



**Wirtschaftspatent**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11) **211 808**

Int.Cl.<sup>3</sup> 3(51) C 12 N 9/14  
C 12 N 11/00  
C 12 R 1/685

**AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN**

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N/ 2451 750

(22) 24.11.82

(44) 25.07.84

(71) AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR; BERLIN, DD  
(72) WARDSACK, CHRISTINE; SCHIWECK, ERHARD, DIPL.-ING.; LEUCHTENBERGER, ANDREAS, DR. DIPL.-BIOL.;  
KOERNER, DIETER, DIPL.-ING.; DD;  
HERMERSDOERFER, HEINO, DR. DIPL.-BIOL.; RUTTLOFF, HEINZ, PROF. DR. DIPL.-LEBENSMITTELCHEM.;  
PARDEMANN, BERNHARD; DD;

(54) **GEWINNUNG EINES PEKTINOLYTISCHEN ENZYMGEMISCHES MITTELS TRAEGERFIXIRTER  
MIKROORGANISMEN**

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung pektinolytischer Enzyme mit trägerfixiertem Myzel von *Aspergillus niger* in Submerskultur. Das auf diese Weise hergestellte Enzymgemisch läßt sich in der obst- und gemüseverarbeitenden Industrie zur Steigerung der Fruchtsaftausbeuten und zur Mazeration einsetzen. Ziel der Erfindung ist eine Erhöhung der Enzymproduktion bei möglichst effektiver Nutzung des Fermentationsraumes. Die daraus abgeleitete Aufgabe besteht im Auffinden einer geeigneten Verfahrensweise. Erfindungsgemäß wird in einem herkömmlichen Rührfermentor oder in einem speziellen Spezialfermentor mit einem beweglichen oder fixierten Träger aus sterilisierbarem Material ein Nährmedium üblicher Zusammensetzung mit Sporen des Schimmelpilzes von *Aspergillus niger* beimpft und submers bei 28 bis 32°C 5 bis 7 Tage kultiviert. Dabei bildet sich auf dem Träger zu Beginn ein Myzelrasen, der während der Kultivation zu einer kompakten zusammenhängenden Biomasse auswächst. Bei Austausch des enzymhaltigen Nährmediums durch frisches Nährmedium kann das Myzel für mehrere Fermentationsansätze verwendet werden.

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

Gewinnung eines pektinolytischen Enzymgemisches mittels  
trägerfixierter Mikroorganismen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur fermentativen Gewinnung pektinolytischer Enzyme mit *Aspergillus niger*. Die enzymhaltige Kulturlösung wird nach entsprechender Konzentrierung und Reinigung vorrangig zur Mazeration von Obst und Gemüse eingesetzt. Sie ist desweiteren zur Steigerung der Fruchtsaftausbeute geeignet.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die submerse Herstellung pektinolytischer Enzyme erfolgt nach bekannten Verfahren vorwiegend unter Verwendung von Schimmelpilzkulturen mit diffusem Myzelwachstum. Da bei dieser Myzelstruktur die Enzymsynthese relativ gering ist, gibt es verschiedenartige Bemühungen, durch Zugabe spezieller Nährmedienbestandteilen sowie durch Variation der Kulturführung die Enzymproduktion zu erhöhen. So sind Verfahren bekannt, bei denen durch Zugabe von Aluminiumsalzen (SU-US 501 058), organischen Komplexbildnern (SU-US 696 051) bzw. Myzelautolysaten eine Steigerung er-

wirkt wird. Bei einem anderen Verfahren (HU-PS 160 532) zeigen Kobalt- und Magnesium-Salze eine besondere Wirkung, während nach einer weiteren Verfahrensweise (Pl-PS 91 984) durch Variation der Rührergeschwindigkeit die Enzymsynthese angeregt wird.

Sehr selten sind Literatur- und Patentangaben, die sich mit der Bildung pektinolytischer Enzyme bei Vorliegen von kompakteren Myzelstrukturen befassen. A.A. Martakov und O.P. Dianova (Izv. Akad. Nauk Kaz. SSR, Ser. Biol. 5 (1967) 6, 54-99) berichten, daß mit schwammartigem Myzel eine wesentlich höhere Bildung pektinolytischer Enzyme erreicht wird als mit diffusum. Nachteilig für die im Labormaßstab praktizierte Verfahrensweise ist, daß zum Zwecke der Enzymbildung die in Standkultur angezüchtete Myzeldecke in kreisende Bewegung versetzt werden muß, was technisch schwer realisierbar ist. Eine für die technische Dimension geeignetere Verfahrensweise wird von F. Baum, A. Leuchtenberger, H. Ruttloff, E. Schiweck und Ch. Wardsack (DWP 145 027) angegeben. Nach Anzucht einer Myzeldecke von *Aspergillus niger* in einem Spezialfermentor mit großer Oberfläche wird diese mittels einer Siebplatte untergetaucht und 5 bis 7 Tage belüftet. Es entsteht eine schwammartige Myzelstruktur, die gegenüber Diffusmyzel zu einer deutlich höheren Enzymsynthese befähigt ist. Der Nachteil dieses Verfahrens besteht in der durch den Fermentordurchmesser bedingten begrenzten Myzeldeckengröße. Zur Erzielung einer guten Enzymaktivität ist die Einhaltung eines bestimmten Verhältnisses zwischen Myzelmasse und Kulturflüssigkeit erforderlich, woraus eine relativ schlechte Ausnutzung des Fermentorraumes resultiert. Eine verbesserte Variante der Fermentation mit kompaktem Myzel, die nicht an einen Spezialfermentor gebunden ist, wird von Ch. Wardsack, A. Leuchtenberger, F. Baum und H. Ruttloff vorgeschlagen. Danach wird in einer 1. Kulturstufe diffuses Myzel von *Aspergillus niger* in Submerskultur angezüchtet und dieses dann in einem oder mehreren Behältnissen aus sterilisierbarem Textil- oder Drahtgewebe bestimmter Durchlässigkeit von der Kulturlösung abgetrennt, wodurch es

zwangsweise zu einer für die Pektinasebildung vorteilhaften Verdichtung des Myzels kommt. Einer oder mehrere dieser myzelhaltigen Behältnisse werden zum Zwecke der Enzymproduktion in einer 2. Kulturstufe unter Verwendung von Kulturmedien üblicher Zusammensetzung kultiviert. Der Vorteil gegenüber dem vorherigen Verfahren besteht darin, daß durch Ablassen des enzymhaltigen und durch Zugabe von frischem Kulturmedium das Myzel für mehrere Fermentationen genutzt werden kann. Nachteilig bei dieser Variante ist die beschränkte Behältergröße und die daraus resultierende relativ geringe Oberfläche sowie die technisch etwas komplizierte Reinigung und Neubefüllung der Behältnisse.

Das Prinzip der Trägerfixierung von Mikroorganismen zum Zwecke der Enzymgewinnung bzw. zur Durchführung von enzymatischen Reaktionen ist aus dem Schrifttum bekannt. Nach der Art der Immobilisierung unterscheidet man dabei zwischen Adsorptions-, Bindungs- und Einschließverfahren. Aus japanischen Patentschriften sind Verfahren bekannt, nach denen verschiedene Enzyme, wie Urease, Invertase und Glucoseoxidase (J 262 9693) sowie Glucoseisomerase (GB 1 443 269) mit trägerfixierten Mikroorganismen produziert werden bzw. mit diesen verschiedene enzymatische Umwandlungsreaktionen durchgeführt werden. Ohne Nennung spezieller Enzyme werden nach einem Verfahren von Divies (DE-OS 2 633 076) mittels Mikroorganismen, die in eine Polymerisatschicht eingeschlossen sind, verschiedene Umwandlungsreaktionen durchgeführt. Mit Kultivationsformen von immobilisierten Mikroorganismen, die durch Adsorption an Träger gebunden sind, befaßt sich ein von W. Engelbart und F. Engelbart beschriebenes Verfahren (DWP 108 322). Eine zur Abwasserbehandlung verwendete Prinziplösung mit trägerfixierten Mikroorganismen ist von B. Atkinson, G.M. Black, A. Pinches und P.J.S. Lewis (DE-OS 2 845 552) bekannt. Es handelt sich um eine Vorrichtung, bei der in einem Reaktionsgefäß für die Anhaftung des biologischen Materials ein Träger installiert ist. Angaben über die Gewinnung pektinolytischer Enzyme mittels träger-

fixierter Mikroorganismen liegen bisher nicht vor.

Als wesentlichste Mängel der bisher bekannten Verfahrensvarianten zur Gewinnung pektinolytischer Enzyme erweisen sich die zu geringe Aktivität, die einmalige Verwendung der Biomasse bei den Verfahren mit diffusem Myzel im Rührfermentor sowie das ungünstige Verhältnis von Biomasse zu Kulturflüssigkeit bei Verwendung kompakter Myzelformen in Rühr- oder Spezialfermentoren.

### Ziel der Erfindung

Es ist das Ziel der Erfindung, durch Immobilisierung von *Aspergillus niger* an inerte Träger in einem einfachen Fermentorsystem eine hohe Syntheserate pektinolytischer Enzyme zu erreichen. Dabei sollen die vorher angeführten Nachteile bekannter Verfahren weitgehend eliminiert und einzelne Vorteile dieser in einem Verfahren möglichst vereint werden.

### Darlegung des Wesens der Erfindung

Das Wesen des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht nun darin, daß auf der Oberfläche eines innerhalb eines Fermentors vom Kulturmedium umgebenen freischwebenden oder fixierten inerten Trägers eine kompakte Myzelstruktur mit dem Stamm *Aspergillus niger* - hinterlegt in der zentralen Stammsammlung der DDR im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie in Jena unter ZIMET 43 692 angezüchtet wird.

Dabei ist von Bedeutung, daß die Oberfläche der kompakten Myzelstruktur gegenüber dem Volumen des Kulturmediums im Hinblick auf eine hohe Enzymausbeute im richtigen Verhältnis steht. Zur Anzucht des Myzelrasens, d. h. dem Auswachsen der Sporen auf dem inerten Material mit poriger Oberfläche sind die folgenden Bedingungen einzuhalten:

- Die Konzentration der Sporen im Nährmedium beträgt unmittelbar nach Zugabe der Sporensuspension  $10^2$  bis  $10^4$  Sporen/ml.

- Das Verhältnis der Menge des Nährmediums zur Oberfläche des inerten Materials beträgt 0,5 bis 10 ml Nährmedium je 1 cm<sup>2</sup> des Trägers.
- Die Luftzufuhr beträgt 1 bis 3 l je min bezogen auf 1 l Nährmedium. Eine Umwälzung des Nährmediums ist zu vermeiden.
- Die Kultivierung erfolgt bei Temperaturen im Bereich von 28 bis 32 °C über 2 bis 3 Tage.

Die für den Stoffaustausch erforderliche Bewegung des Mediums kann dadurch erreicht werden, daß sich der Träger durch die eingetragene Luft frei bewegt (Rührfermentor), daß das Medium zwangsweise am Träger vorbeigeführt wird (Spezialfermentor) oder indem der Träger einer routierenden Bewegung ausgesetzt wird (Rührfermentor). Durch Ablassen des enzymhaltigen und durch Zugabe von frischem Nährmedium ist die Biomasse mehrmals verwendbar. Außerdem ist durch die Trägerfixierung bekanntlich auf sehr einfache Weise eine Trennung der enzymhaltigen Kulturlösung von der Biomasse möglich.

Erfindungsgemäß werden zur Herstellung pektinolytischer Enzyme Schimmelpilze, vorzugsweise der Art *Aspergillus niger*, vor allem der bereits genannte Stamm verwendet. Zu Beginn werden in einem herkömmlichen Rühr- oder in einem Spezialfermentor unter Verwendung eines Nährmediums üblicher Zusammensetzung Sporen des Stammes an einem freischwebenden oder fixierten Träger aus hitzebeständigem Material zum Wachsen gebracht. Dabei wird unter schonender Belüftung bei 28 bis 32 °C über 2 bis 3 Tage ein zusammenhängender Myzelrasen angezüchtet, der nachfolgend zum Zwecke der Enzymproduktion innerhalb von 3 bis 5 Tagen in dem Anzuchtmedium oder in einem Medium anderer Zusammensetzung kultiviert wird.

Das Nährmedium enthält Salze, Kohlenstoff- und Stickstoffquellen. Dies sind vorzugsweise Pektin 0,1 - 0,5 % oder pektinhaltige Rohstoffe, wie Zuckerrübenschnitzel- bzw.

Rübenschnitzelextrakt etwa 4 %, Glukose oder Saccharose 1 - 7 %,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,5 - 1 %,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 - 0,75 % sowie NaCl,  $\text{CaCO}_3$  und  $\text{FeSO}_4$  0,01 - 0,1 %.

Der für die Anhaftung des Myzels erforderliche sterilisierbare Träger besteht aus Textil-, Sinter- oder Steingutmaterial sowie Cr-Ni-Stahl-Gewebe und besitzt eine poröse oder maschenartige Struktur. Die Größe der Trägeroberfläche sowie das Volumen des Nährmediums werden aufeinander abgestimmt, um einerseits bei Inokulation mit Sporenmaterial eine ausreichende Anhaftung von Sporen zu gewährleisten und andererseits eine effektive Enzymsynthese zu ermöglichen. Erfindungsgemäß liegt dieses Verhältnis zweckmäßiger Weise im Bereich von 0,5 - 10 ml Nährmedium je  $\text{cm}^2$  Träger. Die Beimpfung des Nährmediums sollte mit der jeweiligen Sporensuspension von *Aspergillus niger* in der Weise erfolgen, daß in dem Nährmedium eine Konzentration von  $10^2$  -  $10^4$  Sporen/ml erreicht wird.

Da die Bildung von diffusen Myzel zu einem Aktivitätsrückgang führt, sind Belüftung und Bewegung des Mediums gegenseitig so abzustimmen, daß ein möglichst fester Myzelrasen erhalten wird. Die Strömungsgeschwindigkeit des Mediums an der Myzeloberfläche sollte im Bereich von 0,05 - 2 m/s liegen. Die günstige Luftmenge liegt bei 0,01 - 3 l Luft je min und je l Medium.

Die auf dem Träger angezüchtete Myzelmasse läßt sich für mehrere Fermentationsansätze nutzen, indem nach 3 bis 5 Tagen Fermentationsdauer das enzymhaltige Nährmedium abgelassen und durch frisches Nährmedium ersetzt wird. Um das Zuwachsen von speziellen Fermentoren durch das Myzel zu verlangsamen, kann nach Ablassen des enzymhaltigen Nährmediums maximal eine eintägige Unterbrechung erfolgen, in der die Biomasse unter schwacher Luftzufuhr auf eine dünne Schicht zusammentrocknet. Nach Zuführung von frischer Nährlösung kommt es zu erneutem Myzelwachstum und hoher Enzymsynthese.

Nachfolgend wird in einigen Ausführungsbeispielen die Erfindung näher erläutert.

### Ausführungsbeispiele

#### Beispiel 1

In 200 ml Kulturflaschen werden 50 ml Standardmedium (5 % Glukose; 0,1 % Pektin; 0,75 %  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 0,5 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 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 %  $\text{CaCO}_3$ ; 0,03 % NaCl auf 100 ml Aqua dest., pH 4,5), in das ein 20 cm<sup>2</sup> großer sterilisierter Träger gegeben wird, mit 0,5 ml einer Sporensuspension ( $10^5$  Sporen/ml) von *Aspergillus niger* des bezeichneten Stammes beimpft und 5 bis 7 Tage bei 28 bis 32 °C auf einem Rotationsschüttler (220 U/min) geschüttelt. Nach 48 h ist der Träger mit einem Myzelrasen überzogen, der sich bis zum 4. Tag zu einer festen Myzelstruktur ausbildet. Nach 6 bis 7 Tagen ist eine Enzymaktivität von ca. 400 bis 450 PG-E/ml nachweisbar. Etwa 10 PG-E/ml werden vergleichsweise mit diffusem Myzel des gleichen Stammes erreicht. Die Enzymaktivität wird mittels viskosimetrischer Meßmethode bestimmt (DWP 145 027).

#### Beispiel 2

1500 ml Standardmedium werden nach Zugabe eines 800 bis 1000 cm<sup>2</sup> großen textilen Trägers in einem 2 l Glasfermentor mit 15 ml Sporensuspension ( $10^5$  Sporen/ml) von *Aspergillus niger* des bezeichneten Stammes beimpft und 24 h bei 30 °C und einer Luftzufuhr von 2 bis 3 l/min kultiviert. Zur besseren Entwicklung eines geschlossenen Myzelrasens wird die Luftzugabe für etwa 1 bis 2 Tage auf 1 l/min reduziert und danach wieder auf die anfänglichen Werte gesteigert. Nach 6 Tagen erzielt man eine Enzymaktivität von ca. 140 PG-E/ml.

#### Beispiel 3

In einem 30 l Glasfermentor wird ein textiler Träger fixiert, dessen Oberfläche 3000 cm<sup>2</sup> beträgt. Nach Zugabe

von 15 l Standardmedium wird mit 150 ml Sporensuspension ( $10^5$  Sporen/ml) von *Aspergillus niger* beimpft und bei 28 bis 32 °C mit einer Luftzufuhr von 30 l/min kultiviert. Nach Anhaftung der Sporen (etwa nach 12 h) wird die Luftzufuhr zur besseren Ausbildung der Myzelstruktur für 48 h unterbrochen. Danach wird die Belüftung wieder auf 10 bis 20 l/min erhöht. Es wird eine Enzymaktivität von 60 bis 100 PG-E/ml unter diesen Bedingungen erhalten.

#### Beispiel 4

In einem 2 l Spezialfermentor (Glasrohr mit den Maßen: Ø 70 mm, Höhe 700 mm) wird eine Trägerplatte aus nichtrostendem Stahlgewebe (65 mm x 350 mm) fest installiert (Oberfläche  $460 \text{ cm}^2$ ). Der Fermentor wird mit 2 l Standardmedium gefüllt und mit einer solchen Sporenmenge beimpft, daß ein Titer von  $10^3$  Sporen/ml Kulturlösung eingestellt ist. Die Kultivation erfolgt bei 28 bis 32 °C mit einer Luftzufuhr von 1 bis 3 l Luft/min. Die Belüftung bzw. die Bewegung der Kulturlösung erfolgt nach dem Mammutpumpenprinzip. Nach 48 h hat sich eine starke, stabile Myzeldecke am Gewebe ausgebildet.

Die Abtrennung der enzymhaltigen Kulturlösung erfolgt nach 6 Tagen mit einer Aktivität von 150 bis 200 PG-E/ml.

Bei der Zuführung von frischem Medium werden nach 6 Tagen vergleichbare Aktivitätsausbeuten erzielt. Der Medienwechsel kann bis zu 5mal mit dem gleichen Ausbeuteergebnis durchgeführt werden.

#### Beispiel 5

In einem 50 l Spezialfermentor (Ø 250 mm, Höhe 1000 mm) wird ein Trägerzylinder aus nichtrostendem Stahlgewebe (Ø 150 mm, Höhe 700 mm) mit einer Oberfläche von  $6600 \text{ cm}^2$  fest installiert. Der Fermentor wird mit 50 l Standardmedium gefüllt und mit 500 ml Sporensuspension mit  $10^5$  Sporen/ml beimpft. Zur Anzucht des Myzelrasens wird der Fermentor zunächst nur belüftet (5 l Luft/min). Nach

2 Tagen beginnt die Zwangsumwälzung des Mediums. Die Kultivierung erfolgt bei 28 bis 32 °C mit einer Luftzufuhr von 0,5 l Luft/min. Die Luftverteilung bzw. das Vorbeiströmen der Kulturlösung am Myzel erfolgt mit Hilfe einer Kreiselpumpe, durch die das Medium am Boden des Fermentors angesaugt und am Kopfteil wieder zugeführt wird. Nach einer Kultivationsdauer von 6 Tagen kann die Kulturlösung mit einer Ausbeute von 100 bis 150 PG-E/ml abgelassen werden. Ein mehrfacher Wechsel des Mediums ist mit gleichen Enzymausbeuten möglich.

#### Beispiel 6

In einem 2 l Fermentor wird an der Rührwelle ein Gewebezylinder (Ø 50 mm, Höhe 150 mm) aus nichtrostendem Stahlgewebe befestigt. Der Fermentor wird mit 1,5 l Standardmedium befüllt und mit 15 ml Sporensuspension mit  $10^5$  Sporen/ml beimpft. Die Kultivierungstemperatur beträgt 28 bis 32 °C, die Belüftungsmenge 0,5 bis 1,0 l Luft/min. Der Gewebezylinder dreht sich in der Kulturlösung mit 200 U/min. Nach 5 bis 7 Tagen kann die Kulturlösung mit einer Enzymausbeute von 100 bis 150 PG-E/ml abgelassen und durch frisches Medium ersetzt werden.

Erfindungsansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung eines pektinolytischen Enzymgemisches mittels trägerfixierter Mikroorganismen durch submerse Kultivierung eines Schimmelpilzes in gebräuchlichen Rühr- oder in Spezialfermentoren unter Verwendung bekannter Nährmedien dadurch gekennzeichnet, daß die Sporen des einzusetzenden Mikroorganismus auf einem freischwebenden oder stationären Träger aus inertem Material mit poröser oder gewebter Struktur zum Auswachsen gebracht werden, wodurch ein Myzelrasen entsteht, der in dem Nährmedium gleicher oder gewünschter Zusammensetzung weiter kultiviert und dadurch zu einer hohen Enzymsynthese angeregt wird.
2. Verfahren nach Punkt 1 dadurch gekennzeichnet, daß für die Kultivierung der Stamm *Aspergillus niger*, hinterlegt in der zentralen Stammsammlung der DDR im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie in Jena unter ZIMET 43 692 verwendet wird.
3. Verfahren nach den Punkten 1 und 2 dadurch gekennzeichnet, daß zum Auswachsen des Myzelrasens ein Träger aus Textil- oder CrNi-Stahl-Gewebe oder aus Sinter- oder Steingutmaterial eingesetzt wird.
4. Verfahren nach den Punkten 1 bis 3 dadurch gekennzeichnet, daß zur Anzucht des Myzels an den Träger
  - die Sporenkonzentration im Nährmedium auf  $10^2$  bis  $10^4$  Sporen pro ml eingestellt wird,
  - die Nährmedienmenge 0,5 bis 10 ml je  $\text{cm}^2$  Träger beträgt,
  - die Luftzufuhr auf einer Intensität von 1 bis 3 je min je 1 Nährmedium erfolgt,
  - eine Umwälzung des Nährmediums mittels Rührer oder Pumpen vermieden und
  - eine Temperatur von 28 bis 32 °C eingestellt wird.

- 8
5. Verfahren nach den Punkten 1 und 4 dadurch gekennzeichnet, daß der Träger oder das Nährmedium bewegt werden.
  6. Verfahren nach den Punkten 1 bis 5 dadurch gekennzeichnet, daß die Strömungsgeschwindigkeit des Nährmediums im Fermentor 0,05 bis 2 m/sec und die Luftzufuhr 0,01 bis 3 l/min je l Medium beträgt.
  7. Verfahren nach den Punkten 1 bis 6 dadurch gekennzeichnet, daß das fixierte Myzel für 3 bis 5 Fermentationsansätze genutzt wird, indem nach 3 bis 5 Tagen Fermentationsdauer das enzymhaltige Nährmedium abgelassen und durch frisches Nährmedium ersetzt wird, wobei gegebenenfalls eine Trocknungsphase für das Myzel bis zu 24 Stunden eingeschaltet wird.