[B] (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLÄGGNINGSSKRIFT 69484

C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 10 02 1986

(51) Kv.lk.⁴/Int.Cl.⁴ C 12 N 9/42

SUOMI—FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patenttihakemus — Patentansökning 801137
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag 09.04.80
(23) Alkupäivä — Giltighetsdag 09.04.80
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig 10.10.80
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 31.10.85

(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet 09.04.79
USA(US) 028500

(71) SRI International, 333 Ravenswood Avenue, Menlo Park, California 94025, USA(US)

(72) Wilfred A. Skinner, Portola Valley, California, USA(US)
Shigeyuki Takenishi, Nara, Japani-Japan(JP)

(74) Berggren Oy Ab

(54) Menetelmä β-glukosidaasin saannon lisäämiseksi viljeltäessä Thielavia terrestris-mikro-organismia - Förfarande för att öka utbytet av β-glukosidas vid odling av mikroorganismen Thielavia terrestris

Esillä oleva keksintö koskee menetelmää β-glukosidaasin, erityisesti lämmönkestävän β-glukosidaasin saannon lisäämiseksi pienentämättä C_1-C_X-sellulaasin tuottoa, jolloin Thielavia terrestris-mikro-organismia viljellään standardiväliaineessa ja tuotetut entsyymit mahdollisesti puhdistetaan

a) suodattamalla kasvuliuos,

b) saostamalla entsyymit kyllästetyllä ammoniumsulfaattiliuoksella,

c) liuottamalla ja suorittamalla sitten suolanpoisto geelisuodatuksella,

d) eluoimalla natriumkloridilla,

e) geelisuodattamalla edelleen useiden erotettujen, aktiivista β-glukosidaasia ja aktiivista C_1- ja C_X-entsyymiä sisältävien fraktioiden saamiseksi.

On todettu, että Thielavia terrestris-mikro-organismista saatu entsyymiseoksen sellulaasiaktiivisuus, jota on kuvattu US-patenttijulkaisussa 4 081 328, voidaan puhdistaa ja/tai erottaa

saadun aktiivisuuden lisäämiseksi. Lisäksi on yllättäen havaittu, päinvastoin kuin aikaisemmissa muita sellulaasia tuottavia mikro-organismeja käsittelevissä julkaisuissa, joissa glyserolilla on esitetty olevan inhibointivaikutus, ettei tällaisia tuloksia saada käyttäen Thielavia terrestris-mikro-organismia sellulaasia tuottavana organismina. Täten on todettu, että käyttämällä edellä mainittua mikro-oraganismia glyserolin läsnäollessa on mahdollista lisätä β-glukosidaasisaanto noin 5-kertaiseksi vähentämättä C_1/C_X-selluloosatuotantoa.

Seuraavat julkaisut käsittelevät glyserolin tai glukoosin vaikutuksesta tapahtuvaa sellulaasituoton estymistä käytettäessä muita mikro-organismeja kuin Thielavia terrestris:

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

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

Montenecourt at al., 1977, Preparation of Mutants of Trichodermia reisei with Enhanced Cellulase Production, Appl. and Env. Microbiol., 34, n:o 6, 777-782. Tämä tutkimus osoitti, että 5 % glyserolia esti sellulaasin tuottoa ja vähensi myös huomattavasti syntetisoituneen ekstrasellulaarisen proteiinin määrää verrattuna vastaavaan proteiinin määrään selluloosan ollessa ainoa hiilen lähde.

Päinvastoin kuin tekniikan tason perusteella on odotettavissa, on nyt havaittu, että lisättäessä glyserolia Thielavia terrestris mikro-organismia sisältävään ravintoväliaineeseen, jota käytetään tuottamaan sellulaaseja mainitusta organismista, on mainittujen entsyymien tuotto lisääntynyt. Edelleen havaittiin, että C_1 ja C_X entsyymiaktiivisuuksien tuottoon ei glyserolin lisäys vaikuttanut, mutta sen sijaan β-glukosidaasiaktiivisuuksien tuotto saattoi lisääntyä noin 5-kertaiseksi. Edelleen suorittamalla geelisuodatus-erotusmenetelmä havaittiin, että glyserolin läsnäollessa β-glukosidaasien koostumus erosi standardi ravintoväliaineessa muodostuneen entsyymin koostumuksesta. Lämmönkestävämpien β-glukosidaasien osuus kasvoi suhteessa vähemmän lämmönkestävien entsyymien osuuteen, joka on tärkeä käytännön tulos, koska lämmönkestävyys on erittäin toivottava ominaisuus pyrittäessä lisäämään glukoosisaantoja selluloosapitoisista aineksista, jolloin käytetään korkeampia lämpötiloja. Kuumentamisen aikana mahdollistaa sellulaasien lämmönkestävyys näiden entsyymien aktiivisuuden säilymisen kun taas samanaikaisesti läsnäolevat suhteellisen lämpöherkät ei-toivotut entsyymit hajoavat. Esimerkkejä tällaisista entsyymeistä, jotka siis voidaan eliminoida mainitulla tavalla niin, että arvokkaat sellulaasit säilyvät, ovat sellaiset, jotka aiheuttavat ei-toivottuja reaktioita kuten proteiinien hydro-

lyysiä, erilaisia deaminaatioita, lipidien hydrolyysiä ym.

Tutkittaessa ravintoväliaineeseen lisättävän glyserolin määrän vaikutusta β-glukosidaasin tuoton lisääntymiseen havaittiin, että niin alhaisella glyserolipitoisuudella kuin 0,5 paino-% on vaikutusta β-glukosidaasisaantoihin ja glyserolipitoisuuksilla 5 paino-%:iin asti on edullinen vaikutus. Tämä ilmiö on täysin odottamaton, koska kuten todettiin, on hyvin tunnettua, että glukoosi ja glyseroli aiheuttavat kataboliittirepressiota esim. Trichoderma-suvun sellulolyyttisten entsyymien tuotolle.

Näin ollen keksinnön mukaiselle, selityksen alkuosassa esitettyä tyyppiä olevalle menetelmälle β-glykosidaasin saannon lisäämiseksi on tunnusomaista, että standardiväliaineeseen lisätään viljeltäessä 0,5-5 paino-% glyserolia.

Tämän odottamattoman vaikutuksen selvittämiseksi, jonka glukoosi ja glyseroli aiheuttavat Thielavia terrestris-mikroorganismin sellulolyyttisten entsyymien tuottoon, tehtiin lukuisia tutkimuksia käyttäen erilaisia ravintoväliaineen koostumuksia seuraavasti:

A) Ravintoväliaineen koostumus
(Avicel 105 on selluloosajauhe ja CSL on maissinliuotusvesi)

N:o	Tavanomainen ravintoväliaine*	Avicel 105	Peptoni	CSL	Glukoosi	Sellobioosi	Glyseroli
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

*Tavanomainen ravintoväliaine: KH_2PO_4 6,8 g/l, $(NH_4)_2SO_4$ 1,3 g/l $MgCO_4$ $7H_2O$ 0,5 g/l, $CaCl_2$ 0,2 g/l, hivenaineliuos 2 ml/l.

B) Kasvatus: Valmistettiin esiviljelmä siirrostamalla pieni määrä rihmastoa vinopinnalta 250 ml pulloon, joka sisälsi 100 ml ravintoväliainetta n:o 2. Pulloa pidettiin pyörivässä ravistelijassa 48°C:ssa 48 tuntia. Pääkasvatus aloitettiin siirtämällä aina 2 ml esiviljelmän ravintoväliainetta 250 ml pulloihin, jotka sisälsivät 100 ml yllä mainittuja eri ravinto-

väliaineita. Kasvatus tapahtui pyörivässä ravistelijassa 48°C:ssa.

C) Tulos:
Kuten kuvioista nähdään estyy sellulolyyttisten entsyymien tuotto Thielavia terrestris mikro-organismilla glukoosin vaikutuksesta aivan kuten Trichoderma-suvulla. Kuitenkaan ei glyserolilla ollut mitään vaikutusta C_1- ja C_X-aktiivisuuksien tuottoon (C_1 on suodatinpaperiaktiivisuus). Thielavia terristris tuotti noin 5-kertaisen määrän β-glukosidaasia kasvatettaessa ravintoväliaineessa, joka sisälsi 5 % glyserolia verrattuna standardi ravintoväliaineessa (NO_2) tapahtuneeseen tuottoon (vertaa US-patenttia n:o 4 081 328). Geelisuodatuksessa havaittiin myös, että β-glukosidaasin koostumuksessa oli eroja verrattaessa standardi-ravintoväliaineessa ja glyserolia sisältäneessä väliaineessa tuotettuja entsyymejä keskenään.

Selluloosa-aktiivisuuden optimilämpötilan todettiin olevan noin 60°C. Aktiivisuudet voidaan määrittää seuraavien koemenetelmien avulla. Thielavia terrestris mikro-organismin tuottamien lämmönkestävien sellulaasien aktiivisuus on 10-12 suodatinpaperiaktiivisuusyksikköä, 25-30 aryyli-β-glukosidaasiyksikköä ja 80-90 CMC-aasiyksikköä 1 ml:ssa kasvuliuoksen suodosta.

Entsymaattiset kokeet

1. Suodatinpaperiaktiivisuus

Substraattina käytettiin 100 mg:n painoista suodatinpaperiliuskaa (1 x 12 cm) Whatman n:o 1. Koeputkessa (16 x 150 mm) oleva koeseos sisältää 1 ml 0,5 M asetaattipuskuria pH 5,0, suodatinpaperiliuskan taitettuna palkeen muotoiseksi ja 1 ml laimennettua entsyymiliuosta. Seosta pidetään vesihauteella (60°C) 1 tunnin ajan. Inkuboinnin jälkeen lisätään 2 ml dinitrosalisyylihapporeagenssia koeseokseen ja muodostuneet pelkistävät sokerit määritetään DNS-menetelmällä ja lasketaan glukoosiekvivalentteina. Yksi suodatinpaperiaktiivisuusyksikkö määritellään sellaiseksi entsyymimääräksi, joka tuottaa 1 mg:n glukoosiekvivalentteina ilmoitettuja pelkistäviä sokereita edellä mainituissa olosuhteissa.

2. CMC-aasi

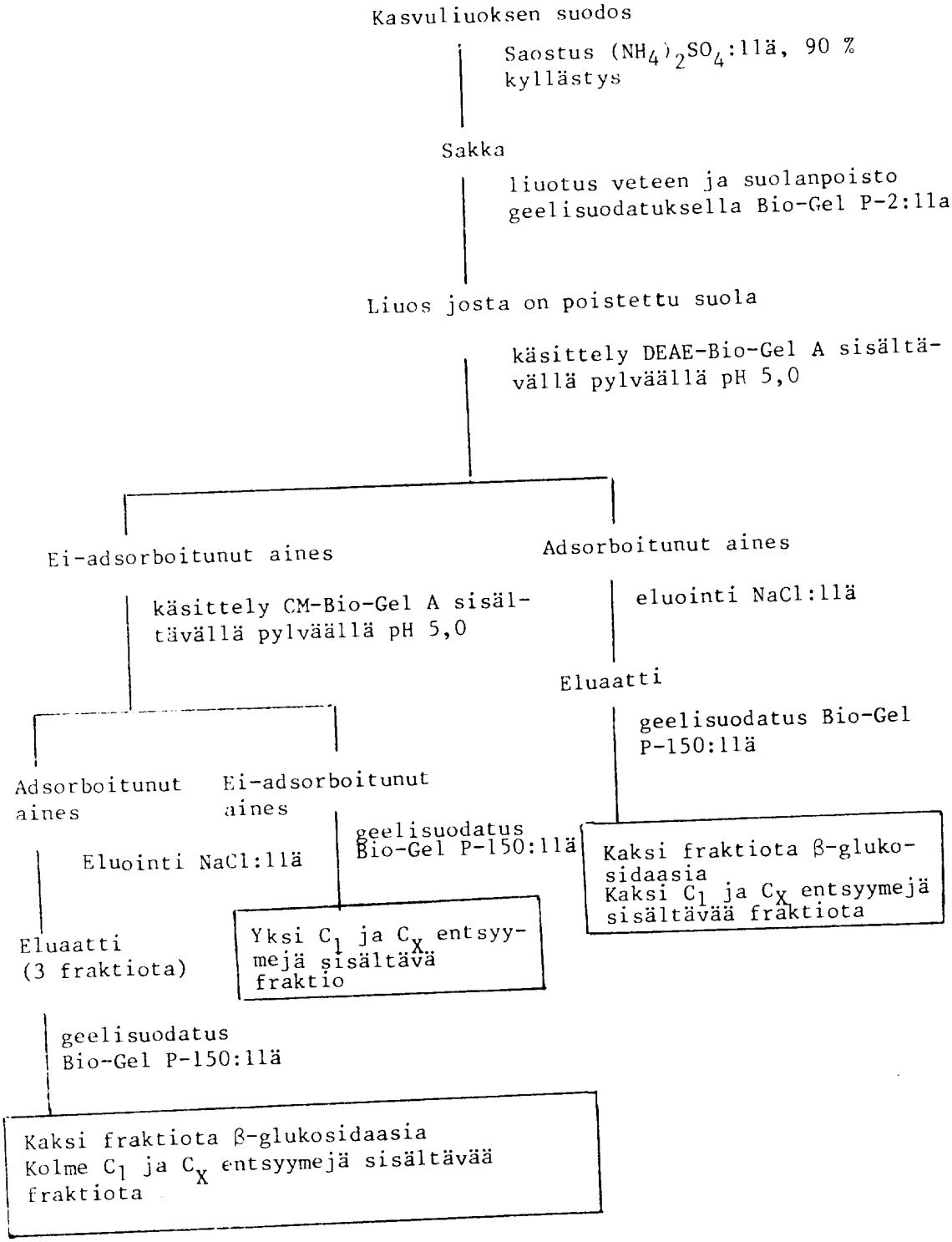
Koeseos sisältää 1 ml 1 % karboksimetyyliselluloosaa (SIGMA, tuote n:o C-8758) 0,5 M asetaattipuskurissa pH 5,0 ja 1 ml laimennettua entsyymiliuosta. Seosta pidetään 30 min 60°C:ssa. Inkuboinnin jälkeen lisätään seokseen 2 ml dinitrosalisyylihapporeagenssia ja pelkistävät sokerit määritetään DNS-menetelmällä ja lasketaan glukoosiekvivalentteina. Yksi CMC-aasiyksikkö määritellään sellaiseksi entsyymimääräksi, joka tuottaa 1 mg:n glukoosiekvivalentteina ilmoitettuja pelkistäviä sokereita edellä mainituissa olosuhteissa.

3. Aryyli-β-glukosidaasi

Substraattina käytettiin o-nitrofenyyli-β-D-glukopyranosidia. Koeseos sisältää 0,5 ml 10 mM o-nitrofenyyli-β-D-glukopyranosidia, 0,5 ml 0,5 M asetaattipuskuria pH 5,0 ja 1 ml laimennettua entsyymiliuosta. 30 min. inkuboinnin jälkeen 60° C:ssa lisätään 2 ml 0,2 M natriumkarbonaattia seokseen. Vapautunut o-nitrofenoli määritetään mittaamalla absorbanssi aallonpituudella 410 nm. Yksi aryyli-β-glukosidaasiyksikkö määritellään sellaiseksi entsyymimääräksi, joka tuottaa 1 µmoolin o-nitrofenolia edellä mainituissa olosuhteissa.

Käyttämällä näitä koemenetelmiä fraktioinnin seuraamiseen erotettiin C_1, C_X ja β-glukosidaasit toisistaan seuraavan kaavan mukaisesti:

PUHDISTUSMENETELMÄ



Kuviosta 1 nähdään, että näiden entsyymien erottamisessa onnistuttiin siinä määrin, että saatiin eristettyä toisistaan kaksi homogeenistä β-glukosidaasia. Kuvio 1 osoittaa pH:n vaikutuksen kahden β-glukosidaasin aktiivisuuteen.

Käyttämällä edellä esitetyssä fraktiointikaaviossa mainittua geelisuodatusta Bio-Gel P-150:llä, erotettiin β-glukosidaasit kahteen homogeeniseen fraktioon eluoimalla 0,1 M natriumasetaattipuskurilla pH 5,0. Virtausnopeus oli 27 ml/h ja kerättiin 7 ml:n fraktioita.

Kuvioista 2, 3, 4 ja 5 voidaan todeta, että päinvastoin kuin aiemmissa muita sellulaasin tuottajia koskeneissa tutkimusraporteissa on todettu, lisäsi glyseroli odottamatta β-glukosidaasin tuoton Thielavia terrestris organismilla noin 5-kertaiseksi kun taas C_1/C_X-tuotto pysyi muuttumattomana.

β-glukosidaasien koostumus muuttui myös glyserolin läsnäollessa verrattuna standardiravintoväliaineessa tuotettuihin (kuvio 4). Lämmönkestävämmän β-glukosidaasin määrä kasvoi suhteessa vähemmän lämmönkestävän entsyymin määrään, mikä on käytännön kannalta tärkeä tulos, koska lämmönkestävyys on tärkeä ominaisuus haluttaessa lisätä selluloosapitoisista aineksista saatavia glukoosimääriä.

Tutkittaessa ravintoväliaineen glyserolikonsentraation vaikutusta β-glukosidaasisaantoihin havaittiin, että niin alhaisella glyserolipitoisuudella kuin 0,5 % oli positiivinen vaikutus.

Kuvio 2 esittää pH:n ja C_1-aktiivisuuden muutoksia kasvuajan funktiona käytettäessä erilaisia ravintoväliaineita. Suorittamalla vertailu esimerkin n:o 1 mukaisessa väliaineessa saatuihin tuloksiin voidaan arvioida eri ravintoväliaineiden vaikutus C_1-aktiivisuuden ja pH-muutoksiin kasvuajan kuluessa. Tällöin on havaittavissa, että glukoosi estää selluloosaentsyymien tuottoa, mutta että glyserolilla ei ole mitään vaikutusta C_1- ja C_X-aktiivisuuksiin, vaikkakin se lisäsi β-glukosidaasisaantoa.

Kuvio 3 osoittaa ravintoväliaineen muuttamisen vaikutukset β-glukosidaasi- ja C_X-aktiivisuuksiin.

Kuvio 4 esittää tulokset geelisuodatuksen avulla tapahtuvasta β-glukosidaasien erottamisesta käytettäessä entsyymintuottoon standardi-ravintoväliainetta sekä glyserolia sisältävää väliainetta, jolloin nähdään kuinka glyserolin lisäys vaikuttaa kahden erilaisen β-glukosidaasin saantoihin. Fraktio n:o noin 80 on kasvanut lisättäessä glyserolia ja tämä on lämmönkestävämpi puhdistetuista kahdesta β-glukosidaasista.

Kuvio 5 osoittaa, että glyserolin lisääminen ravintoväliaineeseen suosii lämmönkestävämmän β-glukosidaasin tuottoa.

Kuvio 6 esittää glyserolikonsentraation vaikutusta β-glukosidaasien tuottoon. On ilmeistä, että saannot lisääntyvät huomattavasti lisättäessä glyserolia standardi-ravintöväliaineeseen. Jopa niin alhaisella glyserolikonsentraatiolla kuin 0,5 % on positiivinen vaikutus entsyymisaantoon selluloosan ollessa substraattina.

Helposti käytettävissä olevien glukoosilähteiden merkitystä on hahmoteltu edellä ja US-patentissa n:o 4 081 328.

Keksinnön mukaisia uusia menetelmiä käyttäen on nyt mahdollista saada suurempia määriä β-glukosidaasia Thielavia terrestris mikro-organismista. Edelleen on mahdollista puhdistaa ja/tai erottaa β-glukosidaasi esitettyjen uusien erotusmenetelmien avulla. Erotettua β-glukosidaasia voidaan nyt käyttää tehokkaalla ja taloudellisella tavalla muuttamaan selluloosapitoisia materiaaleja, esim. osaksi muutettua selluloosapitoista materiaalia, jolloin voidaan lisätä glukoosin tuottoa. Eräässä erityisessä sovellutusmuodossa voidaan β-glukosidaasi sitoa kiinteään kantajaan tai polymeeriseen matriisiin, jolloin entsyymiä käytetään muuttamaan tehokkaasti konsentroitujen liuosten sisältämää selluloosapitoista raaka-ainetta glukoosiksi.

Keksintöä on edellä kuvattu yksityiskohtaisesti viitaten erityisesti erääseen suosittuun toteutusmuotoon, mutta on selvää, että alan asiantuntijan mieleen saattaa johtua muunnoksia keksinnön hengessä ja sen sallimissa puitteissa.

Patenttivaatimus

Menetelmä β-glukosidaasin, erityisesti lämmönkestävän β-glukosidaasin saannon lisäämiseksi pienentämättä C_1/C_X-sellulaasin tuottoa, jolloin Thielavia terrestris mikro-organismia viljellään standardiväliaineessa ja tuotetut entsyymit mahdollisesti puhdistetaan

a) suodattamalla kasvuliuos,

b) saostamalla entsyymit kyllästetyllä ammoniumsulfaattiliuoksella,

c) liuottamalla ja suorittamalla sitten suolanpoisto geelisuodatuksella,

d) eluoimalla natriumkloridilla,

e) geelisuodattamalla edelleen useiden erotettujen, aktiivista β-glukosidaasia ja aktiivista C_1- ja C_x-entsyymiä sisältävien fraktioiden saamiseksi, t u n n e t t u siitä, että standardiväliaineeseen lisätään viljeltäessä 0,5-5 paino-% glyserolia.

Patentkrav

Förfarande för att öka utbytet av β-glukosidas, isynnerhet värmebeständigt β-glukosidas, utan att minska produktionen av C_1/C_X-cellulas, varvid mikroorganismen Thielavia terrestris odlas i ett standardmedium och de bildade enzymerna eventuellt renas genom

a) filtrering av odlingslösningen,

b) utfällning av enzymerna med en mättad lösning av ammoniumsulfat,

c) upplösning och därefter avsaltning medelst gelfiltrering,

d) eluering med natriumklorid,

e) ytterligare gelfiltrering för erhållande av flera separerade fraktioner av aktivt β-glukosidas och av aktivt C_1- och C_X- enzym, k ä n n e t e c k n a t av att man till standardmediet vid odlingen sätter 0,5-5 vikt-% glycerol.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Patenttijulkaisuja:-Patentskrifter: USA(US) 3 734 831 (C 07 g 7/02), 4 081 328 (C 12 D 13/10), 4 106 989 (C 12 D 13/10).
Muita julkaisuja:-Andra publikationer: Chem. Abstr. vol. 85 (1976): 43546e.

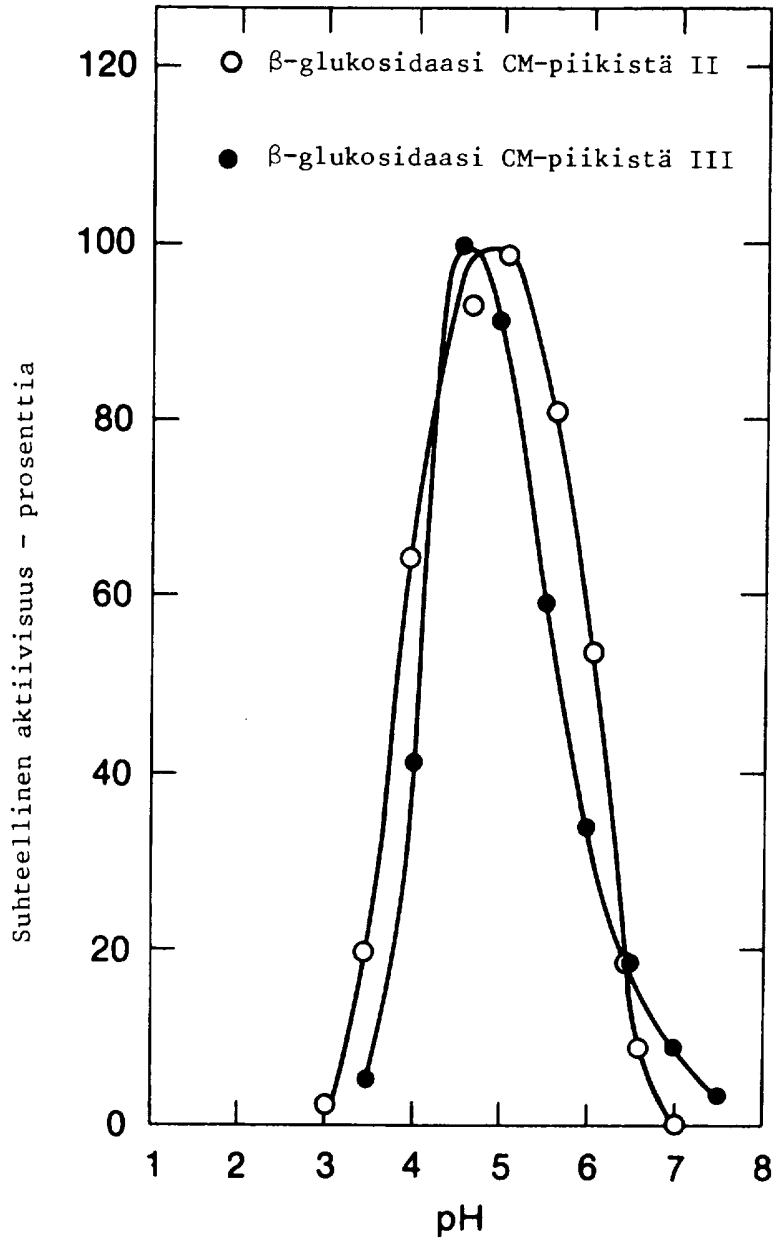


Figure 1 pH:n vaikutus kahden β-glukosidaasin entsyymiaktiivisuuteen

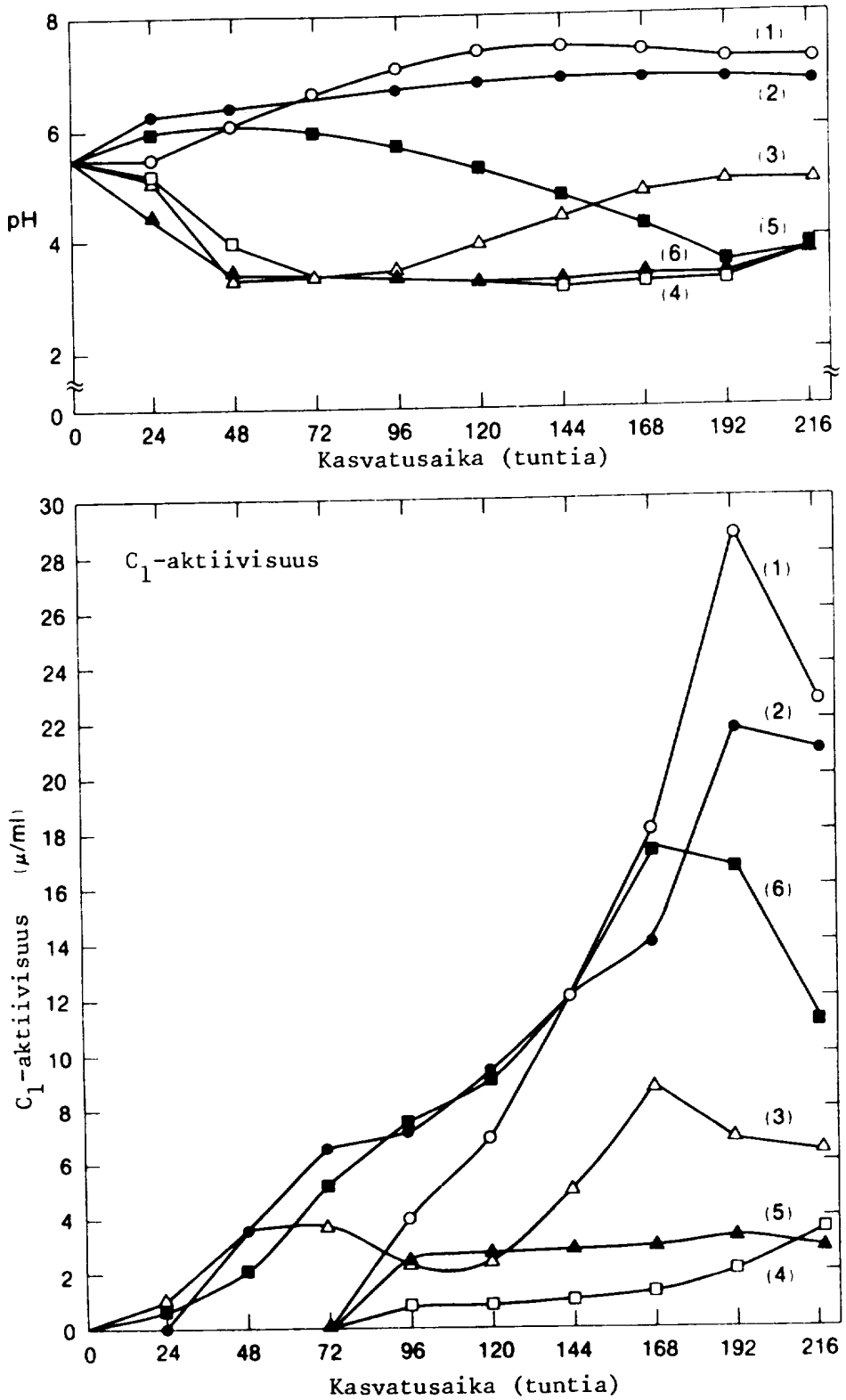


Figure 2 pH ja C_1-entsyymiaktiivisuuden muutokset kasvuajan kuluessa käytettäessä erilaisia ravintoväliaineita

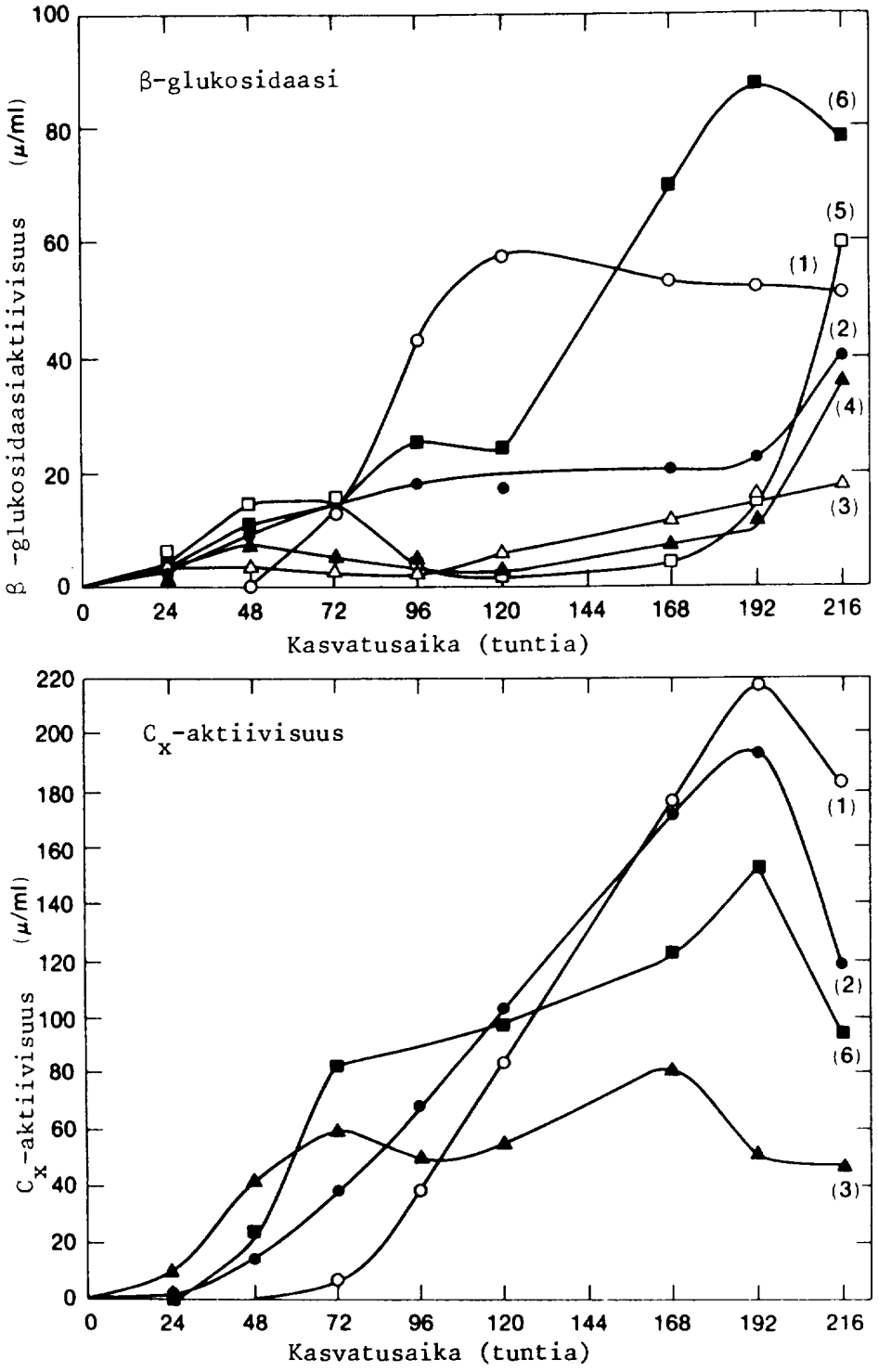


Figure 3 Ravintoväliaineen muuttamisen ja kasvatusajan vaikutus β-glukosidaasin ja C_x-entsyymin aktiivisuuksiin

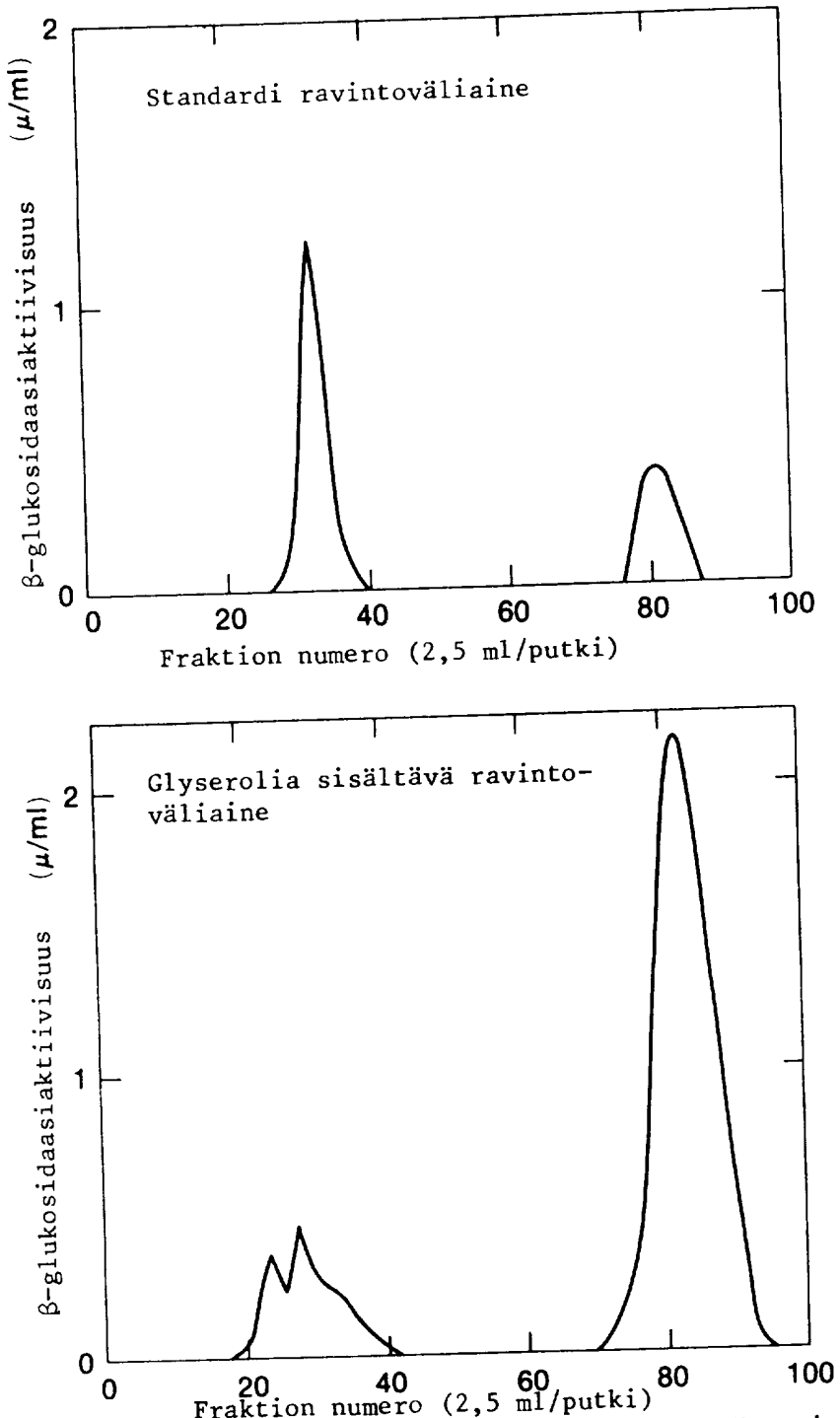


Figure 4 Standardi ja glyserolia sisältävässä ravintoväliaineessa tuotettujen β-glukosidaasientsyymien erottaminen geelisuodatuksella

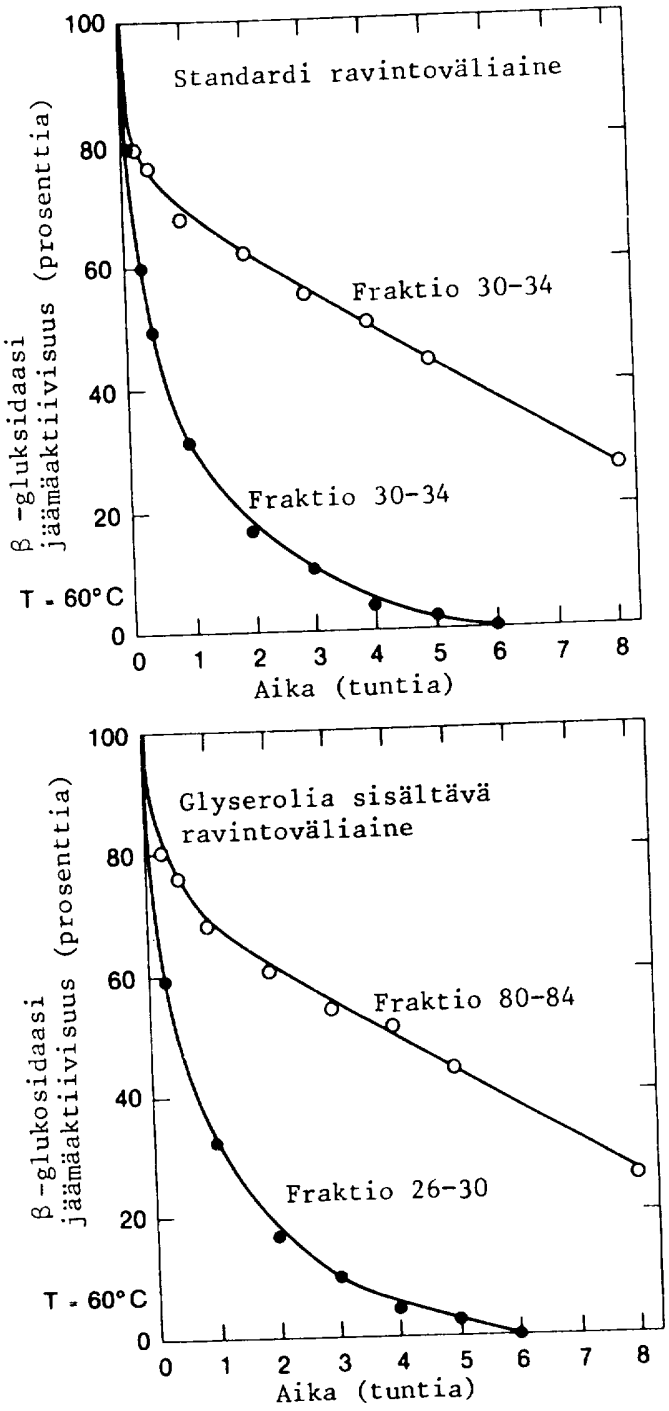


Figure 5 Standardi ja glyserolia sisältävästä ravintoväliaineesta eristettyjen β-glukosidaasientsyymien lämpöstabiilisuus

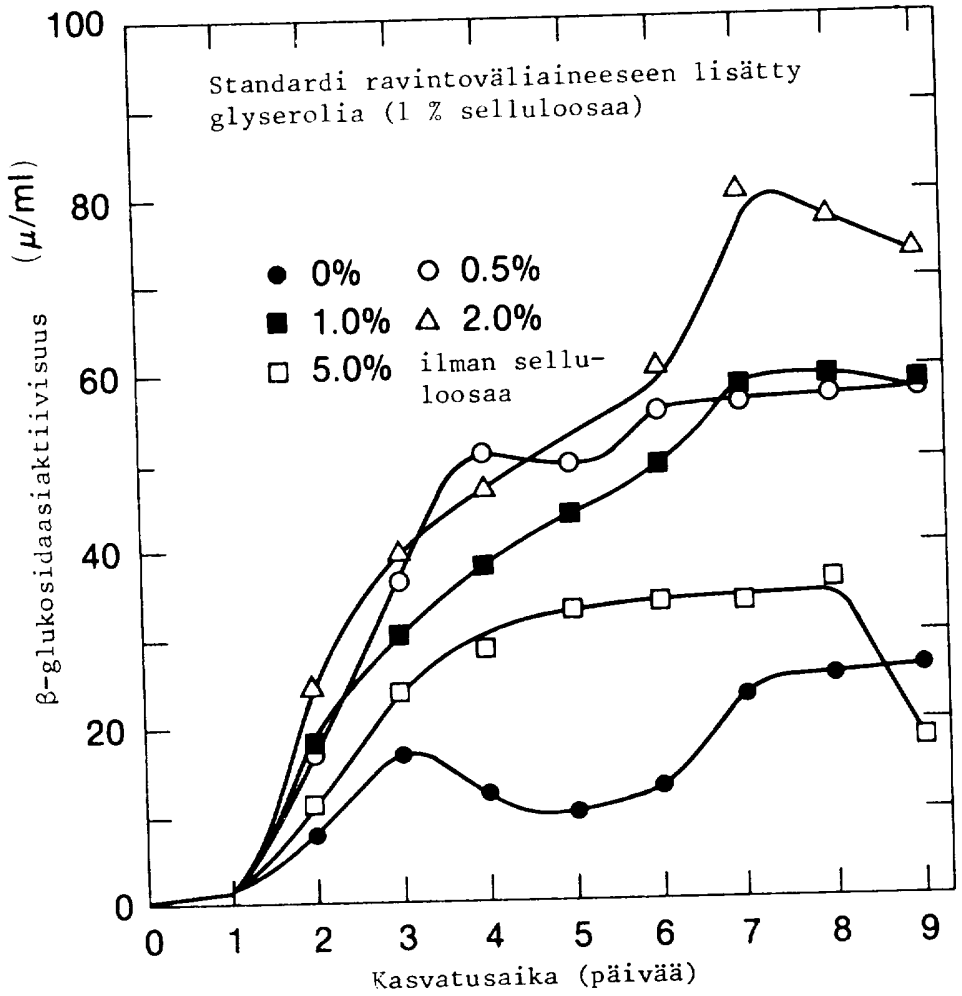


Figure 6

Ravintoväliaineen glyserolin vaikutus β-glukosidaasi entsyymien tuottoon