



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **250 135 A1**4(51) C 12 P 13/10
C 12 P 21/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 P / 291 390 7

(22) 18.06.86

(44) 30.09.87

(71) Friedrich-Schiller-Universität Jena, Büro für Schutzrechte, 6900 Jena, August-Bebel-Straße 4, DD

(72) Schluttig, Alexander, Dr. rer. nat.; Nüske, Jörg, Dr. rer. nat.; Fritsche, Wolfgang, Prof. Dr. sc. nat.; Michel, Hans-Jürgen, Dr. rer. nat., DD

(54) Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Phaseolotoxin und N-Phosphosulfamylornithin

(57) Grundlage der Erfindung ist der Mikroorganismus *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 6/0, der unter submersen Bedingungen in synthetischen oder komplexen Nährmedien Phaseolotoxin und N-Phosphosulfamylornithin produziert. Die Ausbeute ist gegenüber anderen Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Phaseolotoxin und N-Phosphosulfamylornithin wesentlich erhöht. Auf Grund der biologischen Aktivität können Phaseolotoxin und N-Phosphosulfamylornithin als Herbizide, Enzyminhibitoren, als Wachstumsregulatoren und als Algizide eingesetzt werden.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Phaseolotoxin und N-Phosphosulfamylornithin unter submersen, aeroben Bedingungen, in einem Kohlenstoff- und Stickstoffquellen enthaltenden Nährmedium, **gekennzeichnet dadurch**, daß ein Bakterienstamm *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 6/0 unter submersen Bedingungen in einem synthetischen oder komplexen Medium bei pH-Werten von 6,0 bis 7,5, einer Temperatur von 16°C bis 22°C und einem Sauerstoffpartialdruck von mehr als 50% Sättigung 20 bis 96 Stunden kultiviert wird, wobei eine Nachdosierung der Kohlenstoffquelle und der Ammoniumionen erfolgen kann.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Konzentration der Ammoniumionen vor Beginn der Fermentation auf Werte zwischen 0,15 g/l und 1,7 g/l eingestellt wird.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Konzentration der Kohlenstoff- und Energiequelle vor Beginn der Fermentation auf Werte zwischen 3 g/l und 30 g/l eingestellt wird.
4. Verfahren nach Punkt 1 bis 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Anfangskonzentration an organischem Phosphat im Bereich von 0,1 g/l bis 5,0 g/l eingestellt wird.
5. Verfahren nach Punkt 1 bis 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Nachdosierung der Kohlenstoff- und Energiequelle und der Ammoniumionen so erfolgt, daß die aktuelle Konzentration der Kohlenstoff- und Energiequelle auf Werte zwischen 0,5 g/l und 25 g/l und die aktuelle Konzentration der Ammoniumionen auf Werte zwischen 0,1 g/l und 1,7 g/l kontinuierlich oder diskontinuierlich eingestellt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Phaseolotoxin (N-Phosphosulfamylornithyl-alanyl-homoarginin) und seinem Spaltprodukt N-Phosphosulfamylornithin. Beide Verbindungen hemmen die Ornithin-Carbamyl-Transferase in mikrobiellen und pflanzlichen Zellen. Demzufolge können diese beiden Verbindungen für medizinische Zwecke als Enzymhemmer, als Herbizide als Wachstumsregulatoren und als Algizide eingesetzt werden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Bisher sind verschiedene Verfahren zur Herstellung von Phaseolotoxin und N-Phosphosulfamylornithin bekannt (MITCHELL, R. E. [1976] *Phytochemistry* **15**, 1941; MITCHELL, R. E. [1978] *Phys. Plant Path.* **13**, 37; RUDOLPH, K. et al. [1978] *Arch. Microbiol.* **119**, 219; Bublit, F. und Völksch, B. [1983] *Z. allg. Mikrobiol.* **23**, 485). Diese Verfahren haben allerdings den Nachteil, daß Phaseolotoxin und Phosphosulfamylornithin nur in sehr geringen Konzentrationen gebildet werden (1 bis 5 mg pro Liter).

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung ist die mikrobielle Herstellung von Phaseolotoxin und N-Phosphosulfamylornithin in hohen Ausbeuten.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein mikrobielles Verfahren zur Herstellung von Phaseolotoxin und N-Phosphosulfamylornithin in hohen Ausbeuten zu beschreiben. Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch ein mikrobielles Verfahren gelöst, das von einem Bakterium ausgeht, das als *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 6/0 bezeichnet ist, von uns aus der Natur isoliert wurde und das in der Hinterlegungsstelle des Zentralinstitutes für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der Akademie der Wissenschaften der DDR für die Hinterlegung von Mikroorganismen bei der Vornahme von Erfindungsanmeldungen unter der Nummer ZIMET 11 107 hinterlegt worden ist.

Der Stamm *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 6/0 wird unter submersen Bedingungen bei einer Temperatur von 16°C bis 22°C, einem pH-Wert von 6,0 bis 7,5 und einem Sauerstoffpartialdruck von mehr als 50% Sättigung in einem synthetischen oder komplexen Nährmedium mit oder ohne Nachdosierung von Nährstoffen 20 bis 96 Stunden kultiviert.

Das verwendete synthetische Nährmedium hat folgende Zusammensetzung: 5,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,6 g KH_2PO_4 , 1,0 g Na_2SO_4 , 10 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 mg MgSO_4 , 2,5 g NH_4Cl und 15 g Saccharose pro Liter Wasser. Vor Unterschreiten einer Schwellenkonzentration von 0,1 g/l NH_4^+ und 0,5 g/l Saccharose können beide Nährstoffe kontinuierlich oder diskontinuierlich nachdosiert werden, wobei Konzentrationen von 1,7 g/l NH_4^+ und 25 g/l Saccharose nicht überschritten werden dürfen.

Als Impfmateriale dienen Vorkulturen mit der gleichen Zusammensetzung von Mediums, die in 500 ml Standrundkolben mit 100 ml Kulturlösung 20 Stunden bei 18°C auf einem FANAL-Rundschüttler mit einer Frequenz von 250 RPM kultiviert wurden. Die Vorkulturen wurden mit Schrägagarröhrchen, in denen der Mikroorganismus 24 h auf einem Glycerin-Bouillon-Agar kultiviert wurde, beimpft.

Nach Beendigung der Fermentation wird die Kulturlösung durch Zentrifugation von Mikroorganismus abgetrennt. Die Reinigung von Phaseolotoxin und N-Phosphosulfamylornithin erfolgt nach bereits bekannten Verfahren.

Ausführungsbeispiele

In drei Ausführungsbeispielen soll das Verfahren näher erläutert werden.

1. Die Stammhaltung von *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 6/0 erfolgt auf Schrägagarröhrchen mit Bouillon-Glycerin-Agar. Nach erfolgtem Bewuchs (18°C) werden die Kulturen bis zur nächsten Beimpfung bei +4°C gelagert. Eine Überimpfung erfolgt aller acht Wochen. Als Dauerkonserven wurden Lyophilkonserven in Magermilch angelegt. Mit den Schrägagarröhrchen werden die Vorkulturen beimpft und 20 Stunden bei 18°C kultiviert. Das Vorkulturmedium entspricht dem Hauptkulturmedium und hat folgende Zusammensetzung: 5,5 g Na_2HPO_4 , 2,6 g KH_2PO_4 , 1,0 g Na_2SO_4 , 10 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 mg MgSO_4 , 4,5 g NH_4Cl und 30 g Saccharose pro Liter Wasser.

Die Beimpfung der Hauptkultur im Fermenter erfolgt mit 20 Stunden alten Vorkulturen. Es wird mit einer Animpfdichte von 0,2 bis 0,5 g/l Biomasse gearbeitet. Die Fermentation wird bei einer Temperatur von 18°C und einem Sauerstoffpartialdruck von 70% bis 100% Sättigung durchgeführt. Der pH-Wert wird mittels 1 N NaOH auf 6,8 konstant gehalten. Bei Erreichen einer Biomasse von 8 g/l wird die Fermentation beendet.

Nach Abtrennung der Biomasse durch Zentrifugation wird der pH-Wert des Kulturfiltrates mit 2 N NaOH auf 8 bis 9 eingestellt. Anschließend erfolgt eine Hitzebehandlung bei 120°C im Autoklaven (10 min). Die weitere Aufarbeitung und Isolierung der Wirkstoffe erfolgt nach bereits bekannten Verfahren.

Es werden Ausbeuten von 130–150 mg Phaseolotoxin pro Liter erzielt.

2. die Stammhaltung und die Ausführung der Vorkultivierung von *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 6/0 erfolgte wie im Ausführungsbeispiel 1 dargestellt.

Vorkultur- und Hauptkulturmedium sind identisch und entsprechen dem Ausführungsbeispiel 1, enthalten aber 2,5 g/l NH_4Cl und 15 g/l Saccharose.

Die Beimpfung der Kultur im Fermenter erfolgt mit 20 Stunden alten Vorkulturen. Es wird mit einer Animpfdichte von 0,5 g Biomasse/l gearbeitet. Nach Erreichen einer Biomassekonzentration von 4 g/l werden wiederum 2,5 g NH_4Cl und 15 g Saccharose pro Liter Kulturlösung dosiert. Die weiteren Dosierungen erfolgen mit den gleichen Mengen NH_4Cl und Saccharose bei Biomassekonzentrationen von 8,5 g/l, 13 g/l und 17 g/l oder bei Saccharoserestkonzentrationen von 3 g/l. Nach Erreichen einer Biomassekonzentration von 20 bis 25 g/l wird der Fermenter abgelassen und die Biomasse in einer Kühlzentrifuge separiert. Während der Fermentation wird der pH-Wert durch automatische Titration mit 2 N NaOH auf pH 6,8 konstant geregelt. Der Sauerstoffpartialdruck wird durch Regelung der Luftzufuhr und der Rührerdrehzahl auf 70 bis 80% Sättigung gehalten. Die Kultivierungstemperatur beträgt 18°C.

Die Isolierung der Wirkstoffe aus dem Kulturfiltrat erfolgt nach bekannten Verfahren. Der Stamm produziert unter diesen Bedingungen 480 bis 550 mg Phaseolotoxin pro Liter Kulturfiltrat.

3. Stammhaltung von *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 6/0 und Vorkultur erfolgen wie im Ausführungsbeispiel 1.

Die Beimpfung der Fermenter erfolgt mit 20 Stunden alten Vorkulturen. Es wird mit einer Animpfdichte von 0,2 bis 0,5 g Biomasse pro Liter gearbeitet. Die synthetische Nährlösung enthält zu Beginn der Kultivierung 4,0 g NH_4Cl und 25 g Saccharose pro Liter.

Bei Erreichen einer Biomassekonzentration von 7 g/l wird ein Substratgemisch, bestehend aus 20,4 g NH_4Cl und 162 g Saccharose auf 650 ml Wasser, mit einer Pumpgeschwindigkeit von 7 ml/h/l Kulturvolumen kontinuierlich zudosiert, bis eine Biomassekonzentration von 15 g/l erreicht ist. Bei Erreichen dieser Biomassekonzentration beträgt die gebildete Phaseolotoxinmenge 430 mg/l.

Der pH-Wert wird während der Fermentation mittels 2 N NaOH konstant auf 6,8 gehalten. Die Fermentationstemperatur beträgt 18°C. Der Sauerstoffpartialdruck wird durch Regelung der Luftzufuhr und der Rührerdrehzahl auf 70 bis 80% Sättigung eingestellt.

Die Abtrennung der Biomasse und die Isolierung der Wirkstoffe erfolgt wie in Ausführungsbeispiel 1.