



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2 Patentgesetz

PATENT SCHRIFT

(19) DD (11) 226 156 A3

4(51) C 12 N 9/54

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21) WP C 12 N / 236 445 4

(22) 30.12.81

(45) 14.08.85

(71) Institut für technische Mikrobiologie, 1017 Berlin, Alt-Stralau 62, DD

(72) Grunow, Reiner, Dr. sc. Dipl.-Biol.; Huber, Johann, Dr. Dipl.-Biol.; Müller, Martina, Dipl.-Biol.; Winkler, Barbara, DD

(54) Verfahren zur Herstellung einer Metalloprotease aus *Bacillus cereus*

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer *Bacillus cereus*-Metalloprotease für den Einsatz für verschiedene kommerzielle, technische und wissenschaftliche Zwecke, bei denen Proteine oder eiweißhaltige Materialien zu niedermolekularen Produkten abgebaut werden sollen. Ziel der Erfindung ist es, ein ökonomisches, biotechnisches Verfahren zur Herstellung eines Proteasepräparates mit einer oligosporen *Bacillus cereus*-Mutante zu entwickeln, die eine durch EDTA hemmbare, toxikologisch unbedenkliche Metalloprotease bildet und keine Nebenaktivitäten an α -Amylase und β -1,3-1,4-Glucanase synthetisiert. Die erfindungsgemäß verwendete *Bacillus cereus*-Mutante ZF C-39 wurde in der zentralen Stammsammlung der DDR im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der Akademie der Wissenschaften der DDR, Jena, unter der Nummer ZIMET 10 700 hinterlegt. Sie unterscheidet sich von Typ-Stamm *Bac. cereus* ATCC 14 579 durch folgende Merkmale:

- stark reduzierte Versporung
 - keine Lecithinaseaktivität
 - kein Wachstum auf Citratagar
 - kein Tyrosinabbau
 - anaerober Nitratabbau
 - keine Bildung von löslichen, für Mäuse und Ratten bei oraler Applikation toxischen Substanzen.
- Im Fluoreszenz-Antikörper-Test wurde die Zugehörigkeit zur Species *Bacillus cereus* bestätigt.

ISSN 0433-6461

4 Seiten

Erfindungsansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung einer Metalloprotease aus *Bac. cereus*, **dadurch gekennzeichnet**, daß *Bac. cereus* ZF C-39/ ZIMET 10700 diskontinuierlich in wäßrigen Medien mit Feststoffgehalten von 3,0 bis 7,5% fermentiert wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die wäßrigen Medien polysaccharidhaltige Naturstoffe, wie Getreide, Mais und Sojabohnen, Trockenhefe sowie verschiedene anorganische Salze enthalten.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer extrazellulären Metalloprotease aus *Bacillus cereus*, die für verschiedene kommerzielle, technische und wissenschaftliche Zwecke, insbesondere zum Abbau von Proteinen oder eiweißhaltigen Materialien zu niedermolekularen Verbindungen verwendet werden kann.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Mikrobielle Metalloproteasen können von einer Vielzahl von Bakterien und Pilzen synthetisiert werden. In biotechnischen Verfahren werden bevorzugt Stämme von *Bacillus*-Arten (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. brevis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. stearothermophilus*) verwendet (Ruttloff, H., u. a., Industrielle Enzyme, Fachbuchverlag Leipzig, 1979). Weiterhin wird in der Literatur (Ruttloff, H., Mikrobielle Enzymproduktion, Akademie-Verlag Berlin, 1981, S. 448) erwähnt, daß *B. cereus*-Metalloproteasen für die Käseherstellung verwendet werden können, ohne daß ein Hinweis auf die toxikologische Unbedenklichkeit der Präparate gegeben ist.

Extrazelluläre Metalloproteasen treten in der Regel als Nebenaktivitäten bei der Herstellung von α -Amylase und/oder Glucan abbauenden Enzymen auf, z. B. bei den Verfahren nach DD-WP C 12 D/220 223, DD-WP C 12 N/219 710 und DD-WP 148 891. *Bacillus cereus* synthetisiert eine Protease, die weitgehend frei von extrazellulären Nebenenzymen ist (CH-PS 547 858 und CH-PS 567 100).

In CH-PS 547 858 wird eine Protease produzierende asporogene *Bac. cereus*-Mutante beschrieben, deren Art der Protease nicht näher erläutert wird. Der Patentanspruch bezieht sich dabei auf die Verwendung von nicht-sporenbildenden, enzymbildenden Mutanten für die Herstellung eines Enzymproduktes mit niedrigem Bakteriengehalt. Zur Herstellung der Protease werden Kulturlösungen verwendet, die Feststoffgehalte von 12 bis 20% aufweisen. Die proteolytische Aktivität in der Fermentationsbrühe beträgt 150 AE/kg.

CH-PS 567 100 beschreibt eine *Bac. cereus*-Mutante, die eine Protease mit hohen Aktivitäten bei pH 7,0 und einem Molekulargewicht von weniger als 10000 synthetisiert. Nach den dargestellten Untersuchungen über den Einsatz spezifischer Hemmer kann es sich jedoch um keine Metalloprotease handeln, da eine Hemmung durch EDTA nicht nachweisbar ist. In beiden Patenten werden keine toxikologischen Prüfungen erwähnt; auf die Rolle von *Bac. cereus* als unspezifischer Lebensmittelvergifter wird nicht eingegangen.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein ökonomisches biotechnisches Verfahren zur Herstellung eines Proteasepräparates mit einem *Bac. cereus*-Stamm zu entwickeln, der ein durch EDTA hemmbares, toxikologisch unbedenkliches Metalloproteasepräparat ohne weitere Nebenenzyme bildet.

Darstellung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, mit einer oligosporigen *Bac. cereus*-Mutante ein von anderen extrazellulären Enzymen weitgehend freies, toxikologisch unbedenkliches Metalloproteasepräparat in Kulturlösungen mit einem niedrigen Feststoffgehalt und mit hohen Ausbeuten zu produzieren.

Erfindungsgemäß wird für die Herstellung eines solchen Enzympräparates die *Bac. cereus*-Mutante ZF C-39 benutzt, die sich durch folgende Eigenschaften auszeichnet:

- stark reduzierte Versporung (Versporungsrate liegt bei maximal 5%)
- keine Lecithinaseaktivität
- kein Wachstum auf Citratagar
- kein Tyrosinabbau
- anaerober Nitratabbau
- Bildung einer bis zu 90% durch EDTA hemmbaren extrazellulären proteolytischen Aktivität
- keine Freisetzung einer löslichen Substanz in die bakterienhaltige Kulturlösung, die bei oraler Verabfolgung an ICR-Mäuse und an Wistar-Ratten toxische Reaktionen hervorrief.

Der erfindungsgemäße Stamm *Bacillus cereus* ZF C-39 wurde in der zentralen Stammsammlung der DDR im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der Akademie der Wissenschaften der DDR, Jena, unter der Nummer ZIMET 10700 hinterlegt und weist folgende Charakteristik auf:

Zellmorphologie: aerobes bewegliches grampositives Stäbchen, Sporulationsrate maximal 5 %, Sporen sind oval und im Zentrum der sporulierenden Zelle gelagert

Koloniemorphologie

auf Nähragar:	hellbeige, mattglänzend, großflächig, glatter Rand
auf Blutagar:	graugrün, mattglänzend, β -Hämolyse nach 48 Stunden bei 37 °C
sog. „Riesenkolonie“:	rund, ca. 40 mm Durchmesser, hellbeige, mattglänzend, gelappter Rand
auf Glukose-Nitrat-Agar:	zart, sehr klein
auf Glukose-Aspa-ragin-Agar:	zart
Wachstum in Nährbouillon:	Trübung, Bodensatz, keine Hautbildung
anaerobes Wachstum in Glukose-Medium mit Gasbildung	
Wachstum in NaCl-Bouillon:	3% +
	5% –
	7% –
	10% –

Biochemische Tests:

Säurebildung aus: Glukose, Maltose, Trehalose, Saccharose, Ribose
keine Säurebildung aus: Arabinose, Xylose, Mannose, Galactose, Fructose, Lactose, Raffinose, Rhamnose, Mannit, Dulcitol, Aesculin, Sorbit

positive Reaktionen: Reduktion von Nitrat zu Nitrit, anaerober Nitratabbau, Katalase, Amylase, Gelatinase, Caseinpeptidasen, Acetyl-Methyl-Carbinol-Bildung

negative Reaktionen: Lezithinase, Urease, Indolbildung, Citratverwertung

Die Mutante *Bac. cereus* ZF C-39/ZIMET 10700 unterscheidet sich in wesentlichen Merkmalen vom Typ-Stamm *Bac. cereus* ATCC 14579 nach Buchanan, R.E. u. a., *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA, 1974. Im Fluoreszenz-Antikörper-Test (FAT) mit monospezifischen Antisporenseren konnte jedoch die Zugehörigkeit zu *Bac. cereus* bestätigt werden.

Bac. cereus ZF C-39/ZIMET 10700 synthetisiert unter Testbedingungen (vgl. Ausführungsbeispiele) bis zu $28 \text{ TE}_{\text{cas}}/\text{ml}$ proteolytische Gesamtaktivität bei pH 7,0 und keine nachweisbaren Aktivitäten an α -Amylase und β -1,3-1,4-Glucanase. Der durch Chelatbildner (10^{-2} M EDTA) inhibierbare Anteil der Gesamtaktivität beträgt mehr als 90%.

Die Synthese der extrazellulären Metalloprotease beim Stamm ZF C-39/ZIMET 10700 wird durch Glucose reprimiert. Die Fermentation erfolgt durch diskontinuierliche Kultivierung in wäßrigen Medien erfindungsgemäß mit Feststoffgehalten von 3,0 bis 7,5%.

Die mittleren Generationszeiten bei 30°C in Glucose-Nährbouillon und in kohlenhydratreichen Medien betragen 50 bis 60 min.

Im oralen Test auf akute Toxizität an Wistar-Ratten und ICR-Mäusen wurde bakterienhaltige Kulturlösung mit Enzymaktivität bis zur Dosierungsgrenze (36 ml/kg Körpermasse bei Wistar-Ratten und 15 ml/kg Körpermasse bei ICR-Mäusen) ohne toxische Wirkung vertragen.

Bac. cereus ZF C-39/ZIMET 10700 ist gegen die Bacillusphagen PBS 1, PZA, PZB, PZC, PZD und PZF resistent.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung soll an Hand folgender Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

Beispiel 1

Kulturführung

Zellmaterial von *Bac. cereus* ZF C-39/ZIMET 10700 von Schrägagarkulturen auf Gerstenschrot (2,5% Gerstenschrot, 1% Sojaschrot, 0,5% Glucose, 2% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 3% Agar, pH 7,0) wird nach 48 Stunden Bebrütung bei 37°C entweder direkt oder nach Zwischenpassage auf Nähragar I (Staatl. Institut für Immunpräparate und Nährmedien, Berlin-Weißensee, DDR) bzw. auf Gerstenschrotagar in 50 ml Vorkulturmedium (VK) in 500 ml-Rundschüttelkolben überführt und 16 Stunden bei 30°C geschüttelt (Rundschütteltisch, 200 U/min).

VK: 1% Maisstärke
0,7% Sojaschrot
0,5% Weizenfeinschrot
0,1% Hefeextrakt
0,1% Glucose
0,05% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
0,1% KCl

Mit dieser Vorkultur werden 50 ml Hauptkultur-Medium (HK) in 500 ml-Rundschüttelkolben mit einer Zellzahl von 2×10^7 koloniebildenden Einheiten/ml beimpft und bei 30°C unter Schütteln inkubiert.

In einem HK-Medium aus:

1% Maisstärke
0,7% Sojaschrot
0,5% Weizenfeinschrot
0,2% Trockenhefe
0,05% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
0,1% KCl

werden nach 48 Stunden $27 \pm 5 \text{ TE}_{\text{cas}}/\text{ml}$ (0,168 AE/ml) gebildet.

Beispiel 2

Kulturführung: siehe Beispiel 1

Bei Verwendung eines VK-Mediums aus:

0,1% Maisstärke
0,5% Hefeextrakt
2% Glucose
0,1% NaCl
0,4% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
0,1% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$

und eines HK-Mediums aus:

- 2 % Maisstärke
- 1,5 % Sojaschrot
- 2 % Weizenfeinschrot
- 1,5 % $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
- 0,02 % $\text{CaCl}_2 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
- 0,15 % KCl
- 0,05 % $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

werden nach 48 Stunden $26 \text{TE}_{\text{cas}}/\text{ml}$ (0,162 AE/ml) und nach 72 Stunden $29 \text{TE}_{\text{cas}}/\text{ml}$ (0,181 AE/ml) gemessen.

Beispiel 3

Verfahrensweise bis zur Vorkultur wie in Beispiel 1

Hauptkultur im 300l-Fermenter mit 150l Medium, Kultivierung bei 30°C und Rührung.

Im Hauptkulturmedium entsprechend Beispiel 1 werden nach 12 Stunden $22 \text{TE}_{\text{cas}}/\text{ml}$ (0,137 AE/ml) gemessen.