



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 249 920 A1

4(51) C 12 N 9/26
C 12 N 9/16

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 291 106 2

(22) 09.06.86

(44) 23.09.87

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD

(72) Friese, Elke, Dr. Dipl.-Biol.; Leuchtenberger, Andreas, Dr. sc. Dipl.-Biol.; Ruttloff, Heinz, Prof. Dr. Dipl.-Lebensmittelchem., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von Pektinasepräparaten

(57) Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Pektinasepräparaten mit unterschiedlichen Anteilen an Polygalakturonase (PG) und Pektinesterase (PE) mittels trägerfixierter Schimmelpilze, vorzugsweise *Aspergillus niger*, besteht im wesentlichen darin, daß die Kultivierung bei Vorgabe bestimmter Parameter (Sporentiter, Kultivierungstemperatur und -dauer, Luftzufuhr, Umwälzgeschwindigkeit des Mediums, Verhältnis der Trägeroberfläche zum Nährmedienvolumen) in Nährmedien erfolgt, die unterschiedliche N-Quellen (anorganische Salze, komplexe Substanzen) bzw. Kombinationen von komplexen C- und N-Quellen enthalten. In Abhängigkeit von der eingesetzten N- bzw. C-Quelle entstehen Enzymgemische, die in ihren PG- und PE-Anteilen deutlich unterschiedlich sind und je nach Bedarf in der Obst- und Gemüseverarbeitung zur Mazeration, zur Maischeherstellung bzw. zur Totalverflüssigung eingesetzt werden können.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung von Pektinasepräparaten mit unterschiedlichen Anteilen von Polygalakturonase (PG) und Pektinesterase (PE) mittels trägerfixierter Schimmelpilze, vorzugsweise *Aspergillus niger*, durch submerse Kultivierung in Schüttelgefäßen, gebräuchlichen Rühr- oder Spezialfermentoren unter Anwendung bekannter Kulturbedingungen, **dadurch gekennzeichnet**, daß als N-Quellen 0,5 bis 2% löslicher anorganischer Nitrate oder Ammoniumsalze im Nährmedium oder 0,5 bis 10% komplexer N-Quellen, vorzugsweise Hefeextrakt, Futterhefe, Fleischextrakt, Maisquellwasser und/oder Pepton, zusammen mit Zuckern, vorzugsweise Glukose, Fruktose, Lactose, Galactose, Rohrzucker und/oder Saccharose als C-Quellen oder mit komplexen C-Quellen, vorzugsweise mit Melasse, Apfeltrub, Apfeltrester-, Möhrentrester- und/oder Zuckerrübenschnitzeleextrakt, eingesetzt werden und die Fermentation nach 96 bis 168 h beendet wird, wobei
 - bei Einsatz von anorganischen N-Quellen und Zuckern 150 bis 400 PG-E · ml⁻¹ und 1 bis 2 PE-E · ml⁻¹, mit einem PG/PE-Verhältnis von 200 bis 300:1,
 - bei Einsatz von komplexen N-Quellen und Zuckern 200 bis 400 PG-E · ml⁻¹ und 3 bis 7 PE-E · ml⁻¹, mit einem PG/PE-Verhältnis von 60 bis 100:1 und
 - bei Einsatz von komplexen N-Quellen und komplexen C-Quellen 200 bis 500 PG-E · ml⁻¹, und 15 bis 30 PE-E · ml⁻¹, mit einem PG/PE-Verhältnis 20:1, bezogen auf diese Fermentationszeit resultieren.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Pektinasepräparaten mit unterschiedlichen Anteilen an Polygalakturonase (PG) und Pektinesterase (PE) mittels Schimmelpilzen, vorzugsweise *Aspergillus niger*, die der Obst- und Gemüseverarbeitung zur Mazeration, im Maischprozeß zur Vorbereitung der Saftgewinnung bzw. zur Totalverflüssigung zum Einsatz kommen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bekannt, daß die Herstellung pektinolytischer Enzyme mittels kompaktem Schimmelpilzmycel im Vergleich zu diffusem Mycel Vorteile aufweist. So werden von WARDSACK, CH., SCHIWECK, E., LEUCHTENBERGER, A., KÖRNER, D., HERMERSDÖRFER, H., RUTTLOFF, H. und PARDEMANN, B. (DD-PS 245 175) mit trägerfixierter Biomasse des Stammes *Aspergillus niger* Aktivitäten pektinolytischer Enzyme erreicht, die über denen bei diffusem Mycelwachstum liegen. In der Patentschrift DD-PS 219 504 beschreiben SCHIWECK, E., KÖRNER, D., PARDEMANN, B., WARDSACK, CH., LEUCHTENBERGER, A., RUTTLOFF, H. und HERMERSDÖRFER, H. eine Verfahrensverbesserung, in dem durch erhöhte Trägerdichte, gleichmäßige Verteilung des Trägers im Fermentor sowie geringen Trägerabstand eine kompakte, feste Mycelstruktur erreicht wird, welche Voraussetzung für die erhöhte Enzymausschüttung ins Medium ist. Von FRIESE, E., MAREK, E., LEUCHTENBERGER, A., und von LUPIN, I. wird gefunden, daß die unterschiedliche Pufferkapazität des Nährmediums die Ausschüttung der pektinolytischen Enzyme in Abhängigkeit von der Kulturdauer beeinflusst und die Anteile an Polygalakturonase (PG) und Pektinesterase (PE) am Gesamtzymkomplex verändert werden können. Dies ist hinsichtlich der unterschiedlichen Anwendung in der obst- und gemüseverarbeitenden Industrie von großer Bedeutung.

Weiterhin wird vorgeschlagen (FRIESE, E. u. a. 1986), daß durch Einsatz verschiedener Kohlenstoff-Quellen (Zucker, komplexe C-Quellen) die Synthese der pektinolytischen Enzyme in unterschiedlichem Maße in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer gesteigert wird, wodurch gleichzeitig das PG/PE-Verhältnis in der Kulturlösung beeinflusst wird. Um einen möglichst ökonomischen Einsatz der Enzympräparate in der Obst- und Gemüseverarbeitung zu gewährleisten, ist es notwendig, die Anteile der Einzelenzyme (vor allem PG und PE) am Gesamtzymkomplex noch stärker zu variieren.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es daher, eine möglichst hohe PG-Syntheserate mittels Kultivierung von trägerfixiertem Mycel von *Aspergillus niger* zu erreichen und das PG/PE-Verhältnis des Enzymgemisches so zu variieren, daß je nach Anwendungszweck ein Mazerase- bzw. Maischeenzympräparat hergestellt werden kann.

Darlegung des Wesens der Erfindung

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

Zunächst wird in an sich bekannter Weise ein Schimmelpilz, vorzugsweise der Stamm *Aspergillus niger* R1/214 — hinterlegt in der Zentralen Stammsammlung der DDR im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie in Jena unter ZIMET 43692 — auf einem vom Nährmedium umgebenen inerten Träger zum Aufwachsen gebracht. Bei einer Sporenkonzentration von 10^2 bis 10^4 Sporen $\cdot$ ml $^{-1}$ kommt es unter Einhaltung bestimmter Parameter (Kultivations Temperatur 26 bis 32°C, Luftzufuhr 0,01 bis 1,0vvm, Umwälzungsgeschwindigkeit des Mediums 1 bis 50 cm $\cdot$ sec $^{-1}$, Kultivationsdauer 4 bis 8 Tage, Verhältnis der effektiven Trägerfläche zum Nährmedienvolumen 160 bis 550 m ^{2} $\cdot$ m $^{-3}$) zur Ausbildung einer kompakten Mycelstruktur durch den entsprechenden Stamm. Die Enzymausschüttung erfolgt in das Nährmedium, welches Salze, Kohlenstoff- und Stickstoffquellen in bestimmten Relationen enthält. Die auf dem Träger angezüchtete Mycelmase ist für mehrere Fermentationsansätze nutzbar, indem nach 3 bis 8 Tagen Fermentationsdauer die enzymhaltige Kulturlösung abgelassen und diese nach einer Trocknungsphase des Mycels durch frisches Nährmedium ersetzt wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Pektinasepräparaten mit unterschiedlichen Anteilen von Polygalakturonase (PG) und Pektinesterase (PE) mittels trägerfixierter Schimmelpilze, vorzugsweise *Aspergillus niger*, durch submerse Kultivierung in Schüttelgefäßen, gebräuchliche Rühr- oder Spezialfermentoren unter Anwendung bekannter Kulturbedingungen besteht darin, daß als N-Quellen 0,5 bis 2% löslicher Nitrate oder Ammoniumsalze im Nährmedium oder 0,5 bis 10% komplexer N-Quellen, vorzugsweise Hefeextrakt, Futterhefe, Fleischextrakt, Maisquellwasser und/oder Pepton, zusammen mit Zuckern, vorzugsweise Glukose, Fruktose, Lactose, Galactose, Rohrzucker und/oder Saccharose als C-Quellen oder mit komplexen C-Quellen, vorzugsweise mit Melasse, Apfeltrub, Apfeltrester-, Möhrentrester- und/oder Zuckerrübenschnitzelextrakt, eingesetzt werden und die Fermentation nach 96 bis 168 h beendet wird.

Beim Einsatz von anorganischen N-Quellen und Zuckern und einer Fermentationszeit von 96 bis 168 h werden Pektinasepräparate mit 150 bis 400 PG-E $\cdot$ ml $^{-1}$ und 1 bis 2 PE-E $\cdot$ ml $^{-1}$ erreicht, wobei das PG/PE-Verhältnis 200 bis 300:1 beträgt.

Werden komplexe N-Quellen und Zucker eingesetzt und 96 bis 168 h fermentiert, erhält man Pektinasepräparate mit 200 bis 400 PG-E $\cdot$ ml $^{-1}$ und 3 bis 7 PE-E $\cdot$ ml $^{-1}$ und einem PG/PE-Verhältnis von 60 bis 100:1.

Eine weitere Ausführungsform ist der Einsatz von komplexen N-Quellen und komplexen C-Quellen 200 bis 500 PE-E $\cdot$ ml $^{-1}$, und 15 bis 30 PE-E $\cdot$ ml $^{-1}$, mit einem PG/PE-Verhältnis < 20:1, bezogen auf diese Fermentationszeit.

Die Erfindung wird durch folgende Ausführungsbeispiele näher erläutert:

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

In 300-ml-Kulturflaschen werden 70 ml Nährmedium, welches als N-Quelle z. B. 0,5 bis 2% anorganische Salze ((NH $_4$) $_2$ SO $_4$, KNO $_3$, NaNO $_3$, NH $_4$ NO $_3$) oder 0,5 bis 10% komplexe Substanzen (Hefeextrakt, Futterhefe, Maisquellwasser, Fleischextrakt, Pepton) enthält, mit einer solchen Sporenmenge des Stammes *Aspergillus niger* beimpft, daß ein Titer von 10^3 bis 10^4 Sporen pro ml Kulturlösung vorliegt. In dem Nährmedium ist ein sterilisierter textiler Träger enthalten, auf dem das Sporenmateriale zum Auskeimen gebracht wird. Die Kulturansätze werden bei einer Temperatur von 28°C bis 30°C auf einer Rotationsschüttelmaschine (FANAL, 220 rpm) 96 bis 144 h inkubiert. Bei Einsatz von N-haltigen Salzen wird eine PG-Aktivität von 150 bis 400 PG-E $\cdot$ ml $^{-1}$ und eine PE-Aktivität von 1 bis 2 PE-E $\cdot$ ml $^{-1}$ erreicht, woraus sich ein PG/PE-Verhältnis von etwa 200–300:1 ergibt. Unter den gleichen Bedingungen wird mit komplexen N-Quellen in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge bei gleichbleibender PG-Aktivität eine höhere PE-Aktivität von 3 bis 7 PE-E $\cdot$ ml $^{-1}$ erzielt, wodurch ein PG/PE-Verhältnis von 100:1 erreicht wird und sich das PG/PE-Verhältnis zugunsten eines Maischeenzymes verschiebt. Werden neben den komplexen N-Quellen ebensolche C-Quellen eingesetzt, sinkt das PG/PE-Verhältnis auf 20:1 und es entsteht ein Enzymgemisch, welches für den Maischprozeß sehr gut geeignet ist.

Beispiel 2

Ein Spezialfermentor (Glasrohr: Durchmesser 70 mm, Höhe 700 mm, mit 2 parallel zueinander im Abstand von 30 mm fest installierten Trägerplatten aus nichtrostendem Stahlgewebe, Gesamtträgerfläche 800 cm ^{2}) wird mit 2 l Kulturmedium, welches unterschiedliche N-Quellen und Zucker als C-Quellen enthält, gefüllt und mit einer Sporenmenge des Stammes *Aspergillus niger* beimpft, daß eine Endkonzentration von 10^3 bis 10^4 Sporen pro ml vorliegt. Die Kultivierung verläuft bei einer Temperatur von 28°C bis 30°C und einer Luftzufuhr von 1 bis 2 l Luft $\cdot$ min $^{-1}$; Belüftung und Durchmischung der Kulturlösung erfolgen nach dem Mammutpumpenprinzip. Nach 48 h hat sich am Träger eine starke Myceldecke ausgebildet.

Die Variation des PG/PE-Verhältnisses entspricht im wesentlichen den in Beispiel 1 erzielten Ergebnissen, doch die Höhe der absoluten Ausbeuten an PG- und PE-Aktivität liegt etwas darunter (150 bis 200 PG-E $\cdot$ ml $^{-1}$, bis 2 PE-E $\cdot$ ml $^{-1}$). Werden neben den komplexen N-Quellen gleichzeitig komplexe C-Quellen eingesetzt, verschiebt sich das PG/PE-Verhältnis noch weiter zugunsten eines Maischeenzymes (PG/PE 20–30:1).