



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **279 267 A1**

4(51) C 12 N 9/20

PATENTAMT der DDR

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 324 824 0

(22) 05.01.89

(44) 30.05.90

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD

(72) Hadeball, Wolf, Dr. rer. nat.; Pauli, Günter, Dr. rer. nat.; Duwe, Hannelore, Dipl.-Chem.; Schneider, Jörg, Prof. Dr. sc. nat., DD

(54) Verfahren zur Herstellung mikrobieller Lipase

(55) mikrobielle Enzymherstellung; neuer Hefestamm; *Yarrowia lipolytica* IMET 43836; Lipase; Neutralfette; Kultivierung

(57) Das Verfahren betrifft die mikrobielle Herstellung von Lipase mittels Hefen. Durch die Verwendung des neuen Hefestammes *Yarrowia lipolytica* IMET 43896 in einem aeroben Kultivierungsverfahren mit kostengünstigen und verfügbaren Neutralfetten als eine oder alleinige C-Quelle kann eine hohe Raum-Zeit-Ausbeute an extrazellulärer Lipase realisiert werden.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung mikrobieller Lipase mittels Hefen, **gekennzeichnet durch**
 - aerobe Kultivierung des neuen Hefestammes *Yarrowia lipolytica* IMET 43896
 - im pH-Bereich von 3-7
 - im Temperaturbereich von 15-40°C
und
 - Verwendung von Neutralfetten als eine oder alleinige C-Quelle
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet durch** einen pH-Bereich von 4-5.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet durch** einen Temperaturbereich von 20-30°C.
4. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet durch** die Verwendung von Glycerolester, Fetten oder Ölen, vorzugsweise Rapsöl, sowie Gemischen derselben im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 10 Ma.-% als C-Quelle.
5. Verfahren nach Anspruch 1 und 4, **gekennzeichnet durch** die Verwendung von Neutralfetten in Kombination mit kohlenhydrathaltigen oder n-alkanhaltigen Substraten als C-Quelle.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die Herstellung von Lipase durch Kultivierung eines neuen Hefestammes. Sie kann in entsprechenden mikrobiellen Enzymsynthesenanlagen Verwendung finden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Zur Herstellung von Lipasen mittels Mikroorganismen sind verschiedene Verfahren bekannt, in welchen Bakterien, Hefen oder Pilze als mikrobielle Produzenten auf verschiedenen Nährmedien, wie Maisquellwasser, Molke, Bouillon u. ä. gezüchtet werden. Aber auch andere kohlenhydrathaltige Medien, die Glucose, Saccharose, Mannitol, Sorbitol, Dextrin, Cellulose oder Stärke enthalten, werden verwendet. Darüber hinaus werden wasserlösliche Fettsäureester als C-Quelle in der Fermentation eingesetzt.

Der Nachteil der bisherigen Verfahren besteht im allgemeinen darin, daß bei Verwendung von Pilzen, aufgrund ihrer geringen Wachstums- und Enzymbildungsgeschwindigkeiten, sehr lange Fermentationszeiten erforderlich sind. So liegt die Kultivierungsdauer bei Verwendung von *Rhizopus chinensis* HI-S zwischen 3 und 7 Tagen (US 4665029). Die Enzymbildungsgeschwindigkeit beträgt dabei 4×10^2 EE/lxh. Auf der anderen Seite haben Bakterien, die meist mit relativ guter Geschwindigkeit wachsen, den Nachteil, daß sie nur geringe Volumenaktivitäten an extracellulärer Lipase ergeben. Beispielsweise wird gem. EP 204204 bei der Kultivierung von *Pseudomonas fragi* 22.39B bei einer Kultivierungsdauer von 48 Stunden nur eine geringe Volumenaktivität von 2 Enzymeinheiten pro ml erreicht (eine Enzymeinheit EE entspricht der Menge Fettsäure in μ mol, die in 1 Minute aus einer Triacylglycerol-Emulsion freigesetzt wird). Die entsprechende Enzymbildungsgeschwindigkeit betrug in diesem Fall $0,4 \times 10^2$ EE/lxh.

Mit verschiedenen Stämmen von *Staphylococcus capitis* werden bei Fermentationszeiten von 24 bis 72 Stunden maximale Volumenaktivitäten von 6-12 EE pro ml erreicht (EP 187869).

Weiterhin ist bekannt, daß der Bakterienstamm *Acinetobacter calcoaceticus* unter Verwendung wasserlöslicher Fettsäureester (Tween) als teurer C-Quelle Lipase produziert (DD 249712). Die dabei erreichte Enzymbildungsgeschwindigkeit lag bei nur 2×10^2 EE/lxh.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, Lipase in einem mikrobiellen Verfahren mit hohen Produktivitäten auf der Grundlage verfügbarer Rohstoffe zu produzieren.

Wesen der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen Hefestamm zu selektieren und einzusetzen, der eine hohe Raum-Zeit-Ausbeute an extracellulärer Lipase realisiert und dabei nicht die Verwendung von wasserlöslichen Fettsäureestern als C-Substrat erfordert.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch Kultivierung des neuen Hefestammes *Yarrowia lipolytica* IMET 43896 im pH-Bereich von 3-7 und im Temperaturbereich von 15-40°C unter Verwendung von Neutralfetten als eine oder alleinige C-Quelle gelöst. Vorzugsweise ist dabei ein pH-Wert von 4-5 und ein Temperaturbereich von 20-30°C einzustellen.

Die Kultivierung erfolgt dabei diskontinuierlich bei einer Kultivierungsdauer von 6 bis 18 Stunden.

Als Neutralfette können Glycerolester, Fette und Öle, vorzugsweise Rapsöl, sowie Gemische derselben eingesetzt werden, wobei ihr Anteil am Kultivierungsmedium 0,1 bis 10 Ma.-% beträgt. Sie können als alleinige C-Quelle dienen, andererseits aber auch in Kombination mit kohlehydrathaltigen oder n-alkanhaltigen Substraten verwendet werden.

Unter den erfindungsgemäßen Kultivierungsbedingungen werden Enzymbildungsgeschwindigkeiten über 10^5 EE/l $\times$ h erreicht, was dem 5 bis 250fachen der gemäß Stand der Technik erreichten Leistung entspricht.

Die durch das erfindungsgemäße Verfahren gewonnene Lipase ist wie folgt zu charakterisieren:

Die Lipase besitzt ein Temperaturoptimum bei 40°C und ist über einen Bereich von 15 bis 60°C aktiv.

Die Lipase ist im pH-Bereich von 3 bis 11 aktiv, wobei das pH-Optimum im schwach alkalischen Bereich liegt. Bei einer Temperatur von 5°C ist das Enzym lagerstabil und weist im Zeitraum bis 6 Monate keinen Aktivitätsverlust auf.

Die neue Lipase ist in der Lage, natürliche und synthetische Triglycerole, Fette und Öle (Triolein 100% bei T = 37°C) zu hydrolysieren:

Triolein	100
Tributyrin	114
Olivenöl	125
Rapsöl	104
Leinöl	85
Rindertalg	80
Rinderfußöl	108

Die Lipase vermag weiterhin, Ester wie p-Nitrophenylacetat und -plamitat zu hydrolysieren.

Der neue Hefestamm *Yarrowia lipolytica* IMET 43869 wurde in der IMET-Hinterlegungsstelle für Mikroorganismen im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der AdW der DDR hinterlegt.

Der neue Stamm ist wie folgt zu charakterisieren:

Kolonnenmorphologie

Kreideweiß, stark gefaltete Oberfläche

Zellmorphologie

- Zellen überwiegend sehr langgestreckt, wenig ovale Zellen
- nach 3 Tagen Hautbildung (Inseln) und Sediment im flüssigen Medium
- Blastosporen +
- Pseudomycel +

Physiologische Merkmale

Wachstum bei:

20°C mittleres Wachstum auf Agar

30°C gutes Wachstum auf Agar

37°C mittleres Wachstum auf Agar

Assimilation von:

Erythritol, D-Mannitol, D-Galactosidase, Glycerin, L-Sorbitose, Succinat, D-Glucitol, D-Glucose, Ethanol, Lactat, Citrat, D-Ribose

keine Assimilation von:

Maltose, Cellobiose, Inositol, Lactose, Saccharose, Melibiose, Raffinose, D-Xylose, Stärke, Salicin, D-Arabinose, Melizitose, Inulin, L-Arabinose, Trehalose, L-Rhamnose, Nitrat

Die Erfindung wird durch folgendes Beispiel näher erläutert:

Ausführungsbeispiel

Ein flüssiges Nährmedium (pH = 5), das 0,5% Pepton, 0,5% Hefeextrakt, 1,0% Rapsöl und 0,03% Tween 80 enthält, wird mit dem Hefestamm IMET 432869 beimpft und 6 Stunden bei 25°C im Schüttelkolben kultiviert.

3,5l Nährmedium, das folgende Zusammensetzung pro Liter aufweist:

NH ₄ Cl	3,8 g
CaCl ₂ × 6 H ₂ O	0,22 g
KH ₂ PO ₄	0,68 g
K ₂ HPO ₄	0,87 g
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	1,78 g
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	0,12 g
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	11 mg
MnSO ₄ × 4 H ₂ O	20 mg
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	19 mg
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	6 mg
sowie 50 ml Rapsöl	

werden mit 0,5l Vorkultur in einem 12-l Rührfermentor beimpft. Die Temperatur beträgt 25°C und der pH-Wert 5,0. Als Stickstoffquelle wird eine 5%ige Ammoniaklösung verwendet, die gleichzeitig zur pH-Regelung dient.

Nach einer Zeitdauer von 10 Stunden wird der Fermentorinhalt zentrifugiert und die zellfreie Rohenzymlösung steht für weitere Untersuchungen und Aufarbeitungen zur Verfügung.

Die extrazelluläre Volumenaktivität beträgt 105 EE/ml.