



(12) Wissenschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(13) DD (11) 278 358 A1

4(51) C 12 N 9/42

PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 N / 323 566 2	(22)	21. 12. 88	(44)	02. 05. 90
(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD				
(72)	Kerns, Gerhard, Dr. rer. nat.; Kude, Jelena, Dr. rer. nat.; Jalchow, Elke, Dipl.-Biochem.; Meyer, Dietrich, Prof. Dr. sc. nat.; Klappach, Günter, Dr. rer. nat., DD				
(54)	Verfahren zur Gewinnung von Cellulase-Enzymkomplexen				

(55) Cellulase, Enzyme, Gewinnung, Katabolitrepression, Penicillium, Pilz, Fermentation, fed-batch-Technik

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Cellulase-Enzymkomplexen. Mögliche Anwendungen bestehen in Produktionsanlagen, wo solche Enzyme erzeugt werden. Die hergestellten Cellulase-Enzymkomplexe sind beispielsweise für den Einsatz in der Nahrungsgüter- und Getränkeindustrie, der Landwirtschaft und Textilindustrie geeignet. Die Gewinnung der Cellulase-Enzymkomplexe erfolgt durch aerobe Submerszüchtung einer neuen Penicillium verruculosum-Mutante, welche eine reduzierte Katabolitrepression der Cellulasebildung aufweist. Als Kohlenstoffquelle bei der Fermentation dienen induzierende Substrate allein oder in Kombination mit nichtinduzierenden Substraten. Durch Wahl des Substrates sowie des pH-Profiles wird die Zusammensetzung des Cellulase-Enzymkomplexes gezielt beeinflusst. Mittels einer fed-batch-Technik werden insbesondere lösliche Substrate für die Cellulasegewinnung dem Fermentationsmedium zugegeben.

Patentanspruch:

1. Verfahren zur Gewinnung von Cellulase- Enzymkomplexen und/oder zellwandlytischen Enzymen durch Pilze im Submersverfahren, **gekennzeichnet dadurch**, daß die neue Pilzmutante *Penicillium verruculosum* IMET 43858 nach an sich bekannter Weise in einem Nährmedium kultiviert wird, welches ein oder mehrere die Cellulasebildung und/oder die Bildung zellwandlytischer Enzyme induzierende Substrate allein oder in Kombination mit einem oder mehreren nichtinduzierenden Substraten enthält.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß lösliche induzierende Substrate und/oder lösliche nichtinduzierende Substrate verwendet werden und daß die Zugabe dieser Substrate in das Fermentationsmedium mittels fed-batch-Technik in einer solchen Weise erfolgt, daß die zugeführten Substrate im Fermentationsmedium die Enzymbildung induzieren oder nicht reprimieren.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß als induzierende Substrate sowohl lösliche, wie wäßriger Weizenkeie-Auszug und/oder Zuckerlösungen als auch unlösliche, wie Cellulose, cellulosehaltige Abfallprodukte oder Zellwände von Pflanzen oder Pilzen verwendet werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß Getreidekleie und/oder Brennerischlempe und/oder Brauereitreber als induzierendes Substrat in Kombination mit löslichen Kohlenhydraten wie beispielsweise Glucose, Xylose oder Lactose verwendet werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Cellulase-Enzymkomplexen und/oder zellwandlytischen Enzymen durch aerobe Submerszüchtung von Pilzmutanten. Die gewonnenen Enzymkomplexe können zum teilweisen oder vollständigen Abbau von Cellulose sowie Hemicellulose in industriellen Produkten, Abfallstoffen, Abwässern oder beim Abbau von lebenden oder toten pflanzlichen Zellwänden verwendet werden.

Mögliche Anwendungsgebiete betreffen beispielsweise die Obst- und Gemüseverarbeitungsindustrie, die Brennerei- und Brauereiindustrie, die Extraktion pflanzlicher Zellinhaltsstoffe sowie die Silierung von Futtermitteln in der Landwirtschaft. Die gewonnenen Cellulase-Enzymkomplexe können auch als Biochemikale Anwendung finden, beispielsweise bei der Herstellung von Protoplasten, der Behandlung oder analytischen Bewertung von Futtermitteln.

Die Erfindung kann in die IPKC 12N eingeordnet werden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Es ist bekannt, Enzyme des Cellulasekomplexes durch aerobe Submerszüchtung von Pilzen herzustellen. Die bekannten Verfahren unterscheiden sich hauptsächlich in bezug auf die eingesetzten Pilzstämme, die verwendeten Substrate beim Fermentationsprozeß sowie die Prozeßführung. Die Wirtschaftlichkeit bei der Cellulasegewinnung wird wesentlich bestimmt durch die im Fermentationsmedium erzielte Enzymaktivität, durch die pro Zeiteinheit gebildete Enzymmenge (Enzymproduktivität), durch die bezogen auf das eingesetzte Substrat gebildete Enzymmenge (Enzymausbeute) sowie durch die Zusammensetzung des Enzymkomplexes. Als geeignete Cellulasebildner sind besondere Pilzstämme der Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium* und *Trichoderma* bekannt.

Die aus der Patent- und Fachliteratur bekannten Cellulasebildner mit dem bisher höchsten Cellulasebildungsvermögen gehören zur Art *Trichoderma reesei*. Die Cellulase-Enzymkomplexe von *T. reesei* sind durch einen besonders hohen Anteil an Cellobiohydrolase gekennzeichnet und sind besonders für den Abbau mikrokristalliner Cellulose geeignet. Mit dem Ziel einer Verbesserung des Cellulasebildungsvermögens wurden verschiedene *T. reesei*-Mutanten hergestellt. So wird in der Patentschrift WO 80/01080 die Cellulasebildung mit der Mutante *T. reesei* MCG 77 beschrieben. Die Cellulasebildung wird durch Glucose reprimiert, nicht jedoch durch Glycerol; Lactose wirkt induzierend auf die Cellulasebildung. Die mit 1% Cellulose im Nährmedium erhaltene Cellulaseaktivität beträgt 1... 1,8 U/ml FPA, die mit 1% Lactose erhaltene Aktivität beträgt 1,35 U/ml FPA und die mit 1% Lactose plus 1% Cellulose beträgt 1,75 U/ml FPA.

In der Patentschrift US 4,472,504 wird die Cellulasebildung mit der Mutante *T. reesei* MCG 80 beschrieben, welche aus der Mutante *T. reesei* Rut C30 gewonnen wurde. Bei Verwendung eines Nährmediums mit 8% Cellulose und Zusatz von Biotin wird in diskontinuierlicher Fermentation eine Cellulaseaktivität von 17,2 U/ml FPA erreicht, was einer Ausbeute von 215 U FPA/g Cellulose entspricht.

Es wurde auch *T. reesei*-Mutanten hergestellt, welche auf der Basis von Glucose als Kohlenstoffquelle Cellulase bilden können. Über das Cellulasebildungsvermögen von *T. reesei*-Mutanten bei Einsatz von Glucose als Substrat wurde auf dem 3. Europäischen Kongreß über Biotechnologie berichtet (München, BRD; 10.-14. Sept. 1984; M. Bailly: „Cellulase Production by Mutant Strains of *Trichoderma reesei* on non-Cellulosic Media“): Die höchste beschriebene Cellulaseaktivität wird mit der Mutante *T. reesei* VTT-D-79 125 auf Basis von 4% Glucose plus 4% Brennerei-Treber erhalten und beträgt 6,4 U/ml FPA. Mit Cellulose anstatt Glucose wurde bei diesem Stamm etwa die gleiche Cellulaseaktivität erhalten.

Es wurde auch vorgeschlagen (1986), die Mutanten *T. reesei* ZIMET 43803 und *T. reesei* ZIMET 43804 für die Cellulaseherstellung einzusetzen, um auch mit löslichen Substraten hohe Cellulaseaktivitäten bei gleichzeitig hohen Cellulaseproduktivitäten erzielen zu können.

Alle bekannten *Trichoderma*-Cellulasekomplexe haben jedoch den Nachteil, daß der β -Glucosidaseanteil gering ist, was beim enzymatischen Abbau von Cellulose zu einer stärkeren Inhibierung der Cellulase durch die gebildete Cellobiose führt. Dieser Nachteil ist seit langem bekannt.

So wurde ein Verfahren beschrieben, wo β -Glucosidase mit *Aspergillus phoenicia* hergestellt wird, um *T. reesei*-Cellulasekomplexe zu supplementieren (Biotechnol. Bioeng. Symp. 10 (1980), 189). Für zahlreiche Cellulaseapplikationen in der Nahrungsgüter- und Getränkeindustrie sowie der Landwirtschaft werden Cellulase-Enzymkomplexe benötigt, welche neben der cellulosespaltenden Aktivität noch Nebenaktivitäten aufweisen, beispielsweise Hemicellulase- und Amylaseaktivität. Die *T. reesei*-Cellulasekomplexe verfügen zwar über eine hohe Aktivität gegenüber Cellulose, jedoch sind die Nebenaktivitäten geringer als bei verschiedenen Cellulasekomplexen anderer Pilzgattungen (z. B.: Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 300, 283-291, 1983). Deshalb wurden auch Verfahren entwickelt, in denen *Penicillium*-Stämme für die Cellulasegewinnung eingesetzt werden. Beispielsweise wird gemäß DD-WP 225 712 *Penicillium janthinellum* als Cellulasebildner eingesetzt, wobei Cellulose in Kombination mit vorbehandeltem Grünmehl als Substrat für die Cellulasefermentation dient. In einer fed-batch-Kultivierung wird bei Einsatz von insgesamt 6% Cellulose zuzüglich Grünmehlmedium nach 8 Tagen eine Cellulaseaktivität von 6 U/ml Filterpapieraktivität erreicht, was einer Ausbeute von 100 U FPA je Gramm Cellulose entspricht; die Cellobiose-Aktivität beträgt 2 bis 4 U/ml.

Das Grünmehlmedium wird durch mechano-chemische Vorbehandlung von Grünmehl hergestellt.

Darüber hinaus wurden auch andere *Penicillium*-Stämme für die Cellulasegewinnung eingesetzt, beispielsweise gemäß DE-OS 2 133 544 und DE-OS 1 767 737. All diesen Verfahren liegen batch- oder fed-batch-Techniken zugrunde, in denen Cellulose oder pflanzliche cellulosehaltige Substrate einzeln oder in Kombination als C-Quelle dienen und in denen jeweils unterschiedliche definierte pH- und Temperaturprofile zur Erzielung günstiger Enzymkomplexe eingestellt werden.

So wird mit *Penicillium funiculosum* (Enzyme Microb. Technol. 1983, Vol. 5, 22-24) auf Basis von 6% Cellulose eine Cellulase-Aktivität von 3,5 U/ml FPA und eine β -Glucosidase-Aktivität 12 U/ml (gemessen durch Abbau von 4-Nitrophenyl- β -D-glucosid) erzielt.

Es wird auch die Cellulasegewinnung mit einem *Penicillium verruculosum* Wildstamm beschrieben (European J. Appl. Microbiol. 11 (1981), 2, 120-124); bei Verwendung eines Nährmediums mit Zuckerrübenextraktionsrückständen sowie entfettetem Sonnenblumensamenmehl wurde die günstigste Cellulasebildung beobachtet. Mit Mandels-Reese-Medium (1957) und 7,5 g/l reiner Cellulose plus 1 g/l Weizenkleie wurde eine Filterpapieraktivität von 0,3 U/ml erzielt.

Alle bekannten Verfahren zur Cellulasegewinnung haben den Nachteil, daß die bezogen auf das eingesetzte Substrat erhaltenen Cellulaseausbeuten relativ niedrig sind oder daß die im Fermentationsmedium erzielten Cellulase-Aktivitäten niedrig sind oder daß eine proportionale Erhöhung der Cellulase-Aktivität mittels Substratzugabe nicht möglich ist oder aber daß der Cellulase-Enzymkomplex eine wenig günstige Zusammensetzung aufweist.

Ziel der Erfindung

Es ist das Ziel der Erfindung, hohe Cellulase-Aktivitäten im Fermentationsmedium und gleichzeitig hohe substratbezogene Enzymausbeuten zu erreichen, um somit eine effektive Ausnutzung von Fermentatorvolumen und Substrat zu gewährleisten. Darüber hinaus besteht das Ziel darin, einen Cellulasekomplex zu gewinnen, welcher eine hohe Abbauleistung sowohl gegenüber reiner Cellulose als auch gegenüber cellulosehaltigen pflanzlichen Substraten aufweist.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine leistungsverbesserte Cellulase-Mutante zu gewinnen und in einem Kultivierungsverfahren einzusetzen, wobei in einer Fermentationsstufe mit hoher Cellulaseproduktivität und hoher Cellulase-Aktivität ein solcher Cellulase-Enzymkomplex gebildet wird, welcher über einen ausreichenden Anteil β -Glucosidase verfügt und welcher einen höheren Anteil an Nebenaktivitäten aufweist, die für den Abbau cellulosehaltiger pflanzlicher Substanzen erforderlich sind.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß die Pilz-Mutante *Penicillium verruculosum* IMET 43858 aerob und submers nach an sich bekannter Weise in einem Nährmedium kultiviert wird, welches ein oder mehrere die Cellulasebildung und/oder die Bildung zellwandlytischer Enzymer induzierende Substrate allein oder in Kombination mit einem oder mehreren nichtinduzierenden Substraten enthält.

Es wurde gefunden, daß diese Mutante bei geeignetem pH bzw. geeignetem pH-Profil einen höheren Anteil β -Glucosidase und einen höheren Anteil Nebenaktivitäten, insbesondere Hemicellulase, Pektinase und Amylase, ins Kulturmedium ausscheidet. Der Stamm verfügt über eine reduzierte Katabolitrepression der Cellulasebildung gegenüber Glycerol und Galactose; darüber hinaus verfügt er auch über eine reduzierte Katabolitrepression der Endoglucanasebildung gegenüber Glucose, erkennbar am Abbau von säuregequollener Cellulose bei Wachstum des Stammes auf einem Medium mit säuregequollener Cellulose plus Glucose.

Der erfindungsgemäße Stamm wurde durch Mutation und Selektion in mehreren Stufen aus dem Wildstamm *Penicillium verruculosum* ITC 71 gewonnen und in der Hinterlegungsstelle der ZIMET-Kultursammlung im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der Akademie der Wissenschaften der DDR hinterlegt und unter der Nummer IMET 43858 registriert.

Der Stamm ist durch folgende Merkmale charakterisiert:

Stammbeschreibung / Morphologie, Physiologie

Der Stamm weist die für *Penicillium* typischen morphologischen Merkmale auf und unterscheidet sich vom Ausgangsstamm hauptsächlich in physiologischen Eigenschaften, insbesondere in bezug auf die Cellulasebildung.

Die Erhaltung des Stammes ist auf den für *Penicillium*-Stämme gebräuchlichen Nährmedien möglich. Beispielsweise sind Kartoffel-Dextrose-Agar, Czapek-Dox-Agar, Sporulationsagar (Ammoniumsulfat 0,2%; Kaliumdihydrogenphosphat 0,5%; Glucose 2%, Hefeextrakt 0,7%; Agar 2%) oder CM-Agar (Kaliumhydrogenphosphat 1%, Glucose 1%; Hefeextrakt 0,5%; Agar 2%) hierfür geeignet. Die Bebrütungstemperatur beträgt zweckmäßig 28 bis 32°C, die Bebrütungsdauer etwa 5–7 Tage und weitere 5–7 Tage bei Raumtemperatur bis zur vollen Entwicklung der Stämme. Die Überimpfung wird mittels Konidien vorgenommen; die Farbe der Konidien ist in Abhängigkeit des Nährmediums grün bis graugrün, mitunter auch gelbgrün. Der Stamm ist prototroph (z. B. bezügl. Wachstum auf Glucose, Fructose, Glycerol, Lactose), darüber hinaus resistent gegenüber 2-Deoxy-D-glucose und 2-Deoxy-D-galactose sowie partiell resistent gegenüber 5-Thio-D-glucose.

Wachstum von Einzelkolonien auf CM-Agar, 6 Tage Bebrütung bei 30°C

IMET 43858 33 mm Koloniedurchmesser; weiß-graugrün;
mittelstarke Sporulation; radiale Faltung

Die Erhaltung des Stammes in lyophilisierter Form oder über bzw. in flüssigem Stickstoff ist mittels der allgemein praktizierten Methoden möglich, ohne daß ein Rückgang des Cellulasebildungsvermögens bisher beobachtet werden konnte. Der Stamm besitzt ein partiell-katabolitdereprimiertes Cellulasebildungsvermögen, d. h. in Gegenwart einiger leicht verwertbarer Substrate wie beispielsweise Glycerol oder verschiedenen Zucker werden bis zu einer bestimmten Substratkonzentration Enzyme des Cellulase-Komplexes gebildet.

Die reduzierte Katabolitrepression des Cellulasebildungsvermögens läßt sich in Anlehnung an die Methode von B. S. Montencourt und D. E. Eveleigh (Applied and Environmental Microbiology 33, 1977, 178–183) testen. Als Substrate im Agarmedium dienen säuregequollene Cellulose in Kombination mit dem jeweils untersuchten Repressor, insbesondere Glycerol, Galactose, Glucose und Xylose. Zur Begrenzung der Koloniegroße wird Bengalrosa in einer Konzentration von 30 mg/l dem Agarmedium zugesetzt. Die Dicke der Agarschicht wird auf 4 mm eingestellt. Bei einem Plattendurchmesser von 9 cm werden zweckmäßig 100 bis 200 Konidien je Platte aufgeimpft. In Anlehnung an die genannte Methode wird die Ausbildung der Klarzonen als Folge des Celluloseabbaues durch eine an die Bebrütung sich anschließende Inkubation bei 45...47°C über 20 Stunden vorgenommen, wobei die Lebensfähigkeit der Konidien des erfindungsgemäßen Stammes erhalten bleibt. Der Stamm IMET 43858 bildet Klarzonen bei den Substratkombinationen 0,5% säuregequollene Cellulose plus 5% Glycerol und 0,5% säuregequollene Cellulose plus 5% Galactose. Darüber hinaus bildet der Stamm IMET 43858 Klarzonen bei der Substratkombination 0,5% säuregequollene Cellulose plus 0,5% Glucose. Der Ausgangsstamm *P. verruculosum* ItC 71 bildet auf keinem dieser Medien Klarzonen, da bei diesem die Cellulasebildung einer starken Katabolitrepression unterworfen ist. Mit dieser Methode kann auch die Klonselektionierung vorgenommen werden.

Die Testung des katabolitdereprimierten Cellulasebildungsvermögens des beschriebenen Stammes ist auch in Röhrchen möglich. Beispielsweise werden Konidien auf ein Agarmedium mit säuregequollener Cellulose in Kombination mit dem jeweils untersuchten Repressor, jedoch ohne Zusatz von Bengalrosa, überimpft. Der Röhrchendurchmesser beträgt zweckmäßig 9 mm. Als Maß für das Cellulasebildungsvermögen dient die Tiefe der Klarzone im Röhrchen unterhalb der Mycelschicht; die Bebrütung und Inkubation bei 45°C werden wie bei dem beschriebenen Plattentest vorgenommen.

Cellulasebildungsvermögen in Röhrchentest

Stamm	1% AC	C-Quelle (Klarzonen in mm)		
		0,5% AC + 5% Glycerol	0,5% AC + 5% Galactose	0,5% AC + 0,5% Glucose
P. v. ItC 71	2	0	0	0
P. v. IMET 43858	4	5	4	4

AC: Amorphe Cellulose

Kultivierung des Cellulasebildners und Gewinnung des Enzymkomplexes

Die Kultivierungstemperatur der Mutante *P. verruculosum* IMET 43858 beträgt 22 bis 38°C, vorzugsweise 30 bis 35°C für das Mycelwachstum und 26 bis 32°C für die Enzymbildung. Der pH-Wert für die Kultivierung liegt im Bereich von 2 bis 7, vorzugsweise von 2,5 bis 5,5 für das Mycelwachstum und von 3,1 bis 6,2 für die Enzymbildung.

Als Kultivierungsgefäße sind alle unter Ausschluß von Fremdinfectionen betreibbaren Fermentoren geeignet, welche eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff gewährleisten und in welchen keine lang andauernden extrem hohen Scherfelder auftreten, denen große Teile des Fermentationsmediums ständig ausgesetzt sind.

Ausgangspunkt für die Kultivierung sind Konidien von Emerskulturen, insbesondere von Schrägagarkulturen auf Kartoffel-Dextrose-Agar.

Als Inokulum für das Fermentationsmedium dienen Konidien, vorzugsweise in einer Konzentration von 10^7 bis 10^9 je Liter Fermentationsmedium, oder Suspension vegetativen Mycels, vorzugsweise in einer Menge von 1 bis 15 Vol.-% des zu beimpfenden Mediums.

Für die Beimpfung großer Fermentoren wird das Inokulum zweckmäßig in mehreren Stufen nacheinander angezogen.

Die Prozeßführung bei der Züchtung der Mutante *P. verruculosum* IMET 43858 zur Gewinnung des Cellulase-Enzymkomplexes ist in Abhängigkeit der verwendeten Substrate oder Substratkombinationen und der zu erzielenden Enzymzusammensetzung verschieden.

Zur Bildung des Cellulase-Enzymkomplexes ohne erhöhten Anteil an Nebenaktivitäten kann reine Cellulose als induzierendes Substrat eingesetzt werden. Bis zu einer Konzentration von etwa 2% Cellulose ist in diskontinuierlicher Fermentation die im Fermentationsmedium gebildete Cellulosemenge proportional der eingesetzten Cellulosemenge. Höhere Cellulosekonzentrationen führen zu einer höheren Cellulaseaktivität im Fermentationsmedium, wobei die Zunahme der Cellulaseaktivität dann jedoch nicht mehr der eingesetzten Cellulosemenge proportional ist, so daß die Cellulaseausbeute

absinkt. Eine der eingesetzten Cellulosemenge proportionale Erhöhung der Cellulasebildung ist gemäß einer beschriebenen fed-batch-Technik möglich, bei welcher die Zuführung der Cellulose mittels einer Regeleinrichtung oder einer rechnergestützten Prozeßsteuerung von der spezifischen Kohlendioxidentwicklung des Mycels angesteuert wird.

Mittels Weizenkleie, Brennerereischlempe oder anderer komplexer Nährmediumsbestandteile kann die Bildung von Nebenaktivitäten wie beispielsweise Hemicellulase, Amylase und Pektinase erhöht werden.

Für die Herstellung zellwandlytischer Enzyme werden zweckmäßig Pilzzellwände als induziertes Substrat eingesetzt. Der gebildete Enzymkomplex hat eine Zusammensetzung auf Grund derer er beispielsweise zur Herstellung von lebenden Pilzprotoplasten geeignet ist.

Die Bildung des Cellulase-Enzymkomplexes kann auch auf Basis löslicher induzierender Substrate oder löslicher nichtinduzierender Substrate in Kombination mit induzierenden Substraten erfolgen. Dafür ist eine fed-batch-Technik geeignet, bei welcher die löslichen induzierenden Substrate oder die löslichen nichtinduzierenden Substrate oder eine Kombination löslicher induzierender und löslicher nichtinduzierender Substrate in einer solchen Weise dem Fermentationsmedium zugeführt werden, daß die sich im Fermentationsmedium einstellende aktuelle Konzentration der löslichen Substrate in einem Bereich liegen, in welchem die Cellulasebildung induziert aber nicht reprimiert wird. Die obere Grenze dieses Bereiches wird durch die Katabolitrepression des Cellulasebildungsvermögens bestimmt, welche dem jeweils eingesetzten Substrat entspricht.

Der Fermentationsprozeß bei der fed-batch-Technik besteht aus einem diskontinuierlichen Abschnitt (batch) und der Substratzuführungsphase (fed-batch-Abschnitt). Die batch-Phase dient der Anzucht von Mycel, während in der Substratzuführungsphase vorwiegend die Enzymbildung erfolgt. Die Substratzuführung wird entweder mittels der Kohlendioxidkonzentration des Fermentationsabgases angesteuert oder aber nach einem empirisch ermittelten Zeitregime vorgenommen. Werden nichtinduzierte Substrate wie beispielsweise Glycerol oder Galactose zugeführt, so muß das Grundnährmedium mindestens ein induzierendes Substrat enthalten, wie z. B. Cellulose, Weizenkleie oder Brennerereischlempe. Es ist möglich, das Mycel im batch-Abschnitt der Fermentation auf Basis nichtinduzierender Substrate, wie z. B. Glucose, Glycerol, Fructose, anzuziehen, da die Katabolitrepression bei der Mutante IMEt 43858 nach Verbrauch des reprimierenden Substrates nicht nachwirkt.

Durch gezielte Veränderung des pH-Wertes während der Fermentation läßt sich die Zusammensetzung des Cellulase-Enzymkomplexes beeinflussen. Einige Nebenaktivitäten, wie beispielsweise Xylanase, Amylase und β -Glucosidase, werden bei höheren pH-Werten stärker gebildet; es ist auch möglich, mittels pH-Abfall auf pH = 3,1 einen Cellulase-Enzymkomplex herzustellen, der keine β -Glucosidase-Aktivität enthält.

Die Abtrennung und Reinigung der gewonnenen Enzyme kann mittels bekannter Verfahren vorgenommen werden. Je nach Applikation können das nichtaufgearbeitete Fermentationsmedium, das Kulturfiltrat, getrocknete Rohenzyme oder gereinigte Enzyme eingesetzt werden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1:

In einem Rührfermentor mit einem Bruttovolumen von 30 Litern wird der Stamm IMEt 43858 für die Gewinnung des Cellulase-Enzymkomplexes kultiviert.

Als Substrat dienen Glucose, wäßriger Weizenkleie-Auszug und Cellulose. Die Glucose wird in dem wäßrigen Weizenkleie-Auszug gelöst und mittels fed-batch-Technik dem Fermentationsmedium zugegeben.

Fermentor:

Der Fermentor ist mit einem allgemein gebräuchlichen Sechsstab-Scheibenrührer versehen, dessen Gesamtdurchmesser etwa ein Drittel des Fermentorinnendurchmessers beträgt. Die Einbauhöhe des Rührers im Fermentor beträgt etwa ein Fünftel der Gesamthöhe des Fermentorinnenraumes. Die Begasung des Fermentors erfolgt über einen unterhalb des Rührers befindlichen Ring, welcher etwa den gleichen Durchmesser wie der Rührer aufweist und mit je 1 mm breiten Öffnungen im Abstand von je 8 mm versehen ist. Der Fermentor ist mit der allgemein gebräuchlichen Meß- und Regeltechnik ausgestattet, insbesondere mit einer Temperatur-, Meß- und Regeleinrichtung, einer pH-Meß- und Regeleinrichtung, einer Gelöst-Sauerstoff-Messung und einer Meßeinrichtung für die CO_2 -Konzentration des Fermentorabgases gekoppelt mit einem Steuersignal, beispielsweise zur Ansteuerung von Dosierpumpen. Mittels einer automatisch geregelten Schaumbekämpfung wird eine überschüssige Entschäumerzugabe vermieden.

Das Anfangsvolumen beträgt 12 Liter, bestehend aus 11 Liter Grundnährmedium plus 1 Liter Inokulum.

Zusammensetzung des Grundnährmediums

KH_2PO_4	45 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	60 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,5 g
CaCl_2	4,5 g
Mikrokristalline	
Cellulose	150 g
Weizenkleie	30 g
Tween 80	15 g

Herstellung der Glucoselösung:

90 g Weizenkleie werden in 3 Litern Wasser suspendiert und kurzzeitig zum Sieden erhitzt; nach dem Abkühlen werden die Feststoffe abgetrennt (z. B. Zentrifugation). Im Fugat werden 900 g Glucose (z. B. handelsübliche Sorte) gelöst. Mit Wasser wird auf 3 Litern aufgefüllt und sterilisiert.

Die Bestandteile des Grundnährmediums werden in 11 Liter Leitungswasser gelöst bzw. suspendiert, sterilisiert und unter Ausschluß von Fremdkeimen in den sterilisierten Fermenter gegeben. Anschließend wird der Fermenter mit 1 Liter frischer Mycelsuspension (Inokulum) beimpft.

Inokulum:

Das Inokulum wird in 10 Schüttelkolben mit je 100 ml Nährmedium hergestellt. Das Nährmedium hat folgende

Zusammensetzung:

KH_2PO_4	15 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,5 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3 g/l
CaCl_2	0,3 g/l
Weizenkleie	2 g/l
Glucose	25 g/l

Die Kolben werden mit je etwa 10^7 Konidien einer 10 bis 20 Tage alten Abimpfung des hinterlegten Stammes IMET 43858 beimpft und 24 bis 32 Stunden bei 30 bis 32°C und ohne Korrektur des pH kultiviert.

Fermentation:

Die Kultivierungstemperatur wird zu Beginn der Fermentation auf 32°C eingestellt; die Regelgrenzen für den pH werden auf 4,0 (untere Regelgrenze) und 5,5 (obere Regelgrenze) eingestellt; die Rührerdrehzahl beträgt 500 U/min und die Begasungsmenge 450 Norm-Liter-Luft je Stunde. Als Antischaummittel wird Silikonentschäumer NM 40 verwendet.

Der pH-Wert liegt zu Beginn der Fermentation innerhalb des Sollbereiches, je nach Zustand und Alter des Inokulums bei etwa 4,2 bis 5,4. Während der Fermentation tritt ein Abfall des pH ein; bei Erreichen der unteren Regelgrenze wird mittels 12%iger Ammoniaklösung der pH bei 4,0 konstant geregelt. Mitunter ist – bedingt durch den Weizenkleie-Zusatz – in der Anfangsphase ein zwischenzeitlicher Anstieg des pH zu verzeichnen, der im Falle des Erreichens der oberen Regelgrenze eine Konstantregelung des pH mittels 10%iger Schwefelsäure bei 5,5 erfordert.

Mit der Zuführung der Glucoselösung wird begonnen, nachdem die Kohlendioxidkonzentration im Fermentationsabgas dasjenige Maximum überschritten hat, welches sich nach dem Verbrauch der leicht utilisierbaren Bestandteile der Weizenkleie und der mit dem Inokulum eingebrachten restlichen Glucose ausbildet und auf 80% des Maximalwertes abgesunken ist. Gleichzeitig wird die Fermentationstemperatur auf 28°C abgesenkt.

Die Kohlendioxidkonzentration von 80% des Maximalwertes wird zu Beginn der Glucosezuführung als Regelgrenze eingestellt; bei Unterschreitung der Regelgrenze wird eine Förderpumpe eingeschaltet, welche die Glucoselösung dem Fermentationsmedium so lange zuführt, bis die Kohlendioxidkonzentration die Regelgrenze wieder überschreitet. Die Förderleistung der Pumpe wird auf eine Menge von 0,1 l/h eingestellt. Bei erneutem Absinken der Kohlendioxidkonzentration unter die Regelgrenze wird die Pumpe wieder eingeschaltet, bis die Regelgrenze wieder überschritten wird. Auf diese Weise werden insgesamt 3 Liter der Glucoselösung dem Fermentationsmedium zugeführt.

Die Begasungsmenge wird mit der Zunahme des Fermentationsmediums proportional erhöht. Die Kohlendioxidkonzentration im Fermentationsabgas hat während der Substratzuführung einen oszillatorischen Verlauf.

Die Fermentation wird beendet, nachdem die 3 Liter Glucoselösung zugeführt sind, entsprechend einer Gesamtfermentationszeit von 5 bis 6 Tagen.

Die Filterpapieraktivität im Kulturfiltrat beträgt etwa 8 U/ml, die β -Glucosidaseaktivität etwa 6 U/ml.

Beispiel 2:

Die Stämme *Penicillium verruculosum* Itc 71 und IMET 43858 werden in Schüttelkolben 7 Tage bei 30°C und ohne Korrektur des pH kultiviert. Es werden Schüttelkolben mit je 100 ml des Nährmediums in drei Parallelversuchen hergestellt. Sämtliche Schüttelkolben werden mit der gleichen Menge einer Konidiensuspension beimpft, welche von einer 10 bis 20 Tage alten Abimpfung des jeweiligen Stammes gewonnen wird. Die Konidiensuspension wird unter Ausschluß von Fremdkeimen über eine G2-Glasfritte filtriert, um Reste noch vorhandenen Mycels zu entfernen. Die Menge der für die Beimpfung eines jeden Schüttelkolbens verwendeten Konidiensuspension wird so bemessen, daß die Kolben mit jeweils 10^7 Konidien beimpft werden.

Das Nährmedium hat folgende Zusammensetzung:

KH_2PO_4	15 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4,8 g/l
CaCl_2	0,3 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g/l
Tween 80	1 g/l
Heweten 10 Hz	10 g/l
Weizenkleie	5 g/l

Die Kulturfiltrate werden mittels Ultrafiltration etwa 10:1 aufkonzentriert.

Die analytischen Untersuchungen der Konzentrate ergeben folgende Werte:

		IMET 43858	ItC 71
Protein	/mg/ml/	19,0	3,2
Xylanase	/U/mg Protein/	2,68	2,75
Endoglucanase	/U/mg Protein/	3,87	1,07
β -Glucosidase	/U/mg Protein/	0,0	0,13
End-pH		2,9	4,3

Der Cellulase-Enzymkomplex der hinterlegten Mutante ist in diesem Beispiel frei von β -Glucosidase, da infolge des hohen Celluloseumsatzes während der Fermentation der pH-Wert zwischenzeitlich auf Werte kleiner pH3 absinkt.