

2491

Kreislaufführung mikrobieller Biomasse

Prof. Dr. Erwin Flaschel, Dipl.-Ing. Markus Blaesen

Universität Bielefeld, Technische Fakultät, Lehrstuhl für Fermentationstechnik

efl@fermtech.techfak.uni-bielefeld.de

Zusammenfassung

Dieses Projekt sollte dazu beitragen, alternative Wege für die bei der fermentativen Gewinnung von Bulk-Produkten anfallenden Biomasseströme zu entwickeln. Dazu wurde ein am Lehrstuhl für Fermentationstechnik seit Jahren verfolgter Ansatz aufgegriffen, indem anfallende Biomasse aufgeschlossen und als Medienbestandteil in den Fermentationsprozess zurückgeführt wird (Friehs *et al.*, 1998; Risse *et al.*, 2001). Für die Untersuchungen standen drei Prozesse bzw. Organismen, darunter zwei industriell relevante, zur Verfügung. Begonnen wurde mit einem *Klebsiella planticola*-Stamm. Für weitere Untersuchungen kam mit dem *Escherichia coli*-Stamm B-3996 ein *L*-Threoninproduzent zum Einsatz. Als drittes wurde mit dem *Bacillus licheniformis*-Stamm P300, ein Vertreter der Gram-positiven Bakterien, gearbeitet. Mit ihm wurde ein Hochleistungsstamm zur Produktion der alkalischen Protease Subtilisin Carlsberg genutzt.

In kleinem Maßstab durchgeführte Lyseversuche führten zur Entwicklung geeigneter Verfahren zur Behandlung der Biomasse. Diese stellten einen Kompromiss aus verfahrenstechnischen Ansprüchen, Ökonomie und Lysequalität dar. Für *Klebsiella planticola* und *Escherichia coli* wurde ein aus einer Hochdruckhomogenisation und einer nachgeschalteten enzymatischen Behandlung mit einer alkalischen Protease zusammengesetztes Verfahren entwickelt. Die erreichten Lysegrade lagen bei 75 %. Der Einsatz der technischen Protease konnte auf unter 1 Liter pro Tonne Biotrockenmasse eingestellt werden. Lyseversuche für *Bacillus licheniformis* zeigten u. a., dass schon eine einfache Autolyse bei Durchlaufen eines Temperaturprofils in einem Bereich von 25 bis 55 °C zu Lysegraden von bis zu 89 % führt.

Mit Hilfe der Lysatanalytik konnte das jeweilige Lysat ausreichend charakterisiert werden. Durch die bis zu neun Messgrößen umfassende Analytik konnte eine gleichbleibende Lysatqualität sichergestellt werden.

Hefeextrakt in einem halbsynthetischen Medium konnte erfolgreich durch ein *Klebsiella*-Lysat ersetzt werden. Neun zyklische Rückführungen zeigten keinen negativen Einfluss auf das Wachstum. Eine deutlich höhere Biomassebildung war mit Zunahme der Zykluszahl zu verzeichnen (M. Blaesen *et al.*, 2006 u. 2006a). Dies bietet gerade für eine biomasseabhängige Produktbildung interessante Möglichkeiten, da ein Mehr an Biomasse im Prozess auch zur Bildung größerer Produktmengen führen kann.

Fermentationen mit *Escherichia coli* auf einem technischen Medium mit Hefeextrakt als komplexer Komponente führten zu Produktivitäten von $0,95 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in Bezug auf Threonin. Der Ersatz der ursprünglich durch den Hefeextrakt in das Medium eingebrachten Stickstoff- und Kohlenstoffmasse durch Lysat führte zu keinen negativen Auswirkungen auf Wachstum und Produktbildung. Die so erzielten Produktivitäten lagen durchschnittlich bei $0,91 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Die Ertragskoeffizienten zeigten im Vergleich zu denen auf Originalmedium keine signifikanten Unterschiede.

Fermentationen mit *Bacillus licheniformis* auf einem komplexen Produktionsmedium führten zu einer durchschnittlichen Proteasekonzentration von 1400 U mL^{-1} . Durch den Einsatz von *Bacillus*-Lysaten als Ersatz für unterschiedliche Medienbestandteile konnte gezeigt werden, dass der Austausch des Maisquellwassers durch ein autoly-

tisch gewonnenes Zelllysat ohne negativen Einfluss auf das Wachstum und die Produktbildung möglich ist. Die erreichten Proteasekonzentrationen lagen ebenfalls bei 1400 U mL^{-1} . Weitere Fermentationen gaben Hinweise darauf, dass auch die Hälfte des Sojamehls ersetzt werden konnte. In keinem der betrachteten Fälle kam es zu negativen Auswirkungen auf das Wachstum der Bakterien. Die höchsten Aktivitäten ließen sich mit einem durch alkalische Hydrolyse gewonnenem Lysat erzielen.

Einleitung

Die in allen Fermentationsverfahren anfallende Biomasse ist gewöhnlich ein notwendiges Übel, die die Produktausbeute schmälert und zusätzlich kostenträchtig entsorgt werden muß. Hersteller von (z.B.) Aminosäuren, technischen Enzymen und Antibiotika sind von dieser Problematik besonders betroffen. In wenigen Fällen klassischer biotechnischer Prozesse wird die anfallende Biomasse als Futtermittel abgegeben. Andere Hersteller haben kostspielige Infrastrukturen aufgebaut, um die Biomasse als Dünger absetzen zu können. Beide Wege wären ökonomisch jedoch unrentabel, wenn nicht die sonst fälligen Kosten für Deponie, Kompostierung oder Klärung berücksichtigt würden. Eine Entsorgung der mikrobiellen Biomasse entzieht den biologischen Prozessen wertvolle Rohstoffe, zumal Biomasse alle Komponenten enthält, die zur Erzeugung derselben benötigt werden. Es sollte deshalb von großem Interesse sein, mikrobielle Biomasse so aufbereiten zu können, daß es in den Prozeß zurückgeführt oder für andere biotechnische Prozesse nutzbar gemacht werden kann.

Genau diese Problematik ist Inhalt des Projektes gewesen. Detailliertere Ergebnisse werden im folgenden für die L-Threoninproduktion mit Hilfe des *Escherichia coli*-Stamms B-3996 präsentiert.

Rückführung mikrobieller Biomasse für den Prozess der Produktion von L-Threonin mit *Escherichia coli*

Bei dem verwendeten Threoninproduzenten handelt es sich um den *Escherichia coli* K12-Abkömmling B-3996. Dieser ist in der Nationalen Russischen Sammlung für industrielle Mikroorganismen (VKPM, Moskau, Russland) hinterlegt und enthält das 14,6 kb große Plasmid pVIC40 (**Abb. 1**). Als Selektionsmarker dient eine Streptomycinresistenz (Sm).

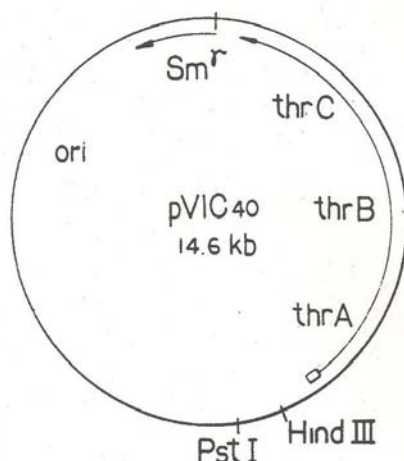


Abb. 1 Plasmid pVIC40
(Debabov *et al.*, 1996)

Die Gene *thrA* (Aspartatkinase I), *thrB* (Homoserinkinase) und *thrC* (Threoninsynthase) bilden ein Operon und codieren für Enzyme des Threoninsynthesewegs. Der Stamm besitzt eine Resistenz gegenüber einer intrazellulären Threoninkonzentration von 5 g L^{-1} . Außerdem verfügt er über die Fähigkeit, Saccharose als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Genauere Informationen über den Stamm enthalten die US Patente US 5 175 107 und US 5 538 873 (Debabov *et al.*, 1992 u.1996).

Zur Kultivierung wurde ein Medium eingesetzt, das neben Saccharose hauptsächlich aus Hefeextrakt und Ammoniumsulfat bestand.

Aufschluss der Zellen

Autolyse reicht für einen Zellaufschluss nicht aus, weil viele Proteine nicht abgebaut werden und beim Autoklavieren zur Medienbereitung ausfallen. Proteolytische Behandlung zeigte jedoch überzeugende Ergebnisse. Die Zugabe der Protease führte

zu einem sprunghaften Anstieg des Lysegrades. Wie zu erwarten, führten niedrigere Proteasekonzentrationen zwar zu einem verlangsamten Abbau der Proteine und damit zu einer langsameren Zunahme des Lysegrades, jedoch glichen sich die Proteinkonzentrationen und die Lysegrade schließlich an. So stellten sich Lysegrade zwischen 72 % und 75 % ein. Wie **Abb. 2** erkennen lässt, wurde ein Versuch ohne Enzymzugabe als Referenzwert mitgeführt. Dessen Lysegrad lag durch das Ausfallen von Zellbestandteilen, größtenteils der Proteine, bei nur 29 %.

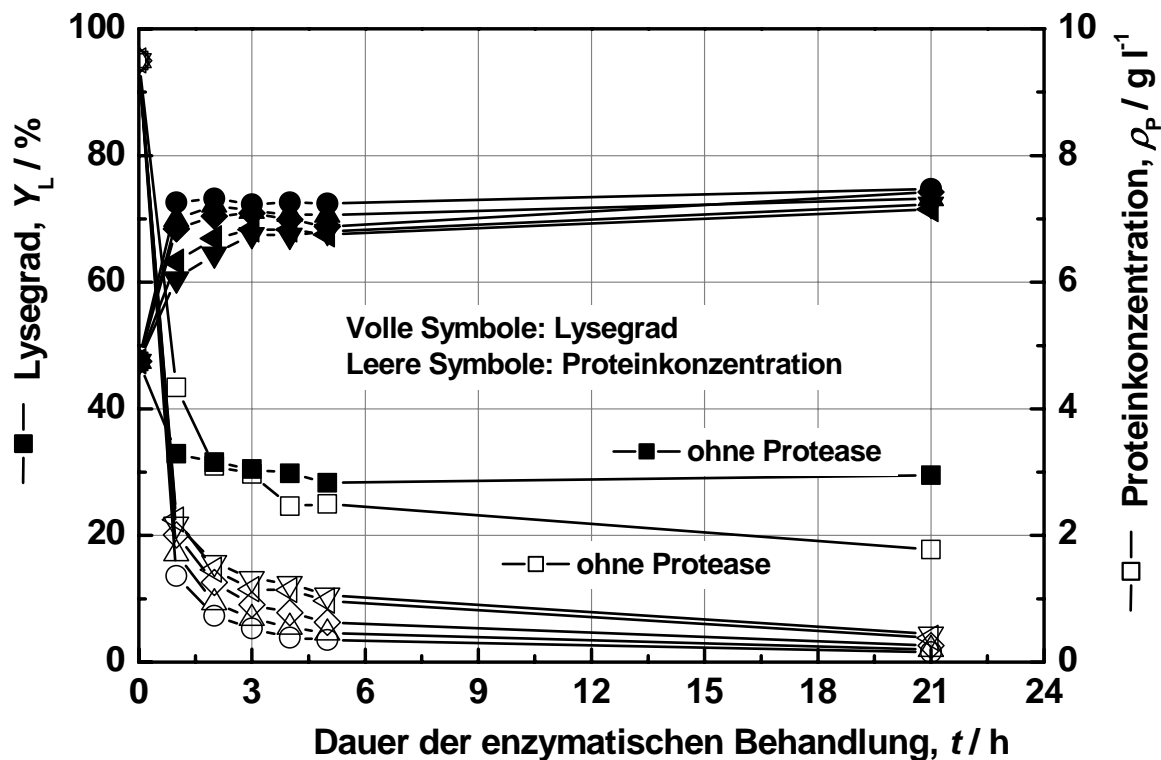


Abb. 2 Proteolytische Behandlung von *E. coli* B-3996 nach Hochdruckhomogenisation unter Variation der Enzymkonzentration (Alcalase[®] 2.4 L FG, Novozymes, DK; Proteosedosierung 19,2; 9,6; 4,8; 1,9; 0,96; 0 L t⁻¹; Biotrockenmassegehalt 26 g L⁻¹)

Abbildung 3 gibt eine Zusammenfassung über die erzielten Ergebnisse in Bezug auf verschiedene Lyseversuche mit *Escherichia coli* B-3996. Die maximal erreichten Lysegrade sind übersichtshalber mit in das Schema eingetragen worden. Der Lysegrad konnte innerhalb eines Aufschlussgangs auch wieder durch Präzipitatbildung abnehmen.

Die Abstimmung der Aufschlussparameter für den Hochdruckaufschluss führten zu einem optimalen Arbeitsdruck von 800 bar bei drei Passagen. So konnte bereits ein Lysegrad von 65 % erreicht werden. Darüber hinaus war der Lysegrad unabhängig von der Zellkonzentration.

Ein Blick auf die Übersicht zeigt, dass die chemischen Hydrolysen im alkalischen Milieu sowohl mit als auch ohne vorgeschalteten Hochdruckaufschluss zu den höchsten Lysegraden führten. Auch in Bezug auf die Lysegeschwindigkeiten überzeugten diese beiden Verfahren. Klare Nachteile lagen aber im fehlenden Abbau der freigesetzten Proteine und in der hohen Salzfracht.

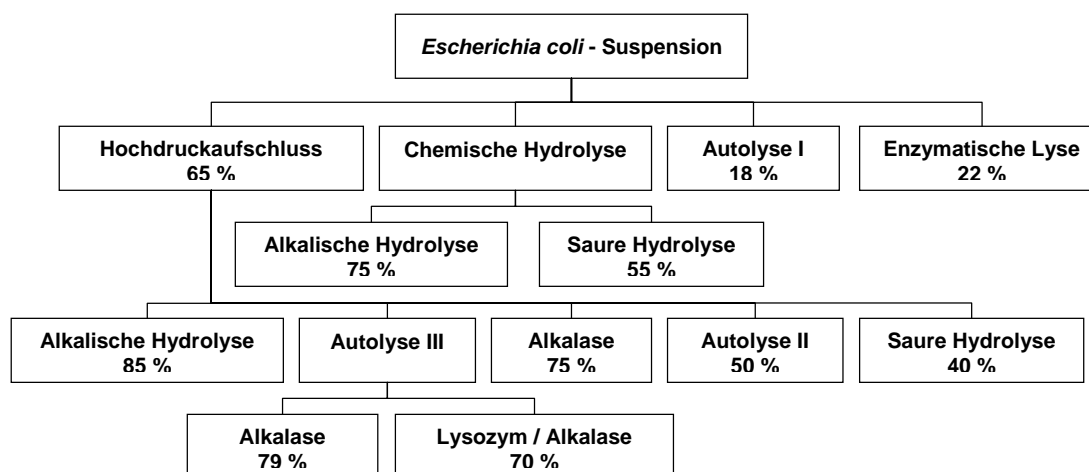


Abb. 3 Aufschlussgänge für *Escherichia coli* B-3996 mit Angabe der maximal erreichten Lysegrade.

Lysate, die mit einem aus einer Hochdruckhomogenisation und einer Alkalase-Behandlung bestehenden Aufschlussgang (s.o.) hergestellt wurden, ersetzen daraufhin den im ursprünglichen Medium vorhandenen Hefeextrakt. Zu diesem Zweck wurde ein geklärtes Lysat eingesetzt. Die dem Medium zugeführte Lysatmenge wurde so dosiert, dass der ursprünglich durch den Hefeextrakt in das Medium eingebrachte Stickstoffanteil durch die Zugabe von Lysat aufgewogen wurde. Ein Vergleich mit Fermentationen unter Verwendung des ursprünglichen Mediums ist in **Abb. 4** in Bezug auf das Wachstum und in **Abb. 5** in Bezug auf die Produktbildung wiedergegeben.

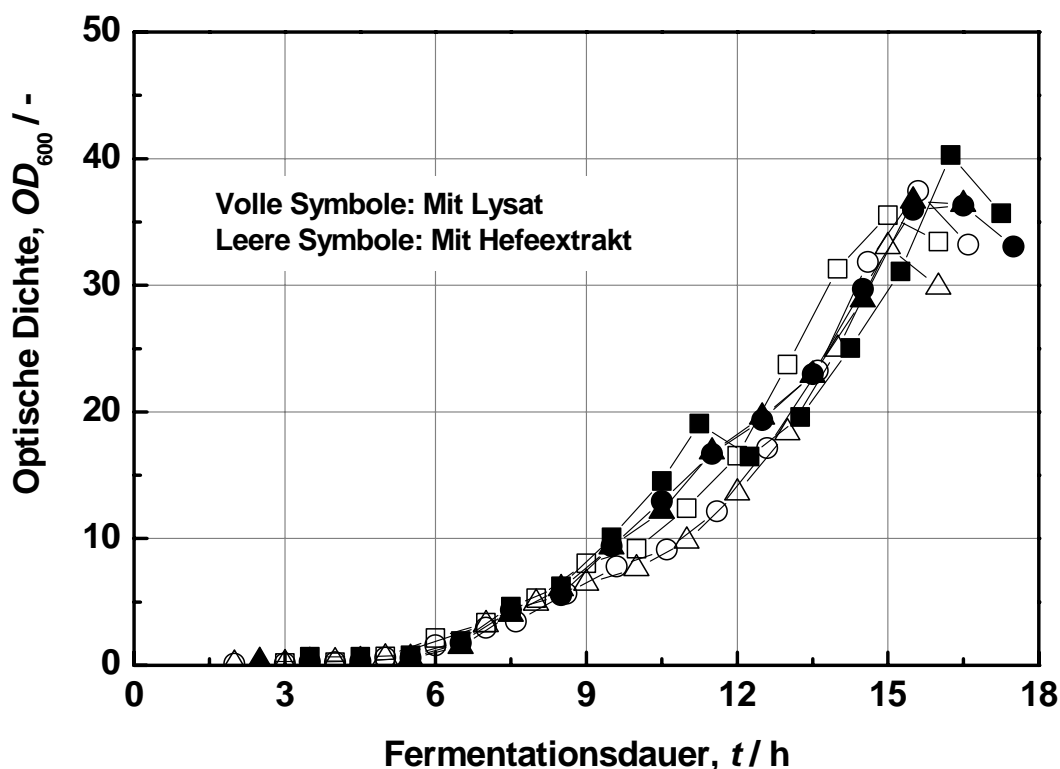


Abb. 4 Satzweise Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem ursprünglichen Medium und unter Ersatz des Hefeextrakts durch *E. coli*-Lysat. Die Profile sind adaptionsphasenkorrigiert aufgetragen worden.

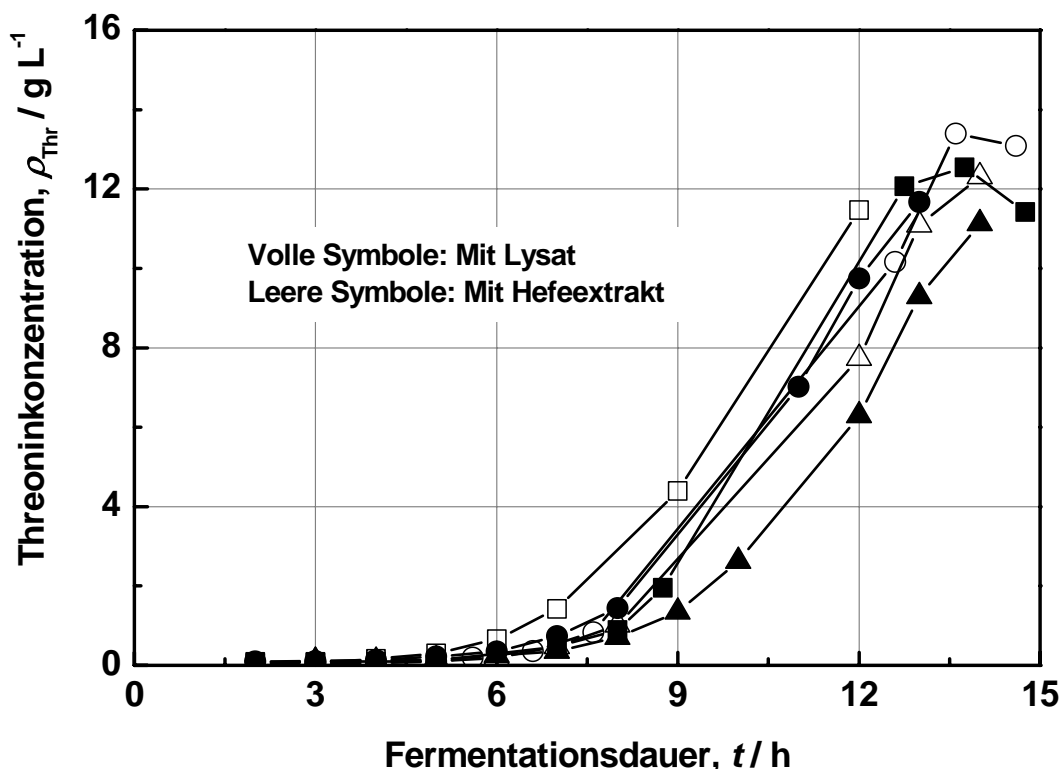


Abb. 5 Satzweise Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem ursprünglichen Medium und unter Ersatz des Hefeextrakts durch *E. coli*-Lysat. Die Profile sind adaptionsphasenkorrigiert aufgetragen worden.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Hefeextrakt ohne Nachteil durch *E. coli*-Lysat aus demselben Prozess ersetzt werden kann.

Ziel weiterer Untersuchungen war die zyklische Rückführung der bakteriellen Biomasse in den Prozess. Hierzu wurde mit einer Fermentation auf dem ursprünglichen Medium begonnen (Zyklus 0). Die aus dieser Fermentation gewonnene Biomasse wurde der Lyse zugeführt und der gesamte durch die Lyse in Lösung gebrachte Anteil als Ersatz für den Hefeextrakt im nächsten Fermentationsschritt eingesetzt. Die in das Medium eingebrachte Kohlenstoff- und Stickstoffmasse wurde dadurch im Vergleich zum ursprünglichen Medium mit Hefeextrakt erhöht

Abbildung 6 fasst die wichtigsten Ergebnisse der vier zyklischen Rückführungen zusammen. Durch das erhöhte Angebot an Kohlenstoff- und Stickstoffquelle nahm die Zelldichte mit steigender Zyklusanzahl zu. Wie **Abb. 6** erkennen lässt, erhöhte sich das Zellwachstum bereits im ersten Zyklus und trat im vierten Zyklus am deutlichsten hervor. Jedoch konnte die erhöhte Biomassebildung nicht in eine erhöhte Produktkonzentration umgesetzt werden. Die Threoninkonzentration blieb auf einem Niveau von ca. 12 g L^{-1} konstant. Dies führte zwar durch die unveränderten Kultivierungszeiten und Threoninkonzentrationen zu gleichbleibenden Produktivitäten, jedoch erhöhte sich der Biomasseanfall deutlich.

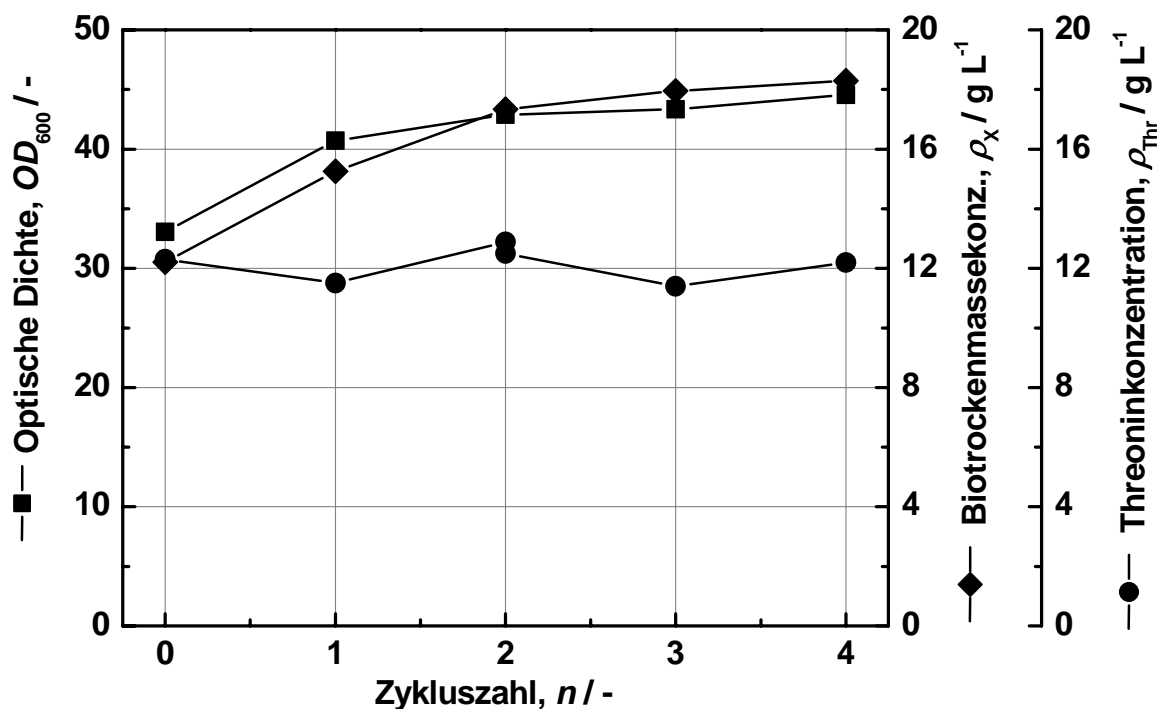


Abb. 6 Leistung des Prozesses zur Threoningewinnung beim Versuch zur zyklischen Rückführung der Biomasse von *Escherichia coli*. Der Zyklus 0 wurde ohne Lysat auf ursprünglichem Medium durchgeführt.

Schlussbetrachtung

Durch die Arbeiten an den drei Beispielsystemen konnte die Möglichkeit einer alternativen Verwendung bakterieller Biomasse erfolgreich gezeigt werden. Es konnte dargestellt werden, dass durch einfache im großen Maßstab durchführbare Verfahren Lysate hergestellt werden können, die sich als Ersatz für konventionelle Substrate ohne schädliche Auswirkungen auf wichtige Prozessgrößen eignen. Auch die praktische Umsetzung der Rückführung bakterieller Biomasse in den ursprünglichen Fermentationsprozess konnte mit Hilfe dieser Arbeit belegt werden. Der Verzicht auf konventionelle Extrakte führte zu einer Senkung des Rohstoffbedarfs und zu einer Reduzierung der bakteriellen Abfallmenge. Für eine ökonomische Beurteilung der Verfahren sowie die Übertragung der Ergebnisse auf andere Produktgruppen, bei denen durch die fermentative Gewinnung große Mengen an Biomasseabfall anfallen, sind die Grundlagen erarbeitet worden.

Literatur

- M. Blaesen, K. Friehs, E. Flaschel (2006) Produktintegrierter Umweltschutz am Beispiel der Rückführung bakterieller Biomasse. *Chem. Ing. Tech.*, **78** (3), 267-272
- M. Blaesen, E. Flaschel, K. Friehs (2006a) Sustainable Production: Recycling of bacterial biomass resulting from a fermentation process with *Klebsiella planticola*. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, **20** (3), 263-268
- V. G. DEBABOV; US 5 175 107, 1992
- V. G. DEBABOV; US 5 538 873, 1996
- K. Friehs, F. Schierl, E. Flaschel (1998) Aufbereitung bakterieller Biomasse zwecks Rückführung in Fermentationsprozesse. *Chem.-Ing.-Tech.* **70**, 435-437
- J.M. Risse, K. Friehs, E. Flaschel (2001) Recycling of Biomass Resulting from Fermentation Processes with *Bacillus licheniformis*. *Chem. Eng. Technol.* **24** (Eng. Life Sci. 1) 141-145