



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 249 919 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 / 291 105 4

(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.; Hermersdörfer, Heino, Dr. Dipl.-Biol., DD

(54) Herstellungsverfahren für Pektinasepräparate mit unterschiedlichem Polygalakturonase- und Pektin-
esteraseanteil

(57) Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung pektinolytischer Enzymgemische mit unterschiedlichen Anteilen an PG und PE mittels trägerfixierter Biomasse, vorzugsweise des Schimmelpilzes *Aspergillus niger*, besteht im wesentlichen darin, daß bei Einhaltung vorgegebener Parameter (Sporentiter, Kultivierungstemperatur, Luftzufuhr, Umwälzungsgeschwindigkeit des Mediums, Verhältnis der Trägeroberfläche zum Nährmediumvolumen) die Kultivierung in Nährmedien erfolgt, die unterschiedliche C-Quellen enthalten, und zwar Zucker oder komplexe Stoffe. In Abhängigkeit von der eingesetzten C-Quelle und der Kultivierungsdauer wird damit eine unterschiedliche Beeinflussung der PG- und PE-Syntheserate erreicht, wodurch Enzymgemische mit variierten PG- und PE-Anteilen entstehen, die zur Mazeration bzw. im Maischeprozeß benötigt werden.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung von Pektinasepräparaten mit unterschiedlichem Anteil an Polygalakturonase (PG) und Pektinesterase (PE) mittels trägerfixierter Schimmelpilze, vorzugsweise *Aspergillus niger*, durch submerse Kultivierung in Schüttelgefäßen, gebräuchlichen Rühr- oder Spezialfermentoren unter Anwendung üblicher Kulturbedingungen, **dadurch gekennzeichnet**, daß als C-Quellen 2 bis 8% Zucker im Nährmedium, vorzugsweise Glukose, Fruktose, Lactose, Galactose und/oder Saccharose, oder 5 bis 15% komplexer C-Quellen, vorzugsweise Melasse, Apfelfruchtsaft, Apfelfruchtsaft-, Möhrentrester- und/oder Zuckerrübenschnitzel-extrakt, eingesetzt werden und die Fermentationszeit in Abhängigkeit von den erreichbaren $\text{PG-E} \cdot \text{ml}^{-1}$ und dem PG/PE-Verhältnis gewählt wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß bei Einsatz von Zuckern eine Fermentationszeit von 72 bis 120 h gewählt wird, wobei $300 \text{ bis } 600 \text{ PG-E} \cdot \text{ml}^{-1}$ sowie $1 \text{ bis } 3 \text{ PE-E} \cdot \text{ml}^{-1}$, mit einem PG/PE-Verhältnis von 200 bis 300:1, erreicht werden.
3. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß bei Einsatz komplexer C-Quellen zum Erreichen von $200 \text{ bis } 300 \text{ PG-E} \cdot \text{ml}^{-1}$ sowie $3 \text{ bis } 10 \text{ PE-E} \cdot \text{ml}^{-1}$, mit einem PG/PE-Verhältnis von 30 bis 70:1, Fermentationszeiten von 72 bis 120 h, oder zum Erreichen von $300 \text{ bis } 600 \text{ PG-E} \cdot \text{ml}^{-1}$ sowie $6 \text{ bis } 15 \text{ PE-E} \cdot \text{ml}^{-1}$, mit einem PG/PE-Verhältnis von 20 bis 40:1, Fermentationszeiten von 120 bis 196 h gewählt werden.
4. Verfahren nach den Punkten 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein mazerierendes Pektinasepräparat mit einem PG/PE-Verhältnis über 100 durch Einsatz von Nährmedien mit Zuckern als C-Quelle in einem Rühr- oder Rohrfermentor und einer Fermentationszeit von 96 bis 120 h hergestellt wird.
5. Verfahren nach den Punkten 1 und 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Maischeenzym mit einem PG/PE-Verhältnis unter 50 durch Einsatz von Nährmedium mit komplexen C-Quellen in einem Rühr- oder Rohrfermentor und einer Fermentationszeit von 120 bis 196 h hergestellt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von pektinolytischen Enzymen mit unterschiedlichen Anteilen an Polygalakturonase (PG) und Pektinesterase (PE) mittels Schimmelpilzen, vorzugsweise *Aspergillus niger*, die in 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 mit kompaktem Schimmelpilzmycel im Vergleich zu diffus wachsendem Mycel Vorteile aufweisen kann. So werden WARDSACK, CH., SCHIWECK, E., LEUCHTENBERGER, A., KÖRNER, D., HERMERSDÖRFER, H., RUTTLOFF, H. und PARDEMANN, B. (DD-PS 245 175) mit trägerfixierter Biomasse des Schimmelpilzes *Aspergillus niger* Enzymausbeuten erzielt, die weit über denen bei diffusem Mycelwachstum liegen. Gemäß Patentschrift DD-PS 219 504 von SCHIWECK, E., KÖRNER, D., PARDEMANN, B., WARDSACK, CH., LEUCHTENBERGER, A., RUTTLOFF, H. und HERMERSDÖRFER, H. erfolgt in einem speziellen Rohrfermentor vor allem dann eine hohe Pektinaseausschüttung ins Medium, wenn durch gleichmäßige Verteilung des Trägers im Fermentor sowie geringer Trägerabstand eine kompakte, feste Mycelstruktur erreicht wird. Von FRIESE, E., MAREK, E., LEUCHTENBERGER, A. und von LUPIN, I. wird gefunden, daß durch unterschiedliche Abpufferung des Nährmediums die Ausschüttung verschiedener pektinolytischer Enzyme gezielt beeinflußt und die Anteile an Polygalakturonase und Pektinesterase am Gesamtzyzymkomplex im beschränkten Maße verändert werden können. Dies ist hinsichtlich des Anwendungszweckes in der Obst- und Gemüseverarbeitung von großer Bedeutung. Um den Anforderungen der verschiedenen Applikationsgebiete hinsichtlich des Anteils einzelner Pektinasen in den Enzympräparaten besser gerecht werden zu können, ist jedoch vor allem eine noch stärkere Variation des Verhältnisses zwischen Polygalakturonase (PG) und Pektinesterase (PE) erforderlich.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es daher, eine möglichst hohe PG-Syntheserate durch Kultivierung von trägerfixiertem Mycel von *Aspergillus niger* zu erreichen und das PG/PE-Verhältnis des Enzymgemisches noch stärker zu variieren, so daß je nach Anwendungszweck ein möglichst optimal wirkendes Mazerase- bzw. Maischeenzym 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 einem Fermentationsgefäß in an sich bekannter Weise ein Schimmelpilz, vorzugsweise der Stamm *Aspergillus niger* R 1/214 (hinterlegt in der Zentralen Stammsammlung der DDR im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie in Jena unter ZIMET 43 692) auf einem vom Nährmedium umgebenen Träger zum Anwachsen gebracht. Bei einer vorgegebenen Sporenkonzentration von 10^2 bis 10^4 Sporen $\cdot$ ml $^{-1}$ kommt es unter Einhaltung vorgegebener Parameter (Kultivations Temperatur 26 bis 32°C, Luftzufuhr 0,01 bis 1,0 vvm, 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 des einzusetzenden Stammes. Die Enzymausschüttung erfolgt in das Nährmedium, das Salze, Kohlenstoff- und Stickstoffquellen enthält. Die auf dem Träger angezüchtete Mycelmasse ist für mehrere Fermentationsansätze nutzbar, in dem nach 3 bis 8 Tagen Fermentationsdauer die enzymhaltige Kulturlösung abgelassen und diese nach einer Trocknungsphase durch frisches Nährmedium ersetzt wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Pektinasepräparaten mit unterschiedlichem Anteil an Polygalakturonase (PG) und Pektinesterase (PE) mittels trägerfixierter Schimmelpilze, vorzugsweise *Aspergillus niger*, durch submerse Kultivierung in Schüttelgefäßen, gebräuchlichen Rühr- oder Spezialfermentoren unter Anwendung üblicher Kulturbedingungen, besteht darin, daß als C-Quellen 2 bis 8% Zucker im Nährmedium, vorzugsweise Glukose, Fruktose, Lactose, Galactose und/oder Saccharose, oder 5 bis 15% komplexer C-Quellen, vorzugsweise Melasse, Apfeltrub, Apfeltrester-, Möhrentrester- und/oder Zuckerrübenschnitzelextrakt, eingesetzt werden und die Fermentationszeit in Abhängigkeit von den erreichbaren PG-E $\cdot$ ml $^{-1}$ und dem PG/PE-Verhältnis gewählt wird.

Eine zweckmäßige Ausführungsform ist der Einsatz von Zuckern und eine Fermentationszeit von 72 bis 120 h, wobei 300 bis 600 PG-E $\cdot$ ml $^{-1}$ sowie 1 bis 3 PE-E $\cdot$ ml $^{-1}$, mit einem PG/PE-Verhältnis von 200 bis 300:1, erreicht werden.

Beim Einsatz komplexer C-Quellen werden zum Erreichen von 200 bis 300 PG-E $\cdot$ ml $^{-1}$ sowie 3 bis 10 PE-E $\cdot$ ml $^{-1}$, mit einem PG/PE-Verhältnis von 30 bis 70:1, Fermentationszeiten von 72 bis 120 h, oder zum Erreichen von 300 bis 600 PG-E $\cdot$ ml $^{-1}$ sowie 6 bis 15 PE-E $\cdot$ ml $^{-1}$, mit einem PG/PE-Verhältnis von 20 bis 40:1, Fermentationszeiten von 120 bis 196 h gewählt.

Durch Einsatz von Nährmedium mit Zuckern als C-Quellen in einem Rühr- oder Rohrfermentor und einer Fermentationszeit von 96 bis 120 h wird ein mazerierendes Pektinasepräparat mit einem PG/PE-Verhältnis über 100 hergestellt.

Werden Nährmedien mit komplexen C-Quellen in einem Rühr- oder Rohrfermentor eingesetzt und eine Fermentationszeit von 120 bis 196 h gewählt, erhält man ein Maischeenzym mit einem PG/PE-Verhältnis unter 50.

Die Erfindung wird durch die folgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert:

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

In 300 ml Kulturflaschen werden 70 ml Nährmedium, welches als C-Quelle (z. B. 8% Glukose) oder eine komplexe C-Quelle (z. B. 5% Zuckerrübenschnitzelextrakt) enthalten, mit einer solchen Sporenmenge des Stammes *Aspergillus niger* R 1/124 beimpft, daß ein Titer von 10^3 bis 10^4 Sporen pro ml Kulturlösung vorliegt. In dem Nährmedium befindet sich ein 6 $\times$ 6 ml großer sterilisierter textiler Träger, auf dem das Sporenmaterial zum Auskeimen gebracht wird. Die Kulturansätze werden bei 28°C auf einem Rotationsschüttler (FANAL, 220 rpm) inkubiert. Nach einer Kultivationsdauer von 72 bis 120 h liegt die PG-Aktivität in den zuckerhaltigen Medien bei 200 bis 600 PG-E $\cdot$ ml $^{-1}$ und die PE-Aktivität bei 1 bis 3 PE-E $\cdot$ ml $^{-1}$, woraus sich ein PG/PE-Verhältnis von ca. 200 bis 300:1 ergibt. Unter den gleichen Bedingungen erzielt man mit der o. g. komplexen C-Quelle eine PG-Aktivität von 200 bis 300 PG-E $\cdot$ ml $^{-1}$ und eine PE-Aktivität von 3 bis 10 PE-E $\cdot$ ml $^{-1}$, was einem PG/PE-Verhältnis von 30 bis 70:1 entspricht. Bei Verlängerung der Kultivationsdauer über 120 h (bis 196 h) werden in Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten C-Quelle in der Kulturlösung 300 bis 600 PG-E $\cdot$ ml $^{-1}$ und 6 bis 15 PE-E $\cdot$ ml $^{-1}$ ermittelt. In Abhängigkeit von der Kultivierungszeit kann somit auch das PG/PE-Verhältnis des Enzymkomplexes sowohl in Medien mit Zuckern als auch mit komplexen C-Quellen variiert werden. In Medien mit komplexen C-Quellen liegt die PE-Aktivität wesentlich höher (2- bis 5fach), so daß sich das PG/PE-Verhältnis zugunsten eines Maischeenzyms verschiebt. In zuckerhaltigen Medien liegt im Enzymkomplex mit einem PG/PE-Anteil von > 100 vor, was für Mazerationszwecke besser geeignet ist.

Beispiel 2

Ein 2,5-l-Rohrfermentor (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, in dem unterschiedliche C-Quellen zum Einsatz kommen (s. Beispiel 1), gefüllt und mit einer Sporenmenge von *Aspergillus niger* beimpft, daß eine Endkonzentration von 10^3 bis 10^4 Sporen $\cdot$ ml $^{-1}$ vorliegt. Die Kultivation verläuft bei 28 bis 32°C und einer Luftzufuhr von 1 bis 2 l Luft $\cdot$ min $^{-1}$. Belüftung und Durchmischung der Kulturlösung erfolgen nach dem Mammutpumpenprinzip. Im Verlaufe von 48 h bildet sich am Träger eine starke stabile Myceldecke aus, die nach 120 bis 196 h in der zuckerhaltigen Kulturlösung 150 bis 250 PG-E $\cdot$ ml $^{-1}$ und 1 bis 2 PE-E $\cdot$ ml $^{-1}$ ergibt. Das PG/PE-Verhältnis erreicht Werte von 100 bis 200. In Kulturlösungen mit komplexen C-Quellen beträgt die PG-Aktivität nach gleicher Kultivationsdauer 150 bis 200 PG-E $\cdot$ ml $^{-1}$ und die PE-Aktivität 5 bis 15 PE-E $\cdot$ ml $^{-1}$, womit das PG/PE-Verhältnis deutlich unter 50 liegt.