



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2 Patentgesetz

# PATENTSCHRIFT

(19) DD (11) 271 030 A3

4(51) C 12 N 11/16

## AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

---

(21) WP C 12 N / 304 531 0 (22) 02.07.87 (45) 23.08.89

---

(71) Humboldt-Universität zu Berlin, Unter den Linden 6, Berlin, 1086, DD  
(72) Ehwald, Rudolf, Dr. sc. nat. Dipl.-Biol.; Jungnickel, Fritz, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Richter, Eckehard, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Lietz, Peter, Dr. rer. nat.; Wolff, Steven, Dipl.-Biol.; Nagel, Renate, Dr. rer. nat. Dipl.-Bio-chem.; Lippert, Eberhard, Dr. agr. Dipl.-Ing.; Göring, Horst, Prof. Dr. sc. Dipl.-Biol., DD

---

(54) Biokatalysemodul auf der Grundlage denaturierter Pflanzen oder Pflanzenteile

---

(55) Mikroorganismen, Enzyme, Hohlträger, extrahiertes Pflanzenteil, Aerenchym, Abschlußgewebe, immobilisiert, Fremdorganismus

(57) Die Erfindung betrifft einen mit lebenden oder permeabilisierten, enzymatisch aktiven Mikroorganismen oder mit Enzymen gefüllten Hohlträger pflanzlicher Herkunft. Der Biokatalysemodul besteht aus einer extrahierten intakten Pflanze oder einem extrahierten intakten Pflanzenteil mit einem interzellulärenreichen Luftgewebe, dem Aerenchym, das nach außen durch ein dichtes Abschlußgewebe mit hydrophilen Zellwänden begrenzt wird und immobilisierte Zellen oder Enzyme eines Fremdorganismus enthält.

### Patentansprüche:

1. Biokatalysemodul auf der Grundlage denaturierter Pflanzen oder Pflanzenteile und Fremdzellen oder Fremdenzyme, dadurch gekennzeichnet, daß die Fremdzellen oder Fremdenzyme in unzerkleinerten aerenchymreichen Pflanzen oder Pflanzenteilen lokalisiert sind und das Aerenchym durch ein dichtes Abschlußgewebe mit hydrophilen Zellwänden begrenzt ist.
2. Biokatalysemodul nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Fremdzellen oder -enzyme im Aerenchym der Sproßglieder von Lemnaceen lokalisiert sind.
3. Biokatalysemodul nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Fremdzellen oder -enzyme im Aerenchym denaturierter Wurzeln von Gefäßpflanzen lokalisiert sind.
4. Biokatalysemodul nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Fremdzellen oder -enzyme im Aerenchym der Blätter von Wasserpflanzen lokalisiert sind.
5. Biokatalysemodul nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Fremdzellen oder -enzyme im Aerenchym eines Kryptogamen, vorzugsweise im Schwimmthalus von Riccia fluitans, lokalisiert sind.
6. Biokatalysemodul nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Hohlräume des Aerenchyms ein durch Koagulation oder Polymerisation erzeugtes Gel oder einen durch Fällung erhaltenen anorganischen Niederschlag enthalten.

### Anwendungsbereich der Erfindung

Die Erfindung ist in der Biotechnologie, besonders in der technischen Mikrobiologie, Pharmazie und Lebensmittelproduktion einsetzbar.

### Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Für die Immobilisierung von Mikroorganismen und Biokatalysatoren sind verschiedene Prinziplösungen (Trägerbindung, Vernetzung, Einhüllung und Membrantrennung) außerdem verschiedene Mischformen und Modifikationen dieser Lösungen bekannt. (Hartmeier, W., Naturwissenschaften 72, 310-314, 1985). Im Zusammenhang mit der Membrantrennung sind die Vorteile extrahierter pflanzlicher Zellen bekannt (DE-OS 3629692). Es ist auch ein Verfahren zur Einführung von Mikroorganismen in leere Pflanzenzellen bekannt (DE-OS 3629692). Es setzt voraus, daß die extrahierten Zellen eines Pflanzengewebes oder einer Pflanze Zellwand-Durchbrüche aufweisen, durch die in Verbindung mit Flüssigkeitsaufnahme Mikroorganismen eingesaugt werden können. Die Immobilisierung wird durch mechanisch feste Zellwände bewirkt, die den Stoffaustausch mit dem Medium kaum einschränken. Die Gebrauchseigenschaften der in Pflanzenzellen derart verkapselften Mikroorganismen sind stark von der Art des pflanzlichen Trägermaterials abhängig. Für einen hohen Beladungsgrad ist wichtig, daß die Mehrzahl der Zellen einzelne Zellwand-Durchbrüche besitzen. Diese Durchbrüche dürfen nicht so groß oder so zahlreich sein, daß die im Inneren der Zellen vermehrten Mikroorganismen den Hohlräum leicht wieder verlassen können, da sonst die Abgabe freier Mikroorganismen an das Medium ein störendes Ausmaß erreicht. Als bedingt für den technischen Einsatz geeignet haben sich bisher die Hyalozyten bestimmter Torfmoosarten (Sphagnum-Arten) und zerkleinerte Parenchymgewebe erwiesen (DE-OS 3629692). Die Hyalozyten bestimmter Torfmoose können leicht und relativ vollständig mit Mikroorganismen, beispielsweise Hefen, gefüllt werden. Die technische Nutzung der mit Hefe gefüllten Torfmoos-Sprosse wird jedoch u. a. dadurch erschwert, daß die ästige Struktur dieser Sprosse der Erzeugung dichter Packungen und dem Einsatz von Rührgeräten entgegensteht, daß ein lockeres Anhaften der Mikroorganismen zwischen den Blättchen unvermeidbar ist, und vor allem dadurch, daß bei der Herstellung der Immobilisate auf natürliche Standorte von Sphagnum-Arten zurückgegriffen werden muß. Methoden zur Sterilkultur von Torfmoosen sind bisher nicht bekannt. Dies bringt neben der umweltabhängigen Variation der Porenzahl und Porengröße das Problem mit sich, daß die Sprosse von Hand gesäubert werden müssen und daß unkontrollierbare Kontaminationen auftreten. Die ebenfalls bekannte Möglichkeit der Verwendung zerkleinerter Parenchymgewebe (DE-OS 3629692) ist dadurch begrenzt, daß in den geeigneten Materialien (Apfel- und Rübenparenchym, Albedo der Zitrusfrüchte) eine große Zahl von Zellen nicht beimpfbar oder mechanisch instabil ist und daß die verletzten Zellen an den Oberflächen zuviel Raum für eine unerwünschte lockere Immobilisierung bieten. Eine technisch verwertbare Möglichkeit zur Immobilisierung zellfreier Enzyme im Lumen lokal geöffneter Pflanzenzellen ist bisher nicht bekannt.

### Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung ist ein verbesserter Biokatalysemodul auf der Grundlage denaturierter Pflanzen oder Pflanzenteile und immobilisierter Zellen oder Enzyme eines Fremdorganismus, der vielseitig in der Biotechnologie einsetzbar sein soll.

### Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht in der Bereitstellung eines Biokatalysemoduls auf der Grundlage denaturierter Pflanzen oder Pflanzenteile, in dem Fremdzellen oder Fremdenzyme nach dem Prinzip der Membrantrennung immobilisiert vorliegen, wobei die Immobilisierung der Fremdzellen oder -enzyme nicht vom Vorhandensein einzelner Zellwand-Durchbrüche abhängt.

Die Aufgabe wird erfahrungsgemäß dadurch gelöst, daß aerenchymreiche, denaturierte und unzerkleinerte Pflanzenteile oder kleine Pflanzen als Hohlträger genutzt werden und diese Hohlträger Fremdzellen oder zellfreie Enzyme eines Fremdorganismus im Aerenchym enthalten, wobei das Aerenchym nach außen durch ein mechanisch unverletztes, hochpermeables und dicht schließendes Abschlußgewebe begrenzt wird. Das Aerenchym ist das ursprünglich in der lebenden Pflanze als extrazellulärer Gasraum vorliegende Hohlraumsystem von Luftkammern, das Wasserpflanzen einen Auftrieb verleiht oder in submers wachsenden Pflanzenteilen als Gasdiffusionsweg für die Atmung entwickelt ist. Es ist nach außen nicht allein durch eine Zellwand, sondern durch mindestens eine, dicht geschlossene, mechanisch sehr stabile Zellschicht (die Epidermis) oder ein mehrschichtiges Abschlußgewebe begrenzt. Das ein- oder mehrschichtige Abschlußgewebe wirkt im erfahrungsgemäßen Biokatalysemodul als Trennmembran. Die scharfe Ausschlußgrenze dieser Trennmembran bewirkt, daß eingeführte zellfreie Enzyme oder hochmolekulare Ausscheidungsprodukte eingeführter Fremdzellen wie Dextrane, Enzyme oder Antikörper im Inneren des pflanzlichen Hohlträgers gehalten werden. Für den Stoffaustausch steht die gesamte, für niedermolekulare Stoffe hochpermeable Oberfläche des Hohlträgers zur Verfügung. Zur Herstellung des Biokatalysemoduls werden nur solche Pflanzen oder Pflanzenteile eingesetzt, die eine schnelle Einstellung des Diffusionsgleichgewichtes für die Nährstoff der Mikroorganismen bzw. Fremdzellen oder die Produkte und Substrate von Enzymen zwischen dem inneren Hohlraumsystem und dem Medium ermöglichen. Der pflanzliche Hohlträger besteht vorzugsweise aus besonders permeablen pflanzlichen Strukturen mit weitgehend unverletzter Epidermis und hohem Volumenanteil des Aerenchyms. Geeignete Ausgangsmaterialien sind wegen der geringen Diffusionsstrecken und der nicht oder wenig entwickelten Cuticula die Sproßglieder der Lemnaceen, submers gewachsene Wurzeln von Hygrophyten, bandförmige Blätter untergetauchter Pflanzen oder Schwimmthalli des Lebermooses Riccia fluitans. In den genannten pflanzlichen Strukturen wachsen die in das Aerenchym eingeführten Fremdzellen, z.B. Hefen, sehr schnell, wenn das denaturierte beimpfte Pflanzenmaterial in einem geeigneten Medium inkubiert wird. Die eingeführten Biokatalysatoren werden um so sicherer immobilisiert, je weiter entfernt sie sich von diesen offenen Verbindungen und je geringer ihre Beweglichkeit im Aerenchym ist. Die Sicherheit der Immobilisierung kann im Bedarfsfall dadurch verbessert werden, daß die Viskosität oder der Strömungswiderstand im Aerenchym durch Koagulate oder Kristalle vergrößert bzw. die Beweglichkeit der Zellen durch Anwendung von Flockungshilfsmitteln verringert wird, außerdem dadurch, daß offene Verbindungen zwischen dem Aerenchym und dem Medium durch ein Gel, Kristalle oder eine undurchlässige Haut unterbrochen werden. Die immobilisierten Zellen können im lebenden oder denaturierten bzw. permeabilisierten Zustand als Biokatalysatoren eingesetzt werden.

In Anlehnung an ein bereits früher beschriebenes Immobilisierungsverfahren (DE-OS 3629692) wird der Biokatalysemodul dadurch hergestellt, daß die Fremdzellen oder -enzyme durch natürliche Öffnungen im Abschlußgewebe, z.B. die Spaltöffnungen der Lemnaceen oder die Schnittfläche eines zylindrischen oder bandförmigen Pflanzenteiles, aus einer Flüssigkeit durch quellungsbedingten Massenstrom oder Konvektion aufgenommen werden. Sie können auch mittels Injektion mit Hilfe einer Kanüle in das abgeschlossene Hohlraumsystem des Aerenchyms eingeführt werden. Die eingeführten Zellen oder Enzyme breiten sich strömungsbedingt auch dann im gesamten Hohlraumsystem aus, wenn die zur Einführung genutzte Öffnung sehr klein ist. Im Unterschied zu dem bisher bekannten Immobilisierungsverfahren (DE-OS 3629692), das die Einführung der Biokatalysatoren in perforierte pflanzliche Zellen betrifft, ermöglicht die Verwendung bandförmiger oder zylindrischer aerenchymreicher Pflanzenkörper, z.B. lyophilisierter, aerenchymreicher Wurzeln, eine dauerhafte Immobilisierung diffusionsfähiger Makromoleküle bzw. Enzyme, weil der diffusionsbedingte Verlust dieser Stoffe selbst bei offener Schnittfläche bei Diffusionsstrecken im Zentimeterbereich vernachlässigt werden kann. Außerdem ist es möglich, die Schnittflächen solcher Pflanzenkörper nach der Einführung des Biokatalysators zu verschließen.

Die Vorteile des Biokatalysemoduls ergeben sich allgemein aus der Struktur (glatte, dehnungsfeste und belastbare, hochpermeable Hautschicht mit idealen Ultrafiltereigenschaften) und speziell aus der Vielfalt der einsetzbaren Pflanzen und Pflanzenteile sowie aus der Kultivierbarkeit der pflanzlichen Ausgangsmaterialien *in vitro* unter axenischen Bedingungen. Die axenische Kultur der zur Produktion des erfahrungsgemäßen Biokatalysemoduls eingesetzten Pflanzen gewährleistet eine reproduzierbare Qualität hinsichtlich der stofflichen Zusammensetzung, absolute Freiheit von Kontaminationen des natürlichen Standortes und im Fall der Lemnaceen auch die Möglichkeit der saisonunabhängigen Produktion in Fermentoren. Die Vielfalt der einsetzbaren Pflanzen macht es möglich, je nach Bedarf zylindrische, bandförmige, diskoidale oder rundliche Biokatalysemodule mit geringem Diffusionswiderstand, hohem Gehalt an Biokatalysatoren, guter Raumausnutzung und hoher mechanischer Festigkeit herzustellen.

#### Beispiel 1

Wasserlinsen der Gattungen Lemna, Spirodela oder Wolffia (mit Ausnahme von Lemma trisulca) werden mit heißem Ethanol entfärbt und auf der Fritte vom beweglichen Teil des Ethans befreit. Die Extraktionsprodukte werden im Vakuumrotationsverdampfer nur soweit getrocknet, wie es ohne starke Schrumpfung der Sproßglieder möglich ist und anschließend im Volumenverhältnis 1:4 in einer konzentrierten Suspension aus lebenden, kurz zuvor in der Wachstumsphase geernteten Hefezellen in Wasser (etwa 50 g Frischmasse/l) geschüttelt. Als Hefe können beispielsweise *Saccharomyces*- oder *Candida*-Arten eingesetzt werden. Die Wasserlinsen werden nach einer Stunde mit Wasser kurz gespült. Die in das Aerenchym durch Spaltöffnungen und den Wurzelansatz eingedrungenen Hefezellen werden vermehrt, indem die beimpften Sproßglieder in einem geeigneten Medium (z.B. Melasse-Medium mit 0,1% Hefe-Extrakt und Ammonium als Stickstoffquelle) belüftet werden. Es ist darauf zu achten, daß die Nährlösung durch frische Nährlösung ersetzt wird, wenn die außerhalb der Hohlträger wachsenden freien Zellen die stationäre Wachstumsphase erreicht haben. Nach mehrmaligem Wechsel der Nährlösung ist ein großer Teil der Wasserlinsen im Inneren vollkommen mit immobilisierter Hefe gefüllt. Das Verfahren läßt sich vorteilhaft mit Wasserlinsen durchführen, die *in vitro* axenisch in definierten Medien angezogen wurden. Ihre Epidermis ist in keinem Fall verletzt oder mikrobiell angegriffen.

**Beispiel 2**

Das Lebermoos *Riccia fluitans* wird nach Ernte aus der axenischen in-vitro-Kultur mit 50%igem Ethanol extrahiert und wie in Beispiel 1 am Beispiel der Wasserlinsen beschrieben, mit Hefezellen beimpft. Die Schwimmthalli mit den großen Luftkammern zerfallen in etwa 1 cm lange, dichotom gegabelte bandförmige Stücke. Um die Beweglichkeit der Zellen in diesen Luftkammern und damit die Gefahr des Herausspülens zu verringern, werden die Hefe enthaltenden Hohlträger auf einem Sieb gesammelt und mit 2%iger Natriumphosphatlösung pH 2 gesättigt. Nach dem Abtropfen der Phosphatlösung wird das Material im kalten Lufstrom unter ständigem Schütteln oder im Vakuumrotationsverdampfer partiell getrocknet (Gewichtsverlust etwa 50%). Anschließend wird eine der verdunsteten Flüssigkeitsmenge entsprechende Menge von 1%igem Aluminiumsulfat zugesetzt. Das außerhalb der Hohlträger gefällte Aluminumphosphat wird mit Wasser abgewaschen. Durch das im Inneren der Hohlträger gefällte Aluminumphosphat wird die Beweglichkeit der Hefezellen herabgesetzt. In einer phosphathaltigen Lösung ist der Niederschlag unter physiologischen Bedingungen stabil. In ähnlicher Weise kann die Beweglichkeit der Hefezellen im Inneren des Hohlträgers herabgesetzt werden, indem zu der partiell getrockneten Masse der mit Hefe gefüllten Thallusabschnitte von *Riccia fluitans* etwas geschmolzene Gelatine-Lösung oder 1%iger flüssiger Agar bei einer Temperatur von 40°C beigemischt wird. Es ist auch möglich, die mit Hefe gefüllten Thallusabschnitte mit einer Calciumchloridlösung (2%) zu sättigen, partiell wie oben dargestellt zu entwässern und ein Verstopfen der Öffnungen durch Zugabe verdünnter calciumfreier Alginatlösung (0,5%) zu erreichen.

**Beispiel 3**

Gewaschene aerenchymreiche Wurzeln von Hygrophyten, z.B. von *Oryza sativa*, werden in 3 cm lange Segmente unterteilt, mit Ethanol extrahiert, lyophilisiert und in einer Lösung von Glucoamylase infiltriert. Anschließend werden die Schnittflächen der Segmente durch Eintauchen in geschmolzenes Paraffin verschlossen. Das Material wird sorgfältig gewaschen. Die in dieser Weise hergestellte immobilisierte Glucoamylase wird benutzt, um aus einem Präparat löslicher Stärke selektiv niedermolekulare Bestandteile zu verzuckern. Stärkemoleküle mit Molekulargewichten über 20 kD werden nicht abgebaut.