



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) DD (11) 251 994 A1

4(51) C 12 N 11/14
 C 12 N 9/26
 C 12 P 19/20
 C 12 P 1/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 293 510 0

(22) 08.08.86

(44) 02.12.87

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

(72) Marek, Elke, Dr. Dipl.-Biol.; Körner, Dieter, Dr. Dipl.-Ing.; von Lupin, Ingeborg; Friese, Elke, Dr. Dipl.-Biol., DD

(54) Verfahren zur Gewinnung pektinolytischer Enzyme mit Hilfe trägerfixierter Schimmelpilze, vorzugsweise der Spezies *Aspergillus niger*

(55) – Enzymgewinnung

- Polygalakturonase
- trägerfixierte Schimmelpilzkulturen
- *Aspergillus niger*
- zyklisches Batch-Verfahren
- Submersverfahren
- pH-geregelte Fermentation

(57) Das erfindungsgemäße Verfahren zur Gewinnung pektinolytischer Enzyme mit Hilfe trägerfixierter Schimmelpilze, vorzugsweise der Spezies *Aspergillus niger*, besteht im wesentlichen darin, daß bei vorgegebenen Kultivierungsbedingungen die Schimmelpilze zunächst während der Anwachsphase auf dem Träger fixiert werden und die eigentliche Fermentation unter Einhaltung der erforderlichen Bedingungen während der Fermentationsphase erfolgt, wobei während der Anwachs- und Fermentationsphase eine pH-Regelung vorgenommen wird. Erfindungsgemäß wird während der Anwachsphase ein pH-Wert von pH 4,5 bis pH 3,5 eingestellt und gehalten und nach einer vorgegebenen Kultivierungszeit während der Fermentationsphase auf pH 2,6 bis pH 3,5 herabgesetzt. Nach vollständigem oder teilweise Austausch von enzymhaltigem Kulturmedium im Fermentor und anschließender Weiterfermentation erfolgt eine ständige pH-Wert Regelung auf pH 2,6 bis pH 3,5.

Patentanspruch:

1. Verfahren zur Gewinnung pektinolytischer Enzyme mit Hilfe trägerfixierter Schimmelpilze, vorzugsweise der Spezies *Aspergillus niger*, bei dem die Schimmelpilze in einem vorgegebenen Kulturmedium auf einem formstabilen Träger oder Trägersystem, die innerhalb eines herkömmlichen oder eines Spezialfermentors beweglich oder fest installiert sind, zunächst bei bekannten Kultivierungsbedingungen während der Anwuchsphase auf dem Träger fixiert werden und die eigentliche Fermentation unter Einhaltung der erforderlichen Bedingungen, vorzugsweise der Kultivationstemperatur, des pH-Wertes, der Luftzufuhr, der Umfließgeschwindigkeit des Mediums und der Trägerdichte im Medium während der Fermentationsphase erfolgt, **dadurch gekennzeichnet**, daß während der Anwuchsphase und der Fermentationsphase eine pH-Regelung vorgenommen wird, bei der der Ausgangs-pH-Wert in der Anwuchsphase der Schimmelpilze auf dem Träger im Bereich von pH 4,5 bis pH 3,5, vorzugsweise pH 4,5, des Mediums eingestellt und nach einer Kultivierungszeit von 24 h bis 48 h, vorzugsweise 24 h, der pH-Wert während der Fermentationsphase auf pH 2,6 bis pH 3,5, vorzugsweise pH 2,8, durch Ansäuern, vorzugsweise unter Zusatz von Schwefel-, Salz- oder Essigsäure herabgesetzt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß jeweils nach vollständigem oder teilweise Austausch von enzymhaltigen Kulturmedium im Fermentor und anschließender sofortiger Weiterfermentation, gegebenenfalls nach einer zwischengeschalteten Trocknungszeit für die trägerfixierten Schimmelpilze, eine ständige pH-Wert-Regelung im Bereich von pH 2,6 bis pH 3,5 erfolgt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur fermentationstechnischen Gewinnung pektinolytischer Enzyme unter Verwendung von trägerfixierten Schimmelpilzkulturen, vorzugsweise vom Stamm *Aspergillus niger*, bei dem durch Einhaltung eines speziellen pH-Wert-Profiles während der Fermentation hohe Enzymausbeuten erzielt werden. Das Enzymgemisch wird vorrangig zur Maischebereitung und für die Mazeration von Obst und Gemüse eingesetzt.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Massenproduktion pektinolytischer Enzyme erfolgt zur Zeit überwiegend durch emerse Fermentationstechnologien. Abgesehen vom großen arbeitstechnischen Aufwand dieser Prozesse, beinhalten sie vor allen Dingen hohe arbeitshygienische Risiken infolge der Unvermeidlichkeit der Sporenverteilung in der Raumluft. Es hat daher nicht an Versuchen gefehlt, die effektivere Submerstechnologie anzuwenden. Ökonomischen Verfahren steht jedoch entgegen, daß sie als Produzenten in Frage kommenden Schimmelpilze bei Wachstum in diffuser morphologischer Struktur nur unbedeutende Enzymmengen synthetisieren. Durch spezielle Substratzusammensetzungen oder durch Zusätze von besonderen Komponenten wird eine Steigerung der Enzymausbeute nachgewiesen (SU-US 501 058, SU-US 696 051, HU-PS 160 532). Auch die Variation der Kulturparameter, wie z. B. der Rührgeschwindigkeit (PL-PS 91 984), kann zur vergrößerten Enzymbildung beitragen. Jedoch lassen sich ökonomisch verwertbare Enzymmengen nach diesen Verfahren nicht erzielen.

Demgegenüber wird festgestellt, daß beim Wachstum der Biomasse in Form kompakter Mycelstrukturen die Enzymbildung deutlich zunimmt. So weisen A. A. MARTAKOV und O. P. DIANOVA (Izv. Akad. Nauk Kaz. SSR, Ser Biol. 5, 1967, 6, 54–99) eine gesteigerte Ausschüttung pektinolytischer Enzyme nach, wenn im Vergleich zur diffusen eine schwammartige Mycelstruktur vorliegt. Eine Übertragung des praktizierten Schüttelkulturprinzips in die technische Dimension ist jedoch nicht möglich. Einen für die praktische Anwendung geeigneteren Weg beschreiten F. BAUM, A. LEUCHTENBERGER, H. RUTTLOFF, E. SCHIWECK und Ch. WARDSACK (DD-PS 145 027). In einem Fermentor mit großer Oberfläche wird eine Myceldecke auf der Medienoberfläche angezogen und danach durch die Siebplatte in das Medium eingetaucht. Es bildet sich im Verlauf von 5 bis 7 Tagen eine schwammartige Biomassenschicht. Im Medium werden erhöhte Mengen an pektinolytischen Enzymen nachgewiesen. Der Nachteil dieses Verfahrens besteht jedoch darin, daß die Biomassmenge durch den Querschnitt des Fermentors begrenzt wird und ein ungünstiges Verhältnis zum Mediovolumen annimmt. Dadurch ist nur eine uneffektive Ausnutzung des Fermentorvolumens möglich. Eine andere Verfahrensweise wird von CH. WARDSACK, A. LEUCHTENBERGER, F. BAUM und H. RUTTLOFF (DD-PS 235 310) vorgeschlagen. Danach wird diffusangezogenes Mycel in einem durchlässigen Behälter verdichtet. Die so erzeugte kompakte Biomassestruktur synthetisiert bei anschließender Fermentation unter Laborbedingungen hohe Enzymmengen. Der Nachteil besteht auch hier in Problemen bei der technischen Nutzung des Prinzips.

Ein weiteres Verfahren beschreiben CH. WARDSACK, E. SCHIWECK, A. LEUCHTENBERGER, D. KÖRNER, H. HERMERSDÖRFER, H. RUTTLOFF und B. PARDEMANN (DD-PS 211 808). Pektinolytische Enzyme lassen sich danach mit hohen Ausbeuten erzeugen, wenn die Sporen von *Aspergillus niger* auf einem frei schwebenden oder stationären Träger zum Anwachsen gebracht werden und die Kultivierung mit gleichem oder anderem Medium über mehrere Tage fortgesetzt wird. Es werden verschiedene Bedingungen angeführt, die insbesondere die Impfkonzentration der Sporen, die Medienmenge pro Trägerfläche, die Belüftungsrate, die Strömungsgeschwindigkeit des zirkulierenden Mediums und die Fermentationstemperatur betreffen. In der Patentschrift DD-PS 219 504 werden dazu von 4. SCHIWECK, D. KÖRNER, B. PARDEMANN, Ch. WARDSACK, A. LEUCHTENBERGER und H. RUTTLOFF weitere Spezifizierungen bezüglich des Verhältnisses von Trägerfläche zu Nährlösungsvolumen sowie des Trägerabstandes angegeben. Die letztgenannten Verfahren ermöglichen Enzymausbeuten, die über denen anderer bekannter submerse Fermentationsprozesse liegen. Jedoch läßt sich eine befriedigende Ökonomie, bezogen auf die Raum-Zeit-Ausbeute, bei der technischen Realisierung noch nicht erreichen.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es daher, durch die gezielte Beeinflussung wirksamer Fermentationsparameter, die spezifische Enzymbildungsrate so zu erhöhen, daß die Raum-Zeit-Ausbeute eine weitere Verbesserung der Verfahrensökonomie gestattet.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die Führung wesentlicher Prozeßparameter so zu wählen, daß dadurch dem obigen Ziel in einfacher Weise entsprochen werden kann.

Erfindungsgemäß werden zur Gewinnung pektinolytischer Enzyme mit Hilfe trägerfixierter Schimmelpilze, vorzugsweise der Spezies *Aspergillus niger*, z. B. des Stammes R 1/214 – hinterlegt in der Zentralen Stammsammlung der DDR im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie in Jena unter ZIMET 42 692 – die Schimmelpilze in einem vorgegebenen Kulturmedium auf einem formstabilen Träger oder Trägersystem, die innerhalb eines herkömmlichen oder eines Spezialfermentors beweglich oder fest installiert sind, zunächst bei bekannten Kultivierungsbedingungen zum Anwachsen auf dem Träger gebracht. Die eigentliche Fermentation erfolgt danach unter Einhaltung der erforderlichen Kultivierungstemperatur, des pH-Wertes, der Luftzufuhr, der Umfließgeschwindigkeit des Mediums und der Trägerdichte im Medium während der Fermentationsphase.

Erfindungswesentlich dabei ist, daß während der Anwachsphase und der Fermentationsphase eine pH-Regelung vorgenommen wird, bei der der Ausgangs-pH-Wert in der Anwachsphase der Schimmelpilze auf dem Träger auf einen Wert von pH 4,5 bis pH 3,5, vorzugsweise pH 4,5, eingestellt wird.

Nach einer Kultivierungszeit von 24 h bis 48 h, vorzugsweise 24 h, erfolgt die Herabsetzung des pH-Wertes durch Ansäuern, vorzugsweise mittels Schwefel-, Salz- oder Essigsäure auf pH 2,6 bis pH 3,5, vorzugsweise pH 2,8, während der Fermentationsphase.

Nach vollständigem oder teilweisem Austausch von enzymhaltigen Kulturmedium im Fermentor durch frisches Kulturmedium und anschließender sofortiger Weiterfermentation erfolgt eine ständige pH-Wert-Regelung auf Werte im Bereich von pH 2,6 bis pH 3,5. Vor der Weiterfermentation kann gegebenenfalls eine Trocknungszeit für die trägerfixierten Schimmelpilze zwischengeschaltet werden.

Die Erfindung wird durch folgende Ausführungsbeispiele näher erläutert:

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

In einem 5 l-Laborfermentor werden 3 l sterilisiertes Kultivierungsmedium (5 bis 8 % Glukose oder Saccharose; 0,1 % Pektin; 0,75 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 % KH_2PO_4 ; 0,03 % $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,03 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,03 % CaCO_3 ; 0,03 % NaCl) mit einer solchen Sporenmenge des Stammes *Aspergillus niger* beimpft, daß eine Konzentration von 10^8 Sporen/ml Kulturmedium vorliegt. Zum Anwachsen wird der Rührer durch einen Zylinder mit rauher Oberfläche ersetzt, auf dem die Sporen auskeimen und eine feste Mycelschicht bilden. Die Fermentation erfolgt bei 25 bis 32 °C, vorzugsweise bei 30 °C, einer Drehzahl des Zylinders von 80 U/min und einer Belüftungsrate von 50 l h^{-1} . Der Ausgangs-pH-Wert wird in den Bereich von pH 3,5 bis pH 4,5 eingestellt und während der Anwachsphase, gegebenenfalls durch Korrektur, beibehalten. Danach wird erfindungsgemäß der pH-Wert nach etwa 24stündiger Fermentation mit H_2SO_4 oder einer anderen geeigneten Säure in den pH-Bereich von pH 2,6 bis pH 3,5 eingestellt und das Niveau durch ständige pH-Regelung nach NaOH bzw. Säure gehalten.

Nach 90 bis 110 h Kultivierungszeit beträgt die PG-Aktivität (Polygalakturonase-Aktivität) vergleichsweise für eine pH-ungeregelte Fermentation $1,5 \cdot 10^5$ bis $1,88 \cdot 10^5$ PG-Einheiten absolut, das entspricht einer mittleren PG-Syntheserate von 560 bis $700 \text{ PG-E} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Mit erfindungsgemäß pH-geregelter Fermentation werden nach dem Ausführungsbeispiel durchschnittlich $2,34 \cdot 10^5$ bis $3,0 \cdot 10^5$ PG-Einheiten erreicht, das entspricht einer mittleren PG-Syntheserate von 880 bis $1120 \text{ PG-E} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Die Enzymsynthese kann ohne Neubeimpfung nach Entnahme des enzymhaltigen Kulturmediums mit oder ohne zwischengeschalteter Trocknungszeit in gleicher Art und Weise wiederholt werden (zyklisches Batch-Verfahren).

Beispiel 2

In einem 60 l-Spezialfermentor (Glasrohr mit 5 bis 7 parallel im gleichen Abstand zueinander fest installierten Trägerplatten aus nichtrostendem Stahlgeflecht, Gesamtträgerfläche 1,3 bis $1,9 \text{ m}^2$) werden 46 bis 55 l Kulturmedium (siehe Beispiel 1) gefüllt und mit einer solchen Sporenmenge beimpft, daß eine Sporenkonzentration von 10^8 Sporen/ml Kulturmedium vorliegt. Die Fermentation erfolgt bei 25 bis 32 °C mit einer Luftzufuhr von 60 bis $100 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$. Der Stoffaustausch erfolgt durch Umwälzen des Mediums im Fermentor mit Volumenströmen von 6 bis $10 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$. Zu Beginn der Fermentation erfolgt eine pH-Wert-Einstellung auf pH 3,6 bis pH 4,5, der gegebenenfalls korrigiert wird.

Bei weiterem Fermentationsverlauf erfolgt nach etwa 24 h die pH-Einstellung und Regelung entsprechend Beispiel 1. Nach teilweiser bzw. vollständiger Entnahme von enzymhaltigem Kulturmedium und gegebenenfalls zwischengeschalteter Trockenphase wird nach Auffüllen mit frischem Kulturmedium (nach Beispiel 1) sofort weiter kultiviert.

Zum Vergleich der Wirksamkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die bei pH-ungeregelter Fermentation nach 96 bis 144 h (durchschnittlich 125 h) Fermentationszeit erreichbaren Aktivitäten, nämlich 6,9 bis $8,21 \cdot 10^5$ PG-Einheiten absolut (durchschnittlich $7 \cdot 10^5$ PG-E) herangezogen, das entspricht einer mittleren PG-Syntheserate von 1060 bis $1590 \text{ PG-E} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (durchschnittlich 1300).

Bei erfindungsgemäß pH-geregelter Fermentation werden nach gleicher Fermentationszeit von 96 bis 144 h (durchschnittlich 118 h) Aktivitäten von $7,8 \cdot 10^5$ (durchschnittlich $9,8 \cdot 10^5$) PG-Einheiten erreicht, das entspricht einer mittleren PG-Syntheserate von 1150 bis 2350 (durchschnittlich 1900) $\text{PG-E} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.