



DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK
AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

PATENTSCHRIFT 142130

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 29 Absatz 1 des Patentgesetzes

(11)	142 130	(45)	11.06.80	Int. Cl. ³	3(51)	C 12 N 9/42
(21)	WP C 12 D / 196 387	(22)	16.12.76			

(71) siehe (72)

(72) Hirte, Wolfgang F., Dr.habil.; Liebherr, Renate, Dr.
Dipl.-Ing.; Schulz, Günter, Dr. Dipl.-Biol., DD

(73) siehe (72)

(74) Humboldt-Universität zu Berlin, Direktorat für Forschung, Büro
für Neuerer- und Patentwesen, 1086 Berlin, Unter den Linden 6

(54) Verfahren zur Herstellung von Cellulasen und Hemicellulasen

(57) Verfahren zur Herstellung von Cellulasen und Hemicellulasen mit Hilfe eines Stammes der Gattung Trichoderma. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, durch Verwendung eines geeigneten Mikroorganismen-Stammes unter geeigneten Kultivierungsbedingungen und Aufarbeitungsverfahren ein Enzympräparat mit besonders hohen cellulolytischen und hemicellulolytischen Aktivitäten zu gewinnen. Durch ein umfangreiches Screening auf Holz und die Eignung zur Hydrolyse von mechano-chemisch aufgeschlossenem Stroh als Siebstufe wurde ein als Subspecies non-verrucosa benannter Trichoderma viride-Stamm selektioniert und phänotypisch optimiert. Die Enzymproduktion im Emers- oder Submersverfahren erfolgt unter Verwendung billiger, pflanzlicher Ausgangsmaterialien, z.B. Grünmehl (hydrolytisch aufgeschlossen), mit oder ohne Zusatz von Zellulosen unter Kultivierungsbedingungen, bei denen eine maximale Enzymausschüttung stattfindet. Nach Abtrennung der Myzel- und Nährbodenbestandteile wird ein Kulturfiltrat bzw. Konzentrat oder Festpräparat mit hohen C₁-cellulolytischen Aktivitäten gewonnen, das zum Abbau zellulosereicher Roh- und Abfallstoffe besonders geeignet ist.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur biotechnischen Herstellung von zellulose- und hemizellulosespaltenden Enzymen im Emers- und Submersverfahren mittels eines selektionierten und optimierten Stammes aus der Gattung *Trichoderma*.

Mit Hilfe der angegebenen Enzyme werden zellulosereiche Roh- und Abfallstoffe gespalten, so daß ihre löslichen Spaltprodukte durch Mikroorganismen weiter verwertet werden können, z. B. zur Gewinnung von mikrobiellem Eiweiß und verschiedenen mikrobiellen Endprodukten wie Alkohol oder organischen Säuren. Weiterhin werden Cellulasen zur Optimierung und Rationalisierung von Verfahren in der Lebensmittelindustrie eingesetzt, so z. B. zur Erhöhung der Saftausbeute bei Obst und Gemüse, zur Herstellung von Mazeraten und Säften sowie zur Erhöhung der Alkoholausbeute bei der Spritherstellung.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen.

Der effektive Einsatz eines Cellulasepräparates verlangt ein geeignetes Spektrum von cellulolytischen und hemicellulolytischen Enzymen. Zur Bildung von Glukose aus der

Zellulose von Stroh u. a. zellulosereichen Roh- und Abfallprodukten müssen hohe C_1 -, C_x -cellulolytische, bestimmte Cellobiase- und Hemicellulase-Aktivitäten vorhanden sein. Eine Anzahl von Cellulasepräparaten besitzt nicht das geeignete Enzymspektrum, da einzelne Enzymkomponenten geringere Aktivitäten aufweisen, wie z. B. Präparate von *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten. Auch die mit Hilfe der Stämme *Gliocladium spec. Kleinmachnowi* und *Penicillium citreoviride* produzierten Cellulasen besitzen noch nicht die geeignete Zusammensetzung der notwendigen Enzymaktivitäten. Dagegen produzieren *Trichoderma*-Arten, vor allem *T. viride* ein besonders geeignetes Enzymspektrum zum Abbau von zellulosereichen Roh- und Abfallstoffen.

15

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein Cellulasepräparat unter produktionstechnisch rentablen Bedingungen herzustellen, das hohe Enzymaktivitäten und ein geeignetes Enzymspektrum von Cellulasen und Hemicellulasen besitzt.

25

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, durch Verwendung eines geeigneten Stammes der Gattung *Trichoderma* unter geeigneten Kultivierungsbedingungen und Aufbereitungsverfahren ein Enzympräparat zu gewinnen, das ein geeigneteres Enzymspektrum mit höherer Aktivität besitzt als die bisher beschriebenen Stämme.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß ein Stamm mit hohen cellulolytischen und hemicellulolytischen Aktivitäten aus geeigneten zellulosehaltigen Substraten unter Bedingungen, die die Cellulasebildner besonders entwickeln lassen, isoliert, durch geeignete Screeningmethoden aus einer Vielzahl von ebenfalls cellulolytisch aktiven Mikroorganismen ausgewählt und durch phänotypische Optimie-

10 rung seine Enzymaktivität gesteigert wird.

5 Isolation und Selektion des ausgewählten Organismus

Holzstücke werden in einer feuchten Kammer bei verschiedenen Temperaturen im Bereich von 20 - 60 °C inkubiert und die sich darauf entwickelnden Mikroorganismen auf geeignete zellulosehaltige Nährböden mit Hilfe von Anreicherungs- und Verdünnungsmethoden abisoliert. Die isolierten Organismen werden durch ein spezielles Screening-Verfahren in verschiedenen Siebstufen ausgewählt, so auf phosphorsäuregeschwollener Zellulose im Clearing-Test nach (RAUTELA und
15 COWLING (Appl. Microbiol. 14, 892 (1966)) und in Submerskultivierung durch Erfassung der C₁-, C_x-, Cellobiase-, Xylanase- und Lichenaseaktivitäten. Dabei müssen sich besonders hohe Enzymaktivitäten zeigen, wobei die der zwei Cellulasebildner Gliocladium spec. und Penicillium citreoviride als Basisaktivitäten zu erreichen sind.

Die besondere Eignung zur enzymatischen Hydrolyse von Stroh wird an mechano-chemisch aufgeschlossenem Stroh als entscheidende Screening-Stufe getestet.

25

Stammbeschreibung

Der selektionierte Stamm konnte nach dem Bestimmungsschlüssel für Trichoderma-Arten nach RIFAI (Mycol. Paper 116,
30 1 - 56 (1969)) nicht exakt einer Art zugeordnet werden, steht aber Trichoderma viride nahe.

Der Stamm der Gattung Trichoderma ist durch folgende Merkmale gekennzeichnet:

Makroskopisches Wachstum: Auf Malz-, Czapek-Dox- und Hafer-
35 Erbsmehl-Agar ausgebreitetes, niedriges, lockeres, teilweise spinnwebartiges Myzel; letzteres vor allem auf Hafer-Erbsmehl-Agar. Das spinnwebartige Myzel überzieht eine lockere Myzelmatte.

Die Farbtönung ist im allgemeinen graugrün und wird mit zunehmendem Alter intensiver dunkelgrün - blaugrün. Gelegentlich tritt eine gelbgrüne Farbtönung auf. Häufig treten zuerst dunkelgrünere Stellen auf, bedingt durch eine tuffartige Sporenbildung.

Die Unterseite ist farblos; nur auf Hafer-Erbsmehl tritt ein typischer Kokusnußgeruch auf.

Mikroskopisches Wachstum: Niederliegendes Myzel, teilweise von Luftmyzelfäden überzogen. Das Myzel ist glatt, farblos. Nur auf Hafer-Erbsmehl bilden sich hyaline Chlamydosporen, die rund - schwach oval sind. Sie entstehen entweder direkt in der Hyphe oder terminal an kurzen Seitenzweigen.

Die Konidienträger sind unterschiedlich lang, je nach der Verzweigungsintensität ($14 - 50 \mu$ Länge). Konidienträger, die in Tuffen gebildet werden, sind stärker verzweigt. Die Seitenzweige gehen im stumpfen Winkel oder rechtwinklig ab. Sie stehen entweder einzeln oder unregelmäßig wirtelig zu 2 - 3. Die Seitenzweige sind $8,5 - 15 \mu$ lang und enden immer mit einer Phialide. Konidienträger und Seitenzweige sind gewöhnlich glatt, auf Czapek-Dox-Agar bilden sich jedoch gelegentlich Warzen aus.

Die seitlich gebildeten Phialiden stehen einzeln sowie in falschen Wirteln zu 2 - 5; sie entspringen rechtwinklig oder stumpfwinklig am Seitenzweig. Ihre Länge variiert von $6 - 11 \mu$; die einzeln abgehenden Phialiden sind länger ($9 - 11 \mu$).

An der Spitze der Phialiden entstehen Sporen, zu 1 - 12, die zusammengeballt aneinanderhaften und ein köpfchenartiges Aussehen ergeben. Die Sporen sind rundlich - schwach oval ($1,8 - 2,3 \mu \times 2,8 - 3,7 \mu$). Auf Czapek-Dox-Agar sind die Sporen im allgemeinen rundlicher ($1,9 - 3,1 \mu \varnothing$). Alle Sporen sind glatt und haben keine Anzeichen von Warzen, was sonst typisch ist für *Trichoderma viride*. Aus diesem Grunde, sowie einiger weiterer kleinerer Abweichungen dürfte der vorliegende Stamm sich deutlich von typischen *Trichoderma viride*-Stämmen unterschei-

den, wenn er auch morphologisch ihm ähnlich ist. Er wird somit zukünftig als *T. viride* subspec. *nonverrucosa* angesprochen.

- 5 Der beschriebene Stamm ist in der Stammsammlung der Humboldt-Universität, Kleinmachnow bei Berlin, Bereich Mikrobiologie der Sektion Nahrungsgüterwirtschaft und Lebensmitteltechnologie unter der Nr. 2713 (Anmeldungs-jahr 1975) registriert.

10

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

Die Enzymproduktion erfolgt unter Verwendung billiger,

- 15 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.

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

25

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

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

Mit Sporen bzw. einem Sporen/Myzelgemisch wird die nachfolgende Inokulumstufe beimpft. Diese kann eine Produktions-

- 35 oder eine Vorkulturstufe sein. Mit einer Vorkultur werden je nach Bedarf und Größe des Produktionsumfanges weitere Propagationsstufen (Vorkulturen) angelegt. Diese Vorkulturen dienen zur Beimpfung des Produktionsmediums. Die erforderli-

che Impfmenge beläuft sich auf 0,5 bis 20 %, wobei sich das Impfmateri-
 5 al in der logarithmischen Wachstumsphase befinden muß. Die Zusammensetzung der Nährlösung für die Impfstufen und das Produktionsmedium sind gleich. Sie enthalten Zellulose, Grünmehl und anorganische Salze, gegebenenfalls zusätzlich α - und β -Glukoside.

Die Enzymproduktion erfolgt entweder in Schüttelkolben, im halb- oder großtechnischen Maßstab. Die großtechnische
 10 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 Myzel in Autolyse
 15 übergegangen ist und/oder die Enzymaktivitäten ihre Endwerte erreicht haben.

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

25

Ausführungsbeispiele

B e i s p i e l 1 :

Zur Herstellung von zellulose-, hemizellulose- und β -glukosidespaltenden Enzymen im Labormaßstab werden Spo-
 30 ren bzw. das Sporen/Myzel-Gemisch aus der Konserve (1/3 Luvos-Heilerde II, 1/3 Seesand, 1/3 Aktivkohle) oder einer Würzeagar-Erhaltungskultur (2 % ungehopfte Würze, 2 % Agar, pH 5,6) auf Weizenkleie-Grünmehl- oder Bierwürze-Agar überimpft. (Zusammensetzung des Weizenkleie-Grünmehlagers:
 35 0,5 % Weizenkleie, 0,5 % Grünmehl, 2,5 % Agar in Leitungswasser). Nach einer Inkubation von etwa 6 - 14 Tagen wird eine Öse voll Sporen 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 % KH_2PO_4 , 0,05 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$,
Leitungswasser, pH 5,2 - 5,6.

- 5 Es wird auf einer Panal-Schüttelmaschine 3 - 6 Tage bei einer Temperatur von $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ geschüttelt, dann abfiltriert und das Filtrat im Vakuum bei $25 - 50^\circ\text{C}$ auf etwa 1/10 des Volumens eingeeengt.

Folgende Aktivitäten werden erreicht:

10 C_1	- Aktivität:	100 - 150	E/ml KF
C_x	- "	: 30 - 35	g NaCMC/ml KF
Cellobiase	- "	: 100 - 150	mU/ml KF
Xylanase	- "	: 4 - 6	mg) Glukose-
Lichenase	- "	: 5 - 9	mg) Gleichwerte/ml KF

15

Die Bestimmungen der Enzymaktivitäten wurden wie folgt durchgeführt:

C_1 -Aktivität:

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

- Zur Ermittlung der Aktivität in Flüssigpräparaten oder
25 Kulturlösungen wird 1 ml der Enzymlösung in 4 ml Puffer gegeben (Phosphat-Puffer nach SÖRENSEN pH 5,1) 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
30 bei einer Schüttelfrequenz von 120 Schwingungen/Min und einer Amplitude von 2 cm bei 38°C im Brutschrank oder Thermostaum geschüttelt. Die Zeit, welche die völlige Zerstörung des Filterpapiers angibt, wird vermerkt.

- 35 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 25 %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 Ferngostbesteckes 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. Chem. 47, 5 (1921) bestimmt.

20 B e i s p i e l 2 :

Zur Herstellung von zellulose-, hemizellulose- und β -glukosidespaltenden Enzymen im großtechnischen Maßstab wird von der im Beispiel 1 dargestellten Weizenkleie-Grünmehl- oder Bierwürzeagarkultur ausgegangen. Mit Sporen 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 $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ inkubiert. Der pH-Wert vor dem Beimpfen wird auf 4,0 - 5,6 eingestellt. Nach 16 bis 24-stündiger Kultur wird das Myzel 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. Vor-

kultur beträgt 1,2 bis 12 l. 16 - 72 Stunden nach Inkubationsbeginn wird mit dem Material der 2. Vorkultur die Nährlösung in einem 12000 l - Tank aus nichtrostendem Stahl beimpft. Zusammensetzung und pH-Wert der Nährlösung sind ebenso wie bei der 1. Vorkultur. Durch Steuerung des pH-Wertes ist es möglich, das Enzymspektrum in bestimmten Grenzen zu verändern. Die Tankausrüstung entspricht der klassischen Antibiotika-Batch-Kultur. Der Tankinhalt beträgt 9000 l und wird mit 100 bis 1000 l der 2. Vorkultur beimpft. Während der Kulturdauer von 48 bis 144 Stunden (je nach Beimpfungsmenge und angestrebter Kulturdauer) wird im Verhältnis 0,15 - 0,5 : 1/Min.; d.h. 0,15 - 0,5 m³ sterile Luft auf 1 m³ KL/Min. belüftet.

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

Die Fermentation wird beendet, nachdem das Myzel teilweise in Lyse übergegangen ist, oder die festgelegten Enzymparameter erreicht sind. Je nach Kultivierungsdauer können die Verhältnisse der Enzymaktivitäten zueinander verschoben werden, z. B. kann durch längere Kultivierungszeit die Cellobiase-Aktivität erhöht und die C₁-Aktivität vermindert werden.

Das Myzel wird durch Separation von der Flüssigkeit getrennt. Folgende Aktivitäten im Kulturfiltrat können erreicht werden:

C ₁	- Aktivität:	120 - 180	E/ml KF
C _x	- "	: 20 - 30	g NaCMC/ml KF
Cellobiase	- "	: 50 - 150	mU/ml KF
30 Xylanase	- "	: 4 - 7	mg Glukose-Gleichwerte/ ml/KF
Lichenase	- "	: 5 - 10	mg Glukose-Gleichwerte/ ml/KF

Das Filtrat wird im Vakuum bei 30 °C auf 1/5 - 1/10 des Ausgangsvolumens eingeeengt.

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.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur biotechnischen Herstellung von Cellu-
lasen und Hemicellulasen im Emers- oder Submersverfah-
5 ren mittels eines Stammes der Gattung Trichoderma,
dadurch gekennzeichnet, daß ein in einem Screening aus
Holzstücken isolierter und infolge seiner besonderen,
durch sein Enzymspektrum bedingten Wirksamkeit auf Stroh
selektionierter Stamm Trichoderma viride subspec. non-
10 verrucosa sowie seine daraus entstehenden genetischen
Varianten in einem Medium mit Zellulose mit oder ohne
Grünmehl, mit oder ohne hydrolytisch aufgeschlossenem
Grünmehl bzw. allein Verwendung findet.
- 15 2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß
durch jeweiligen Zusatz von α - und/oder β -glukosidisch
gebundenen Kohlenhydraten zum Medium eine Steigerung
spezieller cellulolytischer, hemicellulolytischer und
Cellobiaseaktivitäten erreicht wird.
- 20 3. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß
mit Hilfe seiner Enzymaktivitäten, die während seiner
Kultivierung entstehen, zellulosehaltige Substrate auf-
geschlossen werden, die zur eigenen Biomasse- und Pro-
duktbildung oder zur Biomasse- und Produktbildung ande-
rer Mikroorganismen dienen.