

---

**Inhaltsverzeichnis**

<i>Danksagung</i>	I
<i>Inhaltsverzeichnis</i>	III
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	VI
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>5</b>
<b>3 Stand des Wissens</b>	<b>7</b>
3.1 Biologische Grundlagen	7
3.1.1 Das Bakterium <i>Escherichia coli</i>	7
3.1.2 Stoffwechselwege in <i>E. coli</i>	7
3.1.3 Shikimat-Biosyntheseweg in <i>E. coli</i>	10
3.1.4 <i>E. coli</i> als Produktionsstamm	12
3.1.5 Prozesstechnische Optimierungen bei <i>E. coli</i> Produktionsstämmen	13
3.1.6 Struktur und physiologische Bedeutung der <i>trans</i> -Cyclohexadien-Derivaten	14
3.1.7 Mikrobieller Zugang zu den Cyclohexadien-Derivaten	14
3.2 Chemische Grundlagen	16
3.2.1 Verfahren zur chemischen Synthese von Cyclohexadien-Derivaten	16
3.3 Verfahrenstechnische Grundlagen der Produktabtrennung	17
3.3.1 Grundlagen der Extraktion	17
3.3.2 Grundlagen der Reaktivextraktion	18
3.3.2.1 Reaktivextraktion als ein Verfahren zur <i>in situ</i> Produktgewinnung	19
3.3.2.2 Lipophile Gegenionen bei der Reaktivextraktion	20
3.3.2.3 Lösungsmittel bei der Reaktivextraktion	21
3.3.2.4 Reaktivextraktion der <i>trans</i> -Cyclohexadiendiole	22
3.3.2.5 Theorie des Stoffübergangs	25
3.3.2.6 Aufbau der Flüssig-Flüssig-Extraktoren	27
3.3.2.7 Theorie der Phasentrennung	28
3.4 Reaktionstechnische Grundlagen	29
3.4.1 Prozessführung im Bioreaktor	29
3.4.2 Kinetische Parameter	31
3.4.3 Bilanzierung des Kohlenstoffs	33
3.5 Grundlagen der „Metabolischen Stoffflussanalyse“	34
3.5.1 Praktische Umsetzung der <sup>13</sup> C-Stoffflussanalyse	34
<b>4 Material und Methoden</b>	<b>37</b>
4.1 Das biologische System	37
4.1.1 <i>E. coli</i> Überproduzenten	37
4.1.2 Stammhaltung und Vorkultivierung	38
4.2 Analytische Verfahren	38
4.2.1 Bestimmung der off-line Werte	38
4.2.1.1 High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC)	39
4.2.1.2 <sup>1</sup> H-NMR-Messung	39
4.2.2 Bestimmung der on-line Werte	40
4.2.2.1 Messdaten vom Bioreaktor	40
4.2.2.2 Bestimmung der Glukosekonzentration	41

## Inhaltsverzeichnis

---

4.3	Apparativer Aufbau und Fermentationsdurchführung	43
4.3.1	Fermentationsprozess im Zulaufverfahren im 7,5 Liter Bioreaktor	43
4.3.2	Fermentationsprozess im Zulaufverfahren im 42 Liter Bioreaktor	46
4.3.3	Fermentationsprozess im Zulaufverfahren im 300 Liter Maßstab	47
4.3.4	Master/Sensor-Fermentationstechnik für das <sup>13</sup> C-Markierungsexperiment	48
4.3.5	Integration der Reaktivextraktion an den Fermentationsprozess	50
4.3.6	Datenerfassung	52
4.3.7	Prozesskontrolle	54
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion der Prozessentwicklung des fermentativen Zugangs zum 2,3-<i>trans</i>-CHD</b>	<b>57</b>
5.1	Entwicklung des Fermentationsverfahrens	57
5.1.1	Suche nach einem geeigneten 2,3- <i>trans</i> -CHD-Überproduzenten	57
5.1.2	Untersuchung der Ursachen der Nebenproduktakkumulation	62
5.1.3	Experiment zur Vermeidung der Nebenproduktbildung	65
5.1.4	Zugang zum 2,3- <i>trans</i> -CHD im halbtechnischen Maßstab	68
5.2	Diskussion zur 2,3- <i>trans</i> -CHD-Prozessentwicklung	71
5.2.1	Die Suche nach den Ursachen der Glukonsäurebildung	71
5.2.2	Die Folgen der Nebenproduktbildung auf die Stoffflüsse in dem Produktionsstamm	74
5.2.3	Ursache der Glukonsäurebildung	75
5.2.4	Vermeidung der Glukonsäurebiosynthese während der Produktion von 2,3- <i>trans</i> -CHD	77
5.2.5	Abhängigkeit der Produktbildung vom Zellwachstum	79
5.2.6	Zugang zum 2,3- <i>trans</i> -CHD im halbtechnischen Maßstab	81
<b>6</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion der Prozessentwicklung des fermentativen Zugangs zum 3,4-<i>trans</i>-CHD</b>	<b>83</b>
6.1	Entwicklung des 3,4- <i>trans</i> -CHD Fermentationsverfahrens	83
6.1.1	Zugang zum 3,4- <i>trans</i> -CHD im g/l-Maßstab	83
6.1.2	Optimierung der 3,4- <i>trans</i> -CHD-Biosynthese	86
6.1.3	Produktion von 3,4- <i>trans</i> -CHD im 300 Liter-Maßstab	88
6.1.4	Metabolischen Stoffflussanalyse mittels eines <sup>13</sup> C-Markierungsexperiments	90
6.2	Diskussion zur 3,4- <i>trans</i> -CHD-Prozessentwicklung	95
6.2.1	Optimierung der 3,4- <i>trans</i> -CHD-Biosynthese	95
6.2.2	Vergleich des fermentativen Zugangs zu unterschiedlichen Produkten des Aromaten-Biosyntheseweges	97
6.2.3	<sup>13</sup> C-Markierungsexperiment	99
6.2.4	Modellgestützte Optimierung der CHD-Biosynthese	100
<b>7</b>	<b>Fermentativer Zugang zu der <math>\beta</math>-Aminosäure 2,3-<i>trans</i>-CHA</b>	<b>103</b>
7.1	Ergebnis der Fed-Batch Fermentation im 300 Liter Maßstab	103
7.2	Diskussion der Arbeiten zum fermentativen Zugang zum 2,3- <i>trans</i> -CHA	105

---

<b>8 Ergebnisse und Diskussion der Untersuchung der Reaktivextraktion als Verfahren zur <i>in situ</i> Gewinnung von 2,3-<i>trans</i>-CHD und 3,4-<i>trans</i>-CHD</b>	<b>107</b>
8.1 Voruntersuchungen zur Identifizierung der geeigneten Lösungsmittel- und Akzeptorphase für die Reaktivextraktion von <i>trans</i> -CHD	107
8.1.1 Untersuchung der Lösungsmittelphase	108
8.1.2 Untersuchung der Akzeptorphase	108
8.1.3 Analyse der Biokompatibilität der eingesetzten Lösungsmittelphasen	109
8.2 Untersuchungen zur off-line Reaktivextraktion	110
8.2.1 Off-line Reaktivextraktion von 3,4- <i>trans</i> -CHD	110
8.2.2 Off-line Reaktivextraktion von 2,3- <i>trans</i> -CHD	111
8.3 Untersuchungen zur <i>in situ</i> Reaktivextraktion	113
8.3.1 <i>In situ</i> Reaktivextraktion von 2,3- <i>trans</i> -CHD	114
8.3.2 <i>In situ</i> Reaktivextraktion von 3,4- <i>trans</i> -CHD	118
8.4 Diskussion zur Entwicklung des Reaktivextraktionsverfahrens zur <i>in situ</i> Gewinnung von 2,3- <i>trans</i> -CHD und 3,4- <i>trans</i> -CHD	121
8.4.1 Grundlagen der Reaktivextraktion von 2,3- <i>trans</i> -CHD und 3,4- <i>trans</i> -CHD	121
8.4.2 <i>In situ</i> Reaktivextraktion von 2,3- <i>trans</i> -CHD und 3,4- <i>trans</i> -CHD	124
<b>9 Zusammenfassung</b>	<b>129</b>
<b>10 Ausblick</b>	<b>131</b>
<b>11 Literaturverzeichnis</b>	<b>135</b>
<b>12 Anhang</b>	<b>143</b>
12.1 Zusammensetzung von Medien und Lösungen	143
12.1.1 Stammlösung	143
12.1.2 Spurenelementstammlösung	143
12.1.3 Vorkulturmedium	143
12.1.4 Hauptkulturmedium	144
12.1.5 LB-Medium	144
12.1.6 Zulaufmedien: Glukose und Aminosäuren	145
12.1.7 Antischaummittel, pH-Korrekturmittel und IPTG-Lösung	145
12.1.8 Puffer für die kontinuierliche Glukose-Analytik (OLGA)	145
12.2 Chemikalienliste	146
12.2.1 Datenblatt der chemischen und physikalischen Eigenschaften von TOMAC	147
12.3 HPLC-Geräteparameter	147
12.3.1 HPLC für Aminosäuren	147
12.3.2 HPLC für organische Säuren	148
12.3.3 HPLC für Produkte, Nebenprodukte und Abbauprodukte	148
12.4 <sup>1</sup> H-NMR-Geräteparameter	152
12.5 Geräteliste	154
12.6 Fehlerbetrachtung	156
12.7 Abbildungsverzeichnis	158
12.8 Tabellenverzeichnis	163