



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461 (11)

1572 64

Int.Cl.³ 3(51) C 12 N 1/20
C 12 R 1/04

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 K/ 2172 73

(22) 30.11.79

(44) 27.10.82

(71) AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR, BERLIN;DD;

(72) ROTH, MARTIN,DIPL.-BIOLOGE;NOACK, DIETER,DR. HABIL,DIPL.-PHYS.;GAUBE, KARIN;DD;

(73) siehe (72)

(74) ERICH HULTSCH, ADW DER DDR, INSTITUTE U. EINRICHTUNGEN JENA, PATENTBUERO, 6900
JENA, BEUTENBERGSTR. 11

(54) VERFAHREN ZUR KONTINUIERLICHEN HERSTELLUNG GENETISCH HOMOGENER
ACTINOMYCETEN-KULTUREN

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kontinuierlichen Herstellung genetisch homogener Actinomyceten-Kulturen und verfolgt das Ziel, das Risiko der Degeneration dieser Mikroorganismen, das bei den bisher bekannten und genutzten Methoden zur Anzucht und Vermehrung auftritt, zu vermeiden. Die Aufgabe, ein dazu geeignetes Verfahren zu beschreiben, wird dadurch gelöst, daß die Actinomyceten in einer kontinuierlichen Submerskultur unter geeigneten und reproduzierbaren Bedingungen kultiviert werden.

Dipl.-Biol. Martin Roth
Dr. Dieter Noack
Biol.-Labor. Karin Gaube

Titel der Erfindung

Verfahren zur kontinuierlichen Herstellung genetisch homogener Actinomyceten-Kulturen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kontinuierlichen Herstellung von genetisch homogener Biomasse von Actinomyceten, das in der technischen Mikrobiologie sowie in der mikrobiologischen und mikrobengenetischen Forschung einsetzbar ist.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bekannt, daß Actinomyceten als Produzenten zahlreicher Metabolite und Enzyme in großem Umfang in der pharmazeutischen und mikrobiologischen Industrie eingesetzt werden. Für einen ungestörten und effektiven Produktionsablauf ist die Stabilität der Fähigkeit des betreffenden Produktionsstammes zur Bildung des erwünschten Produkts von entscheidender Bedeutung.

Aus der Praxis der technischen Mikrobiologie und der genetischen Grundlagenforschung ist bekannt, daß es bei Produktionsstämmen von Actinomyceten, die zur Herstellung von Metaboliten, wie z. B. Antibiotika und Enzymen genutzt werden, spontan zur Degeneration kommen kann, die durch den Verlust der Fähigkeit zur Bildung des betreffenden Produkts gekennzeichnet ist. Weiterhin ist bekannt, daß derartige Degenerationen häufig bei mehrmaligen aufeinanderfolgenden Überimpfungen der Bakterien auf Agarnährböden bzw. Passagierungen in Nährlösungen auftreten (Perlman et al., Appl. Microbiol. 2 (1954), 199; Reusser et al., Appl. Microbiol. 9 (1961), 342; Reusser, Adv. Appl. Microbiol. 5 (1963), 189; Freeman und Hopwood, J. Gen. Microbiol. 106 (1978), 377).

Die in der technischen Mikrobiologie allgemein genutzten Methoden zur Anzucht und Vermehrung von Actinomyceten sind gerade dadurch gekennzeichnet, daß die Biomasse für die Beimpfung der Produktionsfermentoren ausgehend von Agarkulturen oder Mycelkonserven durch mehrere aufeinanderfolgende Vorkulturen mit zunehmenden Kulturvolumina gewonnen wird. Nachteilig an dieser Verfahrensweise ist, daß sie nur bedingt reproduzierbar ist und daß auf Grund der mehrmaligen Überimpfungen und der langen Kultivierungszeit das Risiko für eine Degeneration des betreffenden Actinomyceten-Stammes besonders groß ist.

Ein Kultivierungsverfahren, mit dem unter reproduzierbaren Bedingungen genetisch homogene Biomasse von Actinomyceten hergestellt werden kann, ist bisher nicht bekannt.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung verfolgt das Ziel, unter reproduzierbaren Bedingungen genetisch homogene Biomasse von Actinomyceten herzustellen, um die Nachteile der bisher bekannten und genutzten Methoden zur Anzucht und Vermehrung dieser Mikroorganismen zu vermeiden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein kontinuierliches Kultivierungsverfahren zu beschreiben, mit dem genetisch homogene Biomasse von Actinomyceten unter reproduzierbaren Bedingungen hergestellt werden kann. Das Verfahren soll die Nachteile der bisher bekannten Methoden zur Anzucht und Vermehrung dieser Bakterien, die im Risiko der Degeneration der Bakterien und in der ungenügenden Reproduzierbarkeit bestehen, vermeiden.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß der betreffende Actinomyceten-Stamm in einer kontinuierlichen Submerskultur (Chemostat) unter Verwendung einer Mineralsalze, eine organische Kohlenstoff- und eine Stickstoffquelle enthaltenden Nährlösung gezüchtet wird. Die Art des limitierenden Substrats in der Nährlösung, welches das Wachstum der Bakterien

in der kontinuierlichen Kultur begrenzt, und die Verdünnungsrate D im Chemostaten ($D = F/V$; F ... Zuflußrate der Nährlösung und V ... Volumen des Kulturgefäßes) sind von entscheidender Bedeutung für die Erhaltung der genetischen Stabilität der Actinomyceten-Kultur.

Der Erfindung gemäß wird als limitierendes Substrat in der Nährlösung die Stickstoffquelle verwendet. Die Verdünnungsrate D der kontinuierlichen Kultur soll 20 bis 40 % der maximalen Wachstumsrate des betreffenden Bakterienstammes in der verwendeten Nährlösung betragen. Die Kultivierung wird bei einer Kultivierungstemperatur im Bereich von 25 bis 37 °C durchgeführt.

Die kontinuierliche Kultur wird belüftet und bei mycelbildenden Actinomyceten hochtourig gerührt, um eine ausreichende Zerkleinerung des wachsenden Mycels zu erreichen.

Das Verfahren wird folgendermaßen durchgeführt:

Zur Beimpfung der kontinuierlichen Kultur wird eine Vorkultur des zu kultivierenden Actinomyceten-Stammes hergestellt. Dazu wird eine Nährlösung gleicher Zusammensetzung wie für die kontinuierliche Kultur verwendet. Zur Beimpfung der Vorkultur werden entsprechend der Wachstumsform der Actinomyceten-Art Sporen, Mycel, Mycelfragmente oder Einzelzellen benutzt. Bei Verwendung von Mycel werden große Mycelteile bzw. Mycelpellets vorher durch Filtrieren durch ein geeignetes Bakterienfilter entfernt, so daß eine Suspension von Mycelteilen möglichst geringer Größe gewonnen wird. Nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase wird die Vorkultur in das leere Kulturgefäß des Chemostaten eingimpft. Die Belüftung und die Rührung werden eingestellt. Die Wahl der Drehzahl des Rührers erfolgt in Abhängigkeit von der Actinomyceten-Art in der Weise, daß eine möglichst weitgehende Fraktionierung des Mycels gewährleistet wird, ohne daß es zur Lyse des Mycels kommt.

Eine konstante Zuflußrate der Nährlösung, die Mineralsalze, eine organische Kohlenstoffquelle und als limitierenden Bestandteil eine Stickstoffquelle enthält, wird eingestellt, wobei die Verdünnungsrate D der kontinuierlichen Kultur 20 bis

40 % der maximalen Wachstumsrate der Actinomyceten-Art in dieser Nährlösung betragen soll.

Das Fließgleichgewicht der kontinuierlichen Kultur (steady state) ist erreicht, wenn mindestens die Nährlösungsmenge zur Kultur zugeführt worden ist, die dem fünffachen Arbeitsvolumen des Kulturgefäßes entspricht.

Danach kann die aus dem Chemostaten abfließende Kulturlösung gesammelt und weiter verwendet werden. Die in der Kultur enthaltenen Bakterien sind über mehrere Wochen zu mindestens 99 % hinsichtlich ihrer genetischen Merkmale, wie z. B. der Fähigkeit zur Bildung von Metaboliten und Enzymen, homogen und stabil. Sie können als Impfmateriel für Fermentationsverfahren in der technischen Mikrobiologie und als Ausgangsmateriel für Stammhaltung und -konservierung verwendet werden. Ebenso eignen sie sich als Ausgangsmateriel für experimentelle Zwecke in der mikrobiologischen und genetischen Forschung.

Ausführungsbeispiel

Das folgende Beispiel dient dazu, die Erfindung zu erläutern, ohne sie hierauf zu beschränken.

Von einer Schrägagarkultur (AL 53-Agar) des *Streptomyces hygroscopicus* JA 6599/NG 60-93, Bildner des Macrolid-Antibiotikums Turimycin, werden die Sporen durch Abschwemmen mit Glucose-Mineralsalz-Medium gewonnen. Die Suspension wird durch ein G2-Bakterienfilter (VEB Schott & Gen., Jena) filtriert, um damit große Mycelteile zu entfernen. Mit der Sporensuspension werden 100 ml Glucose-Mineralsalz-Medium in der Weise beimpft, daß etwa 10^6 Sporen pro ml enthalten sind. Die Vorkultur wird im Fernbachkolben bei 30 °C auf einem Reziprokschüttler mit einer Frequenz von 130 min^{-1} 15 Stunden geschüttelt. Die Vorkultur enthält dann Mycelflocken mit bis zu 20 Verzweigungen und wird in das leere Kulturgefäß des Chemostaten geimpft, das ein Arbeitsvolumen von 250 ml hat. Danach werden sofort die Nährlösungszufuhr (Glucose-Mineralsalz-Medium) mit einer Verdünnungsrate von $D = 0,1 \text{ pro h}$, der Rührer, der aus einem horizontal am Ende der Rührerwelle befestigten Glasplättchen von 25 x 15 x 2 mm besteht, mit einer Drehzahl von 3000 min^{-1}

und die Belüftung mit einer Rate von 0,1 l Luft pro Stunde und 1 Kulturvolumen eingestellt. Die Kultivierungstemperatur beträgt 30 °C.

Die kontinuierliche Kultivierung wird unter den genannten Bedingungen 28 Tage lang durchgeführt. Während dieser Zeit sind die aus den Bakterien auf Agarmedium wachsenden Kolonien zu 100 % in der Lage, sowohl Luftmycel als auch das Antibiotikum Turimycin zu bilden. Die in der Kultur enthaltene Population ist also hinsichtlich dieser beiden Eigenschaften homogen und stabil.

Zusammensetzung von Glucose-Mineralsalz-Medium:

(Angaben in g pro l)

Glucose 2,0; NH_4Cl (limitierendes Substrat) 0,08; KH_2PO_4 2,72; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 7,16; NaCl 5,1; Na_2SO_4 1,07; $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,041; $\text{FeCl}_{2/3}$ 0,0054; MnCl_2 0,0039; Vitaminfree Casamino Acids (Difco Laboratories, Detroit) 0,1. Lösungsmittel aqua dest., pH-Wert 6,8.

Zusammensetzung von AL 53-Agar:

(Angaben in g pro l)

Saccharose 3,0; Dextrin 15,0; Harnstoff 0,1; NaCl 0,5; KH_2PO_4 0,5; Hefeextrakt 1,0; Pepton (bakt.) 5,0; FeSO_4 (1%ig) 1 ml; Fadenagar 15,0; Lösungsmittel aqua dest., pH-Wert 7,2.

Zur Prüfung der genetischen Homogenität und Stabilität werden aus dem Chemostaten täglich Proben entnommen, verdünnt und auf AL 53-Agar plattiert. Nach Inkubation bei 28 °C wird die Luftmycel-Bildungsfähigkeit der Kolonien visuell und die Turimycin-Bildungsfähigkeit mit einem bekannten mikrobiologischen Testverfahren (Agardiffusionstest, Kähler und Noack, Z. Allg. Mikrobiol. 14 (1974), 529.) geprüft, wobei aus statistischen Gründen von jeder Probe mindestens 200 Kolonien untersucht werden.

Erfindungsanspruch

Verfahren zur kontinuierlichen Herstellung genetisch homogener Actinomyceten-Kulturen, gekennzeichnet dadurch, daß Actinomyceten in einer kontinuierlichen Submerskultur (Chemostat) unter Belüftung und bei mycelbildenden Arten unter Mycelfraktionierung gewährleistender, jedoch Mycellyse ausschließender hochtouriger Rührung in einer Mineralsalze, eine organische Kohlenstoffquelle sowie eine Stickstoffquelle, die als wachstumslimitierendes Substrat verwendet wird, enthaltenden Nährlösung bei einer Verdünnungsrate, die 20 bis 40 % der maximalen Wachstumsrate der betreffenden Actinomyceten-Art in dieser Nährlösung entspricht, und bei einer Kultivierungstemperatur im Bereich von 25 bis 37 °C kultiviert werden, und daß die resultierende homogene Actinomyceten-Kultur als Impfmateri-
al für Fermentationen in der mikrobiologischen Industrie und als Ausgangsmateri-
al für Forschungszwecke und für Stammhaltung und -konservierung verwendet wird.