



(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 147286 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: 1581/80

(51) Int.Cl.³: C 12 N 9/42

(22) Indleveringsdag: 11 apr 1980

(41) Alm. tilgængelig: 12 okt 1981

(44) Fremlagt: 04 jun 1984

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: -

(71) Ansøger: *SRI INTERNATIONAL; Menlo Park, US.

(72) Opfinder: Wilfred A. *Skinner; US, Shigeyuki *Takenishi; JP.

(74) Fuldmægtig: Th. Ostenfeld Patentbureau A/S

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af cellulaseenzymer af C₁- og C_x-typen samt aryl-beta-glucosidaser ved dyrkning af *Thielavia terrestris*

(57) Sammendrag:

1581-80

Ved fremstillingen af cellulolytiske enzymer fra *Thielavia terrestris* tilsættes 0,5-5% glycerol til standardmediet.

Herved fås forøget udbytte, navnlig af de mere varmestabile β -glucosidaser.

Enzymerne renses og adskilles ved 1) filtrering af mediekulturen, 2) udfældning med mættet ammoniumsulfatopløsning, 3) opløsning og afsaltning ved gelfiltrering, 4) eluering med NaCl, 5) gelfiltrering af eluaterne til frembringelse af adskilte fraktioner af β -glucosidase og fraktioner med C₁- og C_x-enzymaktivitet.

Den fraskilte β -glucosidase kan anvendes til fremstilling af glucose ud fra cellulose ved på en fast bærer eller indesluttet i en polymermatrix at udsættes for koncentreret strømme af partielt konverterede cellulosematerialer.

DK 147286 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af cellulaseenzymer af C_1 - og C_x -typen samt aryl- β -glucosidaser ved dyrkning af Thielavia terrestris.

05 Det er kendt af fremstille cellulaseenzympræparater ved dyrkning af svampen Thielavia terrestris i et næringsmedium indeholdende kilder for cellulose, nitrogen, salte og evt. yderligere stoffer, jfr. USA-patentskrift nr. 4.081.328. Det fremstillede enzympræparat rapporteres at have C_1 - og C_x -cellulaseenzymaktivitet. Det er endvidere tidligere rapporteret, at enzymproduktionen af andre cellulaseproducerende organismer end Thielavia terrestris 10 inhiberes af glycerol.

Følgende artikler behandler glycerol eller glucoses undertrykkelse af cellulaseproduktionen ved anvendelse af andre organismer end Thielavia terrestris:

15 Mandels, 1975, Growth and Cellulase Production by Trichoderma, pp. 81-109. I Bailey et al, Symposium on the Enzymatic Hydrolysis of Cellulose, The Finnish National Fund for Research and Development (SITRA), Helsinki, Finland.

20 Nisizawa et al, 1972, Catabolite Repression of Cellulase Fermentation in Trichoderma Viride, J. Biol. Chem. 71, 999-1007.

Montenecourt et al, 1977, Preparation of Mutants of Trichoderma reisei with Enhanced Cellulase Production, Appl. and Env. Microbiol., 34, No. 6, 777-782. Denne undersøgelse viste, at 5% glycerol undertrykkede cellulaseproduktion og også i vidt omfang reducerede mængden af syntetiseret ekstracellulært protein i forhold til, hvad der udskiltes, når cellulose var den eneste carbonkilde.

30 I modsætning til angivelserne ifølge de tidligere undersøgelser som ovenfor nævnt, har det nu overraskende vist sig, at der, når glycerol sættes til et cellulose-holdigt næringsmedium, som anvendes til fremstilling af cellulaser ved dyrkning af Thielavia terrestris, op-

nås en forøgelse af fremstillingen af disse enzymer, idet fremstillingen af enzymer med C_1 - og C_x - aktivitet ikke påvirkes af glyceroltilsætningen, men fremstillingen af enzymer med aryl- β -glucosidaseaktivitet forøges indtil ca. fem fold. Endvidere har det vist sig ved gelfiltreringsadskillesesteknikker, at sammensætningen af β -glucosidaserne i nærværelse af glycerol ændres i forhold til den, der findes i standardmediet i sig selv. Andelen af de mere varmestabile af β -glucosidaseenzymerne forøgedes således i forhold til de mindre varmestabile, et vigtigt praktisk resultat, da varmestabilitet er en yderst ønskværdig egenskab med henblik på forøgelse af udbyttet af glucose fremstillet ud fra cellulosematerialer ved arbejde ved højere temperaturer. Desuden gør cellulaserne varmestabilitet det muligt ved opvarmning af systemet at fortsætte den enzymatiske aktivitet, der skyldes cellulaserne, og samtidig udvirke destruktion af forholdsvis varmfølsomme uønskede enzymer, som kan være til stede. Eksempler på uønskede enzymer, der kan elimineres på denne måde, mens de værdifulde cellulaser bevarer, er sådanne enzymer, som forårsager uønskede virkninger, såsom proteinhydrolyse, forskellige deamineringer, hydrolyse af lipider og lignende.

Hvad angår mængden af glycerol, som til forøgelse af udbyttet af aryl- β -glucosidaser kan sættes til mediet med positiv og gunstig virkning, har det vist sig, at så lidt som ca. 0,5 vægt% er effektivt, mens mængder op til ca. 5 vægt% kan anvendes med fordel. Dette fænomen er således en klart uventet opdagelse, da det som nævnt er velkendt fra den kendte teknik, at fremstillingen af cellulolytiske enzymer fra f.eks. Trichoderma dissimilationsundertrykkes med glucose og glycerol.

Den foreliggende opfindelse angår i overensstemmelse hermed en fremgangsmåde til fremstilling af cellulaseenzymer af C_1 - og C_x -typen samt aryl- β -glucosidaser ved dyrkning af Thielavia terrestris i et næringsmedium indeholdende kilder for cellulose, nitrogen, salte og evt. yderligere stoffer og udvinding og evt. adskillelse af de dannede enzymer, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at der til mediet sættes fra ca. 0,5 til ca. 5% glycerol.

Ifølge en udførelsesform for opfindelsen udvindes de dannede enzymer og adskilles ved 1) filtrering af mediekulturen, 2) udfæld-

ning med ammoniumsulfat-mættet opløsning, 3) opløsning og derefter afsaltning ved gelfiltrering, 4) fornyet gelfiltrering med eluering med natriumchlorid, og 5) yderligere gelfiltrering af eluaterne med opsamling af adskilte fraktioner af aryl- β -glucosidase og C_1 - og C_x -enzymaktivitet.

For at vise denne uventede virkning, som glycerol har på fremstillingen af cellulolytiske enzymer med Thielavia terrestris, blev der gennemført nogle undersøgelser under anvendelse af medier af forskellig sammensætning som vist:

A) Mediesammensætning:

("Avicel 105" er cellulosepulver, og "CSL" er majsstøbevæske)

Nr.	Grund-medium*	"Avicel 105"	Pepton	"CSL"	Glu-cose	Cello-biose	Gly-cerol
1	100 ml	1 g	2 g	2 g			
2	100 ml	1 g	0,5 g	0,5 g			
3	100 ml	1 g	0,1 g	0,1 g			
4	100 ml	1 g	0,5 g	0,5 g	5 g		
5	100 ml	1 g	0,5 g	0,5 g		5 g	
6	100 ml	1 g	0,5 g	0,5 g			5 g

* Grundmedium: KH_2PO_4 6,8 g/l, $(NH_4)_2SO_4$ 1,3 g/l, $MgCO_4$ 7H₂O 0,5 g/l, $CaCl_2$ 0,2 g/l, sporstofopløsning 2 ml/l.

B) Dyrkning: En forkultur fremstilledes ved overføring af en lille mængde mycelium fra et skråsubstrat til en 250-ml kolbe indeholdende 100 ml medium nr. 2. Kolben anbragtes ved 48°C i 48 timer på rotationsrysteapparat. Hovedkulturen påbegyndtes ved overføring af 2 ml af mediet fra forkulturen til en 250-ml kolbe indeholdende 100 ml af mediet. Dyrkningen gennemførtes på et rotationsrysteapparat ved 48°C.

C) Resultat:

Som vist i figurerne, jfr. nedenfor, undertrykkedes fremstillingen af cellulolytiske enzymer med Thielavia terrestris af glucose ligesom ved Trichoderma. Glycerol havde imidlertid ikke nogen virkning på fremstillingen af enzymer med C_1 - (filterpapiraktivitet) og C_x -aktivi-

tet. Thielavia terrestris fremstillede ca. fem gange så meget aryl- β -glucosidase i mediet indeholdende 5% glycerol som i standardmediet (nr. 2) (sammenlign med USA-patentskrift nr. 4.081.328). Det viste sig også ved gelfiltrering, at der er forskel i sammensætningen af de fra standard mediet og det glycerolholdige medium opnåede β -glucosidaser.

Den optimale temperatur for cellulaseaktivitet bestemtes til at være ca. 60°C. Disse aktiviteter kan måles ved hjælp af følgende analysemetoder. De med Thielavia terrestris fremstillede termostabile cellulaser frembringer 10-12 enheder filterpapiraktivitet, 25-30 enheder aryl- β -glucosidase og 80-90 enheder CMC-ase i 1 ml centrifugat af dyrkningsvæsken.

Enzymanalyse

15 1. Filterpapiraktivitet

Som substrat benyttes en 100-mg strimmel af "Whatman nr. 1" filterpapir (1 x 12 cm). Analyseblandingen i et prøverør (16 x 150 mm) udgøres af 1 ml 0,5M acetatpuffer, pH 5,0, en strimmel filterpapir foldet ligesom en bælg, og 1 ml fortyndet enzymopløsning. Blandingen holdes i en time i vandbad (60°C). Efter inkubering sættes 2 ml dinitrosalicylsyrereagens til analyseblandingen, og fremstillede reducerende sukkerer bestemmes ved DNS-metoden og beregnes som glucoseækvivalent. Én enhed filterpapiraktivitet defineres som den mængde enzym, der frembringer 1 mg glucoseækvivalent reducerende sukkerer under de ovenfor beskrevne betingelser.

2. CMC-ase

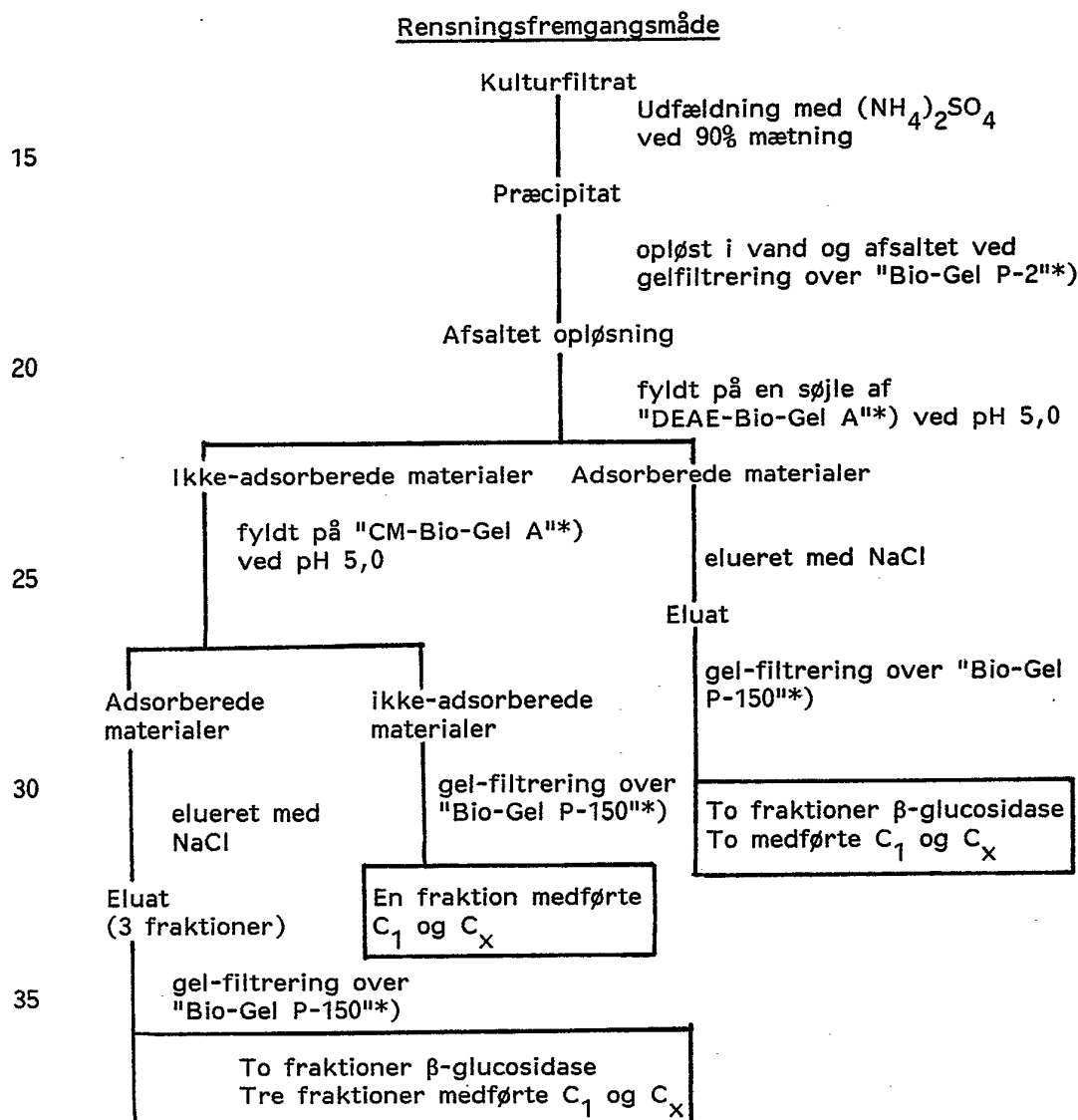
Analyseblandingen udgøres af 1 ml 1% carboxymethylcellulose (SIGMA, produkt nr. C-8758) indeholdende 0,5M acetatpuffer, pH 5,0, og 1 ml fortyndet enzymopløsning. Blandingen holdes ved 60°C i 30 minutter. Efter inkubering sættes 2 ml dinitrosalicylsyrereagens til blandingen, og fremstillede reducerende sukkerer måles ved DNS-metoden og beregnes som glucoseækvivalent. Én enhed CMC-ase defineres som den mængde enzym, der fremstiller 1 mg glucoseækvivalent reducerende sukkerer under de ovenfor beskrevne betingelser.

3. Aryl- β -glucosidase

Der anvendes o-nitrophenyl- β -D-glucopyranosid som substrat.

Analyseblandingen indeholder 0,5 ml 10 mm o-nitrophenyl- β -D-glucopyranosid, 0,5 ml 0,5M acetatpuffer, pH 5,0, og 1 ml fortyndet enzymopløsning. Efter inkubering ved 60°C i 30 minutter sættes 2 ml 0,2M natriumcarbonat til blandingen. Frigjort o-nitrophenol måles ved absorbansen ved 410 nm. Én enhed aryl- β -glucosidase defineres som den mængde enzym, der fremstiller 1 μ mol o-nitrophenol under de ovenfor beskrevne betingelser.

Ved at benytte disse analysemetoder til at følge fraktioneringsfremgangsmåderne er enzymer med C_1 , C_x -aktiviteter og aryl- β -glucosidaser blevet skilt fra hinanden efter følgende skema:



*) polyacrylamidgeler fremstillet af BIO-RAD Laboratories, Richmond, Californien, USA.

Ved anvendelse af det skitserede fraktioneringsskema adskiltes aryl- β -glucosidaserne i to homogene fraktioner med "BIO-Gel P-150" (gennemsnitlig partikelstørrelse ~ 150 mesh i våd tilstand) ved eluering med 0,1M natriumacetatpuffer, pH 5,0. Strømningshastigheden var 27 ml/time, og der opsamledes fraktioner på 7 ml.

Som fig. 1 giver udtryk for, var adskillelsen af disse enzymer i højeste grad vellykket, idet to homogene aryl- β -glucosidaser blev isoleret fra hinanden. Fig. 1 illustrerer indvirkningen af pH på de to aryl- β -glucosidasers aktivitet.

De data, der svarer til den uventede iagttagelse, at glycerol i modstrid med tidligere rapporter over andre cellulaseproducerende organismer var i stand til med *Thielavia terrestris* at forøge udbyttet af β -glucosidaseenzym omkring fem fold i stedet for at inhibere dets fremstilling, mens udbyttet af C_1/C_X -fremstillingen var uændret, vises i fig. 2, 3, 4 og 5.

Sammensætningen af aryl- β -glucosidaserne ændredes også i nærværelse af glycerol i forhold til, hvad der findes med standardmediet (fig. 4). De mere varmestabile af β -glucosidaseenzymerne (fig. 5) forøgedes i forhold til de mindre varmestabile, et vigtigt praktisk resultat, da varmestabilitet er en vigtig egenskab med henblik på forøgelse af udbyttet af glucose fra cellulosematerialer.

Undersøgelse af, hvilken indvirkning glycerolkoncentrationen i mediet har på udbyttet af aryl- β -glucosidaser, viste, at så lidt som 0,5% glycerol havde en positiv virkning.

Fig. 2 illustrerer ændringer i pH og C_1 aktivitet med dyrkningstiden under anvendelse af forskellige medier. Under anvendelse af de ovenfor beskrevne medier 1-6 vises virkningerne på C_1 aktivitet og pH-ændringer som funktion af dyrkningstiden. Disse data viser, at glucose undertrykkede produktionen af cellulaseenzym, men at glycerol ikke havde nogen væsentlig virkning på C_1 -aktiviteten, selvom det forøgede udbyttet af aryl- β -glucosidase.

Fig. 3 viser indvirkningen af de forskellige medier på aryl- β -glucosidase- og C_X -aktivitet.

Fig. 4 viser resultaterne af gelfiltreringsadskillelsen af aryl- β -glucosidaser fra standardmedium og fra glycerolholdigt medium og viser, hvordan udbyttet af de to forskellige β -glucosidaser påvirkes ved tilsætning af glycerol til standardmediet. Fraktionen omkring nr. 80 forøges ved glyceroltilsætningen, og denne er den mest varmestabile af de to rensede β -glucosidaser.

Fig. 5, der viser den termiske stabilitet af aryl- β -glucosidaseenzymer isoleret fra standardmedium og glycerolholdigt medium, viser sammen med fig. 4, at fremstillingen af den mere stabile β -glucosidase begunstiges, når glycerol sættes til mediet.

05 Fig. 6 viser glycerolkoncentrationens virkning på fremstillingen af aryl- β -glucosidaser. Det fremgår klart, at udbyttet forøges dramatisk, når glycerol sættes til standardmediet. Selv tilsætning af så lav en mængde som ca. 0,5% glycerol har en positiv virkning på enzymud-

10 byttet ud fra et cellulosesubstrat. Som man vil forstå af det foregående, er det ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen muligt at fremstille signifikant større mængder aryl- β -glucosidase ud fra Thielavia terrestris. Desuden er det med de beskrevne hidtil ukendte adskillelsesmetoder gjort muligt at rense og/eller fraskille aryl- β -glucosidasen. Den fraskilte aryl- β -glucosidase
15 kan anvendes på effektiv og økonomisk måde til konvertering af cellulosematerialer, f.eks. partielt konverterede cellulosematerialer, hvilket fører til forøget glucoseproduktion. β -glucosidasen kan om ønsket anvendes på en fast bærer eller indesluttet i en polymermatrix på en sådan måde, at den kan modtage koncentrerede strømme af cellu-
20 loseråmaterialet for effektivt at omdanne dette til den ønskede glucose.

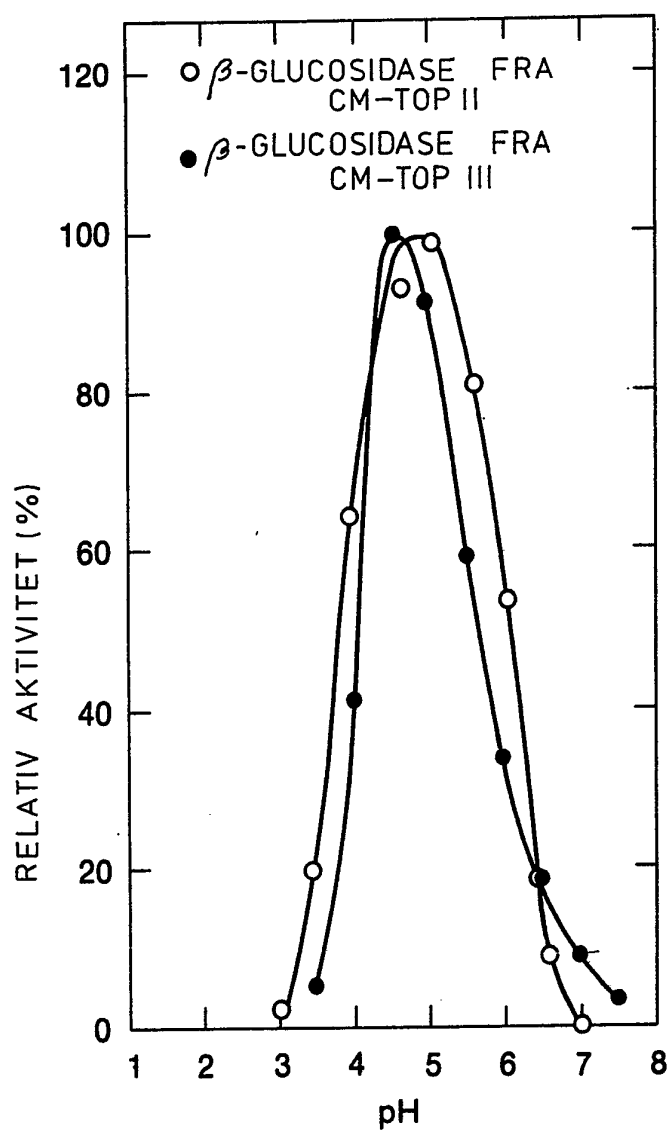
Betydningen af at have lettilgængelige glucosekilder er skildret i store træk ovenfor og i USA-patentskrift nr. 4.081.328.

PATENTKRAV

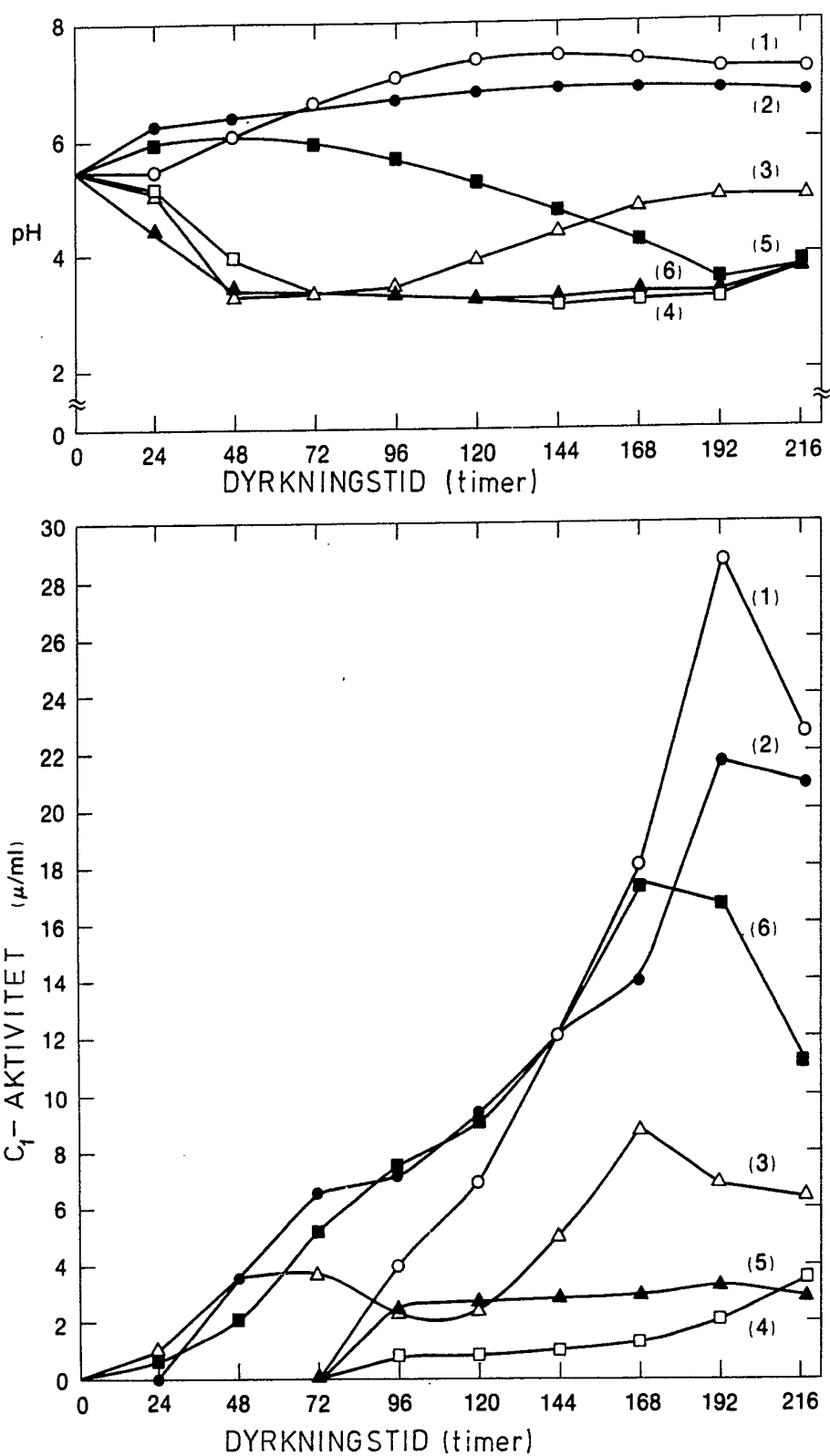
25 1. Fremgangsmåde til fremstilling af cellulaseenzymer af C_1 - og C_x -typen samt aryl- β -glucosidaser ved dyrkning af Thielavia terrestris, i et næringsmedium indeholdende kilder for cellulose, nitrogen, salte og eventuelt yderligere stoffer og udvinding og eventuel adskillelse af de dannede enzymer, KENDETEGNET ved, at der til mediet sættes fra ca. 0,5 til ca. 5% glycerol.

30 2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, KENDETEGNET ved, at de dannede enzymer udvindes og adskilles ved 1) filtrering af mediekulturen, 2) udfældning med ammoniumsulfat-mættet opløsning, 3) opløsning og derefter afsaltning ved gelfiltrering, 4) fornyet gelfiltrering med eluering med natriumchlorid, og 5) yderligere gelfiltrering
35 af eluaterne med opsamling af adskilte fraktioner af aryl- β -glucosidase og C_1 - og C_x -enzymaktivitet.

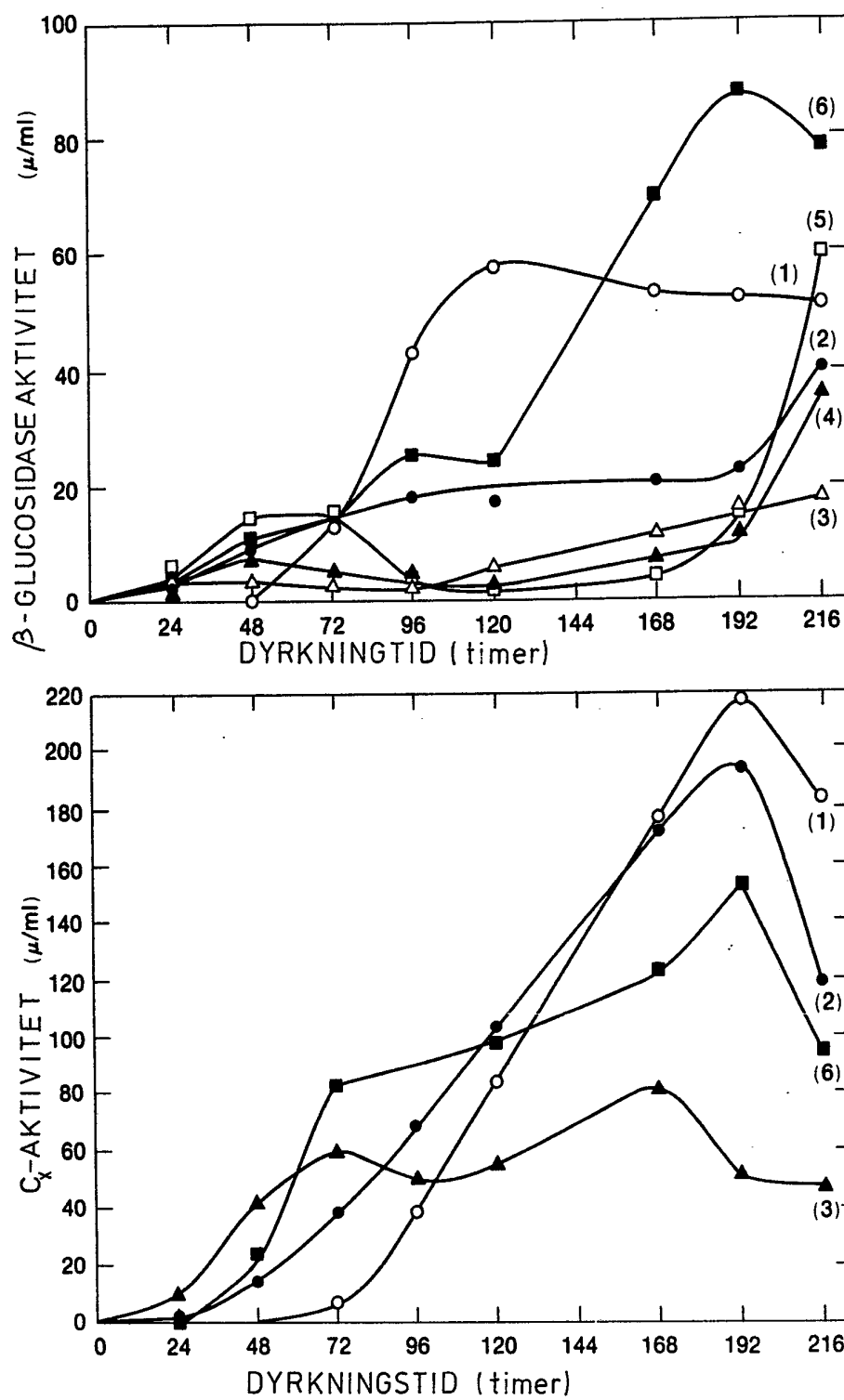
Fremdragne publikationer:



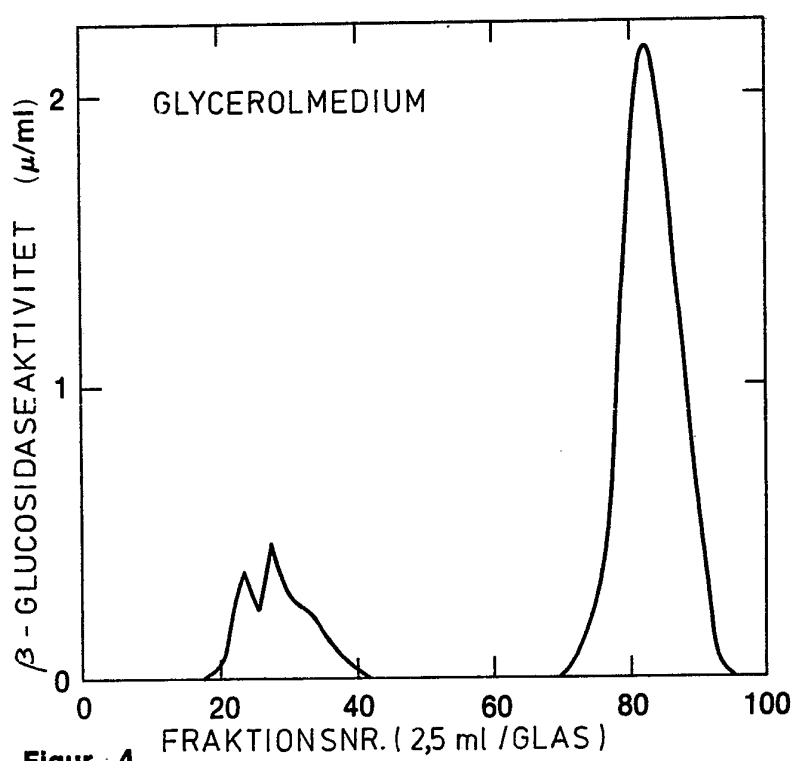
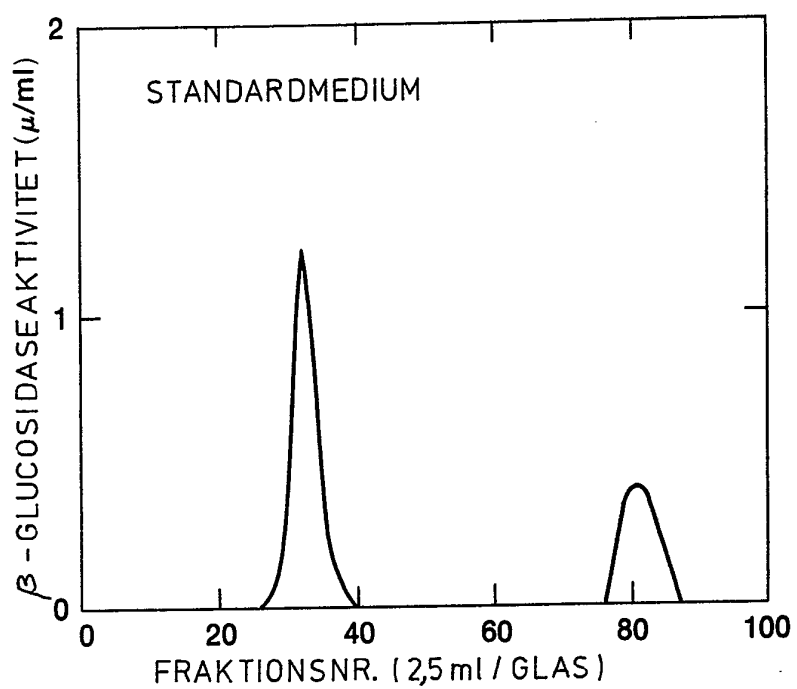
Figur 1



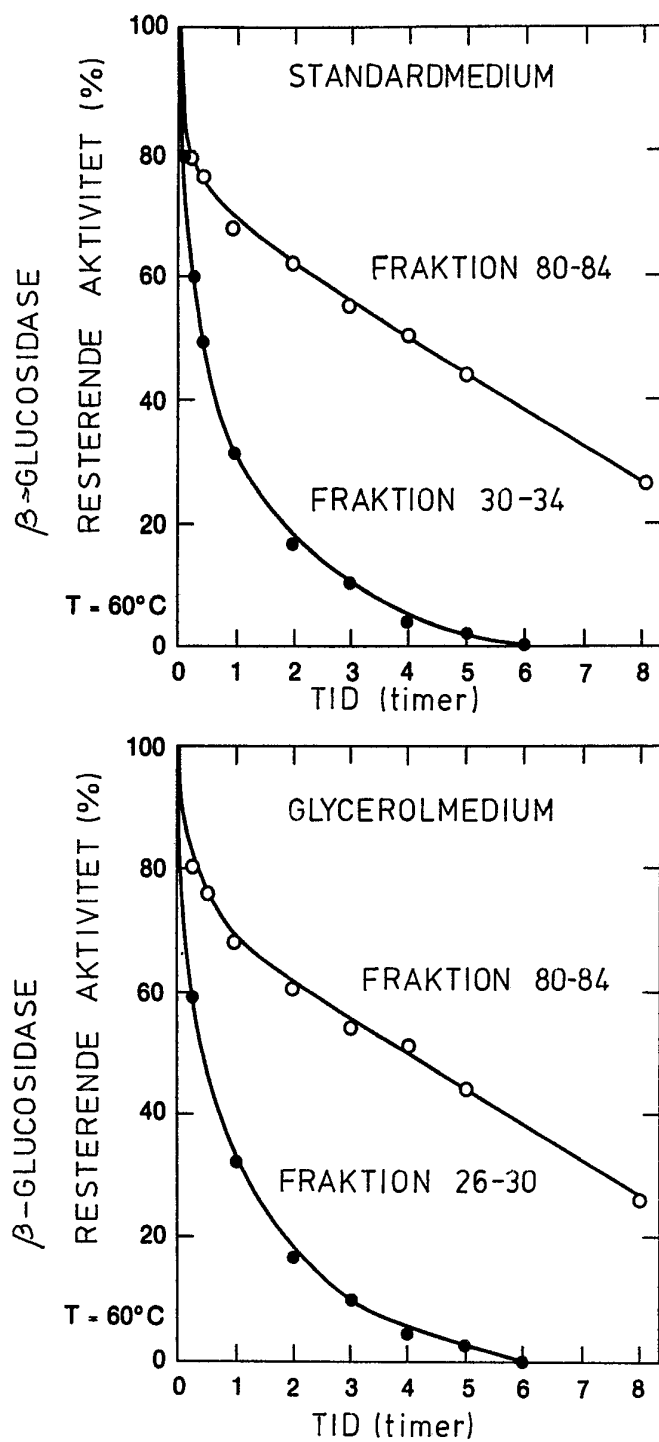
Figur 2



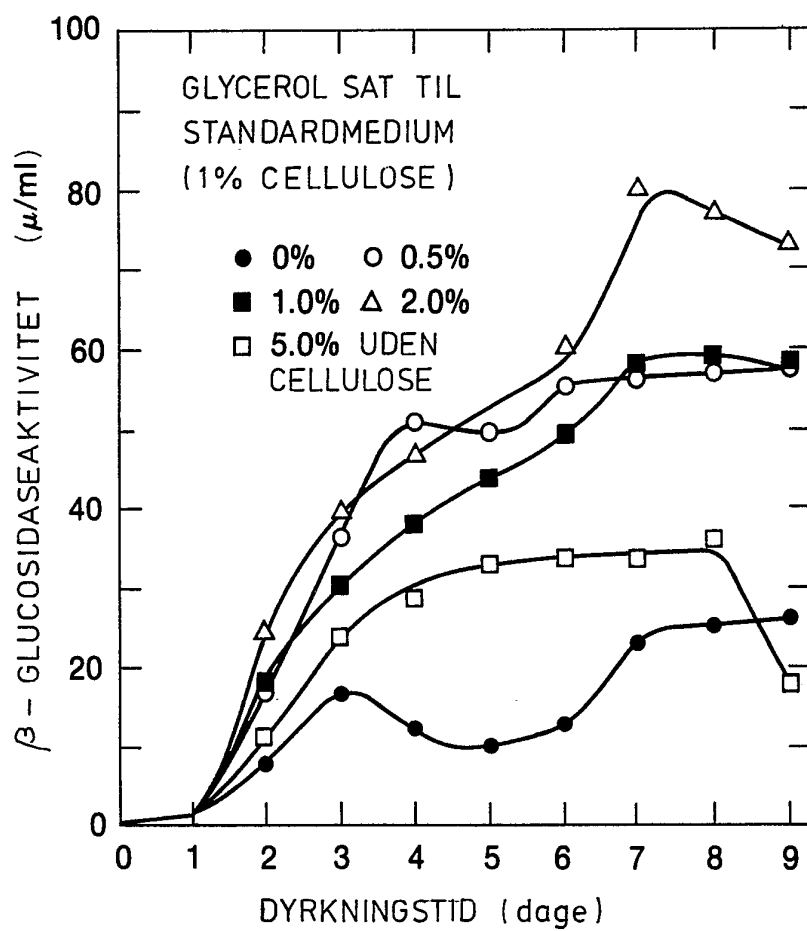
Figur 3



Figur 4



Figur 5



Figur 6