



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **250 331 A1**4(51) C 12 D 13/10
C 12 N 11/04

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 D / 291 656 5

(22) 25.06.86

(44) 08.10.87

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

(72) Schluttig, Alexander, Dr.; Teicher, Renate; Nüske, Jörg, Dr.; Fritsche, Wolfgang, Prof. Dr., DD

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

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Phaseolotoxin und N'-Phosphosulfamylornithin mit immobilisierten und permeabilisierten Bakterienzellen. Grundlage der Erfindung ist der Mikroorganismus *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 6/0, der in immobilisiertem und permeabilisiertem Zustand unter submersen Bedingungen in synthetischen und komplexen Medien Phaseolotoxin und N'-Phosphosulfamylornithin produziert. Gegenüber dem Hauptpatent (SCHLUTTIG et al., 1986) wird ein Verfahren beschrieben, welches eine Isolierung und Reinigung beider Verbindungen mit wesentlich geringerem Aufwand an Energie, Material und Arbeitszeit ermöglicht. Das Verfahren kann diskontinuierlich und kontinuierlich betrieben werden. Bei Durchführung des Verfahrens in kontinuierlichem Betrieb kann mit sehr hoher Verdünnungsrate gearbeitet werden. Somit kann die Raum-Zeit-Ausbeute des Verfahrens gesteigert werden. Auf Grund der biologischen Aktivität können Phaseolotoxin und N'-Phosphosulfamylornithin als Herbizide, Enzyminhibitoren, als Wachstumsregulatoren und als Algizide eingesetzt werden.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung von Phaseolotoxin und N'-Phosphosulfamylornithin mit dem Bakterienstamm *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 6/0 unter submersen Bedingungen in einem synthetischen Medium bei einem pH-Wert von 7, einer Temperatur von weniger als 22°C und einem Sauerstoffpartialdruck von 90 %, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Zellen von *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 6/0 in immobilisiertem und permeabilisiertem Zustand verwendet werden.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Bakterienzellen in Agar Agar immobilisiert werden.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Konzentration des Agar Agar 1–3% beträgt.
4. Verfahren nach Punkt 1, 2 und 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Permeabilisierung der Zellen durch Zugabe von EDTA zum synthetischen Medium in Inkubationsansatz erfolgt.
5. Verfahren nach Punkt 1 bis 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Konzentration des EDTA im synthetischen Medium 5–10 mM beträgt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Phaseolotoxin und N'-Phosphosulfamylornithin mit permeabilisierten und immobilisierten Zellen von *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 6/0. Beide Verbindungen hemmen die Ornithin-Carbamylphosphat-Transferase in mikrobiellen, pflanzlichen und tierischen Zellen. Demzufolge können diese beiden Verbindungen für medizinische Zwecke als Enzymhemmer, als Herbizide, als Wachstumsregulatoren und als Insektizide eingesetzt werden. Ebenso kann ein Einsatz als Algizid und Cytostatikum erfolgen.

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 Pathol.* **13**, 37; RUDOLPH et al. [1978], *Arch. Microbiol.* **119**, 291; BUBLITZ, F. und VÖLKSCH, B. [1983], *Z. Allg. Mikrobiol.* **23**, 485). Diese Verfahren haben den Nachteil, daß Phaseolotoxin und N'-Phosphosulfamylornithin in geringen Konzentrationen (1–5 mg pro Liter) gebildet werden. SCHLUTTIG, A. et al. (1986) beschreiben im Patent „Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Phaseolotoxin und N'-Phosphosulfamylornithin“ ein Verfahren, welches wesentlich höhere Ausbeuten an beiden Produkten (bis 550 mg/l) erbringt.

Das Verfahren von SCHLUTTIG et al. (1986) ist auf Grund der hohen Biomassekonzentration mit einem hohen Aufwand an Energie (Abtrennung der Biomasse vom Produkt), Material (auf Grund hoher Nebenproduktkonzentrationen werden für die Produktreinigung große Mengen an Trennmittel benötigt) und Arbeitszeit (das Verfahren kann nur diskontinuierlich betrieben werden, Trenn- und Aufarbeitungsschritte müssen mehrmals durchgeführt werden) belastet. Dieses führte zu dem Ziel der Erfindung, ein Verfahren, das auf der Basis immobilisierter und permeabilisierter Bakterienzellen arbeitet, somit kontinuierlich arbeiten kann und nur vereinfachte Aufarbeitungs- und Reinigungsverfahren für das Produkt benötigt, zu entwickeln.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung ist die mikrobielle Herstellung von Phaseolotoxin und N'-Phosphosulfamylornithin in einem Verfahren, das kontinuierlich betrieben werden kann und eine energie-, material- und zeitsparende Aufarbeitung und Reinigung der Produkte ermöglicht.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein mikrobielles Verfahren zur Herstellung von Phaseolotoxin und N'-Phosphosulfamylornithin zu beschreiben, das nicht die geschilderten Nachteile im Sinne hoher Nebenproduktkonzentrationen und daraus resultierender energie-, material- und zeitintensiven Isolation der Substanzen hat und zudem kontinuierlich bei hohen Durchflußraten betrieben werden kann. Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch ein Verfahren gelöst, daß das Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 6/0 in immobilisiertem und permeabilisiertem Zustand verwendet. Der Bakterienstamm *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 6/0 ist in der Hinterlegungsstelle des Zentralinstituts 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 11107** hinterlegt worden.

Der Stamm *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 6/0 wird submers in einer synthetischen Nährlösung bis zu einer Dichte von 0,7 g Biomasse pro Liter bei einer Temperatur unter 22°C und einem pH-Wert von 6,8 kultiviert. Bei Verwendung nichtsynthetischer Medien kann der pH-Wert zwischen 6,5 und 7,5 liegen. Das verwendete synthetische Medium hat folgende Zusammensetzung: 5,5 g Na₂HPO₄, 2,6 g KH₂PO₄, 1,0 g Na₂SO₄, 10 mg FeSO₄ · 7 H₂O, 10 mg MnSO₄ · 7 H₂O, 100 mg MgSO₄, 10 g Glycerol, 2,5 g NH₄Cl und 1 g Casaminoacids pro 1 Liter destillierten Wassers.

Die Kultivierung erfolgt in 500 ml Standrundkolben mit 100 ml Kulturlösung auf einem Rundschtüttler mit einer Frequenz von 250 Umdrehungen pro Minute.

Vor Beginn der Immobilisierung werden die Bakterienzellen abzentrifugiert, in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 resuspendiert und in gekühltem Zustand (4°C) bis zur Immobilisierung aufbewahrt. Immobilisierung in Agar Agar: Je 10 ml der Zellsuspension mit entsprechend eingestellter Zelldichte werden mit 50 ml 0,1 M Phosphatpufferlösung pH 7 mit 2 % Agar Agar im Eisbad vermischt. Nach Erstarren des Agarblocks wird dieser zerkleinert, indem er durch ein Sieb mit einer Porengröße von etwa 1 mm gedrückt wird. Die dabei entstehenden Partikel haben ein Volumen von etwa 1 mm³.

Die mit dieser Methode immobilisierten Bakterienzellen werden nach dem Waschen mit 10 mM Phosphatpuffer pH 7 in das synthetische Medium gebracht. Das Verhältnis der Volumina des Immobilisierungsgutes zum synthetischen Medium beträgt 1:4. Dem synthetischen Medium sind Zwecke der Permeabilisierung der Bakterienzellen 5–10 mM EDTA zugesetzt. Die Herstellung von Phaseolotoxin und N'-Phosphosulfamylornithin erfolgt durch Inkubation dieses Gemisches bei einer Temperatur zwischen 18 und 22°C über einen Zeitraum von mindestens 24 Stunden bei einem Sauerstoffpartialdruck im Gemisch von mindestens 90%.

Die Herstellung der beiden Produkte kann diskontinuierlich und kontinuierlich erfolgen. Bei kontinuierlichen Betrieb wird das synthetische Medium kontinuierlich mit bestimmter Durchflußrate erneuert und gleichzeitig teilweise verbrauchtes und mit den Produkten angereichertes Medium entfernt.

Nach Beendigung der Inkubation wird die immobilisierte Biomasse durch Absieben oder Dekantieren von der Kulturlösung getrennt und nach BUBLITZ und VÖLKSCH (1983) Phaseolotoxin aus der Kulturlöslichkeit isoliert.

N--Phosphosulfamylornithin wird aus Phaseolotoxin durch Behandlung mit Leucinaminopeptidase gewonnen.

Ausführungsbeispiel

An einem Ausführungsbeispiel soll das Verfahren näher erläutert werden.

Das Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 6/0 wird submers in einer synthetischen Nährlösung bis zu einer Dichte von 0,7 g Biomasse pro Liter bei einer Temperatur unter 22°C und einem pH-Wert von 6,8 kultiviert. Die Kultivierung erfolgt in 500 ml Standrundkolben mit 100 ml Kulturlöslichkeit auf einem Rundschteller mit einer Frequenz von 250 Umdrehungen pro Minute.

Das verwendete synthetische Medium hat folgende Zusammensetzung: 5,5 g Na₂HPO₄, 2,6 g KH₂PO₄, 1,0 g Na₂SO₄, 10 mg FeSO₄ · 7 H₂O, 10 mg MnSO₄ · 7 H₂O, 10 g Glycerol, 1 g Casaminoacids und 2,5 g NH₄Cl pro 1 Liter destillierten Wassers. Zur Immobilisierung der Zellen in Agar Agar werden die Bakterienzellen von mindestens 1 Liter Kulturvolumen abzentrifugiert, in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 resuspendiert und 10 ml dieser Zellsuspension mit einer Dichte von 4 g Biomasse pro Liter in 50 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 mit 2 % Agar Agar im Eisbad vermischt. Nach dem Erstarren des Agarblocks wird dieser zerkleinert, indem er durch ein Sieb mit einer Porengröße von etwa 1 mm gedrückt wird. Die dabei entstehenden Partikel haben ein Volumen von etwa 1 mm³.

Die so immobilisierten Zellen werden in das synthetische Medium, das 5–10 mM EDTA enthält, gebracht, wobei das Verhältnis des Volumens der Immobilisierungspartikel zum Inkubationsvolumen 1:4 beträgt.

Die Inkubation erfolgt in einem Reaktor mit Sauerstoffversorgung, Temperaturregelung und Möglichkeiten der intensiven Durchmischung. Der Sauerstoffpartialdruck im Inkubationsansatz muß mindestens 90 % betragen. Unter diesen Bedingungen wird nach 24 Stunden eine Ausbeute von 30–40 mg Phaseolotoxin pro Gramm Biomasse erreicht.

Nach Beendigung der Inkubation wird die immobilisierte und permeabilisierte Biomasse durch Absieben oder Dekantieren vom synthetischen Medium abgetrennt.

Aus dem synthetischen Medium wird das Phaseolotoxin nach BUBLITZ und VÖLKSCH (1983) isoliert.

Phaseolotoxin kann durch Umsetzung mit Leucinaminopeptidase in N'-Phosphosulfamylornithin umgesetzt werden.