



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 103 15 376 B4** 2005.07.14

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **103 15 376.4**
(22) Anmeldetag: **03.04.2003**
(43) Offenlegungstag: **04.11.2004**
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **14.07.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C12N 1/00**

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden.

(71) Patentinhaber:
Stockhausen GmbH, 47805 Krefeld, DE

(72) Erfinder:
**Lorenz, Josef, 47809 Krefeld, DE; Woronin, S.P.,
Saratov, RU; Kosulin, S.W., Saratov, RU; Singirzev,
I.N., Saratow, RU; Debabov, V.G., Moskau, RU;
Yanenko, A.S., Moskau, RU**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:
DE 44 80 132 C2
EP 03 62 829 A2
EP 03 19 123 A2

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Kultivierung des Nitrilhydratase-produzierenden Stammes RHODOCOCCLUS RHODOCHROUS M33**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur Kultivierung des Nitrilhydratase-produzierenden Stammes Rhodococcus rhodochrous M33, der unter der Hinterlegungsbezeichnung DSM 14230 bei der DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Marschroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Deutschland, hinterlegt ist, dadurch gekennzeichnet, dass ein Kultivierungsmedium verwendet wird, das 12 bis 60 mmol/l Phosphat-Puffer enthält und während der Kultivierung einen pH-Wert im Bereich von 5,5 bis 9,0 aufrecht erhält, wobei als Kohlenstoffquelle im Kultivierungsmedium Glucose und Essigsäure eingesetzt werden und in dem nach dem Verbrauch der vorgelegten Glucosemenge Essigsäure als neue Kohlenstoffquelle zudosiert wird.

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein biotechnologisches Verfahren zur Kultivierung des Nitrilhydratase-produzierenden Stammes *Rhodococcus rhodochrous* M33 sowie ein im Verfahren verwendetes Kultivierungsmedium zur Steigerung der Biomassenausbeute mit hoher Nitrilhydratase-Aktivität.

[0002] Die Entwicklung industrieller biotechnologischer Produktionsverfahren für chemische Verbindungen führte zu großem Interesse an Mikroorganismen mit speziellen Enzymen, die für ausgewählte biokatalytische Reaktionen einsetzbar sind. Ein Beispiel hierfür ist das biotechnologische Produktionsverfahren zur Herstellung von Amiden, das auf der Fähigkeit einiger Mikroorganismen basiert, Nitrilhydratase zu synthetisieren, einem Enzym, das die Umwandlung von Nitrilen organischer Säuren in die entsprechenden Amide katalysiert. Besonderes Interesse gilt hierbei insbesondere Bakterienstämmen, die Acrylnitril in Acrylamid transformieren können.

[0003] Die Abkürzung „U“ (Unit) steht im Folgenden für „Einheit“.

[0004] Eine wichtige Rolle bei der Produktion der katalytisch aktiven Biomasse bzw. des Biokatalysators spielt das Verfahren zur Kultivierung der jeweiligen Mikroorganismen. Üblicherweise ist die Erhöhung der Enzymaktivitäts-Ausbeute pro Volumeneinheit der Kulturbrühe (Gesamtaktivität in U/ml) auf zwei Wegen möglich:

1. Aktivierung der Enzym-Synthese der (Bakterien-) Zelle, d.h. Erhöhung der spezifischen Enzym-Aktivität (U/mg Biotrockenmasse)
2. Steigerung der Ausbeute an aktiven Zellen (aktive Biomasse) pro Volumeneinheit der Kulturbrühe

Stand der Technik

[0005] In der GB 2 087 926 A und der dort zitierten Patentliteratur wird u.a. das Kultivierungsverfahren für den Stamm *Corynebacterium* sp. N-774 (Hinterlegungsnummer Fermentation Research Institute FERM No. 4446) beschrieben. Der Stamm, der über eine Nitrilhydratase verfügt, wird in einem Mineralmedium kultiviert, das eine wasserlösliche Eisenverbindung in Mengen von mindestens 0,2 mg/l enthält sowie 1 Gew.-% Caseinhydrolysate (casamino acids). Die Nachteile dieses Verfahrens sind die hohen Kosten der Caseinhydrolysate und die erzielte niedrige Nitrilhydrataseaktivität: spezifische Aktivität – 53,3 U/mg, Biotrockenmasse – 5,66 mg/ml, Gesamtaktivität – 301,7 U/ml.

[0006] Es ist bekannt, dass Nitrile und Amide organischer Säuren, insbesondere der Propion- und Isobuttersäure, zur Induktion der Nitrilhydratase führen. Der US 4 555 487 kann diesbezüglich entnommen werden, daß die Zugabe solcher Verbindungen, sogenannte enzyminduzierende Mittel bzw. Induktoren, in das Kultivierungsmedium der Stämme *Pseudomonas chlororaphis* Stamm B23 (FERM BP-187) und *Pseudomonas* sp. Stamm PS 1 (FERM BP-188) es möglich macht, Biomasse (5,36 g/l Biotrockenmasse) mit einer spezifischen Aktivität von 62,65 U/mg und eine Gesamtaktivität von 335,8 U/ml zu erhalten.

[0007] Die Nachteile dieses Verfahrens bestehen in der Nutzung von kostenintensiven Induktoren und einer niedrigen Nitrilhydratase-Aktivität der gewonnenen Zellen.

[0008] Das in der EP 0 115 781 beschriebene Kulturmedium zur Züchtung der Stämme *Pseudomonas chlororaphis* Stamm B23 (FERM BP-187) und *Pseudomonas* sp. Stamm PS-1 (FERM BP-188) enthält außer den z.B. in der US 4 555 487 beschriebenen Induktoren eine oder mehrere α -Aminosäuren als Mittel zur Erhöhung der Enzymaktivität. So werden α -Aminosäuren wie z. B. Cystin, Cystein, Alanin, Valin, Methionin etc. in einer Konzentration im Bereich von 0,1 bis 10,0 g/l eingesetzt. Dennoch übersteigt die spezifische Aktivität der auf die Weise gewonnenen Biomasse nicht den Wert 105,7 U/mg, bzw. die Gesamtaktivität von 428,1 U/ml.

[0009] Eine höhere Nitrilhydratase-Aktivität wurde bei der Züchtung des Stammes *Rhodococcus rhodochrous* M33 erreicht, die in der DE 44 80 132 beschrieben ist. Dort wurde gezeigt, dass es bei der Stammkultivierung im synthetischen Medium mit Glucose (Konzentration 5 g/l) möglich ist, Zellen mit einer spezifischen Aktivität bis zu 200 U/mg sowie eine Gesamtaktivität bis 360 U/ml zu erhalten. Ein wesentlicher Vorteil des vorgeschlagenen Verfahrens ist die Einfachheit des Mediums, das keine kostspieligen Komponenten enthält. Jedoch übersteigt die Gesamtaktivität bei der Erhöhung der Glucose-Konzentration auf 20 g/l nicht den Wert von 1368 U/ml.

[0010] Ein technisch adäquates Verfahren ist das Verfahren zur Kultivierung des Stammes *Rhodococcus rhodochrous*, Stamm J1 (FERM BP-1478), das in der EP 0 362 829 beschrieben wird. Im Medium, das einen preis-

werten Induktor – Harnstoff (Konzentration 15 g/l) und Verbindungen des bivalenten Kobalts enthält – ermöglicht das vorgeschlagene Kultivierungsverfahren, Zellen mit einer spezifischen Aktivität von 578 U/mg zu erhalten. Zur Steigerung der Zellausbeute (Biomasseausbeute) werden zusätzlich Pepton und Hefeextrakt dem Medium beigemischt. Jedoch übersteigen die Werte der Gesamtaktivität nicht 2480 U/ml, weil die Biomasseausbeute nur 4,3 g/l beträgt. Beim "upscaling" des Kultivierungsprozesses unter industriellen Bedingungen gelang es die Zellausbeute auf 28 g/l zu erhöhen; dabei sank die spezifische Nitrilhydratase-Aktivität auf 76 U/mg, die Gesamtaktivität sank auf 2100 U/ml (Yamada H., Kobayashi M., "Nitrile Hydratase and Application to Industrial Production of Acrylamide", Biosci. Biotech. Biochem., 60(9), 1391–1400, 1996).

[0011] Es besteht somit weiterhin ein Bedürfnis nach biotechnologischen Verfahren zur Kultivierung von Nitrilhydratase-produzierenden Stämmen, die unter industriellen Bedingungen eine Steigerung der Biomasseausbeute mit hoher Nitrilhydratase-Aktivität ermöglichen.

Aufgabenstellung

[0012] Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein solches Verfahren aufzufinden.

[0013] Die Abkürzungen „M" und „mM" stehen im Folgenden für die Einheiten „md/L" bzw. „mmd/L".

[0014] Überraschenderweise konnte gefunden werden, dass ein Verfahren zur Kultivierung des Nitrilhydratase-produzierenden Stammes *Rhodococcus rhodochrous* M33, der unter der Hinterlegungsbezeichnung DSM 14230 bei der DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Marschroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Deutschland, hinterlegt ist, die erfindungsgemäße Aufgabe löst, wenn zur Kultivierung ein Kultivierungsmedium verwendet wird, das auf einem 12–60 mM Phosphat-Puffer basiert und den Bedarf der Zellen an Phosphor deckt sowie den pH-Wert während der Kultivierung im Bereich von 5,5 bis 9,0 aufrecht erhält, wobei als Kohlenstoffquelle im Kultivierungsmedium Glucose und Essigsäure eingesetzt werden und in dem nach dem Verbrauch der vorgelegten Glucosemenge Essigsäure als neue Kohlenstoffquelle zudosiert wird.

[0015] Die EP 0 319 123 A beschreibt ein Verfahren, in dem ein Mikroorganismus der Gattung *Rhodococcus*, nämlich *Rhodococcus* sp. KSM-B-3M-Stamm (FERM-BP-1531) zur Herstellung ungesättigter Fettsäuren oder Fettsäurederivate in Gegenwart eines Kohlenhydrates oder einer Aminosäure verwendet wird, wobei die Reaktion mit Thiamin oder einem anorganischen Metallsalz durchgeführt wird. Hinsichtlich der erfindungsgemäßen Verfahrensweise, wonach als Kohlenstoffquellen im Kultivierungsmedium Glucose und Essigsäure einzusetzen sind bzw. daß nach dem Verbrauch der vorgelegten Glucosemenge Essigsäure als neue Kohlenstoffquelle zuzudosieren ist, findet sich in diesem Dokument kein Hinweis.

[0016] Das erfindungsgemäße Kultivierungsmedium (nachfolgend SI genannt) hat vorzugsweise die Zusammensetzung (in g/l):

- a.) 7,9 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$
- b.) 1,8 g/l KH_2PO_4
- c.) 0,02–0,04 g/l $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
- d.) 1,0 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
- e.) 0 bis 10 g/l Maisextrakt
- f.) 20 bis 90 g/l Glucose
- g.) 4 bis 20 g/l Harnstoff

[0017] Die Grundlage dieses Kultivierungsmediums ist ein 12–60 mM Phosphat-Puffer, der den Bedarf der Zellen an Phosphor deckt und es ermöglicht, den pH-Wert während der Kultivierung im Bereich von 5,5–9,0 aufrecht zu erhalten, wobei als Quellen für Kohlenstoff Glucose und Essigsäure eingesetzt werden.

[0018] Besonders bevorzugt wird ein 35,3 mM Phosphat-Puffer verwendet.

[0019] Vorteilhaft enthält das Kultivierungsmedium, insbesondere bei der Kultivierung in Schüttelkolben 20 bis 90 g/l, vorzugsweise 20 bis 60 g/l und besonders bevorzugt 20 bis 40 g/l Glucose als Kohlenstoffquelle. Als weitere Kohlenstoffquelle wird neben Glucose Essigsäure verwendet werden, wobei vorzugsweise die Zugabe der Kohlenstoffquellen, insbesondere bei der Kultivierung in Fermentern – im Labor- bis großtechnischen Maßstab – in Form eines Zwei-Phasen-Verfahrens erfolgt:

Die erste Phase ist hierbei gekennzeichnet durch ein eingeleitetes, verstärktes Zellwachstum von *Rhodococcus rhodochrous* M33 auf Basis der im Medium vorgelegten ersten Kohlenstoffquelle, vorzugsweise 20 g/l Glu-

cose. Nach dem Verbrauch der Glucose wird die Fermentation in der zweiten Phase als sogenannter fed-batch-Prozess, bei dem Essigsäure als Kohlenstoffquelle verwendet wird, fortgesetzt. Die kostengünstigere Essigsäure kann die für die Kultivierung verwendbare Glucose ersetzen und gewährleistet eine hohe spezifische Nitrilhydrataseaktivität und eine hohe Gesamtaktivität.

[0020] Vorteilhaft kann die Zugabe der Essigsäure auch in Form ihrer wasserlöslichen Salze erfolgen, wobei Natriumacetat als wasserlösliches Acetatsalz besonders bevorzugt ist. Das erfindungsgemäß einzusetzende wasserlösliche Acetatsalz wird in einer Ausführungsform der Erfindung nach dem Verbrauch der Glucose zudosiert, wobei die Zugabemenge des vorzugsweise zu verwendenden Natriumacetat 1 bis 4 g/l betragen kann. Eine Zugabemenge von Natriumacetat 3 g/l ist hierbei besonders bevorzugt.

[0021] In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird das wasserlösliche Salz der Essigsäure, vorzugsweise Natriumacetat zunächst vorgelegt. Nach Anstieg des pH-Wertes auf pH 7,5–8,5 wird anschließend Essigsäure als 20 bis 50%-ige, vorzugsweise als 30%-ige wässrige Lösung zudosiert. In vorteilhafter Weise erfolgt die Dosierung der wässrigen Essigsäurelösung über ein pH-Stat-Feeding bei pH 7.5–8.5, insbesondere bei pH 7.9.

[0022] Weiterhin kann das erfindungsgemäße Verfahren in der Weise geführt werden, dass die zuzusetzenden Induktorkomponenten, vorzugsweise $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ und Harnstoff zu bestimmten Zeitpunkten während der Fermentation in geeigneter Konzentration zudosiert werden können.

[0023] Insbesondere werden zur Induktion der Nitrilhydratase dem Kultivierungsmedium 4 bis 20 g/l Harnstoff und 0,02 bis 0,04 g/l $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ zudosiert. Vorzugsweise erfolgt die Harnstoffinduktion in der Weise, dass der Harnstoff als Induktor teilweise im Medium vorgelegt wird, insbesondere in einer Einsatzmenge von 4 g/l, und nach dem Verbrauch der vorgelegten Glucose nochmals, bevorzugt in einer Menge von 6 g/l, zudosiert wird.

[0024] Die Zugabe des Induktors $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ kann erfindungsgemäß in der Weise erfolgen, dass das $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ in der Wachstumsphase, die auf der Kohlenstoffquelle Glucose basiert, im Medium vorhanden ist, bevorzugt in einer Einsatzmenge von 0,01 g/l, und nach dem Verbrauch der Glucose nochmals, vorzugsweise in einer Einsatzmenge von 0,03 g/l, zudosiert wird.

[0025] Es wurde überraschend gefunden, dass eine Verkürzung der Fermentationsdauer erzielt werden kann, wenn das erfindungsgemäße Verfahren in der Weise geführt wird, dass $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, vorzugsweise 0,01 g/l, zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase zudosiert wird.

[0026] Es wurde weiterhin gefunden, dass das erfindungsgemäße Verfahren vorteilhaft geführt werden kann, wenn als zusätzlicher Wachstumsfaktor ein Maisextrakt, z.B. in Form von Maisquellwasser bzw. Corn Steep-Lösung in dem Kultivierungsmedium in einer Konzentration von 1 bis 10 g/l eingesetzt wird. Als Maisextrakte sind alle Maisquellwässer einsetzbar, die die mittels üblichen Quellprozeß in Lösung gegangenen Inhaltsstoffe des Maiskorns in konzentrierter Form enthalten. Bevorzugt werden erfindungsgemäß Maisquellwässer verwendet, die unter der Bezeichnung Cerestar 15840 von der Firma Cerestar Deutschland GmbH, Krefeld vertrieben werden.

[0027] Die Stammkultivierung des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt in Schikanenkolben (Schüttelkulturen) und in Labor- und Industrie-Fermentern im Temperaturbereich 25 bis 30°C und einer Kultivierungszeit von 48 bis 170 Stunden. In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird bei der Kultivierung, insbesondere in industriellen Fermentern die Sauerstoffversorgung so gestaltet, dass der relative O_2 -Partialdruck größer 30%, vorzugsweise $\geq 50\%$, ist.

[0028] Die Vorteile des erfindungsgemäßen Kultivierungsverfahren des Nitrilhydrataseproduzierenden Stammes *Rhodococcus rhodochrous* M33 sind, dass unter Verwendung des ebenfalls beanspruchten Kultivierungsmediums sowohl große Mengen an Nitrilhydratase-haltiger Biomasse (Ausbeute bis 39,5 g/l Biotrockenmasse), als auch eine Biomasse mit einer hohen spezifischen Nitrilhydratase-Aktivität (bis 315 U/mg) hergestellt werden kann, wobei sich eine Nitrilhydratase-Gesamtaktivität von 7169 U/ml erzielen läßt, wie den nachfolgenden Beispielen entnommen werden kann.

[0029] Im Unterschied zu den bekannten Kultivierungsverfahren für Nitrilhydrataseproduzierende Stämme zeichnet sich das erfindungsgemäß vorliegende Verfahren durch die Verwendung eines Kultivierungsmediums aus, das auf einem 12–60 mM Phosphat-Puffer basiert, der den Bedarf der Zellen an Phosphor deckt. Außer-

dem können als zusätzlicher Wachstumsfaktor Maisextrakte in Form von Maisquellwasser oder Corn Steep-Lösung verwendet werden. Weiterhin ist vorteilhaft, dass im Kultivierungsmedium die für die Kultivierung verwendbare Glucose durch die kostengünstigere Essigsäure ersetzt werden kann und so eine hohe spezifische Nitrilhydrataseaktivität und hohe Gesamtaktivität des erfindungsgemäßen Verfahrens gewährleistet ist.

Standardtest zur Messung der Nitrilhydratase-Aktivität

[0030] 1 ml 2%-ige Acrylnitril-Lösung in 10 mM Phosphat-Puffer (pH 7,5) werden mit 1 ml M33-Zellsuspension vermischt, die durch vorheriges Zentrifugieren der Kulturbrühe, Waschen und anschließendem Resuspendieren der Zellen in 10 mM Phosphat-Puffer (pH 7,5) erhalten wurde. Die Suspension enthält 0,08 bis 0,16 mg Zellen (Trockenmasse). Die Reaktion läuft 5 min bei 20°C, danach wird die Reaktion durch Zugabe von 20 µl konzentrierter HCl angehalten. Die Konzentration des gebildeten Acrylamids wird gaschromatographisch oder photometrisch bestimmt.

[0031] Die Nitrilhydratase-Aktivität wird in folgenden Einheiten angegeben:

- spezifische Aktivität – in µMol Acrylamid/min × mg Biotrockenmasse = (U/mg)
- Gesamtaktivität – in µMol Acrylamid/min × ml Kulturbrühe

[0032] Die Erfindung wird anhand folgender Beispiele illustriert:

Ausführungsbeispiel

Beispiel 1:

[0033] Schikankolben (250 ml) mit 50 ml Kultivierungsmedium „SI“ (Zusammensetzung in g/l: Na₂HPO₄ × 12H₂O – 7,9; KH₂PO₄ – 1,8; CoCl₂ × 6H₂O – 0,02; MgSO₄ × 7H₂O – 1,0; Maisextrakt – 2,0; pH 7,2 ± 0,2), das Glucose (50 g/l) und Harnstoff (4 bis 20 g/l) enthält, werden mit 1 ml Rhodococcus rhodochrous M33-Inokulumkultur beimpft. Das Inokulum wurde innerhalb von 24 Stunden im gleichen Medium angezüchtet. Die Kultivierung wird in einem Schüttelinkubator bei 180 Umdrehungen/min (kreisförmig) und 30°C innerhalb von 96 Stunden durchgeführt. Die Ausbeute an Biomasse und die Nitrilhydratase-Aktivität der Zellen werden ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1

Harnstoff-Konzentration [g/l]	Biotrockenmasse-Ausbeute [g/l]	Nitrilhydratase-Aktivität	
		Spezifische Aktivität [U/mg]	Gesamtaktivität [U/ml]
4	22,3	62	1383
8	24,2	126	3040
12	24,4	150	3660
16	25,1	177	4453
20	23,0	173	3970

Beispiel 2:

[0034] Schikankolben (250 ml) mit 50 ml Kultivierungsmedium „SI“ (Zusammensetzung in g/l: Na₂HPO₄ × 12H₂O – 7,9; KH₂PO₄ – 1,8; CoCl₂ × 6H₂O – 0,02; MgSO₄ × 7H₂O – 1,0; Harnstoff – 16,0; pH 7,2 ± 0,2), das Glucose (50 g/l) und Maisextrakt (0 bis 10 g/l) enthält, werden mit 1 ml Rhodococcus rhodochrous M33-Inokulumkultur beimpft. Das Inokulum wurde innerhalb von 24 Stunden im gleichen Medium angezüchtet. Die Kultivierung wird in einem Schüttelinkubator bei 180 Umdrehungen/min (kreisförmig) und 30°C innerhalb von 96 Stunden durchgeführt. Die Ausbeute an Biomasse und die Nitrilhydratase-Aktivität der Zellen werden ermittelt und die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

Maisextrakt-Konzentration [g/l]	Biotrocken- masse- Ausbeute [g/l]	Nitrilhydratase-Aktivität	
		Spezifische Aktivität, [U/mg]	Gesamtaktivität [U/ml]
0*	23,3	126	2940
1	23,5	140	3299
2	24,4	150	3660
4	24,9	172	4290
6	24,6	163	4012
8	24,4	156	3802
10	25,3	141	3562

* Diesem Ansatz werden 0,01 g/l $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ zugesetzt.

[0035] Aus den vorgelegten Daten ist es ersichtlich, dass die Zugabe des Maisextraktes zur Erhöhung der spezifischen und der Gesamt-Nitrilhydratase-Aktivität führt. Die optimale Konzentration des Maisextraktes beträgt 4 g/l.

Beispiel 3:

[0036] Schikanenkolben (250 ml) mit 50 ml Kultivierungsmedium „SI“ (Zusammensetzung in g/l: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ – 7,9; KH_2PO_4 – 1,8; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; Harnstoff – 16,0; Maisextrakt – 4,0; pH $7,2 \pm 0,2$) enthalten Glucose in den Konzentrationen 20–90 g/l. Die Inokulation und Inkubation der Kolben werden wie in Beispiel 1 durchgeführt. Die gemessene Biomasseausbeute und die Nitrilhydratase-Aktivität der Zellen sind in der Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3

Glucose-Konzentration [g/l]	Biotrocken- masse- Ausbeute [g/l]	Inkubations- zeit [Stunden]	Nitrilhydratase-Aktivität	
			Spezifische Aktivität [U/mg]	Gesamtaktivität [U/ml]
20	10,5	72	306	3212
30	15,9	72	255	4051
40	19,2	96	223	4282
50	23,5	96	216	5076
60	27,4	120	204	5595
70	32,7	144	198	6465
80	36,4	166	191	6956
90	39,5	166	182	7169

[0037] Wie aus der Tabelle 3 folgt, erhöht sich die Zellausbeute und die Gesamt-Nitrilhydratase-Aktivität proportional der Erhöhung der Konzentration der Glucose im Kulturmedium. Dies resultiert daraus, dass alle Kom-

ponenten des Kulturmediums in nicht limitierenden Mengen vorhanden sind.

Beispiel 4:

[0038] Ein 3 l-Laborfermenter (AK-203), mit 1,5 l Medium „SI“ (Zusammensetzung in g/l: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O} - 7,9$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1,8$; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O} - 0,01$; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 1,0$; Harnstoff – 16,0; Maisextrakt – 4,0; pH 7,2 ± 0,2), das 5 g/l Glucose enthält, wird mit 100 ml *Rhodococcus rhodochrous* M33-Inokulumkultur beimpft. Das Inokulum wurde innerhalb von 24 Stunden in einem Medium gleicher Zusammensetzung gezüchtet.

Kultivierungsbedingungen:

- | | |
|-------------------|--------------------------------|
| • Temperatur | 30°C |
| • Rührer-Drehzahl | 560 min ⁻¹ |
| • Belüftungsrate | 1,5 vvm (volume/volume/minute) |

[0039] Nach 18 Stunden Fermentationsdauer werden alle 2 Stunden je 1,5 g/l Glucose bis zu einer Endkonzentration von 40 g/l zudosiert. Im Ergebnis gelang es, 16,4 g/l Biotrockenmasse mit einer spezifischen Aktivität von 215 U/mg herzustellen. Die Gesamtaktivität betrug 3526 U/ml.

Beispiel 5:

[0040] Ein 3 l-Laborfermenter (AK-203) mit 1,5 l Medium „SI“ (Zusammensetzung in g/l: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O} - 7,9$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1,8$; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O} - 0,01$; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 1,0$; Harnstoff – 4,0; Maisextrakt – 4,0; pH 7,2 ± 0,2), das 20 g/l Glucose enthält, wird wie in Beispiel 4 beimpft. Die Kultivierungsbedingungen sind ebenfalls wie in Beispiel 4. Nach 24–36 Stunden Fermentationsdauer und dem Verbrauch der gesamten Glucosemenge werden 6 g/l Harnstoff, 3 g/l Natriumacetat und 0,03 g/l $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ zudosiert. Nach dem Ansteigen des pH-Wertes des Mediums wird 30%-ige Essigsäure zudosiert (fedbatch). Unter diesen Bedingungen gelang es, innerhalb von 72 Stunden, 19,6 g/l Biotrockenmasse mit einer spezifischen Aktivität von 315 U/mg herzustellen. Die Gesamtaktivität betrug 6174 U/ml.

Beispiel 6:

[0041] Ein 15 l-Laborfermenter (BIOSTAT® E) mit 7,0 l Medium „SI“ (Zusammensetzung in g/l: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O} - 7,9$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1,8$; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 1,0$; Harnstoff – 4,0; Maisextrakt – 4,0; pH 7,2 ± 0,2), das 20 g/l Glucose enthält, wird mit 4% (v/v) *Rhodococcus rhodochrous* M33-Inokulumkultur beimpft. Das Inokulum wurde innerhalb von 24 Stunden als Schüttelkultur in einem Medium gleicher Zusammensetzung angezüchtet.

Kultivierungsbedingungen:

- | | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| • Temperatur | 29–30°C |
| • Belüftungsrate | 0,5 vvm |
| • Überlagerungsdruck | 0,3 bar |
| • Rel. O ₂ -Partialdruck | ≥ 50% (über Rührerdrehzahl geregelt) |
| • Rührer-Drehzahl | 300–600 min ⁻¹ |

[0042] Nach 12 Stunden Fermentationsdauer (Beginn der exponentiellen Wachstumsphase) werden 0,01 g/l $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ zudosiert. Nach 21 bis 23 Stunden Fermentationsdauer und dem Verbrauch der gesamten Glucosemenge werden 6 g/l Harnstoff, 3 g/l Natriumacetat und 0,03 g/l $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ zudosiert. Nach dem Ansteigen des pH-Wertes der Kulturbrühe auf pH 7,9 erfolgt die Zudosierung der neuen Kohlenstoffquelle, Essigsäure (30%-ig), über die pH-Regelung auf pH 7,9 (pH-stat feeding). Unter diesen Bedingungen gelang es, innerhalb von nur 66,5 Stunden, 19,9 g/l Biotrockenmasse mit einer spezifischen Aktivität von 294 U/mg herzustellen. Die Gesamtaktivität betrug 5851 U/ml.

[0043] Dadurch, dass $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ erstmals zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase dem Medium beigemischt wird, konnte gegenüber Beispiel 5 die Fermentationsdauer verkürzt werden.

Beispiel 7:

[0044] Ein industrieller 15 m³-Produktionsfermenter mit 10 m³ Kultivierungsmedium „SI“ (Zusammensetzung in g/l: $\text{H}_3\text{PO}_4 - 3,46$; KOH – 0,74; NaOH – zur Einstellung auf pH 6,9; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O} - 0,01$; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 1,0$; Harnstoff – 4,0; Maisextrakt – 4,0; pH 7,2 ± 0,2), das 20 g/l Glucose enthält, wird mit 5% (v/v) *Rhodococcus*

rhodochrous M33-Inokulumkultur beimpft. Die Inokulumanzucht wurde vorab, innerhalb von 24 Stunden, in einem Vorfermenter ebenfalls mit Medium „SI“ durchgeführt.

Kultivierungsbedingungen:

• Temperatur	28–30°C
• Rührer-Drehzahl	160–165 min ⁻¹
• Belüftungsrate	0,5 vvm

[0045] Nach 24 bis 36 Stunden und nach dem Verbrauch der gesamten Glucosemenge werden dem Medium 6 g/l Harnstoff, 3 g/l Natriumacetat und 0,03 g/l $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ zudosiert. Das Feeding der Essigsäure erfolgt analog Beispiel 6. Nach 72 Stunden Fermentationsdauer gelang es, 18,8 g/l Biotrockenmasse mit einer spezifischen Aktivität von 290 U/mg herzustellen. Die Gesamtaktivität betrug 5452 U/ml.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Kultivierung des Nitrilhydratase-produzierenden Stammes *Rhodococcus rhodochrous* M33, der unter der Hinterlegungsbezeichnung DSM 14230 bei der DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Marschroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Deutschland, hinterlegt ist, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein Kultivierungsmedium verwendet wird, das 12 bis 60 mmol/l Phosphat-Puffer enthält und während der Kultivierung einen pH-Wert im Bereich von 5,5 bis 9,0 aufrecht erhält, wobei als Kohlenstoffquelle im Kultivierungsmedium Glucose und Essigsäure eingesetzt werden und in dem nach dem Verbrauch der vorgelegten Glucosemenge Essigsäure als neue Kohlenstoffquelle zudosiert wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Kultivierungsmedium als Kohlenstoffquelle Glucose in einer Einsatzmenge von 20 bis 90 g/l enthält.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Zugabe der Essigsäure zunächst in Form ihrer wasserlöslichen Salze erfolgt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass als wasserlösliches Salz der Essigsäure Natriumacetat eingesetzt wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das wasserlösliche Salz der Essigsäure zunächst vorgelegt und nach Anstieg des pH-Wertes auf pH 7,5 bis 8,5 Essigsäure zudosiert wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das wasserlösliche Salz der Essigsäure in einer Einsatzmenge von 1 bis 4 g/l, vorzugsweise 3 g/l nach dem Verbrauch der Glucose zudosiert wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die weitere Zugabe der Essigsäure in Form einer 20 bis 50%-igen, vorzugsweise 30%-igen wässrigen Lösung erfolgt.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Essigsäure-Lösung über ein pH-Stat-Feeding bei pH 7.5 bis 8.5, vorzugsweise bei pH 7.9, zudosiert wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass dem Kultivierungsmedium Harnstoff und $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ zudosiert werden.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass Harnstoff als Induktor teilweise im Medium vorgelegt, und nach dem Verbrauch der vorgelegten Glucose nochmals zudosiert wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ in der Wachstumsphase, die auf der Kohlenstoffquelle Glucose basiert, im Medium vorhanden ist, und nach dem Verbrauch der Glucose nochmals zudosiert wird.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass in dem Kultivierungsmedium Maisextrakt als Wachstumsfaktor verwendet wird.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass als Maisextrakte Maisquellwasser verwendet wird.

14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, dass der Maisextrakt in einer Konzentration von 1 bis 10 g/l, vorzugsweise 4 g/l, im Kultivierungsmedium eingesetzt wird.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass bei der Kultivierung im Fermenter die Sauerstoffversorgung so gestaltet wird, dass der relative O₂-Partialdruck größer 30%, vorzugsweise $\geq 50\%$, ist.

16. Kultivierungsmedium zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 15 bestehend aus

- a.) 7,9 g/l Na₂HPO₄ × 12 H₂O
- b.) 1,8 g/l KH₂PO₄
- c.) 0,02–0,04 g/l CoCl₂ × 6 H₂O
- d.) 1,0 g/l MgSO₄ × 7 H₂O
- e.) 20 bis 90 g/l Glucose
- f.) 4 bis 20 g/l Harnstoff

17. Kultivierungsmedium nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Kultivierungsmedium als Komponente g.) bis 10 g/l Maisextrakt enthält.

18. Kultivierungsmedium nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Kultivierungsmedium den Maisextrakt in einer Konzentration von 1 bis 10 g/l im Kultivierungsmedium enthält.

19. Kultivierungsmedium nach einem der Ansprüche 16 oder 18, dadurch gekennzeichnet, dass es 12 bis 60 mmol/l Phosphat-Puffer enthält und während der Kultivierung einen pH-Wert im Bereich von 5,5 bis 9,0 aufrecht erhält.

20. Kultivierungsmedium nach einem der Ansprüche 16 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass das Medium Essigsäure als weitere Kohlenstoffquelle aufweist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen