



PATENTSCHRIFT 145765

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

Int. Cl.³

(11) 145 765 (44) 07.01.81 3(51) C 12 N 9/24
(21) WP C 12 D / 215 195 (22) 27.08.79

(71) siehe (72)

(72) Reuter, Gerhard, Prof. Dr.; Häßler, Ortwin, Dr. Dipl.-Chem.;
Wisniewski, Hans-Georg, Dipl.-Biol.; Röber, Bernd,
Dipl.-Biol., DD

(73) siehe (72)

(74) Friedrich-Schiller-Universität Jena, Direktorat für
Forschung, Büro für Neuererbewegung und Schutzrechte,
6900 Jena, August-Bebel-Straße 4

(54) Verfahren zur Erzeugung eines zellwandlytischen
Enzymkomplexes

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erzeugung eines zellwand-
lytischen Enzymkomplexes, geeignet zur Sphäroplastenpräparation.
Es ist das Ziel der Erfindung, ein Mannanase und Glucanase
enthaltendes Enzympräparat zu gewinnen, mit dem man in beliebigen
Mengen und in guten Ausbeuten unter Vermeidung proteolytischer
Prozesse Mikroorganismen erzeugen kann, die weitgehend von der Zellwand
befreit sind. Es wurde ein Verfahren entwickelt, mit dessen Hilfe es
möglich ist, jahreszeitlich unabhängig ein Enzympräparat in
beliebigen Mengen zu gewinnen und damit weitgehend zellwandbefreite
Mikroorganismen bei gleichzeitiger Ermittlung von Ausbeute und
Lyse-Rate isotopmarkierter Sphäroplasten zu erzeugen. Wichtige
Produktionsstämme können durch die Sphäroplastenbildung besser
erforscht und kontrolliert werden hinsichtlich labiler Strukturen,
die ohne vorherigem Zellwandabbau nicht zugänglich sind.

Titel der Erfindung

Verfahren zur Erzeugung eines zellwandlytischen Enzymkomplexes

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Submersverfahren zur Gewinnung eines zellwandlytischen Enzymkomplexes, der Mannanase, Glucanase und Chitinase enthält. Das rohe Enzympräparat kann sehr vorteilhaft zur Gewinnung von Sphäroplasten eingesetzt werden. Sphäroplasten können als weitgehend zellwandbefreite osmolabile Mikroorganismen Verwendung finden bei der Kontrolle von Produktionsstämmen hinsichtlich labiler Strukturen, die ohne vorherigem Zellwandabbau nicht zugänglich sind.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der Erfindung besteht in der Gewinnung eines Enzympräparates, das als Ausgangsmaterial zur Isolierung der darin enthaltenen Enzyme genutzt werden kann.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die bisher eingesetzten Enzympräparate zur Sphäroplasten- bzw. Protoplastengewinnung wurden fast ausschließlich aus dem Verdauungssaft der Weinbergschnecke *Helix pomatia* gewonnen, die jedoch jahreszeitlich begrenzt zu erhalten sind und außerdem unter Naturschutz stehen.

Ferner enthält das aus *Helix pomatia* gewonnene Enzympräparat nur eine geringe Mannanaseaktivität, dagegen aber eine stärkere Proteaseaktivität, so daß die Lyse der Zellen schlechter zu steuern ist.

In der Literatur werden weitere Verfahren zur Gewinnung von lytischen Enzymen beschrieben, die allerdings den Nachteil haben, daß keine Mannanase ausgewiesen wird (DOS 226170, DWP 130422, 69330 und 78202). Das Vorhandensein von Mannanase gewinnt jedoch spezielle Bedeutung für den lytischen Abbau der Hefezellwand, die in größerem Umfang Mannan enthält.

Das in der Literatur beschriebene Verfahren zur Protoplastenerzeugung bzw. Lyse von Hefen hat den Nachteil, daß unter den genannten Bedingungen kein oder nur ein unvollständiger Abbau der Zellwand bei *Candida*-Arten erfolgt. (VRŠANSKÁ, M., KRÁTKÝ, Z., and BIELY, P. (1977) Z. Allg. Mikrobiol. 17, 391-402).

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines jederzeit im präparativen Maßstab darstellbaren Enzymkomplexes, der es gestattet, in beliebigen Mengen und in guten Ausbeuten Mikroorganismen zu gewinnen, die weitgehend von der Zellwand befreit sind.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, mit Hilfe eines einfachen Verfahrens einen lytischen Enzymkomplex zu gewinnen, mit dessen Hilfe sich Sphäroplasten aus Mikroorganismen im präparativen Maßstab darstellen lassen.

Gleichzeitig sollen Ausbeute und Lyse-Rate der Sphäroplasten durch Einsatz isotop-markierter Verbindungen ermittelt werden.

Es stellte sich vorteilhaft heraus, daß zur Adaption an andere Mikroorganismen deren Zellwände als C-Quelle eingesetzt werden.

Die Aufgabe wurde dadurch gelöst, daß ein Mikroorganismus, beispielsweise der Stamm *Arthrobacter* GJM-I unter submersen Bedingungen in einem Nährmedium mit Zellwand der zu lysierenden Organismen als C-Quelle und Ammoniumsulfat als N-Quelle bei einem pH-Wert von 7 und einer Temperatur von 20-35 °C unter Rührung und Belüftung kultiviert wird. Nach einer Kultivierungszeit von 2-5 Tagen wird eine gute lytische Aktivität erreicht.

Die als Schüttelkulturen oder in Fermentoren durchzuführenden Hauptkulturen werden mit einer 24-stündigen Vorkultur beimpft.

Als Impfmateriel für die Vorkultur dienen Kulturen auf Schrägagar.

Die Maxima der Mannanase- und Glucanasebildung fallen zeitlich nicht zusammen. Eine lytische Gesamtaktivität erhält man nach einer Kultivierung von mindestens 2 Tagen.

Die Hauptkultur wird nach 50 - 170 Stunden abgeerntet.

Das Zentrifugat wird im Vakuum eingeengt, steril filtriert, anschließend gegen Aqua dest. oder Puffer dialysiert und lyophilisiert.

Das erhaltene Dialysat ist frei von Protease. Das so erzeugte Präparat wird zur kontrollierten Gewinnung von Sphäroplasten eingesetzt.

Die Sphäroplastenausbeute und Lyse-Rate kann nach erfolgter Fütterung der Mikroorganismen mit einer uniform ^{14}C -markieren Aminosäure über die ^{14}C -Freisetzung bestimmt werden.

Der rohe Enzymkomplex kann jedoch auch so eingesetzt werden, daß Mikroorganismen lysieren, wodurch eine bessere Freisetzung der in der Zelle vorhandenen Proteine ermöglicht wird.

Eine so durchgeführte Proteinfreisetzung kann, im technischen Maßstab angewandt, zum qualitätsverbessernden Aufschluß in der Nahrungs- und Futtermittelindustrie genutzt werden.

Ausführungsbeispiel 1

Die Stammhaltung des *Arthrobacter* GJM-I erfolgt in Schrägagarröhrchen. Das Agarmedium hat folgende Zusammensetzung:

10 g Hefeextrakt
10 g Pepton
35 g Agar
1 g Kohlenhydrat
auf 1 l Aqua dest.

Die 500 ml Schüttelkolben für die Vor- und Hauptkultur enthalten 200 ml Nährlösung mit folgender Zusammensetzung:

7,50 g K_2HPO_4
2,32 g KH_2PO_4
3,75 g $(NH_4)_2SO_4$
1,50 g Hefeextrakt
20,0 g Kohlenhydrat
10,0 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$
314 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
74,5 mg $CaCl_2 \cdot 6H_2O$
mit Aqua dest. ad 1 l

Sterilisation: 30 Minuten bei $121^\circ C$.

Die Züchtung des Impfmateriails zur Beimpfung der Vorkultur erfolgt auf Schrägagarröhrchen bei $30^\circ C$. Der Bakterienrasen von 2 Kulturröhrchen wird mit 5 ml Kulturmedium abgeschwemmt und in 200 ml Medium zur Vorkultur überführt.

Diese Vorkultur wird 48 h bei $30^\circ C$ geschüttelt. Danach werden je 10 ml Vorkultur in 200 ml Hauptkultur überführt. Die Hauptkultur wird mindestens 2 Tage bei $30^\circ C$ geschüttelt.

Aufarbeitung der Kulturlösung

Die Arthrobacterkulturen werden zentrifugiert und die Überstände im Vakuum auf ca. 1/10 bis 1/5 eingeengt. Das Konzentrat wird sterifiltriert und dialysiert (Ausschlußgröße 10 000 - 20 000 Dalton). Die Dialyse erfolgt bei 0 - 4°C gegen Aqua dest. Das Dialysat wird lyophilisiert. Das erhaltene weiße Produkt besteht zu etwa 30-40% aus Protein.

Bestimmung der Mannanase- und Glucanaseaktivität

Bei diesem Test wird Mannan bzw. Glucan enzymatisch gespalten und anschließend werden die reduzierenden Einheiten nach dem SOMOGYI-NELSON-Test bestimmt.

Eine Enzymeinheit (U) ist dabei die Enzymaktivität, die bei 30°C in einer Minute 1 μ mol monomeres Produkt bzw. Produktäquivalent freisetzt.

Die Ansätze von 500 μ l enthalten:

250 μ l 0,1 M Phosphatpuffer (Sörensen) pH 7,6 bei Mannanase
bzw. pH 5,0 bei Glucanase
200 μ l einer 1 mg/ml enthaltenden Mannanlösung bzw. Glucan-
suspension

50 μ l der zu prüfenden Enzymlösung

Die Ansätze werden 1 Stunde bei 30°C inkubiert und die enzymatische Hydrolyse wird danach durch Zugabe von 1 ml der alkalischen Kupferreagenslösung nach SOMOGYI gestoppt (SOMOGYI, M. (1952) J. Biol. Chem. 195, 19).

Zu allen Proben werden gleiche Ansätze mit inaktiviertem Enzym zur Bestimmung des Blindwertes mitgeführt.

In den so erhaltenen Proben werden anschließend die reduzierenden Zucker bestimmt.

Ausführungsbeispiel 2

Anzucht der Hefe und Sphäroplastenpräparation

Hefezellen von *Candida spec.* H werden in einem Flüssigkeitsmedium folgender Zusammensetzung bei 28°C unter Schütteln kultiviert:

1	g KH_2PO_4	0.26 mg	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
0.16	g K_2HPO_4	0.38 mg	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
0.5	g NaCl	0.11 mg	KJ
0.7	g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.11 mg	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
0.4	g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.50 mg	H_3BO_4
20	g Glucose	0.36 mg	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
1.34	g Harnstoff	0.25 mg	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
0.1	mg Biotin	mit Aqua dest. ad 1l	

Soll später die Sphäroplastenbildung bzw. die Lyse durch Messung der Radioaktivität bestimmt werden, so wird 3 Stunden vor der Ernte der Hefekultur $^{14}\text{C}(\text{U})$ -L-Leucin gefüttert.

Die Hefezellen werden aus der Kulturflüssigkeit abzentrifugiert, mit einer 1%igen Kaliumchloridlösung gewaschen und anschließend 30 Minuten bei 28°C in 40 ml Vorinkubationsmedium geschüttelt.

Danach werden die Hefezellen zweimal in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 6,0), der zur osmotischen Stabilisierung 0,6 M Mannit enthält, gewaschen und schließlich bis zu 200 mg/ml Hefefeuchtmasse im gleichen Puffer suspendiert.

Nach Zusatz von Arthrobacter-Enzymkomplex (bis zu 20 mg/ml) wird bei 28°C auf einem Reziprokschüttler inkubiert.

Nach 5 - 15 Minuten ist eine Sphäroplastenausbeute von etwa 90 Prozent erreicht.

Bestimmung der Sphäroplastenausbeute und der Lyse-Rate

Nach der Vorinkubation wäscht man die radioaktive Hefe und stellt zwei volumengleiche Hefesuspensionen mit 50-200 mg/ml Feuchtmasse im Präparationspuffer her. Während die eine Suspension mit Enzymkomplex (bis zu 20 mg/ml) versetzt wird, dient die andere als Kontrolle.

Ansatz und Kontrolle schüttelt man bei 20-30°C. In bestimmten zeitlichen Abständen werden aus Kontrolle und Ansatz je 200 µl Proben in je 1 ml osmotisch stabilisierten Präparationspuffer, 1 ml nicht stabilisierten Präparationspuffer, sowie zu je 2 ml Protonol pipettiert.

Durch Zufügen von Oberflächenaktiven Substanzen kann eine ^{14}C -Gesamtfreisetzung von nahezu 100% erzielt werden.

Die Protosolproben dienen der Bestimmung der ^{14}C -Gesamtinkorporation. Sie werden 20 h bei 55°C inkubiert und anschließend in 10 ml Dioxanszintillator in Probegläser zur Szintillationsmessung überführt.

Die anderen Proben werden sofort 10 min bei 5600 g zentrifugiert, und je 500 µl der Überstände werden in 10 ml Dioxanszintillator gegeben. Zwecks Abklingen der Chemilumineszenz lagert man die Proben 24 h bei 4°C und vermischt anschließend in einem LKB Wallac 81000 liquid scintillation counter.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Erzeugung eines zellwandlytischen Enzymkomplexes durch submerse Kultivierung eines Mikroorganismus, beispielsweise des Stammes *Arthrobacter* GJM-I, gekennzeichnet dadurch, daß ein Stamm unter submersen Bedingungen in einem Nährmedium mit Zellwand der zu lysierenden Organismen als C-Quelle und Ammoniumsulfat als N-Quelle bei einem pH-Wert von 7 und einer Temperatur von 20 - 35°C unter Rührung und Belüftung kultiviert wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß das Kulturfiltrat des Mikroorganismus zu einem rohen Enzymkomplex aufgearbeitet wird.