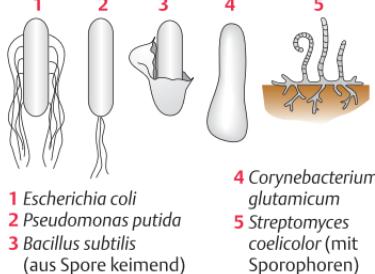


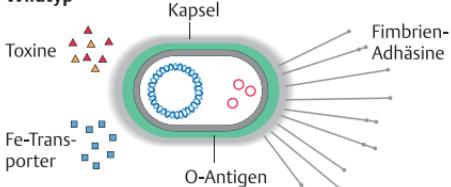
Biotechnologisch wichtige Bakterien



	1	2	3	4	5
Begeißelung	+	+	-	-	-
Gram-Färbung	-	-	+	+	+
Sporenbildung	-	-	+	-	+
aerobes Wachstum	+	+	+	+	+
GC-Gehalt	51	61	44	56	72
Genom-Größe (Mbp)	4,6	6,1	4,2	3,1	8,7

E. coli K12-Wirtsstamm

Wildtyp



E. coli K12



Genfunktion im *E. coli* K12-Genom

gesamt	4364
Enzyme	~1500
Transportproteine	~600
Regulationsproteine	~400
Gene fremder Herkunft	~300
Membranproteine	~250
Strukturproteine	~200
Carrierproteine	~100
RNA-Synthese	~150
Sonstige	~300
unbekannte Funktion	~600

Corynebacterium glutamicum

Corynebacterium glutamicum

Glutaminsäure-Fermentation
Lysin-Fermentation
Threonin-Fermentation

Protoplasten-Fusion

Wirts-Vektor-Systeme
gentechnische Methoden

Genom-Sequenzierung

1950

2000

Genom-Optimierung

gerichtetes metabolic engineering

ungerichtete Mutation und Selektion

Technologien zur Stammentwicklung

Einige vollständig sequenzierte Prokaryoten-Genome (Auswahl)

	Erkrankung	Genomgröße (Mbp)
<i>Haemophilus influenzae</i>	Erkältungen beim Kleinkind	1,8
<i>Helicobacter pylori</i>	Ulkus	1,7
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	bakterielle Lungenentzündung	0,8
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Lungentuberkulose	4,4
<i>Treponema pallidum</i>	Syphilis	1,1
<i>Mycobacterium leprae</i>	Lepra	3,3

Mikroorganismen: Isolierung, Stammhaltung, Sicherheit

Allgemeines. Für die meisten Untersuchungen verwendet man Reinkulturen von Mikroorganismen. Bei biotechnologischen Anwendungen handelt es sich dabei in der Regel um Stämme, die durch Mutation und Selektion für die gewünschte Anwendung optimiert wurden. Man lagert und konserviert sie in Stammsammlungen. Ihre Anzucht erfolgt auf festen oder flüssigen Nährmedien unter sterilen Bedingungen. Die meisten in der Biotechnologie verwendeten Mikroorganismen sind heterotroph und wachsen aerob. Für die Anzucht photosynthetischer Mikroorganismen gibt es spezielle Arbeitsprotokolle unter Licht, für Anaerobier unter O₂-Ausschluss.

Reinkulturen erhält man aus Stammsammlungen oder durch Anreicherung der Mikroorganismen aus ihren natürlichen Standorten (z.B. Boden, Wasser, Lebensmittel, andere Organismen). Die bevorzugte Methode ist ein Verdünnungs-Ausstrich auf sterilem, Nährstoff-haltigem Agar, einem vernetzten Polysaccharid aus Meeresalgen („ausplattieren“). Dabei kann man Einzelkolonien isolieren. Meist wählt man die Wachstumsbedingungen (→88) so, dass der gewünschte Mikroorganismus einen Wachstumsvorteil hat (Selektion) (→24): so kann man bei O₂-freiem Arbeiten unter Licht mit CO₂ als einziger C-Quelle und N₂ als N-Quelle Cyanobakterien anreichern. Mit einem schwach sauren pH-Wert eines Zucker-reichen Mediums isoliert man bevorzugt Pilze, durch erhöhte Bebrütungstemperatur thermophile Mikroorganismen, und durch Zusatz von Casein als einziger organischer N-Quelle Protease-Bildner. Nach Maßgabe der 16S-rRNA-Analytik erfasst man mit diesen Methoden allerdings weniger als 5% der in Wasser und Erdproben vorkommenden Mikroorganismen (→74).

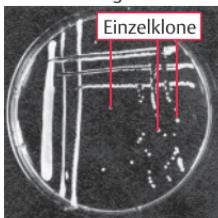
Stammhaltungen dienen der Konservierung von Reinkulturen, die dabei ihre Identität, Lebensfähigkeit und Funktionsfähigkeit behalten müssen. Die konventionelle Methode besteht im regelmäßigen Überimpfen auf Agarplatten oder Schrägar-Röhrchen. Dabei können allerdings genetisch bedingte Degenerationserscheinungen auftreten. Für Typstämme oder wichtige Produktionsstämme bevorzugt man deshalb folgende

Methoden: a) Aufbewahrung unter chemisch inerten Flüssigkeiten, z.B. unter Paraffin (geeignet für Hyphenpilze), b) Einfrieren bei -196 °C und Aufbewahren unter flüssigem N₂ oder bei -70 °C (Tiefkühltruhe); Einfrieren und Auftauen müssen rasch und in Gegenwart von Glycerin oder DMSO erfolgen, um eine Zerstörung der Zellen durch Eiskristalle zu verhindern (diese Methode wird vor allem für Bakterien und Hefen verwendet), c) Eintrocknen von Suspensionen im Vakuum auf Träger (Silicagel, Sand) in Gegenwart eines Emulgators (Magermilch, Serum) und Aufbewahren bei -70 °C. Dabei ist sicherzustellen, dass die Stämme reaktiviert werden können. Weltweit stehen mittlerweile umfangreiche öffentliche Stammsammlungen zur Verfügung, von denen Reinkulturen abgerufen werden können. Sie sind entweder universell (Beispiele: ATCC: American Type Culture Collection; DSMZ: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) oder auf bestimmte Gruppen von Mikroorganismen, z.B. auf Pilze spezialisiert (Beispiel: CBS: Centralbureau voor Schimmelkultuuren). Viele Industrieunternehmen unterhalten umfangreiche eigene Stammsammlungen. Liegt der Wert eines Stamms in einer Plasmid-kodierten Eigenschaft (häufig z.B. bei der Herstellung von Enzym-Mutanten-Bibliotheken), so tritt neben die Stammsammlung die Aufbewahrung von Plasmiden, die als sogenannte „Plasmid-Preps“ bei -20 °C sehr lange gelagert werden (nuclease-frei!) und auch leicht transportiert oder versendet werden können.

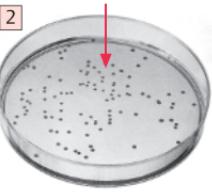
Sicherheit. Jeder Umgang mit Mikroorganismen muss nach den Regeln der biologischen Sicherheit erfolgen (→332), denn schließlich gibt es in nahezu jeder Gattung auch gefährliche Krankheitserreger (Beispiele: *Bacillus subtilis*: harmloser Produzent technischer Enzyme – *Bacillus anthracis*: Milzbranderreger; *Aspergillus oryzae*: Sojasauce-Fermentations – *Aspergillus flavus*: Bildner lebertoxischer, carcinogener Aflatoxine). Mikroorganismen sind in Positiv-Listen vier Risikogruppen zugeordnet. Die Ausstattung der Labors und die Arbeitsrichtlinien entsprechen dem biologischen Risiko. Zur Risikogruppe 1 zählen vor allem solche Mikroorganismen, die seit alters her zur Nahrungsmittel-Herstellung eingesetzt werden, z.B. Backhefe. Die meisten biotechnologisch verwendeten Mikroorganismen gehören in diese Gruppe.

Reinkulturen

1 Verdünnungsausschlag auf Nähragar



Überimpfen von Einzelkolonien auf Nähragar: Reinkultur

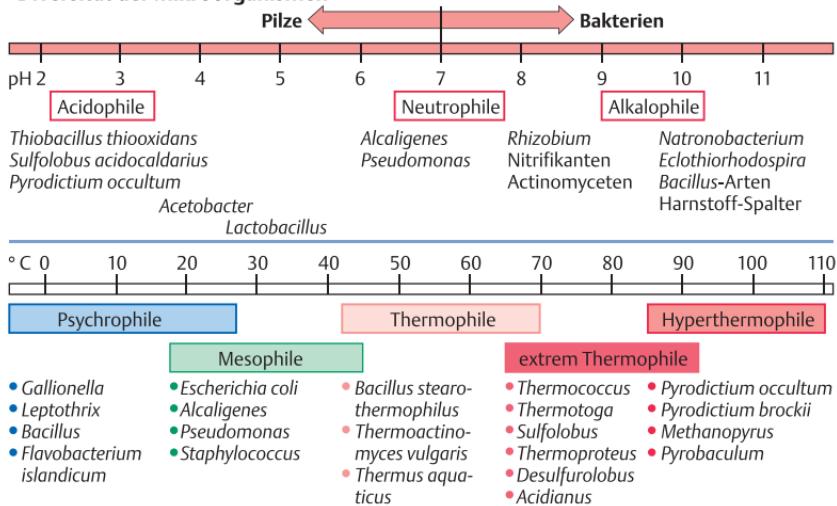


Anreicherungskulturen (Beispiele)

Bakterien	Energiequelle, Nährstoffe
phototroph Rhodospirillen	● Licht, H ₂ oder org. Säuren, CO ₂
Cyanobakterien	■ Licht, CO ₂ , N ₂ als N-Quelle
chemolithotroph <i>Nitrosomonas</i>	● NH ₄ ⁺ als H-Donator, O ₂ als H-Akzeptor
<i>Thiobacillus</i>	● H ₂ S, S oder S ₂ O ₃ ²⁻ als H-Donator
Methan-Bildner	■ H ₂ als H-Donator, CO ₂ als H-Akzeptor
heterotroph Pseudomonaden	■ 2 % KNO ₃ als H-Akzeptor, org. Säuren
Clostridien	■ Stärke, NH ₄ ⁺ , pasteurisiertes Impfgut
Enterobakterien	■ Glucose, NH ₄ ⁺
Milchsäurebakterien	■ Glucose, Hefeextrakt, pH 5
Bacillen	● Stärke, NH ₄ ⁺
Streptomyzeten	● Mannit, NH ₄ ⁺
enzymbildend aerobe Protease-Bildner	● Glucose, NH ₄ ⁺ , Casein
aerobe Lipase-Bildner	● Glucose, NH ₄ ⁺ , Tributyrin

● aerobe oder ■ anaerobe Wachstumsbedingungen

Diversität der Mikroorganismen



Risikogruppen (Auswahl)

Risikogruppe 1

Acetobacter acetii, Agrobacterium tumefaciens, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus casei*

Penicillium notatum, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Candida tropicalis*

Bakterien

Risikogruppe 2

Acinetobacter calcoaceticus, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*

Aspergillus flavus, *Candida albicans*, *Trychophyton rubrum*, *Histoplasma capsulatum*

Pilze, Hefen

Risikogruppe 3

Bacillus anthracis, *Mycobacterium tuberculosis*, *Yersinia pestis*

Histoplasma capsulatum

Stammverbesserung von Mikroorganismen

Allgemeines. Aus der Umwelt isolierte Mikroorganismen weisen nur selten optimale Eigenschaften für technische Anwendungen auf. Sie werden deshalb meist durch eine Kombination von Mutations- und Selektionsschritten optimiert. Die wichtigsten Ziele einer Stammoptimierung sind: a) die Ausbeute-Steigerung eines Produkts, b) die Entfernung von Nebenprodukten, und c) verbesserte Eigenschaften des Mikroorganismus bei der Produktion (z.B. verkürzte Fermentationsdauer, keine störende Pigmentbildung, Resistenz gegen Bakteriophagen). Ein großer Vorteil der Mikroorganismen ist ihre kurze Generationszeit (oft <1 h). Sie erlaubt es, eine sehr große Zahl von Mutanten herzustellen und zu analysieren. Bei eukaryotischen Mikroorganismen, z. B. bei Pilzen, müssen dabei Rekombinations-Ereignisse berücksichtigt werden. Mit zunehmender Kenntnis des Stoffwechsels, seiner Regulation und seiner Codierung im Genom werden immer häufiger gentechnische Methoden zur gezielten Ausschaltung oder Amplifikation von Stoffwechselschritten eingesetzt (*metabolic engineering*).

Mutation. Die spontane Mutationshäufigkeit (Veränderung der DNA-Sequenz infolge natürlicher Mutationsereignisse und Fehlern bei der Replikation) liegt für ein Gen normaler Stabilität bei 10^{-6} – 10^{-7} . Derartige Mutationen bleiben meist stumm, revertieren genetisch oder funktionell oder werden durch DNA-Reparatur behoben. Für die industrielle Stammverbesserung ist eine drastischere Mutationsauslösung erforderlich. Dazu setzt man vor allem UV-Strahlung und mutagene Chemikalien ein. Durch Wahl des Mutagens und der Dauer seiner Einwirkung kann man Mutationstyp und -häufigkeit beeinflussen. Je nach Aufgabenstellung liegt dabei die Abtötungsrate bei 90 bis > 99 %. Man selektiert dann im Phänotyp der Überlebenden auf die gewünschten Eigenschaften.

Selektion in Oberflächenkultur. Zur Auswahl von Mikroorganismen mit verbessertem Phänotyp wird meist die selektive Isolierung von Hochleistungsmutanten verwendet. Entscheidend dafür ist, ob eine gut erkennbare Indikatorreaktion zur Verfügung steht. So kann beispielsweise die Resistenz von

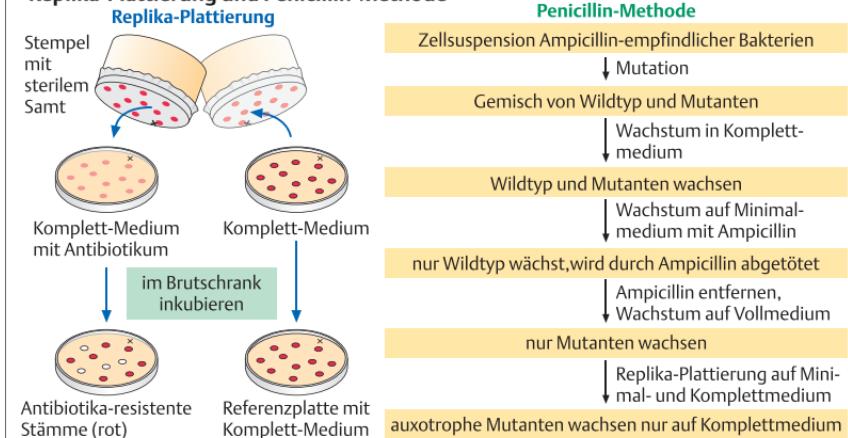
Mutanten gegenüber Antibiotika, Hemmstoffen oder Phagen durch Ausplattieren auf ein Nährmedium erprobt werden, das dieses abtötende Prinzip enthält. Auch die Replika-Plattierung auf kompletten und Selektionsmedien, ggf. nach einem Penicillin-Anreicherungsschritt (Penicillin tötet nur wachsende Zellen ab), leistet wertvolle Dienste, z. B. bei der Selektion auxotropher Mutanten. Sollen Mutanten isoliert werden, die einen biologisch aktiven Metaboliten (z. B. ein Antibiotikum oder ein Enzym) in höheren Ausbeuten bilden, so können Hemmhofstests oder Lysehöfe als Indikatorreaktion verwendet werden. Beispielsweise lässt sich bei einem Screening nach Lipase-Bildnern der klare Lyse-Hof eines Agars verwenden, der durch den Zusatz des Triglycerids Tributyrin opaque ist. Die beiden großen Vorteile dieses Selektionsverfahrens liegen einmal in der großen Flexibilität bei der Auswahl des Selektionsprinzips, zum andern in der großen Zahl von Mutanten (einige 100 pro Agarschale), die durchmustert werden können. Aufgrund des unspezifischen Mutationsverfahrens sind die dabei erhaltenen Mutanten allerdings meist in mehreren Genen verändert, sodass sie in aufwändigen Versuchen auf ihre Eignung als Produktionsstamm untersucht werden müssen. Man überprüft sie deshalb zuerst im Schüttelkolben, dann unter möglichst produktionsnahen Bedingungen auf Wachstum, Stoffproduktion und Handhabbarkeit und optimiert durch stufenweise Auslese der besten Stämme in mehreren Mutations- und Selektionsschritten. Durch das Einkreuzen von Wildstämmen oder wenig mutierter Produktionsstämme versucht man, die negativen Folgen ausgedehnter Mutationsverfahren zu reduzieren.

Selektion in Submerskultur. Kontinuierliche Fermentationen können zur selektiven Auslese von Mutanten benutzt werden. Dabei unterwirft man in einem Chemostaten wachsende Mikroorganismen in Gegenwart eines Mutagens einem Selektionsdruck (beispielsweise dem langsamen Ersatz einer gut verwertbaren C-Quelle (→88) gegen eine schlechtere). Bei kontinuierlichem Wachstum setzen sich diejenigen Mutanten durch, die den veränderten Nährstoffbedingungen besser angepasst sind. Diese Methode lässt sich allerdings nicht zur Ausbeuteerhöhung von Metaboliten verwenden.

Stammverbesserung von Mikroorganismen

Mutagenese	Mechanismus	Anwendungen
physikalisch		
ionisierende Strahlung (Röntgen)	führt zu DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen	nachhaltige genetische Veränderungen
UV-Licht um 254 nm	dimerisiert Thymidin und Cytosin	Punktmutationen
chemisch		
Nitrit	desaminiert Adenin zu Hypoxanthin, Cytosin zu Uracil	Punktmutationen
Alkylierungsmittel	alkyliert Purine	Punktmutationen
Basenanaloge	werden in replizierende DNA eingebaut	nachhaltige Veränderungen
Acridinorange	interkaliert mit DNA	nachhaltige Mutationen
biologisch		
Transposons	übertragen DNA-Elemente innerhalb des Chromosoms	Genmarkierung

Replika-Plattierung und Penicillin-Methode



Nährmedien zur Selektion

Wachstum bei verändelter Temperatur	Minimalmedium mit Metaboliten	Medium mit Indikator für Metaboliten	Medium und Antimetabolit
Temperatur-Mutanten	auxotrophe Mutanten defekt in Biosynthese eines Zellbausteins*	katabolische Mutanten defekt in einem Enzym des Substrat-Abbaus*	regulatorische Mutanten veränderte Syntheserate eines Enzyms oder Produkts
Medium, Testkeime und β -Lactamase	Medium und Testkeime	Medium und Casein	Medium und Tributyrin
Lactamase-resistente Antibiotika-Bildner	erhöhte Antibiotika-Bildung	erhöhte Protease-Bildung	erhöhte Lipase-Bildung

*nach Replika-Plattierung und Penicillin-Methode