

**Biotechnologische Gewinnung von Aminosäuren und Peptiden aus  
Abfallfedern durch extremophile Mikroorganismen im  
Technikumsmaßstab**

**AZ 13040/07**

Projektleiter Prof. Dr.-Ing. H. Märkl, TU Hamburg-Harburg

Projektpartner Prof. Dr. rer.nat. G. Antranikian, TU Hamburg-Harburg  
Dr.-Ing. H. Friedmann, BKW Biokraftwerke Fürstenwalde GmbH



# Biotechnologische Gewinnung von Aminosäuren und Peptiden aus Abfallfedern durch extremophile Mikroorganismen im Technikumsmaßstab

AZ 13040/07

Prof. Dr.-Ing. H. Märkl, Dipl.-Biotechnol. J. Brodersen, Bioprozess- und  
Bioverfahrenstechnik, Technische Universität Hamburg-Harburg

Prof. Dr. rer.nat. G. Antranikian, Dr. rer.nat. S. Rießen, Technische Mikrobiologie,  
Technische Universität Hamburg-Harburg

Dr.-Ing. H. Friedmann, Dipl.-Ing. C. Leichtl, BKW Biokraftwerke Fürstenwalde GmbH

## 1. Zusammenfassung

**Enzymbereitstellung:** Mit dem Ziel, Federkeratin zu Aminosäuren und Peptiden umzusetzen wurden zwei thermophile Bakterien, *Fervidobacterium pennivorans* und *Thermoanaerobacter keratinophilus*, untersucht. Der Stamm *T. keratinophilus* wurde in einem Screeningprogramm zum Abbau von Keratinen isoliert und beschrieben. Der *in vivo* Abbau von Federkeratin durch eine extrazelluläre Serinprotease dieses Stammes konnte nachgewiesen werden. Um den Abbau von Federkeratin im großen Maßstab effektiv durchführen zu können, wurden die korrespondierenden Gene in mesophilen Wirtsorganismen kloniert.

Die Keratinase aus *Fervidobacterium pennivorans* konnte erfolgreich in *E. coli* kloniert werden, jedoch war kein aktiv exprimiertes Enzym nachweisbar (Kooperation: Prof. W. de Vos, Kluskens et al., 2002). Daher wurde zusätzlich die Protease aus *T. keratinophilus* kloniert. Durch den Einsatz von degenerierten Primern, die die Teilsequenzen der katalytischen Triade einer Serinprotease flankieren, konnte die Protease-kodierende Sequenz aus *T. keratinophilus* detektiert werden. Diese Sequenz wurde in *E. coli* in den Expressionsvektor pQE30 ligiert und aktiv exprimiert.

Um eine Überexpression und Sekretion des rekombinanten Proteins zu erreichen, wurde die Protease-kodierende Sequenz zusätzlich in *Bacillus megaterium* kloniert. Dazu stellte Prof. Dr. Jahn vom Institut für Mikrobiologie der TU Braunschweig den Vektor pMM1520 sowie



einige ausgewählte *B. megaterium* Stämme zur Verfügung. Das heterologe Gen wurde intrazellulär in *B. megaterium* aktiv exprimiert. Um das rekombinante Enzym aus *B. megaterium* auszuschleusen, wurde das Signalpeptid aus *T. keratinophilus* gegen ein wirtsspezifisches Signalpeptid ausgetauscht und so ein Fusionsprotein aus Pro- sowie nur der reifen Proteasesequenz aus *T. keratinophilus* hergestellt. Die Konstruktion des Pro-Proteins war erfolgreich.

**Verfahrensentwicklung:** Zum Abbau von Federn wurden *F. pennivorans* und *T. keratinophilus* im 2 l-Folienfermenter auf Komplexmedium mit Federn bei 70°C kultiviert. Für den Abbau zu Aminosäuren und Peptiden wurde eine optimale Federkonzentration von 10g/l ermittelt. Pro Tag setzten die Organismen etwa 1g/l•d gelöstes Protein aus den Federn frei. Da die *in vivo* Abbauraten hinsichtlich eines technischen Verfahrens zu niedrig ist, wurde die Variante eines Zwei-Stufen-Prozesses gewählt, bei der erst das Enzym mit dem Wildstamm *T. keratinophilus* oder einem rekombinanten *E. coli* produziert und im zweiten Schritt mit Hilfe der so produzierten Protease der Abbauprozess durchgeführt wird. Für den Wildstamm ergaben sich Ausbeuten von bis zu 150 U/l im 2-l Fermenter. Da ein Scale-up nicht möglich war, konnten ausreichende Enzymmengen ausschließlich für den Labormaßstab hergestellt werden. Mit dem rekombinanten *E. coli* hingegen konnten ca. 4000 U/l im Reaktor produziert werden, was einer Steigerung von 2700% entspricht. Hierfür wurde ein Fedbatchverfahren mit exponentieller Fütterung entwickelt, welches erfolgreich bis in den 300l-Maßstab überführt werden konnte.

Für den *in vitro*-Abbau wurden die Protease aus *T. keratinophilus* und kommerziell erhältliche Enzyme eingesetzt. Ein Enzym der Firma TFL konnte bei 60°C und pH 8 in Gegenwart eines Reduktionsmittels binnen 24h 20% der eingesetzten Federn zu löslichen Proteinen umsetzen. Im Vergleich dazu wies die Protease aus *T. keratinophilus* einen Hydrolysegrad von 37 % auf. Für ein mögliches Scale-up würde sich ein beheizter Rührkessel mit großer Einfüllöffnung anbieten, da die nass angelieferten Federn nicht pumpfähig sind.

**Beratung und Marktpotential:** Recherchen bei Behörden, Verbänden, Geflügelschlachtereien und der weiterverarbeitenden Industrie ergaben bei 800.000 t/a produziertem Geflügel etwa 8.000 t Federmehl und rund 20.000 t/a Abfallfedern. Die Entsorgungskosten belaufen sich auf bis zu 200,- €/t. Mit den nun vorliegenden Ergebnissen der Laborversuche zum Federabbau mit direktem Einsatz von Enzymen ist es derzeit möglich,

einen Abbaugrad von 37% zu erreichen. Um eine Anlage zur biotechnologischen Federnverwertung aufzubauen und mit wirtschaftlichem Erfolg zu betreiben, wäre nach den jetzigen Berechnungen ein Abbaugrad von 90% anzustreben. Falls dies erreicht werden sollte, bietet sich angesichts der EU- „Hygienevorschriften für nicht zum menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte“ vorwiegend der Einsatz als Zuschlagstoff für die Herstellung von Kleintierfutter an.

## **2. Anlass und Zielsetzung des Projektes**

In einem innovativen Verfahren sollten aus Abfallfedern, die in einer Menge von 20.000 t/a anfallen, hochwertige Futtermitteladditive gewonnen werden. Dabei wird die Entsorgung eines Abfallstoffes mit der Gewinnung eines vermarktbaren Produktes kombiniert und auf ökologisch und ökonomisch vorteilhafte Weise ein Beitrag zum produktionsintegrierten Umweltschutz geleistet. Für den biotechnologischen Prozess sollte die thermophilen Mikroorganismen *Fervidobacterium pennivorans* und *Thermoanaerobacter keratinophilus* eingesetzt werden. Der thermophile Abbau bei 70°C führte zu einer Hygienisierung des Abfalls und steigenden Abbauraten. Die Raum-Zeit-Ausbeuten sollten durch ein Membranverfahren zur Zellrückhaltung und selektiven Produktabscheidung stark gesteigert werden. Nach den Laboruntersuchungen sollten Möglichkeiten erörtert werden, in Kooperation mit einem Abfallverwertungsunternehmen eine Anlage im Technikumsmaßstab zu realisieren.

## **3. Verwendete Methoden**

- Aerobe und anaerobe Kultivierungstechnik in Kolben und Fermentern
- Fermentation in 2l-Folienfermentern, 30 l und 300 l Stahlfermentern von Bioengineering im Batch und Fedbatchbetrieb, Fütterung über computergesteuerte Feedpumpen
- Analyse von Essigsäure über Gaschromatographie (Varian)
- Gravimetrische Trockengewichtsbestimmung über Celluloseacetatfilter
- DOC, Dissolved Organic Carbon (Multi N/C 3000)
- Bestimmung der proteolytischen Aktivität nach Kunitz
- Photometrische Proteinbestimmung nach Lowry
- Nachweis der proteolytischen Aktivität im SDS-Polyacrylamidgel
- Klonierung von Protease-kodierenden Sequenzen

## 4. Ergebnisse

### *Enzymbereitstellung*

#### *Screening*

Im Zuge eines Screeningprogrammes wurden thermophile, keratinabbauende Mikroorganismen angereichert. Es konnten mehrere Organismen isoliert werden, die in der Lage waren, auf nativen Federn als Kohlenstoffquelle zu wachsen. Zwei der Isolate, *Fervidobacterium pennivorans* und *Thermoanaerobacter keratinophilus*, erschienen für den Abbau von nativem Federkeratin zur Gewinnung von Peptiden und Aminosäuren besonders geeignet.

Der erste Stamm, *Fervidobacterium pennivorans*, ein zur Ordnung der Thermotogales zählendes Bakterium, welches optimal bei 70°C und pH 7,0 wächst, weist eine hohe Protease- bzw. Keratinaseaktivität auf. Der zweite Stamm, *Thermoanaerobacter keratinophilus*, ein thermophiles, anaerobes Bakterium, ist ebenfalls in der Lage Federn abzubauen. In ersten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass an der Hydrolyse des Federkeratins ein extrazelluläres, proteolytisches Enzym beteiligt ist. Dieses Enzym ist optimal aktiv bei 85°C und pH 8,0 und besitzt eine hohe Temperaturstabilität bei 70°C (Rießen und Antranikian, 2001), so dass der direkte Abbau von nativen Federn durch *T. keratinophilus* vorteilhaft erschien.

#### *Klonierung Protease codierender Gene*

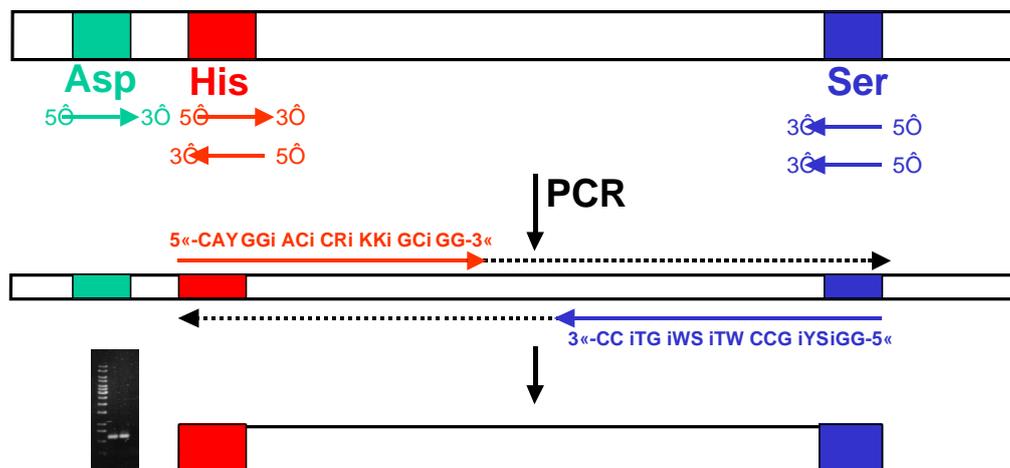
Um die Umsetzung von Keratinen zu Aminosäuren und Peptiden effektiv durchführen zu können, ist es erforderlich, rekombinante thermostabile Proteasen zu produzieren. Die Keratinase aus *Fervidobacterium pennivorans* konnte erfolgreich in *E. coli* kloniert werden, jedoch war kein aktives Enzym nachweisbar (Kooperation: Prof. W. de Vos, Kluskens et al., 2002) (siehe auch Bericht 2001). Gleichzeitig wurde versucht, die Protease-kodierende Sequenz aus *Thermoanaerobacter keratinophilus* zu ermitteln.

Auf der Suche nach Expressionssystemen, die für die aktive Expression von thermoaktiven Proteasen geeignet sind, sind wir auf eine rekombinante, thermostabile Subtilisin-ähnliche Serinprotease gestoßen. In Anlehnung an die Protease-kodierende Sequenz aus *Thermoanaerobacter yonseiensis* konnten Oligonukleotidprimer konstruiert werden, mit denen es gelungen ist, ein PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) - Produkt mit einer Länge von etwa 1200 Bp aus *T. keratinophilus* zu amplifizieren. Durch den Einsatz von degenerierten

Primern, die die Teilsequenzen der katalytischen Triade einer Serinprotease flankieren, konnte gezeigt werden, dass es sich um ein putatives Serin-Proteasogen handelt.

Die Identifizierung war dadurch möglich, dass sich die verschiedenen Proteaseklassen alle durch das Vorkommen hochkonservierter Regionen in ihrer DNA-Sequenz auszeichnen. Die Serinproteasen besitzen drei katalytisch aktive Aminosäuren, Aspartat, Histidin und Serin, die am Katalyseprozess beteiligt sind. Um diese konservierten Bereiche herum findet man auf Proteinebene identische bzw. ähnliche Aminosäuren bzw. Basenpaare auf DNA-Ebene.

Auf diesem Wege konnten fünf degenerierte Primer synthetisiert werden, die von der niederländischen Arbeitsgruppe Prof. W. de Vos an der Universität Wageningen zur Verfügung gestellt wurden. Sie entstammen den Bereichen um die drei katalytisch aktiven Aminosäuren Asp, His und Ser. Die Primer wurden in einem PCR-Screening in allen möglichen Kombinationen (z.B. sense Asp + antisense His oder sense Asp + antisense Ser) mit dem aus *Thermoanaerobacter keratinophilus* amplifiziertem PCR-Produkt eingesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Homologie zu konservierten Bereichen von Serinproteasen besteht (s. Abb. 1).



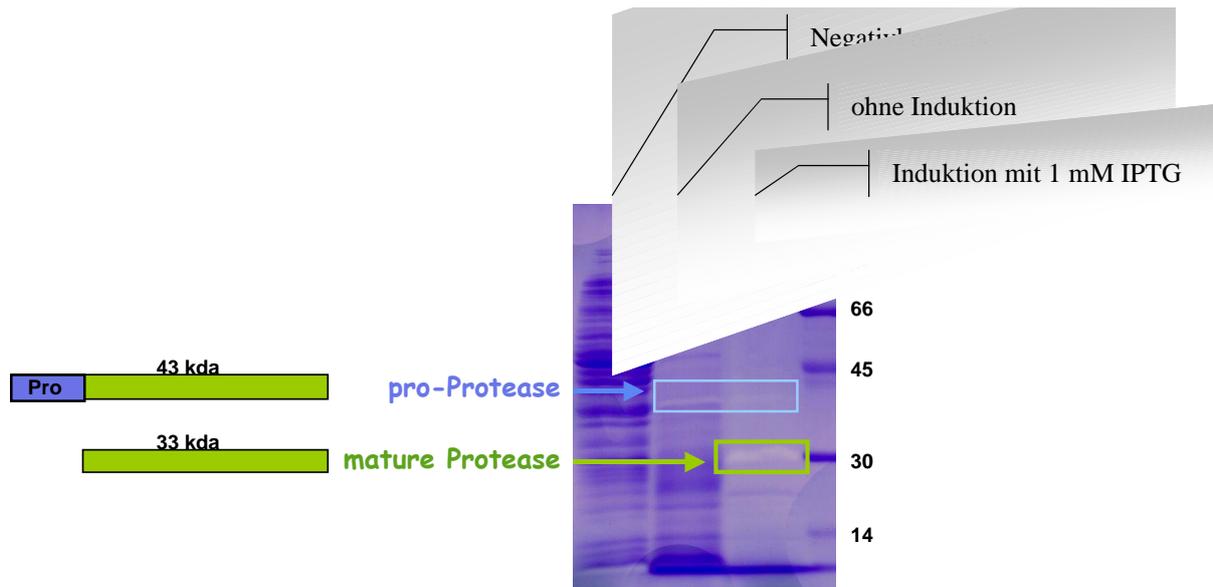
**Abb. 1:** Schematische Darstellung der degenerierten Primer angelehnt an die konservierten Sequenzen der katalytisch aktiven Zentren einer Serinprotease und das daraus resultierende PCR-Produkt.

Ausgehend von dieser Protease-kodierenden Sequenz aus *T. keratinophilus* wurde nach geeigneten Expressionssystemen gesucht. Folgende Expressionssysteme wurden ausgewählt und die Klonierung erfolgreich umgesetzt:

1. Klonierung und Expression in *E. coli* M15 unter Zuhilfenahme des pQE 30 Expressionsvektors (Qiagen).
2. Klonierung und Expression in *Bacillus megaterium* in den Vektor pMM1520 in Kooperation mit Prof. Dr. Jahn vom Institut für Mikrobiologie der TU Braunschweig.

Zu 1) Das QIA express Kit der Firma Qiagen ist ein Expressionskit, welches hohe Ausbeuten der rekombinanten heterologen Proteine mit anschließender Reinigung über ein integriertes His-tag Protein verspricht. Das Protease-kodierende Gen aus *T. keratinophilus* konnte mit spezifischen Primern amplifiziert werden und in den pCR<sup>®</sup>2.1 Vektor durch eine TA-Klonierung zwischenkloniert werden. Nach Transformation von *E. coli* Top10 wurde das Plasmid durch Anzucht des inserttragenden Transformanden vermehrt und in einer Plasmidpräparation aufgereinigt. Mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sac*I wurde es aus dem Vektor herausgeschnitten. Insert und Vektor wurden in einem Agarosegel gelelektrophoretisch voneinander getrennt und aus dem Gel aufgereinigt. Danach erfolgte die Ligation des geschnittenen Inserts in den ebenfalls mit *Bam*HI und *Sac*I restringierten pQE30-Vektor. Dieser Vektor wurde eingesetzt, da die vorangegangenen Experimente zur Klonierung Protease-kodierender Gene gezeigt hatten, dass mit diesem System eine aktive Expression möglich ist. Der inserttragende Vektor wurde als pTkProt bezeichnet.

Der *E. coli* M15 (pREP4) Stamm wurde mit pTkProt transformiert auf LB/Carbicillin/Kanamycin-Agarplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Die Transformanden wurden auf das Vorhandensein des Plasmids mit 1,2 kb großem Insert überprüft. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die Protease aus *T. keratinophilus* durch dieses System aktiv exprimiert wird (s. Abb. 2). Damit konnte erfolgreich demonstriert werden, dass es möglich ist, thermostabile Keratinasen in mesophilen Wirtsorganismen aktiv zu exprimieren.

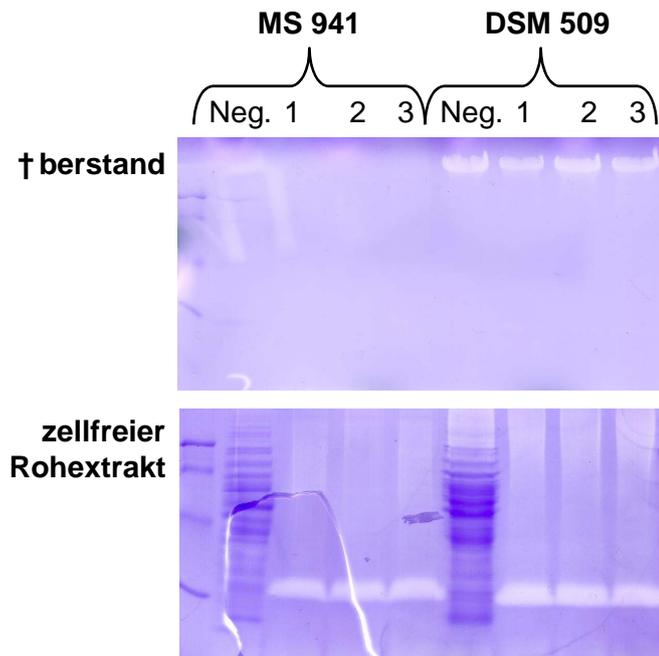


**Abb. 2:** SDS-Polyacrylamidgel [10%iges (w/v) Trenn- und 4%iges(w/v) Sammelgel] mit Proteinfractionen von *E. coli* M15 pTKProt. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel 30 min in Triton X-100, 30 min in 1% Azocasein und 30 min in Universalpuffer pH 8,0 bei 80°C inkubiert. Die Färbung erfolgte mit Comassie Brilliant Blue.

Zu 2) Die heterologe Genexpression der Protease aus *T. keratinophilus* in *Bacillus* besitzt den Vorteil der Sekretionsmöglichkeit des Enzyms aus dem mesophilen Wirt. Der bestuntersuchte Organismus sowohl auf molekularbiologischer als auch biotechnologischer Ebene ist unbestritten *B. subtilis*. Nachteilig für die Produktion von sekretorischen rekombinanten Enzymen ist das Vorkommen von sieben verschiedenen extrazellulären Proteasen in *B. subtilis* (Wittchen und Meinhardt, 1995). Wir haben uns daher für die Expression in *B. megaterium* entschieden. Für die Industrie ist *B. megaterium* besonders interessant, da er auf Abfällen aus der Fleisch- und Petroindustrie, wie Maissirup wächst. Im Vergleich zu *B. subtilis* konnte bei der Expression heterologer Proteine in *B. megaterium* eine besonders hohe Proteinausbeute nachgewiesen werden, die auf fehlende alkalische Proteaseaktivität zurückzuführen ist.

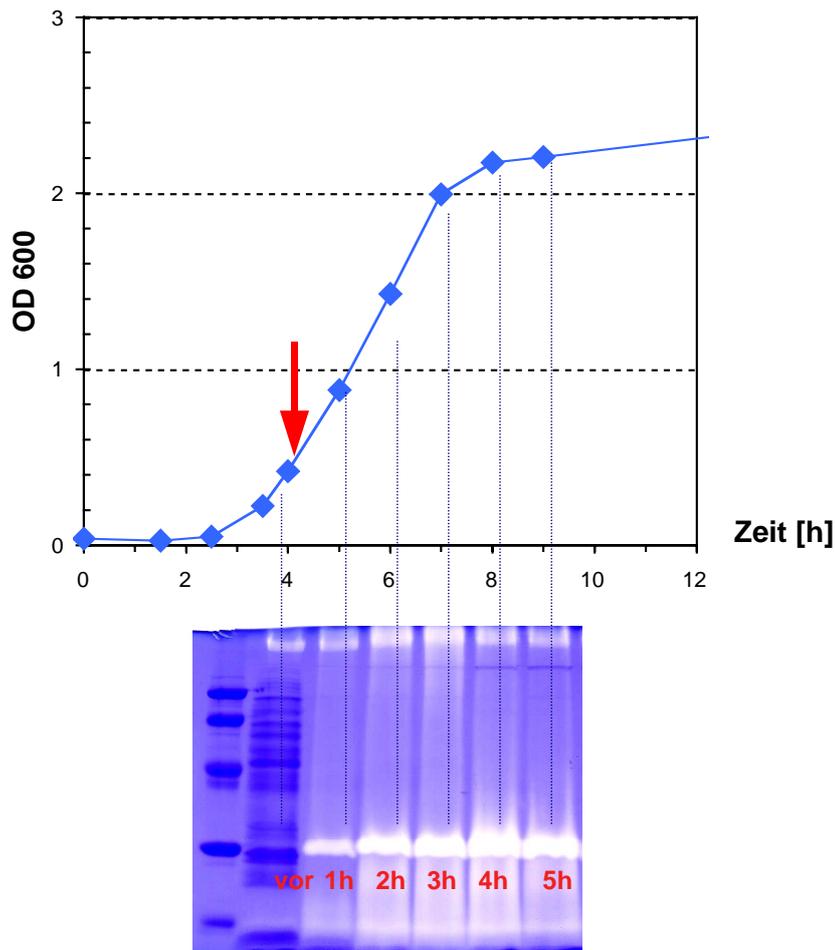
Das Protease-kodierende Gen aus *T. keratinophilus* wurde wie oben in den pCR<sup>®</sup>2.1 Vektor durch eine TA-Klonierung zwischenkloniert. Das Insert wurde mit dem Restriktionsenzym *SacI* aus dem Vektor herausgeschnitten und aufgereinigt. Danach erfolgte die Ligation des geschnittenen Inserts in den ebenfalls mit *SacI* restringierten für *B. megaterium* konstruierten Vektor pMM1520 (Prof. Dr. Jahn, Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig). Anschließend wurde ein Aliquot des Ligationsansatzes in *E. coli* Top 10 elektrotransformiert.

Die Selektion positiver Klone erfolgte auf LB/Carbicillin (50µg/ml) Platten. Die Transformanden wurden auf das Vorhandensein des Plasmids mit 1,2 kb großem Insert überprüft, indem die Plasmid DNA isoliert und mittels Restriktionsverdau die Größe der einzelnen Fragmente überprüft wurde. Es verblieben wenige inserttragender Klone, die in einer weiteren Sequenzierung untersucht wurden. Die Transformation in *B. megaterium* erfolgte am Institut für Mikrobiologie der TU Braunschweig in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jahn. Es standen zwei Stämme zur Verfügung: zum einen *Bacillus megaterium* DSM 509, ein Stamm, welcher eine extrazelluläre *Bacillus*-eigene Protease exprimiert; zum anderen *B. megaterium* MS941, in welchem die oben beschriebene *Bacillus*-eigene Protease ausgeschaltet worden ist (Wittchen und Meinhardt 1995). Die erhaltenen Transformanden wurden auf ihre Proteaseaktivitäten untersucht. Es stellte sich heraus, dass alle Transformanden eine heterologe thermoaktive Protease exprimierten. Diese lag in allen Fällen intrazellulär vor und wurde nicht sekretiert (s. Abb. 3). Da die *Bacillus*-eigene, extrazelluläre Protease im Stamm DSM 509 auch bei relativ hohen Temperaturen aktiv ist, stört sie bei der weiteren Bearbeitung der rekombinanten Protease. Der Stamm ist demnach für die Expression einer heterologen Protease nicht geeignet.



**Abb. 3:** SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese: Proteaseaktivitätsgele mit intra- und extrazellulären Extrakten der *Bacillus megaterium* Transformanten. Es wurde zum einen ein proteasedefizienter Wirtsstamm eingesetzt, *B. megaterium* MS 941, zum anderen *B. megaterium* DSM 509, der eine extrazelluläre *Bacillus*-eigene Protease enthält. Die Negativkontrollen enthielten den Vektor pMM 1520 ohne Proteasesequenz. Die drei bzw. sechs Klone enthielten den Expressionsvektor pMM 1520, der eine Protease-codierende Sequenz von 1239 Bp aus *T. keratinophilus* enthielt. Die Expression des heterologen Proteins wurde durch die Zugabe von Xylose (0,5% Endkonz.) induziert und sowohl die Überstände als auch die Zellen 5 h nach Induktion geerntet. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine im Gel wurde das SDS durch eine 30 minütige Inkubation in Triton X 100 entfernt, anschließend wurde das Gel 30 min in 1,5% Azocasein und nachfolgend in Universalpuffer pH 8,0 bei 80°C für 15 min inkubiert. Durch die nachfolgende Färbung aller Proteine mit Coomassie und anschließender Entfärbung erhält man ein blaugefärbtes Gel mit hellen Hydrolysezonen, die den Bereich aktiver Proteasen anzeigen.

Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass im Stamm *B. megaterium* MS 941, in dem die extrazelluläre neutrale Protease ausgeschaltet worden ist, bei Inkubation bei 37°C eine intrazelluläre Protease produziert wird (s. Abb. 4). Eine größere Produktion dieser *Bacillus*-eigenen intrazellulären Protease konnte durch Anzucht des Stammes bei 30°C verhindert werden. Folglich erscheint eine Anzucht bei 30 °C für die weiteren Experimente sinnvoll.



**Abb. 4:** Wachstum von *B. megaterium* MS 941 pMM1520 TkP bei 37°C auf LB/Tetracyclin (10 µg/ml). Induziert wurde nach 4 h bei einer OD von 0,3 mit Xylose (Endkonzentration 0,5%). Für die Aktivitätsbestimmung der Protease im SDS- Polyacrylamidgel wurden aus jeweils 5 ml Kulturbrühe Zellen geerntet. Die Zellen wurden in 60 µl Puffer (100 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 20 mg/ml Lysozym) bei 37°C aufgeschlossen und der zellfreie Extrakt nach entsprechender Vorbereitung aufs Gel aufgetragen und aufgetrennt und die Aktivität bestimmt (s. Abb. 3).

Aufgrund der Größe des erhaltenen heterologen Proteins von etwa 30 kDa, gehen wir davon aus, dass die Prepro-Sequenz aus *T. keratinophilus* in einem autokatalytischen Prozess in *B. megaterium* abgespalten wird und deshalb kein Transport über die Membran erfolgt. Die kalkulierte Größe der einzelnen Vorstufen der Protease aus *T. keratinophilus* sind in Tabelle 1 dargestellt.

**Tab. 1:** Errechnete Größe verschiedener Vorstufen der Protease aus *T. keratinophilus*

Protein	Aminosäuren	kalkulierte Größe
Pre-Pro-Protease	413	45 kDa
Pro-Protease	400	43 kDa
reife Protease	31	33 kDa

Da in *Bacillus* möglicherweise die Signalpeptidsequenz aus *T. keratinophilus* nicht erkannt wird, wurde versucht die Signalpeptidsequenz gegen eine Sequenz aus einem wirtsspezifischen *Bacillus* Protein auszutauschen. Dazu wurde ein neues Vektorkonstrukt basierend auf dem Vektor pMM 1520 hergestellt. Dieser Vektor sollte zum einen die in Braunschweig an der TU optimierte ribosomale Bindungsstelle enthalten als auch die Signalpeptidsequenz einer neutralen Protease (nprM) aus *B. megaterium* DSM 319 (Wittchen und Meinhardt 1995). Dazu wurde *B. megaterium* DSM 319 angezogen, die chromosomale DNA isoliert und mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion (PCR) die Signalpeptidsequenz der neutralen Protease (npr M) amplifiziert. Das PCR-Produkt enthielt die optimierte ribosomale Bindungsstelle. Die Signalpeptidsequenz aus npr M wurde flankiert von der Restriktionsschnittstellen *Sac* I. Das Fragment wurde in den Vektor pCR<sup>®</sup>2.1 durch eine TA-Klonierung zwischenkloniert und mit dem Restriktionsenzym *Sac* I aus dem Vektor ausgeschnitten und aufgereinigt. Danach erfolgte die Ligation des Fragmentes in den ebenfalls mit *Sac* I restringierten für *B. megaterium* konstruierten Vektor pMM 1520 (Prof. Jahn, Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig). Nach Transformation und Überprüfung des Vektors erhielten wir das neue Vektorkonstrukt (inkl. optimierter RBS und SP nprM), welches wir im Folgenden nur noch als pSR 1520 bezeichnen.

Es wurde versucht sowohl die Pro-Proteasesequenz (PP) als auch nur den reifen Teil der Protease aus *T. keratinophilus* in den Vektor pSR 1520 zu klonieren. Bisher ist die Herstellung des ersten Fusionsproteins SP<sub>nprM</sub>-PP gelungen.

### Verfahrensentwicklung

#### *In vivo* Abbau von Keratin mit extremthermophilen Anaerobiern: Optimierung der Fermentation mit Mikroorganismen im 2l-Maßstab

Zum Abbau von Federn wurden *F. pennivorans* und *T. keratinophilus* im 2 l-Folienfermenter auf Komplexmedium mit Federn bei 70°C kultiviert. Der Federabbaugrad wurde über die

gelöste Proteinmenge und den gelösten Kohlenstoff im Überstand (DOC) errechnet. OD-Messungen konnten wegen des Feststoffanteiles nicht durchgeführt werden. Gravimetrische Messungen der Trockensubstanz wurden ausgeschlossen, da eine repräsentative Probennahme des Feststoffes nicht möglich ist.

Im Zuge einer Mediumsoptimierung wurde eine für den Abbau zu löslichen Proteinen optimale Federkonzentration von 10 g/l ermittelt. Hochpreisige Medienbestandteile konnten bei gleicher Abbauleistung deutlich reduziert werden. Hefeextrakt wurde um 90% von 5 g/l auf 0,5 g/l verringert, Trypton ist nicht mehr notwendig. Ein Ersatz von Hefeextrakt durch andere Komplexbestandteile wie Sojamehl gelang nicht. Auf Autoklavieren und steriles Arbeiten konnte verzichtet werden, es wurden weder makro- noch mikroskopisch Kontaminationen beobachtet.

Um die mechanische Belastbarkeit der Mikroorganismen einschätzen zu können, wurden Fermentationen mit Rührerdrehzahlen im Bereich von 300-1800 rpm ausgeführt. Es ergab sich eine maximale Zellkonzentration von  $2,2 \cdot 10^8$  Zellen/ml bei 600 rpm (sonst  $5 \cdot 10^7$ - $1,2 \cdot 10^7$  Zellen/ml) und eine maximale Abbaurrate von 28% (2,8 g/l) binnen 4 Tagen bei 300 rpm (sonst 10-15% Abbau). Die Zellen müssen zur Spaltung des Keratins direkten Kontakt mit den Federn haben, welches bei höheren Drehzahlen wahrscheinlich verhindert wurde.

Federmehl konnte mit Hilfe einer Mischkultur von *F. pennivorans* und *T. keratinophilus* mit einer Abbaurrate von 15% abgebaut werden. Die Zellen wuchsen lediglich bis zu einer Zelldichte von  $3,5 \cdot 10^7$  Zellen/ml. Federmehl besteht nicht nur aus gemahlenden Federn, sondern enthält alle bei der Prozessierung der Hühner anfallenden Schlachtabfälle. Es besteht zwar zum großen Teil aus Federn, doch könnten sich auch zahlreiche Stoffe, die das Wachstum oder die Enzymaktivität inhibieren, darin befinden.

Für einen 80%igen Abbau mit aktiven Zellen (=nicht mehr lebendige Zellen mit aktiven Enzymsystemen) wurden 4 g Feuchtmasse für 1 g Federmehl benötigt.

Der Federabbau durch *T. keratinophilus* ähnelt dem von *F. pennivorans* bei gleicher Anfangsfederkonzentration von 10 g/l Federn. Allein durch die Zugabe von Vitaminen in Konzentrationen von  $1 \mu\text{g/l}$  konnte der Abbau auf 56% verdoppelt werden.

Für den Einsatz einer Mischkultur der beiden anaeroben, thermophilen Mikroorganismen *Fervidobacterium pennivorans* und *Thermoanaerobacter keratinophilus* wurde ein optimiertes Medium entwickelt. Die Mischkultur, noch ohne Vitamine, steigert die Abbaurrate im Vergleich zu den Reinkulturen von etwa 30% auf etwa 40%. Pro Tag wurden durch die Organismen etwa  $1 \text{g/l} \cdot \text{d}$  gelöstes Protein freigesetzt.

*In vitro* Abbau von Keratin durch direkten Einsatz von Enzymen: eigene Proteasen im Vergleich zu kommerziell erhältliche Proteasen

Zum Abbau eingesetzt wurden die Proteasen der im Projekt verwendeten thermophilen Bakterien *Fervidobacterium pennivorans* und *Thermoanaerobacter keratinophilus* sowie ausgewählte kommerziell vertriebene Proteasen der Firmen Novozymes und TFL mit angegebenen Temperaturstabilitäten von 40-80°C. Die Halbwertszeiten von vier untersuchten Enzymen belaufen sich bei der gewünschten Zieltemperatur von 70°C für einen thermophilen Abbau von Hühnerfedern auf 0,2h für die Enzyme Savinase und Alkalase (beide von Novozymes) und auf 5h für die Protease von TFL. Die Protease von *T. keratinophilus* hingegen weist mit 54h Halbwertzeit eine mehr als 10fach höhere Temperaturstabilität auf und ist damit ideal für die Zielsetzung des umweltschonenden Federabbaus bei höheren Temperaturen geeignet. Zwar sind bei tieferen Temperaturen von beispielsweise 40°C eine Reihe anderer Proteasen ebenfalls fähig, Federn zu hydrolysieren, doch kontaminierten die Versuchsansätze bei diesen niedrigen Temperaturen. Somit wäre eine vorherige Sterilisierung nötig, was für eine Abfallentsorgung als zu aufwändig erachtet wurde.

Die Protease von *F. pennivorans* wurde nicht weiter für Abbauprobieren *in vitro* verfolgt, da sie membrangebunden vorliegt und die Produktion somit proportional der gebildeten Biomasse ist.

Hinsichtlich des verfahrenstechnischen Abbauprozesses waren möglichst einfache Operationen und wenig Zuschlagstoffe wichtig. Getestet wurde zunächst die Abbaueffizienz der kommerziell erhältlichen Protease mit der höchsten Temperaturstabilität. Nach Untersuchung verschiedener Abbaubedingungen folgte der Vergleich mit der Protease aus *T. keratinophilus*.

Ausgehend von einer Federkonzentration von 25 g/l wurden in einer wässrigen, ungepufferten Enzymlösung (Protease von TFL) binnen 24h 16% in Lösung gebracht. Die Zugabe des Reduktionsmittels Natriumsulfit bewirkte eine Steigerung auf 25%. Durch den Einsatz von 50 mM Phosphatpuffer (pH 8) steigerte sich der Abbau auf 80% (25 g/l Federn, Protease von TFL). Wurde die Menge der Federn auf 100 g/l vervierfacht, blieb die absolut in Lösung gebrachte Menge identisch bei 20 g/l.

Zum Vergleich: Mit der thermostabilen Protease aus *T. keratinophilus* konnte ein Umsatz von 55% (Federkonzentration 25g/l) bzw. von 37 g/l (Federkonzentration 100 g/l) nachgewiesen werden.

Für ein mögliches Scale-up würde sich ein beheizter Rührkessel mit großer Einfüllöffnung



anbieten, da die nass angelieferten Federn nicht pumpfähig sind. Da Verzögerungen durch Versuche mit dem inaktiven Enzym aus *F. pennivorans* aufgetreten sind, konnten noch keine Scale-up Versuche mit der thermostabilen Protease aus *T. keratinophilus* durchgeführt werden.

### *Produktion nativer und rekombinanter thermostabiler Proteasen*

#### *Enzymproduktion mit T. keratinophilus*

Da der *in vivo* Abbau hinsichtlich eines technischen Verfahrens zu niedrig ist, wurde die Variante eines Zwei-Stufen-Prozesses gewählt, bei der zunächst das Enzym durch den Wildstamm *Thermoanaerobacter keratinophilus* produziert und im zweiten Schritt der Abbauprozess mit Hilfe der so produzierten Protease durchgeführt wird. In späteren Versuchen wurde für die Protease-Produktion der rekombinante Stamm *Escherichia coli pTK* herangezogen.

Ausgehend vom Medium, welches zur Isolierung des extremthermophilen Anaerobiers eingesetzt worden war, wurden Variationen zur Steigerung der Enzymausbeute zunächst im Vial dann im Fermenter durchgeführt. Im Vial wurde der Einfluss von verschiedenen Reduktionsmitteln (Natriumsulfit, Natriumthiosulfat) sowie weiterer Zusätze, beispielsweise von Magnesium, Calcium und Ammonium untersucht. Weiterhin erfolgten Versuche zur Substitution des Hefeextraktes als hauptsächliche C-Quelle. Eingesetzt wurden Federn, gemahlene Federn (als Substrat mit größerer Oberfläche und damit schnellerer Verstoffwechselbarkeit) bzw. Magermilchpulver oder Hornmehl als alternative Proteinquellen. Dabei hat sich gezeigt, dass in keinem Fall eine Steigerung der Enzymausbeute beobachtet werden konnte. Allerdings war eine 10%ige Ausbeutesteigerung durch den Einsatz des Reduktionsmittels Natriumthiosulfat (3 g/l) zu verzeichnen.

Erfolg versprechende Kultivierungsergebnisse im Vial wurden vergleichend im Fermenter untersucht. Allerdings zeigte sich hier eine niedrigere Enzymproduktivität als im Vial (Vial: 600-900 U/l, Fermenter: 130-150 U/l). Grund hierfür könnten inhibierende Metabolite sein. Versuche, die Inhibitoren bei 4°C durch eine Begasung mit Luft oder Stickstoff auszustrippen, führten nicht zu dem gewünschten Ergebnis. Es zeigte sich weiterhin nahezu keine Aktivität im Überstand der Fermentation. Um flüchtige Inhibitoren auszustrippen wurde unter Standardbedingungen (i) ohne, (ii) mit ständiger und (iii) mit getakteter Begasung fermentiert. Einzig ohne Begasung war Enzymaktivität nachweisbar. Eine Stickstoffbegasung

erfolgte daher nur noch in der Lag-Phase nicht aber in der exponentiellen Wachstumsphase. Unter diesen Bedingungen konnten Enzymaktivitäten von etwa 130 U/l erreicht werden.

*Proteaseproduktion mit rekombinanten E. coli*

Für die folgenden Versuche wurde ein rekombinanter *E. coli*-Stamm verwendet der von *E. coli* M15 abgeleitet war. Die Expression der aktiven, intrazellulären Protease ist IPTG-induzierbar. Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass der rekombinante Stamm eine aktive Protease bildet, die bei 70°C Keratin abbaut, wurden Untersuchungen zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen durchgeführt.

Hierbei wurden folgende Schwerpunkte bearbeitet:

- Feedstrategie für einen Fedbatch
- Wachstumsgeschwindigkeit
- Induktionszeitpunkt
- Induktormenge
- Temperaturführung nach Induktion

Für die beiden ersten Optimierungsschritte, mit denen eine Erhöhung der Zelldichte erreicht werden sollte, kam die in Abb. 5 dargestellte Anlage zum Einsatz.

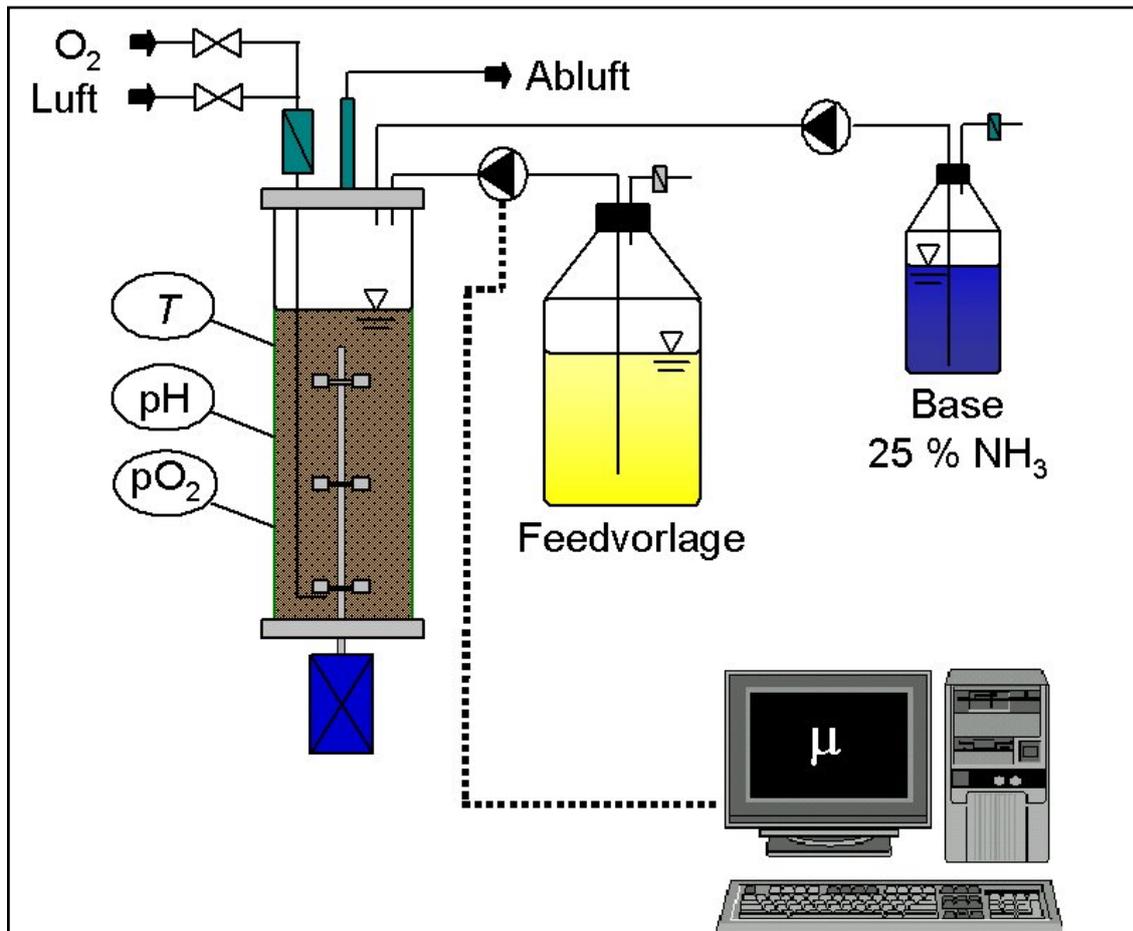
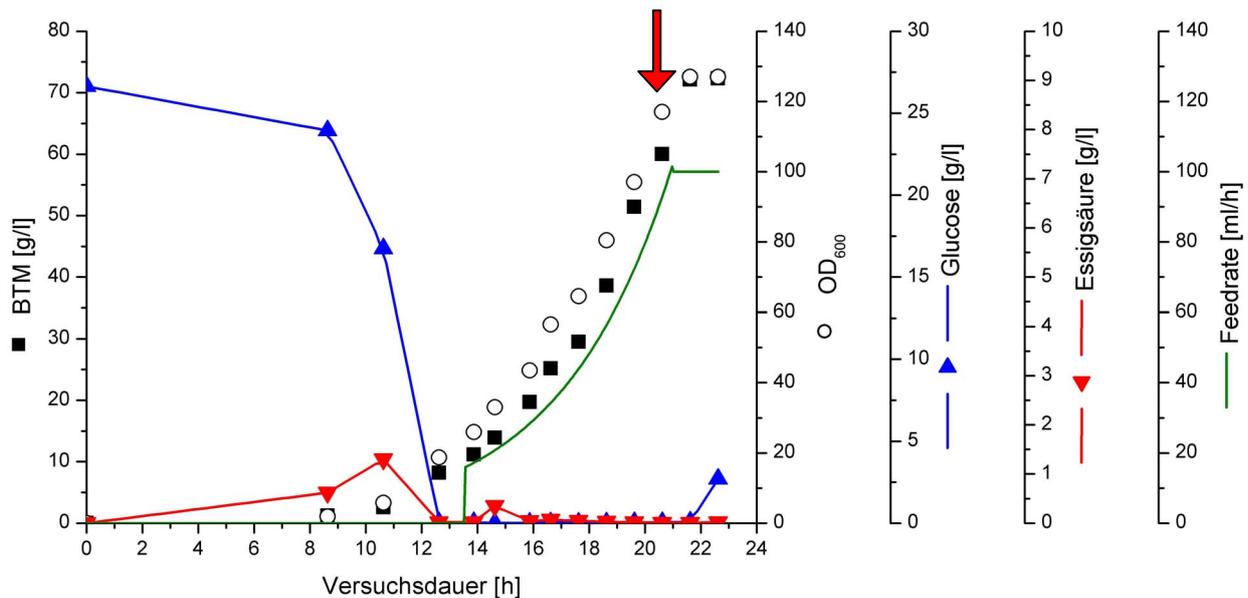


Abb. 5: 2-Liter-Folienfermenter Bioengineering, Schweiz, Arbeitsvolumen 1,5 l, Steuerung der Feedpumpe und Datenaufnahme mit Field-Controller und Software Phoenix-Contact, USA. Temperatur / pH-Wert geregelt, pO<sub>2</sub> manuell über Rührerdrehzahl bzw. Zuluft-Gemisch.

Für die experimentelle Erarbeitung der optimalen Induktionsparameter wurden folgende Prozessparameter als Standard definiert:

Als Kulturmedium wurde ein von Horn (1996) veröffentlichtes Medium ausgewählt. Die Fermentationen wurden als Fedbatch mit exponentiell gesteuerter Fütterung durchgeführt. Als Wachstumsrate wurde ein  $\mu$  von 0,25 vorgegeben. Die Fermentationstemperatur wurde konstant auf 37°C und der pH-Wert auf 7 geregelt. Mit diesen Fermentationsbedingungen konnte eine Zelldichte von bis zu 93 g/l Zelltrockenmasse ca. 10 Stunden nach Beginn der Fedbatch-Phase erreicht werden. Ausgehend von diesem Standard-Versuch wurden einzelne Fermentations- bzw. Induktionsparameter variiert. Als Startwert wurde bei einer OD<sub>600</sub> von 55 mit 1 mmol/l IPTG induziert. Die Temperatur wurde bei konstant 37°C gehalten. Die maximale volumetrische Enzymaktivität betrug 868 U/l, was bei einer Zelltrockenmasse von 28,6 g/l eine Produktivität von 30 U/g l entspricht. Die Verlagerung des Induktionszeitpunktes auf eine OD<sub>600</sub> von 112 erbrachte eine Steigerung der volumetrischen Enzymaktivität von 868

U/l auf 2251 U/l, siehe Abb. 6. Die Produktivität war mit 31,4 U/l g gleich. Die schrittweise Reduktion der Induktorkonzentration von 1 mmol/l auf 0,25 mmol/l steigerte die volumetrische Enzymbausbeute von 2251 U/l auf 3513 U/l und die Produktivität der Zellen von 31,4 U/l g auf 67 U/l g. Die sprunghafte Absenkung der Fermentationstemperatur nach der Induktion führte zu einer Produktivität von 80 U/g l. Unter diesen Bedingungen wurde die maximale volumetrische Enzymaktivität von 4160 U/l erreicht.

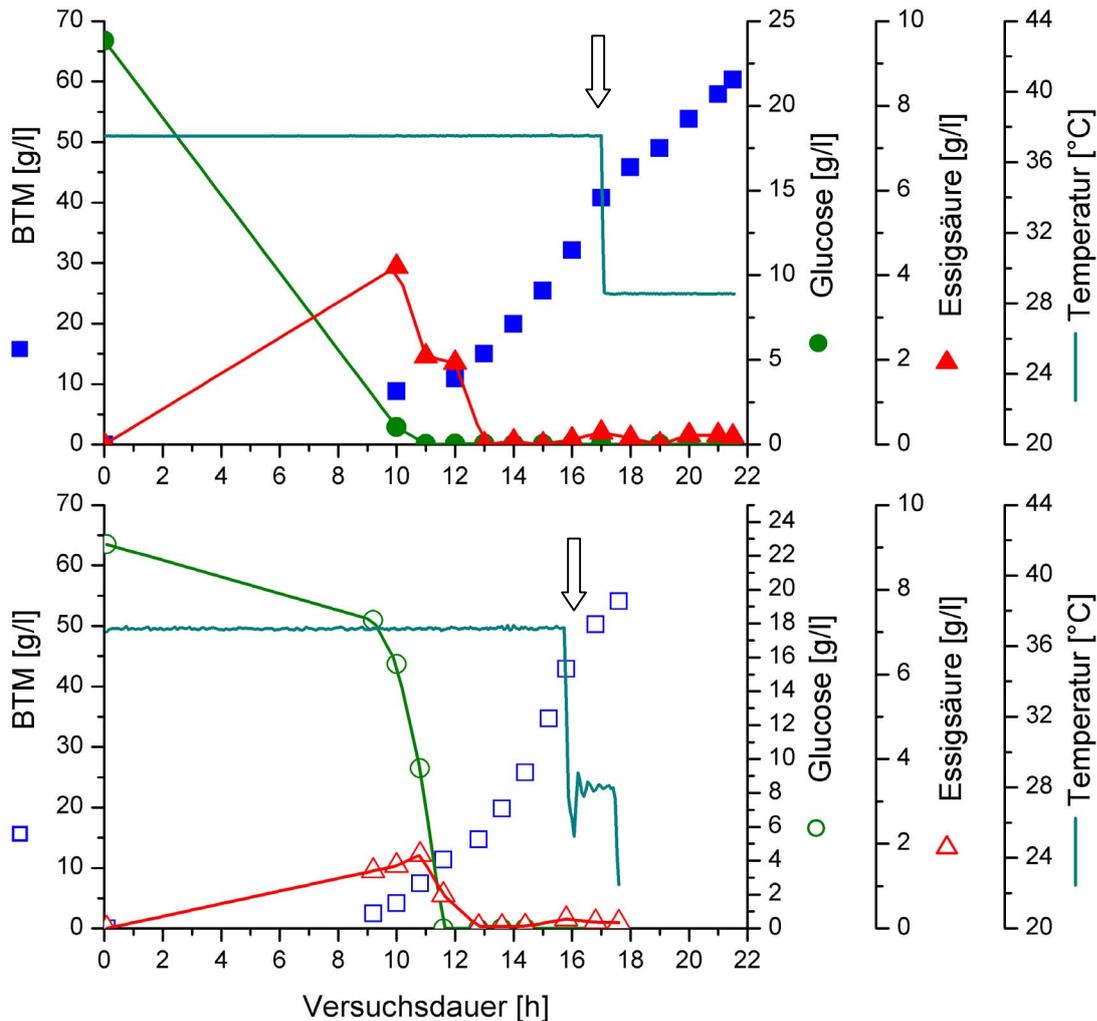


**Abb. 6:** Fedbatch-Fermentation von *E. coli* pTK mit Induktion später exponentieller Phase. Induktion (Pfeil) mit 1mmol/l IPTG bei OD<sub>600</sub>=112. Medium nach Horn. T = 37°C. Es konnten 2251 U/l erzielt werden. 2-Liter-Folienfermenter Bioengineering, Schweiz, Arbeitsvolumen 1,5 l, Steuerung der Feedpumpe und Datenaufnahme mit Field-Controller und Software Phoenix-Contact, USA. Temperatur / pH-Wert geregelt, pO<sub>2</sub> manuell über Rührerdrehzahl bzw. Zuluft-Gemisch

Ein Scale-up auf einen 20-Liter-Maßstab wurde erfolgreich durchgeführt und lag mit einer Enzymaktivität von 4080 U/l bei der im 2-Liter-Maßstab erreichten Aktivität. Es ist damit gelungen, ausreichend rekombinantes Enzym für Abbauersuche herzustellen.

Bei der Fermentation des Wildstammes lag die Protease extrazellulär vor. Im 2-Liter-Maßstab konnte eine volumetrische Enzymaktivität von bis zu 150 U/l erreicht werden. Durch Einsatz des rekombinanten Stammes hingegen konnte die Ausbeute des Wildstammes bei Kultivierung im Fermenter mit 4160 U/l um 2700% gesteigert werden und ist Scale-up fähig (siehe Abb. 7). Somit ist die Herstellung ausreichender Mengen an Proteasen für Abbauersuche im technischen Maßstab möglich.





**Abb. 7:** Fermentation von *E. coli* pTK im 2-Liter-Maßstab (oben) und 30-Liter-Maßstab (unten). Induktion mit 0,25 mmol/l IPTG. Sprunghafte Temperaturabsenkung nach Induktion von 37°C auf 28 °C. Im 2-Liter-Reaktor wurden 2,5 h nach Induktion 4160 U/l erreicht, im 30-Liter-Reaktor 2 h nach Induktion 4086 U/l, danach wurde abgeerntet.

### Ergebnisse Beratung und Marktpotential

Zur Ermittlung des Marktpotentials wurden sowohl die derzeitige Entsorgungssituation der Abfallfedern in Deutschland als auch die Möglichkeiten zur Weiterverwendung der Produkte des neuen Verfahrens untersucht. Hierzu wurden Recherchen bei Behörden (Ministerien, Bundesämter, Statistikbehörden etc.), bei den entsprechenden Verbänden, bei den Erzeugern selbst (Geflügelschlachtereien) und bei der weiterverarbeitenden Industrie (Entsorgungsbetriebe, Futtermittelindustrie) durchgeführt.

Demnach werden in Deutschland bei einer Geflügelgesamtproduktion von ca. 800.000

Tonnen pro Jahr etwa 9.000 Tonnen Federmehl (1999: 8.800 t) produziert. Zusammen mit den Schlachtabfällen, die auf andere Art und Weise entsorgt werden, z.B. direkt über Tierkörperbeseitigungsanlagen oder Federmehlhersteller in den Niederlanden, fallen in Deutschland erhebliche Menge an Federn (rund 20.000 Tonnen im Jahr) zur Entsorgung bzw. Verwertung an. Dies stellt ein erhebliches Potenzial für neue umweltfreundliche Verwertungsmethoden in diesem Bereich dar. Innovative Entsorgungsmöglichkeiten stoßen dabei auch auf Interesse bei den „Produzenten“ der Abfallfedern, den Geflügelschlachtereien. Für sie stehen die Entsorgungskosten im Vordergrund, die sich auf bis zu 200,- EURO pro Tonne Federn belaufen.

Um für die anwendungstechnische Beratung Erfahrung mit dem Handling von Federn in größeren Mengen zu bekommen, wurde in der Biogasanlage Fürstenwalde versuchsweise Federmaterial zur Verwertung angenommen. Dabei stellte sich v. a. der Eintrag des Materials auf Grund seiner Eigenschaften als nicht ganz einfach dar. Hierfür sollten bei der späteren Umsetzung der Versuche im Technikumsmaßstab Lösungen gefunden werden.

Es konnten Geflügelschlachtereien als Projektpartner gewonnen werden, die auch die Belieferung der TU Hamburg-Harburg mit Federn für die Versuchsdurchführungen gewährleisteten.

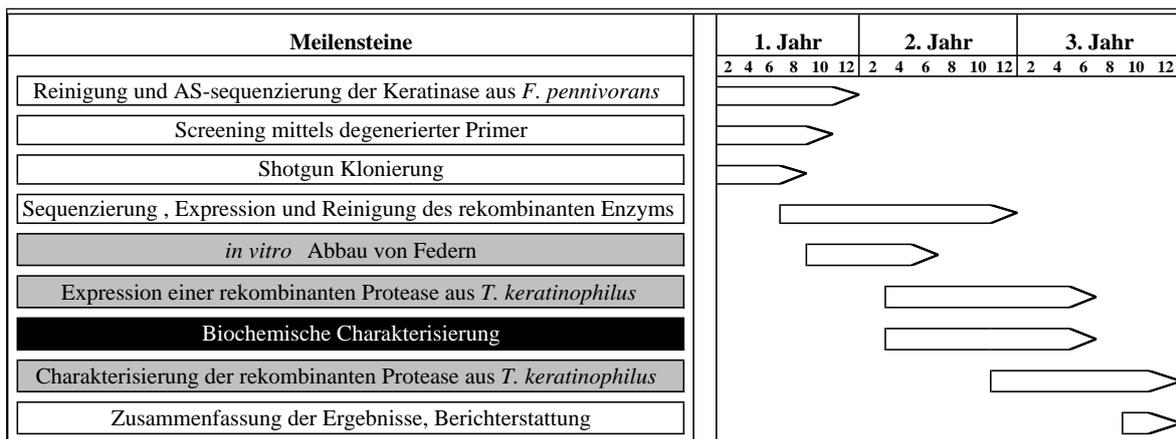
Mit den nun vorliegenden Ergebnissen der Laborversuche zum Federabbau mit direktem Einsatz von Enzymen ist es derzeit möglich, einen Abbaugrad von 37% zu erreichen. Um eine Anlage zur biotechnologischen Federverwertung aufzubauen und mit wirtschaftlichem Erfolg zu betreiben, wäre nach den jetzigen Berechnungen ein Abbaugrad von 90% anzustreben.

Ein *in vitro* Abbau lässt mit kommerziell erhältlichen Enzymen dabei nach ersten Schätzungen alleine Kosten in Höhe von mehr als 100 Euro für Enzym- und Chemikalieneinsatz je Tonnen verarbeiteter Federn erwarten. Daraus folgert, dass ein Produkt erzeugt werden muss, welches ein hohes Ertragspotenzial aufweist und beispielsweise in der Futtermittelindustrie Anwendung findet. Hier bietet sich angesichts der aktuellen Diskussion um die EU- „Hygienevorschriften für nicht zum menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte“ vorwiegend der Einsatz als Zuschlagstoff für die Herstellung von Kleintierfutter an.

### 5. Soll/Ist-Vergleich

**Enzymbereitstellung:** Der Projektplan sah vor, die ersten rekombinanten Enzyme nach einem Jahr zur Verfügung zu stellen. Dadurch dass die aktive Expression der Keratinase aus *F. pennivorans* in verschiedenen Expressionssystemen und Wirten nicht gelang, mussten die Arbeitspakete der Expression und Reinigung einer rekombinanten Protease sowie die biochemische Charakterisierung nach hinten verlegt und überarbeitet werden. Dementsprechend sind die Arbeitspakete, die die Klonierung betreffen, auf das zweite Jahr ausgedehnt worden und haben einen Hauptteil der Arbeiten im zweiten Jahr ausgemacht. In dieser Zeit lag der Fokus auf der Klonierung der Protease-kodierenden Sequenz aus *T. keratinophilus*, die zum Ende des zweiten Jahres sowohl in *E. coli* als auch in *B. megaterium* erfolgreich umgesetzt werden konnte. Die Protease wurde daraufhin für die weitere Verfahrensentwicklung zur Verfügung gestellt. Im dritten Jahr konnte die Optimierung der Expression und die biochemische Charakterisierung des rekombinanten Enzyms wie geplant vorgenommen werden.

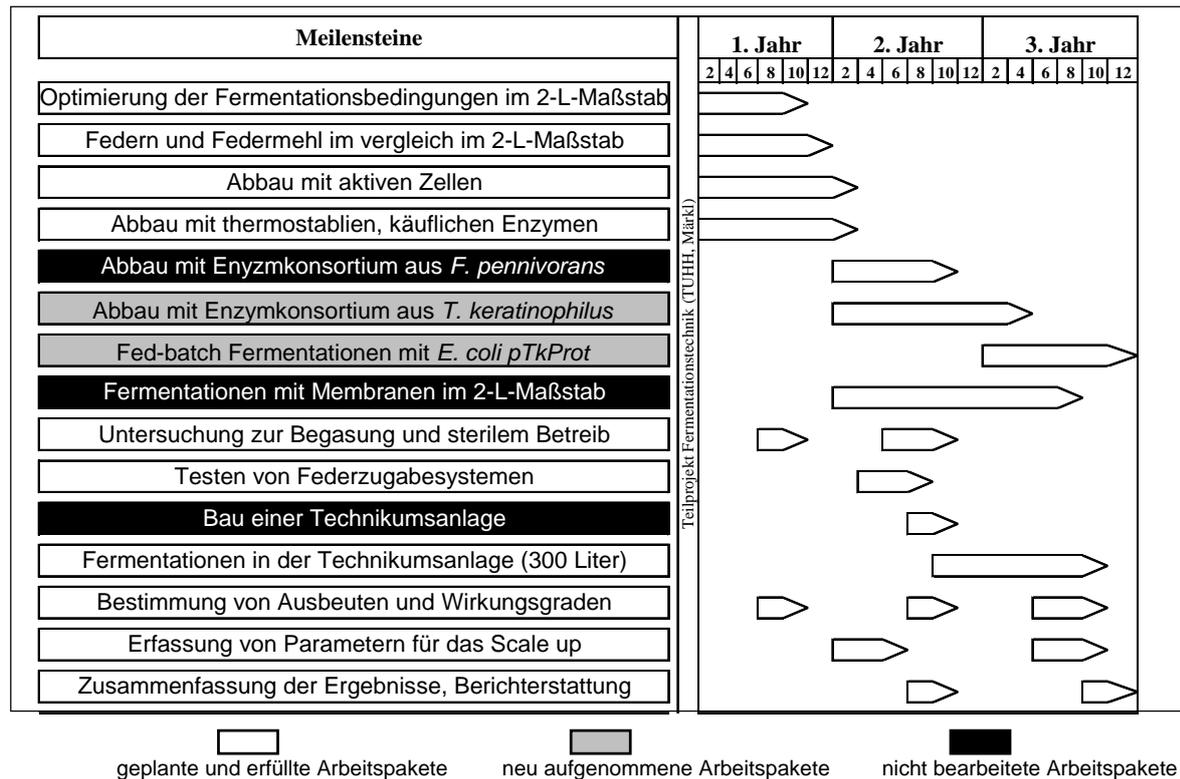
Auf Grund der Verzögerung bei der Klonierung der Protease mussten die Meilensteine angepasst werden. Trotzdem ist es gelungen, nach erfolgreicher Klonierung der Protease aus *T. keratinophilus* in *E. coli* und *B. megaterium* die Arbeiten zur Expression und biochemischen Charakterisierung im letzten Jahr abzuschließen.



geplante und erfüllte Arbeitspakete
  neu aufgenommene Arbeitspakete
  nicht bearbeitete Arbeitspakete

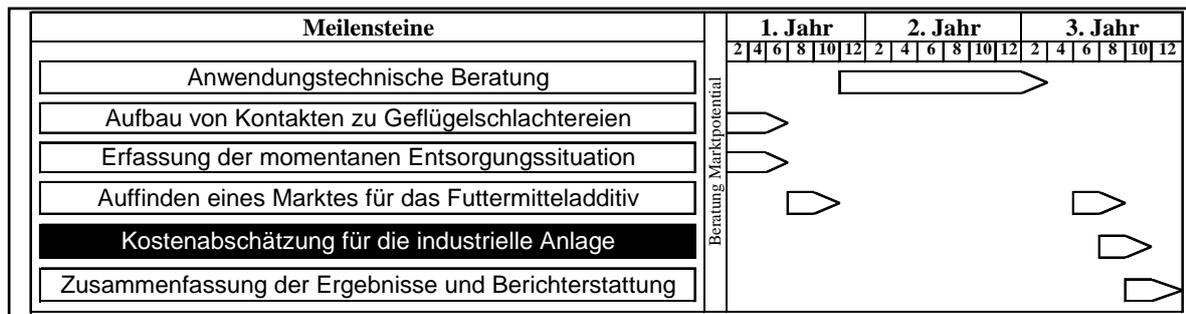


**Verfahrensentwicklung:** Auf die Fermentation mit Membranen wurde verzichtet, weil die Rentabilität eines *in vivo*-Abbaus nicht gegeben war. Der Bau einer Technikumsanlage setzt einen Abbaugrad der Federn von 90% voraus und wurde daher noch nicht umgesetzt. Die weiteren Arbeitspakete konnten im Rahmen eines modifizierten Zeitplanes erfolgreich bearbeitet werden.



**Beratung und Marktpotential:** Da die Kostenschätzung für eine industrielle Anlage erst erfolgen kann, wenn Abbaugrade von 90% erreicht werden, wurde dieses Arbeitspaket nach hinten verlegt (siehe Abb. auf der folgenden Seite).





## 6. Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen

Die im Rahmen der Wirtschaftlichkeitsanalyse ermittelten Daten lassen den Schluss zu, dass ein technisches Verfahren bei einer Feder-Abbauleistung von mindestens 90% rentabel ist. Solche *in vivo* bzw. *in vitro* Abbauraten werden zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht erreicht. Eine zwischenzeitlich angedachte alternative Einsatzmöglichkeit der hydrolysierten Federabfälle als Tierfutternahrung oder Zusatzstoff zur Tierfutternahrung ist durch die BSE Problematik und neue Gesetzesvorlagen ebenfalls problematisch.

## 7. Diskussion

### Enzymbereitstellung

Die Herstellung größerer Mengen des nativen Enzyms aus den Wildstämmen *F. pennivorans* und *T. keratinophilus* ist aus wirtschaftlichen Gesichtspunkten nicht sinnvoll. Ähnlich wie in der Industrie sollte daher die Klonierung der Protease-kodierenden Sequenzen in einem für thermostabile Proteasen kompatiblen System erfolgen. Obwohl die Klonierung der Protease-kodierenden Sequenz aus *F. pennivorans* gelang, konnte kein aktives Enzym exprimiert werden. Eine mögliche Schwierigkeit, die bei der Klonierung von Proteasen auftreten kann, ist die Bildung eines für den Wirt toxischen Genproduktes. Dies ist in unserem Fall jedoch unwahrscheinlich, da die Proteasen ein Temperaturoptimum von über 80°C aufweisen und bei 37°C (Wachstumstemperatur mesophiler Mikroorganismen) kaum Aktivität aufweisen. Des Weiteren könnte eine unkorrekte oder fehlende Faltung des rekombinanten Proteins im mesophilen Wirt die Freilegung der katalytischen Zentren und damit die Aktivierung des Enzyms verhindern. Die Klonierung der Protease-kodierenden Sequenz aus *T. keratinophilus* in andere Expressionssysteme führte jedoch zur erfolgreichen aktiven Expression sowohl in *E. coli* als auch in *B. megaterium*.



Besonders viel versprechend war die Klonierung der Protease-kodierenden Sequenz aus *T. keratinophilus* in den Gram positiven Wirtsorganismus *B. megaterium*. Hier konnte eine intrazelluläre Produktion der rekombinanten Keratinase nachgewiesen werden.

Auf Grund der Größe des rekombinanten Proteins von etwa 30 kDa kann angenommen werden, dass es in der Zelle prozessiert wird. Die Signalpeptid- und Prosequenz, die bei der Faltung des Enzyms eine Rolle spielt, scheint abgespalten zu werden. Somit kann der Transport über die Membran nicht mehr erfolgen. Es findet keine Sekretion statt. Um die Ausschleusung zu gewährleisten, wurde daher ein Fusionsprotein hergestellt, welches ein wirtsspezifisches Signalpeptid (Signalpeptid npr M neutrale Protease aus *B. megaterium* DSM 319) enthält. Der Austausch gegen das wirtsspezifische Signalpeptid soll bewirken, dass das rekombinante Protein in *B. megaterium* als sekretorisches Protein erkannt wird und ein Transport über die Membran erfolgen kann.

#### *Verfahrensentwicklung*

Wie die Versuche ergeben haben, zeigt der Einsatz lebender Kulturen deutliche Vorteile gegenüber dem Federabbau durch Zellmasse, welche separat auf anderen Proteinsubstraten produziert wurde. Beim *in vivo* Abbau mit *F. pennivorans* und *T. keratinophilus* konnten 10 g/l Federn abgebaut werden. Neue Möglichkeiten eröffneten sich durch die Kombination zweier anaerober thermophiler Keratinabbauer in Mischkultur. Die Versuche steigerten zwar den Abbaugrad, doch konnten weder technisch relevante Federkonzentrationen von 100-300 g/l Trockengewicht noch schnellere Abbauraten von <3 Tagen erreicht werden. Aus wirtschaftlicher Sicht ist die *in vivo*-Verarbeitung daher noch optimierungsbedürftig.

Der *in vitro*-Abbau mit Enzymen verläuft innerhalb eines Tages und damit - verglichen mit lebenden Organismen - deutlich schneller. Die eingesetzten Federmengen liegen mit 100 g/l 10 Mal höher als beim bakteriellen Abbau und lassen sich eventuell sogar noch steigern. Allerdings muss die Federabbaurate noch auf mindestens 90% gesteigert werden. Mit der kommerziell erhältlichen Protease von TFL lag der Abbau bei 20% und damit niedriger als bei der Protease aus *T. keratinophilus* (37%).

Die Produktion der thermostabilen Protease wurde zunächst mit dem Wildstamm *T. keratinophilus* untersucht. Die Modifikation der Kultivierungsbedingungen führte nicht zu einer signifikanten Steigerung der Enzymausbeuten. Beim Scale-up im Fermenter war eine Erhöhung der Enzymausbeute nicht zu beobachten. Ein weiterer Lösungsansatz bestand im Einsatz eines rekombinanten Produktionsstammes. Eingesetzt wurde hierbei der Stamm E.

*coli pTK*. Die Beobachtung, dass das Wachstum dieses Stammes nach der Induktion stagnierte, legt die Vermutung nahe, dass die intrazellulär gebildete Protease eine toxische Wirkung auf den Wirtsorganismus ausübt, zumal bei 37°C noch ca. 30% der maximalen Protease-Aktivität messbar waren. Diese Ergebnisse sind Ausgangspunkt für eine weitere Ausbeutesteigerung durch Optimierung der einzelnen Prozessparameter. Um die Protease im großen Maßstab wirtschaftlich produzieren zu können, ist die Verbesserung des Produktionsstammes ein viel versprechender Ansatzpunkt. Durch gezielte Modifikationen könnte die Neigung zur Acetatproduktion, die Produktivität sowie die Art der Expression (intrazellulär bzw. extrazellulär) positiv beeinflusst werden (Friebs, 1999; Baneyx, 1999). Eine Sekretion der Protease in das Medium würde zusätzlich die Aufarbeitungskosten deutlich reduzieren.

Um die Raum-Zeit-Ausbeute zu steigern, ist eine geregelte Prozessführung notwendig, wie sie bereits an der TU Hamburg-Harburg etabliert wurde. Erste Versuche zu Entwicklung einer Probingstrategie zeigten, dass mit dieser Methode eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit ohne störende Essigsäureproduktion realisiert werden konnte. Bei einer Produktionsphase von ca. 2 bis 3 Stunden ist die Verkürzung der Fedbatch-Phase (bisher ca. 8 Stunden) ein sinnvoller Ansatzpunkt für weitere Bemühungen. Durch die sinnvolle Anwendung von Regelungsstrategien lässt sich auch die Batch-Phase reduzieren, welche bisher bis zu 10 Stunden dauerte (Lee et al., 1999).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Herstellung thermostabiler Proteasen aus extremophilen Wirtsstämmen in rekombinanten *E. coli* möglich ist. Die Ausbeute konnte mit relativ wenigen Optimierungsschritten um über 2700% gesteigert werden. Es ist zu erwarten, dass die Ausbeute durch die oben genannten Maßnahmen noch weiter gesteigert werden kann.

## 8. Kooperation innerhalb des Projektes

Innerhalb des Teilprojektes standen die Kooperationspartner in ständigem Austausch. Der Kontakt wurde über Telefonate, e-Mails und interne Treffen intensiv gepflegt. Mit den Arbeitsgruppen von W. DeVos (Wageningen) und D. Jahn (TU Braunschweig) wurde im Rahmen molekularbiologischer Fragestellungen erfolgreich kooperiert. Innerhalb des Verbundes bestand eine enge Zusammenarbeit mit dem Evaluationsprojekt von Prof. Heinzle (AZ 13040/02). Diese Zusammenarbeit führte zu einer detaillierten Analyse der wirtschaftlichen und ökologischen Aspekte des bearbeiteten Vorhabens.



## 9. Literatur und Präsentationen

Kluskens, L.D., Voorhorst, W.G.B., Siezen, R.F., Schwertfeger, R.M., Antranikian, G., van de Oost, J., de Vos, W.M. (2001) Molecular characterization of fervidolysin, a subtilisin-like serine protease from the thermophilic bacterium *Fervidobacterium pennivorans*. Poster presentation on the Third International Kongress on Extremophiles.

Riessen, S., Antranikian, G. (2001) Isolation of *Thermoanaerobacter keratinophilus* sp. nov., a novel thermophilic anaerobic bacterium with keratinolytic activity. *Extremophiles* 5:399-408

Brodersen, J.; C. Goedde; C. Fuchs; S. Riessen; G. Antranikian and H. Märkl (2001): Biotechnologische Verwertung von Abfallfedern mit Hilfe extremophiler Mikroorganismen. Sonderband Biokatalyse der DBU

Kluskens, L.D., Voorhorst, W.G.B., Siezen, R.F., Schwertfeger, R.M., Antranikian, G., van de Oost, J., de Vos, W.M. (2002) Molecular characterization of fervidolysin, a subtilisin-like serine protease from the thermophilic bacterium *Fervidobacterium pennivorans*. *Extremophiles* 6:185-194

Brodersen, J., Rießen, S., Antranikian, G., Märkl, H. (2002): From isolation to application: degradation of  $\beta$ -keratin by a novel extremothermophilic bacterium, *Thermoanaerobacter keratinophilus*. Posterpräsentation, *Extremophiles* 2002

Brodersen, J., Rießen, S., Antranikian, G., Märkl, H. (2002): Degradation of  $\beta$ -keratine by extremophilic bacteria. Posterpräsentation, *Biocat* 2002

Brodersen, J., Rießen, S., Antranikian, G., Märkl, H. (2003): Umweltfreundliche Aufbereitung von Hühnerfedern mittels extremthermophiler Bakterien und thermostabilen Enzymen, *Transkript Sonderband* 2003, 17-19

### References

Baneyx, F. (1999): Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* Vol. 10: 411-421

Friehs, K.H. (1999): Maßnahmen zur Verbesserung der Produktion von rekombinanten Proteinen und Plasmid-DNS. Habilitationsschrift

Lee, J., S.Y., Park, S., Middelberg, A.P.J. (1999): Control of fed-batch fermentations. *Biotechnol. Adv.* Vol. 17: 29-48

Meinhardt, F., Busskamp, M., Wittchen, K.D. (1994) Cloning and sequencing of the *leu C* and *npr M* genes and a putative *spo IV* gene from *Bacillus megatrium* DSM 319. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41: 344-351

Wittchen, K.D., MeinhardtF. (1995) Inactivation of the major extracellular protease from *Bacillus megatrium* DSM 319 by gene replacement. *Applied microbiology and Biotechnology* 42: 871-877