

Weißer Biotechnologie

Vitamin B₂-Produktion: nachhaltig und wirtschaftlich dank neuer Technologien

BIRGIT HOFF

WHITE BIOTECHNOLOGY RESEARCH, BASF SE, LUDWIGSHAFEN

VAAM-Innovationspreis 2021

Among chemicals, vitamin B₂ is one of the best examples to show the development from early strain improvement via classical mutagenesis to modern metabolic engineering approaches. Within less than 15 years, a complete shift from chemical to exclusive biotechnological production was achieved resulting in a more sustainable and cost-efficient process. Optimization potential is still seen via rational strain improvement as well as bioprocess engineering.

DOI: 10.1007/s12268-021-1637-x
© Springer-Verlag GmbH 2021

Während der letzten Jahrzehnte führte eine steigende Nachfrage dazu, dass Vitamin B₂ (Riboflavin) als essenzielles wasserlösliches Vitamin eines der wichtigsten biotechnologisch hergestellten Produkte ist. Bereits in den 1930er-Jahren gelang die Aufklärung der molekularen Struktur des Vitamin B₂, das die Vorstufe für die Flavin-Ko-Enzyme bildet, die ihrerseits eine zentrale Rolle im Stoffwechsel von Lebewesen spielen (Abb. 1, [1]). Beim Menschen ist ein Vitamin B₂-Mangel mit Hautläsionen, einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und Störungen des Wachstums verbunden. Auch Tiere reagieren mit verlangsamtem Wachstum, schlechterer Nahrungsverwertung und Diarrhö. Damit ist zu erklären, dass 70 Pro-

zent des weltweit produzierten Vitamin B₂ als Futtermitteladditiv dienen, während 30 Prozent als Lebensmittelzusatz, Farbstoff (E101) oder in der Pharmaindustrie verwendet werden (Abb. 1). Der globale Markt für Vitamin B₂ hat sich von 4000 t/a im Jahr 2002 auf 9000 t/a im Jahr 2015 verdoppelt [2].

Von der Chemie zu Biotechnologie und mehr Nachhaltigkeit

Vitamin B₂ ist eines der besten Beispiele für den erfolgreichen Einsatz der Biotechnologie. Hier wurde der Wechsel von der chemischen Synthese zu einer ausschließlich biotechnologischen Produktion in weniger als 15 Jahren realisiert. Lange Zeit wurde Vitamin B₂ durch eine mehrstufige chemische Synthese ausgehend von Glucose produziert [3]. Schnell zeigten sich aber Nachteile mit geringer Ausbeute von nur 60 Prozent durch additive Verluste in den Syntheseschritten, der Nutzung von toxischen Einsatzstoffen, wie beispielsweise Amalgam, und damit auch der Produktion von Abfallprodukten, die eine

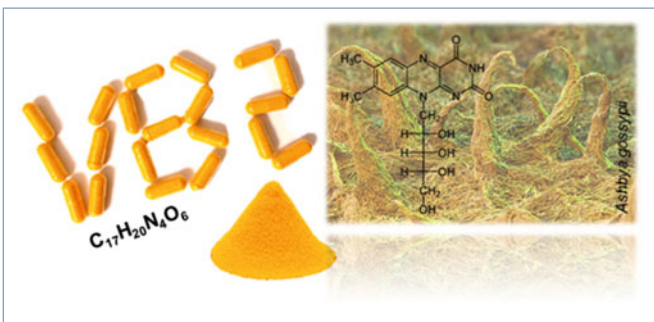
spezielle Entsorgung erforderlich machten (Abb. 2A).

Aufgrund dessen starteten bereits 1940 erste Versuche, Vitamin B₂ mittels Fermentation zu produzieren. Mit dem Einstieg von Merck 1974 und der Nutzung des pilzlichen Produktionsorganismus *Ashbya gossypii* wurde die mikrobielle Route immer attraktiver. Unter Nutzung des pilzbasierten Systems mit pflanzlichem Öl als Hauptkohlenstoffquelle führte BASF bereits 1990 die Vitamin B₂-Fermentation im industriellen Maßstab ein. Nach nur sechs Jahren paralleler chemischer und fermentativer Produktion wurde die chemische Synthese komplett eingestellt. Auch andere Hersteller stellten auf eine ausschließlich fermentative Produktion um, jedoch unter Verwendung des Bakteriums *Bacillus subtilis* und Glucose als Einsatzstoff [4].

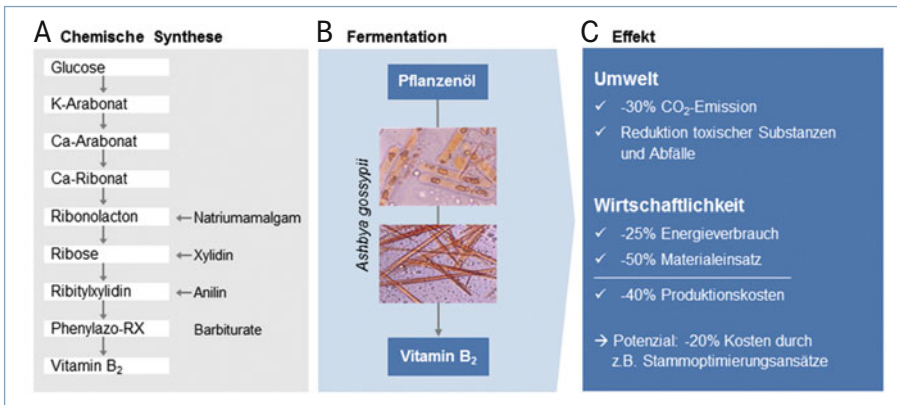
Eine umfangreiche Ökoeffizienzanalyse der BASF zeigte, dass der fermentative Prozess deutlich nachhaltiger als der petrochemische Weg ist [5]. Neben den ökologischen Vorteilen durch den Wegfall toxischer Einsatzstoffe sowie einer um 30 Prozent reduzierten CO₂-Emission ist der fermentative Prozess zudem deutlich kosteneffizienter [5]. Durch einen halbierten Materialeinsatz, einen ca. 25 Prozent geringeren Energieverbrauch sowie eine verringerte Abfallentsorgung konnten die Produktionskosten um ca. 40 Prozent reduziert werden (Abb. 2). Die Analysen rechnen mit einem Optimierungspotenzial des fermentativen Prozesses von bis zu 20 Prozent, was beispielsweise durch Stammentwicklung mit einer Erhöhung von Ausbeute und Titer erzielt werden kann [5].

Stammentwicklung – klassische Mutagenese bis rationales Stammdesign

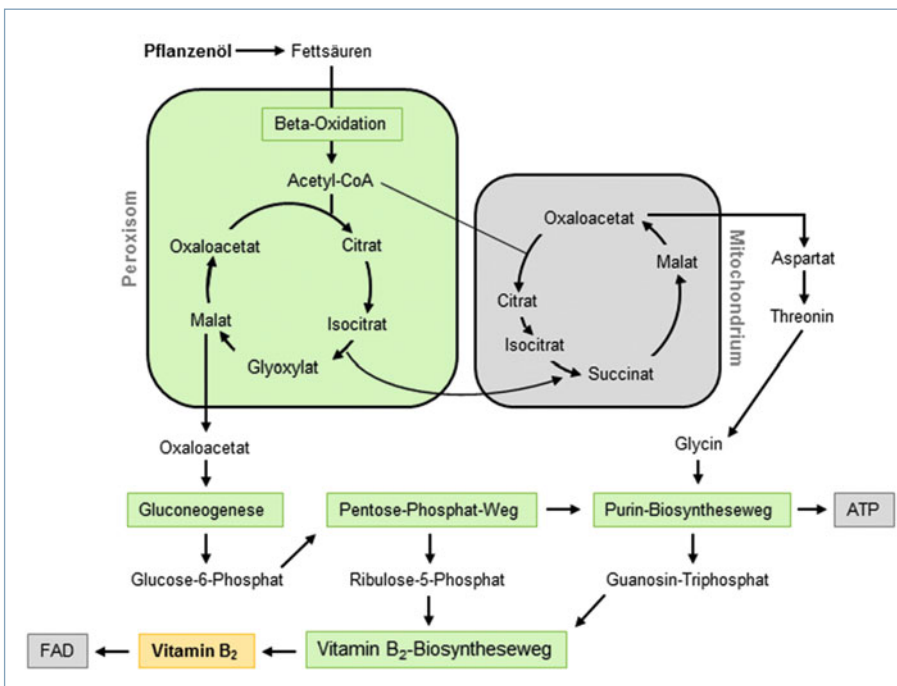
Seit der Umstellung auf eine fermentative Vitamin B₂-Produktion generieren umfangreiche Stammentwicklungsprogramme mit Kombinationen aus klassischer und rationaler Mutagenese immer neue verbesserte Vitamin B₂-Produktionsstämme (Übersicht s. [1, 2, 4]).



▲ **Abb. 1:** Vitamin B₂ wird als essenzielles Nahrungsergänzungsmittel für Mensch und Tier alltäglich eingesetzt. Einer der Hauptproduzenten im fermentativen Herstellungsverfahren ist der Pilz *Ashbya gossypii*.



▲ **Abb. 2:** Ökoeffizienzanalysen der Vitamin B₂-Produktion: Die Umstellung der mehrstufigen chemischen Synthese (A) zu einem biotechnologischen Verfahren basierend auf Pflanzenöl und dem Einsatz des pilzlichen Produktionsstamms *Ashbya gossypii* (B) resultiert in einer nachhaltigen Vitamin B₂-Produktion mit verbesserten ökologischen Bedingungen sowie einer erhöhten Wirtschaftlichkeit (C). *A. gossypii*-Stämme produzieren während des fermentativen Prozesses große Mengen Vitamin B₂, das kristallin in der Fermentationsbrühe akkumuliert.



▲ **Abb. 3:** Schematische Darstellung der Vitamin B₂-Biosynthese und ihrer Kompartimentierung in *Ashbya gossypii*. Extrazellulär sekretierte Lipasen bauen pflanzliches Öl zu Glycerin und Fettsäuren ab. Letztere werden durch die in den Peroxisomen stattfindende Betaoxidation und den Glyoxylatzyklus metabolisiert. Der in den Mitochondrien lokalisierte Citratzyklus stellt Glycin bereit. Letztlich erfolgt dann über die im Cytosol ablaufenden Stoffwechselwege der Gluconeogenese, des Pentose-Phosphat-Wegs, der Purin- und terminalen Vitamin B₂-Biosynthese die Bildung des finalen Produkts. Für eine optimale Produktion ist ein kombinatorisches Feintuning mehrerer Stoffwechselwege notwendig: Alle grün gekennzeichneten Stoffwechselwege sollten verstärkt, alle grau markierten Wege reduziert werden. ATP: Adenin-Triphosphat; FAD: Flavin-Adenin-Dinucleotid.

Erste rationale Stammoptimierungen mittels *metabolic engineering* starteten in den industriell genutzten Produzenten *A. gossypii* und *B. subtilis* mit der Modifikation des terminalen Vitamin B₂-Biosynthesewegs, in dem Vitamin B₂ ausgehend von den zwei

direkten Vorläufermolekülen, Ribulose-5-Phosphat und Guanosintriphosphat, gebildet wird (Abb. 3). Um die Produktivität zu erhöhen, wurden multiple Kopien des RIB(Riboflavin)-Operons in das *B. subtilis*-Genom integriert und native gegen starke

konstitutive Promotoren ersetzt. Analoge Ansätze führten wir mit *A. gossypii* durch, indem die sechs terminalen Biosynthesegene als synthetische Gencluster assembliert und mittels homologer Rekombination genomisch integriert wurden. Die zur Selektion verwendeten Marker wurden anschließend durch Rekombination recycelt [1, 2, 4]. So konnten Stämme mit hoher genetischer Stabilität während des Fermentationsprozesses generiert werden, was eine wichtige Voraussetzung für den erfolgreichen Transfer vom Labor- in den Produktionsmaßstab ist. Für industrielle *A. gossypii*-Stämme werden Produkttiter von bis zu 20 g/l beschrieben [6].

Weitere Stammentwicklungen fokussieren auf einer optimierten Bereitstellung der Vorläufermoleküle. Dieses wird zum einen durch Erhöhung des Kohlenstoffflusses durch den Pentose-Phosphat-Weg versucht, zum anderen durch Verstärkung des Purin- und Glycinbiosynthesewegs. In *B. subtilis* erfolgte die direkte Überexpression der Purin-Operons sowie verschiedener Gene des Pentose-Phosphat-Wegs und der Gluconeogenese. Es wurden finale Produkttiter von 17 g/l bis 27 g/l nach 70 Stunden Fermentationszeit berichtet [7]. In *A. gossypii* wurde neben der Bereitstellung von Vorstufen auch an der effizienten Ölverstoffwechslung im Prozess gearbeitet. So konnten wir zeigen, dass eine simultane Überexpression von Genen der Betaoxidation und der Fettsäureaufnahme zu einem bis zu zehnzehnjährigen Anstieg der Vitamin B₂-Produktion im Vergleich zum entsprechenden Referenzstamm führt [8]. Mit diesem Beispiel wird deutlich, dass eine Optimierung der industriellen Produktionsstämme eines kombinatorischen Feintunings und damit einer parallelen Modifikation zentraler Stoffwechselwege bedarf (Abb. 3). So können wir erfolgreich verbesserte Stämme für den direkten Einsatz in die Produktion generieren und ökonomische Ziele, wie die weitere Reduktion der Produktionskosten, realisieren.

Stammentwicklung 2.0 – Einsatz neuer Technologien

Die traditionellen Strategien des *metabolic engineering* wurden durch die Anwendung neuer *Omics*-Methoden weiterentwickelt. So konnten metabolische Engpässe und Schlüsselstellen sowie neue regulatorische Systeme in den Produktionsorganismen identifiziert werden [1]. 2014 wurde das erste manuell kuriierte metabolische *A. gossypii*-Genommodell als Basis genutzt, um Transkriptomdaten der Wachstums- und Produktions-

phase zu analysieren. Es zeigten sich Reaktionen, die einen korrelierten Anstieg im Expressionslevel, aber auch metabolischen Fluss aufwiesen. Neben den bekannten Wegen, wie der der Betaoxidation, konnten so bisher noch nicht analysierte, aber für die Vitamin B₂-Synthese relevante Wege identifiziert werden, die beispielsweise an der Aufnahme extrazellulärer Aminosäuren und Nukleoside beteiligt sind [9].

Diese stellen potenzielle Ziele für weitere Stammentwicklungsansätze dar, weil in industriellen Fermentationsprozessen oft komplexe Einsatzstoffe wie Hefeextrakt oder hydrolysiertes Pflanzenprotein genutzt werden. Sie sind zumeist kostengünstig und können Wachstum und Produktivität durch das Einbringen zusätzlicher Nährstoffe in den Prozess steigern. Allerdings erschweren sie die Fermentationsanalytik, wodurch präzise Prozessbilanzierungen und die Identifikation neuer Ziele für die Stamm- und Prozessoptimierung zur Herausforderung werden.

Kürzlich gelang erstmals ein tiefer Einblick in den Metabolismus von *A. gossypii* in der Gegenwart von Hefeextrakt. Eine Kombination aus 13C-Tracer-, Gaschromatographie/Massenspektroskopie(MS)- und Flüssigchromatographie/MS-Analysen sowie 1-D- und 2-D-NMR-Spektroskopie ermöglichte es, den Kohlenstofffluss in die Biomasse und Vitamin B₂-Synthese unter industriell relevanten Bedingungen aufzulösen. Dabei zeigte sich, dass der C1-Metabolismus ein signifikanter Engpass während der initialen Vitamin B₂-Produktionsphase ist. Basierend auf den Ergebnissen konnte durch eine gezielte zeitliche Fütterung von Formiat und Serin deren intrazelluläre Verfügbarkeit gesteigert werden, was den finalen Vitamin B₂-Titer nahezu verdoppelte [10].

Neben besseren Analysemethoden ist die Weiterentwicklung genetischer Werkzeuge,

wie beispielsweise CRISPR-basierten Technologien, zur effizienteren Stammoptimierung unerlässlich. So entwickelten wir für *A. gossypii* ein vektorbasiertes CRISPR/CAS9- und CRISPR/CPF1-System, mit dem multiple Modifikationen in einem Transformationsansatz ohne nachgeschaltetes Markerrecycling eingebracht werden konnten [11]. Damit bietet sich die Möglichkeit des schnellen kombinatorischen Feintunings, d. h. mehrere Gene parallel in ihrer Aktivität gezielt zu modifizieren. Diese Anwendung wurde bereits für *B. subtilis* am Beispiel der Vitamin B₂-Biosynthesegene publiziert [12]. Eine konstante Verbesserung der genetischen Toolbox sowie der Analysemethoden ist entscheidend für eine immer schnellere und maßgeschneiderte Weiterentwicklung der Stämme, die den steigenden globalen regulatorischen Anforderungen entsprechen. ■

Literatur

- [1] Schwachheimer SK, Park EY, Revuelta JL et al. (2016) Biotechnology of riboflavin. *Appl Microbiol Biotechnol* 100: 2107–2119
- [2] Hoff B, Plassmeier J, Blankschien M et al. (2020) Unlocking nature's biosynthetic power – metabolic engineering for the fermentative production of chemicals. *Angew Chem Int Ed* 59: 2–23
- [3] Wolf R, Reiff F, Wittmann R et al. (1983) Process for the preparation of riboflavin. Europäisches Patentamt, Veröffentlichungsnummer EP0020959 B1
- [4] Revuelta JL, Ledesma-Amaro R, Lozano-Martinez P et al. (2017) Bioproduction of riboflavin: a bright yellow history. *J Ind Microbiol Biotechnol* 44: 659–665
- [5] Saling P (2005) Eco-efficiency analysis of biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 68: 1–8

- [6] Sahn H, Antranikian G, Stahmann KP et al. (2013) Riboflavin (Vitamin B₂). In: Sahn H, Antranikian G, Stahmann KP, Takors R (Hrsg.) *Industrielle Mikrobiologie*. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 132–140
- [7] Lee KW, Park YH, Han JK et al. (2004) Microorganism for producing riboflavin and methods for producing riboflavin using the same. United States Patent Application Publication, Publication Number US 2004/0110249 A1
- [8] Hoff B, Molt A, Haefner S et al. (2015) Over-expression of a fatty acid transporter gene and of genes encoding enzymes of the beta-oxidation pathway for higher production of riboflavin via fermentation of *Eremothecium*. WIPO, Publication Number WO/2015/086427
- [9] Ledesma-Amaro R, Kerkhoven EJ, Revuelta JL (2014) Genome scale metabolic modeling of the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii*. *Biotechnol Bioeng* 111: 1191–1199
- [10] Schwachheimer KS, Becker J, Peyrigab L et al. (2018) Improved riboflavin production with *Ashbya gossypii* from vegetable oil based on 13C metabolic network analysis with combined labeling analysis by GC/MS, LC/MS, 1D, and 2D NMR. *Metab Eng* 47: 357–373
- [11] Jiménez A, Hoff B, Revuelta JL (2020) Multiplex genome editing in *Ashbya gossypii* using CRISPR-Cpf1. *New Biotechnol* 57: 29–33
- [12] Liu D, Huang C, Guo J et al. (2019) Development and characterization of a CRISPR/Cas9n-based multiplex genome editing system for *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Biofuels* 12: 197

Korrespondenzadresse:

Dr. Birgit Hoff
White Biotechnology Research
BASF SE
Carl-Bosch-Straße 38
D-67056 Ludwigshafen
birgit.hoff@basf.com

AUTORIN



Birgit Hoff

Biologiestudium an der Universität Bochum. 2004 Promotion am Lehrstuhl für Allgemeine und Molekulare Botanik der Universität Bochum bei Prof. Dr. U. Kück, anschließend Postdoc und Projektleiterin im Christian-Doppler-Labor „Fungal Biotechnology“. 2010 Wechsel in die Forschung im Bereich der Weißen Biotechnologie der BASF SE in Ludwigshafen, dort Senior Principal Scientist und Projektleiterin. 2021 VAAM-Innovationspreis.