

Project brief

Thünen-Institut für Agrartechnologie

2023/30

Betriebsmittel im biologischen Landbau verbessern (RELACS)

Anja Kuenz¹, Sarah Bromann

- Viele der am Markt erhältlichen Vitamine, unter anderem Vitamin B2 (Riboflavin), werden mittels gentechnisch veränderter Organismen (GVO) hergestellt und dürfen daher in Bio-Betrieben dem Futter nicht zugesetzt werden.
- Es wurde ein Screening von Wildtyp-Mikroorganismen ohne GVO durchgeführt, die Riboflavin überproduzieren. Die Wildtyp-Hefe *Meyerozyma guilliermondii* produzierte im Screening-Verfahren die höchste Riboflavinkonzentration.
- Mittels angepasster Fermentationsstrategie konnte mit einem GVO-freien Hefestamm 30 mg Riboflavin pro g Trockenzellgewicht im Labormaßstab erreicht werden.

Hintergrund und Zielsetzung

Im Gegensatz zu vielen Bakterien und Hefen können höhere Eukaryonten kein Riboflavin (Vitamin B2) synthetisieren und es muss über die Nahrung aufgenommen werden. Die Zufuhr von Riboflavin in der Geflügelfütterung ist unerlässlich, da es für viele Stoffwechselforgänge nötig ist. Riboflavin wird zurzeit biotechnologisch, basierend auf gentechnisch veränderten Organismen (GVO), hergestellt. Aufgrund der Gesetzgebung müssen ökologisch gehaltene Tiere mit GVO-freien Futtermitteln gefüttert werden. Das gilt auch für die Herstellungsverfahren von Vitaminzusätzen im Futter. Um eine kontinuierliche Versorgung der ökologischen Tierhaltung mit Riboflavin zu gewährleisten, wurde die Isolierung und Optimierung eines neuen GVO-freien Hefestamms für Vitamin B2 durchgeführt. Folgendes stand in diesem Projekt im Fokus:

- Screening nach neuen Riboflavin-Produzenten aus speziellen Habitaten,
- Identifizierung neuer, bisher unbekannter Riboflavin-Produzenten auf Grundlage des phylogenetischen Stammbaums bekannter, natürlicher Überproduzenten,
- Optimierung des Fermentationsprozesses der neuen potenten Riboflavin-produzierenden Hefestämme,
- Fermentationsparameter wie Medien, Inokula, pH-Wert, Temperatur, Rühr- und Belüftungsraten wurden untersucht.

Vorgehensweise

Das Screening von nicht gentechnisch veränderten Wildtyp-Hefestämmen, die Riboflavin überproduzieren, ist der erste Schritt zur Entwicklung von GVO-freien Riboflavin-Produktionslinien.

Auf verschiedenen Nährmedien wurden Proben aus speziellen Habitaten wie Kompost, Baumrinde, verrottendes Obst, selbstgemachtes Sauerkraut und Sauerteig, selbstgemachtes Bier aus Weintrauben, Böden bei Ölförderpumpen und Tankstellen und aus dem Pansensaft kultiviert (Abbildung 1). Von diesen Ansätzen konnten 37 verschiedene Hefestämme isoliert werden. Weiterhin wurden 14 phylogenetisch nahe Verwandte bekannter natürlich überproduzierender Vitamin-B2-Stämme aus Kultursammlungen erworben.

Abbildung 1: Übersicht zur Probennahme und Isolierung neuer Hefestämme



Quelle: Thünen-Institut/Anja Kuenz(2022).

Ergebnisse

Von diesen 51 getesteten Stämmen produzierte der Wildtyp-Hefestamm *Meyerozyma guilliermondii* DSM 11947 im Screening-Verfahren die höchste Riboflavinkonzentration.

M. guilliermondii ist eine Hefeart, die in der Umwelt weit verbreitet ist. Er wird in die Risikogruppe 1 eingestuft und ist somit ein Organismus mit geringem individuellen und gemeinschaftlichen Risiko, d. h. es ist sehr unwahrscheinlich, dass er Krankheiten verursacht. Dieser natürliche Überproduzent wurde für die weitere Prozessoptimierung ausgewählt.

Untersucht wurden der Nährstoffbedarf des Wildtyp-Stammes und das Scale-up von Schüttelkolben auf einen 1-Liter-Bioreaktor.

Um den Prozess wirtschaftlich zu gestalten, ist es wichtig, teure Komponenten während des Kultivierungsprozesses der Hefe zu eliminieren. Neben dem Substrat verursachen Nährstoffquellen wie Hefeextrakt die höchsten Produktionskosten. Daher lag der Fokus hier vor allem auf dem Hefeextrakt, der einen enormen Anteil an den Medienkosten ausmacht, andererseits aber als wichtige Quelle für Stickstoff und Nährstoffe wie Vitamine, Spurenelemente und andere dient.

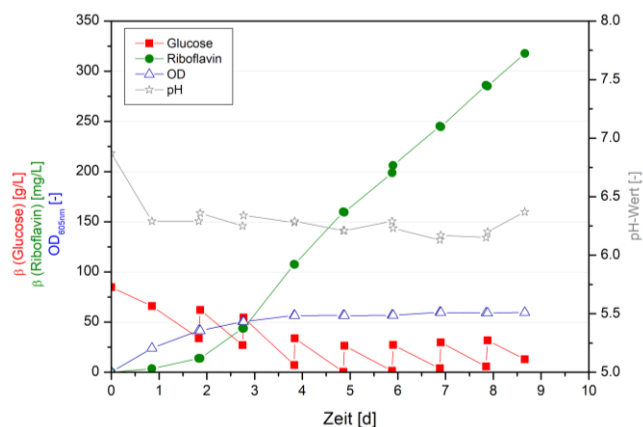
Deshalb wurde die Hefeextraktkonzentration reduziert. Bei den Varianten mit geringerer Hefeextraktkonzentration dauerte die Verwertung der Glucose länger und die maximale Produktivität der Riboflavinbildung war deutlich geringer. Da das Produktionsmedium mit Harnstoff bereits eine andere Stickstoffquelle enthält, die im Vergleich zu Hefeextrakt wesentlich günstiger ist, wurde der vollständige Ersatz von Hefeextrakt durch Harnstoff getestet. Der vollständige Verzicht auf Hefeextrakt führte unabhängig von der verwendeten Harnstoffkonzentration zu einer verlangsamten Riboflavinbildung. Die maximale Produktivität war geringer, aber nach 14 Tagen Kultivierung wurde die gleiche Menge an Riboflavin produziert, so dass Hefeextrakt durch Harnstoff ersetzt werden könnte.

Nach der Variation der Stickstoffquelle wurde der Einfluss des Vitamin- und Aminosäuregehalts des Hefeextrakts untersucht. Die Zugabe von B-Vitaminen ist für eine Überproduktion von Riboflavin mit *M. guilliermondii* nicht notwendig, da der Stamm auch ohne den Zusatz von Vitaminen in der Lage war, Riboflavin zu bilden. Anders verhält es sich mit dem Einfluss von Aminosäuren, hier sind weitere Untersuchungen notwendig, um mehr Informationen über den Nährstoffbedarf zu erhalten.

Die Riboflavin-Produktion wurde anschließend erfolgreich in den 1-Liter-Bioreaktor-Maßstab übertragen (Abbildung 2).

Hier scheint der kritischste Parameter die Versorgung mit ausreichend Sauerstoff in Kombination mit dem richtigen Drehzahlbereich zu sein. Der bisher höchste erreichte Titer mit 317,6 mg/L Riboflavin wurde während einer Fed-Batch-Kultivierung nach neun Tagen erreicht. Insgesamt wurde eine Ausbeute von 30 mg Riboflavin pro g Trockenmasse der Hefezellen erreicht.

Abbildung 2: Fed-batch Kultivierung von *M. guilliermondii* DSM 11947 in einem 1 L-Bioreaktor, Rührgeschwindigkeit 500 - 800 rpm, Begasungsrate 9 sL/h, Gelöstsauerstoffanteil 30 %



Quelle: Thünen-Institut/Anja Kuenz(2022).

Damit konnte gezeigt werden, dass es durch reine Bioproduktionstechnik und ohne gentechnische Veränderungen möglich ist, mit dem Wildtyp-Stamm *M. guilliermondii* höhere Riboflavinegehalte zu erzielen. Der ausgewählte Stamm birgt das Potenzial für eine weitaus höhere Riboflavinkonzentration als derzeit aufgezeigt. Mittelfristig dürfte dies die Verfügbarkeit von nicht gentechnisch verändertem Vitamin B2 für die ökologische Futtermittelproduktion erhöhen.

Weitere Informationen

Kontakt

¹ Thünen-Institut für Agrartechnologie
Anja.Kuenz@thuenen.de

www.thuenen.de/at
Project website: www.relacs-project.eu
Social media: Facebook (RELACSeu) & Twitter (@RELACSeu)

DOI:10.3220/PB1687161924000

Laufzeit

5.2018 - 4.2022

Projekt-ID

2023

Veröffentlichungen

Kuenz, A., Tölle, M. & Bromann, S. Investigations on riboflavin production by wild-type yeast strain for supplementation of organic feed. Org. Agr. (2023).
<https://doi.org/10.1007/s13165-023-00435-4>

Gefördert durch



'Replacement of Contentious Inputs in Organic Farming Systems' (RELACS) has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 773431.