

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

Naziv patenta: Method for the fermentative production of pyruvate/Metoda za proizvodnju piruvata fermentacijom

Oznaka patenta: DE10129711 (A1), DE10129711 (B4), WO03000913 (A2), WO03000913 (A3)

Država u kojoj je zatražena patentna prijava: R. Njemačka

Datum podnošenja prijave: 12. 6. 2002.

Kratki opis patentne prijave:

Izum se odnosi na metodu proizvodnje piruvata fermentacijom. Postojeći kemijski procesi i metode za proizvodnju piruvata su tehnički složeni i skupi. Osnovni nedostatci postojećih bioloških procesa su da se korišteni supstrati ne mogu 100 % konvertirati u piruvat što značajno smanjuje iskorištenje na produktu. Intenzifikacija procesa proizvodnje piruvata biološkim metoda može se postići upotrebom mikroorganizama koji su genetski modificirani, odnosno kojima je smanjena ekspresija nukleotidnih sekvenci koje kodiraju enzime piruvat-dehidrogenazu, piruvat-dekarboksilazu, piruvat-ferredoksin-oksidoreduktazu, piruvat flavodoksin-oksidoreduktazu, piruvat formiat-lijazu, fosfoenolpiruvat sintetazu i / ili piruvat oksidazu.

METODA ZA PROIZVODNNU PIRUVATA FERMENTACIJOM

Bruno Zelić, član Odjela kemijskog inženjerstva, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, [bzelic@fkit.hr](mailto:zelic@fkit.hr)

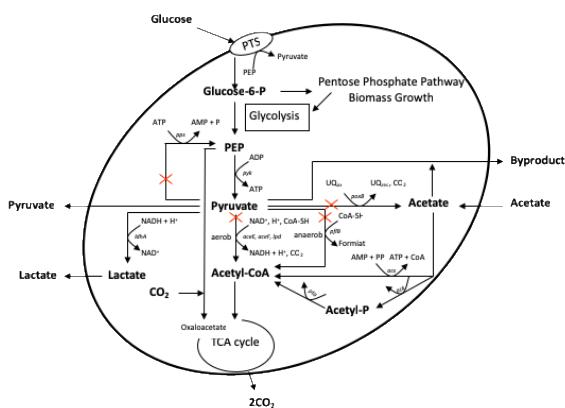
Sažetak: Izum se odnosi na metodu proizvodnje piruvata fermentacijom. Intenzifikacija procesa proizvodnje piruvata iz glukoze i acetata postignuta je upotrebom genetski modificirane *Escherichia coli* YYC202.

1. Uvod

Klasični kemijski način proizvodnje pirogrožđane kiseline je piroliza vinske kiseline uz prisustvo KHSO_4 i teških metala kao katalizatora pri temperaturi 200 °C. U zadnjih dvadesetak godina intenzivirana je primjena čistijih tehnologija u industrijskoj proizvodnji stoga je razvijeno više procesa dobivanja pirogrožđane kiseline upotrebom biokatalizatora. Jedan od tih procesa je dobivanje pirogrožđane kiseline iz glukoze i acetata upotrebom rekombinantne *Escherichia coli* YYC202.

2. Opis patentne prijave

Intenzifikacija procesa proizvodnje piruvata iz glukoze postignuta je upotrebom genetski modificirane *Escherichia coli* YYC202. *Escherichia coli* YYC202 je mikroorganizam kojemu je smanjena ekspresija nukleotidnih sekvenci koje kodiraju enzime piruvat-dehidrogenazu, piruvat-dekarboksilazu, piruvat-ferredoksin-oksidoreduktazu, piruvat flavodoksin-oksidoreduktazu, piruvat formiat-lijazu, fosfoenolpiruvat sintetazu i / ili piruvat oksidazu kako je to pojednostavljeno prikazano na slici 1. Primjenom na ovaj način genetski modificirane *Escherichia coli* YYC202 moguće je glukozu kroz unutarstanične reakcije te uz 100 %-tно iskorištenje konvertirati u piruvat. Kako bi se osigurali nutritivni preuvjeti za rast i održavanje ostalih metaboličkih funkcija genetski modificirane *Escherichia coli* YYC202 potrebno je u reakcijski medij dodati drugi supstrat, odnosno kosupstrat što je u predmetnom slučaju bio acetat.

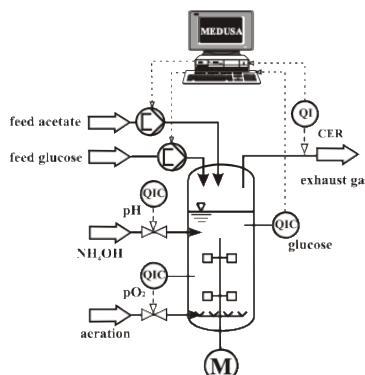


Slika 1. Pojednostavljeni prikaz metaboličkih puteva u genetski modificiranoj *Escherichia coli* YYC202

Primjenom genetski modificirane *Escherichia coli* YYC202 proveden je niz šaržnih pokusa na tresilici te u laboratorijskom kotlastom reaktoru i kotlastom reaktoru s dotokom pri čemu su kao supstrati korišteni glukoza i acetat. Temeljem rezultata provedenih pokusa pokazano je da je do proizvodnje piruvata dolazi i s rastućim i s nerastućim stanicama biomase te da piruvat nastaje isključivo iz glukoze, dok je rast biomase moguć samo uz istodobnu prisutnost glukoze i acetata. Ovime je dokazan da biomasa raste simultano na oba supstrata, odnosno da

nije moguće glukozi konvertirati u piruvat uz 100 %-tno iskorištenje. Osim toga ovim pokusima je ustanovljeno da visoke koncentracije piruvata u mediju imaju za posljedicu inhibiciju rasta biomase, ali i inhibiciju nastajanja samog piruvata. Pokusi provedeni na tresilici rezultirali su niskom konačnom koncentracijom piruvata, $c = 30 \pm 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, uz visoko iskorištenje piruvata na glukozi, $Y = 95\%$ što je neznatno manje od teoretski mogućih 100 %. Kod pokusa provedenih u laboratorijskom reaktoru s dotokom ostvarena je konačna koncentracija piruvata, $c = 30 \pm 5 \text{ mmol dm}^{-3}$, uz smanjenje iskorištenje piruvata na glukozi koje je u ovim pokusima bilo, $Y = 75\%$.

Kako bi se prevladali uočeni nedostatci procesa i povećala konačna koncentracija piruvata u reakcijskoj smjesi do razine koja omogućuje komercijalizaciju, proizvodnja piruvata je provedena u kotlastom laboratorijskom reaktoru s dotokom za koji je osmišljen inovativni sustav doziranja oba supstrata što je pojednostavljen prikazano na slici 2. Doziranje glukoze bilo je temeljeno na *on-line* mjerenu koncentraciju glukoze u reaktoru, dok je doziranje acetata bilo temeljeno na *on-line* mjerenu koncentraciju CO_2 u izlaznoj plinskoj struji. Temeljen izmjerene koncentracije CO_2 u izlaznoj plinskoj procesnoj struji računata je, pomoću u kući razvijenog programskega paketa (MEDUSA, Research Center Juelich, Germany), brzina proizvodnje CO_2 koja je jednaka brzini potrošnje acetata što je potvrđeno neovisnim pokusima.



Slika 2. Pojednostavljeni shematski prikaz laboratorijskog bioreaktora za proizvodnju piruvata sa sustavima za doziranje glukoze i acetata

Primjena ovakvog reaktorskog sustava rezultirala je visokom konačnom koncentracijom piruvata, $c = 500 \pm 20 \text{ mmol dm}^{-3}$, uz relativno nisko iskorištenje piruvata na glukozi, $Y = 40\%$ te visokom koncentracijom sporednog produkta, laktata. Zbog toga je bilo nužno usmjeriti daljnja istraživanja na daljnji razvoj mikroorganizma, odnosno smanjiti ekspresiju nukleotidnih sekvenca koje kodiraju enzim laktat dehidrogenazu.

3. Zaključak

Razvijen je proces proizvodnje piruvata iz glukoze i acetata pomoću genetski modificirane *Escherichia coli* YYC202. Primjenom inovativnih načina vođenja procesa postignute su visoke koncentracije piruvata u reakcijskoj smjesi uz istovremeno nisko iskorištenje na glukozi i visoku koncentraciju sporednog produkta laktata što je zahtjevalo daljnji rad na razvoju mikroorganizma.

4. Literatura

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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