



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENT SCHRIFT

(19) DD (11) 219 504 A1

4(51) C 12 N 9/26
C 12 N 11/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12.N. / 257 384 8

(22) 01.12.83

(44) 06.03.85

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1199 Berlin, Rudower Chaussee 5, DD

(72) Schiweck, Erhard, Dipl.-Ing.; Körner, Dieter, Dipl.-Ing.; Pardemann, Bernhard; Wardsack, Christine; Leuchtenberger, Andreas, Dr. Dipl.-Biol.; Ruttloff, Heinz, Prof. Dr. Dipl.-Lebensmittelchem.; Hermersdörfer, Heino, Dr. Dipl.-Biol., DD

(54) Gewinnung pektinolytischer Enzyme unter Einsatz trägerfixierter Schimmelpilze

(57) Das erfindungsgemäße Verfahren zur Gewinnung pektinolytischer Enzyme unter Einsatz trägerfixierter Schimmelpilze, vorzugsweise vom Stamm *Aspergillus niger*, hinterlegt in der zentralen Stammsammlung der DDR im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie in Jena unter ZIMET 43 692, wobei der Mikroorganismus auf Träger innerhalb eines Fermentors zum Aufwachsen gebracht und die Enzymsynthese mit dem gleichen oder einem in der Zusammensetzung geänderten Nährmedium durchgeführt wird, besteht im wesentlichen darin, daß bei Vorgabe der Sporenkonzentration für die Anzucht des Myzelrasens, Kultivationstemperatur, Luftzufuhr, Umwälzungsgeschwindigkeit des Nährmediums und Kultivationsdauer eine solche Trägerdichte im Nährmedium vorgesehen wird, daß das Verhältnis der effektiven Trägerfläche zum Nährmedienvolumen über $160 \text{ m}^2/\text{m}^3$, vorzugsweise 180 bis $550 \text{ m}^2/\text{m}^3$, bei einem mittleren Trägerabstand von 4 bis 25 mm innerhalb des Nährmediums, beträgt.

ISSN 0433-6461

7 Seiten

1

Erfinder: Erhard Schiweck Dr. Andreas Leuchtenberger
 Dieter Körner Prof. Dr. Heinz Ruttloff
 Bernhard Pardemann Dr. Heino Hermersdörfer
 Christine Wardsack

Gewinnung pektinolytischer Enzyme unter Einsatz träger-
fixierter Schimmelpilze

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Gewinnung pektinolytischer Enzyme mit dem Schimmelpilz *Aspergillus niger*. Das gewonnene Enzym wird vorrangig zur Mazeration von Obst und Gemüse eingesetzt.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die mikrobielle Gewinnung pektinolytischer Enzyme nach den bekannten Verfahren erfolgt in den letzten Jahren mehr und mehr vorwiegend durch submerse Kultivation von Schimmelpilzen bei diffusem Myzelwachstum. Diese Kultivationsform ist zwar in herkömmlichen Fermentoren durchführbar, liefert aber nur relativ geringe Aktivitätsausbeuten.

Einige Literatur- und Patentschriftenangaben beziehen sich auch auf die Erreichung höherer Enzymsyntheseleistungen durch Anwendung kompakter morphologischer Strukturen der Biomasse. So erzielten MARTAKOV A.A. und Dianova, O.P. (IZV.Akad. Nauk Kaz. SSR, Ser. Biol. 5 (1967) 6, 54-59) im Labormaßstab durch submerse Kultivation von schwammartigen Myzel eine Aktivitätssteigerung gegenüber dem

Einsatz von diffusem Myzel. Für die technische Realisierung wirkt sich nachteilig aus, daß das Kompaktmyzel in eine Drehbewegung versetzt werden muß.

Auch Baum, F./Leuchtenberger, A./Ruttloff, H./Schiweck, E./Wardsack, Ch. (DWP 145 027) arbeiten vorteilhaft mit kompaktem Myzel. Eine in Oberflächenkultur angezüchtete Myzeldecke wird durch eine Lochplatte unter der Flüssigkeitsoberfläche gehalten und weiterkultiviert. Nachteilig ist hierbei die geringe Biomassekonzentration ausgedrückt als kompakte Biomassemenge pro Medienvolumen.

Wardsack, Ch./Leuchtenberger, A./Baum, F./Ruttloff, H. (DWP 235 310) schlagen nach einer anderen Verfahrensweise vor, diffuses (breiförmiges) Myzel von *Aspergillus niger* in durchlässigen Behältnissen zu verdichten und zwangsweise in eine kompakte Wuchsform zu überführen. Diese Verfahrensweise liefert im Labormaßstab hohe Enzym-Ausbeuten, führt aber bei einer technischen Nutzung wegen der umständlichen Manipulationen zu Realisierungsschwierigkeiten.

Ein weiteres Verfahren zur Gewinnung eines pektinolytischen Enzymgemisches beschreiben Wardsack, Ch./Schiweck, E./Leuchtenberger, A./Körner, D./Hermersdörfer, H./Ruttloff, H./Pardemann, B. unter DD-PS 245 175. Es wird dabei mit trägerfixierten Schimmelpilzen, vorzugsweise mit einem Stamm von *Aspergillus niger*, gearbeitet. Wesentlich für dieses Verfahren ist, daß die Sporen des Mikroorganismus auf einem freischwebenden oder stationären Träger aus inertem Material zum Auswachsen gebracht werden und die Kultivierung mit dem gleichen oder mit einem veränderten Nährmedium fortgesetzt wird. Für die Anzucht des Myzelrasens auf dem Träger sind bestimmte Bedingungen angeführt, zu denen insbesondere die Einhaltung eines bestimmten Verhältnisses der Menge des Nährmediums zur Oberfläche des inerten Trägermaterials gehört. Dieses Verfahren läßt sich auch unter industriellen Bedingungen durchführen. Die erreichbaren Aktivitätsausbeuten liegen über denen anderer bekannter submerser Verfahren. Sie

sind jedoch in der genannten Höhe nicht ausreichend, um die Ökonomie des Verfahrens zu garantieren. Ferner fehlt die für einen Produktionsprozeß notwendige Stabilität und feste Myzelstruktur.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist daher durch einfache Kultivation eines Stammes von *Aspergillus niger* eine so hohe Syntheserate zu erreichen, daß eine ökonomische Produktion pektinolytischer Enzyme weiter verbessert wird.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde Verfahrensbedingungen aufzuzeigen, die es ermöglichen das obige Ziel in relativ einfacher Weise zu erreichen.

Zunächst wird in an sich bekannter Weise auf der Oberfläche eines in einem speziellen Fermentor installierten und vom Kulturmedium umgebenden fixierten inerten Trägers eine kompakte Myzelstruktur des einzusetzenden Stammes von *Aspergillus niger* angezogen. Der Schimmelpilz bewächst in 2 bis 4 Tagen die gesamte Trägerfläche. Sehr entscheidend für eine wesentlich erhöhte Enzymausbeute ist nun das Einhalten eines möglichst hohen Verhältnisses der Myzeloberfläche zum Volumen der Kulturlösung, wobei das Trägermaterial gleichmäßig im Fermentor verteilt sein muß. Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Gewinnung pektinolytischer Enzymgemische mittels eines trägerfixierten Mikroorganismus, vorzugsweise des Stammes *Aspergillus niger* R1/214, hinterlegt in der Stammsammlung der DDR im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie in Jena unter ZIMET 43 692, wird also der Mikroorganismus auf dem Träger innerhalb des Fermentors zum Aufwachsen gebracht und die Enzymsynthese mit dem gleichen oder mit einem in der Zusammensetzung geänderten Nährmedium durchgeführt wird. Dabei ist wesentlich, daß bei einer vorgege-

bener Sporenkonzentration für die Anzucht des Myzelrasens unter Einhaltung bestimmter Parameter hinsichtlich, Kultivations-temperatur, Luftzufuhr, Umwälzgeschwindigkeit des Nährmediums und Kultivationsdauer eine solche Trägerdichte im Nährmedium vorgesehen wird, daß das Verhältnis der effektiven Trägerfläche zum Nährmedienvolumen über $160 \text{ m}^2/\text{m}^3$, vorzugsweise 180 bis $550 \text{ m}^2/\text{m}^3$, bei einem mittleren Trägerabstand von 4 bis 25 mm innerhalb des Nährmediums beträgt.

Zur Anzucht des Myzelrasens sind folgende Bedingungen vorteilhaft:

- das Verhältnis der effektiven Trägerfläche (m^2) zur Medienmenge (m^3) beträgt 160 - $550 \text{ m}^2/\text{m}^3$
- Trägerabstand 4 - 25 mm
- Sporenkonzentration 10^2 - 10^4 Sporen pro ml
- Luftzufuhr 0,01 bis 1,0 vvm
- Medienumwälzung zur Erzielung einer Strömungsgeschwindigkeit des Nährmediums am fixierten Myzel von 1 bis 50 cm/sec
- Kultivations-temperatur 26 - 32 °C
- Kultivationsdauer 4 - 8 Tage

Durch die wesentlich erhöhte Trägerdichte (überraschender Weise wird trotz des Bewuchses mit dem Myzelrasen der ständige Wechsel des Nährmediums an der Oberfläche während der Umwälzung nicht behindert), die gleichmäßige Verteilung des Trägers im Fermentor sowie den geringen Trägerabstand wird eine kompakte und feste Myzelstruktur erreicht, die eine wichtige Voraussetzung für eine wesentlich erhöhte Enzymausbeute darstellen. Bei dieser Art der Fixierung ist des weiteren eine einfache und vollständige Abtrennung der Kulturlösung von der Biomasse voll gewährleistet.

Die Erfindung wird durch die folgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert:

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

In einem 2 l Spezialfermentor (Glasrohr mit den Abmessungen; Durchmesser 70 mm, Höhe 700 mm) werden 9 Trägerplatten

aus nichtrostendem Stahlgewebe mit einer dem Durchmesser des Rohres angepaßter maximalen Breite im Abstand von 5 mm in Längsrichtung des Rohres parallel zueinander fest installiert. Die Träger besitzen eine Länge von 500 mm. Daraus ergibt sich insgesamt eine Trägeroberfläche von $0,475 \text{ m}^2$ und ein Verhältnis Trägerfläche zu Medienmenge von $240 \text{ m}^2/\text{m}^3$. Der Fermentor wird mit 2 l Kulturmedium (5 % Glucose; 0,1 % Pektin; 0,75 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 % KH_2PO_4 ; 0,03 % $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; CaCO_3 ; NaCl) gefüllt und mit einer solchen Sporenmenge beimpft, daß ein Titer von 10^3 Sporen/ml Kulturlösung eingestellt ist. Die Kultivation wird bei 28 bis 32°C und einer Luftzufuhr von 1 bis 2 l Luft/min vorgenommen. Belüftung bzw. die Bewegung der Kulturlösung erfolgen nach dem Mammutpumpenprinzip. Nach 48 Stunden hat sich eine starke, stabile Myzeldecke am Gewebeträger ausgebildet. Danach wird die Kultivation zur Enzymsynthese fortgesetzt. Die Abtrennung der enzymhaltigen Kulturlösung erfolgt nach 5 bis 6 Tagen. Die Enzymaktivität liegt bei 250 bis 300 PG-E/ml.

Beispiel 2

In einem 50 l Spezialfermentor (Durchmesser 250 mm; Höhe 1000 mm) wird ein Trägerplattenpaket aus nichtrostendem Stahlgewebe aus 23 Platten (Breite der Platten 140 bis 250 mm; Länge 700 mm; Trägeroberfläche $6,8 \text{ m}^2$ bei einem Plattenabstand von 10 mm; Trägerfläche : Medienvolumen = $230 \text{ m}^2/\text{m}^3$) fest in senkrechter Lage installiert. Der Fermentor wird mit 30 l Medium (siehe Beispiel 1) gefüllt und mit $3 \cdot 10^7$ Sporen (10^8 Sporen/ml Kulturlösung) beimpft.

Zur Anzucht des Myzelrasens wird der Fermentor zunächst über 24 Stunden schonend nach dem Mammutpumpenprinzip betrieben und anschließend wird der notwendige intensive Medienumlauf durch das Zuschalten einer Kreiselpumpe in den Kreislauf erreicht.

Die Kultivation erfolgt bei 28 bis 32°C mit einer Luftzufuhr von 40 bis 90 l Luft/h. Nach einer Kultivationsdauer von 6 Tagen kann die Kulturlösung mit einer pektinolytischen Aktivität von 200 bis 250 PG-E/ml abgelassen werden.

Erfindungsanspruch

Verfahren zur Gewinnung pektinolytischer Enzyme unter Einsatz trägerfixierter Schimmelpilze, vorzugsweise des Stammes *Aspergillus niger*, hinterlegt in der zentralen Stammsammlung der DDR im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie in Jena unter ZIMET 43 692, bei dem der Mikroorganismus auf einem formstabilen Träger innerhalb eines herkömmlichen oder Spezialfermentors, beweglich oder fest installiert, zum Aufwachsen gebracht und die Enzymsynthese mit dem gleichen oder einem in der Zusammensetzung geänderten Nährmedium durchgeführt wird, dadurch gekennzeichnet, daß bei Vorgabe der Sporenkonzentration für die Anzucht des Myzelrasens, Kultivations- temperatur, Luftzufuhr, Umwälzungsgeschwindigkeit des Nährmediums und Kultivationsdauer eine solche Trägerdichte im Nährmedium erreicht wird, daß das Verhältnis der effektiven Trägerfläche zum Nährmedienvolumen über $160 \text{ m}^2/\text{m}^3$, vorzugsweise 180 bis $550 \text{ m}^2/\text{m}^3$, bei einem mittleren Trägerabstand von 4 bis 25 mm innerhalb des Nährmediums, beträgt.