

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK
AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

PATENT-SCHRIFT 145 027

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 29 Absatz 1 des Patentgesetzes

Int. Cl.³

(11) 145 027

(45) 19.11.80

3(51) C 12 N 9/24

(21) WP C 12 d / 192 975

(22) 24.05.76

-
- (71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Zentralinstitut für Ernährung, Bergholz-Rehbrücke, DD
- (72) Baum, Friedbert, Dr. Dipl.-Biol.; Leuchtenberger, Andreas, Dr. Dipl.-Biol.; Ruttloff, Heinz, Prof. Dr. Dipl.-Lebensmittelchem.; Schiweck, Erhard, Dipl.-Ing.; Wardsack, Christine, DD
- (73) siehe (72)
- (74) AdW der DDR, FZ für Molekularbiologie und Medizin, Zentralinstitut für Ernährung, Büro für Schutzrechte und Neuererwesen, 1505 Bergholz-Rehbrücke, Arthur-Scheunert-Allee 114-116
-

- (54) Verfahren und Vorrichtung zur Herstellung von pektinolytischen Enzymen
-

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Herstellung von pektinolytischen Enzymen durch Kultivierung von Schimmelpilzen. Die pektinolytischen Enzyme dienen u.a. der Fruchtsaftklärung, der Ausbeutesteigerung bei der Fruchtsaftgewinnung, sowie zur Mazeration von Obst und Gemüse. Ziel der Erfindung ist die Erhöhung der Enzymaktivität von Kulturflüssigkeiten. Die Aufgabe besteht in der Entwicklung spezieller Verfahrensbedingungen. Erfindungsgemäß wird eine Kulturflüssigkeit I, mit einem Schimmelpilz, insbesondere aus der Art *Aspergillus niger*, beimpft und eine Myzeldecke emers vorgezchtet. Anschließend wird eine spezielle Kulturflüssigkeit II, in der Weise zugeführt, daß durch den Anstieg der Flüssigkeitsoberfläche bedingt, die Myzeldecke in geringem Abstand unterhalb der Flüssigkeitsoberfläche unzerstört verbleibt. Die Kultivierung wird dann submers weitergeführt. Das Verfahren ist in einer ebenfalls erfindungsgemäßen Vorrichtung, sehr vorteilhaft durchführbar.

-4- 192 975

Erfinder: Dr. Friedbert Baum
Dr. Andreas Leuchtenberger
Prof. Dr. Heinz Ruttloff
Dipl.-Ing. Erhard Schiweck
Christine Wardsack

Verfahren und Vorrichtung zur Herstellung von pektinolytischen Enzymen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Herstellung von pektinolytischen Enzymen durch Kultivierung von Schimmelpilzen. Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten pektinolytischen Enzyme bzw. die solche enthaltenden Kulturlösungen werden in der obst- und gemüseverarbeitenden Industrie eingesetzt. Sie dienen zur Fruchtsaftklärung, zur Ausbeutesteigerung bei der Fruchtsaftgewinnung, außerdem werden sie zur Mazeration von Obst und Gemüse verwendet.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bekannt, daß verschiedene Schimmelpilze, davon solche der Gattung Aspergillus, unter geeigneten Kulturbedingungen im Emers- und Submersverfahren pektinolytische Enzyme produzieren. Im Falle der Produktion von Pektinase nach dem Submersverfahren wird die erforderliche Kulturflüssigkeit in einem Schüttelkolben oder Fermentor mit Konidien des Schimmelpilzstammes oder mit vegetativem Myzel desselben beimpft.

Die Population wird anschließend unter Schütteln der Kolben oder unter Rühren und Belüftung im Fermentor zum Wachsen gebracht. Im Verlauf der Kulturführung synthetisiert das Pilzmyzel pektinolytische Enzyme, die in die Kulturflüssigkeit ausgeschieden werden. Durch die bekannten Verfahren mit submerser Kulturführung werden jedoch nur relativ geringe Ausbeuten, bis etwa eine Einheit Pektinaseaktivität pro Milliliter Kulturfiltrat an pektinolytischen Enzymen erzielt. Die Einheit der Pektinaseaktivität ist definiert durch die Pektinmenge in g, die von 1 ml Kulturfiltrat in ihrer Viskosität um 30 % gesenkt wird. Nachdem man erkannt hatte, daß beim Submersverfahren der Kultivierung von Schimmelpilzen, insbesondere bei der Kultivierung von *Aspergillus niger*, eine Klümpchenbildung durch das Zusammenballen des Myzels während des mechanischen Mischens eintritt, ist man dazu übergegangen, diese Submerskultivierung zu modifizieren.

Nach einem dieser bekannten Verfahren (A. A. Martakov und O. P. Dianova; Izv. Akad. Nauk Kaz. SSR, Ser. Biol. 5 (6) 54 - 99 (1967)) wird eine günstigere fädchen- und schwammartige Myzelstruktur dadurch erhalten, daß man die Kulturflüssigkeit in dem betreffenden Behälter kreisen läßt, wobei durch die Zentrifugalkraft beim Wachsen des Myzels ein dichter Ring an der Kolbenwand entsteht. Von den gleichen Autoren wird auch eine andere Verfahrensvariante angegeben. Bei dieser bekannten Verfahrensweise wird zunächst die Kulturflüssigkeit mit Sporen des Schimmelpilzes beimpft und im Emersverfahren innerhalb von 6 bis 7 Tagen eine dichte Myzelschicht erzeugt. Vom Zeitpunkt der Sporenbildung an wird der Kolben mit der Kulturflüssigkeit auf einen Schüttelapparat gestellt und die weitere Fermentation nach dem Submersverfahren vorgenommen. Im Ergebnis wird eine Kulturflüssigkeit mit einer erhöhten pektinolytischen Aktivität gegenüber einer im herkömmlichen Submersverfahren erhaltenen Kulturflüssigkeit erhalten.

Die letztgenannten Verfahren erfordern nach wie vor ein Rühren bzw. Schütteln des Behälters und sind daher in technischen Dimensionen nur mit zusätzlichem Aufwand zu realisieren. Abgesehen davon, wird durch die zuletzt genannten Verfahrensweisen die Enzymaktivität gegenüber der beim Submersverfahren nicht in solcher Größenordnung erhöht, wie es für die technische Anwendung wünschenswert ist.

Zur Durchführung von bekannten Verfahren der Fermentation im Submersverfahren werden Behälter, d. h. Fermentoren zur Aufnahme der Kulturflüssigkeit benutzt, die ein Belüftungssystem für die Luftzufuhr und einen gegebenenfalls außerhalb des Behälters angebrachten Heizmantel besitzen. Diese Vorrichtungen sind auch mit einem Deckel ausgerüstet. Es sind ebenfalls Fermentationsbehälter bekannt, die ein Rührwerk zum Durchmischen des Kulturmediums besitzen. Besondere Fermentationsbehälter, die für den Übergang der Kultivierung von Schimmelpilzen nach dem Emersverfahren in das Submersverfahren eingesetzt werden, sind nicht bekannt.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, eine Kulturflüssigkeit zu erhalten, deren Enzymaktivität wesentlich erhöht ist gegenüber Kulturflüssigkeiten aus herkömmlichem breiartigen Myzel. Im Vergleich zu bekannten Lösungen soll darüber hinaus der mit dem Verfahren verbundene apparative Aufwand verringert werden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Gegenüber einer von Beginn der Kultivierung eines Schimmelpilzes an submers geführten Verfahrensweise geht die bereits bekannte zunächst emers begonnene Kultivierung, die dann submers fortgesetzt wird davon aus, eine schwammige Struktur des Myzels zu erzeugen.

Diese Struktur wird für wesentlich angesehen und die weitere Verfahrensweise als von geringem Einfluß auf die Erhöhung der Enzymaktivität. Die Durchführung dieser bekannten Verfahren in technischem Maßstab erfordert einen erheblichen Aufwand. Aus der obigen Zielstellung ist die Aufgabe abgeleitet, eine Verfahrensweise aufzuzeigen, die nach der zunächst emers begonnenen Kultivierung im weiteren Verfahrensverlauf zu hohen Enzymaktivitäten führt.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von pektinolytischen Enzymen durch Kultivierung von Schimmelpilzen, insbesondere solchen der bekannten Gattung *Aspergillus*, vorzugsweise der Art *Aspergillus niger*, in kohlenhydrat- und stickstoffhaltigen Nährmedien, wird zunächst emers und anschließend submers kultiviert und nachfolgend die enzymatisch aktive Kulturflüssigkeit vom Myzel abgetrennt und frische Kulturflüssigkeit zugeführt. Die Kultivierung wird in dieser Weise kontinuierlich weitergeführt. Wesentlich ist, daß eine Kulturflüssigkeit I, die die für das Wachstum des Schimmelpilzes erforderlichen kohlenhydrat- und stickstoffhaltigen Nährstoffe enthält, insbesondere mit einem Gehalt von 4 Gew.% Zuckerrübenextrakt und 1 Gew.% NH_4NO_3 mit dem Schimmelpilz beimpft wird und, daß innerhalb von 2 bis 5 Tagen bei 28 bis 32 °C eine Myzeldecke emers vorgezchtet wird. Wesentlich ist weiter, daß anschließend eine Kulturflüssigkeit II, die neben den erforderlichen Nährstoffen eine Puffersubstanz enthält, insbesondere mit einem Gehalt von 2 bis 4 Gew.% Zuckerrübenextrakt, 1 Gew.% NH_4NO_3 und 0,2 bis 1 Gew.% KH_2PO_4 in der Weise zugeführt wird, daß durch den Anstieg der Flüssigkeitsoberfläche bedingt die Myzeldecke in geringem Abstand, insbesondere im Abstand von einigen Zentimetern, unterhalb der Flüssigkeitsoberfläche unzerstört verbleibt. Die Kultivierung wird dann submers in 5 bis 8 Tagen mit nach den ersten Tagen zunehmender Belüftung unter Erhaltung der Myzeldecke weitergeführt und mehrmals ein Austausch der erhaltenen enzymatisch aktiven Lösung durch frische Kul-

turflüssigkeit II vorgenommen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist in einer besonderen, ebenfalls erfindungsgemäßen Vorrichtung, sehr vorteilhaft durchzuführen. Diese Vorrichtung, siehe Figur 1, stellt einen Fermentor dar, sie besteht in ihren wesentlichen Teilen aus einem Behälter 1, dessen Durchmesser so gewählt ist, daß eine große Flüssigkeitsoberfläche resultiert, zur Aufnahme der Kulturflüssigkeiten, einen im unteren Teil innerhalb des Behälters angeordneten Luftverteiler 2, siehe auch Figur 2, der aus einem Zentralrohr 3 für die Luftverteilung mit in horizontaler Ebene angebrachten Verteilerrohren 4, die mit zahlreichen Bohrungen oder Düsen 15 zum Luftaustritt versehen sind und einem Luftzuführungsrohr 10 besteht, einer in etwa halber Höhe im Behälter in horizontaler Ebene angebrachten siebartigen Platte 5, die sich über den gesamten horizontalen Querschnitt erstreckt und deren Anbringung 6 eine gleitende Verschiebung in vertikaler Richtung gestattet, einen mit Flansch 7 und Tragösen 8 versehenen Deckel 9 und Zuleitungen 13 sowie einer Ableitung 14 und gegebenenfalls einen Heizmantel am äußeren unteren Teil des Behälters. Die in den Verteilerrohren angebrachten Bohrungen oder Düsen besitzen einen Durchmesser von 0,6 bis 1,2 mm und es handelt sich um etwa 1500 Stück pro m² Querschnittsfläche.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die hochaktive Myzelform hergestellt, indem in den beschriebenen Fermentor 1 zunächst ein bestimmtes Volumen einer für den betreffenden Schimmelpilz geeigneten Nährlösung mit Konidien eines Schimmelpilzes, z. B. *Aspergillus niger*, beimpft wird und sich nach 2-5 tägiger Standkultur unterhalb der siebartigen Platte auf der Flüssigkeitsoberfläche eine Myzeldecke 11 ausbildet. Es wird dann weitere Nährlösung in der Weise zugegeben, daß die Myzeldecke unter der Flüssigkeitsoberfläche 12 an der siebartigen Platte deponiert bleibt.

Anschließend wird mit zunehmender Intensität belüftet. Während der Kultivierung bildet sich ein Myzel aus, das pektinolytische Enzyme in die Nährlösung ausschüttet. Nach Beendigung der Kultivierung und Ablassen der Kulturflüssigkeit kann neue Nährlösung in den Behälter gegeben und auf diese Weise die Kultivierung mehrfach unter Verwendung ein und desselben Myzels durchgeführt werden.

Der Vorteil dieser technischen Lösung besteht darin, daß in einem geschlossenen System unter submersen Bedingungen hohe Enzymausbeuten erzielt werden, bei gleichzeitiger Berücksichtigung toxikologisch-hygienischer Belange. Darüber hinaus kann eine Myzeldecke mehrfach genutzt und die Produktivität des Verfahrens in dem beschriebenen Fermentor wesentlich erhöht werden.

Die Erfindung soll an folgendem Ausführungsbeispiel erläutert werden:

Beispiel

Der für die Herstellung von Pektinase vorgesehene Behälter wird mit einer solchen Menge der Kulturflüssigkeit, die 4%igen Zuckerrübenextrakt und 1 % HN_4NO_3 enthält, gefüllt, daß sich der Flüssigkeitsspiegel unterhalb einer im Behälterinneren in horizontaler Ebene angebrachten siebartigen Platte befindet. Die Kulturflüssigkeit I wird nun in üblicher Weise mit einer Konidienabschwemmung eines bekannten *Aspergillus niger* Stammes beimpft.

Nach 2 bis 5 Tagen Standkultur bei 30 °C bildet sich auf der Oberfläche der Kulturflüssigkeit I eine geschlossene kräftige Myzeldecke aus. Zu der Kulturflüssigkeit wird nun soviel Kulturflüssigkeit II, die 2 bis 4%igen Zuckerrübenextrakt, 1 % NH_4NO_3 und 0,5 % KH_2PO_4 enthält, hinzugegeben, daß sich der Flüssigkeitsspiegel etwa 5 - 10 Zentimeter oberhalb der siebartigen Platte befindet. Durch die Siebplatte wird die Myzeldecke unter der Flüssigkeits-

oberfläche zurückgehalten. Die weitere Kultivierung erfolgt bei 30 °C und anfangs unter schwacher Belüftung, um nicht durch starke Flüssigkeitsbewegungen die Deckenstruktur zu zerstören. Im Verlauf von 5 Tagen kommt es zu einer weiteren Verstärkung des Myzels und zur Bildung von pektinolytischen Enzymen. Die Belüftung wird am zweiten Kultivierungstag erhöht und in den darauffolgenden Tagen weiter gesteigert. Nach 5- 8 Tagen wird die Kulturlösung aus dem Fermentor abgelassen und die entsprechende Menge einer frisch zubereiteten, sterilen Kulturflüssigkeit II wieder hinzugegeben. Die Belüftung wird auf 1 Luft/ Medium/min eingestellt. Die optimale Enzymaktivität ist bei dem 2. Fermentationsansatz bereits nach 4 - 6 Tagen erreicht. Die enzymatisch aktive Kulturflüssigkeit wird erneut abgelassen und durch frische Kulturflüssigkeit II ersetzt. Insgesamt lassen sich etwa 5 - 10 Wechsel mit jeweils 4 - 6 Tagen Fermentationsdauer durchführen. Im Verlauf einer Fermentation verändert sich der pH-Wert von etwa 5 auf 2,5 bis 3. Die Pektinaseaktivität erreicht Werte bis zu 15 E/ml. Die Bestimmung der Pektinaseaktivität wird wie folgt durchgeführt:

2 ml einer 1%igen Pektinlösung mit einem pH 4,0 (berechnet auf Reinpektin) werden mit 1 ml Fermentlösung (9 ml Azetatpuffer pH 0,4 + 1 ml Kulturfiltrat; gegebenenfalls weitere Verdünnung mit dem genannten Puffer) vermischt und 20 min bei 30 °C inkubiert. Nach der Inaktivierung des Enzyms (2 min. im kochenden Wasserbad) wird 2 min in kaltem Wasser abgekühlt und 10 min bei 30 °C temperiert. Anschließend wird die Zeit gemessen, die die Pektinlösung benötigt, um in einer 0,1 ml Pipette von 0 - 0,03 ml auszulaufen. Blindwert: 2 ml Pektinlösung + 1 ml Azetatpuffer pH 4,0 (Auslaufzeit: 6,8 - 7,5 sec).

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Gewinnung von pektinolytischen Enzymen durch Kultivierung von Schimmelpilzen, insbesondere solchen der bekannten Gattung Aspergillus, vorzugsweise der Art Aspergillus niger, in kohlenhydrat- und stickstoffhaltigen Nährmedien mit zunächst emerser und anschließend submerser Kultivierung und nachfolgender Abtrennung der enzymatisch aktiven Kulturflüssigkeit sowie erneuter Zuführung frischer Kulturflüssigkeit und kontinuierlicher Weiterführung der Kultivierung, dadurch gekennzeichnet, daß eine Kulturflüssigkeit I, die die für das Wachstum des Schimmelpilzes erforderlichen kohlenhydrat- und stickstoffhaltigen Nährstoffe enthält, insbesondere mit einem Gehalt von 4 Gew.% Zuckerrübenextrakt und 1 Gew.% NH_4NO_3 , mit dem Schimmelpilz beimpft und innerhalb von 2 bis 5 Tagen bei 28 bis 32 °C eine Myzeldecke emers vorgezchtet wird und anschließend eine Kulturflüssigkeit II, die neben den Nährstoffen eine Puffersubstanz enthält, insbesondere mit einem Gehalt von 2 bis 4 Gew.% Zuckerrübenextrakt, 1 Gew.% NH_4NO_3 und 0,2 bis 1 Gew.% KH_2PO_4 , in der Weise zugeführt wird, daß durch den Anstieg der Flüssigkeitsoberfläche bedingt, die Myzeldecke im geringen Abstand unterhalb der Flüssigkeitsoberfläche unzerstört verbleibt und danach die Kultivierung submers in 5 bis 8 Tagen, mit nach den ersten Tagen zunehmender Belüftung, unter Erhaltung der Myzeldecke weitergeführt und mehrmals ein Austausch der erhaltenen enzymatisch aktiven Lösung durch frische Kulturflüssigkeit II vorgenommen wird.
2. Vorrichtung zur Gewinnung von pektinolytischen Enzymen durch Kultivierung von Schimmelpilzen, gekennzeichnet durch einen Behälter (1) zur Aufnahme der Kulturflüssigkeit, einen im unteren Teil innerhalb des Behälters angeordneten Luftverteiler (2), der aus einem Zentralrohr (3) für die Luftverteilung

mit in horizontaler Ebene angebrachten Verteilerrohren (4), die mit zahlreichen Bohrungen oder Düsen zum Luftaustritt versehen sind und einem Luftzuführungsrohr (10) besteht, einer in etwa halber Höhe im Behälter in horizontaler Ebene angebrachten siebartigen Platte (5), die sich über den gesamten horizontalen Querschnitt erstreckt und deren Anbringung (6) eine gleitende Verschiebung in vertikaler Richtung gestattet, einen mit Flansch (7) und Tragösen (8) versehenen Deckel (9) und Zuleitungen (13) sowie einer Ableitung (14) und gegebenenfalls einen Heizmantel am äußeren unteren Teil des Behälters.

Hierzu 1 Blatt Zeichnungen

Fig. 1

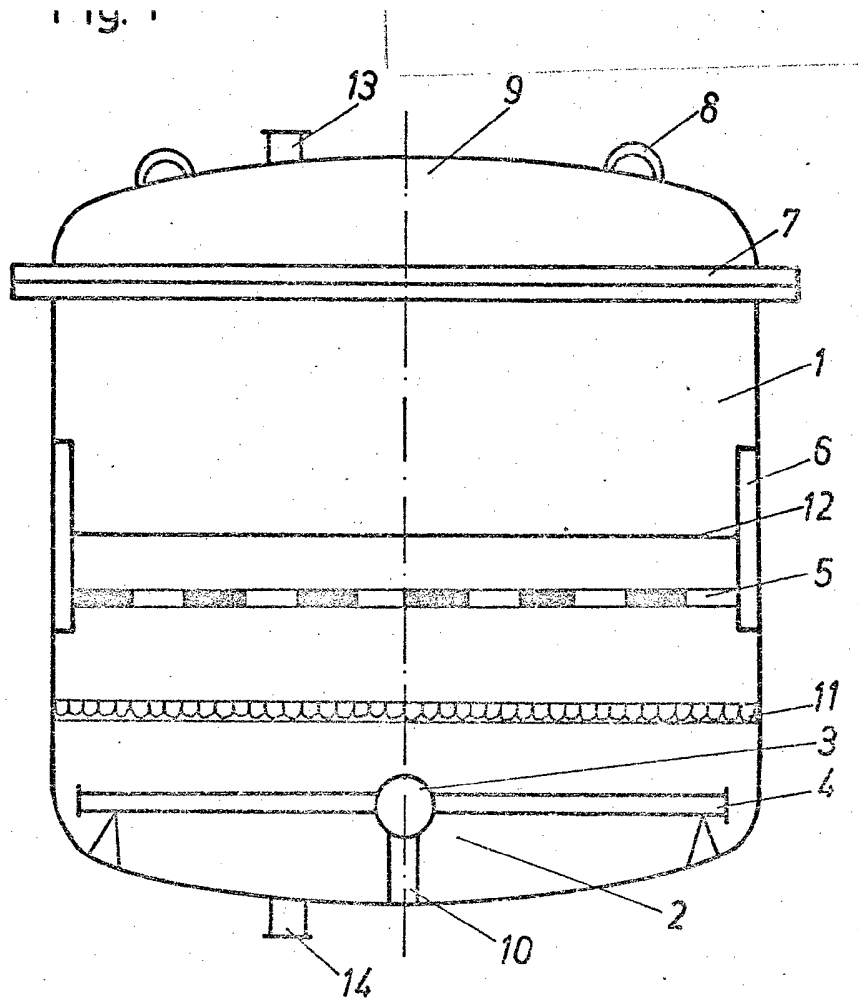


Fig. 2

