

## Industrielle Mikrobiologie

### Fragen und Antworten

#### Kapitel 1: Geschichtlicher Überblick

**F:** Welche Gär- bzw. Stoffwechselprozesse wurden schon vor mehr als 5000 Jahren zur Lebensmittelbereitung und -konservierung genutzt, obwohl die beteiligten Mikroorganismen und die biologischen und biochemischen Hintergründe nicht bekannt waren? Welche Substrate wurden verwendet und welche Mikroorganismen waren höchstwahrscheinlich beteiligt?

**A:** Nach schriftlichen oder bildlichen Überlieferungen wurden mindestens vier mikrobielle Prozesse für die Herstellung von fünf Lebensmitteln genutzt:

- a) Die CO<sub>2</sub>-freisetzende Gärung bei der Brotherstellung; Substrate waren flüssiger und halbfester Getreidebrei, d.h. aus Getreidestärke freigesetzter Zucker. Beteiligt waren zufällig eingebrachte Hefen und Milchsäurebakterien.
- b) Die ethanolische Gärung bei der Bierherstellung; Substrate waren flüssiger Brotteig oder gebackenes und dann wieder eingeweichtes Brot, d.h., das eigentliche Substrat war aus Getreidestärke freigesetzter Zucker. Beteiligt waren zufällig eingebrachte Hefen.
- c) Ebenfalls die ethanolische Gärung bei der Weinherstellung; Substrate waren zuckerhaltige Obstsaften (hauptsächlich Weinbeeren) und verdünnter Honig. Beteiligt waren die auf den Schalen der geernteten Früchte vorhandenen Hefen.
- d) Die Milchsäuregärung bei der Herstellung von Sauer Milchprodukten; Substrat war Milch, beteiligt waren zufällig eingebrachte Milchsäurebakterien.
- e) Die Ethanoloxidation bei der Herstellung von Essig; Substrat war Wein, beteiligt waren Essigsäurebakterien.

**F:** Im Mittelalter wurde in Europa Salpeter hergestellt, das für Schießpulver gebraucht wurde. Erklären Sie, welche Mikroorganismen daran beteiligt waren und welche Stoffwechselleistung zu Salpeter führt.

**A:** Die aus stickstoffhaltigen, organischen Verbindungen in mit tierischen und menschlichen Exkrementen getränkten Böden und Dung freigesetzten Ammoniumsalze wurde durch nitrifizierende Bakterien (z.B. *Nitrobacter* und *Nitrosomonas*) zu Nitrat oxidiert und als Kalium- oder Natriumsalz gewonnen. Der Prozess wird heute Nitrifikation genannt.

**F:** Nennen und beschreiben Sie kurz wesentliche Verdienste von Louis Pasteur für die Mikrobiologie. In welcher Zeit erarbeite L. Pasteur seine Erkenntnisse?

**A:** Die Arbeiten von L. Pasteur gehen auf die Zeit zwischen 1856 und 1880 zurück. Wesentliche Verdienste sind:

- a) Der durch Hitzeinaktivierung (heute Pasteurisieren genannt) erbrachte Nachweis, dass damals bekannten Stoffumwandlungen zumindest teilweise auf die Aktivität von Mikroorganismen zurückgeht
- b) Die Bedeutung von mikrobiellen Reinkulturen bzw. die Gefahr von Kontaminationen, sowie die Einführung von Steriltechniken und Sterilisationsverfahren als Voraussetzung

- c) Die Beschreibung der aeroben und anaeroben Lebensweise sowie der Alkoholgärung von Hefen
- d) Die Beschreibung der Milchsäuregärung und der Buttersäuregärung durch Milchsäurebakterien bzw. *Clostridien*

**F:** Warum wurde Ende des 19. Jahrhunderts der Bau von Kläranlagen notwendig?

**A:** Die immer dichtere Besiedlung und die Entstehung von Ballungsräumen durch die Industrialisierung führte zu einer drastischen Zunahme von kommunalen und industriellen Abwässern, die mit organischen Verbindungen belastet waren und in natürliche Gewässer eingeleitet wurden. Der durch Sauerstoffmangel viel zu langsame natürliche Abbau durch Mikroorganismen führte in Bächen, Flüssen und Seen zur Akkumulation von Abbauprodukten und damit verbunden zu unangenehmen Gerüchen. Außerdem bestand in den belasteten Gewässern eine erhebliche Infektionsgefahr.

**F:** Welchen Anlass gab es zu Beginn des 20. Jahrhunderts für die industrielle Herstellung von Glycerin mit Mikroorganismen? Welche Spezies und welche Substrate wurden eingesetzt? Beschreiben Sie kurz, wie dabei in den natürlichen Stoffwechsel des Mikroorganismus eingegriffen wurde.

**A:** Der Ausbruch des 1. Weltkrieges verursachte einen Engpass an Industriefett, aus dem Glycerin für die Darstellung von Nitroglycerin zur Produktion von Dynamit gewonnen wurde. Mithilfe von *Saccharomyces cerevisiae* wurde deshalb Glycerin aus Melasse im großen Maßstab produziert. Durch Zugabe von Sulfid wurde die Ethanolbildung drastisch reduziert und die Bildung von Glycerin, dem wichtigsten Nebenprodukt, gesteigert. Sulfid fängt den bei der Ethanolbildung als Zwischenprodukt anfallenden Acetaldehyd ab. Mit den bei der Glycolyse anfallenden Reduktionsäquivalenten wird Dihydroxyaceton-Phosphat zu Glycerin-3-Phosphat reduziert. Dieses wird zu Glycerin dephosphoryliert.

**F:** Beschreiben Sie die Entdeckung des Penicillins. Wer entdeckte das Penicillin? Wann wurde Penicillin zum ersten Mal in großtechnischem Maßstab produziert und welche Probleme mussten bei der Überführung in den großen Maßstab überwunden werden?

**A:** Alexander Fleming beobachtete 1928, dass der Schimmelpilz *Penicillium chrysogenum* eine Substanz ausscheidet, die wachsende Zellen von *Staphylococcus aureus* und anderen Bakterien abtötet. Die Substanz nannte er Penicillin. Es dauerte noch bis Anfang der 1940er Jahre, bis es gelang, Penicillin in ausreichender Menge für eine klinische Studie zu isolieren. Ab 1943 wurde Penicillin von mehreren Firmen großtechnisch mit neu isolierten und weiter entwickelten *Penicillium*-Stämmen auf optimierten Kulturmedien hergestellt. In der Anfangsphase gab es beträchtliche Probleme mit der Optimierung der Kulturbedingungen, mit Kontaminationen und mit der Aufarbeitung des relativ empfindlichen Produktes.

**F:** Was ist mit dem Begriff „Weiße Biotechnologie“ gemeint? Grenzen Sie den Begriff anhand von Beispielen zur roten und zur grünen Biotechnologie ab.

**A:** Die „Weiße Biotechnologie“, auch „Industrielle Mikrobiologie“ genannt, beschreibt und erklärt Aspekte der industriellen Produktionsweise mithilfe von Mikroorganismen oder auch mikrobiellen Enzymen/Enzymsystemen. Die Methodenentwicklung zur Produktion des Insulinvorläufers mit *Escherichia coli* gehört zur Weißen Biotechnologie, obwohl das

Peptidhormon im Menschen wirkt. Dagegen wird die wissenschaftliche Arbeit zur Gewinnung von tPA mit Säugerzellen zur Roten Biotechnologie gezählt. Die Expression des bakteriellen Gens für das Insektentoxin aus *Bacillus thuringiensis* in Mais ist ein Thema der Grünen Biotechnologie, denn der Produzent ist eine Pflanze.

**F:** Seit etwa 1990 wird in der Industriellen Mikrobiologie das sogenannte „Metabolic Engineering“ eingesetzt. Was verstehen Sie unter diesem Begriff?

**A:** Als „Metabolic Engineering“ bezeichnet man den Einsatz gentechnischer Methoden zur Modifizierung von Stoffwechselwegen in industriellen Produktionsstämmen und, damit verbunden, die Optimierung und Ausweitung der Produktionseigenschaften der Stämme, z.B. durch gezielte Veränderung in der Regulation.

**F:** Durch welche gentechnischen Schritte konnten ab etwa 1990 die Produktionseigenschaften eines Mikroorganismus durch „Metabolic Engineering“ verbessert werden?

**A:** Durch Ausschalten, Abschwächen oder die Überexpression eines oder mehrerer Gene für Enzyme oder Regulatorproteine kann der Kohlenstofffluss vom Substrat zu einem gewünschten Produkt in einem Mikroorganismus umgelenkt, das Substratspektrum erweitert oder Synthesewege zu unerwünschten Nebenprodukten unterbrochen werden. Durch die Expression von heterologen (d.h. aus anderen Organismen stammenden) Genen können auch völlig neue Stoffwechselwege etabliert werden. In diesem Fall spricht man von „Synthetischer Mikrobiologie“.

**F:** Seit etwa 1990 werden in der Industriellen Mikrobiologie zunehmend gentechnische Methoden zur Entwicklung von Produktionsstämmen eingesetzt. Nennen Sie je ein Beispiel für ein niedermolekulares Produkt und für ein makromolekulares Produkt, das ohne Gentechnik mikrobiell nicht wirtschaftlich herstellbar wäre.

**A:** Ein niedermolekulares Produktbeispiel ist das Vitamin Riboflavin. Ein Beispiel für ein Makromolekül ist das Insulin für Diabetiker.

## Kapitel 2: Bioverfahrenstechnik

**F:** Im Rahmen eines Praktikums bekommt der Student Willi Neuling von seinem Betreuer die Aufgabe, *E. coli* im Schüttelkolben in LB-Medium<sup>1</sup> bis zu einer Biotrockenmassekonzentration von 4 g/L zu kultivieren. Er soll dazu Inokulum aus einer Glycerinkultur<sup>2</sup> verwenden, was bei einer  $OD_{620} = 10$  geerntet wurde. Der Betreuer schlägt als Animpfdichte 1 %<sup>3</sup> vor.

Wie viel Zeit sollte Willi Neuling für die Kultivierung einplanen?

Parameter	Einheit	Wert	Bemerkung
$\mu = \text{const}$	1/h	0,5	vereinfachend als konstant angenommen
$K_{OD, BTM}$	OD/BTM	3	Ergebnis einer zuvor durchgeführten Kalibrierungskurve; gilt für den lin. OD Bereich von 0,03–0,3

**A:**

$$\text{Ernte } OD = 10 \Rightarrow x_{\text{Ernte}} \left[ \frac{g}{L} \right] = \frac{OD_{620}}{K_{OD, BTM}} = \frac{10}{3} = 3,33 \frac{g_{BTM}}{L}$$

$$\text{Animpfdichte 1\%: } 0,01 = \frac{V_{\text{Ino}}}{V_R}$$

$$x_{\text{Ino}} = \frac{x_{\text{Ernte}} * V_{\text{Ino}}}{V_{\text{Ino}} + V_R} \approx x_{\text{Ernte}} * \frac{V_{\text{Ino}}}{V_R} = x_{\text{Ernte}} * 0,01 = 0,033 \frac{g_{BTM}}{L}$$

Schüttelkolben ist ein Batch-Ansatz:

$$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot x(t)$$

$$\Rightarrow \ln \frac{x_{\text{Ende}}}{x_{\text{Ino}}} = \mu \cdot t$$

$$\Rightarrow t = \frac{1}{\mu} \ln \frac{x_{\text{Ende}}}{x_{\text{Ino}}} = \frac{1}{0,5} [h] \cdot \ln \frac{4}{0,033} = 9,6h$$

**F:** Die Studentin Nicky Smart bekommt von ihrer Betreuerin die Aufgabe gestellt, im Schüttelkolben (für nachfolgende Experimente) die *E. coli*-Menge von 0,5 g<sub>BTM</sub> in einem 2L-Kolben mit 100 mL Flüssigvolumen herzustellen. Die Animpfdichte mit einem Glycerin-Stock sei 1 %,  $OD_{620} = 15$ .

<sup>1</sup> LB-Medium wird häufig für die Kultivierung von *E. coli* eingesetzt. Die Bezeichnung leitet sich von Luria Bertani als Urheberin ab, was jedoch auch Guiseppe Bertani zugeschrieben werden sollte.

<sup>2</sup> Für die Erstellung einer *working cell bank* werden häufig zellhaltige Proben aus einer Vorkulturstufe in 10–50% glycerinhaltige Medien eingefroren (= *stocks*).

<sup>3</sup> Bezeichnet typischerweise den Anteil an Animpfvolumen zu ‚Gesamt‘-Volumen zu Fermentationsstart. Zur Vereinfachung wird auch das Verhältnis Animpfvolumen zu *Batch*-Vorlagevolumen teilweise verwendet.

**F:** Wie viel Substrat S (z.B. Zucker) muss sie dafür bereit stellen? Welche Startkonzentration stellt sie im Schüttelkolben ein?

Parameter	Einheit	Wert	Bemerkung
$Y_{XS}$	g/g	0,4	vereinfachend als konstant angenommen
$K_{OD, BTM}$	OD/BTM	3	Ergebnis einer zuvor durchgeführten Kalibrierungskurve; gilt für den lin. OD Bereich von 0,03–0,3

**A:**

$$Y_{XS}^{batch} = \frac{x_{Ende} - x_{Ino}}{s_o - s_{Ende}} = \frac{x_{Ende} - x_{Ino}}{s_o - 0}$$

$$\text{Ernte OD} = 15 \Rightarrow x_{Ernte} \left[ \frac{g}{L} \right] = \frac{OD_{620}}{K_{OD, BTM}} = \frac{15}{3} = 5 \frac{g_{BTM}}{L}$$

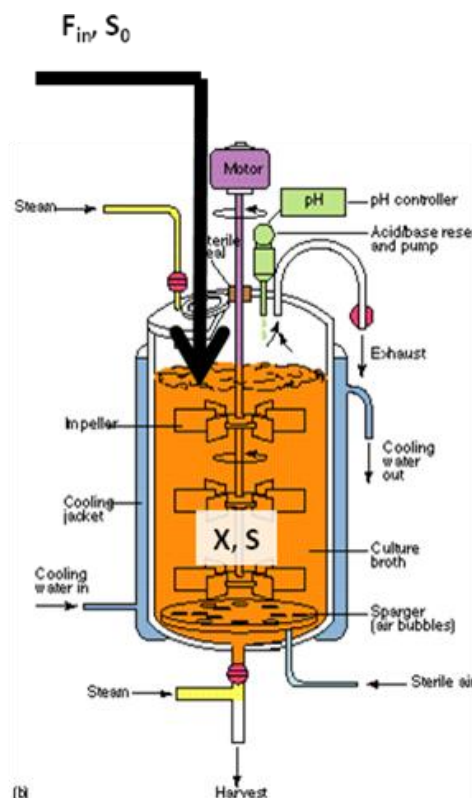
$$\text{Animpfdichte 1 \% : } 0.01 = \frac{V_{Ino}}{V_R}$$

$$x_{Ino} = \frac{x_{Ernte} * V_{Ino}}{V_{Ino} + V_R} \approx x_{Ernte} * \frac{V_{Ino}}{V_R} = x_{Ernte} * 0,01 = 0,05 \frac{g_{BTM}}{L}$$

$$\Rightarrow s_0 = \frac{x_{Ende} - x_{Ino}}{Y_{XS}} = \frac{\frac{m_{X, Ende}}{V_R} - x_{Ino}}{Y_{XS}} = \frac{\frac{0,5 [g_{BTM}]}{0,1 [L]} - 0,05 \left[ \frac{g_{BTM}}{L} \right]}{0,4} = 12,375 \left[ \frac{g}{L} \right]$$

Substratmenge:

$$S[g] = s_0 * V_R = 1,2375[g]$$



**F:** Der nebenstehend skizzierte Reaktor wird zunächst im Batch- und anschließend im Fed-Batch-Modus betrieben. Die angegebenen Größen besitzen die Einheiten  $F_{in}$  [l/h]; Eintrittskonzentration Substrat  $S_0$  [g/l];  $S$  [g/l];  $X$  [g/l]. Das Flüssigvolumen sei  $V_L$  [L]. Fred Clever (1) entscheidet sich dafür den Feed mit 500 g<sub>glucose</sub>/L von 0,02 L/h bereits 8 h nach Animpfen zu starten. Nicky Smart (2) möchte 10 h nach Animpfen starten.

- Welcher der beiden Experimentatoren stellt damit eine Substratversorgung ein, die näher an dem wahren, aktuellen Verbrauch ist?
- Wie wird sich Ihrer Meinung nach der Substratkonzentrationsverlauf im Fall 1 und 2 jeweils entwickeln. Zeichnen Sie einen qualitativen Verlauf mit dem Startpunkt bei Feedstart.

(Anmerkung: Nehmen Sie vereinfachend an, dass die Zellen mit max. Wachstumsgeschwindigkeit wachsen).

Parameter	Einheit	Wert	Bemerkung
$Y_{XS,true}$	g/g	0,4	Wahre Ausbeute
$\mu_{max}$	1/h	0,3	Monod-Kinetik
$K_S$	g/L	0,1	Monod-Kinetik
$X_0$	g/L	0,1	Startkonzentration
$S_0$	g/L	10	Glucose-Startkonzentration
$V_L$	L	10	Reaktionsvolumen

**A:**

a)  $\frac{dc_X}{dt} = \mu \cdot c_X \Rightarrow c_{x,batch} = c_{X0} \cdot \exp(\mu \cdot t)$

$\Rightarrow Fall1: c_{X1} = 1.102 \frac{g}{L} (8h); Fall2: c_{X2} = 2.008 \frac{g}{L} (10h)$

$Fall1: Q_1 = \frac{\mu}{Y_{XS}} c_{X1} \cdot V = \frac{0.3}{0.4} 1.102 \cdot 10 = 8.265 \frac{g}{h}$

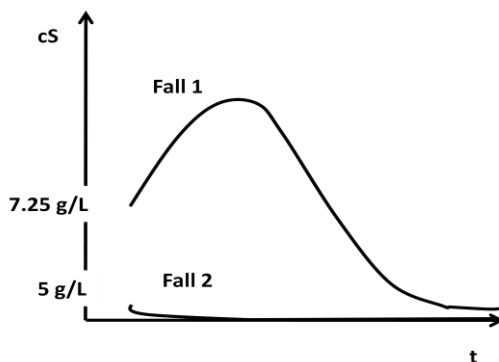
$Fall2: Q_2 = \frac{\mu}{Y_{XS}} c_{X2} \cdot V = \frac{0.3}{0.4} 2.008 \cdot 10 = 15.006 \frac{g}{h}$

$Feed = 0.02 \cdot 500 \frac{g}{h} = 10 \frac{g}{h}$  d.h.: Exp. 1 ist näher dran.

b)

$c_{S1} = c_{S0} - \frac{c_{X1}}{Y_{XS}} = 10 - \frac{1.102}{0.4} = 7.25 \frac{g}{L}$

$c_{S2} = c_{S0} - \frac{c_{X2}}{Y_{XS}} = 10 - \frac{2.008}{0.4} = 5 \frac{g}{L}$



**F:** Nehmen Sie an, dass in einem kontinuierlichen Prozess ein *steady-state* bei 30 % der maximalen Wachstumsrate eingestellt wurde. Welche Substratkonzentration kann beobachtet werden?

Parameter	Einheit	Wert	Bemerkung
$K_S$	g/L	0,5	Monod-Kinetik

**A:**

$\mu^* = 0,3 \cdot \mu_{max}$

$\mu = \mu_{max} \frac{c_S}{c_S + K_S} \Rightarrow c_S^* = \frac{\mu^* K_S}{\mu_{max} - \mu^*} = \frac{0,3 \cdot K_S}{0,7} = 0.214 \frac{g}{L}$

Die beobachtete Substratkonzentration liegt – wie erwartet – unterhalb von  $K_S$ .

**F:** Ein Bioreaktor wird kontinuierlich im steady-state betrieben. Der Prozess läuft Substrat limitiert bei  $S \sim 0$  g/L.

- a) Leiten Sie eine Bestimmungsgleichung für die ‚Batch‘-Produktivität ( $g_{\text{Produkt}}/h$ ) her, in der ausschließlich die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Größen berücksichtigt sind.  
b) Welche Einflussgröße müsste besonders bei einem ‚konkurrierenden‘ Batch oder Fed-Batch-Ansatz berücksichtigt werden?

Parameter	Einheit	Wert	Bemerkung
$Y_{PX}$	$g_{\text{Produkt}}/g_{\text{BTM}}$	-	Produkt/Biomasse-Ausbeute
$Y_{XS}$	$g_{\text{BTM}}/g_{\text{Substrat}}$	-	Biomasse/Substrat-Ausbeute
$D$	1/h	-	Durchflussrate
$S_0$	g/L	-	Eingangskonzentration Substrat
$V_L$	L	-	Reaktionsvolumen

**A:**

$$a) Q_P = \dot{P} \left[ \frac{g}{hL} \right] \cdot V_L [L] = q_P \left[ \frac{g_P}{g_{BTM} h} \right] \cdot X \left[ \frac{g_{BTM}}{L} \right] \cdot V_L [L]$$

Aus der Substratbilanz eines *steady-state*-Prozesses folgt:

$$Y_{XS} = \frac{X}{S_0 - S} \Rightarrow X = Y_{XS} \cdot (S_0 - S) \stackrel{\text{Bedingung}}{=} Y_{XS} \cdot S_0$$

$$Y_{PX} = \frac{q_P}{\mu} \Rightarrow q_P = Y_{PX} \cdot \mu \stackrel{\text{steady-state, } \mu=D}{=} Y_{PX} \cdot D$$

*einsetzen*

$$\Rightarrow Q_P = Y_{PX} \cdot Y_{XS} \cdot D \cdot S_0 \cdot V_L$$

b) Bei Batch- oder Fed-Batch-Ansätzen muss die Präparationszeit (Rüstzeit) der Reaktoren berücksichtigt werden, was die Produktivität deutlich verringert. Der *prep*-Einfluss ist bei kontinuierlichen Prozessen entsprechend geringer.

**F:** Nicky Smart erhält die Aufgabe, die Produktivität eines Fed-Batch-Prozesses zu berechnen. Um eine möglichst hohe Biomassekonzentration zu erhalten, wird der Prozess mit einem exponentiellen *feed*-Profil für die Glucose-Konzentration von 0,1 g/L gefahren. Zu Beginn werden 30 g/L Substrat in einem 10 L Bioreaktor mit 4 L Startvolumen vorgelegt. Der *feed*-Start soll bei der Soll-Konzentration der Fed-Batch-Phase starten. Der Prozess soll so lange gefahren werden, bis 80 % des Reaktorvolumens gefüllt sind.

- Vereinfachend kann davon ausgegangen werden, dass in der anfänglichen Batch-Phase kein Produkt gebildet wird.
- In der Batch-Phase kann vereinfachend von max. Wachstum ausgegangen werden.
- In der Fed-Batch-Phase gehorcht das Wachstum einer Monod-Kinetik.
- Die Produktbildung ist streng Wachstums-gekoppelt.
- Sie können vereinfachend den Anteil des Substratverbrauchs für die Produktbildung vernachlässigen.

- 1) Wie lange dauert die anfängliche Batch-Phase?
- 2) Wie lange dauert die sich anschließende Fed-Batch-Phase?

- 3) Wie groß ist die Batch-Produktivität (g/h), wenn für die Präparationszeit 5 h eingeplant werden müssen?

Parameter	Einheit	Wert	Bemerkung
$Y_{PX}$	$\text{g}_{\text{Produkt}}/\text{g}_{\text{BTM}}$	0,2	Produkt/Biomasse-Ausbeute
$Y_{XS}$	$\text{g}_{\text{BTM}}/\text{g}_{\text{Substrat}}$	0,4	Biomasse/Substrat-Ausbeute
$\mu_{\max}$	1/h	0,5	Wachstumsrate
$K_S$	g/L	0,3	Monod $K_S$ -Wert
$K_P$	$\text{g}_{\text{Produkt}}/\text{g}_{\text{BTM}}$	0,5	Produktbildungskonstante
$S_0$	g/L	500	Eingangskonzentration Substrat
$X_0$	g/L	0,1	Start-Biomassekonzentration im Batch

**A:**

$$\text{a) } Y_{XS} = \frac{X_1 - X_0}{S_0 - S_1} \Rightarrow X_1 = X_0 + Y_{XS} \cdot (S_0 - S_1) = 0,1 + 0,4 \cdot (30 - 0,1) = 12,06 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

Batch-Biomasse-Bilanz:

$$\ln \frac{X_1}{X_0} = \mu_{\max} \cdot t \Rightarrow t_{\text{batch}} = \frac{\ln \frac{X_1}{X_0}}{\mu_{\max}} \Leftrightarrow t_{\text{batch}} = \frac{\ln \frac{12,06}{0,1}}{0,5} = 9,58 \text{ h}$$

b) Entscheidend für die Fed-Batch-Zeit ist das Erreichen von 80 % Reaktorfüllvolumen.

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F_{in}}{V_R} \cdot (S_{0,F} - S) - q_S \cdot X \stackrel{!}{=} 0$$

$$\Rightarrow F_{in} = \frac{q_S \cdot X \cdot V_0}{(S_{0,F} - S)}$$

$$\Leftrightarrow F_{in}(t) = \frac{\mu}{Y_{XS}} \cdot \frac{V_0}{(S_{0,F} - S)} \cdot X$$

$$\Leftrightarrow F_{in}(t) \stackrel{\text{insert } c_X(t)}{=} \frac{\mu}{Y_{XS}} \cdot \frac{V_0}{(S_{0,F} - S)} \cdot X_1 \cdot \exp(\mu \cdot \Delta t)$$

$$\int_0^{t_e} \frac{\mu}{Y_{XS}} \cdot \frac{V_0}{(S_{0,F} - S)} \cdot X_1 \cdot \exp(\mu \cdot t) \cdot dt = V_{\max} - V_0$$

$$\frac{1}{Y_{XS}} \cdot \frac{V_{R0}}{(S_{0,F} - S)} \cdot X_1 \cdot [\exp(\mu \cdot t_e) - 1] = \Delta V$$

$$\Rightarrow t_e = \frac{\ln \left[ \frac{\Delta V \cdot Y_{XS} \cdot (S_{0,F} - S)}{V_0 \cdot X_1} + 1 \right]}{\mu}$$



Mit Monod-Kinetik:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{S + K_s} = 0,5 \cdot \frac{0,1}{0,1 + 0,3} = 0,125 \frac{1}{h}$$

$$\Rightarrow t_e = \frac{\ln \left[ \frac{4 \cdot 0,4 \cdot (500 - 0,1)}{4 \cdot 12,06} + 1 \right]}{0,125} = 22,93h$$

c) Batch-Produktivität

$$Q_P = \frac{m_P}{t_P}$$

$$m_P = \int_0^{t_{fb}} q_p \cdot X \cdot V \cdot dt$$

Biomasse-Bilanz:

$$\frac{dm_x}{dt} = \frac{d(V_R X)}{dt} = \mu \cdot X \cdot V_R$$

$$\Rightarrow \frac{d(X \cdot V_R)}{X \cdot V_R} = \mu \cdot dt$$

$$\Rightarrow \ln \left[ \frac{X_2 \cdot V_e}{X_1 V_{R0}} \right] = \mu \cdot t_{fb}$$

$$\Rightarrow X \cdot V = X_1 \cdot V_{R0} \cdot \exp(\mu \cdot t_{fb})$$

Einsetzen:

$$m_P = \int_0^{t_{fb}} q_p \cdot X_1 \cdot V_{R0} \cdot \exp(\mu \cdot t_{fb}) \cdot dt \quad \text{Mit } q_p = Y_{PX} \cdot \mu$$

$$m_P = Y_{PX} \cdot \mu \cdot X_1 \cdot V_{R0} \cdot \int_0^{t_{fb}} \exp(\mu \cdot t_{fb}) \cdot dt$$

$$\Rightarrow m_P = Y_{PX} \cdot X_1 \cdot V_{R0} \cdot [\exp(\mu \cdot t_{fb}) - 1] = 159,88g$$

$$Q_P = \frac{m_P}{(t_{prep} + t_{batch} + t_{fb})} = 4,26 \frac{g}{h}$$

**F:** Fred Clever hat seinen ersten Job in der Industrie übernommen und soll im Labor einen Fermentationsprozess unter realen Produktionsbedingungen entwickeln. Als Test schlägt er einen Batch-Prozess mit 2 L Reaktionsvolumen vor. Insgesamt sollen 120 g Glucose vollständig in Biomasse umgesetzt werden. Die Projektleiterin Nicky Smart ist skeptisch und behauptet, dass dieser Ansatz technisch bei einer maximalen Sauerstoffeintragsrate von 150° mmol/Lh nicht realisiert werden kann. Fred Smart hält dagegen.

a) Wer von den beiden hat Recht? Begründen Sie Ihre Antwort rechnerisch.

b) Als eine andere Möglichkeit schlägt Fred Clever einen Feed-Start bei Erreichen von 70 % der maximalen Sauerstoffeintragsrate vor. Dafür möchte er die verfügbare Substratmenge zu 2/3 im Batch vorlegen und den Rest für den Feed mit einer Eingangskonzentration von 500 g/L verwenden.

Welche Substratrestkonzentration wird erwartungsgemäß bei Feed-Start vorliegen?

Wie hoch muss die Feed-Rate (L/h) zu Beginn eingestellt werden, um gerade den Zuckerbedarf zu decken?

Parameter	Einheit	Wert	Bemerkung
$Y_{XS,true}$	g/g	0,4	wahre Ausbeute
$\mu_{max}$	1/h	0,5	Monod-Kinetik
$Y_{O_2X}$	mol/g <sub>BTM</sub>	0,015	Ausbeute – Sauerstoffbedarf pro g BTM
$c_{XO}$	g/L	0,1	Startkonzentration Biomasse

Kein Maintenance

**A:**

$$Y_{XS} = 0.4 = \frac{x_1 - x_0}{s_0}$$

$$\Rightarrow x_1 = 0.4 * s_0 + x_0 = 0.4 * \frac{120}{2} \frac{g}{L} + 0.1 \frac{g}{L} = 24.1 \frac{g}{L}$$

$$OUR = q_{O_2} * x_1 = Y_{O_2X} * \mu * x_1$$

$$= 0.015 \frac{mol}{g} * 0.5 \frac{1}{h} * 24.1 \frac{g}{L} = 180.75 \frac{mmol}{Lh} > 150 \frac{mmol}{Lh}$$

Nicky Smart hat Recht.

$$OTR_{Start} = 0.7 * OTR_{max} = 105 \frac{mmol}{Lh}$$

$$\Rightarrow x_1 = \frac{OTR_{Start}}{Y_{O_2X} * \mu} = \frac{105}{15 * 0.5} \frac{g}{L} = 14 \frac{g}{L}$$

$$Y_{XS} = \frac{x_1 - x_0}{-s_1 + s_0} \Rightarrow s_1 = s_0 - \frac{x_1 - x_0}{Y_{XS}} = 40 - \frac{14 - 0.1}{0.4} = 5.25 \frac{g}{L}$$

Restkonz. bei Feedstart = 5.25 g/L

$$Q_S = q_S * x_1 = \frac{\mu}{Y_{XS}} * x_1 = \frac{0.5}{0.4} * 14 \frac{g}{Lh} = 17.5 \frac{g}{Lh}$$

$$\Rightarrow Q_{S,ges} = 17.5 \frac{g}{Lh} * 2L = 35 \frac{g}{h}$$

$$= 70 \frac{mL}{h}$$

**F:** In einem Schüttelkolben sollen die beiden Studenten Fred Clever und Nicky Smart Bakterien kultivieren. Ihr Betreuer stellt als Aufgabe, dass selbst unter maximalen

Wachstumsbedingungen, die Zellen nicht weniger als 10 % der maximalen Sauerstofflöslichkeit ausgesetzt sollen.

- Welche maximale Biomassekonzentration darf im Schüttelkolben erreicht werden?
- Welche Zuckermenge muss daher für ein Reaktionsvolumen von 200 mL (in einem 2L-Kolben) bereit gestellt werden?
- Der Betreuer der beiden verlangt, dass die Zellen gerade vor Eintreten einer Substratlimitierung geerntet werden. Nicky Smart schlägt daher vor, den Kolben um 15:00 Uhr zu beimpfen und am nächsten Morgen gegen 9:00 Uhr (nach dem Frühstück) zu ernten. Fred Clever ist skeptisch und schlägt stattdessen vor in der Nacht zu beimpfen, um dann zur gleichen Zeit am nächsten Morgen zu ernten. Wer von den beiden hat Recht und warum?
- Wird anstelle der in b) errechneten Substratmenge mehr Glucose vorgelegt, welche Folgen würden Sie erwarten?

Parameter	Einheit	Wert	Bemerkung
$Y_{XS,true}$	g/g	0,5	Wahre Ausbeute
$\mu_{max}$	1/h	0,5	Monod-Kinetik
$Y_{O_2X}$	mol/g <sub>BTM</sub>	0,015	Ausbeute – Sauerstoffbedarf pro g BTM
$c_{X0}$	g/L	0,005	Animpfkonzentration
$k_L a$	1/h	100	angenommen für Schüttelkolben

Kein Maintenance

**A:** a) Sauerstofflöslichkeit unter Umgebungsbedingungen (Vorlesung): 7,7 mg/L ~ 0,23 mmol/L

$$OTR = k_L a \cdot (c_{O_2}^* - c_{O_2}) = 100 \frac{1}{h} \cdot 0,9 \cdot 0,23 \frac{mmol}{L} = 20,7 \frac{mmol}{Lh}$$

$$Y_{O_2X} = \frac{q_{O_2}}{\mu} \Rightarrow q_{O_2} = Y_{O_2X} \cdot \mu = 0,015 \frac{mol}{g} \cdot 0,5 \frac{1}{h} = 0,0075 \frac{mol}{gh}$$

$$OTR = OUR = q_{O_2} \cdot c_X \Rightarrow c_X = \frac{OUR}{q_{O_2}} = \frac{20,7 \frac{mmol}{Lh}}{7,5 \frac{mmol}{gh}} = 2,76 \frac{g}{L}$$

Maximale Biomasse = 2.76 g/L !

b)

$$Y_{XS} = \frac{\Delta c_X}{\Delta c_S} = \frac{c_{X,final} - c_{X,0}}{c_{S,0} - c_{S,final}} \Rightarrow c_{S,0} = \frac{c_{X,final} - c_{X,0}}{Y_{XS}} + c_{S,final} = \frac{2,76 - 0,005}{0,5} \frac{g}{L} + 0 \frac{g}{L} = 5,51 \frac{g}{L}$$

Bei 200 mL Reaktionsvolumen werden demnach nur  $0,2 \cdot 5,51 = 1,1g$  Glucose benötigt.

$$c) \quad \frac{dc_x}{dt} = \mu \cdot c_x(t)$$

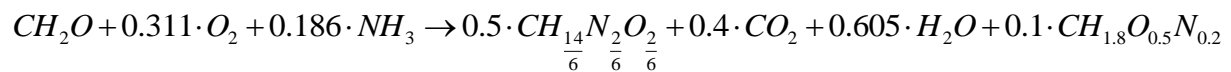
$$\Rightarrow \ln \frac{c_{x_{Ende}}}{c_{x_{Ino}}} = \mu \cdot t$$

$$\Rightarrow t = \frac{1}{\mu_{max}} \ln \frac{c_{x_{Ende}}}{c_{x_{Ino}}} = \frac{1}{0,5} [h] \cdot \ln \frac{2,76}{0,005} = 12,63h$$

Um sicher zu gehen, keine Substratlimitierung eintreten zu lassen, sollte die Zellernte daher ca. 12 h nach Animpfen erfolgen; d.h. der Zeitplan von Fred Clever ist zu bevorzugen, der um 21:00 Uhr abends animpfen wollte.

d): Wird mehr Glucose vorgelegt, erhöht sich die Biomassekonzentration und damit die Sauerstoffaufnahme. Zunächst wird dies durch ein Absinken der Gelöstsauerstoffkonzentration auf null sichtbar werden. Die Zellen werden in Folge dessen Sauerstoff limitiert und schließlich ihren Stoffwechsel – wenn möglich – auf fermentativen Metabolismus umstellen. Nebenproduktbildungen, Zelllyse etc. sind nicht ausgeschlossen.

**F:** Ein Bioprozess kann stöchiometrisch durch folgende Reaktionsgleichung beschrieben werden. Das Produkt wird dabei mit einer 50% C-Mol Ausbeute aus dem Substrat Glucose hergestellt.



- Welche Biomasse-/Substrat-Ausbeute (C-Mol%) wurde offensichtlich angenommen?
- Welche Wärmeentwicklung (kJ/c-mol) erwarten Sie für diesen Prozess?
- Gehen Sie davon aus, dass die Zellen eine Substrataufnahmerate von 0,3 g<sub>Glucose</sub>/(g<sub>Biotrockenmasse</sub> h) besitzen und die Biomassekonzentration 10 g<sub>Biotrockenmasse</sub>/L ist. Das Substrat Glucose hat ein Molgewicht von 180 g/mol. Welche Wärmebildung würden Sie für einen solchen Prozess pro L erwarten?

**A:**

a) 0,1

$$b) Q_{env} = 4 \cdot \lambda_{O_2} \cdot 115 \left[ \frac{kJ}{C-mole} \right] = 460 \cdot Y_{os} \left[ \frac{kJ}{C-mole} \right]$$

$$Q_{env} = 4 \cdot 0.311 \cdot 115 \left[ \frac{kJ}{C-mole} \right] = 143.06 \left[ \frac{kJ}{C-mole} \right]$$

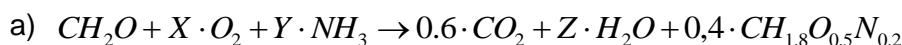
c)  $0,3 \cdot 10 = 3$  g<sub>Glucose</sub>/(Lh) dies entspricht  $3/180 = 0,0166$  mol<sub>Glucose</sub>/(Lh) bzw. 0,1 c-mol<sub>glucose</sub>/Lh

$$Q_{env} = 143,06 \cdot 0,1 = 14,31 \text{ kJ/Lh} = 3,97 \text{ W/L Wärmetönung}$$

**F:** Für das Wachstum eines Wildstamms wurde eine c-molare Biomasse/Glucose Ausbeute von 0,4 experimentell ermittelt. CO<sub>2</sub> tritt als einziges zusätzliches C-Produkt im aeroben Prozess auf.

- Stellen Sie für diesen Prozess die Reaktionsgleichung in c-mol auf.
- Welche Wärmeentwicklung (kJ/c-mol) erwarten Sie für diesen Prozess?
- Gehen Sie davon aus, dass die Zellen eine Substrataufnahmerate von 0,3 g<sub>Glucose</sub>/(g<sub>Biotrockenmasse</sub> h) besitzen und die Biomassekonzentration 10 g<sub>Biotrockenmasse</sub>/L ist. Das Substrat Glucose hat ein Molgewicht von 180 g/mol. Welche Wärmebildung würden Sie für einen solchen Prozess pro L erwarten?

**A:**



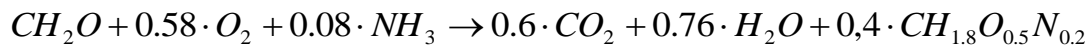
Elementbilanzen:

$$O: 1 + 2 \cdot X = 1.2 + Z + 0.4 \cdot 0.5 \Rightarrow X = 0.5 \cdot (1.4 + Z - 1)$$

$$N: Y = 0.4 \cdot 0.2 = 0.08$$

$$\text{H: } 2 + 3 \cdot Y = 2 \cdot Z + 0.4 \cdot 1.8 \xRightarrow{N\text{-Bilanz}} Z = 0.5 \cdot (2 + 3 \cdot 0.08 - 0.72) = 0.76$$

$$\Rightarrow X = 0.5 \cdot (1.4 + 0.76 - 1) = 0.58$$



b)

$$Q_{\text{env}} = 4 \cdot \lambda_{\text{O}_2} \cdot 115 \left[ \frac{\text{kJ}}{\text{C} - \text{mole}} \right] = 460 \cdot Y_{\text{OS}} \left[ \frac{\text{kJ}}{\text{C} - \text{mole}} \right]$$

$$Q_{\text{env}} = 4 \cdot 0.58 \cdot 115 \left[ \frac{\text{kJ}}{\text{C} - \text{mole}} \right] = 266.8 \left[ \frac{\text{kJ}}{\text{C} - \text{mole}} \right]$$

c)  $0.3 \cdot 10 = 3 \text{ g}_{\text{Glucose}}/(\text{Lh})$  dies entspricht  $3/180 = 0.0166 \text{ mol}_{\text{Glucose}}/(\text{Lh})$  bzw.  $0.1 \text{ c-mol}_{\text{glucose}}/\text{Lh}$

$$Q_{\text{env}} = 266.8 \cdot 0.1 = 26.68 \text{ kJ/Lh} = 7.4 \text{ W/L Wärmefönung}$$

### Kapitel 3: Lebensmittel

**F:** Erklären Sie bei der Herstellung von Bier das Prinzip der Verzuckerung der Stärke. Warum ist das wichtig für die Vergärung?

**A:** Die Hefe besitzt keine Amylasen, kann also Stärke nicht abbauen. Bei der Bierherstellung wird die Stärke der Gerste deshalb durch die Amylasen der gekeimten Getreidekörner hydrolysiert. Dabei entstehen Glucose, Maltose und Oligosaccharide, sogenannte Dextrine. Nur Maltose und Glucose werden in die Hefezelle aufgenommen, erstere mit einer intrazellulären  $\alpha$ -Glucosidase in zwei Glucosemoleküle gespalten. Glucose wird zu Alkohol und Kohlendioxid vergoren.

**F:** Bei welchen Schritten der Käseherstellung sind Bakterien, Pilze oder deren Enzyme wichtig? Erklären Sie drei Produkteigenschaften, die sich dadurch ändern.

**A:** Bei der Herstellung von Labkäse werden keine Proteasen aus Rindermägen sondern mit *Aspergillus* produzierte Enzyme eingesetzt. Die damit erzielte partielle Hydrolyse des Milchproteins Casein führt zur Dicklegung der Milch. Der Entzug von Wasser (Molke) ändert deren Konsistenz.

Zur Ansäuerung durch Vergärung der Lactose zu Lactat werden Milchsäurebakterien, z.B. *Streptococcus thermophilus*, eingesetzt. Die Absenkung des pH auf 4 verbessert die Haltbarkeit, weil unerwünschte Bakterien im Wachstum gehemmt werden.

Die Oberfläche des Camembert ist mit einem weißen Stamm von *Penicillium* besiedelt. Die in den Käse abgegeben Proteasen machen ihn weich und erzeugen pikante Peptide.

**F:** Um welchen Faktor ändert sich die Sedimentationsgeschwindigkeit von *Saccharomyces cerevisiae*, wenn einzelne Zellen mit einem Durchmesser von 5  $\mu\text{m}$  sich zu Flocken mit einem Durchmesser von 0,5 mm zusammenlagern? Welche Änderung erwarten Sie, wenn sich dabei die Viskosität verdoppelt?

**A:** Da die Sedimentationsgeschwindigkeit vom Quadrat des Partikeldurchmessers abhängt, führt eine Verhundertfachung des Durchmessers zum Faktor 10 000. Da die Viskosität im Nenner der Gleichung steht, kommt es bei einer Verdopplung zu einer Halbierung der Geschwindigkeit, also Faktor 5 000.

**F:** Erklären Sie den mit 100 mg Ascorbinsäure pro 100 g Sauerkraut relativ hohen Gehalt an diesem auch als Vitamin C bekannten Inhaltsstoff.

**A:** Sauerkraut wird aus Weißkohl hergestellt, der diesen hohen Vitamin C-Gehalt hat. Das Problem ist jedoch seine leichte Verderblichkeit durch Bakterien, z.B. *Alternaria brassicicola* und Schimmelpilze, z.B. *Botrytis cinerea*. Wird nun, im einfachsten Fall durch Einlegen in Salzlösung, eine Vergärung durch die auf dem Kohl vorhandenen Milchsäurebakterien erzwungen, dann entsteht das haltbare Sauerkraut ohne Verlust an Vitamin C.

**F:** Erklären Sie, warum der Teig bei der Herstellung von Brot nicht nur wenige Sekunden sondern viele Minuten gemischt werden muss.

**A:** Eine wichtige Aufgabe der Backhefe bei der Herstellung von Brot ist die Lockerung des Teigs. Idealerweise entsteht im Brotlaib um jede einzelne Hefezelle eine Blase aus

Kohlendioxid. Da der Teig keine Flüssigkeit, sondern eine hochviskose Masse mit hohem Feststoffgehalt ist, kann nur mit geringer Geschwindigkeit geknetet werden. Deshalb ist die Mischzeit relativ lang.

**F:** Vergleichen Sie das Substrat für die Zucht von Champignons mit dem für Shii-take bzgl. Behandlung, Struktur, Hygiene und Nährstoffangebot.

**A:** Beide Pilze benötigen pflanzliche Substrate.

Allerdings wird für den Champignon z.B. Mist von Pferden eingesetzt, d.h. das Gras wurde von den Tieren mechanisch zerkleinert und durch eine Darmassage verdaut. Zur Vorbereitung des Mists für die Champignonzucht ist eine zweiphasige Feststofffermentation nötig, bei der durch Pasteurisierung (57–58°C) unerwünschte Mikroorganismen abgetötet werden. Die erwünschten Mikroorganismen, z.B. Streptomyces, verwerten leicht katabolisierbare Substratbestandteile, so dass der relative Gehalt von Cellulose und Stickstoffverbindungen steigt. Der pH muss durch Kalkzusatz auf 7,0 bis 7,8 eingestellt werden.

Das Substrat des Shii-take besteht dagegen zu über 80 % aus Holz. Die Pilzhyphen sind in der Lage ganze Laubholzstämmen zu durchwachsen, wenn diese ausreichend feucht sind. Man kann die Kultur aber wesentlich beschleunigen, wenn man Holzspäne einsetzt. Steigernd auf die Fruchtkörperausbeute wirken stickstoffreiche Zuschlagstoffe und mineralische Ergänzungstoffe. Das in Plastiktüten gefüllte Material muss autoklaviert (121°C) werden und bei der mehrere Monate dauernden Wachstumsphase z.B. durch einen Papierstopfen keimdicht verschlossen aber für den Gasaustausch offen inkubiert werden. Durch den Ligninabbau des Shii-take verklebt das Substrat-Myzel-Gefüge zu einem festen Block.

**F:** Nennen Sie einige Verfahren für die Substratherstellung des Austernpilzes und erläutern Sie das Ziel, das man mit Hilfe dieser Verfahren erreichen möchte.

**A:** Für die Herstellung des Austernpilzsubstrates können verschiedene Verfahren verwendet werden. Solche sind die Sterilisation, Semisterilisation, Pasteurisation, aerobe Fermentation, semianaerobe Fermentation und das xerotherm Verfahren. Alle Verfahren haben das Ziel, unerwünschte Mikroorganismen zu inaktivieren, oder diese in einer Balance zu halten, sodass sie die Besiedlung des Substrates durch das Austernpilzmyzel nicht beeinträchtigen. Da der Austernpilz ein sogenannter Primärzersetzer ist, d. h. er kann direkt auf abgestorbenem Pflanzenmaterial wachsen, braucht das Substrat für ihn weder physikalisch noch biologisch aufgeschlossen zu werden.

**F:** Welche Kriterien lagen der Suche zugrunde, als man mit Pilzen einen Fleischersatz herstellen wollte und wie lautet der wissenschaftliche Name der Spezies, die in Großbritannien unter dem Produktnamen Quorn verkauft wird?

**A:** Wichtig war, dass eine Humanpathogenität ausgeschlossen und eine preiswerte Kultivierung in großen Fermentern möglich ist. Weiterhin waren ein mit 12 g pro 100 g Trockenmasse hoher Eiweißgehalt im Myzel des Pilzes und, nach entsprechender Verarbeitung, eine fleischähnliche Textur, die zu einem bissfesten Produkt führt, gewünscht. *Fusarium venenatum* heißt der Pilz, der zu den Ascomyceten gehört und keinen Fruchtkörper bildet.

**F:** Wie erklärt es sich, dass Zuschlagstoffe des Champignonsubstrates einerseits seine Produktivität erhöhen, andererseits aber riskant sind und zum Ertragsausfall führen können?

**A:** Zuschlagstoffe, wie z.B. Sojamehl, sind eiweißreich und beschleunigen das Wachstum, denn der Champignon kann Peptide einfach aufnehmen und wird dadurch bei der Aminosäuresynthese entlastet. Der Einsatz von Zuschlagstoffen erhöht aber das Risiko, dass damit unerwünschte Mikroorganismen, hauptsächlich Schimmelpilze, eingetragen werden. Schnell wachsende Schimmelpilze können eine unkontrollierbare Temperatursteigerung im Substrat bewirken, die zum Absterben des Champignonmyzels und somit zum Totalausfall der Kulturcharge führt.

**F:** Erklären Sie den Grund dafür, dass die Pilzbiomasse von *Fusarium venenatum* nach dem Wachstum für eine dreiviertel Stunde auf 74°C erwärmt werden muss.

**A:** Das Myzel enthält wegen des schnellen Wachstums höhere Mengen Nukleinsäuren, vor allem RNA, als z.B. Pflanzen. Wichtige Bausteine der Nukleinsäuren sind Purine, die im menschlichen Körper zu Harnsäure abgebaut werden. Die Ablagerung von Harnsäurekristallen in peripheren Gelenken ist schmerzhaft und wird als Gicht bezeichnet. Um die Nukleinsäure-bildenden Prozesse im Myzel von *Fusarium venenatum* zu unterbinden und die meisten intrazellulären Proteine unlöslich zu machen, wird es für 45 Minuten auf 74°C erwärmt. Die RNAsen sind deutlich temperaturstabiler, so dass die RNA in Oligomere gespalten werden können, die dann aus den Hyphen herausdiffundieren. Damit beugt man der Gefahr vor, dass durch den regelmäßigen Verzehr von Quorn Gicht ausgelöst wird.



## Kapitel 4: Technische Alkohole und Ketone

**F:** Nennen Sie mikrobiell erzeugte Alkohole und Ketone mit industrieller Relevanz.

**A:** Ethanol, Butanol, Isobutanol, 1,3-Propandiol, Aceton.

**F:** Beschreiben Sie im Detail die Fermentationsverfahren, die zur Bildung von a) Ethanol, b) Butanol und c) 1,3-Propandiol führen, sowie die entsprechenden Mikroorganismen.

**A:** a) alkoholische Gärung durch *Saccharomyces cerevisiae*, vgl. Abb. 4.1

b) Aceton-Butanol-Ethanol-Gärung durch *Clostridium acetobutylicum*, vgl. Abb. 4.6

c) entweder die natürliche Glycerin-Vergärung durch z. B. *Citrobacter*- oder *Clostridium*-Stämme (vgl. Abb. 4.4) oder die Glucose-Verstoffwechselung durch einen gentechnisch veränderten *Escherichia coli*-Stamm (vgl. Abb. 4.5).

**F:** Wie wird Isobutanol für eine technische Nutzung mikrobiell hergestellt?

**A:** Durch gentechnisch modifizierte Mikroorganismen wie z. B. das Bakterium *Escherichia coli* oder den Eukaryot Hefe. Als Substrat dient Glucose, die über 2-Acetyllactat, 2-Ketoisovalerat und Isobutyraldehyd in Isobutanol umgesetzt wird (vgl. Abb. 4.8).

**F:** Wofür wird 1,3-Propandiol industriell eingesetzt?

**A:** Zur Herstellung des Kunststoffes Polytrimethylenterephthalat (PTT). Dabei findet eine Polykondensationsreaktion von 1,3-Propandiol mit Terephthalsäure statt (vgl. Abb. 4.3). Terephthalsäure wird nicht von Mikroorganismen gebildet, PTT ist also nur zum Teil biologischen Ursprungs. Das Polymer fühlt sich wie Wolle an und findet Anwendung in der Textil-, Teppichboden- und Automobilpolster-Industrie.

**F:** Was passiert in einer Bioraffinerie?

**A:** Die Umwandlung von Biomasse in wichtige Basis- und Spezialchemikalien. Beispiel: Lignocellulose-haltige Komponenten wie Holz, Stroh, etc. Wichtig ist dabei, dass alle Einzelkomponenten (Cellulose = C<sub>6</sub>-Fraktion, Xylan = C<sub>5</sub>-Fraktion, Lignin) einer Nutzung zugeführt werden.

**F:** Warum steht die Biotechnologie vor einem Paradigmenwechsel, was die Nutzung der bisherigen Substrate Zucker und Stärke angeht?

**A:** Diese Komponenten spielen eine wichtige Rolle für die menschliche Ernährung. Eine großtechnische Nutzung für die Produktion von z. B. Biotreibstoffen würde eine erhebliche Konfliktsituation heraufbeschwören. Das ist 2007 in Mexiko aufgrund der Verteuerung von Maismehl bereits passiert: Mais wurde zu höheren Preisen für die Ethanolproduktion verkauft (Tank-Teller-Kontroverse). Für Massenprodukte ist daher für die Zukunft die Verwertung von Lignocellulose-Hydrolysaten und die Nutzung von Abfallgasen bzw. Synthesegas (auch aus Biomasse) zu erwarten. Bei den genannten Gasen stellen CO<sub>2</sub> und/oder CO die Kohlenstoffquelle dar, für die CO<sub>2</sub>-Reduktion ist zusätzlich Wasserstoff erforderlich (in Synthesegas enthalten). Gerade die Gase sind ein vergleichsweise billiges und überall verfügbares Substrat. Aus CO und Wasserstoff lässt sich auch leicht Methanol gewinnen,

das ebenfalls ein gut verwertbares, preiswertes und somit interessantes Substrat für biotechnologische Prozesse darstellt. Nur Fermentationen hochpreisiger Produkte in geringerer Menge werden auch in Zukunft mit Zucker oder Stärke als Substrat durchgeführt werden.

**F:** Ist Ethanol ein sinnvoller Benzin-Zusatz?

**A:** Eigentlich nicht. Es kam nur zum Einsatz, da die entsprechende Gärung einfach und in großem Maßstab durchzuführen ist. Als Substrat dient in Europa Zucker bzw. Stärke, was eine Konfliktsituation mit Nahrungsmitteln heraufbeschwört (vgl. Frage 6). Technisch gesehen sind Butanol oder Isobutanol erheblich günstiger (viel weniger hygroskopisch, dadurch geringere Korrosionsgefahr; in jedem Verhältnis mit Benzin mischbar; höherer Energiegehalt; sicherere Handhabung durch geringeren Dampfdruck).

**F:** Warum ist das in der Regel praktizierte Verfahren zur Messung von Produkttoxizität (steigender Zusatz von Produkt zu wachsenden Kulturen) häufig wenig aussagekräftig?

**A:** Die Bildung eines Fermentationsprodukts im Zellinneren unterliegt einer Reihe von metabolischen Vorgängen wie z. B. Substratverfügbarkeit, spezifischer Aktivität der Enzyme, Verfügbarkeit von Coenzymen, Regulation auf DNA-/RNA- und/oder Proteinebene. Dagegen löst der externe Zusatz einer Substanz in der Regel eine Stressantwort aus, die ganz andere Faktoren beeinflusst. Häufig sind so ermittelte Produkttoxizitäten deutlich geringer als Produktkonzentrationen, die natürlicherweise oder nach gentechnischer Veränderung erreicht werden können.

**F:** Warum bestehen manche Gärungen (wie z. B. die Glycerinvergärung) aus einem oxidativen und einem reduktiven Ast?

**A:** Die drei Prinzipien, die bei jeder Gärung erfüllt sein müssen, sind a) anaerobe Verhältnisse, b) Möglichkeit zur ATP-Synthese und c) Beseitigung aller entstehenden Redox-Äquivalente (z. B. NADH). Im aeroben Stoffwechsel kann NADH ja in der Atmungskette reoxidiert werden, wobei letztendlich Sauerstoff als Akzeptor dient und zu Wasser reduziert wird. Das geht unter anaeroben Bedingungen nicht. Im oxidativen Ast entstehen in der Regel ATP und NADH, der reduktive Ast stellt dann ein oder mehrere Akzeptormoleküle zur Verfügung, die mit NADH reduziert werden können und dieses damit reoxidieren (vgl. Abb. 4.4).

**F:** Woher stammt die große Menge an Glycerin, die mittlerweile als Substrat für biotechnologische Fermentationen zur Verfügung steht?

**A:** Aus der Herstellung von Biodiesel. Dafür werden pflanzliche Öle und/oder tierische Fette eingesetzt. Diese Lipide bestehen aus einem Glycerin-Rückgrat, das an den OH-Gruppen mit Fettsäuren verestert wurde. Bei der Biodieselherstellung erfolgt eine Umesterung mit typischerweise Methanol (also die Bildung von Fettsäuremethylestern), wobei eben Glycerin zurückbleibt.

## Kapitel 5: Organische Säuren

**F:** Welche organischen Säuren werden mikrobiell im industriellen Maßstab hergestellt? Beschreiben Sie kurz die wesentlichen Schritte im Stoffwechsel, die zur Bildung dieser organischen Säuren führen.

**A:** Zu den biotechnisch hergestellten organischen Säuren gehören: Essigsäure, Gluconsäure, Milchsäure, Citronensäure, Itaconsäure und Bernsteinsäure. Essigsäure wird mit *Acetobacter*- und *Gluconobacter*-Stämmen aus Ethanol unter aeroben Bedingungen in hohen Ausbeuten gebildet. Gluconsäure wird durch eine unvollständige Oxidation der Glucose primär mit *Asperillus niger* oder *Gluconobacter*-Stämmen gewonnen. Die Herstellung von Milchsäure erfolgt durch homofermentative Milchsäurebakterien, welche unter anaeroben Bedingungen den Zucker über die Glykolyse zu Milchsäure vergären. Die Bildung von Citronensäure verkürzt den Citratzyklus auf die erste Reaktion. Damit das benötigte Oxalacetat bereitgestellt wird, spielt bei *Asperillus niger* die Pyruvatcarboxylase eine zentrale Rolle. Die Biosynthese der Itaconsäure erfolgt über die Citronensäure, welche über die *cis*-Aconitsäure durch Decarboxylierung zu Itaconsäure umgesetzt wird. Die Bernsteinsäure wird als Metabolit des Citrat- und Glyoxylatzyklus gebildet.

**F:** Wie unterscheiden sich die Stoffwechselwege in Bakterien und Pilzen bei der Gluconsäure-Bildung?

**A:** Bei Bakterien z. B. *Gluconobacter* oder *Acetobacter* ist für die Umsetzung der Glucose zur Gluconsäure eine membrangebundene Pyrroloquinolin-Chinon (PQQ)-abhängige Glucose-Dehydrogenase verantwortlich. Bei Pilzen z. B. *Aspergillus* oder *Penicillium* wird die Glucose von einer FAD-abhängigen Glucose-Oxidase zum Gluconolacton oxidiert. Das bei der Glucose-Oxidation gebildete  $\text{FADH}_2$  reagiert mit  $\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}_2$ , das durch eine Katalase in Wasser und Sauerstoff gespalten wird. Das Gluconobacter hydrolysiert in Wasser zur Gluconsäure; diese Reaktion wird auch von der Lactonase katalysiert.

**F:** Welche beiden Enzyme sind für die Citronensäure-Bildung von besonderer Bedeutung und warum?

**A:** Erstens ist die Pyruvat-Carboxylase, die unter Verbrauch von ATP Pyruvat mit  $\text{CO}_2$  zu Oxalacetat umsetzt, wichtig. Diese anaplerotische Reaktion ist für die Synthese von Oxalacetat bei der Citronensäure-Bildung von zentraler Bedeutung. Zweitens ist die Citrat-Synthase, die das Citrat aus Oxalacetat und Acetyl-CoA bildet, ein wichtiges Schlüsselenzym bei diesem Prozess.

**F:** Welche Kulturparameter sind für eine optimale Citronensäurebildung mit *Asperillus niger* von besonderer Bedeutung?

**A:** Für die Induktion der Glucosetransporter, die für eine hohe Citratsyntheserate mitverantwortlich sind, sind hohe Glukosekonzentrationen im Kulturmedium erforderlich. Bei der Verwendung von Melasse als Kohlenstoffquelle müssen die Spurenelemente für eine optimale Citrat-Ausbeute auf eine Konzentration im ppm-Bereich reduziert werden. So darf z.B. die Eisenkonzentration für eine optimale Citrat- Bildung nur zwischen 0,05 und 0,5 ppm liegen. Durch eine limitierte Mangankonzentration wird die Bildung kleiner, fester Pellets erreicht, die für eine effiziente Citrat- Produktion wichtig sind. Ferner sollte eine

Sauerstoffkonzentration von mindestens 20 bis 25 % des Sättigungswertes während der gesamten Fermentation gewährleistet sein. Außerdem sollte der pH-Wert im Kulturmedium während der Produktionsphase unter pH 3 liegen, um die Bildung von Gluconsäure und Oxalsäure zu verhindern.

**F:** Warum bilden manche Milchsäurebakterien ein Gemisch aus D- und L-Milchsäure?

**A:** Milchsäurebakterien, die nicht nur eine L- sondern auch eine D-stereospezifische Lactat-Dehydrogenase besitzen, bilden beide Isomere. Ferner gibt es Milchsäurebakterien, die eine Lactat- Racemase besitzen, die zur Bildung eines D-/L-Milchsäuregemisches führt.

**F:** Erklären Sie, weshalb bei der Citronensäure-Herstellung große Mengen Gips anfallen.

**A:** Bei der Aufarbeitung der Citronensäure erfolgt nach Abtrennung der Pilzmycel eine Fällung der Citronensäure durch Zugabe von Calciumhydroxyd zum Kulturfiltrat. Um das so gefällte Calciumcitrat wieder in Lösung zu bringen, wird es mit Schwefelsäure versetzt. Diese starke Säure setzt die Citronensäure in wässriger Lösung wieder frei während Calciumsulfat entsteht, das ausfällt und anschließend abgetrennt und entsorgt wird.

**F:** Welche Veränderungen im Stoffwechsel waren erforderlich, um *Escherichia coli* zu einem Succinat-Produzenten zu machen?

**A:** Um unter anaeroben Bedingungen die Bildung von Acetat, Formiat und Lactat zu unterbinden, wurden in einem *E. coli*- Stamm die Gene der Pyruvat-Formiat-Lyase und der Laktat-Dehydrogenase deletiert. Ferner wurde das Gen für die Pyruvat- Carboxylase in diesem Stamm eingebracht, da für eine effiziente Succinat-Bildung die Umsetzung von Pyruvat und CO<sub>2</sub> zu Oxalacetat wichtig ist.

**F:** Welchen Vorteil hat *Saccharomyces cerevisiae* im Vergleich zu *Escherichia coli* als Produzent von organischen Säuren?

**A:** Da *S. cerevisiae* säuretolanter ist als *E. coli* kann die Herstellung organischer Säuren mit dieser Hefe bei niedrigem pH erfolgen (ca. pH 4.0). Dies hat den großen Vorteil, dass während der Säurebildung weniger Lauge zur Neutralisation zum Kulturmedium zugegeben werden muss.

**F:** Wie kann man bei der mikrobiellen Herstellung von organischen Säuren deren Ausbeuten bezogen auf das eingesetzte Substrat steigern?

**A:** Damit von den Mikroorganismen möglichst viel von dem eingesetzten Substrat zu dem gewünschten Produkt von den Mikroorganismen umgesetzt wird, sollten möglichst wenig Nebenprodukte gebildet werden. Es sollte möglichst kein *futile cycle* ablaufen. Ferner sollte das Wachstum von der Produktbildung entkoppelt werden, damit von der eingesetzten Kohlenstoffquelle möglichst wenig in Biomasse eingebaut wird. Im Idealfall wachsen die Zellen nicht mehr, sondern setzen die Substrate in die gewünschten organischen Säuren um. Dieses erreicht man durch das Wachstum begrenzende aber die Produktion nicht behindernde Bedingungen. Beispiele sind ein hohes C/N-Verhältnis oder der Mangel an Kationen.

**F:** Erklären Sie an einem Beispiel, wie in der Produktionsphase einer organischen Säure mit einem Mikroorganismus eine Massen-Ausbeute von über 100% erzielt werden kann. Wie viel Mol Glucose werden für ein Mol Succinat benötigt?

**A:** Betrachtet man stationäre Biomasse von *Aspergillus niger*, die extrazellulär Glucose zu Gluconsäure umsetzt, so kann theoretisch aus einem Mol Glucose ein Mol Gluconsäure entstehen. Da die Masse durch Oxidation der Aldehydgruppe am 1'-C-Atom zur Carboxylgruppe um 16 g/mol von 180 g/mol auf 196 g/mol steigt, kann man eine Massenausbeute von 108 % erzielen.

Da Succinat vier C-Atome enthält und Glucose sechs, können aus zwei mol Glucose maximal drei mol Succinat gebildet werden, wenn keine Glucose in Biomasse eingebaut wird.

## Kapitel 6: Aminosäuren

**F:** Welche Vorteile hat die Supplementation von Futtermitteln mit Aminosäuren?

**A:** Im Futtermittel wird Getreide, wie Weizen zum Beispiel, als Proteinquelle benutzt. Alle Aminosäuren des Getreides können aber nicht genutzt werden, da manche Aminosäuren limitierend sind. Zugabe dieser Aminosäuren ermöglicht die vollständige Nutzung des Getreideproteins. Dadurch wird die Futtermittelherstellung günstiger, und überdies werden auch weniger stickstoffhaltige Abbauprodukte bei der Tieraufzucht ausgeschieden.

**F:** Wo bieten sich im Stoffwechsel Ansatzpunkte an, um gesteigerte Aminosäure-Bildung zu erreichen?

**A:** Ansatzpunkte können die katabolen Reaktionen sein, die die Vorstufen der Biosynthesewege bilden, sowie auch die benötigten Reduktionsäquivalente zur Synthese der Aminosäuren liefern. Weiterhin bieten die anabolen Reaktionen selbst Ansatzpunkte. Hier ist es oft das erste Enzym des Synthesewegs, das durch sein Endprodukt gehemmt wird, und dessen Hemmung überwunden werden muss. Auch bieten Aufnahme des Substrats und der Export der Aminosäure Angriffspunkte zur verbesserten Aminosäure-Produktion.

**F:** Wie kann man mutierte Enzyme gewinnen, deren Aktivitätshemmung durch das Endprodukt des entsprechenden Synthesewegs ausgeschaltet ist?

**A:** Eine klassische Methode ist die Nutzung eines wachstumshemmenden Aminosäure-Analogons. Isoliert man Mutanten, die resistent sind gegen solch ein Analogon, kann man davon ausgehen, dass sich unter den resistenten Mutanten solche befinden, bei denen die Aktivitätshemmung durch das Analogon und auch die Aminosäure selbst nicht mehr erfolgt.

**F:** Unter welchen natürlichen Bedingungen benötigt die Zelle Aminosäure-Exporter?

**A:** Manche Bakterien können Aminosäuren nicht abbauen, nehmen aber Peptide auf. Nach Aufnahme und zellinterner Hydrolyse der Peptide kann es deswegen zu einem Überschuss einer bestimmten Aminosäure kommen. Die Zelle nutzt den Export dann als Ventil, um eine mögliche Wachstumshemmung durch extreme zellinterne Akkumulation der Aminosäure zu verhindern.

**F:** Warum benutzt *Escherichia coli* drei Isoenzyme für die Synthese der drei aromatischen Aminosäuren, obwohl die ersten Reaktionsschritte identisch sind?

**A:** Dies ermöglicht, dass jedes der Endprodukte des verzweigten Synthesewegs seinen Bedarf getrennt reguliert und somit eine bessere Abstimmung der Synthese erfolgt. Dies kann beispielsweise der Fall sein, wenn in der natürlichen Umgebung oder beim Wachstum im Labor auf Komplexmedium ein starkes Ungleichgewicht der drei aromatischen Aminosäuren besteht.

**F:** Was zeichnet ein Leaderpeptid aus, und welche Rolle spielt es bei der Regulation der Aminosäure-Synthese?

**A:** Gene für ein Leaderpeptid sind oft vor einem Aminosäure-Synthese-Operon lokalisiert. Im

Peptid kommt gehäuft die Aminosäure vor, an deren Synthese das Operon beteiligt ist. Wenn viel von der entsprechenden Aminosäure in der Zelle vorliegt, erfolgt schnelle Synthese des Leaderpeptids und durch Ausbildung einer Terminatorstruktur der Abbruch der Transkription des Operons. Wenn aber wenig von der Aminosäure vorliegt, wird die Termination der Transkription verhindert. Dadurch wird das Aminosäure-Synthese-Operon transkribiert und so letztlich mehr Aminosäure synthetisiert.

**F:** Was versteht man unter „omics“-Technologien und was ist kennzeichnend für sie?

**A:** Die „omics“-Ansätze haben den Anspruch die Gesamtheit der Zelle zu erfassen. Ursprünglich zählten nur *Genomics* und *Transkriptomics* dazu, die ein komplettes Genom, bzw. alle Transkripte eines Organismus erfassen und beschreiben. Weitere „omics“-Technologien sind *Metabolomics* oder auch *Proteomics*.

**F:** Mit welchem Organismus wird Glutamat produziert? Wie lässt sich Glutamat-Produktion erreichen?

**A:** Die Glutamat-Produktion erfolgt ausschließlich mit *Corynebacterium glutamicum*. Sie lässt sich zum Beispiel durch Biotinmangel oder Eingriffe in die Zellwandsynthese erreichen. Für die Glutamat-Bildung ist eine geringe Aktivität der Ketoglutaratdehydrogenase wichtig, an deren Regulation ein phosphorylierbares spezielles Regulatorprotein beteiligt ist.

**F:** Welche Mediumkomponenten müssen Bakterien zugeführt werden, damit sie viel Aminosäure produzieren?

**A:** Im Wesentlichen sind dies Zucker als Kohlenstoffquelle sowie eine Stickstoffquelle, wie z. B. Ammoniak oder Ammoniumsalze. Im Falle von Cystein und Methionin ist zusätzlich eine Schwefelquelle erforderlich. Auch ist ausreichende Belüftung und pH Kontrolle wichtig.

**F:** Warum wird der Zucker bei der industriellen Produktion von Aminosäuren kontinuierlich zugeführt?

**A:** Durch die im Verlaufe der Fermentation erfolgende Zufuhr kann die Kohlenstoffquelle dem tatsächlichen Bedarf angepasst werden. Auch kann dadurch eine niedrige Zuckerkonzentration im Fermenter eingestellt werden, was die unerwünschte Nebenproduktbildung verringert.

## Kapitel 7: Vitamine, Nukleotide und Carotinoide

**F:** Was sind Vitamine? Welche werden industriell mit Bakterien oder Pilzen hergestellt?

**A:** Vitamine sind organische Verbindungen, die von Mensch und Tier in sehr kleinen Mengen mit der Nahrung aufgenommen werden müssen, weil sie diese nicht selbst synthetisieren können, aber zum Wachstum brauchen. Bei der Herstellung von Vitamin C nach dem 2-KGS-Verfahren werden *Gluconobacter oxydans* und *Ketogulonicigenium vulgare* eingesetzt. Mit *Bacillus subtilis* wird Riboflavin, mit *Pseudomonas denitrificans* wird Vitamin B12 hergestellt. Interessanterweise wird Riboflavin auch mit dem filamentösen Pilz *Ashbya gossypii* produziert.

**F:** Welche Reaktion wird bei der Produktion von Vitamin C nach dem Reichstein-Verfahren mikrobiell durchgeführt? Worin besteht die Besonderheit solcher Reaktionen, die chemisch nur mit erhöhtem Aufwand erreichbar ist?

**A:** Die Synthese von L-Ascorbinsäure aus D-Glucose erfolgt nach dem Reichstein-Verfahren in fünf Stufen. Die zweite Stufe, die Oxidation von D-Sorbit zu L-Sorbose, erfolgt mikrobiell. Die Besonderheit besteht in der Regioselektivität. Ausschließlich am C5 wird die Hydroxygruppe zur Ketogruppe oxidiert. Um chemisch weiter zu arbeiten, müssen in Stufe 3 und 4 Schutzgruppen eingeführt werden.

**F:** Welches Vitamin wurde Jahrzehnte-lang chemisch hergestellt, bis es endlich gelang, ein mikrobielles Verfahren konkurrenzfähig zu machen? Nennen Sie einige Vorteile des mikrobiellen Verfahrens. Welche Bausteine des Stoffwechsels sind wichtig?

**A:** Riboflavin (Vitamin B2) wurde über 50 Jahre chemisch hergestellt. Da dieses Verfahren mehrstufig ablief, besteht ein wichtiger Vorteil der mikrobiellen Produktion darin, dass alle biochemischen Schritte in einem Fermenter stattfinden. Zudem werden fossile Rohstoffe durch nachwachsende Rohstoffe, z. B. Zucker, ersetzt. Zur Biosynthese sind die Bausteine Ribulose-5-phosphat und GTP erforderlich.

**F:** Welche Kohlenstoffquelle wird bei der Produktion von Riboflavin mit *Ashbya gossypii* eingesetzt und welchen verfahrenstechnischen Vorteil bietet sie.

**A:** Als C-Quelle wird Sojaöl eingesetzt, das sich im wässrigen Kulturmedium nicht löst, sondern eine Emulsion bildet. Es kann deshalb hochdosiert eingesetzt werden, ohne bei den Pilzzellen Osmostress zu verursachen. Im Gegensatz zur C-Quelle Glucose ist hierbei keine aufwendig geregelte Zugabe erforderlich.

**F:** Nennen Sie einen Naturstoff, der zur Gruppe der „metallorganischen Verbindungen“ gehört. Welche Funktion hat dieser Naturstoff?

**A:** Vitamin B<sub>12</sub> ist der einzige bekannte Naturstoff, bei dem eine kovalente Bindung zwischen einem Metall- und einem C-Atom nachgewiesen wurde. Das Vitamin dient im aktiven Zentrum von Enzymen dem Transfer von Methylgruppen. Ein Beispiel ist die Mutasereaktion beim Abbau ungeradzahlgiger Fettsäuren.



**F:** Wie kann man mit einem Wildtyp von *Bacillus subtilis* über Nacht gelbe Mutanten gewinnen, und warum sind sie gelb? Erklären Sie einen möglichen Mechanismus.

**A:** Bei *Bacillus subtilis* unterliegt die Biosynthese von Riboflavin einer negativen Regulation. Dabei bindet das aus Riboflavin gebildete FMN an eine Sekundärstruktur der mRNA des *rib*-Operons und terminiert die Transkription der Strukturgene. Selektioniert man mit dem Strukturanalogen Roseoflavin, z.B. nach UV-Mutagenese, auf Agarplatten nach Resistenz, erhält man Klone, die wegen einer Überproduktion von Riboflavin gelb sind. Eine Gruppe von Mutanten hat eine verminderte Riboflavin-Kinase-Aktivität. Daher wird weniger FMN gebildet, das den Terminator stabilisiert. Die Strukturgene des *rib*-Operons werden häufiger in mRNA transkribiert. Es kommt zu einer Überproduktion von Riboflavin.

**F:** Erklären Sie zwei verschiedene Strategien der Phosphorylierung, die bei der Produktion von als Geschmacksverstärkern eingesetzten Nukleotiden eine Rolle spielen. Wie kommt die nötige Energie in die Produktionssysteme?

**A:** Eine erste Möglichkeit besteht im Zusatz von Pyrophosphat. Mit einer gentechnisch veränderten Kinase können damit Purinnukleoside phosphoryliert werden. Die zweite Strategie ist die Verwendung von ATP, das aber nicht zugegeben, sondern regeneriert wird. Während im ersten Fall die Energie in Form der Anhydridbindung im Pyrophosphat zugegeben wird, erfolgt im zweiten Fall eine Supplementierung von Glucose. Da die Bakterien permeabilisiert sind, wird über die Substratkettenphosphorylierung das ATP regeneriert, denn ein Protonengradient kann nicht aufgebaut werden.

**F:** Erklären Sie eine Eigenschaft von Provitamin A, die beim Downstream Processing nach Herstellung mit einem Zygomyceten vorteilhaft ist.

**A:** Provitamin A, häufiger  $\beta$ -Carotin genannt, ist nicht wasser- sondern fettlöslich. Das führt zu einer Lokalisation in Membranen. Bei der Extraktion aus den Produzenten-Zellen von *Blakeslea trispora* erreicht man durch organische Lösungsmittel eine Anreicherung und anschließend eine Kristallisierung.

**F:** Riboflavin wird aus GTP und Ribulose-5'-Phosphat gebildet. Erklären Sie die Stöchiometrie und schlagen Sie einen experimentellen Ansatz vor, mit dem sich nicht nur die Herkunft, sondern auch die Orientierung der Vorstufen im Produkt zeigen lässt.

Das Purin-Ringsystem eines Guanosins wird durch Anlagerung von zwei C4-Körpern, die aus zwei Ribulose-5'-Phosphat-Molekülen stammen, zum Isoalloxazinring erweitert. Diese Stöchiometrie lässt sich durch  $^{13}\text{C}$ -Markierung, z.B. mit  $^{13}\text{C}$ -Ribose, die im C1-Atom markiert ist, zeigen. Zur Lokalisation einzelner C-Atome im Molekül eignet sich die NMR-Analyse.

**F:** Diskutieren Sie anhand von Beispielen zwei verschiedene gentechnische Manipulationen, die zu einer gesteigerten Überproduktion eines Vitamins führen.

1. Beispiel: Deletion eines Gens für ein Enzym, das eine unerwünschte Reaktion katalysiert. Entfernt man beim Riboflavinproduzent *Ashbya gossypii* das Gen für die cytosolische Serinhydroxymethyltransferase, dann wird weniger Glycin in L-Serin umgewandelt. Da Glycin die Riboflavin-Produktion limitieren kann, steigert diese Veränderung die Produktion.

2. Beispiel: Veränderung einer nicht translatierten Region zur Vermeidung einer als Riboswitch wirkenden mRNA-Sekundärstruktur. Das *rib*-Operon von *Bacillus subtilis* trägt nicht nur Strukturgene. Vor dem ersten Strukturgen liegt eine Sequenz, die in mRNA transkribiert eine FMN-bindende Sekundärstruktur bildet. Ist genügend FMN vorhanden terminiert dieser Komplex die Transcription. Wird diese Sequenz so geändert, dass diese Struktur nicht gebildet wird, entfällt diese negative Regulation.

## Kapitel 8: Antibiotika

**F:** Welche grundlegenden Mechanismen sind bei der Entstehung von Antibiotika-Resistenzen entscheidend?

**A:**

- Veränderung der Zielstruktur in der Zelle (z.B. Zellwand, Ribosom, Gyrase)
- Inaktivierung des Wirkstoffs
- Austransport des Wirkstoffs aus der Zelle

**F:** Aus welchen Vorstufen bauen Mikroorganismen Antibiotika auf und wie bezeichnet man die daraus resultierenden Antibiotika-Hauptklassen? Nennen Sie zu jeder Klasse drei konkrete Beispiele!

**A:**

- aus Aminosäuren → Peptid-Antibiotika  
Beispiele: Penicillin, Cephalosporin, Daptomycin
- aus kurzkettigen, aktivierten Carbonsäuren (z.B. Malonyl-CoA) → Polyketid-Antibiotika  
Beispiele: Erythromycin, Avermectin, Tetracyclin
- aus aktivierten Zuckerbausteinen → Glykosid-Antibiotika  
Beispiele: Vancomycin, Streptomycin, Hygromycin

Daneben gibt es noch weitere Vorläufer, z.B. aus der Terpenbiosynthese oder dem Shikimatweg, aus denen Antibiotika aufgebaut werden können.

**F:** Aus welchem Grundbaustein werden Aminoglykoside aufgebaut und in welche Gruppen werden Aminoglykosid-Antibiotika üblicherweise unterteilt?

**A:** Das Grundgerüst von Aminoglykosiden besteht aus einer sechsgliedrigen Aminocyclitol-Einheit, die über Verknüpfung mit Zuckereinheiten (Glykosylierung) oder andere Modifikationen (z.B. Methylierungen) noch weiter dekoriert wird.

Anhand ihres Cyclitol-Grundgerüsts können Aminoglykosid-Antibiotika (AGAs) grundsätzlich in vier Gruppen eingeteilt werden (siehe auch Tabelle 8.4):

- Streptamin-enthaltene AGAs
- 2-Desoxystreptamin-enthaltene AGAs
- Fortamin- und 2-Desoxyfortamin-enthaltene AGAs
- Valienamin-enthaltene AGAs

**F:** Welche Screeningmethoden werden in der Antibiotika-Forschung prinzipiell angewandt, um neue Wirkstoffe aus Mikroorganismen zu identifizieren?

**A:** Das Screening kann prinzipiell über zwei grundlegende Vorgehensweisen erfolgen:

*In vivo:* Lebende Bakterienzellen werden daraufhin überprüft, ob neue Stoffe diese abtöten, am Wachstum hindern, oder mit Infektionsprozessen interferieren.

*In vitro:* Vielversprechende Zielproteine (sogenannte „Targets“) werden in reiner Form dargestellt und nachfolgend werden in Aktivitätsassays Inhibitoren gesucht.

In beiden Fällen benötigt man Substanzbibliotheken, welche bereits aufgereinigte Naturstoffe (Reinsubstanzen) oder angereicherte Fraktionen bzw. Kulturfiltrate und/oder Zellextrakte aus Mikroorganismen beinhalten.

**F:** Was versteht man unter natürlichen, biosynthetischen und semisynthetischen Penicillin-Derivaten? Nennen Sie jeweils ein konkretes Beispiel für die Herstellung eines biosynthetischen und eines semisynthetischen Penicillin-Derivates!

**A:** Natürliche Penicilline: werden von dem Mikroorganismus natürlicherweise produziert  
Biosynthetische Penicilline: werden durch Zusatz alternativer (unnatürlicher) Vorstufen zum Kulturmedium hergestellt. Der Prozess wird als Vorläufer-dirigierte Biosynthese bezeichnet. Da die dabei zugesetzten, alternativen Vorstufen in Konkurrenz mit den natürlicherweise vorkommenden Substraten stehen, erhält man in der Regel ein Gemisch aus natürlichen und biosynthetischen Penicillinen.

Beispiel: Zufütterung von Phenoxyessigsäure zu Fermentationskulturen von *P. chrysogenum* zur Herstellung von Phenoxyethylpenicillin (Penicillin V, siehe auch Abbildung 8.2)

Semisynthetische Penicilline: werden durch strukturelle Modifikation von natürlichen Penicillin-Derivaten hergestellt.

Beispiel: Isolierung natürlicher Penicillin-Derivate aus der Kulturbrühe, enzymatische Abspaltung der N-Acyl-Seitenkette (Deacylierung) und chemische Modifikation der dabei entstandenen 6-Aminopenicillansäure durch Kopplung mit neuen Acylsubstituenten. So wird beispielsweise durch Kopplung mit Phenylglycin (aktiviert als Phenylglycinmethylester) Ampicillin hergestellt.

**F:** Welche entscheidenden Schritte haben zu einem enormen Anstieg der Fermentations-Produktivitäten bei der Penicillin-Herstellung geführt (im Vergleich der Penicillin-Produktion im Jahr 1950 und 2000)?

**A:** Im Jahr 1950 kostete ein Kilogramm Penicillin etwa 300 US\$ pro Kilogramm, während die Kosten 50 Jahre später bereits zwischen 10 und 20US\$ pro Kilogramm lagen.

Die entscheidenden Schritte zur Produktionsoptimierung waren:

- erhöhte Ausbeuten durch Zusatz von Vorläufer-Molekülen zum Medium und die Bestimmung von optimalen Kultivierungsbedingungen (Medienzusammensetzung, pH-Wert, Kultivierungstemperatur, Belüftung und Dauer des Fermentationsprozesses)
- Herstellung und Selektion von Hochleistungsproduzenten durch ungerichtete Mutagenese über Röntgen- oder UV-Strahlung
- Entwicklung von adäquaten industriellen Produktionsanlagen, die beispielsweise durch die Weiterentwicklung der Steriltechnik eine Fermentation im Fed-Batch-Verfahren ermöglichen.

**F:** Welche Bedeutung hat die Erschließung bislang wenig erforschter Produzentengruppen bei der Entwicklung neuer Antibiotika?

**A:** Vor dem Hintergrund einer etwa 40-jährigen Innovationslücke in der Antibiotika-Forschung werden dringend neue Antibiotika-Klassen benötigt, um den rasanten Resistenzentwicklungen Paroli bieten zu können. Nach wie vor sind die meisten erfolgreich entwickelten Antibiotika Naturstoff-basiert. Da man in altbekannten Produzentengruppen, die bereits intensiv erforscht wurden, nur noch wenige neuartige Naturstoffe entdeckt, ist die Erschließung bislang wenig erforschter Quellen von großer Bedeutung. Hier ist die Wahrscheinlichkeit zur Identifizierung neuer Wirkstoffe und Wirkprinzipien deutlich höher.

**F:** Ein neuer Wirkstoffproduzent (natürliches Isolat) wurde identifiziert. Skizzieren Sie grob den Weg bis hin zur Herstellung der Reinsubstanz im industriellen Großmaßstab!

**A:** Da die Wildstämme in der Regel nur begrenzte Mengen des gewünschten Antibiotikums produzieren, meist nur zwischen 0,1 und 20 mg/l, ist es die Aufgabe von Industrie-Mikrobiologen, ausgehend von den natürlichen Isolaten neue Hochleistungsstämme zu entwickeln. Hierzu wird die anfängliche Kultur meist in mehreren Zyklen mutagenisiert, wobei ungerichtete Verfahren (klassische Stammoptimierung) oder gerichtete Verfahren (gerichtete Stammoptimierung) angewandt werden können. Letzteres setzt allerdings ein grundlegendes Verständnis der Antibiotika-Produktion und ihrer limitierenden Faktoren in der Wirtszelle voraus. Zudem können durch Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Fermentationsparametern wie  $pO_2$ , pH und Nährstoffangebot auf die Antibiotika-Produktion mögliche Regulationsmechanismen erkannt und im Folgenden ausgenutzt werden. Darauf basierend müssen Fermentationsprozesse und adäquate industrielle Produktionsanlagen entwickelt werden. Im langfristigen Verlauf von Produktions-Prozessen müssen Hochproduzenten ständig re-isoliert werden, weil genetische Variabilität recht schnell zum Verlust der optimierten Produktionsraten führt. Eine wichtige Rolle spielt auch die Entwicklung geeigneter Aufarbeitungsprotokolle, die individuell auf die jeweilige Zielverbindung und ihre chemischen Eigenschaften angepasst werden müssen (z.B. geeignete Extraktionsmethoden und chromatographische Aufreinigungsverfahren).

**F:** Bei der Entwicklung von Hochleistungsstämmen können klassische und gerichtete Stammoptimierungsverfahren angewandt werden. Erklären Sie den Unterschied und nennen Sie Vor- und Nachteile beider Verfahren!

**A:** Bei der klassischen Stammoptimierung werden die Wildstämme (natürliche Isolate) in mehreren Zyklen mutagenisiert. Hierfür werden ungerichtete Verfahren, wie UV-Strahlung oder Behandlung mit chemischen Agenzien, eingesetzt. Die dabei erzeugten Mutanten werden anschließend auf verbesserte Eigenschaften hin analysiert, z.B. erhöhte Produktion der Zielverbindung.

Im Gegensatz zur klassischen Stammoptimierung setzt die gerichtete Stammoptimierung ein grundlegendes Verständnis der Antibiotika-Produktion und ihrer limitierenden Faktoren in der Wirtszelle voraus. Mögliche Angriffspunkte zur Produktionsoptimierung müssen bekannt sein und genetische Methoden zur gezielten Manipulation des Produzentenstammes zur Verfügung stehen. Im Gegensatz zur klassischen Optimierung werden hier gezielte genetische Eingriffe durchgeführt und es müssen in der Regel deutlich weniger Mutanten analysiert werden.

Vorteile der klassischen Stammoptimierung, z.B.:

- experimentell leicht durchführbar
- schrittweise Optimierung in aufeinanderfolgenden Mutations-/Selektions-Zyklen möglich
- Angriffspunkte zur Produktionsoptimierung müssen nicht bekannt sein

Nachteile der klassischen Stammoptimierung, z.B.:

- lange Dauer und hoher Aufwand zur Erzeugung des gewünschten Stammes (es müssen sehr viele Mutanten analysiert werden)
- Akkumulation unerwünschter Mutationen
- vorteilhafte Mutationen können nicht zielgerichtet kombiniert werden

Vorteile der gerichteten Stammoptimierung, z.B.:

- gezielte Veränderung des Erbguts durch molekularbiologische Methoden
- Es müssen keine umfangreichen Screens von Mutanten-Bibliotheken durchgeführt werden
- Kombination und Akkumulation erwünschter Mutationen möglich

Nachteile der gerichteten Stammoptimierung, z.B.:

- Angriffspunkte zur Produktionsoptimierung müssen bekannt sein
- genetische Verfahren zur gezielten Modifikation des Stammes müssen etabliert sein

**F:** Über welchen Biosyntheseweg werden komplexe Peptid-Antibiotika wie beispielsweise Daptomycin aufgebaut? Beschreiben Sie allgemein die zugrundeliegende Biochemie!

**A:** Das Grundgerüst von Peptid-Antibiotika (wie z.B. Daptomycin) wird sequentiell durch aufeinanderfolgende Kondensation einzelner Aminosäure-Bausteine in einer Art von Fließbandmaschinerie aufgebaut. Die beteiligten Enzymsysteme werden als nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) bezeichnet. Sie weisen eine modulare Struktur auf, wobei jedes Modul für den Einbau einer Aminosäure in das Peptidgerüst verantwortlich ist (und im Unterschied zur ribosomalen Peptidsynthese hier auch nichtproteinogene Aminosäuren eingebaut werden können). Jedes Modul enthält ein Set an katalytischen Domänen, um die Ausgangsaminosäuren auszuwählen und als Adenylate zu aktivieren (Adenylierungsdomäne), kovalent an den Proteinkomplex zu binden (Peptidyl-Carrier-Protein-Domäne) und anschließend unter Ausbildung von Peptidbindungen miteinander zu verknüpfen (Kondensationsdomäne). Auf diese Weise kann die Peptidkette schrittweise um je eine Aminosäure verlängert werden, wobei alle Intermediate während des gesamten Biosyntheseprozesses kovalent an den Enzymkomplex gebunden sind. Das letzte Modul enthält in der Regel eine zusätzliche Thioesterase-Domäne, welche die Abspaltung der Peptidkette vom Enzymkomplex bewirkt. Dies kann über intramolekulare Zyklisierung (zyklische Peptide) oder Hydrolyse (lineare Peptide) erfolgen.

**F:** Über welchen Biosyntheseweg werden Makrolid-Antibiotika wie beispielsweise das Erythromycin aufgebaut? Beschreiben Sie allgemein die zugrundeliegende Biochemie!

**A:** Das Grundgerüst von Makrolid-Antibiotika (wie z.B. dem Erythromycin) wird sequentiell durch aufeinanderfolgende Kondensation aktivierter, kurzkettiger Carbonsäuren in einer Art von Fließbandmaschinerie aufgebaut. Die beteiligten Enzymsysteme werden als Polyketidsynthasen (PKS) bezeichnet. Diese weisen eine modulare Struktur auf, wobei jedes Modul für den Einbau einer Polyketid-Einheit in das Makrolid-Grundgerüst verantwortlich ist. Typische Vorläufermoleküle hierbei sind Acetyl-CoA oder Propionyl-CoA als Startereinheiten sowie Malonyl-CoA oder Methylmalonyl-CoA als Verlängerungseinheiten. Die Polyketidkette wird dabei analog zur Fettsäure-Biosynthese immer um zwei Kohlenstoffatome verlängert. Jedes Modul enthält ein Set an katalytischen Domänen, um die Vorläufermoleküle auszuwählen (Acyltransferasedomäne), kovalent an den Proteinkomplex zu binden (Acyl-Carrier-Protein-Domäne) und anschließend über decarboxylierende Claisen-Esterkondensation zu verknüpfen (Ketosynthasedomäne). Nach jedem Kettenverlängerungszyklus kann die gebildete  $\beta$ -Oxofunktion durch Ketoreduktase-, Dehydratase- und Enoylreduktase-Domänen schrittweise reduziert werden. Während bei der Fettsäurebiosynthese dieser Zyklus immer vollständig durchlaufen wird, sind die Reduktionsschritte bei der Polyketidbiosynthese optional. Sie können vor der nächsten Verlängerungsrunde teilweise oder vollständig ausgelassen werden, so dass wahlweise Keto-, Alkohol-, Olefin- bzw. Methylen-Gruppen erhalten bleiben. Während des Biosyntheseprozesses sind die Intermediate durchgängig kovalent an den Enzymkomplex gebunden. Das letzte Modul enthält in der Regel eine zusätzliche Thioesterase-Domäne, welche die Abspaltung der Polyketidkette vom Enzymkomplex bewirkt. Im Fall der Makrolid-Antibiotika erfolgt dies über intramolekulare Zyklisierung unter Bildung eines Makrolacton-Ringes. Dieser wird häufig noch durch sogenannte Post-PKS-Enzyme, beispielsweise

Glycosyltransferasen, weiter modifiziert, was entscheidend zur Wirksamkeit des Naturstoffs beitragen kann.

**F:** Warum kann bei der Biosynthese von reduzierten Polyketiden eine deutlich höhere strukturelle Diversität als bei der Fettsäurebiosynthese erzielt werden, obwohl die zugrunde liegende Biochemie im Prinzip gleich ist?

**A:** Bei der Polyketidbiosynthese kann eine breitere Palette an Vorläufermolekülen verwendet werden, zum Beispiel auch Methylmalonyl-CoA, während bei der Fettsäurebiosynthese ausschließlich Malonyl-CoA als Verlängerungseinheit genutzt wird. Die nach jedem Kettenverlängerungszyklus gebildete  $\beta$ -Oxofunktion wird während der Fettsäurebiosynthese immer vollständig reduziert, wohingegen die Reduktionsschritte bei der Polyketidbiosynthese optional sind. Sie können vor der nächsten Verlängerungsrunde teilweise oder vollständig ausgelassen werden, so dass wahlweise Keto-, Alkohol-, Olefin- oder Methylen-Gruppen erhalten bleiben.

## Kapitel 9: Pharmaproteine

**F:** Nennen Sie zwei mikrobiell produzierte Pharmaproteine, deren Umsatz über 1 Mrd. US-Dollar liegt und erklären Sie kurz ihre Wirkung.

**A:** Die bedeutendsten mikrobiell hergestellten Pharmaproteine sind die Insuline mit 15 Mrd. US-Dollar Umsatz. Insulin senkt den Blutzuckerspiegel und wird von ca. 250 Mio Diabetikern gebraucht. Das Peptidhormon bindet an einen Rezeptor, der als Tyrosinkinase wirkt und die Aufnahme der Glucose in die Zellen auslöst.

Eine Größenordnung kleiner ist der Umsatz für Interferon- $\beta$  1b, das mit *Escherichia coli* hergestellt wird. Es handelt sich um einen Botenstoff des Immunsystems, der gegen Multiple Sklerose eingesetzt wird. Bei dieser Krankheit wird die Isolierschicht der Nervenzellen durch das eigene Immunsystem angegriffen, so dass es zu einer gestörten Reizweiterleitung kommt. Das Interferon hemmt die Proliferation der weißen Blutkörperchen, d.h. es greift in diese unerwünschte Autoimmunreaktion ein.

**F:** Was ist ein Einschlusskörper (*Inclusion body*) und warum kann es vorteilhaft sein, ein Pharmaprotein in dieser Form zu produzieren.

**A:** Wenn durch eine hohe Translationsrate in der Bakterienzelle die Faltung eines Proteins in Sekundär- und Tertiärstruktur zu langsam erfolgt, bilden sich unlösliche Aggregate, die als Partikel in der Zelle sichtbar sind. Diese Partikel werden Einschlusskörper genannt.

Vorteilhaft ist, dass die Proteine darin vor Proteolyse sicher sind. Zudem lassen sich Einschlusskörper relativ leicht nach Aufschluss der Zellen abtrennen und bieten eine gute Anreicherung im Vergleich zu cytosolisch gelösten Proteinen.

**F:** Erklären Sie zwei verschiedene Selektionsmarker, die genutzt werden, um Plasmide, die ein Gen für ein gewünschtes Pharmaprotein tragen, stabil im bakteriellen Wirt zu halten.

**A:** Man unterscheidet dominante Marker von Komplementationsmarkern.

Ein dominanter Marker, z.B. das Gen für eine  $\beta$ -Lactamase, vermittelt die Resistenz für ein  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum, z.B. Ampicillin. In einem Kulturmedium, das mit Ampicillin versetzt wird, wachsen nur die Zellen, die das Plasmid in ausreichender Kopienzahl enthalten, um genügend  $\beta$ -Lactamase bilden zu können. Die  $\beta$ -Lactamase spaltet das Antibiotikum.

Ein Komplementationsmarker auf einem Plasmid sorgt dafür, dass ein chromosomaler Defekt in einem essentiellen Gen funktionell ergänzt wird. Ist der Bakterienstamm z.B. auxotroph für die Aminosäure L-Leucin, weil ein Gen der zugehörigen Biosynthese-Enzyme defekt ist, ermöglicht ihm das intakte Gen auf dem Plasmid das Wachstum.

In beiden Fällen finden sich Marker-Gen und Ziel-Gen auf dem gleichen Plasmid, so dass das Zielgen quasi als Passagier mitfährt.

**F:** Durch welche organisatorische Maßnahme wird sichergestellt, dass sich der gentechnisch veränderte Hochleistungsstamm auch bei einem über Jahrzehnte dauernden Einsatz einer Produktionsanlage nicht verändert, d.h. konstante Produktqualität liefert und nicht irgendwelche unerwünschten Nebenprodukte auftreten?

**A:** Dazu wird eine Masterzellbank angelegt. Es handelt sich dabei um mehrere hundert Gefäße, die tiefgekühlte Zellen des Produktionsstamms enthalten. Sie sind, z.B. bezüglich der Sequenz und der Kopienzahl des enthaltenen Plasmids, sorgfältig charakterisiert. Aus



jedem einzelnen Gefäß der Masterzellbank kann eine Workingzellbank aus mehreren hundert Inokula für den Start der Produktion hergestellt werden. Beide Zellbänke sind Bestandteil der Zulassung durch die Genehmigungsbehörde.

**F:** Wieviele Disulfidbrücken enthält Insulin und wann und wo findet deren Bildung statt? Vergleichen Sie den *Saccharomyces cerevisiae* Prozess mit dem *Escherichia coli* Verfahren.

**A:** Insulin besteht aus zwei Peptidketten (A und B), die durch zwei Disulfidbrücken verbunden sind. Eine dritte Disulfidbrücke befindet sich innerhalb der A-Kette. Mit Hefe wird eine Sekretion des Insulins durchgeführt. Dazu wurde eine Signalsequenz an den N-Terminus gesetzt, die für den Transport des Vorläuferpeptids ins endoplasmatische Retikulum sorgt. Dort erfolgt die Faltung und dabei die Bildung der Disulfidbrücken. *Escherichia coli* kann im Cytosol keine Disulfidbrücken bilden, weil die dazu nötigen reduzierenden Bedingungen fehlen. Cytosolisch wird ein Einschlusskörper mit Proteinaggregaten produziert. Dieser wird aus den Zellen isoliert. Die Bildung der Disulfidbrücken erfolgt *in vitro* nach dessen Solubilisierung, d.h. während der sogenannten Rückfaltung.

**F:** Erklären Sie einen wesentlichen Unterschied des Granulozytenkolonie-stimulierenden Faktors, wie er mit CHO-Zellen hergestellt wird im Vergleich zu dem Produkt von *E. coli*. Wozu führt dieser Unterschied beim Wirkprofil und wie kann man diesem Problem begegnen?

**A:** Das mit CHO-Zellen hergestellte Pharmaprotein ist humanidentisch. Das liegt daran, dass die verwendeten Säugerzellen die korrekte Glycosylierung vornehmen können. Das mit *E. coli* hergestellte Protein ist nicht glycosyliert. Deshalb koppelt man letzteres über den N-Terminus kovalent an ein 20 kDa Polyethylenglykol. Dadurch wird die Halblebensdauer des Wirkstoffs im Menschen verlängert.

**F:** Welches Protein wird als rekombinanter Impfstoff gegen Hepatitis A/B eingesetzt? Schlagen Sie eine Lokalisation des Proteins im Expressionssystem und einen Hilfsstoff zur Extraktion des Wirkstoffs vor.

**A:** Als Impfstoff wird ein 24 kDa Protein der Virushülle eingesetzt. Im menschlichen Wirt dient es der Ausschleusung der Viren aus der Leberzelle und ist ein Membranprotein. Folglich findet es sich auch in der Hefezelle in der Membran. Zur Extraktion müssen daher Tenside, z.B. Tween, eingesetzt werden.

**F:** Schlagen Sie einen Test vor, der zeigt, dass die nötige posttranslationale Modifikation zum funktionalen Fragmentantikörper, die im Periplasma von *E. coli* erfolgen soll, im Produkt vorhanden ist.

**A:** Das sogenannte Fab-Fragment besteht aus zwei leichten Ketten und zwei gekürzten schweren Ketten. Insgesamt müssen vier Disulfidbrücken gebildet werden, um eine Quarternärstruktur zu erhalten, die zwei Antigenbindestellen hat. Sind zwei Antigenbindestellen vorhanden, lässt sich bei geeignetem Antigen-Fab-Verhältnis eine Präzipitation beobachten. Es entstehen verhältnismäßig große Partikel, die eine Lösung trüben und leicht sedimentieren.

**F:** Die Herstellung von ausreichenden Mengen Insulin lässt sich nur durch gentechnische Verfahren erreichen. Welchen weiteren Vorteil bietet die Gentechnik für die Weiterentwicklung der Insuline, der über die Möglichkeiten der Reinigung des Hormons aus tierischen Bauchspeicheldrüsen und über die Gewinnung von humanidentischem Insulin aus einem Expressionssystem deutlich hinaus geht.

**A:** Der weitere Vorteil besteht in der Möglichkeit, die Aminosäuresequenz zu ändern. So wirkt das Analogon Glargin, bei dem in der A-Kette das C-terminal Asparagin gegen ein Glycin ausgetauscht wurde und zusätzlich in der B-Kette eine Extension um zwei Arginine erfolgte, als Depot-Insulin, d.h. das Wirkprofil ist flacher. Mit einem Spektrum an Insulin-Analoga ist eine auf den individuellen Patienten abgestimmte Behandlung möglich.

**F:** Diskutieren Sie zwei Strategien um eine aus dem Menschen stammende DNA-Sequenz, die ein medizinisch interessantes Protein kodiert, in einem bakteriellen Wirt zu exprimieren.

**A:** Eine Strategie optimiert die Nukleotid-Sequenz ohne den Informationsgehalt zu verändern. Eine zweite Strategie sorgt für hohe Raten bei der Transkription und der Translation.

Die Anpassung der Sequenz an den Wirt erfolgt durch Deletion der Introns und Anpassung der Codonverwendung. Der genetische Code ist zwar universell, die Effizienz mit der beladene tRNAs geliefert werden können, ist aber in jedem Expressionssystem verschieden. Heute können Computer-optimierte DNAs durch chemische Nukleinsäure-Synthese realisiert werden.

Um hohe mRNA Konzentrationen in der Zelle zu erzielen, muss die Genkopie hoch sein. Durch Verwendung eines geeigneten Plasmids, d.h. einer autonom replizierenden, extrachromosomalen DNA, können mehrere hundert Kopien pro Zelle vorliegen. Weiterhin führt der Einsatz eines starken Promotors zum häufigen Ablesen des Zielgens. Ein effizienter Terminator verhindert zu lange mRNAs, die schneller abgebaut werden.

## Kapitel 10: Enzyme

**F:** Was sind Enzyme und welche Eigenschaften haben sie?

**A:** Enzyme sind Proteine, die unter physiologischen Bedingungen in oder außerhalb von Zellen biochemische Reaktionen katalysieren. Dadurch spielen diese Proteine bei der Entwicklung und dem Stoffwechsel von allen lebenden Organismen eine zentrale Rolle. Enzyme sind Biokatalysatoren, welche die Aktivierungsenergie herabsetzen und biochemische Reaktionen beschleunigen. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Enzymen werden durch die Zusammensetzung und Sequenz der Aminosäurebausteine definiert. Durch die physiologischen Bedingungen, die in der natürlichen Enzymumgebung vorherrschen, arbeiten diese Proteine nur in einem bestimmten Wirkungsbereich, der durch Parameter wie Temperatur und pH vorgegeben wird. Das Schlüssel-Schloss-Prinzip beschreibt, dass Enzyme substratspezifisch agieren und zumeist ein Substrat in ein Produkt umwandeln können. Dabei ändert sich vorübergehend die Struktur des Enzyms. Sobald das Produkt freigesetzt wird, kehrt das Enzym dann wieder in den Ausgangszustand zurück.

**F:** Mit welchen Methoden wird heute nach neuen Enzymen gesucht und bekannte Enzyme verbessert?

**A:** Neue unbekannte Enzyme können z. B. mit Hilfe von einem aktivitätsbasierten Screening aus kultivierbaren Mikroorganismen oder aus dem Metagenom eines bekannten Habitats gewonnen werden. Das Metagenom ist die Gesamtheit aller genetischen Information zu einem bestimmten Zeitpunkt in einem definierten Habitat. In diesem Zusammenhang wird das Forschungsgebiet, welches die Eigenschaften von Metagenomen beschreibt als Metagenomik bezeichnet. Zur Verbesserung von Enzymen werden gerichtete und ungerichtete Methoden unterschieden. Beim *protein engineering* wird die Aminosäuresequenz eines Enzyms durch molekularbiologische Verfahren auf Ebene der DNA verändert. Bei Kenntnis der dreidimensionalen Struktur des Enzyms kann dies durch ortsgerichtete Mutagenese (*site directed mutagenesis*) geschehen. *Protein engineering* kann aber auch durch Zufallsmutagenese (random mutagenesis) erfolgen oder durch *gene shuffling*, bei dem z.B. die Genfragmente verschiedener Genvarianten eines Enzyms mit einer gewissen Ähnlichkeit miteinander kombiniert werden. Die mehrfache zyklische Kombination von Mutagenese, Expression, Selektion und erneuter Mutagenese des verbesserten Enzyms bezeichnet man als gerichtete Evolution (*directed evolution*). Die Selektion besteht in der Regel aus der Identifizierung verbesserter Enzyme mit einem Hochdurchsatz-Screening (*high throughput screening*).

**F:** Was sind Glykosidhydrolasen? Beschreiben Sie einen großtechnischen Prozess bei dem diese Enzyme heute verwendet werden!

**A:** Glykosidhydrolasen (auch Glykosidasen genannt) sind Enzyme, die zur Klasse der Hydrolasen gehören und reversibel die Hydrolyse von glykosidischen Bindungen katalysieren. Dabei kommen diese Enzyme weit verbreitet in allen drei Reichen des Lebens vor und spalten z. B. Stärke, Cellulose oder Hemicellulose. Der Prozess der Stärkehydrolyse wird heutzutage großtechnisch in der Lebensmittelindustrie durchgeführt, um Fructose-Glucose-Zuckersirup herzustellen. Dabei werden drei Schritte enzymatisch durchgeführt. Um einen optimalen Abbau von Stärke bei hohen Temperaturen zu gewährleisten werden insbesondere Temperatur-stabile Enzyme benötigt. (1) Die zu der Gruppe der

Stärkespaltenden Glykosidhydrolasen gehörenden  $\alpha$ -Amylasen hydrolysieren die  $\alpha$ -1,4-glykosidische Bindungen im Stärkemolekül und produzieren Dextrine. (2) Glucoamylasen hydrolysieren  $\alpha$ -glykosidische Bindungen vom nicht-reduzierenden Ende des Zuckermoleküls und spalten das Monosaccharid Glukose ab, welches (3) abschließend durch immobilisierte Glucose-Isomerase zu Fructose umgewandelt wird.

**F:** Woran wird heute bei Produktionsorganismen für die industrielle Herstellung von Enzymen geforscht?

**A:** Mikroorganismen, die zur Überproduktion von Enzymen eingesetzt werden, werden in der Regel genetisch modifiziert, um optimale Ausbeuten zu gewährleisten. Für die Produktion von Proteinen limitierende Faktoren sind insbesondere die Transkriptions- und Translationseffizienz, sowie die Gewährleistung einer optimalen Sekretionsrate von aktiven Proteinen. Eine gesteigerte Produktion kann durch, die Kopienanzahl des kodierenden Gens beeinflusst werden: Dies kann bei Plasmiden durch *low-copy*- oder *high-copy*-Plasmide beeinflusst werden, oder bei der Integration ins Genom durch Zahl und Ort der genetischen Integration von Genen in das Genom des Produktionsorganismus. Ein weiterer Punkt ist die Halbwertszeit der mRNA in der Zelle. Posttranslational ist es möglich die Glykosylierung bei pilzlichen Produktionsstämmen und den proteolytischen Abbau von Enzymen zu beeinflussen, indem Produktionsstämme verwendet werden, die Deletionen in für Proteasen kodierenden Genen aufweisen.

**F:** Welche Kriterien sind entscheidend für die Auswahl von Hochleistungsproduktionsstämmen in der industriellen Produktion?

**A:** Mikroorganismen zur Produktion von Enzymen werden danach ausgewählt, dass sie nicht schädlich für Mensch, Tier und Umwelt sind, Enzyme in großer Menge produzieren und auch sekretieren können, nicht sporulieren und molekularbiologisch gut bearbeitet werden können. Die lange sichere Verwendung in der biotechnischen Produktion ist ein zusätzliches Kriterium, da hiermit bessere Akzeptanz bei den Behörden und bei den Verfahrenstechnikern verbunden ist. Bei den gentechnisch modifizierten Produktionsorganismen wird in der Regel versucht die Enzymgene ins Chromosom zu integrieren und grundsätzlich auf den Einsatz von Antibiotikaresistenzmarkern zu verzichten.

Bacilli (*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*) als typische Vertreter der Bakterien werden genutzt um industriell relevante Enzyme zu produzieren, da diese Mikroorganismen während kurzer Fermentationszeiten hohe Zelldichten und hohe Sekretionsleistungen erlauben. Als eukaryotische Vertreter werden insbesondere filamentöse Pilze aus der Gattung *Aspergillus* (*A. oryzae*, *A. niger*) und *Trichoderma reesei* verwendet, da aufgrund von posttranslationalen Modifikationen und Faltungseigenschaften pilzliche Wirtsorganismen insbesondere häufig einen Vorteil zur Produktion von eukaryotischen Proteinen bieten. Pilze benötigen längere Fermentationszeiten, erreichen aber auch deutlich höhere Ausbeuten. Pro- und eukaryotische Stämme, die zur Produktion von heterologen Proteinen genutzt werden, werden oftmals genetisch so verändert, dass sie eine höhere Ausbeute ermöglichen oder fremde Proteine weniger stark abbauen.

**F:** Was sind Extremozyme und warum können diese in verschiedenen industriellen Bereichen besonders gut eingesetzt werden?

**A:** Als Extremozyme werden katalytische Proteine aus Mikroorganismen bezeichnet, die Lebensräume besiedeln, welche wir als extrem ansehen. Dabei kann es sich z. B. um Standorte handeln, an denen besonders hohe oder niedrige Temperaturen vorherrschen, hohe Drücke oder Salzgehalte vorliegen. Extremozyme weisen oftmals physiko-chemische Eigenschaften auf, die sie für industrielle Anwendungen interessant machen. Sie können z. B. resistenter gegen Detergenzien oder thermostabiler als ihre Verwandten aus mesophilen Mikroorganismen sein.

**F:** Warum kann ein Großteil der natürlich vorkommenden Enzyme nur rekombinant hergestellt werden? Mit welchen Problemen werden Sie bei der Expression heterologer Gene konfrontiert?

**A:** Schätzungsweise können nur 1 % aller Mikroorganismen im Labor kultiviert werden. Aus diesem Grund können die meisten natürlich vorkommenden Enzyme nicht aus ihrem nativen Wirt isoliert werden. Die regulierbare Produktion von rekombinanten Proteinen in heterologen Expressionssystemen ermöglicht eine hohe Ausbeute von Enzymen, die z. B. in Bakterien wie *Escherichia coli* oder *Bacillus subtilis* oder in Hefepilzen wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris* produziert werden. Aufgrund von unterschiedlichen Regulations- und Modifikationssystemen lassen sich jedoch Proteine nicht in beliebigen Wirten produzieren. Neben der Berücksichtigung von natürlichen Barrieren wie der *codon usage* oder posttranslationalen Modifikationen müssen ebenfalls Kulturbedingungen bei der Auswahl von funktionellen Expressionswirten berücksichtigt werden. So erfordert z. B. die Produktion von hitzestabilen Enzymen oftmals die Verwendung von thermophilen Expressionswirten, die essentielle Voraussetzungen für die Funktionalität derartiger Proteine bieten.

**F:** Welchen wichtigen Aspekt muss man beim Einsatz von Oxidoreduktasen zur Stoffumwandlung beachten? Beschreiben Sie ein konkretes Beispiel!

**A:** Alkohol-Dehydrogenasen gehören zur Klasse der Oxidoreduktasen und sind in der Natur Schlüsselenzyme bei der Produktion von Alkoholen. In der Regel wird bei dieser Redox-Reaktion ein Aldehyd oder Keton zu einem Alkohol reduziert. Dabei werden Kofaktoren als Elektronendonatoren benötigt, so dass parallel mit der Reduktion des Substrates ein Kofaktor (z.B. NADH oder NADPH) oxidiert wird. Der Kofaktor muss entweder in ausreichender Menge vorhanden sein oder regeneriert werden, um eine kontinuierliche Substratumsetzung zu gewährleisten. Die industriell relevante Umwandlung von Acetophenon in Phenylalkohol wird durch eine NAD(P)-abhängige Alkohol-Dehydrogenase katalysiert. Das entstandene NAD(P)<sup>+</sup> kann in einer parallel ablaufenden Reaktion ebenfalls durch eine Alkohol-Dehydrogenase vermittelte Umwandlung von 2-Propanol in Aceton recycelt werden, so dass wieder der für die Reduktion von Acetophenon benötigte Kofaktor NAD(P)H + H<sup>+</sup> entsteht. Alternative Enzyme, die zur Regeneration des Kofaktors eingesetzt werden können sind: (1) Die Glucose-Dehydrogenase, die NAD(P)-abhängig Glukose-6-Phosphat in 6-Phosphogluconat umwandelt und (2) die Formiat-Dehydrogenase, welche die Umwandlung von Formiat in CO<sub>2</sub> katalysiert.

**F:** Was zeichnet einen guten Produktionsorganismus für Enzyme aus?

**A:** Gute Produktionsorganismen für Enzyme sind

- nicht pathogen (haben eine lange Geschichte sicherer Verwendung; QPS – *qualified presumption of safety*; GRAS – *generally recognized as safe*)
- in der Lage die gewünschten Enzyme ins Nährmedium zu sekretieren und ermöglichen damit eine einfache Abtrennung von Enzym und Biomasse
- mit molekularbiologischen Methoden gut zu bearbeiten
- frei von Sporulation, um im Fall einer ungewollten Freisetzung bei Havarie kein Überleben als Sporen zu ermöglichen

**F:** Welche Bedeutung haben Phytasen in der Futtermittelindustrie?

**A:** Phytasen werden dem Tierfutter beigelegt um die Verdaulichkeit von Phytinssäuren zu verbessern. Körpereigene Enzyme zum Abbau von Phytinsäure werden vom tierischen Organismus nicht produziert. In monogastrischen, nicht wiederkäuenden Tieren gibt es auch keine Mikroorganismen, die im Verdauungstrakt entsprechende Enzyme bereitstellen. Die Phytinsäure wird deshalb ohne den Zusatz von Phytasen im Tierfutter unverdaut ausgeschieden, was zu einer Umweltbelastung führen kann. Durch den Einsatz von Phytasen in Tierfutter wird Phosphat aus der Phytinsäure zugänglich gemacht und die Phosphatausscheidung um bis zu 30 % reduziert.

## Kapitel 11: Polysaccharide und Polyhydroxyalkanoate

**F:** Nennen Sie mindestens jeweils fünf verschiedene technisch relevante Polymere, die als intrazelluläre bzw. als extrazelluläre Produkte von Mikroorganismen synthetisiert werden und erläutern Sie Vor- und Nachteile des Vorkommens.

**A:** siehe Tabelle 11.1

**F:** Beschreiben Sie das Vorkommen und die Struktur von Dextran unter Nennung der unter den Monomer-Bausteinen auftretenden Bindungsformen.

**A:** Dextran ist ein Exopolysaccharid, dass von dem heterofermentativen Milchsäurebakterium *Leuconostoc mesenteroides* sowie einigen wenigen weiteren Bakterienspezies synthetisiert wird. Dextrane sind definiert als Homopolysaccharide aus Glucosemolekülen, die überwiegend durch aufeinanderfolgende  $\alpha$ -1,6 glycosidische Bindungen das Rückgrat des Polymers bilden. Diese Hauptkette kann darüber hinaus Seitenketten aus gleichermaßen verknüpften Glucose-Oligomeren unterschiedlichen Polymerisationsgrades tragen. Zwar erfolgt die Anbindung oftmals  $\alpha$ -1,3-glycosidisch, mitunter treten jedoch  $\alpha$ -1,4- oder  $\alpha$ -1,2-glycosidische Bindungen auf. Polymerisationsgrad und Art der Anknüpfung der Seitenketten sind stammspezifisch.

**F:** Erläutern Sie natürliches Vorkommen und anhand von Strukturformeln die chemische Struktur von Cellulose.

**A:** Cellulose ist neben Lignin das quantitativ bedeutendste in der Natur auftretende Biopolymer, macht den größten Anteil an der pflanzlichen Biomasse aus und stellt darüber hinaus ein mikrobielles extrazelluläres Polymer dar. Es handelt sich um ein unverzweigtes Glucan, bei dem die Glucosereste  $\beta$ -1,4-glykosidisch verknüpft vorliegen; Strukturformeln analog zu Abb. 11.4.

**F:** Erläutern Sie die bakterielle Cellulosesynthese anhand von *Gluconobacter xylinus*.

**A:** Die Synthese beginnt ausgehend von Glucose-6-phosphat, das durch eine Phosphoglucomutase in Glucose-1-phosphat umgewandelt wird. Der Glucoserest wird nun durch das Enzym Glucose-1-phosphat-Uridyltransferase mit Uridintriphosphat (UTP) auf Uridindiphosphat (UDP) übertragen, wodurch UDP-Glucose und Pyrophosphat entstehen. Von UDP-Glucose ausgehend werden dann unter Abspaltung von zwei UDP Molekülen zwei Glucosereste durch die Cellulose-Synthase kovalent miteinander verbunden. Der Cellulose-Synthase-Komplex ist in der Cytoplasmamembran lokalisiert und schleust die entstehende Cellulosekette durch die Zellmembran nach außen.

**F:** Beschreiben Sie den Biosyntheseweg von Poly(3-hydroxybuttersäure) mit Strukturformeln und mit Nennung der daran beteiligten Enzyme! Welches ist das Schlüsselenzym der Synthese?

**A:** siehe Abb. 11.6

**F:** Beschreiben Sie das für die Dextransynthese verantwortliche Enzym. Welches Substrat verwendet das Enzym und warum können keine alternativen Substrate zur Synthese genutzt werden?

**A:** Dextran wird von *L. mesenteroides* extrazellulär durch eine sekretierte Hexosyltransferase, die Dextransaccharase, synthetisiert. Das Enzym verwendet exklusiv Saccharose als Substrat und überträgt den Glucoseresst auf das wachsende Polysaccharid. Für die Reaktion wird kein ATP benötigt, da das Enzym die Energie der glykosidischen Bindung zwischen Glucose und Fructose nutzt. Mit Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle wird daher kein Dextran synthetisiert. Neben der Bildung des Dextranrückgrats katalysiert die Dextransaccharase außerdem die Anknüpfung der Seitenketten-Verzweigungen.

**F:** Welches Polysaccharid wird biotechnisch mit dem Bakterium *Xanthomonas campestris* produziert? Beschreiben Sie die Struktur dieses industriell relevanten Polymers.

**A:** Das Bakterium *Xanthomonas campestris* synthetisiert ein Exopolysaccharid namens Xanthan. Bei diesem Polymer handelt es sich um ein Heteropolysaccharid von komplexer Struktur aus sich wiederholenden Pentasaccharid Einheiten. Das Rückgrat besteht aus Cellulose, also  $\beta$ -1,4-glycosidisch verknüpfter Glucose. Jede zweite Glucoseeinheit ist zudem kovalent mit einem aus D-Mannose, D-Glucuronsäure und D-Mannose bestehenden Trisaccharid verbunden, wobei die beiden Mannoseresste wiederum mit Acetat bzw. Pyruvat verknüpft sein können. Während der terminale Mannoseresst C-4 und C-6 verknüpftes Pyruvat in Form eines Ketals enthalten kann, kann die interne Mannoseeinheit über C-6 acetyliert vorliegen. In Abhängigkeit des jeweiligen *X. campestris*-Stammes variiert die Menge der an die Seitenketten gebundenen Acetyl- und Pyruvyl-Substituenten. Üblicherweise variiert der Substitutionsgrad für Pyruvat zwischen 30 und 40 % und jener für Acetat zwischen 60 und 70 %.

**F:** Durch welche Verfahren kann die natürliche Cellulosesynthese von *Gluconobacter xylinus* erhöht werden?

**A:** Methoden des Metabolic Engineering können angewendet werden, um beispielsweise Mutanten zu erzeugen, deren veränderter Stoffwechsel vermehrt Vorstufen der Cellulose-Synthese bereitstellt. Ein solcher erfolgreich durchgeführter Ansatz zielte darauf ab, Mutanten mit inaktiver Glucose-6-phosphat Dehydrogenase zu erzeugen, um eine Konversion von Glucose zu organischen Säuren zu verhindern. Außerdem können Synthese-stimulierende Substanzen eingesetzt werden. So wurde bei Zugabe von Ethanol oder Lactat eine Zunahme der Polymersynthese beobachtet, die auf ein Anheben des zellulären ATP Spiegels zurückgeführt wurde, was letztlich die Konzentration des Edukts Glucose-6-phosphat erhöht. ATP aktiviert die Fructokinase und inhibiert die Glucose-6-phosphat Dehydrogenase, was die unerwünschte Umsetzung von Glucose-6-Phosphat zu 6-Phosphogluconat blockiert.

**F:** Wie unterscheidet sich die Biosynthese einer Lipase von der Biosynthese von Cyanophycin?

**A:** Das Enzym Lipase wird durch den ribosomalen Proteinbiosynthese-Apparat synthetisiert, während Cyanophycin durch ein lösliches, für die Biosynthese von Cyanophycin spezifisches Enzym, die Cyanophycin-Synthetase, synthetisiert wird. Folglich sind Ort und generelle



Möglichkeiten der Inhibition und auch die Substrate der Reaktionen verschieden. Inhibitoren der Proteinbiosynthese, die auch häufig als Antibiotika verabreicht werden, hemmen die Cyanophycin-Biosynthese nicht. Die Proteinbiosynthese verläuft über an tRNA-Moleküle gebundene Aminosäuren, während die Aminosäuren bei der Cyanophycin-Biosynthese in freier Form verwendet werden.

**F:** Welche Vorteile zeichnen Polyhydroxyfettsäuren im Vergleich zu herkömmlichen, synthetischen Kunststoffen aus?

**A:** Polyhydroxyfettsäuren sind im Gegensatz zu den meisten synthetischen Kunststoffen biologisch abbaubar, da die Esterbindungen durch PHF-Depolymerasen sowie auch durch Esterasen und Lipasen hydrolytisch gespalten werden können. Darüber hinaus können Polyhydroxyfettsäuren aus nachwachsenden Rohstoffen produziert werden, während synthetische Kunststoffe fast ausschließlich aus Raffinerieprodukten des Erdöls produziert werden.

## Kapitel 12: Steroide und Aromastoffe

**F:** Was sind Steroide? Welches gemeinsame Strukturmerkmal besitzen die Steroide?

**A:** Steroide sind organische Naturstoffe, die bereits in sehr geringen Konzentrationen Stoffwechselvorgänge in eukaryotischen Organismen regulieren. So fungieren z. B. einige Steroide als Sexualhormone.

Steroide setzen sich aus drei sechsgliedrigen Kohlenstoff-Ringsystemen und einem fünfgliedrigen Kohlenstoff-Ringsystem zusammen. Die chemische und funktionelle Heterogenität von Steroiden wird durch Modifikationen (wie z. B. Substituenten oder Doppelbindungen) erzielt.

**F:** Was versteht man unter einer semi-synthetischen Herstellung von Steroiden? An welchem Beispiel können die Vorteile der regioselektiven Modifikation durch Mikroorganismen besonders gut verdeutlicht werden?

**A:** Steroide werden, ausgehend von einem Naturstoff, durch eine Kombination aus chemischen und mikrobiellen Schritten produziert. Diese Herstellungsweise wird als semi-synthetische Herstellung bezeichnet. Durch den Einsatz von *Rhizopus* zur 11- $\alpha$ -Hydroxylierung konnte bei der Herstellung von Hydrocortison die Anzahl der notwendigen Reaktionsschritte von über 30 auf 20 Schritte reduziert werden.

**F:** Was entsteht bei der Biotransformation von Hydrocortison mit einer  $\delta$ -1-Dehydrogenase? Welcher Mikroorganismus verfügt über ein solches Enzym und welches Koenzym wird benötigt?

**A:** Das Enzym ist FAD-abhängig und erzeugt durch eine regioselektive Eliminierung von Wasserstoff eine Doppelbindung zwischen C1 und C2 im A-Ring des Steroids. Das Produkt heißt Prednisolon, und *Arthrobacter simplex* kann zu dieser Biotransformation eingesetzt werden.

**F:** Warum kann es trotz Verzehnfachung der Enzymmenge (z. B. durch Überexpression des entsprechenden Gens) dazu kommen, dass die Geschwindigkeit der Biotransformation bei der Herstellung eines Steroids deutlich weniger als zweifach zunimmt?

**A:** Als hydrophobe Verbindungen lösen sich Steroide nur langsam und in geringen Konzentrationen im wässrigen Kulturmedium bzw. im Cytosol. Die erreichbaren Konzentrationen liegen oft deutlich unterhalb der  $K_m$ -Werte der beteiligten Enzyme. Die Produktionsrate wird deshalb durch den Phasenübergang vom Feststoff in die Lösung, den Transport zur Zelle und die Diffusion zum Enzym limitiert.

**F:** Welche Stoffeigenschaft von Steroiden erweist sich als vorteilhaft beim Down-Stream-Processing?

**A:** Aufgrund der guten Löslichkeit von Steroiden in unpolaren organischen Lösungsmitteln kann man eine Extraktion vornehmen. Extrahiert man 100 Kubikmeter Fermentationsmedium mit 10 Kubikmetern Lösungsmittel, so bekommt man nicht nur eine Anreicherung, d.h. Entfernung von unerwünschten Stoffen wie der Biomasse, sondern gleichzeitig eine Aufkonzentrierung.

**F:** Nennen Sie drei aromarelevante Carbonsäuren sowie deren Vorstufen für die mikrobielle Herstellung. Mit welchen Mikroorganismen werden diese Carbonsäuren produziert und warum ist hierbei eine intensive Sauerstoffversorgung erforderlich?

**A:** Folgende natürliche aliphatische Carbonsäuren sind neben der Essigsäure für viele Fruchtaromen von wirtschaftlicher Bedeutung: Propionsäure, Buttersäure, Isobuttersäure sowie 2-Methylbuttersäure und 3-Methylbuttersäure. Die Vorstufen für die mikrobielle Herstellung sind die entsprechenden Alkohole: Propanol, Butanol, Isobutanol sowie 2-Methylbutanol und 3-Methylbutanol. Diese Alkohole werden mit den aeroben Bakterien *Gluconobacter oxydans* bzw. *Acetobacter pasteurianus* zu den entsprechenden Säuren oxidiert. Da hierbei Sauerstoff als Elektronenakzeptor dient, ist der Sauerstoffbedarf sehr hoch.

**F:** Beschreiben Sie die mikrobielle Herstellung von Vanillin.

**A:** Das meistverbreitete mikrobielle Verfahren zur Herstellung von Vanillin besteht in der Biotransformation von Ferulasäure zu Vanillin. Die Ferulasäure kann entweder aus Reisspelzen gewonnen werden oder sie wird mit einem *Pseudomonas*-Stamm aus Eugenol über Coniferylalkohol und Coniferylaldehyd zur Ferulasäure oxidiert. Die Umsetzung der Ferulasäure zu Vanillin erfolgt bei hohen Ausbeuten mit Bakterien der Gattung *Amycolatopsis*. Hierbei sind zwei Enzyme beteiligt, zunächst wird Feruloyl-CoA gebildet, das dann unter Abspaltung von Acetyl-CoA zum Vanillin umgesetzt wird.

**F:** Welche Gründe sprechen für die Herstellung von Aromastoffen mithilfe biotechnischer Methoden?

**A:** Aromastoffe, die aus pflanzlichen, tierischen oder mikrobiellen Ausgangsstoffen durch enzymatische oder mikrobielle Verfahren hergestellt werden, sind gemäß der Aromenverordnung natürliche Aromastoffe. Ferner sind diese Herstellverfahren nachhaltig, da hierbei nachwachsende Rohstoffe eingesetzt werden.

**A:** Welche Verbindung wird als Birnenester bezeichnet und wie wird diese Substanz hergestellt?

**F:** Trans-2-cis-4-ethyldecadienoat riecht und schmeckt ganz typisch nach Birne und wird deshalb auch als Birnenester bezeichnet. Bei der Herstellung geht man von Stillingiaöl aus, das etwa 5 % trans-2-cis-4-Decadiensäure enthält. Diese Verbindung wird mittels einer Lipase aus *Candida antartica* mit Ethanol durch Umesterung zu dem gewünschten Produkt umgewandelt.

**F:** Welche Aromastoffe werden vorwiegend im Blauschimmelkäse durch *Penicillium roqueforti*-Kulturen gebildet? Beschreiben Sie kurz den Stoffwechselweg, der zur Bildung dieser Aromastoffe führt.

**A:** Eine bedeutende Aromastoffklasse im Blauschimmelkäse stellen die Methylketone wie z.B. 2-Pentanon, 2-Heptanon und 2-Nonanon dar. Bei der Bildung dieser 2-Ketone werden nach der lipolytischen Spaltung der Fette die dabei entstehenden Fettsäuren in die Acyl-CoA-Formen umgesetzt. Durch  $\beta$ -Oxidation werden diese dann zu  $\beta$ -Ketosäuren und durch  $\text{CO}_2$ -Abspaltung zu Methylketone umgewandelt.

## Kapitel 13: Verfahren der Abwasserreinigung

**F:** Wie hoch ist der auf Einwohner bezogene Wasserverbrauch, wenn ein  $BSB_5$ -Wert im Rohabwasser von 600 mg/l gemessen wird?

**A:** Spezifische Schmutzfracht ist 60 g  $BSB_5$  pro Einwohner und Tag →  
 $60\text{g} : 0,600\text{ g/l} = 100\text{ Liter pro Einwohner und Tag.}$

**F:** Wie ist der CSB und der  $BSB_5$  definiert und warum ist der CSB-Wert für kommunales Abwasser höher als der  $BSB_5$ -Wert?

**A:** CSB ist der chemische Sauerstoffbedarf und wird beispielsweise durch Oxidation der Schmutzfracht mit Kaliumdichromat in Schwefelsäure bei 148°C für 2 Stunden colorimetrisch bestimmt. Der  $BSB_5$  ist der biochemische Sauerstoffbedarf in 5 Tagen. Dieser Parameter wird durch Benutzung eines Misch-Inokulums bestimmt, wobei der aerobe Abbau leicht abbaubarer organischer Stoffe durch den Sauerstoffverbrauch innerhalb von 5 Tagen bei 20°C im Sapromat manometrisch gemessen wird.

Mit dem CSB werden auch schwer bzw. biologisch nicht abbaubare Stoffe gemessen, die in der  $BSB$ -Bestimmung während einer Inkubationszeit von 5 Tagen nicht erfasst werden.

**F:** In eine Kläranlage fließt ein Abwasser mit 600 mg/l  $BSB_5$ . 1/3 der  $BSB$ -Fracht wird in der Vorklärung abgeschieden. Das gereinigte Abwasser hat einen Rest- $BSB_5$  von 10 mg/l. Wie viel Sauerstoff wird unter den gegebenen Bedingungen im Belebungsbecken für die C-Elimination verbraucht, wenn die Überschuss-Schlammproduktion 25 % des  $BSB_5$  beträgt?

**A:**  $BSB_5$ -Zulauf zur Belebungsanlage:  $600 - 200 = 400\text{ mg/l}$

$BSB_5$ -Umsatz in der Belebungsanlage:  $400 - 10 = 390\text{ mg/l}$

Davon gehen 25 % in die Biomassevermehrung:  $390 \times 0,25 = 97,5\text{ mg/l}$  (= Überschuss-Schlamm).

Also müssen  $390 - 97,5 = 292,5\text{ mg/l } BSB_5$  abgebaut werden. Dies entspricht einem Sauerstoffbedarf von 292,5 mg/l.

**F:** Wie wird in einer kommunalen Kläranlage die Umsatzrate bei biologischen Prozessen erhöht und welche Voraussetzungen sind dafür notwendig?

**A:** Durch Schlammrückführung aus dem jeweiligen Nachklärbecken zurück in das Belebungsbecken (aerobe Abwasserreinigung) oder in den Faulturm (anaerobe Schlammstabilisierung). Durch die Schlammrückführung wird die Biomasse-Konzentration im Belebungsbecken erhöht. Es können sich dadurch auch langsam wachsende Mikroorganismen-Gruppen wie z.B. die Nitrifikanten mit längeren Generationszeiten in Belebungsbecken etablieren. Um z.B. Nitrifikanten anzureichern, sollte das Schlammalter 6 Tage nicht unterschreiten. Für C-Abbau und Nitrifikation ist eine hydraulische Aufenthaltszeit von mindestens 12 h bei einer Schlammkonzentration von durchschnittlich 4,5 kg TS pro  $\text{m}^3$  nötig. Dafür muss Schlamm aus dem Nachklärbecken zurückgeführt werden. Für eine gute Schlammabtrennung im Nachklärbecken muss der Schlamm gute Absetzeigenschaften haben. Ein Maß dafür ist der Schlammvolumenindex (SVI). Der SVI sollte einen Wert von 80 – 120 ml pro g TS aufweisen.

**F:** Welche Vor- und Nachteile haben aerobe und anaerobe Verfahren bei der kommunalen Abwasserreinigung?

**A:** Aerobe Verfahren:

Etabliertes Verfahren bei der kommunalen Abwasserreinigung.

Geeignet für eher schwach belastete Abwässer wie z.B. kommunale Abwässer ( $\leq 600 \text{ mg/l BSB}_5$ ).

Bei der Veratmung der Schmutzkomponenten wird die Energie der veratmeten Substrate zum großen Teil als Wärme frei und mit der Abluft ausgetragen (65,5 %) und ist somit nicht nutzbar. Der Rest wird biochemisch konserviert und dient dem Zellwachstum (34,5 %).

Selbsterhitzung ist möglich (z.B. bei Reinsauerstoffbelüftung) und sollte vermieden werden.

Aerobe Verfahren liefern gute Ablaufwerte aber auch viel Überschussschlamm und verbrauchen viel Energie für die Belüftung.

Anaerobe Verfahren:

Etabliertes Verfahren für die Schlammstabilisierung und die Behandlung von konzentrierten Industrieabwässern (in der Regel mit  $\geq 1000 \text{ mg/l CSB}$ ).

Bei der anaeroben Umsetzung der Schmutzkomponenten wird die in den Substraten gespeicherte Energie überwiegend mit dem Faul- oder Biogas abgegeben und so nutzbar (88,5 %). Der biochemisch konservierte Anteil ist deutlich geringer als bei der aeroben Reinigung und deshalb entsteht nur wenig Wärme (4,6 %) und wenig Überschussschlamm (6,9 %).

Die bei anaeroben Umsetzungen freigesetzte Wärmeenergie reicht nicht für die Aufrechterhaltung der Reaktionstemperatur von  $\geq 30^\circ\text{C}$ , sodass Anaerobreaktoren beheizt werden müssen.

Anaerobe Verfahren liefern schlechtere Ablaufwerte als aerobe Verfahren, eignen sich daher nicht als Endreinigungsstufen, produzieren wenig Überschussschlamm und benötigen eine konstante Temperatur im Reaktor.

**F:** Wie unterscheidet sich eine Hochlastbelebung von einer Schwachlastbelebung

**A:** Hochlastbelebung:

Die Schlammbelastung in einer Hochlastbelebung beträgt zwischen 0,3–2 kg  $\text{BSB}_5$  im Zulauf pro kg TS Schlamm in der Anlage und Tag. Es kommt zu einem unvollständigen  $\text{BSB}_5$ -Abbau ohne Nitrifikation. Dabei wird viel Überschussschlamm aus  $\text{BSB}$ -Komponenten (bis zu 50 Gew.% des abgebauten  $\text{BSB}_5$ ) gebildet. Sauerstoff wird nur für die Veratmung des mineralisierten Anteiles des  $\text{BSB}_5$  (max. 50 %) benötigt.

Der Schlamm ist nicht mineralisiert, d.h. nicht stabilisiert. Die Hochlastbelebung eignet sich nicht als Endstufe für die Abwasserreinigung weil der Ablauf nicht die gesetzlich geforderten Grenzwerte für  $\text{BSB}_5$ , Ammonium und Gesamt-N erreicht.

Schwachlastbelebung:

Die Schlammbelastung in einer Schwachlastbelebung beträgt zwischen 0,15 – 0,3 kg  $\text{BSB}_5$  im Zulauf pro kg TS Schlamm in der Anlage und Tag. Es kommt zu vollständigem  $\text{BSB}_5$ -Abbau und Nitrifikation. Dabei wird wenig Überschussschlamm aus  $\text{BSB}$ -Komponenten (ca. 25 Gew.% des abgebauten  $\text{BSB}_5$ ) gebildet und es resultiert ein höherer spezifischer Sauerstoffbedarf.

Der Schlamm ist ausgezehrt (= mineralisiert). Der C-Abbau und die Nitrifikation erfolgen im gleichen Becken. Das Abwasser ist gereinigt und erreicht die gesetzlich geforderten minimalen Ablaufwerte.

**F:** Was sind AOB und NOB und welche Rolle spielen sie bei der kommunalen Abwasserreinigung? Welche physikalischen Parameter haben einen Einfluss auf die Nitrifikation und wie wirken sich diese physikalischen Einflussfaktoren aus?

**A:** AOB = Ammonium-oxidierende Bakterien d.h. Bakterien die Ammonium mit Sauerstoff zu Nitrit oxidieren (z.B. Spezies der Gattung *Nitrosomonas*)

NOB = Nitrit-oxidierende Bakterien d.h. Bakterien die Nitrit mit Sauerstoff zu Nitrat oxidieren (z.B. Spezies der Gattung *Nitrobacter*).

AOB und NOB sind für die Nitrifikation bei der kommunalen Abwasserreinigung erforderlich  
Physikalische Parameter:

pH-Wert: Bei alkalischen pH-Werten liegt  $\text{NH}_3$  und nicht  $\text{NH}_4^+$  vor.  $\text{NH}_3$  hat einen deutlich größerer Einfluss auf die NOB als auf die AOB und hemmt daher die Nitratation. Bei sauren pH-Werten liegt  $\text{HNO}_3$  undissoziiert vor.  $\text{HNO}_3$  hat einen deutlich größerer Einfluss auf die AOB als auf die NOB und hemmt die Nitritation.

Temperatur: Generell bewirkt eine Erhöhung der Temperatur eine Erhöhung der Umsatzrate. Bei Abwassertemperaturen unter  $30^\circ\text{C}$  wachsen die NOB schneller als die AOB. Es kommt zu keiner Anreicherung von Nitrit. Die geforderten Grenzwerte für Stickstoff gesamt und Ammonium-Stickstoff (Tab. 13.1) gelten nur für Abwassertemperaturen von  $\geq 12^\circ\text{C}$ . Bei Temperaturen darunter sind die Umsatzraten der Nitrifikanten zu gering.

**F:** Warum können Nitrifikanten und Denitrifikanten in einem belüfteten Becken nicht gleichzeitig nitrifizieren und denitrifizieren?

**A:** Nitrifikanten sind obligat aerobe, langsam wachsende, autotrophe Bakterien.

Denitrifikanten sind fakultativ aerobe, schnell wachsende, heterotrophe Bakterien, die die äußere Schicht einer Schlammflocke bilden. Für die Nitrifikation wird Sauerstoff essentiell benötigt, für die Denitrifikation darf kein Sauerstoff vorhanden sein, weil die meisten Denitrifikanten in Gegenwart von Sauerstoff von Nitratatmung auf Sauerstoffatmung „umschalten“ und Nitrat dann liegen bleibt.

**F:** Welche Aussagen über die biologische P-Elimination sind richtig?

- a) Polyphosphat akkumulierende Organismen (PAO) sind fakultativ anaerobe Bakterien.
- b) Unter anaeroben Bedingungen nutzen die aeroben PAO den Glykogenspeicher als C-Quelle.
- c) Die beim aeroben Abbau des  $\text{PP}_n$ -Speichers abgespaltenen Phosphatreste werden ins Abwasser ausgeschieden.
- d) PAO haben im Belebungsbecken einen Vorteil gegenüber den anderen heterotrophen Bakterien.
- e) Im aeroben Becken wird der PHB-Speicher aufgebaut, da dort die PAO genügend Energie zur Verfügung haben.

**A:** a) ist falsch, da PAO obligate Aerobier sind.

b) ist richtig.

c) ist falsch,  $\text{P}_i$  wird unter anaeroben Bedingungen abgegeben.

d) ist falsch, da PAO mit den heterotrophen Bakterien um  $\text{BSB}_5$  konkurrieren müssen und daher ihren PHB-Speicher nutzen (müssen).

e) ist richtig.

<http://www.springer.com/978-3-8274-3039-7>

Industrielle Mikrobiologie

Sahm, H.; Antranikian, G.; Stahmann, K.-P.; Takors, R.

(Hrsg.)

2013, XII, 310 S. 139 Abb., 110 Abb. in Farbe.,

Softcover

ISBN: 978-3-8274-3039-7