DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

(12) Wirtschaftspatent

(19) DD (11) 249 712 A1

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

4(51) C 12 N 9/20
C 12 N 1/20

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 291 068 0 (22) 06.06.86 (44) 16.09.87

(71) Karl-Marx-Universität Leipzig, 7010 Leipzig, Goethestraße 3–5, DD
(72) Fischer, Bernhard, Dipl.-Biochem.; Kleber, Hans-Peter, Prof. Dr. sc., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von Lipase

(57) Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein Verfahren anzugeben, das ein Enzym hoher spezifischer Aktivität und Anreicherung liefert. Die Aufgabe wird darin gesehen, durch Züchtung eines Bakterienstammes auf einem bisher nicht verwendeten Kultursubstrat das gewünschte Enzym herzustellen. Das Wesen der Erfindung besteht darin, den Stamm Acinetobacter calcoaceticus auf wasserlöslichen Fettsäureestern als einziger C-Quelle zu züchten, bei deren Abbau Fettsäuren entstehen.

ISSN 0433-6461

3 Seiten

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

(12) Wirtschaftspatent

(19) DD (11) 249 712 A1

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

4(51) C 12 N 9/20
C 12 N 1/20

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 291 068 0 (22) 06.06.86 (44) 16.09.87

(71) Karl-Marx-Universität Leipzig, 7010 Leipzig, Goethestraße 3–5, DD
(72) Fischer, Bernhard, Dipl.-Biochem.; Kleber, Hans-Peter, Prof. Dr. sc., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von Lipase

(57) Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein Verfahren anzugeben, das ein Enzym hoher spezifischer Aktivität und Anreicherung liefert. Die Aufgabe wird darin gesehen, durch Züchtung eines Bakterienstammes auf einem bisher nicht verwendeten Kultursubstrat das gewünschte Enzym herzustellen. Das Wesen der Erfindung besteht darin, den Stamm Acinetobacter calcoaceticus auf wasserlöslichen Fettsäureestern als einziger C-Quelle zu züchten, bei deren Abbau Fettsäuren entstehen.

ISSN 0433-6461

3 Seiten

Zur PS Nr. 249 712 ...
ist eine Zweitschrift erschienen.
(Teilweise bestätigt gem. § 18 Abs.1 d. Änd.Ges.z.Pat.Ges.)

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Lipase, **dadurch gekennzeichnet,** daß der Stamm Acinetobacter calcoaceticus gezüchtet wird und dabei als einzige C-Quelle wasserlösliche Fettsäureester eingesetzt werden.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß der Stamm Acinetobacter calcoaceticus bei Temperaturen von 20–40 °C in Submerskultur in einem flüssigen Minimalmedium gezüchtet wird, nach einer Wachstumszeit von 5–40 h die Bakterien separiert werden und das Enzym aus dem Kulturüberstand abgetrennt wird.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet,** daß als einzige C-Quelle, bei deren Abbau Fettsäuren entstehen, wasserlösliche Fettsäureester wie z. B. Polyoxyethylensorbitan-monooleat, -laurat, -palmiat oder -oleat verwendet werden.
4. Verfahren nach Punkt 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet,** daß aus dem zellfreien Kulturüberstand durch Chromatographie an einem hydrophoben Träger wie z. B. Octyl-Sepharose eine Isolierung des Enzyms bis zur diskelektrophoretischen Reinheit erfolgt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Lipase, die in der Praxis zur Hydrolyse von Fettsäureestern verwendet werden kann.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bereits bekannt, Lipase herzustellen. Zu diesem Zweck werden verschiedene Bakterien- und Hefestämme bzw. Pilze auf komplexen Medien (u. a. Bouillon, Molke, Maisquellwasser) kultiviert, die Bakterien durch Zentrifugation separiert und die Kulturüberstände zur Lipasegewinnung aufbereitet (Literatur z. B. Lipases, ed. B. Borgström und H. Brockman, Elsevier, Amsterdam, 1984). Die dargestellten Verfahren haben den Nachteil, daß durch die Züchtung auf komplexen Medien die Lipase stark verunreinigt und zu ihrer Isolierung mehrere aufwendige Reinigungsstufen notwendig sind.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, mit einem bisher nicht verwendeten Bakterienstamm ein Verfahren zur Enzymproduktion anzugeben, das es gestattet, ein Enzym mit wesentlich höherer Reinheit und spezifischer Aktivität zu gewinnen und so die Isolierung aus den Kulturüberstand zu vereinfachen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Erfindung hat die Aufgabe, wesentliche bekannte Merkmale der bisherigen Verfahrensweise zu verändern und durch den Einsatz eines bisher nicht verwendeten Stammes sowie spezieller Kultivierungssubstrate das gewünschte Enzym mit hoher spezifischer Aktivität zur Verfügung zu stellen.
Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß das Enzym Lipase aus dem Stamm Acinetobacter calcoaceticus hergestellt wird. Die Stammhaltung geschieht bevorzugt auf 3%igem Bouillon-Agar bei 4 °C im Dunklen.
Die Kultivierung von Acinetobacter calcoaceticus erfolgt nach Beimpfen bei einer Temperatur von 20–40 °C, vorzugsweise bei 30 °C, in Submerskultur in einem flüssigen Minimalmedium. Die Züchtung wird erfindungsgemäß auf wasserlöslichen Fettsäureestern als einziger C-Quelle durchgeführt, bei deren Abbau Fettsäuren gebildet werden. Solche C-Quellen sind z. B. Polyoxyethylen-sorbitan-laurat, -palmitat oder -oleat u. a. Als N-Quelle wird NH_4Cl, $(NH_4)_2$ o. dgl. verwendet. Nach einer Wachstumszeit von 5–40 Stunden — je nach physioloiigischen Zustand und Menge des Impfmaterials — werden die Bakterien z. B. durch Zentrifugation separiert und der zellfreie Kulturüberstand gewonnen. Das im zellfreien Kulturüberstand bei erfindungsgemäßer Züchtung erhaltene Enzym ist im Gegensatz zu Kultivierungen auf komplexen Medien nur gering mit Fremdstoffen verunreinigt und besitzt eine hohe spezifische Aktivität (Tabelle 1).
Die Isolierung des Enzyms aus dem Kulturüberstand erfolgt an einem hydrophoben Trägermaterial, wie z. B. Octyl-Sepharose, wie folgt: Der gewonnene zellfreie Kulturüberstand wird bei 4 °C mit kristallinem NaCl zu einer Konzentration von 1 mmol/l versetzt. Die Lösung wird auf eine mit Octyl-Sepharose gefüllte Glassäule gegeben. Die Lipase adsorbiert dabei an dem hydrophoben Träger. Fremdproteine werden nur gering gebunden. Nacheinander wird die Säule mit 1 mol/l NaCl in Phosphatpuffer (50 mmol/l, *p*H 7,5) und 50 mmol/l Phosphatpuffer (*p*H 7,5) gewaschen. Die Lipase wird durch eine 0,5%ige Lösung von Triton X-100 in 50 mmol/l Phosphatpuffer, *p*H 7,5, von der Octyl-Sepharose abgelöst. 60 % der ursprünglichen Lipase werden dabei 10fach angereichert gefunden. Das so erhaltene Lipasepräparat ist diskelektrophoretisch rein.
Die Erfindung soll nachstehend an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiel

Acinetobacter calcoaceticus (69V) wird bei 30°C in Submerskultur in einem flüssigen Minimalmedium gezüchtet. Das Medium enthält pro Liter: 6,97 K_2HPO_4, 1,5 g NaH_2PO_4, 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 7,5 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,75 mg $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0,75 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,15 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,15 mg $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ und 0,15 mg Borsäure. Als Impfsuspension dient eine Abschwemmung von Bouillon-Agar. Als C-Quelle wie Polyoxyethylen-sorbitan-monooleat in einer Konzentration von 10 ml/l als einziger Kohlenstoffquelle und NH_4Cl (3 g/l) als N-Quelle verwendet.
Nach einer Wachstumszeit von 12 h werden die Bakterien durch Zentrifugation (2000 × g, 20 min) separiert und der zellfreie Kulturüberstand gewonnen. Zu diesem Kulturüberstand wird NaCl zu einer Konzentration von 1 mol/l zugegeben und die Lösung bei 4°C auf eine Octyl-Sepharose-Säule aufgetragen. Die Lipaseaktivität verbleibt am Trägermaterial. Nacheinander wird der Träger mit 1 mol/l Natriumchloridlösung (in 50 mmol/l Phosphatpuffer, *p*H 7,5)[x)] gewaschen, bis kein Protein im Eluat nachweisbar ist. Das Enzym wird anschließend mit Triton X-100 (5 g/l in 50 mmol/l Phosphatpuffer, *p*H 7,5) vom Träger gelöst. Das gewonnene Enzym ist diskelektrophoretisch rein. Die Isolierung der Lipase ist in Tabelle 2 dargestellt.
x) und Phosphatpuffer, *p*H 7,5

Tabelle 1
Volumenaktivität, Proteinkonzentration und spezifische Aktivität der Lipse im Kulturüberstand von Acinetobacter calcoaceticus nach Wachstum auf verschiedenen Kultursubstraten

Kultursubstrat	Volumen-aktivität (µmol/min/ml)	Protein (mg/l)	spezifische Aktivität (µmol/min/mg Protein)
Bouillon	0,3	9,5	0,03
Polyoxyethylen-sobitan-mono-laurat	6,5	0,25	26
Polyoxyethylen-sorbitan-mono-palmitat	6,0	0,25	24
Polyoxyethylen-sorbitan-mono-oleat	26,6	0,34	78

Tabelle 2
Reinigung der Lipase (Kultursubstrat: Polyoxyethylen-sorbitanmonooleat) von Acinetobacter calcoaceticus

Reinigungsstufe	Volumen (ml)	Protein (mg/ml)	Gesamtakt. (µmol/min)	spez. Aktivität (µmol/min/mg Protein)	Reinig. (-fach)	Ausbeute (%)
Kulturüberstand	190	0,34	5054	78,2		
Triton X-100 Fraktion	30	0,13	3040	779,2	9,96	60