

Automatisierte Probenfiltration zur Analyse intrazellulärer Metaboliten bei höheren Biomassekonzentrationen

Enrico Hans und An-Ping Zeng*

DOI: 10.1002/cite.202100091

 This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

Die meisten Stoffwechseluntersuchungen hinsichtlich intrazellulärer Metaboliten für *Corynebacterium glutamicum*-Stämme wurden bisher mit Biomassekonzentrationen $\leq 10 \text{ g L}^{-1}$ durchgeführt. Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Untersuchungen bis Konzentrationen von 32 g L^{-1} möglich sind. Die Modifikation einer automatisierten Schnellfiltration weist den Weg zu weiteren zeitlichen Verkürzungen auf. Außerdem konnte mithilfe der Filtration der Einfluss einer genetischen Modifikation der Aspartokinase zur Unterdrückung der Inhibierung im Aspartatstoffwechsel quantifiziert werden.

Schlagwörter: *Corynebacterium glutamicum*, Intrazelluläre Metaboliten, Lysinbiosynthese, Schnellfiltration

Eingegangen: 31. Mai 2021; revidiert: 19. November 2021; akzeptiert: 20. Dezember 2021

Automated Fast Filtration for the Analysis of Intracellular Metabolites at Higher Biomass Concentrations

Studies of intracellular metabolites of *Corynebacterium glutamicum* mostly were done at levels of biomass concentrations below 10 g L^{-1} . In this work we could show that it is also possible up to 32 g L^{-1} biomass concentration. Hereby we could point towards a faster filtration process with a modification of the already established automated fast filtration. We also could quantify the influence of a genetic modification of the lysine feedback inhibited asparto kinase in the aspartate metabolism with the automated fast filtration at higher biomass concentrations.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, Fast filtration, Intracellular metabolites, Lysin biosynthesis

1 Einleitung

Metabolische Stoffwechseluntersuchungen von mikrobiellen Kultivierungen, also die quantitative Bestimmung intrazellulärer Stoffwechselprodukte, benötigen eine schnelle und verlustfreie Probenentnahme aus der Fermentationsbrühe. Dabei haben sich zwei Verfahren etabliert, das sogenannte Quenchen und die Filtration. Beide wurden separat als Verfahren für die Probenentnahme methodisch behandelt, modifiziert, verbessert [1–3], automatisiert und gegenübergestellt [4–9]. Nachteilig wirkt sich beim Quenchen das Verlustverhalten (*cell leakage*) der Organismen aus, bei dem Stoffwechselprodukte in undefinierter Menge aus dem Zellinneren in die Umgebung abgegeben werden [3, 10]. Erklärungen hierfür finden sich wahrscheinlich in strukturellen Veränderungen innerhalb der Membran [5, 10, 11], überexprimierten Proteinen [12], in diffusiven Effekten [13] und auch im Wachstumsstadium der Zellen [12]. Eine ausführ-

liche Behandlung der Hintergründe ist bei Schädel et al. [14] zu finden.

Hauptursachen für das *cell leakage* sind thermischer und osmotischer Stress oder die Verwendung von organischen Lösungen [15], wobei sich die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Phospholipide innerhalb der Zellmembran und somit deren Stabilität ändern. Dies kann wiederum zu einer Schädigung oder Zerstörung der Membran führen, was das Gleichgewicht von intra- und extrazellulären Ionen stört und zu unspezifischem Diffusionsverhalten führen kann [3].

Um zu verhindern, dass der festgestellte Verlust an Metaboliten einen Einfluss auf die Bestimmung der Stoffkon-

Enrico Hans, Prof. An-Ping Zeng
aze@tuhh.de

Technische Universität Hamburg, Institut für Bioprocess- und Biotechnik, Denickestrasse 15, 21073 Hamburg, Deutschland.

zentrationen hat, tritt die Filtration in den Fokus [3, 16, 17]. Dabei werden Biomasse und Medium getrennt, der Filter gespült, um das noch vorhandene Restmedium zu entfernen, und der Stoffwechsel im Anschluss durch Quenchen gestoppt. Um einen Verlust an intrazellulären Stoffen während des Waschvorganges zu unterbinden, wird die Waschlösung angepasst. Der ausschlaggebende Parameter ist hier die Ionenstärke (I), die ausgehend vom Grundgerüst des osmotischen Drucks zusätzlich den Einfluss der Dissoziation auf die Eigenschaften der Lösung beschreibt [1, 18]. Für das Stoppen des Stoffwechsels, also den Schritt des Quenchens, hat sich flüssiger Stickstoff etabliert. Mit diesem Verfahren und einer vorab entwickelten automatisierten Schnellfiltration innerhalb von 6 s sollen in dieser Arbeit intrazelluläre Konzentrationen von Aminosäuren bei Biomassekonzentrationen bis zu 32 g L^{-1} von *Corynebacterium glutamicum* bestimmt werden. Bisherige Untersuchungen mittels einer Schnellfiltration wurden bisher nur bis maximal 10 g L^{-1} Biomassekonzentrationen des genannten Organismus durchgeführt.

Mittels mikrobieller Kultivierung wird eine Reihe wichtiger Aminosäuren industriell hergestellt. Da liegt es auf der Hand, die involvierten Stoffwechselwege zu optimieren und gezielt auf einzelne Stoffe auszurichten. Auf dem klassischen Weg funktioniert dies über initiierte zufällige Mutationen (*random mutations*), die im Hinblick auf eine erhöhte Lysinproduktion weitestgehend gute Resultate bezüglich der Lysinkonzentration zeigen, gleichzeitig aber mit einer niedrigeren Substrataufnahme, geringerem Wachstum und ungewollten, sich akkumulierenden Nebenmutationen im Hintergrund [19] sowie einer geringeren Robustheit des modifizierten Stamms einhergehen [20]. An diesem Punkt setzt das sogenannte System *metabolic engineering* an, dessen Strategie auf einem genombasierten Ansatz fußt und zu minimal mutierten Stämmen führt [19, 21]. Dabei wurden neben der Überexpression aller Gene im Zielstoffwechselweg oder von Schlüsselenzymen in den Stoffwechselwegen (Aspartokinase, Pyruvatcarboxylase, Phosphoenolpyruvatcarboxylase) [22] die NADPH-Versorgung [23] oder auch die Sekretion des Lysin durch verstärkte Genexpression des Lysin Carriers (LysE) erhöht [24]. Im Falle der Lysinproduktion zeigt die Modifikation der Aspartokinase (LysC) die beste Erfolgsquote und gilt somit als Schlüsselenzym für diesen Stoffwechselweg [25]. Die Aspartokinase bewerkstelligt den Schritt der Phosphorylierung des Aspartats zu *L*- β -Aspartylphosphat, von dem aus die Synthesewege über Diaminopimelat zu Lysin und über Homoserin zu Threonin beginnen. Über den Zwischenschritt Homoserin werden auch Methionin, Glycin und Isoleucin synthetisiert. Aber nur Threonin und Lysin haben eine hemmende Wirkung auf das Enzym Aspartokinase [26]. Bei dieser Art von Hemmung liegt eine sogenannte Feedback-Inhibierung vor. Endprodukte eines Synthesewegs reduzieren bei Anwesenheit ihre weitere Bildung. Ein Ansatz zur Modifikation für einen Lysin-produzierenden Stamm ist somit die Aufhebung dieser Produktinhibierung der Aspartokinase.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Stämme

Soweit nicht anderweitig benannt, wurden alle verwendeten Chemikalien von Sigma-Aldrich (Deutschland), Carl Roth (Deutschland) oder Merck (Deutschland) bezogen. Die Reinheit der Chemikalien war stets von Analysegrad. Metabolitenstandards für die Analytik wurden ausschließlich von Sigma-Aldrich bezogen. Der Wildstamm *C. glutamicum* ATCC 13032 stammt von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland). Durch die genetische Modifikation dieses Wildstamms wurde der Lysin-produzierende Stamm mit der Bezeichnung *C. glutamicum* LC298 erzeugt [21, 26]. Die Modifikation beruht auf einer Punktmutation des Enzyms Aspartatkinase, das im Wildstamm für die katalytische Umsetzung von Aspartat zu Aspartyl-Phosphat verantwortlich ist.

2.2 Kultivierung und Medium

Die Kultivierung wurde in einem kontrollierten Bioreaktorsystem mit 2,5 L Arbeitsvolumen (Bioengineering, Switzerland) durchgeführt. Die Kultivierungstemperatur betrug 30°C . Die Anfangswerte der Rührerdrehzahl von 800 UPM und der Begasungsrate von $0,5 \text{ v v}^{-1}$ wurden fortlaufend angepasst, um einen Sauerstoffpartialdruck ($p\text{O}_2$ -Wert) von mindestens 40 % zu gewährleisten. Die Kontrolle des pH-Wertes von 7,2 erfolgte mittels Titration von 2 M Phosphorsäure und 25 % Ammoniakwasser. Zur Minderung des Schaumvorkommens im Bioreaktor wurde als oberflächenaktives Polymer Struktol[®] J673 A eingesetzt. Das Medium für den Satzbetrieb wurde von da Luz et al. [27] übernommen, wobei die anfängliche Substratkonzentration 30 g L^{-1} Glucose betrug. Das für die Fütterungsphase verwendete Medium unterschied sich davon in der Glucosekonzentration von 500 g L^{-1} , der fehlenden Salzlösung und der Zugabe von $45 \text{ g L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

2.3 Schnellfiltration

Die Schnellfiltration wurde nach der von da Luz et al. [28] entwickelten automatisierten Schnellfiltration durchgeführt. Es wurde keine Veränderung der dabei verwendeten Filterkombination, des Ablaufs sowie der Berechnung der Ionenstärke der Waschlösung vorgenommen. Für die darauf aufbauende Filtration wurde der in der Mischlösung verwendete interne Standard *L*-Arabinose in einer Konzentration von 2 g L^{-1} bei der Berechnung der Ionenstärke berücksichtigt.

2.4 Analytik

Für die Extraktion intrazellulärer Metabolite und deren anschließende Bestimmung wurde die von Luz et al. [27] entwickelte Methode als Protokoll benutzt. Die Biomassekonzentrationen wurden durch die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 660 nm mit dem Spektrophotometer V-1200 der Firma VWR (Deutschland) bestimmt, die Biotrockenmasse gravimetrisch. Die Bestimmung und Quantifizierung von Alkoholen, organischen Säuren, Zuckern und Glycerin wurde mit einer HPLC-Analyse durchgeführt.

Zur Bestimmung von intrazellulären Aminosäuren der Filterextrakte mittels HPLC wurde eine Derivatisierung der Aminogruppen mit der AccQ-Tag-Methode der Firma Waters (USA) durchgeführt. Das Handling der Proben zur Derivatisierung erfolgte dabei nach den Vorgaben des Herstellers. Als HPLC-System diente eine Dionex Ultimate-3000 der Firma Thermo Scientific (Deutschland). Zur Messung von Glycerin im Konzentrationsbereich von $0,01 \text{ g L}^{-1}$ bis $0,1 \text{ g L}^{-1}$ wurde eine amperometrische Detektion mittels Ionenchromatographie herangezogen.

Als HPLC-System diente ein ICS-3000 Ionenchromatographie System (Dionex, Thermo Scientific, Deutschland) mit einer CarboPac PA 100 Säule (Dionex, Thermo Scientific, Deutschland).

3 Ergebnisse

3.1 Schnellfiltration (Ausgangspunkt)

Die automatisierte Schnellfiltration erfolgte mit der von da Luz et al. [28] entwickelten Anlage am Institut für Bioprocess- und Biosystemtechnik der TUHH. Die Anlage wurde zuerst für die Probenahme bei zunehmenden Biomassekonzentrationen über 10 g L^{-1} charakterisiert. Aus den zu erreichenden Biomassekonzentrationen ergeben sich Unterschiede zu den bisher abgebildeten Kultivierungsszenarien innerhalb der Anlage, die ihrerseits wiederum Einfluss auf den Filtrationsvorgang darstellen können. Dazu gehören morphologische Veränderungen der Organismen durch Stresssituationen und Veränderungen der Umgebung durch das Exprimieren von Metaboliten. Die Ergebnisse dieser Charakterisierung zeigten eine Abnahme der Volumina von Probenmenge und Waschlösung mit zunehmender Kultivierungsdauer. Ob und welcher Einfluss daraus auf die Validität bei der Bestimmung intrazellulärer Metaboliten mit der Schnellfiltration entsteht, musste somit vorab geklärt werden.

Es konnte während der Fermentationen ein starker Anstieg der Schaumbildung innerhalb der Kultivierungsbrühe beobachtet werden, so dass hier ein Ansatzpunkt für die Überprüfung der Anlage bestand. Stabiler Schaum innerhalb der Probe kann zu Lufteinschluss in der Filterstruktur führen und den Membranwiderstand erhöhen. Neben

einem größeren Anteil an Luftblasen innerhalb der Probe zeigte das verwendete chemische Antischaummittel Struktol® J673 A ebenfalls einen Einfluss auf die Filtration (Daten hier nicht aufgeführt). Aufgrund verschiedener Viskosität von Kulturbrühe und Waschlösung bei der Filterkuchenwaschung während der Fermentation kommt es zu unterschiedlichen Strömungsgeschwindigkeiten während des Waschvorganges. Dieses als Fingerströmung bezeichnete Phänomen kann zur Physiosorption zwischen Partikeln und Mutterflüssigkeit führen und eine Entfernung des Mediums erschweren [27]. Die höhere Viskosität von Antischaumpolymeren hat weiterhin einen relevanten Einfluss auf den Kontaktwinkel zur Membran, die Tropfengrößenverteilung sowie die Adhäsion an das Membranmaterial. Kleinere Tropfen des Antischaummittels können in die Membran eindringen und zu einem höheren Membranwiderstand führen [30]. Die ansteigende Biomasse auf dem Filter kann ebenfalls zu einem höheren Widerstand und einer qualitativ schlechteren Filterkuchenwaschung führen, was noch unterstützt werden kann durch die weiter oben genannten morphologischen Veränderungen, die zu einer veränderten Porosität des Filterkuchens führen.

Um diese Einflüsse zu minimieren, wurde die Anlage mit einer Adaption versehen. Deren Ziel war die Verringerung der Probenmenge nach der Entnahme aus dem Bioreaktor, was zu einer Verringerung des Gasgehaltes, der Konzentration des chemischen Antischaumpolymeren und der Biomasse in der verwendeten Filterstruktur führen sollte. Eine weitere Verringerung der Probenmenge aus dem Reaktor war innerhalb der Anlage technisch nicht realisierbar, so dass die Probe während der Entnahme aus dem Bioreaktor auf dem Strömungsweg zur Filtration mit einer weiteren Flüssigkeit vermischt wurde, der sogenannten Mischlösung. Diese sorgte für eine Abnahme des Probenvolumens aus dem Reaktor in Abb. 1 und zeitgleich für die Reduzierung der möglichen Einflussfaktoren. Die Anpassung der Mischlösung zur Vorverdünnung der Probe erfolgte parallel zur Anpassung der Waschlösung mithilfe des Parameters der Ionenstärke. Dieser Parameter wurde an die Ausgangssituation des Fermentationsmediums angepasst und während

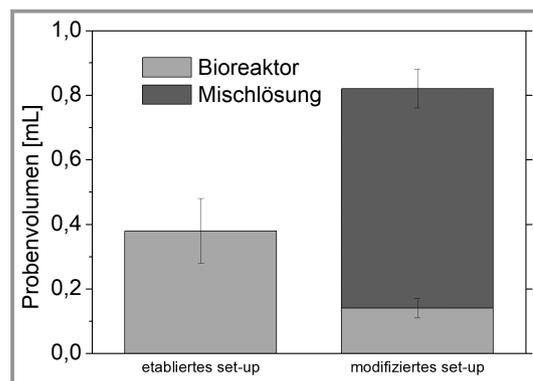


Abbildung 1. Probenvolumina der beiden Methoden zur Schnellfiltration.

der Kultivierung nicht kontinuierlich angepasst, wie bei den bisherigen Publikationen zu diesem Thema. Der Kontakt von Organismen mit einer Flüssigkeit einer abweichenden Ionenstärke führt zum Verlust intrazellulärer Metaboliten. Dabei reagieren gram-positive Organismen nicht so stark auf den Unterschied wie gram-negative [1, 31]. Dass die Leitfähigkeit der Lösung inklusive der Bakterien ebenfalls ansteigt, kann darauf zurückgeführt werden, dass bei ansteigender Leitfähigkeit der Umgebung ebenfalls die Leitfähigkeit der Zellwand erhöht wird [32].

3.2 Automatisierte Schnellfiltration

Für den Vergleich der Modifikation mit dem etablierten Set-up wurden Fed-Batch-Kultivierungen zweier grampositiver *C. glutamicum*-Stämme durchgeführt, dem Wildstamm ATCC 13032 sowie dem daraus generierten Stamm mit der Bezeichnung LC 298. Es ist erkennbar, dass der Probenloop mit der Vorvermischung über den gesamten Zeitraum gefüllt wird, die Probenmenge auf $160 \mu\text{L} \pm 20 \mu\text{L}$ verringert wurde und die Probe mit der kompletten Waschlösung gespült wurde (s. Abb. 1 und 2). Für das ursprüngliche Filtrationssetup wiederholt sich die weiter oben schon angesprochene Abnahme beider Volumina. In Abb. 3 ist die Konzentration des Restmediums auf dem Filter dargestellt. Diese wurde anhand des benutzten internen Standards in der Brühe bestimmt und beschreibt die Qualität der Filterkuchenwaschung. Dabei befinden sich die Konzentrationen für den Bereich einer Biomassekonzentration bis 32 g L^{-1} bei beiden Methoden zwischen 4 und 5%. Durch die Bestimmung der Menge an nicht ausgewaschenem Medium auf dem Filter konnten die bestimmten intrazellulären Metaboliten in ihrer Konzentration korrigiert werden.

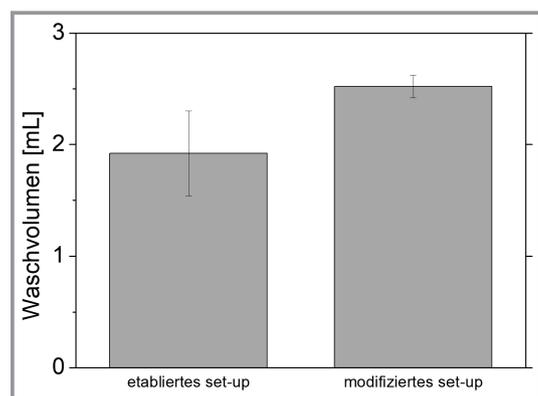


Abbildung 2. Washvolumina der beiden Methoden zur Schnellfiltration.

Die Konzentration an Restmedium auf dem Filter zeigt, dass kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Methoden bestimmt wurde. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass die Einflüsse der oben genannten Luftfeinschlüsse und Polymerkonzentrationen zu vernachlässigen sind und beide

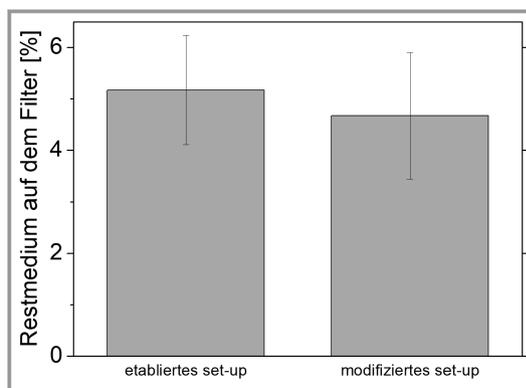


Abbildung 3. Prozentualer Anteil an verbliebenem, nicht ausgewaschenem Restmedium der Probe auf dem Filter.

Methoden zur automatisierten Schnellfiltration bei höheren Biomassekonzentrationen innerhalb der Wachstumsphasen benutzt werden können. Von Kim et al. [33] und Meyer et al. [34] wurde beschrieben, dass eine Erhöhung des Verhältnisses über 1:2 der Probe zur Waschlösung bei einer manuellen Filtration keine Verbesserung der Filterkuchenwaschung herbeiführt, was von da Luz et al. [27] bei einem Verhältnis von 1:3 innerhalb der benutzten Anlage zu einer Restkonzentration von unter 4% auf dem Filter quantifiziert wurde. Die Restkonzentration liegt bei höheren Biomassekonzentrationen zwischen 4,5 und 5%, während der Wachstumsphase etwas darüber. Es bestätigt sich aber, dass mit einer Erhöhung des angesprochenen Verhältnisses keine signifikante Verbesserung der Filterkuchenwaschung erreicht wird. Für das etablierte Set-up lag das Verhältnis bei 1:5, aufgrund der Vorvermischung und des kleineren Probenvolumens lag es im modifizierten Set-up bei 1:15. Mit dem beschriebenen maximal nötigen Verhältnis von 1:3 von Probe zu Waschlösung wäre aufgrund der Minimierung des Probenvolumens eine weitere Reduzierung der Filtrationsdauer für den Bereich kleinerer Biomassekonzentrationen möglich, sollten sich die Ergebnisse für die Bestimmung intrazellulärer Metaboliten für beide Methoden nicht signifikant unterscheiden.

$$\text{Ratio}_{\text{Filtrationsmethode}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{\bar{c}_{\text{mod},i}}{\bar{c}_{\text{etabliert},i}} \quad (1)$$

Neben den Volumina der einzelnen Lösungen und dem Restmedium auf dem Filter erfolgte ein weiterer Vergleich beider Methoden anhand gemessener intrazellulärer Aminosäuren. Der Vergleich erfolgte mittels Gl. (1), bei der das Verhältnis von modifizierter Filtration zu etablierter Filtration bestimmt wird. Dabei bedeutet ein Wert von 1, dass sich keine Unterschiede zwischen den Methoden finden. Ein steigender Wert bedeutet eine höhere bestimmte Konzentration anhand der Modifikation, ein kleinerer Wert entspricht dem Gegenteil. Die Einteilung der Aminosäuren fand dabei aufgrund ihrer Polarität statt. Es kann ausgesagt werden, dass sich zwischen den Methoden über alle intra-

zellulär bestimmten Aminosäuren sowohl für den Wildstamm als auch für den modifizierten Stamm keine statistisch signifikanten Unterschiede finden (p -Wert = 0,8). Abweichungen finden sich jedoch bei den beiden Aminosäuren Thyrosin und Alanin, in Abb. 4 dargestellt. Die Stoffe wurden somit durch die Modifikation der Anlage in einer höheren Konzentration bestimmt als ohne Vorverdünnung. Eine direkte Ursache lässt sich aus der Gruppierung nach den Ladungseigenschaften der Aminosäuren nicht ableiten. Inwiefern die Extraktionsmethode oder die Bestimmungsmethode mittels HPLC einen Einfluss auf die Bestimmung hat, muss im Weiteren geprüft werden. Für das polar positive Lysin wurde mit der Modifikation der Filtration im Gegensatz zu den oben genannten Aminosäuren eine geringere intrazelluläre Konzentration bestimmt, hauptsächlich beeinflusst durch die Ergebnisse des für die Lysinproduktion modifizierten Stamms LC 298. Ob der Einfluss von verringertem Probenvolumen in Kombination mit einer geringeren Effizienz der Metabolitenextraktion bei höheren intrazellulären Konzentrationen einhergeht, muss nachgehend geprüft werden.

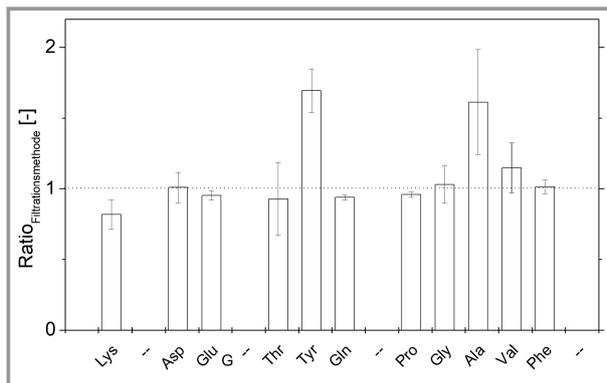


Abbildung 4. Vergleich beider Methoden zur automatischen Schnellfiltration bezüglich der bestimmten intrazellulären Aminosäuren. *Ratio* (s. Gl. (1)) beschreibt dabei das Verhältnis der bestimmten Konzentrationen mit der modifizierten Filtrationsmethode zu etablierter Filtration in der Anlage. Ein Verhältnis < 1 bedeutet eine höhere Konzentration bei der etablierten Methode, > 1 eine höhere Konzentration bei der modifizierten Methode. Die Aminosäuren sind anhand ihrer Ladungseigenschaften gruppiert und stellen die Messungen die Mittelwerte dar, von Probenentnahmen zweier Kultivierungen der Organismen *C. glutamicum* ATCC 13032 und LC 298. Die Vergleiche erfolgten innerhalb der Wachstumsphase bei vergleichbaren Biomassekonzentrationen der Organismen. Pro Probenentnahme wurden drei technische Replikate genommen. Es sind nur Aminosäuren gegenübergestellt, die bei beiden Stämmen bestimmt wurden.

3.3 Automatisierte Schnellfiltration für höhere Biomassekonzentrationen

Für die Anwendung der Anlage zur Bestimmung intrazellulärer Aminosäuren wurden Kultivierungen mit *C. glutamicum* durchgeführt. Dabei handelt es sich um den

Wildstamm ATCC 13032 und einen durch Chen et al. [21, 26, 37] modifizierten Stamm LC 298, dessen Modifikation einen Ausgangspunkt für eine erhöhte Produktion der Aminosäure Lysin darstellt. Beide Fermentationen wurden als Batch gestartet und nach 15 h mit einer kontinuierlichen Fütterung für weitere 10 h weitergeführt.

Die Wachstumsrate beider Organismen ist im Satzbetrieb vergleichbar. Sie verringert sich jedoch bei LC 298 während der Zufütterung, bei der die Substratkonzentration von Glucose zu keiner Zeit eine Limitierung darstellte. Die höhere durchschnittliche Substrataufnahme von ATCC 13032 führt zu einer höheren maximalen Biomassekonzentration von 32 g L^{-1} (s. Tab. 1).

$$Ratio_{\text{genetische Modifikation}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{\bar{c}_{LC\ 298,i}}{\bar{c}_{ATCC\ 13032,i}} \quad (2)$$

Tabelle 1. Wachstumsraten sowie Substrataufnahme- und Produktbildungsrate der beiden *C. glutamicum*-Stämme ATCC 13032 und LC 298.

	ATCC 13032	LC 298
μ_m [h^{-1}]	0,31	0,25
BTM_{max} [g L^{-1}]	32	23
$Y_{(X/S)m}$ [g g^{-1}]	0,34	0,34
$q_{S,m}$ [$\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$]	0,65	0,56

Für die Kultivierungen aus Abb. 5 sind Probenentnahmen während der Wachstumsphase für beide Organismen bei vergleichbaren Biomassekonzentrationen in Abb. 7 dargestellt. Mithilfe von Gl. (2) wird ein direkter Vergleich der Stoffe realisiert. Angeordnet sind die Aminosäuren dabei nach den jeweiligen Stoffwechselwegen aus Abb. 6. Es handelt sich um die Stoffwechselwege von Aspartat- und Lysinstoffwechsel, den Glutamatstoffwechsel, den Pyruvatstoffwechsel und den Phosphoenolpyruvatstoffwechsel.

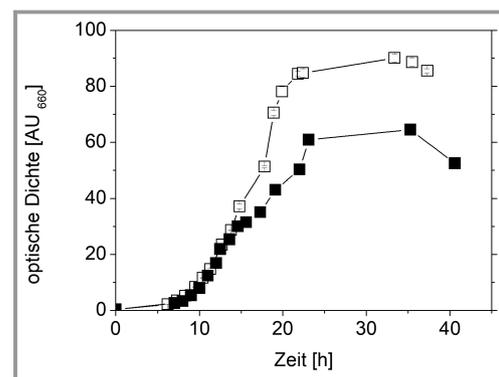


Abbildung 5. Wachstumsverläufe der beiden *C. glutamicum*-Stämme ATCC 13032 und LC 298, dargestellt als optische Dichte (OD) über die Kultivierungsdauer.

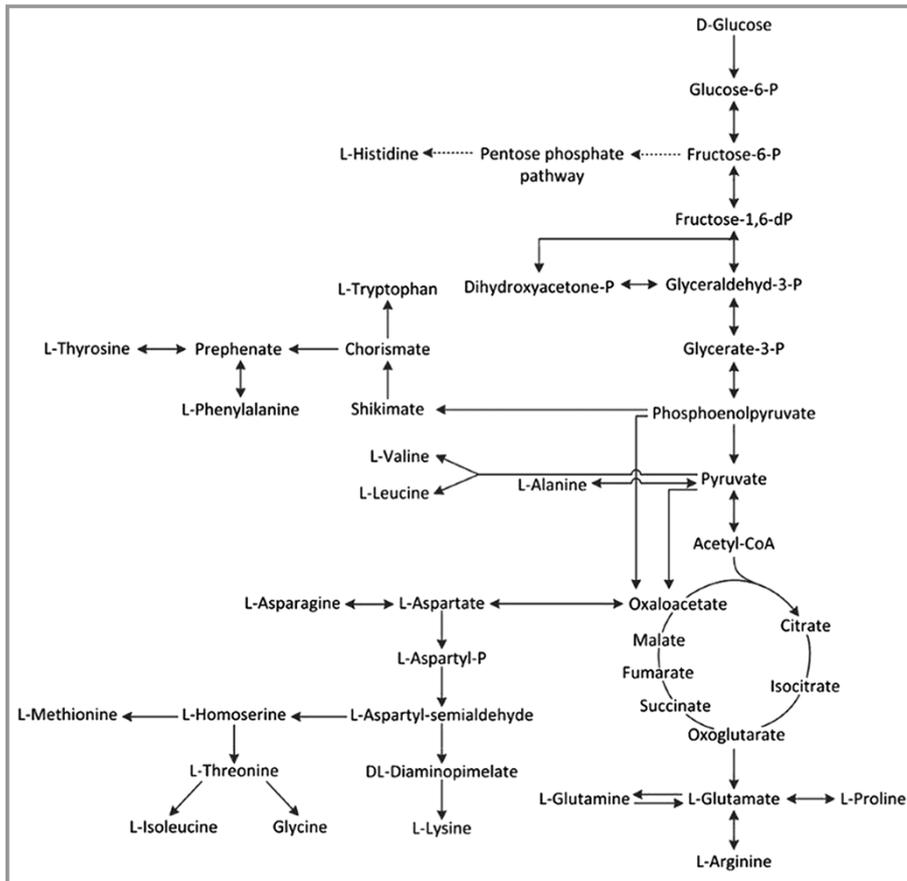


Abbildung 6. Vereinfachter Auszug des Stoffwechsels von *C. glutamicum*.

Eine direkte Vergleichbarkeit der bestimmten Konzentrationen mit gleichen Stämmen aus anderen Kultivierungen ist nicht ganz unproblematisch, da sich die Kultivierungsbedingungen teilweise stark unterscheiden. So reicht die Bandbreite von Schüttelkolbenversuchen über Satzfermentationen bis hin zu der in dieser Arbeit beschriebenen Fed-Batch-Kultivierung. Differenzen gibt es zudem auch bei den verwendeten Medien. So unterscheidet sich das von Chen et al. [26] verwendete Medium von jenem in dieser Arbeit bezüglich der eingesetzten Konzentrationen der Komponenten des Mediums. Der Stamm mit der Bezeichnung LP917 aus den Arbeiten von da Luz et al. [27,36] gehört ebenfalls zur Reihe der von Chen et al. [26] beschriebenen Modifikationen.

Dabei findet sich für LP917 bei vergleichbaren Biomassekonzentrationen ein nahezu konstanter Verlauf der Lysin-konzentration zwischen $43,8\text{--}55,9\ \mu\text{m g}_{\text{BTM}}^{-1}$. Ein Verweis innerhalb dieser Arbeit auf die Untersuchungen eines ebenfalls modifizierten Stamms zur höheren Lysinproduktion von Krömer et al. [37] zeigt, dass die jeweils beschriebenen Daten mit denen für LC298 kongruent sind. Lediglich die erzielten Biomassekonzentrationen bezüglich der Fermentationsdauer unterscheiden sich leicht zwischen LP917 und LC298, so dass die korrelierenden optischen Dichten von

22 (BTM von $8\ \text{g L}^{-1}$ in Abb. 7) bei den Arbeiten von da Luz im Zeitraum von 17–19 h zu finden sind und in der vorliegenden Arbeit bei 12–13 h (Abb. 5). Diese Verschiebung des Wachstums wurde schon von Chen et al. [21] als Unterschied beschrieben und auf eine erhöhte Nutzung des PEP zur Lysin-synthese anstelle des Zellwachstums zurückgeführt.

Außerdem weist der Mutant LC298 eine geringere intrazelluläre Konzentration an Diaminopimelate um den Faktor 3 auf. Der Vergleich zwischen den Kultivierungen des Wildstamms ATCC 13032 zeigt in den Arbeiten von da Luz größtenteils eine höhere Konzentration, mit Ausnahme von Alanin, Tyrosin, Threonin, Phenylalanin und Glycin. Da sich die Unterschiede teilweise bis zu Faktor 3 darstellen, ist hier die Frage, woran diese festgemacht werden können. Neben ähnlichen Biotrockenmassen und Glucosekonzentrationen besteht eine deutliche Differenz der Wachstumsraten, so dass davon

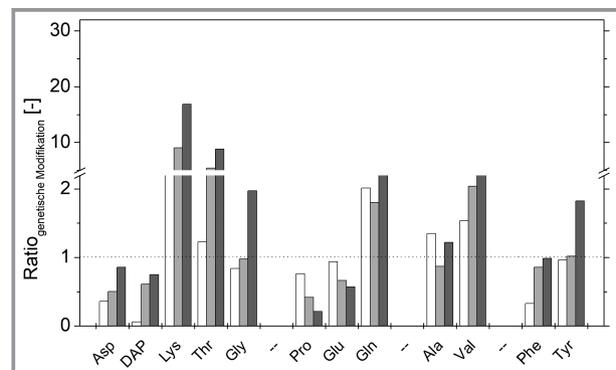


Abbildung 7. Vergleich beider Stämme (ATCC 13032 und LC298) bezogen auf das Verhältnis der bestimmten intrazellulären Aminosäuren. *Ratio* (s. Gl. (2)) beschreibt dabei das Verhältnis der bestimmten Konzentrationen des modifizierten Stamms zum Wildstamm. Ein Verhältnis < 1 bedeutet eine höhere Konzentration beim Wildstamm, > 1 eine höhere Konzentration beim genetisch modifizierten Stamm. Die Aminosäuren sind anhand ihrer Stoffwechselwege gruppiert und stellen die Messungen der Mittelwerte beider Methoden bei vergleichbaren Biomassekonzentrationen der Organismen dar. Pro Probenahme wurden drei technische Replikate je Filtrationsmethode genommen. Es sind nur Stoffe gegenübergestellt, die bei beiden Stämmen bestimmt wurden. Die Stoffe werden bei den Biomassekonzentrationen von $8\ \text{g L}^{-1}$, $16\ \text{g L}^{-1}$ und $23\ \text{g L}^{-1}$ verglichen, von links nach rechts.

ausgegangen werden kann, dass sich die geringeren intrazellulären Konzentrationen von Aminosäuren durch das stärkere Wachstum begründen lassen.

Beginnend beim Aspartat- und Lysinstoffwechsel zeigt sich als erstes Merkmal ein zunehmender Trend bei allen dargestellten Stoffen dieses Zweiges. Das hat zwei verschiedene Bedeutungen. Für alle Ratio unter 1 bedeutet ein zunehmender Trend, dass sich die Konzentration des Stoffes im modifizierten Stamm der Konzentration des Stoffes im Wildstamm angleicht. Der Trend beschreibt also eine relative Annäherung der Werte zueinander. Dies trifft für die ersten beiden Stoffe in der Abb. 7, Aspartat und Diaminopimelat, zu. Für Lysin ist dieser zunehmende Trend ebenfalls zu beobachten, mit dem Unterschied, dass er sich deutlich über dem Ausgleichswert von 1 befindet. Die zweite Bedeutung ist somit, dass sich die Konzentration im Verhältnis zur Konzentration im Wildstamm um weitere Vielfache erhöht. Im Fall von Lysin ist dies eine Steigerung vom 6-fachen auf das 23-fache der Aminosäure Lysin. Threonin zeigt eine ähnliche Steigerung für die intrazelluläre Konzentration, wobei sich bei einer Biomassekonzentration unterhalb von 10 g L^{-1} nur ein geringfügiger Unterschied zwischen den Stämmen darstellt und erst oberhalb davon eine deutlich höhere Threoninkonzentration bestimmt wurde. Bei Glycin ist erst über einer Biomassekonzentration von 20 g L^{-1} eine relative Steigerung erkennbar.

Bei der Betrachtung des Glutamatstoffwechselzweiges stellt sich ein deutlich umgekehrter Sachverhalt dar. Zeigen sich für niedrigere Biomassen noch vergleichbare intrazelluläre Konzentrationen für Prolin und Glutamat, nimmt deren Synthese im modifizierten Stamm LC 298 deutlich ab. Bei Prolin entspricht der intrazelluläre Level am Ende noch 21 % des Wildstamms, bei Glutamat sind es noch 57 %. Glutamin liegt während der gesamten Wachstumsphase für den Mutanten bei einem mittleren Faktor von ca. 2,3 über der Konzentration des Wildstamms. Für den Abgang des Pyruvatweges konnten nur Alanin und Valin bei beiden Stämmen bestimmt werden, wobei beide durchgehend eine höhere Konzentration zugunsten des Mutanten wiedergeben. Die Produkte des Phosphoenolpyruvatweges Tyrosin und Phenylalanin zeigen, dass diese anfänglich beim Mutanten in einer ähnlichen Konzentration wie beim Wildstamm vorliegen. Im weiteren Verlauf werden diese aber verstärkt synthetisiert, so dass auch hier eine höhere Konzentration vorliegt. Wie bereits dargelegt, erfolgen der Vergleich beider Stämme und die daraus resultierenden Rückschlüsse aufgrund der Einflüsse der Punktmutation der Aspartokinase zur allosterischen Regulierung bei vergleichbaren Biomassekonzentrationen im Fermenter. Chen et al. [26] konnten mit ihrer Deregulierung der Aspartokinase eine Steigerung der Lysinproduktion provozieren, was sich auch in den vorliegenden Ergebnissen bestätigt. Neben Lysin zeigt sich der Einfluss der Mutation auch bei anderen Aminosäuren intrazellulär. Dies ist an erster Stelle an einer Steigerung der Threoninkonzentration erkennbar, wie zu erwarten war, da die Mutation auch die Insensitivität gegen-

über Threonin reduziert. Für eine weitere Aminosäure des Aspartatstoffwechsels, Glycin, zeigt sich eine Erhöhung gegenüber dem Wildstamm erst im weiteren Verlauf der Fermentation, einhergehend mit einer größer werdenden Akkumulation von Aspartat und Diaminopimelat, die sich als Zeichen einer Flaschenhalssituation interpretieren lässt. Diese Stoffe häufen sich an, weil die nachfolgende Synthese der vorangehenden Versorgung von Oxalacetat unterliegt. Ein Indiz, dass dies auf Kosten anderer Synthesewege erfolgt, lässt sich im abnehmenden Trend von Prolin und Glutamat sehen, was sich wiederum als Reduktion der Aktivität des Zitronensäurezyklus interpretieren lässt und sich auch in der reduzierten Wachstumsrate widerspiegelt [38]. Dass sich die Konzentration von Glutamin im Gegensatz dazu auf einem höheren und gleichbleibenden Niveau befindet, lässt sich als erhöhter Bedarf von NADPH deuten, das für die Synthese sowohl von Glutamat als auch von Prolin notwendig ist. Aufgrund der Nutzung von ATP [39] trifft dies nicht bei der Synthese von Glutamat zu Glutamin zu, so dass schlussendlich eine zu geringe Versorgung und Bereitstellung von NADPH als Ursache herausgearbeitet werden kann. Neben der logischen Schlussfolgerung, dass die Mutation eine erhöhte Lysinproduktion provoziert, kann festgehalten werden, dass eine weitere Steigerung nur mit einer Erhöhung der NADPH Versorgung möglich ist. Dies konnte in den Arbeiten von Bommareddy et al. [23] mit einer Manipulation des Pentosephosphat-Stoffwechselweges als hauptsächliche Quelle für NADPH gezeigt und innerhalb der Arbeiten von da Luz et al. [25] zusätzlich mit Untersuchungen zu intrazellulären Metaboliten bestätigt werden.

4 Zusammenfassung

Wir konnten zeigen, dass die Anlage zur Schnellfiltration filtrierte Probenahmen bei Kultivierungen von *C. glutamicum* im Laborreaktor von Biomassekonzentrationen bis zu 32 g L^{-1} innerhalb von 6 s verlässlich ermöglicht. Dabei hat ein starkes Schaumvorkommen in der Fermentationsbrühe keinen qualitativen Einfluss auf die Bestimmung intrazellulärer Metabolitenkonzentrationen. Dafür wurden Fermentationen von zwei *C. glutamicum*-Stämmen durchgeführt und anhand der Probenahmen Unterschiede der beiden aufgezeigt. Diese basieren auf einer genetischen Modifikation der Aspartokinase. Bestimmt wurden hierbei die Konzentrationen intrazellulärer Aminosäuren der beeinflussten Stoffwechselwege. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass mit der Anlage eine weitere Reduzierung der Filtrationsdauer durch die Reduzierung der Probengröße möglich ist und somit die Filtration einer Probe innerhalb einer Sekunde näher rückt.

Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Formelzeichen

BTM_{\max}	[g L ⁻¹]	maximale Biotrockenmasse- konzentration
\bar{c}	[$\mu\text{m g}_{BTM}^{-1}$]	Mittelwert der Konzentration
q_S	[g g ⁻¹ h ⁻¹]	Substrataufnahmerate
$Y_{(X/S)}$	[g g ⁻¹]	Ertrag (<i>yield</i>), Biomasse pro Substrat
μ_m	[h ⁻¹]	Wachstumsrate

Indizes

m	Mittelwert
S	Substrat
X	Biomasse

Abkürzungen

Ala	Alanin
ASP	Aspartat
DAP	Diaminopimelat
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
Lys	Lysin
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
Thr	Threonin
Tyr	Tyrosin
Val	Valin

Literatur

- [1] C. J. Bolten, P. Kiefer, F. Letisse, J.-C. Portais, C. Wittmann, Sampling for Metabolome Analysis of Microorganisms, *Anal. Chem.* **2007**, *79* (10), 3843–3849. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac0623888>
- [2] M. A. Hans, E. Heinzle, C. Wittmann, Quantification of intracellular amino acids in batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *56* (5), 776–779. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002530100708>
- [3] C. Wittmann, J. O. Krömer, P. Kiefer, T. Binz, E. Heinzle, Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria, *Anal. Biochem.* **2004**, *327* (1), 135–139. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.01.002>
- [4] A. Canelas, C. Ras, A. t. Pierick, J. van Dam, J. Heijnen, W. van Gulik, Leakage-free rapid quenching technique for yeast metabolomics, *Metabolomics* **2008**, *4* (3), 226–239. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11306-008-0116-4>
- [5] M. Mashego, K. Rumbold, M. d. Mey, E. Vandamme, W. Soetaert, J. Heijnen, Microbial metabolomics: past, present and future methodologies, *Biotechnol. Lett.* **2007**, *29* (1), 1–16. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9218-0>
- [6] S. G. Villas-Bôas, J. Højer-Pedersen, M. Åkesson, J. Smedsgaard, J. Nielsen, Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods, *Yeast* **2005**, *22* (14), 1155–1169. DOI: <https://doi.org/10.1002/yea.1308>
- [7] M. Volmer, S. Northoff, S. Scholz, T. Thüte, H. Büntemeyer, T. Noll, Fast filtration for metabolome sampling of suspended animal cells, *Biotechnol. Lett.* **2011**, *33* (3), 495–502. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0466-7>
- [8] M. Wellerdiek et al., Metabolic quenching of *Corynebacterium glutamicum*: efficiency of methods and impact of cold shock, *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2009**, *32*, 581–592. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00449-008-0280-y>
- [9] F. Schädel, E. Franco-Lara, Rapid sampling devices for metabolic engineering applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *83*, 199–208. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1976-x>
- [10] M. v. Gulik, Fast sampling for quantitative microbial metabolomics, *Anal. Biotechnol. Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21* (1), 27–34. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.01.008>
- [11] S. G. Villas-Bôas, P. Bruheim, Cold glycerol – saline: The promising quenching solution for accurate intracellular metabolite analysis of microbial cells, *Anal. Biochem.* **2007**, *370* (1), 87–97. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.06.028>
- [12] L. d. Jonge, R. Douma, J. Heijnen, W. van Gulik, Optimization of cold methanol quenching for quantitative metabolomics of *Penicillium chrysogenum*, *Metabolomics* **2012**, *8* (4), 727–735. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0367-3>
- [13] L. Cao-Hoang, F. Dumont, P. Marechal, M. Le-Thanh, P. Gervais, Rates of chilling to 0 °C: implications for the survival of microorganisms and relationship with membrane fluidity modifications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *77* (6), 1379–1387. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1279-z>
- [14] F. Schadel, F. David, E. Franco-Lara, Evaluation of cell damage caused by cold sampling and quenching for metabolome analysis, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *92* (6), 1261–1274. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3377-1>
- [15] H. Link, B. Anselment, D. Weuster-Botz, Leakage of adenylates during cold methanol/glycerol quenching of *Escherichia coli*, *Metabolomics* **2008**, *4* (3), 240–247. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11306-008-0114-6>
- [16] S. Dietmair, N. E. Timmins, P. P. Gray, L. K. Nielsen, J. O. Krömer, Towards quantitative metabolomics of mammalian cells: Development of a metabolite extraction protocol, *Anal. Biochem.* **2010**, *404* (2), 155–164. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.04.031>
- [17] S. Kim, D. Y. Lee, G. Wohlgenuth, H. S. Park, O. Fiehn, K. H. Kim, Evaluation and optimization of metabolome sample preparation methods for *Saccharomyces cerevisiae*, *Anal. Chem.* **2013**, *85* (4), 2169–2176. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac302881e>
- [18] T. H. Yang, C. Wittmann, E. Heinzle, Dynamic calibration and dissolved gas analysis using membrane inlet mass spectrometry for the quantification of cell respiration, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17* (24), 2721–2731. DOI: <https://doi.org/10.1002/rcm.1251>
- [19] J. Ohnishi, S. Mitsuhashi, M. Hayashi, S. Ando, H. Yokoi, K. Ochiai, M. Ikeda, A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *58* (2), 217–223. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0883-6>
- [20] M. Ikeda, S. Mitsuhashi, K. Tanaka, M. Hayashi, Reengineering of a *Corynebacterium glutamicum* L-arginine and L-citrulline producer, *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75* (6), 1635–1641. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02027-08>
- [21] Z. Chen, R. R. Bommarreddy, D. Frank, S. Rappert, A.-P. Zeng, Deregulation of feedback inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase for improved lysine production in *Corynebacterium glutamicum*, *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *80* (4), 1388–1393. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.03535-13>

- [22] M. Ikeda, J. Ohnishi, M. Hayashi, S. Mitsuhashi, A genome-based approach to create a minimally mutated *Corynebacterium glutamicum* strain for efficient L-lysine production, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *33* (7), 610–615. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0104-5>
- [23] R. R. Bommarreddy, Z. Chen, S. Rappert, A.-P. Zeng, A de novo NADPH generation pathway for improving lysine production of *Corynebacterium glutamicum* by rational design of the coenzyme specificity of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, *Metab. Eng.* **2014**, *25*, 30–37. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.06.005>
- [24] A. Bellmann, M. Vrljić, M. Patek, H. Sahm, R. Krämer, L. Eggeling, Expression control and specificity of the basic amino acid exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum*, *Microbiology* **2001**, *147* (7), 1765–1774. DOI: <https://doi.org/10.1099/00221287-147-7-1765>
- [25] R. Kelle, T. Hermann, B. Bathe, L-Lysine Production, in *Handbook of Corynebacterium glutamicum* (Eds: L. Eggeling, M. Bott), 1st ed., CRC Press, Boca Raton, FL **2005**, 465–491.
- [26] Z. Chen, W. Meyer, S. Rappert, J. Sun, A.-P. Zeng, Coevolutionary analysis enabled rational deregulation of allosteric enzyme inhibition in *Corynebacterium glutamicum* for lysine production, *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77* (13), 4352–4360. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.02912-10>
- [27] J. A. da Luz, E. Hans, D. Frank, A.-P. Zeng, Analysis of intracellular metabolites of *Corynebacterium glutamicum* at high cell density with automated sampling and filtration and assessment of engineered enzymes for effective l-lysine production, *Eng. Life Sci.* **2017**, *17* (5), 512–522. DOI: <https://doi.org/10.1002/elsc.201600163>
- [28] J. A. da Luz, E. Hans, A.-P. Zeng, Automated fast filtration and on-filter quenching improve the intracellular metabolite analysis of microorganisms, *Eng. Life Sci.* **2014**, *14* (2), 135–142. DOI: <https://doi.org/10.1002/elsc.201300099>
- [29] M. Wilkens, *Flushing – Entfernen von organischen Lösungsmitteln aus Haufwerken und Filterkuchen*, Freiburger Forschungshefte, TU Bergakademie Freiberg **2014**.
- [30] M. K. Liew, A. G. Fane, P. L. Rogers, Fouling of microfiltration membranes by broth-free antifoam agents, *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *56* (1), 89–98. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19971005\)56:1<89::AID-BIT10>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19971005)56:1<89::AID-BIT10>3.0.CO;2-5)
- [31] C.-J. Tsai, A. Del Sol, R. Nussinov, Protein allostery, signal transmission and dynamics: a classification scheme of allosteric mechanisms, *Mol. Biosyst.* **2009**, *5* (3), 207–216. DOI: <https://doi.org/10.1039/b819720b>
- [32] E. L. Carstensen, H. A. Cox Jr., W. B. Mercer, L. A. Natale, Passive electrical properties of microorganisms: I. Conductivity of *Escherichia coli* and *Micrococcus lysodeikticus*, *Biophys. J.* **1965**, *5*, 289–300. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(65\)86717-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(65)86717-0)
- [33] S. Kim, Do Y. Lee, G. Wohlgenuth, H. S. Park, O. Fiehn, K. H. Kim, Evaluation and optimization of metabolome sample preparation methods for *Saccharomyces cerevisiae*, *Anal. Chem.* **2013**, *85* (4), 2169–2176. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac302881e>
- [34] H. Meyer, M. Liebecke, M. Lalk, A protocol for the investigation of the intracellular *Staphylococcus aureus* metabolome, *Anal. Biochem.* **2010**, *401* (2), 250–259. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.03.003>
- [35] Z. Chen, S. Rappert, J. Sun, A.-P. Zeng, Integrating molecular dynamics and co-evolutionary analysis for reliable target prediction and deregulation of the allosteric inhibition of aspartokinase for amino acid production, *J. Biotechnol.* **2011**, *154* (4), 248–254. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.05.005>
- [36] J. A. da Luz, *Automatisierte Schnellfiltration zur Untersuchung intrazellulärer Metabolite in Mikroorganismen*, Dissertation, Technische Universität Hamburg-Harburg **2017**.
- [37] J. O. Krömer, C. Wittmann, H. Schröder, E. Heinzle, Metabolic pathway analysis for rational design of L-methionine production by *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*, *Metab. Eng.* **2006**, *8* (4), 353–369. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2006.02.001>
- [38] J. van Ooyen, S. Noack, M. Bott, L. Eggeling, Proline addition increases the efficiency of l-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*, *Eng. Life Sci.* **2013**, *13* (4), 393–398. DOI: <https://doi.org/10.1002/elsc.20120018>
- [39] C. Varela, E. Agosin, M. Baez, M. Klapa, G. Stephanopoulos, Metabolic flux redistribution in *Corynebacterium glutamicum* in response to osmotic stress, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *60* (5), 547–555. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1120-7>