



Christoph Wittmann (Autor)  
**Entwicklung und Einsatz neuer Tools zur  
metabolischen Netzwerkanalyse des industriellen  
Aminosäure-Produzenten *Corynebacterium  
glutamicum***



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/671>

Copyright:  
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,  
Germany  
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

## 2 Einleitung

Die Biotechnologie setzt seit vielen Jahrzehnten Organismen als lebende Minifabriken ein. Diese Zellfabriken ermöglichen gezielte Umsetzungen durch die koordinierte katalytische Aktivität tausender Enzyme innerhalb und außerhalb der Zelle. Ihre herausragenden Eigenschaften haben mittlerweile zu einem breiten Spektrum biotechnologischer Produkte aus fermentativen Verfahren geführt, welches diverse Feinchemikalien und Pharmazeutika umfasst (Tab. 1). Zukünftig wird sich die Biotechnologie zunehmend auch im Bereich der chemischen Industrie etablieren und dort bislang chemische Prozesse substituieren (Bachmann et al., 2004). An der Schwelle zum 21. Jahrhundert wird die Biotechnologie als Schlüsseltechnologie für die Zukunft angesehen. Einer der herausragenden Mikroorganismen in der industriellen Biotechnologie ist *Corynebacterium glutamicum*, welcher für die Herstellung von jährlich über 2 Millionen Tonnen an Aminosäuren eingesetzt wird.

**Tab. 1:** Auswahl biotechnologischer Produkte aus fermentativen Verfahren. Die Daten entstammen überwiegend Bachmann et al. (2004) sowie dem Positionspapier zur Weißen Biotechnologie der Dechema (2004) und sind durch persönliche Mitteilungen aktualisiert und ergänzt.

	Produkt	Jahresproduktion (t/a)	Marktwert (Mio. Eur)	Hauptanwendung
Basischemikalien	Bioethanol	18.500.000	11.000	Lösungsmittel, Energieträger
	Zitronensäure	1.000.000	800	Medizin, Lebensmittel, Waschmittel
	Milchsäure	150.000	270	Lebensmittel, Textil
Wirkstoffe	Penicilline	45.000	13.500	Medizin, Futtermittel
	Epogen		5.000	Medizin
	Interferone		4.000	Medizin
Aminosäuren	L-Glutamat	1.500.000	1.800	Geschmacksverstärker
	L-Lysin	700.000	1.400	Futtermittel
Vitamine	Vitamin C	80.000	640	Lebensmittel, Futtermittel
	Vitamin B <sub>12</sub>	20	500	Wirkstoff, Futtermittel
	Vitamin B <sub>2</sub>	30.000	240	Wirkstoff, Futtermittel
Spezialchemikalien	Enzyme		1.800	Waschmittel, Lebensmittel, Textil
	Aromastoffe		1.500	Lebensmittel, Pharma, Kosmetik

In praktisch allen biotechnologischen Prozessen ist es notwendig, den verwendeten Organismus zu optimieren, um gewünschte physiologische Eigenschaften für eine effektive Produktion zu erhalten. Eine in der Vergangenheit erfolgreiche aber aufwendige Strategie ist die Einfügung zufälliger Mutationen und die Selektion auf gewünschte Eigenschaften, die zur Entwicklung einer Reihe von industriell genutzten Produktionsstämmen geführt hat (Rowlands, 1984). Allerdings ist dieses Vorgehen aufwendig und mit verschiedenen Nachteilen wie die Akkumulation unerwünschter Mutationen oder fehlendem Wissenszuwachs über den Organismus verbunden. Diverse Entwicklungen in Molekularbiologie bzw. Molekulargenetik haben jedoch mittlerweile die gezielte Amplifikation, Deregulation, Deletion oder auch Insertion von Genen ermöglicht. Diese Tools erlauben eine zielgerichtete und rationale Optimierung zellulärer Eigenschaften, das so genannte *Metabolic Engineering* (Bailey, 1991; Stephanopoulos, 1994; Stephanopoulos und Sinskey, 1993). Heute sind experimentelle Methoden zur gezielten Manipulation einer Vielzahl biotechnologisch relevanter Organismen verfügbar (Lal et al., 1996; McDaniel et al., 2001; Nielsen, 1998; Olsson und Nielsen, 2000; Thykaer und Nielsen, 2003). In allen diesen Prozessen immer wiederkehrende Fragen sind, welche Gene in welcher Weise manipuliert werden sollen, um eine maximale Verbesserung zu erreichen. Aufgrund der hohen Komplexität und Robustheit biologischer Systeme ist die Klärung dieser Fragen, d.h. die Identifizierung und Vorhersage der richtigen genetischen Targets oft schwierig. Es gibt eine Reihe von Beispielen, in denen gezielte genetische Eingriffe in Organismen keine oder sogar unerwünschte Effekte hervorrufen (Bailey, 1999; Emmerling et al., 2002). In anderen Fällen führen einzelne, auf den ersten Blick geringfügig erscheinende Manipulationen zu sehr komplexen Änderungen (Lee et al., 1996). Es liegt auf der Hand, dass nur durch detaillierte Analyse ein Verständnis des komplexen Zusammenspiels der verschiedenen Prozesse in der Zelle und somit eine rationale Basis für die Stammoptimierung gewonnen werden kann (Bailey, 2001).

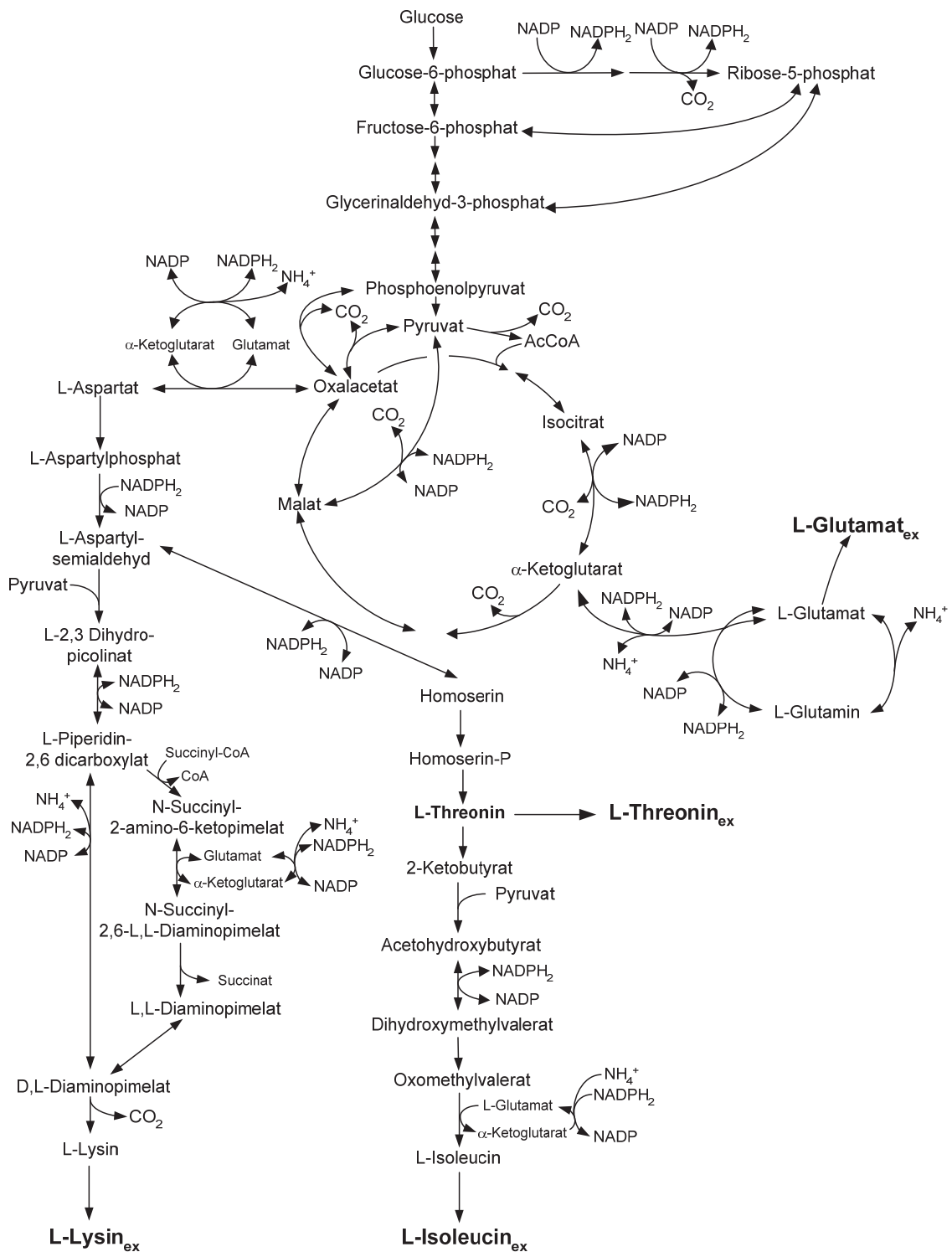
## **2.1 *Corynebacterium glutamicum* als Zellfabrik in der Biotechnologie**

*C. glutamicum* wurde vor etwa 50 Jahren im Rahmen eines japanischen Screening-Programms zur Suche nach Aminosäure produzierenden Mikroorganismen isoliert (Kinoshita et al., 1957). Dies stellt sozusagen die Geburtsstunde der heutigen biotechnologischen Aminosäureproduktion dar. In den letzten Jahrzehnten sind mit *C. glutamicum* eine Reihe industrieller Prozesse etabliert worden (Ikeda, 2003). L-Glutamat (1.500.000 t/a) und L-Lysin (700.000 t/a) sind heute die wichtigsten Produkte (Tab. 1). Weitere biotechnologisch interessante Feinchemikalien, die mit *C. glutamicum* hergestellt werden können, sind L-Valin (Radmacher et al., 2002), L-Isoleucin (Morbach et al., 1996), L-Tryptophan (Ikeda und Katsumata, 1999), L-Phenylalanin (Shu und Liao, 2002), L-Histidin (Ishino et al., 1986) oder Panthothensäure (Sahm und Eggeling, 1999). Alle mit *C. glutamicum* hergestellten Aminosäuren besitzen die L-Konfiguration. Im Folgenden werden sie der Einfachheit halber ohne diese Angabe genannt.

### **2.1.1 Zentralstoffwechsel und Produktsynthese**

Detaillierte metabolische Untersuchungen haben von Beginn an die Entwicklung und den Einsatz von *C. glutamicum* in der Biotechnologie vorangetrieben (Eggeling und Sahm, 1999; Sahm et al., 2000; Wittmann und de Graaf, 2005). Dies hat u. a. zur Identifizierung der relevanten Stoffwechselwege geführt. Interessanterweise verfügt *C. glutamicum* über zwei alternative Synthesewege für Lysin (Ishino et al., 1984; Schrupf et al., 1991; Sonntag et al., 1993). Wie in Abb. 1 dargestellt, sind Zentralstoffwechsel und Synthese biotechnologisch relevanter Aminosäuren eng miteinander gekoppelt. Dies betrifft zum einen die Bildung der Precursor-Metabolite  $\alpha$ -Ketoglutarat (für Glutamat), Oxalacetat (für Threonin und Isoleucin) bzw. Pyruvat und Oxalacetat (für Lysin). Zum anderen ist die Synthese der Aminosäuren mit einem hohen Bedarf an NADPH verbunden. Dieses wird über die Reaktionen im Pentosephosphat-Weg und im TCA-Zyklus gebildet. Unter

bestimmten Bedingungen ist vermutlich auch die decarboxylierende Malatdehydrogenase (EC 1.1.1.40) an der Bildung von NADPH beteiligt (Kiefer et al., 2004).



**Abb. 1:** Zentralmetabolismus von *Corynebacterium glutamicum* bei Wachstum auf Glucose: Pentose-phosphat-Weg, Glykolyse, TCA-Zyklus, anaplerotische Carboxylierung sowie Synthesewege für die industriell relevanten Produkte L-Lysin, L-Glutamat, L-Threonin und L-Isoleucin. Zusätzlich gezeigt sind Bildung und Verbrauch von NADPH.