

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK
AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

PATENTSCHRIFT 145 182

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 29 Absatz 1 des Patentgesetzes

(11)	145 182	(45)	26.11.80	Int. Cl. ³ 3(51)	C 12 D 13/10
(21)	WP C 12 d / 149 914	(22)	28.08.70		

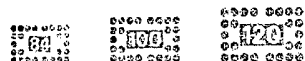
(71) siehe (72)

(72) Hirte, Wolfgang F., Dr.habil.; Glathe, Ingrid, Dr.; Gradel, Annelies, Dr.; Schade, Werner, Dr.; Huber, Johann, Dr., DD

(73) siehe (72)

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

(54) Verfahren zur biotechnischen Herstellung von Cellulose und β -Glucoside spaltenden Enzymen



Verfahren zur biotechnischen Herstellung von Cellulose und β -Glucoside spaltenden Enzymen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur biotechnischen Herstellung von Cellulose- und β -Glucosidespaltenden Enzymen im Emers- und Submersverfahren mittels eines Stammes aus der Gattung Gliocladium.

Zur biotechnischen Herstellung von Cellulasen werden verschiedene Schimmelpilze, z. B. Aspergillus- oder Trichodermaarten, verwendet. Der Einsatz eines Gliocladium-Stammes zur biotechnischen Herstellung von Cellulose und β -Glucosidespaltenden Enzymen ist bisher noch nicht erwähnt worden, obwohl bekannt ist, daß mehrere Arten der Gattung Gliocladium zum Abbau zellulosehaltiger Materialien befähigt sind.

Zweck der Erfindung ist es, einen Stamm einzusetzen, der es gestattet, unter produktionstechnischen Bedingungen rentabel Cellulasen (C_1 und C_x) und β -Glucosidasen in hoher Ausbeute zu gewinnen, die zur Spaltung von Cellulose aus natürlichen Pflanzenmaterialien eingesetzt werden können, so z. B. zum Aufschluß von Obst und Gemüse zur Erhöhung der Saftausbeute, zur Herstellung von Mazeraten und Säften sowie für diätetische Zwecke, zum Aufschluß von Futtermitteln und von Holz und holzartigen Pflanzenmaterialien.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, durch Verwendung eines Stammes der Gattung Gliocladium und durch geeignete Kultivierungsbedingungen zu dem genannten Ziel zu gelangen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß zur biotechnischen Herstellung von Cellulose und β -Glucosidespaltenden Enzymen im Emers- oder Submersverfahren mittels eines Stammes aus der Gattung Gliocladium ein insbesondere unter Verwendung von Cellulosesubstraten selektierter und vorzugsweise in einem Medium mit Cellulose und Grünmehl kultivierter Stamm von Gliocladium spec. Kleinmachnowi verwendet wird.

Der verwendete Stamm von *Gliocladium spec. Kleinmachnowi* mit der Stammanmeldungsnummer 2642, Anmeldungsjahr 1968, (Stamm-sammlung der Humboldt-Universität, Kleinmachnow b. Berlin, Bereich Mikrobiologie, Sektion Nahrungsgüterwirtschaft und Lebensmitteltechnologie, DDR), der durch ein Screening-Pro-gramm unter Verwendung von natürlichen Zellulosesubstraten selektiert und dessen cellulolytische Aktivitäten (C_1 -Aktivi-täten) durch geeignete Kultivierungsbedingungen weiter ge-steigert wurden, grenzt sich nach dem Bestimmungsschlüssel von R a p e r und T h o m (Raper, K. und Ch. Thom, A manual of the Penicillia, Williams and Wilkins Company, Bal-timore 1949, S. 674-687) von den dort beschriebenen Arten und Unterarten dieser Gattung durch den Aufbau seines konidien-tragenden Apparates deutlich ab.

Der Stamm *Gliocladium spec. Kleinmachnowi* ist durch folgende Merkmale gekennzeichnet:

Mikrobiologische Merkmale:

Makroskopisches Wachstum:	Auf Malz-, Czapek-Dox-, Hafer-Erbsmehlagar ausgebreitet, samtig, selten spinnwebarti-ges Luftmyzel über samtigem.
Farbe:	Oberseite dunkel-grünlich, Unterseite farblos
Myzel:	Niederliegend, teilweise Luftmyzel, sep-tiert, glatt
Konidienbildung:	In Köpfchen am Ende eines unterschiedlich differenzierten konidientragenden Appara-tes
Köpfchen:	Köpfchen rund, durch in Schleim zusammen-gehaltene Sporenanhäufungen: durchschnitt-lich trägt 1 Konidienträger 1 bis 3, sel-ten 4 Köpfchen. Köpfchen unterschiedlich groß, je nach Ausbildung des konidientra-genden Apparates.
Konidienträger:	Meist auf niederliegendem Myzel, seltener im Luftmyzel entstehend, unterschiedlich warzig, je nach Nährboden

Konidientragender Apparat:	Länge: sehr unterschiedlich, 14 bis 100 μ verzweigt und unverzweigt 1 bis 3 Stockwerke. Meist 1 bis 2 Stockwerke: Metulae, Sterigmata. Selten 3 Stockwerke: Zweige, Metulae, Sterigmata, in diesem Falle penicilliumähnlich. Zweige einzeln abgehend, seltener gegenständig oder wirtelig.
Metulae:	Glatt
Sterigmata:	Stehen meist zu viert, entweder auf Metulae oder Seitenzweigen oder am Ende eines unverzweigten Konidienträgers, birnenförmig, 6 bis 9 μ lang; 2,5 bis 3,5 μ breit, glatt.
Sporen:	Durch Schleim zusammengehalten, dicht gedrängt auf den Sterigmata. Rundlich bis leicht elliptisch, ca. 4 μ im Durchmesser, glatt.

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

Die Enzymproduktion erfolgt unter Verwendung billiger, natürlicher Ausgangsmaterialien, wobei ein Zusatz von nativer Cellulose zum Kulturmedium die Enzymaktivität wesentlich erhöht.

Die Enzymproduktion im Emersverfahren erfolgt auf angefeuchteten pflanzlichen Materialien, vorzugsweise Weizenkleie und/oder Grünfischmehl. Der sterile Nährboden wird mit Sporen bzw. vegetativen Myzelien beimpft. Die Inkubation erfolgt etwa bei 25 bis 35 °C und dauert 2 bis 4 Tage.

Bei der Enzymproduktion im Submersverfahren wird von einer Sporenkonserve ausgegangen, wobei die Sporen von *Gliocladium spec. Kleinmachnowi* auf Weizenkleie- oder Bierwürzeagar vermehrt werden.

Nach einer Inkubation von 2 bis 14 Tagen bei 25 bis 35 °C werden die Sporen mit Wasser abgeschwemmt. Die Sporensuspension wird zur Beimpfung der nachfolgenden Inoculumstufe benutzt (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 Cellulose, Grünflehl und anorganische Salze.

Die Enzymproduktion erfolgt entweder im Schüttelkolben, im halb- oder im 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 Myzel in Autolyse übergegangen ist und die Enzymaktivitäten ihre Endwerte erreicht haben.

Die Myzel- und Nährbodenbestandteile werden von der Kulturlösung abgetrennt. Aus dem Filtrat wird in üblicher Weise entweder durch Einengen im Vakuum ein Konzentrat oder durch Fällung mit anorganischen Salzen oder organischen Lösungsmitteln oder durch Gefriertrocknung 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 Cellulose- und β -Glucoside spaltenden Enzymen im Labormaßstab werden Sporen 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- oder Bierwürze-Agar überimpft.

(Zusammensetzung des Weizenkleieagars: 5 % Weizenkleie, 2 % Agar, pH 5,6). Nach einer Inkubation von etwa 8 bis 14 Tagen werden die Sporen von der Agarkultur mit Leitungswasser abgeschwemmt und je 10 bis 50 Millionen in 100 ml Produktionsmedium eingeeimpft. Dieses hat folgende Zusammensetzung: 0,5 % Cellulose, 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 5,6. Es wird auf einer Schüttelmaschine mit 220 Ausschlägen /Minute 3 bis 4 Tage geschüttelt, dann wird abfiltriert und das Filtrat im Vakuum bei 25 bis 50 °C auf etwa 1/5 eingeeengt.

Folgende Aktivitäten wurden erreicht:

C_1 -Aktivität:	50 E/ml (Flüssipräparat)
	2800 E/ml (Festpräparat)
C_x -Aktivität:	750 E/g
B-Glucosidase-Aktivitätswert:	397 Kolorimetereinheiten

Aktivitätsbestimmungen:

C_1 -Aktivität:
- - - - -

Bestimmung in Anlehnung an die Filterpapiermethode nach KITAMIKADO und TOYAMA (Hakko, Kogaku, Zassku 40, 85 (1962) und ref. C. A. 62, 1900, (1965) unter Verwendung von FN_1 -Chromatografiepapier (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 5,6). Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$E_{C_1} = \frac{10\,000}{\text{Zeit d. Auflösg. in min.}}$$

Hierbei wird die vollständige Auflösung des Filterpapiers in 1 Minute mit einer Aktivität von 10 000 E bewertet.

Zur Ermittlung der Aktivität in festen Präparaten wird eine 1 %ige Enzymlösung in o. a. Puffer hergestellt.

Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$E/g = \frac{10\ 000}{\text{Zeit d. Auflösg. in min.}} \times \frac{1000}{\text{mg Enzym}}$$

C_x-(CMC)-Aktivität

Die Bestimmung der C_x-Aktivität erfolgt durch Messung des Viskositätsabfalls der Na-Carboxymethylcellulose. Die cellulolytische C_x-Aktivität in Enzympräparaten wird ausgedrückt als die Menge Na-Carboxymethylcellulose in einer Untersuchungslösung, welche unter bestimmten Bedingungen durch 1 g Enzym zu einem 25 %igen Viskositätsabfall der Ausgangsviskosität geführt hat.

$$E_{C_x} = \frac{\text{g Na-Carboxymethylcellulose}}{\text{g Enzym}}$$

β-Glucosidase-Aktivität:

Die Glucosidase-Aktivität wird durch Abbau einer p-Nitrophenyl-D-Glucosidlösung ermittelt (NORKRANS, B., Physiol. Plant. 10, 198, (1957)). Die Enzymaktivitätswerte werden ausgedrückt durch die Größe des Anstiegs der Lichtadsorption bei 400 nm. Die Aktivitätsangaben sind Kolorimeterwerte, ermittelt am Havemannkolorimeter.

Beispiel 2

Zur Herstellung von Cellulose- und β-Glucosidespaltenden Enzymen im großtechnischen Maßstab wird von der im Beispiel 1 dargestellten Weizenkleie- oder Bierwürzeagarkultur ausgegangen.

Mit den Sporen dieser Stufe wird die 1. Vorkultur (10-50 Millionen Sporen auf 100 ml Nährlösung) beimpft.

Die beimpfte Kulturlösung: 0,5 % Cellulose, 1,0 % alkalisch aufgeschlossenes Grünmehl, 0,2 % NH₄H₂PO₄, 0,2 % KH₂PO₄, 0,05 % MgSO₄ · 7 H₂O wird in Kolben auf Schüttelmaschinen bei 30 °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. Vorkultur beträgt 1,2 bis 6 l.

16 bis 24 Stunden nach Inkubationsbeginn wird mit dem Material der 2. Vorkultur 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 70 bis 90 Stunden (je nach Beimpfungsmenge und angestrebter Kulturdauer) wird im Verhältnis 0,5 : 1/Min.; d. h. 0,5 m³ sterile Luft auf 1 m³ Kulturlösung je Minute belüftet.

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

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

Die Enzymaktivitäten des Konzentrates betragen:

C₁-Cellulase: 150 E/ml

C_x-Cellulase: 32 E/ml.

Aus dem Konzentrat kann anschließend die Fällung des Enzymkomplexes nach bekannten Methoden, wie beispielsweise mit NH₄-Salzen, Aceton oder Tannin vorgenommen werden. Die anfallenden Fällungsprodukte werden im Vakuum getrocknet. Die Aktivität der Fällungsprodukte beträgt bei

C₁-Cellulase 2880 E/g

C_x-Cellulase 750 E/g

B-Glucosidase 350 Kolorimetereinheiten.

Beispiel 3

Zur Herstellung von Cellulase- und β -Glucosidespaltenden Enzymen im großtechnischen Maßstab wird von der im Beispiel 1 dargestellten Weizenkleie- oder Bierwürzeagar-Kultur ausgegangen. Mit den Sporen dieser Stufe wird die Vorkultur in einem 2000 l Impftank beimpft.

Nach 16 bis 24-stündiger Kultur in dem wie in Beispiel 2 angegebenen Medium wird das Myzel unter sterilen Bedingungen in einen Produktionstank überführt. Die Impfmenge beträgt 3 bis 10 %. Die Kultivierung im Produktionstank, die Gewinnung des Filtrates, Konzentrates und der Fällungsprodukte erfolgt, wie in Beispiel 2 angegeben wurde. Die Enzymaktivitäten entsprechen ebenfalls denen in Beispiel 2.

Patentanspruch

Verfahren zur biotechnischen Herstellung von Cellulose und β -Glucosidespaltenden Enzymen im Emers- oder Submersverfahren mittels eines Stammes aus der Gattung Gliocladium, dadurch gekennzeichnet, daß ein insbesondere unter Verwendung von Cellulosesubstraten selektierter und vorzugsweise in einem Medium mit Cellulose und Grünmehl kultivierter Stamm von Gliocladium spec. Kleinmachnowi verwendet wird.