



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 291 672 A7

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 N 9/42
C 12 N 9/24
C 12 N 1/14
C 12 R 1:66

DEUTSCHES PATENTAMT

(21)	DD C 12 N / 290 962 1	(22)	04.06.86	(45)	11.07.91
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Institut für Biotechnologie, Permoserstraße 15, O - 7050 Leipzig, DE
(72)	Kerns, Gerhard, Dr. rer. nat., DE; Dalchow, Elke, Dipl.-Biochem., DE; Kude, Jelena, Dipl.-Ing., SU; Arnold, Günter R. W., Dr. rer. nat., DE; Hübsch, Peter, Dr. rer. nat., DE; Klappach, Günter, Dr. rer. nat., DE; Meyer, Dietrich, Prof. Dr. sc. nat., DE
(73)	Institut für Biotechnologie Leipzig, O - 7050 Leipzig; Friedrich-Schiller-Universität, Sektion Biologie-Pilzkultursammlung, O - 5300 Weimar, DE
(74)	siehe (71)

(54) Verfahren zur Gewinnung von Cellulaseenzymen und zellwandlytischen Enzymen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Cellulaseenzymen und zellwandlytischen Enzymen durch aerobe Kultivierung von Pilzmutanten. Es ist das Ziel der Erfindung bei Einsatz kostengünstiger Substrate hohe Cellulaseaktivitäten und gleichzeitig hohe substratbezogene Enzymausbeuten zu erreichen, um somit eine effektive Ausnutzung von Fermentorvolumen und Substrat zu gewährleisten. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, leistungsverbesserte Mutanten zu gewinnen, welche mittels geeigneter Kultivierungsverfahren dies ermöglichen. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst, indem die Mutante *Aspergillus terreus* ZIMET 43 802 aerob und submers 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. Die Mutante vermag bei geeigneter Prozeßführung auch auf Basis löslicher Substrate, wie beispielsweise Glucose oder Lactose, den Cellulase-Enzymkomplex ins Kulturmedium auszuschleiden. Die Erfindung ist anwendbar zur Herstellung von Cellulaseenzymen und/oder zellwandlytischen Enzymen als Biochemikalie, beispielsweise für den Einsatz in der Lebensmittel-, Brennerei- und Brauereiindustrie.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung von Cellulaseenzymen und/oder zellwandlytischen Enzymen durch Pilze im Submersverfahren, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Pilzmutante *Aspergillus terreus* ZIMET 43802 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 mittels fed-batch-Technik in einer solchen Weise erfolgt, daß die zugeführten Substrate im Fermentationsmedium die Enzyymbildung induzieren oder nicht reprimieren.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß als induzierende Substrate sowohl lösliche, wie Lactose, Molke als auch unlösliche, wie Cellulose, cellulosehaltige Abfallprodukte oder Pilzzellwände verwendet werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß Getreidekleie oder Brennereischlempe als induzierendes Substrat in Kombination mit löslichen Kohlenhydraten, wie Glucose, Xylose, Lactose oder Molke verwendet wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Cellulaseenzymen und/oder zellwandlytischen Enzymen durch aerobe Submerszüchtung von Pilzmutanten.

Die gebildeten 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 Enzymkomplexe können auch als Biochemikalien Anwendung finden, beispielsweise zur Herstellung von Protoplasten oder zur analytischen Futtermittelbewertung.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

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) sowie durch die bezogen auf das eingesetzte Substrat gebildete Enzymmenge (Enzymausbeute). Als geeignete Cellulasebildner sind besonders Pilzstämme der Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium* und *Trichoderma* bekannt. Beispielsweise wird gemäß DD-WP Nr. 225712 *Penicillium janthinellum* als Cellulasebildner eingesetzt, wobei Cellulose in Kombination mit vorbehandeltem Grünmehl als Substrat für die Cellulasefermentation dient. In einer fed-batch-Kultivierung von 1 l bei Einsatz von insgesamt 6% Cellulose zuzüglich Grünmehl nach 8 Tagen eine Cellulaseaktivität von 610 IU/ml Filterpapieraktivität erreicht, was einer Ausbeute von 100 IU/g Cellulose entspricht.

In einem anderen Verfahren gemäß JP 59 151 888 wird ein *Trichoderma koningii* Stamm als Cellulasebildner verwendet; als Substrat dient mikrokristalline Cellulose (Avicel) in einer Konzentration von 3%. Die resultierenden Enzymaktivitäten betragen nach 7 Tagen 11,5 IU/ml Endo- β -glucanaseaktivität und 0,85 IU/ml Exo-cellobiohydrolase, was einer Ausbeute der für den Abbau von mikrokristalliner Cellulose erforderlichen Exocellobiohydrolase von 28,3 IU je Gramm Cellulose entspricht; die entsprechende Produktivität beträgt 5 IU/l · h Exo-cellobiohydrolase.

Die aus der Patent- und Fachliteratur bekannten Cellulasebildner mit dem bisher höchsten Cellulasebildungsvermögen gehören zur Art *Trichoderma reesei* (früher *Trichoderma viride*). Mit dem Ziel einer Verbesserung des Cellulasebildungsvermögens wurden verschiedene *Trichoderma reesei*-Mutanten hergestellt.

In der Patentschrift WO 80/01080 wird die Cellulasebildung mit der Mutante *Trichoderma 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 IU/ml EPA, die mit 1% Lactose erhaltene Aktivität beträgt 1,35 IU/ml FPA und die mit 1% Lactose plus 1% Cellulose beträgt 1,75 IU/ml FPA. In der Patentschrift US 4,472,504 wird die Cellulasebildung mit der Mutante *Trichoderma reesei* MCG 80 beschrieben, welche aus der Mutante *Trichoderma 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 IU/ml FPA erreicht, was einer Ausbeute von 215 IU FPA/g Cellulose entspricht. Bei Kultivierung des gleichen Stammes auf einem Nährmedium mit 2% Lactose wird eine Cellulaseaktivität von 1,7 IU/ml FPA erzielt, entsprechend einer Ausbeute von 85 IU FPA/g Lactose. Diese *T. reesei*-Mutanten bilden auf Basis von Cellulose, insbesondere mikrokristalliner Cellulose und Baumwollcellulose, relativ hohe Cellulaseaktivitäten, nicht jedoch auf Basis löslicher Substrate wie beispielsweise Glucose. Daraus ergeben sich neben hohen Substratkosten auch Nachteile für die Prozeßführung.

Es wurden auch *Trichoderma reesei*-Mutanten hergestellt, welche auf 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. Baily: „Cellulase Production by Mutant Strains of *Trichoderma reesei* on non-Cellulosic Media“). Die höchste beschriebene Cellulaseaktivität wird mit der Mutante *T. reesei* VTT-D-79125 auf Basis von 4% Glucose plus 4% Brennerei-Treber erhalten und beträgt 6,4 IU/ml FPA. Mit Cellulose anstatt Glucose wurde bei diesem Stamm etwa die gleiche Cellulaseaktivität erhalten.

Die Cellulase-Enzymkomplexe von *Trichoderma reesei*-Stämmen weisen in der Regel einen Mangel an Cellobiaseaktivität auf, so daß für den Abbau von Cellulose zu Glucose eine Supplementierung der *T. reesei*-Cellulasekomplexe mit Cellobiase erforderlich ist. Beispielsweise wird die Supplementierung von *T. reesei*-Cellulase mit *Aspergillus*-Cellobiase von Lützen et al. beschrieben (Phil. Trans. R. Soc. Lond. B300, 283-291; 1983). Verschiedene Pilze anderer Gattungen, insbesondere der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* vermögen Cellulase-Enzymkomplexe mit einer höheren Cellobiaseaktivität zu bilden. Beispielsweise wird Pilz *Aspergillus terreus* 17P zur Cellulasebildung eingesetzt (Aleksidze, T. I.; Kvachadze, L. L.; Soobshch. Akad. Nauk Gruz. SSR, 1984, 1'5 (2), 405-408). Die im Fermentationsmedium erzielbare Cellulaseaktivität mit den bekannten *Aspergillus*-Stämmen ist jedoch niedrig.

Alle bekannten Verfahren zur Cellulasegewinnung haben den Nachteil, daß die bezogen auf das eingesetzte Substrat erhaltenen Cellulaseausbeuten relativ niedrig sind oder daß kostenintensive Substrate wie mikrokristalline Cellulose oder Baumwoll-Cellulose als Substrat für die Cellulasefermentation benötigt werden oder daß die im Fermentationsmedium erzielten Cellulaseaktivitäten niedrig sind oder daß eine proportionale Erhöhung der Cellulaseaktivität mittels Erhöhung der Substratkonzentration nicht möglich ist oder daß die Zusammensetzung des Cellulase-Enzymkomplexes nicht optimal ist.

Ziel der Erfindung

Es ist das Ziel der Erfindung, hohe Aktivitäten des Cellulase-Enzymkomplexes bei Einsatz kostengünstiger Substrate und gleichzeitig hohen substratbezogenen Enzymausbeuten zu erreichen, um somit eine effektive Ausnutzung von Fermentatorvolumen und Substrat zu gewährleisten.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, leistungsverbesserte Cellulase-Mutanten zu gewinnen und in einem Kultivierungsverfahren einzusetzen, wobei in einer Fermentationsstufe hohe Cellulaseaktivitäten bei gleichbleibender hoher substratbezogener Cellulaseausbeute und bei Einsatz von kostengünstigen Substraten ermöglicht werden. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe so gelöst, daß die Pilz-Mutante *Aspergillus terreus* ZIMET 43802 aerob und submers 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.

Es wurde gefunden, daß diese Mutante ein partiell-katabolitdereprimiertes Cellulasebildungsvermögen auch in bezug auf Glucose besitzt und daß diese Mutante auch auf löslichen Substraten wie beispielsweise Glucose oder Lactose hohe Konzentrationen der Enzyme des Cellulasekomplexes in das Medium ausscheidet.

Der genannte Stamm wurde durch Mutation aus einem *Aspergillus terreus*-Wildstamm gewonnen, welcher unter der Nummer *Aspergillus terreus* i 996 in der Pilzkultursammlung der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Sektion Biologie, hinterlegt ist. Die beschriebene Mutante wurde in der Hinterlegungsstelle der ZIMET-Kultursammlung im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der Akademie der Wissenschaften der DDR hinterlegt und unter der Nummer ZIMET 43802 registriert. Der Stamm ist durch folgende Merkmale charakterisiert.

Stammbeschreibung/Morphologie, Physiologie

Der Stamm weist für die *Aspergillus terreus* typischen morphologischen Merkmale auf und unterscheidet sich vom Wildstamm in physiologischen Eigenschaften bezüglich Cellulasebildung.

Die Erhaltung des Stammes ist auf den für *Aspergillus*-Stämme geeigneten Nährmedien möglich. Beispielsweise sind Kartoffel-Dextrose-Agar, Sporulationsagar oder Czapek-Dox-Agar hierfür geeignet. Die Bebrütungstemperatur beträgt zweckmäßig 28 bis 32°C, die Bebrütungsdauer etwa 4 bis 5 Tage und weitere 4 bis 6 Tage bei Raumtemperatur bis zur vollen Entwicklung des Stammes. Die Überimpfung wird mittels Konidien vorgenommen; die Farbe der Konidien ist braun. Die Konidienbildung ist sehr stark ausgeprägt, wobei nach relativ kurzer Zeit die Konidien leicht abgelöst werden.

Eine 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 leicht verwertbarer Substrate wie beispielsweise verschiedene Zucker oder Glycerol werden bis zu einer bestimmten Substratkonzentration Cellulaseenzyme gebildet.

Das katabolitdereprimierte Cellulasebildungsvermögen 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 Substrat im Agarmedium dienen säuregequollene Cellulose in Kombination mit dem jeweils untersuchten Repressor, insbesondere Glucose, Xylose, Lactose bzw. Glycerol. Zur Begrenzung der Koloniegröße 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 überimpft. In Anlehnung an die genannte Methode wird die Ausbildung von clearing-Zonen durch eine an die Bebrütung sich anschließende Inkubation bei 45°C über 20 Stunden vorgenommen, wobei die Lebensfähigkeit der

Konidien erhalten bleibt. Somit kann auch die Klonselktionierung auf diese Weise vorgenommen werden. Die Form und Größe der Einzelkolonien des vorliegenden Stammes sind unterschiedlich, in Abhängigkeit des verwendeten Substrates. Allgemein tritt eine Entfärbung des Bengalrosaagars in der Umgebung kräftig ausgebildeter Kolonien von *A. terreus* ZIMET 43802 auf. Die Testung des katabolitereprimierten Cellulasebildungsvermögens des beschriebenen Stammes ist auch in Röhrrchen möglich. Beispielsweise werden Konidien auf ein Agarmedium mit säuregequollener Cellulose in Kombination mit dem jeweils untersuchten Repressor, jedoch ohne Zusatz von Bengalrosa, überimpft. Der Röhrrchendurchmesser beträgt zweckmäßig 9 mm. Als Maß für das Cellulasebildungsvermögen dient die clearing-Tiefe; die Bebrütung und Inkubation bei 45°C werden wie bei dem beschriebenen Plattentest vorgenommen.

Der beschriebene Stamm bildet clearing-Zonen in Gegenwart von 5% Lactose und schwächer ausgeprägt von 5% Glucose als Repressor.

Die Kultivierungstemperatur der Mutante *A. terreus* ZIMET 43802 beträgt 24 bis 40°C, vorzugsweise 30 bis 36°C für das Myzelwachstum und 28 bis 34°C für die Enzymbildung. Der pH-Wert für die Kultivierung liegt im Bereich von 2,5 bis 7, vorzugsweise von 3 bis 5 für das Myzelwachstum und von 3,5 bis 6,5 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 dauernden und extrem hohen Scherfelder auftreten, denen große Teile des Fermentationsmediums ständig ausgesetzt sind.

Ausgangspunkt für die Kultivierung sind Konidien von Emeralkulturen, insbesondere von Schrägagarkulturen auf Kartoffel-Dextroseagar. Als Inokulum für das Fermentationsmedium dienen Konidien, vorzugsweise in einer Konzentration von 10^7 bis 10^9 je Liter Fermentationsmedium, oder Suspensionen vegetativen Myzels, 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 *Aspergillus terreus* ZIMET 43802 zur Gewinnung von Cellulaseenzymen oder zellwandlytischen Enzymen ist in Abhängigkeit der verwendeten Substrate oder Substratkombinationen und der zu erzielenden Enzymzusammensetzung verschieden.

Zur Bildung des Cellulaseenzymkomplexes ohne erhöhten Anteil an Nebenaktivitäten, wie beispielsweise Xylanaseaktivität, Glucanaseaktivität, kann reine Cellulose als induzierendes Substrat eingesetzt werden, zweckmäßig bei Einstellung eines Temperatur- und pH-Profiles des Fermentationsmediums gemäß dem Beispiel 1.

Bis zu einer Konzentration von etwa 2% Cellulose ist in diskontinuierlicher Fermentation die gebildete Cellulaseenzymmenge der eingesetzten Cellulosemenge proportional. Höhere Cellulosekonzentrationen führen zu einer höheren Cellulasekonzentration, wobei die Zunahme der Cellulasekonzentration dann jedoch nicht mehr der eingesetzten Cellulosemenge proportional ist, so daß die Cellulaseausbeute absinkt. Eine der eingesetzten Cellulosemenge proportionale Erhöhung der Cellulasekonzentration ist gemäß einer fed-batch-Technik möglich, bei welcher die Zuführung der Cellulose mittels einer Regeleinrichtung oder einer rechnergestützten Prozeßsteuerung vom Kohlendioxidgehalt des Fermentationsabgases in einer solchen Weise angesteuert wird, daß die auf das Myzelprotein bezogene Kohlendioxidentwicklung bei sonst gleichen Prozeßparametern während der Substratnachführung etwa konstant bleibt.

Mittels Weizenkleie oder anderer komplexer Nährmediumsbestandteile kann die Bildung von Nebenaktivitäten wie Cellobiase und Xylanase erhöht werden.

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

Die Gewinnung von Cellulaseenzymen auf Basis löslicher induzierender Substrate oder löslicher nichtinduzierender Substrate in Kombination mit induzierenden Substraten wird erfindungsgemäß mittels einer fed-batch-Technik durchgeführt, in 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 liegt, in welchem die Cellulasebildung induziert oder nicht reprimiert wird. Die obere Grenze dieses Bereiches wird durch den Grad des partiell-katabolitereprimierten Cellulasebildungsvermögens der Mutante bestimmt, welcher dem jeweils eingesetzten Substrat entspricht.

Der Fermentationsprozeß dieser fed-batch-Technik besteht aus einem diskontinuierlichen Abschnitt (batch) und der Substratnachführungsphase (fed-batch-Abschnitt). Die batch-Phase dient der Anzucht von Myzel, während in der Substratnachführungsphase vorwiegend die Enzymbildung erfolgt. Die Substratnachführung wird mittels der Kohlendioxidkonzentration des Fermentationsabgases angesteuert. Werden nichtinduzierende Substrate nachgeführt, so muß das Grundnährmedium mindestens ein induzierendes Substrat enthalten, wie z. B. Cellulose, Weizenkleie oder Brennereschlempe. Werden lösliche induzierende Substrate nachgeführt, so braucht das Nährmedium keine anderen induzierenden Substanzen zu enthalten; in diesem Fall ist es auch möglich, das Myzel im batch-Abschnitt der Fermentation auf Basis nichtinduzierender Substrate, wie z. B. Glucose, Saccharose, Glycerol oder Xylose anzuziehen. Es ist auch möglich, gleich nach der Beimpfung mit der Zuführung der löslichen induzierenden Substrate zu beginnen, wenn die Beimpfung mit vegetativem Myzel in einer Konzentration von zweckmäßig 2 bis 8 g/l bezogen auf Myzeltrockensubstanz erfolgt.

Bei Einsatz löslicher induzierender Substrate, wie z. B. Lactose, ist es auch möglich, die in das Fermentationsmedium ausgeschiedenen Enzyme mittels bekannter Membrantrennoperationen kontinuierlich vom Fermentationsmedium abzutrennen. Mittels einer Mikrofiltration werden die Feststoffe (Pilzmyzel) und mittels Ultrafiltration die niedermolekularen löslichen Bestandteile des Nährmediums von den Enzymen abgetrennt. Die Feststoffe werden zweckmäßig unmittelbar in das Fermentationsmedium zurückgeführt, während ein Teil oder das gesamte Ultrafiltrat zur Aufnahme der zuzuführenden induzierenden Substrate dienen kann und gemeinsam mit diesen in das Fermentationsmedium rückgeführt wird.

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

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

In einem Rührfermentor mit einem Bruttovolumen von 30 Litern wird der Pilz *Aspergillus terreus* ZIMET 43802 für die Gewinnung von Cellulaseenzymen kultiviert.

Als Substrat wird der Holzzellstoff Heweten 10Hz eingesetzt; die Fermentation wird in diskontinuierlicher Prozeßführung durchgeführt.

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 Fermentorrinnenraumes. Die Begasung des Fermentors erfolgt über einen, unterhalb des Rührers befindlichen Ring, welcher etwa den gleichen Durchmesser wie der Rührer und mit je 1 mm breiten Luftaustrittsöffnungen 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-Meß- und Regeleinrichtung, einer Meßeinrichtung für die CO₂-Konzentration des Fermentorabgases gekoppelt mit einem Steuersignal, beispielsweise zur Ansteuerung von Dosierpumpen sowie mit einer automatisch geregelten Schaumbekämpfung, welche die Vermeidung einer überschüssigen Entschäumerzugabe gewährleistet. Besonders geeignet ist ein Fermentor, welcher eine rechnergestützte Prozeßführung ermöglicht.

Die Bestandteile des Nährmediums werden folgendermaßen zusammengesetzt:

Heweten 10 Hz	20 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,0 g/l
KH ₂ PO ₄	3 g/l
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,4 g/l
CaCl ₂	0,3 g/l
Pepton	1,5 g/l
Tween 80	1 g/l
Spurensalzlösung	10 ml/l

Zusammensetzung der Spurensalzlösung:

FeSO ₄ × 7 H ₂ O	0,50 g/l
MnSO ₄ × 7 H ₂ O	0,16 g/l
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0,14 g/l
CoCl ₂	0,20 g/l

Die für 16 Liter erforderlichen Nährmediumsbestandteile werden in geeigneter Weise in 16 Litern Wasser gelöst bzw. suspendiert und unter Ausschluß von Fremdkeimen in den sterilisierten Fermentor gegeben. Anschließend wird der Fermentor mit 1 Liter einer frischen Myzelsuspension als Inokulum beimpft.

Inokulum

Das Inokulum wird in Schüttelkulturen hergestellt. Es werden die gleichen Nährmediumsbestandteile wie für den 30-l-Fermentor verwendet, jedoch wird die Konzentration des KH₂PO₄ auf 15 g/l erhöht und zusätzlich werden 0,9 g/l Harnstoff dem Medium zugefügt; die Konzentration der übrigen angegebenen Nährmediumsbestandteile ist die gleiche, wie im Nährmedium für den Fermentor.

Es werden 10 Schüttelkolben mit je 100 ml dieses Nährmediums hergestellt und unter Ausschluß von Fremdkeimen je Schüttelkolben mit etwa 10⁷ Konidien einer Abimpfung des hinterlegten Stammes *A. terreus* ZIMET 43802 beimpft. Die Kultivierung erfolgt auf einer für die Kultivierung von Mikroorganismen allgemein gebräuchlichen Schüttelmaschine bei 30°C. Die Kultivierungsdauer beträgt 36 bis 50 h bis zur Beimpfung des Fermentors.

Fermentation

Die Kultivierungstemperatur wird zu Beginn der Fermentation auf 32°C eingestellt; die Regelgrenzen für den pH werden auf 4,5 (untere Regelgrenze) und 5,5 (obere Regelgrenze) eingestellt; die Rührerdrehzahl wird auf 500 U/min eingestellt und die Begasungsintensität auf 30 Norm-Liter Luft je Stunde und Liter Fermentationsmedium, entsprechend einer Begasungsmenge von 450 Norm-Liter Luft pro Stunde. Als Antischaummittel wird Silikonentschäumer NM40 verwendet.

Der pH-Wert liegt zu Beginn der Fermentation innerhalb des Soll-Bereiches, je nach Zustand und Alter des Inokulums bei etwa 4,5–5,4. Während der Fermentation tritt ein Abfall des pH ein, bei Erreichen der unteren Regelgrenze wird mittels 12%iger Ammoniaklösung der pH bei 4,5 konstant geregelt. Mitunter ist in der Anfangsphase ein zwischenzeitlicher Anstieg des pH zu verzeichnen, der bei Überschreiten der oberen Regelgrenze eine Konstantregelung des pH mittels 10%iger Schwefelsäure bei 5,5 erfordert.

Bei Erreichen eines Myzelwachstums, welches etwa der logarithmischen Wachstumsphase einzelliger Mikroorganismen entspricht, wird die Fermentationstemperatur auf 29°C eingestellt. Dieser Zeitpunkt ist nach etwa 35 bis 55 Stunden erreicht, erkennbar an dem Anstieg der Kohlendioxidkonzentration im Fermentorabgas. Im vorliegenden Beispiel wird bei Erreichen einer CO₂-Konzentration im getrockneten Fermentorabgas von 0,2 Vol.-% die Fermentationstemperatur auf 29°C eingestellt. Die CO₂-Konzentration steigt weiter an und fällt nach Überschreitung eines Maximums wieder ab. Die Fermentation wird nach 96 bis 120 Stunden beendet, wenn die CO₂-Konzentration im Abgas auf 0,05 Vol.-% oder darunter abgesunken ist und der pH-Wert ansteigt.

Die Cellulaseaktivität im Kulturfiltrat beträgt am Ende der Fermentation 4,5 bis 5,0 IU/ml Filterpapieraktivität, entsprechend einer Ausbeute von 225 bis 250 IU Filterpapieraktivität pro Gramm Holzzellstoff Heweten 10 Hz. Mittels bekannter Verfahren der Mikrofiltration und Ultrafiltration wird der Enzymkomplex von den übrigen Nährmedialumskomponenten abgetrennt und gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete Rohenzym weist folgende Zusammensetzung bzw. Aktivitäten auf:

Proteingehalt:	48,3 %
Filterpapieraktivität (IU/mg Protein):	1,03
Cellobiase (IU/mg Protein):	0,50
α -Amylase (IU/mg Protein; 30°C):	0,64
Xylanase (IU/mg Protein):	4,5
Protease:	nicht nachweisbar

Die vom Fermentationsmedium abgetrennten Feststoffe, welche überwiegend aus Zellwänden des eingesetzten Pilzes bestehen, werden sprühgetrocknet oder gefriergetrocknet und anschließend pulverisiert. Diese Zellwände sind beispielsweise als Substrat für die Herstellung zellwandlytischer Enzyme geeignet.

Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die Bestimmung der Cellulaseaktivität sowie des Proteingehaltes erfolgt nach den von der IUPAC empfohlenen Analysemethoden (T. K. Ghose; „Final Recommendations on the Measurement of Cellulase Activities“; prepared for: International Union of Pure and Applied Chemistry, Commission on Biotechnology; July 1983). Die Bestimmung der Amylaseaktivität erfolgt bei 30 °C, alle anderen Enzymaktivitäten werden bei 50 °C bestimmt; 1 IU entspricht einem Substratabbau von 1 Mikromol pro Minute.

Beispiel 2

In einem Rührfermentor, wie im Beispiel 1 beschrieben, wird der Pilz *A. terreus* ZIMET 43802 für die Gewinnung von Cellulaseenzymen kultiviert. Als Substrat wird der Holzzellstoff Heweten 10 Hz eingesetzt.

Die Fermentation wird in einer fed-batch-Technik durchgeführt, bei welcher die Substratnachführung von der Stoffwechselaktivität des Pilzmyzels angesteuert wird.

Die Bestandteile des Grundnährmediums werden folgendermaßen zusammengesetzt:

Heweten 10 Hz	240 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	72 g
KH ₂ PO ₄	60 g
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	7,5 g
CaCl ₂	7,5 g
Pepton	45,0 g
Tween 80	15,0 g
Spurensalzlösung (wie im Beispiel 1)	150 ml

Diese Bestandteile werden in Wasser gelöst bzw. suspendiert, auf ein Volumen von 12 Litern gebracht und in den Fermentor gegeben.

Als Inokulum dient 1 Liter einer Myzelsuspension, wie im Beispiel 1 beschrieben.

Das Medium für die Substratnachführung wird folgendermaßen hergestellt:

900 Gramm Heweten 10 Hz und 30 Gramm Carboxymethylcellulose werden in trockenem Zustand gleichmäßig vermischt und unter Rühren in Wasser suspendiert, mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 3 Litern gebracht und sterilisiert.

Fermentation

Die Einstellung des Temperaturprofils und der Rührerdrehzahl sowie die Regelung des pH und die Schaumbekämpfung werden wie im Beispiel 1 vorgenommen.

Die Begasungsmenge wird auf 420 Norm-Liter Luft pro Stunde eingestellt.

Mit der Zuführung der Cellulosesuspension wird begonnen, nachdem die Kohlendioxidkonzentration im Fermentationsabgas das Maximum überschritten hat und auf etwa 80% des Maximalwertes abgesunken ist, bei gleicher Einstellung der Prozeßparameter. Das Maximum der Kohlendioxidkonzentration liegt bei etwa 0,6 bis 0,8 Vol.-% im getrockneten Fermentationsabgas; ein mitunter zeitlich vorgelagertes und schwächer ausgeprägtes Maximum der Kohlendioxidkonzentration im Fermentationsgas wird für die Prozeßsteuerung nicht berücksichtigt.

Diese Kohlendioxidkonzentration von 80% des Maximalwertes wird zu Beginn der Substratnachführung als Regelgrenze eingestellt; bei Unterschreitung der Regelgrenze wird eine Förderpumpe eingeschaltet, welche die Cellulosesuspension dem Fermentationsmedium so lange zuführt, bis die Kohlendioxidkonzentration die Regelgrenze überschreitet. Die Förderleistung der Pumpe wird auf eine Menge von 0,5% je Stunde der Masse des Fermentationsmediums eingestellt, zu Beginn der Nachführung somit auf 60 g/h Cellulosesuspension. Die Konzentration des Myzelproteins im Fermentationsmedium wird zu Beginn der Substratnachführung ermittelt; die Kohlendioxid-Regelgrenze wird der sich verändernden Konzentration des Myzelproteins angepaßt, also mit steigender Myzelproteinkonzentration proportional erhöht.

Es werden insgesamt 3 Liter der 30%igen Cellulosesuspension in das Fermentationsmedium nachgeführt. Die Fermentation wird nach 210 bis 240 Stunden beendet, wenn die Kohlendioxidkonzentration im Abgas auf 0,2% oder darunter abgesunken ist und der pH-Wert ansteigt.

Die Cellulaseaktivität im Kulturfiltrat beträgt am Ende der Fermentation 16,5IU/ml an Filterpapieraktivität, entsprechend einer Ausbeute von 205IU FPA pro Gramm Holzzellstoff Heweten 10Hz.

Beispiel 3

Zur Herstellung von zellwandlytischen Enzymen wird der Pilz *A. terreus* ZIMET 43802 in Schüttelkulturen fermentiert. Als Substrat werden Pilzzellwände eingesetzt, welche beispielsweise wie im Beispiel 1 beschrieben gewonnen werden. Das Nährmedium ist folgendermaßen zusammengesetzt:

getrocknete Pilzzellwände	25 g/l
KH ₂ PO ₄	15 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,8 g/l
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,4 g/l
CaCl ₂	0,3 g/l
Harnstoff	0,6 g/l
Pepton	1,5 g/l
Tween 80	1,0 g/l
Spurensalzlösung (wie im Beispiel 1)	10 ml/l

Die Schüttelkolben, beispielsweise Rundkolben mit einem Bruttovolumen von 500ml, werden mit 100ml des Nährmediums gefüllt und mit Konidien in einer Konzentration von 5×10^8 /l Nährmedium beimpft. Die Kultivierungstemperatur beträgt 30°C, die Kultivierungsdauer 8 Tage. Das gewonnene Kulturfiltrat wird mittels Ultrafiltration bzw. Dialyse im Verhältnis 10:1 eingengt. Das Kulturfiltrat, welches auch zum Enzymtrockenprodukt aufgearbeitet werden kann, ist beispielsweise zur Herstellung lebensfähiger Pilzprotoplasten geeignet.

Beispiel 4

In einem Rührfermentor, wie im Beispiel 1 beschrieben, wird der Pilz *A. terreus* ZIMET 43802 für die Gewinnung von Cellulaseenzymen kultiviert. Das Nährmedium enthält Weizenkleie und Cellulose als induzierende Substrate in Kombination mit Glucose als nichtinduzierendem Substrat.

Die Fermentation wird in einer fed-batch-Technik durchgeführt, bei welcher die Substratnachführung regelungstechnisch wie im Beispiel 2 beschrieben erfolgt.

Die Bestandteile des Grundnährmediums werden folgendermaßen zusammengesetzt:

Weizenkleie	140 g
Heweten 10 Hz	140 g
Glucose	210 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	67 g
KH ₂ PO ₄	45 g
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	5,6 g
CaCl ₂	5,6 g
Pepton	21 g
Tween 80	14 g
Spurensalzlösung (wie im Beispiel 1)	140 ml

Diese Bestandteile werden in 12,6 Litern Wasser in den Fermentor gegeben. Als Inokulum dienen 2 Liter einer Myzelsuspension, welche auf einem Nährmedium der gleichen Zusammensetzung wie das Grundnährmedium in einer Vorstufe (Schüttelkultur oder Fermentor) 24 bis 30 Stunden kultiviert wird; die Vorkultur wird mit Konidien beimpft. Als Medium für die Substratnachführung wird eine 50%ige Glucoselösung eingesetzt.

Fermentation

Die Begasungsmenge wird auf 490 Norm-Liter Luft pro Stunde eingestellt. Die übrigen Prozeßparameter sind die gleichen, wie in den Beispielen 1 bzw. 2 angegeben.

Mit der Zuführung der Glucoselösung wird begonnen, nachdem die Kohlendioxidkonzentration nach Überschreiten des Maximums auf etwa 70% des Maximalwertes abgesunken ist.

Die Förderleistung der Pumpe wird auf 75 ml/h eingestellt. Die Pumpe wird, wie im Beispiel 2 beschrieben, bei einem Absinken der CO₂-Konzentration auf Werte unterhalb der Regelgrenze eingeschaltet und bei Überschreiten der Regelgrenze wieder ausgeschaltet. Die Kohlendioxid-Regelgrenze wird, wie im Beispiel 2 beschrieben, der sich verändernden Konzentration des Myzelproteins angepaßt. Die Kohlendioxidkonzentration im Fermentationsabgas hat während der Substratnachführung einen oszillatorischen Verlauf.

Es werden insgesamt 1,4 Liter der 50%igen Glucoselösung in das Fermentationsmedium zugeführt. Die Fermentation wird nach 120 bis 140 Stunden beendet, wenn die Kohlendioxidkonzentration auf 0,1% oder darunter abgesunken ist und der pH-Wert ansteigt.

Die Cellulaseaktivität im Kulturfiltrat beträgt am Ende der Fermentation 9,2IU/ml an Filterpapieraktivität und 0,8IU/ml an Cellobiaseaktivität.

Beispiel 5

Das Cellulasebildungsvermögen des Pilzstammes *A. terreus* ZIMET 43802 wird mittels Kultivierung auf verschiedenen Substraten in Schüttelkulturen untersucht und mit dem Ausgangsstamm *A. terreus* i 996 verglichen. Das Nährmedium ist folgendermaßen zusammengesetzt:

KH ₂ PO ₄	15 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,4 g/l
CaCl ₂	0,3 g/l
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,3 g/l
Harnstoff	0,3 g/l
Pepton	1,5 g/l
Tween 80	1 g/l
Spurensalzlösung (wie im Beispiel 1)	10 ml/l
Substrat	10 g/l

Es werden Schüttelkolben mit je 100ml des zu testenden Nährmediums gefüllt und mit 10⁷ Konidien ein- und derselben Konidiensuspension des jeweiligen Stammes beimpft. Die Kultivierungszeit beträgt 6 Tage, die Kultivierungstemperatur 30°C.

Folgende Cellulaseaktivitäten werden erhalten:

Substrat	ZIMET 43802	i996
1% Holzzellstoff	2,3	0,9
0,5% Holzzellstoff + 0,5% Glucose	1,4	0,2
0,5% Holzzellstoff + 0,5% Lactose	1,3	0,5
0,5% Glucose + Brennereischlampe (50%ig)	0,35	0,02

(Cellulaseaktivität in IU/ml FPA)