



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2 Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

211 039

Int.Cl.³

3(51)

C 12 N 1/38

C 12 N 1/26

C 12 N 1/32

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21) WP C 12 N/ 2343 160

(22) 23.10.81

(45) 27.06.84

(71) KARL-MARX-UNIVERSITAET LEIPZIG;DD;

(72) KLEBER, HANS-PETER, PROF. DR.SC.; CLAUS, REINER, DR.RER.NAT. DIPL.-BIOCHEM., DD

(54) VERFAHREN ZUR ZUECHTUNG VON METHYLOTROPEN BAKTERIEN

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Züchten von obligat oder fakultativ methylo-trophen Bakterien. Die Erfindung hat das Ziel, die Wachstumsrate der Bakterien zu steigern. Die Aufgabe besteht darin, zur Erzeugung von Biomasse Bakterienstämme einzusetzen, die auf den Zusatz von chemischen Verbindungen mit verstärktem Wachstum reagieren. Die Aufgabe wird durch den Einsatz von Stämmen wie *Methylomonas alba*, *Methylomonas methanica* u. a. gelöst, wobei als Wachstumsstimulation quaternäre Ammoniumverbindungen wie Carnitin, Cholin o. dgl. eingesetzt werden.

Titel der Erfindung

Verfahren zur Züchtung von methylo-trophen Bakterien

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Züchtung von methylo-trophen Bakterien, die als Biomasse von Bedeutung sind.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bereits bekannt, Bakterien zu züchten und die Produkte der Züchtungsverfahren als Biomasse zu verwenden. So ist es weit verbreitet, als Kohlenstoffquelle für die Kultivierung von Bakterien Ethanol, Glucose, organische Säuren oder aliphatische Kohlenwasserstoffe einzusetzen. Darüber hinaus gewinnt auch die Verwertung von Methan/ Methanol durch bestimmte Mikroorganismen zunehmend an praktischem Interesse. Um das Wachstum der Bakterien auf diesen Kohlenstoff- und Energiequellen zu beschleunigen, werden - da die Nährstoffansprüche der Mikroorganismen sehr komplex sind - im allgemeinen dem Kulturmedium Hefe-, Fleisch-, Malzextrakt, Serum, Maisquellwasser oder andere, Wachstumsfaktoren enthaltende Verbindungen zugesetzt.

Außerdem ist bekannt, daß das Wachstum von Bakterien und/oder die Ausbeute an Biomasse außer durch verfahrenstechnische Lösungen auch durch die Optimierung der

Kultivierungsbedingungen beschleunigt bzw. erhöht werden kann. Dazu gehören z.B. die gesteuerte Zugabe von Nährsubstraten, die Ausbalancierung des Kohlenstoff/Stickstoffangebots, die Aufrechterhaltung eines bestimmten pH-Wertes und/oder der Temperatur, der Zusatz von Spurenelementen wie z.B. Cu oder verschiedener Nährsalze, von Siliconöl entsprechender Viskosität o.dgl. Die Mehrzahl der Verfahren ist dabei auf ein bestimmtes Substrat oder Mikroorganismenspezies fixiert oder schlägt verfahrenstechnische Lösungen vor, die sich darauf beziehen.

Weiterhin ist bekannt, Wachstumsförderer zur Effektivitätssteigerung bei der Erzeugung von Biomasse einzusetzen. So beschreibt die DE-OS 2 454 048 die Verwendung von quaternären Ammoniumverbindungen ebenso wie die SU-PS 540 578 und SU-PS 712 029 als Wachstumsstimulantien für Hefen. An eine Übertragung auf den Wachstumsprozeß für Bakterien ist bisher nicht gedacht worden. Das erklärt sich daraus, daß sich Bakterien als Prokaryonten grundlegend von Hefen, die zu den Eukaryonten gehören, unterscheiden. Analogieschlüsse z.B. hinsichtlich der Lokalisation bestimmter Stoffwechselwege (Atmungskette, Fettsäureabbau) zwischen Hefezellen und tierischen Zellen sind näherliegend als solche zwischen Hefe- und Bakterienzellen. Entsprechendes gilt für die physiologische Funktion von Carnitin im Intermediärstoffwechsel, das unter Beteiligung der Carnitinacetyltransferase für die Aufnahme von Fettsäuren in die Mitochondrien von Hefen und tierischen Zellen von Bedeutung ist. Eine entsprechende Carnitinacetyltransferase, die in Bakterienkulturen eine Wirkung entfaltet, ist nicht bekannt.

In der Fachliteratur (I.Silveira-Schrank, A.Drozdowicz, Ann. Microbiol. (Institut Pasteur), 134 A, 411, (1983); B.L.Zamost, D.O.McClary, Biotechnol.Lett. 5, 179, (1983) u.a.) wird über die wachstumsstimulierende Wir-

kung von Pflanzenhormonen auf Bakterien und Pilze berichtet, während über Hefen keine Aussagen gemacht werden, weil offensichtlich Analogieschlüsse nicht möglich sind. Nach vorherrschender Meinung der Fachleute bedingt die unterschiedliche chemische Struktur der Zellbegrenzung zwischen Bakterien und Hefen Differenzen im Aufnahmemechanismus und damit in der Verwertung der quaternären Ammoniumverbindungen. Es wurde beschrieben (T. Nakahara, K. Hisatsuka, Y. Minoda, J. Ferment. Technol. 59, 415, (1981)), daß das jeweils gleiche Tensid bei Hefen und Bakterien unterschiedlichen, z.T. gegensätzlichen Einfluß auf das Wachstum der jeweiligen Species ausübt.

Wünschenswert ist eine Methode zum Züchten von Bakterien, die durch den Zusatz definierter Stoffe das Wachstum stimuliert.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, das Wachstum von Bakterien im Verlauf des Züchtungsprozesses zu steigern, die Ausbeute zu erhöhen und damit die Ökonomie der Herstellung verwertbarer Biomasse wesentlich zu verbessern.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Erfindung hat die Aufgabe, die Kultivierungsdauer der Bakterien zu vermindern, indem zur Erzeugung von Biomasse Bakterienstämme eingesetzt werden, die auf den Zusatz von chemischen Verbindungen mit verstärktem Wachstum reagieren. Es soll dabei unerheblich sein, ob die Zusätze von den Bakterien als Kohlenstoff- und/oder Stickstoffquelle bzw. Elektronen- oder Wasserstoffdonatoren mit verwendet werden.

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß Bakterienstämme in einem flüssigen Minimalmedium, flüssigen oder festen Komplexmedium unter Verwendung von Acetat, Malat, Glucose, Methan, Methanol o.dgl. als Kohlenstoffquelle und

NH_4Cl o.dgl. als Stickstoffquelle gezüchtet werden, wobei erfindungsgemäß als wachstumsstimulierende Mittel quaternäre Ammoniumverbindungen, insbesondere Cholin, Acetylcholin, D,L-, L(-)- oder D(+)-Carnitin, dessen Vorläufer wie z.B. Lysin, Abbauprodukte oder Derivate eingesetzt werden.

Carnitin ist nicht nur Bestandteil tierischer Zellen bzw. Organe (Muskel, Leber), sondern kommt auch weitverbreitet in Mikroorganismen (Neurospora, Streptokokken) vor. Die Rolle des Carnitins im Stoffwechsel der Fettsäuren eukaryontischer Zellen bzw. Zellkompartimente (Mitochondrien) ist in den letzten beiden Jahrzehnten intensiv untersucht worden. Trotz der Beschäftigung der Fachwelt mit dem Carnitin und seiner Rolle im Stoffwechsel von Mikroorganismen ist es bisher nicht bekannt geworden, daß Carnitin selbst, Derivate davon oder Vorläufer von ihm auf das Wachstum von Bakterien einen merklichen Einfluß ausüben. Es ist zweifellos überraschend, daß Carnitin und seine Derivate auf Bakterienstämme der Gattung *Methylomonas*, speziell *Methylomonas alba* EG 18 und *Methylomonas methanica* sowie auf Mischkulturen anderer Art bei Anwesenheit ein oder mehrerer Spezies o.g. Bakterien wachstumsstimulierend wirken. Als Carnitinderivate sind insbesondere DL-Carnitin selbst, Acetylcarnitin, Cholin, Acetylcholin, Betainhydrat, Lysin, γ -Butyrobetain, Crotonobetain als wirksam erkannt worden, jedoch sind auch Salze des Carnitins und seiner Vorläufer wie Halogenide oder Nitrate, Sulfate und Phosphate einsetzbar.

Beispiele für verwendbare Carnitinderivate sind weiterhin solche Verbindungen, die zu Carnitin gespalten werden können, wie kurzkettige oder langkettige Acylcarnitine wie Propionylcarnitin, Butyrylcarnitin, Palmitoylcarnitin und Stearoylcarnitin, sowie Alkylester, wie Methyl- und Ethylester des Carnitins. Beispiele für Derivate von Crotonobetain und Butyrobetain sind die ent-

sprechenden Alkylester, wie der Methyl- und Ethylester sowie Doppellester, wie z.B. Acetylcarnitinmethylester.

Im erfindungsgemäßen Sinne können über das eingangs angegebene flüssige Minimalmedium hinaus Nährmedien mit beliebigen, durch Bakterien verwertbaren Kohlenstoffquellen verwendet werden. Beispiele für diese Kohlenstoffquellen sind neben Methan oder methanhaltigen Gasgemischen Alkohole wie Methanol oder Ethanol, C₁-Verbindungen wie Formiat, Formaldehyd, methylierte Amine, Dimethylester, Zucker wie Glucose oder Stärke, Carbonsäuren wie Essigsäure, gasförmige Kohlenwasserstoffe wie Ethan o.dgl.

Das Nährmedium enthält ferner Stickstoffquellen wie Ammoniumsalze, beispielsweise Ammoniumsulfat oder Ammoniumchlorid, Nitrate wie Natriumnitrat oder Harnstoff. Ferner kann das Nährmedium anorganische Salze, wie Kaliumsalze, Magnesiumsalze, Salze der Phosphorsäure, Zinksalze und Mangansalze, wie Kaliumchlorid, Magnesiumsulfat, Kaliumphosphat, Zinksulfat oder Mangansulfat enthalten. Ferner können dem Nährmedium Spuren Mengen an Vitaminen, wie Biotin, Pantothensäure oder Vitamin B₁, Melassen und Maisquellwasser, die diese Vitamine enthalten, zugesetzt werden.

Die Züchtung kann entweder auf festen oder flüssigen Nährmedien unter Verwendung üblicher Fermenter und bei den üblichen Temperaturen durchgeführt werden. Züchtungstemperaturen von 25 bis 40°C sind besonders günstig. Der pH-Wert des Nährmediums beträgt bei Verwendung von Methan/Methanol vorzugsweise 6 bis 8. Das erfindungsgemäß verwendete Carnitin oder dessen Derivate bzw. Vorläufer werden dem Nährmedium in einer Konzentration von maximal 50mg/l, berechnet als Carnitinchlorid, zugesetzt. In höheren Konzentrationen hemmt das Carnitin oder dessen Derivate das Wachstum der Bakterien. Die bevorzugte Konzentration liegt bei 10 µg bis 5 mg/l.

Die Erfindung wird an Beispielen näher erläutert.

Beispiel 1

Es wird auf einen pH-Wert von 6,6 eingestelltes Minimalmedium verwendet, das aus 0,68 g KH_2PO_4 ; 0,87 g K_2HPO_4 ; 1 mg CaCl_2 ; 71 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 5 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 812 μg $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$; 785 μg $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$; 440 μg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ und 252 μg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in 1 Liter bidestilliertem Wasser hergestellt wird. Als einzige Kohlenstoffquelle diene Methan; N-Quelle ist NaNO_3 (0,2 g/l). Dieses Grundmedium wird mit D,L-Carnitin in den nachstehenden, in Tabelle I angegebenen Mengen versetzt.

100 ml dieses Mediums werden in 500 ml fassende Schüttelkolben mit Einstichen und Begasungsaufsatz gegeben und mit 12,0 ml einer Kulturflüssigkeit (optische Dichte bei 600 nm etwa 0,6) von *Methylomonas alba* beimpft. Die Kulturflüssigkeit wird durch Abschwemmen von 24h alten Schrägagarröhrchen mit Minimalmedium gewonnen. Die Züchtung wird bei 30°C unter Schütteln durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengefaßt.

Tabelle I

D,L-Carnitin- Konzentration (g/l)	Bakterientrockengewicht (mg/l) nach angegebener Züchtungsdauer (h)		
	21	42	65
-	280	490	660
0,01	340	580	790
0,05	290	500	700

Beispiel 2

Beispiel 1 wird wiederholt; anstelle von D,L-Carnitin wird Lysin als Zusatz verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle II zusammengefaßt.

Tabelle II

Lysinkonzentration (g/l)	Bakterientrockengewicht (mg/l) nach angegebener Züchtungsdauer (h)				
	24	48	72	78	95
-	40	55	160	360	670
0,001	60	70	415	700	740
0,005	410	730	910	940	1350

Beispiel 3

Beispiel 1 wird wiederholt; anstelle von DL-Carnitin wird Acetylcarnitin als Zusatz verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle III zusammengefaßt.

Tabelle III

Acetylcarnitin- Konzentration (g/l)	Bakterientrockengewicht (mg/l) nach angegebener Züchtungsdauer (h)		
	24	48	72
-	250	480	660
0,01	300	552	725

Beispiel 4

Beispiel 1 wird wiederholt; anstelle von DL-Carnitin wird Glycinbetain als Zusatz verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV zusammengefaßt.

Tabelle IV

Glycinbetain- konzentration (g/l)	Bakterientrockengewicht (mg/l) nach angegebener Züchtungsdauer (h)		
	24	48	72
-	160	360	670
0,05	186	425	805

Erfindungsansprüche

1. Verfahren zur Züchtung von methylotrophen Bakterien in einem flüssigen Minimalmedium, flüssigen oder festen Komplexmedium unter Verwendung von Acetat, Malat, Glucose, Methanol, Ethanol, Methan o.dgl. als Kohlenstoffquelle und NH_4Cl o.dgl. als Stickstoffquelle, dadurch gekennzeichnet, daß als wachstumsfördernder Zusatz quaternäre Ammoniumverbindungen, insbesondere DL-, L(-)- oder D(+)-Carnitin, dessen Vorläufer, Abbauprodukte und/oder Derivate eingesetzt werden.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Stamm *Methylomonas alba* gezüchtet wird.
3. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Stamm *Methylomonas methanica* gezüchtet wird.
4. Verfahren nach Punkt 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß Mischkulturen gezüchtet werden.
5. Verfahren nach Punkt 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß *Methylomonas alba*, *Methylomonas methanica* jeder für sich oder in Kombination miteinander anwesend sind bei der Züchtung beliebiger anderer Arten von Mischkulturen.
6. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Carnitinvorläufer Crotonobetain, Butyrobetain oder Lysin verwendet werden.
7. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Carnitinderivate Acylcarnitin, Alkylcarnitin oder Acyl-alkyl-carnitin verwendet werden.

8. Verfahren nach Punkt 1 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß man als Acylcarnitine solche mit Fettsäureresten der Kettenlänge zwischen C_2 und C_{24} wie z. B. Acetylcarnitin, Propionylcarnitin, Butyrylcarnitin, Palmitoylcarnitin oder Stearoylcarnitin verwendet.
9. Verfahren nach Punkt 1 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß man als Alkylcarnitin Methyl- oder Äthylcarnitin verwendet.
10. Verfahren nach Punkt 1 und 6, dadurch gekennzeichnet, daß man als Crotonobetainderivat ein Alkylcrotonobetain verwendet.
11. Verfahren nach Punkt 1, 6 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß man als Alkylcrotonobetain Methyl- oder Äthylcrotonobetain verwendet.
12. Verfahren nach Punkt 1 und 6, dadurch gekennzeichnet, daß man als Butyrobetainderivat ein Alkylbutyrobetain verwendet.
13. Verfahren nach Punkt 1, 6 und 12, dadurch gekennzeichnet, daß man als Alkylbutyrobetain Methyl- oder Äthylbutyrobetain verwendet.
14. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Nitrile und Amide der entsprechenden Betaine einsetzt.
15. Verfahren nach Punkt 1 - 14, dadurch gekennzeichnet, daß unter partiell anaeroben Bedingungen gezüchtet wird.
16. Verfahren nach Punkt 1 - 14, dadurch gekennzeichnet, daß unter mikroaerophilen Bedingungen gezüchtet wird.