

Industrielle Biotechnologie

Mannosylerythritollipide – mikrobielle Biotenside aus dem Bioreaktor

ALEXANDER BECK¹, SUSANNE ZIBEK^{1, 2}

¹ INSTITUT FÜR GRENZFLÄCHENVERFAHRENSTECHNIK UND PLASMA-TECHNOLOGIE (IGVP), UNIVERSITÄT STUTTGART

² FRAUNHOFER-INSTITUT FÜR GRENZFLÄCHEN- UND BIOVERFAHRENSTECHNIK (IGB), STUTTGART

Mannosylerythritol lipids (MEL) are microbial biosurfactants belonging to the class of glycolipids. They can be produced biotechnologically by smut fungi and have the potential to replace current chemical surfactant products, for example in household detergents or cosmetics. In this article, we highlight our latest research on the various producer organisms as well as the genetics and regulation of MEL biosynthesis, aiming for the development of an industrial production process in the future.

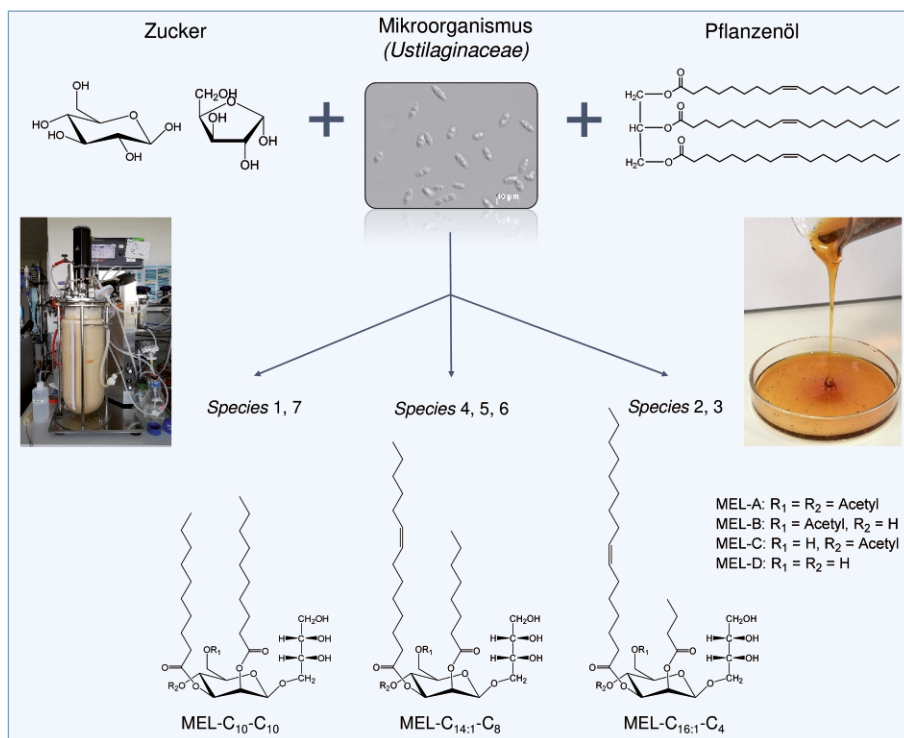
DOI: 10.1007/s12268-020-1332-3

© Die Autoren 2020

■ Mikrobielle Biotenside, die durch Fermentation aus nachwachsenden Rohstoffen mithilfe von Mikroorganismen hergestellt werden, werden immer wieder als möglicher Ersatz für konventionelle erdölbasierte Tenside genannt. Laut einer Studie der Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe (FNR) waren von den 184.000 Tonnen Tensiden, die 2015 in Deutschland in Wasch-, Pflege- und Reinigungsmitteln eingesetzt wurden, lediglich sieben Prozent vollständig biobasiert, während noch immer 50 Prozent komplett petrochemisch hergestellt wurden [1]. Daran lässt sich erkennen, dass aktuell ein gewaltiges Potenzial für die Erforschung und Herstellung vollkommen biobasierter mikrobieller Biotenside besteht, um den Einsatz fossiler Ressourcen mittelfristig zu verringern.

Mögliche Anwendungsgebiete für diese Art Biotenside umfassen sowohl klassische Haushaltsanwendungen, wie Waschen und Reinigen, sie können aber auch insbesondere in der Kosmetik und Pharmazie oder in industriellen Anwendungen, wie der Sanierung kontaminierter Landflächen oder dem Pflanzenschutz, zum Einsatz kommen. Mikrobielle Biotenside sind dabei vollständig biologisch abbaubar und hinterlassen somit keine Rückstände in der Umwelt.

Mannosylerythritollipide (MEL) gehören zu den Glykolipiden, das heißt sie enthalten einen hydrophilen Zuckerbaustein und einen hydrophoben Lipidrest. Der hydrophile Teil besteht dabei aus Mannose und Erythritol, während sich der hydrophobe Teil aus zwei Fettsäureketten und möglichen Acetylierungen zusammensetzt. Je nach Grad der Acetylierung und Länge der Fettsäureketten unterscheidet man verschiedene MEL-Varianten. Jeder Mikroorganismus produziert dabei eine Mischung aus verschiedenen Varianten, allerdings mit einer Präferenz für bestimmte Strukturen (Abb. 1). Den MEL werden zellproliferierende Eigenschaften zugeschrieben, weshalb sie für die Kosmetik und Pharmazie besonders interessant sein könnten [2].



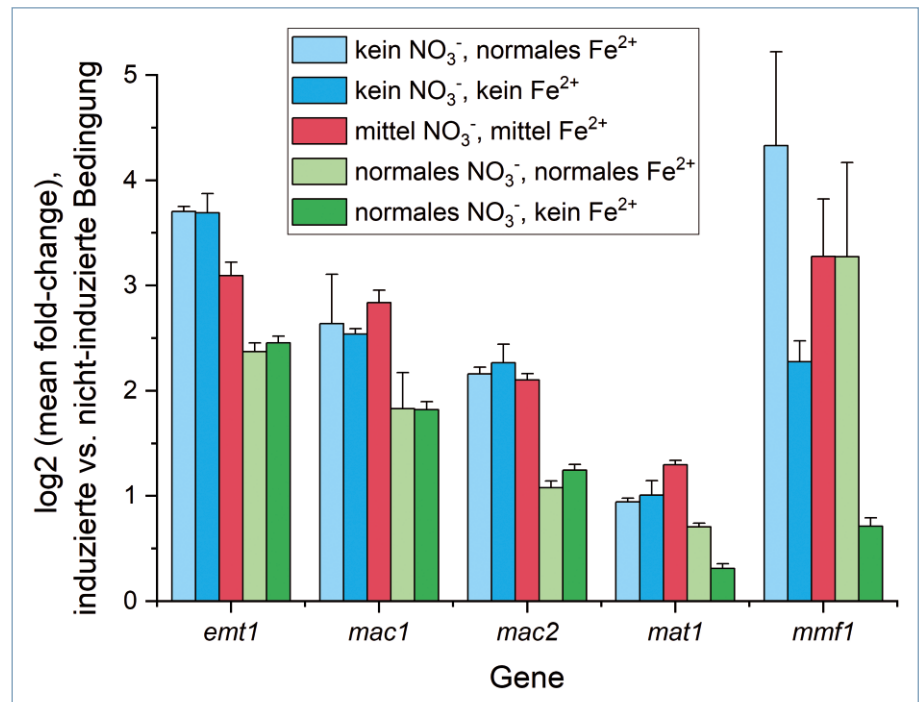
▲ **Abb. 1:** Die kontrollierte Produktion von Mannosylerythritollipiden (MEL) im Bioreaktor wird durch die Fermentation von Zuckern und Pflanzenölen mithilfe von Mikroorganismen aus der Familie der Ustilaginaceae erreicht. Unterschiedliche MEL-Strukturen resultieren aus der Verwendung unterschiedlicher Mikroorganismen. Aufgereinigtes MEL (rechts) besitzt eine honigartige, zäh-viskose Konsistenz.

Einfluss der Mikroorganismen auf die Biotensidstrukturen

Mögliche Produzentenstämme für die MEL-Biosynthese finden sich vor allem in der Familie der Ustilaginaceae (Brandpilzverwandte). Zu dieser Familie zählen sowohl pflanzenparasitische Organismen, wie der Maisbeulenbrand (*Ustilago maydis*) oder der Gerstenflugbrand (*U. nuda*), aber auch nicht-pathogene Pflanzensymbionten. Diese Mikroorganismen sind allgemein dafür bekannt, eine Vielzahl biotechnologisch interessanter Chemikalien zu produzieren. So z. B. verschiedene Polyole, organische Säuren, Eisen-bindende Siderophore und Glykolipide, wie z. B. Cellobioselipide oder eben MEL [3].

Für die MEL-Produktion besonders interessant sind die nicht-pathogenen, hefeartig wachsenden Spezies wie *Moesziomyces*, *Ustilago* oder *Sporisorium*, die früher unter dem Namen *Pseudozyma* zusammengefasst wurden [4]. Als Substrate für die Herstellung können unterschiedliche Zucker und vor allem Pflanzenöle eingesetzt werden. Ein großer Vorteil bei mikrobiell hergestellten Tensiden ist die Verwendung heimischer Pflanzenöle, wie z. B. Raps- oder Sonnenblumenöl, während für die chemische Synthese biobasierter Tenside oft tropische Öle, wie Kokos- oder Palmkernöl, verwendet werden.

Wie kürzlich von unserer Arbeitsgruppe gezeigt, unterscheiden sich die gebildeten MEL-Strukturen je nach verwendetem Produktionsorganismus und ggf. auch Substrat [5]. Durch die Kombination dreier Analysemethoden – Dünnschichtchromatographie, MALDI-TOF-Massenspektrometrie und Gaschromatographie – konnten die zugrunde liegenden Strukturen aufgeklärt werden. Hierbei gibt es zwischen den Organismen sowohl Unterschiede im Grad der Acetylierung, was in einem unterschiedlichen Verhältnis der Varianten MEL-A, -B, -C und -D resultiert, aber auch in der Kettenlänge der Fettsäurereste, die jeweils spezifisch für einen Mikroorganismus sind (**Abb. 1**). Darüber hinaus konnten auch seltene Varianten gefunden werden, bei denen im hydrophilen Teil der Erythritolrest durch Mannitol ausgetauscht wurde. Durch die Wahl des Ölsubstrats können ebenfalls noch kleine Modifikationen in den Fettsäureketten, wie z. B. zusätzliche Doppelbindungen oder Hydroxylgruppen, eingebracht werden. Insgesamt steht somit ein Baukasten zur Verfügung, mit dem ein gewünschtes MEL-Produkt durch Kombination aus Mikroorganismus und Sub-



▲ **Abb. 2:** Differenzielle Genexpression der für die MEL-Synthese (*emt1*, *mac1*, *mac2*, *mat1*) und den MEL-Transport (*mmf1*) verantwortlichen Enzyme. Verglichen wurde jeweils die Expression unter induzierten (Rapsöl) versus nicht-induzierten Bedingungen (kein Rapsöl) bei unterschiedlichen Konzentrationen an Natriumnitrat (NaNO₃) und Eisen (Fe²⁺).

strat hergestellt werden kann. Für die Zukunft wäre es mit diesem Verständnis außerdem vorstellbar, durch gentechnische Modifikation der Organismen komplett neuartige MEL-Strukturen produzieren zu können.

Genexpression wird durch Nährstofflimitation reguliert

Der verantwortliche Gencluster für die MEL-Synthese besteht aus fünf codierten Enzymen, die vermutlich gemeinsam reguliert werden. Diese sind für die Verknüpfung des Zuckerbausteins (Emt1) und der verschiedenen hydrophoben Reste (Mac1, Mac2, Mat1) sowie den Export aus der Zelle (Mmf1) zuständig. Für den Produktionsorganismus *Moesziomyces aphidis* konnten wir zeigen, dass die MEL-Synthese bei Vorhandensein eines Pflanzenöls stark induziert wird [6]. Neben vielen weiteren Stoffwechselwegen wurden vier der fünf Gene des MEL-Clusters im Vergleich zur Kontrolle ohne Öl überexprimiert.

Neuere Ergebnisse deuten außerdem darauf hin, dass eine Nährstofflimitation, hervorgerufen z. B. durch den Verbrauch von Stickstoff, vorteilhaft für die MEL-Biosynthese ist. In einem Experiment wurde jeweils die differenzielle Genexpression der fünf MEL-

Gene bei verschiedenen Konzentrationen an Natriumnitrat und Eisen (normal, halb und null) mittels qPCR in Mehrfachbestimmung untersucht. Zur Induktion wurde Rapsöl verwendet. Als Referenz diente jeweils die vergleichbare Bedingung ohne Öl. Alle fünf untersuchten Gene wurden bei induzierten Bedingungen (Rapsöl) stärker exprimiert als in der jeweiligen Referenz, ausgedrückt im *mean fold-change*. Die relative Expression der vier für die Synthese verantwortlichen Gene (*emt1*, *mac1*, *mac2* und *mat1*) wurde zudem von der Stickstoffkonzentration beeinflusst, wobei bei Stickstofflimitation die höchste Expression zu verzeichnen war. Die Eisenkonzentration hatte keinen Einfluss auf diese vier Gene. Das Transporter-Gen (*mmf1*) hingegen war sowohl abhängig von der Eisen- als auch der Stickstoffkonzentration, wobei die stärkste Expression hier bei hoher Eisenkonzentration und gleichzeitiger Stickstofflimitation zu verzeichnen war (**Abb. 2**). Es konnte somit gezeigt werden, dass zur optimalen Produktion und einem effizienten Export der MEL aus der Zelle neben dem Pflanzenölsubstrat eine Stickstofflimitation und hohe Eisenkonzentration zur Induktion vorteilhaft ist.

Außerdem konnte bei weiteren Experimenten beobachtet werden, dass bei Vorhan-

densein einer Stickstoffquelle zudem die Biomassebildung gegenüber der MEL-Produktion bevorzugt wurde, was ebenfalls für die Notwendigkeit einer Stickstofflimitation spricht.

Vom Labor bis zum industriellen Prozess

Basierend auf diesen Forschungsergebnissen werden in unserem Labor aktuell Fermentationsversuche im Bioreaktor mit ausgewählten Mikroorganismen durchgeführt und die Prozesse individuell optimiert. Die Auswahl der Mikroorganismen erfolgte nach der Art der gebildeten MEL-Strukturen und der produzierten Produktkonzentrationen, die sich im Bereich von 10–40 Gramm pro Liter bewegen.

Anschließend sollen diese Prozesse verfahrenstechnisch charakterisiert und modelliert werden, um sie in einer weiteren Phase auf den Pilotmaßstab zu skalieren. Dies ist die Voraussetzung dafür, dass MEL-Biotenside in der Zukunft auch industriell produziert werden können.

Danksagung

Die Autoren danken Rouven Wolf und Stella Radermacher für die Unterstützung bei den qPCR-Experimenten. Die Arbeiten von Alexander Beck wurden durch das Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst des Landes Baden-Württemberg (7533-10-5-85B) im Rahmen des BW-ForWerts-Graduiertenprogramms gefördert. ■

Literatur

- [1] FNR (2019) Basisdaten biobasierte Produkte 2019. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (FNR), Gülzow-Prützen
- [2] Morita T, Fukuoka T, Imura T et al. (2013) Production of mannosylerythritol lipids and their application in cosmetics. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:4691–4700
- [3] Paulino BN, Pessoa MG, Molina G et al. (2017) Biotechnological production of value-added compounds by *ustilaginomycetous* yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:7789–7809
- [4] Wang QM, Begerow D, Groenewald M et al. (2015) Multigene phylogeny and taxonomic revision of yeasts and related fungi in the *Ustilaginomycotina*. *Stud Mycol* 81:55–83
- [5] Beck A, Haitz F, Grunwald S et al. (2019) Influence of microorganism and plant oils on the structure of mannosylerythritol lipid (MEL) biosurfactants revealed by a novel thin layer chromatography mass spectrometry method. *J Ind Microbiol Biotechnol* 46:1191–1204
- [6] Günther M, Grumaz C, Lorenz S et al. (2015) The transcriptomic profile of *Pseudozyma aphidis* during production of mannosylerythritol lipids. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:1375–1388

Funding: Open Access funding provided 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>.



Alexander Beck und Susanne Zibek

Korrespondenzadresse:

Alexander Beck
Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und
Plasmatechnologie (IGVP)
Universität Stuttgart
Nobelstraße 12
D-70569 Stuttgart
alexander.beck@igvp.uni-stuttgart.de

Dr.-Ing. Susanne Zibek
Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und
Bioverfahrenstechnik (IGB)
Nobelstraße 12
D-70569 Stuttgart
susanne.zibek@igb.fraunhofer.de