

Allgemeine Biotechnologie

- **Definition:**
Biotechnologie ist der Einsatz biologischer Prozesse im Rahmen technischer Verfahren und industrieller Produktion
- Die Reaktionen sind zumeist biologischer Natur, mit
 - lebenden Mikroorganismen
 - Viren
 - pflanzlichen oder tierischen Zellen bzw.
 - Geweben oder Enzymen aus Zellen oder Zellteilen
- **Teilbereiche**
 - Grüne Biotechnologie
 - Graue Biotechnologie, weiße Biotechnologie
 - Rote Biotechnologie
 - Gentechnik - Gentechnologie
 - Gentherapie

Berufsfelder

- **Forschung und Entwicklung (F&E, R&D)**
 - ◆ Grundlagenforschung
 - ◆ Entwicklung von Stämmen, Prozessen, theoretische Beschreibung von Abläufen etc.
 - ◆ Möglichkeiten der Applikation
- **Produktion (der Prozess - Verfahrenstechnik)**
 - ◆ Up stream, down stream
- **Qualitätssicherung, Analytik, Monitoring**
 - ◆ Entwicklung neuer Methoden
 - ◆ Validierung
- **Qualitätsmanagement**
 - ◆ Vernetzung aller Teilschritte um die Qualität eines Produktes je nach Anforderungen zu sichern
- **Applikation / Vertrieb**
 - ◆ Bereitstellung von Produkten, Organisation der Logistik
 - ◆ Anmeldung von Produkten, Kostenkalkulation
- **Patentwesen**
 - ◆ Beurteilung und Bewertung von Patenten
 - ◆ Verfassen von Patentschriften
 - ◆ Verteidigen von Patenten

Literatur

- Wulf Crueger, Anneliese Crueger: Biotechnologie – Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie
- Rolf D. Schmid: Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik (Wiley-VCH)
- William J. Thieman, Michael A. Palladino: Biotechnologie (Pearson Studium)
- Theodor Dingermann: Gentechnik, Biotechnik

Biotechnologie

- ..basiert auf der Kultivierung von Zellen, die entweder direkt zur Produktion verwendet werden oder Produkte für die Weiterverarbeitung darstellen
- Daher ist eine zentrale Frage, wie kann man Zellen optimal kultivieren und welche Anforderungen müssen gesichert sein

Für Zellen gibt es grundsätzlich zwei Wege zur Energiegewinnung:

Die Zelle nimmt Energie in Form von Licht auf und wandelt die Lichtenergie in chemische Energie um (Photosynthese). **Die Fähigkeit dazu haben ausschließlich chlorophyllhaltige Pflanzen und einige Bakterien.**

Die Zelle nimmt Energie aus der Umgebung in Form reduzierter, energiereicher Moleküle auf.

Glukose

- **Glukose als Hauptprodukt der Photosynthese Glukose ist wichtigstes Substrat für das Wachstum von MOs**
- **Glukose ist Energieträger in der Zelle**
- **Glukose ist C-Quelle in der Zelle**
- **Aufbau wichtiger Zellsubstanzen**
 - ◆ **Peptidoglykane**
 - ◆ **Glykogen**
 - ◆ **Stärke**

Glukose als Hauptprodukt der Photosynthese (CO₂ Assimilation)

- Abbau der Naturstoffe im Organismus zu
 - ◆ CO₂ im Zitratzyklus
 - ◆ H₂O bei der biochemischen Oxidation in der Atmungskette
- CO₂ Assimilation
 - ◆ KH und Sauerstoffbildung aus CO₂ und H₂O
 - ◆ Lichtreaktion:
 - ◆ Photolyse des Wassers in ein Reduktionsäquivalent (H) und Sauerstoff
 - ◆ durch den aktiven Wasserstoff wird NADP zu NADPH + H hydriert
 - ◆ Dunkelreaktion (Calvin Zyklus):
 - ◆ Übertragung des CO₂ auf Ribulose-1.5.diphosphat

Glukose als Produkt des Ribulosebiphosphatweges

➤ Glukoseaufbau aus CO₂:

- ◆ aeroben chemolithotrophen Bakterien
- ◆ allen phototrophe Bakterien
- ◆ Cyanobakterien
- ◆ grünen Pflanzen

➤ Charakteristische Enzyme:

- ◆ Phosphoribulokinase
- ◆ Ribulosebiphosphat-Carboxylase

➤ CO₂ wird in 3 Stufen zu KH reduziert:

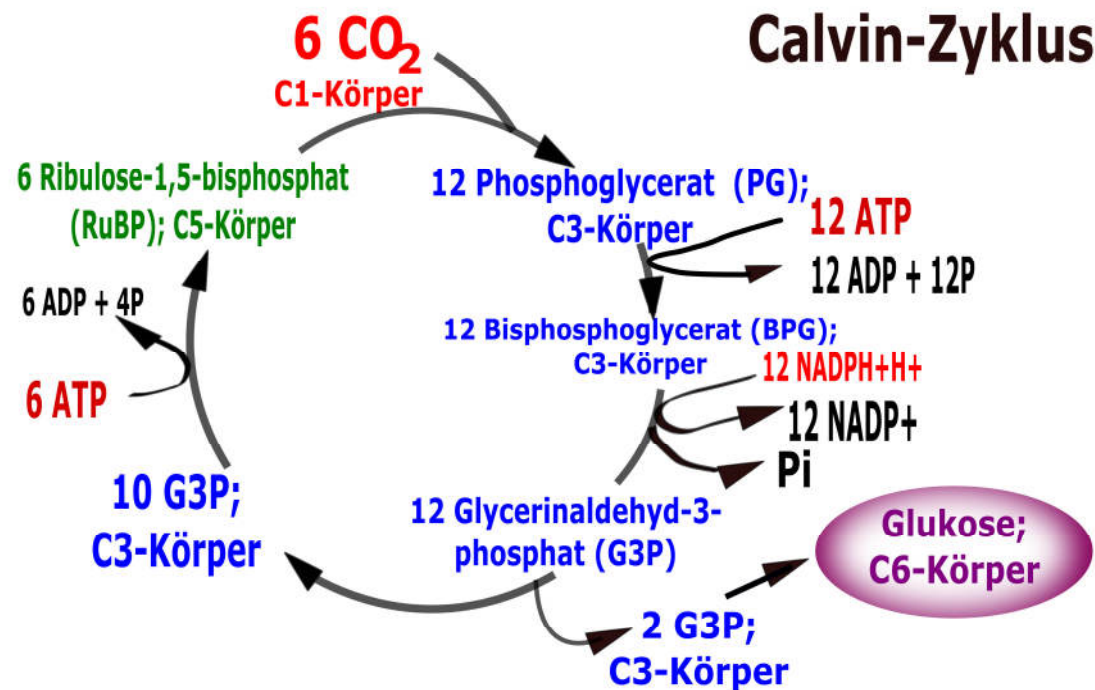
- ◆ Carboxylierung
- ◆ Reduktion
- ◆ Regeneration des CO₂-Akzeptors

Carboxylierungsreaktion

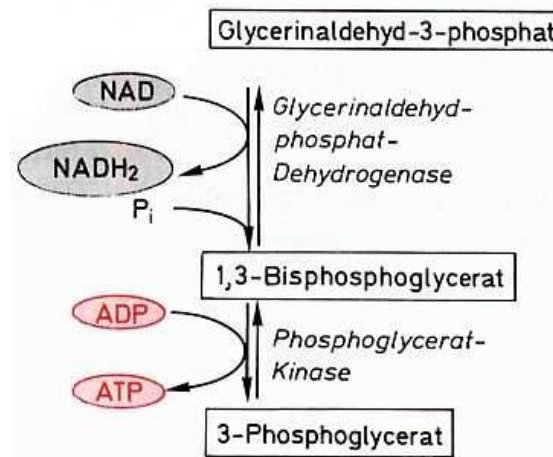
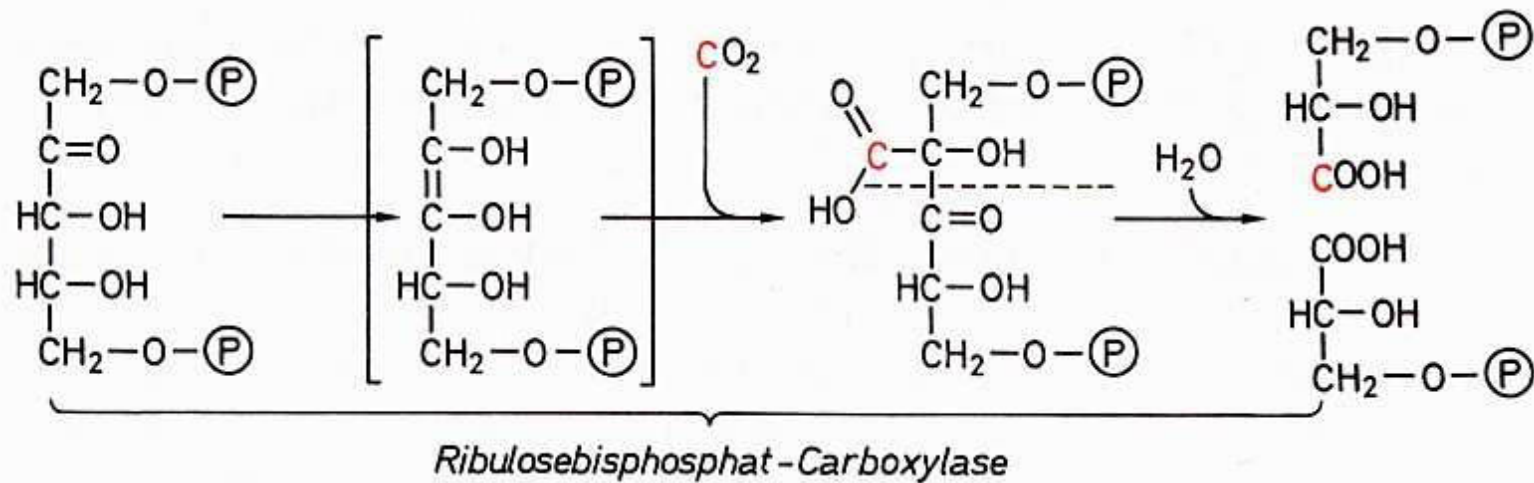
Ribulosebiphosphat-Carboxylase bindet CO_2 an die Ribulose-1,5-bisphosphat und spaltet es in 2 Moleküle

3-Phosphoglycerat

Reduktion der Carboxylgruppe des 3-Phosphoglycerats zur Aldehydgruppe unter Energieverbrauch

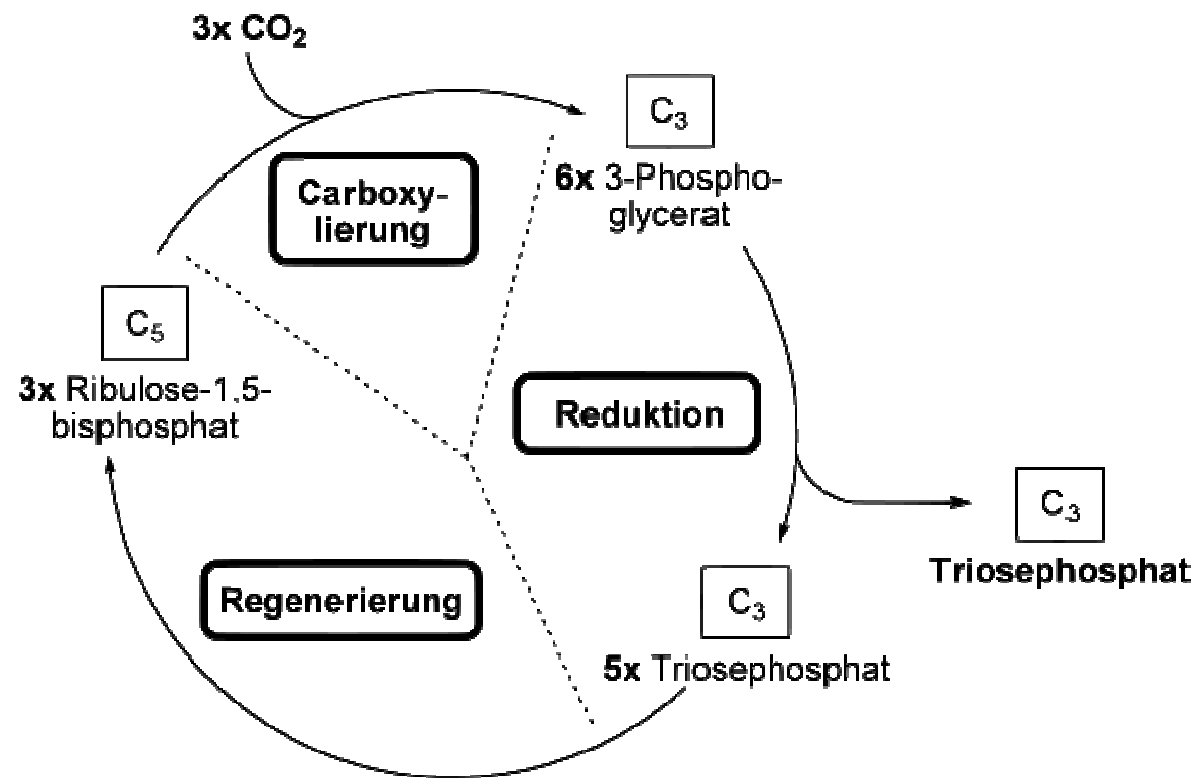


Carboxylierungsreaktion



Regeneration des CO_2 -Akzeptormoleküls

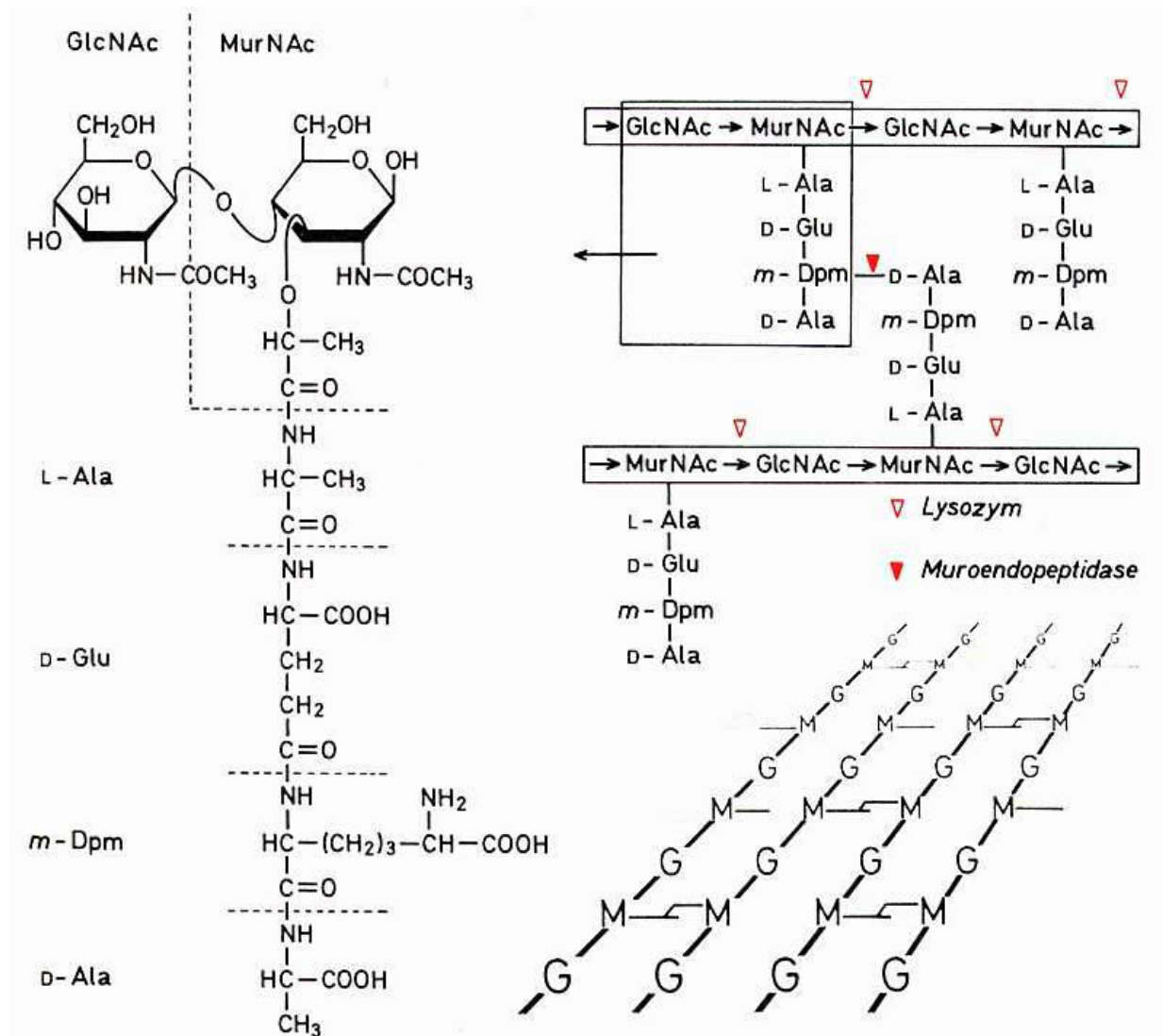
Durch Übertragung von Glykolylgruppen auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat entsteht Ribulose-5-Phosphat.



Glukose als zum Aufbau von Zellsubstanzen

➤ Peptidoglykane (z.B. Murein)

Murein = Mucopetid =
Peptidoglykan = Stützsubstanz
der Bakterien-Zellwände, die bei
E. coli aus alternierenden beta-
(1->4)-verknüpften Einheiten
von N-Acetyl-D-glucosamin und
N-Acetylmuraminsäure besteht.
Die so entstehenden Stränge
(Glykosaminoglykan-Ketten)
tragen über die Carboxy-Gruppe
der N-Acetylmuraminsäure
peptidisch gebundene
Peptidketten, meist Tetrapeptide
mit L-Alanin und den
ungewöhnlichen Aminosäuren
D-Alanin und D-Glutaminsäure
sowie meso-2,6-
Diaminopimelinsäure.



Glukose als zum Aufbau von Zellsubstanzen

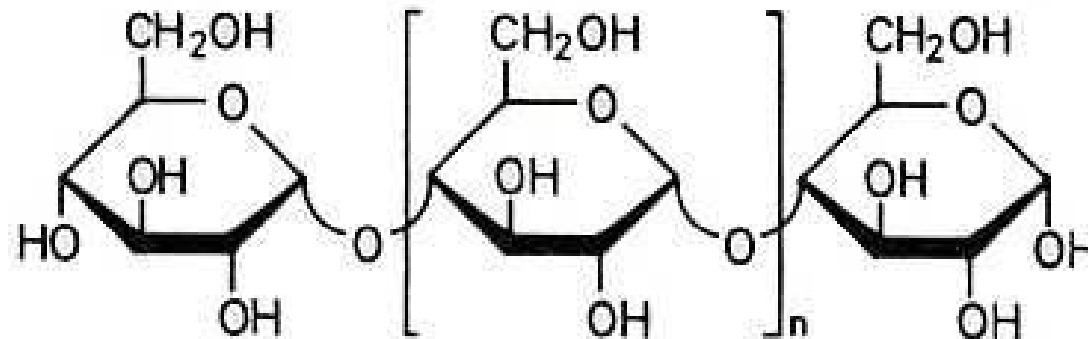
STÄRKEROHSTOFFE Generell enthalten alle Pflanzen Kohlenhydrate, die in verschiedensten Formen für den Pflanzenstoffwechsel benötigt werden. Als Stärkerohstoff sind jedoch nur solche Pflanzen von Interesse, welche die Stärke in Form von unlöslichen Körnern in verschiedenen Teilen der Pflanze als Reservekohlehydrat einlagern und dadurch der Gewinnung zugänglich ist.

Weltweit wird Stärke hauptsächlich aus den Samenkörner verschiedener Getreidearten gewonnen. Besonders in Europa und Asien werden aber auch bedeutende Mengen aus Knollen und Wurzeln erhalten. Die Hauptquellen von Stärke stellen Mais, Weizen, Kartoffeln, Reis und Maniok dar. Andere Rohstoffe für die Stärkenproduktion sind Sorghum, Süßkartoffel, Gerste, Hafer, Roggen, Erbse, Bohne, Linsen und Süßkartoffel, die aber eher untergeordnete Rollen spielen.

In Österreich wird Stärke ausschließlich aus Mais und Kartoffeln gewonnen.

Ein Maiskorn besteht im ausgereiften Zustand aus der Samenschale, dem Keimling und dem stärkehaltigen Nährgewebe, dem sogenannten Endosperm. Mais besteht zu ca. 70% aus Stärke, ca. 8% aus Protein und zu ca. 4% aus Fett. Der Rest setzt sich aus Wasser, Fasern, Zucker und verschiedenen Mineralstoffen zusammen.

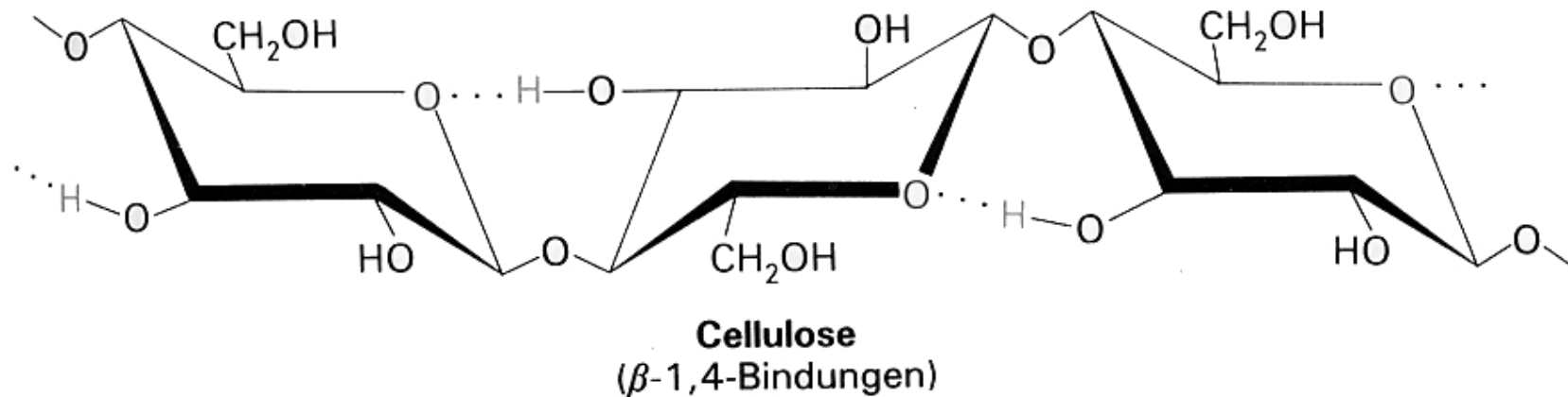
Stärke



Glukose als zum Aufbau von Zellsubstanzen

Cellulose

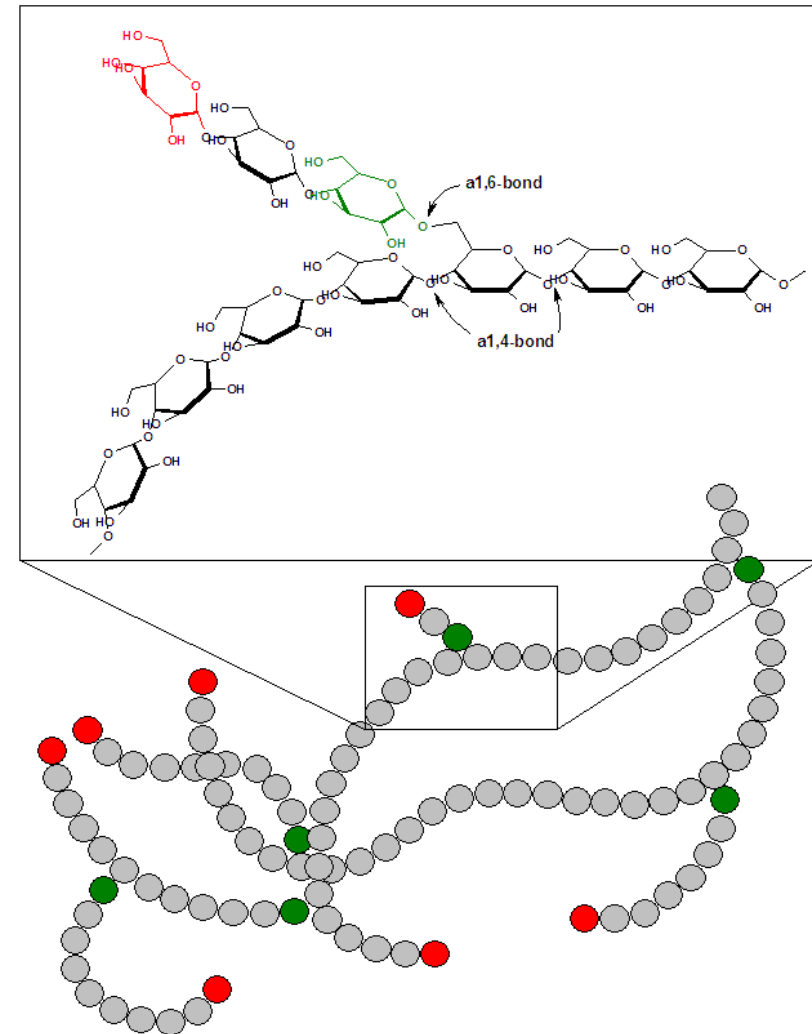
Cellulose wird in großem Umfang aus Fichten und Kiefernholz gewonnen. Das geschnittene, geschliffene und schließlich zermahlene Holz, der Holzschliff, wird in Lösungsmitteln, z.B. Calciumhydrogensulfit $\text{Ca}(\text{HSO}_3)_2$ oder Natronlauge gekocht, die alle Bestandteile außer der Cellulose in lösliche Stoffe überführen. Der Rückstand besteht aus lockeren Cellulosefasern. Gewaschen und gebleicht dienen sie als Rohstoff für die Celluloseindustrie (Zellstoff).



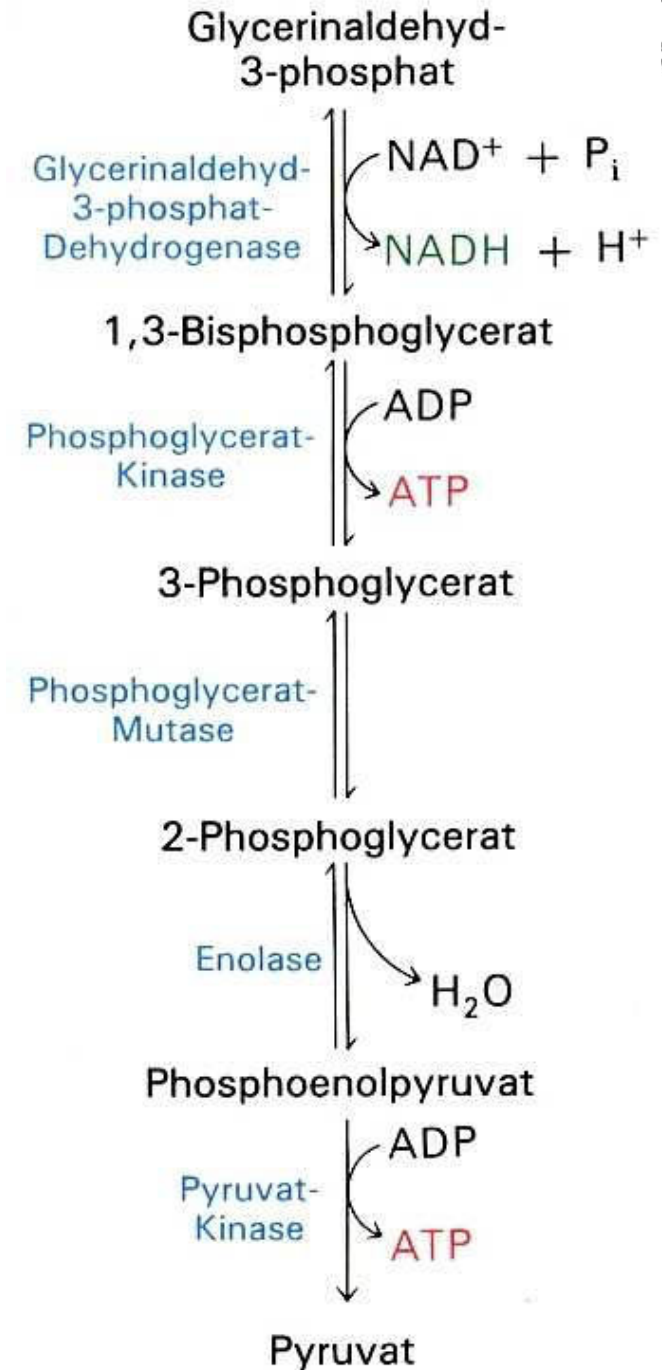
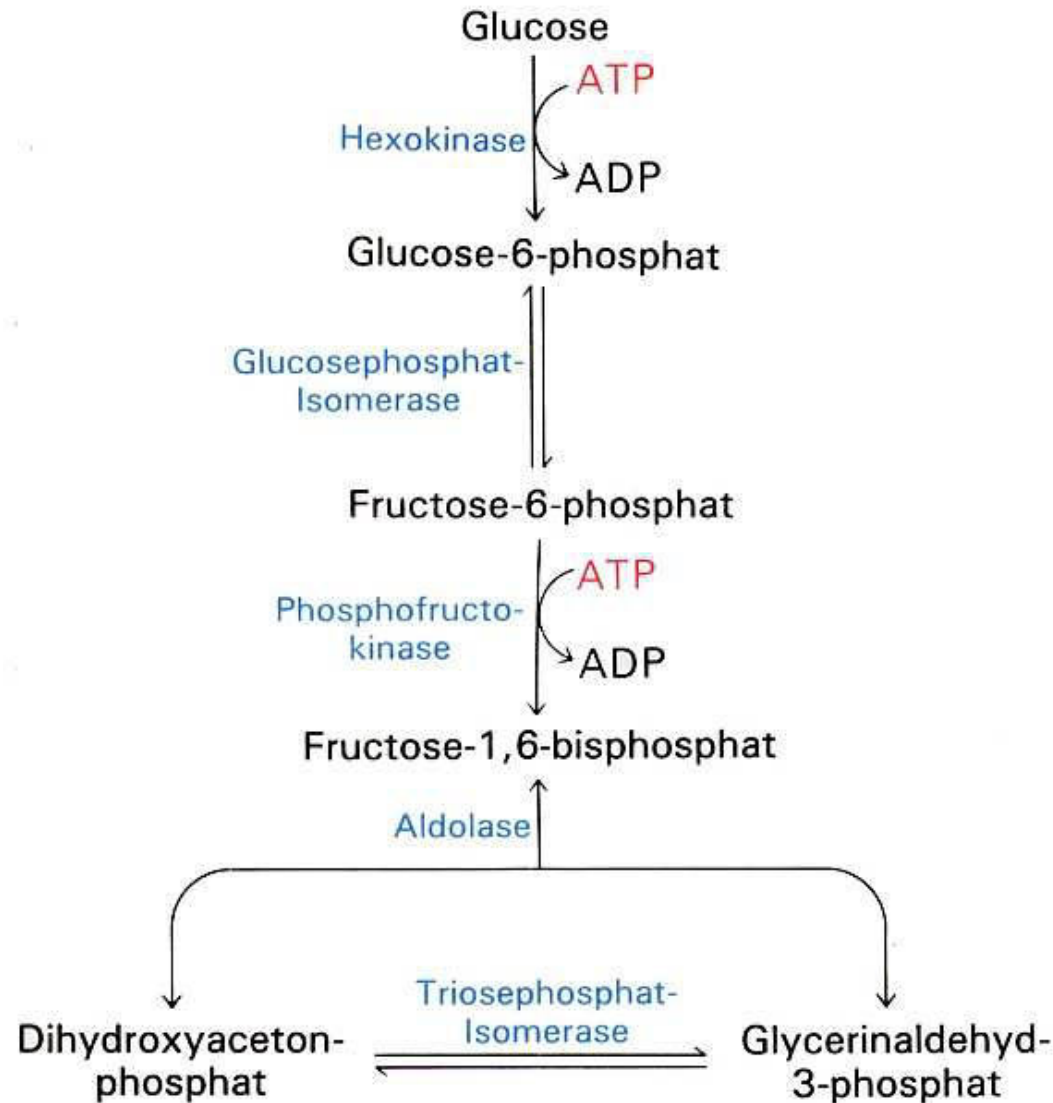
Glykogen als Speichersubstanz

Glykogen

Glykogen ist die Speicherform von KH bei Mensch und Tier (= Reservekohlenhydrate). Es kommt in der Leber (etwa 100 g Glykogen) und Muskulatur vor. Das Leberglykogen dient der Blutzuckerregulation und verhindert einen Abfall des Blutzuckers zwischen den Mahlzeiten. Damit trägt es auch zur Versorgung der Muskulatur bei. Die Aufrechterhaltung des Blutzuckers ist vor allem für die kontinuierliche Versorgung der Gehirn- und Nervenzellen wichtig. Muskelglykogen wird als Energielieferant ausschließlich im Muskel verwertet. Ein Erwachsener besitzt einen Muskelglykogen-Pool von 1 bis 3 g je 100 g Muskelgewebe. Das entspricht im Durchschnitt etwa 400 g Glykogen. Bei Kindern sind die Glykogenspeicher entsprechend kleiner. Bereits nach 24 Stunden Fasten oder sind die Glykogenspeicher aufgebraucht. Glykogen besteht aus vielen Glucosebausteinen und unterscheidet sich von Stärke nur durch die Art der Bindungen zwischen den einzelnen Bausteinen.

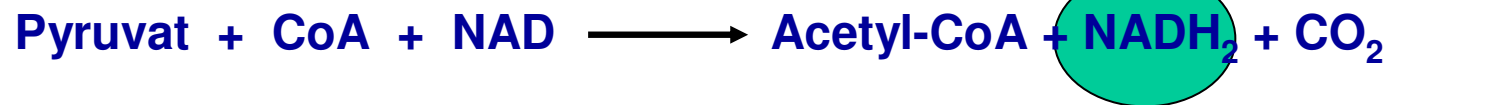


Abbau von Kohlenstoff- und Energiequelle

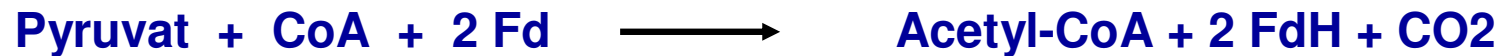


Verwertung von Pyruvat

➤ **Aerobe Organismen**



➤ **Anaerobe Organismen (z.B. Clostridien)**



➤ **Anaerobe Organismen (z.B. Formiatbildner, phototrophe Organismen)**

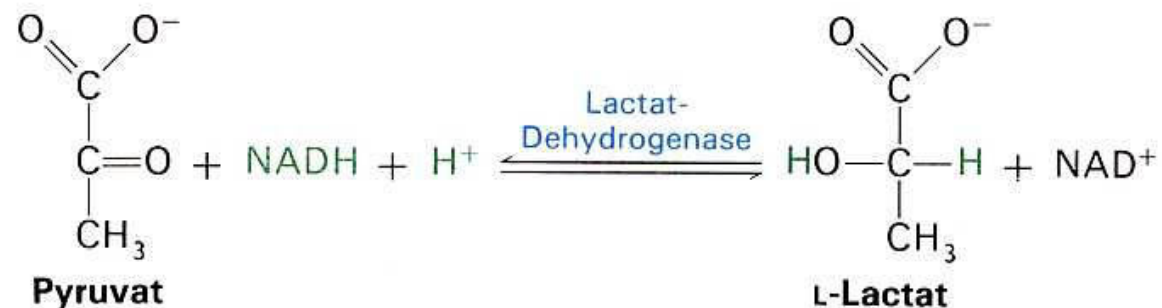


Verwertung von Pyruvat

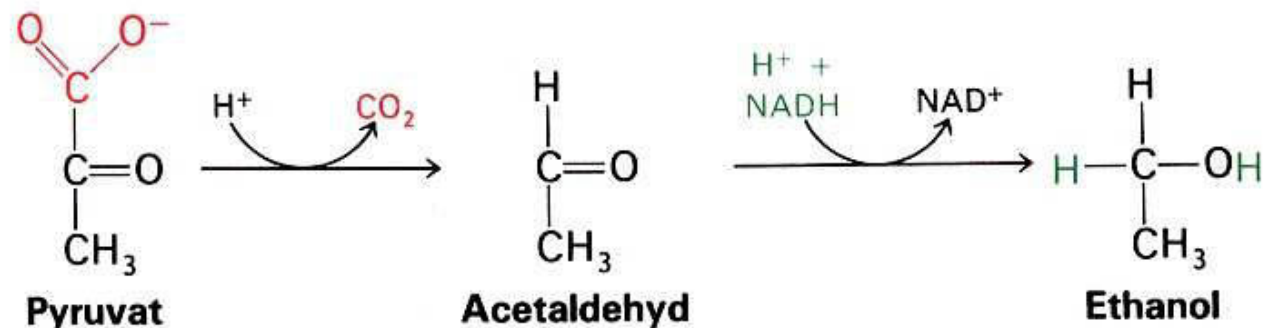
Im anaeroben Stoffwechsel wird Pyruvat durch die Pyruvat Decarboxylase zu Acetaldehyd und CO_2 gespalten.

Anschließend NAD^+ durch Rehydrierung wieder regeneriert, dadurch wird

➤ im Muskel Laktat



➤ und in Hefen Alkohol gebildet



Produktion von Substanzen aus dem Kohlenhydrat Stoffwechsel

- Vollständige Oxidation
 - ◆ Es werden von den MOs keine organischen Verbindungen ausgeschieden, das heißt aber nicht, dass alle Substrate endoxidiert werden; ca. 40-70% der Substrate werden in Zellmaterial umgewandelt.
 - ◆ Die Nährstoffquelle wird vollständig zur Energiegewinnung genutzt.

- Unvollständige Oxidation
 - ◆ Die Energiegewinnung erfolgt über die Atmungskette - aerober Prozess, es werden aber verschiedene Produkte ausgeschieden, die nicht weiter verstoffwechselt werden. Das sind unter anderem: Essigsäure, Gluconsäure, Oxosäure, Zitronensäure, Aminosäuren, Fumarsäure, Milchsäure.
 - ◆ Da bei der Gärung oft ähnliche Produkte gebildet werden spricht man auch von oxidativen Gärungen oder aerobe Fermentation.

- Gärung
 - ◆ Stoffwechselform, bei der unter anaeroben Bedingungen Endprodukte ausgeschieden werden, die noch weiter oxidiert werden könnten.
 - ◆ Die entstehenden e- werden bei O₂ Mangel in Form von Gärungsprodukten ausgeschleust.

Ethanol ein Hauptprodukt der BT

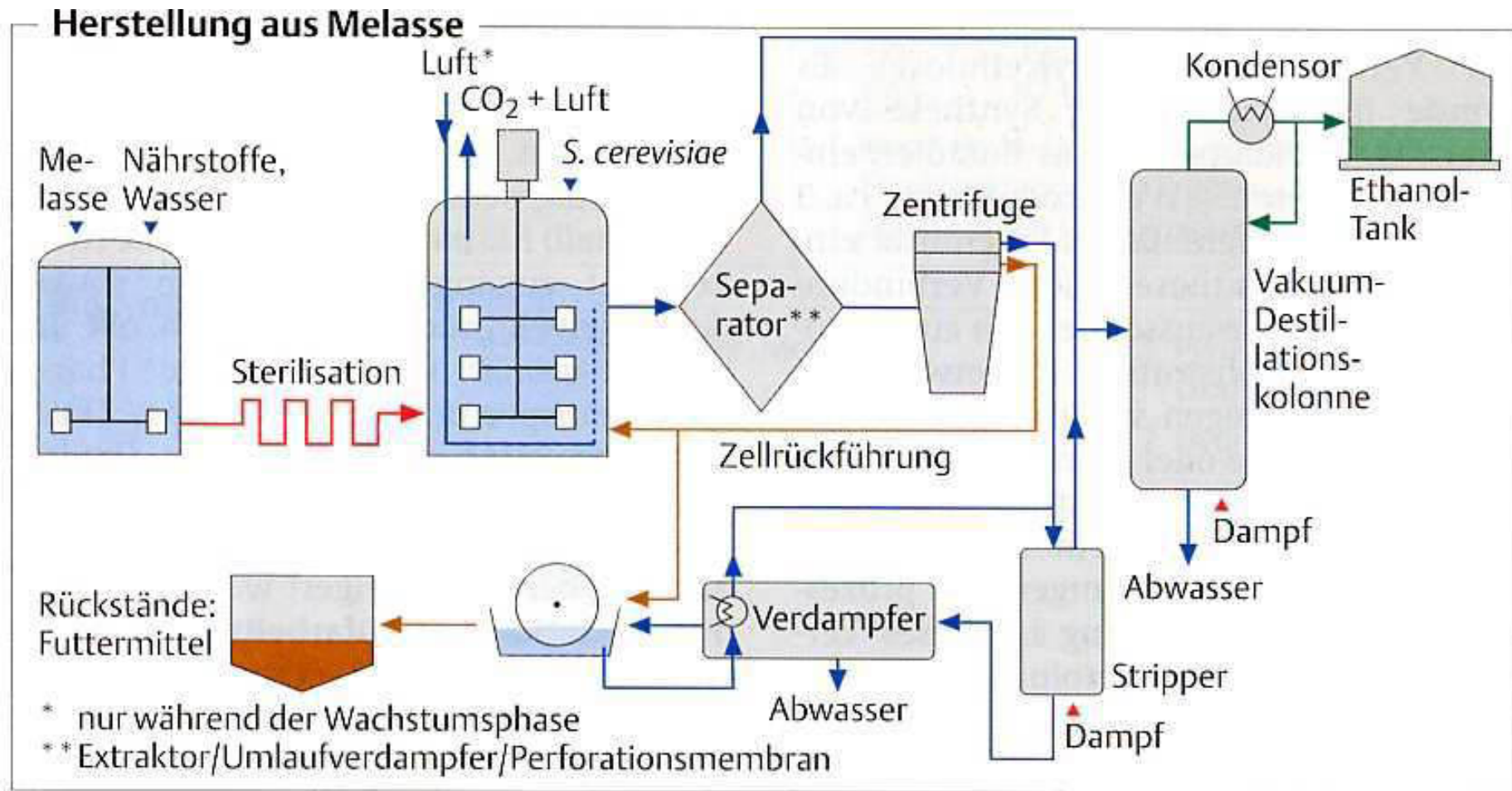
Industrie-Alkohol ist ein wichtiges Lösungsmittel, ein bedeutender Ausgangsstoff zur Synthese chemischer Verbindungen und Energieträger als Bioalkohol. Etwa 2/3 der Weltproduktion gewinnt man durch biotechnologische Umsetzung von Glucose mittels anaerob wachsender Hefen und Bakterien. Einen geringeren Teil durch katalytische Wasseranlagerung an Ethylen. Besonders in Zeiten steigender Rohölpreise wird der Biosprit immer wichtiger.

Der klassische Organismus ist *Saccharomyces cerevisiae*. Sie bildet aus 1 Mol D-Glucose 2 Mol Ethanol, ebenso wie *Zymomonas mobilis* (ein aus Agavensaft isoliertes Bakterium).

Beide Organismen können Polysaccharide nicht abbauen, die als C-Quelle verwendeten Polysaccharide müssen vorher enzymatisch verzuckert werden. Alternativ wird die Herstellung rekombinanter Produktionsstämme intensiv bearbeitet, die durch Einklonieren geeigneter Gene oder Genkassetten kostengünstigere Rohstoffe wie Stärke, Zellulose oder Hemizellulosen umsetzen können.

Die Herstellung erfolgt meist diskontinuierlich in Bioreaktoren mit bis zu 500 m³. Die Vorkultur erfolgt mit Zuckerlösung, die mit anderen Nährstoffen angereichert ist. Nach 14-20 Stunden ist die maximale Alkohol-Bildung erreicht und liegt bei 90% der theoretischen Ausbeute.

Ethanolherstellung



Pasteur Effekt

L. Pasteur (1822 – 1895) hat die Frage nach der Ursache der Gärung geklärt und festgestellt:
...dass Hefe aus einer vorgegebenen Menge Zucker unter aeroben Bedingungen
20mal mehr Zellsubstanz bildet als unter anaeroben Bedingungen.

Der Befund, dass Sauerstoff die Gärung unterdrückt ist als
„Pasteur-Effekt“ zum Modellbeispiel der Stoffwechselregulation geworden.

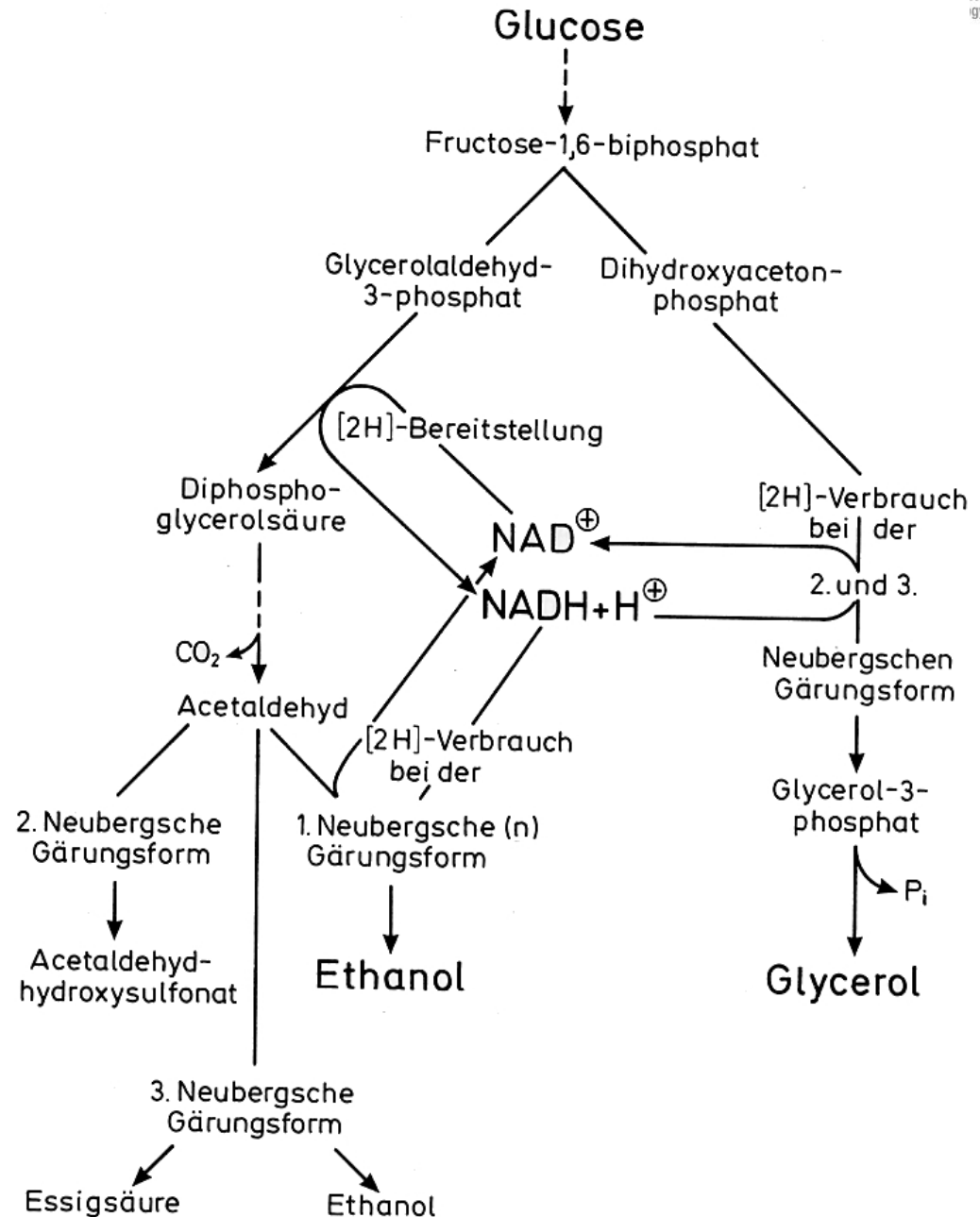
Crabtree-Effekt

- Der Crabtree-Effekt kann als Sonderfall, bzw. Erweiterung des Pasteur-Effektes gesehen werden, und zwar kann Hefe - entgegen der klassischen Ansicht - auch unter aeroben Bedingungen Alkohol bilden, und zwar dann, wenn die Glucosekonzentration einen Schwellenwert übersteigt (abhängig vom Produktionsorganismus), da die Glucose die Transkription jener Gene, die für die Veratmung notwendig sind (oxidativen Enzymen), unterdrückt.
Dadurch kommt es zur Abnahme der Sauerstoffaufnahme und die Glucose wird zu Ethanol metabolisiert.
Die Zufütterungsrate des Substrates wird dabei der spezifischen Wachstumsrate der Hefe angepasst.
Der Crabtree-Effekt wird deshalb auch Glucose-Effekt bezeichnet.
- Dieses Phänomen wurde unter anderem deshalb intensiv studiert, weil es bei der Produktion von Backhefe zur Verminderung der Zellausbeute führt.

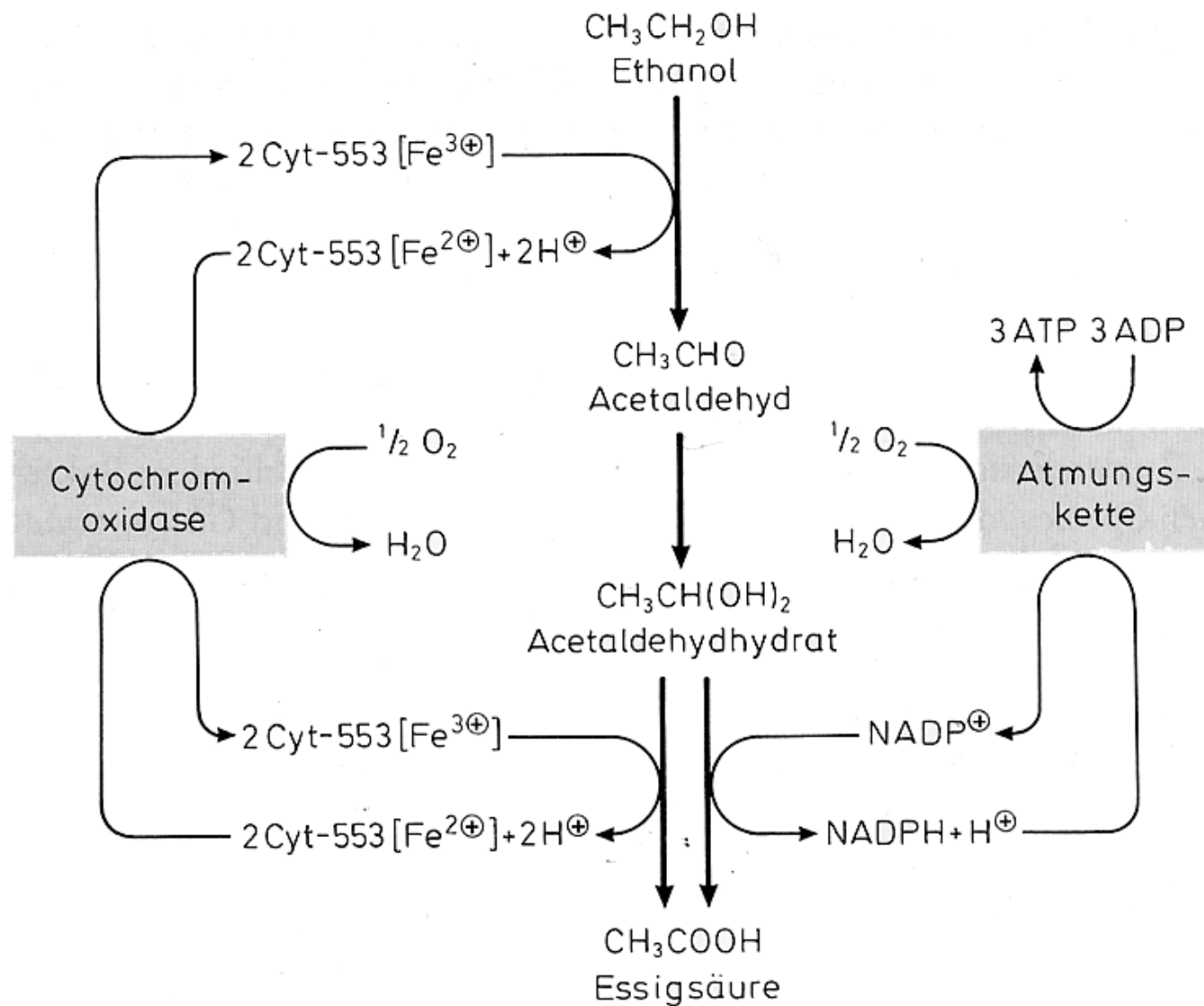
Neuberg'sche Gärungsformen

Um das Gärungsgeschehen von der EthOH Produktion auf Glycerin-Produktion umzulenken, bedarf es nach Neuberg eines besonderen Eingriffs.

Bei der 2. Neuberg'schen Gärungsform nutzt man das spezifische Bindungsvermögen aus, das zwischen Aldehyden und H_2SO_3 besteht. In Form des Acetaldehyd-hydroxysulfonats ist der Acetaldehyd vollständig aus dem konkurrierenden Spiel mit dem 2 H-Akzeptor, dem Dihydroxyacetonphosphat genommen und diese wir nun allein H-Akzeptor. Die Ausbeute kann trotzdem nur 50% maximal betragen, da die andere Hälfte des Substrates zur Bereitstellung der Reduktionskraft, dh der 2 H-Äquivalente, in der Glykolyse oxidiert werden muss.



Essigsäurebildung aus Ethanol

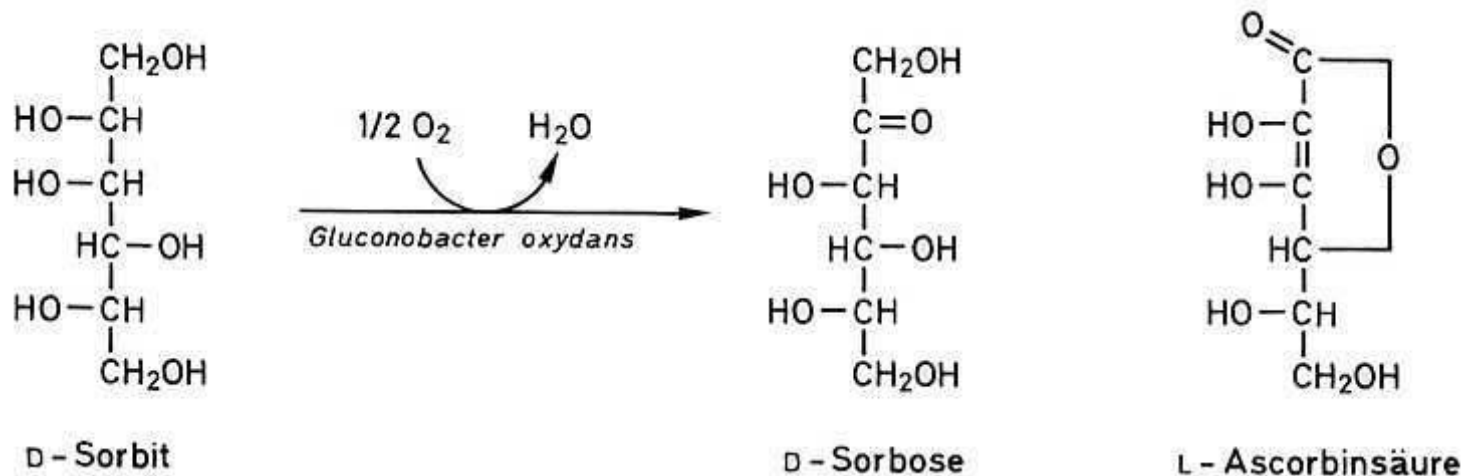


Essigsäurebakterien

- Aufgrund der Art der Gärungsprodukte werden mehrere Gattungen aerober, nicht sporenbildender, Gram negativer Bakterien, die viel H_2 und CO_2 bilden als Essigsäurebakterien zusammengefasst.
- Sie bilden durch unvollständige Oxidation aus Zuckern oder Alkoholen Säuren, die vorübergehend oder als unverwertbare Endprodukte in die Nährlösung ausgeschieden werden.
- Oft sind es peritrich (Acetobakter) oder polar (Acetomonas = Gluconobacter) begeißelte Stäbchen mit hoher Säuretoleranz, geringer proteolytischer Aktivität, geringer Beweglichkeit und ohne farbigen Pigmente.

Essigsäurebakterien

- Natürlicher Standort sind Pflanzen, wo zuckerreiche Säfte frei werden, oft mit Hefen vergesellschaftet.
- Peroxidanten oxidieren das gebildete Acetat zu CO_2 weiter, während Suboxidanten auf der Stufe der Essigsäure die Gärung beenden (Prüfung mit Kreideagar).
- Primäre Alkohole werden zu Fettsäure oxidiert.
- Sekundäre Alkohole werden zu Ketonen oxidiert.
- Zuckeralkohole werden zu Aldosen und Ketosen oxidiert - z.B. Sorbit zu Sorbose (Vitamin C Bildung).



Technologie der Essigäuregärung

Biotechnologische Verfahren

➤ Oberflächen- oder Deckenverfahren:

dabei wird in flachen Schalen der MO auf der Oberfläche des Substrates (Wein) kultiviert und es entsteht eine zusammenhängende Haut (Decke) von *Acetobacter xylinum*.

17.-18. Jh. Entwicklung des Orléons Verfahren: Oberflächenverfahren, bei dem die MO auf Buchholzspänen als feste Träger fixiert sind

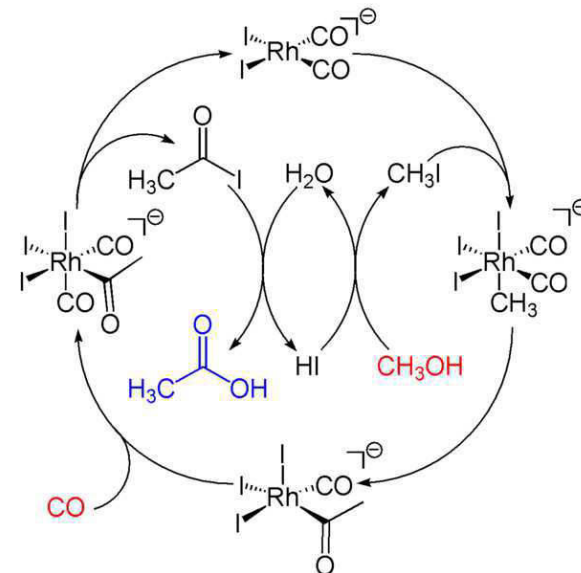
➤ Fesselverfahren:

ebenfalls ein Oberflächenverfahren wobei die Bakterien an einem Trägermaterial gefesselt sind (Weintrester, Traubenstiele in belüfteten Fässern, Buchholzspäne) - Generator-Verfahren ab 1935 kontinuierlich

➤ Submersverfahren seit 1952 (Frings Acetator)

Chemisches Verfahren

Im Gegensatz zu den biotechnologischen Verfahren kann Essigsäure auch chemisch hergestellt werden: Der **Monsanto-Prozess** ist ein wichtiges Verfahren zur industriellen Darstellung von Essigsäure. Der Prozess findet bei einem Druck von 30-60 bar und einer Temperatur von 150-200°C statt mit einer Selektivität von über 99 %. Dabei wird Methanol mit Kohlenmonoxid katalytisch zu Essigsäure umgesetzt.



Lactobacteriaceae

- morphologisch uneinheitlich
- physiologisch gut charakterisiert,
- Gram positiv
- bilden keine Sporen
- unbeweglich (beide Eigenschaften nicht obligatorisch)
- Energiegewinnung durch KH, wobei Laktat ausgeschieden wird
- Milchsäurebakterien sind obligate Gärer, kein Hämin (Cytochrome, Katalase), sind aber trotzdem anaerob, aerotolerant
- Sind auf Supplie angewiesen (Vitamine, Laktoflavin, Thiamin, Pantothersäure, Nikotinsäure, Folsäure, Aminosäuren, Purine, Pyrimidine) und daher auf komplexen Medien zu kultivieren

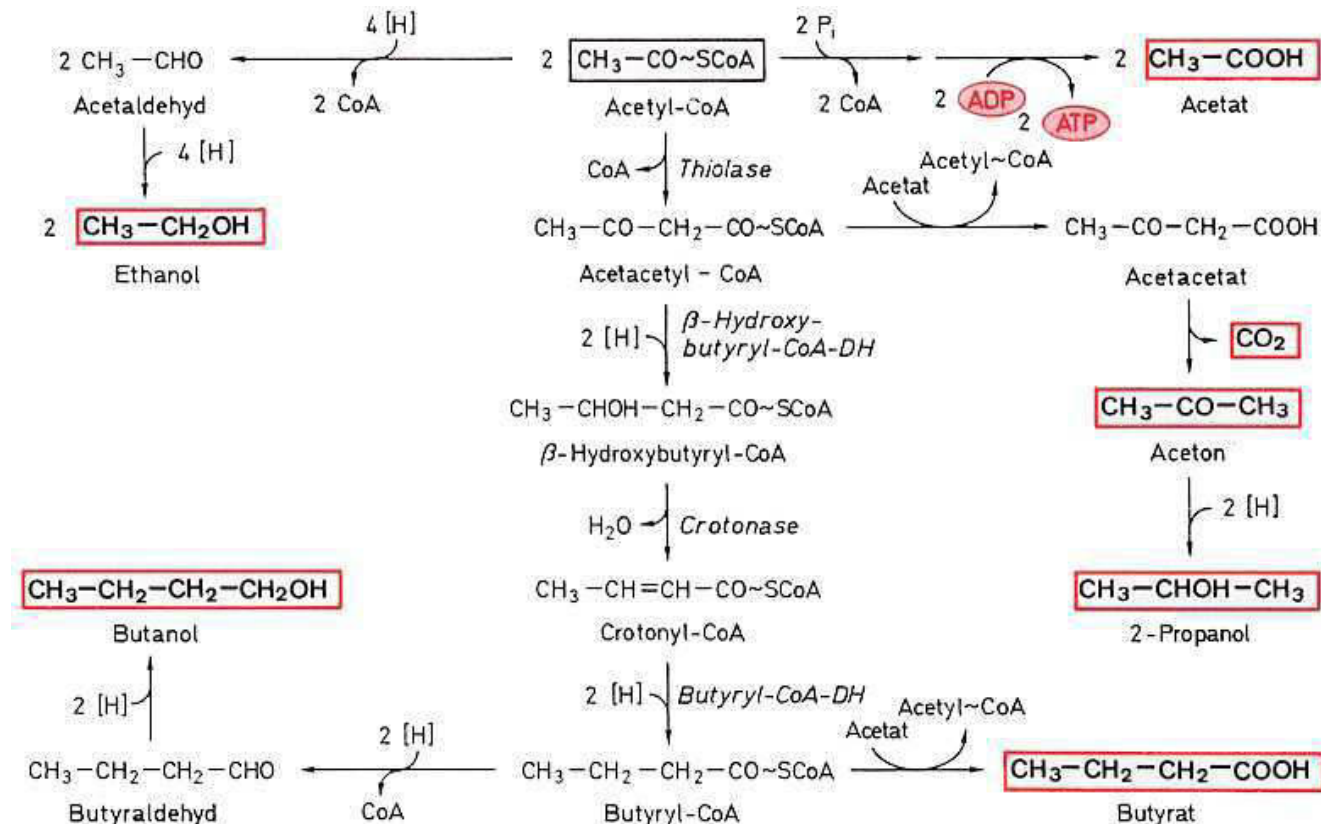
Weltweit werden etwa 150.000 Tonnen Milchsäure produziert, die vor allem in der Lebensmittelindustrie sowie zur Herstellung von Polylactiden (PLA) genutzt werden.

Homofermentative /heterofermentative Milchsäurebakterien

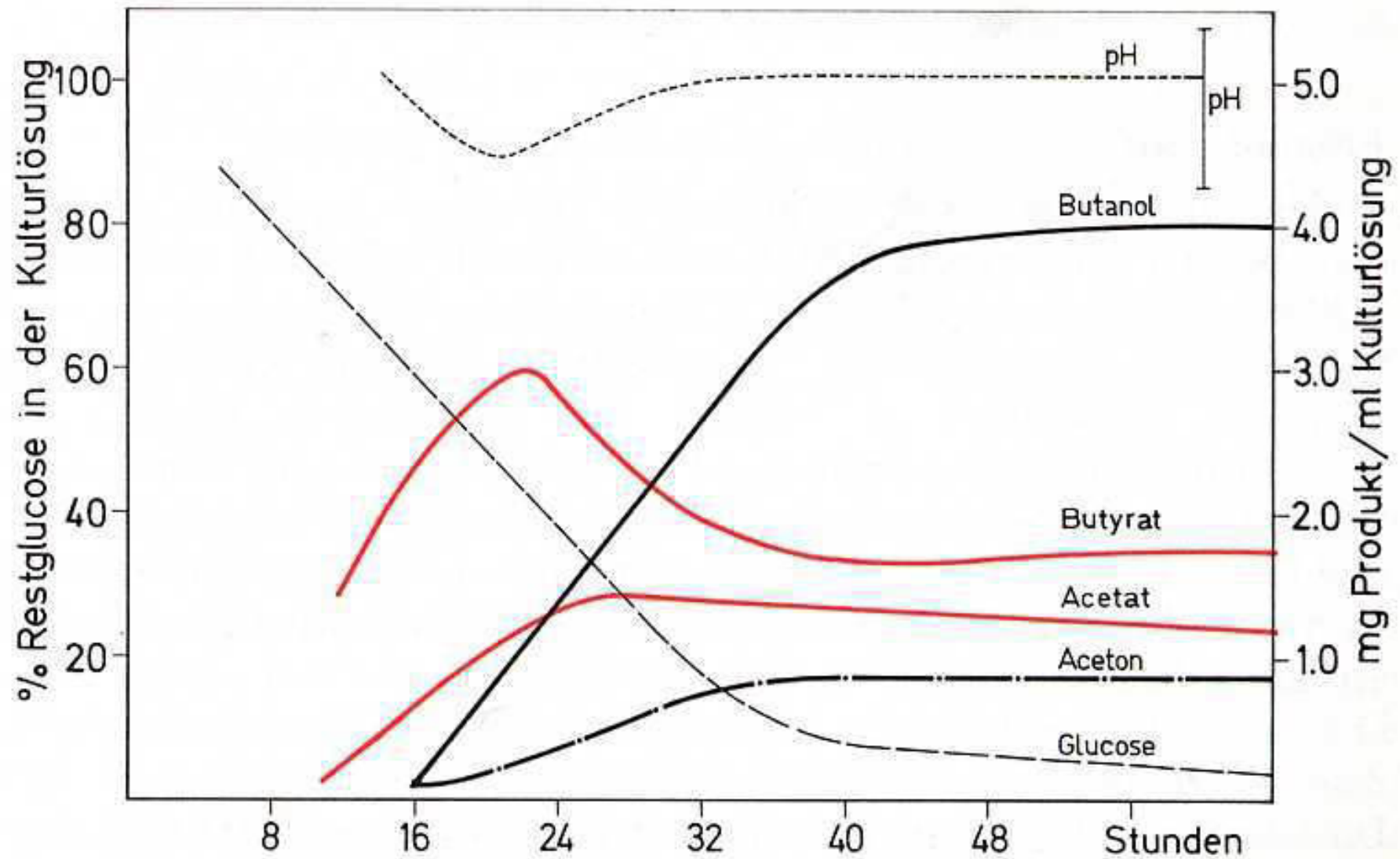
- Homofermentative Milchsäurebakterien bauen Glukose über den Fruktosebiphosphatweg ab.
- Heterofermentative Milchsäurebakterien bauen Glukose über den Pentosephosphatweg ab; es entsteht zusätzlich Ethanol oder Essigsäure und CO₂

Clostridien-Gärprodukte und Biochemie der Clostridien-Gärung

- Saccharolytische und peptidolytische (oft Krankheitserreger und Toxinbildner) Vertreter
- zumeist einem weiten Spektrum von Substraten zugänglich (Stärke, Glykogen, Cellulose, Hemicellulose, Pektine, Nukleinsäuren, Proteine, Aminosäuren, Purine, Pyrimidine)



Zeitlicher Verlauf der Glucosevergärung durch *Clostridium acetobutylicum*



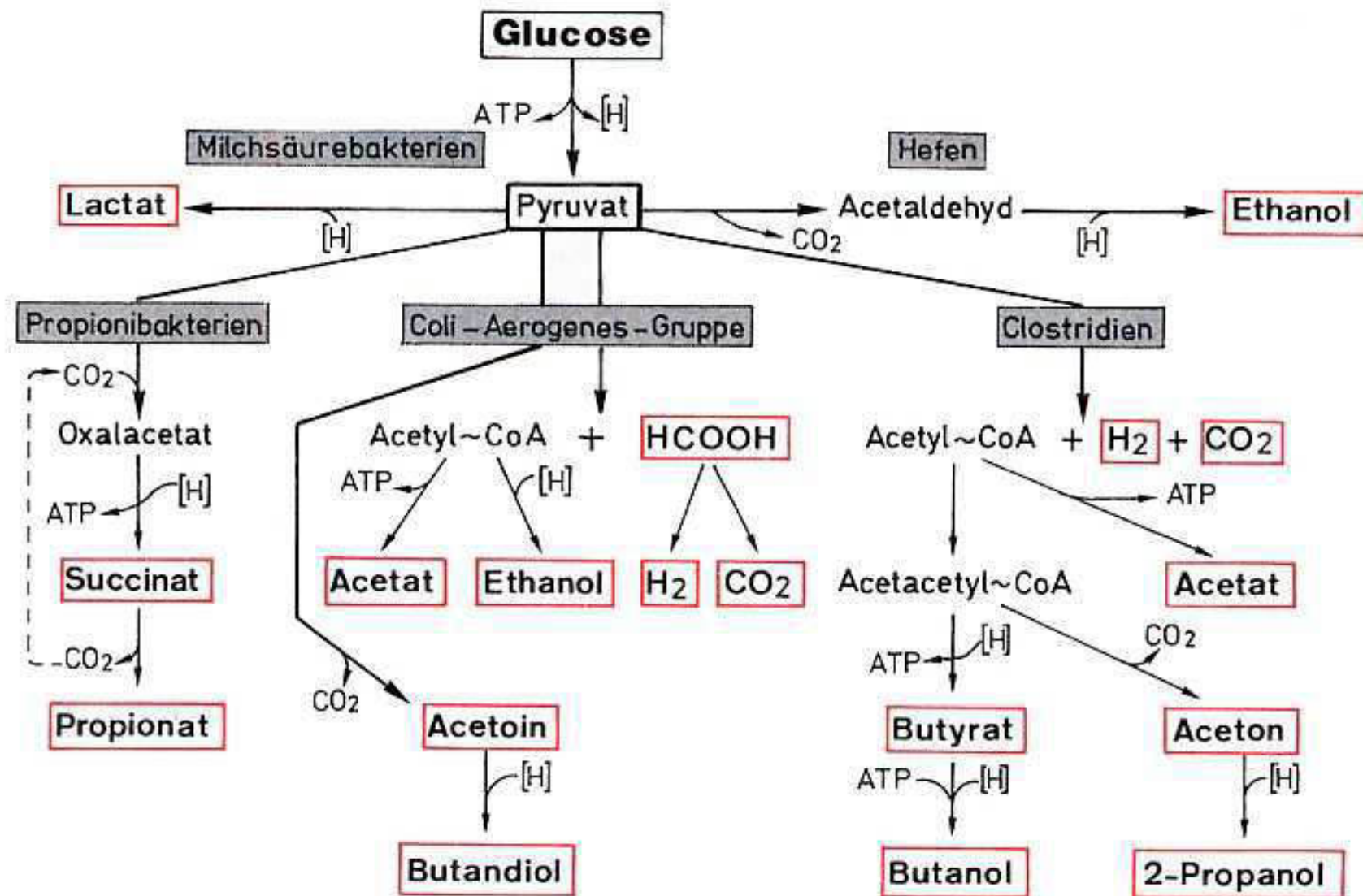
Butanol - Acetonherstellung

- Weizmannprozess 1915/16 entwickelt zur Produktion von Butanol und Aceton - die Anlagen wurden aber nach dem Krieg wegen Unwirtschaftlichkeit geschlossen.
- Buttersäure, Butanol, Aceton, 2-Propanol und andere organische Säuren und Alkohole sind typische Gärungsprodukte von Kohlenhydraten anaerober Sporenbildner.
- Clostridien zur Familie der Bacillaceae, Gram positiv, stäbchenförmig, peritrich begeißelt, Endosporen deformieren die Mutterzelle und sind thermoresistent.
- Strikt anaerobe bis aerotolerante Vertreter, ausgeprägter Gärungsstoffwechsel.
- Keine Häm-Derivate, vermögen aber Cytochrome zu bilden.
- werden durch Ansäuern im Wachstum behindert (Sauerkraut, Rohwurst...).

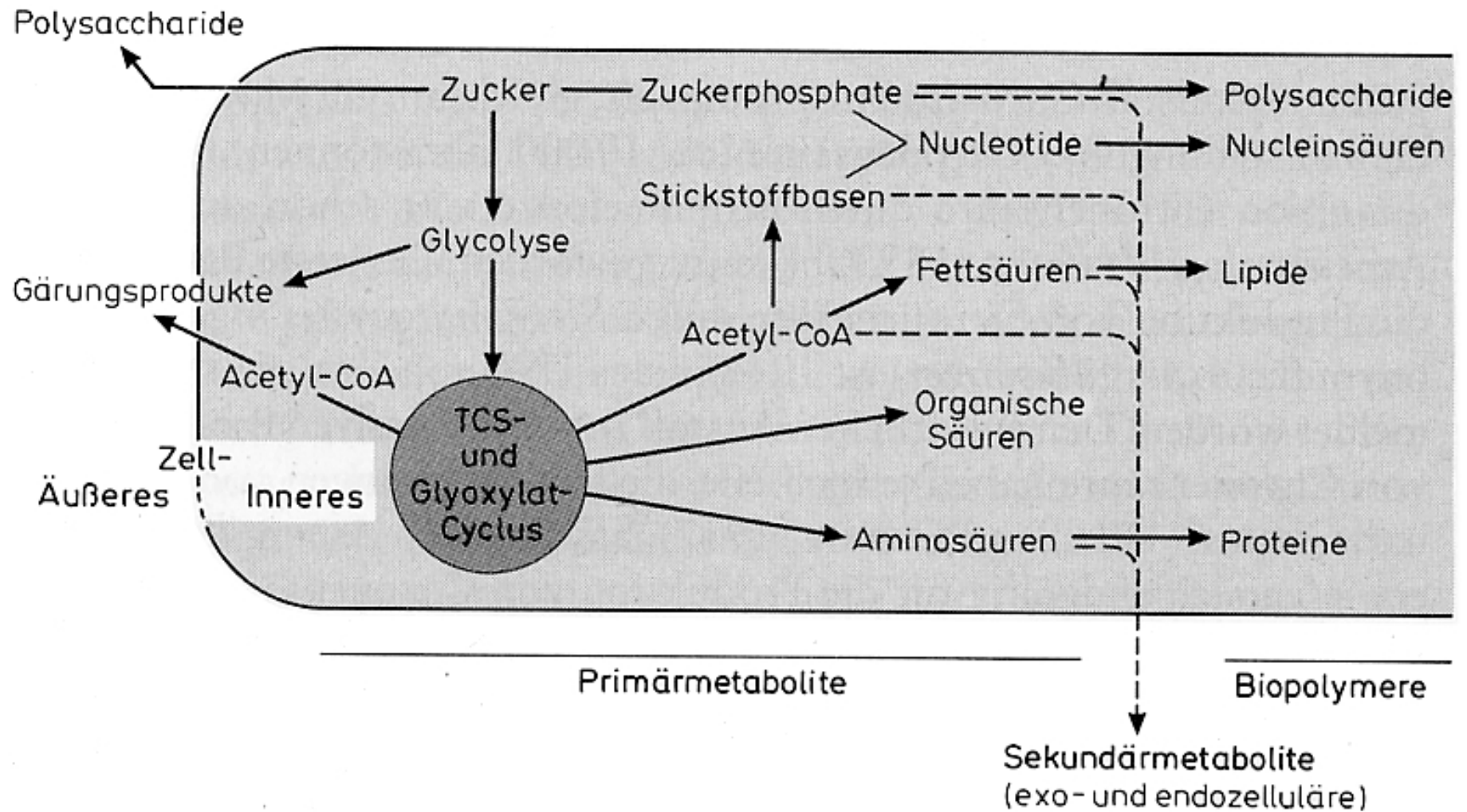
Industrielle Produktion von n-Butanol und Aceton

- Butanol zur Synthese von Butadien, das das Ausgangsmaterial für Synthesekautschuk ist.
- Butanol ist Lösungsmittel für Harze.
- In Lacken zum schleiffreien Trocknen verwendet.
- Heute erfolgt die Herstellung meist aus der Petrochemie.
- Ausgangsmaterial der Fermentation ist Mais, da man die Stärke vorher nicht verzuckern muss (Amylasen).
- Die Gärung muss streng anaerob durchgeführt werden, sodass man die Anlage unter CO_2 -Atmosphäre hält.
- In der Wachstumsphase starke Gasentwicklung und Produktion von Essig- und Buttersäure (werden mit NH_3 neutralisiert pH 5-6).
- Später wird n-Butanol, Aceton und wenig CO_2 gebildet

Gärungen (Zusammenfassung)

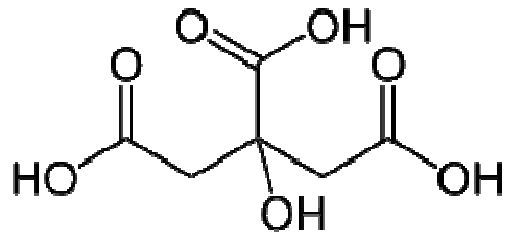


Primärmetabolite (und Biopolymere)

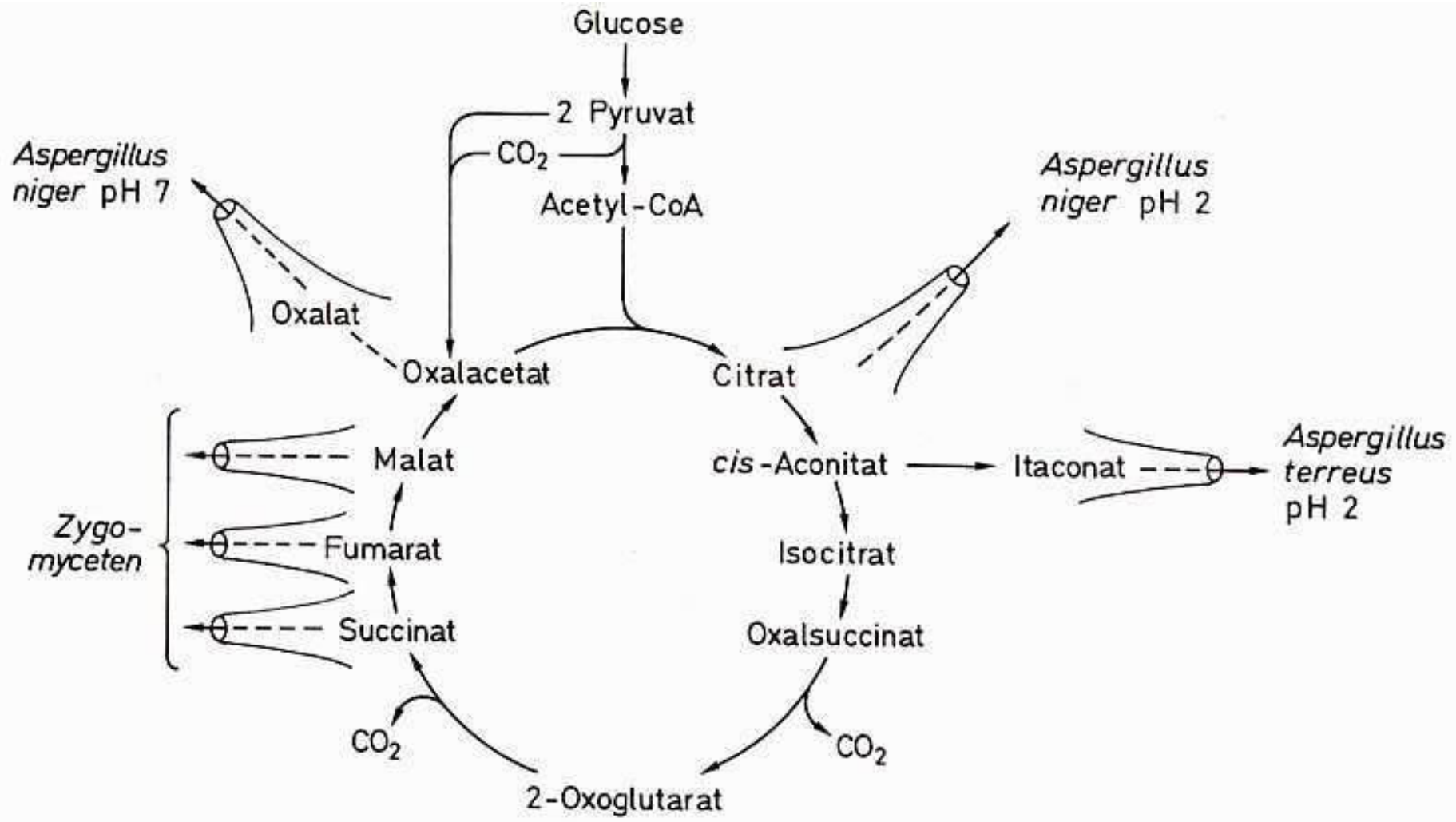


Zitronensäure

- Bis 1920 wurden aus Zitronen ca 10.000 t/a gereinigt.
- 1933 wurden bereits 83 % des Weltmarktes fermentativ hergestellt.
- Zitronensäure ist eine starke Tricarbonsäure und bildet 3 Reihen von Salzen und Ester.
- Zitronensäure komplexiert Metallionen.
- Schlüsselsubstanz im Zitronensäurezyklus, der wichtigsten cyclischen Reaktionsfolge für den weiteren oxidativen Endabbau des C-Skeletts.
- Im Menschen werden tgl ca. 2.000g Zitronensäure als Zwischenprodukt gebildet und wieder abgebaut.
- Verwendung der Zitronensäure:
 - ◆ LM-Industrie (Säuerung, Antioxidans, Unterdrückung der Bräunung bei Obst und Gemüse)
 - ◆ Haut- und Haarkosmetik
 - ◆ Entrosten von Metallen
 - ◆ Entkalken
 - ◆ Verhinderung der Blutgerinnung



Zitronensäurebildung



Zitronensäurebildung

Die Überproduktion von Zitrat durch *A. niger* setzt am TCC an.

Der Zyklus wird bei der Überproduktion zwar gut mit Substrat versorgt, er ist in seinem Verlauf aber unterbrochen, sodass er an der Stelle des Citrats über- und auslaufen muss.

Da die Oxidation von 2-Oxoglutarat zu Succinat die einzige irreversible Reaktion ist, muss dort unterbrochen werden. Die Synthese der 2-Oxoglutaratdehydrogenase wird durch Glucose und auch durch NH_4^+ -Ionen reprimiert.

Aus diesem Grund lässt man die Zitronensäurefermentation von Beginn an mit hoher Zuckerkonzentration ablaufen und versorgt die Kultur mit NH_4^+ als einziger N-Quelle.

Dadurch 2 Vorteile: Durch den Verbrauch an NH_4^+ sinkt der pH-Wert des Milieus rasch ab, wodurch die Zitratakkumulation zusätzlich gefördert wird. Bei einer N-Quelle mittels Harnstoff oder Nitrat würde diese Säuerung entfallen.

Durch die Unterbrechung des TCC an der 2-Oxoglutaratdehydrogenase müsste sich eigentlich 2-Oxoglutarat anreichern. Da die Isocitratdehydrogenase, die den nächst zurückliegenden Schritt im Zyklus katalysiert, durch 2-Oxoglutarat gehemmt wird, sollte es aber eher zu einer Anreicherung von Isocitrat kommen. Die Anreicherung wird aber unterbunden durch eine spezifische Wirkung der Aconitase (Aconitathydratase), die zw. Citrat, cis-Aconitat und Isozitrat ein konstantes Mengenverhältnis von 90:3:7 einstellt. Zusätzlich verstärkt wird die Zitratanhäufung noch weil Isozitratdehydrogenase durch Zitrat gehemmt wird.

Zitronensäurebildung

Die Überproduktion von Zitrat durch *A. niger* setzt am TCC an.

Der Zyklus wird bei der Überproduktion zwar gut mit Substrat versorgt, er ist in seinem Verlauf aber unterbrochen, sodass er an der Stelle des Citrats über- und auslaufen muss.

Da die Oxidation von 2-Oxoglutarat zu Succinat die einzige irreversible Reaktion ist, muss dort unterbrochen werden. Die Synthese der 2-Oxoglutaratdehydrogenase wird durch Glucose und auch durch NH_4^+ -Ionen reprimiert.

Aus diesem Grund lässt man die Zitronensäurefermentation von Beginn an mit hoher Zuckerkonzentration ablaufen und versorgt die Kultur mit NH_4^+ als einziger N-Quelle.

Dadurch 2 Vorteile: Durch den Verbrauch an NH_4^+ sinkt der pH-Wert des Milieus rasch ab, wodurch die Zitratakkumulation zusätzlich gefördert wird. Bei einer N-Quelle mittels Harnstoff oder Nitrat würde diese Säuerung entfallen.

Durch die Unterbrechung des TCC an der 2-Oxoglutaratdehydrogenase müsste sich eigentlich 2-Oxoglutarat anreichern. Da die Isocitratdehydrogenase, die den nächst zurückliegenden Schritt im Zyklus katalysiert, durch 2-Oxoglutarat gehemmt wird, sollte es aber eher zu einer Anreicherung von Isocitrat kommen. Die Anreicherung wird aber unterbunden durch eine spezifische Wirkung der Aconitase (Aconitathydratase), die zw. Citrat, cis-Aconitat und Isozitrat ein konstantes Mengenverhältnis von 90:3:7 einstellt. Zusätzlich verstärkt wird die Zitratanhäufung noch weil Isozitratdehydrogenase durch Zitrat gehemmt wird.

Enhanced citrate production through gene insertion in *Aspergillus niger*

W.A. de Jongh, J. Nielsen

Metabolic Engineering 10 (2008) 87–96



VIBT
Vienna Institute
of BioTechnology

The effect of inserting genes involved in the reductive branch of the tricarboxylic acid (TCA) cycle on citrate production by *Aspergillus niger* was evaluated. Several different genes were inserted individually and in combination, i.e. malate dehydrogenase (*mdh2*) from *Saccharomyces cerevisiae*, two truncated, cytosolic targeted, fumarases (*Fum1s* and *FumRs*) from *S. cerevisiae* and *Rhizopus oryzae*, respectively, and the cytosolic soluble fumarate reductase (*Frds1*) from *S. cerevisiae*. Overexpression of these genes in their native strain backgrounds has been reported to lead to alterations in the intracellular cytosolic dicarboxylate concentrations. It was found that all the transformant strains had enhanced yield and productivities of citrate compared with the wild-type strain. The transformants also had the ability to produce citrate in trace-manganese-contaminated medium, where the wild type was unable to produce. Overexpression of *FumRs* and *Frds1* resulted in the best citrate-producing strain in the presence of trace manganese concentrations. This strain gave a maximum yield of 0.9 g citrate per g glucose and a maximum specific productivity of 0.025 g citrate per g DW per h. Overexpression of *mdh2* alone resulted in an increased citrate production rate only in the initial phase of the fermentations compared with the other transformants and the wild type.

Produktionsverfahren

- Die Auswahl an Stoffwechselprodukten, die mit geeigneten MOs gewonnen werden können, sind groß aber die Wirtschaftlichkeit ist oft nicht gegeben:
 - ◆ entweder stehen die Fermentationsprodukte in Konkurrenz zu billigeren synthetischen und natürlichen Produkten
 - ◆ oder die Anwendung und die Nachfrage sind nicht groß genug

- Primärmetaboliten werden mit 4 verschiedenen technischen Verfahren hergestellt:
 - ◆ Oberflächenverfahren auf festen Substraten
 - ◆ Oberflächenverfahren auf flüssigen Substraten
 - ◆ Anaerobe Submersverfahren
 - ◆ Aerobe Submersverfahren

Zitronensäureherstellung

- In Oberflächenverfahren wird mit *Aspergillus niger* oder *Aspergillus wentii* seit 1920 Zitronensäure durch aerobe Fermentation gewonnen.
- Durch Fermentation C-reicher Substrate wie Melasse oder Sulfitablaugen entsteht Zitronensäure mit einer Ausbeute von 50-90% bezogen auf Zucker, der in Zitronensäure umgewandelt wird.
- Hefen der Gattungen *Hansenula* und *Candida* können auch Paraffine als Substrat verwerten.
- Aus der Gärmaische wird mit Ca-Salzen die Zitronensäure gefällt und gereinigt.

Oberflächenverfahren

- In Oberflächenverfahren wird mit *Aspergillus niger* oder *Aspergillus wentii* seit 1920 Zitronensäure durch aerobe Fermentation gewonnen.
- Durch Fermentation C-reicher Substrate wie Melasse oder Sulfitablaugen entsteht Zitronensäure mit einer Ausbeute von 50-80% bezogen auf Zucker, der in Zitronensäure umgewandelt wird.
- Edelstahlwannen von 8-12 cm tiefe mit Substratlösung füllen
- Beimpfen mit *Aspergillus niger* Konidie (100 mg/m²)
- Während der Mycelbildung fällt der pH durch Säurebildung auf 2
- nach 6-8 Tagen ist die Säurebildung beendet (200g/l)
- Aufarbeitung
 - ◆ **CaOxalat bei pH 2 ausfällen**
 - ◆ **Tricalciumcitrat bei pH 7 und 90°C fällen**
 - ◆ **CaSO₄ mit H₂SO₄ fällen**
 - ◆ **Zitronensäurelösung über Aktivkohle filtrieren**

Submersverfahren

➤ Schwierigkeiten

- ◆ andere Produktionsstämme
- ◆ O₂ Mangel bewirkt schlechte Zitronensäurebildung
- ◆ Scherkräfte sind problematisch für das Hyphenwachstum
- ◆ höhere Empfindlichkeit gegen Schwermetalle und Hexacyanoferrat II
- ◆ größerer Aufwand in der Prozessleitung

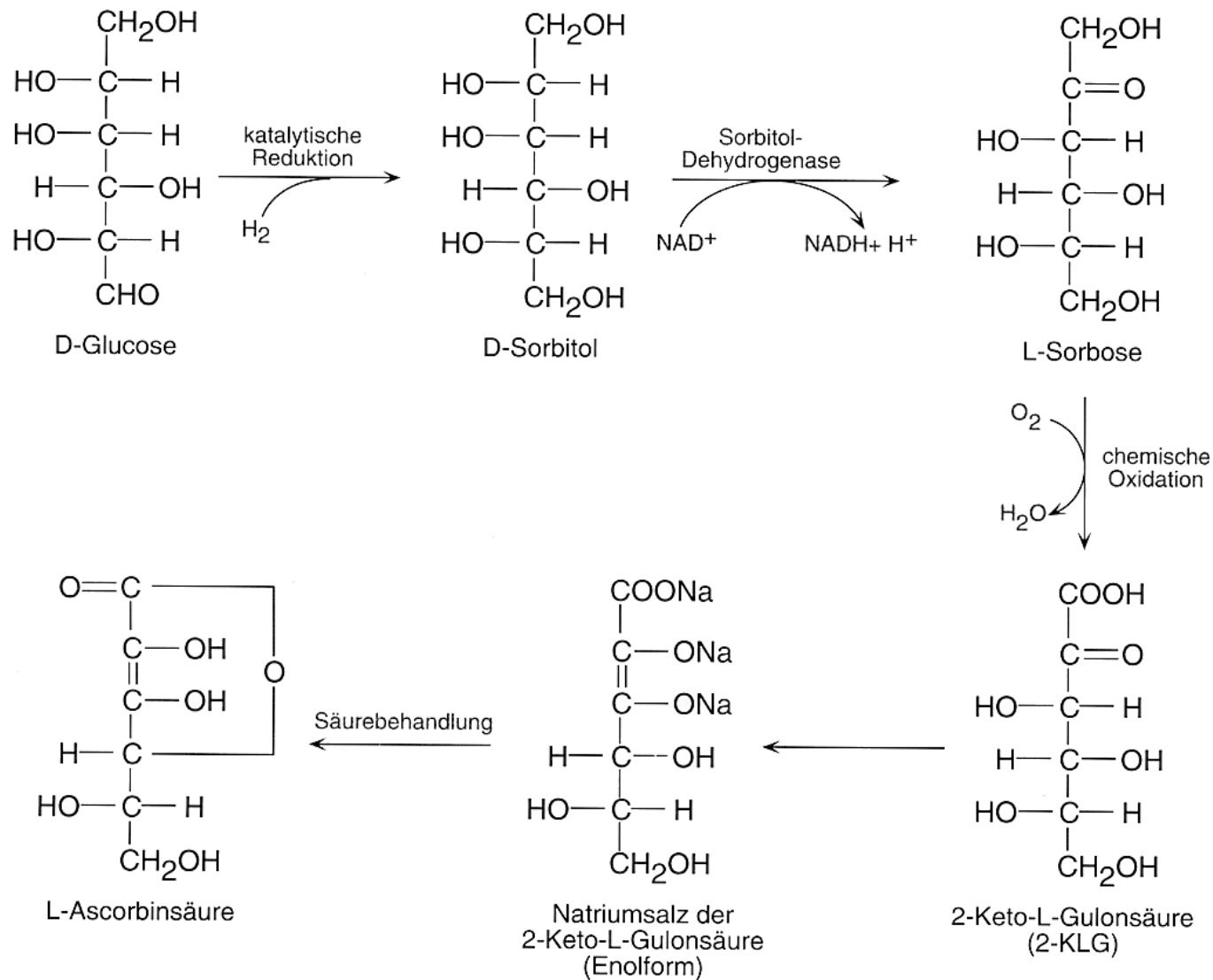
➤ Vorteile

- ◆ größere Produktionseinheiten
- ◆ mehrere 100 m³
- ◆ Hefen der Gattungen Hansenula und Candida können auch Paraffine als Substrat verwerten.

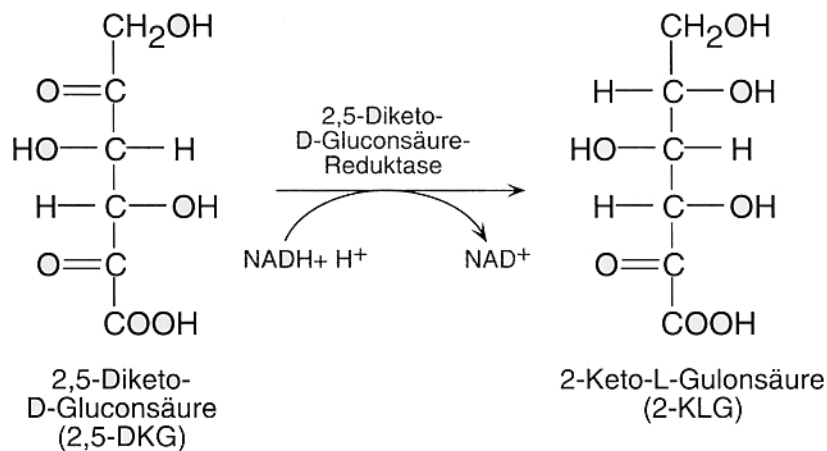
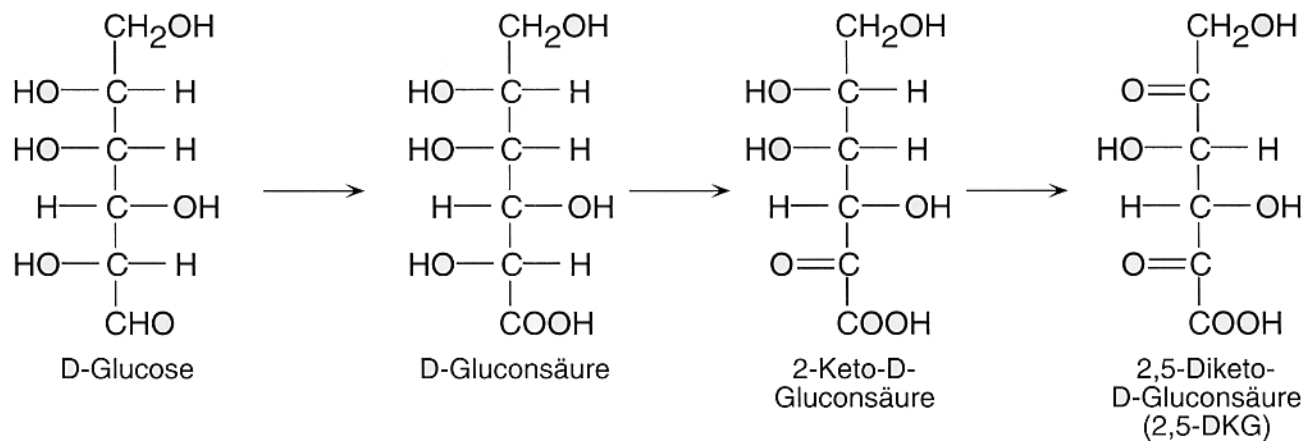
Synthese von L-Ascorbinsäure

- Ausgangsmaterial ist D-Glucose, die katalytisch zu D-Sorbitol reduziert wird
- Dann wird Sorbitol zu Sorbose oxidiert.
Enzym:Sorbitol-Dehydrogenase (biotechnisch; regioselektiv mit einem Enzym aus *Acetobacter suboxidans*)
- Anschließend erfolgt die chemische Umsetzung der Sorbose zu 2-Keto-L-Gulonsäure und dann zu Ascorbinsäure

Synthese von L-Ascorbinsäure (Reichsteinverfahren)



Biotechnologische Synthese von L-Ascorbinsäure



➤ Acetobacter, Glyconobakterien und Erwinia wandeln die D-Glucose direkt über D-Gluconsäure und 2-Keto-D-Gluconsäure in 2,5-Diketo-D-Gluconsäure um.

➤ Corynebakterien, Brevibakterium und Arthrobakter setzen die gebildete 2,5-Diketo-D-Gluconsäure durch die 2,5-DKG-Reduktase direkt in 2-Keto-L-Gulonsäure um.

Die Ko-kultivierung dieser Bakterien ist noch nicht gelungen

Stammverbesserung zur Produktion von L-Ascorbinsäure

- Genetische Modifizierung von Bakterien
- Umwandlung von D-Glucose zu 2,5-DKG in *Erwinia herbicola* braucht 3 Oxidationsschritte: am C1, C2 und C5 (3 Enzyme)
- Umwandlung von 2,5-DKG in 2-Keto-L-Gulonsäure in *Corynebakterium* in einem Schritt (mittels 2,5 DKG-Reduktase)
- Daher wird man das Enzym 2,5 DKG-Reduktase in *Erwinia* bringen

Industriell bedeutende Aminosäuren

Aminosäure	Jahresproduktion* [t/a ⁻¹]	Wert* [US-\$/kg]	Herstellmethode	Hauptanwendung
Protein-bildende Aminosäuren				
L-Glutamat	>800 000	1	Fermentation	Geschmacksverstärker
L-Lysin	200 000	2	Fermentation, Enzymreaktor	Futtermittelzusatz
D,L-Methionin	200 000	2	chemische Synthese	Futtermittelzusatz
L-Threonin	10 000	5	Fermentation	Futtermittelzusatz
L-Asparaginsäure	10 000	10	chiraler Pool, Zellreaktor	Aspartam TM
Glycin	10 000	10	chemische Synthese	Süßstoff
L-Phenylalanin	10 000	10	Fermentation, Enzymreaktor	Aspartam TM ; Medizin
L-Arginin	1 000	20	Fermentation, chiraler Pool	Medizin, Kosmetik
L-Tryptophan	1 000	20	Fermentation, Enzymreaktor	Futtermittelzusatz
andere	3 000		chiraler Pool, Fermentation, Enzym- und Zellreaktoren	Medizin und andere Anwendungen
andere Aminosäuren (Beispiele)				
D-Phenylglycin, D-4-Hydroxyphenylglycin			chemische Synthese	Vorstufen für Ampicillin und Amoxicillin
(S)-5-Hydroxytryptophan			chemische Synthese	Oxitriptan TM , ein Anti-depressivum

Herstellverfahren von AS



Hydrolyse aus Proteinen und chemische Synthese

Proteinhydrolyse: aus Pflanzenproteinen, Schlachttierabfällen

Cystein, Cystin, Leucin, Asparagin, Arginin, Tyrosin

Saure Hydrolyse

Hydrophobe AS durch Alkoholextraktion fällen

Ionenaustauschchromatographie der wasserlöslichen AS in basische, saure und neutrale Fraktion

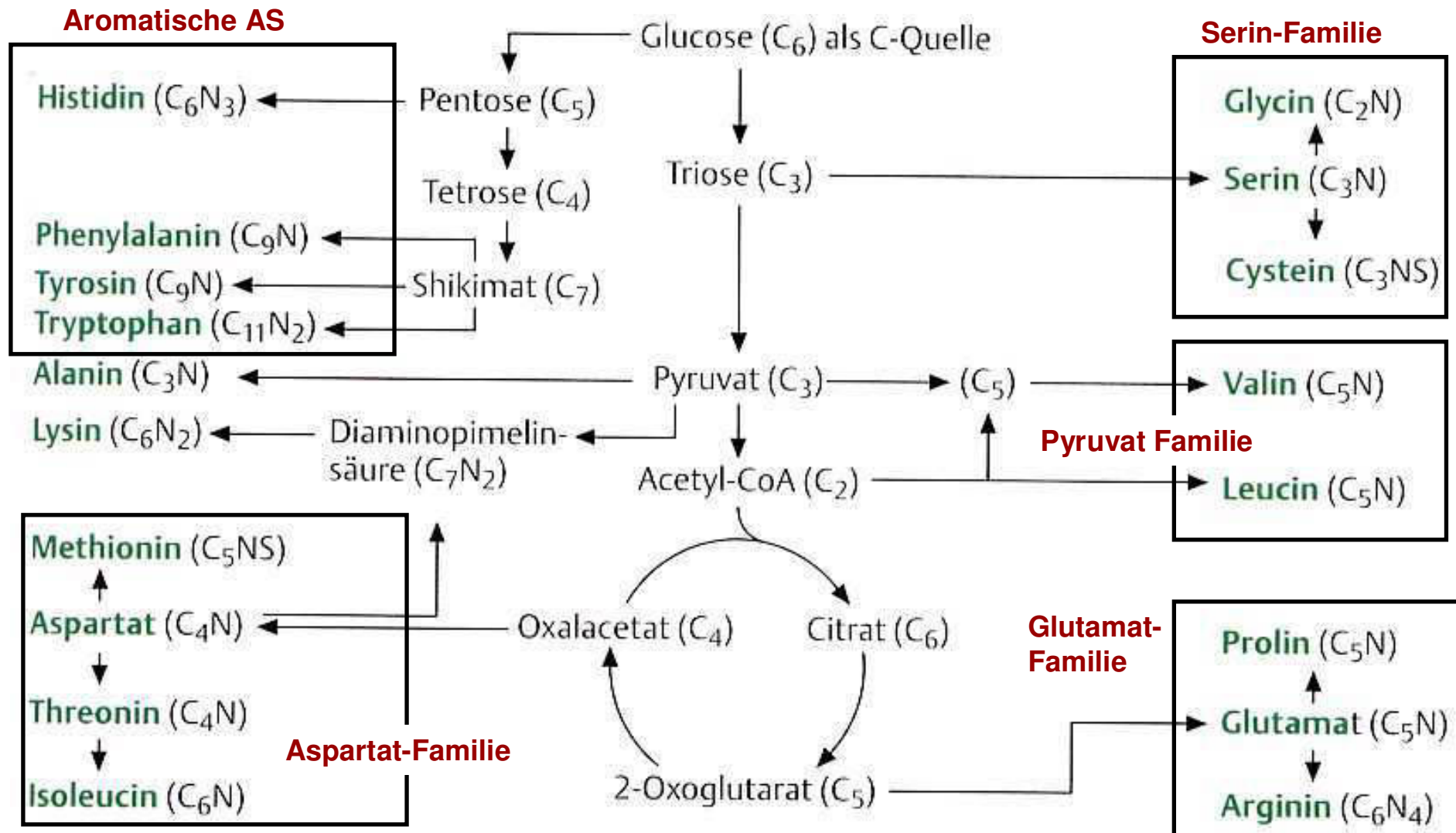
Kristallisation

Chemische Synthese: führt zum Racemat

D,L-Alanin zur Geschmacksabrundung in Fruchtsäften

D,L-Methionin als Futtermittelzusatz

Biosynthese der AS



L-Glutaminsäure

1908 wurde in Japan die geschmacksverstärkende Wirkung von L-Glutaminsäure in den Konbu-Algen entdeckt.

Seit 1909 wurde durch saure Hydrolyse von Weizengluten und Soja Glutaminsäure gewonnen.

Die Firma Kyowa Hakko entdeckte 1957, dass *Corynebacterium glutamicum* beim Wachstum auf Zucker L-Glutaminsäure ausscheidet.

Durch Stammverbesserung und Optimierung der Wachstumseigenschaften erhält man heute Ausbeuten bis zu 150 g/l.

Glu wird von *C. glutamicum* als Folge des Zitronensäurezyklus durch Transaminierung von 2-Oxoglutarinsäure gebildet, die selbst durch Oxidation der Isozitronensäure entsteht. Im Wildstamm ist das Verhältnis zwischen Glu Biosynthese und oxidativem Abbau zu C2-Einheiten im Z-Zyklus streng reguliert.

L-Glutaminsäure

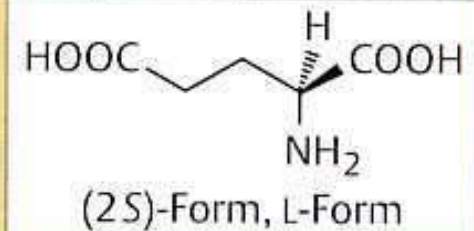
$C_5H_9NO_4$

M_R 147,13

Schmp. 247 – 249 °C (Zers.)

Löslichkeit 600 g/L Wasser (20 °C)

CAS 56-86-0 (L)-Form



Fermentation und Aufarbeitung

Impfkultur, Vorkulturen

zunehmende
Reaktor-
volumen

Hauptfermentation

Bioreaktoren bis zu
500 m³, C-Quelle meist
Melasse oder Stärke-
hydrolysat, N-Quelle
meist NH₃, definierter
Biotin-Gehalt

Zellab- trennung

Filterpresse
oder Ultra-
filtration

Konzen- trierung

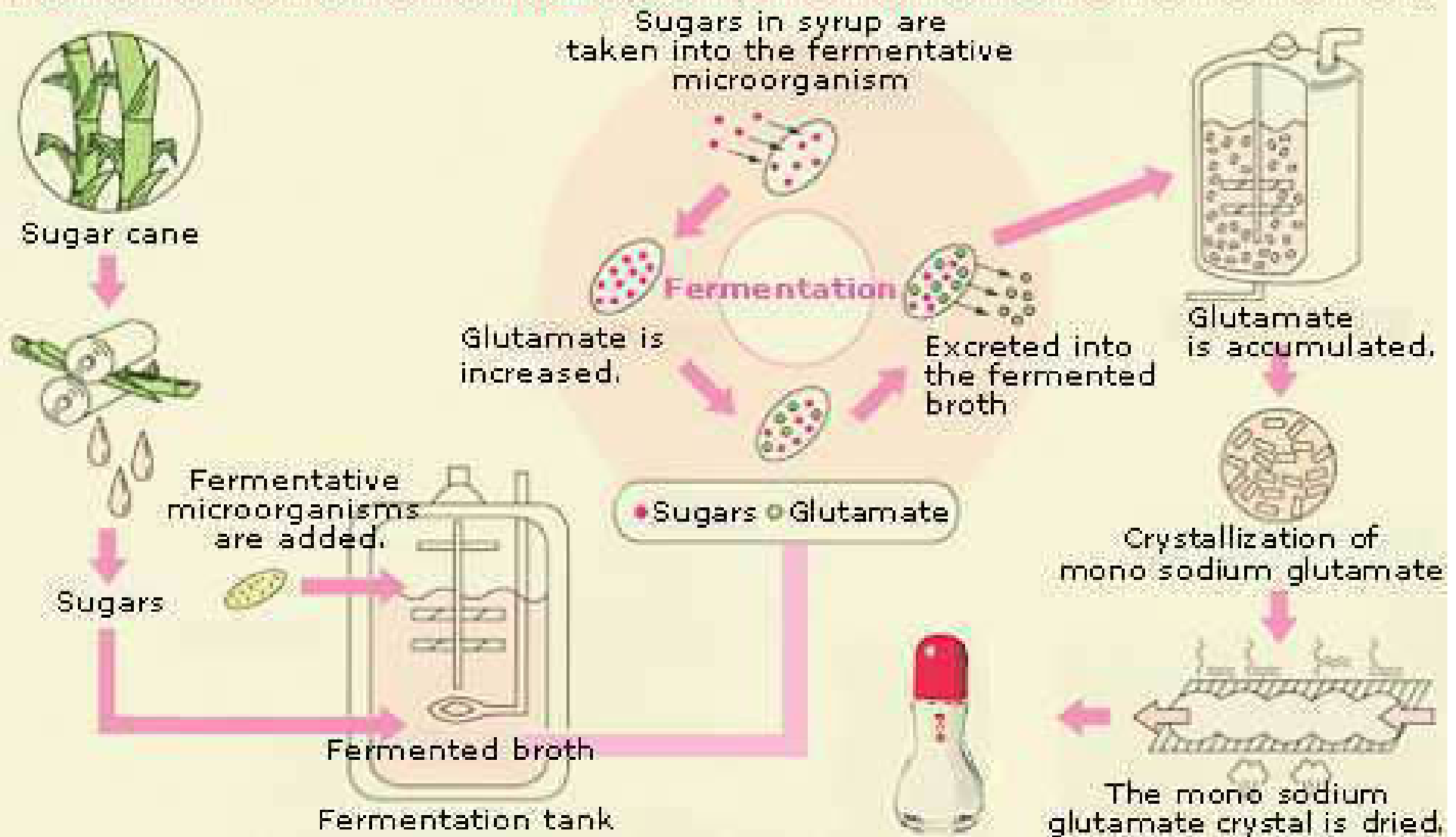
des Filtrats,
meist durch
Ultrafiltra-
tion

Endkon- fektio- nierung

Sprüh-
trocknung
oder Kristal-
lisation

ca.
150 g/L
in
40 – 60 h

Production of mono sodium glutamate by fermentation



L-Glutaminsäure

Als C-Quelle wird vor allem Melasse oder Stärkehydrolysat verwendet, die von den besten Stämmen zu 50-60% zu der C-Quelle zu Glu umgesetzt werden. Als N-Quellen dienen NH_4^+ , NH_3 .

Der Biotingehalt des Mediums ist optimiert, der pH zwischen 7 und 8 gehalten. Die optimale O_2 Versorgung ist kritisch

Die Fermentation findet im 500m³ Maßstab statt.

Um Katabolitrepression zu vermeiden wird nach Bildung der Zellbiomasse (14h) der Glucosegehalt im Medium durch CO_2 Bestimmung in der Abluft auf 0,5% gehalten.

Nach 60 Stunden erfolgt die Glu Isolierung aus dem Nährmedium:
Ultrafiltration,
Ionenaustausch-Chromatographie,
Absorptions-chromatographie

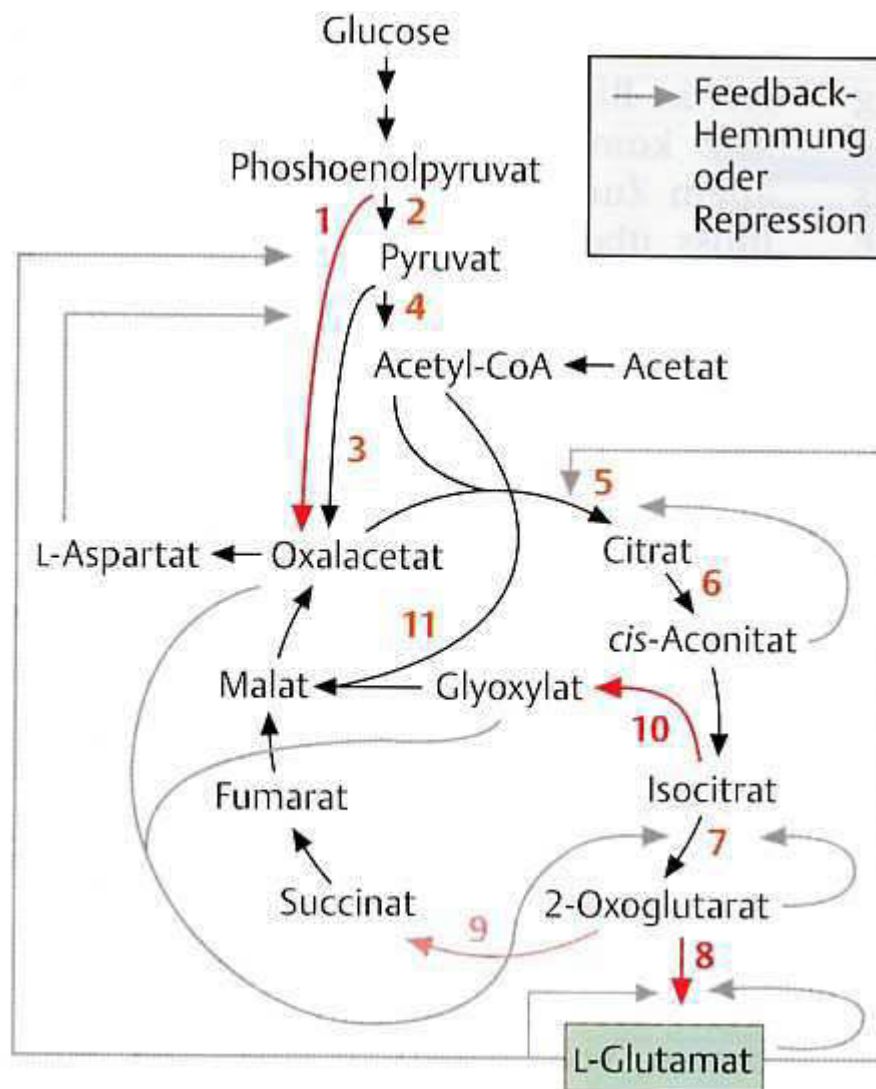
Verwendung: als Geschmacksverstärker in Kombination mit Nukleosiden, Hersteller meist im asiatischen Raum

Die technische verwendeten Mutanten weisen demgegenüber starke Veränderungen auf:



1. Die Sekretion ins Medium ist stark erhöht: die Überproduktion ist über die Ausscheidung geregelt und damit abhängig von der Zellpermeabilität, reduzierte Verfügbarkeit von Biotin, Mangel an Ölsäure bei Ölsäure-auxotrophen Stämmen oder Glycerinmangel bei Glycerin-auxotrophen Stämmen aber auch durch Zusatz von Penicillin.
2. Einige Schlüsselenzyme in der Biosynthese sind dereguliert, die Aktivität der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase im Vergleich zur L-Glutamat-dehydrogenase ist deutlich verringert, dadurch entsteht mehr Glutamat.
3. Einige anapleurotische Stoffwechselwege (Auffüllreaktionen) sind aktiviert: Carboxylierung von PEP mit PEPC, und die Aktivierung des Glyoxylat-Cyclus. Beide Reaktionen führen zur Bildung von Oxalessigsäure, und schleusen damit weitere C2 Einheiten aus der Glykolyse in den TCC. Die PEPC benötigt Biotin, sodass dieser Cofaktor in ausreichender Menge vorhanden sein muss. Zusätzliche Metabolite (wie NH₃, NAD/NADH, Endprodukte) dürfen die Enzyme nicht beeinflussen
4. Durch die Sequenzierung des *C.glutamicum* Genoms untersucht man die Auswirkung von Multi-copy-Genkassetten der Glutamat-Dehydrogenase auf die Produktausbeute

L-Glutaminsäure - Biosynthese



Enzyme

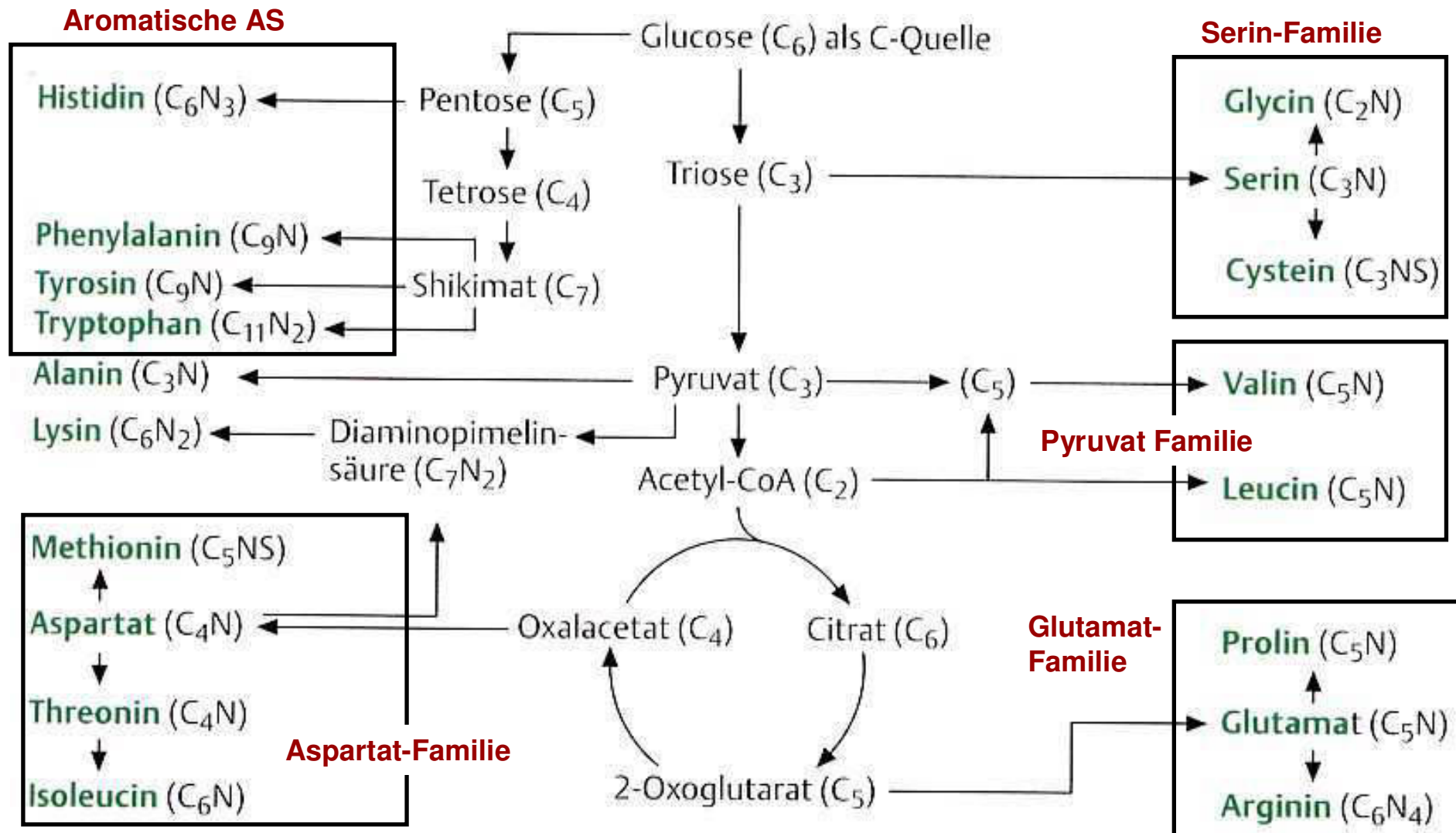
Gen

1 Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC)	<i>ppc</i>
2 Pyruvat-Kinase	<i>pyk</i>
3 Pyruvat-Carboxylase	<i>pyc</i>
4 Pyruvat-Dehydrogenase	<i>pdh</i>
5 Citrat-Synthase	<i>gltA</i>
6 Aconitase	<i>citB</i>
7 Isocitrat-Dehydrogenase	<i>icd</i>
8 L-Glutamat-Dehydrogenase (GDH)	<i>gdh</i>
9 α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (KDH)	<i>aceE</i>
10 Isocitrat-Lyase (ICL)	<i>aceA</i>
11 Malat-Synthetase (MS)	<i>aceB</i>

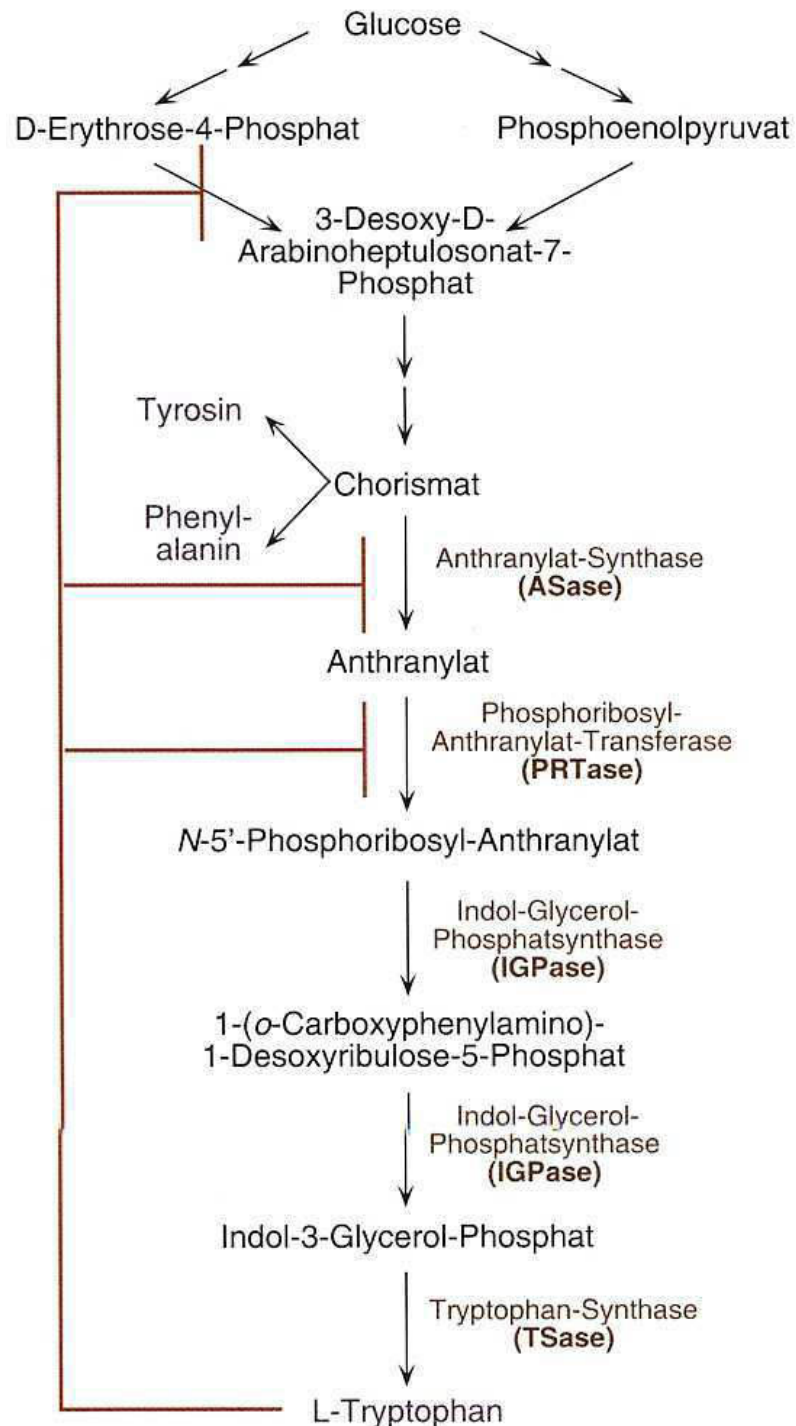
Hochleistungsmutanten:

1. höhere Aktivität von **PEPC**, **GDH**, **ICL** und **MS**
2. verringerte Aktivität oder Block bei **KDH**
3. **PEPC** mit verringerter Feedback-Hemmung durch L-Glutamat

Biosynthese der AS



Tryptophan Produktion in E.coli



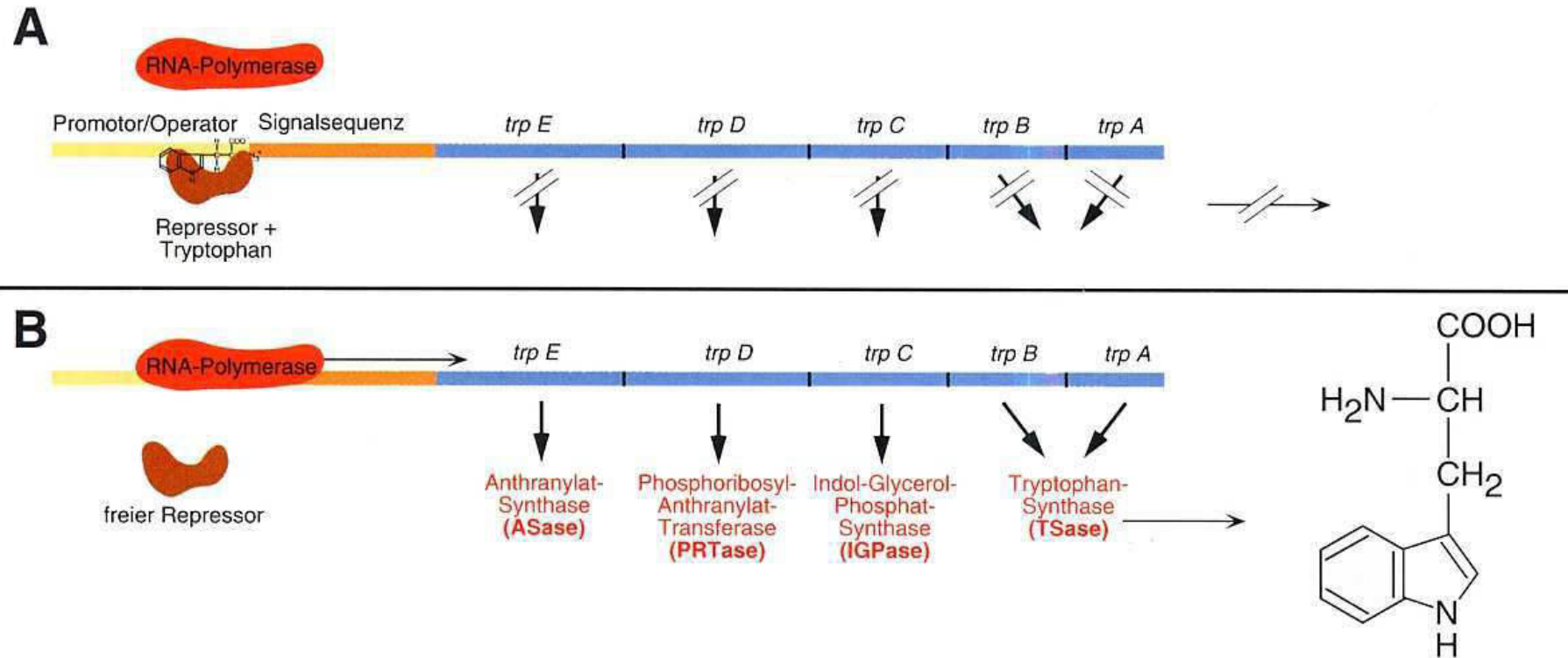
Regulation des Trp Operons durch Rückkopplungsinhibition:

Inhibiert werden die Enzyme

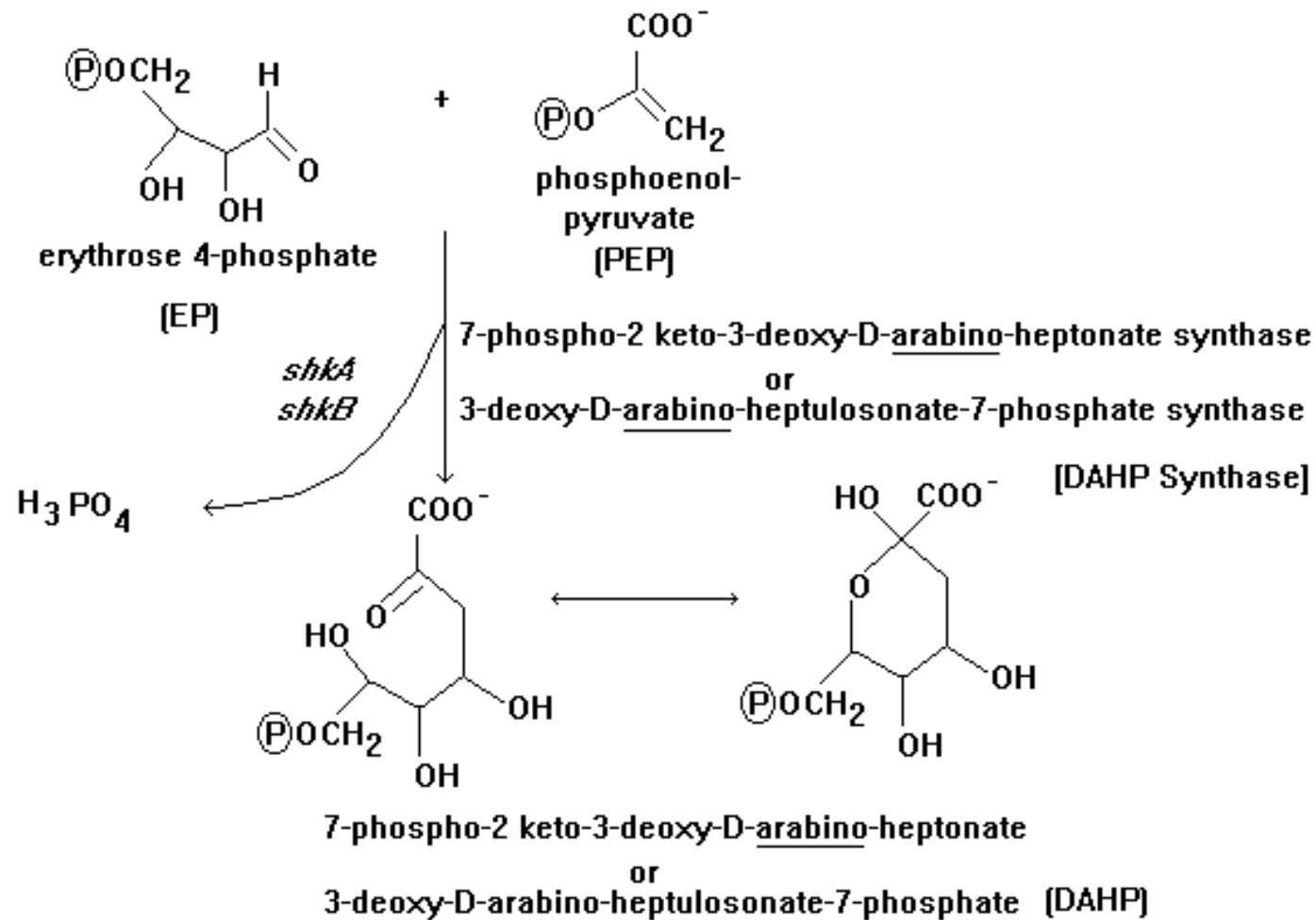
3-Desoxy-D-Arabinohexulose Synthase (DAHP),
Anthranilat-Synthase (ASase) und
Phosphoribosyl-Anthranilat-Transferase (PRTase)

Tryptophan Produktion in E.coli

Regulation des Trp-Operons durch den Repressor



Tryptophan Produktion in E.coli



Tryptophan Produktion in E.coli

Produktionsstamm:

Folgende Genabschnitte wurden durch knock-out inaktiviert:

Das trp-Operon

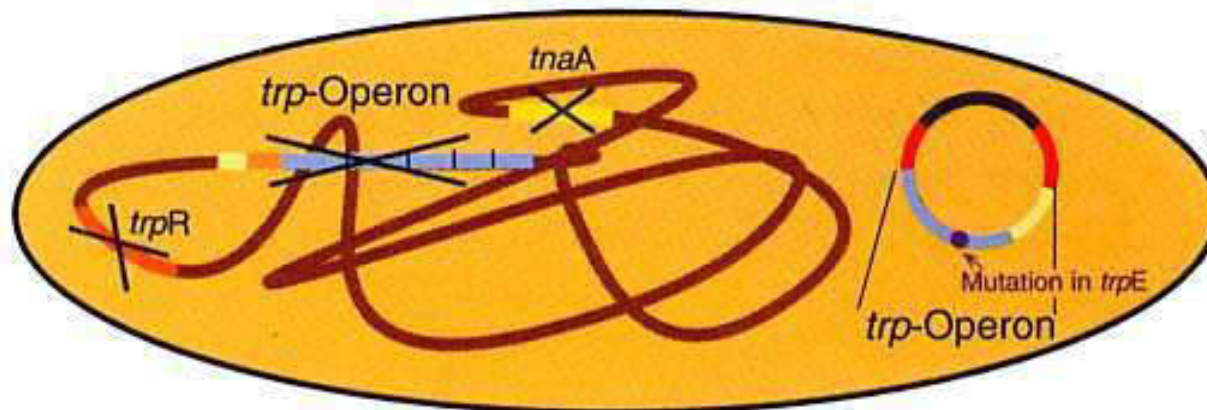
Der trp-Repressor

Die Tryptophanase

Stattdessen wurde ein Plasmid dem trp-Operon in die Bakterien kloniert, das eine Mutation in der Anthranylatsynthase enthält, sodass keine Hemmung durch trp mehr erfolgen kann

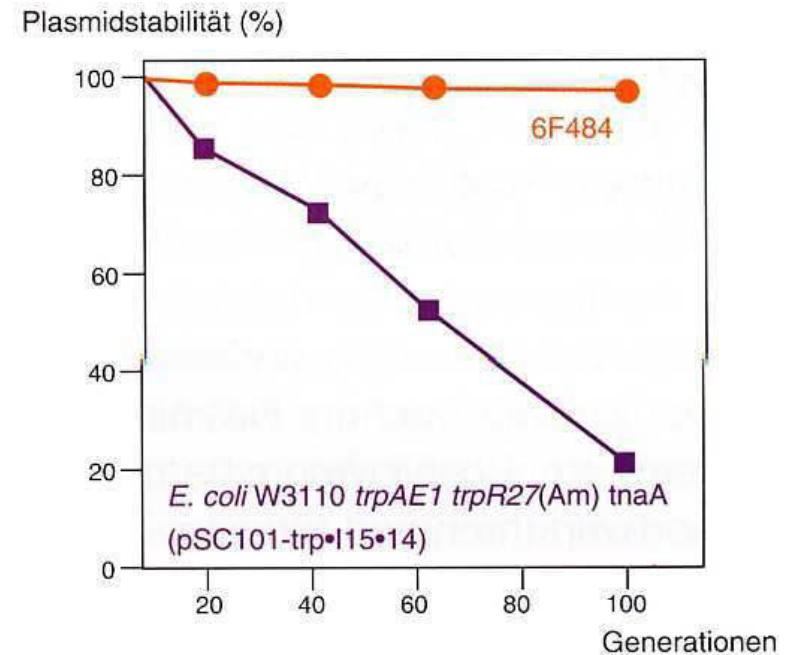
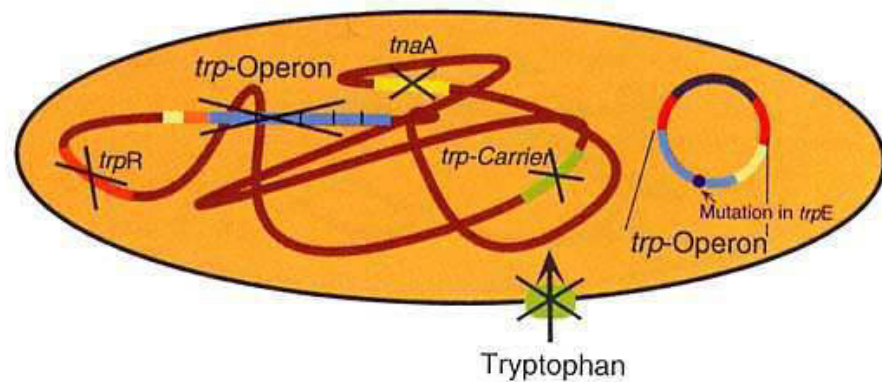
Hochleistungsstamm E.coli W3110 trpAE1 trpR tnaA (pSC101trpI5.14)

Problem: Plasmidinstabilität, daher keine kontinuierliche Produktion möglich



Tryptophan Produktion in E.coli

Zusätzlich wurde auch noch das Gen für den trp Carrier entfernt:
 Behandlung mit Mutagen (N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin),
 Selektion mit 6-Fluorotryptophan (Trp-Analogon),
 wachsende Kolonie haben einen inaktivierten trp-Carrier
 Klon:6F484



Tryptophan Produktion in E.coli

- Produktionsstamm:
 - ◆ Trp-Operon vollständig entfernt (keine Rekombination)
 - ◆ Trp-Repressor und auch Tryptophanase inaktiviert
 - ◆ Trp-carrier zerstört
 - ◆ Plasmid mit Trp-Operon
 - ◆ Gen für Anthranilat-Synthase mutiert, sodass die ASase keine Rückkopplungsreaktion mehr ausführt

- Kultivierungsbedingungen:
 - ◆ Anthranylsäure im Kulturmedium als wichtige Vorstufe
 - ◆ Nichtionische Detergenzien senken die Löslichkeit von Trp in der Kulturbrühe, Trp fällt aus, Trp-Synthase wird nicht mehr gehemmt und Indol akkumuliert nicht mehr

Tryptophan Produktion mittels Biokatalyse

Die Amino GmbH produziert L-Tryptophan aus Indol und Serin mittels Tryptophansynthase.

Durch Immobilisierung der Tryptophansynthase-haltigen *E.coli*-Zellen in Polyvinylalkohol (Lenticats) konnte die Aktivität über einen Zeitraum von 12 Tagen um 200 % gesteigert

