

Biotechnologische Wertstoffsynthese

Malatproduktion aus Rohglycerin mit *Ustilago*

THIEMO ZAMBANINI¹, MARC GAUERT², GUIDO MEURER², NICK WIERCKX¹, LARS M. BLANK¹

¹ INSTITUT FÜR ANGEWANDTE MIKROBIOLOGIE – IAMB, RWTH AACHEN

² BIOTECHNOLOGY RESEARCH AND INFORMATION NETWORK AG, ZWINGENBERG

The use of biodiesel derived crude glycerol for the production of value added chemicals has been discussed frequently. Current glycerol-based microbial production process often suffers from low rates, titers, and yields, hindering their industrial application. Here we report on the identification and optimization of *Ustilago trichophora* as promising novel production organism for malic acid from glycerol. All optimization steps presented avoid metabolic engineering resulting in a non-GMO organism.

DOI: 10.1007/s12268-018-0908-7
© Springer-Verlag 2018

Die Notwendigkeit von Alternativen zu fossilen Brennstoffen ist heutzutage in aller Munde. Jedoch haben viele der neuen Möglichkeiten Schwachstellen und Optimierungsbedarf. Bei der Produktion von Biodiesel beispielsweise, das als vielversprechende Alternative zum herkömmlichen rohöl-basierten Diesel gehandelt wird, fallen zehn

Prozent (w/v) des produzierten Biodiesels als Rohglycerin an. Eine wertschöpfende Nutzung dieses Nebenproduktes würde sowohl den ökologischen als auch den ökonomischen Vorteil des Produktionsprozesses von Biodiesel deutlich steigern. Die Möglichkeit der mikrobiellen Verwertung von Glycerin wurde viele Male diskutiert [1–4]. Oftmals resultieren

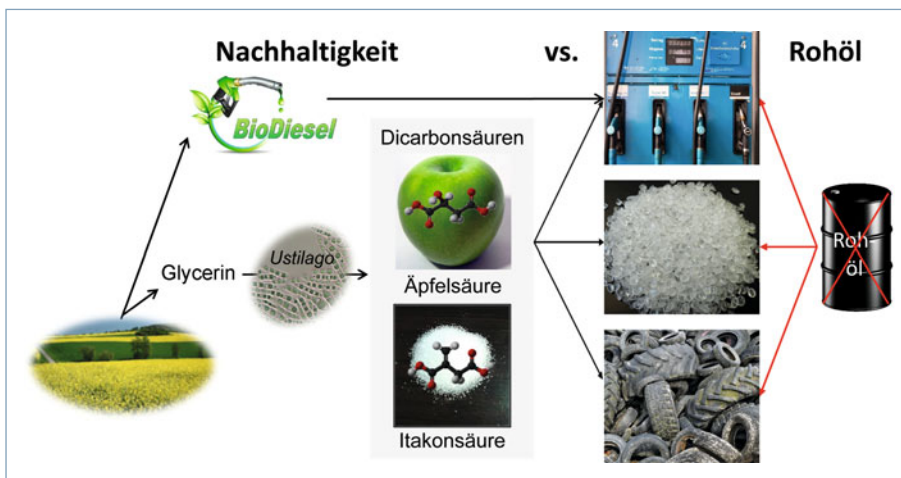
Fermentationen jedoch nicht in den für eine Wirtschaftlichkeit benötigten hohen Werten für Titer, Rate und Ausbeute. Dies ist unter anderem auf die im Rohglycerin enthaltenen Verunreinigungen zurückzuführen, die die Möglichkeiten der Verwendung etablierter Produktionsorganismen schmälern.

Identifizierung eines neuen Produktionsorganismus

Die Identifizierung neuer, vielversprechender Organismen, die in der Lage sind, viele Substrate zu verwerten, und eine hohe Toleranz gegenüber Verunreinigungen im Medium aufweisen, ist von großer Bedeutung für die Bioproduktion. Ferner sollten diese Organismen natürlicherweise große Mengen an wertvollen Produkten herstellen. Eine Gruppe von Organismen, die diese Charakteristika erfüllt, sind Pilze der Familie Ustilaginaceae [5–7]. In den vergangenen Jahren hat sich insbesondere der bekannteste Vertreter, *Ustilago maydis*, zu einem Modellorganismus für die Untersuchung von Pflanze-Wirt-Interaktionen entwickelt [8, 9]. Aufgrund der Fähigkeit zur Verwertung vielfältiger Substrate und ihrer großen Bandbreite an natürlicherweise produzierten Produkten, gelten Ustilaginaceen jedoch auch als vielversprechende Organismen für die biotechnologische Produktion unter anderem von organischen Säuren, wie Itakonsäure und Äpfelsäure. Diese organischen Säuren können ihrerseits als Ersatzstoffe für viele derzeit petrochemisch hergestellte Chemikalien und Produkte verwendet werden, beispielsweise in Farben und Lacken, als Kunststoffe, in der Lebensmittelindustrie oder als Vorstufe für Biokraftstoffe [10]. In einem breit angelegten Screening von 74 Ustilaginaceen mit Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle erreichte *U. trichophora* mit einer Wachstumsrate von $0,11 \text{ h}^{-1}$ und einer Malatproduktionsrate von $0,01 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ die besten Werte [11].

Adaptive Laborevolution

Verglichen mit Literaturwerten für die mikrobielle Malatproduktion sind diese Werte

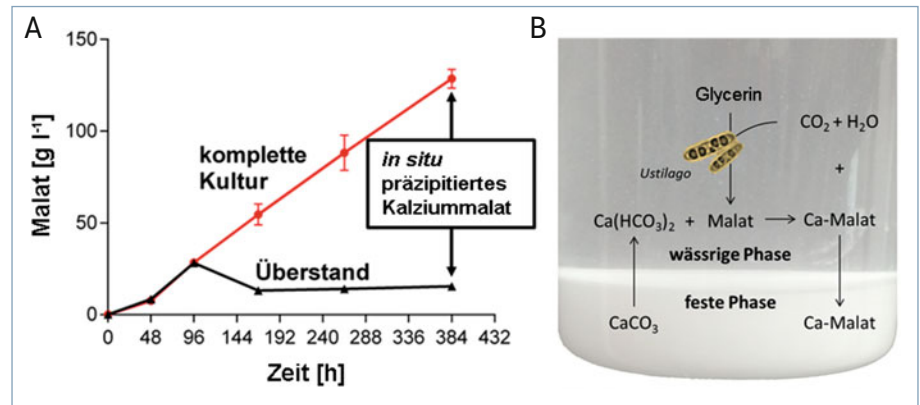


▲ **Abb. 1:** Schema des skizzierten Beitrags zu einer Bioökonomie. Durch die Etablierung eines biotechnologischen Prozesses zur Herstellung von Dicarbonsäuren aus Glycerin kann die Biodieselherstellung optimiert und eine Vielzahl petrochemischer Produktionsprozesse ersetzt werden. Dazu wurden *Ustilago*-Stämme identifiziert und optimiert, die in der Lage sind, effizient auf Glycerin zu wachsen. Diese Brandpilze wachsen hefeartig, was einen bedeutenden Vorteil gegenüber filamentösen Pilzen im industriellen Maßstab darstellt. Die produzierte Äpfelsäure (Malat) oder Itakonsäure haben Anwendungen in der Polymer- und Biokraftstoffsynthese.

jedoch gering. Deshalb wurde in einem zweiten Schritt die Glycerinverwertung von *U. trichophora* mittels adaptiver Laborevolution verbessert. Diese Methode kann dabei helfen, Mikroben für bestimmte Umweltbedingungen, wie suboptimale pH-Werte und Temperaturen oder die Verwertung einer nicht präferierten Kohlenstoffquelle zu optimieren [12, 13]. Durch ein einfaches sequenzielles Reinokulationsschema in Schüttelkolben, bei dem nach Erreichen einer bestimmten optischen Dichte eine neue Kultur angeimpft wurde, konnte die Wachstumsrate innerhalb von etwa 140 Generationen auf $0,26 \text{ h}^{-1}$ verbessert werden. Gleichzeitig erhöhte sich die Produktionsrate für Malat auf $0,07 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ [11]. Diese Produktionsverbesserungen beruhen auf einer optimierten Glycerinverwertung, wobei es sich sowohl um Verbesserungen handeln kann, die durch Adaption an die gegebenen Bedingungen entstanden sind, als auch um solche, die durch Mutation hervorgerufen wurden.

In situ-Produktabtrennung

Da sowohl die Stammselektion als auch die adaptive Laborevolution äußerst arbeitsintensiv sind, insbesondere bei einer hohen Anzahl von Parallelansätzen, wurde ein Medium verwendet, das einen einfachen, schnellen und verlässlichen Arbeitsablauf ermöglicht. Dafür wurde ein lösliches Puffersystem benutzt, das jedoch auf eine hohe Pufferkapazität verzichtet und folglich für die Etablierung einer maximalen Produktionsrate und Produktkonzentration hinderlich ist. Um dieser äußeren Limitierung entgegenzuwirken, wurde das Puffersystem gewechselt und unlösliches CaCO_3 eingesetzt. Gleichzeitig wurde eine höhere Glycerinkonzentration für den Organismus zur Verfügung gestellt. Der Wechsel zu CaCO_3 resultierte, zusätzlich zur höheren Pufferkapazität, in der Bildung von unlöslichem Ca-Malat (**Abb. 2B**). Durch die höhere Pufferkapazität des CaCO_3 wird zum einen der pH-Wert über den gesamten Produktionszeitraum konstant gehalten. Zum anderen sorgt die Präzipitation von Ca-Malat für eine geringere gelöste Malatkonzentration (**Abb. 2A**) und reduziert dabei den toxischen Effekt, den hohe Malatkonzentrationen haben. So konnte eine Konzentration von fast 200 g l^{-1} und eine Produktionsrate von $0,39 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in Schüttelkolben erreicht werden. Dabei liegt der Großteil des gebildeten Malats (etwa 180 g l^{-1}) als unlösliches Ca-Malat vor.



▲ **Abb. 2:** *In situ*-Abtrennung von Malat. **A**, Malatkonzentration im Schüttelkolben in der kompletten Kultur (rot) und gelöst im Überstand (schwarz) (adaptiert von [11]). **B**, Schema der Kalziummalat-Präzipitation (*in situ*-Produktabtrennung) im Medium. Das durch *Ustilago* produzierte Malat reagiert mit CaCO_3 zu Ca-Malat, was bei Konzentrationen über 14 g l^{-1} ausfällt. Hierbei entsteht CO_2 als Nebenprodukt, das durch *Ustilago* wieder als Substrat mittels Anaplerose für die Produktion von Malat verwendet wird.

Hoch-Zelldichte-Fermentation

Um die Produktionsrate weiter zu erhöhen, können hohe Zelldichten hilfreich sein. Dabei sind jedoch im Schüttelkolben der geringe Sauerstoffeintrag, der aus viskoser Kulturbrühe resultiert, und der vollständige Verbrauch des Glycerins die limitierenden Faktoren. Diese Limitationen konnten in Bioreaktoren überwunden werden. Durch die Möglichkeit der Kombination von Rühren und Begasen konnte unter Zugabe höherer Mengen an Ammoniumchlorid (NH_4Cl) eine deutlich höhere Zelldichte erreicht werden als in Schüttelkolben. An dieser Stelle sei kurz auf den grundsätzlichen Produktionsprozess von organischen Säuren bei Ustilaginaceen eingegangen. Nach einer Wachstumsphase, in der insbesondere Stickstoff und Kohlenstoff verbraucht werden, im verwendeten Medium NH_4Cl und Glycerin, beginnt nach vollständigem Verbrauch des Stickstoffs die Produktionsphase, in der aus Glycerin die organischen Säuren hergestellt werden. Die erhöhte NH_4Cl -Konzentration sorgte somit für eine längere Wachstumsphase und einen deutlich höheren Verbrauch an Glycerin für die Biomassebildung. In der sich anschließenden Produktionsphase konnte jedoch eine gesteigerte Malatproduktionsrate erzielt werden. Durch zusätzlichen Glycerin-Feed konnte eine konstante Substratzufuhr gewährleistet werden. Eine Kombination der optimalen Faktoren – hoher Sauerstoffeintrag, hohe Zelldichte, hohe Substratzufuhr – resultierte in 200 g l^{-1} Malat. Hierbei wurde Malat mit einer durchschnittlichen Rate (Mittelwert von Wachstums- und Produktionsphase) von $0,8 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und einer maximalen Rate (Pro-

duktionsphase bis 100 g l^{-1} Malat) von fast $2 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ produziert [14]. Diese Werte stellen bis heute die höchsten veröffentlichten Werte für die mikrobielle Malatproduktion dar. Darüber hinaus handelt es sich bei dem verwendeten *U. trichophora*-Stamm um einen genetisch unmodifizierten Organismus, wodurch die Verwendung auch im Bereich der Lebensmittelindustrie ermöglicht wird. Das geschilderte Verfahren der Stammfindung und Produktionsverbesserung kann auf weitere organische Säuren übertragen werden (z. B. Itakonat [15]). Dadurch ergibt sich ein äußerst breites Spektrum an erzielbaren Produkten, deren gemeinsamer Ausgangsstoff das Rohglycerin aus der Biodieselproduktion ist. Insbesondere die Etablierung solcher Produktionsprozesse direkt vor Ort gekoppelt an Biodieselfraffinerien scheint ein vielversprechender Weg, um deren Gesamtkonzept weiter zu verbessern. Dies wäre ein wichtiger Schritt auf dem Weg in eine zirkuläre Bioökonomie und in eine saubere Zukunft.

Danksagung

Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung im Rahmen der strategischen Allianz ZeroCarbFP (FKZ 031A217F) gefördert.

Literatur

- [1] West TP (2012) Crude glycerol: a feedstock for organic acid production by microbial bioconversion. *J Microb Biochem Technol* 4, doi: 10.4172/1948-5948.1000e106
- [2] Da Silva GP, Mack M, Contiero J (2009) Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol Adv* 27:30–39

- [3] Dobson R, Gray V, Rumbold K (2012) Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39:217–226
- [4] Klein M, Swinnen S, Thevelein JM et al. (2017) Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities. *Environ Microbiol* 19:878–893
- [5] Geiser E, Wierckx N, Zimmermann M et al. (2013) Identification of an endo-1,4-beta-xylanase of *Ustilago maydis*. *BMC Biotechnol* 13:59
- [6] Klement T, Büchs J (2013) Itaconic acid – a biotechnological process in change. *Bioresour Technol* 135:422–431
- [7] Paulino BN, Pessôa MG, Molina G et al. (2017) Biotechnological production of value-added compounds by ustilaginomycetous yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:7789–7809
- [8] Dean R, Van Kan JA, Pretorius ZA et al. (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 13:414–430
- [9] Bölker M, Basse CW, Schirawski J (2008) *Ustilago maydis* secondary metabolism – from genomics to biochemistry. *Fungal Genet Biol* 45:88–93
- [10] Magnuson JK, Lasure LL (2004) Organic acid production by filamentous fungi. In: Tkacz JS, Lange L (Hrsg) *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture and Medicine*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. S 307–340
- [11] Zambanini T, Sarikaya E, Kleineberg W et al. (2016) Efficient malic acid production from glycerol with *Ustilago trichophora* TZ1. *Biotechnol Biofuels* 9:67
- [12] Dragosits M, Mattanovich D (2013) Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. *Microb Cell Fact* 12:64
- [13] Sauer U (2001) Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes. *Adv Biochem Eng/Biotechnol* 73:129–169
- [14] Zambanini T, Kleineberg W, Sarikaya E et al. (2016) Enhanced malic acid production from glycerol with high-cell-density *Ustilago trichophora* TZ1 cultivations. *Biotechnol Biofuels* 9:135
- [15] Zambanini T, Hosseinpour Tehrani H, Geiser E et al. (2017) Efficient itaconic acid production from glycerol with *Ustilago vetiveriae* TZ1. *Biotechnol Biofuels* 10:131



Lars M. Blank, Thiemo Zambanini, Nick Wierckx (iAMB, RWTH Aachen), Marc Gauert (nicht abgebildet) und Guido Meurer (BRAIN AG) (v. l. n. r.)

Korrespondenzadresse:

Dr. Nick Wierckx
 Institut für Angewandte Mikrobiologie (iAMB)
 RWTH Aachen
 Worringerweg 1
 D-52074 Aachen
 Tel.: 0241-80-26649
 Fax: 0241-80-622180
 nick.wierckx@rwth-aachen.de