



DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK
AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

PATENTCHRIFT 145 028

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 29 Absatz 1 des Patentgesetzes

Int. Cl.³

(11) 145 028

(45) 19.11.80

3(51) C 12 N 9/42

(21) WP C 12 d / 189 403

(22) 12.11.75

(71) siehe (72)

(72) Hirte, Wolfgang F., Dr.habil.; Glathe, Ingrid, Dr. Dipl.-Biol., DD

(73) siehe (72)

(74) Humboldt-Universität zu Berlin, Direktorat für Forschung, Büro für Neuerer- und Patentwesen,
1080 Berlin, Unter den Linden 6

(54) Verfahren zur biotechnischen Herstellung von Cellulasen, Hemicellulasen und β -Glucosidasen

Verfahren zur biotechnischen Herstellung von Cellulasen,
Hemicellulasen und β -Glucosidasen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur biotechnischen Herstellung von zellulose-, hemizellulose- und β -glucoside-spaltenden Enzymen im Emers- und Submersverfahren mittels selektierten und optimierte Stämmen aus der Gattung Penicillium.

Zur biotechnischen Herstellung von Cellulasen werden verschiedene Schimmelpilze verwendet, so z. B. aktive Stämme aus den Gattungen Aspergillus, Trichoderma, Gliocladium und Penicillium. Die Produkt von Cellulase mit Hilfe von Stämmen der Gattung Penicillium wird mehrfach beschrieben.

Die von den angegebenen Stämmen produzierten Cellulasen werden als Fest- oder Flüssigpräparat zur Spaltung von Zellulose aus verschiedenen Pflanzenmaterialien verwendet, so z. B. zum besseren Aufschluß von Obst und Gemüse, zur Erhöhung der Saftausbeute, zur Herstellung von Mazeraten und Säften, für diätetische Zwecke und zum Aufschluß von Futtermitteln sowie von Holz und Stroh zur Gewinnung von Glukose zur Biomasseproduktion von Einzellereiweiß.

Der effektivere Einsatz eines Cellulasepräparates verlangt ein geeignetes Spektrum von cellulolytischen und hemicellulolytischen Enzymen. Zur Produktion von Biomasse mittels Hefe müssen die zellulosehaltigen Substrate bis zur Glukose abgebaut werden, so daß neben einer hohen C_{17} , C_x - vor allem auch eine hohe Cellobiase-aktivität notwendig ist. Eine Anzahl von Cellulasepräparaten besitzt ein für den jeweilig praktischen Einsatz nicht optimales Enzymspektrum, da einzelne Enzymkomponenten geringere Aktivitäten aufweisen.

12 NOV 1975 * 504806

Auch die mit Hilfe des Stammes Gliocladium produzierte Cellulase besitzt Cellobiase in nicht ausreichendem Maße.

Zweck der Erfindung ist es, ein Cellulasepräparat unter produktionstechnisch rentablen Bedingungen herzustellen, das ein breites Enzymspektrum von Cellulasen und Hemicellulasen, vor allem mit hohen Aktivitäten von C_1 - und C_x - sowie Cellobiaseaktivitäten hat, bei gleichzeitig hohen hemicellulolytischen Aktivitäten, um zellulosereiche Substrate intensiv für verschiedene Verwendungszwecke abbauen zu können.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, durch Verwendung eines geeigneten Stammes unter geeigneten Kultivierungsbedingungen ein Enzympräparat zu gewinnen, das eine höhere Enzymaktivität und geeignetere Enzymzusammensetzung hat als die bisher beschriebenen Stämme.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß ein Stamm mit hohen cellulolytischen und hemicellulolytischen Aktivitäten durch Verwendung zellulosehaltiger Substrate isoliert und durch ein Screening ausgesucht wird und durch genotypische und phänotypische Optimierungen seine Enzymaktivitäten um 30 - 50 % gesteigert werden.

Isolation und Selektion des ausgewählten Organismus

Zellulosetestbeutel nach U N G E R wurden in Ackerböden von Getreidefeldern im Raum Stendal ausgelegt und nach einem vierteljährigen Verbleib zur Aufarbeitung wieder entnommen. Die Pilze, die sich an der Zellulose der Beutel entwickelt hatten, wurden durch Verwendung geeigneter zellulosehaltiger Nährmedien mit Hilfe des Plattenverdünnungstestes isoliert. Der selektierte Organismus wurde durch ein geeignetes Screening-Verfahren auf phosphorsäuregeschwollener Zellulose (Clearing-Test nach R A U T E L A) ausgewählt. Im Submersverfahren wurde seine besonders hohe Enzymproduktion nachgewiesen.

. . . 4 . .

Von der reingezüchteten Kultur wurden Einkeimkolonien angelegt und die aktivste ausgewählt. Der selektierte Klon entwickelte verschiedene Varianten, die sich makroskopisch (Farbspiel, Sporulationsintensität) und enzymatisch unterschieden. Diese Varianten wurden in Hinblick auf ihre Cellulaseaktivität im Submersverfahren selektiert.

Stammbeschreibung

Der isolierte Stamm konnte nach dem gültigen Bestimmungsbuch von R A P E R und T H O M, A Manual of the Penicillia, Williams and Wilkins, Baltimore 1949, als eine Varietät der Art *Penicillium citreo viride* bestimmt werden. Er stimmt mit den in R A P E R und T H O M beschriebenen Formenvarianten dieser Art nicht überein, sondern stellt eine eigene Varietät dar. Diese Varietät wurde daher als parvo-citreo bezeichnet. Eine Beschreibung dieser Varietät wurde in der Literatur noch nicht vorgenommen. Eine Einteilung des Stammes in die Art *Penicillium citreo viride* wurde deswegen vorgenommen, da das Penicillien-Formenspektrum sehr groß ist und eine systematische Eingliederung in bisher beschriebene Gruppen = Arten angebracht erscheint.

Er grenzt sich von den beschriebenen Artenvarietäten wie folgt ab: Wachstum auf Würzeagar ist ausgebreitet, flach, schwach samtig, mit konzentrischer Ringbildung. Die Luftmycelfarbe ist grün bis grau-grün. Die Substratmycelfarbe variiert von schwach gelblich bis braun. Das Wachstum auf Czapek bzw. Czapek-Dox-Agar ist begrenzt, samtig bis schwach wollig mit Faltenbildung. Die Luftmycelfarbe variiert von weiß über gelblich bis hin zu rötlich-violettem Schimmer.

Das mikroskopische Erscheinungsbild kann wie folgt beschrieben werden:

Die Sporulation ist im allgemeinen nicht sehr stark und findet im wesentlichen nur auf Würze-Agar und in geringerem Maße auf Sabouraud-Agar statt. Auf Würzeagar entspringen die Konidienträger dem Luftmycel und tragen einen charakteristischen monoverticillaten Pinsel. Die Konidienträger sind meistens unver-

zweigt, gelegentlich tritt ein Seitenzweig auf. Sie sind unterschiedlich lang von $11\ \mu$ - $26\ \mu$ und sind glatt. Sie tragen 3 - 5, selten 7, dicht stehende Sterigmen. Die Sterigmen sind glatt und röhrenförmig, die durchschnittliche Länge beträgt $5\ \mu$ - $9\ \mu$. Die Konidien bilden lockere Säulenketten, die auch eine wirre Anordnung breit auseinandergehender Ketten zeigen können. Die durchschnittliche Länge der Ketten beträgt $17\ \mu$ - $45\ \mu$. Die Sporen sind rundlich, glatt und haben einen Durchmesser von $1\ \mu$ - $3\ \mu$. Die Sporen lösen sich in den Ketten nur sehr schwer voneinander.

Der beschriebene Stamm ist in der Stammsammlung der Humboldt-Universität, Kleinmachnow b. Berlin, Bereich Mikrobiologie der Sektion NGW und LMT unter der Nr. 2711 (Anmeldungs-jahr 1973) registriert.

Die biotechnischen Verfahren zur Herstellung der Cellulasen, Hemicellulasen und β -Glucosidasen können in Submers- und Emerskulturen durchgeführt werden.

Die Enzymproduktion erfolgt unter Verwendung billiger, natürlicher Ausgangsmaterialien, wobei ein Zusatz von nativer Zellulose zum Kulturmedium die Enzymaktivitäten wesentlich erhöht. Zur Steigerung bestimmter Enzymaktivitäten können α - und/oder β -Glukoside dem Medium zugesetzt werden.

Die Enzymproduktion im Emersverfahren erfolgt auf angefeuchteten pflanzlichen Materialien, vorzugsweise Weizenkleie und/oder Grünmehl. Der sterile Nährboden wird mit Sporen bzw. vegetativen Mycelien beimpft. Die Inkubation erfolgt etwa bei 25 bis 35 °C und dauert 2 bis 8 Tage.

Bei der Enzymproduktion im Submersverfahren wird von einer Kulturenkonserve ausgegangen, wobei auf Weizenkleie-Grünmehl oder Bierwürzeagar geimpft wird.

Nach einer Inkubation von 5 - 14 Tagen bei 25 - 35 °C wird nochmals auf die gleichen Medien abgeimpft und in gleicher Weise kultiviert.

Mit Sporenmycel-Gemisch wird die nachfolgende Inokulumstufe beimpi (1. Vorkultur). Mit dieser ersten Vorkultur werden je nach Bedarf und Größe des Produktionsumfanges weitere Propagationsstufen (Vorkulturen) angelegt. Die Vorkulturen dienen zur Beimpfung des Produktionsmediums. Die erforderliche Impfmenge beläuft sich auf 0,5 bis 10 %, wobei sich das Impfmateriel in der logarithmischen Wachstumsphase befinden muß. Die Zusammensetzung der Nährlösung für die Impfstufen und das Produktionsmedium sind gleich. Sie enthalten Zellulose, Grünsmehl und anorganische Salze, gegebenenfalls zusätzlich α - und β -Glucoside.

Die Enzymproduktion erfolgt entweder in Schüttelkolben, im halb- oder großtechnischen Maßstab. Die großtechnische Produktion erfolgt in Tanks mit Zwangsbelüftung und Rührung unter sterilen Bedingungen. Zur Bekämpfung der Schaumbildung während der Fermentation werden pflanzliche oder tierische Fette und Öle oder Öle auf Silikonbasis eingesetzt.

Die Fermentation ist beendet, wenn das Mycel in Autolyse übergegangen ist und/oder die Enzymaktivitäten ihre Endwerte erreicht haben.

Die Mycel- und Nährbodenbestandteile werden von der Kulturlösung abgetrennt. Aus dem Filtrat oder Zentrifugat wird in üblicher Weise entweder durch Einengen im Vakuum ein Konzentrat oder durch Fällung mit anorganischen Salzen, organischen Lösungsmitteln, durch Gefriertrocknung oder Sprühtrocknung ein festes Präparat hergestellt.

Auf Grund der hohen Aktivitäten an C_1 - und C_x -cellulolytischen Enzymen sowie β -Glucosidasen ist es möglich, natürliche, zellulosehaltige Ausgangsmaterialien zu spalten.

Die Erfindung soll anhand von Beispielen näher erläutert werden:

Beispiel 1

Zur Herstellung von zellulose-, hemizellulose- und β -glucoside-spaltenden Enzymen im Labormaßstab werden Sporen bzw. das Sporenmycel-Gemisch aus der Konserve (1/3 Luvos-Heilerde II, 1/3 Seesand 1/3 Aktivkohle) oder einer Würzeagar-Erhaltungskultur (2 % ungehoher Würze, 2 % Agar, pH 5,6) auf Weizenkleie-Grünsmehl- oder Bierwürze-Agar überimpft. (Zusammensetzung des Weizenkleie-Grünsmehlagars:

0,5 % Weizenkleie, 0,5 % Grünmehl, 2,5 % Agar in Leitungswasser). Nach einer Inkubation von etwa 6 - 14 Tagen wird eine Öse Sporenmycel-Gemisch in 100 ml Produktionsmedium eingimpft.

Dieses hat folgende Zusammensetzung:

0,5 % Zellulose, 1,0 % Grünmehl, alkalisch aufgeschlossen, 0,2 % $\text{NH}_4 \text{H}_2 \text{PO}_4$, 0,1 % $\text{K H}_2 \text{PO}_4$, 0,05 % $\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2 \text{O}$, Leitungswasser, pH 5,2 - 5,6.

Es wird auf einer Fanal-Schüttelmaschine 4 - 6 Tage bei einer Temperatur von $30^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$ geschüttelt, dann wird abfiltriert und das Filtrat im Vakuum bei 25 - 50 $^\circ \text{C}$ auf etwa 1/10 eingengt.

Folgende Aktivitäten wurden erreicht:

- C_1 - Aktivität: 60 - 80 E/ml KF
- C_x - Aktivität: 50 - 70 g CMC/ml KF (spez. Abbau)
- Cellobiase - Aktivität: 125 - 250 mU/ml KF
- Xylanase - Aktivität: 5,0 - 6,0 mg Glukosegleichwerte/ml KF
- Lichenase - Aktivität: 4,5 - 5,5 mg Glukosegleichwerte/ml KF

Die Bestimmungen der Enzymaktivitäten wurden wie folgt durchgeführt:

C_1 -Aktivität:

Bestimmung in Anlehnung an die Filterpapiermethode nach KITAMIKADO und TOYAMA (Hakko, Kogaku, Zasski 40, 85 (1962) und ref. C.A. 62, 1900 (1965) unter Verwendung von FN_1 -Chromatographiepapier (Filtrak, Niederschlag) als Substrat:

Zur Ermittlung der Aktivität in Flüssigpräparaten oder Kulturlösungen wird 1 ml der Enzymlösung in 4 ml Puffer gegeben (Phosphat-Puffer nach SÖRENSEN pH 5,2) und mit 1 Stück Filterpapier von 1,5 x 1,5 cm Kantenlänge beschickt. Auf einer Schüttelmaschine (Universalschüttelmaschine Thys 1, VEB Labortechnik Ilmenau) werden die Proben bei einer Schüttelfrequenz von 120 Schwingungen/Mi und einer Amplitude von 2 cm bei 38 $^\circ \text{C}$ im Brutschrank oder Thermostaum geschüttelt. Die Zeit, welche die völlige Zerstörung des Filterpapiers angibt, wird vermerkt.

C_x -(CMC)-Aktivität:

Die Bestimmung der C_x -Aktivität erfolgt durch Messung des Viskositätsabfalles der Na-Carboxymethylcellulose. Die C_x -Aktivität in

Enzympräparaten wird ausgedrückt als die Menge Na-CMC in einer Untersuchungslösung, welche unter bestimmten Bedingungen durch 1 g oder 1 ml Enzym zu einem 75. %igen Viskositätsabfall der Ausgangsviskosität geführt hat. Die Messung wird im Ubbelohde-Viskosimeter 1 durchgeführt.

Cellobiase-Aktivität:

Diese Aktivität wird durch Abbau von Cellobiose zu Glukose mit Hilfe des Fermognostbesteckes des AWD Dresden bestimmt. Hierbei wird die Glukose durch die Glukoseoxydase-Reaktion ermittelt.

Hemicellulase-Aktivität

Es wird der Abbau von Hemicellulasesubstraten (z.B. Xylan) durch Bestimmung der reduzierenden Zucker mit Hilfe der Dinitrosalicylsäuremethode nach SUMNER (J. biol. Chemistry 47, 5 (1921) bestimmt.

Beispiel 2

Zur Herstellung von zellulose-, hemizellulose- und β -glucoside-spaltenden Enzymen im großtechnischen Maßstab wird von der im Beispiel 1 dargestellten Weizenkleie-Grünmehl- oder Bierwürze-agarkultur ausgegangen.

Mit dem Sporen-Mycelgemisch dieser Stufe wird die 1. Vorkultur (1 Öse in 100 ml Nährlösung) beimpft.

Die beimpfte Kulturlösung: 0,5 % Zellulose, 1,0 % alkalisch aufgeschlossenes Grünmehl, 0,2 % $\text{NH}_4 \text{H}_2\text{SO}_4$, 0,2 % KH_2PO_4 , 0,05 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ wird in Kolben auf Schüttelmaschinen bei $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ inkubiert. Der pH-Wert vor dem Beimpfen wird auf 4,0 - 5,6 eingestellt. Nach 16 bis 24-stündiger Kultur wird das Mycel zur weiteren Vermehrung unter sterilen Bedingungen zur 2. Vorkultur überimpft. Die Vermehrung dieser Stufe erfolgt in 200 l großen Impftanks aus nichtrostendem Stahl. In den Tanks werden 120 l Nährlösung mit gleicher Zusammensetzung wie bei der 1. Vorkultur zubereitet, sterilisiert und beimpft. Die Impfmenge aus der 1. Vorkultur beträgt 1,2 bis 6 l. 16 - 24 Stunden nach Inkubationsbeginn wird mit dem Material der 2. Vor-

kultur die Nährlösung in einem 12 000 -l- Tank aus nichtrostendem Stahl beimpft. Zusammensetzung und pH-Wert der Nährlösung sind ebenso wie bei der 1. Vorkultur. Die Tankausrüstung entspricht der klassischen Antibiotika-Batch-Kultur. Der Tankinhalt beträgt 9000 l und wird mit 100 bis 500 l der 2. Vorkultur beimpft. Während der Kulturdauer von 96 bis 144 Stunden (je nach Beimpfungsmenge und angestrebter Kulturdauer) wird im Verhältnis 0,3 - 0,5 : 1/Min.; d. h. 0,3 - 0,5 m³ sterile Luft auf 1 m³ KL/Min. belüftet.

Die Schaumbekämpfung erfolgt mit pflanzlichen Ölen (Rapsöl) oder mit Ölen auf Silikonbasis.

Die Fermentation wird beendet, nachdem das Mycel teilweise in Lyse übergegangen ist. Der End-pH-Wert beträgt 4,0 bis 4,5. Das Mycel wird durch Separation von der Flüssigkeit getrennt. Das Filtrat wird in einem Vakuum-Umlaufverdampfer auf etwa 1/10 des Ausgangsvolumens bei 30 °C eingeeengt.

Die Enzymaktivitäten des Konzentrates betragen:

- C₁ - Aktivität: 180 - 220 E/ml
- C_x • - Aktivität: 400 - 600 g CMC/ml (spez. Abbau)
- Cellobiase - Aktivität: 500 - 700 mU/ml
- Xylanase - Aktivität: 50 - 55 mg Glukosegleichwerte/ml
- Lichenase - Aktivität: 50 - 60 mg Glukosegleichwerte/ml

Bei der Rückverdünnung des Konzentrates zeigt sich ein maximaler Aktivitätsverlust von 10 - 20 %.

Aus dem Konzentrat kann anschließend die Fällung des Enzymkomplexes nach bekannten Methoden, wie beispielsweise mit NH₄-Salzen, Aceton oder Tannin vorgenommen werden.

Patentanspruch

1. Verfahren zur biotechnischen Herstellung von Cellulasen, Hemicellulasen und β -Glucosidasen im Emers- oder Submersverfahren mittels eines Stammes der Gattung *Penicillium citreoviride*, dadurch gekennzeichnet, daß ein auf zellulosehaltigen Substraten und durch Klonselektion ausgewählter Stamm var. *parvocitreo* sowie seiner daraus entstehenden genetischen Varianten in einem Medium mit Zellulose mit oder ohne Grünmehl bzw. allein Verwendung findet.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß durch jeweiligen Zusatz von α - und/oder β -glukosidisch gebundenen Kohlenhydraten eine Steigerung spezieller cellulolytischer, hemicellulolytischer und Cellobiaseaktivitäten erreicht wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß mit Hilfe seiner Enzymaktivitäten, die während seiner Kultivierung entstehen, zellulosehaltige Substrate aufgeschlossen werden, die zur eigenen Biomassebildung oder zur Biomassebildung anderer Mikroorganismen dienen.