

Výroba a vlastnosti mikrobiálních celulas

RNDr. MARIA GOTTVALDOVÁ, Výzkumný ústav potravinářského průmyslu, Praha

863./8 577.154.3

V průběhu uplynulých let, kdy jsme se ve VÚPP zabývali výzkumem výroby a vlastností celulas, získali jsme poznatky o celém rozsahu problému od výběru kmene až po vypracování reprodukovatelného technologického postupu, od nejjednodušších postupů získání surového preparátu až po separaci jednotlivých složek a jejich alespoň částečnou charakterizaci. O všech těchto výsledcích se chci stručně zmínit v tomto přehledu.

Tab. 1. Celulolytická aktivita kmenů izolovaných z přirozených materiálů

Izolát č.	Místo	C_x aktivita (7. den)
13	jehličnatý les v okolí	10,0
29	Cukráku	14,9
34		18,9
43	okolí Dobříše	13,5
58		13,5
79	Orlická přehrada	12,3
88		18,5
140		18,2
178		13,2
187		11,6
192		18,0
193		12,8
197		10,7
200		13,6
239	severní Čechy	24,0
259		10,7
269	okolí Mladé Boleslavi	16,0
271	les Dobříš	11,4
273		18,1
294	vzorky z pily	37,4

Produkční kmen jsme se pokusili získat z přirozených zdrojů (lesní půda, tlející listí, odpadní vody z papíren apod.), dále ze sbírkových kultur a konečně výběrem vhodných mutant získaných z jiných pracovišť nebo připravených v rámci našeho ústavu. Kmeny získané z přirozených zdrojů vykazovaly v některých případech podstatně vyšší enzymové aktivity (C_x) než sbírkové kultury. V tabulce 1 jsou uvedeny tyto kmeny, pokud jejich celulolytická aktivita byla vyšší než 10 mg RL/ml. Kmeny získané z průmyslových lignocelulozových odpadů (pila) vykazovaly nejvyšší aktivity. Sbírkové kultury, jak ukazuje tab. 2, dávaly celulolytické aktivity většinou velmi nízké, i když i zde byly získány kmeny, které by mohly být základem pro další šlechtění. Konečně mutanty jak vlastní, tak i získané z jiných pracovišť, vykazují celulolytické aktivity vhodné pro průmyslové využití. Některé z těchto mutant jsou uvedeny v tab. 3.

V naší další práci jsme se zaměřili na mutanty *Trichoderma viride* 9123, *T. viride* B-7, *T. viride* 76 a 20. Kmeny *Trichoderma viride* jsou preferujeme proto, že obsahují vedle dostatečně vysokých koncentrací složky C_x rovněž složku C_1 , která je nezbytná pro hydrolýzu nativní celulózy.

Produkce celulas je silně ovlivněna složením kultivačního média a podmínkami kultivace. Optimálním zdrojem uhlíku je celulóza, avšak nejsou všechny druhy celulózy zcela ekvivalentní a optimální koncentrace celulózy se mění podle druhu a struktury. To je ve značné míře způsobeno tím, že celulóza jako suspendovaná látka

Tab. 2. Celulolytická aktivita sbírkových kmenů

Kmen	Původ	C_x aktivita	Max. akt. den
<i>Aspergillus niger</i> 7	VÚPP	0,15	9
<i>A. niger</i> 20	VÚPP	0,22	6
<i>A. niger</i> 21	VÚPP	0,17	6
<i>Fusarium oxysporum</i>	MBÚ ČSAV	1,9	7
<i>Chaetomium globosum</i>	MBÚ ČSAV	0,14	12
<i>Chrysosporium lignorum</i>	Inst. Ferm. prům. Varšava, PLR	0,6	19
<i>Myrothecium verrucaria</i>	Inst. Ferm. prům. - Varšava, PLR	3,0	12
<i>Trametes sanguinea</i>	USA	20,3	12
<i>Torulopsis utilis</i> 80	Univ. Helsinky	0,14	9
<i>T. utilis</i> 88	Univ. Helsinky	0,14	9
<i>Trichoderma viride</i>	UK Praha	7,2	7
<i>T. viride</i>	Kuba	6,3	7
<i>T. viride</i> 6a	USA		
<i>T. koningii</i>	UK Praha		
<i>Trichothecium roseum</i>	Inst. Ferm. prům., Varšava	18,3	12
		11,2	9
		12,96	10

Tab. 3. Celulolytická aktivita mutant

Mutanta	C_x aktivita	Max. akt. den
<i>Trichoderma viride</i> 9123	48	7
<i>Trichoderma viride</i> B-7	73	6
<i>Trichoderma viride</i> 20	74	6
<i>Trichoderma viride</i> 55	49	6
<i>Trichoderma viride</i> 76	78	6

značně ovlivňuje rychlost přenosu kyslíku. Spotřeba kyslíku je u *T. viride* poměrně nízká, tvorba celulas je však podmíněna vysokou koncentrací kyslíku v médiu během kultivace. Mikrokrystalická buková celulóza nezhoršuje přenos kyslíku ani při koncentraci 4 % v médiu (obr. 1). Naproti tomu vláknitá celulóza (celulózový výprašek) zhoršuje přenos kyslíku a snižuje produkci celulas již při koncentraci 1,5% (obr. 2). Vliv struktury na tvorbu celulas je dále patrný z tabulky 4, kde je srovnávána produkce celulas na mikrokrystalické bukové celulóze, celulózovém výprašku a mletém celulózovém výprašku. Nízká produkce celulas na mletém celulózovém výprašku je způsobena pravděpodobně tím, že mletím na kulovém mlýnu se porušuje vláknitý charakter výprašku a narušuje struktura celulózy. Tím se stává hydrolýza celulózy enzymem snazší a rychlejší a to má za následek snížení tvorby celulas katabolickou represí. Za těchto podmínek je totiž hydrolýza celulózy rychlejší než růst mikroorganismu a dochází k nahromadění lehce metabolizovatelných cukrů v kultivační kapalině. Tvorba celulas je u všech kmenů *T. viride* poněkud nižší na vláknité celulóze než na mikrokrystalické bukové celulóze,

Tab. 4. Vliv mletí celulóзовého výprašku na celulolytickou aktivitu kultivační kapaliny

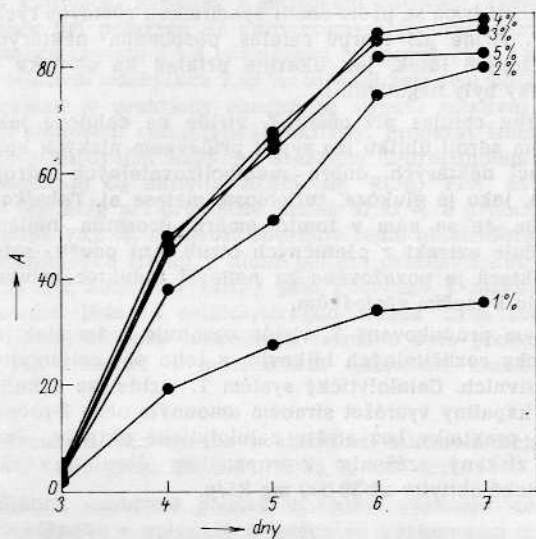
Zdroj uhlíku	Prům. C_x aktivita
mikrokrystalická celuloza	116,2
výprašek	76,6
výprašek mletý	58,0

Tabulka 5. Vliv množství inokula na tvorbu celulas *T. viride*

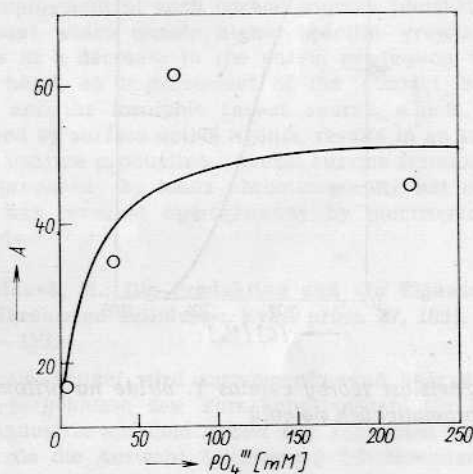
Koncentrace inokula [%]	Koncentrace celulózy [%]	C_x aktivita
3,0	1,26	76,5
8,5	1,26	78,1
18,7	1,26	68,7

Tab. 6. Maximální specifické růstové rychlosti *T. viride* při použití různých zdrojů uhlíku

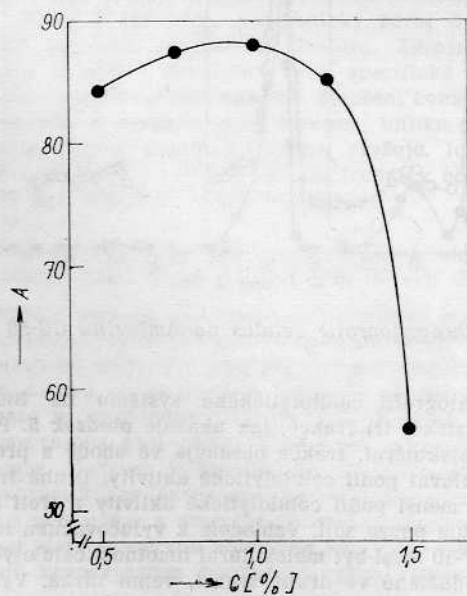
Zdroj uhlíku	μ_m	C_x aktivita
glukoza	0,501	0,4
sacharoza	0,217	0,6
laktoza	0,206	0,7
ethylacetát	1,340	0,0
octan sodný	0,670	0,0
salicin	0,060	0,2
CMC	0,081	12,0
celulóza	0,050	79,0



Obr. 1. Vliv různého množství mikrokrystalické bukové celulózy v půdě na tvorbu celulas u *T. viride*. (A celulolytická aktivita)



Obr. 3. Závislost tvorby celulas *T. viride* na koncentraci fosfátu



Obr. 2. Závislost celulolytické aktivity kultivační kapaliny (A) na počáteční koncentraci celulóзовého výprašku (C) při kultivaci ve fermentoru objemu 5 l

ale ekonomické hledisko zvýhodňuje použití vláknité celulózy.

Zdroj dusíku je rovněž významný pro tvorbu celulas. Anorganický zdroj dusíku dává daleko lepší výsledky než organické zdroje. Matematickou optimalizací pro řa-

du různých zdrojů dusíku bylo zjištěno, že optimální pro tvorbu celulas u *T. viride* je amoniakální dusík s malým přídavkem dusíku nitrátového. Organické zdroje uhlíku v nízké koncentraci (pepton do 0,25 %, kvasničný extrakt do 0,3 %) nemají na tvorbu celulas žádný vliv, při vyšších koncentracích tvorbu enzymu výrazně reprimují.

T. viride vyžaduje také pro tvorbu celulas poměrně značnou koncentraci fosfátu (obr. 3). Přitom je, jak ukazuje obrázek, závislost tvorby enzymu na koncentraci fosfátu hyperbolická, tedy předávkování nemá nepříznivý vliv. Optimální koncentrace je zde asi 100 mM.

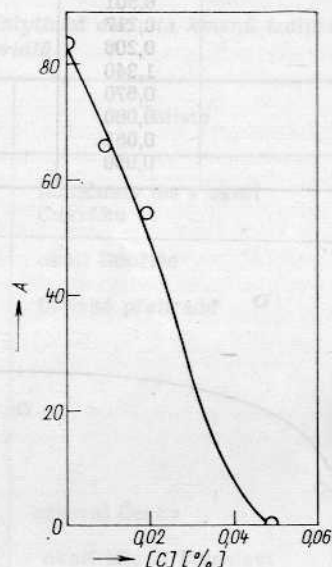
Zajímavý je také průběh závislosti tvorby celulas u *T. viride* na koncentraci smáčedla. Tato závislost vykazuje maximum pro koncentraci kolem 0,1 % [Tween 80]. Domníváme se, že smáčedla zlepšují kontakt mezi nerozpustnou celulozou a mikroorganismem. Je známo, že *T. viride* tvoří celulas pouze v přímém kontaktu s celulozou.

Optimální inokulace je vegetativním inokulem, přičemž koncentrace inokula není kritická. Při inokulaci sporovým inokulem se zpožďuje produkce enzymu o 24 až

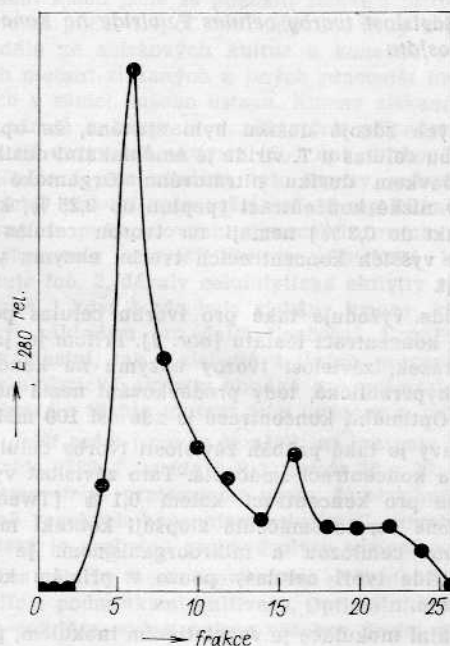
Tabulka 7

Induktor	C _x aktivita % kontroly
kontrola	100
soforosa	52,4
glukosa	90,1
melasa	95,0
salicin	1,7
beta-thioglukosid	1,2

Jako kontroly bylo použito pšeničných otrub



Obr. 4. Závislost tvorby celulas *T. viride* na přítomnosti aromatických polyolů



Obr. 5. Separace endo-glukanasy I na Biogelu P-10

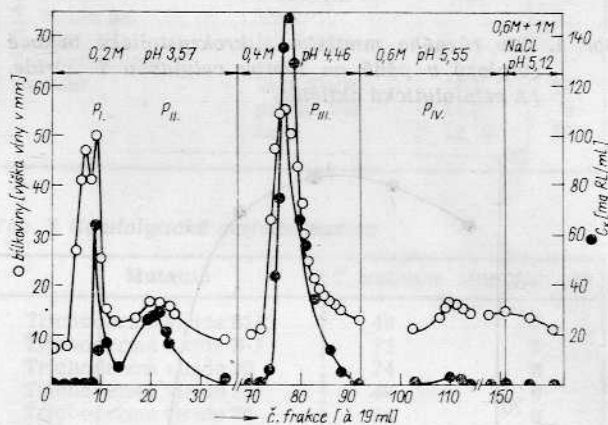
48 hodin. Koncentrace vegetativního inokula 3 % je dostačující a zvýšení koncentrace inokula nemá na tvorbu enzymu vliv, s výjimkou použití vysokých koncentrací vláknité celulózy, kde se projeví vliv zředění velkým objemem inokula příznivě (tab. 5).

Tvorbu celulas při růstu *T. viride* na celulóze jako růstovou rychlostí. V přítomnosti induktorů je tvorba enzymu tím vyšší, čím nižší je specifická růstová rychlost (tab. 6). Toto pozorování se shoduje i s výsledky jiných autorů.

Pokusili jsme se proto snížit specifickou růstovou rychlost *T. viride* při tvorbě celulas působením některých fungicidních látek. Jak ukazuje příklad na obrázku 4, výsledky byly negativní.

Tvorbu celulas při růstu *T. viride* na celulóze jako jediném zdroji uhlíku lze zvýšit přidávkou nízkých koncentrací některých dobře metabolizovatelných zdrojů uhlíku, jako je glukóza, cellobiosa, melasa aj. Tabulka 7 ukazuje, že se nám v tomto směru prozatím nejlépe osvědčuje extrakt z pšeničných otrub. Ani použití soforosy, která je považována za nejlepší induktor celulas, nevedlo k lepším výsledkům.

Enzym produkovaný *T. viride* obsahuje sedm elektroforeticky rozlišitelných bílkovin, z toho pět celulolytických aktivních. Celulolytický systém *T. viride* lze z kultivační kapaliny vysrážet síranem amonným nebo 2-propanolem prakticky bez ztráty celulolytické aktivity. Preparát získaný srážením 2-propanolem dosahuje vyšší specifické aktivity až 30 000 mg RL/g.



Obr. 6. Chromatografie celulas na Amberlitu CG-50

Chromatografií celulolytického systému na Biogelu P-10 lze získat tři frakce, jak ukazuje obrázek 5. První, vysokomolekulární, frakce obsahuje ve shodě s předpokladem hlavní podíl celulolytické aktivity. Druhá frakce obsahuje menší podíl celulolytické aktivity a třetí frakce obsahuje pouze soli. Vzhledem k vylučovacímu limitu Biogelu P-10 musí být molekulární hmotnost celulolytické složky, oddělené ve druhé frakci, velmi nízká. Vylučovací limit Biogelu P-10 je pro bílkoviny 15 000, takže tato složka podle vylučovacího objemu by měla mít molekulární hmotnost kolem 10 000. I toto zjištění je ve shodě s údaji literatury, kde řada autorů uvádí nízkomolekulární složku o molekulové hmotnosti v rozmezí 5 000 až 15 000. Podle našich výsledků se přikláníme k molekulové hmotnosti, kterou stanovil pro tuto složku Pettersson, tj. 12 500. Uvedená složka obsahuje poměrně vysokou koncentraci glycidů a hydrolyzuje rozpustnou karboxymethylcelulózu.

Ionexovou chromatografií celulolytického systému na Amberlitu CG 50 (obr. 6) jsme získali tři hlavní frakce

obsahující celulytickou aktivitu C_x , žádná z nich však není elektroforeticky homogenní. Chromatografie na DEAE-celuloze dává dvě celulytické frakce s velmi nízkým výtěžkem aktivity. Izolace složek affinitní chromatografií na Avicelu za nízké teploty nebyla úspěšná. Kromě nízkomolekulární složky celulytického systému se nám nepodařilo získat žádnou jinou složku v elektroforeticky homogenní formě.

Závěrem tohoto přehledu stručně shrnuji naše dosa-
vadní výsledky. Byl získán kmen produkující 70 mg RL/
/ml kultivační kapaliny v šestidenní kultivaci. Tento vý-
sledek byl potvrzen 42 kultivacemi v laboratorním fer-
mentoru objemu 5 l s průměrnou hodnotou 71,67 a střed-
ní relativní odchylkou 7,35 %. Střední relativní odchylka
výsledku je prakticky shodná se střední relativní chy-
bou stanovení celulytické aktivity. Preparát izolovaný
z této kultivační kapaliny srážením 2-propanolem měl
průměrnou C_x aktivitu 20,625 mg RL/g, FPA aktivitu
680 mg RL/g při průměrné sušině 97,92 % a průměrném
výtěžku 78,2 %. Preparát obsahuje sedm elektroforeticky
rozišitelných frakcí, z nichž pět má celulytickou akti-
vitu, dvě neaktivní složky jsou obsaženy v nízké kon-
centraci. Jedna z celulytických složek byla získána
v elektroforeticky homogenní formě a bylo prokázáno,
že jde o složku s molekulární hmotností menší než
15 000.

**Gottvaldová, M.: Výroba a vlastnosti mikrobiálních ce-
lulas.** Kvas. prům., 27, 1981, č. 10, s. 232—235.

Článek souhrnně podává výsledky výzkumu celulas
prováděného v uplynulých letech ve Výzkumném ústavu
potravinářského průmyslu. Byl proveden výběr kmenů —
producentů celulas z přírodního materiálu, ze sbírkov-
ých kultur a byla prováděna další selekce a mutace.
Byl získán produkční kmen *Trichoderma viride*, který
pro optimální tvorbu enzymu vyžaduje celulózu jako
zdroj uhlíku a induktor, anorganický zdroj dusíku a
poměrně vysokou koncentraci fosfátu. Zdroje uhlíku
(deriváty celulózy) dovolující vyšší specifické růstové
rychlosti snižují produkci enzymu. Zlepšení kontaktu me-
zi kapalinou a nerozpustným zdrojem uhlíku použitím
smáčedla naopak produkci enzymu zvyšuje. Ionexovou
chromatografií bylo získáno několik frakcí, z nichž žád-
ná však není elektroforeticky homogenní.

**Готтвалдова, М.: Производство и свойства микробных
целюлаз.** Квас. prům., 27, 1981, № 10, стр. 232—235.

В статье суммарно представлены результаты исследова-
ний целюлаз, проведенных за истекшие годы с Иссле-
довательском институте пищевой промышленности. Про-
ведена работа по выделению штаммов — продуцентов
целюлаз из природных условий, из коллекций культур
и осуществлена дальнейшая селекция с использованием
мутантов. Получен мутантный штамм *Trichoderma vi-
ride*, который для активного синтеза целюлаз нуж-
дался в целлюлозе в качестве источника углерода и ин-
дуктора, неорганическом источнике азота и сравнительно
высокой концентрации фосфата в среде. Показано, что

источники углерода (derivаты целлюлозы), которые
обеспечивают более высокие специфические скорости
роста штамма, понижают продукцию ферментов. Улуч-
шение контакта между растущей культурой и нераство-
римым источником углерода при использовании поверх-
ностью активных веществ повышает образование фер-
ментов.

Путем ионообменной хроматографии было выделено
несколько фракций обладающих целлюлитической актив-
ностью, из которых ни одна не была электрофоретически
гомогенна.

**Gottvaldová, M.: The production and characteristics of
microbial cellulases.** Kvas. prům., 27, 1981, No. 10, pp.
232—235.

The results are reviewed of the study of cellulases
which has been carried out at the Research Institute of
Food Industry in Prague during recent years. By means
of selection of strains producing cellulases from natural
sources and their mutations, a productive strain of *Tri-
choderma viride* has been obtained. For the optimum
enzyme formation, cellulose as the source of carbon
and inducer, an inorganic source of nitrogen, and a re-
latively high concentration of phosphate are required.
The employment of such carbon sources (derivatives of
cellulose) which enable higher specific growth rates
results in a decrease in the enzyme production. On the
other hand, an improvement of the contact between
liquid and the insoluble carbon source, which can be
achieved by surface active agents, results in an increase
in the enzyme production. Several enzyme fractions have
been prepared by ionex chromatography but none of
them has revealed homogeneity by electrophoretical
methods.

**Gottvaldová, M.: Die Produktion und die Eigenschaften
der mikrobiellen Zellulasen.** Kvas. prům., 27, 1981. No. 10,
S. 232—235.

In dem Artikel wird zusammenfassend über die For-
schungsergebnisse des Forschungsinstituts für Lebens-
mittelindustrie auf dem Gebiet der Zellulasen berichtet.
Es wurde die Auswahl Zellulasen-produzierender Stäm-
me aus natürlichem Material und aus Sammlungskultu-
ren durchgeführt, sowie auch die weitere Selektion und
Mutation der Produktionsstämme. Es wurde ein Produk-
tionsstamm *Trichoderma viride* gewonnen, der für die
optimale Enzymproduktion Zellulose als Kohlenstoff-
quelle und Induktor, eine anorganische Stickstoffquelle
und eine verhältnismäßig hohe Phosphatkonzentration
benötigt. Kohlenstoffquellen (Zellulose-Derivate), die
höhere spezifische Wachstumsgeschwindigkeiten er-
möglichen, vermindern die Enzymproduktion. Diese wird
dagegen erhöht durch die Verbesserung des Kontakts
zwischen der Flüssigkeit und der unlöslichen Kohlen-
stoffquelle mittels Applikation eines Benetzungsmittels.
Mittels Ionexchromatographie wurden einige Fraktionen
gewonnen, von denen sich jedoch keine als elektropho-
retisch homogen erwiesen hatte.