

BIO PROZESSTECHNIK

Gruppe 2: Medienoptimierung und Aufarbeitung

Sarah Tschorn, Karin Gerner, Anne-Katrin Schmäzle, Alexandra Mietz



Fachhochschule Gelsenkirchen
Sommersemester 2011

Inhalt



- Ziele
- Medien
- Aufarbeitung
- Literatur

Ziele der Gruppenarbeit

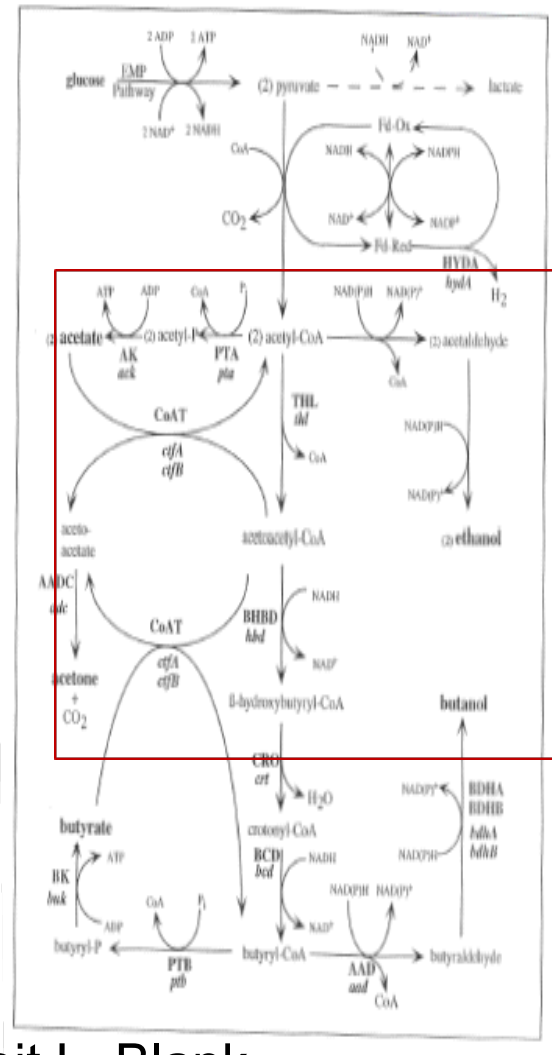


Optimierung eines Verfahrens zur biotechnologischen Herstellung von Aceton mit Hilfe eines rekombinanten *E. coli* Stammes

Medienoptimierung und Aufarbeitung

- Optimierung eines synthetischen Mediums zur Steigerung der Aceton Konzentration
- Aufarbeitung und Gewinnung von Aceton

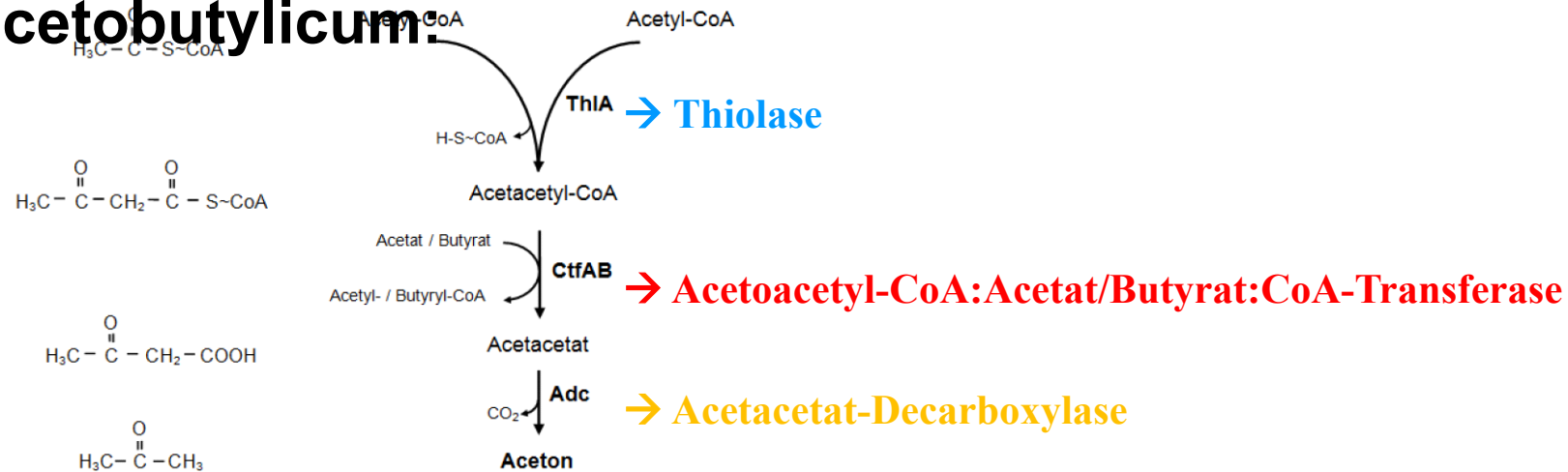
Stoffwechselweg zum Aceton



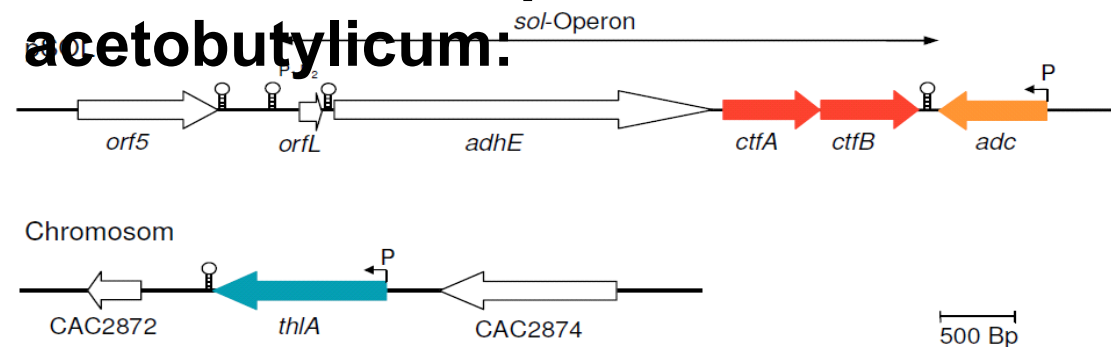
Quelle: Diplomarbeit L. Blank

Stoffwechselweg zum Aceton

Acetonproduktion in *C. acetobutylicum*:



Gene für Acetonproduktion *C. acetobutylicum*:



Medienoptimierung

Verwendete Medien zur Acetonproduktion mit rekombinanten *E. coli*

Literatur	Medium	pH	Kultivierungsart	Verwendete Menge	Glucose Konz.	Temperatur (°C)	Umdrehungszahl (rpm)	Aceton (mM)
Lars Blank	SD8	7,0	Batch	300 ml	2 %	37	220	75-80
	SD8	7,0	Fed- Batch	300 ml	2%; alle 12h + 4ml 3,5 M Glc	37	220	106-167
Lederle	TY	7,0	Batch	100ml	2 %	37; 30	150	Ca. 60
	SD8	7,0	Batch	100ml	2 %	37	150	Ca. 10
	Evonik	7,5	Batch	100ml	2 %	37	150	Ca. 35
	TM3a	6,8	Batch	100ml	2 %	37	150	Ca. 30
Bermejo	SD8	7,0	Batch	125ml	-	37	250	40
	SD8	7,0	Fed-Batch	4,4 l	Fed wenn Glc unter 20 mM	30	Automatisch, max. 250	> 90

Quelle: Diplomarbeit Lars Blank; Dissertation S.

Lederle; Bermejo et al.

SD8 – Medium

Zusammensetzung des SD8-Mediums

SD-8

7 g/L	NH ₄ Cl
7,5 g/L	KH ₂ PO ₄
7,5 g/L	Na ₂ PO ₄
0,85 g/L	K ₂ SO ₄
0,17 g/L	MgSO ₄ * 7 H ₂ O
0,8 ml/L	Spurenelemente
5 g/L	Hefeextrakt
2 g/L	Glucose

Spurenelemente in 5M HCl

40 g/L	FeSO ₄ *H ₂ O
10 g/L	MnSO ₄ *H ₂ O
28,38 g/L	Al ₂ (SO ₄) ₃
4 g/L	CoCl * 6 H ₂ O
2 g/L	ZnSO ₄ *7 H ₂ O
2 g/L	Na ₂ MoO ₄ *2 H ₂ O
1 g/L	CuCl ₂ *2 H ₂ O
0,5 g/L	H ₃ BO ₄

Quelle: Diplomarbeit

Optimierung des SD8 - Mediums

Bestandteile des Hefeextraktes

- Oligopeptide
- Aminosäuren
- Zucker
- Vitamine
- Einige Fettsäuren
- Cholin



Abb. 2: Hefeextrakt der Firma Roth

Quelle: Schlegel, Allgemeine

Optimierung des SD8-Mediums

Hefeextrakt ersetzen durch Zugabe von:

- **Biotin**
 - Kohlendioxid Fixierung
 - Biosynthese von Fettsäuren
- **Thiamin**
 - Pentosephosphat-Weg
 - Citratzyklus
 - Acetyl-CoA → Aceton
- **Ca-Pantothenat**
 - Coenzym A
 - Acetyl-CoA → Aceton

Quelle: Eger, Vitamine

Optimierung des SD8-Mediums

Lederle steigerte die Acetonkonzentration im TY-Medium durch Änderung: \longrightarrow

der Temperatur

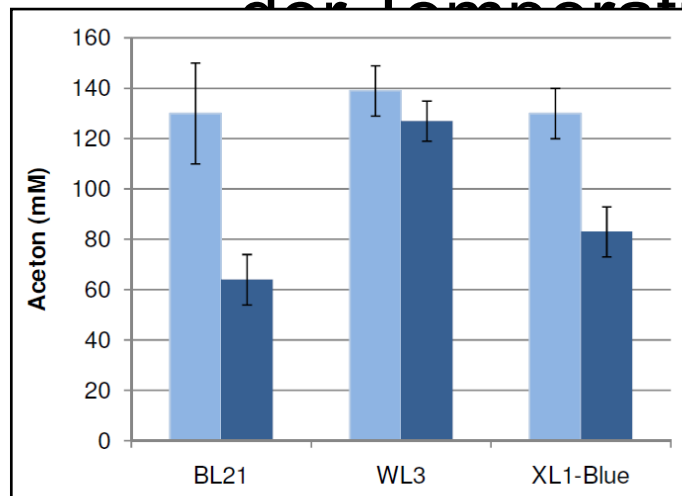


Abb. 3: maximal detektierte Acetonkonzentration bei 30 °C ■ bzw. 37 °C ■

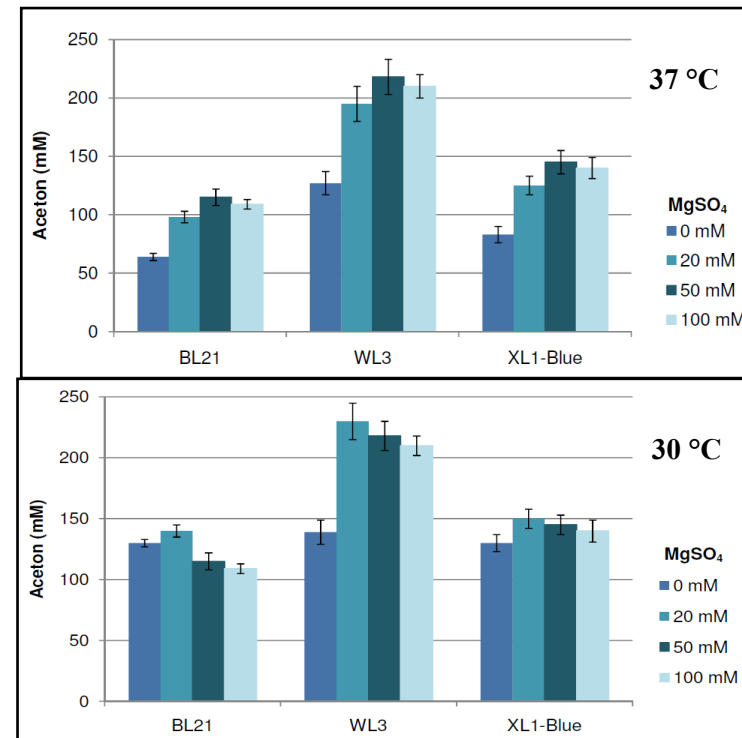


Abb. 4: Acetonkonzentrationen bei unterschiedlichen MgSO₄ Konzentrationen

Quelle: Dissertation S.

Optimierung des SD8-Mediums

Optimiertes SD8-Medium für 30°C

SD-8	
7 g/L	NH ₄ Cl
7,5 g/L	KH ₂ PO ₄
7,5 g/L	Na ₂ PO ₄
0,85 g/L	K ₂ SO ₄
4,93 g/L	MgSO₄ * 7 H₂O
0,8 ml/L	Spurenelemente
2 g/L	Glucose
1 mg/L	Biotin
1 mg/L	Ca-Pantothenat
1 mg/L	Thiamin

Spurenelemente in 5M HCl	
40 g/L	FeSO ₄ *H ₂ O
10 g/L	MnSO ₄ *H ₂ O
28,38 g/L	Al ₂ (SO ₄) ₃
4 g/L	CoCl * 6 H ₂ O
2 g/L	ZnSO ₄ *7 H ₂ O
2 g/L	Na ₂ MoO ₄ *2 H ₂ O
1 g/L	CuCl ₂ *2 H ₂ O
0,5 g/L	H ₃ BO ₄

Kostenaufstellung des optimierten SD8-Mediums

Spurenelementlösung		
Chemikalie	Menge	Kosten
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	40 g	0,59 €
MnSO ₄ x H ₂ O	10 g	0,72 €
Al ₂ (SO ₄) ₃ x 18 H ₂ O	55 g	8,03 €
CoCl x 6 H ₂ O	4 g	1,19 €
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	2 g	0,07 €
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	2 g	0,38 €
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	1 g	0,05 €
H ₃ BO ₃	0,5 g	0,01 €
HCl	1000 mL	17,90 €
Endpreis für 1 Liter		28,94 €

SD8-Medium		
Chemikalie	Menge	Kosten
NH ₄ Cl	7 g	0,23 €
KH ₂ PO ₄	7,5 g	0,29 €
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	7,5 g	0,29 €
K ₂ SO ₄	0,85 g	0,05 €
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	4,93 g	0,16 €
Spurenelementlösung	0,8 mL	0,03 €
Glucose x H ₂ O	20 g	0,41 €
Biotin	1 mg	0,01 €
Thiamin	1 mg	0,01 €
Ca-Panθοthenat	1 mg	0,01 €
Endpreis für 1 Liter		1,49 €

Aufarbeitung



- Fermentative Herstellung von Aceton (und 1-Butanol) mit *C. acetobutylicum*:
Satzfermentern von $> 100\text{m}^3$
- Substratkosten (Maisstärke oder Melasse)
60 %
- Energiekosten für die Produktisolierung
durch Destillation mit ca. 12 %
- Annahme: Rekombinanter *E. coli* hat den
gleichen Stoffwechsel wie *C.*
acetobutylicum, daher gleiche Kosten

Aufarbeitung



- Annahme: Rekombinanter *E. coli* hat den gleichen Stoffwechsel wie *C. acetobutylicum*, daher gleiche Kosten

Kostenstellen	Prozentualer Anteil	Kosten
Biomasse	60 %	31,48 €
Destillation	12 %	6,30 €
Endpreis für 1 L		37,78 €

- Verbesserte Produktisolierung durch Membranverfahren

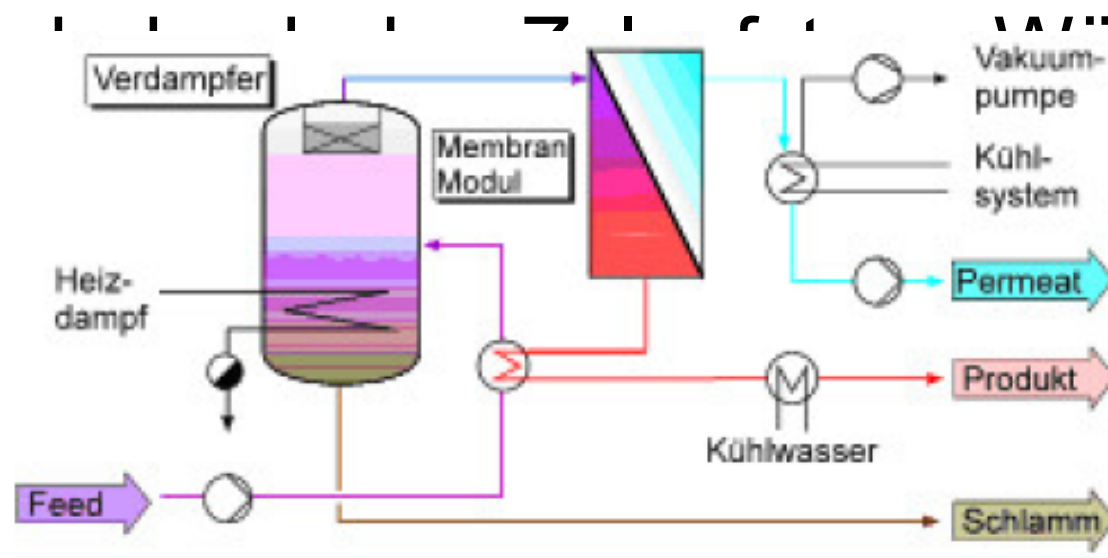
Mögliche Aufreinigungsschritte



- Mikro-/Ultra Filtration der Fermentationsbrühe
- Dampfpermeation um die Destillation zu ersetzen
- Nutzen:
Geringer Primärenergiebedarf
Geringe Betriebskosten

Dampfpermeation

- Gesättigter Dampf über die Membran geleitet.
- Durch transportierte Permeat wird auf der Membranrückseite verdampft und entzogen



Ausblick



- Weitere optimierende Parameter (pH, Zusatzstoffe o. ä.) zur Steigerung der Produktausbeute
- Limitierende Faktoren:
 - Toxizität von Aceton (ab welcher Konzentration)
 - Toxizität von Nebenprodukten
- Verbesserte Produktisolierung durch Membranverfahren (Pervaporation, Umkehrosmose)

Literatur



- BERMEJO, L., WELKER, N., AND PAPOUTSAKIS, E. 1998. expression of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Genes in *Escherichia coli* for acetone production and acetate detoxification. *Applied and Environmental microbiology* Vol 64, Nr. 3 (1998).
- BLANK, L. *Molekularbiologische und fermentative Charakterisierung eines rekombinanten Stammes von C. acetobutylicum zur Optimierung der Stoffwechselwege*. Diplomarbeit, Universität Dortmund.
- EGER, K. 1989. Vitamine II, Wasserlösliche Vitamine. Von O. Isler, G. Brubacher, S. Ghisla und B. Kräutler. G. Thieme Verl., Stuttgart 1988; X, 467 S., 334 Abb., 31 Tab., kart. DM 220, —. *Pharmazie in unserer Zeit* 18, 6, 187.
- FUCHS, G., SCHLEGEL, H.G., AND EITINGER, T. 2007. *Allgemeine Mikrobiologie. 53 Tabellen*. Thieme, Stuttgart [u.a.].
- LEDERLE, S.M. 2010. *Heterofermentative Acetonproduktion*. Dissertation, Universität Ulm.



Vielen Dank für Ihre
Aufmerksamkeit!

Fragen ?