



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **253 433 A1**
 4(51) C 12 N 1/20
 C 12 N 1/00
 C 12 N 1/34
AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 295 299 5

(22) 16.10.86

(44) 20.01.88

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

(72) Janke, Hans-Dieter, Dr. rer. nat.; Herrmann, Heidrun, Dr. sc. nat., DD

(54) **Verfahren zur Massenzucht von Bakterienzellen mit Typ-M-Abbauvermögen für Phenole**

(55) Massenzucht von Bakterienzellen, diskontinuierliches Verfahren, aerobe, sterile Bedingungen, Induktor-Natriumsalicylat, C-Quelle-Glukose, Ernte durch Zentrifugation, oxidativer Phenolabbau, Typ-M-Abbauvermögen, Phl⁺-Subkulturen von *Pseudomonas putida*

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Massenzucht von Bakterienzellen, welche die Fähigkeit zum oxidativen Abbau von Phenol und einigen Phenolderivaten über den meta-Weg des mikrobiellen Aromatenstoffwechsels (Typ-M-Abbauvermögen) aufweisen. Sie verfolgt das Ziel, derartige Bakterienzellen in großen Mengen und in hoher Effektivität bereitzustellen. Die diesem Ziel zugrunde liegende Aufgabe wird in der Weise gelöst, daß

- Phl⁺-Subkulturen (d. h. Subkulturen mit der induzierbaren genetischen Potenz zum Typ-M-Abbau von Phenol) des Mikroorganismus *Pseudomonas putida* ZIMET 11054 oder einer seiner Varianten diskontinuierlich unter aeroben, sterilen Bedingungen in einer Nährlösung, die Glukose als Kohlenstoffquelle sowie Natriumsalicylat als Induktor des Phenol abbauenden Enzymsystems enthält, kultiviert und
- nach vollständigem Verbrauch der Kohlenstoffquelle die in der Kultur gewachsenen Bakterienzellen durch Zentrifugation geerntet werden.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Massenzucht von Bakterienzellen mit Typ-M-Abbauvermögen für Phenol und Phenolderivate, **gekennzeichnet durch** die diskontinuierliche Kultivierung von Phl^+ -Subkulturen des Stammes *Pseudomonas putida* unter aeroben, sterilen Bedingungen in einer mineralischen Nährlösung, welche Glukose und Natriumsalicylat enthält und Ernte der in der Kultur gewachsenen Bakterienzellen mittels Zentrifugation nach vollständigem Verbrauch der Glukose.
2. Verfahren nach Pkt. 1, **gekennzeichnet durch** die Verwendung des Stammes 4 von *Pseudomonas putida* oder seiner Variante *Pseudomonas putida* PG 306.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **gekennzeichnet durch** den Einsatz von Natriumsalicylat in einer Ausgangskonzentration von 100 mg/l bis 250 mg/l und von Glukose in einer Ausgangskonzentration von 2 g/l bis 10 g/l.
4. Verfahren nach Pkt. 3, **gekennzeichnet durch** den Einsatz von 150 mg/l bis 220 mg/l Natriumsalicylat und 2,0 g/l bis 5,0 g/l Glukose.
5. Verfahren nach Pkt. 1 und 2, **gekennzeichnet durch** die Kultivierung bei einer Temperatur von 25°C bis 32°C und bei pH-Werten im Bereich von pH 6,0 bis pH 8,0.
6. Verfahren nach Pkt. 5, **gekennzeichnet durch** die Kultivierung bei 28°C bis 30°C und pH 6,5 bis pH 7,6.

Hierzu 2 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Massenzucht von Bakterienzellen mit Typ-M-Abbauvermögen für Phenol und einige Phenolderivate, d. h. mit der Fähigkeit zum oxidativen Abbau dieser toxischen aromatischen Verbindungen über den meta-Weg des mikrobiellen Aromatenstoffwechsels.

Potentielle Anwendungsgebiete der Erfindung sind die biologische Detoxifikation von mit phenolischen Verbindungen belasteten Industrieabwässern sowie die Synthese bestimmter organischer Verbindungen mittels gezielter Biotransformation phenolischer Ausgangsstoffe.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Eine Reihe von Bakterien, darunter *Pseudomonas putida* Stamm H und andere Stämme der Art *Pseudomonas putida*, verfügt bekanntermaßen über die genetische Potenz, Phenol und Cresole oxidativ über den meta-Weg des mikrobiellen Aromatenstoffwechsels abzubauen (Typ-M-Abbau) und als Wachstumssubstrat zu nutzen (Bayly et al., *Biochem. J.*, **101**, 292–301, 1966; Feist und Hegemann, *J. Bacteriol.*, **100**, 869–877, 1969; Ribbons, *Arch. Microbiol.*, **74**, 103–115, 1970; Sala-Trepat et al., *Eur. J. Biochem.*, **28**, 347–356, 1972; Buswell, *J. Bacteriol.*, **124**, 1077–1083, 1975; Janke et al., *Zs. Allg. Mikrobiol.*, **21**, 295–303, 1981). Der Abbau und die Verwertung von Phenol und dessen Derivaten durch Bakterien unterliegt einer Substrathemmung, d. h. bereits bei geringen Konzentrationen dieser toxischen Substrate wird der bakterielle Stoffwechsel maßgeblich gehemmt (Jones et al., *J. gen. Microbiol.*, **74**, 139–148, 1973; Pawlowsky und Howell, *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 889–896, 1973; Hill und Robinson, *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 1599–1615, 1975; Janke et al., *Zs. Allg. Mikrobiol.*, **21**, 295–303, 1981).

Eine entscheidende Voraussetzung für die Ausprägung des Phänotypes Phl^+ , d. h. für die Realisierung der genetischen Potenz zum Phenolabbau in den Bakterienzellen, ist die Anwesenheit eines geeigneten (metabolisierbaren oder nicht-metabolisierbaren) Induktors, welcher die Neusynthese der beteiligten degradativen Enzyme bewirkt. Das Induktionsverhalten von *Pseudomonas putida* Stamm H und anderen Stämmen der Art *Pseudomonas putida* ist nun dadurch gekennzeichnet, daß allein das jeweilige phenolische Primärsupstrat (oder ein entsprechend wirksamer nicht-metabolisierbarer Induktor) die Neusynthese aller für seinen oxidativen Abbau über den meta-Weg erforderlichen Enzyme induziert (Feist und Hegemann, 1969 a. a. O.; Sala-Trepat et al., 1972 a. a. O.; Janke et al., 1981 a. a. O.).

Bisher wurden in Laboruntersuchungen unter Verwendung von Stämmen der Art *Pseudomonas putida* folgende Verfahren für die Anzucht von Bakterienzellen mit Typ-M-Abbauvermögen für phenolische Verbindungen angewandt:

— diskontinuierliche Kultivierung der Zellen mit Phenol (100–300 g/l) bzw. mit einem der Cresol-Isomere (100 bis 300 mg/l) als einziger Kohlenstoffquelle (Sala-Trepat et al., 1972 a. a. O.; Janke et al., 1981 a. a. O.);

Entscheidende Nachteile dieses Verfahrens sind das Auftreten von lag-Phasen bis zu 10 Stunden im Wachstumsverlauf sowie eine durch die jeweilige, toxische Kohlenstoffquelle bedingte Substrathemmung des Zellwachstums. Die zwangsläufig geringe Substratausgangskonzentration erlaubt zudem nur eine sehr geringe Raum-Zeit-Ausbeute an Typ-M-abbauaktiven Bakterienzellen.

- kontinuierliche Kultivierung der Zellen im Chemostaten mit Phenol als einziger Kohlenstoffquelle (Pawlowsky und Howell, 1973 a. a. O.; Hill und Robinson, 1975 a. a. O.; Janke et al., 1981 a. a. O.);
Dieses Verfahren bietet — nach einmaligem Erreichen eines Fließgleichgewichtszustandes (steady-state) — zwar die Möglichkeit einer kontinuierlichen Produktion von Bakterienzellen mit Typ-M-Abbauvermögen für Phenole, jedoch können hohe Raum-Zeit-Ausbeuten an derartigen Bakterienzellen nur bei Verwendung großvolumiger Chemostat-Apparaturen, hoher Konzentrationen des toxischen Substrates im Chemostat-Zulauf sowie von Durchflußraten nahe D_c (Auswaschungsrate) erzielt werden. Dies erfordert einen hohen apparativen Aufwand und eine ständige Prozeßkontrolle.
- diskontinuierliche Kultivierung der Zellen mit Natriumsuccinat (2,7 g/l) bzw. Natriumacetat (2,7 g/l) als Hauptkohlenstoffquelle in Gegenwart von Phenol (235 mg/l) als Induktor des phenolabbauenden Enzymsystems (Feist und Hegeman, 1969 a. a. O.);
Dieses Verfahren basiert auf dem Einsatz von Hauptkohlenstoffquellen (Natriumsuccinat bzw. -acetat), deren Bereitstellung in größeren Mengen einen hohen ökonomischen Aufwand erfordert. Das als Induktor eingesetzte Phenol unterliegt zudem einem Totalabbau durch die wachsende Zellkultur und steht somit nur für eine begrenzte Zeitdauer als Induktor zur Verfügung. Um einer „Ausverdünnung“ der induzierten, für den Typ-M-Abbau erforderlichen Enzyme nach Verbrauch des Phenols vorzubeugen, ist eine aufwendige Prozeßkontrolle erforderlich.
- diskontinuierliche Kultivierung der Zellen mit Natriumacetat (2,7 g/l) bzw. Natriumsuccinat (2,7 g/l) als Kohlenstoffquelle in Gegenwart von Benzylalkohol (270 mg/l) bzw. 2,6-Dimethylphenol (220 mg/l) als nicht-metabolisierbarem Induktor des phenolabbauenden Enzymsystems (Feist und Hegeman, 1969 a. a. O.);
Dieses Verfahren gewährleistet zwar die zeitlich unbegrenzte Präsenz des (nicht-metabolisierbaren) Induktors in der wachsenden Zellkultur, erfordert aber gleichfalls den Einsatz von Kohlenstoffquellen, deren Bereitstellung in größeren Mengen mit einem hohen ökonomischen Aufwand verbunden ist. Die Typ-M-Abbauaktivität von Zellen, die in Gegenwart von 2,6-Dimethylphenol kultiviert wurden, beträgt zudem nur ca. 10% im Vergleich zu mit Phenol als einziger Kohlenstoffquelle vorkultivierten Zellen.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die effektive Massenzucht von Bakterienzellen mit Typ-M-Abbauvermögen für Phenol und Phenolderivate.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein einfaches mikrobiologisches Verfahren zu beschreiben, das die Massenzucht von Bakterienzellen mit Typ-M-Abbauvermögen für Phenol und Phenolderivate mit hoher Raum-Zeit-Ausbeute bei Verwendung leicht zugänglicher und kostengünstiger Einsatzstoffe ermöglicht.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe in ihren Grundzügen wie folgt gelöst:

Phl⁺-Subkulturen des Mikroorganismus *Pseudomonas putida* Stamm H oder einer seiner Varianten (z. B. *Pseudomonas putida* PG 306) werden diskontinuierlich unter aeroben, sterilen Bedingungen in einer Nährlösung kultiviert, welche Glukose als gut verwertbare Kohlenstoffquelle und Natriumsalicylat als nicht-metabolisierbaren Induktor des phenolabbauenden Enzymsystems enthält. Die eingesetzten Mikroorganismen *Pseudomonas putida* Stamm H sowie seine Variante PG 306, deren Typ-M-Abbauvermögen für Phenol und einige Phenolderivate in der beiliegenden Übersicht (Tabelle) näher charakterisiert ist, sind in der ZIMET-Hinterlegungsstelle für Mikroorganismen im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der Akademie der Wissenschaften der DDR, Beutenbergstr. 11, Jena, 6900, unter den Registriernummern ZIMET 11054 bzw. ZIMET 11179 hinterlegt worden.

Die Kultivierung der Phl⁺-Subkulturen von Stamm H *Pseudomonas putida* oder seiner Variante Stamm PG 306 wird in Glasfermentern verschiedenen Inhalts oder in V 2 A-Stahltanks durchgeführt und erfolgt bei pH-Werten der Nährlösung im Bereich von 6,0 bis 8,0, bei einer Kultivierungstemperatur von 25°C bis 32°C, wobei der Induktor Natriumsalicylat in einer Konzentration von 100 mg/l bis 250 mg/l vorliegt. Nach vollständigem Verbrauch der eingesetzten Kohlenstoffquelle, d. h. nach Beendigung der Zunahme der optischen Dichte der Zellkultur, werden die Typ-M-abbauaktiven Bakterienzellen mittels Zentrifugation „geerntet“ und ohne weitere Konservierungsmaßnahmen innerhalb von 10 Stunden in an sich bekannter Weise entweder in mit phenolischen Verbindungen belastete Industrieabwässer eingetragen oder für die Synthese bestimmter organischer Verbindungen (z. B. zweifach hydroxylierte aromatische Verbindungen wie Brenzkatechine) durch gezielte Biotransformation phenolischer Ausgangsstoffe verwendet.

Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens ist durch folgende Kultivierungsparameter gekennzeichnet:

- diskontinuierliche Kultivierung von *Pseudomonas putida* Stamm H oder seine Variante PG 306 unter sterilen, aeroben Bedingungen
- pH-Wert der Nährlösung: 6,5 bis 7,6
- Kultivierungstemperatur: 28°C bis 30°C
- Kohlenstoffquelle: Glukose in einer Ausgangskonzentration von 2,0 g/l bis 5,0 g/l
- Natriumsalicylat-Ausgangskonzentration: 150 mg/l bis 220 mg/l (die jeweilige Induktormenge wird der Nährlösung zu Beginn der Kultivierung unter sterilen Bedingungen zugesetzt)
- Kultivierungsdauer: 10 Stunden bis 20 Stunden

Auskunft über die verfahrensgemäß erreichbaren Ausbeuten an Typ-M-abbauaktiver Zellmasse von Stamm H *Pseudomonas putida* bzw. Stamm PG 306 unter den Bedingungen der bevorzugten Ausführung geben die beiliegenden Abbildungen 1 und 2. Die Vorteile des beschriebenen Verfahrens zur Massenzucht von Bakterienzellen mit Typ-M-Abbauvermögen für Phenole liegen darin begründet, daß

- leicht zugängliche, ökonomisch unaufwendig bereitstellbare Einsatzstoffe (Glukose, Natriumsalicylat) verwendet werden
- auf Grund einer kurzen lag-Phase von ca. 2 Stunden und eines exponentiellen (nicht-gehemmten) Zellwachstums mit einer Verdoppelungszeit von ca. 2 Stunden hohe Raum-Zeit-Ausbeuten an Typ-M-abbauaktiven Bakterienzellen erreicht werden, wobei durch Verwendung des nicht-toxischen, nicht-metabolisierbaren Induktors Natriumsalicylat die für Phenol und Cresole typische Hemmung des bakteriellen Zellwachstums umgangen wird
- praktisch keine Prozeßkontrolle erforderlich ist.

Ausführungsbeispiel 1

Ein 2,5-Liter-Sulfierkolben enthält 1 Liter einer Nährlösung, die sich aus folgenden Komponenten zusammensetzt:

1. Komponente:	
D-Glukose	2,5 g
Natriumsalicylat	0,20 g
in Aqua destillata, 250 ml	
2. Komponente:	
Dinatriumhydrogenphosphat $\times 12 \text{ H}_2\text{O}$	0,5 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,14 g
in Aqua destillata, 250 ml	
3. Komponente:	
Ammoniumnitrat	0,5 g
Magnesiumsulfat $\times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,2 g
Kalziumnitrat	0,1 g
Eisensulfat $\times 7 \text{ H}_2\text{O}$	2,5 mg
Borsäure	0,5 mg
Mangansulfat $\times 4 \text{ H}_2\text{O}$	0,4 mg
Zinksulfat $\times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,4 mg
Natriummolybdat $\times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,2 mg
Kaliumjodid	0,1 mg
in Aqua destillata, 500 ml	

Die 3 Komponenten werden getrennt 25 Minuten bei 120°C sterilisiert und nach Erkalten unter sterilen Bedingungen vereinigt. Der pH-Wert der kompletten Nährlösung beträgt 7,5.

Die fertige Nährlösung wird mit einer konzentrierten Zellsuspension beimpft, welche durch Abschwemmen einer auf Nähragar gezüchteten 24 Stunden alten Emerskultur (Phl^+ -Phänotyp) des Stammes *Pseudomonas putida* H mit sterilem Leitungswasser hergestellt wird. Die Animpfdichte der Kultur wird so gewählt, daß sie einer Ausgangsbiomasse-Konzentration von 0,045 mg Zelltrockenmasse/ml entspricht. Anschließend erfolgt die Kultivierung des beimpften Ansatzes im Sulfierkolben bei einer Temperatur von 30°C über einen Zeitraum von 15 Stunden bei mechanischer Rührung.

Nach vollständigem Verbrauch der Glukose, d. h. nach Beendigung der Zunahme der optischen Dichte der Zellkultur, werden die Typ-M-abbauaktivierten Bakterienzellen mittels 40minütiger Zentrifugation bei 3000 U/Min. in einer Zentrifuge des Typs K 70 (Fa. Janetzki, DDR) geerntet. Die mit Hilfe der Methode von Kaminski et al. [Zs. Allg. Mikrobiol., **23**, 235–246, 1983] ermittelte Biomasse-Endkonzentration in der Kultur entsprach einer Gesamtausbeute an Typ-M-abbauaktivierter Zelltrockenmasse von 1,355 g.

Ausführungsbeispiel 2

Phl^+ -Zellen des Stammes PG 306 werden, wie im Ausführungsbeispiel 1 beschrieben, über einen Zeitraum von 15 Stunden kultiviert und nach vollständigem Verbrauch der Glukose mittels Zentrifugation geerntet. Die ermittelte Biomasse-Endkonzentration in der Kultur entsprach einer Gesamtausbeute an Typ-M-abbauaktivierter Zelltrockenmasse von 1,402 Gramm.

Übersicht:

Angaben zur Charakterisierung des Typ-M-Abbauvermögens von verfahrensgemäß kultivierten Zellen der Stämme ZIMET 11054 und ZIMET 11179 für Phenol und einige Phenolderivate.

Die für die Aktivitätsbestimmung verwendete Methode basiert auf der polarographischen Messung des Sauerstoff-Verbrauches durch „ruhende“ Zellsuspensionen, welcher durch den oxidativen Umsatz der eingesetzten phenolischen Substrate bedingt ist (Janke et al., Zs. Allg. Mikrobiol., **24**, 305–316, 1984). Die Ausgangskonzentration der eingesetzten Testsubstrate in den Versuchsansätzen betrug jeweils 0,3 $\mu\text{Mole/ml}$.

Testsubstrat	Sauerstoff-Verbrauch			
	ZIMET 11054 Q_{O_2} -Werte ^{a)} /in %		ZIMET 11179 Q_{O_2} -Werte ^{a)} /in %	
Phenol	118 ^{b)}	100	108	100
o-Cresol	170	144	148	137
m-Cresol	110	93	97	90
p-Cresol	105	89	96	89
2,4-Dimethylphenol	51	43	49	45
3,5-Dimethylphenol	25	21	22	20
2,3-Dimethylphenol	72	61	66	61
4-Chlorphenol	59	50	54	50

Testsubstrat	Sauerstoff-Verbrauch			
	ZIMET 11054 Q _{O₂} -Werte ^{a)} /in %		ZIMET 11179 Q _{O₂} -Werte ^{a)} /in %	
4-Nitrophenol	14	12	13	12
3-Aminophenol	40	34	38	35
2-Methoxyphenol	28	24	27	25

^{a)} ausgedrückt in $\mu\text{l O}_2$ pro Stunde pro mg Zelltrockenmasse

^{b)} dieser Wert entspricht nach Janke et al. (1981 a. a. O.) einem Umsatz von $1,18 \mu\text{Mol}$ bzw. $0,11 \text{ mg}$ Phenol pro Stunde pro mg Zelltrockenmasse

Abb. 1

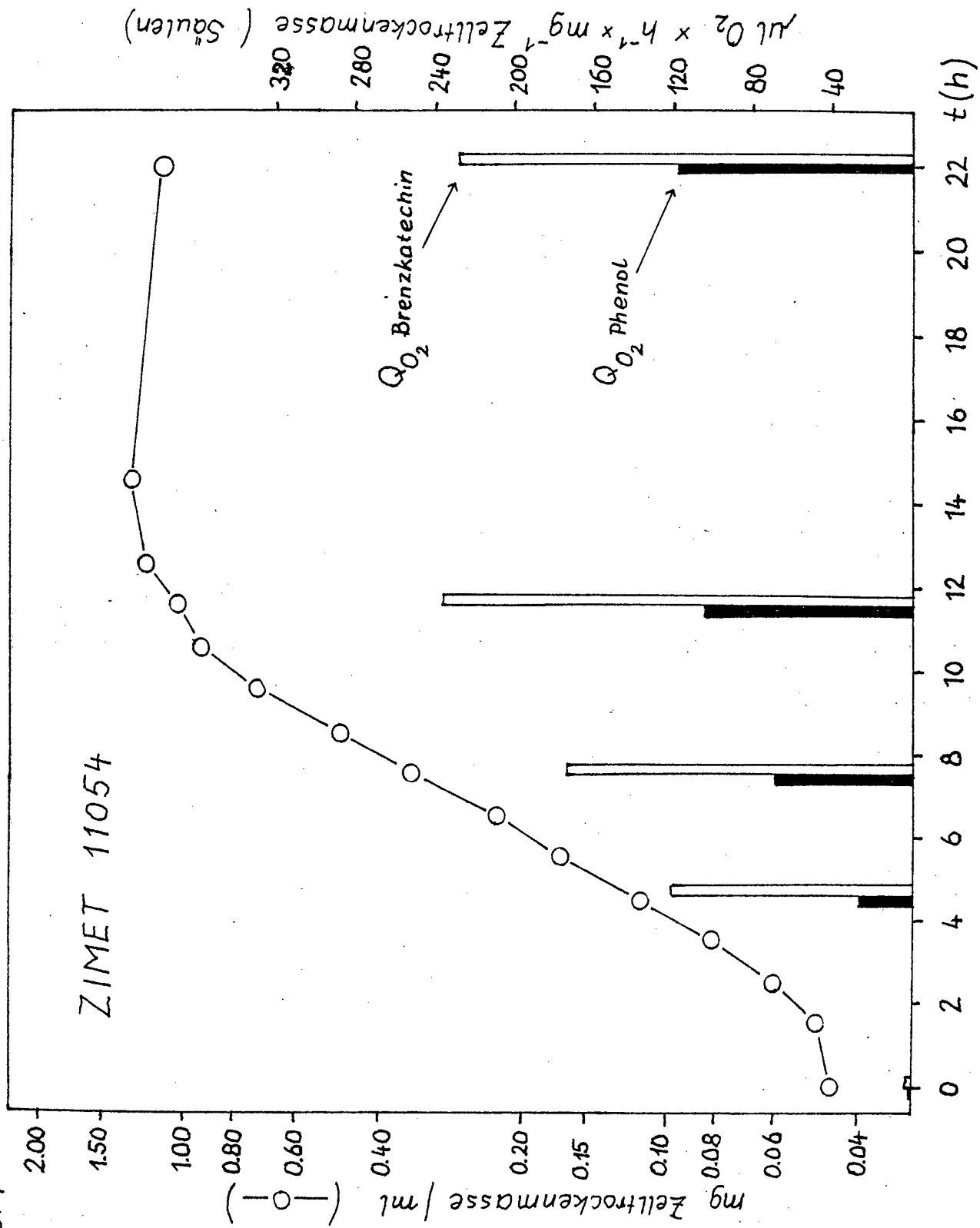


Abb. 2

