

# 1 Einleitung

Die Entwicklung eines Produktionsstammes zur Herstellung von Feinchemikalien ist in der Regel ein schwieriges Unterfangen, denn Mikroorganismen verfügen über komplexe Regulationsmechanismen. Diese sorgen dafür, dass Stoffwechselprodukte nur in den für die Energiegewinnung und Vermehrung erforderlichen Mengen gebildet werden. Dennoch nutzen wir Mikroorganismen bereits seit Jahrtausenden für die Herstellung von Lebensmitteln wie Brot, Joghurt, Bier, Wein und Essig. Die Spezialisierung der eingesetzten Kulturen entwickelte sich im Laufe der Zeit durch natürliche Auslese.

Eine Überproduktion industriell relevanter Stoffwechselprodukte kommt in der Natur nur selten vor. Das Ausschalten der zellulären Kontrolle kann jedoch durch eine gerichtete genetische Veränderung gelingen, so dass ein Organismus als Folge das gewünschte Produkt in unnatürlich hohem Maße produziert. Diese Strategie wird in der modernen Biotechnologie mit Methoden wie dem *Metabolic Engineering* verfolgt. Dieses definierte Bailey 1991 als „die Verbesserung der zellulären Aktivitäten durch Manipulation der enzymatischen, regulatorischen und Transportfunktionen der Zelle unter Verwendung rekombinanter DNA-Technologien“. Mit anderen Worten, man arbeitet an der gezielten Beeinflussung des mikrobiellen Stoffwechsels um Produktausbeuten und -titer zu optimieren. Das *Metabolic Engineering* umfasst (1.) die Konstruktion eines rekombinanten Stammes mit verbesserten Eigenschaften, (2.) die Analyse des rekombinanten Stammes, insbesondere den Vergleich zum ehemaligen Ausgangsstamm und (3.) die Identifizierung eines neuen Angriffsziels für die Stammoptimierung (Nielsen 2001). Auch Veränderungen der extrazellulären Bedingungen in Produktionsprozessen haben Einfluss auf intrazelluläre Umsatzraten, die sich nicht nur positiv, sondern auch negativ auf die Produktion auswirken können. Deshalb erfolgt das *Process Engineering* zur Entwicklung des gesamten Produktionsprozesses parallel zur Optimierung eines Produktionsstammes.

Heutzutage ist absehbar, dass die Verfügbarkeit von Öl und anderen fossilen Rohstoffen begrenzt ist und dass die Rohstoffpreise zukünftig weiter steigen werden. Aus diesem Grund wird es zunehmend attraktiver, fossile durch nachwachsende pflanzliche Rohstoffe zu ersetzen. Bezogen auf den Kohlenstoff sind Rohstoffe wie Zucker und Bio-Ethanol sogar kostengünstiger, wobei sich aber schon heute eine Preiskopplung an das Mineralöl abzeichnet. Auch im Hinblick auf eine günstige Kohlendioxidbilanz beim Herstellungsverfahren stehen nachwachsende Rohstoffe im Fokus, da beim landwirtschaftlichen Anbau z. B. Kohlendioxid gebunden wird (BIOforum 2008).

Die Biotechnologie wird nach einem Farbcode (rot, grün, weiß, blau und grau) in fünf Anwendungsfelder unterteilt. Die weiße oder industrielle Biotechnologie beschäftigt sich mit organischen Grund- und Spezialchemikalien, die zu einer Vielzahl von Folgeprodukten weiterverarbeitet werden können. Sie wurde bei der EuropaBio 2003 in Brüssel als „*Application of nature's toolbox in industrial production*“ definiert und zeichnet sich heute bereits als vielversprechende Technologie zur Umsetzung nachwachsender Rohstoffe in industriell relevante Produkte ab. Allerdings muss die Entwicklung von Organismen mit hohen Produktivitäten vorangetrieben werden, um gegenüber der chemischen Produktion konkurrenzfähig zu blei-

## Einleitung

ben. Die weiße Biotechnologie findet unter Anderem bei der Herstellung von Aminosäuren Anwendung. Mittlerweile sind sie wichtige Fermentationsprodukte die in Lebensmitteln, Futtermitteln und der pharmazeutischen Industrie zum Einsatz kommen. L-Threonin ist dabei mit 40.000 t/a (Eggeling und Bott 2005) eine der drei Hauptaminosäuren welche industriell auf fermentativem Wege hergestellt werden (Takors et al. 2007), die jährliche Wachstumsrate beträgt 5-7 % (Leuchtenberger et al. 2005).

Alle traditionell entwickelten Aminosäureproduzenten wurden in mehreren Runden von ungerichteter Mutagenese und Selektion sukzessive optimiert (Lee et al. 2007). Obwohl sich die Möglichkeiten des *Metabolic Engineering* in den letzten Jahren weiter entwickelt haben, stellt die rationale Optimierung des metabolischen Netzwerks noch immer eine Herausforderung dar. Aufgrund komplexer Regulationsmechanismen sind die Effekte genetischer Modifikationen häufig nicht vorhersehbar, so dass im Nachhinein umfangreiche analytische Untersuchungen notwendig sind. Deshalb steht die Entwicklung der *Omics*-Technologien (*Transkriptomics*, *Proteomics*, *Metabolomics* und *Fluxomics*) zur Analyse rekombinanter Stämme seit einigen Jahren im Fokus. An solche analytischen Methoden werden hohe Anforderungen gestellt, im Feld der *Metabolomics* z. B. ist die simultane Messung unterschiedlicher Substanzklassen innerhalb eines großen dynamischen Bereichs erforderlich. Neben einer sicheren Identifizierung (qualitativ) sollte zudem gewährleistet sein, dass geringe physiologische Änderungen erfasst werden (quantitativ). Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Metabolomanalyse haben gezeigt, dass neben der Kernresonanzspektroskopie (NMR) die Massenspektrometrie (MS) sehr gut für die Untersuchung des Stoffwechsels von bakteriellen (Buchholz et al. 2001, Oldiges et al. 2004), tierischen (Qian et al. 2004, Murphy et al. 2005) und pflanzliche Zellen (Fiehn 2002) geeignet ist.