



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **224 868 A1**4(51) C 12 N 1/14
C 12 N 9/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 N / 262 656 4	(22)	03.05.84	(44)	17.07.85
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71) VEB Wissenschaftlich-Technisches Zentrum der Gärungs- und Getränkeindustrie, 1017 Berlin, Alt-Stralau 52-54, DD

(72) Tischler, Michael, Dipl.-Chem.; Peglow, Karin, Dipl.-Chem.; Hirte, Wolfgang, Prof. Dr. habil.; Schulz, Günter, Dr. Dipl.-Biol.; Freyberg, Werner, Dipl.-Ing.; Heinig, Wolfgang, Dipl.-Chem., DD

(54) **Nährmedium zur Herstellung eines Enzymkomplexes**

(57) Die Erfindung betrifft ein Nährmedium zur Herstellung eines Enzymkomplexes für die Anwendung in der Brennerei zur Hydrolyse von Nichtstärke-Polysacchariden des Getreides mit Hilfe dafür geeigneter Pilzstämmen. Es bestand die Aufgabe, spezifische brennereiorientierte Nährmedien zu entwickeln, auf denen durch Kultivierung unter den Bedingungen der Brennereiindustrie cellulolytische, xylanolytische und Getreideglucane abbauende Enzymkomplexe erhalten werden. Erfindungsgemäß enthält das Nährmedium 30 Vol.-% Brennereischlempe als Nährstoff sowie 2 Ma.-% i. TS aus Schlempe durch Heißwasser-Extraktion bei 62 °C fraktionierten und gewaschenen Brennereitreber als Enzyminduktor. Das Nährmedium wird in Brennereien angewendet.

ISSN 0433-6461

7 Seiten

Zur PS Nr. *224 868*

ist eine Zweitschrift erschienen.

(Teilweise bestätigt gem. § 18 Abs.1 d. Änd.Ges.z.Pat.Ges.)

1. Titel der Erfindung

Nährmedium zur Herstellung eines Enzymkomplexes für die Anwendung in der Brennerei

2. Anwendungsgebiete der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Nährmedium zur Submerskultivierung eines Enzymkomplexes zur Anwendung in der Brennerei, der die Ethanolausbeute erhöht.

3. Charakterisierung der bekannten technischen Lösungen

Die bisher bekannten Nährmedien zur Kultivierung Cellulase bildender Mikroorganismen enthalten als Kohlenstoffquelle einen Zusatz von Cellulose, wie z. B. mikrokristalliner Cellulose, wie im DD-WP 145028 - Verfahren zur biotechnischen Herstellung von Cellulasen, Hemicellulasen und β -Glucosidasen - dargestellt.

Im DD-WP 151472 - Anwendung eines cellulolytischen und hemicellulolytischen Enzymkomplexes zur Ethanolgewinnung - wird der Einsatz dieser Cellulasen in der Brennereiindustrie geschützt. Der Nachteil derartiger Nährmedien besteht in den hohen Beschaffungskosten der Cellulose und in einem für Brennereizwecke nicht optimal auf Getreide abgestimmten Enzymspektrum.

Die Verwendung nativer Substrate wird in der DE-OS-2704342 zur Kultivierung von *Thielavia terrestris* NRRL 8126 allgemein beschrieben. In der GB-PS 1227211 wird eine adaptive

Kultivierung von Enzymbildnern auf landwirtschaftlichen Rohstoffen, wie z. B. Weizenkleie geschützt. Der Einsatz von Dünnschlempe (feststofffreies Schlempefugat) als Stickstoffquelle für die Kultivierung von *Lampteromyces* und *Formitopsis* wird in der GB-PS 1278195, zur Herstellung von *Aspergillus niger*-Glucosylase in der GB-PS 116149 beschrieben. Getrocknete Dünnschlempe wird auch in der GB-PS 1421127 bzw. US-PS 3880742, US-PS 3677899 zur Herstellung von β -(1,3)(1,4)-Glucanase aus *Penicillium emersonii* angeführt.

Zur Ausschüttung von Cellulasen bei der Kultivierung von Cellulasebildnern wird nach Literaturangaben der Einsatz von Cellulose im Nährmedium als essentiell angesehen. Demzufolge wäre durch Schlempe und ihre Bestandteile (Brennereitreiber) eine Induktion cellulolytischer Enzyme kaum zu erwarten. Jedoch ergeben sich durch die Kultivierung auf diesen o.g. Substraten nach entsprechender Vorbehandlung Cellulase-Aktivitätswerte sowie Ethanol-ausbeuten nach Einsatz dieser Cellulasen, die zu Steigerungen von 3,5 % Ethanol gegenüber dem Einsatz von Alpha- und Glucosylase allein führen.

4. Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung ist es, ein für Brennereizwecke auf das zu hydrolysierende Substrat, d.h. durch Amylasen nicht umgesetzte Getreidebestandteile, optimal abgestimmtes Nährmedium zu erhalten. Hierbei sollen vorbehandelte Abprodukte der Brennerei als Kultivierungssubstrat bzw. Nährmedienbestandteil verwendet werden.

5. Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, spezifische brennerei-orientierte Nährmedien zu entwickeln, auf denen durch Kultivierung unter den Bedingungen der Brennereiindustrie cellulolytische, xylanolytische und Getreideglucane abbauende Enzymkomplexe erhalten werden. Bestandteile des Nährmediums sollen durch Abprodukte

der Brennerei, d.h. fraktionierte und vorbehandelte Schlempeinhaltsstoffe gebildet werden.

Die Gewinnung der Enzymkomplexe erfolgt durch Kultivierung eines vorgegebenen Stammes adaptiv hinsichtlich des abzubauenen Substrates Getreidecellulose.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß ein Nährmedium zur Herstellung eines Enzymkomplexes für die Anwendung in der Brennerei zur Hydrolyse von Nichtstärke-Polysacchariden des Getreides mit Hilfe geeigneter Pilzstämme verwendet wird, das 30 Vol.-% Brennereischlempe als Nährstoff sowie 2 Ma.-% i. TS aus Schlempe fraktionierten Brennereitreber als Enzyminduktor enthält. Der Brennereitreber wird durch eine Heißwasser-Extraktion bei 62 °C der notwendigen Menge Schlempe gewonnen und über ein 0,8 mm-Sieb unter gleichzeitigem Waschen mit Wasser abgetrennt. Die Verwendung für das Nährmedium erfolgt vorzugsweise feucht, kann aber auch nach Umluft- oder Vakuumtrocknung bei ≤ 45 °C vorgenommen werden.

Zur Enzyminduktion kann anstelle von fraktioniertem Brennereitreber der Rückstand einer Heißwasser-Extraktion (65 - 70 °C) von Roggenkleie verwendet werden.

Die auf diesem Nährmedium - unter Zusatz von Mineralsalzen - gewonnenen Enzymkomplexe besitzen bei Kultivierung von Stämmen der Gattung *Penicillium* cellulolytische, xylanolytische, amylolytische und glucanolytische Aktivitäten und können so Nichtstärke-Polysaccharide des Getreides hydrolysieren.

Durch dieses Nährmedium kann das Enzymspektrum der Zusammensetzung der Polysaccharidfraktion des Getreides, die über den Stärkeabbau hinaus der Ethanolgewinnung zugänglich gemacht werden soll, angepaßt werden.

Der Vorteil der Verwendung dieses Nährmediums liegt in der Nutzung von Brennerei-Abprodukten zur Induktion der Bildung von Enzymzusammensetzungen, die den in der Maische zu hydrolysieren

renden Substraten adaptiert sind. Der Einsatz des Nährmediums kann im labor-, kleintechnischen oder großtechnischen Maßstab erfolgen.

Ausführungsbeispiel

Zur Herstellung des Nährmediums im Laborverfahren wird folgende Zusammensetzung gewählt:

- . 30 Vol .-% Brennereischlempe
- . 2,2 Ma .-% i. TS Brennereitreber, fraktioniert und gewaschen (Brennereitreber kann durch den Rückstand einer Heißwasser-Extraktion bei 65 - 70 °C von Roggenkleie ersetzt werden.)

. 0,30 - 0,40 Ma .-% Diammoniumhydrogenphosphat $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

. 0,55 - 0,75 Ma .-% Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4

Im Falle des Einsatzes von 20 Vol .-% Grünmehlhydrolysat werden 0,20 Ma .-% KH_2PO_4 benötigt. Bei Verwendung von Kalkammonsalpeter als Stickstoffquelle muß die KH_2PO_4 -Konzentration mit dem Faktor 1,4 multipliziert werden; der CaCl_2 -Zusatz entfällt.

. 0,045 Ma .-% Magnesiumsulfat $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

. 0,023 Ma .-% Calciumchlorid CaCl_2 .

Der pH-Wert vor der Sterilisation beträgt 5,0 - 5,7.

Nach Inokulation kann im Schüttelkolben oder Fermentor kultiviert werden.

Bei Verwendung von HUPc 2711 (DD-WP 145028) werden folgende Aktivitäten erreicht:

- . Filterpapier saccharifizierende Aktivität 0,45 - 0,65 E/ml
- . Na-CMC liquifizierende Aktivität 45 - 70 % relativ
- . Cellobiase 0,8 - 2,0 U/ml

. Alpha-Amylase	0,5 - 5	IE/ml
. Glucoamylase	8 - 20	E/ml
. Protease (sauer)	50 - 80	Tyr.-E.
. Xylanase	25 - 40	E/ml
. Ethanolausbeute nach Vermaischung	≅	103,5 %

Zur Erhöhung der Enzyausbeute kann eine Substratlimitierung durch Nachdosierung von Nährmedienbestandteilen aufgehoben sowie der pH-Verlauf durch Dosierung von Laugen und Säuren gesteuert werden.

7. Erfindungsanspruch

1. Nährmedium zur Herstellung eines Enzymkomplexes für die Anwendung in der Brennerei zur Hydrolyse von Nichtstärke-Polysacchariden des Getreides mit Hilfe dafür geeigneter Pilzstämmen, gekennzeichnet dadurch, daß 30 Vol.-% Brennereischlempe als Nährstoff sowie 2 Ma.-% i. TS aus Schlempe durch Heißwasser-Extraktion bei 62 °C fraktionierter und gewaschener Brennereitreber als Enzyminduktor enthalten ist.
2. Nährmedium nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß anstelle des fraktionierten Brennereitrebers der Rückstand einer Heißwasser-Extraktion (65 - 70 °C) von Roggenkleie in Verbindung mit Schlempe und anderen Nährmedienbestandteilen verwendet wird.
3. Nährmedium nach Punkt 1/2, gekennzeichnet dadurch, daß die darauf gewonnenen Enzymkomplexe bei Kultivierung geeigneter Stämme cellulolytische, xylanolytische, amylolytische und glucanolytische Aktivitäten aufweisen, die durch Induktion gebildet werden.