

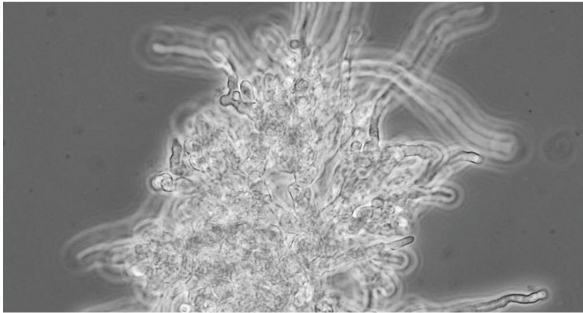


Antje Hevekerl (Autor)

Biotechnisch erzeugte Itaconsäure

Antje Hevekerl

Biotechnisch erzeugte Itaconsäure



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/7430>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>



1. Einleitung und Zielsetzung

Durch die endlichen Reserven an fossilen Rohstoffen hat die Nutzung von erneuerbaren Energien in den letzten Jahren stark zugenommen. Dies trifft insbesondere auf den energetischen Sektor zu, bei dem z. B. Wind- und Solarkraftanlagen zum Einsatz kommen. Ein anderes Gebiet, das durch fossile Rohstoffe abgedeckt wird, ist die Produktion von Materialien und Chemikalien, die z. B. für die Produktion von Kunststoffen genutzt werden. Dieser Bereich kann durch die erneuerbaren Energien nicht abgedeckt werden. Hierfür muss auf die stoffliche Nutzung nachwachsender Rohstoffe zurückgegriffen werden. Dies bedeutet, dass gewonnene pflanzliche Biomasse als Grundstock für die weitere Verwertung genutzt wird. Produkte aus nachwachsenden Rohstoffen setzen bei ihrer Verbrennung nur so viel Kohlenstoffdioxid wieder frei, wie durch die Pflanzen gebunden wurde. Daher sind diese Stoffe weitgehend CO₂-neutral. Die genutzte Biomasse stammen aus der Land- und Forstwirtschaft. Besonders im biotechnologischen Bereich wird als Rohstoff bevorzugt reiner Zucker, wie Glucose und Saccharose, verwendet, da die verwendeten Mikroorganismen ihn direkt verwerten können. Die Nutzung landwirtschaftlicher Flächen für industrielle Zwecke steht allerdings in Konflikt mit der Lebensmittel- und Futtermittelproduktion. Daher gewinnt die Herstellung von Zuckern aus Reststoffen zunehmend an Bedeutung.

Ein möglicher Grundstoff für die chemische Industrie auf der Basis von nachwachsenden Rohstoffen ist die Itaconsäure. Die Produktion erfolgt auf biotechnologischem Weg mit Hilfe des filamentösen Pilzes *Aspergillus terreus*. Dieser Prozess wird schon seit Mitte des 20. Jahrhunderts industriell durchgeführt. Durch die preisgünstigen petrochemischen Rohstoffe ist Itaconsäure aber eher ein Nischenprodukt. Für eine breitere Anwendung der Säure als Grundchemikalie müssen daher die Produktionskosten des biotechnischen Prozesses reduziert werden. Ein Grund für die hohen Kosten sind die geringen Endkonzentrationen, die während der Kultivierung erreicht werden. Mit 91 g/L Itaconsäure (Kuenz et al., 2012) liegen sie deutlich unterhalb der Endkonzentration von



vergleichbaren biotechnologischen Prozessen wie der Citronensäureherstellung. Weiterer Bedarf zur Optimierung besteht bei den erreichten Raum-Zeit-Ausbeuten des Prozesses. Durch das langsame Wachstum des filamentösen Pilzes und geringe maximale Produktivitäten liegen die Kultivierungszeiten oft bei 6 bis 7 Tagen (Okabe et al., 2009). Durch die Verwendung eines filamentösen Pilzes kann es außerdem Schwierigkeiten bei der Inokulumherstellung, Durchmischung und in der Handhabung der Kultur geben.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den biotechnologischen Prozess für die Itaconsäureproduktion zu optimieren. Hierbei sollte insbesondere die erreichte Endkonzentration als auch die Produktivität erhöht werden. Um eine effiziente Medienoptimierung zu ermöglichen, sollte zunächst ein Scale-down von Schüttelkolbenkultivierungen in den Mikrotiterplattenmaßstab durchgeführt werden. Der Einfluss von weiteren Prozessparametern, wie dem pH-Wert, sollte im Bioreaktor untersucht werden. Neben der Prozessoptimierung sollte auch die Inokulumherstellung in Form von Sporen untersucht werden. Diese ist durch die Verwendung von Oberflächenkulturen insbesondere im Großmaßstab sehr aufwendig. Daher sollten Wege für einen effektiven Scale-up gesucht werden.

2. Theorie

2.1. Itaconsäure

Itaconsäure wurde 1837 als ein Produkt der Citronensäuredestillation entdeckt (Baup, 1837). Als ungesättigte Dicarbonsäure besitzt sie zwei Carboxylgruppen und eine konjugierte Doppelbindung (Abbildung 2.1). Durch die besondere Struktur sind eine Vielzahl an Reaktionswegen, wie z. B. Polymerisation, Addition und Veresterungen, möglich.

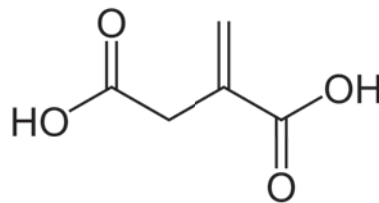


Abbildung 2.1.: Strukturformel der Itaconsäure.

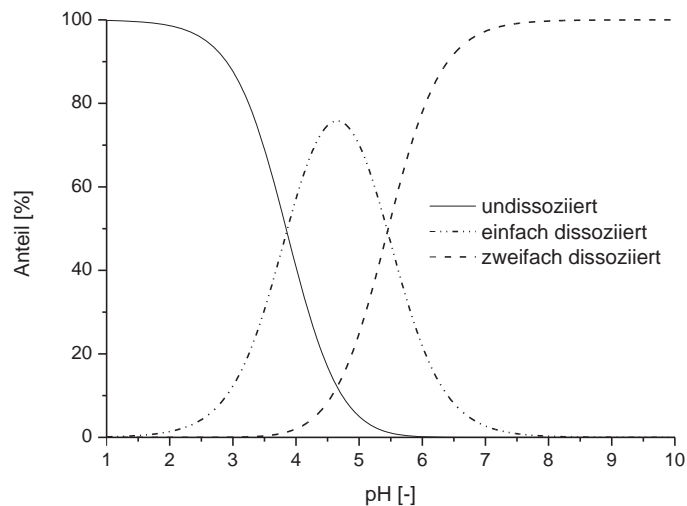


Abbildung 2.2.: Berechnete Dissoziationsstufen von Itaconsäure in Abhängigkeit vom pH-Wert (modifiziert nach Rychtera and Wase, 1981).

Tabelle 2.1.: Eigenschaften der Itaconsäure.

Summenformel	$C_5H_6O_4$
Molare Masse	130,1 g/mol
Aggregatzustand	fest
Dichte	1,63 g/cm ³
Schmelzpunkt	162-167 °C
Siedepunkt	Zersetzung ab 268 °C
pK _S -Wert	3,84 und 5,55
Löslichkeit	83 g/L (20 °C)

Als Dicarbonsäure besitzt Itaconsäure zwei pK_S-Werte, die bei 3,84 und 5,55 liegen. Der Dissoziationsgrad der Säure ist stark vom pH-Wert abhängig (Abbildung 2.2). Bei pH-Werten größer pH 7 liegt der Hauptteil der Säure zweifach dissoziiert vor, während sich bei pH-Werten kleiner pH 2 fast ausschließlich die undissoziierte Form finden lässt. Zwischen diesen beiden Extrema ist ein Gemisch aus undissoziierter, einfach sowie zweifach dissoziierter Säure vorhanden. Diese Eigenschaft hat auch Auswirkungen auf die Löslichkeit von Itaconsäure in Wasser: Bei 20 °C sind nur 83 g/L löslich. Diese und weitere wichtige Eigenschaften der Itaconsäure sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

2.1.1. Markt und Anwendungen von Itaconsäure

Der geschätzte weltweite Markt für Itaconsäure betrug im Jahr 2011 41.400 t. Die Produktionsstätten für die Itaconsäureherstellung liegen nach Einstellung der Produktion in den USA, Japan und Frankreich nun fast ausschließlich in China (Okabe et al., 2009; Weastra, s.r.o., 2013). Durch die zwei Carboxylgruppen eignet sich Itaconsäure für den Einsatz als Monomer oder Comonomer bei Polymerisationsreaktionen. Aber auch eine Umwandlung der Itaconsäure in ungesättigte Ester oder andere Derivate wie z. B. 2-methyl-1,4-Butandiol oder 3-Methyltetrahydrofuran ist möglich. Diese Bausteine finden in verschiedenen Anwendungen Gebrauch, deren Anteil an der Gesamtproduktion von 2011 in Abbildung 2.3 dargestellt ist. Der mit Abstand größte Anteil von Itaconsäure mit 43,9 % wird für die Herstellung von Styrol-Butadien-Kautschuk genutzt. Es findet, wie auch synthetisches Latex, Anwendung in der Papier- und Baubeschichtung (Weastra, s.r.o., 2013). Als Comonomer wird es als Superadsorber, z. B. in Windeln, genutzt (Karadag et al., 2001; Lanthong et al., 2006) oder für die Herstellung von weichen

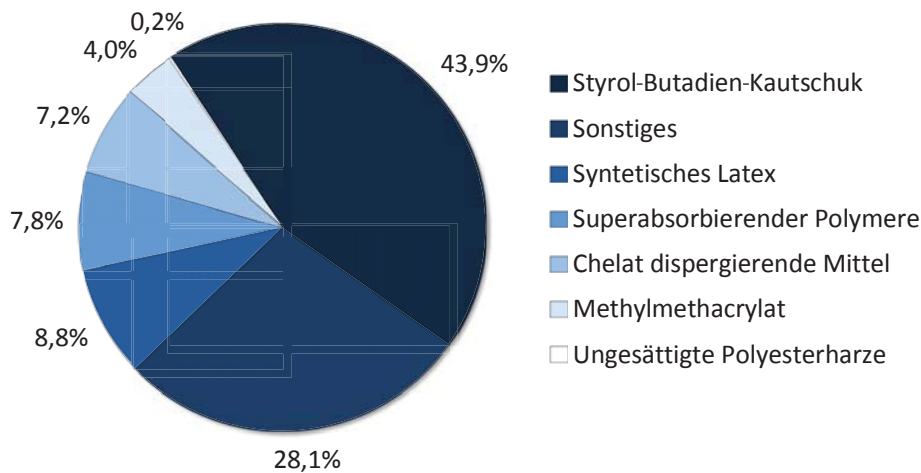


Abbildung 2.3.: Anwendungen der produzierten Itaconsäure bezogen auf die Gesamtproduktion von 41.400 t im Jahr 2011 (Weastra, s.r.o., 2013).

Kontaktlinsen (Masuhara et al., 1976). Im medizinischen Bereich kann der Monoester der Itaconsäure als dentales Adhäsiv und Füllstoff genutzt werden (Saitoh et al., 1993). Ein mit 0,2 % noch sehr geringer Anteil an Itaconsäure wird für die Herstellung von ungesättigten Polyesterharzen verwendet. Dies ist jedoch ein Hauptwachstumsfeld für die Itaconsäureanwendung. Marktanalysen haben ergeben, dass die Verwendung in ungesättigten Polyesterharzen bis 2015 zum zweitstärksten Anwendungsgebiet werden kann (Weastra, s.r.o., 2013).

2.2. Herstellung der Itaconsäure

Die Herstellung von Itaconsäure ist sowohl chemisch als auch biotechnologisch möglich. Die chemischen Verfahren können aber nicht mit den biotechnologischen konkurrieren, so dass sie nicht durchgeführt werden (Tate, 1981).

2.2.1. Chemische Herstellung

Die chemische Herstellung von Itaconsäure ist auf mehreren Wegen möglich: Durch die Pyrolyse von Citronensäure und der anschließenden Hydrolyse der entstehenden Anhydride (Baup, 1837), die Decarboxylierung von Aconitsäure (Luskin, 1974), sowie

der Oxidation von Medityloxid und der anschließenden Isomerisierung der gebildeten Citraconsäure (Berg and Hetzel, 1978).

2.2.2. Biotechnologische Herstellung

Die Biosynthese von Itaconsäure wurde bei dem filamentösen Pilz *Aspergillus itaconicus* entdeckt (Kinoshita, 1932). Kurze Zeit später fand Calam et al. (1939), dass *Aspergillus terreus* in der Lage ist größere Mengen an Itaconsäure zu bilden, so dass sich weitere Untersuchungen auf diesen Organismus konzentrierten. Frühe Kultivierungen wurden als Oberflächenkulturen durchgeführt, bei denen schon Konzentrationen von 50 g/L erreicht wurden (Lockwood and Ward, 1945). Die Durchführung von submersen Kultivierungen setzte sich aber schnell durch (Kane et al., 1945; Lockwood and Nelson, 1946). Die industrielle Itaconsäureproduktion begann 1955 durch die Pfizer Co. Inc. in den USA. Weitere Anlagen wurden in England, Frankreich, Russland und Japan errichtet (Okabe et al., 2009).

Neben den schon genannten filamentösen Pilzen sind auch andere Organismen in der Lage, Itaconsäure zu bilden. So wurde bereits 1955 *Ustilago maydis* als Produzent erkannt, noch unter dem Synonym *Ustilago zea* (Haskins et al., 1955). Die erreichte Itaconsäurekonzentration mit diesem Organismus liegen mit 53 g/L deutlich unterhalb der Konzentrationen, die mit *Aspergillus terreus* heute erreicht werden (Guevarra and Tabuchi, 1990). Weitere Stämme aus der Gattung *Ustilago* sowie einige andere Spezies zeigen auch die Fähigkeit der Itaconsäurebildung, jedoch in geringeren Konzentrationen. Eine Zusammenstellung der natürlichen Itaconsäurebildner ist in Tabelle 2.2 aufgelistet.

2.3. *Aspergillus terreus*

Aspergillus terreus ist ein filamentös wachsender Pilz, der zu den Ascomyceten gehört. Der Pilz ist in der Umwelt weit verbreitet und kommt im Boden oder auf faulenden Pflanzenmaterial vor. Auf Czapek-Dox-Agar kultiviert bildet er hellgelbe Kolonien, die sich zimtfarben bis braun verfärben, wenn die Sporenbildung einsetzt (Thom and Church, 1918).

Die Fortpflanzung von *A. terreus* kann über mehrere Wege erfolgen. Dies geschieht zum einen über die Ausbildung von Konidienträgern (Abbildung 2.4). In Oberflächenkulturen bildet sich hierfür aus einer Fußzelle ein Konidiophor, dessen Spitze sich

Tabelle 2.2.: Natürliche Itaconsäureproduzenten mit den höchsten veröffentlichten Itaconsäurekonzentrationen.

Organismus	Itaconsäurekonzentration	Quelle
<i>Aspergillus itaconicus</i>	k. A.	Kinoshita (1932)
<i>Aspergillus terreus</i>	91 g/L	Kuenz et al. (2012)
<i>Candidia spec.</i>	35 g/L	Tabuchi et al. (1981)
<i>Helicobasidium spec.</i>	k. A.	Sayama et al. (1994)
<i>Pseudozyma antarctica</i>	30 g/L	Levinson et al. (2006)
<i>Rhodotorula spec.</i>	15 g/L	Kawamura et al. (1981)
<i>Ustilago cynodontis</i>	31 g/L	Guevarra and Tabuchi (1990)
<i>Ustilago maydis</i>	53 g/L	Tabuchi and Nakahara (1980)
<i>Ustilago rabenhorstina</i>	16 g/L	Guevarra and Tabuchi (1990)
<i>Ustilago spermophora</i>	13 g/L	Guevarra and Tabuchi (1990)

verdickt. Das so gebildete Vesikel hat bei *A. terreus* eine runde Form. An den oberen 2/3 des Vesikels befinden sich die Metulae, die je ein Bündel Phialiden tragen. An den Enden der kegelförmigen Phialiden schnüren sich die Konidien ab. Die runden Konidien haben einen Durchmesser von 2-4 μm und formen lange Reihen. Die Konidien sind mit einer dicken melaninartigen Schicht umgeben, unter der eine dünne Zellwand liegt (Deak et al., 2009; Johnson and Borman, 2010; Thom and Church, 1918).

Ein weiterer Verbreitungsweg für *A. terreus* ist die Bildung von Chlamydosporen, die charakteristisch für diesen Pilz ist. Diese asexuellen Sporen werden an submersen Hyphen gebildet. Dabei formen sich Chlamydosporen direkt seitlich an Hyphen oder an Hyphenspitzen. Diese Sporen sind mit 4-7 μm Durchmesser größer als die Konidien von Luftmycel. Sie besitzen keine melaninartige Außenschicht, dafür aber eine dicke, glatte, nicht pigmentierte Zellwand (Deak et al., 2009; Johnson and Borman, 2010).

Für lange Zeit wurde angenommen, dass die Vermehrung bei *A. terreus* nur asexuell erfolgt. Der Pilz besitzt jedoch Gene für unterschiedliche Paarungstypen und für die Pheromonbildung und -detektion (Eagle, 2009). Nach der Kreuzung von zwei unterschiedlichen Paarungstypen bildet *A. terreus* Cleistothecia (Fruchtkörper) aus, die glattwandige Ascosporen enthalten (Arabatzis and Velegraki, 2013).

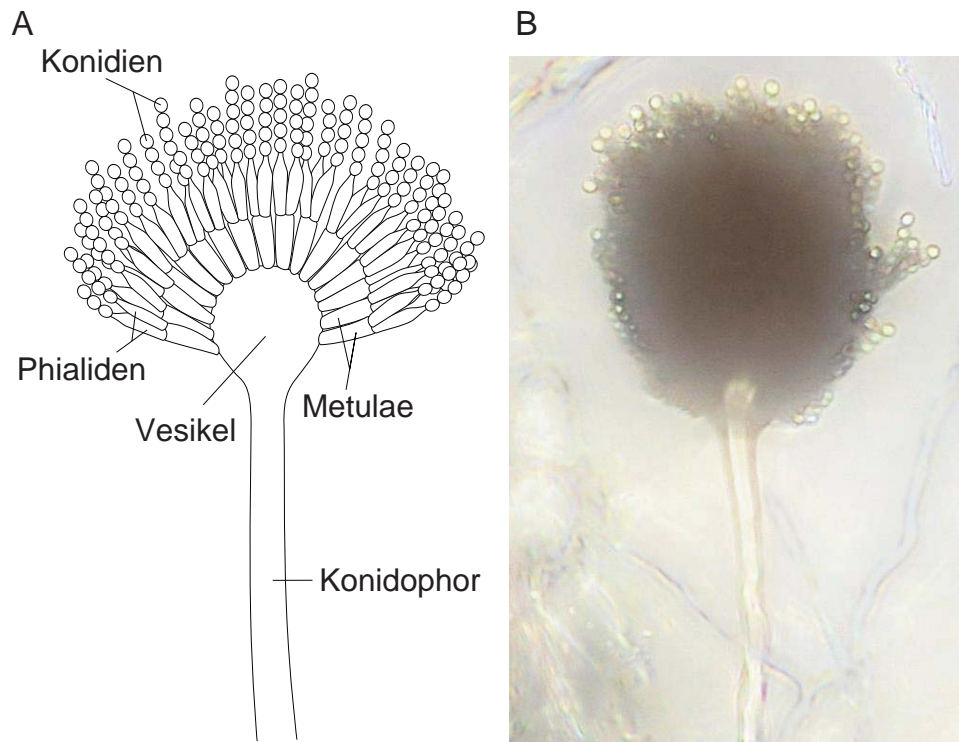


Abbildung 2.4.: Konidienträger von *A. terreus*. A: Schematische Darstellung (modifiziert nach Thom and Church (1918)) B: Mikroskopische Aufnahme eines Konidienträgers in Luftmycel.

2.4. Biotechnologische Produktion von Itaconsäure mit *A. terreus*

2.4.1. Stämme und Stammverbesserung

Der verbreitetste *A. terreus* Stamm, der für die Itaconsäureproduktion genutzt wird, ist *A. terreus* NRRL 1960 (Eimhjellen and Larsen, 1955; Gyamerah, 1995a; Riscaldati et al., 2000; Rychtera and Wase, 1981). Jedoch ist der Einfluss des verwendeten Stammes auf die Itaconsäurebildung gering. Kuenz et al. (2012) verglich unterschiedliche *A. terreus* Stämme (NRRL 1960, NRRL 1963 und ein Eigenisolat DSM 23081) unter zuvor optimierten Bedingungen. Hierbei zeigten sich sehr ähnliche Itaconsäureendkonzentration von 87 bis 91 g/L, die zu den höchsten veröffentlichten Konzentrationen zählen.

Es wurde schon früh versucht, die gefundenen natürlichen Itaconsäure bildenden Stämme durch Mutation zu optimieren (Hollaender et al., 1945). Durch UV-Bestrahlung

gewonnene Mutanten produzierten mit Itaweinsäure und deren Lacton zuvor nicht beobachtete Nebenprodukte bei der Itaconsäureproduktion (Stodola et al., 1945). Die unerwünschte Bildung dieser Nebenprodukte konnte durch die Anhebung des pH-Wertes durch Zugabe von CaCO_3 während der Kultivierung unterdrückt werden (Batti, 1964). Tevž et al. (2010) erreichte durch das Einbringen einer modifizierten Phosphofruktokinase eine Erhöhung des glykolytischen Flusses und erreichte eine Endkonzentration von 31 g/L Itaconsäure. Eine Steigerung der Amylaseaktivität von *A. terreus* konnte durch eine Protoplastenfusion mit *A. usamii* erreicht werden (Kirimura et al., 1997).

Weitere Studien untersuchten die Itaconsäureproduktion mit erzeugten Mutanten von *A. terreus*, jedoch konnte keine Itaconsäureendkonzentration über 90 g/L erreicht werden (Reddy and Singh, 2002; Yahiro et al., 1995).

2.4.2. Biosynthese

Bei der Biosynthese von Itaconsäure wird Glucose zunächst über die Glycolyse zu Pyruvat umgewandelt (Abbildung 2.5). Dies geschieht im Cytoplasma der Zelle. Für die Einschleusung des Pyruvates in den Citratzyklus wird dieses in die Mitochondrien transportiert. Hier wird es über Citrat zu cis-Aconitat umgewandelt, das in das Cytoplasma transportiert wird. Für den Transport durch die mitochondriale Membran wird ein Antiporter mit Malat postuliert. Im Cytoplasma wird cis-Aconitat durch das Enzym cis-Aconitat-Decarboxylase in Itaconsäure umgewandelt (Bonnarme et al., 1995; Jaklitsch et al., 1991).

2.4.3. Wachstum und Morphologie

Das Wachstum bei Pilzen ist ein komplexer Prozess. Aus Sporen bildet sich ein Keimschlauch, von dem weiteres Wachstum ausgeht. Das Hyphenwachstum ist ein sehr polarisierter Prozess, bei dem Wachstum nur an den Hyphenspitzen erfolgt. Die Polarisierung wird u.a. durch die Konzentration an Calciumionen in der Zelle bestimmt und reguliert (Jackson and Heath, 1993). Durch Verzweigungen der Hyphen kann sich ein komplexes Mycel ausbilden.

Die Morphologie des Pilzes während einer Kultivierung ist von den physikalischen und chemischen Parametern des Prozesses abhängig. Hierbei sind filamentöses Wachstum (lockeres Mycel) und Wachstum in Form von Pellets (dicht gepackte Hyphen) zu

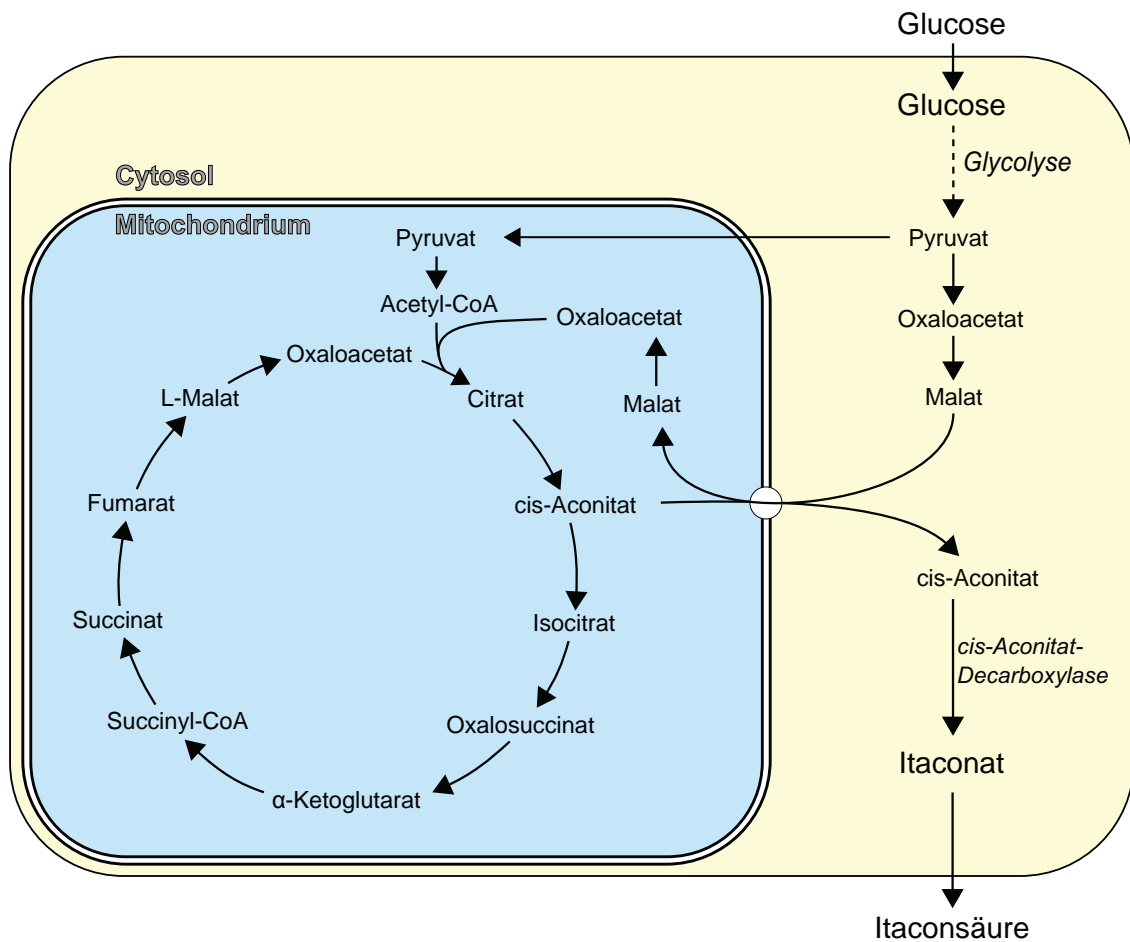


Abbildung 2.5.: Biosyntheseweg von Itaconsäure in *A. terreus* (Bonnarme et al., 1995; Jaklitsch et al., 1991).

unterscheiden. Das filamentöse Wachstum kann zu sehr viskosen Fermentationsbrühen führen, was einen hohen Leistungseintrag und eine schlechte Durchmischung des Mediums zur Folge haben kann. Dieser Effekt kann beim Wachstum in Pelletform vermieden werden. Allerdings kann es ab einer bestimmten Pelletgröße zu einer Unterversorgung der Zellen im Inneren des Pellets kommen. Durch eingeschränkte Diffusion können Sauerstoff und Stoffwechseledukte und -produkte nicht vollständig hin- und abtransportiert werden.

Bei der Art der Pelletbildung wird zwischen agglomerierten Pellets und nicht agglomerierten Pellets unterschieden. Wenn Pellets durch Agglomeration gebildet werden, kann dies durch eine Anlagerung von Sporen oder ausgekeimten Hyphen geschehen, wobei im weiteren Wachstum die Pellets entstehen (Grimm et al., 2004). Diese unterscheiden

sich zu den nicht agglomerierten Pellets, bei denen aus jeder Spore ein Pellet gebildet wird. Auf welche Weise das Pellet entsteht, wird durch den verwendeten Organismus und den Kultivierungsbedingungen beeinflusst.

Die Morphologie von *A. terreus* bei der Itaconsäureproduktion wird nur selten in der Literatur beschrieben. Der Pilz formt vorrangig Pellets (Gyamerah, 1995a,b; Kuenz et al., 2012; Nelson et al., 1952; Okabe et al., 1993), nur selten ist ein filamentöses Wachstum beschrieben (Okabe et al., 1993; Welter, 2000). Die Größe und Form der Pellets kann von verschiedenen Parametern beeinflusst werden. Die Konzentration von Eisen-, Zink- und Calciumionen hat hierbei einen großen Einfluss (Gyamerah, 1995a; Kuenz et al., 2012; Welter, 2000). Kleine fransige Pellets mit einem Durchmesser von 0,1-0,5 mm ergeben die höchste Produktivität (Gyamerah, 1995a; Kuenz et al., 2012).

2.4.4. Substrate und Medienbestandteile

A. terreus kann verschiedene Substrate für die Itaconsäurebildung verwenden. Hierzu gehören Zucker wie Glucose, Saccharose, Xylose und Mannose als auch Glycerol und Ethanol (Eimhjellen and Larsen, 1955). Die Verwendung von Glucose oder Saccharose erbringt hierbei die besten Ausbeuten, daher werden diese Substrate auch vorrangig eingesetzt. Dies geschieht als reiner Zucker oder in Form von Zuckerrüben- oder Zuckerrohrmelasse (Kane et al., 1945; Nubel and Ratajak, 1962). Wenn die Substrate nicht rein sind, müssen sie aufbereitet werden, da der Pilz sehr empfindlich auf Verunreinigungen reagiert. Dies geschieht durch die Verwendung von Ionentauschern oder Ferrocyanid (Batti and Schweiger, 1963; Fries, 1966).

Für den Start der Itaconsäureproduktion ist laut Literatur eine Phosphatlimitierung notwendig (Rychtera and Wase, 1981; Welter, 2000). Hierdurch soll das Wachstum limitiert und die Produktionsphase eingeleitet werden. Stickstoff kann in Form von z. B. Ammonium oder Nitrat in das Medium hinzugegeben werden. Eine Limitierung der Ammoniumquelle während der Kultivierung führt zu einem Einbruch in der Itaconsäurebildung (Kuenz, 2008). Die Calciumkonzentration hat, wie schon in Kapitel 2.4.3 erwähnt, einen großen Einfluss auf die Morphologie der Pellets und somit auch auf die Produktivität. Durch Zugabe der Spurenelemente Zink und Eisen kann die Itaconsäureproduktion deutlich gesteigert (Batti and Schweiger, 1963; Welter, 2000).

Der Pilz *A. terreus* ist für sein Wachstum nicht auf komplexe Medienbestandteile angewiesen und kann daher auf definierten Medien kultiviert werden. Jedoch wird