

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PATENTSCHRIFT



(12) Ausschließungspatent

(11) **DD 297 451 A5**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 P 7/66
C 12 R 1:02

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 P / 336 382 1	(22)	27. 12. 89	(44)	09. 01. 92
(71)	Akademie der Wissenschaften, Otto-Nuschke-Straße 22/23, O - 1080 Berlin, DE				
(72)	Babel, Wolfgang, Prof. Dr. sc. nat.; Miethe, Dietmar, Dr. rer. nat.; Müller, Roland, Dr. rer. nat.; Seidel, Heinz, Dr. rer. nat.; Voigt, Beate, Dr. sc. nat.; Hampel, Carsten, Dipl.-Ing.; Düresch, Rolf, Dr. rer. nat.; Müller, Claudia, Dr. rer. nat.; Sauter, Gerd, Dipl.-Chem., D -				
(73)	Akademie der Wissenschaften, Institut für Biotechnologie, O - 7050 Leipzig; Chemiekombinat Bitterfeld, O - 4400 Bitterfeld, DE				
(74)	Akademie der Wissenschaften, Institut für Biotechnologie, AG Patentwesen, Perlmutterstraße 15, O - 7050 Leipzig, DE				

(54) **Verfahren zur Herstellung von Ubichinon-10 mittels Bakterien**

(55) Ubichinon-10; Bakterien; *Acetobacter methanolicus*; Kultivierung; Chemostat; Limitation; Substratüberschüsse; Methanol; Glucose

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur bakteriellen Herstellung von Ubichinon-10. Erfindungsgemäß wird eine chemostatisch erzeugte methylotrophe Bakterienbiomasse der Art *Acetobacter methanolicus* auf einem heterotrophen Substrat so weiter vermehrt, daß der Substrateintrag immer größer ist, als tatsächlich wachstumsbedingt verbraucht werden kann. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens kann der Ubichinon-10-Gehalt der Bakterienbiomasse signifikant gesteigert werden.

ISSN 0433-6461

4 Seiten

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Ubichinon-10 mittels Bakterien der Art *Acetobacter methanolicus*, die durch eine chemostatische Kultivierung unter Verwendung heterotropher Substrate, insbesondere Methanol, Glucose oder Gluconsäure/Gluconaten, gewonnen wurden, **gekennzeichnet dadurch**, daß auf diese Weise erzeugte Biomasse anschließend so weitervermehrt wird, daß das Substratangebot stets größer ist als wachstumsbedingt verbraucht werden kann.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Substratüberschuß durch ein molares Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnis von mindestens 30:1 charakterisiert wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Weitervermehrung der Biomasse nach dem „fed-batch“-Prinzip erfolgt und die Zulauftrate des Substrates so eingestellt wird, daß sie stets größer ist als die wachstumsbedingte Verbrauchsrate.
4. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Weitervermehrung der Biomasse nach dem „fed-batch“-Prinzip erfolgt und der Verbrauch an heterotrophem Substrat durch Limitation einer anderen für das Wachstum wesentlichen Komponente, insbesondere durch Sauerstofflimitation, geregelt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß Bakterien des Stammes *Acetobacter methanolicus* IMET 11402 verwendet werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ubichinon-10 unter Nutzung von Bakterien als Quelle.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Ubichinone sind dem systematischen Namen nach 2, 3-Dimethoxy-5-methyl 1-1, 4-benzochinone, die in 6-Stellung des Chinonringes eine Isoprenseitenkette variabler Länge tragen. In Hefemitochondrien und Bakterien kommen Homologe vor, die entsprechend der Zahl der isoprenoiden Einheiten als z. B. Q-8, Q-9 oder Q-10 bezeichnet werden. Das Vorkommen und die Verteilung der Ubichinonhomologen in Mikroorganismen ist stammspezifisch und besitzt taxonomische Relevanz. Ubichinone haben wegen ihrer vielfältigen pharmakologischen Wirkungen und der biochemischen Aktivität kommerzielles Interesse erlangt. Mikroorganismenbiomasse enthält in der Regel zu sonstigen natürlichen Quellen um 1 bis 2 Größenordnungen höhere Ubichinonkonzentrationen und wird deshalb als Rohstoff für die Gewinnung von Ubichinonen bevorzugt. Die bekannten Verfahren haben überwiegend die Gewinnung von Ubichinon-10 zum Ziel, da dieses auch im menschlichen Gewebe vorkommt. Beschrieben wurde u. a. die mikrobielle Herstellung mit Arten der Gattungen *Rhodotorula*, *Candida*, *Sporobolomyces*, *Aureobasidium*, *Trichosporon* (US-PS 1.343.066). Bekannt ist auch, daß Bakterien, darunter *Alcaligenes*, *Acetobacter*, insbesondere *A. methanolicus* (DD 236552, Urakami, T., Komagata, K., J. Gen. Appl. Microbiol. 32, 317-341 [1986]) sowie eine Reihe weiterer fakultativ methylotropher und Methylamin assimilierender Spezies der Gattungen *Pseudomonas* und *Methylobacterium* Ubichinon-10 bilden. Ob die Kohlenstoff- und Energiequelle für das Wachstum eine wesentliche Rolle spielt, läßt sich nicht beurteilen. Fest steht nur, daß unterschiedlichste Substrate verwendet worden sind – Kohlenhydrate, organische Säuren und Alkohole. Die analytisch erfaßten Konzentrationen bewegen sich zwischen 60 µg/g Trockensubstanz bis 1000 µg/g (im Falle von *Microcycylus methanolicus* – JP-PS 54-119079).

An Versuchen zur Steigerung der Konzentration und der Ausbeute als mg/l (bezogen auf die Zellkonzentration im Fermentor) hat es nicht gefehlt. Präkursoren wurden dem Nährmedium zugesetzt (US-PS 4.220.719, DE-OS 2838252, US-PS 4.070.244, US-PS 4.367.289) oder spezielle Mutanten benutzt (z. B. von *Agrobacterium*, JP-PS 55-00026). Die erzielten Effekte halten sich in Grenzen. In Rechnung zu stellen ist außerdem, daß die Herstellung der Präkursoren einen ziemlichen präparativen Aufwand zur Voraussetzung hat und Mutanten hinsichtlich der Vermehrung nicht problemlos sind. Das Patent DD 236552 beansprucht *Acetobacter methanolicus* und Methanol allein oder methanolhaltige mit organischen Verbindungen belastete Ab- und Nebenprodukte der chemischen Industrie. Daß die Synthese durch kontinuierliche Vermehrung und unter unsterilen Bedingungen erfolgen kann, ist nicht überraschend, wenngleich bezogen auf eine etwaige Produktion wertvoll. Auch mit anderen Mikroorganismen sollte eine kontinuierliche Erzeugung möglich sein. Die gemäß DD 236552 erreichten Ausbeuten stellen zwar Höchstwerte dar, verglichen mit bis dahin mitgeteilten Ergebnissen, die in der Trockensubstanz vorliegende Stoffkonzentration ist jedoch für eine effektive Verwertung des Verfahrens noch zu gering.

Darstellung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Erhöhung der Konzentration von Ubichinon-10 in der Bakterienbiomasse zu entwickeln.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, indem Bakterien der Art *Acetobacter methanolicus* zunächst auf bekannte Weise durch eine chemostatische, heterotrophe Substrat limitierte Kultivierung unter Verwendung von Methanol oder Glucose bzw. Glucosäure/Gluconaten als Kohlenstoff- und Energiequelle gewonnen werden, anschließend so weitervermehrt werden, daß das Substratangebot stets größer ist als wachstumsbedingt verbraucht werden kann. Dieser Substratüberschuß kann durch ein molares Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnis von mindestens 30:1 charakterisiert werden. Die Weitervermehrung der so

erzeugten Biomasse erfolgt nach dem „fed-batch“-Prinzip, wobei entweder die Zulaufrate des Substrats so eingestellt wird, daß sie stets größer ist als die wachstumsbedingte Verbrauchsrate oder aber der Verbrauch an heterotrophem Substrat durch die Limitation einer anderen für das Wachstum wesentlichen Komponente, insbesondere durch Sauerstofflimitation, geregelt wird. Der Prozeß wird vorteilhafterweise dann beendet, wenn sich die Zellkonzentration etwa verdoppelt hat. In der Weitervermehrungsphase kann auch ein gegenüber der ersten Wachstumsphase anderes Substrat der o.g. Gruppe verwendet werden.

Zur Durchführung des Verfahrens sind alle Stämme der Bakterienart *Acetobacter methanolicus* geeignet, wie z. B. die Stämme IMET B 346 oder IMET 11402, die in der Kultursammlung des Zentralinstitutes für Mikrobiologie und experimentelle Therapie Jena hinterlegt sind.

Der Vorteil der vorliegenden Erfindung besteht darin, daß gegenüber normaler chemostatischer Kultivierung eine Steigerung des Gehaltes an Ubichinon-10 in der Bakteriantrockensubstanz von wenigstens 25%, bei Sauerstofflimitation zur Substratverbrauchsregelung während der Weitervermehrungsphase auch bis 55% erreicht werden kann.

Die Isolierung des Ubichinon-10 aus der Biomasse erfolgt nach bekannter Weise.

Die Erfindung wird durch nachfolgende Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

Acetobacter methanolicus IMET 11402 wurde in einem für aerobe Kultivierung geeigneten Fermentor bei 30°C unter ungeschützten Bedingungen gezüchtet. Der pH-Wert wurde durch NaOH bzw. HCl auf $4,0 \pm 0,1$ konstant gehalten. Die Gelöstsauerstoffkonzentration lag im Bereich von 20–40% des Sättigungswertes. Die Kultivierung erfolgt chemostatisch (C-limitiert) auf Methanol als Kohlenstoff- und Energiequelle bei einer Durchflußrate von $0,12 \text{ h}^{-1}$ auf einem Minimalmedium folgender Zusammensetzung (in mg/g BTS):

NH ₄ Cl	600	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,15
KH ₂ PO ₄	105	MnSO ₄ · 4H ₂ O	0,28
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,26
CaCl ₂ · 2H ₂ O	7	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,08
FeSO ₄ · 7H ₂ O	1,7		

Die so erzeugte Biomasse wurde in einem zweiten Kultivierungsschritt in einem für aerobe Bedingungen geeigneten Fermentor auf Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle vermehrt.

Glucose wurde nach dem „fed-batch“-Prinzip zugesetzt.

Dabei wurde die Zulaufrate für dieses Substrat so gewählt, daß diese größer als die wachstumsbedingte Verbrauchsrate für dieses Substrat war.

Temperatur, pH-Wert und Gelöstsauerstoff-Konzentration bewegten sich im o.g. Bereich. Nach einem 1,5fachen Zuwachs der Biomasse wurde diese abgetrennt und getrocknet. Der Gehalt an Ubichinon-10 im Biomassetrockenprodukt wurde nach alkalischer Hydrolyse der Probe aus dem unverseifbaren Anteil über die Farbreaktion mit Cyanessigsäureethylester photometrisch bestimmt (CHAVENS-Test). Bei chemostatischer Kultivierung auf Methanol wurde ein Ubichinon-10 Gehalt von 0,13% ermittelt. Durch Anschluß der 2. Kultivierungsphase auf Glucose wurde der Gehalt auf 0,176% erhöht. Das entspricht einer Steigerung um 35%.

Beispiel 2

Acetobacter methanolicus wurde, wie in Beispiel 1 beschrieben, aber steril auf Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle bei einer Durchflußrate von $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ chemostatisch (C-limitiert) kultiviert. Nach entsprechender Aufbereitung der Biomasse wurde unter diesen Kultivierungsbedingungen ein Ubichinon-10 Gehalt von 0,116% ermittelt.

Diese so erzeugte Biomasse wurde wiederum einer 2. Kultivierungsphase auf Glucose nach dem „fed-batch“-Prinzip unterzogen, wobei das Substrat entsprechend der Vorgabe in Beispiel 1 zugeführt wurde. Sauerstoff lag in dieser Wachstumsphase ebenfalls im Überschuß vor.

Dieses Verfahrensregime wurde bis zu einem 1,5fachen Biomassezuwachs aufrechterhalten, anschließend die Biomasse abgetrennt und entsprechend aufgearbeitet. Danach konnte ein Ubichinon-10 Gehalt im Trockenprodukt von 0,167% nachgewiesen werden, was einer Steigerung im Vergleich zu chemostatisch auf Glucose kultivierter Biomasse von 44% entspricht.

Beispiel 3

Acetobacter methanolicus IMET B 346 wurde, wie in Beispiel 1 und 2 beschrieben, chemostatisch auf Methanol bei einer Verdünnungsrate $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$ steril kultiviert. Aus der Biomasse konnten nach diesen Kultivierungsbedingungen 0,148% Ubichinon-10 extrahiert werden.

Eine weitere Kultivierung der so erzeugten Biomasse erfolgte wiederum auf Glucose, welche nach dem „fed-batch“-Prinzip lt. Vorgabe im Beispiel 1 zugegeben wurde. Die Sauerstoffkonzentration war in dieser Kultivierungsphase limitierend. Nach einem Zuwachs der Biomasse um das 1,5fache wurde abgetrennt und analysiert. Dabei wurde ein Ubichinon-10 Gehalt von 0,23% ermittelt. Das entspricht einer Steigerung im Vergleich zu auf Methanol chemostatisch kultivierter Biomasse um den Faktor 1,55.

Beispiel 4

Acetobacter methanolicus IMET B 346 wurde, wie in Beispiel 3 beschrieben, chemostatisch auf Methanol kultiviert.

In einer zweiten Kultivierungsphase wurde Methanol nach dem „fed-batch“-Prinzip so zugeführt, daß die wachstumsbedingte Verbrauchsrate geringer als die Zugaberate war. Sauerstoff war in dieser Kultivierungsphase ebenfalls im Überschuß vorhanden. Unter diesen Bedingungen wurde so lange kultiviert, bis ein 1,5facher Biomassezuwachs erreicht war.

Die Analyse der so erzeugten Biomasse wies einen Ubichinon-10 Gehalt von 0,196% aus, was einer Steigerung um 29% im Vergleich zu C-limitiert auf Methanol erzeugter Biomasse entspricht.

Beispiel 5

Acetobacter methanolicus IMET 11402 wurde wie in Bsp. 1 beschrieben kontinuierlich auf Methanol erzeugt. In einer zweiten Kultivierungsstufe erfolgte die weitere Vermehrung auf Gluconsäure/Gluconat als Kohlenstoff- und Energiequelle. Dazu enthielt das Wachstumsmedium (in mg/l): 25%iges Ammoniakwasser (1000), 85%ige H_3PO_4 (94), K_2SO_4 (38), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (34), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,28), $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,47), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,22), H_3BO_3 (0,1), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1), $\text{CoSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1). Der pH-Wert wurde mit 50%iger Gluconsäurelösung auf ca 4,5 eingestellt, das ergibt eine Konzentration im Medium von etwa 10 g/l. Unter diesen „batch“ Bedingungen bleibt der pH-Wert während des Wachstums nahezu konstant auf $4,5 \pm 0,2$. Bei einer Biomasseausgangskonzentration von 5 g/l wird das Wachstum nach 5–6 h durch Auszehrung des Stickstoffs beendet. Die unter diesen Bedingungen erzeugte Biomasse wies einen Ubichinon-10 Gehalt in Trockensubstanz von 0,210 % auf, was einer Steigerung im Vergleich zu C-limitiert auf Methanol erzeugter Biomasse von über 30 % entspricht.