

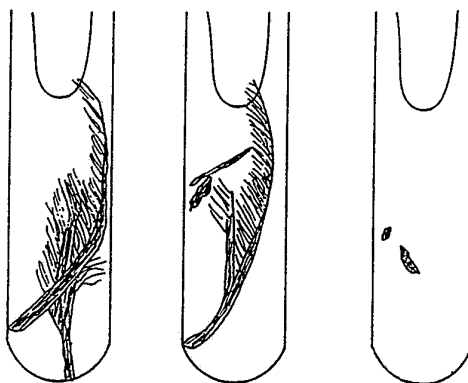


PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C12N 1/20, 9/52 // (C12N 1/20 C12R 1:01)	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/18134 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. September 1993 (16.09.93)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP93/00569 (22) Internationales Anmeldedatum: 12. März 1993 (12.03.93) (30) Prioritätsdaten: P 42 08 275.7 13. März 1992 (13.03.92) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEGUS- SA AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Weißfrauen- straße 9, D-6000 Frankfurt (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : ANTRANIKIAN, Gara- bed [DE/DE]; Dahlienweg 20, D-2105 Seevetal 1 (DE). (74) Anwalt: BIEDERSEE, Heidereich, V.; Degussa Aktienge- sellschaft, Patentabteilung, Postfach 13 45, Rodenbacher Chaussee 4, D-6450 Hanau (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BB, BG, BR, CA, CZ, FI, HU, JP, KP, KR, LK, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA, US, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelasse-</i> <i>nen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderun-</i> <i>gen eintreffen.</i>

(54) Title: STRAIN W MICRO-ORGANISM, ENZYME COMPOSITIONS OBTAINABLE THEREFROM, USE OF THE MICRO-ORGANISM AND HYDROLYSIS PROCESS ESPECIALLY OF KERATIN

(54) Bezeichnung: MIKROORGANISMUS STAMM W, VON DIESEM ERHÄLTICHE ENZYMZUSAMMENSETZUNG, VERWENDUNG DES MIKROORGANISMUS UND VERFAHREN ZUR HYDROLYSE INSBESONDERE VON KERATIN



0 d

1 d

2 d

(57) Abstract

The invention relates to a strain W micro-organism with proteolytical properties, an enzyme composition obtainable therefrom, the use of the micro-organism and a process for hydrolysis, especially of keratin. The micro-organism grows anaerobically thermophilically and allows use of keratin-containing substances, e.g. feathers, as the substrate. The enzymes given off by the micro-organism into the medium or localised on or in the micro-organism are capable of dissolving keratin-containing substances like feathers, hair or horn within a few days and are active between 50 and 105 °C and at a pH of between 4 and 12. The enzymatic hydrolysis of peptides, especially keratin-containing substances, is conducted at a temperature ≥ 70 °C and anaerobically; decomposition can also be conducted at a pH 11 and at high temperature. The quantity of enzymes and other conditions can be selected so that the keratin-containing substrate is dissolved completely after 3 hours at the earliest and to the extent of at least 50 wt % after 24 hours. The enzyme composition and the process are especially suitable for the decomposition of feathers into oligopeptides or individual amino-acids.

(57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft einen Mikroorganismus, Stamm W, mit proteolytischen Eigenschaften, eine von diesem erhältliche Enzymzusammensetzung, die Verwendung des Mikroorganismus sowie Verfahren zur Hydrolyse, insbesondere von Keratin. Der Mikroorganismus wächst anaerob thermophil und kann keratinhaltige Substanzen, wie z.B. Federn, als Substrat verwerten. Die von dem Mikroorganismus in das Medium abgegebene bzw. an oder in dem Mikroorganismus lokalisierte Enzyme können keratinhaltige Substanzen, wie Federn, Haare oder Horn, in wenigen Tagen auflösen und sind aktiv zwischen 50 und 105 °C und bei einem pH zwischen 4 und 12. Die enzymatische Hydrolyse von Peptiden, insbesondere keratinhaltiger Substanz wird vorteilhaft ≥ 70 °C und anaerob durchgeführt; die Spaltung kann auch bei einem pH < 11 und erhöhten Temperaturen durchgeführt werden. Die Enzymmenge und sonstige Bedingungen können so gewählt werden, daß das keratinhaltige Substrat frühestens nach 3 h vollständig und nach 24 h zumindest zu 50 Gew.-% aufgelöst ist. Die Enzymzusammensetzung und die Verfahren sind insbesondere zur Zersetzung von Federn zu Oligopeptiden oder einzelnen Aminosäuren geeignet.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NZ	Neuseeland
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	PL	Polen
BJ	Benin	IE	Irland	PT	Portugal
BR	Brasilien	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SD	Sudan
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KZ	Kasachstan	SK	Slowakische Republik
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SU	Sowjet Union
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CZ	Tschechische Republik	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
DK	Dänemark	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam
FI	Finnland				

Mikroorganismus Stamm W, von diesem erhältliche Enzymzusammensetzung, Verwendung des Mikroorganismus und Verfahren zur Hydrolyse insbesondere von Keratin

Beschreibung

Technisches Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft einen neuen Mikroorganismus mit proteolytischen Eigenschaften, eine von dem Mikroorganismus erhältliche Enzymzusammensetzung, die Verwendung des Mikroorganismus sowie Verfahren zur Hydrolyse insbesondere von Keratin.

Beschreibung des Stands der Technik

Es ist bekannt, daß spezielle Enzyme, die Proteasen, Proteine hydrolysieren, wobei Oligopeptide und schließlich Aminosäuren entstehen. Diese Enzyme werden auch von Mikroorganismen gebildet, wie z. B. von Bakterien der Gattung Pseudomonas, Bacillus oder Proteus. Einige Enzyme, die sogenannten thermophilen Enzyme, zeigen die o. g. Aktivität auch bei Temperaturen $\geq 70^{\circ}\text{C}$ und ermöglichen hierdurch insbesondere industriell interessante Hydrolysen. Eine Quelle für solche thermophilen Enzyme sind z. B. thermophile Mikroorganismen. Einen Überblick hierüber gibt BFE 9, No. 7/8, S. 466 - 470 (1992) in dem Artikel "Thermophilic Enzymes as Industrial

...

Catalysts?" von K. Peek et al. Ein weiteres Enzym, das oberhalb 70°C noch eine gewisse Aktivität zeigt, ist aus Biosci. Biotech. Biochem., 56 (10), S. 1667 - 9 (1992) bekannt. Dieses Enzym zeigt neben gewöhnlichen proteolytischen Eigenschaften auch eine gewisse Keratinase-Aktivität. So wurden mit diesem Enzym zwar Haare bei einer Temperatur bis zu 90°C angegriffen, dies jedoch bei einem pH von 11,0 und über den Zeitraum von 1 h, obwohl das Enzym unter den angegebenen Bedingungen nach bereits 10 min die Hälfte seiner Aktivität eingebüßt hat (vgl. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1989) 30, S. 120 - 124). Da die in Biosci. in Fig. 2b wiedergegebene Zersetzung von menschlichem Haar selbst bei Temperaturen oberhalb 80°C sogar noch eine höhere Zersetzung ausweist, muß diese Zersetzung wegen der Enzymdesaktivierung chemischer und nicht enzymatischer Natur sein. Aufgrund der bei 70°C stark abfallenden Stabilität dieses beschriebenen Enzyms ist dieses nicht geeignet, Keratin, wie es z. B. in Federn, Horn oder Haaren vorkommt, im industriellen Maßstab, d. h. innerhalb einiger Stunden bis wenige Tage, abzubauen, da für einen vollständig enzymatischen Abbau nur solche Keratinmengen zugesetzt werden können, die in weniger als 3 h, insbesondere deutlich schneller als in 1 h, abgebaut sind.

Darstellung der Erfindung

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist das Isolieren und Bereitstellen eines Mikroorganismus, der über proteolytische Eigenschaften verfügt und auch Keratin

...

in Naturprodukten in verhältnismäßig kurzer Zeit abbauen kann. Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher auch eine von diesem Mikroorganismus erhältliche keratinabbauende Enzymzusammensetzung und ein Verfahren zum Abbau insbesondere von Keratin.

Hinsichtlich des Mikroorganismus wird die gestellte Aufgabe durch den Gegenstand des Anspruchs 1 gelöst.

Der Mikroorganismus, Stamm W, wurde bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-3300 Braunschweig, am 12.03.1992 hinterlegt und hat die Eingangsnummer DSM 7003 erhalten. Aufgrund seiner Eigenschaften hat der Mikroorganismus die Bezeichnung *Fervidobacterium pennavorans* erhalten.

Der Mikroorganismus ist lebensfähig und gemäß dem Budapester Vertrag über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke von Patentverfahren hinterlegt und freigegeben. Entsprechende Unterlagen, Erklärungen und Formblatt PCT/RO/134 sind der Anmeldung beigelegt.

Der Mikroorganismus wie auch die von diesem Mikroorganismus gebildeten Proteasen verfügen über eine gute Aktivität, so daß auch eine Enzymzusammensetzung, die aus dem Mikroorganismus erhältlich ist, eine gute in vitro-Aktivität gegenüber Proteinen, insbesondere gegenüber Keratin bzw. keratinhaltigen Substanzen, verfügt. Somit ist auch diese Enzymzusammensetzung isoliert von dem Mikroorganismus einsetzbar.

...

F. pennavorans ist der erste bekannte thermophile Mikroorganismus, der Federn (z. B. Hühnerfedern) als Substrat verwertet, und das sehr gut.

Sowohl mit dem neuen Mikroorganismus als auch mit der Enzymzusammensetzung lassen sich nicht nur unlösliche Strukturproteine, sondern auch lösliche Proteine behandeln. Der Abbau kann vollständig erfolgen, i. d. R. entstehen jedoch neben einzelnen Aminosäuren auch kurze Peptidsequenzen, die gewünschtenfalls auch industriell weiterverwertet werden können. Gegenüber herkömmlichen Verfahren hat der biologische Abbau vor allem den Vorteil, daß auf eine chemische und/oder mechanische Behandlung der Proteine verzichtet werden kann. Ein weiterer Vorteil bei der Anwendung des neuen Mikroorganismus bzw. der Enzymzusammensetzung besteht darin, daß infolge der thermischen Stabilität der Enzyme die hydrolytische Spaltung der peptidischen Bindung günstig bei hoher Temperatur erfolgen kann, und daß der biologische Prozeß hierdurch insgesamt kontaminationssicherer wird, so daß vor allem auch einer Kontamination mit pathogenen Mikroorganismen entgegengewirkt werden kann. Da die beim proteolytischen Abbau erhaltenen Oligopeptide bzw. einzelnen Aminosäuren ein hervorragendes Substrat für viele Mikroorganismen darstellen, ist die erfindungsgemäß mögliche Verfahrensweise insbesondere für die industrielle Anwendung sehr vorteilhaft. Durch die höhere Temperatur erhält man auch eine bessere Substratlöslichkeit und einen leichteren Angriff des Enzyms am Substrat. Außerdem ist die erfindungsgemäße Enzymzusammensetzung auch sonst sehr stabil, z. B. gegen SDS und Harnstoff.

...

Neben der bevorzugten Zersetzung von keratinhaltigen Substanzen kann der neue Mikroorganismus bzw. die Enzymzusammensetzung z. B. auch zur Beseitigung proteinhaltiger Abfälle eingesetzt werden, wobei sich in Kombination mit anderen Mikroorganismen, wie z. B. methanogenen Bakterien, weitere Vorteile ergeben. Werden die gebildeten Peptide oder Aminosäuren weiter zu Methan umgesetzt, kann gleichzeitig eine Energieeinsparung erfolgen. Darüber hinaus können auch z. B. Alkohole oder andere Säuren gebildet werden.

Die zur Erfindung gehörige Enzymzusammensetzung ist erhältlich aus einer den Mikroorganismus Stamm W enthaltenden Kultur, wobei der Kulturüberstand abgetrennt und ggf. konzentriert wird. Ebenso ist eine Enzymzusammensetzung aus einer den Mikroorganismus Stamm W enthaltenden Kultur erhältlich, wobei die Zellen aufgeschlossen werden. Zur Gewinnung der Enzymzusammensetzung der genannten Art ist es vorteilhaft, wenn der Mikroorganismus Stamm W zur Enzymproduktion bzw. zur Enzyminduktion in einem Tryptonmedium kultiviert wird.

Zur Erfindung gehört auch eine Enzymzusammensetzung, die insbesondere wie oben beschrieben zugänglich ist, wobei die Enzymzusammensetzung ein oder mehrere Enzyme beinhalten kann und Proteaseaktivität besitzt, und wobei

- das Temperaturoptimum (bei pH 10) im Bereich von 70 bis 90°C, insbesondere bei 80°C liegt;

- das pH-Optimum (bei 80°C) im Bereich von pH 7 bis pH 11, insbesondere im Bereich von pH 9 bis pH 10 liegt;
- Gelfiltration ein proteolytisches Enzym oder Enzymkomplex mit einem Molekulargewicht von ca. 200 000 Dalton und darüber ausweist und eine Molekulargewichtsbestimmung mit einem SDS-Aktivitätsgel zwei Banden im Bereich zwischen ca. 200.000 und ca. 330.000 zeigt;
- der E₄₀₅-Wert (gegen Blindwert) nach 17 h Inkubation bei 60°C, 0,2 mM Substrat in Phosphatpuffer pH 7 und 0,3 mg/ml Enzymrohextrakt, Meßstrecke 1 cm, bei N-Succinyl-Phe-pNA, N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA und Z-Arg-pNA > 0,5, bei H-Gly-Glu-pNA zwischen 0,3 und 0,5, bei Acetyl-Ala-pNA zwischen 0,1 und 0,3, und bei Benzoyl-DL-Arg-pNA, Z-Gly-Pro-pNA, Benzoyl-Lys-pNA, Z-Arg-pNA und Acetyl-Tyr-pNA unter 0,1 liegt;
- die folgenden Inhibitoren bei den angegebenen Konzentrationen etwa die folgenden Restaktivitäten ergeben:

Inhibitor	Restakt. Restakt.	
	(1 mM)	(5 mM)
ohne	100 %	100 %
Pefabloc SC (Ser.)	83 %	-
PMSF (Ser.)	14 %	10 %
EDTA (Metallo.)	93 %	85 %
Iodoacetat (Cyst.)	83 %	76 %

...

- die Thermostabilitäten wie folgt sind:
 - bei pH 7 und 8,5 über 20 h bei 70°C und 80°C stabil,
 - bei 90°C nach 6 h weniger als 10 % Restaktivität,
 - bei pH 10, 80°C und 90°C nach 15 min Totalverlust der Aktivität
 - bei 70°C etwa 40 % Restaktivität nach 6 h, nach 20 h Totalverlust.

Die Bezeichnung "Enzymzusammensetzung", die für ein oder mehrere Enzyme stehen kann, wurde gewählt, da der proteolytisch aktive Extrakt ein sehr hohes Molekulargewicht hat (ca. 200 000 bei Gelfiltration auf Superdex 200 und zwischen ca. 200 000 und ca. 330 000 bei SDS-PAGE (sodium dodecylsulfat-polyacrylamid gradientgel slab electrophoresis) auf amido black stained gel mit 0,1 % Gelantine als Substrat). Dies deutet auf die mögliche Existenz eines Enzymkomplexes hin, der möglicherweise, unter den beschriebenen Bedingungen jedoch nicht auftrennbar, gleiche oder unterschiedliche Untereinheiten enthält.

Prinzipiell lassen sich die erfindungsgemäßen Enzymzusammensetzungen sowie die erfindungsgemäßen Verfahren mit weiteren Enzymen bzw. -zusammensetzungen - bei entsprechender Stabilität - unmittelbar, ansonsten vor- oder nachgeschaltet kombinieren. Hierdurch kann z. B. der Abbau von Oligopeptiden, die erfindungsgemäß durch Abbau größerer Peptide,

...

insbesondere unlöslicher Peptide, entstehen, zu Aminosäuren gefördert werden.

Der Mikroorganismus Stamm W und/oder die beschriebenen Enzymzusammensetzungen finden Verwendung zum Abbau von Proteinen wie insbesondere auch Keratin bzw. von solchen Stoffen, die diese Proteine beinhalten, insbesondere von Federn, Horn oder Haaren. Besonders günstig ist dabei der Abbau von Federn, da gerade dieser Abbau aufgrund des besonderen Aufbaus von Federn und deren Zusammensetzung bislang enzymatisch besondere Schwierigkeiten bereitete.

Da von Hühnerfarmen mehr als 10 000 t/a Federabfall produziert wird, und Federn zu ca. 95 Gew.-% aus β -Keratin bestehen, bietet die Erfindung eine günstige Alternative zum rein chemischen Abbau von Federn zu Aminosäuren.

Der Mikroorganismus Stamm W findet außerdem Verwendung zur Isolierung eines eine Keratinase codierenden Gens und/oder zur Insertion eines eine Keratinase codierenden Gens in einen anderen Mikroorganismus. Hierbei handelt es sich um routinemäßig durchgeführte bzw. durchführbare Verfahren analog Winnaker E. L., Gene und Klone: Eine Einführung in die Gentechnologie, VCH, Weinheim, 1985; Maniatis, Fritsch, Sambrock: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Lab. New York, 1989, wobei das eine Keratinase codierende Gen aus dem Mikroorganismus Stamm W z. B. in ein E. coli oder Bacillus insertiert wird und der E. coli dann zur Gewinnung der Keratinase gezüchtet wird. Die Keratinase kann aufgrund ihrer

...

Temperaturstabilität dann leicht aus diesem E. coli oder Bacillus durch Erhitzen abgetrennt werden. Da der Mikroorganismus Stamm W als anaerober Mikroorganismus nur langsam gezüchtet werden kann, erlaubt die erfindungsgemäße Insertion in den leicht zu kultivierenden E. coli oder Bacillus eine schnellere Anzucht und höhere Enzymausbeuten.

Ein zur Erfindung gehörendes Verfahren zur Hydrolyse von Peptiden, insbesondere von Keratin oder keratinhaltiger Substanz, wie Federn, Haare oder Horn, in Oligopeptide und/oder Aminosäuren bei einer Temperatur $> 50^{\circ}\text{C}$ mittels eines oder mehrerer Enzyme wird derart durchgeführt, daß die Hydrolyse bei einer Temperatur zwischen 50°C und 105°C erfolgt, wobei der pH zwischen 4 und < 11 eingestellt wird und wobei durch die Wahl der zugegebenen Enzymmenge, insbesondere aber durch Wahl der Temperatur und des pHs Sorge getragen wird, daß der enzymatische Abbau ein mehrfaches von einem eventuell begleitenden chemischen Abbau beträgt. Besonders vorteilhaft ist dabei ein pH von höchstens 10,5. Je höher der pH liegt, desto höher ist auch der Anteil des chemischen Abbaus, wobei gleichzeitig auch die Menge an racemisierten Aminosäuren oder an Oligopeptiden mit racemisierten Aminosäuren zunimmt.

Desweiteren kann gemäß der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Hydrolyse von Peptiden, insbesondere von Keratin oder keratinhaltiger Substanz, wie Federn, Haare oder Horn, in Oligopeptiden und/oder Aminosäuren mittels eines oder mehrerer Enzyme bei einer Temperatur $\geq 70^{\circ}\text{C}$ durchgeführt werden, bei dem der

...

enzymatische Abbau anaerob ist. Besonders günstig ist eine Übertragung des anaeroben Abbaus auf die zuerst beschriebene Verfahrensweise. Grundsätzlich läßt sich die anaerobe Verfahrensweise bei einem pH zwischen 4 und 12 durchführen, wobei wiederum der pH unter 11 und insbesondere bis 10,5 bevorzugt ist. Mit dem anaeroben Abbau lassen sich besonders saubere Aminosäuren gewinnen, insbesondere schwefelhaltige Aminosäuren, wie Cystin und Cystein, werden nicht oxidiert.

Günstig ist auch eine dritte Verfahrensvariante, bei der Peptide, insbesondere Keratin oder keratinhaltige Substanz, wie Federn, Haare oder Horn, in Oligopeptide und/oder Aminosäuren mittels eines oder mehrerer Enzyme hydrolysiert werden, wobei ein mesophiler Mikroorganismus eingesetzt wird, der wie oben beschrieben zugänglich ist und der ein Gen enthält, das eine bei $\geq 70^{\circ}\text{C}$ aktive Protease, insbesondere Keratinase codiert, wobei der mesophile Mikroorganismus bei $\geq 70^{\circ}\text{C}$ in wässrigem Medium mit dem Protein, insbesondere Keratin oder keratinhaltiger Substanz umgesetzt wird, oder wobei der mesophile Mikroorganismus, der das beschriebene Gen enthält, in wässrigem Medium auf $\geq 70^{\circ}\text{C}$ erhitzt und das wässrige Medium, ggf. nach Abtrennen ausgefallener Komponenten, wie z. B. Teile des mesophilen Mikroorganismus, mit dem Protein, insbesondere Keratin oder der keratinhaltigen Substanz versetzt wird. Das die Protease, insbesondere Keratinase codierende Gen ist insbesondere ein - wie oben beschrieben - in den mesophilen Mikroorganismus insertiertes Gen. Diese Verfahrensweise ist insbesondere für die industrielle Peptidhydrolyse, insbesondere von Federn, geeignet.

...

Die Verfahrensweise erlaubt ein praktisch kontaminationsfreies Arbeiten, wobei die erhaltenen Aminosäuren und/oder Oligopeptide verhältnismäßig sauber anfallen bzw. von eventuellen Verunreinigungen, wie z. B. Teilen des Mikroorganismus, einfach, z. B. durch Filtration, abgetrennt werden können.

Gemäß der vorliegenden Erfindung ist ein weiteres Verfahren zur Hydrolyse speziell unlöslicher Proteine, wie Keratin oder keratinhaltiger Substanz, wie Federn, Haare oder Horn, in Oligopeptide und/oder Aminosäuren bei einer Temperatur $> 50^{\circ}\text{C}$ und mittels eines oder mehrerer Enzyme, vorteilhaft, wobei die Hydrolyse mit einer solchen Enzymmenge, bei einem solchen pH und einer solchen Temperatur durchgeführt wird, daß ein zugegebenes unlösliches Substrat, insbesondere Federn, Haare oder Horn, frühestens nach 3 h aufgelöst ist, wobei besonders vorteilhaft dieses Substrat nach 24 h zumindest zu 50 Gew.-% aufgelöst ist. Vorteilhaft wird dieses Verfahren nach 1 bis 4 Tagen abgebrochen, wobei dann insbesondere mindestens 80 Gew.-%, vorzugsweise über 90 Gew.-% und besonders günstig praktisch das gesamte Substrat aufgelöst ist.

Wenn bei den vorgenannten Verfahren Keratin oder keratinhaltige Substanz, insbesondere Federn, eingesetzt werden, kann vorteilhaft auf eine Vorbehandlung, wie z. B. ein Autoklavieren, insbesondere auf ein Behandeln bei einer Temperatur $\geq 130^{\circ}\text{C}$ und besonders vorteilhaft auch auf eine Vorbehandlung $\geq 120^{\circ}\text{C}$, verzichtet werden. Solche Vorbehandlungen sind bei der Hydrolyse von Federn bislang üblich gewesen, hierbei wird jedoch ein beträchtlicher Anteil der Aminosäuren racemisiert.

...

Erfindungsgemäß können die vorgenannten Verfahren auch zweistufig durchgeführt werden, d. h. nach Auflösen zumindest eines Teils des eingesetzten Substrats, insbesondere nach Auflösen von mehr als 50 Gew.-% des eingesetzten Substrats, wird das Hydrolysat, ggf. unter anderen Bedingungen (Temperatur, pH), mit einer oder mehreren anderen Peptidasen weiterbehandelt. Dies dient der schnelleren oder überhaupt weitergehenden Hydrolyse entstandener Oligopeptide.

Mit zur Erfindung gehört auch ein Verfahren zur enzymatischen Hydrolyse von Proteinen, insbesondere von Keratin bzw. von solchen Stoffen, die diese Proteine beinhalten, insbesondere von Federn, Horn oder Haaren, wobei die Hydrolyse mit einer der oben beschriebenen Enzymzusammensetzungen und/oder mit dem Mikroorganismus Stamm W durchgeführt wird. Grundsätzlich sind die oben beschriebenen Enzymzusammensetzungen in allen erfindungsgemäßen Verfahren einsetzbar.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen und Figuren näher erläutert.

Es zeigen:

Fig. 1 das pH-Optimum einer erfindungsgemäßen Enzymzusammensetzung;

Fig. 2 das Temperatur-Optimum der Enzymzusammensetzung gemäß Fig. 1;

...

Fig. 3 die Enzymaktivität dieser Enzymzusammensetzung;

Fig. 4 die Enzymaktivität analog Fig. 3 unter Zusatz von Trypton;

Fig. 5 den enzymatischen Abbau löslicher Substrate;

Fig. 6 den enzymatischen Abbau unlöslicher Substrate und

Fig. 7 den Abbau von Federn innerhalb von 2 Tagen.

Ausführliche Beschreibung / Wege zur Ausführung der Erfindung

Stammcharakterisierung

Der neue Mikroorganismus Stamm W wurde aus einer heißen Quelle der Azoren isoliert. Er läßt sich unter Stickstoff bei 70°C kultivieren. Hierzu lassen sich Hungate-Röhrchen verwenden, die mit einem Medium folgender Zusammensetzung befüllt werden:

K ₂ HPO ₄	1,6 g
NaH ₂ PO ₄	1,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5 g
NaCl	3,0 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,1 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,3 g
FeCl ₂ x 6 H ₂ O	6,0 mg
Trypton	1,0 g
Hefeextrakt	1,0 g

...

Spurenelemente	1,0 ml
Vitamine	1,0 ml
Resazurin (1 mg/ml)	1,0 ml
NaHCO ₃	1,0 g
Cystein HCl	0,5 g
aqua dest ad	1,0 l

pH (mit 6 N HCl) 6,0 (nach dem Autoklavieren etwa 6,3)

Spurenelemente:

MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1,0 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	1,0 g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,5 g
ZnCl ₂	0,5 g
CuSO ₄	0,5 g
H ₃ BO ₄	0,2 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,1 g
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	0,1 g
VO ₂ SO ₄ x 5 H ₂ O	0,03 g
aqua dest ad	1,0 l

Vitaminlösung:

Biotin	0,2 g
Folsäure	0,2 g
Pyridoxin/HCl	1,0 g
Thiamin/HCl	0,5 g
Riboflavin	0,5 g
Nicotinsäure	0,5 g
DL-Calciumpanthothenat	0,5 g

...

Vitamin B ₁₂	0,01 g
p-Aminobenzoat	0,5 g
Liponsäure	0,5 g
aqua dest ad	1,0 l
pH mit 1 N NaOH	7,0

Als Substrat wird dem Medium entweder 0,2 % Trypton oder unlösliches Protein z. B. in Form einer Feder zugegeben. Die Hungate-Röhrchen werden anschließend mit Stickstoff begast. Danach erfolgt eine Sterilisation unter allgemein üblichen Bedingungen wie z. B. bei 120°C für 30 min. Werden allerdings Strukturproteine eingesetzt, wird bei niedrigeren Temperaturen z. B. bei 100°C für 60 min sterilisiert, damit die natürlichen Proteine nicht denaturieren. Die anschließende Inkubation kann bei hohen Temperaturen erfolgen, insbesondere bei 70°C. Unter anaeroben Bedingungen wachsen die Zellen in ca. 8 bis 12 h an, wobei ein Abbau der Strukturproteine nach 3 Tagen festgestellt werden kann.

Eine Sporenbildung konnte bei Anzucht auf Sporenmedium mit und ohne Glucose nicht nachgewiesen werden. Über einen Peroxidasetest war keine Katalase nachweisbar.

Darüber hinaus weist der neue Mikroorganismus Stamm W folgende Abbaueigenschaften auf:

<u>Substrat</u>	<u>Abbau</u>
Lactose	-
Glucose	-
Fructose	- *

...

16

Maltose	+
Xylose	+
Amylase	+
Arabinose	-
Inulin	-
Tween 80	-
HEC (Cellulose)	-
Pullulan	+
Glycogen	+
Stärke	+
Gelantine	-
Pepton	- *
Bactopepton	- *
Collagen	-
Casein	- *
Trypton	+
Amylopectin	-
Succinat	-
Hefeextrakt	+
Grameigenschaft	gramnegativ *
KOH-Test	keine Reaktion
Xylanaleban	-

* nicht eindeutig

Eine Bestimmung des Guanosin+Cytosin-Gehalts der DNA mittels HPLC ergab durchschnittlich

$G + C = 40,0 \pm 0,6$ mol-% (drei Bestimmungen).

Die Bestimmung erfolgte analog wie in Anal. Biochem. 81, (1977), 461 - 6 für die DNA-Isolierung; Int. J. Syst. Bact. 39, (1989), 159 - 167 für den DNA-Abbau, Referenz-DNA sowie G+C-Bestimmung und FEMS

...

Microbiology Letters 25, (1984), 125 - 8 für die chromatographischen Bedingungen beschrieben.

Analytische Säule NUCLEOSIL 100-5C18 (250 x 4 mm) mit Vorsäule NUCLEOSIL 100-5C18 (20 x 4 mm); Temperatur 26°C, Laufmittel 0,6 M (NH₄)H₂PO₄) Acetonitril 80 : 6 (v/v), pH 4,4, 0,7 ml/min, Druck ca. 120 bar, Calibrierung mit nichtmethylierter LAMBDA-DNA (Sigma), G+C-Gehalt 49,858 mol-%, DNA-Abbau mit P1 Nuclease und Dephosphoxylierung mit alkalischer Phosphatase aus Kälberserum (bovine alkaline phosphatase).

Herstellung eines Rohextraktes

Zellen einer Fermenterkultur werden (ca. 1 g / 20 ml Na-Phosphat 50 mM pH 6,8-Puffer) per Ultraschall aufgeschlossen. (15 min, 50 %, Sufe 6 - 7, mittlere Beschallungsspitze, Branson Sonifier). Nach mikroskopischer Kontrolle auf gelungenen Aufschluß wird der Rohextrakt für 20 min, 4°C, 35.000 xg, zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand wird für die Enzymtests eingesetzt.

Aktivität: etwa 0.3 - 0.8 U/ml, je nach Aufschluß.

Protein: etwa 1 - 2 mg/ml.

Bestimmung der proteolytischen Aktivität

Bestimmung der proteolytischen Aktivität gegenüber
löslichen Proteinen

Das Prinzip der Messung proteolytischer Aktivität gegenüber löslichen Proteinen beruht darauf, daß durch enzymatische Aktivität aus Proteinen, wie z. B. Casein oder Rinderserumalbumin aromatische Aminosäuren freigesetzt werden. Diese lassen sich photometrisch nach Abstoppen der Reaktion und Ausfällen des nichtgespaltenen Proteins mit Trichloressigsäure im Überstand bei 280 nm detektieren.

Reaktionsansatz:

0,45 ml 0,25 %ige (w/v) Caseinlösung (Hammersten Quality) in einem entsprechenden B & R-Puffer (Britton & Robinson, J. Chem. Soc. (1931), p. 1456. Eine Lösung enthaltend je 0,4 M H_3PO_4 , CH_3COOH und H_3BO_3 in Wasser wird mit 0,2 N NaOH auf den gewünschten pH eingestellt.) werden auf Eis mit 0,05 ml enzymhaltiger Probe in E-Cups pipettiert und je nach Aktivität bis zu 60 min bei der für das Enzym optimalen Temperatur (80°C) und pH-Wert (10) inkubiert. Anschließend wird der Ansatz zum Abstoppen und Ausfällen der Proteine mit 0,5 ml 10 %iger (w/v) Trichloressigsäure (TCA) versetzt, für 15 - 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann für 10 min bei 13000 Upm in einer Eppendorf-Zentrifuge (Heraeus Sepatech, Osterode) zentrifugiert. Die Extinktion des klaren Überstands wird bei 280 nm in einer Quarzküvette gegen einen nichtinkubierten Leerwert gemessen.

...

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wird eine Tyrosin-Eichkurve im Bereich von 0 - 1 µM/Ansatz aufgenommen. Eine Enzymaktivität (1 Unit) wird als diejenige Menge definiert, die 1 µmol aromatische Aminosäuren/min freisetzt. Aus der Steigung der Eichkurve ergibt sich folgende Berechnung:

$$U/l = \frac{\Delta E \times 1 \times 20.000}{t \text{ [min]}}$$

Herstellung der Enzymzusammensetzung

Um die erfindungsgemäße Enzymzusammensetzung zu erhalten, werden die in einer Reinkultur oder Mischkultur angezogenen Zellen bei 10.000 x g abgetrennt, so daß sich die Enzymzusammensetzung im Überstand befindet. Von hier aus kann eine Konzentration z. B. mittels Cross-flow-Filtration oder über Amicon-Kammern vorgenommen werden.

Allerdings hat sich gezeigt, daß ein Teil der in der Enzymzusammensetzung befindlichen Enzyme membrangebunden ist, so daß zur Enzymgewinnung die Zellen vorteilhaft aufgeschlossen werden. Dieser Aufschluß kann z. B. mittels Ultraschall oder einer French-Press erfolgen. Anschließend kann, wie oben beschrieben, eine weitere Konzentration der Enzyme vorgenommen werden.

...

Charakterisierung der Enzymzusammensetzung

Die erfindungsgemäße Enzymzusammensetzung kann aus einem Enzym oder mehreren Enzymen bestehen. Wird diese Zusammensetzung aus einer den neuen Mikroorganismus enthaltenden Mischkultur gewonnen, können auch Fremdenzyme anderer Mikroorganismen enthalten sein.

In mehreren Versuchen wurde die Proteaseaktivität der Enzymzusammensetzung bestimmt (Klingeberg M., Haswa F., Antranikian G., (1990), Properties of extremely thermostable protease from anaerobic hyperthermophilic bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 715 - 719). Hierbei werden 0,25 %ige Substratlösungen (Casein in B & R-Puffer des gewünschten pH-Wertes) eingesetzt und die Aktivität wie oben angegeben bestimmt. Fig. 1 zeigt das pH-Optimum bei 80°C. Dieses liegt im Bereich von pH 4 bis pH 12, vorzugsweise im Bereich von pH 7 bis pH 11, insbesondere im Bereich von pH 9 bis pH 10. Das Temperaturoptimum gemäß Fig. 2 wurde bei pH 10 ermittelt. Man erkennt eine Enzymaktivität im weiten Bereich von 50 bis 105°C, vorzugsweise im Bereich von 70 bis 90°C, insbesondere bei 80°C. Zur Bestimmung der Thermostabilität werden nach 15', 30', 1 h, stündlich bis 6 h und nach 20 h Proben entnommen und die Aktivität bestimmt. Stabil bedeutet, daß zwischen 6 h und 20 h kein nennenswerter (> 10 %) Aktivitätsverlust eintritt.

Einfluß verschiedener Inhibitoren auf die
Proteaseaktivität

Die Hemmwirkung verschiedener Inhibitoren auf die
Proteaseaktivität gibt Aufschluß über das aktive
Zentrum und den Reaktionsmechanismus der Enzyme.
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und
Diisopropylfluorophosphat (DFP) binden an die
OH-Gruppe des Serins im aktiven Zentrum von
Serinproteasen und hemmen letztere irreversibel.
Ethyldiamintetraacetat Na₂-Salz (EDTA) ist ein
Metallchelator und hemmt Metalloproteasen. Proteasen,
bei denen Cystein im aktiven Zentrum vorliegt, lassen
sich durch Jodacetat irreversibel hemmen. Zur
Bestimmung des aktiven Zentrums der thermostabilen
Proteasen werden diese zusammen mit entsprechenden
Inhibitoren bei Raumtemperatur und pH 7,0 inkubiert,
um eine Hydrolyse von DFP und PMSF zu vermeiden.

Reaktionsansatz:

470 µl 0,25 % (w/v) Casein in 50 mM, pH 10 -
Puffer (B & R)
25 µl Enzymlösung
5 µl Inhibitorstammlösung (s. u.)

Bei Einsatz von 5 µl Inhibitorstammlösung entspricht
die Endkonzentration 1 mM. Bei Einsatz von 25 µl
Inhibitorlösung (Endkonzentration 5 mM) werden
entsprechend nur 450 µl Substratlösung eingesetzt. Die
Ansätze werden zunächst ohne Substrat bei
Raumtemperatur (1 h) und anschließend mit Substrat 1 h
bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert.

...

Nach der Inkubation wird die Reaktion mit 500 µl einer 10 %igen (w/v) Trichloressigsäurelösung gestoppt und die verbleibende Aktivität, wie oben beschrieben, bestimmt. Folgende Inhibitorlösungen werden eingesetzt:

PMSF	17,3 % (w/v) in Ethanol
EDTA	3,56 % (w/v) in H ₂ O bidest
Jodacetat	14,4 % (w/v) in H ₂ O bidest

Hydrolyse chromogener Peptidsubstrate durch Proteasen des Kulturüberstands (E₄₀₅-Wert)

Zur Bestimmung der Substratspezifität der Proteasen werden die genannten chromogenen Peptidsubstrate in einer Endkonzentration von 0,2 mM zusammen mit zellfreiem Rohextrakt inkubiert.

Die Inkubation erfolgt unterhalb der Temperatur- und pH-Optima der Proteasen, um eine thermische bzw. pH-abhängige, nichtenzymatische Hydrolyse der Peptidsubstrate zu vermeiden.

Reaktionsansatz:

900 µl 0,2 mM (w/v) Substratlösung in 50 mM
Na-P-Puffer, pH 7,0
100 µl Enzymprobe
Inkubation für 17 h bei 60°C

Anschließend wird das freigesetzte p-Nitroanilin sofort gegen einen nicht inkubierten Leerwert bei einer Extinktion von 405 nm gemessen.

...

SDS-Gelelektrophorese

Das SDS-Gel hat eine Schichtdicke von 1,5 mm. Die Konzentration des Sammelgels beträgt 4,5 % (w/v), die des Trenngels 11,5 % (w/v). Zur Herstellung der Gele werden folgende Lösungen eingesetzt:

Acrylamidlösung:

Acrylamid	29,2 g
N,N-Methylen-Bisacrylamid	0,8 g
H ₂ O dest.	ad 100 ml

Zur Entfernung ungelöster Partikel wird diese Lösung filtriert.

Trenngelpuffer:

Tris (α,α,α -Tris(hydroxymethyl)-methylamin)	18,15 g
SDS	0,40 g
H ₂ O dest.	ad 100 ml

Vor der Zugabe von SDS wird der pH-Wert mit konzentrierter HCl auf 8,9 eingestellt.

Sammelpuffer:

Tris	6,05 g
SDS	0,40 g
H ₂ O dest.	ad 100 ml

Vor der Zugabe von SDS wird der pH-Wert mit konzentrierter HCl auf 6,8 eingestellt.

Ammoniumpersulfat-Lösung:

Ammoniumpersulfat	0,10 g
H ₂ O dest.	0,94 g

Elektrophoresepuffer:

Tris	3,00 g
Glycin	14,40 g
SDS	1,00 g
H ₂ O dest.	ad 1000 ml

Die Ammoniumpersulfatlösung wird entweder vor Gebrauch frisch angesetzt oder aber portionsweise in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -20°C gelagert und erst kurz vor Gebrauch aufgetaut. Während der Elektrophoresepuffer stets frisch angesetzt wird, können alle anderen Lösungen mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden.

Herstellung der Gele

Zur Herstellung der Plattengele wird zunächst das Trenngel gegossen. Dazu werden

Trenngelpuffer	1,4 ml
Acrylamid-Lösung	2,1 ml
H ₂ O dest.	2,6 ml

gut vermischt und mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entgast. Durch Zugabe von

Ammoniumpersulfatlösung	40 µl
TEMED	6 µl

wird die Polymerisation gestartet und die Lösung so weit in die Kammer gefüllt, bis noch 1,5 cm Raum für das Sammelgel verbleibt. Das Überschichten des Gels

...

mit 1 ml H₂O dest. verhindert ein Austrocknen. Nach ca. 60 min ist der Polymerisationsvorgang abgeschlossen, und das Sammelgel kann gegossen werden. dazu werden

Sammelgelpuffer	0,70 ml
Acrylamid-Lösung	0,26 ml
H ₂ O dest.	1,04 ml

vermischt, entgast und die Polymerisation durch Zugabe von

Ammoniumpersulfatlösung	10 µl
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	2 µl

gestartet. Vor dem Gießen des Sammelgels wird zunächst das Wasser vom Trenngel dekantiert. Ein luftblasenfrei in das noch flüssige Gel eingesetzter Kamm dient der Taschenformung.

Vorbereitung der Proben

Bis zu 50 µl Proteinlösung mit bis zu 50 µg Protein werden mit 10 µl Denaturierungspuffer versetzt, der folgende Komponenten enthält:

SDS	2,00 g
2-Mercaptoethanol	3,00 g
10 mM NaP-Puffer, pH 7,0	ad 100 ml

Der Ansatz wird 5 min bei 100°C inkubiert, anschließend mit 2 µl Bromphenolblau-Lösung sowie

...

einer Spatelspitze Saccharose versetzt und mit einer Hamilton-Spritze auf das Gel aufgetragen.

Durchführung der Elektrophorese

Zum Einwandern der Proben wird zunächst eine konstante Stromstärke von 10 mA/1,5 mm Geldicke und 10 cm Gelbreite angelegt. Nachdem die Proben in das Sammelgel eingewandert sind, wird die Stromstärke auf 20 mA erhöht.

Silberfärbung

Bei der gelelektrophoretischen Auftrennung sehr geringer Proteinnengen erfolgt die Detektion der Proteinbanden durch Anfärben mit Silber. das Gel wird dazu nach der Elektrophorese in den nachfolgend aufgeführten Lösungen auf einem Schüttler inkubiert

Fixierer	60 min
50 % (v/v) EtOH	3 x 20 min
0,03 % (w/v) Na ₂ S ₂ O ₅	1 min
H ₂ O dest. (3 x gewechselt)	1 min
Silberlösung	20 min

und zweimal mit H₂O dest. gespült. Anschließend wird das Gel so lange unter leichtem Schwenken in Entwicklerlösung inkubiert, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar werden. Die Färbereaktion wird durch Einlegen des Gels in eine 50 mM EDTA-Lösung gestoppt.

...

In der letztgenannten Lösung läßt sich das Gel über mehrere Wochen lagern.

Fixierer:	Ethanol	30 ml
	Essigsäure	10 ml
	Formaldehydlösung (37 %)	50 µl
	H ₂ O dest.	ad 100 ml

Silberlösung:	AgNO ₃	0,1 g
	Formaldehydlösung (37 %)	75 µl
	H ₂ O dest.	ad 100 ml

Entwickler:	Na ₂ CO ₃	6 g
	Na ₂ S ₂ O ₅	0,4 mg
	Formaldehydlösung (37 %)	50 µl
	H ₂ O dest.	ad 100 ml

Nachweis proteolytischer Aktivität im SDS-Polyacrylamidgel

Enzyme mit proteolytischer Aktivität können indirekt über die Färbung von Gelatine nachgewiesen werden, die in das Gel eingegossen wird. Dazu wird, wie oben beschrieben, ein 11 %iges SDS-Trenngel gegossen. In Abweichung wird jedoch anstatt 2,6 ml H₂O lediglich 2,0 ml eingesetzt und die restlichen 0,6 ml durch 1 % Gelatine in 100 mM Glycinpuffer, pH 8,5 ersetzt. Dadurch ergibt sich im Gel eine Endkonzentration von 0,1 % Gelatine. Das Sammelgel wird, wie oben beschrieben, ohne Gelatine gegossen. Die Vorbereitung der Proben und die Durchführung der Elektrophorese

...

erfolgt wie oben. An die Elektrophorese schließt sich eine 60minütige Inkubation des Gels in einer 2,5 %igen Triton X-100-Lösung bei 4°C an, um SDS aus dem Gel herauszulösen. Anschließend wird das Gel je nach aufgetragener Aktivität für 5 - 30 min in einem 50 mM Puffer unter optimalen Bedingungen (pH 10, 80°C) inkubiert und anschließend für 60 min in Färbelösung fixiert und gefärbt. Banden mit proteolytischer Aktivität werden nach ca. 3stündigem Entfärben als helle Banden im blau angefärbten Gel sichtbar.

Färbelösung:	Amidoschwarz	0,1 g
	Ethanol	30 ml
	Eisessig	10 ml
	H ₂ O dest.	ad 100 ml

Entfärber:	Ethanol	30 ml
	Eisessig	10 ml
	H ₂ O dest.	ad 100 ml

Gelfiltration auf Superdex 200 (HPLC)

Enzymrohextrakt:

1 mg/ml Protein

0,6 U/ml

Säule: Superdex high-load 200 16/60 (120 ml)

Puffer: NaP pH 6,8

...

Flußrate: 0,5 ml/min

aktiver Proteinpeak: Im Ausschlußvolumen, ist
(größtes Eichprotein: 200.000)
also größer als 200.000

Einfluß von Metallionen auf die proteolytische
Aktivität

Metallion	ca. % Aktivität 1 mM	ca. % Aktivität 5 mM
AgCl ₂	0	0
CaCl ₂	85	117
CoCl ₂	143	187
CuCl ₂	17	0
FeCl ₂	127	0
FeCl ₃	93	0
MgCl ₂	171	125
MnCl ₂	110	120
NaCl	86	116
NaMoO ₄	91	95
NaSe ₂ O ₃	96	136
NaWO ₄	75	134
NiCl ₂	72	44
VOSO ₄	87	44
ZnCl ₂	57	37

Die Metallionen werden in einem Puffer, 50 mM Na-P;
pH 6,8, gelöst. 50 µl dieser Lösung werden mit 50 µl
Rohextrakt für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, dann
werden 400 µl Substrat (0,25 %, pH 10) zugegeben und
für 1 h bei 80°C inkubiert. TCA-Fällung und
Aktivitätsbestimmung wird wie oben beschrieben
durchgeführt.

...

In einem weiteren Versuch wurde das Wachstum des neuen Mikroorganismus auf Komplexmedium mit 0,25 % Federn als Substrat untersucht und gleichzeitig die Enzymaktivität ermittelt (Fig. 3). Wird dem Komplexmedium 0,25 % Trypton zugesetzt (Fig. 4), steigt die Enzymaktivität deutlich an.

Fig. 5 und 6 zeigen schließlich den Abbau löslicher und unlöslicher Substrate. Nach Zugabe einer definierten Enzymmenge (0,1 U/ml) wurde der prozentuale Substratabbau ermittelt, wobei jeweils auf Federsubstrat gewachsene Zellen des neuen Mikroorganismus (linker Balken, F 1) mit auf Trypton gewachsenen Zellen (rechter Balken, F 2) verglichen wurden.

Ein enzymatischer Proteinabbau kann nach allem mit ganzen Zellen des neuen Mikroorganismus Stamm W durchgeführt werden oder in vitro in Gegenwart einer erfindungsgemäßen Enzymzusammensetzung. Die in-vitro-Behandlung hat hierbei noch die Möglichkeit, daß eine Proteolyse auch unter anaeroben Bedingungen bei 50 bis 100°C und z. B. bei pH 10 durchführbar ist, wobei die anaerobe Variante (s. o.) bevorzugt wird.

Formblatt für die Hinterlegung von Mikroorganismen

Internationales Aktenzeichen: PCT/

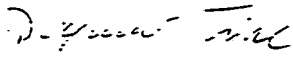
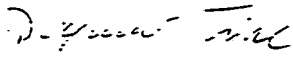
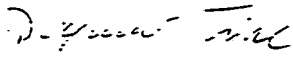
MIKROORGANISMEN	
Angaben über den auf Seite ... ³ ... Zeile ... ⁶ ... der Beschreibung genannten Mikroorganismus ¹	
A. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG ²	
Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt angegeben ☐ ³	
Name der Hinterlegungsstelle ⁴ DSM Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	
Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land) ⁴ Mascheroder Weg 1 B W-3300 Braunschweig	
Datum der Hinterlegung ⁵ 12. März 1992 (12.03.1992)	Eingangsnummer ⁶ DSM 7003
B. WEITERE ANGABEN ⁷ (die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt ☒)	
Lebensfähigkeitsbescheinigung Empfangsbestätigung bei Ersthinterlegung Freigabeerklärung Erklärung bei Ersthinterlegung	
C. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN ³ (falls die Angaben nicht alle Bestimmungsstaaten betreffen)	
D. NACHREICHUNG VON ANGABEN ⁸	
Folgende Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht ⁹ (allgemeine Bezeichnung der Angaben, z.B. "Eingangsnummer der Hinterlegung")	
E. ☒ Dieses Blatt wurde zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht (vom Anmeldeamt nachzuprüfen)	
RUUD JUYN (Bevollmächtigter Beamter)	
☒ Datum des Eingangs dieses (vom Anmelder nachgereichten) Blattes beim Internationalen Büro ¹⁰	
12 MAR 1993 (Bevollmächtigter Beamter)	

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Prof. Dr. G. Antranikian
Dahlienweg 20
2105 Seevetal 1

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER Name: Prof. Dr. G. Antranikian Dahlienweg 20 Adresse: 2105 Seevetal 1	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 7003 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung ¹ : 1992-03-12		
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1992-03-23 ² geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus ☒ ³ lebensfähig ☐ ³ nicht mehr lebensfähig			
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST⁴ 			
IV. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> Name: DSM DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1 B D-3300 Braunschweig </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1992-03-26 </td> </tr> </table>		Name: DSM DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1 B D-3300 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1992-03-26
Name: DSM DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1 B D-3300 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1992-03-26		

¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.

² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.

³ Zutreffendes ankreuzen.

⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

Zur Vorlage beim Deutschen Patentamt

I. Freigabeerklärung

Hiermit wird das Hinterlegungsinstitut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
Mascheroder Weg 1b
D-3300 Braunschweig

unwiderruflich ermächtigt, Proben des Mikroorganismus

Stamm W (Bezeichnung des Anmelders)

ab der ersten Veröffentlichung der Anmeldungsunterlagen (durch Offenlegung oder Patenterteilung) auf Anforderung an jeden Dritten abzugeben.

Für die mit dem Patenterteilungsverfahren befaßten Behörden und Gerichte gilt die Freigabeerklärung auch schon vor der ersten Veröffentlichung der Anmeldungsunterlagen.

Auf das Recht zur Rückforderung oder Zerstörung der Kultur des Mikroorganismus ab der ersten Veröffentlichung der Anmeldungsunterlagen wird unwiderruflich verzichtet.

Die Abgabe der Probe soll zu folgenden Bedingungen erfolgen:

Soweit nicht Bestimmungen des Hinterlegungslandes oder Hinterlegungsinstituts eine Freigabe ohne Bedingungen vorsehen, muß der Empfänger gegenüber einer Hinterlegungsstelle Namen und Adresse angeben, die dem Hinterleger von der Hinterlegungsstelle auf Wunsch mitgeteilt werden sowie eine verpflichtende Erklärung gegenüber dem Hinterleger abgeben, bis zum Ablauf des Patentschutzes

- a) die Probe nicht an andere Personen weiterzugeben,
- b) die Probe nicht aus dem Geltungsbereich des Patentgesetzes zu bringen.

Ort, Datum

Hamburg, 13.3.92


(Prof. Dr. G. Antranikian)

II. Bestätigung

Es wird folgendes bestätigt:

Der oben bezeichnete Mikroorganismus ist in vermehrungsfähigem Zustand

am _____ hier hinterlegt worden und hat die Hinterlegungsbezeichnung _____ erhalten.

Die Dauer der Hinterlegung beträgt mindestens 20 Jahre, gerechnet von dem auf den Anmeldetag der oben genannten Patentanmeldung folgenden Tag, d.h. vom _____ 19 _____, zuzüglich einer Nachfrist von fünf Jahren nach Eingang des letzten Antrags auf Abgabe einer Probe bzw. nach Ablauf der gesetzlichen Laufdauer des auf die oben genannte Patentanmeldung erteilten Patents. Vermehrungsfähige Proben dieser Kultur werden während des gesamten Zeitraums unter den oben genannten Voraussetzungen nach Maßgabe der nationalen Bestimmungen über den Verkehr mit den Mikroorganismen an den abgegeben, der die hierfür vorgesehene Gebühr entrichtet. Vor Ablauf der genannten Fristen kann die Hinterlegung durch uns beendet werden, wenn der Mikroorganismus in eine andere Sammlung überführt wird, die die angegebene Aufbewahrungsdauer und den freien Zugang zum Mikroorganismus gewährleistet.

Für die Ausfuhr der Kultur in die Bundesrepublik Deutschland bestehen

derzeit keine Beschränkungen.

die folgenden Beschränkungen:

Datum _____

(Hinterlegungsinstitut)

35

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

ERKLÄRUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG
(REGEL 6.1)

An
DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN
UND ZELLKULTUREN GmbH
Mascheroder Weg 1b
3300 Braunschweig

Von der Hinterlegungsstelle auszufüllen:

DSM-Aufnahmenummer:

Eingangsdatum der Kultur:

BAKTERIEN/PILZE¹

DER UNTERZEICHNETE HINTERLEGT DEN NACHSTEHEND BEZEICHNETEN MIKROORGANISMUS AUFGRUND DES BUDAPESTER VERTRAGES UND VERPFLICHTET SICH, DIE HINTERLEGUNG WÄHREND DER IN REGEL 9.1 GENANNTEN DAUER NICHT ZURÜCKZUNEHMEN²

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Bezugszeichen ³ : Stamm W	Die zu hinterlegende Kultur ist:
	(☒) eine Reinkultur
Taxonomische Bezeichnung ⁴ :	() eine Mischkultur
	(zutreffendes bitte ankreuzen)
II. Züchtungsbedingungen () ⁵	
Medium: siehe Anlage 1	pH vor Sterilisation: 6,0
	Sterilisation 30 min bei 120 °C
	pH nach Sterilisation: 6,3
	Verhalten gegenüber Sauerstoff:
	() aerob
	() mikroaerophil
	(☒) obligat anaerob
	Besondere Ansprüche an die Gasatmosphäre:
	Bebrütungstemperatur: 70 °C
	Bebrütungsdauer: 24 h
	Aufbewahrung bei: 4 °C
	Überimpfungsintervall: 3 Monate

¹ Die DSM nimmt zur Hinterlegung ausschließlich Mikroorganismen an, die gemäß DIN 58 956 (Beiblatt 1) Teil 1, Medizinische Mikrobiologie, ISBN 3-410-12028-9, zu den Risikogruppen I oder II gehören, bzw. unter Anwendung der Laborsicherheitsmaßnahmen L1 oder L2 entsprechend den "Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch in-vitro neukombinierte Nukleinsäuren" (5. überarbeitete Fassung, BMFT) bearbeitet werden können.

² Dieses Formblatt kann auch verwendet werden, wenn der Unterzeichnete eine Hinterlegung eines Mikroorganismus, die er selbst oder sein Rechtsvorgänger außerhalb des Budapester Vertrags bei derselben Hinterlegungsstelle vorgenommen hat, in eine Hinterlegung nach dem Budapester Vertrag umwandelt. Dabei ist unerheblich, ob die Ersthinterlegung vor (Regel 6.4 Buchstabe d) oder nach dem Zeitpunkt stattgefunden hat, zu dem die Stelle den Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben hat.

³ Nummer, Symbole usw., die der Hinterleger dem Mikroorganismus zugeteilt hat.

⁴ Es wird dringend empfohlen, die taxonomische Bezeichnung und/oder die wissenschaftliche Beschreibung des Mikroorganismus (unter VII.) anzugeben.

⁵ Ankreuzen, wenn auf einem besonderen Blatt weitere Angaben eingereicht werden.

ANLAGE 1

II. Züchtungsbedingungen

Medium:

K ₂ HPO ₄	1,6	g
NaH ₂ PO ₄	1,0	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5	g
NaCl	3,0	g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,1	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,3	g
FeCl ₂ x 6 H ₂ O	6,0	mg
Trypton	1,0	g
Hefeextrakt	1,0	g
Spurenelemente	1,0	ml
Vitamine	1,0	ml
Resazurin (1mg/ml)	1,0	ml
NaHCO ₃	1,0	g
Cystein HCl	0,5	g
aqua dest ad	1,0	l
pH (mit 6 N HCl)	6,0	(nach dem Autoklavieren etwa 6,3)

Substrat: 1 Feder pro Hungate-Röhrchen [Trypton 0,2 %]

Die Hungates werden beim Abfüllen mit N₂ begast.

Sterilisation erfolgt bei 100°C für 60 min, bei höheren Temperaturen wird die Federstruktur zu stark denaturiert.

Inkubation: bei 70°C anaerob. Die Zellen wachsen in 8-12 h an. Federabbau kann nach 3 Tagen festgestellt werden.

Spurenelemente:

MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1,0	g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	1,0	g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,5	g
ZnCl ₂	0,5	g
CuSO ₄	0,5	g

H ₃ BO ₄	0,2 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,1 g
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	0,1 g
VO ₂ SO ₄ x 5 H ₂ O	0,03 g
aqua dest ad	1,0 l

Vitaminlösung:

Biotin	0,2 g
Folsäure	0,2 g
Pyridoxin/HCl	1,0 g
Thiamin/HCl	0,5 g
Riboflavin	0,5 g
Nicotinsäure	0,5 g
DL-Calciumpanthothenat	0,5 g
Vitamin B ₁₂	0,01 g
p-Aminobenzoat	0,5 g
Liponsäure	0,5 g
aqua dest ad	1,0 l

pH mit 1 N NaOH 7,0

III. AUFBEWAHRUNGSBEDINGUNGEN	() ⁵
Als Flüssigkultur unter N₂-Atmosphäre bei 4°C im Komplexmedium. Das Substrat ist entweder Feder oder Trypton. Tryptonmedium + 1,5 % Agar. Wachstum auf Agarplatten bei 70°C unter N₂-Atmosphäre.	
IV. BEDINGUNGEN FÜR DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG	() ⁵
Trübung. Zellzahl auf Agarplatten. Mikroskopische Kontrolle.	
V. BESTANDTEILE DER MISCHKULTUR (wenn zutreffend)	() ⁵
Beschreibung der Bestandteile: Verfahren, die die Prüfung auf Lebensfähigkeit der Bestandteile ermöglichen:	

⁵ Ankreuzen wenn auf einem gesonderten Blatt weitere Angaben eingereicht werden.

VI. EIGENSCHAFTEN, DIE FÜR DIE GESUNDHEIT ODER DIE UMWELT GEFÄHRlich SIND

Risikogruppe des unter I. genannten Mikroorganismus gemäss DIN 58 956 (Beiblatt 1) Teil 1, Medizinische Mikrobiologie, ISBN 3-410-12028-9:¹

.....

Der zu hinterlegende Mikroorganismus darf unter folgenden Sicherheitsmassnahmen¹ gehandhabt werden:

() L1

() L2

() L3

() L4

Der Mikroorganismus hat folgende Eigenschaften, die für die Gesundheit oder die Umwelt gefährlich sind oder sein können:

Bitte angeben:

(X) Dem Unterzeichneten sind derartige Eigenschaften nicht bekannt.

Wenn der Mikroorganismus genetisch manipuliert ist:

1. Bitte alle relevanten genetischen Eigenschaften angeben:

generelle genetische
Rekombination (rec):

Modifikation:

Restriktionen:

Sensitivitäten:

Resistenzen:

Auxotrophien:

2. Bezeichnung der Spenderorganismen, deren Nukleinsäure in das Plasmid kloniert wurde:

3. Unbedingt angeben (ohne diese Angaben kann die Hinterlegung in der DSM nicht in Kraft treten), ob

die klonierten subgenomischen Fragmente des Spenders (der Spender) nachgewiesenermassen kein pathogenes Potential haben

trifft zu ()

oder ob die subgenomischen Fragmente des Spenders (der Spender) ein pathogenes Potential haben

trifft zu ()

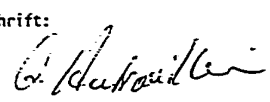
falls letzteres zutrifft gilt folgendes:

Die Hinterlegung des Plasmids in der DSM kann gemäss Verpflichtung durch die ZKBS⁶ nur in Kraft treten, wenn der DSM eine Kopie der Ergebnisse der Sicherheitsüberprüfung durch die ZKBS vom Hinterleger zugesandt wird.

¹ Die DSM nimmt zur Hinterlegung ausschließlich Mikroorganismen an, die gemäß DIN 58 956 (Beiblatt 1) Teil 1, Medizinische Mikrobiologie, ISBN 3-410-12028-9, zu den Risikogruppen I oder II gehören, bzw. unter Anwendung der Laborsicherheitsmassnahmen L1 oder L2 entsprechend den "Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch in-vitro neukombinierte Nukleinsäure" (5. überarbeitete Fassung, BMFT) bearbeitet werden können.

⁵ Ankreuzen, wenn auf einem besonderen Blatt weitere Angaben eingereicht werden.

⁶ ZKBS = Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit

VII. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG ⁷	() ⁵
siehe Anlage 2	
VIII. WEITERE ANGABEN	() ⁸
IX. HINTERLEGER ⁹	
Name: Prof. Dr. G. Antranikian Anschrift: Dahlienweg 20 D-2105 Seevetal 1 Unterschrift:  Datum: 15.3.92	

⁵ Ankreuzen, wenn auf einem gesonderten Blatt weitere Angaben eingereicht werden.

⁷ Es wird dringend empfohlen, die wissenschaftliche Beschreibung und/oder die vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung (unter I.) des Mikroorganismus anzugeben.

⁸ Ankreuzen, wenn auf einem gesonderten Blatt weitere Angaben (außer den unter Fußnote 4 genannten) eingereicht werden, z. B. Herkunft des Mikroorganismus, Name und Anschrift anderer Hinterlegungsstellen, bei denen der Mikroorganismus hinterlegt worden ist, oder das für die Festlegung der vorgeschlagenen taxonomischen Bezeichnung angewandte Kriterium. (Diese Angaben sind fakultativ).

⁹ Der Name des Hinterlegers muß mit der Unterschrift identisch sein.

Bei Firmen müssen zwei offizielle Firmenvertreter unterschreiben.

Wenn natürliche Personen für eine juristische Person unterzeichnen, so ist deren Unterschrift in Maschinschrift zu wiederholen.

ANLAGE 2

VII. Wissenschaftliche Beschreibung

Das Bakterium ist in der Lage auf Komplexmedium bei 70°C zu wachsen. Nach 10 h Wachstum wird die stationäre Phase erreicht. Proteaseproduktion nimmt ebenfalls zu. 90% des Enzyms ist zellgebunden. Die Kultivierung wird unter N₂-Begasung und Rühren (ca. 200 upm) durchgeführt. Die Zellen sind stäbchenförmig.

<u>Substrat</u>	<u>Abbau</u>
Lactose	-
Glucose	-
Fructose	+
Maltose	+
Xylose	+
Arabinose	-
Inulin	-
Tween 80	-
HEC (Cellulose)	-
Pullulan	+
Glycogen	+
Stärke	+
Gelatine	-
Pepton	+
Bactopepton	+
Collagen	-
Casein	+
Trypton	+

Gram-eigenschaft:

Nach KOH-Test und L-Aminopeptidasetest handelt es sich um keine Gramnegativen Organismen. Die Gramfärbung ist bislang nicht gelungen.

Sporen:

Sporen konnten nach Anzucht auf Sporenmedium mit und ohne Glucose nicht gefunden werden. Auch in alten Kulturen nicht.

Katalase:

Mit dem Peroxidasetest konnte keine Katalase nachgewiesen werden.

Patentansprüche

1. Mikroorganismus Stamm W, hinterlegt unter
DSM 7003.
2. Enzymzusammensetzung, erhältlich aus einer den
Mikroorganismus nach Anspruch 1 beinhaltenden
Kultur, wobei der Kulturüberstand abgetrennt und
gegebenenfalls konzentriert wird.
3. Enzymzusammensetzung, erhältlich aus einer den
Mikroorganismus nach Anspruch 1 beinhaltenden
Kultur, wobei die Zellen aufgeschlossen werden.
4. Enzymzusammensetzung nach Anspruch 2 oder 3,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Mikroorganismen zur Enzymproduktion bzw.
Enzyminduktion in einem Tryptonmedium kultiviert
werden.
5. Enzymzusammensetzung, insbesondere nach einem der
Ansprüche 2 bis 4,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß diese ein Enzym oder mehrere Enzyme enthält
und Proteaseaktivität besitzt, wobei
 - das Temperaturoptimum (bei pH 10) im Bereich von
70 bis 90°C, insbesondere bei 80°C liegt;

...

- das pH-Optimum (bei 80°C) im Bereich von pH 7 bis pH 11, insbesondere im Bereich von pH 9 bis pH 10 liegt;
- Gelfiltration ein Enzym oder Enzymkomplex mit einem Molekulargewicht von ca. 200 000 Dalton ausweist und eine Molekulargewichtsbestimmung mit einem SDS-Aktivitätsgel zwei Banden im Bereich zwischen ca. 200.000 und ca. 330.000 zeigt;
- der E₄₀₅-Wert (gegen Blindwert) nach 17 min Inkubation bei 60°C, 0,2 mM Substrat in Phosphatpuffer pH 7 und 0,3 mg/ml Enzymrohextrakt, Meßstrecke 1 cm bei N-Succinyl-Phe-pNA, N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA und Z-Arg-pNA > 0,5, bei H-Gly-Glu-pNA zwischen 0,3 und 0,5, bei Acetyl-Ala-pNA zwischen 0,1 und 0,3 und bei Benzoyl-DL-Arg-pNA, Z-Gly-Pro-pNA, Benzoyl-Lys-pNA, Z-Arg-pNA und Acetyl-Tyr-pNA unter 0,1 liegt;
- die folgenden Inhibitoren bei den angegebenen Konzentrationen etwa die folgenden Restaktivitäten ergeben:

Inhibitor	Restakt. Restakt.	
	(1 mM)	(5 mM)
ohne	100 %	100 %
Pefabloc SC (Ser.)	83 %	-
PMSF (Ser.)	14 %	10 %
EDTA (Metallo.)	93 %	85 %
Iodoacetat (Cyst.)	83 %	76 %

...

- die Thermostabilitäten wie folgt sind:
 - bei pH 7 und 8,5 über 20 h bei 70°C und 80°C stabil,
 - bei 90°C nach 4 h weniger als 10 % Restaktivität,
 - bei pH 10, 80°C und 90°C nach 15 min Totalverlust der Aktivität
 - bei 70°C etwa 40 % Restaktivität nach 6 h, nach 20 h Totalverlust.

6. Verwendung des Mikroorganismus nach Anspruch 1 und/oder der Enzymzusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 5 zum Abbau von Proteinen insbesondere Keratin bzw. von solchen Stoffen, die diese Proteine beinhalten, insbesondere von Federn, Horn oder Haaren.
7. Verwendung des Mikroorganismus nach Anspruch 1 zur Isolierung eines eine Keratinase codierenden Gens und/oder zur Insertion eines eine Keratinase codierenden Gens in einen anderen Mikroorganismus.
8. Verfahren zur Hydrolyse von Peptiden, insbesondere von Keratin oder keratinhaltiger Substanz, wie Federn, Haare oder Horn, in Oligopeptide und/oder Aminosäuren bei einer Temperatur > 50°C und mittels eines oder mehrerer Enzyme,

...

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Hydrolyse bei einer Temperatur zwischen
50°C und 105°C und bei einem pH zwischen 4 und
< 11 erfolgt, wobei der enzymatische Abbau ein
Mehrfaches von einem eventuell begleitenden
chemischen Abbau beträgt.

9. Verfahren zur Hydrolyse von Peptiden, insbesondere
von Keratin oder keratinhaltiger Substanz, wie
Federn, Haare oder Horn, in Oligopeptide und/oder
Aminosäuren mittels eines oder mehrerer Enzyme bei
einer Temperatur $\geq 70^{\circ}\text{C}$,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß der Abbau anaerob durchgeführt wird.

10. Verfahren nach Anspruch 8,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Hydrolyse anaerob durchgeführt wird.

11. Verfahren nach Anspruch 9,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Hydrolyse bei einem pH zwischen 4 und 12
durchgeführt wird.

12. Verfahren zur Hydrolyse von Peptiden, insbesondere
von Keratin oder keratinhaltiger Substanz, wie
Federn, Haare oder Horn, in Oligopeptide und/oder
Aminosäuren mittels eines oder mehrerer Enzyme,

...

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man einen mesophilen Mikroorganismus, der ein
insertiertes Gen enthält, das eine bei $\geq 70^{\circ}\text{C}$
aktive Peptidase, insbesondere Keratinase kodiert,
bei $\geq 70^{\circ}\text{C}$ in wässrigem Medium mit einem Peptid,
insbesondere mit Keratin oder keratinhaltiger
Substanz umsetzt, oder daß man den Mikroorganismus
im wässrigen Medium auf $\geq 70^{\circ}\text{C}$ erhitzt und das
wässrige Medium, gegebenenfalls nach Abtrennen
ausgefallener Komponenten, mit einem Peptid,
insbesondere mit Keratin oder der keratinhaltigen
Substanz versetzt.

13. Verfahren zur Hydrolyse gemäß einem der Ansprüche
8 - 12,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß das Keratin oder die keratinhaltige Substanz,
insbesondere Federn, vor der Hydrolyse nicht bei
einer Temperatur $\geq 120^{\circ}\text{C}$ vorbehandelt werden.

14. Verfahren zur Hydrolyse gemäß einem der Ansprüche
8 - 13,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß das Hydrolysat nach Auflösen von mind.
50 Gew.-% des eingesetzten Substrats mit einer
oder mehreren anderen Peptidasen weiterbehandelt
wird.

15. Verfahren zur Hydrolyse von Keratin oder keratinhaltiger Substanz, wie Federn, Haare oder Horn, in Oligopeptide und/oder Aminosäuren bei einer Temperatur $> 50^{\circ}\text{C}$ und mittels eines oder mehrerer Enzyme, insbesondere nach einem der Ansprüche 8 - 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydrolyse mit einer solchen Enzymmenge, einem solchen pH und einer solchen Temperatur durchgeführt wird, daß ein zugegebenes unlösliches Substrat frühestens nach 3 h aufgelöst ist.
16. Verfahren zur Hydrolyse gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydrolyse mit einer solchen Enzymmenge, einem solchen pH und einer solchen Temperatur durchgeführt wird, daß ein zugegebenes unlösliches Substrat nach 24 h zu mindestens 50 Gew.-% aufgelöst ist.
17. Verfahren zur enzymatischen Hydrolyse von Proteinen, insbesondere Keratin bzw. von solchen Stoffen, die diese Proteine beinhalten, insbesondere von Federn, Horn oder Haaren, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydrolyse mit einer Enzymzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 2 bis 5 und/oder mit dem Mikroorganismus gemäß Anspruch 1 durchgeführt wird.

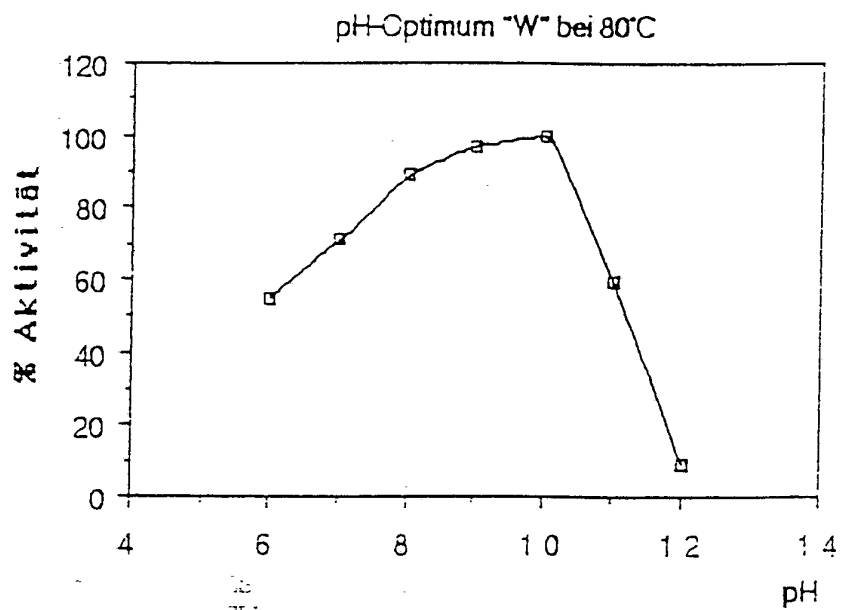


Fig. 1

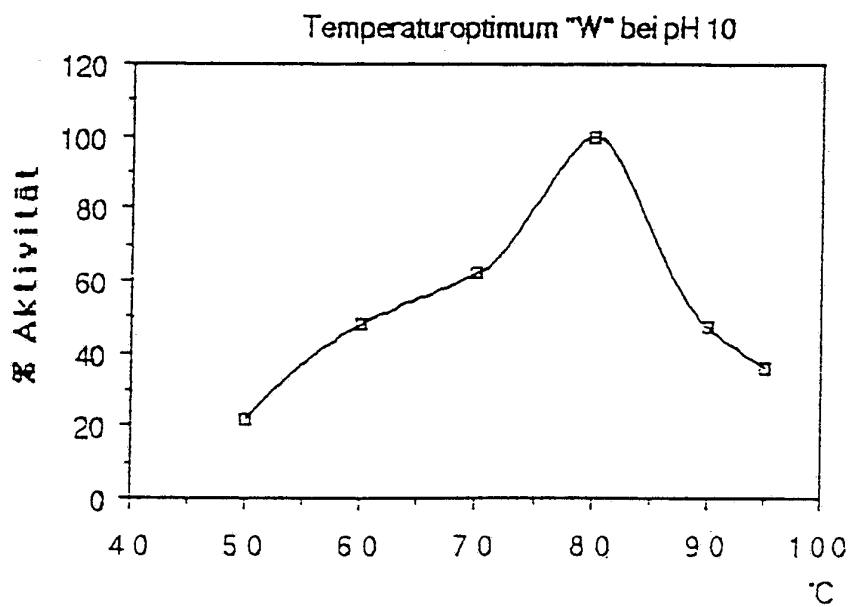


Fig. 2

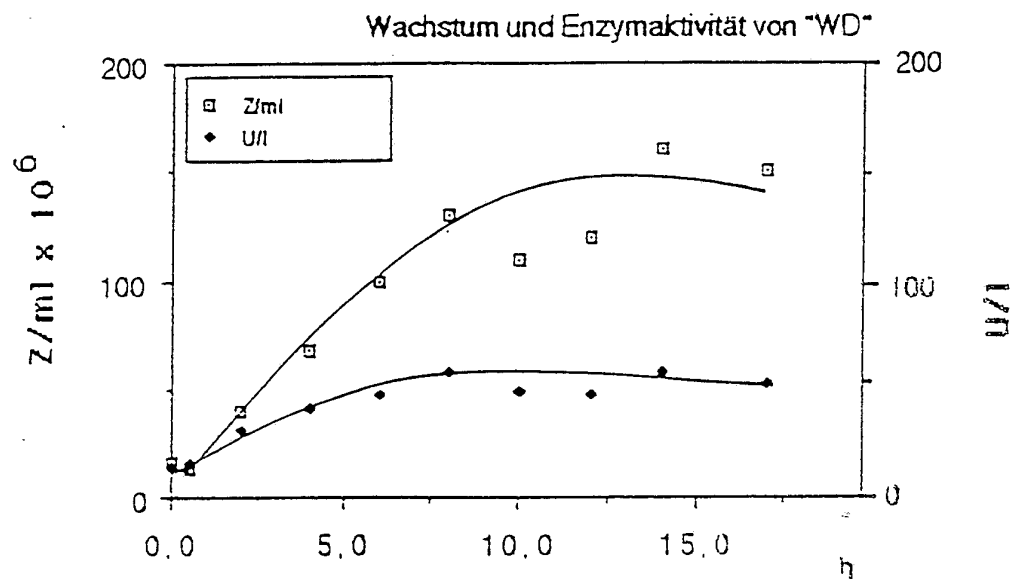


Fig. 3

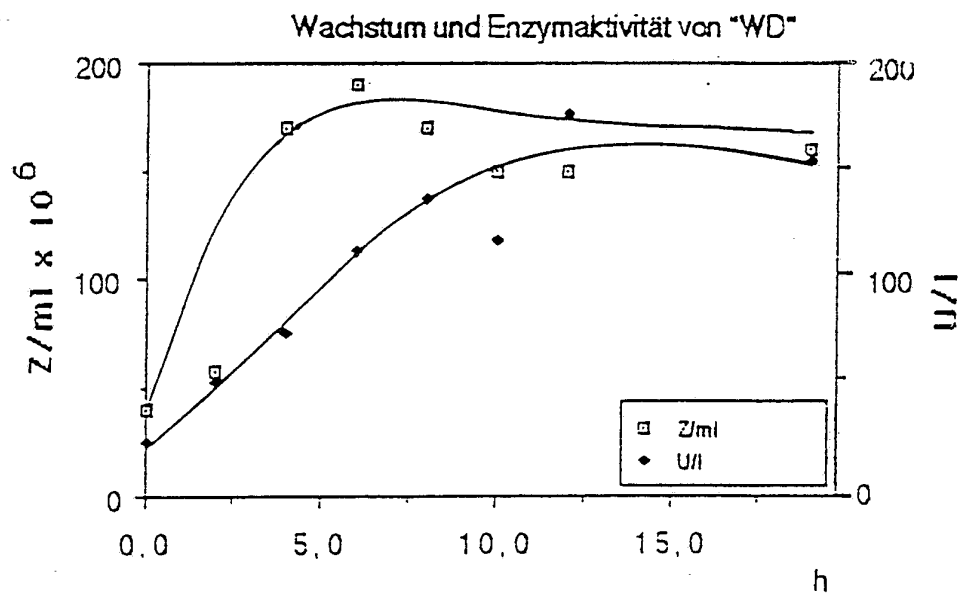


Fig. 4

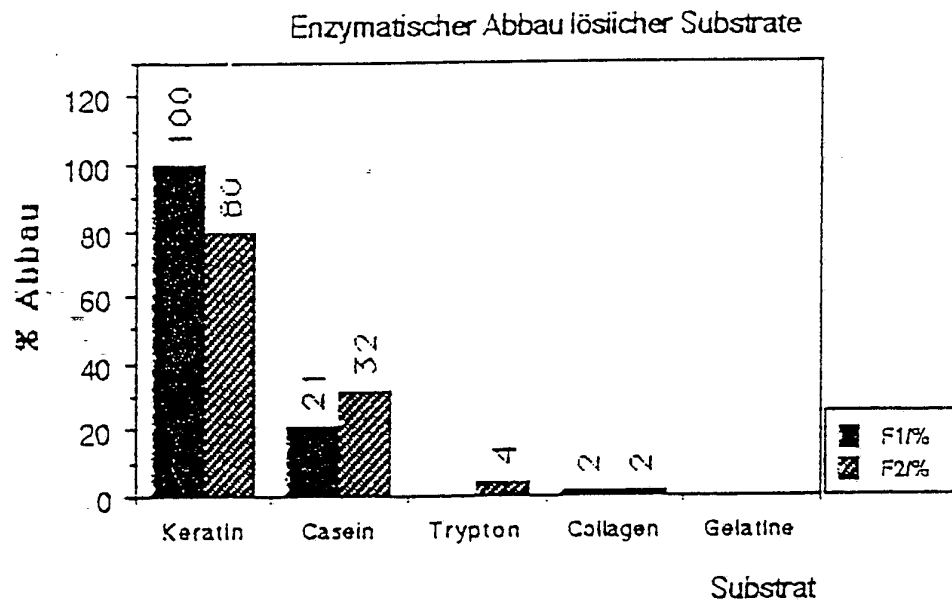


Fig. 5

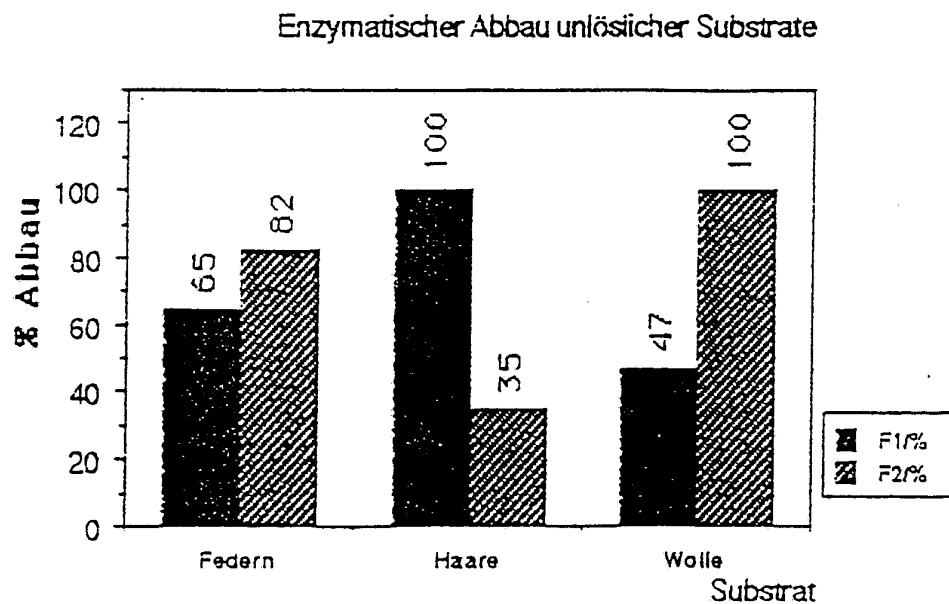


Fig. 6

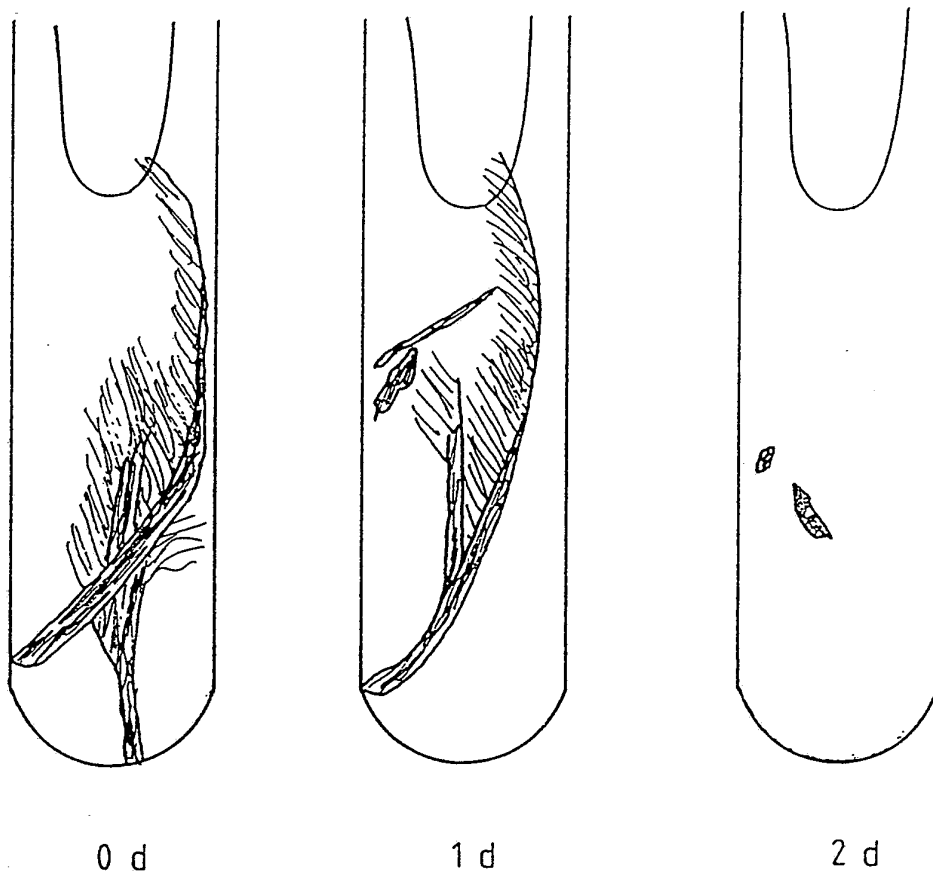


Fig. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 93/00569

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.5 C12N1/20; C12N9/52; //(C12N1/20,C12R1:01)
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.5 C12N; C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR,A,2 590 450 (LICENCIA TALALMANYOKAT ERTEKESITO ES INNOVACIOS KULKERESKEDELMI...) 29 May 1987	
A	DATABASE WPIL Section Ch, Week 9131, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 91-225306 & HU,A,55 833 (BARABAS G) 28 June 1991 see abstract	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
5 July 1993 (05.07.93)

Date of mailing of the international search report
19 July 1993 (19.07.93)

Name and mailing address of the ISA/
EUROPEAN PATENT OFFICE

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

EP 9300569
SA 71836

05/07/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2590450	29-05-87	AT-A,B 384934	25-01-88
		DE-A- 3539231	14-05-87
		HU-A- 3018	28-11-85
		NL-A- 8503119	01-06-87

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int.Kl. 5 C12N1/20; C12N9/52; //(C12N1/20,C12R1:01)		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Kl. 5	C12N ; C12R	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ⁹		
Art. ⁹	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
A	FR,A,2 590 450 (LICENCIA TALALMANYOKAT ERTEKESITO ES INNOVACIOS KÜLKERESKEDELMI...) 29. Mai 1987 ---	
A	DATABASE WPIL Section Ch, Week 9131, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 91-225306 & HU,A,55 833 (BARABAS G) 28. Juni 1991 siehe Zusammenfassung -----	
¹⁰ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen ¹⁰ : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 05.JULI 1993		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 19-07-1993
Internationale Recherchenbehörde EUROPAISCHES PATENTAMT		Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten REMP G.L.E.

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 9300569
SA 71836

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

05/07/93

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
FR-A-2590450	29-05-87	AT-A, B 384934	25-01-88
		DE-A- 3539231	14-05-87
		HU-A- 3018	28-11-85
		NL-A- 8503119	01-06-87

EPO FORM P0473

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82