

Ökologisch produziertes Methionin aus Mikroorganismen

THOMAS WILLKE¹, TANJA HARTWICH¹, HAJO REERSHEMIUS², ILEANA JURCHESCU²,
SIEGMUND LANG² UND KLAUS VORLOP¹

¹Institut für Agrartechnologie und Biosystemtechnik, Johann Heinrich von Thünen Institut
(vTI), Bundesallee 50, 38116 Braunschweig, Deutschland
thomas.willke@vti.bund.de

²Institut für Biochemie und Biotechnologie, Technische Universität Braunschweig
Spielmannstraße 7, 38106 Braunschweig
s.lang@tu-bs.de

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die bakterielle Methionin-Produktion untersucht werden. Eine umfassende Literaturrecherche zeigte, dass viele der bis dato publizierten Ergebnisse einer sorgfältigen Nachprüfung nicht standhalten. Ein Grund sind falsche Schwefel-Bilanzen in Nährmedien, die in der Vergangenheit zur Methionin-Überproduktion eingesetzt wurden. Zudem zeigen viele der früher verwendeten analytischen Methoden falsch-positive Ergebnisse und täuschen so zu hohe Methioningehalte vor. Die vorliegenden Forschungsergebnisse beruhen daher ausnahmslos auf einer zuverlässigen robusten Analytik: Die Kombination eines sehr empfindlichen mikrobiologischen Tests im Mikrotiterplatten-Maßstab mit einer sehr selektiven und präzisen GC-Analytik legte den Grundstein für ein robotertaugliches Screening-Konzept, das im Hochdurchsatz dazu verwendet werden kann, Aminosäure-Überproduzenten zu finden und zu optimieren. Auch, wenn innerhalb dieser Arbeit kein neuer Mikroorganismus gefunden wurde, der Methionin in signifikanten Mengen ausscheidet, konnte gezeigt werden, dass die beschriebene Methodik prinzipiell geeignet ist,

Aminosäureproduzenten inkl. Methionin zu erzeugen und aufzuspüren.

Am Beispiel eines bereits vorhandenen Methionin-Überproduzenten wurde die Methodik evaluiert und die anschließende Mediums- und Fermentationsoptimierung durchgeführt. Die Methionin-Produktion dieses Stammes konnte von anfänglich 50 mg/L auf nahezu 1,5 g/L gesteigert werden. Bezogen auf die bakterielle Trockenmasse (15 g/L) ist das ein Gehalt von 10 %. Für Lysin und Threonin ergeben sich Gehalte von 4,7 bzw. 3,4 %. Nach dem Trocknen der Biomasse erhält man einen proteinreichen Futterzusatz, der zudem mit drei der für die Tierernährung wichtigsten Aminosäuren angereichert ist.

Einleitung

Methionin ist eine von 20 Aminosäuren und mit bis zu 3 % Bestandteil von Proteinen. Methionin ist für Mensch und Tier essentiell und muss daher über die Nahrung aufgenommen werden. Im Bereich der Tiermast reichen die natürlich vorkommenden Methioninquellen, hauptsächlich pflanzliche Proteine wie Raps, Soja, Kartoffel, Getreide u. ä. allein nicht aus. Es werden Futterzusätze benötigt, die alle notwendigen Nährstoffe, insbesondere

Aminosäuren in ausgewogener Form enthalten. Es genügt nicht, ein proteinreiches Zusatzfutter zu geben, da mit dem dann ausreichenden Methionin andere stickstoffhaltige Nährstoffe überdosiert würden. Dies verursacht zusätzliche Kosten und Umweltprobleme durch den wieder ausgeschiedenen Stickstoff. In der konventionellen Landwirtschaft hat sich daher ein riesiger Markt für speziell auf den Bedarf abgestimmte Futtermittel entwickelt. Im Bereich der Aminosäuren ist die Evonik Industries AG mit ihrer in Frankreich und China agierenden Tochter Rexim® Weltmarktführer (www.rexim.fr). Sie produziert neben Methionin noch Lysin und Threonin, hauptsächlich zur Verwendung in der konventionellen Tiermast. Der Weltmarkt für Methionin liegt zurzeit bei ca. 400.000 Tonnen pro Jahr.

Die chemische Methioninsynthese erfolgt auf Basis von Erdöl, Erdgas und Luftstickstoff (Abbildung 1)

schen Landbau die Tierproduktion auf maximalen Ertrag ausgerichtet ist und nur so konkurrenzfähig bleiben kann, ist man auf die Zufütterung nicht synthetisch produzierten Methionins angewiesen. Aus diesem Grund wird eine alternative biotechnische Herstellung von L-Methionin auf rein ökologischer Basis angestrebt. Dies schließt insbesondere den Einsatz gentechnischer Methoden und die Verwendung chemisch-synthetisch hergestellter Nährmedien aus. Biotechnisch synthetisiertes Methionin würde vor allem dann den Forderungen des Ökolandbaus gerecht werden, wenn die gesamte Kulturbrühe einschließlich der Biomasse des Methioninproduzierenden Organismus ohne weitergehende kostenintensive Aufarbeitung verfüttert werden könnte und zudem noch andere limitierende Aminosäuren (z. B. Lysin oder Threonin) enthalten würde.

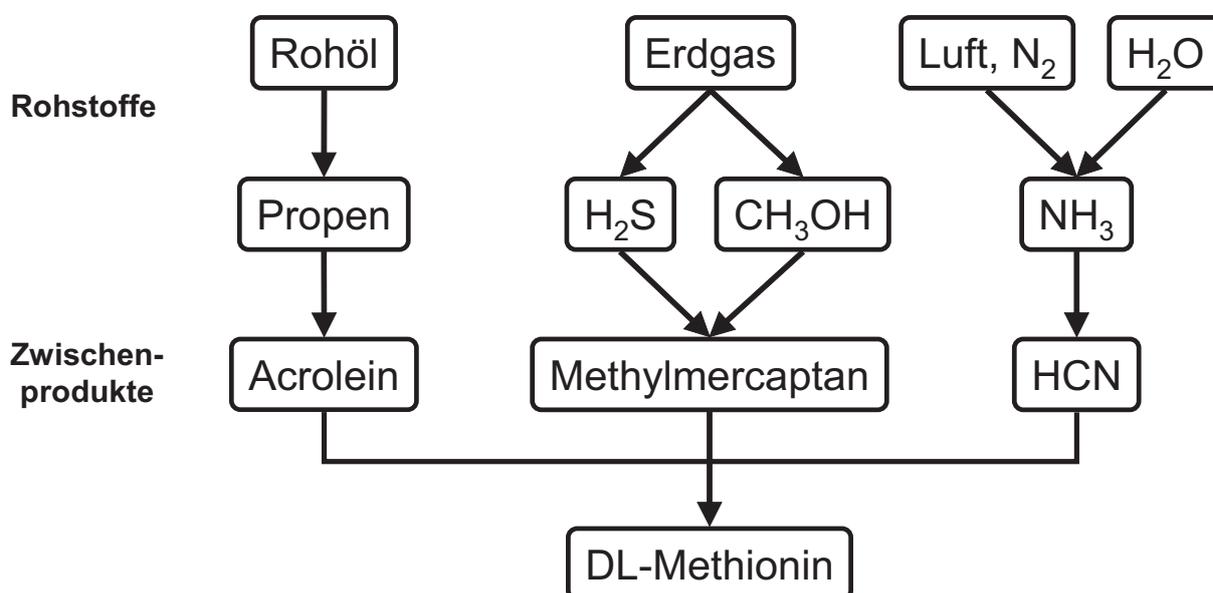


Abbildung 1: Schema der industriellen Methioninsynthese nach dem Degussa-Verfahren (nach Pack 2004)

Bei der Fleischproduktion im Ökolandbau besteht aufgrund von EG Verordnungen (EG 2007, EG 2008b, EG 2008a) ein bis 2012 stufenweise umzusetzendes Verbot der Zufütterung von synthetisch produzierten Aminosäuren. Da auch im ökologi-

Mikroorganismen können L-Methionin für ihren eigenen (Protein-)Bedarf synthetisieren. Da Methionin zu den energetisch aufwendigsten Aminosäuren des mikrobiellen Stoffwechsels zählt und die Methionin-Biosynthese hoch reguliert ist (Krömer et

al. 2006), wird der Mikroorganismus sein Methionin nicht „freiwillig“ überproduzieren und abgeben. Die gezielte Steigerung der Methionin-Produktion über den Eigenbedarf der Bakterien hinaus erfordert daher innovative Forschungsansätze und intensive wissenschaftliche Arbeit.

Forschungsarbeiten aus den 1990er Jahren berichten von biotechnisch produziertem Methionin in Konzentrationen von bis zu

(HPLC, GC, MS) deutlich geringere Methionin-Konzentrationen aufweisen als ältere Arbeiten mit spektroskopischen Nachweisverfahren. Die in dieser Tabelle mit aufgeführten gentechnischen Arbeiten liefern maximal 0,5 g/L. Eine Ausnahme bilden neuere Arbeiten aus der Arbeitsgruppe um Philippe Soucaille, Metabolic Explorer, Frankreich. Ein Patent berichtet von Methionin-Konzentrationen bis zu 169

Tabelle 1: S-Bilanzen einiger Medien in Publikationen zum Thema der mikrobiologischen Methioninproduktion

Quelle	S-Gehalt im Medium [g/L]	Methionin, theor. möglich [g/L]	Methionin, gemessen [g/L]	Analytik
Nakayama et al. 1971	4,8	> 20	3,4	Papierchromatographie (s. Kase et al. 1975)
Banik et al. 1974	0,2	0,9	3 ^a	Papierchromatographie
Mondal et al. 1994	0,02	0,1	25,5 ^a	Mikrobiologischer Test Colorimetrisch ^d
Mondal et al. 1996	0,02	0,1	5,5 ^a	Mikrobiologischer Test Papierchromatographie
Sharma 2001	2,3	> 10	0,5	Colorimetrisch ^c
Kumar et al. 2003	0,8	3,7	2,3	Colorimetrisch ^c
Deutenberg 2003 ^b	15,6	> 50	0,5	HPLC
Mampel et al. 2005 ^b	11,3	> 50	< 0,01	HPLC
Figge et al. 2007 ^b	>10	> 50	25	GC-MS
Nwachukwu et al. 2009	0,2	0,9	3,7 ^a	Colorimetrisch ^d

^a Werte aufgrund der S-Bilanzen der eingesetzten Produktionsmedien nicht möglich

^b Gentechnische Arbeiten

^c Nitroprussid-Test nach Greenstein et al. 1961

^d Ninhydrin-Test (unspezifisch) nach Work 1957

25 g/L. Aufbauend auf diese Arbeiten sollte es möglich sein, durch gezielte Verbesserungen einen ökologisch verträglichen und wirtschaftlichen Prozess zu entwickeln, der die Versorgungslücke an Methionin schließen könnte. Leider konnten die meisten der publizierten Ergebnisse einer sorgfältigen Überprüfung im Labor nicht standhalten. Methionin enthält über 20 % Schwefel, d. h. zur Synthese von beispielsweise 1 Gramm Methionin muss das Produktionsmedium mindestens 200 mg Schwefel enthalten, was in vielen Fällen nicht der Fall war. Weiter fällt auf, dass neuere Arbeiten mit verbesserter Analytik

mM (25 g/L). Allerdings handelt es sich hier um gentechnisch veränderte Organismen auf hochkomplexen Produktionsmedien mit speziellen Zusätzen (Figge et al. 2007). Zurzeit arbeitet man dort an der Reduktion dieser teureren Zusätze.

Experimentelle Fehler und unzureichende analytische Methoden führten also vor allem in älteren Arbeiten zu falschen und daher wertlosen Ergebnissen. Die Arbeiten mussten vollständig neu überdacht und revidiert werden. Aufgrund der revidierten Literatur sollten aber Konzentrationen bis etwa 3 g/L Methionin möglich sein.

Wichtigste Voraussetzung für eine erfolgreiche Bearbeitung des Themas war daher die Entwicklung einer schnellen, empfindlichen und äußerst zuverlässigen Aminosäure-Analytik speziell für Methionin. Des Weiteren musste eine Methode entwickelt werden, die die Chance für das Auffinden eines Methionin-Überproduzenten innerhalb einer Vielzahl von potenziellen Stämmen stark erhöht. Die Methode sollte bei geringem Kosten- und Zeitaufwand eine hocheffiziente Suche nach Methioninproduzenten (Screening) innerhalb einer mikrobiellen Population ermöglichen mit der Option, den kompletten Ablauf automatisieren zu können (Hochdurchsatz-Screening). Die schnelle qualitative Vorauswahl sollte von einer zuverlässigen abschließenden quantitativen Analytik gestützt werden.

Der wissenschaftliche Ansatz der vorliegenden Arbeit besteht darin, die natürliche Vielfalt durch zufällige Mutationen durch Bestrahlung mit UV-Licht (Triebkraft der Evolution) stark zu erhöhen und aus der Vielzahl der erzeugten Kandidaten (Mutation) diejenigen herauszufiltern (Selektion), die sich durch eine erhöhte Methioninkonzentration auszeichnen (Hartwich 2008). Der nächste Mutation/Selektions-Durchlauf erfolgt dann mit genau diesen Kandidaten. Diejenigen Bakterienstämme, die eine signifikant erhöhte Methioninproduktion zeigen, werden genauer charakterisiert und zur Optimierung der biotechnischen Produktion im Laborfermenter eingesetzt (Reershemius 2008).

Material und Methoden

Mikroorganismen

Es wurden verschiedene terrestrische und marine Mikroorganismen, die laut Literatur eine Befähigung dazu besitzen könnten, auf die Produktion von L-Methionin untersucht. Als Grundlage für die Mutations- und Selektionsversuche wurde *Corynebacterium glutamicum* DSM 20300 verwendet (Abbildung 2). Die Prozessoptimierung erfolgte mit *Corynebacterium glutamicum*

KY10574, Kyawo Hakko, Japan). Für den mikrobiologischen Test wurde *Escherichia coli* B834 (Merck Biosciences, Beeston/Nottingham) verwendet.

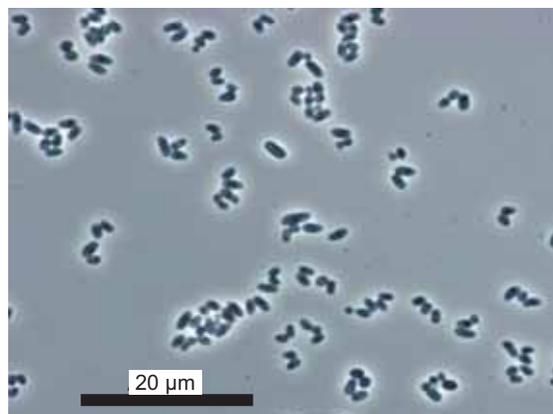


Abbildung 2: Lichtmikroskopische Aufnahme von *C. glutamicum* DSM 20300 im Phasenkontrast

Medien

Alle Angaben beziehen sich auf 1 Liter Endvolumen. Zur Stammhaltung der Methioninbildner und des Testorganismus (*E. coli*) für den mikrobiologischen Test (s. u.) wurde ein Komplexmedium folgender Zusammensetzung verwendet (g/L): Glucose, 5 g; Pepton aus Casein, tryptisch verdaut, 10 g; Hefeextrakt, 5 g und NaCl, 5 g. Für feste Nährböden wurde 15 g Agar zugesetzt.

Als Screening und Produktionsmedium für die *C. glutamicum*-Mutanten wurde ein definiertes Mineralsalzmedium (MM1) verwendet (g/L): Glucose, 22 g; KH_2PO_4 , 1 g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 30 mg; $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 13 mg; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 g; $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$, 10 g; d-Biotin, 1 mg.

Das für den mikrobiologischen Test und den Produktionsstamm optimierte Medium (MM2) hatte folgende Zusammensetzung: Glucose, 22 g; KH_2PO_4 , 3 g; Na_2HPO_4 , 6 g; NaCl, 0,5 g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 30 mg; $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 13 mg; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 g; $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$, 10 g; Harnstoff, 5 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 20 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5 mg; $\text{MgSO}_4 \cdot 7$

H₂O, 250 mg; d-Biotin, 1 mg; Thiamin-HCl, 200 µg; Cyanocobalamin, 200 µg; 3,4-dihydroxybenzoesäure, 15 mg; Ni-SO₄·6 H₂O, 22 µg; Na₂MoO₄·2H₂O, 145 µg; Na₂B₄O₇·10 H₂O, 200 µg, Cu-SO₄·5 H₂O, 540 µg; ZnSO₄·7 H₂O, 1,6 mg; FeCl₃·6 H₂O, 1,74 mg.

Schüttelkulturen

Alle Kultivierungen erfolgten mit 20 mL Medium in 100 mL Schüttelkolben (2 Schikanen) bei 30-32 °C und 150-180 upm und einer Auslenkung von 25 mm im Infors-Schüttler HT Minitron (Infors, Einsbach). Um eine Sauerstofflimitierung zu vermeiden, wurden die Kolben mit nicht mehr als 20 % Medium befüllt.

Mikrotiterplatten (96-Well-Platten)

Jede 96-Well-Platte ist in 8 Reihen (A-H) und 12 Spalten (1-12) mit insgesamt 96 Reaktionsräumen (wells) unterteilt, die ein maximales Fassungsvermögen von je 0,38 mL haben. Die 96-Well-Platten werden in einem temperierbaren 2- oder 4-Platten-Schüttelinkkubator PST-60 HL ThermoShaker (Kisker, Steinfurt) bei 1100 upm inkubiert. Die Trübungsmessungen erfolgten im Plattenreader (Easy Reader EAR 400 AT; SLT-Labinstrumente/Tecan) bei 550 nm, entweder unverdünnt (mikrobiologischer Test) oder nach Verdünnung 1:20 (Wachstumskulturen).

Bioreaktor-Kultivierung

Die Bioreaktor-Kultivierung und die Optimierung der Produktionsbedingungen erfolgten im 5-L Glasreaktor (Minifors, Infors, Einsbach), gefüllt mit 3,5 L Medium. Der Bioreaktor war mit Temperatur-, pO₂-Messung und -Regelung sowie Abgasanalytik ausgestattet. Der pH-Wert wurde mittels Elektrode gemessen; Eine pH-Korrektur erfolgte nicht.

UV-Mutation

Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 3 gezeigt. Die UV-Mutation wurde mit Hilfe einer UV-Lampe UVC 30 (Kendro Labora-

tory Products, Langenselbold) durchgeführt. Zur Herstellung der zu bestrahlenden Kultur wurde 1 Impföse einer DSM 20300-Platte in 20 mL MM2-Medium inkubiert (16 h; 30 °C; 150 upm), nach Abzentrifugieren und Waschen erfolgte die Resuspendierung in 0,1 M MgSO₄-Lösung zu einer OD₆₀₀ von 6.



Abbildung 3: Experimenteller Aufbau der UV-Bestrahlung zur Erzeugung von Mutationen

Mikrobiologischer Test auf Methioninbildung

Zur schnellen und halbquantitativen Vorauswahl Methionin-produzierender Stämme wurde ein mikrobiologischer Test etabliert. Als Indikator für überproduziertes und ins Medium abgegebenes Methionin dient ein für Methionin auxotropher Mikroorganismus, der nur dann wachsen kann, wenn im Medium Methionin vorliegt. Bei dem hier verwendeten Testorganismus *E. coli* B834 besteht innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereiches eine Korrelation zwischen der Methionin-Konzentration im Medium und dem Grad des Wachstums (Messung über die optische Dichte). Nach Aufnahme einer Kalibrierkurve kann durch Messung der optischen Dichte (OD) indirekt der Methioningehalt des zugrundeliegenden Mediums ermittelt werden. Eine Platte (max. 96 Kulturen) konnte innerhalb von 15 Sekunden vermessen werden. Die Parameter wurden so gewählt, dass eine Methionin-Konzentration über 10 mg/L deutlich als positiv zu erkennen war. Bei

Bedarf lässt sich der Test leicht an höhere Methioningehalte anpassen.

Aminosäure-Analytik

Für die exakte Ermittlung der Aminosäurekonzentration, sowie die Messung des Aminosäurespektrums wurde eine gaschromatographische Methode nach Husek weiterentwickelt (Husek 1991, Reershemius 2008) und für die vorliegenden Anforderungen optimiert. Alle Reagenzien und Hilfsmittel sind kommerziell erhältlich (EZ:faast GC-FID-Kit, Phenomenex, Aschaffenburg). Die Ergebnisse des potenziellen Produktionsstammes wurden mit Hilfe der GC-MS (Institut für Organische Chemie, TU-Braunschweig) bestätigt.

Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 5 zeigt das komplette Ablaufschema des Screenings, so, wie er auch von einem Laborautomaten durchgeführt werden könnte. Für ein erfolgreiches Methioninscreening müssten weitaus mehr Kandidaten bearbeitet werden, als es der begrenzte Projektzeitraum zuließ. Innerhalb des Projektzeitraumes wurden mit Hilfe der beschriebenen Methode insgesamt ca. 20.000 Mutanten untersucht. Alle im mikrobiologischen Test positiven Kandidaten wurden zur Überprüfung ein weiteres Mal eingesetzt und erst bei wiederholtem Erfolg mittels Gaschromatographie überprüft und genauer charakterisiert.

Die gemessenen Methionin-Konzentrationen der erhaltenen Stämme lagen ausnahmslos

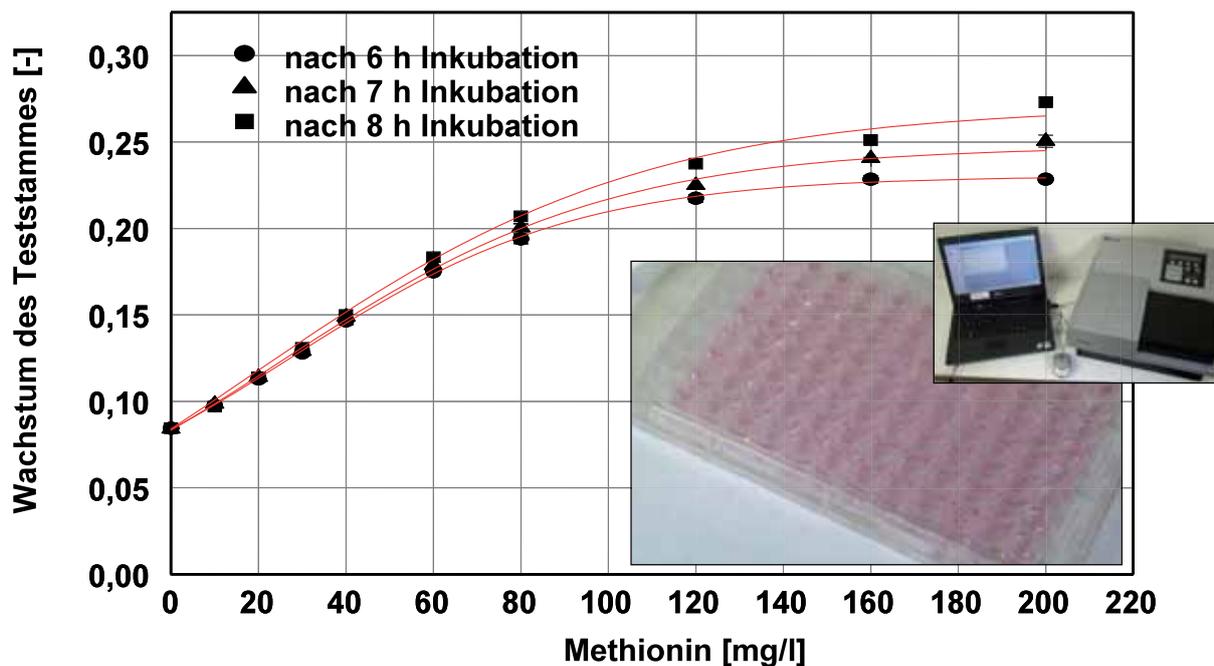


Abbildung 4: Kalibrationskurve des mikrobiologischen Methionin-Nachweises mit *E. coli* B834 im Mikrotiterplatten-Maßstab. Fotos: Mikrotiterplatte, Plattenreader mit automatischer Datenaufnahme und Verarbeitung

Biomasse und Proteinbestimmung

Das Wachstum im Schüttelkolben und Bioreaktor wurde indirekt durch OD-Messung bei 600 nm bestimmt. Die Kalibrierung der Wachstumskurve erfolgte durch Vergleich mit der Biotrockenmasse. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte spektroskopisch nach Bradford 1976.

im Bereich zwischen 1 und 5 mg/L und waren damit viel zu gering für eine wirtschaftliche Nutzung. Sie unterschieden sich nicht wesentlich vom ursprünglichen Wildtyp *C. glutamicum* DSM 20300. Um darüber hinaus Methionin zu produzieren, muss der Biosyntheseweg entsprechend dereguliert werden. Leider konnten innerhalb des Untersuchungszeitraumes keine

Methionin-Überproduzenten erzeugt werden. Trotzdem erwies sich diese Methode als grundsätzlich geeignet und erfolgversprechend, da zahlreiche Überproduzenten anderer Aminosäuren gefunden wurden. Mit Hilfe der beschriebenen Kombination aus Screening und Analytik konnten verschiedene Aminosäurespektren erzeugt werden. Allerdings zeigten sich die stärksten Änderungen gegenüber den natürlichen (Wild-)Stämmen nicht, wie ge-

keit, positive Kandidaten zu finden, deutlich erhöhen. Es lässt sich berechnen, dass nur für das Auffinden nur einer positiven Veränderung im Stoffwechsel statistisch ca. 20.000 Stämme untersucht werden müssten. Im Falle der sehr komplexen Methioninsynthese erhöht sich diese Zahl noch, da mehrere positive Veränderungen gleichzeitig auftreten müssten.

Es zeigte sich, dass der Wildtyp bei einer Extinktion₅₅₀ von 8,0 ungefähr die gleichen

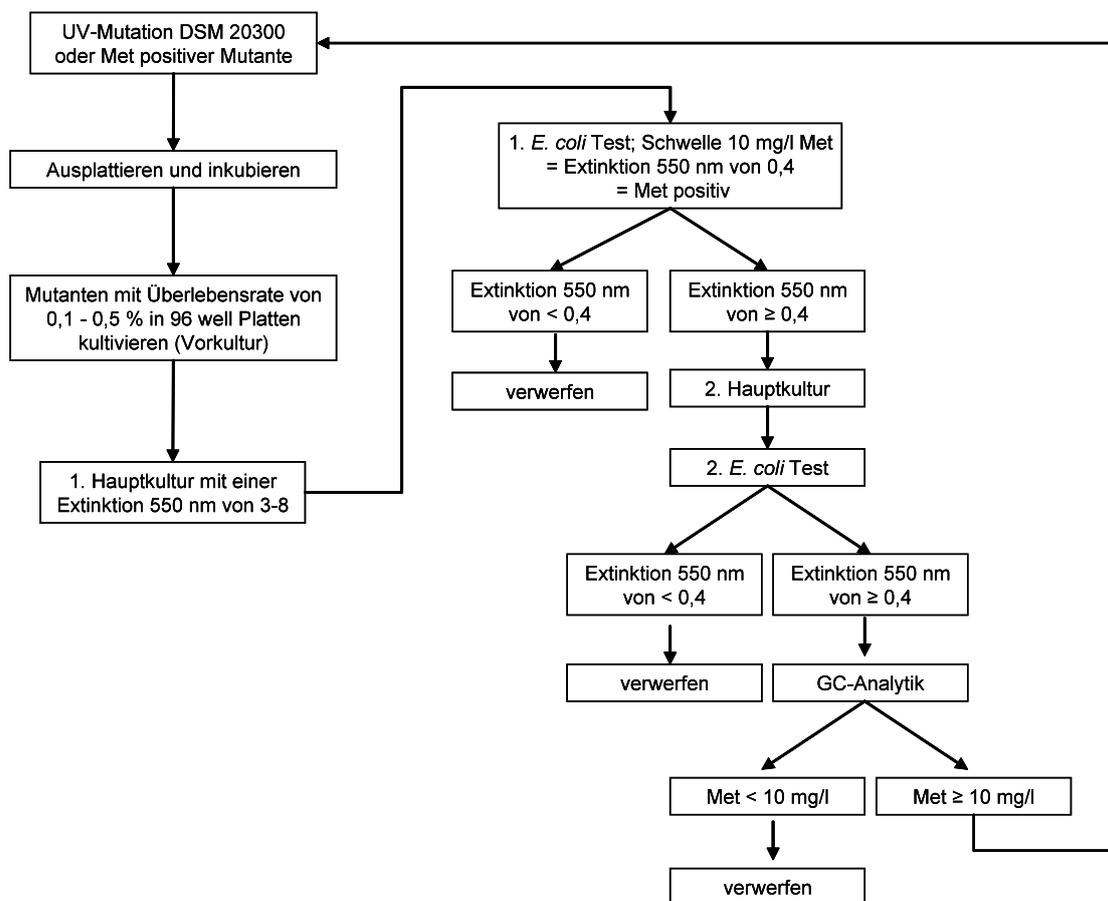


Abbildung 5: Ablauf des Screenings inklusive aller Schritte zur Analytik und Evaluation.

wünscht, beim Methionin sondern bei anderen Aminosäuren wie z. B. Lysin (Lys), Threonin (Thr), Alanin (Ala), oder Glycin (Gly) (s. u.)

Aufgrund des begrenzten Projektzeitraumes war es nicht möglich ausreichend viele Stämme im Screening zu untersuchen. Da das komplette Verfahren aber vollständig automatisierbar ist, könnte der Einsatz eines Laborroboters die Wahrscheinlich-

Aminosäurespektren zeigt wie die 50 vermessenen Mutanten bei einer Extinktion₅₅₀ 5,4-7,0. Es sind nicht alle Aminosäuren des Spektrums in der späten exponentiellen Phase vertreten, die Aminosäuren Alanin (Ala), Glycin (Gly) und Glutaminsäure (Glu) treten in den Vordergrund, während andere Aminosäuren gar nicht oder nur in vernachlässigbar kleinen Mengen gebildet und daher in den gezeigten Chromatogrammen nicht näher beschriftet wurden.

Die Signale für Alanin, Glycin und Glutaminsäure variieren in der Höhe. Bei einigen Mutanten ist kein Glutaminsäure-Peak vorhanden (Abbildung 6). Der Konzentrationen der Aminosäuren beim Wildtyp lagen unter 20 mg/L, sofern noch keine Zelllysis eingetreten war. (Daten nicht gezeigt).

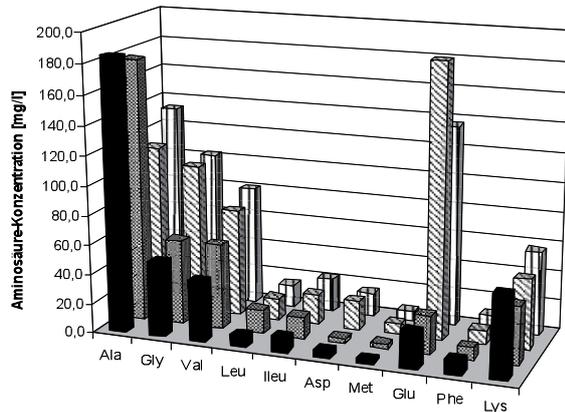


Abbildung 6: Aminosäurespektrum ausgewählter *C. glutamicum*-Mutanten

Methionin-Produktion mit *Corynebacterium glutamicum* KY10575

Um das vorgestellte Verfahren zu evaluieren und die Optimierung des eigentlichen Produktionsprozesses durchführen zu können, wurde auf einen existierenden Methionin-produzierenden Stamm der japanischen Firma Kyowa Hakko zurückgegriffen (Nakayama et al. 1971). Da der hinterlegte Patentstamm (ATCC 21608) trotz mehrfacher Versuche entgegen der Dokumentation kein Methionin bildete, wurde direkt von der hinterlegenden Firma ein vergleichbarer Stamm angefordert. Es handelt sich um eine anfangs der siebziger Jahre mit klassischen Mitteln erzeugte Mutante mit der Bezeichnung *Corynebacterium glutamicum* KY10574.

Der Stamm wurde zunächst nach Informationen der Firma Kyowa Hakko Kogyo Ltd. mit einer Kombination aus komplexer Vorkultur und Minimalhauptmedium kultiviert. Unter diesen Bedingungen wurde

zwar Methionin produziert (ca. 50 mg/L nach 72 h), allerdings wurden andere Aminosäuren in weitaus größerem Maße produziert (Abbildung 7). Man sieht deutlich, dass es während der Kultivierung signifikante Änderungen der Aminosäurezusammensetzung gibt. Die zuerst gebildete Aminosäure Lysin nimmt im Verlauf der Kultur zu Gunsten von Methionin ab. Auch Alanin zeigt ein ausgeprägtes Maximum. Die Abnahme korreliert mit der Bildung von Glycin. Die Zusammenhänge sind offensichtlich sehr komplex und der optimale Erntezeitpunkt ist wichtig, denn auch Methionin nimmt nach einem leichten Maximum wieder ab.

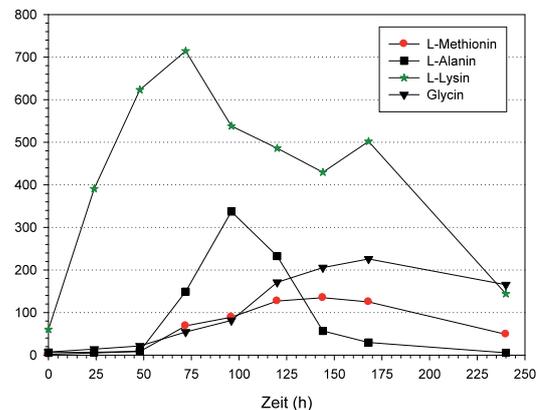


Abbildung 7: Aminosäurezusammensetzung im Verlauf einer Schüttelkolben-Kultivierung mit *C. glutamicum* KY10574 vor der Optimierung.

Die Methionin-Produktion selbst erfolgte mit leichter Verzögerung wachstumsgekoppelt, d. h. der endgültige Gehalt an Methionin korreliert mit der gebildeten Biomasse. Ein entsprechendes Aminosäuremuster nach 37 h ist in Abbildung 8 dargestellt.

Für die weitere Optimierung wurde ein preisgünstiges Minimalmedium konzipiert und optimiert, in dem der Organismus wachstumsfähig ist und möglichst hohe Methionin-Konzentrationen erreicht. In weiteren Versuchen im Schüttelkolbenmaßstab wurden die optimale Glucosekonzentration sowie die optimalen Parameter

für hohe Durchmischung und Sauerstoffversorgung im Schüttelkolben ermittelt. Es wurde in einem Beispiel gezeigt, wie eine Bioreaktorkultivierung mit möglichst hoher Methionin-Produktion aussehen muss und welche Parameter dabei eine besondere Rolle spielen und speziell eingestellt werden müssen. Die Produktion von L-Methionin konnte damit im Schüttelkolben auf Werte über 1,2 g/L (72 h) gesteigert werden.

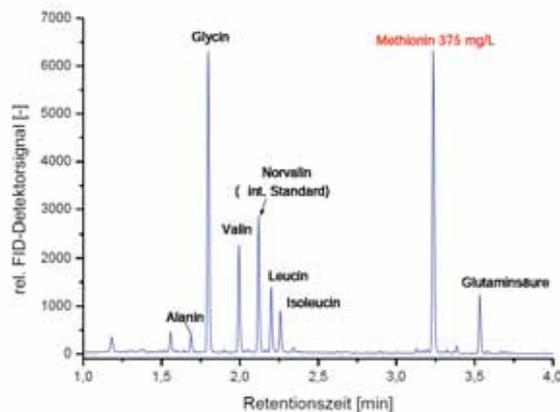


Abbildung 8: Produkt-Chromatogramm von *C. glutamicum* KY10574 im Schüttelkolben nach 37 h

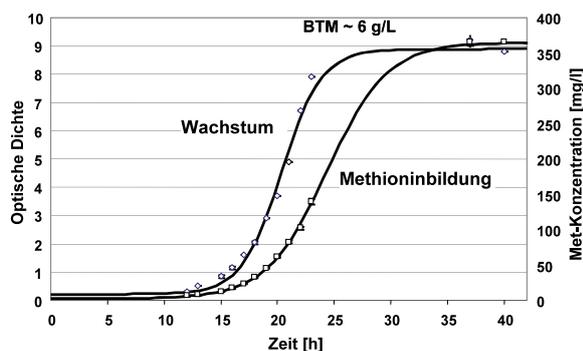


Abbildung 9: Wachstumskurve von *C. glutamicum* KY10574 im Schüttelkolben

Eine weitere Steigerung war durch Übertragung der Kultivierung in den Fermenter möglich. Die konstanten Betriebsbedingungen zusammen mit der besseren Sauerstoff- und Substratversorgung (Fed-Batch) führten zu einer maximalen Methioninkonzentration von nahezu 1,5 g/L nach weniger als 48 Stunden (Abbildung 10).

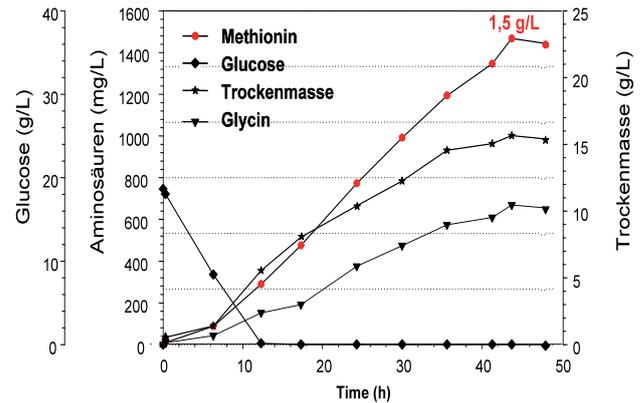


Abbildung 10: Kultivierungsverlauf im Bioreaktor mit dem potenziellen Produktionsstamm *C. glutamicum* KY10574.

Bezogen auf die im Bioreaktor befindliche Trockenmasse am Ende der Kultivierung (15 g/L) beträgt der Methioninanteil nahezu 10 %. Die Analyse der bakteriellen Trockenmasse nach Hydrolyse (LUFAs, Speyer) hat ergeben, dass zwei weitere ebenfalls für die Tierernährung wichtige Aminosäuren (Lysin und Threonin) stark erhöhte Gehalte aufweisen, obwohl diese im Medium kaum nachzuweisen waren. Anders als bei Methionin, das sich zu 90 % im Medium befand, waren Lysin und Threonin in der Biomasse gebunden. Es ist daher nicht nur aus wirtschaftlichen Gründen sinnvoll, die komplette protein- und aminosäurehaltige Kultivierungssuspension einschließlich der Biomasse zu verwenden und nicht die einzelnen Aminosäuren aufwändig und teuer abzutrennen, wie es bei pharmazeutisch oder kosmetisch verwendeten biotechnischen Produkten oder Produkten für die menschliche Ernährung der Fall wäre. Gelingt es, lediglich das überschüssige Wasser unter wirtschaftlichen Bedingungen z. B. durch Sprühtrocknung abzuziehen, hätte man ein Futterergänzungsmittel mit hohem Methioninanteil (10 %). Darüber hinaus wären mit Lysin (4,7%) und Threonin (3,4 %), weitere essenzielle und für die Tierernährung wichtige Aminosäuren enthalten.

Schlussfolgerungen

Die Kombination aus Hochdurchsatzscreening und Optimierung der Bioreaktor-Kultivierungen liefert eine Möglichkeit biotechnisch produziertes Methionin ökologisch herzustellen. Wenn auch aufgrund der begrenzten Projektlaufzeit kein neues Methionin-produzierendes Bakterium gefunden wurde, hat sich die Methodik als geeignet erwiesen und könnte in Kombination mit einem Laborroboter erfolgreich im Screening nach Aminosäure-Überproduzenten (inkl. Methionin) eingesetzt werden.

Die Modellfermentation eines Methionin-Überproduzenten lieferte eine mit Lysin und Threonin angereicherte Biomasse, während Methionin ins Medium ausgeschieden wurde. Die stark mit Methionin angereicherte Kultivierungssuspension könnte zusammen mit der Biomasse als Futterzusatz im biologischen Landbau Verwendung finden. Zusätzlich würden noch weitere limitierende Aminosäuren in einem ausgewogenen Verhältnis geliefert, deren Zusammensetzung ebenfalls optimierbar ist. Da die Konzentrationen der Aminosäuren mit der Biomassekonzentration im Bioreaktor korreliert, lässt sich die Ausbeute an Aminosäuren steigern, indem man die Biomassekonzentration - beispielsweise durch Hochzelldichte-Kultivierung - erhöht. Ob solch eine Maßnahme wirtschaftlich und konkurrenzfähig ist, muss im Einzelfall geklärt werden.

Danksagung

Wir bedanken uns bei der Fa. Kyowa Hakko, Japan für die freundliche Überlassung des Stammes *Corynebacterium glutamicum* KY10574.

Die Förderung der Arbeiten erfolgte aus Mitteln des Bundesprogrammes Ökologischer Landbau durch das BMELV über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE).

Abkürzungen

Ala	Alanin
Asp	Asparaginsäure
BTM	Biotrockenmasse
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
HPLC	Hochleistungsflüssig-Chromatographie
Ileu	Isoleucin
Leu	Leucin
Lys	Lysin
Met	Methionin
MS	Massenspektrometer
OD ₆₀₀	Optische Dichte (Trübung), gemessen bei 600 nm
Phe	Phenylalanin
UV	Ultraviolett
Val	Valin

Literatur

- Banik, A. K. und Majumdar, S. K. (1974): Studies on Methionine Fermentation .1. Selection of Mutants of *Micrococcus-Glutamicus* and Optimum Conditions for Methionine Production. *Indian Journal of Experimental Biology* 12 (4): 363-365
- Bradford, M. M. (1976): Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1-2): 248-254
- Deutenberg, D. (2003): Genetische Optimierung der Methioninproduktion in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. Diplomarbeit. Fakultät Biologie Universität Bielefeld. Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld.
- EG (2007): Verordnung (EG) Nr. 834/2007 des Rates über die ökologische/biologische Produktion und die Kennzeichnung von ökologischen/biologischen Erzeugnissen und zur Aufhebung der Verordnung

- (EWG) Nr. 2092/91. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:189:0001:0023:DE:PDF>
- EG (2008a): Verordnung (EG) Nr. 1254/2008 der Kommission vom 15. Dezember 2008. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:250:0001:0084:DE:PDF>
- EG (2008b): Verordnung (EG) Nr. 889/2008 der Kommission mit Durchführungsvorschriften zur Verordnung (EG) Nr. 834/2007 des Rates. <http://www.bmelv.de/SharedDocs/Rechtgrundlagen/O/Oeko-DurchfuehrungsVO.html>
- Figge, R., Lux, F., Raynaud, C., Chateau, M. und Soucaille, P. (2007): Process for the preparation of methionine and its precursors homoserine or succinylhomoserine employing a microorganism with enhanced sulfate permease expression. Patent: WO 2007/077041 A1 für Metabolic Explorer, Frankreich
- Greenstein, J. P. und Winitz, M. (1961): Methionine. In: Chemistry of the Amino Acid, Vol. 3, John Wiley & Sons. John WILEY & Sons. Chemistry of the Amino Acid. 2125-2155 New York.
- Hartwich, T. (2008): Untersuchungen zur biotechnischen Methionin-Produktion in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 - Entwicklung einer Screening-Strategie. Dissertation, TU Braunschweig.
- Husek, P. (1991): Rapid Derivatization and Gas-Chromatographic Determination of Amino-Acids. *Journal of Chromatography* 552 (1-2): 289-299
- Kase, H. und Nakayama, K. (1975): Fermentation production of L-methionine and regulation of L-methionine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. 3. L-Methionine production by methionine analog-resistant mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *Agricultural and Biological Chemistry* 39 (1): 153-160
- Krömer, J. O., Wittmann, C., Schroder, H. und Heinzle, E. (2006): Metabolic pathway analysis for rational design of L-methionine production by *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. *Metabolic Engineering* 8 (4): 353-369
- Kumar, D., Garg, S., Bisaria, V. S., Sreekrishnan, T. R. und Gomes, J. (2003): Production of methionine by a multi-analogue resistant mutant of *Corynebacterium lilium*. *Process Biochemistry* 38 (8): 1165-1171
- Mampel, J., Schroder, H., Haefner, S. und Sauer, U. (2005): Single-gene knockout of a novel regulatory element confers ethionine resistance and elevates methionine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68 (2): 228-236
- Mondal, S., Das, Y. B. und Chatterjee, S. P. (1994): L-Methionine Production by Double Auxotrophic Mutants of A Ethionine Resistant Strain of *Brevibacterium heali*. *Acta Biotechnologica* 14 (1): 61-66
- Mondal, S., Das, Y. B. und Chatterjee, S. P. (1996): Methionine production by microorganisms. *Folia Microbiologica* 41 (6): 465-472
- Nakayama, Kiyoshi, Sagamihara, Kanagawa, Arai, Kazumi und Machida (1971): Patent: Verfahren zur Herstellung von L-Methionin auf mikrobiologischem Wege. Patent: DT 2105189 für Kyowa Hakkō, Japan
- Nwachukwu, R. E. S. und Ekwealor, I. A. (2009): Methionine-producing *Streptomyces* species isolated from Southern Nigeria soil. *African Journal of Microbiology Research* 3 (9): 478-481
- Pack, M. (2004): Aminosäuren in der Tierernährung. *Elements: Degussa Science - Newsletter* 30-33
- Reershemius, H. K. (2008): Production of L-Methionine with *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, TU-Braunschweig.
- Sharma, S. (2001): Strain improvement and reactor studies for the production of L-Methionine by *Corynebacterium lilium*. Dissertation. Indian Institute of Technology, Delhi (India). Dissertation, Indian Institute of Technology, Delhi (India).
- Work, E. (1957): Reaction of Ninhydrin in Acid Solution with Straight-Chain Amino Acids Containing 2 Amino Groups and Its Application to the Estimation of Alpha-Epsilon-Diaminopimelic Acid. *Biochemical Journal* 67 416-423

