



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 242 424 A1

4(51) C 12 N 9/54
C 12 N 1/20

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 N / 282 237 5	(22)	30.10.85	(44)	28.01.87
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Institut für Technische Mikrobiologie, 1017 Berlin, Alt-Stralau 62, DD
(72)	Harsen, Erika, Dipl.-Biol.; Lebentrau, Brigitte, Dipl.-Biol., DD

(54)	Kultivierungsmethode für Bakterien der Gattung Bacillus zur Herstellung von alkalischer Protease
------	--

(57) Die Erfindung betrifft eine Kultivierungsmethode für Bakterien der Gattung Bacillus zur Herstellung von alkalischer Protease. Ziel der Erfindung ist ein technologisch einfaches feeding-Verfahren zur Herstellung von Serinprotease mit Bakterien der Gattung Bacillus durch Einflußnahme auf das Nährstoffangebot in der Phase der Produktbildung, verbunden mit einer Erhöhung der durchschnittlichen Aktivitätsausbeute pro Fermentationsansatz. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, durch eine einfache „on line“-meßbare Größe den Zeitpunkt für den Beginn der Kohlenhydratzugabe durch eine verzögerungsfrei arbeitende Methode exakt zu bestimmen und damit den Fermentationsprozeß entsprechend dem Ziel der Erfindung zu steuern. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß der Beginn des feeding durch das zweite pH-Minimum des natürlichen, unregelmäßigen pH-Verlaufs während der Fermentation festgelegt und bis zum Ende der Fermentation fortgeführt wird

Erfindungsanspruch:

1. Kultivierungsmethode für Bakterien der Gattung *Bacillus* zur Herstellung von alkalischer Protease unter Anwendung eines Kohlenhydratfeedings, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Beginn des feeding durch das zweite pH-Minimum des natürlichen, pH-Verlaufs während der Fermentation festgelegt und bis zum Ende der Fermentation fortgeführt wird.
2. Kultivierungsmethode für Bakterien der Gattung *Bacillus* nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß Bakterien kultiviert werden, deren extrazelluläre Serinproteasesynthese dem gleichen Regulationsprinzip unterliegt wie *Bacillus licheniformis*, beispielsweise *B. subtilis*, *B. firmus* u. a.
3. Kultivierungsmethode nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß bei der Kultivierung von *Bacillus licheniformis* 41 p — ZIMET 10911 — oder seinen Mutanten *B. licheniformis* 41 p/165/R22, *B. licheniformis* 41 p/5/ R31 und *B. licheniformis* 41 p/174/ R44 lösliches Kohlenhydrat in Mengen von 0,1 bis 0,2g/100 ml/Stunde zudosiert wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft eine feeding-Methode, die für die Kultivierung von Bakterien der Gattung *Bacillus* und die damit gekoppelte Erzeugung von extrazellulären Enzymen, insbesondere alkalischer Protease, deren Synthese mit dem Sporulationsprozeß korreliert, angewendet wird.

Die mit der genannten Kultivierungsmethode hergestellte alkalische Protease wird für den Einsatz in der Waschmittel-, Leder- und Filmindustrie sowie zur Bereitung von Kosmetika verwendet.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bekannt, daß die Synthese alkalischer Protease durch sporenbildende Bakterien an bestimmte Wachstumsphasen dieser Organismen gebunden ist. Der Beginn der Synthese alkalischer Protease korreliert mit frühen Stadien der Sporulation, wohingegen wachsende Zellen keine alkalische Protease bilden.

Bekannt ist auch, daß bei diskontinuierlicher Kultivierung von Mikroorganismen die Synthese von extrazellulärer Protease in erster Linie durch eine schnelle Verarmung des Nährmediums an Nährstoffen begrenzt ist und eine zusätzliche Dosierung von Nährstoffen diesen Mangel vorübergehend aufheben kann.

Zusätze löslicher Kohlenhydrate während einer Zuchtungsperiode von Mikroorganismen zur Gewinnung alkalischer Protease sind mehrfach beschrieben (DE-OS 2551742; DE-OS 2101803; US-PS 3960665; DE-OS 1807185; US-PS 3696000; DE-OS 1965281; DE-OS 1800508). Der Nachteil der beschriebenen Lösungen besteht darin, daß die Bestimmung des für eine maximale Proteasesynthese ausschlaggebenden Zeitpunktes der erstmaligen Kohlenhydratzugabe zum Fermentationsmedium nicht durch einen direkt, kontinuierlich und verzögerungsfrei meßbaren, die Nährstoffsituation charakterisierenden Parameter ermittelt wird.

Dadurch können Zeitverschiebungen des Prozeßablaufes als Folge natürlicher biologischer Schwankungsbreiten nicht in entsprechender Weise berücksichtigt werden.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist ein technologisch einfaches feeding-Verfahren zur Herstellung von Serinprotease mit Bakterien der Gattung *Bacillus* durch Einflußnahme auf das Nährstoffangebot in der Phase der Produktbildung, verbunden mit einer Erhöhung der durchschnittlichen Aktivitätsausbeute pro Fermentationsansatz.

Darstellung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, durch eine einfache „on line“-meßbare Größe den Zeitpunkt für den Beginn der Kohlenhydratzugabe durch eine verzögerungsfrei arbeitende Methode exakt zu bestimmen und damit den Fermentationsprozeß entsprechend dem Ziel der Erfindung zu steuern.

Es wurde nun gefunden, daß bei diskontinuierlicher Kultivierung von Bakterien der Gattung *Bacillus* in einem für eine hohe alkalische Protease-Synthese geeigneten Nährmedium die Syntheserate im wesentlichen durch die Verfügbarkeit der Kohlenhydratquelle bestimmt wird, und daß durch ein entsprechendes Kohlenhydratfeeding ein aufgetretener Nährstoffmangel ausgeglichen werden kann.

Erfindungsgemäß wurde festgestellt, daß der Zeitpunkt der ersten Zugabe der Kohlenhydrate sowie die Dosis ausschlaggebend dafür sind, daß die Kultur in dem gewünschten Differenzierungszustand gehalten und die damit korrelierende alkalische Protease-Synthese mit einer hohen Rate fortgesetzt wird.

Dieser Zeitpunkt ist dadurch charakterisiert, daß die im Nährmedium enthaltenen Kohlenhydrate mit maximaler Rate utillisiert werden.

Wesentlich ist es nun, diesen Zeitpunkt während des Fermentationsprozesses verzögerungsfrei durch eine einfach und direkt meßbare Größe zu ermitteln.

Bei der Kultivierung von Bakterien der Gattung *Bacillus* in einem geeigneten Nährmedium spiegelt der natürlich (ungeregelt) verlaufende pH-Wert der Kulturlösung die Verwertung der Kohlenhydrate wieder und ist durch zwei ausgeprägte pH-Minima charakterisiert.

Überraschenderweise korreliert das zweite pH-Minimum direkt mit der maximalen Verwertungsrate für Kohlenhydrate. Durch Ausnutzung dieses Zusammenhangs wird nunmehr der Zeitpunkt der ersten Zugabe von Kohlenhydraten zum Nährmedium durch den verzögerungsfrei, direkt und kontinuierlich in der Kulturlösung meßbaren pH-Wert ermittelt und muß nicht über die aufwendige Messung und Berechnung der maximalen Kohlenhydratverwertungsrate bestimmt werden. Sporenbildende Bakterien der Gattung *Bacillus*, deren alkalische Protease-Synthese dem gleichen Regulationsprinzip unterliegt, können nach der erfindungsgemäßen Methode zur Herstellung von alkalischer Protease kultiviert werden; beispielsweise *B. subtilis*, *B. firmus* u. a.

Am Beispiel des *Bacillus licheniformis* 41 p — ZIMET 10911 — und seinen Mutanten *B. licheniformis* 41 p/165/ R22, *B. licheniformis* 41 p/5/R31 und *B. licheniformis* 41 p/174/R44 sowie an *B. firmus* ATCC 14575 wurde das erfindungsgemäße Verfahren entwickelt und eingehend untersucht.

Die erfindungsgemäße Methode zur Kultivierung von Bakterien der Gattung *Bacillus* wird am Beispiel von *B. licheniformis* 41 p dargestellt:

B. licheniformis 41 p wird in einem Kulturmedium gezüchtet, das übliche Kohlenhydrat-, Stickstoff- und Spurenelementquellen enthält.

Der anfängliche Gesamtkohlenhydratgehalt des Nährmediums liegt bei etwa 6,5 g/100 ml.

Das Nährmedium wird auf übliche Weise 30 min bei 120°C sterilisiert.

Das Nährmedium wird mit einer Vorkultur aus der mittleren logarithmischen Wachstumsphase beimpft.

Mit Beginn der Fermentation werden die optimale Temperatur, Rührung und Belüftung eingestellt.

Der pH-Wert der Kulturbrühe unterliegt einem durch die Stoffwechsellätigkeit der Mikroorganismen verursachten natürlichen Verlauf und wird während des Fermentationsprozesses kontinuierlich durch eine automatische Messung und Aufzeichnung ermittelt. Nach Ende des logarithmischen Wachstums der Kultur, unmittelbar nach der Registrierung des zweiten pH-Minimums, wird mit der kontinuierlichen Dosierung von löslichen Kohlenhydraten begonnen und bis zum Ende der Fermentation fortgesetzt. Als lösliche Kohlenhydrate können beispielsweise Glukose, enzymatisch oder chemisch hydrolysierte Stärke oder bei der Glukosegewinnung anfallende glukosehaltige Abprodukte verwendet werden.

Die zudosierte Menge beträgt 0,1 bis 0,2 g/100 ml/Stunde. Während der Dauer der Zugabe löslicher Kohlenhydrate bewegt sich der unregelmäßige pH-Wert der Fermentationsbrühe im Bereich von 6,4 bis 6,7.

Die Dauer des Fermentationsprozesses beträgt 44 bis 48 Stunden.

Das Ende der Fermentation wird durch halbstündliche Bestimmung der Aktivität alkalischer Protease in der Kulturlösung ermittelt.

Die Bestimmung der proteolytischen Aktivität erfolgt nach einer modifizierten Anson-Methode. (M. L. Anson, J. Gen. Physiol. Vol. 22 [1939], S. 79–89).

Die proteolytische Aktivität wird durch die Zunahme der in einem Proteinfällungsmittel löslichen Substratbruchstücke charakterisiert. Diese werden in Tyrosinäquivalenten ausgedrückt und im UV-Bereich des Lichtes bei 274 nm bestimmt. Als Substrat wird Hämoglobin nach HAMMARSTEN verwendet.

Die Einheit wird definiert als die Zunahme der im Fällungsmittel löslichen Proteinbruchstücke, ausgedrückt in µMol Tyrosin, die in 1 min entstehen.

Die Isolierung des Enzyms erfolgt nach den üblichen Methoden.

Die Möglichkeit der Nutzung der Korrelation von pH-Verlauf, maximaler Kohlenhydrat-Verwertungsrate und erforderlichem Zeitpunkt der Kohlenhydrat-Zugabe als Parameter zur Prozeßkontrolle und die Verwertung der Ergebnisse zur positiven Beeinflussung des Fermentationsprozesses stellen eine wesentliche Bereicherung der Lösungen des Standes der Technik dar. Sie führen zur

- Stabilisierung des Verfahrens durch exakte Bestimmung des erforderlichen feeding-Zeitpunktes mittels Anwendung einer verzögerungsfreien Meßmethode
- erheblichen Einschränkung der biologischen Schwankungsbreite des Fermentationsprozesses
- Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute
- Verringerung der Kosten pro Aktivitätseinheit
- Minimierung des Arbeitskräfte- und Materialaufwandes für die Prozeßkontrolle.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Nährmedium: Sojaschrot	3,2 %
Stärkehydrolysat	5,0 %
Casein	1,4 %
Glukose	0,525 %
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	0,5 %
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,05 %
Leitungswasser	

Die Sterilisation erfolgt 30 min bei 120°C.

Vor Beimpfen werden Rührung, Belüftung und Temperierung eingestellt.

Die Beimpfung des Nährmediums wird mit 3% einer etwa 7 Stunden in Schüttelkolben oder im Fermenter angezüchteten Vorkultur vorgenommen.

Nach ca. 20 Stunden hat der pH-Wert der Kulturbrühe das zweite pH-Minimum erreicht.

Unmittelbar nach Durchlaufen desselben wird mit der Zudosierung einer 45%igen Glukoselösung begonnen. Die Dosierung erfolgt kontinuierlich.

Die Fütterungsrate beträgt 0,12 g/100 ml/Stunde.

Nach 44 Stunden ist in der Kulturlösung eine alkalische Protease-Aktivität von 300 TE_{Hb}/ml meßbar. Im Kontrollversuch ohne Zugabe löslicher Kohlenhydrate wurde eine Aktivität von 270 TE_{Hb}/ml erreicht.

Beispiel 2

Die Versuchsbedingungen werden wie in Beispiel 1 gewählt.

Anstelle der Glukose wird eine auf Glukose berechnete 30%ige Lösung eines Stärkehydrolysats dosiert.

Die Zufütterungsrate wird auf 0,2 g/100 ml/Stunde eingestellt.

Nach 46 Stunden beträgt die alalkische Protease-Aktivität in der Kulturlösung 295 TE_{Hb}/ml.