



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 266 584 A1

4(51) C 12 N 1/00
C 12 N 1/32

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 N / 310 655 8	(22)	17.12.87	(44)	05.04.89
(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD				
(72)	Sattler, Karl, Dr. sc. nat.; Hilger, Ursula, Dr. rer. nat.; Babel, Wolfgang, Prof. Dr. sc.; Littkowsky, Ute, Dipl.-Chem., DD				
(54)	Verfahren zur mikrobiellen wachstumsassoziierten Gewinnung von intracellulären nichtproteinischen Stoffwechselprodukten				

(55) Verfahren, mikrobiell, Wachstum, assoziiert, Gewinnung, Stoffwechselprodukte, intracellulär, Lipide, Kohlenhydrate

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen wachstumsassoziierten Gewinnung von intracellulären nichtproteinischen Stoffwechselprodukten. Das Verfahren dient zur Gewinnung von intracellulären nichtproteinischen Stoffwechselprodukten, wie Lipide und Kohlenhydrate, und kann in der mikrobiologisch/biotechnologischen Industrie angewendet werden. Die wachstumsassoziierte Produktgewinnung wird erfindungsgemäß durchgeführt, indem die Vorkultivierung von solchen Mikroorganismen, die die Fähigkeit zur intracellulären Phosphatspeicherung besitzen, auf Nährmedien mit Phosphatüberschuß und die weitere Kultivierung auf Nährmedien, in denen die Phosphatquelle fehlt oder limitiert ist, durchgeführt wird.

Patentanspruch:

1. Verfahren zur mikrobiellen wachstumsassoziierten Gewinnung von intracellulären nichtproteinischen Stoffwechselprodukten, wie beispielsweise Poly- β -hydroxybuttersäure oder Trehalose, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Bereitung der Impfkultur und die Vorkultivierung von solchen Mikroorganismen, die die Fähigkeit zur intracellulären Phosphatspeicherung besitzen, auf Nährmedien mit Phosphatüberschuß und die weitere Kultivierung mit Wachstum und Produktsynthese auf Nährmedien, in denen die Phosphatquelle fehlt oder limitiert ist, durchgeführt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Mikroorganismen Bakterien, Hefen oder Algen eingesetzt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft das Gebiet der mikrobiellen Produktsynthese und kann für die Gewinnung intracellulärer nichtproteinischer Stoffwechselprodukte, wie Lipide und Kohlenhydraten, angewendet werden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Für alle Produktsynthesen gilt die Beziehung, daß ihre Produktivität der Zellkonzentration proportional ist. Der Gültigkeitsbereich dieser Proportionalität ist allerdings meist stark eingeschränkt (K. Sattler, L. Wünsche, Acta Biotechnologica 3 (1983), 345), so daß die darin liegenden Möglichkeiten zur Erhöhung der Produktivität nur wenig genutzt werden können. Eine der Ursachen ist, daß die katalytisch aktiven Zellen durch technologische Maßnahmen, wie Limitation oder Mangel eines oder mehrerer für das Zellwachstum essentieller Nährstoffe (meist N) bei gleichzeitigem Überschuß der C-Quelle an der Vermehrung gehindert oder darin eingeschränkt werden (EP 0015669, EP 0046344) und demzufolge proteolytischem Abbau, der Denaturierung polymerer Zellbestandteile und der Inaktivierung ausgesetzt sind. Dieser Nachteil kann gemindert werden, indem die Produktbildungsphase unterbrochen wird, eine oder mehrere Phasen der Vermehrung eingeschaltet werden oder die Versorgung mit den für das Wachstum essentiellen Nähr- und Spurenstoffen von Beginn der Kultivierung an beschränkt wird (EP 046344). Der Nachteil solcher Verfahren besteht darin, daß sowohl die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit als auch die Produktbildungsgeschwindigkeit herabgesetzt sind.

Andere Ursachen für eine zur Zellkonzentration nicht proportionale Produktbildung sind Mängel des Nährmediums, die durch Ausfällung von Spurenelementen oder, unter Praxisbedingungen, durch das Aufkommen von Substratkonkurrenten entstehen.

Produktsynthesen, deren pH-Optimum im Neutralbereich oder im Alkalischen liegt, sind dadurch benachteiligt, daß in solchen Medien überschüssige Phosphate bereits in der Wachstumsphase eine Ausfällung verschiedener Metallionen bewirken, die für die Produktbildung oder als Permeabilitätsvermittler eine Bedeutung haben (z.B. Fe^{++} , Co^{++} , Ca^{++}). Externes Phosphorangebot erleichtert außerdem das Aufkommen von Substratkonkurrenten, insbesondere während der Produktbildungsphase bei hohen Zellkonzentrationen, wo Autolyseprodukte ohnehin günstige Entwicklungsbedingungen für Substratkonkurrenten bieten.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist ein Verfahren zur mikrobiellen Produktsynthese, das die Resynthese, Vermehrung, Stabilisierung und Aktivierung der produktbildenden Zellen gewährleistet und damit zur Erhöhung der Produktivitäten und Produktkonzentrationen führt.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Verfahren zur intracellulären mikrobiellen Produktsynthese unter wachstumsassoziierten Bedingungen durchzuführen, insbesondere überschüssigen externen Phosphor im Nährmedium bei der Kultivierung zu vermeiden.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe so gelöst, daß die Bereitung der Impfkultur und die Vorkultivierung von solchen Mikroorganismen, die die Fähigkeit zur intracellulären Phosphatspeicherung besitzen, auf Nährmedien mit Phosphatüberschuß und die weitere Kultivierung, die Wachstum und Produktsynthese beinhaltet, auf Nährmedien, in denen die Phosphatquelle fehlt oder limitiert ist, durchgeführt wird. Als Mikroorganismen werden Bakterien, Hefen oder Algen eingesetzt. Ein Medium üblicher Zusammensetzung mit Mineralsalzen, unterschiedlichen Kohlenstoffquellen (Methanol, Glucose, Melasse oder Kohlenwasserstoffe), mit oder ohne Supplinen (Hefeextrakt, Pepton) und mit einem Phosphorgehalt zwischen 50 und 300 mg/l wird nach der Sterilisation mit dem auf gleichem Medium vorkultivierten Stamm beimpft, so daß die Anfangskonzentration der Zellsubstanz 0,5–1 g/Liter beträgt.

Auf diesem Medium erfolgt innerhalb von 5–12 Stunden ein exponentielles Wachstum der Zellen. Während der exponentiellen Phase wird der im Überschuß vorhandene Phosphor als Polyphosphat in den Zellen bis auf Werte um 3% der Zelltrockensubstanz akkumuliert. Beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Phase findet eine erste Produktakkumulation statt. Die weitere Kultivierung erfolgt unter fed-batch- oder Chemostatbedingungen in einem im wesentlichen unveränderten oder in seiner Zusammensetzung völlig abweichenden Nährmedium, aber immer unter Phosphorlimitation oder Phosphormangel,

innerhalb eines Zeitraumes von 24–96 Stunden. Diese Verminderung der Beendigung der Phosphorzufuhr vermindert oder beendet weder das Wachstum noch die Produktbildung. Bei unvermindert fortwährendem Wachstum tritt im Gegenteil eine gegenüber anderen Limitationsarten verstärkte Produktbildung auf. Die intracellulär gespeicherten Polyphosphate reichen aus, um in einem phosphatarmen oder phosphatfreien Medium die Zellkonzentration noch um das Drei- bis Zehnfache zu steigern. In der gleichen Größenordnung oder stärker nimmt auch die Produktakkumulation pro Zelle zu. Dadurch werden sowohl die Produktivität als auch die spezifische Produktbildungsrate wesentlich erhöht.

Die Fähigkeit von Mikroorganismen zur intracellulären Speicherung von extracellulären Phosphorquellen schafft optimale Bedingungen für eine wachstumsassoziierte Produktbildung, indem solche Stämme sowohl mit einer intracellulären Phosphor- als auch Energiequelle ausgestattet werden. Der Vorteil einer intracellulären Phosphorquelle besteht darin, daß Phosphatfällung von Spurenelementen im Nährmedium während der Produktbildungsphase nicht möglich ist, auch wenn es sich um ein Medium mit neutralem oder alkalischem pH-Wert handelt, und daß kein Phosphor für die Entwicklung von Substratkonkurrenten zur Verfügung steht. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß die während der Phase der wachstumsassoziierten Produktbildung im Medium befindliche Kohlenstoffquelle in einem verminderten Umfang als Energiequelle in Anspruch genommen wird und demzufolge die Wachstums- und Produktausbeute steigt. Wachstumsassoziation hat den Vorteil, daß infolge der ständigen Resynthese eine Stabilisierung der Produzentenzellen stattfindet und bis in hohe Zellkonzentrationen (50 g/Liter) die Proportionalität zwischen Zellkonzentration und Produktbildung gewahrt werden kann.

Ausführungsbeispiel

Folgende Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern:

Beispiel 1

Mit Hilfe der Volutinfärbung wurde bei dem methanolassimilierenden Hefestamm *Hansenula polymorpha* M/H30 unter Phosphorüberschußbedingungen eine starke intracelluläre Akkumulation von Polyphosphaten nachgewiesen. Die Kultivierung erfolgte bei $T = 30^{\circ}\text{C}$, pH-Wert 5 auf einem Mineralsalzmedium üblicher Zusammensetzung und Methanol als Kohlenstoffquelle.

Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurde die Kultivierung unter Chemostatbedingungen $\frac{\mu_{\max}}{2}$ fortgesetzt,

einmal bei C-Limitation und einmal P-Limitation, untersucht wurde die intracelluläre Akkumulation von Trehalose.

Die Tabelle zeigt die dabei erzielten Werte:

Chemostatbedingungen bei $\frac{\mu_{\max}}{2}$	Biomasse (gHTS/l)	Phosphor (in % HTS)	Trehalose (in % HTS)
C-Limitation	5	2,6	1,5
P-Limitation	15	0,9	10,0

Während des exponentiellen Wachstums und noch ausgeprägter unter C-Limitation, wird Phosphor bis zu 3% in der Hefetrockensubstanz angereichert, überwiegend als Polyphosphat.

Bei P-Limitation nimmt der Phosphorgehalt der Biomasse auf ein Drittel ab. Polyphosphateinlagerungen sind farbetechnisch nicht mehr nachweisbar. Während sich die Biomasse verdreifacht, steigt für das Produkt Trehalose die spezifische Produktbildungsrate etwa um das 7fache und die Produktivität etwa um das 20fache.

Beispiel 2

Wie im Beispiel 1 wurde auch bei dem Hefestamm *Candida utilis* H92 eine ausgeprägte Disposition zur intracellulären Polyphosphatbildung festgestellt. Die Kultivierung erfolgte auf einem analogen Medium und unter gleichen Milieubedingungen. Als Kohlenstoffquelle diente Glycerol. Untersucht wurde die intracelluläre Akkumulation von Glycogen.

Die Tabelle zeigt die dabei erzielten Werte

Chemostatbedingungen bei $\frac{\mu_{\max}}{2}$	Biomasse (gHTS/l)	Phosphor (in % HTS)	Trehalose (in % HTS)
C-Limitation	5	2,8	1
P-Limitation	15	1,0	12

Auch in diesem Fall sinkt bei P-Limitation der Phosphorgehalt der Biomasse auf ein Drittel ab und die Polyphosphateinlagerungen verschwinden. Während sich die Biomasse verdreifacht, steigt für das Produkt Glycogen die spezifische Produktbildungsrate um das 12fache und die Produktivität um das 36fache.

Beispiel 3

Verwendet wird der Bakterienstamm MB 126. Dieses Bakterium ist gramnegativ, methanolassimilierend und fähig zur Akkumulation von Polyphosphaten und Poly- β -hydroxybuttersäure. Die Haltung erfolgt auf einem üblichen Nähragar mit Methanol als Kohlenstoffquelle, einem Phosphorgehalt von 60–150 mg/l, bei pH 6,5 und 30°C . Die Vorkultivierung des Inokulums wird in Erlenmeyerkolben auf einer Nährlösung durchgeführt, die alle Komponenten im Überschuß enthält und deren Phosphorgehalt so berechnet ist, daß nach Verbrauch der Kohlenstoffquelle die Phosphorkonzentration im Medium ≤ 50 mg P/l beträgt.

Im Fermentor erfolgt nach der Beimpfung, die im Verhältnis 1:10 durchgeführt wird, ein diskontinuierliches Wachstum in einer

Nährlösung, die alle Komponenten im Überschuß enthält, außer Methanol als C-Quelle. Dieses wird so zugesetzt, daß die aktuelle Konzentration im Bereich von 200–400 mg/l liegt. Der Phosphorgehalt dieser Nährlösung beträgt 150 mg/l. Je nach Animpfungsichte (0,1–0,5 BTS/l) folgt ein kurzes, etwa 3–8 stündiges exponentielles Wachstum bis auf eine Biomassekonzentration von 1–1,5 g BTS/l. Dabei wird der im Medium enthaltene Phosphor aufgebraucht und intracellulär angereichert. Das weitere Wachstum erfolgt über 48 Stunden in einem Medium ohne extracellulären Phosphor, wobei sich die Biomasse verzehnfacht und gleichzeitig eine verstärkte PHB-Akkumulation stattfindet. Es wird ein PHB-Gehalt von 55–60% der Bakterientrockensubstanz erreicht.

Gegenüber der N-Limitation wird die Produktbildungsrate verdoppelt, die Produktivität um 60% erhöht und der PHB-Ertragskoeffizient um 45% gesteigert.