



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **264 232 A1**

4(51) C 12 P 1/00
C 12 N 9/42
C 12 P 19/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 P / 306 975 2	(22)	15.09.87	(44)	25.01.89
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	VEB Getränk kombinat Neubrandenburg, Ihlenfelder Straße 142, Neubrandenburg, 2000, DD
(72)	Wesenberg, Joachim. Dr. sc.; Nowak, Siegfried, Dipl.-Chem.; Heinath, Angelika; Wegener, Christina, Dr.; Henniger, Hans, Dr. habil.; Röber, Karl-Christian, Dr., DD

(54)	Applikation von Enzymkulturlösungen aus <i>Erwinia carotovora</i> für den Aufschluß von Cerealienrohstoffen
------	---

(55) Rohstoffaufschluß, Cerealienrohstoffe, Gärungsethanol, Enzymkomplex, Kohlehydrate, Verzuckerung, Ethanolausbeuten, Amylasegabereduzierung, Beschleunigung, Angärphase

(57) Die Erfindung beinhaltet die Applikation von Enzymkulturlösungen aus *Erwinia carotovora* für den Aufschluß von Cerealienrohstoffen. Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum effektiven Rohstoffaufschluß von Cerealienrohstoffen bei der Herstellung von Gärungsethanol, das es gestattet im Vergleich zu konventionellen Verfahren durch den Einsatz eines speziellen Enzymkomplexes die durch Amylasen nicht hydrolysierbaren Kohlehydrate zu verzuckern und somit höhere Ethanolausbeuten bei gleichzeitiger Reduzierung der bisher gebräuchlichen Amylasegaben und einer Beschleunigung der Angärphase zu realisieren.

Erfindungsanspruch:

1. Anwendung eines Endo- β -1,4-Glucanase-, Pektatlyase-, Pektinmethylesterase-, Polygalactonase- und Protease enthaltenen Enzymkomplexes aus *Erwinia carotovora* zur Ethanolproduktion für die Mitverwertung von durch amylolytische Enzyme nicht hydrolysierbaren Polysacchariden, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Enzymkomplex aus *Erwinia carotovora* als Kulturlösung, -filtrat oder nach Aufkonzentrierung der Brennereimaische zugesetzt wird.
2. Anwendung nach Pkt. 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Kultivierung des Enzymkomplexes auf der Basis von Abprodukten der Gärungsindustrie realisiert wird und die Enzymkulturlösung sofort bzw. nach einer Aufkonzentrierung für den Rohstoffaufschluß verwendet wird.
3. Anwendung nach Pkt. 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die bisher erforderlichen Amylasegaben reduziert bzw. vollständig eingespart werden.
4. Anwendung nach Pkt. 1-3, **dadurch gekennzeichnet**, daß dem amylolytischem Rohstoffaufschluß eine enzymatische Rast bei pH 6,0 vorgeschaltet wird, bzw. der gesamte Rohstoffaufschluß bei pH 6,0 erfolgt.
5. Anwendung nach Pkt. 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Rohstoffaufschluß drucklos bei Temperaturen $\leq 58^\circ\text{C}$ durchgeführt wird.
6. Anwendung nach Pkt. 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Gärdauer durch eine optimierte Substratzusammensetzung und den bei der Fermentation weiter wirkenden Enzymkomplex von 72 h um ≥ 12 h reduziert wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung kann in Brennereien zur Herstellung von Gärungsethanol unter Einsatz von Ezymkultursubstraten auf der Basis von *Erwinia*-Stämmen angewendet werden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Zur Herstellung von Gärungsethanol werden vergärbare Kohlehydrate mit geeigneten Hefestämmen (üblicherweise der Gattung *Saccharomyces cerevisiae*) vergoren. Diese Zucker werden aus Rohstoffen, welche polysaccharidhaltig sind, mittels enzymatischer- oder saurer Hydrolyse bereitgestellt. Beim enzymatischen Abbau werden Grünmalz, Darrmalz sowie mikrobielle Enzympräparate (Amylasen, Enzymkomplexe mit cellulolytischen, hemizellulolytischen und pektinolytischen Aktivitäten) aus Schimmelpilzkulturen eingesetzt. Die für den industriell bedeutsamen Stärkeabbau wichtigsten Enzyme sind α -Amylase, β -Amylase und γ -Amylase. Durch ihren Einsatz werden jedoch Cellulose und Hemicellulose nicht angegriffen und können somit für die Ethanolproduktion nicht genutzt werden. In neuester Zeit wird der Einsatz nicht-amylolytischer Enzyme, vorrangig unter Verwendung mikrobieller Cellulasen beschrieben. Grundlage für diese Verfahren ist der Einsatz insbesondere cellulosereicher Substrate für die Ethanolgewinnung. Eine weitere Möglichkeit für die Anwendung eines cellulolytischen und hemizellulolytischen Enzymkomplexes, zu dessen Herstellung es eines durch Klonselktion ausgewählten Stammes der Art *Penicillium citreo viride* bzw. seiner natürlichen Mutanten bzw. künstlich induzierter genetischen Varianten bedarf. Der Nachteil dieser Verfahren besteht in dem relativ hohen technisch-technologischen Aufwand zur Schimmelpilzkultivierung und -applikation infolge der hohen Substratansprüche und Kontaminationsgefahr.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, in Brennereirohstoffen enthaltene Polysaccharide, die durch amylolytisch wirkende Enzyme nicht hydrolysiert werden, durch den Einsatz von Enzymkulturlösungen aus *Erwinia carotovora* abzubauen und zusätzlich für die Ethanolgewinnung bereitzustellen. Außerdem gilt es, durch weitere Enzymnebenaktivitäten das Maischesubstrat durch Reduzierung der Viskosität und Erhöhung des α -Amino-Stickstoffangebots für die Kulturhefe aufzuwerten.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde ein aus der Kultivierung von Stämmen der Bakterienart *Erwinia carotovora* gewonnenes enzymhaltiges Kulturfiltrat bzw. -konzentrat zur Hydrolyse von nicht stärkehaltigen Polysacchariden in Getreidemaischen mit folgenden Zielstellungen einzusetzen:

- Optimierung des Rohstoffaufschlusses
- Erhöhung der Ausbeute durch zusätzliche Bereitstellung vergärbarer Kohlehydrate
- Aufwertung des Maischesubstrates
- Optimierung der Fermentation.

Die *Erwinia*-Stämme werden vorzugsweise auf Abprodukten der Gärungs- und Zuckerindustrie wie Getreidenafschlempe, Melasse und Abfallkieselgur unter Zusatz entsprechender Mineralsalze kultiviert. Die auf diesen Medien produzierten enzymhaltigen Kulturlösungen verfügen über folgendes Enzymspektrum: Endo-1,4-Glucanase-, Pektatlyase-, Pektinmethylesterase-, Polygalactonase- und Protease.

Enzymkulturlösung und Amylasen werden zu Beginn des enzymatischen Rohstoffaufschluß gemeinsam dotiert. Das Maischregime wird wie folgt gewählt:

— Rast von 20 Minuten bei 45°C und einem pH-Wert $\geq 6,0$

— Rast von 40 Minuten bei $\leq 58^\circ\text{C}$ und einem pH-Wert von $\geq 6,0$ bzw. 5,4 in Abhängigkeit von den eingesetzten Amylasen.

Durch die Wirkung der Erwiniaenzyme erfolgt ein beschleunigter Abbau von Zellwandpolysacchariden des Getreides und damit beschleunigte Freisetzung von Stärke und anderen vergärbaren Zellinhaltsstoffen. Darüber hinaus werden zusätzlich amylytisch nicht hydrolisierbare vergärbare Kohlehydrate gebildet. Außerdem wird das Maischesubstrat durch die Bildung niedermolekularer Eiweißabbauverbindungen und viskositätssenkender Effekte für den Hefestoffwechsel aufgewertet. Dies hat zur Folge, daß die Anpassungsphase des Kulturhefestammes an das Substrat und somit die ethanolische Fermentation beschleunigt werden.

Hieraus resultiert summarisch eine Einsparung an α - und Glucoamylasen und eine Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeuten.

Ausführungsbeispiel

Zum Einsatz kommt eine Enzymkulturlösung folgender Zusammensetzung:

— 15E/ml Pektatlyase

— 1,4E/ml Cx-Zellulose

— 0,52E/ml Protease

— Spuren Polygulakturonase und Pektinmethylesterase,

welche aus der Kultivierung von *Erwinia carotovora* auf Medien der folgenden Zusammensetzung gewonnen wurde:

— Getreidenaßschlempe 100 ml/l bzw. 10g Melassekonzentrat

— Sojaschrot 10g/l bzw. 1g Roggenschrot

— Kartoffelpülpe (trocken) 5g/l

— $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1g/l

— NaNO_2 0,25g/l

— MgSO_4 0,25g/l

— KCl 0,25g/l

— CaCl_2 0,25g/l

Im Maischgefäß befindet sich 2000 kg Roggenschrot, das nach dem drucklosen Aufschlußverfahren (Werkstandard KSW5 01-84) eingeteigt wurde. Für den Rohstoffaufschluß werden $2,25 \cdot 10^6$ E/t Stärke Glukoamylase, $62,5 \cdot 10^6$ E/t Stärke Alphaamylase und $650 \cdot 10^6$ U/t Stärke Kulturlösung eingesetzt.

Nach einer Rast von 20 Minuten bei 45°C und einem pH-Wert von 6,0 erfolgte die Verzuckerung bei 58°C innerhalb einer Rast von 40 Minuten. Danach wurde auf 23°C gekühlt und in üblicher Weise mit *Saccharomyces cerevisiae* vergoren. Es wurde eine Alkoholausbeute von 677 LW/t Stärke anstelle von 650 LW/t Stärke beim Einsatz von $11 \cdot 10^6$ E/t Stärke Glukoamylase und $250 \cdot 10^6$ E/t Stärke Alphaamylase ohne Zusatz von Enzymkulturlösung bei gleichem Rohstoff erzielt. Die Ethanolbildung während der Fermentation verlief beim Einsatz der Kulturlösung bis zur 45. Gärstunde beschleunigt. Bis zur 20. Gärstunde wurde (13%) Ethanol mehr gebildet.