

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PATENTSCHRIFT



(12) Ausschließungspatent

(11) **DD 290 919 A5**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 Q 1/04
C 12 N 1/00

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 12 Q / 332 385 5 (22) 06.09.89 (44) 13.06.91

(71) Akademie der Wissenschaften, Otto-Nuschke-Straße 22/23, O - 1080 Berlin, DE
(72) Hilger, Ursula, Dr. rer. nat.; Sattler, Karl, Prof. Dr. sc. nat.; Uhlig, Hilde, Dipl.-Biol.; Lange, Karin, DE
(73) Akademie der Wissenschaften, Institut für Biotechnologie, AG Patentwesen, Permoserstraße 15, O - 7050
Leipzig, DE

(54) **Verfahren zur Selektion ethanolbildender Mikroorganismen**

(55) Selektion; Mikroorganismus, ethanolbildend; Gärung; Screening; Ethanoloxidation; pH-Indikator; Agar;
Ethanolbestimmung

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Selektion ethanolbildender Mikroorganismen. Das Verfahren dient der Bestimmung und Selektion besonders gärraktiver Hefen und Bakterien und kann in der Biotechnologie und mikrobiologischen Industrie angewendet werden. Grundlage der Erfindung ist der Nachweis von in Agar diffundiertem Alkohol durch dessen Oxidation zu Essigsäure durch einen spezifischen Bakterienstamm. Erfindungsgemäß wird die gebildete Alkoholmenge bestimmt, indem die den Alkohol enthaltende Agarschicht mit einer den ethanoloxidierenden Stamm sowie einen pH-Indikator enthaltenden Weichagarsuspension überschichtet und der Alkohol als konzentrationsproportional großer Farbfleck bestimmt wird.

ISSN 0433-6461

4 Seiten

Patentanspruch:

1. Verfahren zur Selektion ethanolbildender Mikroorganismen, **gekennzeichnet dadurch**, daß Agar, der den von gärfähigen Mikroorganismen sezernierten Alkohol enthält, mit einer Weichagarsuspension, die einen pH-Indikator sowie Ethanol zu Essigsäure oxidierende Bakterien enthält, überschichtet und der im Agar befindliche Alkohol als konzentrationsproportional großer Farbleck bestimmt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die zu testenden in Einzellkolonien vorliegenden Mikroorganismen unter anaeroben Bedingungen auf nährstoffhaltigem Agar kultiviert werden und der entstehende Alkohol, wie in Anspruch 1 beschrieben, bestimmt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß eine frische Zellsuspension der Äthanol zu Essigsäure oxidierenden Bakterienart *Gluconobacter oxydans* CCM 1723 verwendet wird.

Hierzu 1 Seite Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die Erkennung und Selektion ethanolbildender Mikroorganismen und kann zur Selektion neuer, gäraktiver Mikroorganismenstämme auf dem Gebiet der Gärungsindustrie angewendet werden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Unterschiedliche Mikroorganismen, beispielsweise Hefen der Gattung *Saccharomyces* oder Bakterien der Gattung *Zymomonas*, vergären unter bestimmten Bedingungen in unterschiedlichem Maße zuckerartige Verbindungen zu Alkohol, vorzugsweise Ethanol.

Gärkapazität und Gärgeschwindigkeit sind stammspezifische, für die Gärungsindustrie entscheidende Faktoren. Zum Auffinden neuer geeigneter, d. h. hocheffektiver Mikroorganismen sind Screeningmethoden zur Selektion notwendige Voraussetzung. Der quantitative Nachweis der Gärfähigkeit erfolgt bisher entweder durch quantitative Bestimmung des Produktes Ethanol oder des bei der Gärung in äquivalenter Menge entstehenden gasförmigen CO₂. Mißt man das CO₂-Volumen durch Bestimmung der Wasserverdrängung, so ist ein großer Geräteaufwand notwendig, verwendet man spezielle Meßzellen (JP 59-2697), so sind zeit- und gerätetechnischer Aufwand groß. Gleiches gilt für die Messung der Ethanolkonzentration mittels Flammenionisationsdetektor (JP 59-2696; DE-OS 3302743). Die Anzahl der möglichen parallelen Untersuchungen wird durch solche Methoden auf ein Minimum reduziert.

Wesentlich eleganter ist der Alkoholnachweis mit Hilfe von Enzym-Testbestecks. Dazu werden die nach Gärung gewonnenen Kulturfiltrate mit dem Enzym Alkoholdehydrogenase (ADH), dem Coenzym NAD, dem Elektronentransmitter Phenoxymethosulfat (PMS) und einem in der oxidierten Form farblosen Farbstoff (beispielsweise vom Typ der Tetrazoliumsalze) versetzt. Die enzymvermittelte und coenzymabhängige Oxidation des Ethanols führt letztendlich zur Reduktion der Leukoform zum Farbstoff, dessen Intensität spektrophotometrisch gemessen werden kann (JP 60-188097; DD-WP 252001; US-PS 4.566.634; EP 11569). Sinnvoll ist die von JACOBS u. a. (J. Microbiol. Methods 1983; 1, 339) beschriebene Screening-Methode. Dieser Alkohol-Plattentest erlaubt die Testung der Gärfähigkeit einer beliebig großen Anzahl von Hefestämmen parallel zueinander. Die Konzentration des unter anaeroben, submersen Kultivierungsbedingungen gebildeten Gäralkohols wird ermittelt, indem äquivalente Kulturfiltrat-Volumina auf eine Agarschicht gegeben werden die mit einer Weichagarzone überschichtet wird. Letztere enthält das Enzym ADH, das Coenzym NAD, den Elektronentransmitter PMS sowie den Redox-Farbstoff Dichlorphenolindophenol (DCJP). Bei Inkubation der Platten wird durch die bei der Ethanol-Oxidation freiwerdenden Elektronen die in der oxidierten Form tiefblau gefärbte Verbindung DCJP in die reduzierte Leukoform überführt. Es entstehen – in Abhängigkeit von der gebildeten Produktmenge – unterschiedlich große helle Flecken auf blauem Grund. Der entscheidende Nachteil der beiden zuletzt genannten Verfahren ist der große Verbrauch an teuren reinen Biochemikalien (ADH, NAD, PMS). Sie machen diese Prozesse außerordentlich material- und kostenaufwendig.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist ein einfaches, kostengünstiges mikrobiologisches Verfahren zur Selektion von ethanolbildenden Mikroorganismen, das ohne den Einsatz kostspieliger Biochemikalien einen hohen Durchsatz von Isolaten pro Zeiteinheit gewährleistet und für Routineuntersuchungen geeignet ist.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, für die Selektion und Bestimmung gärraktiver Mikroorganismen eine Methode anzuwenden, die nicht auf der Bewegung von *in vitro* enzymatischen Vorgängen bzw. der Einzelbestimmung nach submerser Kultivierung der Mikroorganismen beruht.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe so gelöst, daß Agar, der den von gärfähigen Mikroorganismen sezernierten Alkohol enthält, mit einer Weichagarsuspension, die einen pH-Indikator sowie Ethanol zu Essigsäure oxidierende Bakterien enthält, überschichtet und der im Agar befindliche Alkohol als konzentrationsproportional großer Farbfleck bestimmt wird. Die Erfindung beruht auf der Tatsache, daß gärfähige Mikroorganismen überwiegend unter aeroben Bedingungen wachsen, den Alkohol aber bevorzugt unter anaeroben Bedingungen sowohl auf festen wie in flüssigen Nährmedien bilden. Der in die Umgebung sezernierte Alkohol wird von bestimmten Bakterien, wie *Gluconobacter oxydans* zu Essigsäure oxidiert. Diese Bakterien sind nicht in der Lage, auf Ethanol zu wachsen oder die Essigsäure zu CO₂ weiter zu oxidieren. Werden die zu testenden in Einzellkolonien vorliegenden Mikroorganismen unter anaeroben Bedingungen auf nährstoffhaltigem Agar kultiviert, so wird der entstehende Alkohol wie vorstehend bestimmt. Es wird dabei ein Substrat eingesetzt, auf dem der ethanoxidierende Stamm nicht wachsen kann. Wachstum, Alkoholbildung und -nachweis finden damit auf einer Platte statt. Vorteile des beschriebenen Verfahrens sind die einfache Handhabbarkeit sowie der Wegfall kosten- und/oder apparataufwendiger Hilfsmittel. Auf diese Weise kann die Gärfähigkeit einer beliebig hohen Anzahl unbekannter Mikroorganismen getestet werden. Da die Größe der sichtbar werdenden Säurezonen der Alkoholkonzentration direkt proportional ist, ist die Unterscheidung zwischen gärunfähigen (Fig. 2, b), wenig (Fig. 2, c), gut (Fig. 2, d) und sehr gut (Fig. 2, e) ethanolbildenden Organismen möglich. Anhand von Ausführungsbeispielen wird die Erfindung näher erläutert.

Ausführungsbeispiel

Beispiel 1

Petrischalen werden mit je 25 ml 2%igem Agar ausgegossen. Der Agar enthält 0,04% Bromkresolgrün und hat einen pH-Wert von 6,3 bis 6,6. In bzw. auf dem Agar werden ethanolische Standardlösungen im Konzentrationsbereich 1... 10% (v/v) Ethanol gebracht, indem entweder je 10 µl Testlösung auf sterile Filterplättchen getropft oder in sterile Glasringe gegeben und kreisförmig auf die Agaroberfläche aufgesetzt werden (Fig. 1). Zur Diffusion des Alkohols gibt man die Platten 2 Std. in den Kühlschrank. Anschließend werden Filterplättchen bzw. Raschigringe entfernt.

2 Tage vorher wird der Stamm *Gluconobacter oxydans* CCM 1723 auf 0,25% Hefeextrakt, 1% Glycerol und Mineralsalze enthaltender Nährlösung unter sterilen Bedingungen im 500 ml Erlenmeyerkolben 48 Std. lang bei 30°C und neutralem pH-Wert unter Schütteln kultiviert. 1 ml dieser Bakteriensuspension wird einem noch flüssigen, 0,9%igen Weichagar zugesetzt, der 0,9% NaCl und 0,01% Bromkresolgrün enthält und einen pH-Wert von 5,8 hat. Mit dem Gemisch werden die ethanolhaltigen Testplatten überschichtet (Fig. 3).

Nach Inkubation der Schalen bei T = 30°C entstehen nach 48–72 Std. gelbe Flecken auf blauem Grund. Der Durchmesser der Flecken wird ausgemessen und zur Kalibrierung für die Ethanolkonzentration verwendet (Fig. 2).

Beispiel 2

Mikroorganismen-Isolate mit unbekanntem Gärvermögen werden unter definierten anaeroben Bedingungen in 10% Saccharose enthaltender Nährlösung eine konstante Zeit lang (24–72 Std.) bei T = 30°C inkubiert. Anschließend werden die Kulturfiltrate wie in Beispiel 1 ausgeführt halbquantitativ auf Ethanolgehalt getestet (Fig. 1 bis 3).

Beispiel 3

Unbekannte Mikroorganismen-Isolate werden in so starker Verdünnung ausplattiert, daß max. 5 Kolonien pro Petrischale einzeln wachsen (Fig. 1). Der Agar enthält 20 g Saccharose, 2 g Harnstoff, 80 mg Bromkresolgrün pro Liter sowie Hefeextrakt und mineralische Nährsalze. Der pH-Wert beträgt 6,5. Die Mikroorganismen werden aerob bei T = 30°C inkubiert bis die Kolonien erkennbar sind (t = 16–48 Std.). Anschließend werden anaerobe Bedingungen geschaffen (Begasung mit N₂) und die Kulturen 48 Std. lang bei 30°C zur Gärung gebracht. Danach werden die Kolonien markiert, vorsichtig mechanisch entfernt und die gebildete Alkoholmenge wie in Beispiel 1 beschrieben nachgewiesen (Fig. 2, 3).

Fig. 1

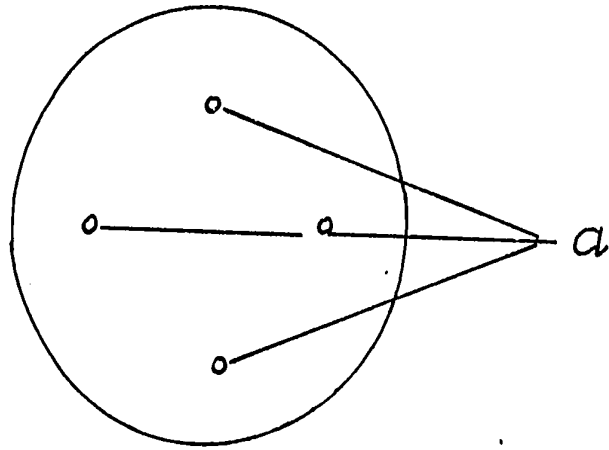


Fig. 2

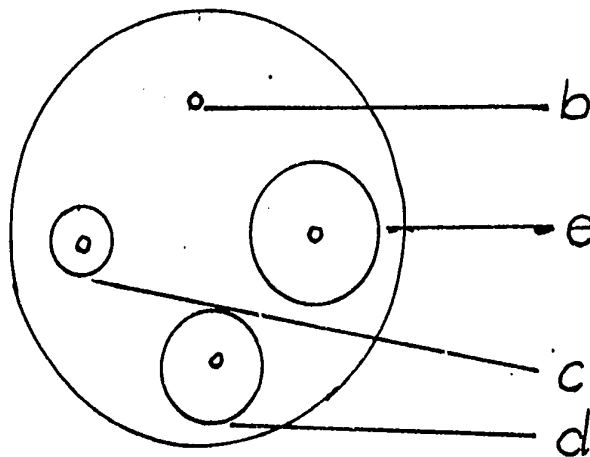


Fig. 3

