

Autori prijave: Tanja Gerharz, **Bruno Zelić**, Ralf Takors, Michael Bott

Naziv patenta: Method and micro-organisms for the microbial production of pyruvate from carbohydrates and alcohols/Metoda i mikroorganizmi za mikrobiološku proizvodnju piruvata iz ugljikohidrata i alkohola

Oznaka patenta: DE10220234 (A1), DE10220234 (B4), WO03093488 (A1)

Država u kojoj je zatražena patentna prijava: R. Njemačka

Datum podnošenja prijave: 17. 4. 2003.

Kratki opis patentne prijave:

Izum se odnosi na metodu i mikroorganizme za mikrobiološku proizvodnju piruvata iz ugljikohidrata i alkohola. Postojeći kemijski procesi i metode za proizvodnju piruvata su tehnički složeni i skupi. Osnovni nedostaci postojećih bioloških procesa su da se korišteni supstrati ne mogu 100 % konvertirati u piruvat što značajno smanjuje iskorištenje na produktu. Dodatno, složen sustav regulacije koncentracije vitamina je nužan u procesu mikrobiološke proizvodnje piruvata iz glukoze. Ova inovativna metoda i mikroorganizmi omogućuju mikrobiološku proizvodnju piruvata s praktički 100 %-tnom konverzijom supstrata. Intenzifikacija procesa proizvodnje piruvata može se postići upotrebom mikroorganizama koji su genetski modificirani, odnosno kojima je brisana, umetnuta i / ili smanjena ekspresija sekvence gena *ldhA* koji kodira enzim laktat dehidrogenazu.

METODA I MIKROORGANIZMI ZA MIKROBIOLOŠKU PROIZVODNJU PIRUVATA IZ UGLJIKOHIDRATA I ALKOHOLA

Bruno Zelić, član Odjela kemijskog inženjerstva, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, bzelic@fkit.hr

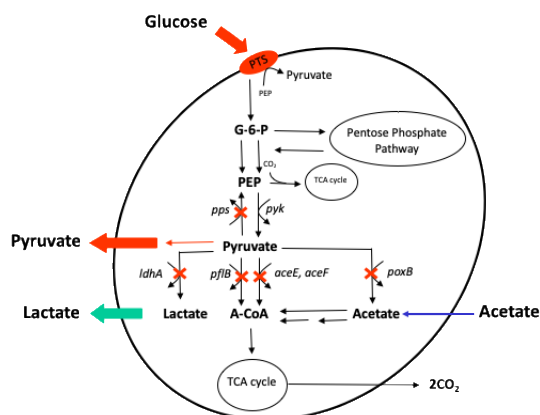
Sažetak: Izum se odnosi na metodu proizvodnje piruvata fermentacijom. Intenzifikacija procesa proizvodnje piruvata iz glukoze i acetata postignuta je upotrebom genetski modificirane i na antibiotik kanamicin rezistentne *Escherichia coli* YYC202 *ldhA::Kan*.

1. Uvod

Kao rezultat provedbe procesa proizvodnje piruvata iz glukoze i acetata pomoću genetski modificirane *Escherichia coli* YYC202 dobivena je visoka koncentracija piruvata u reakcijskoj smjesi uz istovremeno nisko iskorištenje na glukozi i visoku koncentraciju sporednog produkta, laktata. Ovo je zahtjevalo daljnji rad na razvoju mikroorganizma u smislu razvoja genetski modificirane *Escherichia coli* kojoj je brisana, umetnuta i / ili smanjena ekspresija sekvence gena *ldhA* koji kodira enzim laktat dehidrogenazu. Uz to, a kako bi se spriječila kontaminacija novo razvijenog mikroorganizma tijekom dugotrajnih industrijskih fermentacijskih procesa, napravljena je dodatna genetska modifikacija kojom je dobivena na antibiotik rezistentna *Escherichia coli* YYC202 *ldhA::Kan*.

2. Opis patentne prijave

Dodatna intenzifikacija procesa proizvodnje piruvata iz glukoze postignuta je upotrebom genetski modificirane *Escherichia coli* YYC202 *ldhA::Kan*. *Escherichia coli* YYC202 *ldhA::Kan* je mikroorganizam kojemu je smanjena ekspresija nukleotidnih sekvenci koje kodiraju enzime piruvat-dehidrogenazu, piruvat-dekarboksilazu, piruvat-feredoksin-oksidoireduktazu, piruvat flavodoksin-oksidoireduktazu, piruvat formiat-lijazu, fosfoenolpiruvat sintetazu, piruvat oksidazu i / ili laktat dehidrogenazu kako je to pojednostavljeno prikazano na slici 1.



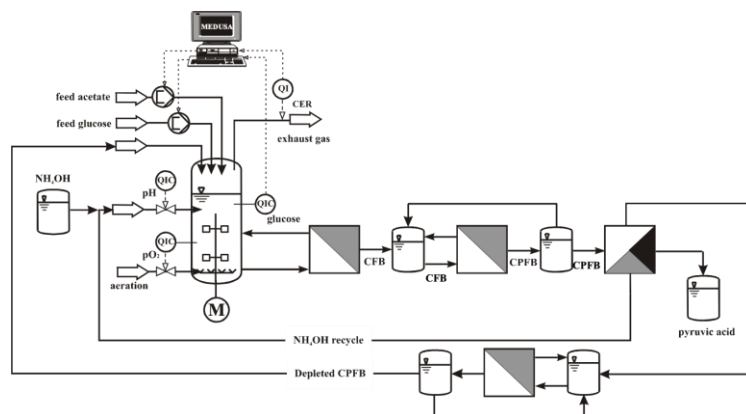
Slika 1. Pojednostavljeni prikaz metaboličkih puteva u genetski modificiranoj *Escherichia coli* YYC202 *ldhA::Kan*

Primjenom genetski modificirane *Escherichia coli* YYC202 *ldhA::Kan* proveden je niz pokusa proizvodnje piruvata u kotlastom laboratorijskom reaktoru s dotokom za koji je ranije osmišljen inovativni sustav doziranja dvaju supstrata, glukoze i acetata. U odnosu na isti pokus proveden s genetski modificiranom *Escherichia coli* YYC202, gdje je

postignuta konačna koncentracija piruvata, $c = 500 \pm 20 \text{ mmol dm}^{-3}$, uz relativno nisko iskorištenje piruvata na glukozi, $Y = 40 \%$ te visoku koncentracijom sporednog produkta, laktata, pri provedbi pokusa s genetski modificiranom *Escherichia coli* YYC202 IdhA::Kan postignuta je znatno veća koncentracija piruvata, $c = 700 \pm 22 \text{ mmol dm}^{-3}$, uz veće iskorištenje piruvata na glukozi, $Y = 53 \%$ te zanemarivu koncentraciju sporednog produkta, laktata.

U svrhu daljnje intenzifikacije procesa proizvodnje piruvata u istoj reaktorskoj konfiguraciji proveden je ponovljivi proces koji je rezultirao povećanjem iskorištenja piruvata na glukozi koje je iznosilo, $Y = 85 \%$. Osim ovoga, provedena je proizvodnja piruvata i u kotlastom protočnom reaktoru s povratnim tokom biomase što je rezultiralo iskorištenjem piruvata na glukozi koje je iznosilo, $Y = 62 \%$.

Kao konačno procesno rješenje razvijen je potpuno integrirani proces proizvodnje piruvata koji je pojednostavljeno prikazan na slici 2.



Slika 2. Pojednostavljeni shematski prikaz laboratorijskog, potpuno integriranog procesa proizvodnje piruvata

Ovim procesnim rješenjem proizvodnja piruvata genetski modificiranom *Escherichia coli* YYC202 IdhA::Kan u bioreaktoru integrirana je sa separacijom piruvata od ostalih komponenata reakcijske smjese. U svrhu provedbe procesa separacije proizvodnji u bioreaktoru su dodani procesi separacije pri čemu su upotrijebljeni mikro i ultrafiltracijski procesi te elektrodijaliza što je rezultiralo konačnom koncentracijom pročišćenog piruvata, $c = 900 \pm 30 \text{ mmol dm}^{-3}$, uz relativno nisko iskorištenje piruvata na glukozi, $Y = 60 \%$ te zanemarivu količinu sporednog produkta, laktata.

3. Zaključak

Razvijen je potpuno integrirani proces proizvodnje i separacije piruvata iz glukoze i acetata pomoću genetski modificirane *Escherichia coli* YYC202 IdhA::Kan pri čemu je postignuta koncentracija pročišćenog piruvata, $c = 900 \pm 30 \text{ mmol dm}^{-3}$, uz relativno nisko iskorištenje piruvata na glukozi, $Y = 60 \%$ te zanemarivu količinu sporednog produkta, laktata.

4. Literatura

- Gerharz, Tanja; Zelić, Bruno; Takors, Ralf; Bott, Michael. Produktion von Pyruvat aus Glucose mit *Escherichia coli*. Biokatalyse, U ur.: Heiden, Stefanie; Erb, Rainer, Spektrum akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, pp 29-33, 2001
- Zelić, Bruno; Gerharz, Tanja; Bott, Michael; Vasić-Rački, Đurđa; Wandrey, Christian; Takors, Ralf. Fed-batch process for pyruvate production by recombinant *Escherichia coli* YYC202 strain. Chemical Engineering and Technology, Engineering in Life Sciences, 3 (2003) 299-305
- Zelić, Bruno; Gostović, Srđan; Vuorilehto, Kai; Vasić-Rački, Đurđa; Takors, Ralf. Process strategies to enhance pyruvate production with recombinant *Escherichia coli*: From repetitive fed-batch to *in situ* product recovery with fully integrated electrodialysis. Biotechnology and Bioengineering, 85 (2004) 638-646
- Zelić, Bruno; Vasić-Rački, Đurđa; Wandrey, Christian; Takors, Ralf. Modeling of the pyruvate production with *Escherichia coli* in a fed-batch bioreactor. Bioprocess and Biosystems Engineering, 26 (2004) 249-258