



Doctoral Thesis

Versuche zur Temperaturadaption thermophiler Bacillen und Produktion, Isolation und Charakterisierung extrazellulärer neutraler Proteinasen mit verschiedener Thermostabilität aus *Bacillus stearothermophilus* und caldoaktiven Bacillen

Author(s):

Sidler, Walter

Publication Date:

1974

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000086052> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. Nr. 5404

VERSUCHE ZUR TEMPERATURADAPTATION THERMOPHILER BACILLEN UND
PRODUKTION, ISOLATION UND CHARAKTERISIERUNG EXTRAZELLULÄRER
NEUTRALER PROTEINASEN MIT VERSCHIEDENER THERMOSTABILITÄT
AUS BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS UND CALDOAKTIVEN BACILLEN.

A B H A N D L U N G

zur Erlangung
des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften
der

E I D G E N Ö S S I S C H E N T E C H N I S C H E N
H O C H S C H U L E Z Ü R I C H

vorgelegt von

W A L T E R S I D L E R
Dipl. Natw. ETH
geboren am 30. Juni 1944
von Zürich und Inwil (Kt. Luzern)



Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. H. Zuber, Referent
Prof. Dr. A. Fiechter, Korreferent

1974

Separatdruck aus FEBS LETTERS, Vol. 25, Nr. 2, 292 - 294 (1972)

H Z U S A M M E N F A S S U N G

Vier Stämme von *Bacillus stearothermophilus*, Stamm NCIB 8924 und 8920 ATCC 7953 und 7954, die caldoaktiven, extrem thermophilen Bacillen caldotenax und caldolyticus wurden bei 37°C und 55°C resp. 70°C kultiviert.

Bacillus stearothermophilus lässt sich durch das Auskeimenlassen von Sporen direkt an die verschiedenen Temperaturbereiche adaptieren. (thermophiler Temperaturbereich: 50°C - 100°C; mesophiler Temperaturbereich: 30°C - 50°C).

Im Temperaturbereich der Thermoadaptation (um 48°C) scheint die Belüftungsrate die Ausbildung der mesophilen oder thermophilen Wachstumsform vegetativer Zellen von *B.stearothermophilus* zu beeinflussen.

Die Temperaturadaptation ist von Veränderungen der morphologischen, metabolischen und enzymatischen Eigenschaften (z.B. Thermostabilität begleitet).

Im mesophilen Wachstumsbereich scheiden alle vier *B.stearothermophilus* Stämme und die caldoaktiven Stämme YTP und YTG unter gleichen Fermentationsbedingungen neutrale Proteinase aus. Sie sind alle gleich thermolabil wie die *B.subtilis* neutrale Proteinase (Denaturierung ab 50°C). Hemmversuche mit EDTA und DFP deuteten auch auf eine alkalische Proteinase hin welche bei der Kultivierung von *B.stearothermophilus* in Hartmann-Medium ausgeschieden wird.

Im thermophilen Temperaturbereich synthetisiert *B.stearothermophilus* eine neutrale Proteinase, die bis 65°C thermostabil bleibt.

Alle 6 untersuchten Bacillenstämme scheiden in beiden Temperaturbereichen α -Amylase aus.

Die thermolabile und die thermostabile Proteinase aus *B.stearothermophilus* wurden in 300 l Ansätzen produziert.

Die Proteinaseausbeute an thermostabiler Proteinase wird durch Calciumphosphatverbindungen im Medium sehr stark beeinträchtigt.

Die mesophile Proteinase wurde durch Adsorption an Amberlite XAD-7 Harz

aus dem Medium extrahiert. Das Kulturmedium mit der thermostabilen Proteinase wurde unter Vakuum bei 40°C auf einen Zehntel des ursprünglichen Volumens eingedampft und die Proteinase mit Ammoniumsulfat (60% Sättigung) ausgefällt.

Die thermolabile und thermostabile Proteinase wurden mit der Affinitätschromatographie-Methode gereinigt. Dabei wurde die thermostabile α -Amylase mitgereinigt. Bei 30% Reinigungsausbeute wurden pro 300 l Ansatz 10 mg thermostabile und pro 10 l Ansatz 10 mg thermolabile neutrale Proteinase rein erhalten.

Die neutralen Proteinase der caldoaktiven Stämme YTP und YTG könnten mit der gleichen Methode isoliert werden.

Das Molekulargewicht der monomeren neutralen Proteinase von *B.stearothermophilus* beträgt für die thermolabile Proteinase 35'000 und für die thermostabile Proteinase 34'400. Die pH-Optima der proteolytischen Aktivität liegen bei pH 7.2. Beide Proteinase hydrolysieren Polypeptide am Aminoende von Leucin. Sie lassen sich mit EDTA total hemmen, nicht aber mit DFP, d.h. es sind Metallenzyme. Calciumionen spielen bei der Thermostabilisierung eine entscheidende Rolle. Ohne Calciumionen denaturiert die thermostabile Proteinase statt bei 65°C bei 40°C und die thermolabile statt bei 50°C ebenfalls bei 40°C.

Als neutrale Proteinase erwiesen sich auch diejenigen der caldoaktiven Stämme. Die Aminosäureanalysen der thermolabilen und thermostabilen Proteinase von *B.stearothermophilus* unterscheiden sich in mehreren Aminosäureresten voneinander. Die Werte bleiben aber im Rahmen der bei anderen neutralen Proteinase gefundenen Daten.

Der Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenz-Analyse der thermostabilen Proteinase von *B.stearothermophilus* mit derjenigen von THERMOLYSIN aus *B.thermoproteolyticus* zeigte eine grosse Homologie (100 % in den ersten 15 Resten).