



## Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Aenderungsgesetzes  
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

# 202 620

Int.Cl.<sup>3</sup>

3(51) A 23 L 2/34

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veroeffentlicht

(21) WP A 23 L/ 2319 835

(22) 22.07.81

(44) 28.09.83

(71) ADW DER DDR, BERLIN, DD

(72) BOCK, WILLY, DR. DIPL.-CHEM.; SCHAWALLER, HANS-JOACHIM, DIPL.-ING.;  
FLEMMING, CHRISTIAN, DR. DIPL.-CHEM.; GABERT, ANTON, DR. DIPL.-CHEM., DD

(73) siehe (72)

(74) ADW DER DDR ZENTRALINST. F. ERNAEHRUNG, PATENTBUERO 1505 BERGHOLZ-REHBR.  
ARTHUR-SCHEUNERT-ALLEE 114-116

(54) VERFAHREN ZUR KONTINUIERLICHEN ENZYMATISCHEN BEHANDLUNG PEKTINHALTIGER  
FLUESSIGKEITEN

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kontinuierlichen enzymatischen Behandlung von pektinhaltigen Flüssigkeiten, vorzugsweise von Frucht- und Gemüsesäften. Das Verfahren gestattet die Herstellung von klaren Säften und von hochwertigen Saftkonzentraten. Darüber hinaus ist es auch zur Herstellung von Pektinhydrolysaten, die bestimmte oligomere Galakturonsäuren enthalten, einsetzbar. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Verfahrenbedingungen zur Erhöhung der Wirksamkeit von trägerfixierten unlöslichen pektinolytischen Enzymen für den kontinuierlichen Pektinabbau aufzuzeigen. Erfindungsgemäß wird ein auf einem Träger fixiertes Enzymgemisch mit einem Aktivitätsverhältnis von 0,2 bis 2,0, vorzugsweise 0,5 bis 1,0 der Hauptwirkkomponenten Polygalakturonase und Pektinesterase eingesetzt.

231983 5 1

Erfinder: Dr. Willy Bock  
Hans-Joachim Schawaller  
Dr. Christian Flemming  
Dr. Anton Gabert

Verfahren zur kontinuierlichen enzymatischen Behandlung  
pektinhaltiger Flüssigkeiten

Anwendungsgebiet der Erfindung

Pektinhaltige Flüssigkeiten, vorzugsweise Frucht- und Gemüsesäfte, weisen aufgrund makromolekularer Pektininhaltstoffe eine relativ hohe Viskosität auf. Diese erschwert bzw. verhindert die Abtrennung von kolloiden Trübbestandteilen, das sogenannte Klären, die Filtration zu klaren Säften und insbesondere die Produktion von hochwertigen Saftkonzentraten durch Wasserverdampfung für die Herstellung von Getränken sowie das Vermischen von Säften bzw. Saftkonzentraten mit Alkohol ohne Niederschlagsbildung für die Herstellung von speziellen Spirituosen.

In all diesen Fällen ist ein Pektinabbau bis zu einer bestimmten Restviskosität erforderlich, der durch das erfindungsgemäße Verfahren gewährleistet wird. Darüber hinaus kann das Verfahren auch zur Herstellung von Pektinhydrolysaten, die bestimmte oligomere Galakturonsäuren, beispielsweise für analytische Zwecke, enthalten, eingesetzt werden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Klärung bzw. Depektinisierung von Fruchtsäften und die Herstellung von Pektinhydrolysaten erfolgt in der Regel durch die Behandlung der Substrate mit pektinolytischen Enzympräparaten aus Schimmelpilzen (*Aspergillus spec.*) vor allem mittels sogenannter Pektinasen oder Klärenzyme. Der erforderliche Pektinabbau wird gewährleistet durch die Hauptwirkkomponenten Polygalakturonasen (EC 3.2.1.15) und Pektinesterasen (EC 3.1.1.11). Pektinesterasen sind bekanntlich allein zum Pektinabbau nicht in der Lage. Gebräuchlich sind verschiedene lösliche Klärenzyme, die bisher hauptsächlich in diskontinuierlichen technischen Prozessen des Pektinabbaus eingesetzt werden.

Der Einfluß und die Bedeutung der Hauptwirkkomponenten für einzelne pektinolytische Enzymsysteme ist unter definierten Substratbedingungen weitgehend bekannt. Außer den Klärenzymen sind aber auch noch Maischeenzyme und Mazerierenzyme, sogenannte Mazerasen, handelsüblich. Für den rationellen Einsatz der pektinolytischen Enzyme ergeben sich für den Fachmann insbesondere Probleme aus der Vielfalt der angebotenen Handelspräparate, die wiederum aus mehreren Einzelenzymen mit unterschiedlicher Aktivität bestehen und verschiedene Pektinpolysaccharide als Substrate bevorzugen.

Bekannt ist auch die Modifizierung von löslichen pektinolytischen Enzymen durch Zumischung einer anderen Enzymkomponente. Dazu gehört der Zusatz von Pektinesterase zur Wirkungsverstärkung eines Enzympräparates (US P 2 457 560) bei der Hydrolyse der glykosidischen Bindung von Polygalakturoniden in einer Menge von etwa 0,085 bis etwa 2,360 Teilen pro Teil Enzympräparat. Gesicherte Kenntnisse über den Einfluß und die Bedeutung von bestimmten Aktivitätsverhältnissen der zum Einsatz kommenden Enzyme für eine kontinuierliche enzymatische Behandlung pektinhaltiger Flüssigkeiten sind daraus jedoch nicht zu entnehmen.

Das betrifft sowohl die Art und Zusammensetzung der Ausgangsenzympräparate als auch ihre Aktivitäten und Einsatzbedingungen.

Bei den vorgeschlagenen kontinuierlichen Verfahren zum Pektinabbau werden handelsübliche Klärenzyme aus Schimmelpilzen in löslicher oder in trägerfixierter Form verwendet, wobei die zu behandelnden pektinhaltigen Flüssigkeiten, wie Fruchtsäfte oder Gemüsesäfte oder Pektinsäurelösungen, eine Festbettkolonne oder einen gerührten Reaktor bzw. Kaskadenreaktor, gesteuert über eine Viskositätsmessung, durchfließen.

Die vorgeschlagenen kontinuierlichen Verfahren, hängen generell hinsichtlich ihrer Effektivität nach Leistung pro Zeiteinheit und nach dem erforderlichen Anlagenaufwand entscheidend von der Wirksamkeit des enzymatischen Pektinabbaus ab. Dies trifft sowohl für den Einsatz löslicher Enzyme als auch in weit stärkerem Maße für den Einsatz an unlösliche Trägermaterialien fixierter Enzyme zu. Bei letzteren ist das im löslichen Zustand vorhandene Zusammenwirken der jeweils eingesetzten Einzelenzyme und die aufeinander abgestimmte Wirksamkeit beim Pektinabbau, wie umfassende Untersuchungen gezeigt haben, nicht ohne weiteres gewährleistet. Ursachen dafür sind verschiedene Einflußbedingungen, die mit der Trägerfixierung der pektinolytischen Enzyme im Zusammenhang stehen, wie eine Substratbehinderung und/oder eine Veränderung in der Spaltungsweise in Abhängigkeit von der Porosität des Trägermaterials, der Fixierungsart und der spezifischen Aktivität der Enzym-Trägerkomplexe. Der bisher stets auftretende generelle Effektivitätsverlust der eingesetzten trägerfixierten Enzyme gegenüber den löslichen Enzymen muß daher durch eine möglichst hohe Wirksamkeit beim Pektinabbau sowie durch die Mehrfachnutzung der Enzym-Trägerkomplexe kompensiert werden.

#### Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, in einem Enzymreaktor einen möglichst schnellen kontinuierlichen Pektinabbau in pektinhal-

tigen Flüssigkeiten mit einem trägerfixierten unlöslichen pektinolytischen Enzymgemisch zu erreichen.

#### Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Verfahrensbedingungen aufzuzeigen, welche die Wirksamkeit der trägerfixierten unlöslichen pektinolytischen Enzyme beim kontinuierlichen Pektinabbau so erhöhen, daß ihre Anwendung in einem Enzymreaktor die erforderliche Reaktionsgeschwindigkeit an den zu behandelnden Säften oder Pektinlösungen gewährleisten.

Es wurde gefunden, daß dies erreicht wird, wenn der Pektinabbau in pektinhaltigen Flüssigkeiten, vorzugsweise Frucht- und Gemüsesäften sowie Pektinlösungen, mit einem trägerfixierten unlöslichen pektinolytischen Enzymgemisch, welches ein Aktivitätsverhältnis der Hauptwirkkomponenten Polygalakturonasen (EC 3.2.1.15) und Pektinesterasen (EC 3.1.1.11) von 0,2 bis 2,0, vorzugsweise 0,5 bis 1,0, aufweist, unter turbulenten Strömungsbedingungen vorgenommen wird.

Derartig hochwirksame Polygalakturonase/Pektinesterase-Aktivitätsverhältnisse werden bisher von handelsüblichen pektinolytischen Enzympräparaten aus Schimmelpilzen nicht erreicht. Die bisher bekannten Arbeitsweisen beruhen daher auf einer gegenüber der tatsächlich erfindungsgemäß erreichbaren Geschwindigkeit beim Pektinabbau auf einer geringen Wirksamkeit der gebräuchlichen Enzympräparate.

Zur Festlegung der erfindungsgemäß entscheidenden Aktivitätsverhältnisse wird die Aktivität beider Hauptwirkkomponenten bei pH 4,5 und 30 °C in internationalen Enzymeinheiten mit standardisierten Substraten bestimmt. Diese standardisierten Substrate sind für Polygalakturonase aus *Aspergillus spec.* gereinigte Citruspektinsäure mit einem Galakturonangehalt von mindestens 80 %, einem Aschegehalt kleiner als 1,0 % und einer Grenzviskositätszahl  $[\eta]$  von 75 bis 100 ml pro g Galakturonan sowie für Pektinesterase verschie-

dener Herkunft gereinigtes Citruspektin mit einem Veresterungsgrad von 55 bis 65 %.

Für die Bestimmung der Aktivität der Polygalakturonase werden eine 1 %ige Pektinsäurelösung, bezogen auf Galakturonan, in 0,1 Citratpuffer von pH 4,5 verwendet und die freigesetzten reduzierenden Endgruppen in mol pro min im linearen Reaktionsbereich nach der jodometrischen Methode durch Titration mit 0,025 N Natriumthiosulfat-Lösung quantitativ ermittelt.

Zur Bestimmung der Aktivität der Pektinesterase werden eine 0,5 %ige Pektinlösung bezogen auf Galakturonan, von pH 4,5 in destilliertem Wasser verwendet und die freigesetzten Carboxylgruppen in mol pro min im linearen Reaktionsbereich nach der pH-stat-Methode durch Titration mit 0,05 M Natronlauge quantitativ ermittelt. (PHAFF, H.J. bzw. KERTESZ, Z.I., Methods in Enzymology, 8 (1966) bzw. 1 (1955) 159).

Für den effektiven Einsatz an unlösliche Trägermaterialien fixierter pektinolytischer Enzyme ist die Erreichung des erfindungsgemäßen Polygalakturonase/Pektinesterase-Aktivitätsverhältnisses auf der Trägeroberfläche bei der Trägerfixierung der beiden Hauptwirkkomponenten, gegebenenfalls unter Einsatz von Pektinesterasen unterschiedlicher Herkunft, von entscheidender Wichtigkeit.

Es wurde weiterhin gefunden, daß eine schrittweise Trägerfixierung der Pektinesterase sich auf die Wirksamkeit der Enzym-Trägerkomplexe sowie auf das Zusammenwirken von Polygalakturonasen und Pektinesterasen günstig auswirken. Dabei ist es gleichgültig, ob im ersten Schritt Pektinesterase aus Schimmelpilzen oder aus höheren Pflanzen, z. B. aus Orangen, Tomaten, Weißkohl, an einem technisch relevanten porösen bzw. gelartigen organischen oder anorganischen Träger, in an sich bekannter Weise fixiert wird. Wesentlich ist, daß die Pektinesterase mehr in den inneren Be-

reichen der Porenoberfläche gebunden vorliegt.

Eine weitere Effektivitätssteigerung wird erreicht, wenn nicht die gesamte für die Trägerfixierung nutzbare Oberfläche mit dem Zweienzymssystem, gemessen als maximale spezifische Aktivität der Polygalakturonase pro g bzw. ml Trägermaterial, besetzt ist. Unter Berücksichtigung, auch ökonomischer Gesichtspunkte, sind spezifische Aktivitäten von 10 bis 60 % der maximal erreichbare spezifischen Aktivität für eine Bindungsart und ein Trägermaterial vorteilhaft. Erfindungsgemäß bevorzugt werden sowohl für poröse als auch für gelartige Trägermaterialien spezifische Aktivitäten um 30 %.

Für den kontinuierlichen Pektinabbau, insbesondere in Fruchtsäften oder Pektinlösungen ist ferner von Bedeutung, daß dieser in einem gesteuerten Reaktor unter turbulenten Strömungsbedingungen erfolgt. Dadurch wird gewährleistet, daß der Pektinabbau nicht durch Substratmangel bzw. durch lokale Anhäufung von weniger schnell spaltbaren Pektinabbauprodukten sich vorzeitig verlangsamt.

Eine für die Ausübung des erfindungsgemäßen Verfahrens benötigte Trägerfixierung des Enzymgemisches mit dem gewünschten Aktivitätsverhältnis ist relativ einfach zu erreichen. Als ein technisch relevanter Träger wird beispielsweise ein poröses Polystyrol eingesetzt. Zunächst erfolgt dabei eine Aktivierung der Trägermatrix, danach die Bindung der vorgesehenen Enzyme. Weitere geeignete Enzym-Trägerkomplexe werden durch Kupplung der Enzyme an BrCN-Aktivierete SEPHAROSE in an sich bekannter Weise erhalten.

Beim Arbeiten mit einem Polystyrolträger wird im allgemeinen wie folgt verfahren:

1 Teil trockenes kugelförmiges Polystyrol G 8 TEPA wird mit 0,2 Teilen Benzochinon, die in 8 Teilen Dioxan gelöst sind, 20 bis 30 min bei Zimmertemperatur gerührt oder geschüttelt. Anschließend wird 5mal jeweils 15 min mit Ethanol oder Dioxan und danach 3mal je 10 min mit Wasser bzw.

Kupplungspuffer gewaschen. Der Waschvorgang ist beendet, wenn im Waschwasser kein Chinoin mehr nachweisbar ist (im anderen Fall tritt nach Zusatz von einigen Tropfen Ethanolamin eine rotbraune Farbe auf). Abschließend wird der aktivierte Polystyrolträger durch Absaugen erhalten. Die Enzymbindung erfolgt zweckmäßiger Weise wie folgt:

Das zu bindende Einzelenzym bzw. Enzymsystem wird in 0,1 M Phosphatpuffer von pH 7,4 oder in einem anderen Aminogruppen-freien Kupplungspuffer gelöst (5 bis 10 Teile) und bei Raumtemperatur mindestens 2 h oder bei 4 °C mindestens 12 h mit dem aktivierten Polystyrolträger geschüttelt. Die Bindung ist auch bei niedrigeren pH-Werten unter Verlängerung der Reaktionszeit möglich. Zur Abtrennung der nur lose adsorptiv gebundenen Enzyme werden die Enzym-Trägerkomplexe mehrfach jeweils 20 min mit 0,025 M Acetatpuffer von pH 4,5, der 0,5 M an NaCl enthält, oder mit Pektinsubstratlösung gewaschen (ca. 20 Teile). Die Enzym-Trägerkomplexe können im feuchten Zustand bei ca. 4 °C längere Zeit ohne Aktivitätsverlust gelagert werden.

Unter der beispielhaft angegebenen Immobilisierungsbedingungen werden die beiden erfindungsgemäß eingesetzten Hauptenzyme, Polygalakturonase und Pektinesterase, zu über 90 % kovalent an die Trägermatrix gebunden.

Zur Erzielung des erfindungsgemäßen Polygalakturonase/Pektinesterase-Aktivitätsverhältnisses wird das gelöste Enzymsystem, als ein Enzymgemisch vorliegend, zum gewünschten Aktivitätsverhältnis unmittelbar oder unter vorgeschalteter Bindung der Pektinesterase und nachgeschalteter Bindung von Polygalakturonase oder eines Enzymsystems, das von vornherein Polygalakturonase und Pektinesterase als Hauptwirkkomponenten enthält, trägerfixiert.

Anstelle des bereits erwähnten Phosphatpuffers haben sich auch Acetat-, Citrat- und Boratpuffer von pH 6,5 bzw. 7,0 für die Enzymkupplung gut bewährt. Für die Trägerfixierung der Pektinesterase erweisen sich Kupplungspuffer, die biva-

lente Metallkationen enthalten, aufgrund ihrer Enzym stabilisierenden Wirkung als besonders geeignet.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird nachfolgend an zwei Ausführungsbeispielen sowie in Figur 1 näher erläutert.

### Ausführungsbeispiele

#### Beispiel 1

Die partielle Depektinisierung von Apfelsaft erfolgt in einem thermostatisierbaren Rührreaktor (continuous stirred tank reactor) bei 30 bis 50 °C. Der Pektinabbau wird mit einem automatischen Viskosimeter, das dem Reaktionsgefäß nachgeschaltet ist, über die Dämpfung einer Ultraschallschwingung zeitlich verfolgt. Die Steuerung des Prozesses wird über die Durchflußgeschwindigkeit mittels eines Stellventils vorgenommen. In dem Reaktor befindet sich ein Enzym-Trägerkomplex mit einem Aktivitätsverhältnis der Polygalakturonase/Pektinesterase von 1,9 und einer Halbwertszeit von 20 Tagen in einer Menge von 2,5 Kilogramm pro 1000 Liter Reaktorvolumen. Der eingesetzte Apfelsaft wird mit einer Viskosität von 5,24 mPa.s innerhalb von 15 bis 60 min im stationären Betrieb auf eine Endviskosität von 1,20 bis 1,63 mPa.s gebracht und anschließend in an sich bekannter Weise für die Konzentratherstellung geklärt. Der Einfluß des Polygalakturonase/Pektinesterase-Aktivitätsverhältnisses auf die Geschwindigkeit des Pektinabbaus geht unmittelbar aus der Figur 1 hervor. Darin ist der jeweils ermittelte Pektinabbau auf ein Polygalakturonan/Pektinesterase-Aktivitätsverhältnis = 1 : 1 bezogen. Man erkennt die bedeutende Zunahme der Wirksamkeit bei kleinen Zahlenwerten des Aktivitätsverhältnisses im Bereich um 1.

#### Beispiel 2

Unter den im Beispiel 1 angegebenen Verfahrensbedingungen wird eine 0,5 % Apfelpektinlösung mit einem Veresterungsgrad von 60 % bei 30 °C und pH 4,5 (0,02 M Citratpuffer)

kontinuierlich zu oligomeren Spaltprodukten abgebaut. Der Prozeß wird über den Viskositätsverlust und die jodometrisch ermittelte Rate an gespaltenen  $\alpha(1\rightarrow4)$ -glykosidischen Bedingungen kontrolliert. Gegen Ende der Reaktion werden ebenfalls, wie bei der Anwendung löslicher Enzyme, Hydrolysegrade um 40 % erreicht. Die Hydrolysate setzen sich dann im wesentlichen aus Mono-, Di- Trigalakuronsäure zusammen und sind nicht mit dem Enzympräparat verunreinigt.

## Erfindungsansprüche

1. Verfahren zur kontinuierlichen enzymatischen Behandlung pektinhaltiger Flüssigkeiten, vorzugsweise von Frucht- und Gemüsesäften sowie Pektinlösungen, mittels pektinolytischer Enzyme aus *Aspergillus spec.* und gegebenenfalls unter Zusatz von Pektinesterase in einem Enzymreaktor, unter turbulenten Strömungsbedingungen, dadurch gekennzeichnet, daß auf einem Träger fixiert ein Enzymgemisch mit einem bei pH 4,5 und 30 °C gemessenen Aktivitätsverhältnis der Hauptwirkkomponenten Polygalakturonase (EC 3.2.1.15) und Pektinesterase (EC 3.1.1.11) von 0,2 bis 2,0, vorzugsweise von 0,5 bis 1,0, eingesetzt wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß in einem ersten Schritt Pektinesterase und anschließend Polygalakturonase oder gleichzeitig das pektinolytische Enzymssystem aus *Aspergillus spec.*, das Polygalakturonase und Pektinesterase als Hauptwirkkomponenten enthält, auf den Träger fixiert werden.

Hierzu 1 Seite Zeichnungen

**Fig.1** Einfluß des Polygalakturonase / Pektinesterase-  
Aktivitätsverhältnisses auf die Geschwindigkeit  
des Pektinabbaus

