibson, M.S. and Wang, C.H. Utilization of fructose and glutamate by *Rhodospirillum rubrum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 14:493–498, 1968.
- Giffhorn, F.; Beuscher, N., and Schaab, C. Activation and deactivation of citratelase during growth of *Rhodopseudomonas gelatinosa* on citrate. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 353:1518–1518, 1972.
- Glaeser, J. and Klug, G. Photo-oxidative stress in *Rhodobacter sphaeroides*: protective role of carotenoids and expression of selected genes. *Microbiology*, 151:1927–1938, 2005.
- Glover, J.; Kamen, M.D., and van Genderen, H. Studies on the metabolism of photosynthetic bacteria. XII. Comparative light and dark metabolism of acetate and carbonate by *Rhodospirillum rubrum*. *Archives of Biochemistry*, 85:384–408, 1952.
- Gokarn, R.R.; Eiteman, M.A., and Altman, E. Expression of pyruvate carboxylase enhances succinate production in *Escherichia coli* without affecting glucose uptake. *Biotechnology Letters*, 20:795–798, 1998.
- Goodwin, T.W. and Osman, H.G. Studies on carotenogenesis 9. General cultural conditions controlling carotenoid (spirilloxanthin) synthesis in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemical Journal*, 53:541–546, 1953.
- Gorchein, A. Control of magnesium protoporphyrin chelatase activity in *Rhodopseudomonas sphaeroides*: Role of light, oxygen, electron and energy transfer. *Biochemical Journal*, 134:833, 1973.
- Gorchein, A.; Gibson, L.C., and Hunter, C.N. Gene expression and control of enzymes for synthesis of magnesium protoporphyrin monomethyl ester in *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemical Society transactions*, 21:201S, 1993.
- Gorrell, T.E. and Uffen, R.L. Fermentative metabolism of pyruvate by *Rhodospirillum rubrum* after anaerobic growth in darkness. *Journal of Bacteriology*, 131:533–543, 1977.
- Gough, S.P.; Petersen, B.O., and Duus, J.Ø. Anaerobic chlorophyll isocyclic ring formation in *Rhodobacter capsulatus* requires a cobalamin cofactor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA (PNAS)*, 97:6908–6913, 2000.
- Grammel, H. and Ghosh, R. Redox-state dynamics of ubiquinone-10 imply cooperative regulation of photosynthetic membrane expression in *Rhodospirillum rubrum*. *Journal of Bacteriology*, 190:4912–4921, 2008.
- Grammel, H.; Gilles, E.-D., and Ghosh, R. Microaerophilic cooperation of reductive and oxidative pathways allows maximal photosynthetic membrane biosynthesis in *Rhodospirillum rubrum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:6577–6586, 2003.

- Granick, S. Magnesium protoporphyrin monoester and protoporphyrin monomethyl ester in chlorophyll biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 236:1168–1172, 1961.
- Gray, C.T.; Wimpenny, J.W.T., and Mossman, M.R. Regulation of metabolism in facultative bacteria. II. Effects of aerobiosis, anaerobiosis and nutrition on the formation of Krebs cycle enzymes in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 117:33–41, 1966.
- Gray, M.J. and Escalante-Semerena, J.C. Single-enzyme conversion of FMNH<sub>2</sub> to 5,6-dimethylbenzimidazole, the lower ligand of B<sub>12</sub>. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA (PNAS)*, 104:2921–2926, 2007.
- Groves, J.T. and Nemo, T.E. Epoxidation reactions catalyzed by iron porphyrins. Oxygen transfer from iodobenzene. *Journal of the American Chemical Society*, 105:5786–5791, 1983.
- Gutowski, S.J. and Rosenberg, H. Succinate uptake and related proton movements in *Escherichia coli* K12. *Bioch*, 152:647–664, 1975.
- Ha, S.-J.; Kim, S.-Y.; Seo, J.-H.; Moon, H.-J.; Lee, K.-M., and Lee, J.-K. Controlling the sucrose concentration increases Coenzyme Q10 production in fed-batch culture of *Agrobacterium tumefaciens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76:109–116, 2007.
- Haas, G.J.; Prescott, H.E.; Dudley, E.; Dik, R.; Hintlian, C., and Keane, L. Inactivation of microorganisms by carbon dioxide under pressure. *Journal of Food Safety*, 9:253–265, 1989.
- Hädicke, O.; Grammel, H., and Klamt, S. Metabolic network modeling of redox balancing and biohydrogen production in purple nonsulfur bacteria. *BMC Systems Biology*, 5: 150, 2011.
- Hallenbeck, P.C. and Benemann, J.R. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27:1185–1193, 2002.
- Handt, Sebastian. Entwicklung eines Perfusionsprozesses für *Rhodospirillum rubrum* zur maximalen Expression photosynthetischer Membranen im Dunkeln. Studienarbeit, Universität Magdeburg, 2011.
- Hanover, L.M. and White, J.S. Manufacturing, composition, and applications of fructose. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 58:724–732, 1993.
- Hansen, T.A. and Veldkamp, H. *Rhodopseudomonas sulfidophila*, nov. spec., a new species of the purple nonsulfur bacteria. *Archives of Microbiology*, 92:45–48, 1973.
- Happe, T. and Müller, K. Biokraftstoffe aus Algen: Photobiologische Wasserstoffproduktion und CO<sub>2</sub>-Fixierung. In *Deutsche Physikalische Gesellschaft - Arbeitskreis Energie: Perspektiven für die Energie der Zukunft*, 2004.
- Hartigan, N.; Hazel, A.; Sweeney, F.; Lawless, A.M., and Papiz, M.Z. The 7.5-Å electron density and spectroscopic properties of a novel low-light B800 LH2 from *Rhodopseudomonas palustris*. *Biophysical Journal*, 82:963–977, 2002.



- Hatefi, Y.; Davies, K.A.; Baltscheffsky, H.; Baltscheffsky, M., and Johansson, Bo C. Isolation and properties of succinate dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 152:613–618, 1972.
- Haywood, G.W.; Anderson, A.J.; Chu, L., and Dawes, E.A. Characterization of two 3-ketothiolases in the polyhydroxyalkanoate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology Letters*, 52:91–96, 1988a.
- Haywood, G.W.; Anderson, A.J.; Chu, L., and Dawes, E.A. The role of NADH- and NADPH-linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxyalkanoate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology Letters*, 52:259–264, 1988b.
- Heider, J. *Allgemeine Mikrobiologie*, chapter 12: Prinzipien der Gärung, pages 350–351. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2007.
- Henderson, B.W.; Sumlin, A.B.; Owczarczak, B.L., and Dougherty, T.J. Bacteriochlorophyll-a as photosensitizer for photodynamic treatment of transplantable murine tumors. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 10:303–313, 1991.
- Heo, J.; Halbleib, C.M., and Ludden, P.W. Redox-dependent activation of CO dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA (PNAS)*, 98:1690–1693, 2001.
- Hessner, M.J.; Wejksnora, P.J., and Collins, M.L.P. Construction, characterization, and complementation of *Rhodospirillum rubrum puf* region mutants. *Journal of Bacteriology*, 173:5712–5722, 1991.
- Hoover, T.R. and Ludden, P.W. Derepression of nitrogenase activity of malate to cultures of *Rhodospirillum rubrum* grown with glutamate as the carbon and nitrogen source. *Journal of Bacteriology*, 159:400–403, 1984.
- Hoppe, U.; Bergemann, J.; Diembeck, W.; Ennen, J.; Gohla, S.; Harris, I.; Jacob, J.; Kielholz, J.; Mei, W.; Pollet, D.; Schachtschabel, G.; Schreiner, V.; Stüb, F., and Steckel, F. Coenzyme Q<sub>10</sub>, a cutaneous antioxidant and energizer. *BioFactors*, 9:371–378, 1999.
- Howell, D.M.; Xu, H., and White, R.H. (R)-citramalate synthase in methanogenic archaea. *Journal of Bacteriology*, 181:331–333, 1999.
- Hu, X.; Damjanovic, A.; Ritz, T., and Schulten, K. Architecture and mechanism of the light-harvesting apparatus of purple bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA (PNAS)*, 95:5935–5941, 1998.
- Hutner, S.H. Organic growth essentials of the aerobic nonsulfur photosynthetic bacteria. *Journal of Bacteriology*, 52:213–221, 1946.
- Imhoff, J.F. Quinones of phototrophic purple bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 25: 85–89, 1984.
- Imhoff, J.F. *Anoxygenic photosynthetic bacteria*. Kluwer Acad. Publ., 1995.

- Imhoff, J.F.; Hiraishi, A., and Süling, J. *Bergey's manual of systematic bacteriology: The proteobacteria*, volume 2, chapter Anoxygenic phototrophic purple bacteria, page 123. Springer Science + Business Media, New York, USA, 2005.
- Inoue, K.; Karashima, T.; Kamada, M.; T. KurabayashiShuin, A.; Furihata, M.; Fujita, H.; Utsumi, K., and Sasaki, J. Regulation of 5-aminolevulinic acid-mediated protoporphyrin IX accumulation in human urothelial carcinomas. *Pathobiology*, 76:303–314, 2009.
- Inui, M.; Murakami, S.; Okino, S.; Kawaguchi, H.; Vertes, A. A., and Yukawa, H. Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 7:182–196, 2004.
- Inui, M.; Suda, M.; Okino, S.; Nonaka, H.; Puskás, L.G.; Vertès, A. A., and Yukawa, H. Transcriptional profiling of *Corynebacterium glutamicum* metabolism during organic acid production under oxygen deprivation conditions. *Microbiology*, 153:2491–2504, 2007.
- Ivanovsky, R.N.; Sintsov, N.V., and Kondratieva, E.N. ATP-linked citrate lyase activity in the green sulfur bacterium *Chlorobium limicola* forma *thiosulfatophilum*. *Archives of Microbiology*, 128:239–241, 1980.
- Ivanovsky, R.N.; Krasilnikova, E.N., and Berg, I.A. A proposed citramalate cycle for acetate assimilation in the purple non-sulfur bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *FEMS Microbiology Letters*, 153:399–404, 1997.
- Iwakura, M.; Tokushige, M.; Katsuki, H., and Muramatsu, S. Studies on regulatory functions of malic enzymes. *The Journal of Biochemistry*, 83:1387–1394, 1978.
- Jansson, M. Phosphate uptake and utilization by bacteria and algae. *Hydrobiologia*, 170: 177–189, 1988.
- Jantama, K.; Haupt, M.J.; Svoronos, S.A.; Zhang, X.; Moore, J.C.; Shanmugam, K.T., and Ingram, L.O. Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate. *Biotechnology and Bioengineering*, 99:1140–1153, 2008.
- Jensen, S.L. and G. StanierCohen-Bazire, R.Y. Biosynthesis of carotenoids in purple bacteria. A re-evaluation based on considerations of chemical structure. *Nature*, 192: 1168–1172, 1961.
- Jeya, M.; Moon, H.-J.; Lee, J.L.; Kim, I.-W., and Lee, J.-K. Current state of coenzyme Q10 production and its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85:1653–1663, 2010.
- Jones, O.T.G. The production of magnesium protoporphyrin monomethylester by *Rhodopseudomonas spheroides*. *Biochemical Journal*, 86:429–432, 1963.
- Jones, O.T.G. *The photosynthetic bacteria*. Plenum Press: New York and London, 1978.

- Jonsson, A. and Nordlund, S. *In vitro* studies of the uridylylation of the three P<sub>II</sub> protein paralogs from *Rhodospirillum rubrum*: the transferase activity of *R. rubrum* GlnD is regulated by  $\alpha$ -ketoglutarate and divalent cations but not by glutamine. *Journal of Bacteriology*, 189:3471–3478, 2007.
- Kaltschmitt, M.; Hartmann, H., and Hofbauer, H. *Energie aus Biomasse. Grundlagen, Techniken und Verfahren*. Springer Verlag, Berlin und Heidelberg, 2009.
- Kamen, M.D. and Gest, H. Evidence for a nitrogenase system in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Science*, 109:560, 1949.
- Kanemoto, R.H. and Ludden, P.W. Effect of ammonia, darkness, and phenazine methosulfate on whole-cell nitrogenase activity and Fe protein modification in *Rhodospirillum rubrum*. *Journal of Bacteriology*, 158:713–720, 1984.
- Kaplan, S. *The Photosynthetic Bacteria*. Plenum Press: New York and London, 1978.
- Karrasch, S.; Bullough, P.A., and Ghosh, R. The 8.5 Å projection map of light-harvesting complex I from *Rhodospirillum rubrum* reveals a ring composed of 16 subunits. *The EMBO Journal*, 14:631–638, 1995.
- Keister, D.L. and Minton, N.J. Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria: VI. Inorganic pyrophosphate-driven ATP synthesis in *Rhodospirillum rubrum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 147:330–338, 1971.
- Khademi, S.; O’Connell, J.O.; Remis, J.; Robles-Colmenares, Y.; Miercke, L.J.W., and Stroud, R.M. Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: Structure of AmtB at 1.35 Å. *Science*, 305:1587–1594, 2004.
- Khan, A.R.; Khan, K.M.; Perveen, S., and Butt, N. Determination of nicotinamide and 4-aminobenzoic acid in pharmaceutical preparation by LC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29:723–727, 2002.
- Kim, Y.-S.; Lee, J.-H.; Kim, N.-H.; Yeom, S.-J.; Kim, S.-W., and Oh, D.-K. Increase of lycopene production by supplementing auxiliary carbon sources in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90:489–497, 2011.
- Klamt, S.; Stelling, J.; Ginkel, M., and Gilles, E.D. FluxAnalyzer: exploring structure, pathways, and flux distributions in metabolic networks on interactive flux maps. *Bioinformatics*, 19f:261–269, 2003.
- Klamt, S.; Saez-Rodriguez, J., and Gilles, E.D. Structural and functional analysis of cellular networks with *Rhodospirillum rubrum*. *BMC Systems Biology*, 1:2, 2007.
- Klemme, J.-H. Unidirectional inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Rhodospirillum rubrum* by ATP. *Archives of Microbiology*, 107:189–192, 1976.
- Klug, G. Regulation of expression of photosynthesis genes in anoxygenic photosynthetic bacteria. *Archives of Microbiology*, 159:397–404, 1993.
- Klyashchitsky, B.A.; Nechaeva, I.S., and Ponomaryov, G.V. Approaches to targeted photodynamic tumor therapy. *Journal of Controlled Release*, 29:1–16, 1994.

- Kornberg, H.L. and Lascelles, J. The formation of isocitratase by the *Athiorhodaceae*. *Journal of General Microbiology*, 23:511–517, 1960.
- Kosourov, S.; Patrusheva, E.; Ghirardi, M.L.; Seibert, M., and Tsygankov, A. A comparison of hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under different growth conditions. *Journal of Biotechnology*, 128:776–787, 2007.
- Koutinas, A.A.; Xu, Y.; Wang, R., and Webb, C. Polyhydroxybutyrate production from a novel feedstock derived from a wheat-based biorefinery. *Enzyme*, 40:1035–1044, 2007.
- Krahe, M. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. Wiley-VCH, 2003.
- Kuroda, A. and Ohtake, H. *Applications of Polyphosphate and other Biopolymers in Wastewater Treatment*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005.
- Kwon, S.J.; de Boer, A.L.; Petri, R., and Schmidt-Dannert, C. High-level production of porphyrins in metabolically engineered *Escherichia coli*: Systematic extension of a pathway assembled from overexpressed genes involved in heme biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:4875–4883, 2003.
- Lascelles, J. Adaption to form bacteriochlorophyll in *Rhodospseudomonas spheroides*: Changes in activity of enzymes concerned in pyrrole synthesis. *Biochemical Journal*, 72:508, 1959.
- Lascelles, J. *The Photosynthetic Bacteria*. Plenum Press: New York and London, 1978.
- Law, J.H. and Slepecky, R.A. Assay of poly-beta-hydroxybutyric acid. *Journal of Bacteriology*, 1:33–36, 1961.
- Lee, S.J.; Lee, D.-Y.; Kim, T. Y.; Kim, B. H.; Lee, J., and Lee, S. Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced production of succinic acid, based on genome comparison and *in-silico* gene knockout simulation. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:7880–7887, 2005.
- Lee, S.J.; Song, H., and Lee, S.Y. Genome-based metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for succinic acid production. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:1939–1948, 2006.
- Lee, Y.-K. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology*, 13:307–315, 2001.
- Lengeler, J.W.; Drews, G., and Schlegel, H.G., editors. *Biology of the Prokaryotes*, chapter Biosynthesis of Building Blocks, pages 110–160. Blackwell Science Ltd, 2009.
- Lin, E.C.C. Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 30:535–578, 1976.
- Lin, H.; Bennett, G.N., and San, Ka-Yiu. Metabolic engineering of aerobic succinate production systems in *Escherichia coli* to improve process productivity and achieve the maximum theoretical succinate yield. *Metabolic Engineering*, 7:116–127, 2005.
- Lozano, R.M.; Manzano, I.; Gomez, R., and Ramirez, J.M. Changes in the native carotenoid of bacterial pigment-protein complexes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 976:196–202, 1989.

- Lu, S.; Eiteman, M.A., and Altman, E. pH and base counterion affect succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36:1101–1109, 2009.
- Ludden, P.W. and Roberts, G.P. Regulation of nitrogenase activity by reversible ADP ribosylation. *Current Topics in Cellular Regulation*, 30:23–56, 1989.
- Lüderitz, R. and Klemme, J.-H. Isolierung und Charakterisierung eines membrangebundenen Pyruvatdehydrogenase-Komplexes aus dem phototrophen Bakterium *Rhodospirillum rubrum*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 32:351–361, 1977.
- Luo, B.; Groenke, K.; Takors, R.; Wandrey, C., and Oldiges, M. Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1147:153–164, 2007.
- Lynd, L.R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass. *Annual Review of Environment and Resources*, 21:403–465, 1996.
- Maness, P.-C. and Weaver, P.F. Evidence for three distinct hydrogenase activities in *Rhodospirillum rubrum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57:751–756, 2001.
- Mansfield, D.A.; Anderson, A.J., and Naylor, L.A. Regulation of PHB metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 41:44–49, 1995.
- Manual, Ridascreen. *RIDASCREEN®FAST Vitamin B<sub>12</sub>*.
- Martelli, H.L.; da Silva, I.M.; Souza, N.O., and Pomeroy, D. Glycerol as substrate for biomass and  $\beta$ -carotene production by *Rhodotorula lactosa*. *World*, 8:635–637, 1992.
- Massarini, E.; Higa, A.I., and Cazzulo, J.J. Regulation properties of the citrate synthase from *Rhodospirillum rubrum*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 32:426–428, 1976.
- McKinlay, J. B. and Harwood, C. S. Calvin cycle flux, pathway constraints, and substrate oxidation state together determine the H<sub>2</sub> biofuel yield in photoheterotrophic bacteria. *MBio*, 2:1–9, 2011.
- McLuskey, K.; Prince, S.M.; Cogdell, R.J., and Isaacs, N.W. The crystallographic structure of the B800-820 LH3 light-harvesting complex from the purple bacteria *Rhodospseudomonas Acidophila* strain 7050. *Biochemistry*, 30:8783–8789, 2001.
- Melis, A. and Happe, T. Hydrogen production. Green algae as a source of energy. *Plant Physiology*, 127:740–748, 2001.
- Mino, T. Microbial selection of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge wastewater treatment processes for enhanced biological phosphate removal. *Biochemistry*, 65:341–348, 2000.
- Mortensen, S.A.; Leth, A.; Agner, E., and Rohde, M. Dose-related decrease of serum coenzyme Q<sub>10</sub> during treatment with HMG-CoA reductase inhibitors. *Molecular Aspects of Medicine*, 18:137–144, 1989.

- Moskowitz, G.J. and Merrick, J.M. Metabolism of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. II. Enzymatic synthesis of D-(-)- $\beta$ -hydroxybutyryl coenzyme A by an enoyl hydratase from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry*, 8:2748–2755, 1969.
- Munasinghe, Pradeep Chaminda and Khanal, Samir Kumar. Biomass-derived syngas fermentation into biofuels: Opportunities and challenges. *Bioresource Technology*, 101: 5013–5022, 2010.
- NCBI, . National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Negishi, E.; Liou, S.Y.; Xu, C., and Huo, S. A novel, highly selective, and general methodology for the synthesis of 1,5-diene-containing oligoisoprenoids of all possible geometrical combinations exemplified by an iterative and convergent synthesis of coenzyme Q<sub>10</sub>. *Organic Letters*, 4:261–264, 2002.
- Neil, E.; Marsh, G., and Holloway, D.E. Cloning and sequencing of glutamate mutase component S from *Clostridium tetanomorphum*. *FEBS*, 310:167–170, 1992.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M. *Lehninger Biochemie. 3. Auflage*, chapter 21 Biosynthese von Lipiden, pages 846–847. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 2001.
- Netzer, R.; Krause, M.; Rittmann, D.; Peters-Wendisch, P.G.; Eggeling, L.; Wendisch, V.F., and Sahm, H. Roles of pyruvate kinase and malic enzyme in *Corynebacterium glutamicum* for growth on carbon sources requiring gluconeogenesis. *Archives of Microbiology*, 182:354–363, 2004.
- Nordlund, S.; Kanemoto, R. H.; Murrell, S.A., and Ludden, P.W. Properties and regulation of glutamine synthetase from *Rhodospirillum rubrum*. *Journal of Bacteriology*, 161:13–17, 1985.
- Ohmori, H.; Ishitani, H.; Sato, K.; Shimizu, S., and Fukui, S. Metabolism of glutamate in purple nonsulfur bacteria: Participation of vitamin B<sub>12</sub>. *Agricultural Biological Chemistry*, 38:359–365, 1974.
- Park, D.H. and Kim, B.S. Production of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha* from soybean oil. *Nature Biotechnology*, 28:719–924, 2011.
- Parson, W.W. and Rudney, H. The biosynthesis of ubiquinone and rhodoquinone from *p*-hydroxybenzoate and *p*-hydroxybenzaldehyd in *Rhodospirillum rubrum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 240:1855–1863, 1965.
- Peters, D. Carbohydrates for fermentation. *Biotechnology Journal*, 1:806–814, 2006.
- Pfennig, N. *The Photosynthetic Bacteria*. Plenum Press: New York and London, 1978.
- Pike, L. and Sojka, G.A. Glycerol dissimilation in *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, 124:1101–1105, 1975.

- Plaetzer, K.; Kiesslich, T.; Oberdanner, C.B., and Krammer, B. Apoptosis following photodynamic tumor therapy: Induction, mechanism and detection. *Current Pharmaceutical Design*, 11:1151–1165, 2005.
- Polgár, A.; van Niel, C.B., and Zechmeister, L. Studies on the pigments of the purple bacteria. II. A spectroscopic and stereochemical investigation of spirilloxanthin. *Archives of Biochemistry*, 5:243–264, 1944.
- Pörtner, R. *Angewandte Mikrobiologie*, chapter 13 Grundlagen der Bioverfahrenstechnik, pages 245–247. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2006a.
- Pörtner, R. *Angewandte Mikrobiologie*, chapter 13 Grundlagen der Bioverfahrenstechnik, pages 248–249. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2006b.
- Pulz, O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57:287–293, 2001.
- Ramana, V. Ch. and Sasikala, Ch. Biotechnological potential of anoxygenic phototrophic bacteria. I. Production of single-cell protein, vitamins, ubiquinones, hormones and enzymes and use in waste treatment. *Advances in Applied Microbiology*, 41:173–279, 1995a.
- Ramana, V. Ch. and Sasikala, Ch. Biotechnological potential of anoxygenic phototrophic bacteria. II. Biopolyesters, biopesticide, biofuel and biofertilizer. *Advances in Applied Microbiology*, 41:227–277, 1995b.
- Riedel, S.L.; Bader, J.; Brigham, C.J.; Budde, C.F.; Yusof, Z.A.M.; Rha, C., and Sinskey, A.J. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by *Ralstonia eutropha* in high cell density palm oil fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 109:74–83, 2011.
- Rohmer, M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural Products Report*, 16:565–574, 1999.
- Roseman, S. The transport of carbohydrates by a bacterial phosphotransferase system. *The Journal of Cell Biology*, 54:138–184, 1969.
- Roth, C. Carl Roth GmbH + Co. KG, Januar 2011. URL <http://www.carlroth.com/>.
- Sahm, H.; Cox, R.B., and Quayle, J.R. Metabolism of methanol by *Rhodospseudomonas acidophila*. *Journal of General Microbiology*, 94:313–322, 1976.
- Saier, M.H. Jr; Feucht, B.U., and Roseman, S. Phosphoenolpyruvate-dependent fructose phosphorylation in photosynthetic bacteria. *The Journal of Biological Chemistry*, 246: 7819–7821, 1971.
- Sánchez, A. M.; Bennett, G. N., and San, K.-Y. Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity. *Metabolic Engineering*, 7:229–239, 2005.
- Sandmann, G. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385:4–12, 2001.

- Sarles Cook, L. and Tabita, F. R. Oxygen regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase activity in *Rhodospirillum rubrum*. *Journal of Bacteriology*, 170:5468–5472, 1988.
- Sasaki, K.; Watanabe, M.; Suda, Y.; Ishizuka, A., and Noparatnaraporn, N. Applications of photosynthetic bacteria for medical fields. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100:481–488, 2005.
- Schick, H.-J. Substrate and light dependent fixation of molecular nitrogen in *Rhodospirillum rubrum*. *Archiv für Mikrobiologie*, 75:89–101, 1971.
- Schick, H.-J. and Drews, G. The morphogenesis of the bacterial photosynthetic apparatus III. The features of a pheophytin-protein-carbohydrate complex excreted by the mutant M 46 of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 183:215–229, 1969.
- Schmidt, K. *The Photosynthetic Bacteria*. Plenum Press: New York and London, 1978.
- Schmidt, K.; Nielsen, J., and Villadsen, J. Metabolic flux ratio analysis of genetic and environmental modulations of *Escherichia coli* central carbon metabolism. *Journal of Biotechnology*, 71:175–190, 1998.
- Schön, G. Fructoseverwertung und Bacteriochlorophyllsynthese in anaeroben Dunkel- und Lichtkulturen von *Rhodospirillum rubrum*. *Archiv für Mikrobiologie*, 63:362–375, 1968.
- Schön, G. Der Einfluss der Reservestoffe auf den ATP-Spiegel in Zellen von *Rhodospirillum rubrum* beim Übergang von aerober zu anaerober Dunkelkultur. *Archiv für Mikrobiologie*, 68:40–50, 1969.
- Schön, G. and Drews, G. Einfluss der Reservestoffe auf die Bacteriochlorophyllbildung in anaeroben Dunkelkulturen und Lichtkulturen von *Rhodospirillum rubrum*. *Archiv für Mikrobiologie*, 54:199–214, 1966.
- Schön, G. and Jank-Ladwig, R. Veränderungen des intracytoplasmatischen Membransystems (Thylakoide) von *Rhodospirillum rubrum* unter Stickstofflimitierung. *Archives of Microbiology*, 85:319–332, 1972.
- Schön, G. and Ladwig, R. Bacteriochlorophyllbiosynthese und Thylakoidmorphogenese in anaerober Dunkelkultur von *Rhodospirillum rubrum*. *Archiv für Mikrobiologie*, 74: 356–371, 1970.
- Schön, G. and Voelskow, H. Pyruvate fermentation in *Rhodospirillum rubrum* after transfer from aerobic to anaerobic conditions in the dark. *Archives of Microbiology*, 107:87–92, 1976.
- Schrader, J.; Schilling, M.; Holtmann, D.; Sell, D.; Filho, M.V.; Marx, A., and Vorholt, J.A. Methanol-based industrial biotechnology: current status and future perspectives of methylotrophic bacteria. *Trends in Biotechnology*, 27:107–115, 2008.
- Schröder, J. and Drews, G. Quantitative Bestimmung der Fettsäuren von *Rhodospirillum rubrum* und *Rhodopseudomonas capsulata* während der Thylakoidmorphogenese. *Archiv für Mikrobiologie*, 64:59–70, 1968.



- Schultz, J. E. and Weaver, P. F. Fermentation and anaerobic respiration by *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodopseudomonas capsulata*. *Journal of Bacteriology*, 149:181–190, 1982.
- Schultz, J.E.; Gotto, J.W.; Weaver, P.F., and Yoch, D.C. Regulation of nitrogen fixation in *Rhodospirillum rubrum* grown under dark, fermentative conditions. *Journal of Bacteriology*, 162:1322–1324, 1985.
- Schwender, J. *Die Mevalonat-unabhängige Isoprenoid-Biosynthese und deren Verbreitung in Pflanzen*. PhD thesis, Universität Karlsruhe (TH), 1999.
- Schwerzmann, R. U. and Bachofen, R. Carotenoid profiles in pigment-protein complexes of *Rhodospirillum rubrum*. *Plant Cell Physiology*, 30:497–504, 1989.
- Senior, P.J. and Dawes, E.A. The Regulation of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate Metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochemical Journal*, 134:225–238, 1973.
- Shadi, A.; Mansurova, S.E.; Tsydendambaev, V.D., and Kulaev, I.S. [Polyphosphate biosynthesis in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores]. *Mikrobiologiya*, 45:333–336, 1976.
- Shemin, D. and Kikuchi, G. Enzymatic synthesis of  $\delta$ -aminolevulinic acid. *Annals New York Academy of Sciences*, 75:122–128, 1958.
- Shemin, D. and Russel, C.S.  $\delta$ -aminolevulinic acid, its role in the biosynthesis of porphyrins and purines. *Journal of the American chemical society*, 75:4873–4874, 1953.
- Shigesada, K. Possible occurrence of a succinate-glycine cycle in *Rhodospirillum rubrum*. *Journal of Biochemistry*, 71:961–971, 1972.
- Siefermann-Harms, D. Carotenoids in photosynthesis. I. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 811:325–355, 1985.
- Sirevag, R.; Buchanan, B. B.; Berry, J. A., and Troughton, J. H. Mechanisms of CO<sub>2</sub> fixation in bacterial photosynthesis studied by the carbon isotope fractionation technique. *Archives of Microbiology*, 112:35–38, 1977.
- Sojka, G.A. *The Photosynthetic Bacteria*. Plenum Press: New York and London, 1978.
- Soret, J.-L. Analyse spectrale: Sur le spectre d'absorption du sang dans la partie violette et ultra-violette. *Comptes rendus*, 97:1269–1270, 1883.
- Srinivas, S.P.; Rao, G., and Mutharasam, R. *Handbook on anaerobic fermentations*, chapter : Redox potential in anaerobic and microaerobic fermentation, pages 147–186. Marcel Dekker, New York, 1988.
- Stanbury, P.F.; Whitaker, A., and Hall, S.J. *Principles of Fermentation technology*. Butterworth-Heinemann, 1999.
- Stanier, R.Y.; Doudoroff, M.; Kunisawa, R., and Contopoulou, R. The role of organic substrates in bacterial photosynthesis. *Biochemistry*, 45:1246–1260, 1959.

- Stephanopoulos, G.N.; Aristidou, A.A., and Nielsen, J. *Metabolic Engineering*, chapter 1.1. Importance of metabolic engineering, pages 9–14. Academic Press, An imprint of Elsevier, San Diego, California, 1998.
- Stokstad, E.L.R. and Koch, J. Folic acid metabolism. *Physiological Reviews*, 47:83–116, 1967.
- Takaichi, S. *The Purple Phototrophic Bacteria*, volume 28, chapter 6 Distribution and biosynthesis of carotenoids, pages 103–104. Springer, Dordrecht, Niederlande, 2009.
- Takasaki, Y.; Kosugi, Y., and Kanbayas, A. Studies on sugar-isomerizing enzyme - purification, crystallization and some properties of glucose isomerase from *Streptomyces sp.* *Agricultural and Biological Chemistry*, 33:1527, 1969.
- Teuber, M.; A., Geis; Krusch, U., and Lembke, J. *Handbuch der Biotechnologie*, chapter 11: Biotechnologische Verfahren zur Herstellung von Lebensmitteln und Futtermitteln, pages 489–491. R. Oldenbourg Verlag GmbH München, 1994.
- Tian, Y.; Yue, T.; Yuan, Y.; Soma, P.K.; Williams, P.D.; Machado, P.A.; Fu, H.; Kratochvil, R.J.; Wei, C., and Lo, M. Tobacco biomass hydrolysate enhances coenzyme Q10 production using photosynthetic *Rhodospirillum rubrum*. *Bioresource Technology*, 101:7877–7881, 2010.
- Todd, D.J. Erythropoietic protoporphyria. *British Journal of Dermatology*, 131:751–766, 1994.
- Trotsenko, Y.A. and Belova, L.L. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and its regulation in bacteria. *Microbiology*, 69: 635–645, 2000.
- Uffen, R.L. Metabolism of carbon monoxide. *Enzyme and Microbial Technology*, 3:197–206, 1984.
- Uffen, R.L.; Sybesma, C., and Wolfe, R.S. Mutants of *Rhodospirillum rubrum* obtained after long-term anaerobic, dark growth. *Journal of Bacteriology*, 108:1348–1356, 1971.
- Urakami, T. and Yoshida, T. Production of ubiquinone and bacteriochlorophyll a by *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter sulfidophilus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76:191–194, 1993.
- van Gernerden, H. Growth measurements of *Chromatium* cultures. *Archiv für Mikrobiologie*, 64:103–110, 1968a.
- van Gernerden, H. On the ATP generation by *Chromatium* in darkness. *Archiv für Mikrobiologie*, 64:118–124, 1968b.
- van Gernerden, H. Utilization of reducing power in growing cultures of *Chromatium*. *Archiv für Mikrobiologie*, 64:111–117, 1968c.
- van Niel, C.B. and Smith, J.H.C. Studies on the pigments of the purple bacteria. *Archiv für Mikrobiologie*, 6:219–229, 1935.
- Voelskow, H. and Schön, G. Propionate formation in *Rhodospirillum rubrum* under anaerobic dark conditions. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie*, 21:545–553, 1981.

- Walz, T.; Jamieson, S.J.; Bowers, C.M.; Bullough, P.A., and Hunter, C.N. Projection structures of three photosynthetic complexes from *Rhodobacter sphaeroides*: LH2 at 6 Å, LH1 and RC-LH1 at 25 Å. *Journal of Molecular Biology*, 282:833–845, 1998.
- Watanabe, F. Vitamin B<sub>12</sub> sources and bioavailability. *Experimental Biology and Medicine*, 10:1266–1274, 2007.
- Weber, H. Über das Vorkommen von kondensierten Phosphaten in Purpurbakterien. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie*, 5:315–329, 1965.
- Wiechert, W. and de Graaf, A.A. Bidirectional reaction steps in metabolic networks: I. Modeling and simulation of carbon isotope labeling experiments. *Biotechnology and Bioengineering*, 55:101–117, 1997.
- Wiechert, W.; Siefke, C.; de Graaf, A.A., and Marx, A. Bidirectional reaction steps in metabolic networks: II. Flux estimation and statistical analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 55:118–135, 1997.
- Wiechert, W.; Möllney, M.; Petersen, S., and de Graaf, A.A. A universal framework for <sup>13</sup>C metabolic flux analysis. *Metabolic Engineering*, 3:265–283, 2001.
- Wisselink, H.W.; Toirkens, M.J.; Wu, Q.; Pronk, J.T.; Antonius, J.A., and van Maris, J.A. Novel evolutionary engineering approach for accelerated utilization of glucose, xylose, and arabinose mixtures by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 75:907–914, 2009.
- Wittmann, C.; Krömer, J.O.; Kiefer, P.; Binz, T., and Heinzle, E. Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria. *Analytical Biochemistry*, 327:135–139, 2004.
- Yakunin, A.F. and Hallenbeck, P.C. Regulation of synthesis of pyruvate carboxylase in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology*, 179: 1460–1468, 1997.
- Yamagata, H.; Matoba, R.; Fujii, T., and Yukawa, H. Application of photosynthetic bacteria for porphyrin production. In *Studies in Surface Science and Catalysis*, 1998.
- Yelton, M.M. and Yoch, D.C. Nitrogen metabolism in *Rhodospirillum rubrum*: Characterization of glutamate synthase. *Journal of General Microbiology*, 123:335–342, 1981.
- Yikrazuul, . Schema des Nicht-oxidativen Pentosephosphatweges, 2009.  
URL [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/de/Nichtox\\_Pentosephosphatweg.png/](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/de/Nichtox_Pentosephosphatweg.png/).
- Yoshida, A.; Nishimura, T.; Kawaguchi, H.; Inui, M., and Yukawa, H. Enhanced hydrogen production from formic acid by formate hydrogen lyase-overexpressing *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:6762–6768, 2005.
- Yu, J. Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. *Journal of Biotechnology*, 86:105–112, 2001.

- Zahiri, H.S.; Yoon, S.H.; Keasling, J.D.; Lee, S.H.; Kim, S.W.; Yoon, S.C., and Shin, Y.C. Coenzyme Q<sub>10</sub> production in recombinant *Escherichia coli* strains engineered with a heterologous decaprenyl diphosphate synthase gene and foreign mevalonate pathway. *Metabolic Engineering*, 8:406–416, 2006.
- Zeiger, L. Entwicklung von Prozessführungsstrategien für die Hochzelldichte-Kultivierung von *Rhodospirillum rubrum*. Diplomarbeit, Hochschule Esslingen, 2008.
- Zeiger, L. and Grammel, H. Model-based high cell density cultivation of *Rhodospirillum rubrum* under respiratory dark conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 105:729–739, 2010.
- Zeikus, J.G.; Jain, M.K., and Elankovan, P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51:545–552, 1999.
- Zerez, C.R.; Lee, S.J., and Tanaka, K.R. Spectrophotometric determination of oxidized and reduced pyridine nucleotides in erythrocytes using a single extraction procedure. *Analytical Biochemistry*, 164:367–373, 1987.
- Zhang, X.; Jantama, K.; Shanmugam, K.T., and Ingram, L.O. Reengineering *Escherichia coli* for succinate production in mineral salts medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 75:7807–7813, 2009.
- Zhang, Y.; Pohlmann, E.L.; Ludden, P.W., and Roberts, G.P. Functional characterization of three GlnB homologs in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*: Roles in sensing ammonium and energy status. *Journal of Bacteriology*, 183:6159–6168, 2001.
- Zhang, Y.; Wolfe, D.M.; Pohlmann, E.L.; Conrad, M.C., and Roberts, G.P. Effect of AmtB homologues on the post-translational regulation of nitrogenase activity in response to ammonium and energy signals in *Rhodospirillum rubrum*. *Microbiology*, 152:2075–2089, 2006.