



Abschlussbericht

zum Teilverbund 2

Einsatz von genetisch veränderten Hefen für die Entwicklung eines biotechnologischen Verfahrens zur Herstellung von Itaconsäure aus nachwachsenden Rohstoffen. (Leiter Prof. Dr. Barth)

Teilvorhaben 1: Screening, Mutantenselektion, Gentechnik und Stabilitätskontrolle (FKZ: 22004203)

Teilvorhaben 2: Prozessanalytik; -optimierung und Scale-up (FKZ: 22007604)

des Verbundprojekts:

Mikrobielle Produktion von Itaconsäure (Leiter Dr. Willke)

Zuwendungsempfänger:

Förderkennzeichen: 22004203

Prof. Dr. Gerold Barth
Technische Universität Dresden
Institut für Mikrobiologie
01062 Dresden

Förderkennzeichen: 22007604

Dr. Andreas Aurich
Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung Leipzig
Umwelt- und Biotechnologisches Zentrum
Permoserstraße 15
04318 Leipzig

Laufzeit des Vorhabens: 01.10.2004 – 30.09.2007

Berichtszeitraum: 01.10.2004 – 31.12.2007

Bearbeiter: Teilvorhaben 1: Dipl. Biol. Christian Bodinus
Prof. Dr. Gerold Barth (Leiter des Teilverbundes 2)
Teilvorhaben 2: Dipl. Ing. Robert Specht
Dr. Andreas Aurich

Dresden, 16.01.2008

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitende Kurzdarstellung	4
1. Aufgabenstellung	4
1.1. Teilvorhaben 1: Screening, Mutantenselektion, Gentechnik und Stabilitätskontrolle	4
1.2. Teilvorhaben 2: Prozessanalytik; -optimierung und Scale-up.....	6
2. Voraussetzung des Vorhabens	8
3. Planung und Ablauf des Vorhabens	9
4. Wissenschaftlich-technischer Stand	9
5. Zusammenarbeit mit den Kooperationspartnern	11
II. Detaillierte Darstellung	12
1. Wissenschaftliche Ergebnisse	12
1.1. Teilvorhaben 1: Screening, Mutantenselektion, Gentechnik und Stabilitätskontrolle (TU Dresden, Institut für Mikrobiologie)	12
1.1.1. Etablierung von Methoden zum Screening nach itaconsäureüberproduzierenden Hefestämmen	12
1.1.2. Optimierung der IA-Produktion im Schüttelkolben	14
1.1.3. Mutantenselektion.....	26
1.1.4. Gentechnische Bearbeitung der Hefe <i>P. tsukubaensis</i>	29
1.2. Teilvorhaben 2: Prozessanalytik, optimierung und Scale up (Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ Leipzig).....	33
1.2.1. Aufbau und Anpassung der Prozessanalytik	33
1.2.2. Stammscreening	37
1.2.3. Substratscreening, Entwicklung und Optimierung der Kultivierungsmedien	41
1.2.4. Optimierung der verfahrenstechnischen Parameter im Laborreaktormaßstab.....	50
1.2.5. Maßstabsübertragung des Bioprozesses	54
2. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit	57
3. Entwicklungen auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen	57
4. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen	57
5. Abbildungen und Tabellen	58
5.1. Abbildungen.....	58
5.2. Tabellen	59

6. Literatur	60
7. Erläuterung von Abkürzungen und Symbolen	63
Anhang.....	64

I. Einleitende Kurzdarstellung

1. Aufgabenstellung

Der Teilverbund 2 „Einsatz von genetisch veränderten Hefen für die Entwicklung eines biotechnologischen Verfahrens zur Herstellung von Itaconsäure aus nachwachsenden Rohstoffen“ im Verbundvorhaben „Mikrobielle Produktion von Itaconsäure“ ist ein Verbundprojekt zwischen dem Institut für Mikrobiologie an der Technischen Universität Dresden und dem Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ Leipzig (ehemals UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH) unter Koordination von Prof. Dr. G. Barth (TU Dresden).

Hauptziel des Teilverbundes 2 war die Entwicklung neuer Leistungsstämme nichtkonventioneller Hefen zur Produktion von Itaconsäure sowie die Entwicklung und Optimierung des für die Produktion notwendigen Bioprozesses mit den gewonnenen Stämmen. Einerseits sollte durch die Nutzung molekularbiologischer und gentechnischer Methoden, andererseits durch Medienoptimierung (Substratscreening, Limitationsbedingungen) die Produktion von Itaconsäure in den Hefen erhöht werden.

Im Rahmen des Projektes wurden entsprechend dem Arbeitsplan deshalb die folgenden **zwei Teilvorhaben** bearbeitet:

**1. Screening, Mutantenselektion, Gentechnik und Stabilitätskontrolle
(TU Dresden, Institut für Mikrobiologie)**

**2. Prozessanalytik; –optimierung und Scale-up
(Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ Leipzig)**

Zur Kontrolle und Evaluierung des Fortschrittes der Projektbearbeitung waren die aufgeführten Meilensteine im Vorhaben vorgesehen.

1.1. Teilvorhaben 1: Screening, Mutantenselektion, Gentechnik und Stabilitätskontrolle

1. Entwicklung eines Screeningsystems für Itaconsäure produzierende Mikroorganismen

Entwicklung eines Screeningsystems für die Selektion Itaconsäure produzierender Hefestämme auf Grundlage der isocitratlyaseinhibierenden Wirkung der Itaconsäure.

Meilenstein 31.01.2005

Auf der Grundlage der Isocitratlyase inhibierenden Wirkung der Itaconsäure wurden zwei Stämme von *E. coli* isoliert, die in Anwesenheit von Itaconsäure nicht mehr auf Acetat wachsen können. Davon ist ein Stamm auch in der Verwertung von Glucose blockiert und ist somit auf Acetat als Energie- und Kohlenstoffquelle bei gleichzeitiger Anwesenheit beider C-Quellen angewiesen. Mit diesen beiden Stämmen wurde ein Screeningverfahren zur Isolierung von Itaconsäure produzierenden Hefestämmen etabliert.

Darüberhinaus wurde im Berichtszeitraum auf Grundlage der Arbeiten von Yahiro et. al, 1995 ein Screeningsystem entwickelt, das die Selektion von Mutanten mit erhöhter IA Produktion mittels einer IA Konzentrationsgradientplattenmethode vorsieht. Ein drittes Platten-Screeningsystem auf Grundlage des Zerfalls von Calciumcarbonat nach Säureproduktion konnte ebenfalls etabliert und erfolgreich angewendet werden.

2. Selektion von Mutanten mit veränderter Itaconsäurebildung

Anwendung des Screeningsystemes auf Hefen nach erfolgter Mutagenese zur Selektion von Mutanten mit erhöhter IA Produktion.

Meilenstein 30.09.2005

Mit dem Screening nach *Yarrowia lipolytica* Stämmen aus der Stammsammlung des Helmholtz-Zentrums für Umweltforschung – UFZ standen im ersten Berichtsjahr Mutanten zur Verfügung, die im Vergleich zum Wildtyp Itaconsäure produzieren können. Der Stamm *Y. lipolytica* H435 produziert im Medium nach Tabuchi bis zu 220 mg/l Itaconsäure. Mit der durch den Projektpartner des Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ identifizierten Hefe *Pseudozyma tsukubaensis* wurden in Schüttelkolbenversuchen mit modifiziertem und optimierten Medium nach Kawamura bis zu 6,1 g/l IA produziert. Die durch UV-Mutagenese gewonnene Mutante *P. tsukubaensis* M15 produzierte im Schüttelkolben 14,4 g/l IA.

3. Gezielte gentechnische Beeinflussung der Itaconsäurebiosynthese

Änderung des „Metabolic Flux“ durch erhöhte Expression des Genes der *cis*-Aconitsäure Decarboxylase. Dazu Gewinnung der Gensequenz des Enzyms und Klonierung in ein multi-copy Plasmid unter Kontrolle eines starken Promotors.

Meilenstein 30.07.2007

Die Suche nach einem *cis*-Aconitsäure Decarboxylase kodierenden Gen erwies sich als schwierig. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Bioinformatik (Prof. Schröder, Biotech Dresden) wurden auch unter Einbeziehung der Datenbank annotierter Gene aus *Aspergillus terreus* und *Ustilago maydis* eine Reihe von Analysen durchgeführt, wobei kein mit Sicherheit bestimmtes Gen, kodierend für eine *cis*-Aconitsäure Decarboxylase gefunden werden konnte. In Kooperation mit dem Verbundpartner AG Lang, TU Braunschweig konnte erfolgreich über eine von der Literatur abweichende Methodik die Enzymaktivität der *cis*-Aconitsäure Decarboxylase etabliert werden. Eine Reinigung des Enzyms konnte aufgrund der Instabilität des Enzyms nicht durchgeführt werden.

Gleichzeitig wurde die genetische Bearbeitbarkeit der Hefe *P. tsukubaensis* nachgewiesen sowie Vektorsysteme für die Übertragung und Expression heterologer Gene entwickelt. Damit wurden die Grundlagen für weitere gentechnische Arbeiten gelegt.

4. Testung der Itaconsäureproduktion im Schüttelkolbenmaßstab

Testung der in den Schritten 2 und 3 hergestellten bzw. gescreenten Transformanten auf ihre Itaconsäurebildungsfähigkeit.

Meilenstein 15.12.2006

Im Initialscreeningmedium nach Kawamura konnte mit der Hefe *P. tsukubaensis* eine mit 0,84 g/l erhöhte IA Produktion im Vergleich zu dem Stamm *Y. lipolytica* H435 (0,22 g/l IA) gemessen werden. Durch Optimierungen des Mediums (Phosphat- und Nitratkonzentration, Glucosekonzentration) und der Kultivierungsbedingungen (pH-Wert, Temperatur, Vorkultur) konnte mit *P. tsukubaensis* im Schüttelkolbenmaßstab die Produktendkonzentration auf 6,1 g/l IA gesteigert werden.

5. Genetische Modifizierung von Ita⁺-Stämmen für die Verwertung von Saccharose

Mit dem integrativen Plasmid pINA302, welches das *Saccharomyces cerevisiae* SUC2 Gen unter der Kontrolle des Promotors pXPR2, flankiert von Teilen des *URA3* Gens enthält, stand ein geeigneter Vektor für die Herstellung saccharoseverwertender Stämme von *Y. lipolytica* zur Verfügung.

Meilenstein 31.04.2007

Mit der erfolgreichen Transformation des für die IA Produktion in den ersten beiden Berichtsjahren ausgewählten Stammes *Y. lipolytica* Stammes H435 und der Insertion der Expressionskassette für ScSUC2 aus dem integrativen Vektor pINA302 in das *URA3*

Gen des Stammes steht ein *Y. lipolytica* Stamm mit größerem Substratspektrum zur Verfügung. Die Selektion erfolgte von Uracil-bedürftigen Transformanden, die gleichzeitig zur Saccharoseverwertung (Phänotyp Suc⁺ Ura⁻, Genotyp *ura3-302* [*ScSUC2*]) befähigt sind.

Ein Vorteil von *P. tsukubaensis* H488 besteht darin, dass er Saccharose als Kohlenstoffquelle von Natur aus verwertet.

6. Kontrolle der genetischen Stabilität

Kontrolle der genetischen Stabilität von zur Produktbildung ausgewählter Stämme mit Hilfe von PCR Analyse und Southern Hybridisierung.

Meilenstein 30.09.2007

Die Integration der *SUC2*-Kassette in das Genom von *Y. lipolytica* H435 konnte erfolgreich mit Hilfe der Southern Blot Hybridisierung nachgewiesen werden.

Der für die Produktion von IA ausgewählte Stamm *P. tsukubaensis* H488 konnte erfolgreich mit dem heterologen Protein sGFP transformiert werden und die erfolgte heterologe Integration ins Genom mittels PCR und Southern Blot nachgewiesen werden. Damit wurden Voraussetzungen geschaffen, um die IA Biosynthese durch Integration und Überexpression von (heterologen) Genen, deren kodierte Enzyme im IA Stoffwechsel von Bedeutung sind, gezielt gentechnisch zu bearbeiten.

Die Meilensteine im Teilvorhaben 1 konnten unter Berücksichtigung des Einsatzes eines neuen Produktionsstammes (*Pseudozyma tsukubaensis* H488) alle weitestgehend erreicht werden.

1.2. Teilvorhaben 2: Prozessanalytik; -optimierung und Scale-up

1. Aufbau und Anpassung der Prozessanalytik

Aufbau und Optimierung eines ionenchromatographischen Verfahrens zur Produktanalytik als Kernstück der Prozessanalytik

Meilenstein 01.02.2005

Mit Hilfe der Ionenchromatographie wurde eine Trennmethode zur sicheren quantitativen Detektion von Itaconsäure in einem Gemisch von organischen und anorganischen Anionen entwickelt. Ebenfalls wurde ein HPLC-Trennverfahren adaptiert, welches die simultane Erfassung von möglichen nichtionischen Nebenprodukten (z.B. Polyole) erlaubt. Im späteren Verlauf des Projektes wurde zusätzlich eine Kationenchromatographiemethode in die Analytik eingebunden.

2. Substratscreening, Entwicklung und Optimierung der Kultivierungsmedien

Auswahl preiswerter Substrate aus nachwachsenden Rohstoffen und Festlegen der Limitationsbedingungen für die biotechnologische Produktion von Itaconsäure.

Meilenstein 30.09.2005

Die Befähigung von Hefen zur Itaconsäurebildung konnte mit in der Literatur der 80er und 90er Jahre ausgewiesenen Stämmen der Hefearten (*Candida*) *Pseudozyma fusiformata*, *Pichia stipitis* und *Candida boidinii* nicht bestätigt werden. Der Fortschritt in der Säureanalytik (IC-MS-Kopplung) zeigte vielmehr, dass diese Stämme im beschriebenen Medium ausschließlich Malat anstatt von Itaconsäure akkumulieren. Es konnten jedoch mit *Yarrowia lipolytica* H420, H427, H430, H432 H433, H435 und H436 in einem Screeningprozess mehrere Hefestämme selektiert werden, welche Itaconsäure in Konzentrationen von 100 – 220 mg/l unter phosphatlimitierenden Bedingungen akkumulieren.

Im weiteren Verlauf der Screeningversuche konnte ausgehend von einer Studie, welche im Rahmen eines BMBF-Vorhabens am IBT Leipzig (Stottmeister und Weißbrodt 1991) durchgeführt wurde und den Arbeiten von Kawamura (1981, 82, 83) der Stamm *P. tsukubaensis* H488 (CBS 422.96) gefunden werden, welcher in ersten Schüttelkolbenversuchen 160 mg/l Itaconsäure sekretierte. Für diesen Stamm konnten schon einige Medienbedingungen näher untersucht und optimiert werden.

3. Untersuchungen der Einflussfaktoren auf die Itaconsäureproduktion, Bioprozessentwicklung und –optimierung

Nach Auswahl geeigneter Substrate und Festlegung der Kultivierungsmedien erfolgt mit leistungsfähigen Ita⁺-Transformanten die Entwicklung des eigentlichen Bioverfahrensprozesses

Meilenstein 01.07.2006

Unter Berücksichtigung des Einsatzes des neuen Produktionsstammes *P. tsukubaensis* H488 und den damit verbundenen Verschiebungen im Zeitplan konnte bis zum Ende der Projektlaufzeit ein Bioprozess entwickelt werden, welcher die biotechnologische Produktion von Itaconsäure ermöglicht. Dabei wurden Konzentrationen von 66 g/l bei einer Produktivität von 0,34 g/l*h erreicht. Insbesondere wurde dabei der Einfluss der Gelöstsauerstoffkonzentration auf die Produktbildung untersucht. Die aus den Ergebnissen gewonnenen Erkenntnisse resultierten in einem Patent.

4. Maßstabsübertragung des optimierten Bioprozesses

Auf Grundlage des im Labormaßstab optimierten Verfahrens wird unter Verwendung des leistungsfähigsten Stammes eine Maßstabsübertragung der Itaconsäureproduktion mit einem ausgewählten Substrat in den halbtechnischen Maßstab durchgeführt.

Meilenstein 30.11.07

Die Übertragung des Bioprozesses aus dem Laborreaktormaßstab von 2 l in den Produktionsbioreaktor des Industriepartners (50 l) konnte zum größten Teil realisiert werden, wenn auch durch den Einsatz eines anderen Reaktortyps die verfahrenstechnischen Parameter noch nicht optimiert werden konnten.

2. Voraussetzung des Vorhabens

Das Teilvorhaben 1 zum Thema „*Screening, Mutantenselektion, Gentechnik, Stabilitätskontrolle*“ war Bestandteil des Teilverbundes 2 „*Einsatz von genetisch veränderten Hefen für die Entwicklung eines biotechnologischen Verfahrens zur Herstellung von Itaconsäure aus nachwachsenden Rohstoffen*“ (Projektleiter Prof. G. Barth, Institut für Mikrobiologie der TU Dresden) des Projektverbundes „*Mikrobielle Produktion von Itaconsäure*“, welcher aus insgesamt zwei Teilverbunden mit je zwei Teilvorhaben bestand.

Während das Teilvorhaben 2 des Teilverbundes 2 (Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ Leipzig, Projektleiter Dr. A. Aurich) die Prozessentwicklung und –optimierung für die biotechnologische Gewinnung von Itaconsäure beinhaltete, stand im Teilvorhaben 1 die gentechnische Optimierung und Modifizierung von Itaconsäure produzierenden Hefen im Vordergrund.

In der Arbeitsgruppe von Prof. G. Barth am Institut für Mikrobiologie (Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften) der TU Dresden liegen umfangreiche Erfahrungen zur Nutzung genetischer und gentechnischer Methoden für die Untersuchung und Modifizierung industriell relevanter Hefearten, insbesondere der Hefe *Y. lipolytica*, vor. Die Forschungstätigkeit des Arbeitskreises konzentrierte sich insbesondere auf die Genetik und Molekularbiologie der nichtkonventionellen, alkan- und fettverwertenden Hefe *Y. lipolytica* (Übersichten in Barth und Gaillardin 1996, 1997, Barth et al. 2003, Fickers et al. 2005) und deren Nutzbarkeit für biotechnologische Anwendungen, einschließlich der Produktion von organischen Säuren (Stottmeister et al. 1982, Barth und Krebs 1984, Barth et al. 1988, Weißbrodt et al. 1989, Barth und Gaillardin 1997, Mauersberger et al. 2002, 2003, Aurich et al. 2003, 2005, 2006; Förster et al. 2007a, 2007b) und von homologen und heterologen Proteinen für die Stoffwandlung (Juretzek et al. 1997, 1998, 1999, 2000a,b, 2001). Diese Arbeitsrichtungen sind auch durch die aufgeführten Patente zur biotechnologischen Gewinnung von CA, ICA und 2-KGA sowie zur Steroidwandlung mit rekombinanten Hefen belegt.

Die gerätetechnische Ausstattung des 1994 neu gegründeten Instituts für Mikrobiologie der TU Dresden befindet sich auf modernstem Niveau. Das Institut für Mikrobiologie verfügt über alle notwendigen Labors, Geräte und modernen Techniken für molekularbiologisches und genetisches Arbeiten. Bereits seit vielen Jahren bestehen zwischen der Arbeitsgruppe von Prof. Barth und dem Arbeitskreis von Dr. A. Aurich (ehm. Prof. Stottmeister) vom Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung Leipzig – UFZ Kooperationen auf dem Gebiet der Produktion organischer Säuren. Auf diese Erfahrungen konnte im Projekt zurückgegriffen werden.

Das Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ ist eine Forschungseinrichtung der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft Deutscher Forschungszentren (HGF) mit den Standorten Leipzig, Halle und Magdeburg. Es liegen am UFZ umfangreiche methodische und praktische Erfahrungen auf den Gebieten der Analytik, Biochemie, Mikrobiologie, Biotechnologie und Verfahrenstechnik vor. Am Umwelt- und Biotechnologischen Zentrum (UBZ) des UFZ unter der Leitung von Dr. R.A. Müller ist die erforderliche Infrastruktur zur Durchführung des Vorhabens (Labors, Bioreaktoren usw.) konzentriert. Diese Ausrüstung entspricht dem neuesten technischen Stand (Labors und Technikum bis 400 I – S1 Status).

Die Kompetenzen zur Bearbeitung des Projektes besitzt das UFZ nicht zuletzt durch die früheren Arbeiten der Antragssteller. Die Synthese von Citronensäure durch nichtkonventionelle Hefen unter Einsatz verschiedener Rohstoffe (z.B. Pflanzenöle, Biodiesel, Saccharose) führte zur Ausarbeitung von Techniken mit den bisher höchsten erzielten Produktkonzentrationen auf der Basis nachwachsender Rohstoffe (Aurich et al. 2002, 2003, 2006a, Förster et al. 2007a, Kamzolova et al. 2005; Moeller et al. 2007). Die Konzeption der Green Chemistry – Verknüpfung biotechnologischer und chemischer Syntheseschritte – wurde gemeinsam mit der Universität Leipzig für die umweltfreundliche Gewinnung von 2-Oxoglucon-, 2-Oxogalacton- und 2-Oxoglutar-säure verwirklicht (Stottmeister et al. 2005, Aurich et al. 2006b). Ein Arbeitsschwerpunkt war dabei

die biotechnologische Produktion von 2-Oxoglutarinsäure durch *Y. lipolytica* aus Pflanzenölen. Die Parameter der Kultivierung wurden so optimiert, dass die nach dem heutigen Kenntnisstand die höchsten Ausbeuten und Produktivitäten für nachwachsende Rohstoffe erreicht wurden (Specht 2004, Aurich et al. 2006b).

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Teilvorhaben 1 dieses Teilverbundes 2 wurde in enger Verzahnung mit dem Leiter des Teilvorhabens 2 (Dr. Aurich, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ Leipzig) geplant und umgesetzt. Es erfolgte eine kontinuierliche Zusammenarbeit mit Dr. Aurich und Mitarbeitern aus dem Teilvorhaben 2, wobei die bereits gut entwickelte Zusammenarbeit und die Erfahrungen aus vorherigen Projekten für die Kooperation besonders förderlich waren.

Nach der Bewilligung des Projektes wurden die praktischen Arbeiten zum 01.10.2004 aufgenommen. Insgesamt kam es damit zu einer kostenneutralen Verschiebung der Bearbeitungszeit bis zum 31.12.2007 (s. Änderungsbescheid vom 03.03.2007). Entsprechend den Zielstellungen wurden die oben angegebenen wesentlichen Arbeitspakete (vgl. 1) bearbeitet und die für die Kontrolle des Fortschritts der Bearbeitung des Projektes vorgesehenen Meilensteine weitestgehend erreicht.

Für die Ablaufplanung konnte eine parallele Bearbeitung von Aufgabenkomplexen wie Aufbau des Prozessanalytik, Stammauswahl, Optimierung der Kulturbedingungen, gentechnische Veränderung von Stämmen sowie Testung der neuen Stämme in der Itaconsäureproduktion gewährleistet werden.

Für die ab dem zweiten Projektjahr, beginnend mit dem 01.10.2005, erforderliche Einbindung eines Industriepartners in das Vorhaben konnte die Firma BEC Biotechnic GmbH in Halle/Saale gewonnen werden. Die Firma, welche auf dem Gebiet der Lebensmittel- und Biotechnologie tätig ist, übernahm entsprechend der Arbeitspläne des Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ Leipzig und der TU Dresden insbesondere Leistungen auf den Gebieten der Entwicklung von Prozessführungsstrategien sowie des Scale-up.

4. Wissenschaftlich-technischer Stand

Itaconsäure wurde bereits von Baup (1837) als Thermolyseprodukt der Citronensäure entdeckt und konnte wenige Jahre später von Crasso auch aus Aconitsäure hergestellt werden (Luskin 1974).

Itaconsäure kann sowohl chemisch als auch mikrobiell hergestellt werden. Die mikrobiologische Bildung von Itaconsäure erfolgt über den Tricarbonsäurezyklus: als Zwischenprodukt der durch die Aconitase katalysierten Reaktion von Citronensäure zu Isocitronensäure entsteht *cis*-Aconitsäure, welches durch das Enzym *cis*-Aconitsäuredecarboxylase unter Abspaltung von CO₂ in Itaconsäure metabolisiert wird. Dieser Syntheseweg mit den darin involvierten Enzymen konnte für die mikrobielle Produktion von Itaconsäure durch Stämme der Arten *Aspergillus terreus* und *Aspergillus itaconicus* nachgewiesen werden (Bentley and Thiessen 1957; Winskill 1983; Jaklitsch et al. 1991; Bonnarme et al. 1995; Dwiarti et al. 2002)

Es gibt inzwischen mehrere Methoden zur chemischen Synthese von Itaconsäure, z. B. durch Thermolyse von Citronensäure (Blatt 1943), Carbonylierung von Propargylchlorid (Chiusoli 1962), Oxidation von Isopren (Pichler 1967), Oxidation von Mesityloxid und anschließender Isomerisierung (Berg und Hetzel 1978) oder durch eine chemische Synthese aus Citronensäure in überkritischem Wasser bei 345 bar und Temperaturen über 250°C (Carlsson et al. 1994). Keine dieser Methoden stellt aber aufgrund zu hoher Produktionskosten (geringe Umsatzraten, quantitative Reinigung der Itaconsäure aus Gemischen ähnlicher Reaktionsprodukte schwierig und kostenaufwendig) eine Konkurrenz zur biotechnologischen Produktion dar und daher konnten sich

chemische Synthesen wirtschaftlich nicht durchsetzen. Die Gewinnung von Itaconsäure erfolgt daher ausschließlich mikrobiell durch aerobe, submerse Kultivierung der filamentösen Pilzarten *Aspergillus terreus* und *Aspergillus itaconicus* auf kohlenhydrathaltigen Medien (Glucose, Saccharose, Stärke, Molasse oder Hydrolysate von Polysacchariden).

Gegenwärtig werden mit verschiedenen Stämmen von *A. terreus* bzw. *A. itaconicus* unter phosphatlimitierenden Bedingungen Produktendkonzentrationen von bis zu 80 g/l Itaconsäure erreicht bei Produktausgangskonzentrationen von 100 g/l – 150 g/l Kohlenhydrat. Geringe Ausbeuten von 40% – 60% sowie niedrige Produktivitäten von maximal 1 g/l*h beschränken die biotechnologisch kostengünstige Herstellung von Itaconsäure.

Nachteilig auf das mikrobiologische Produktionsverfahren und damit auf die Produktionskosten wirken sich weiterhin generelle Probleme bei der Kultivierung filamentöser Pilze aus, die beim Einsatz von Hefen und hefeähnlicher Pilze nicht auftreten: Anzüchten und Ernten von Sporen, Anfälligkeit gegenüber Sauerstoffunterversorgung, hohen Scherkräften und Schwermetallen sowie aufwendige Produktaufarbeitung.

Eine kontinuierliche Prozessführung zur Optimierung der biotechnologischen Anwendung und einer wesentlichen Verbesserung der Produktionsrate konnte nicht erreicht werden. Kobayashi *et al.* (1962) konnten eine Produktionsrate von 1,5 g/l*h durch die Rückführung des Mycels in eine Batchkultur erreichen. In einem Zyklus Verstopfte Filter erlaubten keine Fortführung über einen Zyklus hinaus. Schüttelkolbenversuche, mit denen eine Repeated-Batch Kultivierung über neun Zyklen (45 Tage) gelang, konnten aufgrund zu großer Mycelbildung und geringer Fluidität im Reaktor nicht wiederholt werden, zudem wurde nur eine geringe Produktionsrate von 0,47 g/l* h erreicht (Park *et al.* 1993). Eine Immobilisierung der *Aspergillus*-Biomasse führte zur Steigerung der spezifischen Produktivität, allerdings konnten nur Endkonzentrationen von 21 g/l Itaconsäure erreicht werden (Horitsu *et al.* 1983; Horitsu and Kawai, 1984). Weiterhin erschwert der Mangel an Sauerstoff die Produktion von Itaconsäure durch immobilisierte Zellen, z.B. in einem Polyacrylamidgel (Kautola *et al.* 1985).

Trotz der Jahrzehnte andauernden Untersuchungen zur Optimierung der Fermentationsbedingungen, Variation der Substrate, Immobilisierung der Biomasse und der Produktaufreinigung konnte für das Itaconsäure Produktionsverfahren mit *Aspergillus sp.* keine wesentlich verbesserte Steigerung in den Raum-Zeit-Ausbeuten erreicht werden, die eine deutliche Kostensenkung für das Endprodukt zur Folge gehabt hätte.

Somit war es naheliegend zu prüfen, ob wirtschaftlichere Verfahren durch den Einsatz anderer Mikroorganismen, wie z. B. Hefen, verbunden mit der Erschließung neuer nachwachsender Rohstoffe als Substrate (z.B. Glycerin) entwickelt werden können.

Neben Stämmen der Gattung *Aspergillus* konnte die Produktion von Itaconsäure auch durch Hefen nachgewiesen werden. Speziell in den 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurden von verschiedenen japanischen Arbeitsgruppen Untersuchungen dahingehend durchgeführt (Tabuchi and Nakahara 1980 - Patent, Tabuchi *et al.* 1981, Kawamura *et al.* 1981, Hashimoto *et al.* 1989). So konnten Mutanten der Gattung *Candida sp.* aus Glucose nach fünf Tagen bis zu 42 g/l Itaconsäure produzieren. Hefen der Gattung *Rhodotorula* erreichten nach sieben Tagen Kultivierung bis zu 15 g/l Itaconsäure. Auch filamentösen Pilzen verschiedener *Ustilago* Arten konnte die Produktion von 53 g/l Itaconsäure innerhalb von fünf Tagen nachgewiesen werden (Tabuchi 1991 – Patent). Weiterhin konnten 50 Hefestämme selektiert werden, vornehmlich Arten der Gattungen *Candida*, *Pichia* und *Yarrowia*, die Itaconsäure in geringen Mengen (<1 g/l) sekretieren (Stottmeister und Weißbrodt, 1991).

Neueste Untersuchungen auf dem Gebiet der mikrobiellen Produktion von Itaconsäure durch alternative Mikroorganismen wurden durch Levinson *et al.* (2006) durchgeführt. In Schüttelkolbenversuchen mit dem Stamm *Pseudozyma antarctica* NRRL Y-7808 konnte unter Stickstoff-limitationsbedingungen eine Produktion von 30 g/l Itaconsäure aus 80 g/l Glucose bei einer Produktionsrate von 0,25 g/l*h gemessen werden. Andere untersuchte Stämme bzw. Arten der

Gattung *Pseudozyma* sind nach Levinson nicht dazu befähigt, Itaconsäure im eingesetzten Medium zu produzieren.

Pilze der Gattung *Pseudozyma* sind in der Lage, eine Reihe von Substraten zu verwerten, darunter neben Sacchariden wie Glucose, Fructose, Saccharose, Galactose, Lactose, Maltose, Sorbose, Xylose, Arabinose, Trehalose auch Alkohole wie Ethanol, Glycerol, Erythrinol (Übersichten in Sugita et al., 2002, Wei et al. 2005). Das große Substratspektrum erlaubt es, umweltfreundliche Herstellungsverfahren auf Basis nachwachsender Rohstoffe (Kohlenhydrate, Pflanzenöle) und Abprodukte (Glycerin, -wasser) zu etablieren.

Gentechnische Methoden sind Hefenarten der Gattung *Pseudozyma* noch nicht vollständig etabliert. Erst in den vergangenen Jahren wurden erfolgreiche Untersuchungen zu Gentransfer, Mutagenese und der heterologen Genexpression durchgeführt (Cheng et al. 2001, 2003; Avis et al. 2005). Mit der Klonierung des eigenen Actinpromotors aus *P. flocculosa* gelang es einer kanadischen Arbeitsgruppe erstmalig, ein heterologes Protein mit einem homologen Promotor in *Pseudozyma* zu Überexprimieren (Neveu et al. 2007). Untersuchungen bzw. Ergebnisse zur Transformation von *P. tsukubaensis* wurden bisher nicht publiziert.

5. Zusammenarbeit mit den Kooperationspartnern

Die Zusammenarbeit zwischen den Projektpartnern der ZU Dresden (Prof. Barth), vom Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ (Dr. Aurich), der FAL (Prof. Vorlop, Dr. Willke) und der Technischen Universität Braunschweig (Prof. Lang) verläuft sehr gut und ist sehr stimulierend für alle beteiligten Gruppen. Insbesondere die im Berichtszeitraum durchgeführten acht Arbeitstreffen (abwechselnd in Braunschweig, Dresden und in Leipzig) waren sehr hilfreich und förderlich für die Bearbeitung der Projektaufgaben.

Darüberhinaus wurde die enge Zusammenarbeit der Bearbeiter des Teilverbunds 2 mit mehreren regelmäßig stattfindenden Treffen über die gesamte Laufzeit des Vorhabens unterstrichen. Dabei wurden aktuelle Ergebnisse und Informationen ausgetauscht sowie Diskussionen zu aktuellen Problemlösungen und zur Vereinheitlichung der in den Laboratorien eingesetzten Methoden geführt. Insbesondere während eines Arbeitsaufenthalts des Projektbearbeiters der TU Dresden C. Bodinus am UFZ Leipzig durchgeführter Screeningversuch im ersten Jahr förderte die Identifizierung von *Y. lipolytica* Stämmen, die zur erhöhten Itaconsäureproduktion befähigt sind (siehe 1. Zwischenbericht). Durch die erfolgreiche Zusammenarbeit zwischen den Projektpartnern des Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ und der TU Dresden konnte die Einreichung eines Patents („Verfahren zur biotechnologischen Herstellung von Itaconsäure mit Hefen“) im Berichtszeitraum realisiert werden (siehe Punkt 4).

II. Detaillierte Darstellung

1. Wissenschaftliche Ergebnisse

Die in den ersten beiden Projektjahren erarbeiteten Ergebnisse wurden detailliert in den jeweiligen Zwischenberichten dargestellt. An dieser Stelle werden daher nur ausgewählte Daten der ersten beiden Zwischenberichte mit detaillierten Ergebnissen des dritten Arbeitsjahres zusammen dargestellt. Eine Zusammenfassung aller Arbeiten findet sich auch im Erfolgskontrollbericht zum Abschlussbericht.

1.1. Teilvorhaben 1: Screening, Mutantenselektion, Gentechnik und Stabilitätskontrolle

1.1.1. Etablierung von Methoden zum Screening nach itaconsäureüberproduzierenden Hefestämmen

Zum Meilenstein 31.01.2005 konnte ein Screeningsystem für Itaconsäure produzierende Hefen etabliert werden (siehe Zwischenbericht 1). Dazu wurden zwei *E. coli* Stämme (B44 und ZSC113) isoliert, die in Anwesenheit von Itaconsäure - auf Grundlage der inhibierenden Wirkung der Säure auf die Isocitratlyase - nicht mehr in Anwesenheit von Acetat als alleiniger Kohlenstoffquelle wachsen können. Das Screeningverfahren beruht darauf, Itaconsäure produzierende Hefestämme auf Festmedium wachsen zu lassen, um sie anschließend mit einem auf Acetat wachsenden *E. coli* Keim zu überschichten. Im Blättchentest konnten Hemmwirkungen bis 1 g/l IA festgestellt werden, wobei die Blättchen in IA verschiedener Konzentrationen getaucht waren. Aufgrund der starken Ausdiffusion der Itaconsäure in höheren Konzentrationen (1 g/l) waren kaum noch messbare Hemmbereiche zu erkennen, während bei niedrigen Konzentrationen von bis 0,5 g/l Hemmhöfe messbar waren, die allerdings mit fortschreitender Kultivierungsdauer von dem Durchwachsen von Einzelkolonien begleitet waren.

Der Einsatz dieses Screeningsystems für die Hefe *Pseudozyma tsukubaensis* schien daher ungeeignet für den routinemäßigen Einsatz des Screenings nach IA überproduzierenden Mutanten, da bereits der Wildtyp größere Mengen an IA produzieren kann, die weit jenseits der 1 g/l Grenze liegen (siehe 1.1.2 und 1.2.4). Daher wurden zwei weitere Screeningmethoden etabliert. Die erste Methode, die Selektion von Mutanten mit verstärkter Säurebildung mittels Calciumcarbonat, wurde bereits in vorherigen Arbeiten erfolgreich zum Screening von *Y. lipolytica* Mutanten mit erhöhter Citronensäurebildung eingesetzt. Nachteilig bei dieser Methode ist, dass hierbei nicht spezifisch nach einer Überproduktion von Itaconsäure gescreent wird. Vielmehr werden mittels dieser Methode Mutanten isoliert, die eine allgemein höhere Säuresekretion im Vergleich zum Wildtyp aufweisen. Durch die Säurebildung wird unlösliches CaCO₃ in leicht lösliches Calciumhydrogencarbonat umgewandelt, wodurch ein Klärungshof im Bereich der Säuresekretion durch die Hefen sichtbar wird. In Vorversuchen konnte bewiesen werden, dass neben den hauptsächlich von *P. tsukubaensis* sekretierten Säuren Pyruvat und Malat auch Itaconsäure in Konzentrationen von <20 g/l Klärungshöfe in Anwesenheit von CaCO₃ bewirkt (nicht gezeigt). Abb. 1 zeigt typische Klärungshöfe durch *P. tsukubaensis*, ausplattiert auf Agarplatten mit Produktionsmedium unter Zugabe von 0,5% CaCO₃ und einer Inkubationsdauer von 7 Tagen. Durch diese Methode konnten erste Mutanten der Hefe *P. tsukubaensis* mit einer veränderten Itaconsäuresekretion isoliert werden (siehe Punkt 1.1.4.).

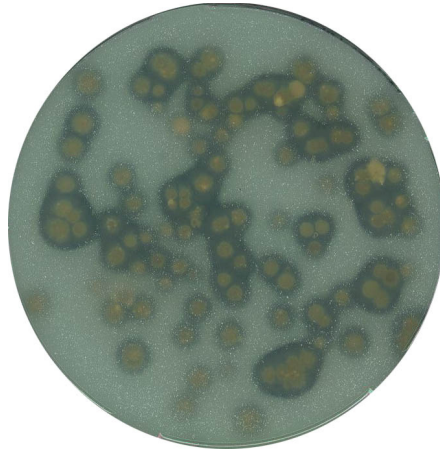


Abb. 1: Selektion von *P. tsukubaensis* Mutanten mittels Calciumcarbonatplattenmethode.

Mit UV-Licht mutagenisierte Zellen (siehe 1.1.3.) wurden auf Produktionsmedium mit CaCO₃ ausplattiert und 7 Tage bei 28 °C inkubiert. Vergrößerte Aufhellungshöfe entsprechen stärkerer Säurebildung.

Da die Calciumcarbonatmethode nicht spezifisch für die Selektion von Mutanten mit erhöhter Itaconsäureproduktion ist, wurde in der Literatur nach weiteren Methoden für eine spezifische Methode gesucht. Einen Ansatz hierzu bot die Arbeit von Yahiro et al. (1995). Durch die Methode der Itaconsäure Konzentrationsgradientplattentechnik konnte in dieser Arbeit eine *Aspergillus terreus* Mutante identifiziert werden, die eine 30 % höhere Endkonzentration an Itaconsäure produzierte als der Ausgangsstamm. Bei dieser Methode werden in einer Petrischale zwei Agarschichten gegossen: die untere, schräg gegessene, enthält Produktionsmedium mit Itaconsäure einer bestimmten Konzentration (in fortlaufenden Experimenten wurden 20 g/l IA eingesetzt). Darauf wird Medium ohne IA gegossen, damit ein IA-Gradient entsteht (Abb. 2).

Für die Testung von Mutanten mit erhöhter IA-Sekretion werden nun Kolonien aus der Hemmzonengrenze isoliert und die Produktion von IA im Schüttelkolbenversuch untersucht. Dabei wird davon ausgegangen, dass eine Produktinhibierung höhere IA Produktionen verhindert. IA resistente Stämme, die aus bzw. jenseits der Hemmzonengrenze isoliert wurden, sollten höhere Ausbeuten erzielen.

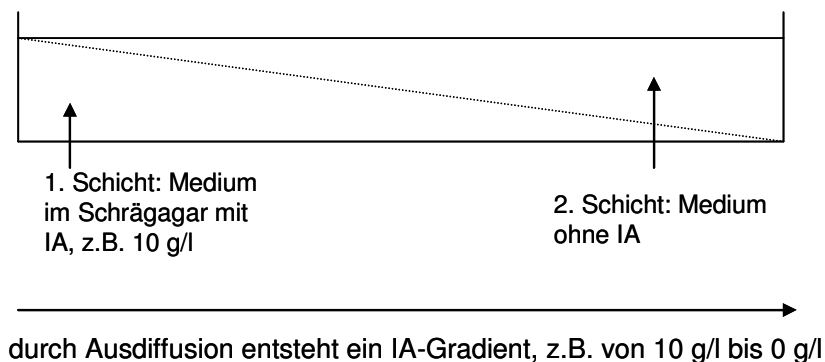


Abb. 2: Prinzip des Itaconsäure Konzentrationsgradienten

Plattenmethode nach Yahiro et al. (1995) und Ausbildung eines kontinuierlichen IA-Gradienten im Medium. Durch den Einsatz von quadratischen Petrischalen wurde ein kontinuierlicher IA Gradient erreicht.

Die Etablierung dieses Tests gelang erst durch den Einsatz von quadratischen Petrischalen (10x10 cm, Fa. Sarstedt). Die anfangs mit runden Petrischalen durchgeführten Experimente führten zu unscharfen Hemmzonen und aufgrund der Kreisform zu ungenügend ausgebildeten Gradienten. Weiterhin wurde dazu übergegangen, Itaconsäure direkt in Pulverform dem Produktionsmedium zuzugeben, da die Zugabe aus einer IA-Stammlösung zur starken Absenkung des pH-Wertes im Medium und der damit verbundenen Hydrolyse des Agars führte. Weiterhin sind

durch den Einsatz von IA in Pulverform höhere Gradienten möglich, da die Löslichkeit der Säure nur bei etwa 8,5-9% liegt. So war es nun möglich, IA-Gradienten mit 100 g/l herzustellen.

In einem Vorversuch wurde eine ÜNK der Hefe *P. tsukubaensis* in verschiedenen Verdünnungen auf IA-Gradientenplatten von 10 g/l, 20 g/l und 30 g/l ausplattiert. In Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration war eine deutlich verschobene Wachstumshemmzone sichtbar (Abb. 3, rote Pfeile). Die Ausbildung dieses deutlichen Hemmbereiches führte zur Etablierung dieses Screeningtests. Dabei wurde für Screeningversuche mit einem IA Gradient von 20 g/l gearbeitet, da bei dieser Konzentration ein Durchwachsen von nicht resistenten Kolonien minimiert ist. Bei den sich anschließenden Experimenten mit UV-Mutagenese wurden Hefezellen auf die Platten mit 20 g/l IA Gradient ausplattiert. (siehe 1.1.4.).

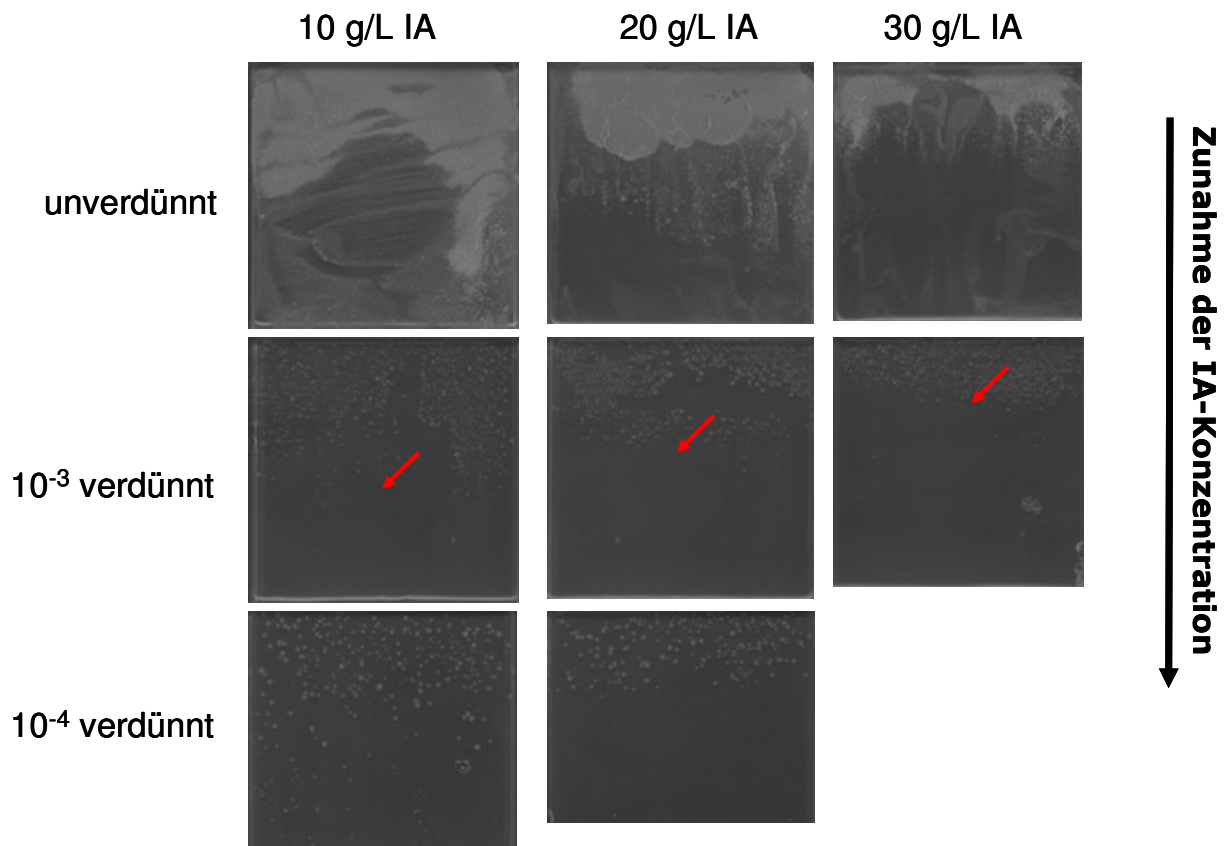


Abb. 3: IA-Konzentrationsgradientplattenmethode modifiziert nach Yahiro et al. (1995).

In quadratischen Agarplatten wurden über einen Schrägagar zwei Schichten mit Produktionsmedium gegossen: die erste (untere) Schrägschicht enthielt Medium mit 10 g/l, 20 g/l bzw. 30 g/l IA. Nach dem Auskühlen wurde sofort Medium ohne IA auf die untere Schicht gegossen, so dass sich nach Diffusion ein IA Gradient von 0-10 g/l, 0-20 g/l bzw. 0-30 g/l ausbildete.

Dargestellt sind jeweils Gradienten von 0 bis 10 g/l, 20 g/l und 30 g/l, wobei je Platte der Gradient von oben nach unten zunimmt. 200 µl einer *P. tsukubaensis* ÜNK in YM-Medium wurden jeweils unverdünnt, 10⁻³ und 10⁻⁴ verdünnt (in isotonomischer Kochsalzlösung) ausplattiert. Die Platten wurden anschließend für 4 Tage bei 28 °C im Brutschrank inkubiert. Die Pfeile markieren die Hemmzonengrenze. Für sich anschließende Mutageneseexperimente wurde die Gradientkonzentration von 20 g/l IA ausgewählt, da bei dieser Konzentration die Hemmgrenze mittig der Agarplatte lag und somit ein schnelles Durchwachsen von Kolonien verhindert werden konnte.

Produktionsmedium: 150 g/l Glucose; 0,05 g/l KH₂PO₄; 2 g/l NaNO₃; 0,1 g/l MgSO₄; 0,2% CSL; 2% Agar; auf pH 5,5 einstellen

1.1.2. Optimierung der IA-Produktion im Schüttelkolben

Im zweiten Zwischenbericht wurde Identifizierung des neuen Hefestammes *P. tsukubaensis* thematisiert, der unter wenig optimierten Produktionsbedingungen 0,84 g/l Itaconsäure im Schüttelkolben sekretiert. In diesen ersten Kultivierungsversuchen wurde ausgehend vom Medium nach Kawamura bereits phosphatlimitierend mit 0,1 g/l KH₂PO₄ gearbeitet und die Konzentration

des Maisquellwassers auf 20 g/l erhöht (siehe 2. Zwischenbericht). Für das dritte Berichtsjahr stellte sich die Aufgabe der weiteren Mediumoptimierung im Schüttelkolben. Die gewonnenen Daten sollten für Fermenter- bzw. Reaktorversuche des Projektpartners Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ Leipzig zur Erhöhung der maximalen Produktion von Itaconsäure unter standardisierten Bedingungen beitragen.

Die Untersuchungen zur Optimierung der IA Produktion mittels Schüttelkolbenversuchen einerseits und das Screening nach Mutanten mit erhöhter IA Produktion andererseits verlangten eine zuverlässige Analytik der durch die Hefe sekretierten Substanzen.

Aufbau einer Produktanalytik zur quantifizierbaren Bestimmung von Itaconsäure mittels Ionenchromatographie

Bereits in einem abgeschlossenen FNR-Projekt (Förderkennzeichen: 22002502) konnte am Institut für Mikrobiologie der TU Dresden eine Produktanalytik mittels Ionenchromatographie (IC) etabliert werden, die die organischen Säuren Pyruvat, α -Ketoglutarat, Citrat und Isocitrat zweifelsfrei qualifizieren lässt (Förster et al. 2006, Abschlussbericht FNR-FKZ: 22002502). Auf diese Erfahrungen konnte bei der Etablierung einer Analytik zur Bestimmung von Itaconsäure zurückgegriffen werden. Zur Detektion organischer Säuren und Anionen aus dem zellfreien Überstand wurde das IC-System DX320 der Firma Dionex verwendet. Die gewonnenen Daten sind zuverlässig und reproduzierbar. In Tab. 1 sind die optimierten Trennparameter zur Detektion und Quantifizierung von Itaconsäure mit der Trennsäule AS15 dargestellt. Damit konnte Itaconsäure zweifelsfrei quantifiziert werden, da es mit diesen Trennparametern zu keinen Peaküberlagerungen mit den anderen durch *P. tsukubaensis* sekretierten Säuren Pyruvat, Malat, Fumarat und Oxalacetat kam (zum Produktmuster siehe 2. Zwischenbericht, Teilvorhaben 2). Fumarat wird zwar ca. 0,4 min nach Itaconat detektiert, jedoch wird diese Säure im Itaconsäure Produktionsmedium von *P. tsukubaensis* nur in sehr geringen Konzentrationen von bis zu 60 mg/l produziert, so dass eine Peaküberlagerung bei entsprechender Verdünnung auszuschließen war.

Tab. 1: Eingesetzte Säulen und Trennparameter für die Bestimmung von Itaconsäure und anderer relevanter Säuren

IC System DX320 (Fa. Dionex) mit Eluentengenerator EG40. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software Chromeleon V. 6.8 SP2

Säule	Trennsäule: IonPac AS15 – 2 x 250 mm Vorsäule: IonPac AG15 – 2 x 50 mm			
Suppressor	ASRS-Ultra II (2 mm) mit 50 mA Stromfluss			
Flussrate	0,4 ml/min			
Injektionsvolumen	10 μ l			
Eluent	KOH			
Gradient	0 – 3 min	5 mM isokratisch		
	3 – 10 min	30 mM linear		
	10 – 20 min	45 mM linear		
	20 – 30 min	45 mM isokratisch		
	30 – 30,1 min	5 mM linear		
	30,1 – 35 min	5 mM isokratisch		
Retentionszeiten	Pyruvat	11,850 min	Nitrat	20,533 min
	Malat	15,780 min	Phosphat	24,043 min
	Itaconat	17,820 min	Citrat	26,800 min
	Fumarat	18,200 min	Isocitrat	28,500 min
	Ketoglutarat	19,200 min		

In Abb. 4 sind der eingesetzte KOH-Gradient und typische Säuren graphisch dargestellt. Die eingesetzte Konzentration der Säuren bzw. Anionen lag bei 20 mg/l. Die Quantifizierung der

einzelnen Komponenten konnte über Kalibrierungsgeraden von eingesetzten Standards definierter Konzentration ermittelt werden.

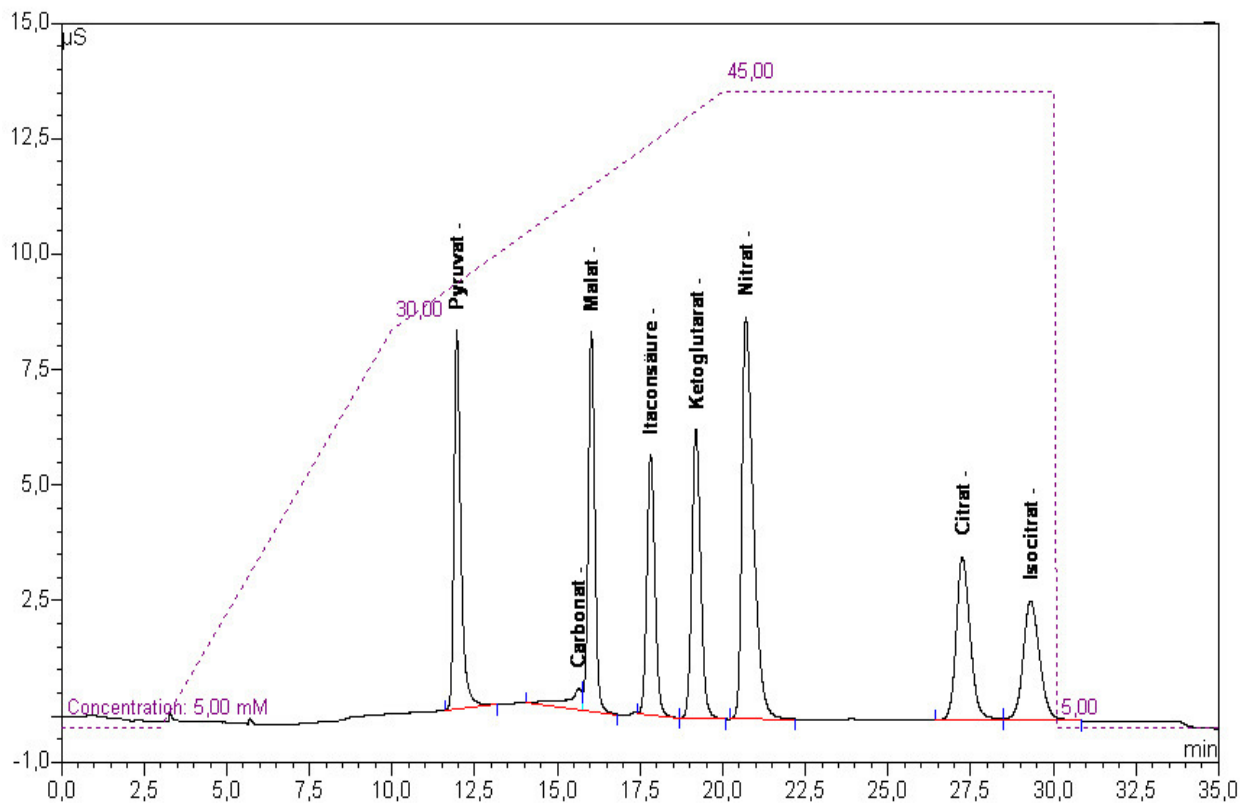


Abb. 4: Chromatogramm wichtiger Säuren des TCC und Nitrat.

Mit der Säule AS15 und optimierter Trennparameter konnten Itaconsäurekonzentrationen präzise nachgewiesen und eine Überlagerung möglicher anderer Säuren ausgeschlossen werden. Farblich hervorgehoben ist der ausgewählte KOH-Gradient in mM über die Laufzeit des Programmes von 35 min (siehe Tab. 1).

Der Aufbau der Produktanalytik und die schnelle, sichere Nachweismethode von Itaconsäure aus dem Kultivierungsüberstand ermöglichte es, gezielt nach Einflussfaktoren für die IA Produktion zu suchen. Dabei konnten die gewonnenen Erkenntnisse der im Folgenden gezeigten Schüttelkolbenversuche erfolgreich durch den Projektpartner des Helmholtz-Zentrums für Umweltforschung GmbH – UFZ Leipzig in den Laborreaktormaßstab übertragen werden.

Einfluss der Phosphat-Konzentration auf die Produktion von Itaconsäure

Biotechnologisch wird Itaconsäure mit Stämmen von *A. terreus* bzw. *A. itaconicus* unter phosphatlimitierenden Bedingungen hergestellt. Das Ziel der folgenden Experimente war daher, zu untersuchen, ob der Phosphatanteil im Medium bei *P. tsukubaensis* ebenso essentiell für die IA Produktion ist wie bei *Aspergillus*. Ausgehend von den Kawamura Bedingungen mit 0,5 g/l KH_2PO_4 wurde schrittweise die Phosphatkonzentration gesenkt und die Auswirkungen auf die IA Produktion verfolgt (Abb. 5). Zunächst erstaunlich war die Tatsache, dass *P. tsukubaensis* ohne Zusatz von Phosphat nicht nur vergleichbare Biomassen erreichte wie bei Kultivierungen mit Phosphatzugabe, sondern auch mit 3,5 g/l eine sehr hohe IA Produktion aufwies. Erklärt werden konnte dieser Umstand, dass organisch gebundenes Phosphat – das ionenchromatographisch nicht zu bestimmen ist – im Maisquellwasser (CSL) vorliegt und die Hefe durch die Sekretion von extrazellulären Phosphatasen auf dieses gebundene Phosphat zugreifen kann.

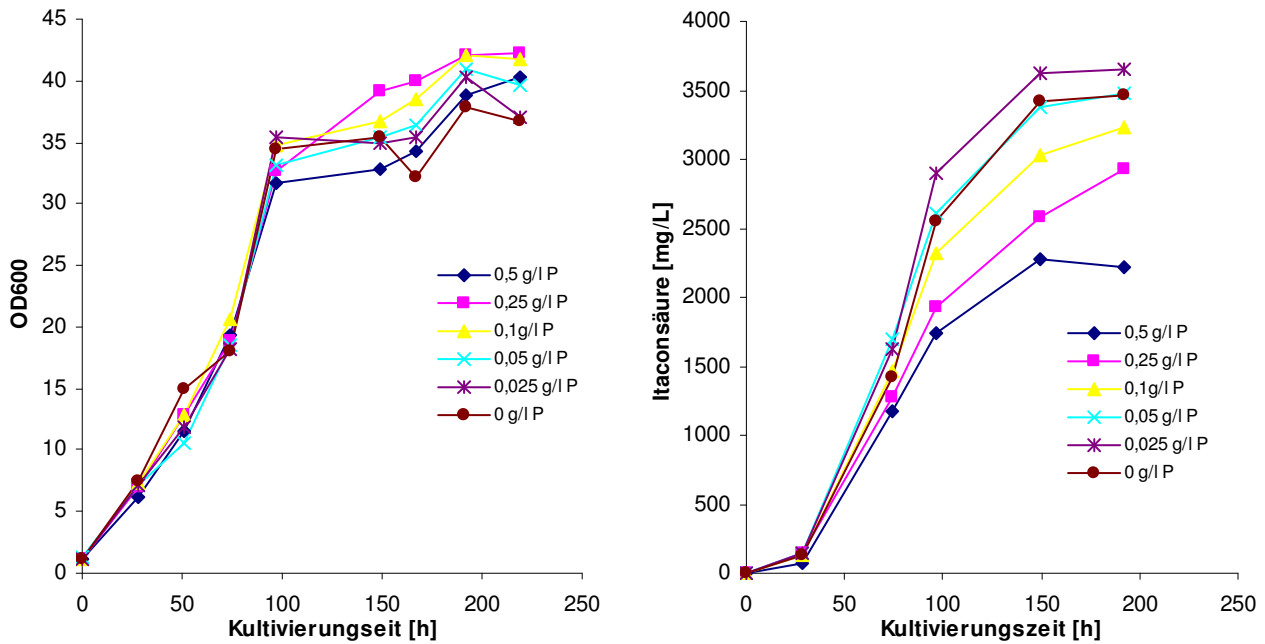


Abb. 5: Kultivierung von *P. tsukubaensis* im Medium nach Kawamura mit Variation der Phosphatkonzentration. Darstellung der Biomassebildung (OD₆₀₀) und Produktion von IA.
 Bedingungen: 100 ml Medium mit 100 g/l Glucose; 1,5 g/l NaNO₃; 0,1 g/l MgSO₄*7 H₂O; 0,2% CSL, pH 5,5, T = 30 °C

In den vergleichenden Kultivierungen aus Abb. 5 ist deutlich zu erkennen, dass mit Abnahme der Phosphatkonzentration auch die IA Endkonzentration steigt. Unter den Ausgangsbedingungen mit Medium nach Kawamura wurde die geringste IA Produktion festgestellt. Bei einer Phosphatkonzentration von 0,025 g/l wurde die höchste IA Produktion mit 3,65 g/l festgestellt. Ohne anorganische Phosphatzugabe und bei 0,05 g/l KH₂PO₄ konnte eine maximale IA Produktion von 3,47 g/l gemessen werden. In allen Versuchen zeigte sich, dass die Produktionsphase von IA wachstumsgekoppelt ist, d.h. mit dem Eintritt der Hefen in die stationäre Phase wird auch kaum noch IA gebildet.

Die für die IA Produktion günstige Phosphatkonzentration wurde bei 0,05 g/l KH₂PO₄ festgesetzt. Mit dieser Konzentration konnten reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Damit werden die Kultivierungen unter phosphatlimitierenden Bedingungen durchgeführt, unter Berücksichtigung der Tatsache, dass organisch gebundenes Phosphat nach Aufbrauch des anorganischen Phosphates (spätestens nach 48 h) aus dem CSL gelöst und aufgenommen wird. Für den großtechnischen Maßstab wäre allerdings aus Kostengründen zu überlegen, ob die bisher erreichten IA Endkonzentrationen von annähernd 70 g/l IA auch ohne zusätzliche Phosphatzugabe zu erreichen wären.

Im zweiten Zwischenbericht wurde ein Kultivierungsversuch beschrieben, bei dem nach Senkung der Phosphatkonzentration von 0,5 g/l auf 0,1 g/l eine IA Endkonzentration von 0,84 g/l erreicht wurde. Allerdings wurden dem Medium statt der nach Kawamura beschriebenen 0,2% CSL (v/v) in diesem Versuch 2% (v/v) eingesetzt. Offenbar wirkt sich eine erhöhte Konzentration an CSL negativ auf die IA Produktion aus. Die genaue Zusammensetzung des CSL ist unbekannt, jedoch sind möglicherweise Spurenelemente oder organische Substanzen (Proteine, Vitamine) in Limitation bzw. in der vergleichsweise geringen Konzentration von 0,2% CSL wichtig für die Produktion von Itaconsäure. Darüber hinaus wurden in verschiedenen Versuchen mit ungenauer Dosierung des sehr dickflüssigen CSL festgestellt, dass sich eine zu geringe CSL Konzentration unter 0,2% (v/v) negativ auf das Wachstum und die IA Produktion auswirkt.

Einfluss der Nitratkonzentration auf die Produktion von Itaconsäure

Neben der eingesetzten Konzentration von Phosphat hat oftmals auch die Stickstoffkonzentration einen entscheidenden Einfluss auf die Sekretion organischer Säuren durch Mikroorganismen. Natriumnitrat erwies sich als optimale N-Quelle für die Produktion und Sekretion von Itaconsäure. Mit den anderen getesteten N-Quellen Ammoniumnitrat, Ammoniumchlorid, Ammoniumsulfat und Natriumglutamat konnten keine IA Endkonzentrationen jenseits von 1 g/l erreicht werden.

Zur Ermittlung der geeigneten Natriumnitratkonzentrationen im Medium nach Kawamura mit 0,05 g/l KH_2PO_4 wurden vergleichende Untersuchungen zur Abhängigkeit der IA Produktion beim Zusatz von 1,5 g/l und 3 g/l NaNO_3 (Abb. 6), sowie 2 g/l und 2,5 g/l NaNO_3 (Abb. 7) durchgeführt.

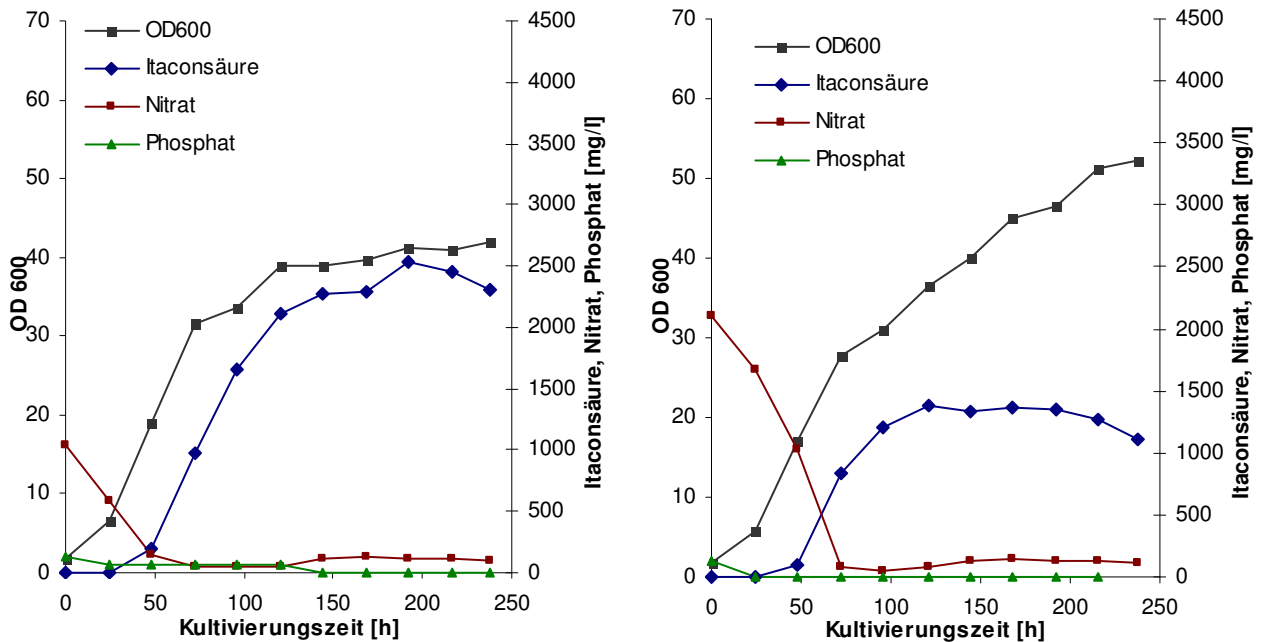


Abb. 6: Kultivierung *P. tsukubaensis* in Medium nach Kawamura mit folgenden veränderten Nitratkonzentrationen: links: 1,5 g/l NaNO_3 , rechts: 3 g/l NaNO_3 .

Bedingungen: 100 ml Medium mit 100 g/l Glucose; 0,05 g/l KH_2PO_4 , 0,1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,2% CSL, pH 5,5-6, T=28 °C.

Dabei konnte zunächst eine schnelle Verwertung des Nitrats festgestellt werden. Bereits nach 50 h bis 75 h Kultivierung wurde das Nitrat verbraucht (Abb. 6), gleichzeitig befinden sich die Hefen noch nicht im Übergang in die stationäre Phase. Vermutlich werden nach Verbrauch des zugesetzten anorganischen Natriumnitrates andere organische Stickstoffquellen aus dem CSL erschlossen. Das Wachstum ist bei 1,5 g/l Nitratzugabe mit einer OD_{600} von 40 schwächer als bei höheren Nitratzugaben, mit denen eine OD_{600} von über 50 erreicht werden. Offenbar wirkt sich die Limitierung der zugegebenen N-Quelle nachteilig auf das Wachstum aus und kann von der Hefe auch nicht durch mögliche Stickstoffquellen aus dem CSL ausgeglichen werden. Die Itaconsäureproduktion war bei 2 g/l NaNO_3 Zugabe am größten (Abb. 7, links). Hierbei konnten 4 g/l IA gemessen werden. Auffällig bei diesem Versuch war die verzögerte Wachstumsphase von 100 Stunden, so dass die maximale Endkonzentration von IA erst nach 300 h erreicht wurde, während höchste IA Konzentration in den anderen Versuchen bereits nach 100 h bis 150 h auftrat. Dies kann durch die verringerte Zelldichte beim Animpfen der Hauptkultur erklärt werden. Im Gegensatz zu den Versuchen aus Abb. 6 und Abb. 7 (rechts) wurde in diesem Versuch mit einer OD_{600} von 0,16 angeimpft. In weiteren Versuchen zur Klärung dieses Sachverhaltes konnte sichergestellt werden, dass die Zelldichte zu Beginn der Kultivierung keinen Einfluss auf die maximale Säureproduktion hat, lediglich auf die Kultivierungszeit (siehe Abb. 9 und Erklärungen). Aufgrund dieser Resultate zum Einfluss der NaNO_3 Konzentration im Kawamura-medium wurde für die folgenden Versuche statt der bisher eingesetzten 1,5 g/l nun 2 g/l NaNO_3 verwendet.

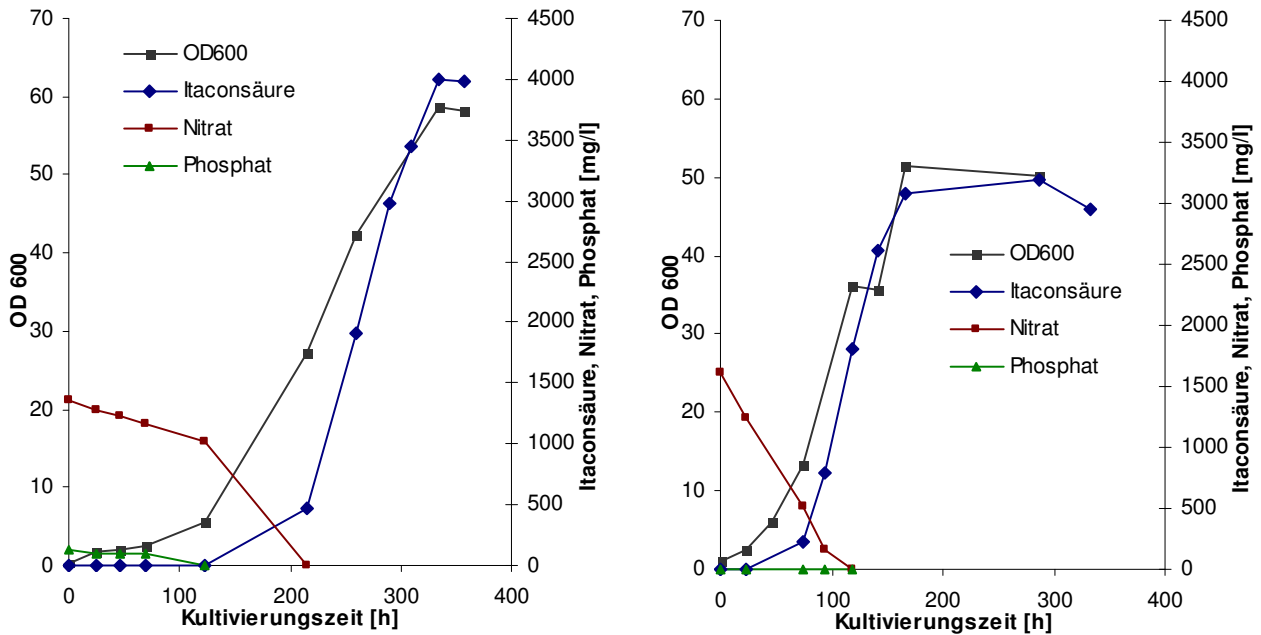


Abb. 7: Kultivierung *P. tsukubaensis* in Medium nach Kawamura mit veränderten Nitratkonzentrationen: links: 2 g/l NaNO₃, rechts: 2,5 g/l NaNO₃. Bedingungen wie in Abb. 5 beschrieben, 0,05 g/l KH₂PO₄.

Weiterhin wurde ein vergleichender Versuch durchgeführt, bei dem sowohl Nitrat als auch Phosphat limitiert wurden (Abb. 8). Die vorangegangenen Versuche zum Einfluss der Nitrat- und Phosphatkonzentrationen auf die IA Produktion sollten damit bestätigt werden.

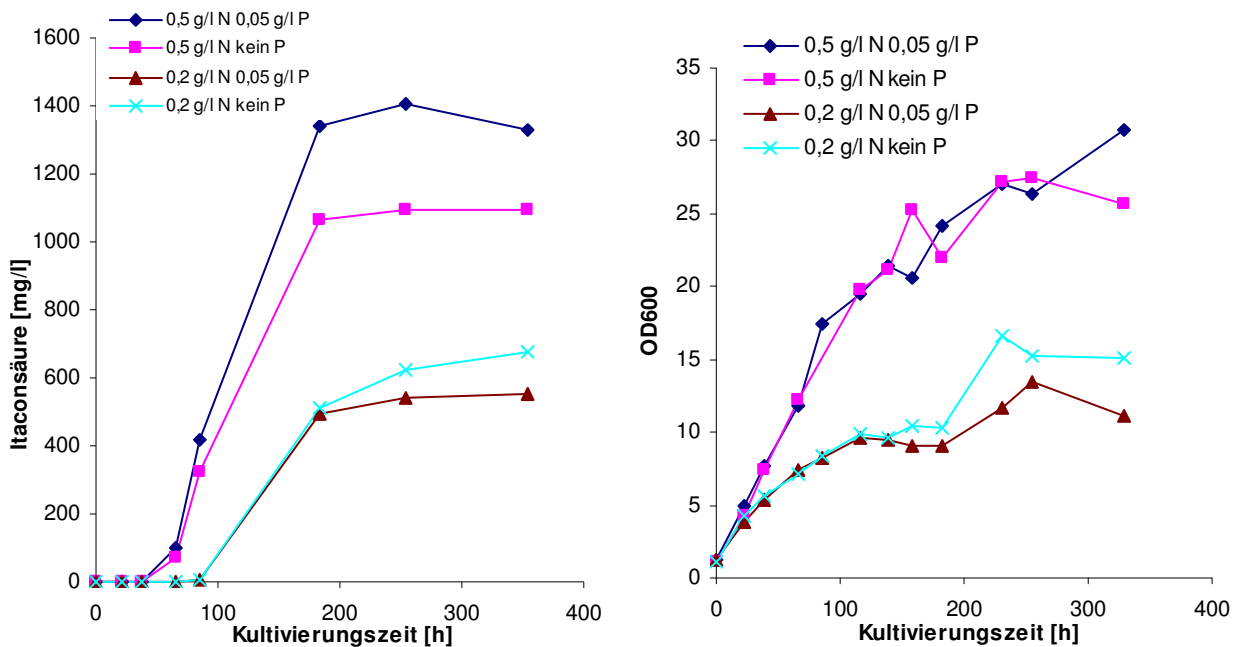


Abb. 8: Kultivierung *P. tsukubaensis* in Medium nach Kawamura mit veränderten Nitrat- und Phosphatkonzentrationen unter Berücksichtigung der IA Produktion und der Biomasseentwicklung (OD₆₀₀).

Die bis zu diesem Zeitpunkt gewonnenen Ergebnisse deuteten darauf hin, dass eine Phosphatlimitation auf 0,05 g/l KH₂PO₄ bei gleichzeitig erhöhter NaNO₃ Konzentration von 2 g/l günstige Bedingungen für die IA Produktion in *P. tsukubaensis* darstellen. Tatsächlich konnte bewiesen werden, dass eine weitere Senkung der Nitratkonzentration auf 0,2 g/l NaNO₃ unter den bisher optimierten Bedingungen mit 0,05 g/l Phosphat in einer sehr geringen IA Endkonzentration von

0,6 g/l IA resultiert. Gleichzeitig führt das Fehlen einer anorganischen Phosphatquelle zu einer weiteren Senkung der IA Endkonzentration. Auf das Wachstum hat das Fehlen der Phosphatquelle keinen entscheidenden Einfluss. Da das zugesetzte Phosphat bereits nach 24 h bzw. beim Eintritt in die logarithmische Wachstumsphase auch im optimierten Medium größtenteils verbraucht ist (siehe Abb. 6 und Abb. 7), sind die Zellen auf das organisch gebundene Phosphat aus dem CSL angewiesen. Die Tatsache, dass meist im späteren Kultivierungsverlauf noch geringe Konzentrationen von Phosphat (<20 mg/l) ionenchromatographisch detektiert werden konnten, weist darauf hin, dass hefeeigene Phosphatasen organisch gebundenes Phosphat freisetzen können, um anschließend das freie, anorganische Phosphat aufzunehmen und zu verwerten.

Dieser Versuch bestätigte, dass geringe NaNO_3 Konzentrationen bei gleichzeitiger Phosphatlimitierung einen negativen Effekt auf die IA Produktion haben. Die Bedingungen im Medium nach Kawamura bezüglich der Konzentration der N- und P-Quelle mit 2 g/l NaNO_3 und 0,05 g/l KH_2PO_4 wurden daraufhin nicht verändert.

Einfluss der Zelldichte des Animpfinokulums

Wie bereits in der Erläuterung zu Abb. 7 beschrieben, wurde in einem Versuch ein stark verzögertes Wachstum mit einem ebenso zeitlich nach hinten verschobenen Beginn der IA Produktion. Als Ursache konnte das Ansetzen der Hauptkultur mit einem zu geringen Inokulum in Frage kommen. Ob sich also die Zelldichte des eingesetzten Inokulums (angegeben in der optischen Dichte bei 600 nm, OD_{600}) der Hauptkultur auf die maximale Endkonzentration von Itaconsäure auswirkt, war Gegenstand des Versuches, der in Abb. 9 dargestellt ist.

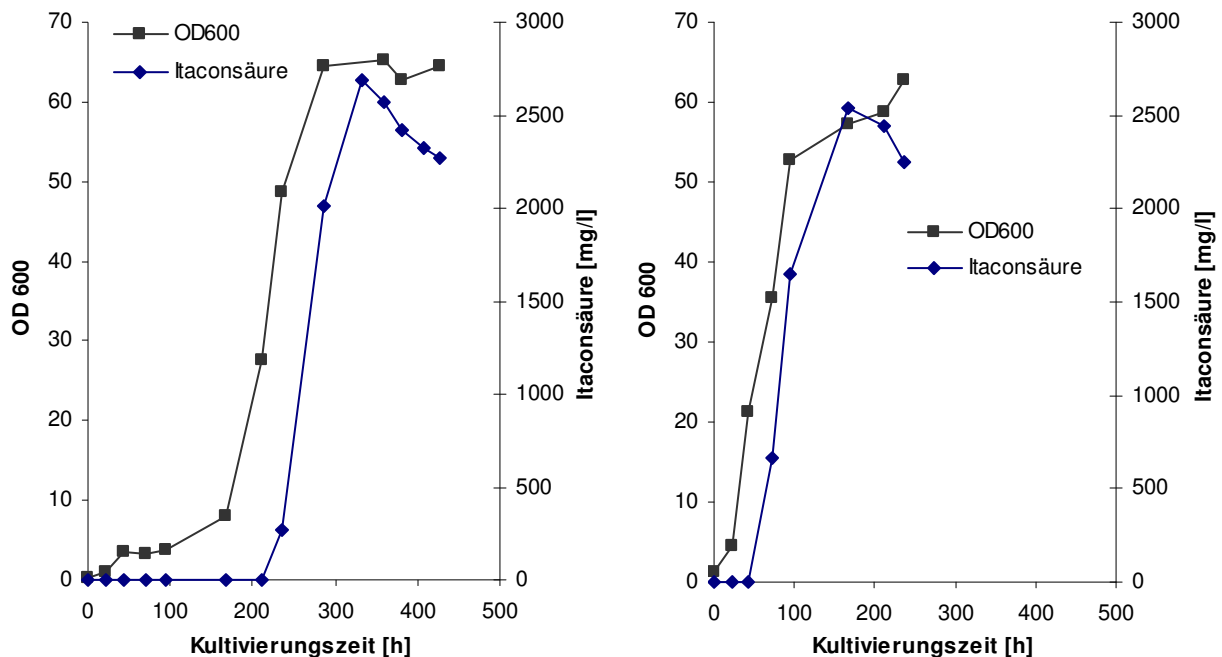


Abb. 9: Produktion von Itaconsäure durch *P. tsukubaensis* in Abhängigkeit von der Zelldichte der Hauptkultur (OD_{600}). Links: Start- OD_{600} 0,2; rechts: Start- OD_{600} 1,2

Das Animpfen der Hauptkultur mit einer OD_{600} von 0,2 bewirkt eine Verzögerung des Eintritts der Zellen in die logarithmische Wachstumsphase um 100 Stunden gegenüber der bisher stets durchgeführten Animpfung der Hauptkultur mit einer OD_{600} von ca. 1. Die IA Produktion setzt zeitlich noch weiter verzögert ein und beginnt erst nach einer Kultivierungsdauer von 200 h. Die maximalen Produktendkonzentrationen, die etwa 160 Stunden voneinander abweichen, sind jedoch nur unwesentlich unterschiedlich. So konnten mit dem 10fach geringeren Animpfinokulum nach 333 h 2,69 g/l IA gemessen werden, hingegen beim normalen Animpfinokulum von 1,2 eine IA Konzentration von 2,54 g/l. Die Raum-Zeit-Ausbeute unterschied sich daher stark und lag damit

bei 0,008 g IA/(l*h) gegenüber 0,015 g IA/(l*h). Für die großtechnische Anwendung im Bioreaktor unter Beachtung der Kultivierungsdauer sollte daher auf ein ausreichend großes Inokulum zum Start der Hauptkultur geachtet werden. Davon abgesehen hat die eingesetzte Zelldichte zu Beginn der Hauptkultur keinen Einfluss auf die maximal gebildete IA Konzentration.

Einfluss der Zelldichte der Vorkultur

Für Kultivierungsversuche wird eine 30 ml Vorkultur angesetzt, die in der Zusammensetzung der Hauptkultur entspricht, mit Ausnahme des Einsatzes von 1,5 g/l NaNO₃ statt der optimierten 2 g/l. Üblicherweise wird die Vorkultur so lange kultiviert, bis eine ausreichende Zelldichte vorhanden ist, um die 100 ml Hauptkultur mit einer OD₆₀₀ von 1 anzuimpfen. In der Regel sind dies 48 bis 72 Stunden bei einer OD₆₀₀ der Vorkultur von ca. 25. Ziel des Versuches aus Abb. 10 war es zu untersuchen, ob das Alter der Vorkultur einen Einfluss auf die maximal gebildete IA Konzentration in der Hauptkultur hat. Ausgehend von einer Vorkultur wurden nach 48 h, 72 h und 96 h Hauptkulturen jeweils mit einer OD₆₀₀ von 1 angeimpft und kultiviert. Bezüglich des Wachstums der Hauptkultur wurden keine wesentlichen Veränderungen festgestellt. Der Übertrag der jungen, als auch der alten Vorkultur resultierte in einem gleich starken Anwachsen und einer maximalen OD₆₀₀ von über 50, wenngleich die Hauptkultur der jungen Vorkultur ca. 5 OD mehr erreichte. Offenbar waren also in der alten Vorkultur noch ausreichend vitale Zellen vorhanden, die im umgesetzten Medium wieder normal anwuchsen. Hinsichtlich der gebildeten IA Konzentration der Hauptkultur wurden allerdings zwischen der jungen Vorkultur und den älteren Vorkulturen Unterschiede festgestellt. Die maximale IA Endkonzentration lag bei den Hauptkulturen mit älteren Vorkulturen bei ca. 2,5 g/l, während im gleichen Zeitraum in der Hauptkultur der jungen Vorkultur nur ca. 2 g/l IA gemessen wurde.

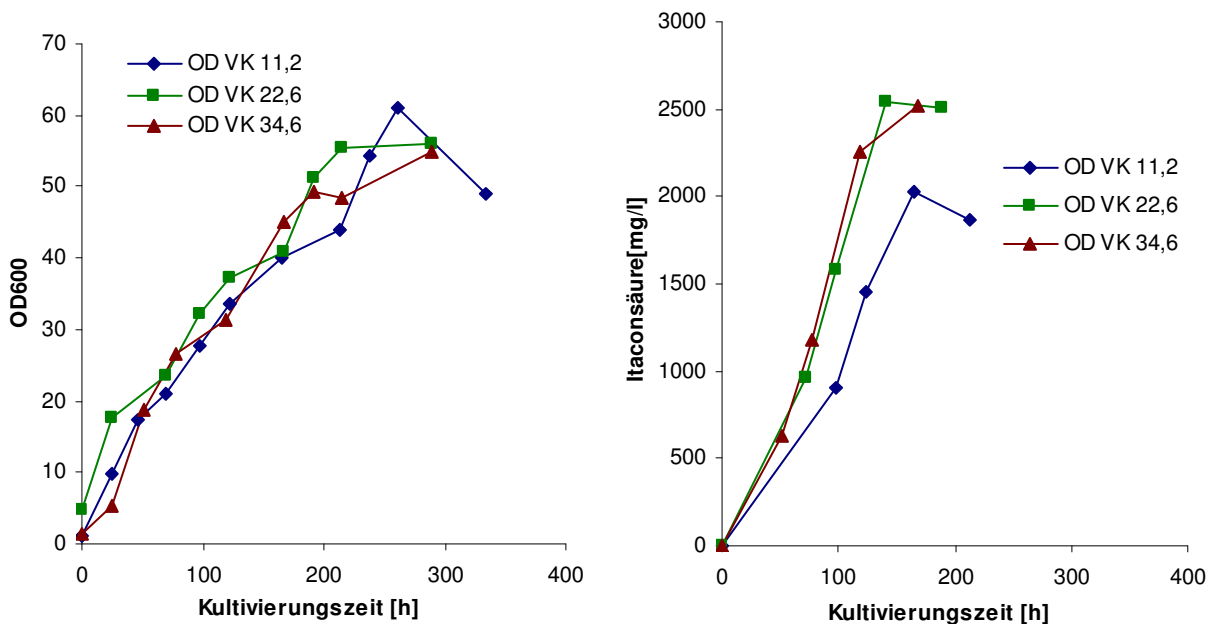


Abb. 10: Produktion von Itaconsäure durch *P. tsukubaensis* in Abhängigkeit von der Zelldichte der Vorkultur.

Von einer Vorkultur wurde beim Erreichen einer Zelldichte OD₆₀₀ 11,2; 22,6 und 34,6 jeweils die Hauptkultur mit einer OD₆₀₀ von 1 angeimpft und das Wachstum bzw. die Itaconsäureproduktion der Hauptkultur verfolgt.

Die in den bisherigen Versuchen verwendete 72 h Vorkultur ist offenbar für die maximale IA Produktion in der Hauptkultur geeignet. Möglicherweise haben sich die Zellen in dieser Phase besser an die Mediumsbedingungen angepasst und entsprechende Proteine im Metabolismus aktiviert bzw. gebildet. Eine junge Vorkultur, deren Zellen sich erst am Beginn der logarithmischen Wachstumsphase befinden, wirkt sich eher negativ auf die Säureproduktion in der Hauptkultur aus.

Einfluss der Glucosekonzentration auf die Produktion von Itaconsäure

P. tsukubaensis besitzt ein sehr großes Substratspektrum. Verschiedene Zucker und (Zucker)alkohole vermag die Hefe als Kohlenstoffquelle zu nutzen, darunter neben Glucose u.a. Fructose, Galactose, Saccharose, Maltose, Trehalose, D-Mannitol, D-Glucitol, Glycerin und Ethanol (Boekhout and Fell, 1998; Wang et al, 2006).

Fructose wurde als Substrat für die IA Produktion getestet, allerdings lag mit dieser C-Quelle die maximale IA Konzentration bei nur 0,51 g/l nach 142 h. Die Testung weiterer C-Quellen zur Produktion von IA durch *P. tsukubaensis* wurde vom Projektpartner des Helmholtz-Zentrums für Umweltforschung GmbH – UFZ Leipzig durchgeführt (siehe 1.2.3).

Die zu diesem Zeitpunkt eingesetzte Glucosekonzentration lag, ausgehend vom Kawamura-medium, bei 100 g/l Glucose. In weiteren Versuchen wurde die Glucosekonzentration auf 150 g/l und 200 g/l erhöht (Abb. 11). Eine Erhöhung darüber hinaus schien nicht sinnvoll, da zu hohe Glucosekonzentrationen im Medium jenseits der 200 g/l einen starken osmotischen Stress für die Hefezellen bedeuten (denkbare Substrathemmung) und weiterhin im möglichen industriellen Einsatz kostengünstig ist.

Mit 150 g/l Glucose im optimierten Medium nach Kawamura konnten nach 190 h eine Endkonzentration von 4,8 g/l IA gemessen werden. Die Erhöhung der Glucosekonzentration auf 200 g/l resultierte in einer IA Endkonzentration von 3,5 g/l. Gegenüber der bisher maximal erreichten IA Konzentration von 4 g/l (Abb. 7) bei vergleichbarem Wachstum bewirkte die Erhöhung der Glucosekonzentration um 50 g/l einer Erhöhung der IA Endkonzentration um 0,8 g/l. Offenbar wird die zusätzliche Glucose nicht in das Zellwachstum metabolisiert, sondern in die Säureproduktion. Für Reaktorversuche ist diese Optimierung auf der Schüttelkolbenebene von untergeordneter Rolle, da im Fermenter eine fed-batch Kultivierung durchgeführt wird. Dennoch wurde für weitere Versuche im Schüttelkolben die Glucosekonzentration bei 150 g/l festgelegt.

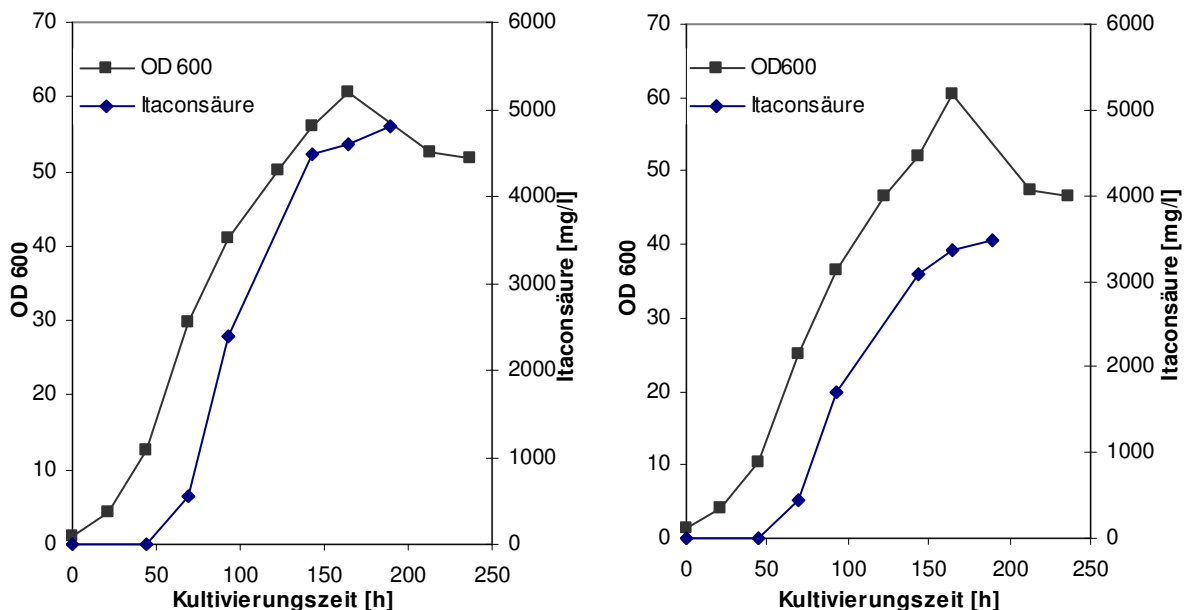


Abb. 11: Kultivierung *P. tsukubaensis* und Produktion von Itaconsäure in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration: links 150 g/l; rechts 200 g/l.

Bedingungen: 100 ml Medium mit 150 g/l bzw. 200 g/l Glucose; 0,05 g/l KH_2PO_4 , 0,1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,2% CSL, pH 5,5-6, T = 28 °C.

Einfluss der Kultivierungstemperatur auf die Produktion von Itaconsäure

Die Kultivierungen wurden bis zu diesem Versuch immer zwischen 28 °C und 30 °C durchgeführt. Zur Reproduktion der Ausgangsbedingungen nach Kawamura wurde die Kultivierungstemperatur auf 30 °C gesetzt, die anderen Versuche wurden bei 28 °C durchgeführt, da auch die Hefe

Y. lipolytica traditionell am Institut für Mikrobiologie der TU Dresden bei dieser Temperatur kultiviert wird. In der Arbeit von Levinson et al. (2006) wurde für das Screening nach Itaconsäure bildenden Hefen ebenfalls bei 28 °C durchgeführt. Avis et al. (2005) kultivierten *Pseudozyma sp.* bei 25 °C – hier allerdings nicht zum Zweck der Säurebildung, sondern zur Anzucht von Biomasse.

Dem Versuch zum Einfluss der Kultivierungstemperatur auf die Produktion von IA war ein Plattentest vorausgegangen. Dieser Test zum Wachstum der Hefen bei unterschiedlichen Temperaturen zeigte, dass *P. tsukubaensis* bei 33 °C noch gut wuchs, bei 37 °C allerdings kein Wachstum mehr zu verzeichnen war. Die niedrigste getestete Temperatur lag bei 22 °C. Hierbei konnten die Hefen ebenfalls gut wachsen.

Vorausgegangen war diesem Versuch die Beobachtung, dass bei einem Parallelversuch auf zwei unterschiedlichen Inkubationsschüttlern in einer Kultur, die konstant bei 28 °C gehalten wurde, ca. 1 g/l IA weniger produziert wurde als in einer Kultur, bei der die Temperatur aufgrund eines schlechten Kühlverhaltens des Schüttlers bei 30 °C lag. In Abb. 12 sind Kultivierungen bei Temperaturen zwischen 25 °C und 34 °C dargestellt und die jeweilige Biomasse- sowie IA Produktion.

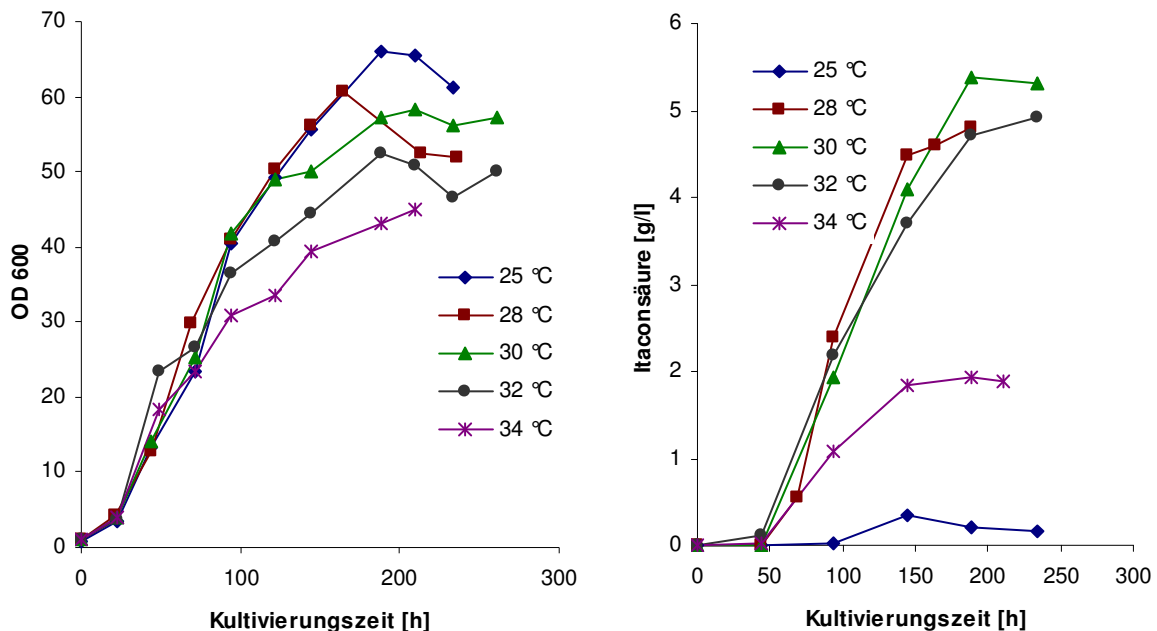


Abb. 12: Kultivierung *P. tsukubaensis*: Biomassebildung (OD₆₀₀) und Produktion von Itaconsäure in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur.

Bedingungen: 100 ml Medium mit 150 g/l Glucose; 0,05 g/l KH₂PO₄, 0,1 g/l MgSO₄·7 H₂O; 0,2 % CSL, pH 5,5-6.

Bei allen getesteten Temperaturen wuchsen die Hefen gleich gut an. Bei 25 °C erreicht *P. tsukubaensis* die höchste Biomasse bei einer OD₆₀₀ von 65, während bei 34 °C das schlechteste Wachstum mit einer OD₆₀₀ von 45 in der stationären Phase ermittelt wurde. Auch ist bei diesen beiden Temperaturen die gebildete IA Konzentration deutlich geringer als bei den Temperaturen von 28-32 °C. Bei 25 °C Kultivierungstemperatur wurden nur 0,35 g/l IA nach 144 h gemessen, bei 34 °C immerhin noch 1,94 g/l IA nach 188 h. Die höchste gemessene IA Konzentration mit 5,4 g/l lag bei 30 °C nach 188 h. Die Raum-Zeit-Ausbeute lag hierbei bei 0,029 g IA/l*h. Bei 28 °C und 32 °C wurden mit 4,7 bzw. 4,9 g/l IA ähnliche Endkonzentrationen erreicht – bezogen auf die Biomasse mit leichtem Vorteil bei 32 °C. Die Kultivierungstemperatur spielt bei *P. tsukubaensis* bezüglich der Produktion von IA offenbar eine entscheidende Rolle. Die für die Säurebildung und –sekretion optimale Kultivierungstemperatur liegt bei 28 – 32 °C, wobei Temperaturen von 30 °C zu bevorzugen sind. Bei folgenden Kultivierungen wurde darauf geachtet, die Temperatur konstant bei 30 °C zu lassen.

Einfluss des pH-Wertes auf die Produktion von Itaconsäure

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Sekretion organischer Säuren ist von außerordentlicher Bedeutung und unterscheidet sich auch innerhalb eines Mikroorganismus. So produzieren beispielsweise Stämme der Hefe *Y. lipolytica* Ketoglutarensäure in größeren Konzentrationen bei einem pH von 3,5-4,0 wohingegen die Citronensäureproduktion bei pH 5,5 durchgeführt wird.

Die Produktion von Itaconsäure mit Hochleistungsstämmen von *Aspergillus terreus* bzw. *Aspergillus itaconicus* wird im stark sauren Milieu von ca. pH 3 durchgeführt. Riscaldati et al. (2000) postulierten das pH-Optimum bei einem Wert von 2,8.

In einem Plattentest wurde zunächst geklärt, in welchen pH-Bereichen die Hefe *P. tsukubaensis* auf Vollmedium wachsen kann (Abb. 13). Bei einem pH-Wert von 4 und 5 wächst die Hefe auf Agarmedium besser als mit höheren pH-Werten von 6 - 8. Plattentests mit pH Werten unter 4 waren nicht möglich, da die Säure den Agar hydrolysiert und dementsprechend der Agar nicht fest wurde.

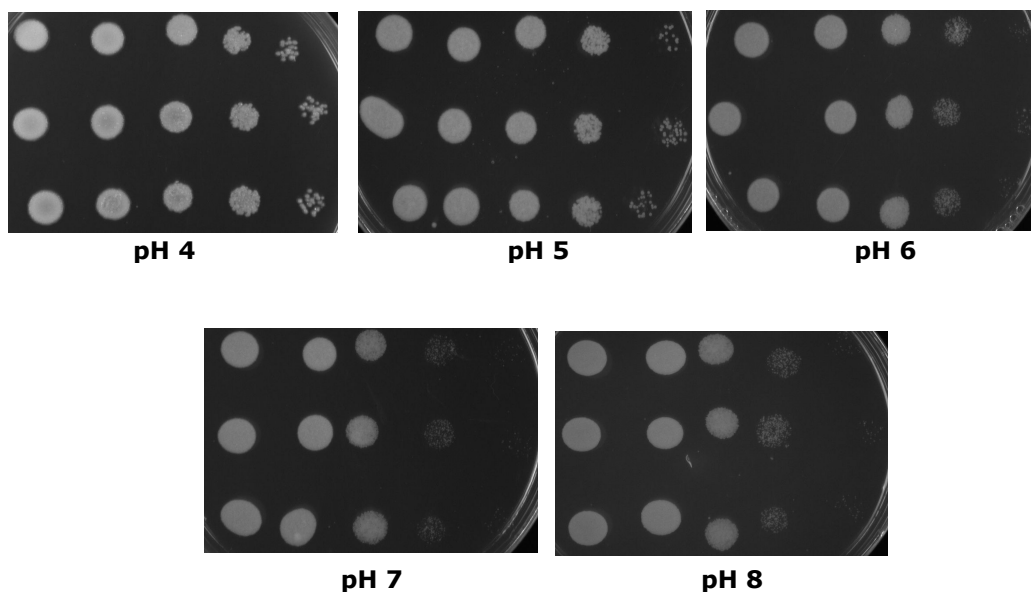


Abb. 13: Wachstum von *P. tsukubaensis* im Tropfplattentest auf YMA-Medium mit unterschiedlichen pH-Werten.

Von einer ÜNK wurden verschiedene Verdünnungsstufen gleichermaßen auf alle Platten getropft und bei 28 °C für 3 Tage inkubiert.

Die Hefen wurden daraufhin im optimierten Kawamuramedium mit pH Werten zwischen 2 und 6,5 kultiviert und das Wachstum bzw. die IA Produktion über den Kultivierungszeitraum verfolgt (Abb. 14). Zunächst war zu beobachten, dass die Hefen bei einem pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 120 h nicht wuchsen und auch keine Itaconsäure produzierten, woraufhin diese Kultivierung nicht fortgeführt wurde. Das bessere Wachstum bei pH-Werten unter 5 zeigt sich in der Schüttelkultur nicht. Hier wurden Biomassen in einem OD₆₀₀ Bereich von 45 - 50 gemessen, gleichzeitig erreichte die Kultur mit dem eingestellten pH von 6 eine OD₆₀₀ von 57. Zudem wächst die Kultur bei pH 3 deutlich langsamer an. Anscheinend sind die Bedingungen im Flüssigmedium mit z.B. verändertem Sauerstoffeintrag im Vergleich zur Plattenkultur derart verändert, dass bezüglich des Wachstums im leicht sauren pH-Bereich um 6 die optimalen Bedingungen vorliegen.

Hinsichtlich der Säureproduktion eignen sich saure pH-Wert Bedingungen von unter 4 nicht für die Bildung von IA durch *P. tsukubaensis*. Im Gegensatz zu *A. terreus* werden mit *P. tsukubaensis* bei einem pH Wert von 3 nur geringen IA Konzentrationen von 0,05 g/l gemessen. Auch bei einem auf pH 4 regulierten Wert produziert die Hefe nur 1,2 g/l IA, was etwa nur einem Fünftel der Konzentration im optimalen pH-Wert darstellt. Dieser liegt im Bereich von 5,5 bis 6. Davon

abweichende pH Werte von 6,5 und 5 führen zu einer geringeren IA Produktion. Es zeigte sich, dass der bisher eingestellte pH-Wert von 5,5 im optimalen Bereich liegt und es hierbei kaum Optimierungsmöglichkeiten gibt. Nachteilig der pH-Einstellung im Schüttelkolben ist, dass die Regulierung nicht kontinuierlich erfolgen kann und daher Schwankungen in der Endkonzentration gebildeter IA auftreten können. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse in den Fermenter muss erwiesen werden – für folgende Schüttelkolbenversuche jedoch wurde der pH-Wert im Verlauf der Kultivierung jeweils auf 5,5 eingestellt.

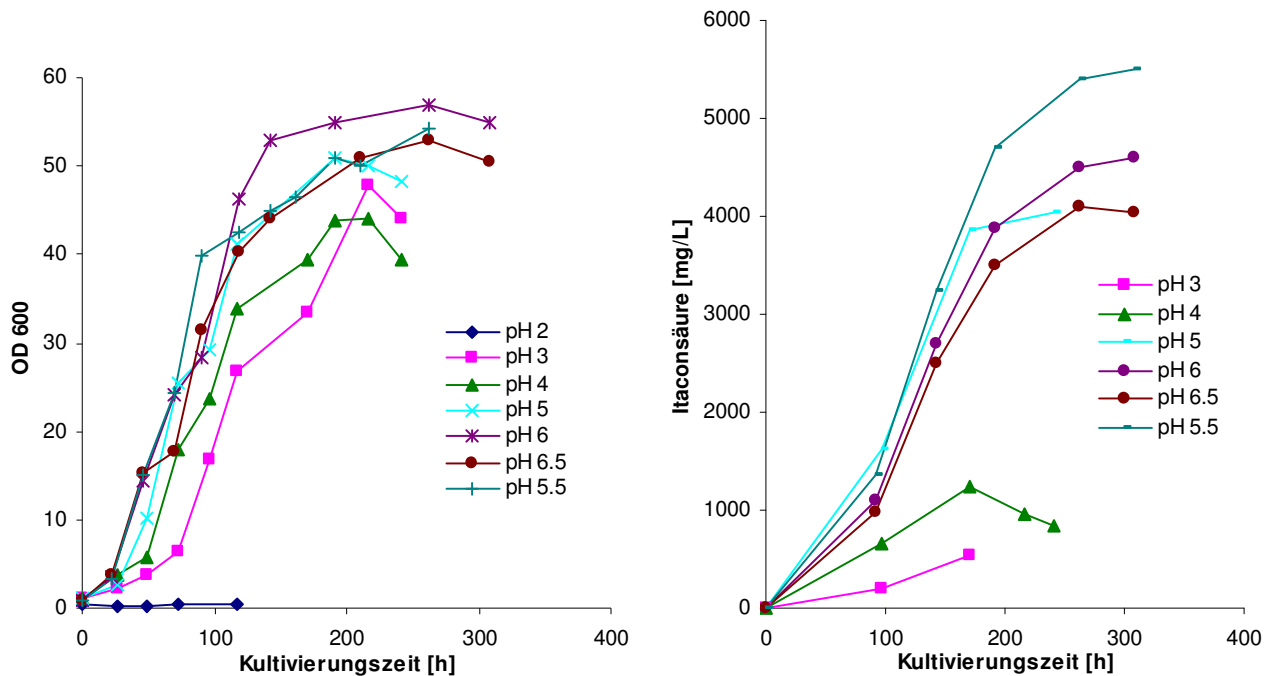


Abb. 14: Kultivierung *P. tsukubaensis* in Abhängigkeit vom pH-Wert unter Berücksichtigung der Biomasse (OD₆₀₀) und der IA Produktion.

Bedingungen: 100 ml Medium mit 150 g/l Glucose; 2 g/l NaNO₃; 0,05 g/l KH₂PO₄, 0,1 g/l MgSO₄·7 H₂O; 0,2% CSL, T=30 °C. Die Medienbestandteile wurden einzeln zusammengefügt, der pH-Wert mit 6 M HCl bzw. 2,5 M NaOH eingestellt, auf 100 ml aufgefüllt und im Kolben bei 121 °C für 15 min autoklaviert. Im Verlauf der Kultivierung wurde der pH täglich mit 6 M HCl bzw. 2,5 M NaOH auf den jeweiligen Start-pH reguliert

Verlaufskurven des unregulierten pH-Wertes und der Einfluss auf die IA Produktion sind in Abb. 15 dargestellt. Der pH-Wert sinkt sowohl vom Start-pH von 5,5 als auch vom Start-pH 7 bzw. 8 im Verlauf der Kultivierung auf 3,8 - 4. Gleichzeitig knickt die IA Produktionskurve ein und es werden nur noch IA Endkonzentrationen von 4 g/l bzw. 3 g/l erreicht. Die Nachregulation des pH-Wertes hat augenscheinlich einen entscheidenden Einfluss auf die maximal gebildete Itaconsäure. Weitere Versuche müssten klären, ob eine Anhebung des pH-Wertes beim Erreichen eines Wertes von 4 wieder zur verstärkten IA Produktion führt. Die bisher ermittelten Werte sprechen dafür, dass in pH-Werten unter 5 die IA Bildung und/oder Sekretion stark eingeschränkt ist. Darin unterscheidet sich *P. tsukubaensis* erheblich von *A. terreus*, bei dem nach Start der Kultivierung bei pH 3 im Verlauf der Kultivierung der pH-Wert nicht reguliert wird.

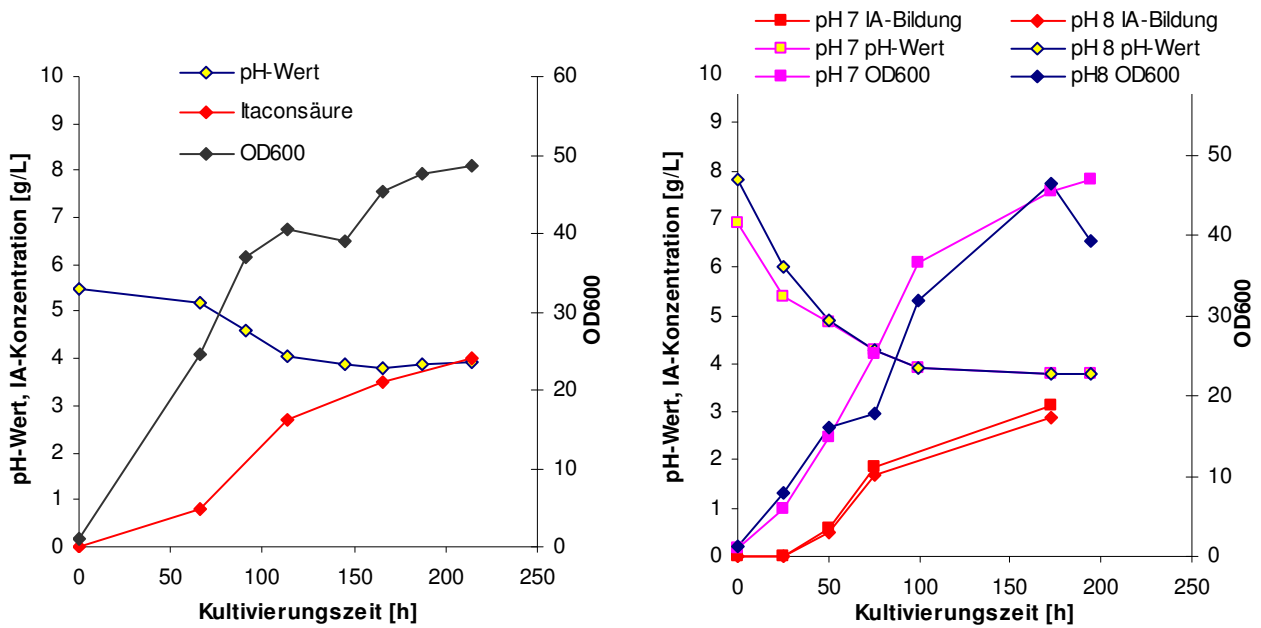


Abb. 15: Kultivierung *P. tsukubaensis* in Abhängigkeit vom unregulierten pH-Wert unter Berücksichtigung der Biomasse (OD₆₀₀) und der IA Produktion. Links: Start pH 5,5; rechts: Start pH 7 und 8.
 Medienbedingungen: 100 ml Medium mit 150 g/l Glucose; 2 g/l NaNO₃; 0,05 g/l KH₂PO₄, 0,1 g/l MgSO₄*7 H₂O; 0,2% CSL, T = 30 °C.

Kultivierung nach Levinson et al. (2006)

Im Berichtszeitraum wurde die Fähigkeit der Hefe *Pseudozyma antarctica* zur Produktion von Itaconsäure durch Levinson et al. (2006) publiziert. In deren Arbeit wurde unter nitratlimitierenden Bedingungen (0,5 g/l Ammoniumsulfat) und ohne Phosphatlimitation mit diesem Stamm die Bildung von 30 g/l Itaconsäure beschrieben. Die Hefe *P. tsukubaensis* und andere Arten der Gattung *Pseudozyma* wurden unter gleichen Bedingungen auch getestet, waren aber laut Levinson et al. (2006) nicht in der Lage, Itaconsäure zu bilden.

Wir haben unter den beschriebenen Bedingungen mit unserem *P. tsukubaensis* Stamm ebenfalls eine Kultivierung durchgeführt und konnten die Produktion von IA nicht nachweisen. Wesentliche gebildete Säuren waren Pyruvat und Malat. Neben dem veränderten N-P Verhältnis, das sich erwiesenermaßen bei *P. tsukubaensis* negativ auf die IA Produktion auswirkt, hat die Arbeitsgruppe um Levinson Hefeextrakt an Stelle von Maisquellwasser (CSL) verwendet. Wie bereits erwähnt, sind in dem CSL offenbar bisher nicht detektierte Substanzen enthalten (möglicherweise Proteine oder Spurenelemente), die die IA Produktion fördern. In der Aufklärung dieser Substanzen liegt noch Optimierungsbedarf. Erste Untersuchungen dahingehend wurden vom Verbundpartner des Helmholtz-Zentrums für Umweltforschung GmbH – UFZ Leipzig durchgeführt (siehe 1.2.3).

1.1.3. Mutantenselektion

Die im zweiten Zwischenbericht erwähnten und begonnenen Versuche zur Mutagenese mit *Y. lipolytica* H435 wurden fortgeführt. Zugrunde lag diesen Experimenten die Beobachtung, dass der Wildtyp in Anwesenheit von 2% Itaconsäure ein deutlich verzögertes Wachstum zeigte. In mehreren UV-Mutagenese Wiederholungen und dem Ausstrich auf insgesamt 244 MG + 2% IA-Platten wurden 12 Mutanten isoliert, wovon 4 Mutanten im Plattenversuch nach 8 Tagen Inkubation ein verbessertes Wachstum als der Wildtyp zeigten. Im Schüttelkolbenversuch allerdings verhielten sich diese Mutanten im Wachstum gleich dem Wildtyp, d.h. das verzögerte

Wachstum in Anwesenheit von 2% IA war ebenfalls ausgeprägt. Durch die Mutagenese konnten demnach keine Mutanten isoliert werden, die ein verbessertes Wachstum in Anwesenheit von 2% IA zeigen. Offenbar ist eine Sensitivität gegenüber IA Konzentrationen ab 2% von vielen verschiedenen metabolischen Vorgängen abhängig, die über ungerichtete Mutagenese nicht zu erreichen ist.

Da mit *P. tsukubaensis* im Vergleich zu *Y. lipolytica* eine Hefe mit einer deutlich erhöhten IA Produktion zur Verfügung stand, wurde daraufhin das Hauptaugenmerk auf die Mutagenese mit diesem Stamm gelegt. Neben der Optimierung der Zusammensetzung des Produktionsmediums wurden Experimente durchgeführt, die mittels UV-Mutagenese zur Selektion von Mutanten mit erhöhter IA Produktion führen sollten. In Abb. 16 ist vergleichsweise die Inaktivierungskurve von *Y. lipolytica* und *P. tsukubaensis* dargestellt. Während *Y. lipolytica* mit einer Intensität von 0,02 J/cm² bestrahlt wurde, musste die Dosis für *P. tsukubaensis* auf 0,05 J/cm² erhöht werden. Die hierbei erreichte Überlebensrate lag bei 0,5%.

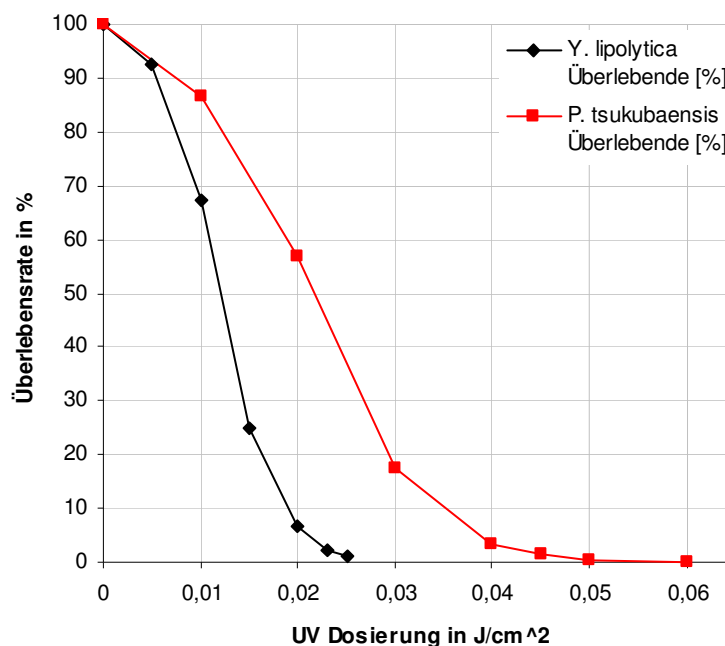


Abb. 16: UV-Inaktivierungskurve der Hefen *Y. lipolytica* H435 und *P. tsukubaensis* H488.

Die Zellen wurden mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm im Crosslinker BLX-254 mit einer Dosis von bis zu 0,05 J/cm² bestrahlt und anschließend auf YPD-Vollmedium ausplattiert. Nach 2 Tagen Inkubation bei 28 °C wurden die koloniebildenden Einheiten bestimmt und die Überlebensrate im Vergleich zum Stamm ohne UV-Bestrahlung bestimmt.

Zur Mutantenselektion wurde zunächst auf die Calciumcarbonatmethode zurückgegriffen (siehe 1.1.1.). Die mit UV-Licht bei einer Intensität von 0,05 J/cm² bestrahlten Hefezellen wurden auf Platten mit Produktionsmedium und Calciumcarbonat ausgestrichen und mindestens eine Woche bei 28 °C inkubiert. Einzelne Mutanten, die größere Klärungshöfe besaßen, wurden auf Produktionsmedium ausgestrichen und anschließend im optimierten Flüssigmedium (siehe 1.1.2.) kultiviert. In Abb. 17 sind ausgewählte Mutanten dargestellt, die eine gleiche bzw. erhöhte IA Produktion aufwiesen. Dabei zeigte sich, dass die Mutante *P. tsukubaensis* H488-M15 mit einer Produktendkonzentration von 14,4 g/l Itaconsäure die etwa 2,5-fache IA Endkonzentration erreichte als der Wildtyp im gleichen Zeitraum. Der Wildtyp sekretierte die unter den optimierten Bedingungen im Schüttelkolben üblichen knapp 6 g/l IA ins Kulturmedium.

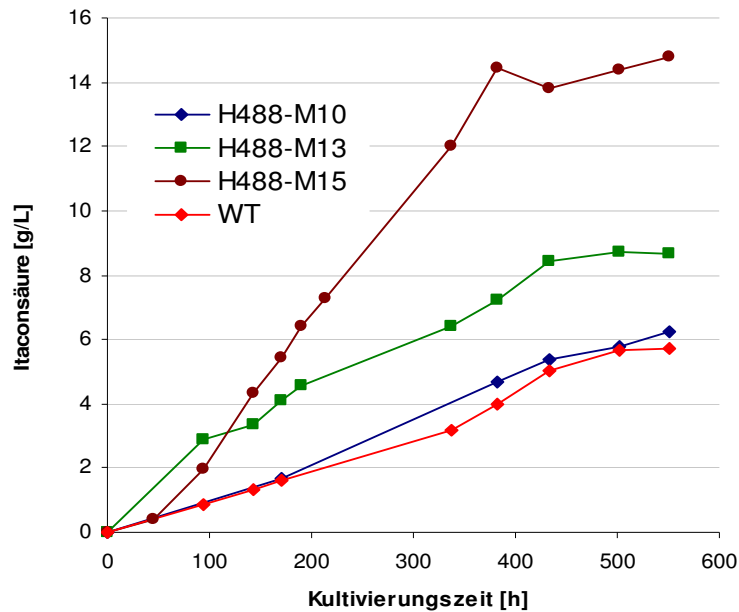


Abb. 17: Screening ausgewählter Mutanten im Vergleich zum Wildtyp auf die Fähigkeit der IA Bildung nach Selektion mittels Calciumcarbonatplattenmethode (siehe 1.1.1).

Medienbedingungen optimiert nach Kawamura: 50 ml Medium mit 150 g/l Glucose; 2 g/l NaNO₃; 0,05 g/l KH₂PO₄; 0,1 g/l MgSO₄*7 H₂O; 0,2% CSL, pH 5,5, T = 30 °C

In Wiederholungsversuchen (Abb. 18) konnte die erhöhte IA Produktion im Vergleich zum Wildtyp bestätigt werden, wenngleich – bei vergleichbarer Biomassebildung – im identischen Wiederholungsversuch mit 50 ml Medium statt der 14,4 g/l IA aus dem Screeningversuch nur 11,4 g/l IA erreicht wurden. Unter gleichen Bedingungen, allerdings in 100 ml Medium, wurden mit der Mutante 15 die aus dem Screeningversuch erreichten IA Endkonzentrationen von über 14 g/l bestätigt. Die offenbar große Abhängigkeit der IA Produktion in Abhängigkeit von der Sauerstoffversorgung erschwert mitunter die Reproduktion gewonnener Ergebnisse. Dennoch wurden in Wiederholungsversuchen mit der Mutante 15 stets signifikant höhere IA Endkonzentrationen gemessen, als mit dem Wildtyp. Die Selektion dieser Mutante M15 zeigt, dass die UV-Mutagenese eine effiziente Methode zur Gewinnung von IA Überproduzenten der Hefe *P. tsukubaensis* ist.

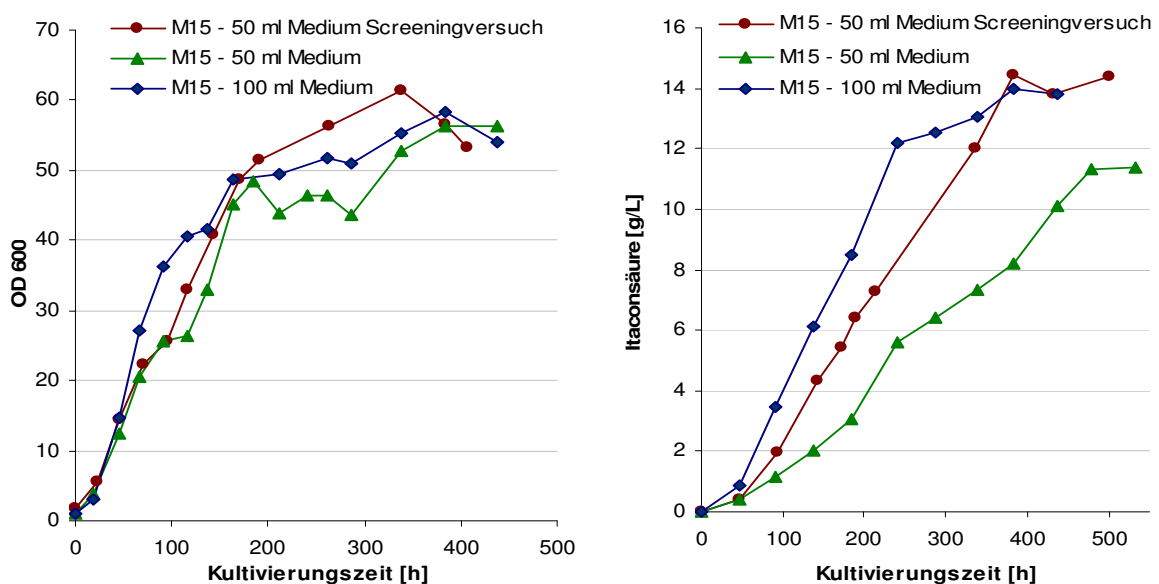


Abb. 18: Wachstum (OD₆₀₀) und IA Produktion im Wiederholungsversuch der Kultivierung der Mutante H488-M15 im optimierten Medium nach Kawamura (siehe Abb. 17).

Braunrot: Kultivierung aus erstem Screening; grün: 50 ml Medium; blau: 100 ml Medium

Im Berichtszeitraum begonnen wurden Arbeiten zur Isolierung von IA resistenten Mutanten nach der IA Konzentrationsgradientplatten Methode nach Yahiro et al. (1995). Nach der erfolgten Etablierung dieser Technik (siehe 1.1.1.) wurden bereits 40 Mutanten isoliert, die im Bereich der Hemmschicht bzw. jenseits dieses Hemmbereiches wuchsen. Die Kolonien wurden vereinzelt und dabei stets auf Platten mit 2% IA kultiviert, um den Selektionsdruck aufrechtzuerhalten. Die Testung dieser Mutanten auf eine erhöhte Produktion von IA wurde begonnen, konnte aber aufgrund des aufwendigen und zeitintensiven Screenings im Schüttelkolben im Berichtszeitraum nicht beendet werden. Die bisher bearbeiteten 18 Mutanten zeigten jedoch keine erhöhte IA Produktion als der Ausgangsstamm. Es wird angestrebt, die restlichen 22 Mutanten nach Ende des Berichtszeitraumes zu testen.

Mit der Gewinnung erster Mutanten mit erhöhter IA Produktion sowie der Etablierung neuer Screeningsysteme wurde der **Meilenstein** zum **30.9.2005** erreicht. Aufgrund der späten Verfügbarkeit der neuen als IA-Produzent charakterisierten Hefe *P. tsukubaensis* wurden die Meilensteine zwar nicht termingerecht, aber im Berichtszeitraum erreicht.

1.1.4. Gentechnische Bearbeitung der Hefe *P. tsukubaensis*

Im zweiten Zwischenbericht wurde bereits die erfolgreiche Transformation des Plasmides pINA302 in den zu diesem Zeitpunkt verwendeten IA Produktionsstamm *Y. lipolytica* H435 berichtet. Damit gelang es, stabile saccharoseverwertende Transformanden zu gewinnen, die einen genetischen Marker (*ura3-302*) tragen und somit für weitere gentechnische Arbeiten zur Verfügung stehen (**Meilenstein 31.04.2007**). Planungen sahen vor, das bislang unbekannte Gen für die *cis*-Aconitsäuredecarboxylase (CAD) in dem Stamm H435 zu überexprimieren, um den metabolic flux Richtung Itaconsäure zu erhöhen. Trotz aller Anstrengungen und der intensiven Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Bioinformatik (Prof. Schröder, Biotech Dresden) konnte kein mit Sicherheit bestimmtes Gen gefunden werden. Auch die parallel mit unserem Verbundpartner Prof. Lang, TU Braunschweig angestrebte Reinigung des Enzyms wurde durch die geringe Stabilität der CAD erschwert und konnte im Rahmen dieses Projektes nicht vollendet werden.

Die durch ein Screening identifizierte, zur IA Produktion befähigte Hefe *P. tsukubaensis* ist gentechnisch noch unerforscht. In den vergangenen Jahren gelangte es der Arbeitsgruppe um Prof. Bélanger die verwandten Hefen *P. antarctica* und *P. flocculosa* zu transformieren und Gentransfersysteme zu etablieren (Cheng et al., 2001; Avis et al., 2005; Neveu et al., 2007; Marchand et al., 2007). Von der Art *P. tsukubaensis* existieren bisher allerdings noch keine Veröffentlichungen auf diesem Gebiet. Ziel der durchgeführten Arbeiten war es daher, zu untersuchen, inwieweit *P. tsukubaensis* gentechnisch zu bearbeiten ist und ob eine heterologe Genexpression in dieser Hefe möglich ist.

Mit dem Plasmid pSPF.GFP stand ein Vektor zur Verfügung, der uns freundlicherweise von Prof. Bélanger (Québec, Kanada) zur Verfügung gestellt wurde und als Marker eine sGFP-Gensequenz enthält (Abb 19).

Nach mehrfach variierten Transformationsexperimenten gelang es schließlich, eine nach Avis et al. (2005) modifizierte Methode zur Transformation von *P. tsukubaensis* zu etablieren. Dabei wurden in einem ersten Schritt Protoplasten isoliert, die mit mindestens 3 µg linearisiertem Plasmid transformiert und auf Hygromycin B Resistenz (100 µg/ml) selektiert wurden. Bei einer erfolgreichen Transformation sollten somit Hygromycin B resistente Stämme entstehen, die das heterologe sGFP Protein exprimieren können. Zwei wahllos ausgesuchte Hygromycin B resistente Transformanden (H488 GFP-TF5 und GFP-TF16) wurden dahingehend untersucht. In Abb 20 (A) ist die Expression des sGFP Proteins nach Anregung bei einer Wellenlänge von 488 nm und der damit verbundenen grünen Fluoreszenz bei der GFP-Transformande 5 mikroskopisch dargestellt.

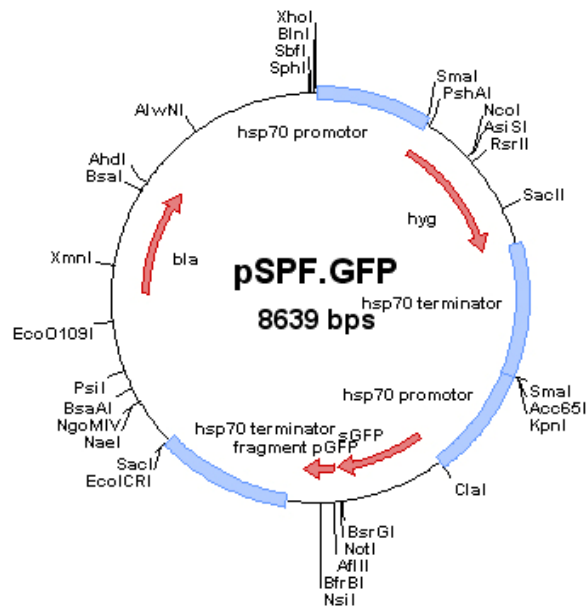
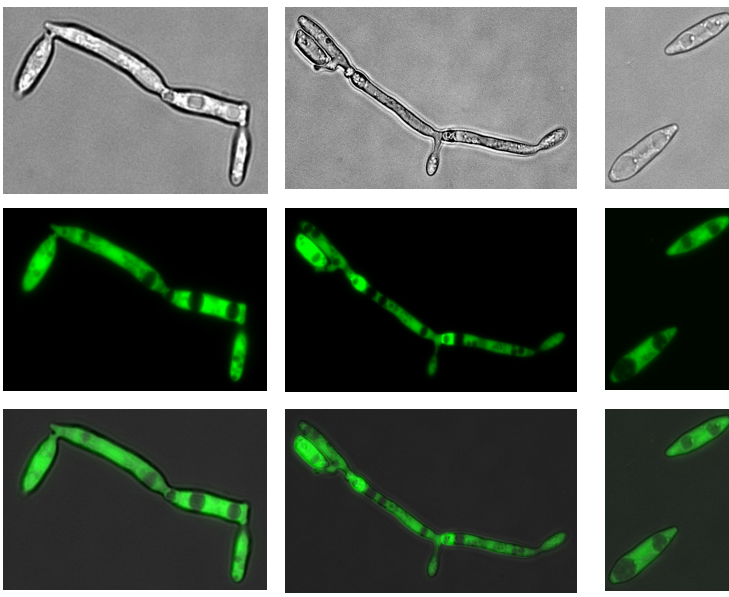


Abb. 19: Integratives Plasmid pSPF.GFP für die Transformation in Pseudozyma sp.

Das Plasmid enthält als Selektionsmarker für *Pseudozyma* das Gen für die Hygromycin-Phosphotransferase (*hyg*), vermittelt Hygromycin B Resistenz) unter Kontrolle des *U. maydis* HSP70 Promotors und Terminators sowie das *bla*-Gen für die Ampicillinresistenz in *E. coli*. Als Markergen ebenfalls unter Kontrolle des *U. maydis* HSP70 Promotors und Terminators ist ein modifiziertes GFP-Gen (sGFP, Mutation S65T für verbesserte Fluoreszenz) aus der Qualle *Aequorea victoria* enthalten. Für die Transformation in *P. tsukubaensis* wurde das Plasmid mit *XhoI* linearisiert.

A



B

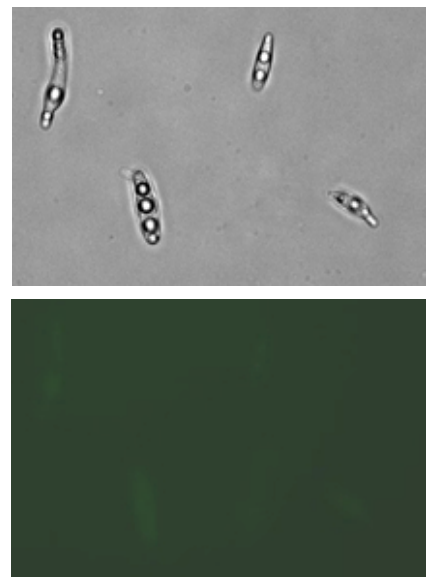


Abb. 20: Nachweis der integration des linearisierten Plasmids pSPF.GFP in *P. tsukubaensis* H488.

Nach Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm fluoreszierten Zellen des Transformanden-Stammes H488 GFP-FT5 grün (A) während der untransformierte Wildtyp H488 nur eine extrem schwache Eigenfluoreszenz zeigte (B). (A) jeweils Mycelform und Einzelzellen in der Ansicht Durchlicht, GFP-Fluoreszenz bei 488 nm und übereinandergelegt (von oben nach unten). (B) Durchlicht und Fluoreszenz bei 488 nm. Der Maßstab entspricht 20 µm.

Abb 20 (B) zeigt den untransformierten Ausgangsstamm, bei dem lediglich eine schwache Eigenfluoreszenz verbunden mit einer großen Belichtungszeit festzustellen war.

Für diesen Versuch wurden die Hefen in 30 ml flüssigem YM-Medium angezogen und nach zwei Tagen mikroskopiert. Dabei war in der Transformande sowohl in der mycelartigen Struktur, als auch in der Einzelzellform die GFP Fluoreszenz sichtbar. Da das Protein cytoplasmatisch vorliegt,

gelangt es nicht in abgrenzbare Kompartimente, wie in die für *Pseudozyma sp.* charakteristischen Lipideinlagerungen, die deutlich in Form runder Kügelchen in einer Anzahl von 2 - 4 je Zelle vorliegen.

Somit konnte mikroskopisch nachgewiesen werden, dass das Plasmid pSPF.GFP erfolgreich transformiert wurde und die Hefe das enthaltene heterologe GFP-Gen auch exprimiert. Der gentechnische Nachweis der (heterologen) Integration des Plasmids ins Genom von *P. tsukubaensis* erfolgte mittels PCR und Southern Blot.

Für die PCR wurden Primer hergestellt, die jeweils vor und hinter der GFP Gensequenz binden und spezifisch ein 1,05 kb großes Fragment amplifizieren (Abb. 21). Beide Transformanden H488 GFP-TF5 und GFP-TF16 zeigten die Bande bei ca. 1 kb, wie sie auch im Kontrollansatz, der PCR mit den GFP-Primern gegen das Plasmid pSPF.GFP, zu sehen ist. Wie zu erwarten, konnte diese Bande im Ausgangsstamm H488 nicht nachgewiesen werden, da dieser Stamm nicht mit dem GFP Plasmid transformiert wurde und dieses Gen auch nicht im Genom lokalisiert ist.

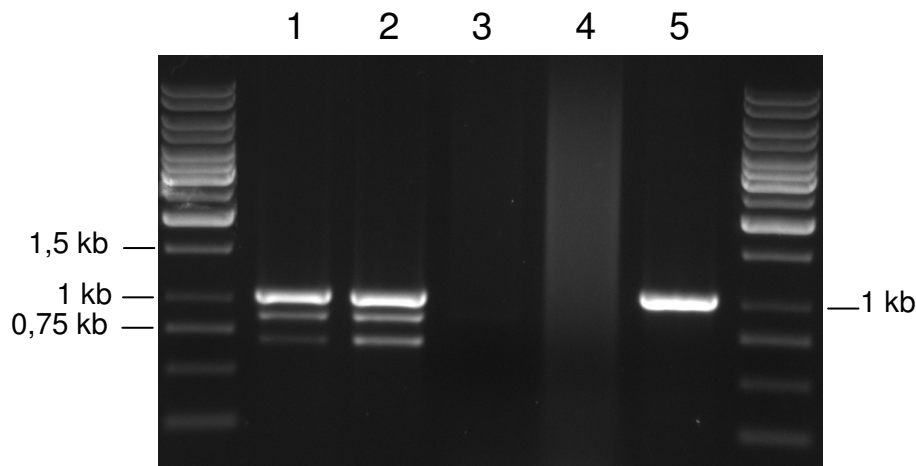


Abb. 21: Nachweis der Integration des Plasmides pSPG.GFP in das Genom von *P. tsukubaensis* mittels PCR.

Genomische DNA der Transformanden H488 GFP-TF5 (1) und H488 GFP-TF16 (2) sowie des Ausgangsstammes H488 (3) und (4) wurde nach Hoffman and Winston (1987) isoliert und das 1,05 kb große GFP-Gen mit Hilfe der Primer GFPscreen (AGATCCCGACGGTATCGATG) und GFPscreen2 (AGTGGGCTGCAGGAATTCTC) nachgewiesen. Als Kontrolle diente eine PCR mit dem Plasmid pSPF.GFP (5).

Auch mittels Southern Blot konnte die Integration des linearisierten Plasmides in das Genom der Transformanden *P. tsukubaensis* H488 GFP-TF5 und GFP-TF16 nachgewiesen werden (Abb. 22). Analog zum Ergebnis des PCR-Versuches wurden auch im Southern Blot keine spezifischen, mit einer Sonde aus dem Ausgangsplasmid detektierten Banden im Wildtypstamm *P. tsukubaensis* H488 nachgewiesen. Die in den Transformanden gefundenen Banden stammen daher eindeutig von dem heterolog ins Genom integrierten Plasmid pSPF.GFP.

Mit diesem Transformationsexperiment wurde daher erstmalig nachgewiesen, dass *P. tsukubaensis* heterologe Proteine exprimieren kann. Weiterhin konnten gentechnische Werkzeuge, die in der Arbeitsgruppe routinemäßig für die gentechnische Bearbeitung der Hefe *Y. lipolytica* eingesetzt werden, auf *P. tsukubaensis* übertragen werden.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Kahmann am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg, konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass autonom-replizierende Plasmide von *Ustilago maydis* in *P. tsukubaensis* transformiert werden können und in der Hefe auch repliziert werden. Darüberhinaus wurden mit Carboxin und Nourseothricin neue Resistenzmarker getestet, gegen die *P. tsukubaensis* (neben Hygromycin B) sensitiv ist. Das erlaubt multiple Gentransfers und ist eine wichtige Voraussetzung dafür, den Metabolismus der Hefe an mehreren Stellen gezielt gentechnisch zu verändern. Zwar ist das Genom von *P. tsukubaensis* noch nicht sequenziert, aber aufgrund ihrer Fähigkeit, Proteine aus fremden

Organismen zu exprimieren, birgt diese Hefe ein großes Potential. So wäre es denkbar, spezifische Enzyme des Itaconsäure Metabolismus aus anderen Organismen zu klonieren und in *P. tsukubaensis* zu exprimieren. Als Option bietet sich die Aconitase aus *A. terreus* oder *U. maydis* an. In beiden Organismen, deren Genom bereits sequenziert und teilweise annotiert, ist wurde die Produktion von IA nachgewiesen. Daher kommt der Aconitase aus diesen Organismen eine besondere Rolle zu, da sie offenbar stärker den flux in Richtung Itaconsäure reguliert.

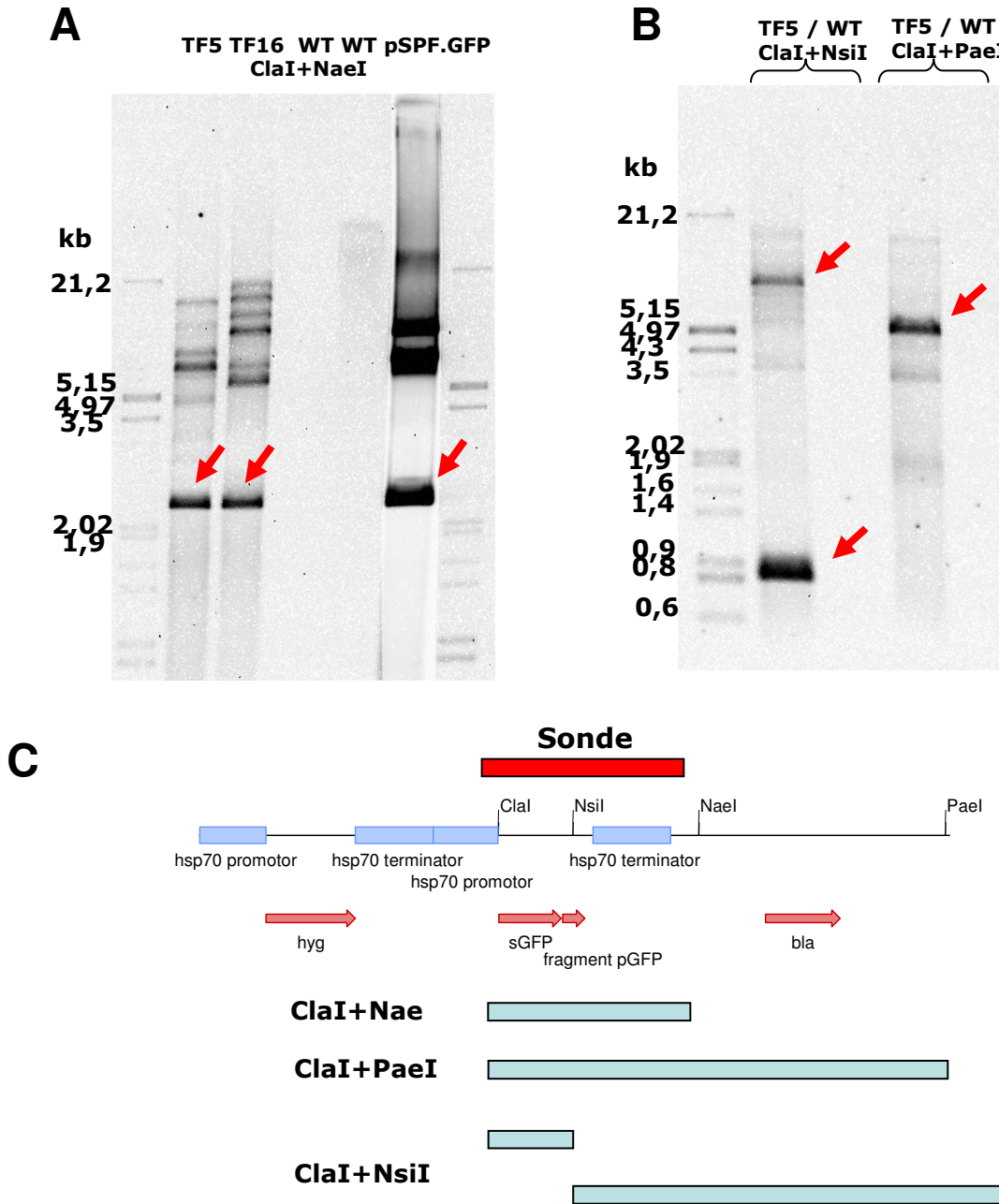


Abb. 22: Southern Blot zum Nachweis der Integration des mit XhoI linearisierten Plasmids pSPF.GFP in *P. tsukubaensis*.

(A) Transformanden H488 GFP-TF5 und -TF16 sowie Wildtyp H488 und Plasmid pSPF.GFP mit ClaI und NaeI verdaut. (B) Transformande H488-GFP-TF5 und Wildtyp H488 mit ClaI und NsiI sowie mit ClaI und PaeI verdaut. (C) Schematische Darstellung der zu erwartenden Banden bei Integration des Plasmids in das Genom unter Verwendung einer 2,3 kb großen ClaI/NaeI-GFP-Sonde aus dem Plasmid pSPF.GFP: Verdau mit ClaI + NaeI 2,3 kb; Verdau mit ClaI + PaeI 5,15 kb; Verdau mit ClaI + NsiI 0,86 kb und Bande größer 5,15 kb, da nicht bekannt ist, wo weitere ClaI bzw. NsiI Schnittstelle im Genom vorliegt. Die roten Pfeile markieren die erwarteten Banden bei (A) 2,3 kb in den Transformanden 5 und 16 sowie im Plasmid pSPF.GFP; (B) 0,86 kb und > 5 kb sowie (C) bei 5,15 kb. Molekulargewichtsstandard: λ -DNA, EcoRI/HindIII verdaut.

Die Meilensteine (**31.07.2007 und 31.08.2007**) der gentechnischen Beeinflussung der Itaconsäurebiosynthese bzw. der Kontrolle der genetischen Stabilität wurden dahingehend erreicht, dass nachgewiesen werden konnte, dass der spät im Projekt identifizierte Stamm *P. tsukubaensis*, der IA in hohen Konzentrationen von >70 g/l in Fermenterversuchen produziert, gentechnisch zu bearbeiten ist und wirtsfremde Proteine exprimieren kann.

1.2. Teilvorhaben 2: Prozessanalytik, Optimierung und Scale up

1.2.1. Aufbau und Anpassung der Prozessanalytik

Quantitative Detektion organischer Säuren mit Hilfe der Ionenchromatographie, Vergleich der Säulen AS11 und AS15

Für ein umfangreiches Screening nach itaconsäurebildenden Mikroorganismen ist eine präzise und zuverlässige Analytik zur Bestimmung der gebildeten Produkte erforderlich. Dabei ist insbesondere im nichtoptimierten Prozess mit der Ausschüttung und Anreicherung von Neben- und/oder Zwischenprodukten (z.B. Citrat, Isocitrat, Malat, 2-Oxoglutarat (2-OGA), Pyruvat) zu rechnen, die möglichst mit derselben analytischen Methode zu erfassen sind. Dabei sind die anorganischen Anionen der Kultivierungsmedien zu berücksichtigen.

Die Trennung komplexer Analytengemische von Mono-, Di- und Tricarbonsäuren, wie sie bei der Produktion von Itaconsäure anfallen, wird insbesondere durch Methoden der Ionenaustauschchromatographie (IC) in Verbindung mit unterdrückter Leitfähigkeitsdetektion („suppressed conductivity“) ermöglicht. Für die quantitative Bestimmung der Itaconsäure sowie der organischen ionischen Nebenprodukte wurde ein Ionenchromatographie-System DX 600 der Firma Dionex (Sunnyvale, USA) benutzt.

Als Grundlage der Versuche zur Detektion von Itaconsäure wurde eine Methode der Firma Dionex (Jensen 2000) zur Detektion von Säuren des Tricarbonsäurezyklus unter Verwendung der DX 600 Gerätekonfiguration mit der Trennsäule AS 11 verwendet. Diese KOH-Gradientenmethode ermöglicht bereits die Trennung der organischen Säuren Citrat, Isocitrat, 2-OGA und Pyruvat sowie der anorganischen Anionen Chlorid, Nitrat, Phosphat und Sulfat.

In ersten Versuchen musste jedoch festgestellt werden, dass die Retentionszeit von Itaconsäure bei dieser Methode mit der von 2-OGA sowie Sulfat zusammenfällt. Durch Variation der Parameter Eluentenflussgeschwindigkeit und Eluentengradient sowie dem Einsatz einer weiteren Trennsäule (IonPac AS 15) war daher eine Methode zu finden, die den Ansprüchen an eine hohe Trennauflösung gerecht wird. Zusätzlich zu den bisher in der Analyse berücksichtigten Komponenten wurden außerdem die organischen Säuren Malat, als mögliches Nebenprodukt, und Aconitsäure, als Zwischenprodukt der Itaconsäurebildung, sowie die wichtigsten anorganischen Medienkomponenten (F^- , Cl^- , NO_3^- , SO_4^- , PO_4^-) in die Untersuchungen einbezogen.

In Tab. 2 sind die optimierten Trennparameter unter Verwendung der Trennsäule IonPac AS11, bei denen alle relevanten Komponenten einzeln quantifiziert werden können, zusammengestellt. Im Vergleich mit der Dionex-Methode (Jensen 2000) ist das neu entwickelte Trennverfahren durch eine höhere KOH-Konzentration (3 mM anstatt 0,5 mM) in der isokratischen Phase sowie einen verlängerten linearen Gradienten (26 min anstatt 20 min) bei einer geringeren KOH-Endkonzentration (30 mM anstatt 40 mM) gekennzeichnet.

Allein die Trennung des Nebenproduktes 2-OGA von der anorganischen Komponente Sulfat war nicht zu realisieren. Daher wurde der Sulfatgehalt einer jeden Probe separat mit einem Testkit der Fa. Dr. Lange (LCK 153) bestimmt und der so ermittelte Wert mit Hilfe einer mit der Software Peaknet 6.5 erstellten Kalibriergerade für Sulfat ($R^2=0,999$ im Bereich von 5 mg/l bis 100 mg/l) in

die entsprechende Peakfläche umgerechnet. Diese Peakfläche wurde unter Berücksichtigung der Probenverdünnung von der Peakfläche für 2-OGA abgezogen. Dabei ist anzumerken, dass der maximale Sulfatgehalt des Mediums niemals über 0,5 g/l zu Beginn der Kultivierung lag und mit zunehmender Kultivierungsdauer abfiel. Somit nahm auch deren störender Einfluss auf die Detektion von 2-OGA mit der Zeit ab.

Für die eindeutige Identifikation der gefundenen Peaks konnte begrenzt eine IC-MS-Konfiguration im Department Umwelttechnik am UFZ eingesetzt werden, welche jedoch nicht für die Routineanalytik zur Verfügung stand.

Tab. 2: Trennparameter der IC für die Bestimmung von Itaconsäure und weiteren organischen Säuren sowie anorganischen Anionen mit einem DX 600-System

Säule	IonPac AS11 – 4mm Durchmesser			
Flussrate	1,5 ml / min			
Injektionsvolumen	10 µl			
Eluent	KOH 0. - 5.min ; isokratisch 3 mM 5. - 26.min ; linear auf 30 mM 26. - 28.min ; isokratisch 60 mM 28. - 32.min ; isokratisch 0,5 mM			
Retentionszeiten	Acetat	1,3 min	Sulfat	10,4 min
	Fluorid	1,4 min	2-Oxoglutarat	10,4 min
	Pyruvat	1,6 min	Fumarat	10,9 min
	Chlorid	2,3 min	Phosphat	15,1 min
	Nitrat	4,1 min	Citrat	17,9 min
	Malat	8,9 min	Isocitrat	18,5 min
	Itaconat	9,8 min	Aconitat	19,2 min

In Abb. 23 ist das Chromatogramm eines Standards mit je 100 mg/l von sechs der untersuchten Säuren dargestellt. Es zeigt eindeutig die hohe Auflösung aller relevanten Peaks. Erst zu einem späteren Stadium der Projektbearbeitung wurden Acetat, Malat und Fumarat in die Kalibration mit einbezogen. Die Quantifizierung der einzelnen Komponenten erfolgte mittels Kalibriergeraden von bekannten Standards. Es besteht hierbei für alle organischen Säuren eine Linearität im Bereich von 1 mg/l bis 100 mg/l ($0,991 < R^2 < 0,999$). Für die anorganischen Anionen ist die Linearität noch ausgeprägter bis in den Bereich über 1 g/l.

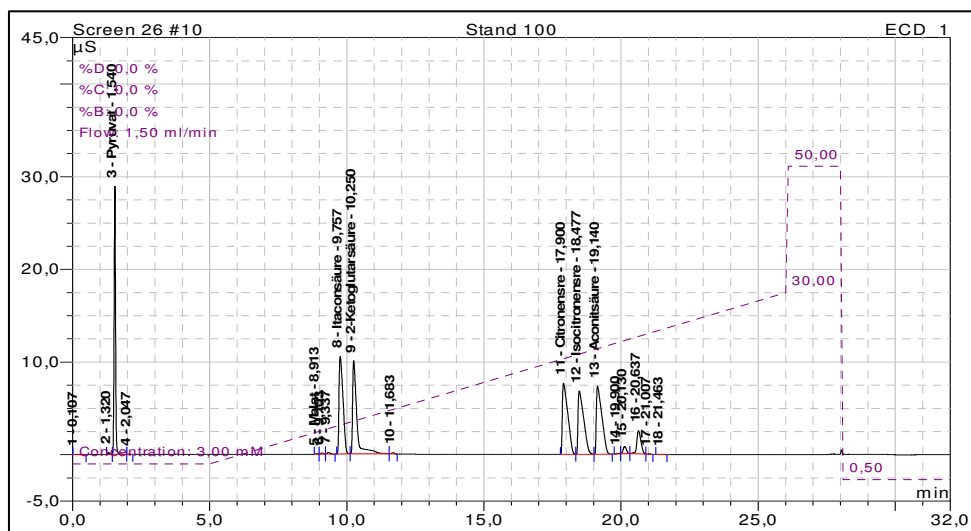


Abb. 23: Chromatogramm der 6 wichtigsten organischen Säuren erstellt mit dem Dionex DX 600, der Säule IonPac AS11 und der optimierten Trennparameter (s. Tab. 1)

Der Einsatz der Trennsäule IonPac AS15 brachte keine bessere Auflösung der kritischen Peaks. Nitrat und Sulfat überlagerten sich hierbei, trotz vielfacher Variation der Trennparameter, jeweils mit Itaconsäure bzw. 2-Oxoglutarsäure. Auch war eine zufrieden stellende Separation von Citronen- und Isocitronensäure nicht möglich.

Quantitative Detektion von Polyolen mit Hilfe der HPLC

Bei einer Kultivierung von Hefen mit Kohlenhydraten als Substrat ist außer der Bildung von organischen Säuren auch mit der Ausscheidung weiterer Nebenprodukte zu rechnen. Dabei handelt es sich vor allem um Polyole wie D(+)-Arahitol, meso-Erythritol, D-Mannitol (z.B. McKay et al. 1994), welche jedoch nicht mit der eingesetzten Standardanalytik (Ionenaustauschchromatographie in Verbindung mit unterdrückter Leitfähigkeitsdetektion) erfassbar sind.

Zur Detektion dieser Polyole wurde daher eine HPLC-Anlage des Departments Umweltmikrobiologie, Arbeitsgruppe PD Dr. Maskow, am UFZ hinzugezogen. Diese Shimadzu HPLC-Anlage ist ausgestattet mit einer Nucleogel ION 300 OA Säule und wird betrieben mit 0,01N H₂SO₄ als Eluent. Da mit dieser Konfiguration die Detektion des Polyols Glycerol bereits erfolgreich durchgeführt wurde, konnte man davon ausgehen, dass auch weitere Polyole hiermit nachzuweisen seien. Die bisher von dieser Arbeitsgruppe verwendete Methode mit einer Säulentemperatur von 60 °C und einem Fluss von 0,2 ml/min bestätigte diese Vermutung, wobei jedoch noch Optimierungsbedarf bestand. In weiteren Versuchen konnten die Parameter 70 °C Säulentemperatur und 0,2 ml/min Flussrate des Eluenten als günstigste Kombination gefunden werden. Abb. 24 zeigt ein Chromatogramm mit allen wichtigen und möglichen Medienbestandteilen zusammengefügt zu einem synthetischen Komponentengemisch. Dabei war zu erkennen, dass sich unter einigen der detektierten Peaks mehrere Substanzen verbergen.

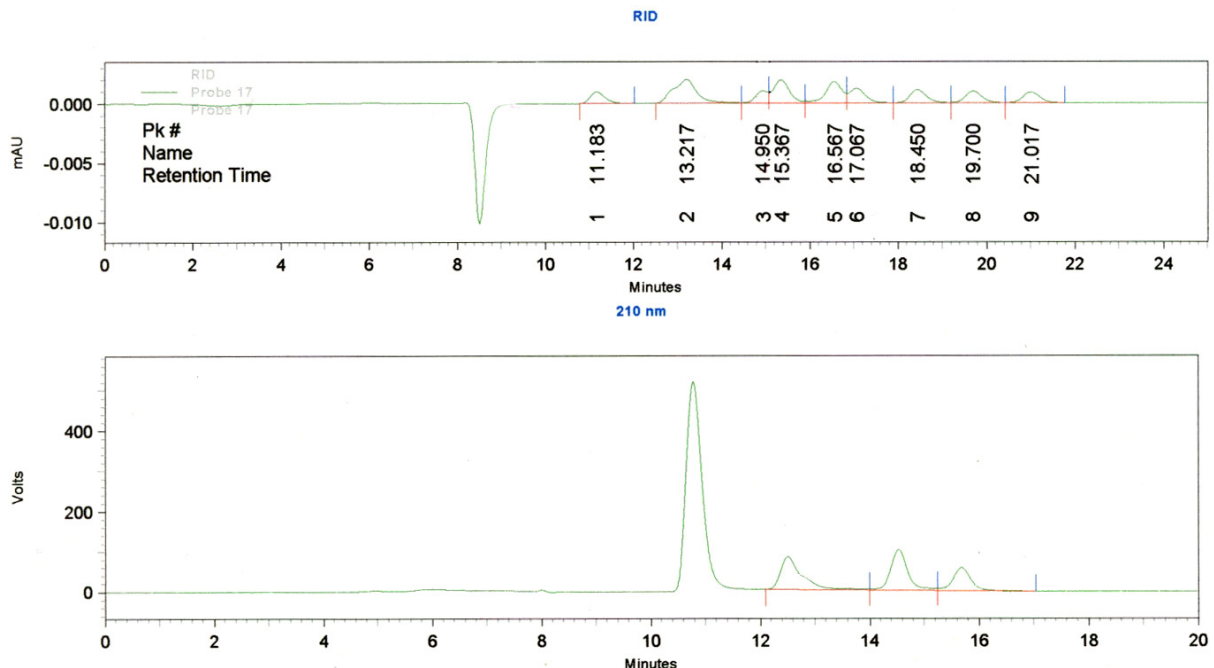


Abb. 24: HPLC-Chromatogramm eines Gemisches von organischen Säuren, anorganischen Anionen und den Polyolen D-Mannitol (Peak 6), D(+)-Arahitol (Peak 7) und meso-Erythritol (Peak 8)

In Tab. 3 sind diese Überlagerungen sowie weitere Verbindungen mit ihren Retentionszeiten zusammengefasst. Die Polyole, welche mit dieser Methode bestimmt werden sollten, konnten mit hinreichender Genauigkeit identifiziert werden. Hierbei gab es nur eine teilweise Überlagerung des D-Mannitol-Peaks mit dem der Fructose. Würde von Fructose und Saccharose als Substrate abgesehen, ist somit eine präzise Quantifizierung der genannten Polyole gewährleistet. Als weitere Erkenntnis kann festgehalten werden, dass mit dieser HPLC-Methodik ebenso eine Bestimmung

der Itaconsäure möglich ist, welche einen eindeutigen Peak bei 21 min ergibt. Auch Glycerin, ein mögliches Substrat der Itaconsäurebildung mit Hefen, kann mit der Methode bestimmt werden. Die Kalibration für die gesuchten Substanzen wurde mit bekannten Standards von 1 mg/l - 1000 mg/l durchgeführt wobei die Linearität mit einem Korrelationskoeffizienten von nicht weniger als $R^2=0,99$ bestätigt werden konnte.

Tab. 3: Retentionszeiten der einzelnen Bestandteile des synthetischen Gemisches

Peak	Substanz	Retentionszeit [min]	Peak	Substanz	Retentionszeit [min]
1	cis-Aconitsäure	11,183	4	D(+)-Glucose	15,400
2	2-Oxoglutar.	12,917	5	Fructose	16,600
2	Citronens.	13,200	6	D-Mannitol	17,100
2	Isocitronens.	13,317	7	D(+)-Arabitol	18,467
2	Anionenstandard	13,567	8	meso-Erythritol	19,733
3	Pyruvat	14,950	9	Itaconsäure	21,017

Quantitative Bestimmung von anorganischen Kationen

Im weiteren Verlauf des Projektes sollte der Einfluss von kationischen Spurenelementen auf die Itaconsäurebildung untersucht werden. Hierzu kam das Ionenchromatographiesystem ICS 90 der Fa. Dionex zum Einsatz. Mit der eingesetzten Säule CS12A und dem Laufmittel Methansulfonsäure konnten durch suppressierte Leitfähigkeitsdetektion die wichtigsten anorganischen Kationen detektiert werden (Tab. 4). Die Kalibration der eingesetzten Substanzen fand über den Bereich von 1 mg/l bis 1 g/l statt, wobei die Korrelationskoeffizienten nahe 1 lagen.

Tab. 4: Trennparameter der Kationenchromatographie mit einem ICS 90 System der Fa. Dionex

Säule	IonPac CS12A (4 x 250 mm), CG12A (4 x 50 mm)			
Flussrate	1,0 ml/min			
Injektionsvolumen	25 µl			
Eluent	Methansulfonsäure 0. 15. min ; isokratisch 20 mM			
Retentionszeiten	Lithium	3,1 min	Kalium	5,5 min
	Natrium	3,8 min	Magnesium	8,5 min
	Ammonium	4,4 min	Calcium	10,9 min

Im Ergebnis der Etablierung von Analysemethoden für den Prozess der Itaconsäurebildung konnte ein ionenchromatographisches Trennverfahren mit dem IC-System Dionex DX 600 unter Verwendung der Trennsäule IonPac AS11 entwickelt werden, welches die simultane Bestimmung des Zielproduktes Itaconsäure sowie der anionischen Nebenprodukte (Säuren des Tricarbonsäurezyklus) und anorganischer Anionen der Medien erlaubt. Die auf der Basis eines KOH-Gradienten beruhende Methode zeigt für die sichere Trennung der organischen Säuren eine hohe Linearität ($R^2=0,991$ bis $0,999$) im Konzentrationsbereich von 1 mg/l - 100 mg/l. Diese Methode steht als Routineanalytik für die Projektbearbeitung zur Verfügung. Zur Identifikation der Säuren konnte im begrenzten Umfang eine IC-MS-Kopplung im Department Umwelttechnik unter Verwendung der neu entwickelten IC-Methode genutzt werden.

Für die Bestimmung von möglichen nichtionischen Nebenprodukten (z.B. Polyole) konnte im Department Umweltmikrobiologie eine HPLC-Methode (Nucleogel ION 300 OA Säule mit 0,01 N H_2SO_4) angepasst werden, mit der die Bestimmung von D(+)-Arabitol, meso-Erythritol und D-Mannitol ermöglicht wurde.

Die Bestimmung der anorganischen Kationen konnte für die Bestandteile Lithium, Natrium, Ammonium, Kalium, Magnesium, Calcium mit Hilfe eines ICS 90 Systems realisiert werden.

Bezüglich der Ergebnisse der am UFZ etablierten Analysemethoden fand ein stetiger Erfahrungsaustausch mit dem Teilverbundpartner TU Dresden (Prof. Barth) sowie den Projektpartnern in Braunschweig (Prof. Lang und Dr. Willke) statt. Mit Hilfe der IC-MS-Kopplung konnten Nebenprodukte der Itaconsäurebildung mit *Aspergillus terreus* in Proben, welche aus Kultivierungen von der FAL Braunschweig (Dr. Willke, A. Kuenz) stammen, bestätigt und neu identifiziert werden.

1.2.2. Stammscreening

Zum Zeitpunkt der Etablierung der Prozessanalysemethoden (IC, HPLC) am UFZ waren die Arbeiten des Projektpartners TU-Dresden zur Entwicklung eines „high throughput“ Screeningsystems (Agartest) für itaconsäurebildende Hefen noch nicht abgeschlossen. Zum Erreichen des gemeinsamen Projektzieles im Bearbeitungszeitraum – Bereitstellung eines itaconsäureproduzierenden Hefestammes – wurde am UFZ umgehend mit dem Stammscreening unter Verwendung von Flüssigkulturen in Schüttelkolbenmaßstab begonnen. Der Schwerpunkt dieser Versuche lag daher bei der Wiederholung bisher in der Literatur beschriebener Untersuchungen mit Hefen. Zusätzlich wurden dabei auch die Medienbedingungen einzelner Versuche variiert um den Einfluß möglicher Limitationen zu untersuchen.

Screening nach itaconsäurebildenden Stämmen von (*Candida*) *Pseudozyma fusiformata*

Von Tabuchi et al. (1980, 81) wird eine Mutante von *Candida sp.* dargestellt, die bis zu 35 g/l Itaconsäure in 5 Tagen Kultivierung auf Glucose akkumuliert. Der Ausgangsstamm für die Mutagenese, welcher Itaconsäure schon in geringen Mengen produziert, wurde taxonomisch zunächst als *Candida fusiformata* (Buhagiar 1979, Tabuchi et al. 1981) eingeordnet und später als *Pseudozyma fusiformata* CBS423.96 (=CBS6951) in der Stammsammlung des Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) hinterlegt.

Nach Erwerb von der CBS wurde der Stamm CBS423.96 in einem Screening bei verschiedenen Medienbedingungen unterzogen. Dabei kam zum einen das von Tabuchi et al. (1981) verwendete Vollmedium zur Anwendung, sowie drei weitere Medienvarianten mit N-, P- bzw. Fe-Limitierung (Medienzusammensetzung siehe Anhang A. 1). Die Versuche wurden in 500 ml Schüttelkolben mit 100 ml Arbeitsvolumen bei 26 °C, pH 5,5-6,5 und 135 rpm über eine Dauer von acht Tagen durchgeführt.

Die IC-Analytik der vier Kultivierungen mit *Pseudozyma fusiformata* H485 (Stammbezeichnung am UFZ) ließ jedoch keine Anreicherung an Itaconsäure im Medium erkennen. Stattdessen konnte eine Zunahme der Peakfläche eines bisher nicht in die Kalibration aufgenommenen Stoffes beobachtet werden. Mittels IC-MS Kopplung wurde dieser unbekannt Peak als Malat identifiziert, welches in die IC-Standardanalytik integriert wurde. In Abb. 25 ist die Anreicherung von Malat unter den verschiedenen Limitationsbedingungen von *Pseudozyma fusiformata* H485 aufgezeigt. Die höchste Malat-Konzentration wurde mit 6,9 g/l nach 187 h Kultivierung für den Ansatz mit Stickstofflimitation verzeichnet. Neben Malat wurden keine weiteren Produkte gebildet. Bei Phosphor-, Eisen-Limitation sowie im Vollmedium lag die Endkonzentration zwischen 3,7 g/l und 3,9 g/l Malat.

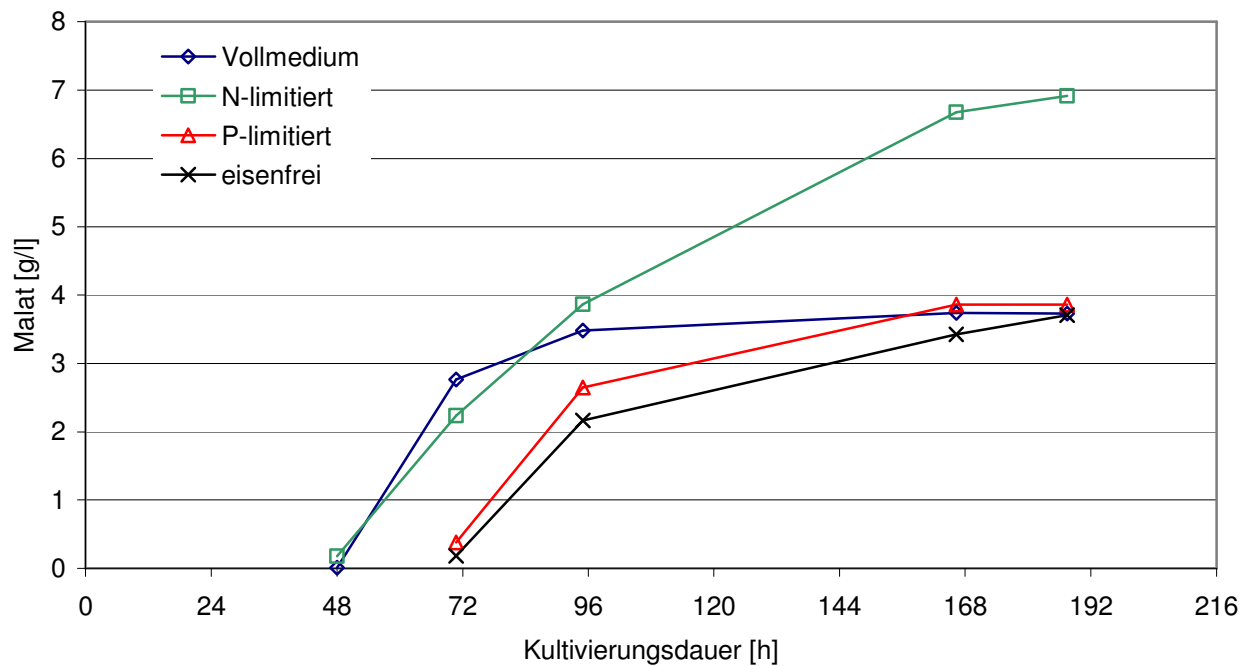


Abb. 25: Malat-Akkumulation im Medium durch den Stamm *Pseudozyma fusiformata* H485 (=CBS423.96) unter N-, P- und Fe-Limitation sowie im Vollmedium mit 100 g/l Glucose

Im Ergebnis dieser Untersuchungen konnte durch *Pseudozyma fusiformata* H485 (=CBS423.96) keine Itaconsäure akkumuliert werden und die Aussagen von Tabuchi et al (1981) müssen offenbar relativiert werden. Insbesondere unter Berücksichtigung der Detektionsmethode von Tabuchi et. al. liegt die Vermutung nahe, dass mit der damals verwendeten Dünnschichtchromatographie die beiden Säuren Malat und Itaconat nicht getrennt werden konnten und somit fälschlicherweise eine Akkumulation von Itaconsäure konstatiert wurde.

Screening nach itaconsäurebildenden Stämmen von *Pichia stipitis* und *Candida boidinii*

Ein Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen stammte aus einer im Rahmen einer BMBF-Studie am IBT Leipzig (Stottmeister & Weißbrodt 1991) angefertigten Arbeit, in welcher eine Reihe von Hefen auf ihre Fähigkeit zur Itaconsäurebildung untersucht wurden. Dabei konnten vier Stämme mit einer maximalen Itaconsäurekonzentration von 279 mg/l selektiert werden.

Ein Screening dieser vier Stämme - *Pichia stipitis* H410, *Candida boidinii* H414, H416 und H418 - erfolgte in dem von Stottmeister und Weißbrodt verwendeten Medium mit und ohne Phosphatlimitation (Medienzusammensetzung siehe Anhang A. 2) bei 30 °C in 500 ml Schüttelkolben mit 100 ml Arbeitsvolumen über 12 Tage.

Auch hierbei konnte in keinem Ansatz für keinen der Stämme Itaconsäure nachgewiesen werden. Dafür wurde wiederum die Anreicherung von Malat sowie die von Citrat und Isocitrat beobachtet werden. Der Stamm *Candida boidinii* H416 (DSM 700 33) zeigte unter Phosphatlimitation die höchste Gesamtsäureproduktion (3,8 g/l nach 9 d Kultivierung), wobei Citrat und Isocitrat mit jeweils ca. 1,7 g/l den Hauptanteil bildeten.

Screening nach itaconsäurebildenden Stämmen von *Yarrowia lipolytica*

Da in den bisherigen Versuchen mit keinem der in der Literatur genannten Hefestämmen eine Itaconsäureproduktion nachgewiesen werden konnte, wurden die Untersuchungen mit einem Screening von 21 *Yarrowia lipolytica* Stämmen aus der Stammsammlung des UFZ fortgesetzt. Die Hefeart *Yarrowia lipolytica* ist als effizienter Produzent von einigen organischen Säuren des

Tricarbonsäurezyklus ausgewiesen (Übersichten siehe Barth, Gaillardin 1996, 1997), wobei die Itaconsäurebildung mit dieser Hefe bisher nicht belegt werden konnte. Die im Screening eingesetzten Stämme entstammen der Suche nach 2-Oxoglutarsäurebildnern in den 80er Jahren.

Als Medium fand das phosphatlimitierte Screeningmedium von Stottmeister und Weißbrodt (1991, siehe Anhang A. 2) Anwendung, wobei das Screening in 500 ml Schüttelkolben mit 100 ml Arbeitsvolumen bei 28 °C und 130 rpm über 330 h stattfand. Im Verlauf dieser Versuche konnten mehrere *Y. lipolytica* Stämme selektiert werden, die während bzw. zum Ende des Versuches Itaconsäure im Medium akkumulierten. Als Nebenprodukte reicherten sie Aconitsäure, Citronensäure, Isocitronensäure, Malat und 2-Oxoglutarsäure im Medium an. Nach 94 h Kultivierung wurde die höchste Itaconsäurekonzentration durch *Yarrowia lipolytica* H435 mit 220 mg/l im Medium erreicht. Im Verlauf der Kultivierung (330 h) nahm diese aber wieder auf 70 mg/l ab.

Ein ähnlicher Verlauf zeigte sich auch bei den Stämmen *Y. lipolytica* H420, H427, H432, H433, H436 mit max. 150 mg/l zwischenzeitlicher Itaconsäureakkumulation. Für den Stamm *Yarrowia lipolytica* H430 wurde eine stetige Akkumulation von Itaconsäure über den gesamten Versuchsverlauf bis 120 mg/l nach 330 h beobachtet. Aconitat als direkte Vorstufe zum Itaconat wird zu Beginn der Kultivierung durch *Yarrowia lipolytica* H428 in einer Konzentration bis zu 380 mg/l im Medium angereichert (für H435 bis 250 mg/l).

Der Stamm *Y. lipolytica* H435 wurde zu diesem Bearbeitungszeitpunkt an den Projektpartner TU-Dresden zur weiteren gentechnischen Bearbeitung übergeben (siehe 1.1.3). In späteren Kultivierungen im Schüttelkolben und auch Bioreaktor wurde er mit einem weiteren potentiellen Itaconsäurebildner verglichen.

Screening nach itaconsäurebildenden Stämmen von *Rhodotorula* sp.

Einige *Rhodotorula* Stämme sollen laut Denbe (1981) in der Lage sein 15 g/l Itaconsäure im Medium zu akkumulieren. Um diese Angabe zu überprüfen wurden mit *Rhodotorula spec.* (RH7 – Stammbezeichnung UFZ) und *Rhodotorula rubra* (RH42 – Stammbezeichnung TU Dresden) Schüttelkolbenversuche im 100 ml Maßstab auf dem von Denbe beschriebenen Screeningmedium (siehe Anhang) durchgeführt. In diesem Medium wurde als Spurenelementequelle anstatt dem wie bisher üblichen Hefeextrakt die komplexe Medienkomponente Maisquellwasser (CSL) eingesetzt. Dies diente zusätzlich noch als Stickstofflieferant, wobei eine genaue Dosierung des Stickstoffes auf Grund der ungenauen Zusammensetzung des CSL nicht möglich war. Die beiden zuvor auf YM-Platten gewachsenen Stämme wurden auf Glucose als C-Quelle bei 28 °C über einen Zeitraum von 330 h kultiviert. Der pH-Wert wurde nach einsetzender Ansäuerung mit 40%iger NaOH auf $\text{pH } 6,0 \pm 0,2$ gehalten. Eine Zudosage von Säure war aufgrund einer leichten Alkalisierung, wahrscheinlich hervorgerufen durch Reduktion von im Maisquellwasser enthaltenen Nitrat, nicht notwendig.

Die Annahme, dass die verwendeten *Rhodotorula*-Stämme zur Bildung von Itaconsäure auf dem verwendeten Medium befähigt sein sollen, konnte nicht bestätigt werden. In keiner der über den Kultivierungszeitraum genommenen Proben konnte diese Säure nachgewiesen werden. Einzig die geringfügige Bildung von Pyruvat, Malat und 2-Oxoglutarat bei einer Gesamtsäure von unter 1 g/l konnte detektiert werden. Auf weitere Versuche wurde auf Grund der negativen Ergebnisse bezüglich Itaconsäurebildung verzichtet.

Screening nach itaconsäurebildenden Stämmen von *Pseudozyma* sp.

Ein weiterer Ausgangspunkt für Screenings basierte auf einer im Rahmen eines BMBF-Vorhabens am IBT Leipzig (Stottmeister & Weißbrodt 1991) angefertigten Studie, in welcher eine Reihe von Hefen auf ihre Fähigkeit zur Itaconsäurebildung untersucht wurden. In dieser Studie wurde im Literaturteil unter anderem auf japanische Arbeiten von Kawamura et al. (1981, 82, 83) mit *Pseudozyma (P.) tsukubaensis* hingewiesen. Drei Stämme dieser Hefeart, ehemals taxonomisch

als *Candida tsukubaensis* eingeordnet, produzierten bis zu 18 g/l Itaconsäure (Stamm 668) nach einer 8-tägigen Kultivierung.

Zur Verifizierung dieser Aussage wurden vier in öffentlichen Stammsammlungen verfügbare *Pseudozyma*-Stämme, *P. aphidis* H486 (CBS517.83), *P. fusiformata* H487 (CBS421.96), *P. tsukubaensis* H488 (CBS422.96) und *P. antarctica* H489 (CBS516.83) (H48X=interne UFZ-Bezeichnung), auf dem Medium nach Tabuchi (1981) und anschließend der für die Itaconsäurebildung aussichtsreichste Stamm (H488) auf dem von Kawamura et al. (1981, 82, 83) entwickelten Medium kultiviert. Die durchgeführten Screenings fanden wiederum im 500 ml Schüttelkolben mit einem Kulturvolumen von 100 ml statt. Das Medium wurde mit 500 mg CaCO₃ pro Kolben gepuffert und der pH-Wert bei dem im Tabuchi-Medium durchgeführten Versuchen mit 20%iger NaOH bei 5,5 gehalten. Kawamura wählte für sein Medium einen pH-Wert von 6,6, welcher ebenfalls nach beginnender Säurebildung mit 20%iger NaOH nachgestellt wurde. Es wurde bei diesem Medium auch eine Alkalisierung bedingt durch die Verstoffwechslung des eingesetzten CSL verzeichnet, welche jedoch so schwach ausfiel, dass keine pH-Einstellung dahingehend erfolgen musste.

Abb. 26 zeigt eine Zusammenstellung der wichtigsten Säuren, die nach Beendigung dieses Screenings erfasst werden konnten. Als Hauptprodukte fielen Pyruvat, Malat und Fumarat an. Zusätzlich wurde jedoch von dem Stamm *P. tsukubaensis* H488 auch die erwartete Itaconsäure gebildet. Auf dem Medium nach Tabuchi konnten dabei nach 160 h 50 mg/l nachgewiesen werden. Eine Überführung dieses Stammes in das von Kawamura eingesetzte, CSL und NaNO₃ enthaltende Medium brachte eine Steigerung der Itaconsäurekonzentration auf 160 mg/l.

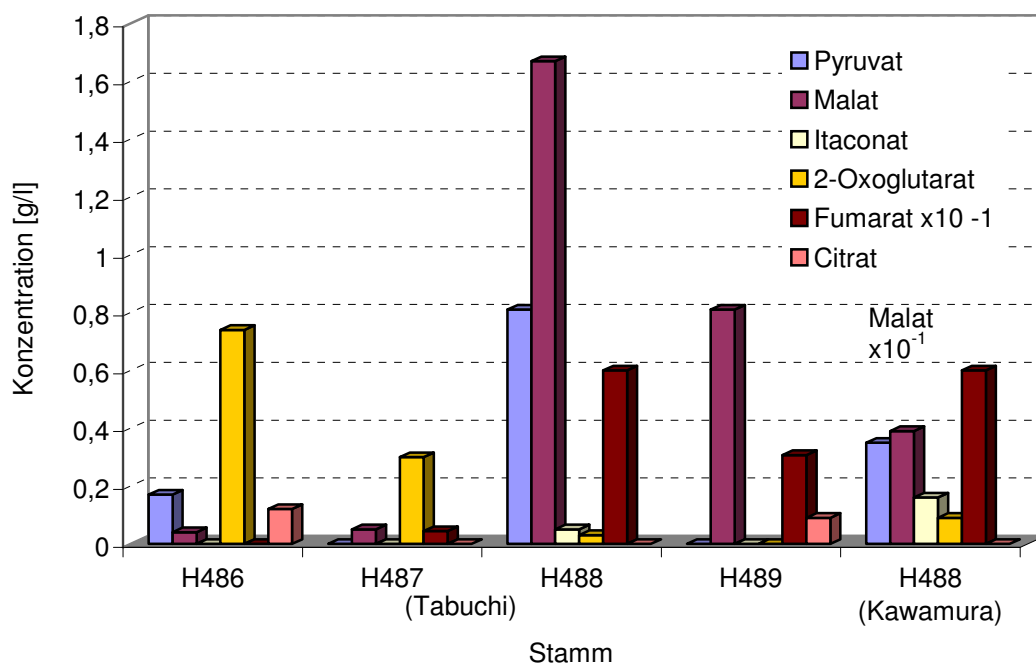


Abb. 26: Säurebildung der *Pseudozyma*-Stämme nach Beendigung der Kultivierung nach 160 h in Medien nach Tabuchi und Kawamura; Kultivierungsbedingungen: siehe Text

Die im Kawamura-Medium anfallenden Nebenprodukte wurden jedoch in Relation zum Itaconat in erheblich höheren Konzentrationen gemessen (Malat 3,9 g/l; Fumarat 6,0 g/l). Da aus den japanischen Originalarbeiten nicht ersichtlich war, ob die Versuche in Schüttelkolben oder Bioreaktoren erfolgten, wurde später ein Screening mit *Pseudozyma tsukubaensis* H488 in einem Bioreaktor unter Vermeidung der unvorteilhaften Bedingungen im Schüttelkolben bezüglich eines geringen Sauerstoffeintrages und ungenauer pH-Statierung durchgeführt.

Der gefundene Stamm *P. tsukubaensis* H488 wurde in später durchgeführten Vergleichskultivierungen mit dem ebenfalls im Schüttelkolben als aussichtsreich konstatierten Stamm *Y. lipolytica* H435 gegenüber gestellt.

1.2.3. Substratscreening, Entwicklung und Optimierung der Kultivierungsmedien

Ziel des Meilensteins 30.09.2005 war die Festlegung der Kultivierungsbedingungen für die Produktion von Itaconsäure. Aus Ermangelung eines geeigneten Stammes konnten dieser Evaluierungspunkt jedoch im geplanten Zeitrahmen nicht ausreichend bearbeitet werden, so dass er auch weiterhin im Fokus der Untersuchungen stand. Parallel zu weiteren Stammscreenings wurden dabei weitere Limitationsbedingungen für die zuvor gefundenen *Y. lipolytica* Stämme mit geringfügiger Itaconsäurebildung getestet. Im späteren Bearbeitungsverlauf des Projektes wurden zusätzlich die Kultivierungsbedingungen für das Wachstum und die bevorzugte Ausscheidung von Itaconsäure für den Stamm *P. tsukubaensis* H488 untersucht.

Medienscreening nach McKay (1994) zur Itaconsäurebildung mit *Y. lipolytica* H435

Neben der Untersuchung des Einflusses des Eisengehaltes auf das Wachstum und die Produktbildung von *Y. lipolytica*, welche keine verwertbaren Ergebnisse lieferte (2. Zwischenbericht), wurde ein Medienscreening bezüglich des Produktspektrums und notwendigen Limitationsbedingungen von *Y. lipolytica* nach McKay (1994) durchgeführt. Der Stamm wurde dabei in Medien mit Limitationen von Ammoniumstickstoff, Sulfat, Phosphat, Kalium, Magnesium und dem Vitamin B1 (Thiamin) kultiviert. Als Basis diente ein Yeast Nitrogen Base (YNB, siehe A. 5) Medium. Die Komponenten dieses Mediums wurden so variiert, dass das zu dem limitierenden Ion korrespondierende durch eine Ersatzverbindung substituiert wurde. Die genaue Medienzusammensetzung, abweichend von dem unlimitierten YNB-Medium, ist in der Tab. 5 aufgelistet.

Tab. 5: Umsetzung der gewünschten Limitationen im Medienscreening mit *Y. lipolytica* H435

Limitation	Konzentration der limitierenden Komponente	weitere Substitutionen
N-Lim	0,5 g/l NH ₄ Cl	---
S-Lim	1,2 mg/l MgSO ₄	+ 400 mg/l MgCl ₂
P-Lim	20 mg/l KH ₂ PO ₄	+ 550 mg/l KCl
P-Lim	30 mg/l KH ₂ PO ₄	+ 550 mg/l KCl
P-Lim	40 mg/l KH ₂ PO ₄	+ 550 mg/l KCl
K-Lim	4,4 mg/l KCl	- KH ₂ PO ₄ + 1 g/l Na ₂ HPO ₄
K-Lim	11 mg/l KCl	- KH ₂ PO ₄ + 1 g/l Na ₂ HPO ₄
Mg-Lim	1,5 mg/l MgCl ₂	- MgSO ₄ + 0,6 g/l Na ₂ SO ₄
Mg-Lim	5 mg/l MgCl ₂	- MgSO ₄ + 0,6 g/l Na ₂ SO ₄
Thiamin-Lim	0 µg/l Thiamin	---

Zur Vermeidung einer Übertragung von Medienkomponenten aus einer Vorkultur in die limitierte Hauptkultur wurde die Animpfstrategie geändert. Ausgehend von Agarplatten wurde die darauf herangewachsene Kultur in isotonischer Kochsalzlösung suspendiert und 2-3 Minuten auf einem Vortexer homogenisiert. Somit konnte zugleich eine gleichmäßige Verteilung der Biomasse auf alle Ansätze und damit eine Vergleichbarkeit des Wachstumsverhaltens gewährleistet werden. Als weitere Kultivierungsbedingungen wurden eine Temperatur von 30 °C und ein pH-Wert von 6,0, nachgestellt mit NaOH, festgelegt. Das Screening fand in 500 ml Schüttelkolben mit 100 ml Arbeitsvolumen auf einem Horizontalsschüttler mit 130 rpm statt.

Parallel zu dem Screening unter Limitationsbedingungen nach McKay wurde der Stamm H435 in einem Schüttelkolben im Medium Yeast 688 nach Kawamura et al. (1981, 82, 83) kultiviert. Hiermit

sollte getestet werden, ob das für *P. tsukubaensis* H488 eingesetzte Medium möglicherweise auch für *Y. lipolytica* H435 die notwendigen Limitationsbedingungen zur Itaconsäureproduktion erfüllt.

Bei der Auswertung dieses Screeningansatzes konnte in keiner der analysierten Proben die Bildung von Itaconsäure nachgewiesen werden. Erwartungsgemäß wurde jedoch von dem im N-limitierten Medium gewachsenen Stamm vorwiegend Citronen- und Isocitronensäure ausgeschieden. Eine Limitation von Sulfat, Kalium oder Magnesium führte zu einem stark vermindertem Wachstum und geringerer Säureausschüttung. Dabei wurde ersichtlich, dass eine Kaliumlimitation eher zur Produktion von Pyruvat führt, wohingegen eine Magnesiumlimitation die Produktion von 2-Oxoglutarat fördert. Die Versuche mit P-limitiertem Medium ließen eine Korrelation von Phosphatkonzentration und Wachstum erkennen, wobei fast ausschließlich Isocitronensäure gebildet wurde.

Wurde das Vitamin B1 (Thiamin), welches sowohl Cofaktor des Enzyms Pyruvatdehydrogenase wie auch 2-Oxoglutardehydrogenase ist, in Limitation gesetzt, konnten nur Pyruvat und 2-Oxoglutarat detektiert werden. Im unlimitierten Versuchsansatz konnte für *Y. lipolytica* H435 bezüglich der Säurebildung nur Pyruvat nachgewiesen werden. Die ausgewogene Zusammensetzung des Mediums führte hier zu einer erheblichen Biomassebildung, erkennbar an einem hohen Messwert für die OD₆₀₀.

Der Ansatz mit dem Medium Yeast 668 führte nur zur Bildung von Citronen- und Isocitronensäure (4,95 g/l bzw. 1,07 g/l). Itaconat oder dessen Vorstufe Aconitat konnten nicht detektiert werden.

Als Ergebnis dieser Versuche kann festgehalten werden, dass weder durch die Limitation einzelner Hauptkomponenten des Mediums YNB noch durch den Einsatz des Medium Yeast 668 von Kawamura die Hefe *Y. lipolytica* H435 befähigt war im Schüttelkolbenmaßstab Itaconsäure zu produzieren. Bezüglich der Projektbearbeitung am UFZ wurde dieser Stamm in nur noch einem weiteren Versuch im Laborreaktor getestet. Auch unter den verbesserten Bedingungen bezüglich des Sauerstoffeintrages zeigte er jedoch keine Produktion von Itaconsäure. Einzig die Bildung von Citronensäure (31,3 g/l) und Isocitronensäure (4,3 g/l) sowie Malat (5,1 g/l) waren nachweisbar. Als Ergebnis dieser Reaktorversuche stellte sich heraus, dass *Y. lipolytica* H435 auch unter den verbesserten Bedingungen bezüglich des Sauerstoffeintrages im Laborreaktor keine Produktion von Itaconsäure zeigte. Einzig die Bildung von Citronensäure (31,3 g/l) und Isocitronensäure (4,3 g/l) sowie Malat (5,1 g/l) waren nachweisbar (2. Zwischenbericht). Von weiteren Versuchen mit dem Stamm *Y. lipolytica* H435 wurde abgesehen und stattdessen mit der vertieften Untersuchung des in einem vorangegangenen Screening gefundenen Stammes *P. tsukubaensis* H488 fortgefahren.

Variation der Medienzusammensetzung bei der Kultivierung von *P. tsukubaensis* H488

Für den Stamm *P. tsukubaensis* H488 wird nach Kawamura (1981, 82, 83) die Kultivierung auf dem Medium Yeast 668 beschrieben. Dieses enthält als Quelle für Spurenelemente Maisquellwasser (CSL). Die Substitution von undefinierten Medienkomponenten, wie in diesem Fall Maisquellwasser, durch ein bekanntes Spurenelementegemisch ist jedoch Voraussetzung, um ein gezieltes Screening unter verschiedenen Limitationsbedingungen durchführen zu können. Um die Fähigkeit des Stammes H488 zur Produktion von Itaconsäure unter veränderten Medienzusammensetzungen zu untersuchen, wurde dieses Screening durchgeführt.

Das Medium Yeast 668 wurde dazu insoweit abgeändert, dass in einem Kolben (A) das Maisquellwasser durch 2,5 g/l Hefeextrakt ersetzt wurde, in einem weiteren Kolben (B) an Stelle dessen eine Spurenelementemischung zum Einsatz kam und in einem 3. Kolben (C) das Maisquellwasser ersatzlos aus dem Ansatz entfernt wurde. Zusätzlich wurde ein Kolben (D) mit dem unveränderten Medium angesetzt. Die Temperatur bei diesem Versuch betrug 30 °C. Der pH-Wert wurde mit 500 mg CaCO₃ pro Kolben gepuffert und über die Versuchsdauer von 310 h mit 20 % NaOH bzw. 2 N HCl bei pH 6,6 konstant gehalten.

Tab. 6: Gebildete Säuren am Ende des Screenings in modifizierten Yeast 668 Medium;
 Kolben A mit Hefeextrakt; Kolben B mit Spurenelementemischung; Kolben C Maisquellwasser entfernt, ohne weiteren Zusatz; Kolben D Standard Yeast 688 Medium, ungepuffert

Kolben	Pyruvat	Malat	Itaconat	2-OGA	Fumarat
A	0,87	0,01	0,0	0,01	0,12
B	13,22	2,77	0,08	1,90	0,72
C	0,32	2,27	0,01	0,21	0,84
D	0,43	1,00	0,14	0,14	0,44

Wie aus der Tabelle Tab. 6 ersichtlich wird, war eine Substitution des Maisquellwassers nicht erfolgreich. Eine Itaconsäureproduktion konnte nur in dem Kolben mit der Spurenelementemischung verzeichnet werden, wobei diese unter den bisher mit diesem Stamm erzielten Konzentrationen lag. Außerdem wurden in diesem Ansatz Pyruvat, Malat und 2-Oxoglutarat in beachtlichen Mengen gebildet. Vor allem die Pyruvatkonzentration von 13,22 g/l lässt darauf schließen, dass *P. tsukubaensis* H488 wahrscheinlich eine Auxotrophie für Thiamin besitzt, welches in der Spurenelementemischung nicht vorhanden war. Dadurch wäre auch der erhöhte Wert für die 2-Oxoglutar Säure zu erklären.

Kolben A, welcher mit Hefeextrakt angesetzt wurde, zeigte zwar ein gutes Wachstum aber kaum Säurebildung. Das Wachstum in Kolben C stagnierte auf Grund des vollständigen Fehlens von Spurenelementen fast vollständig. Auch hier wurden nur geringe Konzentrationen an Säuren detektiert, darunter 10 mg/l Itaconat.

In dem Vergleichskolben, der mit dem unveränderten Medium Yeast 668 parallel zu dem Screening mitgeführt wurde, konnte die Fähigkeit von *P. tsukubaensis* H488 zur Itaconsäurebildung (140 mg/l nach 5 Tagen) bestätigt werden. Die Vermutung liegt daher nahe, dass in dem Maisquellwasser Spurenelemente oder Vitamine enthalten sind, die nicht im Hefeextrakt vorkommen und welche die Produktion von Itaconsäure begünstigen.

Substratscreening

Hinweise aus der Literatur (Boekhout and Fell, 1998; Wang et al, 2006) zufolge ist die Hefe *P. tsukubaensis* in der Lage ein weites Substratspektrum zu verwerten. Zur Verifizierung dieser Angaben und Testung weiterer Substrate, insbesondere Öle, wurde ein entsprechendes Screening auf dem Medium nach Kawamura (siehe A. 4) durchgeführt. Dabei lag das Hauptaugenmerk anfänglich mehr auf dem Zuwachs von Biomasse als auf einem Screening nach Itaconsäurebildung. Um sicher zu stellen, dass in allen Schüttelkolben eine identische Anfangsbiomassekonzentration vorlag wurde ein neues Animpfverfahren entwickelt. Die auf Readeragar 48 h gewachsene Hefe wurde mit einer Impföse aufgenommen und in 50 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Davon wurden jeweils 3 ml zum Animpfen der Kolben verwendet.

Das Substratscreening wurde mit acht verschiedenen C-Quellen durchgeführt, deren Konzentration 100 g/l betrug. Getestet wurden Glucose und Fructose (Monosaccharide), Saccharose, Lactose und Maltose (Disaccharide), Stärke (Polysaccharid), Glycerin und Rapsöl.

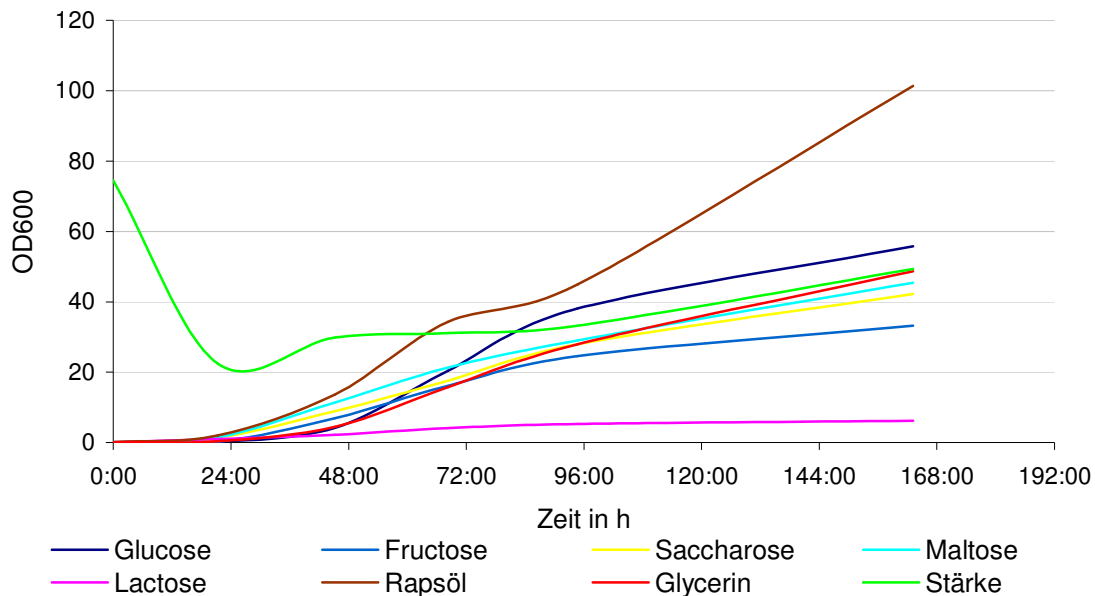


Abb. 27: Darstellung des Wachstums von *P. tsukubaensis*

P. tsukubaensis ist in der Lage, fast alle verwendeten Substrate zu verwerten (Abb. 27). Eine Ausnahme bildet Lactose, bei deren Einsatz kaum ein Wachstum zu verzeichnen war. Rapsöl erwies sich neben Glucose als aussichtsreichste C-Quelle. Jedoch ist im Kolben mit Rapsöl nicht auszuschließen, dass ein Teil der gemessenen optischen Dichte durch emulgierte Öltröpfchen hervorgerufen wird. Im Laufe der Kultivierung wurde das Öl von der Hefe emulgiert und es konnte eine stetige Zunahme der Trübung im Kolben durch das Medium beobachtet werden. Nach abzentrifugieren der Proben war dennoch eine sehr starke Biomassebildung zu erkennen. Der OD-Verlauf des Kolbens mit Stärke ist auf die anfängliche Trübung des Mediums durch die relativ hohe Konzentration an Substrat zurückzuführen. Während der Kultivierung verringerte sich die Viskosität der Biosuspension und auch die Trübung nahm durch den Abbau der Stärke ab. Neben Lactose ließ sich auch Fructose nicht besonders gut von der Hefe verwerten. Saccharose als Disaccharid aus Glucose und Fructose führte zu besserem Biomassewachstum. Glycerin, Maltose und Stärke unterschieden sich in ihren OD-Endwerten nicht wesentlich, allerdings kamen die Hefen bei Maltose deutlich schneller in die exponentielle Wachstumsphase. Die Ursachen für ein verzögertes, dann jedoch schnelleres Wachstum auf Glucose sind nicht geklärt.

Einfluss von Eisen im Medium nach Kawamura et al.

Bei bisherigen Reaktorversuchen mit hoher Itaconsäurebildung konnte ein Anstieg der Eisenkonzentration hauptsächlich zum Zeitpunkt der beginnenden linearen Produktbildung im Medium detektiert werden. Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass Eisen einen Einfluss auf den Itaconsäuremetabolismus hat. Dabei ist es denkbar, dass Eisen als Komplexbildner zu Beginn der Kultivierung gebunden im Medium vorliegt und vorerst nicht für den Stoffwechsel zur Verfügung steht. Ist die Hefe dann in der Lage diese Komplexe aufzuspalten, ist das Eisen frei für den Stoffwechsel der Hefe verfügbar und die Produktion beginnt. Dabei sei an den Eiseneinfluss bei der Citronensäureproduktion mit *A. niger* verwiesen, wobei eine geringe Verfügbarkeit von Eisen das Enzym Aconitase hemmt und es somit zur Ausschleusung von Citronensäure kommt [Stottmeister et al., 1982]. Eine Isomerisierung zu Isocitronensäure ist nur begrenzt möglich und auch das Zwischenprodukt Aconitsäure, welches weiter zu Itaconsäure decarboxyliert werden kann, bleibt im Mangel. Durch eine erhöhte Eisenkonzentration kann dies verhindert werden. Ein möglicher Einfluss sollte in den folgenden Schüttelkolbenscreenings näher untersucht werden.

Um den Einfluss von Eisen auf *P. tsukubaensis* H488 näher beschreiben zu können, wurde dem Medium nach Kawamura et al. zusätzlich Eisen in Form von 15 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ zugesetzt.

Dabei konnte festgestellt werden, dass es im Kolben mit Eisenzusatz zu deutlich höherem und schnellerem Biomassezuwachs kam (Abb. 28).

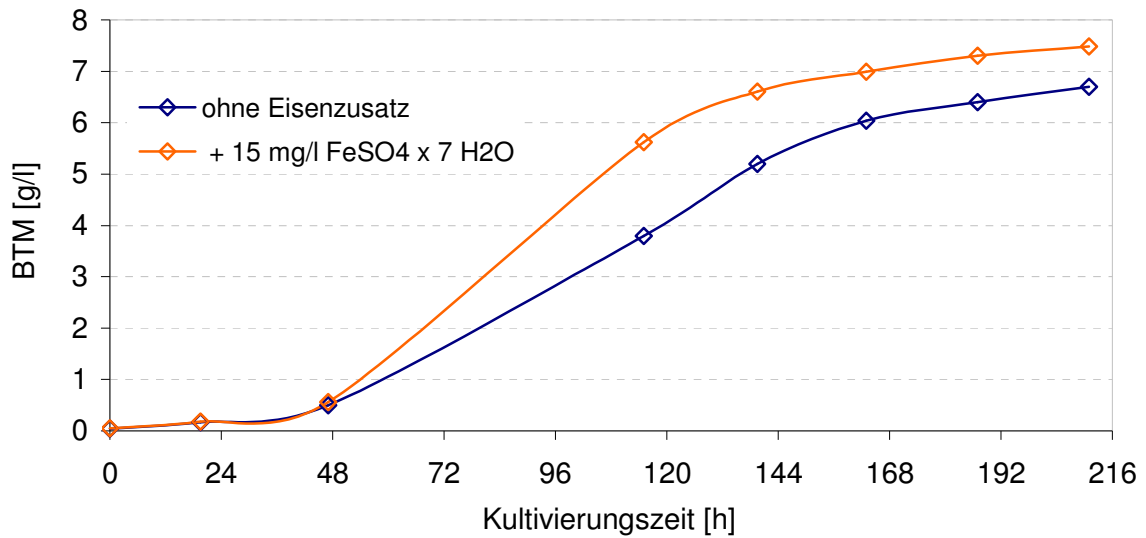


Abb. 28: Verlauf der Biotrockenmasse bei der Kultivierung von *P. tsukubaensis* ohne und mit Zugabe zusätzlichen Eisens (15 mg/l FeSO₄ x 7 H₂O)

Kultivierungsbedingungen: 500 ml-Schüttelkolben; Medium nach Kawamura et al.; T = 30 °C; Schüttelfrequenz 130 rpm; Animpfverhältnis 1:30

Auch ließen sich Unterschiede im Produktmuster erkennen. Zu Versuchsende nach 211 h konnten im Testansatz mit dem unveränderten Medium 2,2 g/l Itaconsäure detektiert werden. In jenem mit 15 mg/l FeSO₄ x 7 H₂O lagen zu diesem Zeitpunkt 3,5 g/l Itaconsäure im Medium vor, wobei dieser Wert bereits nach 140 h erreicht wurde. Die detektierten Nebenprodukte lagen in beiden Kolben in ähnlichen Konzentrationen vor. Hauptsächlich war dies Malat mit ca. 4,2 g/l in beiden Kolben. Die Nebenprodukte Lactat, Pyruvat, Fumarat und Ketoglutarat lagen in Konzentrationen unter 0,5 g/l vor (Abb. 29).

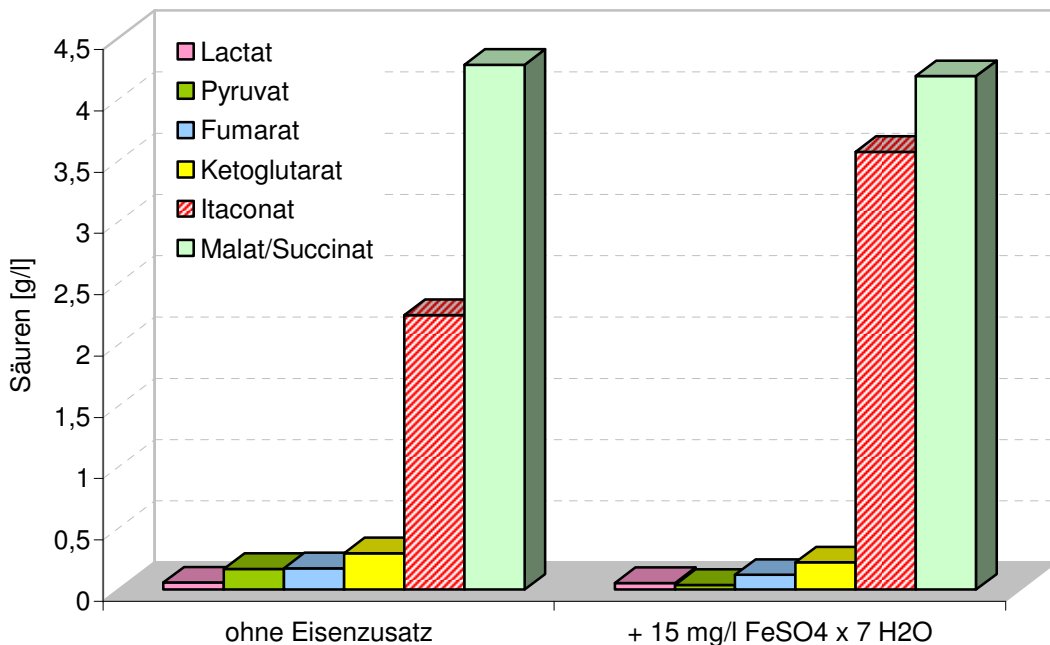


Abb. 29: Itaconsäure- und Nebenproduktbildung durch *P. tsukubaensis* ohne und mit Zugabe zusätzlichen Eisens nach einer Kultivierungsdauer von 211 h

Kultivierungsbedingungen: 500 ml-Schüttelkolben; Medium nach Kawamura et al.; T = 30 °C; Schüttelfrequenz 130 rpm; Animpfverhältnis 1:30

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde ein weiteres Screening mit Zugabe von 30 mg/l und 45 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ durchgeführt. Als Referenz diente hierbei ein Ansatz mit 15 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$. Im Schüttelkolben mit 30 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ konnte eine weitere Steigerung von Biomassezuwachs und Produktbildung beobachtet werden. Bei noch höheren Eisenkonzentrationen trat dann eine Hemmung auf, welche sich ebenfalls in diesen Kennwerten widerspiegelt (Tab. 7).

Tab. 7: Itaconsäure- und Nebenproduktbildung durch *P. tsukubaensis* mit Zugabe von zusätzlich 15 mg/l, 30 mg/l und 45 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ nach einer Kultivierungsdauer von 187 h

additive Zugabe $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ [mg/l]	BTM [g/l]	Gebildete Säuren [g/l]					
		Lactat	Pyruvat	Fumarat	Keto- glutarat	Itaconat	Malat
15	6,8	0,11	0,11	0,18	0,14	1,93	4,61
30	7,3	0,11	0,13	0,13	0,14	2,17	4,50
45	6,3	0,11	0,18	0,22	0,10	1,47	4,51

Kultivierungsbedingungen: 500 ml-Schüttelkolben; Medium nach Kawamura et al.; T = 30 °C; Schüttelfrequenz 130 rpm; Animpfverhältnis 1:30

Auch bei diesem Ansatz lagen die Nebenprodukte in sehr ähnlichen Konzentrationen vor. Der höchste Itaconsäuremesswert lag bei ca. 2,2 g/l im Kolben mit zusätzlich 30 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$.

Eine höhere als im ursprünglich verwendeten Medium nach Kawamura et al. Eisenkonzentration hat sich bei diesen Testansätzen als förderlich für Biomassewachstum und Produktbildung erwiesen. Demnach werden zusätzlich bis 30 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ im Kawamura-Medium von *P. tsukubaensis* sehr gut toleriert und führen zu schnellerem Wachstum und vermehrter Ausscheidung von Itaconsäure. Ein ähnlicher Effekt wurde bei *A. terreus* beobachtet, wobei allerdings die Konzentrationen von Eisen deutlich niedriger lagen [Welter, 2000].

Ein Vergleich beider Screenings zur Untersuchung des Einflusses der Eisenkonzentration zeigt anhand des Kolbens mit 15 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ Probleme der Reproduzierbarkeit. Es liegt dabei nahe, diese mit der Inkonsistenz des CSL zu begründen.

Entwicklung eines synthetischen Mediums zur Biomasseanzucht

Da in allen bislang durchgeführten Versuchen zur Itaconsäureproduktion mit *P. tsukubaensis* die Reproduzierbarkeit nur unzureichend erzielt werden konnte, erscheint eine Substitution des komplexen Medienbestandteils CSL sinnvoll. Vollständig definierte Kultivierungsbedingungen sind eine Grundvoraussetzung für die stoffwechselphysiologische Untersuchung notwendiger Limitationsbedingungen. Das bisher verwendete Medium nach Kawamura et al. erwies sich deshalb für das Verständnis des Prozesses als ungeeignet. Eine wirtschaftliche Notwendigkeit zum Ersetzen des CSL besteht nicht.

Im Rahmen der Entwicklung eines synthetischen Wachstumsmediums zum CSL-Ersatz wurden verschiedene Medienzusammensetzungen entwickelt und im Schüttelkolben getestet. Ausgangspunkt war dabei vorerst eine Nachahmung der angenommenen CSL-Inhaltsstoffe. Als Orientierung wurde dabei eine von Seidel (1999) aufgeführte Teilanalyse des CSL genutzt (siehe Anhang A.3). Demnach besteht CSL zu etwa 50 % aus Trockenmasse und enthält neben den Makroelementen Eisen, Phosphor, Calcium, Zink und Kalium größere Mengen an Lactat. Weiterhin ist es eine reichhaltige Quelle von Proteinen und Aminosäuren. Es ist anzunehmen, dass CSL auch Lieferant sämtlicher Spurenelemente, vieler Vitamine und anderer Ergänzungsstoffe ist.

In einem orientierenden Screening wurde das CSL im bisher verwendeten Medium nach Kawamura et al. durch verschiedene oben genannte Komponenten ersetzt. Zum Einsatz kamen dabei die Spurensalzlösung des YNB-Mediums und zwei Vitaminlösungen mit unterschiedlichem Vitamingehalt. Die Vitaminlösung nach Kao and Michayluk enthielt dabei bedeutend mehr Vitamine als jene nach Gamborg (siehe A. 10). Als Lieferant für Aminosäuren kam tryptisch verdautes

Pepton aus Casein (Trypton) zum Einsatz, da es sich durch einen besonders hohen Gehalt an freien Aminosäuren auszeichnet und frei von verwertbaren Kohlenhydraten ist. In einem Kolben wurde getestet, in wie weit sich das ersatzlose Streichen sämtlicher organischer Komponenten auf das Wachstum von *P. tsukubaensis* auswirkt. Dazu wurde das CSL im Medium nach Kawamura et al. einzig durch die Zugabe der Spurensalzlösung und Eisen ersetzt. Als Referenz wurde ein Kolben mit dem Standardmedium nach Kawamura mitgeführt. In Tab. 8 sind die verschiedenen Ansätze näher erläutert.

Tab. 8: Übersicht über verschiedene Testansätze zum CSL-Ersatz

Ansatz	Spurensalze und Eisen	hinzugefügte Komponenten			Biotin
		Trypton	Kao and Michayluk	Gamborg	
A	x				
B	x	x			
C	x	x	x		
D	x		x		
E	x	x		x	
F	x	x		x	x
G	x			x	x

Da in diesem Screening die weiteren Medienbestandteile in ihrer Konzentration nicht verändert wurden, kam es dazu, dass Phosphat, welches im Medium nach Kawamura et al. auch durch CSL eingetragen wird, in zu geringen Mengen vorlag. Somit ist die BTM-Differenz der synthetischen Testansätze zum Referenzkolben (Abb. 30) zu erklären. Unterschiede im Wachstumsverhalten der Biomasse konnten trotzdem gut beobachtet werden.

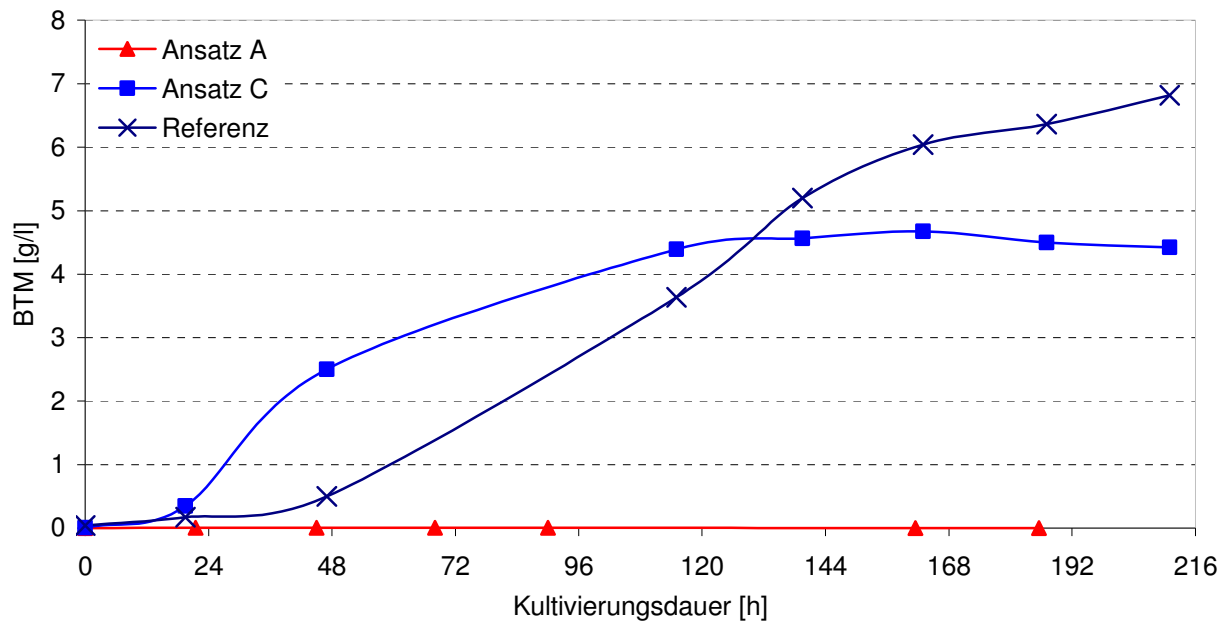


Abb. 30: Biomassewachstum von *P. tsukubaensis* im Medium nach Kawamura et al. und den synthetischen Ansätzen A und C

Kultivierungsbedingungen: 500 ml-Schüttelkolben; T = 30 °C; Schüttelfrequenz 130 rpm; CSL-Ersatz; Animpfverhältnis 1:30 Medienzusammensetzung laut Tab. 8

Abb. 30 zeigt den Biomasseverlauf der Kolben A und C im Vergleich zu der bisherigen Referenz mit CSL. Ansatz C, welcher mit dem umfangreichsten Komponentenspektrum angesetzt wurde, zeigte innerhalb der getesteten synthetischen Medien erwartungsgemäß das beste Biomassewachstum. Deutlich zu sehen ist, dass *P. tsukubaensis* im Medium nach Kawamura et al. bedeutend später in die exponentielle Wachstumsphase kam als dies beim synthetischen Medium der Fall war. Es ist anzunehmen, dass in Ansatz C größere Mengen sofort verwertbarer Aminosäuren vorliegen. Somit müssen nicht erst entsprechende Enzyme gebildet werden, die

komplexere Proteinstrukturen vor Transport in die Zelle spalten. Die verlängerte lag-Phase kann andererseits auch durch Hemmwirkung im CSL enthaltener Komponenten oder nicht optimaler Konzentrationen dieser entstehen. Besonders deutlich geht aus dieser Darstellung hervor, dass es in dem Ansatz, der weder Vitamine noch Aminosäuren enthielt (A) zu gar keinem Zuwachs an Biomasse kam. *P. tsukubaensis* benötigt demnach zusätzlich zu Nährsalzen und Kohlenstoffquelle noch weitere organische Ergänzungsstoffe.

Auch der Einfluss von Aminosäuren und Vitaminen konnte im Rahmen dieses Screenings beurteilt werden. Demnach wirken sich beide Komponenten positiv auf das Kulturwachstum aus, in besonderem Maße jedoch die Aminosäuren, welche strukturelle Zellbestandteile sind. Allein durch einen Zusatz von Trypton ließ sich Biomassewachstum erzielen, welches, nach anfänglicher Verzögerung, dem des Referenzkolbens nahe kam. Nur durch den alleinigen Zusatz von Vitaminen, wie in den Ansätzen D und G, war das Biomassewachstum zwar möglich, aber stark verlangsamt. Ein optimaler Biomassezuwachs wurde nur durch Zugabe beider Supplemente erreicht. Hierbei spielt die verwendete Vitaminlösung nur noch eine untergeordnete Rolle. Der Ansatz mit der komplexen Vitaminlösung nach Kao and Michayluk (D) zeigte gegenüber jener nach Gamborg nur einen geringen Vorteil in der Wachstumsgeschwindigkeit, welcher zudem durch Addition von Biotin vollständig ausgeglichen werden konnte. Ein Versuchsansatz mit Biotin als einzigem Vitamin steht noch aus.

Das bestmögliche Biomassewachstum von *P. tsukubaensis* H488 in den getesteten synthetischen Medien wurde bei jenem mit dem vielfältigsten Komponentenangebot beobachtet. Nach einer Anpassung des Phosphatgehaltes auf den im Medium nach Kawamura et al. tatsächlich vorliegenden, erreichten die Biomassewerte des synthetischen Mediums ähnliche Größenordnungen wie jene des Komplexmediums, welches bereits um 15 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ergänzt wurde. Dies konnte in zwei Versuchen nachgewiesen werden, wobei im synthetischen Medium durchschnittlich 6,8 g/l, im Medium nach Kawamura et al. etwa 7 g/l Biotrockenmasse gebildet wurden.

Variation der Zusammensetzung des synthetischen Mediums und Einfluss auf die Produktbildung

Da ein synthetisches Medium entwickelt werden konnte, in welchem das Biomassewachstum gleichwertig dem im Medium nach Kawamura et al. war, sollte in weiteren Schüttelkolbenversuchen der Einfluss verschiedener Komponenten auf die Itaconsäurebildung untersucht werden. Dazu zählten Lactat, Pyruvat und Eisen, welche dem im synthetischen Medium zugesetzt wurden, und Zink und Kupfer deren Konzentration herabgesetzt wurde.

Eisen

Aufgrund der sich im Medium nach Kawamura et al. positiv auswirkenden Steigerung der Eisenkonzentration sollte dies auch im synthetischen Medium untersucht werden. Dazu wurde in einem Kolben die Eisenzugabe von 15 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ auf 30 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ verdoppelt. Der im Medium nach Kawamura et al. aufgetretene Effekt konnte hierbei nicht beobachtet werden. Bei dem Ansatz mit doppeltem Eisengehalt im synthetischen Medium wurde sogar ein schlechteres Biomassewachstum verzeichnet. Auch hatte Eisen hier keinerlei Einfluss auf die Itaconsäurebildung

Zink und Kupfer

Die eingesetzte Spurensalzlösung enthielt Zink und Kupfer. Die letztendlich im Medium vorliegende Konzentration an $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ betrug 400 µg/l, jene von $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ 40 µg/l. Unter diesen Bedingungen konnte nur eine minimale Sekretion von Itaconsäure nachgewiesen werden. In der Literatur wird jedoch beschrieben, dass Aconiat-Decarboxylase aus *A. terreus* u.a. durch Zink und Kupfer gehemmt wird (Dwiarti et al., 2002). Ausgehend davon wurde eine neue

Spurensalzlösung hinsichtlich des Zink- und Kupfergehaltes so modifiziert, dass beide Komponenten nur noch zu einem Viertel enthalten waren. Bei diesem Versuch war ein verlangsamtes Wachstum der Biomasse zu beobachten und die erreichten Biomasse-Endwerte lagen unter denen des Referenzkolbens. Allerdings konnte zu Versuchsende mit etwa 0,3 g/l mehr Itaconsäure nachgewiesen werden

Lactat und Pyruvat

Um den Einfluss der Stoffwechselmetabolite Lactat und Pyruvat auf die Produktbildung beurteilen zu können, wurden diese dem synthetischen Medium zugesetzt. Im Wachstumsverhalten konnte nur ein geringfügiger Unterschied zum Referenzkolben festgestellt werden. Durch die Zugabe von 4 g/l Lactat konnte bezüglich der Produktbildung kein besonderer Effekt erreicht werden. Lactat wurde im Laufe der Kultivierung von *P. tsukubaensis* fast vollständig mit verstoffwechselt (Tab. 9). Unter Zugabe von 2 g/l Pyruvat konnte eine sofortige Bildung von ca. 0,3 g/l Itaconsäure nachgewiesen werden. Dieser Wert veränderte sich während der weiteren Kultivierung nicht wesentlich. Daraufhin erfolgte ein weiterer Testansatz, in welchem anfänglich ebenfalls 2 g/l Pyruvat vorlagen. Auch in diesem Versuch konnte die unmittelbare Bildung von ca. 0,2 g/l Itaconsäure nachgewiesen werden, welche dann stagnierte. Nach Zudosierung von weiteren 2 g/l Pyruvat lagen dann bis zum Versuchsende ca. 0,4 g/l Itaconsäure vor. Ein Überschuss an Pyruvat induziert offenbar eine minimale Bildung von Itaconsäure. Vermutlich kommt es im Citrat-Zyklus durch das Überangebot an Pyruvat zu einer kurzzeitigen Aufstaureaktion, wodurch Itaconsäure sekretiert wird.

Tab. 9: Itaconsäure- und Nebenproduktbildung durch *P. tsukubaensis* bei Variation der Zusammensetzung des synthetischen Mediums nach einer Kultivierungsdauer von 187 h

Kultivierungsbedingungen: 500 ml-Schüttelkolben; T = 30 °C; Schüttelfrequenz 130 rpm; CSL-Ersatz; Animpfverhältnis 1:30

Ansatz	Gebildete Säure [g/l]						
	Lactat	Pyruvat	Malat	Itaconat	Ketoglutarat	Fumarat	Citrat
Referenz	0,14	0	4,24	0,15	0,03	0,24	0,05
+ Eisen	0,20	0	3,85	0,12	0	0,21	0,05
- $\frac{3}{4}$ Zn & Cu	0,14	0	4,09	0,27	0	0,22	0,06
+ 4 g/l Lactat	0,11	0	5,12	0,11	0,04	0,45	0,06
+ 2 g/l Pyruvat	0,17	0,18	4,48	0,26	0,05	0,34	0,06
+ 2 g/l Pyruvat + Nachdos. 2 g/l	0,15	0,48	5,68	0,39	0,05	0,41	0,07

Bei keinem der Testansätze konnte eine nennenswerte Produktbildung verzeichnet werden. Es wurden lediglich geringe Zunahmen der Itaconsäurekonzentration verzeichnet, welche einen Bereich von 0,4 g/l Itaconsäure nicht überschritten. Als Hauptprodukt wurde in allen Kolben Malat von *P. tsukubaensis* sekretiert. Eine Optimierung des synthetischen Mediums bezüglich der Konzentrationen der Spurenelemente könnte zu einer erheblichen Steigerung der Itaconsäureproduktion führen. Sowohl bei der Itaconsäureproduktion mit *A. terreus* [Willke et al., 2001] als auch bei der Citronensäureproduktion mit *A. niger* wirken sich bereits geringe Konzentrationen bestimmter Komponenten, wie z.B. Mangan, negativ auf die Produktausbeute aus. Dabei ist zu beachten, dass bereits durch die Verwendung nicht hochreiner Chemikalien ein Eintrag von Spurenelementen stattfindet, welcher sich im Folgenden negativ auf die Produktbildung auswirken kann.

Aus den Ergebnissen dieses Arbeitspakets konnten zwei Medien gewonnen werden. Zum einen wurde das Medium nach Kawamura weiterentwickelt und dient als Referenz zur gesicherten Itaconsäureproduktion im Schüttelkolben und später auch im Bioreaktormaßstab. Zum anderen konnte ein rein synthetisches Medium gefunden werden, welches optimales Biomassewachstum zulässt, jedoch noch hinsichtlich der Itaconsäureproduktion optimiert werden muss.

Medium nach Kawamura (modifiziert)

KH ₂ PO ₄	0,05 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g/l
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	15 mg/l
NaNO ₃	2 g/l
Glucose	50-100 g/l
CSL	2 g/l

Synthetisches Medium

KH ₂ PO ₄	0,1 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g/l
NaNO ₃	2 g/l
Glucose	100 g/l
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	15 mg/l
Spurensalzlösung	0,1 %
Vitaminlösung	1 %
Trypton	2 g/l
CaCO ₃	5 g/l

1.2.4. Optimierung der verfahrenstechnischen Parameter im Laborreaktormaßstab

Übertragung des Schüttelkolbenprozesses in den Bioreaktor

Ein wesentlicher Parameter bei obligat aeroben Bioprozessen wie der Itaconsäuregewinnung mit *Aspergillus terreus* ist der Zustand der Sauerstoffversorgung der Zellen sowie der Mischungs- und Zustand des Kulturmediums. Kurzzeitige Unterbrechungen der Sauerstoffversorgung führen zu irreversiblen Schädigungen des Säurebildungsprozesses. (Kuenz, 2006) Eine Kontrolle der gelöstsauerstoffkonzentration pO_2 ist bei Schüttelkolbenkultivierungen jedoch nicht möglich. Deshalb kann bei der Übertragung des Itaconsäurebildungsprozesses mit *P. tsukubaensis* in den Bioreaktormaßstab aufgrund einer gesicherten O₂-Versorgung und Durchmischung des Mediums mit einer Steigerung der Produktivitäten und einer möglichen Veränderung des Produktspektrums gerechnet werden.

Schon während der ersten Versuche zur Optimierung der Medien- und Festlegung der Limitationsbedingung wurden erkundende Reaktorversuche zur Übertragung des Itaconsäurebildungsprozesses in den 2 l Laborbioreaktormaßstab mit dem Stamm *P. tsukubaensis* H488 im Medium nach Kawamura (siehe A. 4) durchgeführt. Auf die Pufferung mit CaCO₃ wurde aus apparate-technischen Gründen verzichtet. Die Nachstellung des pH-Wertes erfolgte mit 10%iger NaOH bzw. 0,5 N HCl. Als Laborreaktor kam ein 2 l Braun-Reaktor mit MD2 Steuereinheit zum Einsatz. Die Sauerstoffversorgung kann dabei wahlweise über Druckluft oder aber auch mit reinem Sauerstoff erfolgen.

Wie vermutet konnte durch die Überführung des Prozesses in den Laborreaktormaßstab eine Steigerung der Itaconsäureproduktion auf eine Konzentration von 31,4 g/l erreicht werden. Dies entsprach einer Produktivität von 0,18 g/l*h. Die Gesamtsäurekonzentration lag bei 39,4 g/l, wobei als überwiegendes Nebenprodukt Pyruvat (6,2 g/l) anfiel (Abb. 31). Durch die Verwendung einer IC-MS-Koppelung des Departments Umwelttechnologie am UFZ konnte die Zuordnung der Peaks zu den entsprechenden Säuren bestätigt werden. Bezüglich der Limitation für die Itaconsäuresekretion kann zu diesem Zeitpunkt von einer kombinierten Stickstoff- und Phosphatlimitation ausgegangen werden (siehe Verlauf Nitrat und Phosphat in Abb. 31). Auch Beachtung fand jedoch auch der Umstand, dass während dieser Kultivierung die Temperaturregelung ausfiel. In Folge dessen schwankte die Temperatur im Tagesrhythmus stark und somit unterlag die absolut gelöste Menge an Sauerstoff im Medium ebenfalls Schwankungen. Untersucht wurde dieser Einfluss in einem Folgeversuch.

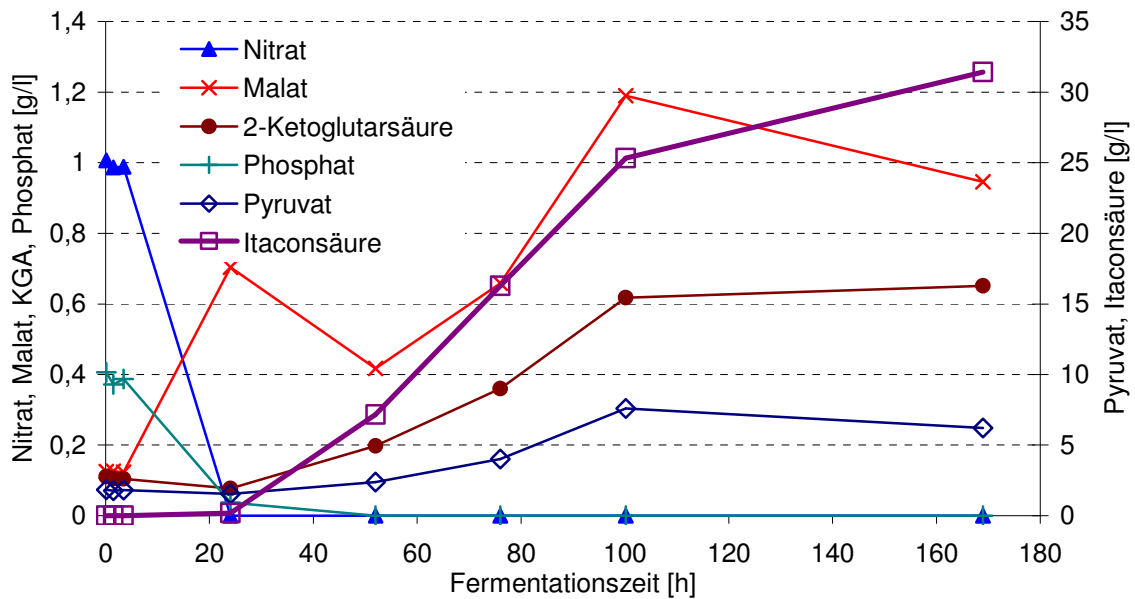


Abb. 31: Kultivierung mit *P. tsukubaensis* H488 im 2 l Laborbioreaktor
 Kultivierungsbedingungen: siehe Text

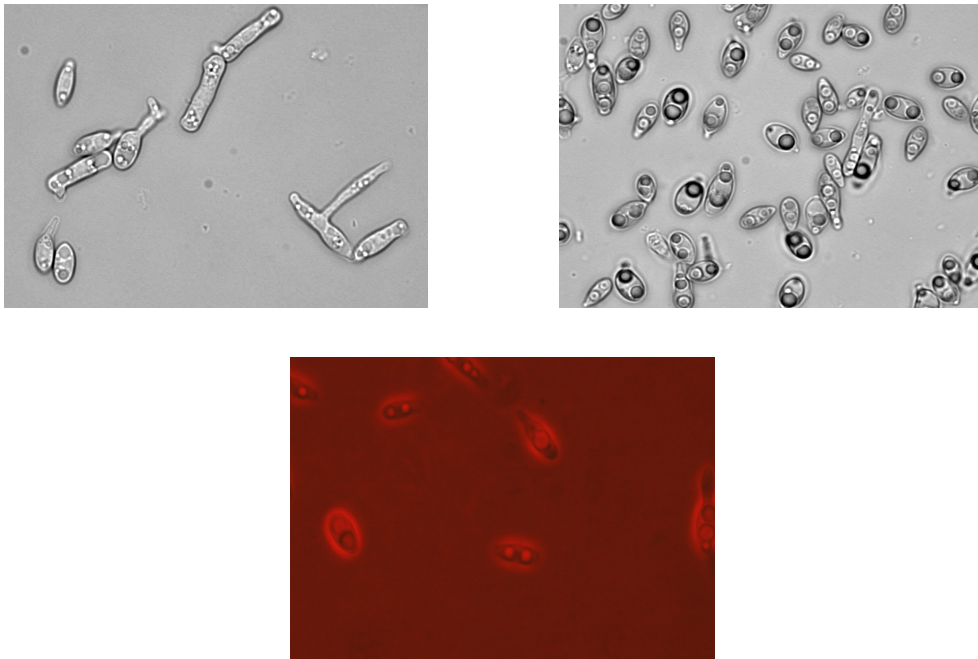


Abb. 32: Mikroskopische Aufnahmen verschiedener Zellstadien

oben links: Wachstumsphase; oben rechts: Produktionsstadium und Bildung von Speicherlipiden; unten: Färbung mit Nilrot und Fluoreszenz nach 100 h Kultivierung; Vergrößerung jeweils 100-fach

Die mikroskopischen Aufnahmen der Kultur (Abb. 32) zeigen zwei unterschiedliche Zellstadien. Während in der Wachstumsphase die Knospung der Hefe und ihr teilweise pseudomycelartiges Wachstum erkennbar sind, zeichnen sich die Zellen in der Phase der Itaconsäureproduktion durch deutlich erkennbare Einlagerungen in den Zellen aus. Eine Färbung mit Nilrot und anschließender Anregung mit UV-Licht erbrachte den Nachweis, dass es sich bei diesen Zelleinschlüssen mit hoher Wahrscheinlichkeit um Lipide handelt.

Im Ergebnis der Übertragung des Itaconsäurebildungsprozesses mit *P. tsukubaensis* H488 in dem Laborbioreaktormaßstab wurde erstmals im Rahmen der Projektbearbeitung ein Hefestamm gefunden, der mit 31,4 g/l Itaconsäure als primärer Itaconsäurebildner eingestuft werden kann. Damit wurde der Meilenstein 30.09.2005 (Itaconsäurekonzentration >25 g/l) erfüllt.

Vergleichende Reaktorkultivierung mit konstantem und oszillierendem Gelöstsauerstoff im Medium

Nach erfolgreicher Übertragung des Bioprozesses in den Reaktormaßstab und der aufgestellten These einer sauerstoffoszillationinduzierten Itaconsäureproduktion sollte dies in weiteren Reaktorkultivierungen überprüft werden. Erste orientierende Versuche in dieser Richtung verliefen erfolgversprechend, so dass zwei parallele Vergleichskultivierungen, ohne bzw. mit Gelöstsauerstoffoszillation angesetzt wurden. Im Medium nach Kawamua (siehe A. 4) mit Glucose als C-Quelle wurden die beiden Ansätze mit der gleichen Ausgangs OD_{600} von ca. 2,5 angeimpft. Bei einem pH-Wert von 6 und 30 °C wurde in dem ersten Reaktor der pO_2 auf konstant 10% geregelt während im Vergleichsreaktor der Gelöstsauerstoff zwischen 50% und 80% mit einer Periode von 12 h sinusförmig oszillierte.

In Abb. 33 ist zu erkennen, dass die pO_2 -Oszillation einen positiven Einfluss auf die Biomassebildungsgeschwindigkeit nimmt, wobei jedoch nicht auszuschließen ist, dass die Mehrzunahme zum Großteil nur durch die Bildung von Speicherstoffen auf Grund von Limitations- oder Stressbedingungen zurückzuführen ist. Wie erwartet konnte jedoch in dem Reaktor ohne Oszillation nur eine geringe Menge an Itaconsäure (6 g/l), ähnlich der im Schüttelkolben, und auch kaum Nebenprodukte gefunden werden, während im Parallelansatz mit schwankendem pO_2 nach 218 h 50,8 g/l Itaconsäure nachweisbar waren. Weitere detektierte Säuren waren hierbei Lactat mit 8,5 g/l und Ketoglutarat mit 2,7 g/l.

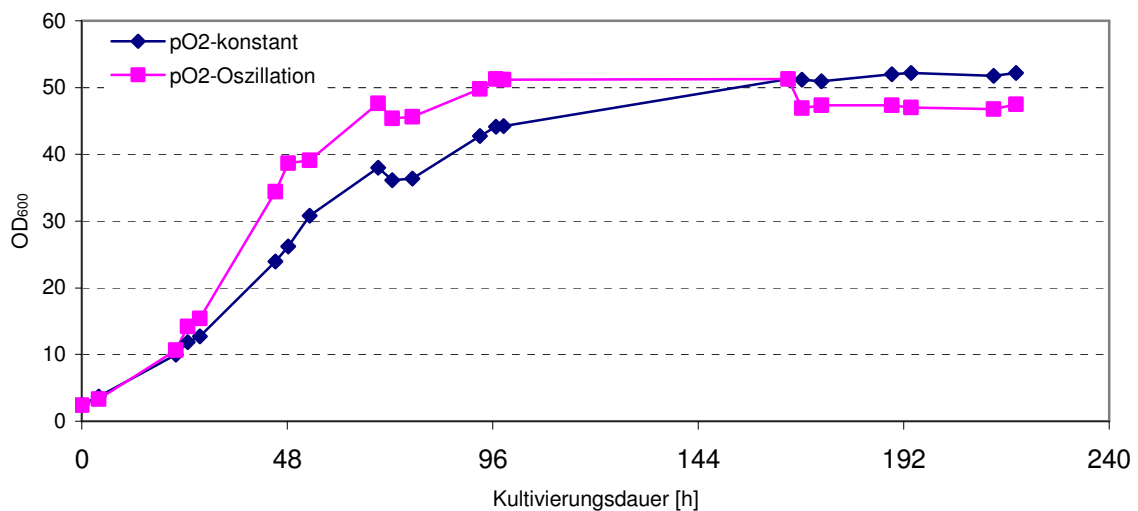


Abb. 33: Biomassebildung anhand der OD_{600} bei der Parallelkultivierung ohne bzw. mit pO_2 -Oszillation

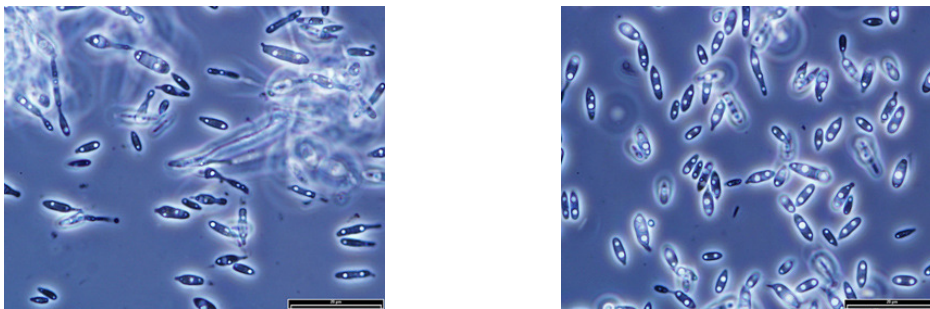


Abb. 34: Mikroskopische Aufnahme der zwei Parallelkulturen nach 48 h

In den mikroskopischen Aufnahmen beider Kultivierungen (Abb. 34) sind Unterschiede in der Morphologie erkennbar. Die Mikroorganismen der Kultur mit konstanter Sauerstoffversorgung

neigen eher zur Knospenbildung und Ausbildung eines Pseudomycel. Jene, welche während des Versuches dem oszillierenden Gelöstsauerstoff ausgesetzt waren zeigten deutlicher ausgeprägt die charakteristischen Lipideinlagerungen in den Zellen.

In einem späteren Reaktorversuch, wurde unter Beibehaltung aller Medienparameter die Oszillation dahingehen abgeändert, dass zu Beginn der Kultivierung eine Sinusschwingung mit der Periode 12 h, dem Offset 65% und der Amplitude 15% in der Reaktorsteuerung programmiert wurde. Als Steuergröße diente eine Kaskade aus Rührerdrehzahl (500 rpm – 1000 rpm) und Begasung (0,1 l/min – 1,5 l/min). Nach 144 h, und damit nach Abschluss des Biomassewachstums, wurden die Parameter der pO₂-Oszillation auf Periode 4 h, Offset 50% und Amplitude 30% geändert. Das Substrat Glucose lag in einem Vorratsgefäß in einer Konzentration von 500 g/l steril vor und wurde so nachdosiert, dass die Konzentration der Glucose im Kulturmedium zwischen 10 g/l und 50 g/l gehalten wurde. Insgesamt gelangten so im Laufe des Prozesses 167 g Glucose in den Reaktor. Nach 356 Stunden wurde die Kultivierung beendet und die Konzentration der gebildeten organischen Säuren betrug 66 g/l Itaconsäure, 3,7 g/l Malat, 1,8 g/l Brenztraubensäure und 1,0 g/l 2-Oxoglutarinsäure. Die substratbezogene Ausbeute für Itaconsäure betrug 0,34 g_{ITA}/g_{Glucose} bei einer Raum-Zeit-Ausbeute von 0,19 g_{IA}/(l*h).

Diese 66 g/l Itaconsäure stellen die höchste in dem Berichtszeitraum und auch nach aktuellem Kenntnisstand je mit Hefen in einem Bioprozess erzielte Konzentration dar.

Reaktorkultivierung mit Glycerin als Substrat

Im Rahmen von Schüttelkolbenversuchen zur Substratverwertung durch *P. tsukubaensis* konnte festgestellt werden, dass neben Glucose auch auf Glycerin Itaconsäurebildung möglich ist. Nach dem Erfolg des Scale-up in den Bioreaktormaßstab mit Glucose als Substrat sollte nun auch ein entsprechender Versuch mit Glycerin durchgeführt werden. Dazu wurde Glucose im Medium nach Kawamura et al. durch eine Anfangsglycerinkonzentration von ca. 50 g/l ersetzt, wobei die Kultivierung des Inokulums noch auf Glucose stattfand. Auch fanden die Schwankungen des pO₂-Gehalts Anwendung in diesem Versuch. Unter der Annahme, dass Itaconsäure vermehrt bei abfallendem pO₂ von *P. tsukubaensis* sekretiert wird, wurde aus der bisherigen pO₂-Oszillation in Form einer Sinuskurve das in Abb. 35 dargestellte pO₂-Profil erstellt. Dieses Profil wurde während der gesamten Fermentationsdauer gefahren.

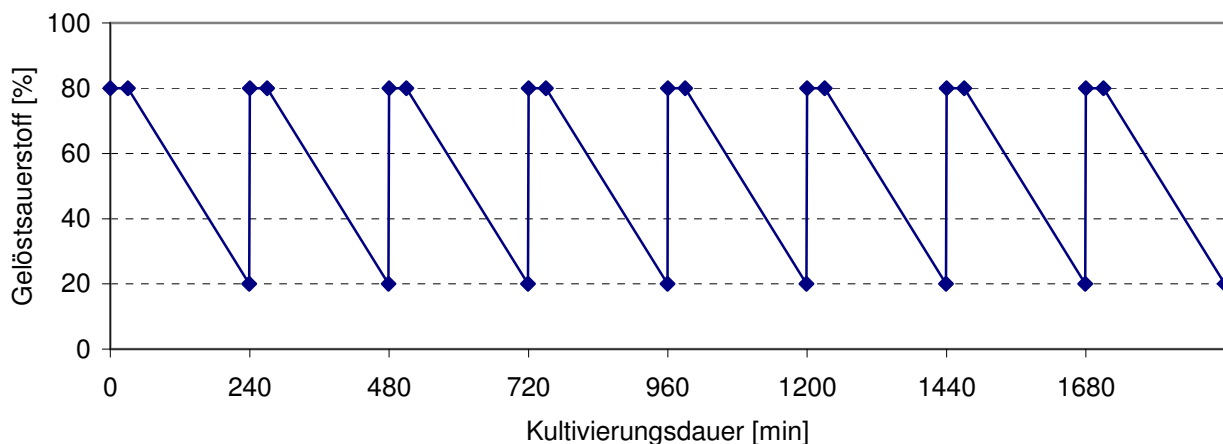


Abb. 35: Ausschnitt des pO₂-Profils bei der Kultivierung von *P. tsukubaensis* auf Glycerin

Oszillation zwischen 20 % und 80 %, schlagartiges Ansteigen des pO₂ auf 80 %, 30 min Konstanthaltung, danach langsamer Abfall auf einen Wert von 20 %, Zykluszeit 4 h

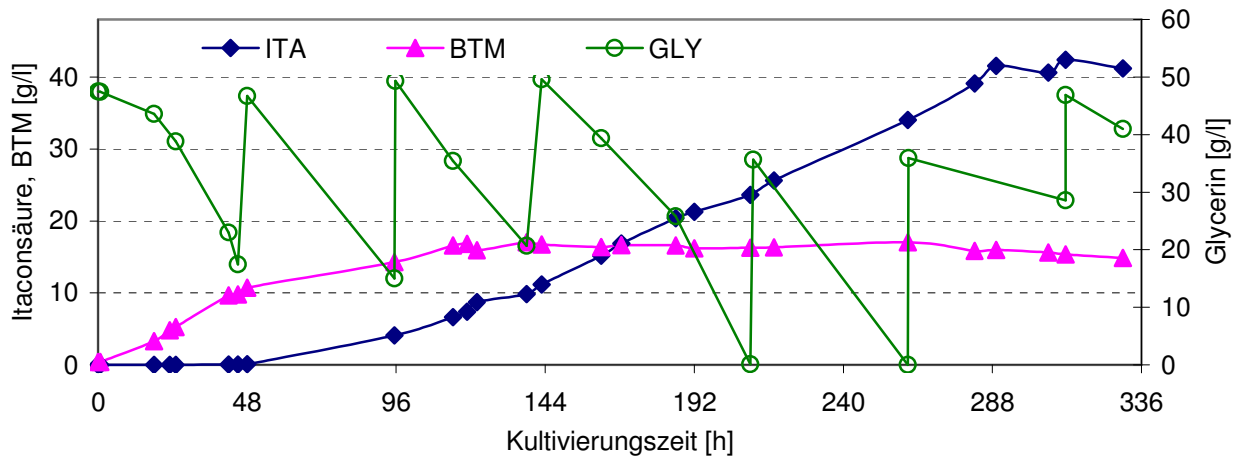


Abb. 36: Fedbatch-Kultivierung von *P. tsukubaensis* mit Glycerin im 2l-Reaktor

Kultivierungsbedingungen: Medium nach Kawamura et al.; Arbeitsvolumen 1,5 l; Animpfverhältnis 1:10; pO₂ oszillierend zwischen 20 % und 80 %; Airflow 0,2 - 1,5 l/min (1. Kaskade); Rührerdrehzahl 500-700 rpm (2. Kaskade); T = 30 °C; pH 6 geregelt mit 20 % H₂SO₄ und 40 % NaOH

Abb. 36 zeigt den Versuchsverlauf der Kultivierung. Bereits ca. 48 h nach Prozessbeginn konnte Itaconsäure erstmalig im Medium bestimmt werden. Die darauf folgende Produktionsphase dauerte etwa 240 h bis zur Stagnation der Itaconsäurekonzentration bei 41,6 g/l. Stickstoff in Form von Natriumnitrat war bereits nach ca. 24 h nicht mehr im Medium nachweisbar. Eine weitere Zunahme der Biomasse ist unter anderem mit der bereits beschriebenen Einlagerung von Speicherstoffen erklärbar. Nach einer Zeit von ca. 114 h stagnierte das mikrobielle Wachstum der Hefen bei einem Wert von etwa 16,5 g/l Biomasse, wobei der Abfall zum Ende des Versuches mit dem Aufbrauchen der intrazellulären Lipide zu erklären ist. Im Laufe der Kultivierung wurde Glycerin in mehreren Schritten zu insgesamt 186 g/l zudosiert. Die Ausbeute bezogen auf die eingesetzte C-Quelle betrug somit 0,22 g_{ITA}/g_{GLY}. Die Raum-Zeit-Ausbeute nach einer Kultivierungsdauer von 330 h betrug ca. 0,13 g_{ITA}/(l*h). Während der Phase linearer Itaconsäureproduktion ergab eine Berechnung der Produktivität zwischen 138 h und 289,25 h die Bildungsrate von 0,21 g_{ITA}/(l*h). Hauptsächlich gebildetes Nebenprodukt war mit 4,23 g/l Malat. Des Weiteren konnte nur eine geringe Menge Ketoglutarat detektiert werden, so dass die Selektivität für die Itaconsäureproduktion 89% betrug.

Im Hinblick auf nachwachsende Rohstoffe kann dieser Reaktorversuch, nach Optimierung der Itaconsäureproduktion mit *P. tsukubaensis*, Ansatzpunkt weiterer Untersuchungen sein. In der Industrie fällt Glycerin in großen Mengen als Abfallprodukt bei der Biodieselherstellung an und wäre somit ein kostengünstiges Ausgangssubstrat.

Reaktorkultivierung mit erhöhter CSL und NaNO₃ Konzentration

Die Produktivität eines Prozesses hängt zu einem großen Teil von der für die Biokatalyse zur Verfügung stehenden Biomasse ab. Da Biomassen von 10 bis 12 g/l, wie sie in bisherigen Versuchen erreicht wurden, noch nicht das Maximum für diese Hefe darstellen dürften, sollte ein Versuch unter den neu gefundenen Standardbedingungen mit Oszillation des pO₂ durchgeführt werden. Dabei wurden jedoch mit 5,0 g/l CSL (2,0 g/l bisher) und 3,0 g/l NaNO₃ (2,0 g/l NaNO₃ bisher) deutlich mehr Nährstoffe dem Medium zugegeben.



A



B

Abb. 37: Mikroskopische Aufnahmen der Hefe *P. tsukubaensis* H488 unter Bedingungen (A) erhöhten Nährstoffangebots (95h) und (B) im Standardmedium nach Kawamura (120h)

Die mikroskopischen Aufnahmen in Abb. 37 zeigen deutlich die unterschiedliche Morphologie der Hefezellen dieser Kultivierung verglichen mit der einer Standardkultivierung auf. Die Bildung von Speicherstoffen, welche in den Zellen der Standardkultivierung klar zu erkennen sind bleibt nahezu aus. Da unter den Bedingungen erhöhter Nährstoffzugabe in diesem Versuch jedoch keine Produktion von Itaconsäure zu erkennen war, ist davon auszugehen, dass die Bildung dieser Lipideinlagerungen entweder notwendig für die Itaconsäureproduktion ist, oder als Indikator einer essentiellen Limitation dient. Das verfolgte Ziel, die Biotrockenmasse in diesem Versuch zu steigern, konnte zusätzlich nicht erreicht werden. Trotz besserer Versorgung mit Nährstoffen und Spurenelementen konnten maximal 4,5 g/l BTM erzielt werden.

1.2.5. Maßstabsübertragung des Bioprozesses

50 l-Bioreaktorkultivierung beim Projektpartner BEC

Von dem im zweiten Projektjahr dem Teilvorhaben 2 beigetretenen Industriepartner BEC GmbH Halle wurde neben ersten Analysen der Wirtschaftlichkeit eines Itaconsäurebioprozesses mit *P. tsukubaensis* H488 das Scale-up in den Kleinproduktionsmaßstab (1 m³) bearbeitet. Um den Prozess von dem bisher verwendeten Laborreaktormaßstab (2 l) zu übertragen sind mehrere Zwischenschritte notwendig. Auch ist auf Grund des unterschiedlichen Reaktordesigns eine Anpassung der Kultivierungsparameter an die neuen Bedingungen erforderlich. Da durch die Verzögerung beim Stammscreening erst relativ spät mit der Bearbeitung dieses Paketes begonnen werden konnte sollte die erste Übertragung direkt in den 50 l Maßstab stattfinden.

Die BEC GmbH Halle verwendet in ihren Laboratorien Umwälzreaktoren mit tangentialer Rückführung der Kulturbrühe bei einem Reaktionsvolumen von 25 - 300 l. Die kultivierungstechnischen Parameter wie Temperatur, pO₂ und pH-Wert werden außerhalb des Reaktors in einem Bypass gemessen und durch entsprechende Regelungstechnik auf ihren Sollwerten gehalten. Für die Vorkultur kam ein 5 l Rührreaktor zum Einsatz, welcher Schüttelkolbenvorkulturen des Helmholtz-Zentrums für Umweltforschung angeimpft wurde. Das Kawamura-Medium wurde angereichert mit 15 mg/l FeSO₄ x 7 H₂O verwendet. Der pH-Wert wurde mit 50%iger NaOH auf pH 5,8 geregelt, die Temperatur bei 30 °C. Eine Umsetzung der Gelöstsauerstoffoszillation wurde durch unterschiedliche Belüftungsraten realisiert, wobei mit den vorhandenen technischen Möglichkeiten keine Sinuskurve, wie in den Reaktoren am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung möglich, erreicht wurde. Die Substratnachdosierung erfolgte in zwei Stufen. Dazu wurde die hochkonzentrierte Substratstammlösung kontinuierlich über einen Zeitraum von 4 d bzw. 2 d in den Reaktor gepumpt.

Zu Beginn dieses Versuchs musste leider festgestellt werden, dass die Temperaturregelung des Vorkulturreaktors ausfiel und so die Vorkultur über ein Wochenende ca. 50 h lang bei einer Temperatur von ca. 17 °C – 20 °C gefahren wurde. Als Folge zeigte die Hefe ein stark verlangsamtes Wachstum, so dass erst nach 5 d die Überimpfung in den 50 l Maßstab erfolgen konnte. Die Vorschädigung der Kultur wirkte sich auch in der Hauptkultur aus. Erst nach ca. 10 d Kultivierung erreicht die Hefe ihre aus bisherigen Versuchen bekannte Wachstumsgeschwindigkeit (Abb. 38). Trotzdem wurde schon in den ersten Versuchstagen eine große Menge des eingesetzten Substrates aufgebraucht: Die Säureanalytik zeigte zu diesem Zeitpunkt eine Akkumulation von 9,8 g/l Lactat, 4,3 g/l, Itaconat und 0,7 g/l Malat im Medium. Da diese Menge an Säuren den Verbrauch von ca. 40 g/l Glucose nicht erklärt, ist anzunehmen, dass weitere, nicht mit der Standardanalytik zu erfassende Verbindungen, gebildet wurden. In bisherigen Versuchen wurde ein solcher Verlauf noch nicht beobachtet.

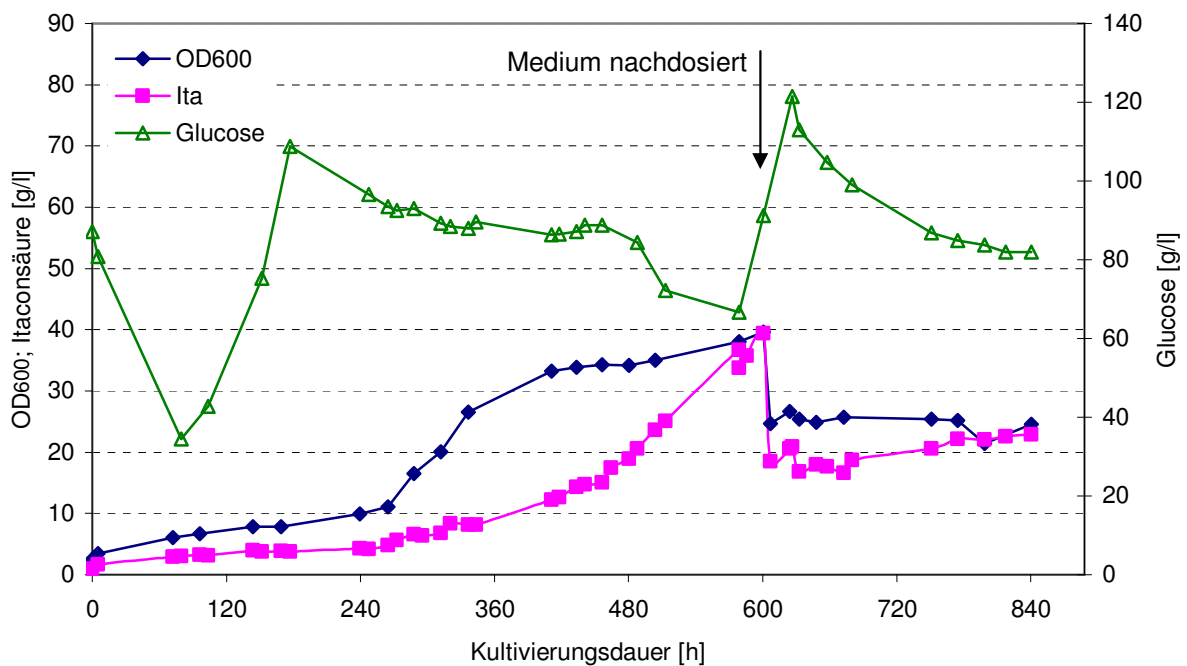


Abb. 38: Erstes Scale-up mit *P. tsukubaensis* im 50 l-Maßstab durch BEC Halle
Kultivierungsbedingungen: siehe Text

Mit dem einsetzenden Wachstum der Kultur setzte auch eine vermehrte Itaconsäureproduktion ein. Die größte Produktbildungsrate wurde dabei im Zeitraum zwischen 460 h und 600 h mit 0,17 g/l*h erzielt, wobei eine Itaconsäureendkonzentration von 39,4 g/l gemessen werden konnte. Diese Werte erreichen zwar noch nicht den Bereich der optimierten Kultivierung im 2 l Bioreaktor des UFZ, zeigen aber die generelle Machbarkeit dieses Scale-ups. Auch muss berücksichtigt werden, dass die sonst angewendete Gelöstsauerstoffoszillation nicht in dem angestrebten Maße umgesetzt werden konnte. Als Nebenprodukte konnten 1,8 g/l Lactat und je 1,3 g/l Pyruvat bzw. Malat detektiert werden.

Im weiteren Verlauf der Kultivierung wurde versucht durch Zugabe neuen Mediums die Kultur zu weiterem Wachstum anzuregen. Dazu wurde die Kulturbrühe im Verhältnis 1:1 mit den entsprechenden Medienkomponenten aufgefüllt. Zu beachten ist, dass durch das mit hinzu gegebene CSL die OD₆₀₀ nicht auf den zu erwartenden Wert abfiel. Ein erneutes Wachstum der Hefe war nicht zu erkennen. Die OD₆₀₀ stagnierte, eine Itaconsäurebildung konnte jedoch weiterhin, wenn auch vermindert beobachtet werden.

Die über den gesamten Kultivierungsverlauf aufgenommenen mikroskopischen Bilder der Kultur zeigten nur in den ersten Tagen der Kultivierung, bedingt durch den Temperatureinbruch, Unterschiede in der Morphologie. Zum Ende des Versuches glichen sie jenen einer erfolgreichen 2 l-Laborreaktorkultivierung.

Bei einer Wiederholung dieses Versuches unter optimalen Bedingungen und somit einem schnelleren Anwachsen der Kultur ist mit ähnlich hohen Ausbeuten und Produktbildungsgeschwindigkeiten verglichen mit dem 2 l-Laborreaktor zu rechnen.

2. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit

Die im Berichtszeitraum erbrachten Leistungen zeigen die generelle Durchführbarkeit einer biotechnologischen Itaconsäureproduktion mit der Hefe *Pseudozyma tsukubaensis* CBS422.96. Insbesondere verfahrenstechnische Vorteile, wie geringe Scherempfindlichkeit, keine Notwendigkeit des Animpfens mit Sporen und Unempfindlichkeit gegenüber Schwermetallen empfehlen diesen Prozess als Ergänzung zu dem bestehenden etablierten Produktionsverfahren mit *Aspergillus terreus*. Eine Optimierung des Gesamtprozesses, allem voran des Verbrauches an Neutralisationmitteln zur pH-Wertkorrektur, ist jedoch weiterhin nötig.

Die Verwendung von Glycerin als Substrat, auch beschrieben in dem eingereichten Patent, erschließt die Gruppe der preiswerten Nebenprodukte im Bereich der nachwachsenden Rohstoffe. Ein solcher Prozess kann gegenüber dem Standardverfahren wirtschaftlicher und damit konkurrenzfähig sein.

3. Entwicklungen auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Ein von Levinson (2006) veröffentlichter Artikel über die Itaconsäurebildung mit Hilfe von *Pseudozyma antarctica* NRRL Y-7808 wurde bereits in die Arbeit eingebunden. Das in diesem Artikel verwendete Medium wurde von der TU-Dresden getestet und zeigte mit den dabei verwendeten Hefen keine Itaconsäureproduktion.

Die Projektpartner des Gesamtverbundprojektes, FAL Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Technische Universität Braunschweig im Teilverbund 1 „Itaconsäureherstellung aus nachwachsenden Rohstoffen als Ersatz für petrochemisch hergestellte Acrylsäure“, beschäftigten sich unter anderem mit einer weiteren Effizienzsteigerung bzw. Kostenreduktion des konventionellen Verfahrens mit *A. terreus*. Detaillierte Ergebnisse aus diesem Forschungsvorhaben werden in dem entsprechenden Endbericht zu finden sein.

4. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen

Das Teilprojekt wurde im Rahmen eines Vortrages durch Prof. K.D. Vorlop auf einer Dechema Tagung über den Förderschwerpunkt „Biokonversion von nachwachsenden Rohstoffen“ des BMELV und der FNR im Oktober 2005 in Frankfurt (Main) vorgestellt.

Im Oktober 2007 reichte Frau Eva Kreyß ihre Bachelorarbeit zum Thema „Biotechnologische Herstellung von Itaconsäure mit nichtkonventionellen Hefen - Untersuchung des Wachstums der Hefe *Pseudozyma tsukubaensis* hinsichtlich der Medienzusammensetzung und weiterer Kultivierungsparameter zur Itaconsäureproduktion“, welche sie am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung anfertigte, an der Hochschule Anhalt (FH), Fachbereich Angewandte Biowissenschaften und Prozesstechnik in Köthen ein und verteidigte sie erfolgreich.

Eine Erfindungsmeldung wurde von dem beiden beteiligten Projektpartnern als Patent angemeldet.

Von weiteren Veröffentlichungen wurde aus patentrechtlichen Gründen bisher abgesehen

5. Abbildungen und Tabellen

5.1. Abbildungen

Abb. 1:	Selektion von <i>P. tsukubaensis</i> Mutanten mittels Calciumcarbonatplattenmethode.	13
Abb. 2:	Prinzip des Itaconsäure Konzentrationsgradienten.....	13
Abb. 3:	IA-Konzentrationsgradientplattenmethode modifiziert nach Yahiro et al. (1995).....	14
Abb. 4:	Chromatogramm wichtiger Säuren des TCC und Nitrat.	16
Abb. 5:	Kultivierung von <i>P. tsukubaensis</i> im Medium nach Kawamura mit Variation der Phosphatkonzentration. Darstellung der Biomassebildung (OD ₆₀₀) und Produktion von IA.	17
Abb. 6:	Kultivierung <i>P. tsukubaensis</i> in Medium nach Kawamura mit folgenden veränderten Nitratkonzentrationen: links: 1,5 g/l NaNO ₃ , rechts: 3 g/l NaNO ₃	18
Abb. 7:	Kultivierung <i>P. tsukubaensis</i> in Medium nach Kawamura mit veränderten Nitratkonzentrationen: links: 2 g/l NaNO ₃ , rechts: 2,5 g/l NaNO ₃	19
Abb. 8:	Kultivierung <i>P. tsukubaensis</i> in Medium nach Kawamura mit veränderten Nitrat- und Phosphatkonzentrationen unter Berücksichtigung der IA Produktion und der Biomasseentwicklung (OD ₆₀₀).	19
Abb. 9:	Produktion von Itaconsäure durch <i>P. tsukubaensis</i> in Abhängigkeit von der Zelldichte der Hauptkultur (OD ₆₀₀). Links: Start-OD ₆₀₀ 0,2; rechts: Start-OD ₆₀₀ 1,2.....	20
Abb. 10:	Produktion von Itaconsäure durch <i>P. tsukubaensis</i> in Abhängigkeit von der Zelldichte der Vorkultur.....	21
Abb. 11:	Kultivierung <i>P. tsukubaensis</i> und Produktion von Itaconsäure in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration: links 150 g/l; rechts 200 g/l.	22
Abb. 12:	Kultivierung <i>P. tsukubaensis</i> : Biomassebildung (OD ₆₀₀) und Produktion von Itaconsäure in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur.....	23
Abb. 13:	Wachstum von <i>P. tsukubaensis</i> im Tropfplattentest auf YMA-Medium mit unterschiedlichen pH-Werten.	24
Abb. 14:	Kultivierung <i>P. tsukubaensis</i> in Abhängigkeit vom pH-Wert unter Berücksichtigung der Biomasse (OD ₆₀₀) und der IA Produktion.....	25
Abb. 15:	Kultivierung <i>P. tsukubaensis</i> in Abhängigkeit vom unregulierten pH-Wert unter Berücksichtigung der Biomasse (OD ₆₀₀) und der IA Produktion. Links: Start pH 5,5; rechts: Start pH 7 und 8.	26
Abb. 16:	UV-Inaktivierungskurve der Hefen <i>Y. lipolytica</i> H435 und <i>P. tsukubaensis</i> H488.	27
Abb. 17:	Screening ausgewählter Mutanten im Vergleich zum Wildtyp auf die Fähigkeit der IA Bildung nach Selektion mittels Calciumcarbonatplattenmethode (siehe 1.1.1).	28
Abb. 18:	Wachstum (OD ₆₀₀) und IA Produktion im Wiederholungsversuch der Kultivierung der Mutante H488-M15 im optimierten Medium nach Kawamura (siehe Abb. 17).....	28
Abb. 19:	Integratives Plasmid pSPF.GFP für die Transformation in <i>Pseudozyma</i> sp.....	30
Abb. 20:	Nachweis der integration des linearisierten Plasmids pSPF.GFP in <i>P. tsukubaensis</i> H488.	30
Abb. 21:	Nachweis der Integration des Plasmides pSPG.GFP in das Genom von <i>P. tsukubaensis</i> mittels PCR.	31
Abb. 22:	Southern Blot zum Nachweis der Integration des mit XhoI linearisierten Plasmids pSPF.GFP in <i>P. tsukubaensis</i>	32
Abb. 23:	Chromatogramm der 6 wichtigsten organischen Säuren erstellt mit dem Dionex DX 600, der Säule IonPac AS11 und der optimierten Trennparameter (s. Tab. 1)	34
Abb. 24:	HPLC-Chromatogramm eines Gemisches von organischen Säuren, anorganischen Anionen und den Polyolen D-Mannitol (Peak 6), D(+)-Arabitol (Peak 7) und meso-Erythritol (Peak 8)	35
Abb. 25:	Malat-Akkumulation im Medium durch den Stamm <i>Pseudozyma fusiformata</i> H485 (=CBS423.96) unter N-, P- und Fe-Limitation sowie im Vollmedium mit 100 g/l Glucose	38
Abb. 26:	Säurebildung der <i>Pseudozyma</i> -Stämme nach Beendigung der Kultivierung nach 160 h in Medien nach Tabuchi und Kawamura; Kultivierungsbedingungen: siehe Text.....	40
Abb. 27:	Darstellung des Wachstums von <i>P. tsukubaensis</i>	44

Abb. 28:	Verlauf der Biotrockenmasse bei der Kultivierung von <i>P. tsukubaensis</i> ohne und mit Zugabe zusätzlichen Eisens (15 mg/l FeSO ₄ x 7 H ₂ O).....	45
Abb. 29:	Itaconsäure- und Nebenproduktbildung durch <i>P. tsukubaensis</i> ohne und mit Zugabe zusätzlichen Eisens nach einer Kultivierungsdauer von 211 h.....	45
Abb. 30:	Biomassewachstum von <i>P. tsukubaensis</i> im Medium nach Kawamura et al. und den synthetischen Ansätzen A und C.....	47
Abb. 31:	Kultivierung mit <i>P. tsukubaensis</i> H488 im 2 l Laborbioreaktor	51
Abb. 32:	Mikroskopische Aufnahmen verschiedener Zellstadien	51
Abb. 33:	Biomassebildung anhand der OD ₆₀₀ bei der Parallelkultivierung ohne bzw. mit pO ₂ -Oszillation	52
Abb. 34:	Mikroskopische Aufnahme der zwei Parallelkulturen nach 48 h.....	52
Abb. 35:	Ausschnitt des pO ₂ -Profils bei der Kultivierung von <i>P. tsukubaensis</i> auf Glycerin.....	53
Abb. 36:	Fedbatch-Kultivierung von <i>P. tsukubaensis</i> mit Glycerin im 2l-Reaktor	54
Abb. 37:	Mikroskopische Aufnahmen der Hefe <i>P. tsukubaensis</i> H488 unter Bedingungen (A) erhöhten Nährstoffangebots (95h) und (B) im Standardmedium nach Kawamura (120h)	55
Abb. 38:	Erstes Scale-up mit <i>P. tsukubaensis</i> im 50 l-Maßstab durch BEC Halle	56

5.2. Tabellen

Tab. 1:	Eingesetzte Säulen und Trennparameter für die Bestimmung von Itaconsäure und anderer relevanter Säuren.....	15
Tab. 2:	Trennparameter der IC für die Bestimmung von Itaconsäure und weiteren organischen Säuren sowie anorganischen Anionen mit einem DX 600-System	34
Tab. 3:	Retentionszeiten der einzelnen Bestandteile des synthetischen Gemisches	36
Tab. 4:	Trennparameter der Kationenchromatographie mit einem ICS 90 System der Fa. Dionex	36
Tab. 5:	Umsetzung der gewünschten Limitationen im Medienscreening mit <i>Y. lipolytica</i> H435..	41
Tab. 6:	Gebildete Säuren am Ende des Screenings in modifizierten Yeast 668 Medium;.....	43
Tab. 7:	Itaconsäure- und Nebenproduktbildung durch <i>P. tsukubaensis</i> mit Zugabe von zusätzlich 15 mg/l, 30 mg/l und 45 mg/l FeSO ₄ x 7 H ₂ O nach einer Kultivierungsdauer von 187 h	46
Tab. 8:	Übersicht über verschiedene Testansätze zum CSL-Ersatz	47
Tab. 9:	Itaconsäure- und Nebenproduktbildung durch <i>P. tsukubaensis</i> bei Variation der Zusammensetzung des synthetischen Mediums nach einer Kultivierungsdauer von 187 h	49

6. Literatur

- Aurich A., Stottmeister U. (2002) Chem Ing Tech 74: 664
- Aurich A., Förster A., Mauersberger S., Barth G., Stottmeister U. (2003). Biotechnol Adv 21: 454-455.
- Aurich A., Stottmeister U., Förster A., Mauersberger S., Barth G. (2005) Abschlussbericht zum Forschungsprojekt AZ: 13-8811.61/89 des Sächsischen Staatsministeriums für Umwelt und Landwirtschaft (SMUL), UFZ Umweltforschungszentrum Leipzig.
- Aurich A., Stottmeister U., Förster A., Mauersberger S., Barth G. (2006a) Patent DE102004028179
- Aurich A, Specht R, Stottmeister U, Keil T, Beyer D (2006b) Schlussbericht FNR, FKZ220010701
- Avis T.J., Cheng Y.L., Zhao Y.Y., Bolduc S., Neveu B., Anguenot R., Labbé C., Belzile F., Bélanger R.R. (2005) Appl Microbiol Biotechnol 69: 304–311
- Barth G., Krebs D. (1984) Patent, DD 227 448 A1
- Barth G., Müller P.-J., Ozegowski J.H., Weber H., Köhler W. (1988) Patent, DD 272 867 A1
- Barth G. and Gaillardin C. (1996) Chapter 10. The dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. In: Non-conventional yeasts in biotechnology (Wolf K, ed) Springer Verlag, Heidelberg, 313-388
- Barth G. and Gaillardin C. (1997) FEMS Microbiol Rev 19: 219-237
- Barth G, Beckerich J.-M., Dominguez A., Kerscher S., Ogrzydziak D., Titorenko V., Gaillardin C. (2003) de Winde JH (ed), Functional genetics of industrial yeasts. Topics in Current Genetics, Vol 1. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 227–271.
- Baup S. (1837) Annales de Chimie et de Physique 19: 29-38
- Bentley R. and Thiessen C.P. (1957) J Biol Chem 226: 673-687
- Berg R.G. and Hetzel D.S. (1978) US Patent, 4.100.179
- Blatt A.H. (1943) Organic Synthesis, John Wiley & Sons, p. 328
- Boekhout T. and Fell J.W. (1998) (De Candolle) Corda. In The Yeasts, a Taxonomic Study, 4th edn, pp. 790–797. Edited by C. P. Kurtzman & J. W. Fell. Amsterdam: Elsevier.
- Bonnarme P., Gillet B., Sepulchre A.M., Role C., Beloeil J.C., and Ducroq C. (1995) J Bactriol 177: 3573-357
- Buhagiar R.W.M. (1979) J Gen Microbiol 110: 91-97.
- Buse R., Qazi G.N., Onken U. (1992). J Biotechnol, 26, 231-44
- Carlsson M., Habenicht C., Kam L.C., Antal M.J., Bian N., Cunnigham R.J., and Jones M. (1994) Industrial Engin Chem Research 33: 1989-1996
- Cheng Y.L., Belzile F., Tanguay P., Bernier L., Bélanger R.R. (2001) Mol Genet Genomics 266: 96–102
- Cheng Y.L., McNally D.J., Labbé C., Voyer N., Belzile F., Bélanger R.R. (2003) Appl Environ Microbiol 69: 2595–2602
- Chiusoli G.P. (1962) US Patent, 3.025.320
- Denbe K (1981) Patent JP 56137893
- Dwiarti L., Yamane K., Yamatani H., Kahar P., Okabe M. (2002) Journal of Bioscience and Bioengineering 94, 29-33
- Fickers P., Benetti P.H., Waché Y., Marty A., Mauersberger S., Smit M.S. and Nicaud J.-M. (2005) FEMS Yeast Research 5: 527-543

- Förster A. (2006) Dissertation, TU-Dresden
- Förster A., Aurich A., Mauersberger S., Barth G. (2007a) *Appl Microbiol Biotechnol* 75:1409–1417
- Förster A., Jacobs K., Juretzek T., Mauersberger S., Barth G. (2007b) *Appl Microbiol Biotechnol* 77 (4): 861-869
- Hashimoto K., Shiray Y., Tanigaki M. (1989) JP-Patent, 01 296 977
- Hoffman C.S. und Winston F. (1987). *Gene* 57: 267-272.
- Horitsu H., Takahashi Y., Tsuda J., Kawai K. and Kawano Y. (1983) *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 18: 358–360
- Horitsu H. and Kawai K. (1984) JP-Patent, 59 063 190
- Jaklitsch W.M., Kubichek C.P. and Scrutton M.C. (1991) *J Gen Microbiol* 137: 533-539
- Jensen D (2000), *Grundlagen der Ionenchromatographie*, Dionex GmbH, Idstein.
- Juretzek T., Prinz A., Schunck W.-H., Barth G., Mauersberger S. (1997) Patent, DE 195 25 282
- Juretzek T., Mauersberger S. und Barth G. (1998) Patent, Az: 198 30 905.8
- Juretzek T., Mauersberger S. und Barth G. (1999) Patent, PCT/DE99/02174
- Juretzek T., Le Dall M.-T., Mauersberger S., Gaillardin C., Barth G., and Nicaud J.-M., (2000a) *Yeast* 18: 97-113
- Juretzek T., Wang H.-J., Nicaud J.-M., Mauersberger S. and Barth G. (2000b) *Biotechnol Bioprocess Eng* 5: 320-326
- Juretzek T., Le Dall M.T., Mauersberger S., Gaillardin C., Barth G., Nicaud J.-M. (2001) *Yeast* 18: 97-113.
- Kautola H., Vahvaselkä M., Linko Y.Y., Linko P. (1985) *Biotechnol Lett* 7: 167-172
- Kamzolova S.V., Morgunov I.G., Aurich A., Perevoznikova O.A., Shishkanova N.V., Stottmeister U., Finogenova T.V. (2005) *Food Technol Biotechnol* 43: 113-122
- Kawamura D., Furuhashi M., Saito O., Matsui H. (1981) JP-Patent, 56 137 893
- Kawamura D., Saito O., Matsui H., Morita K., (1981) *Shizuoka-Ken Kogyo Shikenjo Hokoku* 25: 65-68
- Kawamura D., Saito O., Matsui H., Morita K., (1982) *Shizuoka-Ken Kogyo Shikenjo Hokoku* 26: 97-101
- Kawamura D., Saito O., Matsui H., Morita K., (1983) *Shizuoka-Ken Kogyo Shikenjo Hokoku* 27: 77-88
- Kinoshita K. (1932) *Acta Phytochimica* 5: 271-287
- Kuenz, A. (2006) Projektbesprechung Verbundprojekt "Mikrobielle Produktion von Itaconsäure" Braunschweig
- Levinson W.E., Kurtzman C.P. and Kuo T.M. (2006) *Enzyme Microb Technol* 39: 824–827
- Luskin L.S. (1974) Itaconic Acid. in Yokum, R.H., Nyquist, E.B. (eds): *Functional monomers*. Vol. 2, Marcel Dekker, New York, 465-501
- Kobayashi T. and Nakamura I. (1962) *J Ferment Technol* 40: 181–188
- Marchand G., Fortier E., Neveu B., Bolduc S., Belzile F., Bélanger R.R. (2007) *J Microbiol Methods* 70(3): 519-27
- Mauersberger S., Kruse K., Barth G. (2002) Patentanmeldung, DP102 33 600.8
- Mauersberger S., Kruse K. and Barth G. (2003) In: *Non-conventional yeasts in genetics, biochemistry and biotechnology* (Wolf K., Breunig K., Barth G., eds.) Springer Verlag, pp. 393-400

- McKay I.A., Maddox I.S., Brooks J.D. (1994) *Appl Microbiol Biotechnol* 41: 72-78.
- Moeller L., Strehlitz B., Aurich A., Zehnsdorf A., Bley T. (2007) *Eng Life Sci* 5: 504-511
- Nakahara T., Kawashima H., et al. (1983) *J Ferment Technol* 61: 19-23.
- Neveu B., Belzile F., Bélanger R.R. (2007) *Antonie Van Leeuwenhoek*. 92(2): 245-55
- Pichler H., Obenaus F. und Franz G. (1967) *Erdöl Kohle Erdgas Petrochemie* 20: 188
- Park Y.S., Itida M., Ohta M. and Okabe M. (1994) *J Ferment Bioeng* 77: 329–331
- Riscaldati E., Moresi M., Federici F., Petruccioli M. (2000) *J Biotechnol* 83(3): 219-30
- Seidel, G. (1999) Dissertation, Universität Hannover
- Specht R (2004) Diplomarbeit, TU Dresden
- Specht R., Aurich A., Bodinus C., Barth G., Kreyß E. (2007) Patentanmeldung, EM 0607 (UFZ-intern)
- Sugita T., Takashima M., Poonwan N., Mekha N., Malaithao K., Thungmuthasawat B., Prasarn S., Luangsook P., Kudo T. (2003). *Microbiol Immunol* 47: 183-190
- Stottmeister U., Behrens U., Weissbrodt E., Barth G., Franke-Rinker D. und Schulze E. (1982) *Z Allg Mikrobiol* 22: 399-424
- Stottmeister U., Weissbrodt E. (1991) AZ: 0319759 A 7
- Stottmeister U., Aurich A., Wilde H., Andersch J., Schmidt S., Sicker D. (2005) *J Ind Microbiol Biotechnol* 32: 651-664
- Tabuchi T., Nakahara T. (1980) Patent, JP55034017
- Tabuchi T., Sugisawa T., Ishidori T., Nakahara T. and Sugiyama J. (1981) *Agric Biol Chem* 45: 475-479
- Wang Q.-M., Jia J.-H., Bai F.-Y. (2006) *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 289–293
- Wei Y.H., Lee F.L., Hsu W.H., Chen S.R., Chen C.C., Wen C.Y., Lin S.J., Chu W.S., Yuan G.F., Liou G.Y. (2005) *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46: 223-229
- Weißbrodt E., Gey M., Barth G. et. al. (1989), Patent, DD 267 999 A1 17.05.89
- Welter K. (2000), Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
- Willke T., Vorlop K.D. (2001) *Appl Microbiol Biotechnol* 56: 289-295
- Winskill N. (1983) *J Gen Microbiol* 129: 2877-2883
- Yahiro K., Shibata S., Jia S.R., Park Y., Okabe M. (1997) *J Ferm Bioeng* 84: 375-377

7. Erläuterung von Abkürzungen und Symbolen

2-OGA	2-Oxoglutarsäure
A.	<i>Aspergillus</i>
Abb.	Abbildung
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
CAD	<i>cis</i> -Aconitsäuredecarboxylase
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
CSL	Maisquellwasser (corn steep liquor)
E.	<i>Escherichia</i>
FNR	Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HK	Hauptkultur
IA	Itaconsäure
IC	Ionenchromatographie
kb	Kilobasen
NRRL	Northern Regional Research Laboratory (jetzt: Agricultural Research Service Culture Collection)
OD ₆₀₀	Optische Dichte (600 nm)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
P.	<i>Pseudozyma</i>
SUC2	Gen der Invertase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
T.	Temperatur
U.	<i>Ustilago</i>
ÜNK	Übernachtkultur
URA3	Gen der Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase
VK	Vorkultur
WT	Wildtyp
Y.	<i>Yarrowia</i>
YNB	Yeast Nitrogen Base

Anhang

A. 1 Vollmedium nach Tabuchi et al. (1981) und mit Limitation von N, P und Fe

KH ₂ PO ₄	0,5 g/l
NH ₄ Cl	3 g/l
FeSO ₄	0,0035 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g/l
Hefeextrakt	1 g/l
Glucose	100 g/l

N-limitiert:

NH ₄ Cl	0,5 g/l
--------------------	---------

P-limitiert:

KH ₂ PO ₄	0,1 g/l
---------------------------------	---------

Fe-limitiert

FeSO ₄	0 g/l
-------------------	-------

pH 5,5-6,5; Pufferung mit 0,5 g CaCO₃ pro 100 ml und 20%iger NaOH

A. 2 Medium für Stammscreening nach Stottmeister & Weißbrodt (1991)

KH ₂ PO ₄	2,0 g/l
NH ₄ Cl	2,5 g/l
FeSO ₄	0,0035 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g/l
Hefeextrakt	2,5 g/l
Glucose	100 g/l

P-limitiert:

KH ₂ PO ₄	0,1 g/l
---------------------------------	---------

pH 5,5-6,5; Pufferung mit 0,5 g CaCO₃ pro 100 ml und 20%iger NaOH

A. 3 Medium für Stammscreening nach Denbe (1981)

KH ₂ PO ₄	0,5 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g/l
NaSO ₄	1,5 g/l
Glucose	100 g/l
CSL	0,4 Vol.%

A. 4 Medium nach Kawamura et al (1981, 82, 83), Yeast 668

KH ₂ PO ₄	0,5 g/l
NaNO ₃	1,5 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g/l
Glucose	100 g/l
CSL	0,2 Vol.%

modifiziert:

FeSO ₄ x 7 H ₂ O	15 mg/l
--	---------

A. 5 YNB-Medium

KH ₂ PO ₄	1,0 g/l
MgSO ₄	0,5 g/l
NH ₄ Cl	8,0 g/l
CaCl ₂	0,1 g/l
Glucose	80 g/l
Thiamin	0,4 mg/l
Spurenelemente	1,0 Vol%

Spurenelemente für YNB-Medium (100x)

H ₃ BO ₃	50 mg/l
CuSO ₄	4,0 mg/l
KI	10 mg/l
FeCl ₃	20 mg/l
MnSO ₄	40 mg/l
Na ₂ MoO ₄	20 mg/l
ZnSO ₄	40 mg/l

A. 6 YM Medium

Hefeextrakt	3,0 g/l
Pepton aus Casein	2,5 g/l
Glucose	5,0 g/l
Malzextrakt	3,0 g/l

A. 7 Readeragar für Hefen

Readerkonzentrat	100 ml/l
Hefeextrakt	2,5 g/l
D-Glucose	20 g/l
Agar-Agar	20 g/l

Readerkonzentrat (10x konz.; vereinfacht)

(NH ₄) ₂ SO ₄	30 g/l
MgSO ₄	7 g/l
KH ₂ PO ₄	10 g/l
K ₂ HPO ₄	1,6 g/l
NaCl	5 g/l
Ca(NO ₃) ₂	4 g/l

A. 8 Verwendete Mikroorganismen für Stammscreening

Stamm	Bezeichnung	Referenzen / Bemerkungen
<i>Pseudozyma fusiformata</i>	CBS423.96=CBS6951; H485 ¹⁾	Tabuchi et al. 1981
<i>Pichia stipitis</i>	DSM3651; H401 ¹⁾	Stottmeister & Weißbrodt 1991
<i>Candida boidinii</i>	DSM70034; H415 ¹⁾ DSM70033; H416 ¹⁾ DSM70024; H418 ¹⁾	Stottmeister & Weißbrodt 1991
<i>Yarrowia lipolytica</i>	B204-12D, H420 ¹⁾ H222-136, H421 ¹⁾ H222-27, H422A, H422B ¹⁾ YC H202, H423 ¹⁾ B434, H424 ¹⁾ 222-220, H425 ¹⁾ 222-15, H426 ¹⁾ B4-35, H427 ¹⁾ 222-154, H428 ¹⁾ BYC-1-7, H429 ¹⁾ B204-12c, H430 ¹⁾ B204, H432 ¹⁾ YB24a, H433 ¹⁾ BYB1-1, H434 ¹⁾ 222-44, H435 ¹⁾ B204, H436 ¹⁾ BYC1-1, H437 ¹⁾ 222-230, H438 ¹⁾ 222-1, H439 ¹⁾ 222-211, H440 ¹⁾ 222-9, H441 ¹⁾	Barth & Weber (80er Jahre); Mutanten, welche im Rahmen des Screening nach 2-Oxoglutar Säure- bildenden <i>Yarrowia</i> Stämmen gewonnen wurden
<i>Rhodotorula spec</i> <i>Rhodotorula rubra</i>	RH7 RH42	Denbe 1981
<i>Pseudozyma aphidis</i> <i>Pseudozyma fusiformata</i> <i>Pseudozyma tsukubaensis</i> <i>Pseudozyma antarctica</i>	CBS517.83, H486 ¹⁾ CBS421.96, H487 ¹⁾ CBS422.96, H488 ¹⁾ CBS516.83, H489 ¹⁾	Kawamura (1981, 82, 83)

1) Bezeichnung Stammsammlung UFZ Leipzig

A. 9 CSL-Zusammensetzung und Aminosäuregehalt (aus Seidel, 1999)

Zusammensetzung von Maisquellwasser (Corn-Steep-Liquor)

Bestandteil	Gehalt [g / 100 g CSL]
Trockenmasse	46,8 - 49,6
Asche	8,04 - 10,43
Total-Stickstoff	3,33 - 3,67
Total-Zucker (als Glucose)	0,74 - 4,39
Lactat	11,6 - 19,3
Eisen	0,009 - 0,0027
Phosphor	1,5 - 1,9
Calcium	0,02 - 0,07
Zink	0,005 - 0,012
Kalium	2,0 - 2,5
pH	4,0 - 4,7

: Zusammensetzung des CSL nach Cejka, Schering AG Bergkamen

Aminosäure	Frei [g/kg Trockenmasse]	Total [g/kg Trockenmasse]
Alanin	40,7	54,5
Arginin	2,4	20,3
Aspartat	2,2	19,9
Cystein	0	1,3
Glutamat	7,7	40,2
Glycin	6,6	26,8
Histidin	0	31,8
Isoleucin	11,2	17,3
Leucin	35,5	39,3
Lysin	0	14,8
Methionin	6,5	6,9
Phenylalanin	26,2	27,4
Prolin	27,7	48,2
Serin	10,7	19,0
Threonin	9,3	20,7
Tyrosin	1,3	6,5
Valin	20,1	30,5

: Aminosäuregehalt in Maisquellwasser (CSL) /Christensen 1992/

A. 10 Vitaminlösungen

Es wurden zwei unterschiedliche Vitaminlösungen eingesetzt. In Tabelle 1 ist deren Zusammensetzung gezeigt. Die Vitaminlösungen wurden bereits sterilt gefiltert vom Hersteller bezogen.

Tabelle 1 Zusammensetzung der verwendeten Vitaminlösungen [www.sigmaaldrich.com]

Komponente \ (mg/l)*	Gamborg's vitamin solution (1000x)	Kao and Michayluk vitamin solution (100x)
----------------------	---------------------------------------	--

p-Aminobenzoic acid		0.02
L-Ascorbic acid		2.0
Biotin		0.01
D-Calcium pantothenate		1.0
Choline chloride		1.0
Folic acid		0.4
myo-Inositol	100.0	100.0
Nicotinamide (Niacinamide)		1.0
Nicotinic acid	1.0	
Pyridoxine x HCl	1.0	1.0
Riboflavin		0.2
Thiamine x HCl	10.0	1.0
Vitamin A (Retinol)		0.01
Vitamin B ₁₂		0.02
Vitamin D (Cholecalciferol)		0.01

*im Medium vorliegende Konzentrationen nach oben aufgeführter Verdünnung