

Mikrobielle Produktionssysteme

Pilze: vom „Vitamin“-Überproduzenten zum robusten Alleskönner

SUSANNE NIELAND¹, ARIEF I. ZAMANI², C. LEONG NG², K.-PETER STAHMANN¹

¹ FACHGEBIET TECHNISCHE MIKROBIOLOGIE, BTU COTTBUS-SENFTENBERG

² INSTITUTE OF SYSTEMS BIOLOGY, UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA, BANGI

***Ashbya gossypii*, a fungus overproducing riboflavin, is applied for > 1000 t/a for two decades. Disadvantages of the overproducer are its need of complex nutrients and a weak pH tolerance. An omnipotent anabolism was shown for *Phialemonium curvatum* isolated from compost by screening for plant oil degradation on mineral salts medium at pH 3. It can be cultivated in plastic vessels > 100 L with minimal sterile technique. Its potential to convert crude palm oil into organic acids is discussed.**

DOI: 10.1007/s12268-021-1567-7

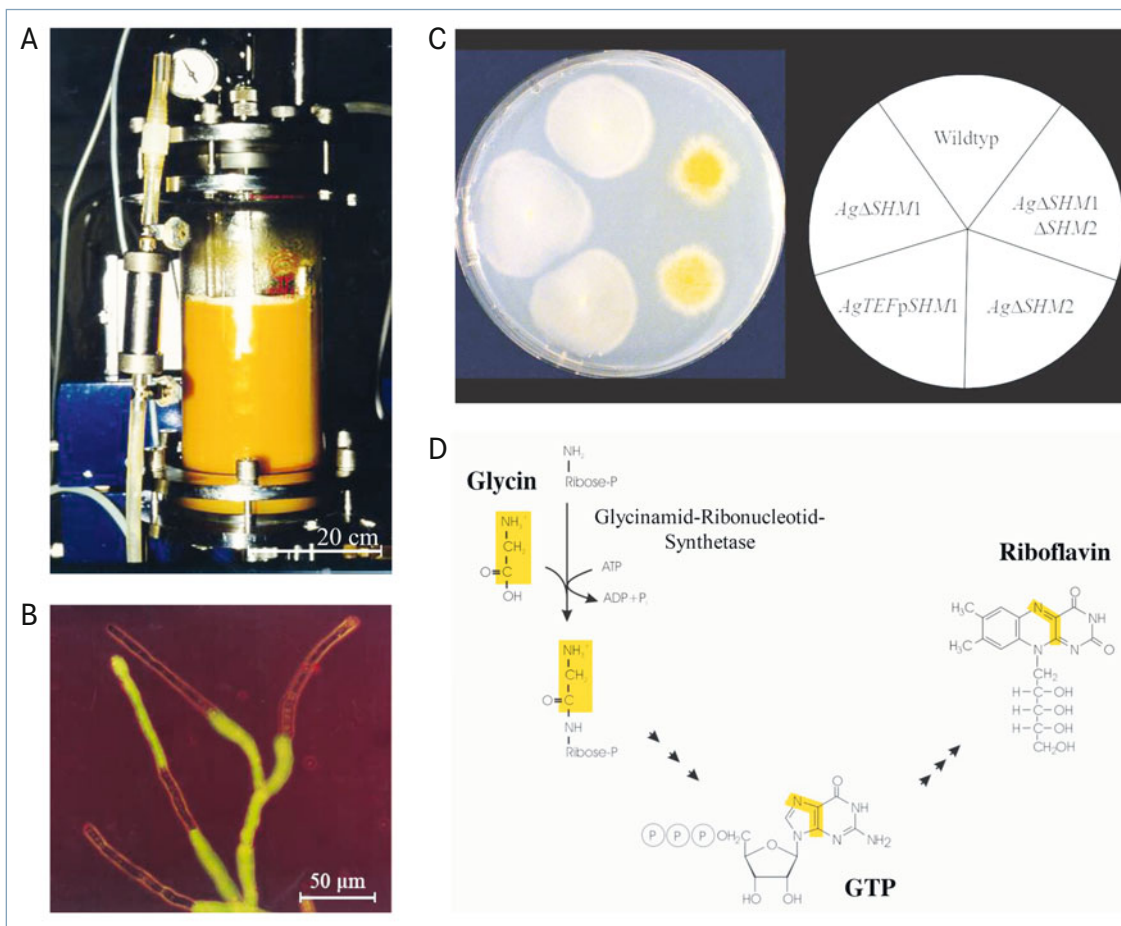
© Die Autoren 2021

■ Nach 50 Jahren Anlauf gelang Ende des letzten Jahrhunderts die Ablösung der siebenstufigen chemischen Synthese von Riboflavin durch mikrobielle Verfahren auf Basis pflanzlicher Rohstoffe [1]. Interessanterweise sind zwei Verfahren wirtschaftlich

erfolgreich, eines mit dem filamentösen Pilz *Ashbya gossypii* und ein weiteres mit dem Gram-positiven Bakterium *Bacillus subtilis*. Beide Verfahren haben den Vorteil, einstufig zu sein. Ansonsten sind die Unterschiede so vielfältig, dass bisher keine Vorhersage möglich ist, welches Verfahren sich ökonomisch bzw. ökologisch durchsetzen wird [2, 3]. Die ehrgeizigere Stammentwicklung war die mit *B. subtilis*, denn hier gab es keine natürliche Überproduktion. Auch der molekulare Regulationsmechanismus war unbekannt. Zwar lassen sich in kurzer Zeit Antimetabolit-resistente gelbe Klone gewinnen, die kommerziell relevanten Stämme tragen jedoch > 100 Mutationen.

Der von Stammsammlungen erhältliche Wildtyp (WT) von *A. gossypii* produziert dagegen in einem einfachen Rührkessel (Abb. 1A) 100 Milligramm Riboflavin pro

flavin durch mikrobielle Verfahren auf Basis pflanzlicher Rohstoffe [1]. Interessanterweise sind zwei Verfahren wirtschaftlich



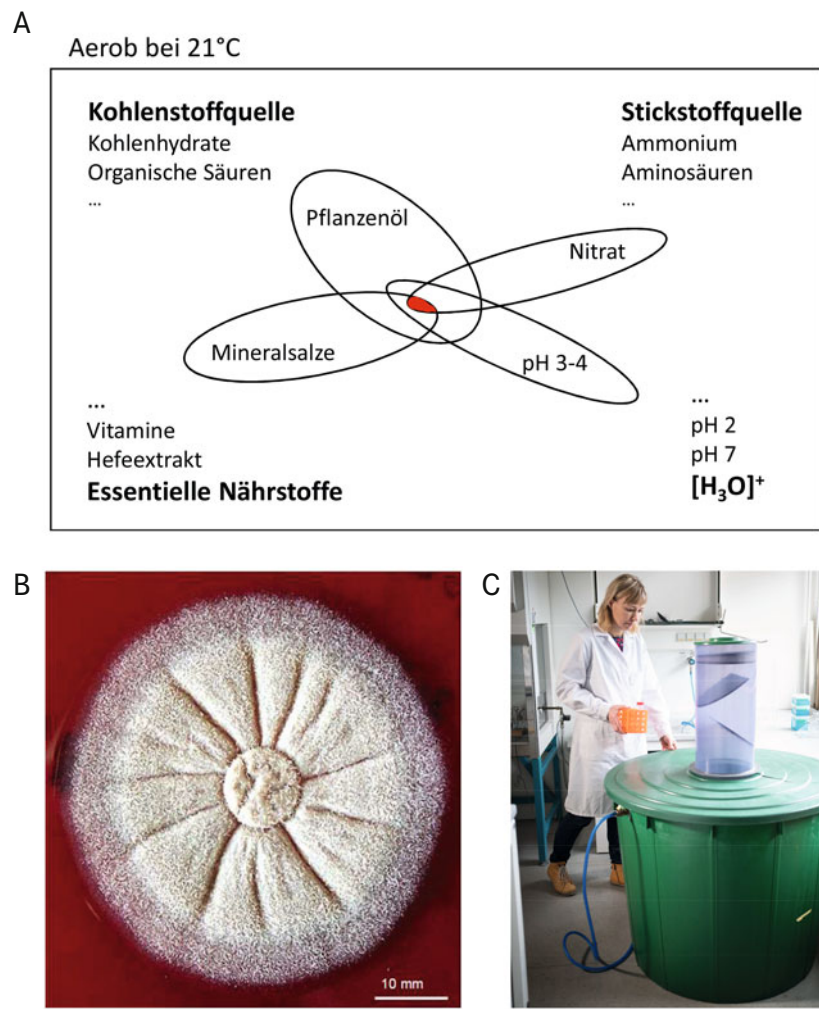
◀ **Abb. 1:** Riboflavin-Produktion in *Ashbya gossypii* **A**, *A. gossypii* produziert im 4-Liter-Rührkessel das gelbe Riboflavin. **B**, Ein Teil der Hyphenzellen akkumuliert dieses grün fluoreszierende Produkt (aus [4]). **C**, Die Deletion von *SHM2* verbessert die Produktbildung, d. h. die Kolonie ist intensiver gelb gefärbt. **D**, Die erhöhte Produktion ist durch die Vorstufenfunktion des Glycins erklärbar. Dieses wird durch die Serinhydroxymethyltransferase (*SHM2*) in Serin umgewandelt. Durch die Deletion des *SHM2*-Gens steht mehr Glycin zur Verfügung. Von diesem werden beide C-Atome und der Stickstoff ins Riboflavin eingebaut.

Gramm Trockenbiomasse. Etwa die Hälfte der Hyphenzellen bildet und akkumuliert das gelbe Pigment, was sich mit grüner Fluoreszenz zeigt (**Abb. 1B**). In diesen Zellen findet man eine gesteigerte Expression der *RIB*-Gene, wie nach Umwandlung der Hyphen in Protoplasten und Trennung im Cellsorter erkennbar wird [4]. Die andere Hälfte bildet z. B. Sporen. Deswegen wird vermutet, dass Riboflavin beim Pilz eine Bedeutung für die Sporen hat. Die hyalinen Sporen überleben UV-Licht nur wenige Sekunden. Es konnte gezeigt werden, dass Riboflavin als Schutzpigment wirkt [5]. Die gentechnische Stammverbesserung bei *A. gossypii* ist erfolgreich. Ein überraschendes, aber vollständig aufgeklärtes Beispiel ist die Deletion des Gens für die cytosolische Serinhydroxymethyltransferase. Δ *SHM2*-Mutanten wachsen langsamer, bilden aber mehr Riboflavin (**Abb. 1C**). Das liegt daran, dass weniger Glycin in Serin umgewandelt wird, wodurch mehr für die Biosynthese von GTP, der Vorstufe von Riboflavin (**Abb. 1D**), übrigbleibt. Supplementiert man die Kultur mit Adenin (1 mM), wird das WT-Wachstum wieder hergestellt, weil dieses den C1-Stoffwechsel entlastet [6].

Ein Vorteil beim Produktionsverfahren mit *A. gossypii* ist die Nutzung von Triglyceriden. Es können große Mengen in den Rührkessel gegeben werden, ohne Osmostress zu erzeugen. Die vom Pilz gebildete Lipase setzt – wegen einer kurzen Halblebensdauer und stringenter Regulation [7] – nur häppchenweise Fettsäuren frei, sodass keine unerwünschte Entkopplung der Atmungskette erfolgt.

Palmöl: Selektivitätsförderndes Substrat – zertifizierter Anteil wächst langsam

Die Nutzung pflanzlicher Triglyceride als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle beschränkt die kultivierbaren Pilze auf Lipaseproduzenten (**Abb. 2A**). Senkt man den pH-Wert auf drei und setzt nur Salze als weitere Substrate ein, entstehen Selektivbedingungen. Die Verwendung von Nitrat anstatt Ammoniak als Stickstoffquelle erhöht die Selektivität [8]. Im Genom von *A. gossypii* findet man kein putatives Gen für eine Nitratreduktase, was eine Erklärung dafür ist, warum er auf diesem Medium nicht wächst (**Abb. 3A**). Das Kompostisolat *Phialemonium curvatum* dagegen (**Abb. 2B**) generiert aus Nitrat so viel Ammoniak, dass mit Mineralsäure titriert werden muss, um den pH-Wert



▲ **Abb. 2:** Die Kultivierung von *Phialemonium curvatum* **A**, *P. curvatum* wächst unter Selektivbedingungen (rote Fläche). **B**, Der filamentöse Pilz bildet auf der Agarplatte ein strukturiertes Luftmyzel. **C**, In einem 500-Liter-Plastikbehälter ist eine Kultivierung mit minimaler Steriltechnik möglich.

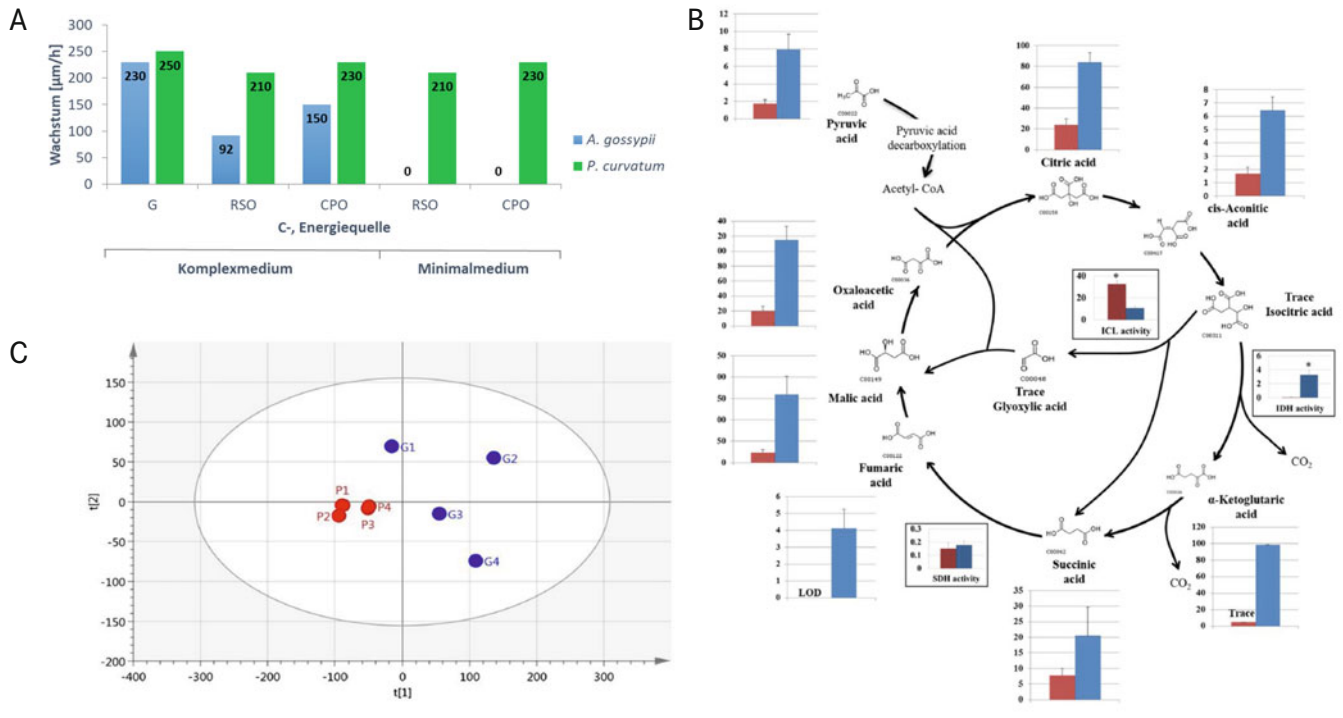
unter fünf zu halten. Steigt der pH-Wert an, kommt es zu bakteriellen Kontaminationen, welche die Pilzkultur überwachsen. Als Kohlenstoff- und Energiequelle eignet sich z. B. Rapsöl (R). Interessanter ist das seit Jahren in der Kritik stehende Palmöl (P), denn Flächenbedarf (R: 1,2 ha/t; P: 0,26 ha/t), Verbrauch an Dünger (R: 99 kg/t; P: 47 kg/t) und Pestiziden (R: 11 kg/t; P: 2 kg/t) sind geringer. Malaysia ist der zweitgrößte Hersteller von Palmöl [8]. Um die weitere Abholzung von Regenwald zu stoppen, hat die Regierung 2019 vier politische Ziele formuliert, z. B. die Begrenzung der Palmölplantzung auf 6,5 Millionen Hektar [9]. Weltweit werden nur etwa 20 Prozent der Gesamtproduktion den über 40 Kriterien der Nachhaltigkeit gerecht. Um die Erhöhung dieses Anteils bemüht sich z. B. der „Roundtable on sustainable Palm Oil“. In Deutschland hat die freiwillige Selbstverpflichtung im Rahmen des Forums Nachhaltiges Palmöl e.V. im Jahr 2020 eine Zertifizierungsquote von 100 Prozent erreicht. Die mikrobielle Umsetzung zu

langlebigeren und höherpreisigen Produkten – im Vergleich zu Biodiesel – könnte einen Weg aufzeigen, den Zertifizierungsanteil zu erhöhen.

Phialemonium curvatum in 100-Milliliter- und 100-Liter-Kultur

Der omnipotente Anabolismus von *P. curvatum*, kombiniert mit Selektivbedingungen (**Abb. 3A**), erlaubt eine monoseptische Kultur in nicht sterilen Plastikfässern [10]. Vergleicht man im 100-Liter-Maßstab die Investitionskosten (< 1 €/L) mit denen eines Stahlfermenters, lassen sich > 90 Prozent einsparen. Ein Indiz für die Robustheit des Systems ist, dass auch ungelernete Mitarbeiter mit 350-Liter-Kulturen (**Abb. 2C**) keine Kontaminationsprobleme haben [10].

Mögliche Produkte könnten polymerisierbare organische Säuren sein. Da bei Wachstum auf Fettsäuren die Isocitrat-Lyase essenziell ist, bieten sich Glyoxylat und Succinat als bifunktionelle Moleküle an. Vergleicht man nun die spezifische Enzymaktivität mit



▲ Abb. 3: *Phialemonium curvatum* und *Ashbya gossypii* im Vergleich **A**, Kolonien von *P. curvatum* wachsen auf Minimalmedium (MSM), die von *A. gossypii* nicht. Auch auf Komplexmedium ist sowohl bei Glucose (G) als auch bei Rapsöl (RSO) oder Palmöl (CPO) die anabolische Überlegenheit erkennbar. **B**, Der Vergleich von spezifischen Enzymaktivitäten und neun organischen Säuren liefert deutliche Unterschiede, wenn man auf Minimalmedium Palmöl (rot) mit Glucose (blau) als Substrat vergleicht (aus [11]). ICL: Isocitrat-Lyase; IDH: NAD-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase; SDH: Succinat-Dehydrogenase. **C**, Diese Ergebnisse lassen sich durch eine Hauptkomponentenanalyse statistisch bewerten, z. B. visualisiert eine *score plot projection*, dass die Glucosemetabolite sich deutlich von den Palmölmetaboliten unterscheiden, aber auch weiter streuen (aus [11]). G: Glucose; P: Palmöl.

der bei Wachstum auf Glucose, findet man den erwarteten Anstieg (**Abb. 3C**). Erstaunlich ist, dass Glyoxylat schwer nachweisbar ist, aber die gut messbaren Metabolite sich in ihren Gehalten deutlich unterscheiden (**Abb. 3B**, [11]). Reizvoll wäre jetzt die Expression eines Gens für einen Metabolit-Carrier in der Cytoplasmamembran.

Da für *P. curvatum* noch keine gentechnischen Methoden bekannt sind, ergäbe sich hier eine Nische für Wissenschaft und Wirtschaft. Weiterführend wäre auch die Frage, welche weiteren Pilze sich zum Wachstum unter diesen Selektivbedingungen eignen, also einen omnipotenten Anabolismus haben.

Danksagung

Teile dieser Arbeit wurden vom BMBF im Rahmen von „Bioeconomy international-Microbial conversion of palm oil“ (031A275) und der Universiti Kebangsaan Malaysia im Rahmen des Economic Transformation Program (ETP-2013-064) unterstützt. Wir danken Prof. Dr. Y. Gräser (Berlin) für die molekulare Identifizierung der Pilzisolat. ■

Literatur

[1] Stahmann KP, Revuelta JL, Seulberger H (2000) Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 509–516

[2] Hohmann HP, Stahmann KP (2010) Biotechnology of riboflavin production. In: Mander L, Liu HW (Hrsg.) *Comprehensive natural products II. Chemistry and biology*. Elsevier, Oxford, 7: 115–139

[3] Stahmann KP, Hohmann HP (2020) Vitamins, nucleotides, and carotenoids. In: Wilson DB, Sahn H, Koffas M (Hrsg.) *Industrial microbiology*. Wiley-Verlag, Weinheim, 161–183

[4] Nieland S, Stahmann KP (2013) A developmental stage of hyphal cells shows riboflavin overproduction instead of sporulation in *Ashbya gossypii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 10143–10153

[5] Stahmann KP, Arst HN, Althöfer H et al. (2001) Riboflavin, overproduced during sporulation of *Ashbya gossypii*, protects its hyaline spores against ultraviolet light. *Environ Microbiol* 3: 545–550

[6] Schlüpen C, Santos MA, Weber U et al. (2003) Disruption of the SHM2 gene, encoding one of two serine hydroxymethyltransferase isoenzymes, reduces the flux from glycine to serine in *Ashbya gossypii*. *Biochem J* 369: 263–273

[7] Stahmann KP, Böddecker T, Sahn H (1997) Regulation and properties of a fungal lipase showing interfacial inactivation by gas bubbles, or droplets of lipid or fatty acid. *FEBS J* 244: 220–225

[8] Malaysian Palm Oil Council (2020) Malaysian Palm Oil Industry. <http://mpoc.org.my/malaysian-palm-oil-industry/> (letzter Zugriff 07.04.2021)

[9] Bernama (2019) Government adopts policies to ensure sustainable oil palm cultivation. *New Straits Time*. <https://www.nst.com.my/news/nation/2019/09/523800/govt-adopts-policies-ensure-sustainable-oil-palm-cultivation> (letzter Zugriff 07.04.2021)

[10] Barig S, Alisch R, Nieland S et al. (2011) Monoseptic growth of fungal lipase producers under minimized sterile conditions: cultivation of *Phialemonium curvatum* in 350 L scale. *Eng Life Sci* 11: 387–394

[11] Zamani AI, Barig S, Ibrahim S et al. (2020) Comparative metabolomics of *Phialemonium curvatum* as an omnipotent fungus cultivated on crude palm oil versus glucose. *Microb Cell Fact* 19: 1–16

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. **Open Access:** Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Klaus-Peter Stahmann
 Institut für Biotechnologie
 BTU Cottbus-Senftenberg
 Universitätsplatz 1
 D-01968 Senftenberg
 stahmann@b-tu.de



Susanne Nieland, Arief I. Zamani, C. Leong Ng und K.-Peter Stahmann (v. l. n. r.)