



(12)

# PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1281/84

(51) Int.Cl.<sup>5</sup> : A23L 2/34

(22) Anmeldetag: 17. 4.1984

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 7.1993

(45) Ausgabetag: 25. 2.1994

(30) Priorität:

18. 4.1983 DK 1679/83 beansprucht.

(56) Entgegenhaltungen:

DE-OS1805808 DE-AS1276989 DE-052038544 US-PS4299849

(73) Patentinhaber:

NOVO INDUSTRI A/S  
DK-2880 BAGSVAERD (DK).

(72) Erfinder:

DÖRREICH KURT ALBERT  
BASEL (CH).

(54) VERFAHREN ZUR ENZYMATISCHEN BEHANDLUNG VON VORENTSAFTETER MAISCHE

(57) Vorgeschlagen wird ein Verfahren zur enzymatischen Behandlung von vorentsafteiter Maische aus Früchten oder Gemüsen durch Zusatz eines wässrigeren Mediums unter Bildung einer viskosen Masse und Zusatz einer Enzymzubereitung, umfassend Cellulasen, Hemicellulasen und Pectinasen zu der viskosen Masse, wobei vorzugsweise die Behandlungstemperatur in üblicher Weise zwischen 10°C und 65°C, insbesondere zwischen 15°C und 30° oder zwischen 45°C und 55°C, liegt, vorzugsweise die Behandlungszeit zwischen 10 Minuten und 15 Stunden, insbesondere zwischen 30 Minuten und 3 Stunden, liegt, vorzugsweise der pH-Wert während der Behandlung in üblicher Weise der natürliche pH-Wert ist und entionisiertes Wasser als wässrigeres Medium verwendet wird und vorzugsweise die Extraktionsflüssigkeit von einem vorherigen Pressen der Maische als wässrigeres Medium verwendet wird, bei dem man als Enzymzubereitung eine Carbohydrase-Zubereitung, die eine durch Selektionieren eines Mikroorganismus des Stammes Aspergillus aculeatus CBS 101.43 und/oder Aspergillus japonicus IFO 4408 auf einem Fermentationsmedium, dessen Hauptkohlenstoffquelle ein flüssiges Polysaccharid (SPS) ist, das insbesondere aus einem pflanzlichen Rohprotein, vorzugsweise entfettetem Sojamehl, erhalten wurde, gebildete Carbohydrase zum Abbau von löslichen Polysacchariden (SPS-ase), die fähig ist zum Abbau von Soja-SPS unter geeigneten Bedingungen zu Abbauprodukten, die sich an Protein in einem wässrigeren Medium in einem geringeren Ausmaß anlagern, als sich das Soja-SPS vor dem Abbau an das gleiche Protein unter entsprechenden Bedingungen anlagern würde, in einer Menge mindestens entsprechend einer MOU-Aktivität von 10 MOU-Einheiten/kg vorentsafteiter Maische enthält, sowie eine Maische aus Äpfeln, Birnen, schwarzen oder roten Johannisbeeren, Pfirsichen, Aprikosen, Beeren, Trauben, Zitrusfrüchten, tropischen Früchten, Karotten, Kartoffeln, Sellerie, Paprika, Erbsen, Tomaten, Kohl oder Zwiebeln einsetzt.

AT 397 189 B

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur enzymatischen Behandlung von vorentsafteiter Maische aus Früchten oder Gemüsen durch Zusatz eines wässrigen Mediums unter Bildung einer viskosen Masse und Zusatz einer Enzymzubereitung, umfassend Cellulasen, Hemicellulasen und Pectinasen zu der viskosen Masse, wobei vorzugsweise die Behandlungstemperatur in üblicher Weise zwischen 10 °C und 65 °C, insbesondere zwischen 15 °C und 30 °C oder zwischen 45 °C und 55 °C, liegt, vorzugsweise die Behandlungszeit zwischen 10 Minuten und 15 Stunden, insbesondere zwischen 30 Minuten und 3 Stunden, liegt, vorzugsweise der pH-Wert während der Behandlung in üblicher Weise der natürliche pH-Wert ist und entionisiertes Wasser als wässriger Medium verwendet wird und vorzugsweise die Extraktionsflüssigkeit von einem vorherigen Pressen der Maische als wässriger Medium verwendet wird.

Ein derartiges Verfahren ist grundsätzlich aus der US-PS 4 275 648 bekannt.

Vorentsafte Maische ist teilweise entsafte Maische, d. h. Maische, aus der ein Teil des Saftes entfernt worden ist, vorzugsweise durch Pressen.

Obst- und Gemüsesäfte, besonders Apfelsaft, können hauptsächlich durch Pressen oder durch vollständige Verflüssigung hergestellt werden. Selbst wenn eine vollständige Verflüssigung der einfachste Weg ist, um einen Saft zu erhalten, erfordert die vollständige Verflüssigung eine verhältnismäßig hohe Enzymmenge und aus diesem Grund wird das übliche Preßverfahren, bei dem weniger Enzym erforderlich ist, häufig bevorzugt.

Bei Anwendung des üblichen Preßverfahrens entsteht eine verhältnismäßig große Menge an vorentsafteiter Maische. In der US-PS 4 275 648 ist angegeben, diese vorentsafte Maische einer enzymatischen Behandlung zu unterwerfen, um weiteren Saft aus der vorentsafteiter Maische zu erhalten. Es hat sich jedoch gezeigt, daß bei Verwendung der üblichen, in der US-PS 4 275 648 angegebenen Enzyme die Behandlungszeit der vorentsafteiter Maische verhältnismäßig lang ist, daß die Geschwindigkeit der Viskositätsabnahme der aus vorentsafteiter Maische und dem wässrigen Medium bestehenden viskosen Masse verhältnismäßig niedrig ist und daß der Durchsatz in Beziehung auf das Pressen nach der Behandlung der vorentsafteiter Maische verhältnismäßig gering ist.

Es bestand daher die Aufgabe, ein Verfahren zur enzymatischen Behandlung von vorentsafteiter Maische der oben erwähnten Art zu entwickeln, mit dessen Hilfe die Behandlungszeit der vorentsafteiter Maische wesentlich verringert werden kann, die Geschwindigkeit der Viskositätsabnahme der aus vorentsafteiter Maische und dem wässrigen Medium bestehenden viskosen Masse deutlich erhöht werden kann und der Durchsatz in Beziehung auf das Pressen nach der Behandlung der vorentsafteiter Maische wesentlich erhöht werden kann.

Es hat sich nun überraschenderweise gezeigt, daß die oben angegebene Aufgabe gelöst werden kann, wenn eine spezielle Enzymzubereitung für die enzymatische Behandlung angewandt wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist demgemäß dadurch gekennzeichnet, daß man als Enzymzubereitung eine Carbohydrase-Zubereitung, die eine durch Selektionieren eines Mikroorganismus des Stammes Aspergillus aculeatus CBS 101.43 und/oder Aspergillus japonicus IFO 4408 auf einem Fermentationsmedium, dessen Hauptkohlenstoffquelle ein flüssiges Polysaccharid (SPS) ist, das insbesondere aus einem pflanzlichen Rohprotein, vorzugsweise entfettetem Sojamehl, erhalten wurde, gebildete Carbohydrase zum Abbau von löslichen Polysacchariden (SPS-ase), die fähig ist zum Abbau von Soja-SPS unter geeigneten Bedingungen zu Abbauprodukten, die sich an Protein in einem wässrigeren Medium in einem geringeren Ausmaß anlagern, als sich das Soja-SPS vor dem Abbau an das gleiche Protein unter entsprechenden Bedingungen anlagern würde, in einer Menge mindestens entsprechend einer MOU-Aktivität von 10 MOU-Einheiten/kg vorentsafteiter Maische enthält, sowie eine Maische aus Äpfeln, Birnen, schwarzen oder roten Johannisbeeren, Pfirsichen, Aprikosen, Beeren, Trauben, Zitrusfrüchten, tropischen Früchten, Karotten, Kartoffeln, Sellerie, Paprika, Erbsen, Tomaten, Kohl oder Zwiebeln einsetzt.

Vorteilhaft wird dabei eine Carbohydrase eingesetzt, die fähig ist, Soja-SPS in einem wässrigeren Medium zu Abbauprodukten abzubauen, die sich an pflanzliches Protein in dem wässrigeren Medium in geringerem Maße anlagern, als Soja-SPS vor dem Abbau sich an das gleiche pflanzliche Protein in dem wässrigeren Medium angelagert hätte.

Insbesondere wird eine Carbohydrase eingesetzt, die fähig ist, Soja-SPS in einem wässrigeren Medium mit einem pH-Wert, der nicht mehr als 1,5 von 4,5 abweicht, zu Abbauprodukten abzubauen, die sich an Sojaprotein in dem wässrigeren Medium in einem geringeren Ausmaß anlagern, als das Soja-SPS sich vor dem Abbau an das Sojaprotein in dem wässrigeren Medium angelagert hätte.

Besonders vorteilhaft gelangt eine Carbohydrase zur Anwendung, die fähig ist, Soja-SPS zu Abbauprodukten abzubauen, die sich an pflanzliches Protein in einem Ausmaß von weniger als 50 %, insbesondere weniger als 20 %, anlagern, als Soja-SPS sich vor dem Abbau an das pflanzliche Protein in dem wässrigeren Medium angelagert hätte.

Es können sich auch bei einem Carbohydrase-Test nicht ansprechende Carbohydrasen eignen, günstig wird jedoch jeweils eine solche ausgewählt, die einen positiven Carbohydrase-Test ergibt, wenn sie nach dem qualitativen und quantitativen Carbohydrase-Bestimmungsverfahren untersucht wird.

Ein Verfahren zur Herstellung derartiger SPS-Asen ist in der AT-PS 387 789, (vergl. auch DE-OS 3 247 276) beschrieben, auf deren Offenbarungen durch Hinweis Bezug genommen wird.

Gegenstand dieser Patentschrift ist ein Verfahren zur Herstellung von neuen SPS-Asen, das dadurch

gekennzeichnet ist, daß ein auf einem Fermentationsmedium, dessen Hauptkohlenstoffquelle ein flüssiges Polysaccharid (SPS) ist, das insbesondere aus einem pflanzlichen Rohprotein, vorzugsweise entfettetem Sojamehl, erhalten wurde, selektionierter Mikroorganismus des Stammes *Aspergillus aculeatus* CBS 101.43 und/oder *Aspergillus japonicus* IFO 4408 zur Bildung einer Carbohydrase, die fähig ist zum Abbau von Soja-SPS unter geeigneten Bedingungen zu Abbauprodukten, die sich an Protein in einem wässrigen Medium in einem geringen Ausmaß anlagern, als sich das Soja-SPS vor dem Abbau an das gleiche Protein unter entsprechenden Bedingungen anlagern würde, in einem Nährmedium gezüchtet wird.

Das beim erfundungsgemäßen Verfahren eingesetzte Medium kann zum Beispiel Leitungswasser sein, ist jedoch vorteilhafter entionisiertes Wasser oder die Extraktionsflüssigkeit eines vorausgehenden Pressens der Maische.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfundungsgemäßen Verfahrens wird die SPS-ase in einer Menge zugesetzt, entsprechend einer MOU-Aktivität zwischen 10 und 2000 MOU-Einheiten/kg vorentsäftete Maische (die Definition der MOU-Einheit ist weiter unten angegeben). Auf diese Weise kann ein Kompromiß zwischen einer kurzen Behandlungszeit und einer hohen Geschwindigkeit der Viskositätsabnahme erreicht werden.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfundungsgemäßen Verfahrens wird eine SPS-ase-Zubereitung verwendet, die gebildet werden kann von *Aspergillus aculeatus* CBS 101.43. Auf diese Weise wird ein optimales Verhältnis zwischen Cellulasen, Hemicellulasen, Pectinasen und SPS-ase bezüglich einem maximalen Abbau erzielt.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfundungsgemäßen Verfahrens liegt die Behandlungs-temperatur in üblicher Weise zwischen 10 °C und 65 °C, vorzugsweise zwischen 15 °C und 30 °C oder zwischen 45 °C und 55 °C. Bei dem bevorzugten niedrigeren Temperaturbereich ist die Reaktionsgeschwindigkeit verhältnismäßig niedrig, aber dafür ist der Geschmack des Abbauproduktes der vorentsäfteten Maische ausgezeichnet. Bei dem bevorzugten höheren Temperaturbereich ist die Reaktionsgeschwindigkeit verhältnismäßig hoch, während der Geschmack des Abbauproduktes der vorentsäfteten Maische etwas weniger gut sein kann. Da das Abbauprodukt der vorentsäfteten Maische nur ein kleiner Teil des primären Saftes ist, ist diese mögliche Verschlechterung nicht von praktischer Bedeutung. Der dazwischen liegende Temperaturbereich ist weniger bevorzugt wegen der Gefahr einer mikrobiellen Verunreinigung.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfundungsgemäßen Verfahrens liegt die Behandlungszeit zwischen 10 Minuten und 15 Stunden, vorzugsweise zwischen 30 Minuten und 3 Stunden. In dem unteren Bereich des Zeitintervalls ist der Abbau der vorentsäfteten Maische verhältnismäßig gering, dafür ist jedoch der Durchsatz durch die Anlage verhältnismäßig hoch. Bei dem höheren Bereich des Zeitintervalls ist der Abbau der vorentsäfteten Maische verhältnismäßig stark, während der Durchsatz durch die Anlage verhältnismäßig gering ist.

Der pH-Wert für die Behandlung ist bei dem erfundungsgemäßen Verfahren vorzugsweise der natürliche pH-Wert und als wässriges Medium wird vorzugsweise entionisiertes Wasser verwendet. Auf diese Weise tritt keine Störung der Zusammensetzung durch natürliche Mineralsalze auf.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfundungsgemäßen Verfahrens wird die Extraktionsflüssigkeit von einem vorherigen Pressen der Maische als wässriges Medium verwendet. Auf diese Weise können die Kosten für die Endkonzentration des flüssigen Extraks aus der vorentsäfteten Maische reduziert werden.

Das Obst oder Gemüse, das für das erfundungsgemäße Verfahren angewandt wird, sind Äpfel, Birnen, schwarze oder rote Johannisbeeren, Pfirsiche, Aprikosen, Beeren, Trauben, Zitrusfrüchte, tropische Früchte, Karotten, Kartoffeln, Sellerie, Paprika, Erbsen, Tomaten, Bohnen, Kohl oder Zwiebeln. Es hat sich gezeigt, daß alle oben erwähnten Vorteile mit vorentsäfteter Maische erreicht werden können, die von diesen Früchten oder Gemüsearten stammt.

Üblicher Weise beträgt das Trockengewicht der Trester etwa 10 bis 50 %, bezogen auf das Trockengewicht der als Ausgangsmaterial eingesetzten vorentsäfteten Maische. So stellt Trester den Frucht- oder Gemüse-rückstand dar, aus dem normalerweise praktisch kein weiterer Saft mehr gewonnen werden kann.

Mit Hilfe des erfundungsgemäßen Verfahrens wird eine Erhöhung der Brix-Ausbeute in dem erhaltenen Saft erzielt durch Löslichmachen von anderen Polysacchariden als Pectinen durch die SPS-ase-Aktivität.

Wie bereits erwähnt, geht die vorliegende Erfindung vom nächstliegenden Stand der Technik gemäß der US-PS 4 275 648 aus; zum weiteren Stand der Technik wird folgendes ausgeführt:

Die Behandlung von unbehandeltem Gemüse- oder Fruchtmaterial, also nicht die Behandlung vorentsäfteter Maische, mit Enzymen ist z. B. in den DE-OS 1 805 808 und 2 038 544 und der US-PS 4 299 849 beschrieben. Die DE-OS 1 805 808 betrifft die Verwendung eines Pektinlykosidasen (Polygalacturonasen) und Protopektininasen enthaltenden und von Polymethylgalacturonasen und Pektinesterasen im wesentlichen freien Enzymproduktes aus Kulturfiltraten von *Aspergillus alleaceus*, *Aspergillus parasiticus*, *Rhizopus javanicus*, *Ceratocystis paradoxa*, *Penicillium roqueforti* oder *Penicillium stoloniferum* zum Mazerieren von zerkleinertem Gemüse- oder Fruchtfleisch. Dabei geht es darum, Gemüse- bzw. Fruchtmarkkonzentrate herzustellen, die sich beim Verdünnen mit Wasser nicht in Serum und Püple trennen und einen niedrigeren Methanolgehalt aufweisen. Dabei wird für Karotten angegeben, entweder 16 - 20 Stunden bei Raumtemperatur

oder 1 - 2 Stunden bei 45 - 50 °C zu fermentieren.

Die DE-AS 2 038 544 betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Frucht- und Gemüsesäften durch enzymatische Vollverflüssigung. Dieser Stand der Technik ist eingangs erwähnt. Bei diesem Verfahren wird das Frucht- und Gemüsematerial fein zerkleinert und gegebenenfalls nach Verdünnen mit Wasser bei Temperaturen von 50 bis 60 °C und bei einem pH-Wert von 3,5 bis 4,5 mit Cellulasen, die aus Trichoderma- oder Aspergillusarten isoliert worden sind und keine oder nur eine sehr geringe pektolytische Aktivität aufweisen und praktisch ausschließlich Cellulaseaktivität besitzen, behandelt und dann homogenisiert.

Die US-PS 4 299 849 betrifft die Herstellung von Orangensaft aus ganzen Orangen oder deren Schalen und spricht ein spezifisches Problem an, nämlich zu verhindern, daß aus der Schale bitterer Geschmack in den Saft gelangt. Wie bekannt bestehen Orangenschalen aus einer äußeren, ätherische Öle produzierende und enthaltende Zellen aufweisenden gelben Flavedoschicht und einer inneren weißen Albedoschicht.

Gemäß der US-PS 4 299 849 wird nun eine enzymatische Behandlung mit speziellen, von Trichoderma viride oder Aspergillus niger gebildeten Cellulasen, die nicht die Fähigkeit aufweisen, Pflanzengewebe zu zerstören, bei 30 bis 55 °C vorgesehen. Auf diese Weise wird nur die Albedoschicht, nicht aber die Flavedoschicht abgebaut.

Die DE-AS 1 276 989 betrifft ein Verfahren zur Herstellung von trüben Zitrussäften. Dabei wird wie üblich aus zerkleinerten Früchten zuerst der Hauptteil Saft abgepreßt, die verbleibende Pülpe wird ohne Verdünnung weitgehend unter Luftabschluß der teilweisen Hydrolyse durch Pektin sowie gegebenenfalls auch Zellulose-abbauenden Enzyme unterworfen; aus der dabei entstehenden dickflüssigen bis cremigen Masse werden die groben Faserbestandteile abgetrennt und der Rest dem Saft zugesetzt. Das Ziel ist eine erhöhte Trubstabilität infolge eines hohen Anteils an gelösten, aber nicht völlig hydrolysierten Pektinstoffen. Dazu wird entweder der erhaltene Saft tiefgekühlt oder die Aktivität der pektinabbauenden Enzyme durch Erhitzen blockiert, so daß die enzymatische Abbaureaktion zum gewünschten Zeitpunkt abgebrochen wird.

Wie aus den folgenden Beispielen hervorgeht, eröffnet die Erfindung die Möglichkeit, eine geringe Enzymmenge zu verwenden im Vergleich mit üblichen Enzymen auf gleicher MOU-Basis.

Bei dem in der US-PS 4 275 648 beschriebenen Verfahren werden die von der enzymatischen Behandlung der vorentsäftenen Maische gewonnenen Trester von der überstehenden Flüssigkeit durch Zentrifugal- oder Gravitationskräfte abgetrennt. Solche Vorrichtungen sind jedoch kein Teil einer üblichen Anlage zur Herstellung von Apfelsaft. Gemäß der Erfindung sind keine derartigen Abtrennvorrichtungen erforderlich, da die gleiche Presse, die zur Erzeugung der vorentsäftenen Maische, die das Ausgangsmaterial für das erfindungsgemäße Verfahren darstellt, angewandt wurde, auch zur Abtrennung der Trester von der überstehenden Flüssigkeit verwendet werden kann. So führt das erfindungsgemäße Verfahren zu dem weiteren technischen Vorteil im Vergleich mit der US-PS 4 275 648, daß die Presse für die beiden oben erwähnten Zwecke angewandt werden kann, wodurch die Investitionskosten für die Anlage zur Saftherstellung gering gehalten werden können.

Die Geschwindigkeit mit der die Viskosität bei Verwendung üblicher Enzyme und unter Verwendung einer SPS-ase-Zubereitung gemäß der Erfindung abnimmt, wird in den folgenden Versuchsreihen verglichen. Bei diesen Tests werden Pectinex (bekannte Pectinase) und andere bekannte Enzyme sowie die SPS-ase-Zubereitung in entsprechenden Konzentrationen verwendet, d. h. Konzentrationen, die die gleiche Pectinase-Aktivität in MOU-Einheiten/kg vorentsäfteter Maische ergeben, wobei die MOU-Aktivität gemessen wird nach "Determination of the Pectinase Units on Apple Juice (MOU)" vom 12. 6. 1981, erhältlich von Schweizerische Ferment AG, Vogesenstraße 132, Basel, Schweiz.

Vorentsäftete Apfelmaische wurde auf folgende Weise hergestellt und als ein Substrat verwendet.

Äpfel wurden mit Hilfe einer Bucher-Zentralmühle (4 mm) grob zerkleinert. Die Apfelmaische wurde gepreßt, bis 75 Gew.-% Saft erhalten worden waren. Die erhaltene vorentsäftete Apfelmaische wurde in der doppelten Menge Wasser suspendiert und dann in einer Fryma-Mühle gemahlen, die mit Korundstein ausgekleidet war und eine spaltförmige Öffnung von 0,5 mm aufwies. Enzymreaktionen wurden 3 Stunden bei 50 °C in dem Contraves Epprecht Rheomat 15 durchgeführt. Während des Rührens wurden kontinuierliche Viskositätsmessungen durchgeführt und die Viskosität, angegeben als Prozentsatz der ursprünglichen Viskosität, wurde bestimmt (Geschwindigkeitseinstellung 15). Tabelle 1 und Figur 1 zeigen einen Vergleich zwischen der Wirkung von Pectinex® 3 X (2550 MOU/g), Celluclast® 1,5 L, der Kombination von Pectinex® 3 X und Celluclast® 1,5 L und einer SPS-ase-Zubereitung. Pectinex und Celluclast sind handelsübliche Enzympräparate (Hersteller Novo Nordisk AS, Kopenhagen). Die bei diesen Versuchen angewandte SPS-ase-Zubereitung wurde nach Beispiel 1 der DE-OS 3 247 276 wie folgt hergestellt:

Eine SPS-ase wurde durch Submers-Fermentation von Aspergillus aculeatus CBS 101.43 hergestellt. In einem Fernbach-Kolben wurde ein Agar-Substrat der folgenden Zusammensetzung hergestellt:

Pepton Difco	6	g
Aminolin Ortana	4	g
Glucose	1	g
Hefeextrakt Difco	3	g

Fleischextrakt Difco	1,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Merck	20 g
Malzextrakt Evers	20 g
entmineralisiertes H <sub>2</sub> O ad	1000 ml

5

Der pH-Wert wurde zwischen 5,3 und 5,35 eingestellt. Dann wurden 40 g Agar (Difco) zugegeben und das Gemisch 20 min im Autoklaven bei 120 °C behandelt. Das Substrat wird als E-Agar bezeichnet.

10

Der Stamm CBS 101.43 wurde auf einer E-Agar-Schräge (37 °C) gezüchtet. Die Sporen von der Schräge wurden in sterilisierter Magermilch suspendiert und die Suspension in Gläsern lyophilisiert. Der Inhalt einer Ampulle mit lyophilisiertem Inhalt wurde in den das Agar-Substrat enthaltenden Fernbach-Kolben gegeben. Der Kolben wurde dann 13 Tage bei 30 °C inkubiert.

Es wurde ein Substrat mit der folgenden Zusammensetzung in einem 500 l Impf-Fermenter hergestellt.

CaCO <sub>3</sub>	1,2 kg
Glucose	7,2 kg
Rofec (Maiswasser-Feststoffe)	3,6 kg
Sojabohnenöl	1,2 kg

Leitungswasser wurde bis zu einem Gesamtvolumen von ungefähr 240 l zugegeben. Der pH-Wert wurde vor der Zugabe von CaCO<sub>3</sub> auf ungefähr 5,5 eingestellt. Das Substrat wurde in dem Impf-Fermenter 1 h bei 121 °C sterilisiert. Das Endvolumen vor der Beimpfung betrug ungefähr 300 l.

Die Sporensuspension aus dem Fernbach-Kolben wurde in den Impf-Fermenter überführt. Die Bedingungen der Impf-Fermentation waren:

25	Fermentertyp:	Üblicher belüfteter und gerührter Fermenter mit einem Verhältnis Höhe : Durchmesser von ungefähr 2,3.
	Rühren:	300 UpM (zwei Turbinen-Propellerrührer)
	Belüftung:	300 Normal Liter Luft pro Minute
	Temperatur:	30 bis 31 °C
30	Druck:	1,5 bar (0,5 ato)
	Zeit:	etwa 28 h

Ungefähr 28 h nach der Beimpfung wurden 150 l aus dem Impf-Fermenter in den Hauptfermenter überführt.

35 In einem 2 500 l Hauptfermenter wurde ein Substrat der folgenden Zusammensetzung hergestellt:

Geröstetes Sojamehl	90 kg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 kg
Pluronic	150 ml

40

Leitungswasser wurde bis zu einem Gesamtvolumen von etwa 900 l zugegeben. Das geröstete Sojamehl wurde in Wasser suspendiert. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 8,0 eingestellt und die Temperatur auf 50 °C erhöht. Daraufhin wurden etwa 925 Anson-Einheiten Alkalase 0,6 L zu der Suspension gegeben. Das Gemisch wurde 4 h bei 50 °C und pH 8,0 (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Zugabe) ohne Belüftung unter Normaldruck (null ato) und Rühren mit 100 UpM gehalten. Anschließend wurden die restlichen Bestandteile des Substrats zugegeben und der pH-Wert mit Phosphorsäure auf ungefähr 6,0 eingestellt. Das Substrat wurde in dem Hauptfermenter 1,5 h bei 123 °C sterilisiert. Das Endvolumen vor der Beimpfung betrug ungefähr 1080 l.

Dann wurden 150 l Impfkultur zugesetzt.

Die Fermentationsbedingungen waren:

50	Fermentertyp:	Üblicher belüfteter und gerührter Fermenter mit einem Verhältnis Höhe : Durchmesser von ungefähr 2,7.
	Rühren:	250 UpM (zwei Turbinen-Propellerrührer)
	Belüftung:	1200 Normal Liter Luft pro Minute
55	Temperatur:	30 °C
	Druck:	1,5 bar (0,5 ato)
	Zeit:	etwa 151 h

60 Zwischen ungefähr 24 und ungefähr 116 h der Fermentation wurde eine Pectinlösung aseptisch zu dem Hauptfermenter mit konstanter Geschwindigkeit von ungefähr 8 l/h zugeführt. Die Pectinlösung der folgenden Zusammensetzung wurde in einem 500 l Dosierungstank hergestellt:

Pectin genu<sup>x)</sup> 22 kg  
 Phosphorsäure, konz. 6 kg  
 Pluronic 50 ml

5 x) Genu pectin (Citrus-Typ NF von The Copenhagen pectin factory Ltd.).

Leitungswasser wurde auf ein Gesamtvolumen von etwa 325 l zugegeben. Das Substrat wurde in dem Dosierungstank 1 h bei 121 °C sterilisiert. Das Endvolumen vor dem Beginn der Dosierung bzw. Zugabe betrug ungefähr 360 l. Nach Auslauf dieser Menge wurde ein zweiter ähnlicher Ansatz hergestellt. Das Gesamtvolumen an Pectinlösung für eine Fermentation betrug ungefähr 725 l.

10 Nach ungefähr 151 h langer Fermentation wurde die Fermentation abgebrochen. Die ungefähr 1850 l Kulturbrei wurden auf ungefähr 5 °C gekühlt und die Enzyme nach dem folgenden Verfahren gewonnen.

15 Die Kulturbrei wurde mit Hilfe eines Vakuum-Trommelfilters (Dorr Oliver), das mit Filterhilfe (Hy-flo-super-cel Diatomeenerde) beschichtet war, filtriert. Das Filtrat wurde durch Eindampfen auf ungefähr 15 % des Volumens der Kulturbrei eingeeignet. Das Konzentrat wurde über eine Seitz-Filterfolie (Type supra 100) mit 0,25 % Hy-flo-super-cel als Filterhilfe filtriert (in der folgenden Tabelle als Filtration I bezeichnet). Das Filtrat wurde mit 561 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/l bei pH 5,5 ausgefüllt und 4 % Hy-flo-super-cel Diatomeenerde als Filterhilfe zugegeben. Der Niederschlag und die Filterhilfe wurden durch Filtration über ein Rahmenfilter getrennt. Der Filterkuchen wurde in Wasser gelöst und unlösliche Bestandteile über ein Rahmenfilter abfiltriert. Das Filtrat wurde (check) filtriert, über eine Seitz-Filterfolie (type supra 100) mit 0,25 % Hy-flo-super-cel als Filterhilfe (in der folgenden Tabelle als Filtration II bezeichnet). Das Filtrat wurde über eine Ultrafiltrationsvorrichtung diafiltriert. Nach der Diafiltration wurde die Flüssigkeit auf einen Feststoffgehalt von 12,7 % eingeeignet (in der folgenden Tabelle als Feststoffgehalt im Konzentrat bezeichnet).

20 25 Dann wurde die Flüssigkeit (check) filtriert und zum Zwecke der Keimverminderung filtriert und das Filtrat über eine Gefriertrockenvorrichtung von Stokes gefriergetrocknet.

	Mirkoorganismus	Code Nr.	Konzentration (%) der Filterhilfe bei Filtration I			Feststoffgehalt im Konzentrat
			Ausfällung	Filtration II		
30	CBS 101.43	KRF 68	0,5	5	0,2	28

35 Es wurde ein Produkt mit folgendem enzymatischen Aktivitätsspektrum erhalten:

40 SPSU/g = 40  
 SRU/g = 205  
 PGE/g = 9650  
 HUT bei pH 3,2 g = 3200  
 VHCU/g = 256000

45 Eine SPSU-Einheit ist definiert als die SPS-ase Aktivität, die unter Standardbedingungen eine 1 µMol Galactose entsprechende Menge eines in 50 %-igem Äthanol löslichen Kohlenhydrats pro Minute freisetzt und wird gemäß der DE-OS 3 247 276 bestimmt.

50 Eine SRU-Einheit ist ein Maß für rückstandslösende Aktivität und wird bestimmt nach der öffentlich zugänglichen und bei der Anmelderin erhältlichen NOVO-Industri A/S Analysevorschrift A 154/4 vom 1. Februar 1981.

55 Eine PGE-Einheit ist ein Maß für Pektinaseaktivität, bestimmt nach der öffentlich zugänglichen und bei der Verfasserin erhältlichen Vorschrift Viskosimetrische Polygalacturonase-Bestimmung (PGE) vom 10. November 1977 der schweizerischen Ferment AG, Basel.

55 Eine HUT-Einheit ist das Maß für die Protease-Aktivität und definiert als die Enzymmenge, die innerhalb einer Minute ein Hydrolysat bildet, dessen Absorption bei 275 nm der einer Lösung von 1,10 ng/ml Tyrosin in 0,0064 HCl entspricht. (Absorptionswert ist 0,0084). Die Bestimmung erfolgt nach der DE-OS 3 247 276; die Abbaureaktion sollte bei 40 °C und pH 3,2 30 Minuten lang ablaufen.

60 Eine VHCU-Einheit ist das Maß für die Hemicellulase-Aktivität und wird bestimmt nach der öffentlich zugänglichen und bei der Anmelderin erhältlichen NOVO-Industri A/S Analytical method AF 156/1-GB.

Tabelle 1

Viskositätsabnahme der Suspension von vorentsafte Apfelmaische in %  
 (Vergleich der Enzyme auf gleicher MOU-Basis; Epprecht Rheomat 15, Geschwindigkeitseinstellung 15)

5

Zeit (min)	Blindprobe (0)	Pectinex® 3 X (1)	Celluclast® 1,5 L (2)	Pectinex® 3 X + Celluclast® 1,5 L (3)	SPS-ase- Zubereitung (4)
10	0	0	0	0	0
15	10	2,5	5,0	6,0	27,0
20	20	3,5	7,5	10,0	37,0
30	30	4,0	10,0	13,0	42,0
40	40	4,5	11,5	15,5	46,0
50	50	5,0	13,0	16,5	48,0
60	60	6,0	14,5	18,0	49,5
20	70	6,5	16,0	13,0	51,0
80	80	7,0	17,0	20,0	52,0
90	90	7,5	18,0	21,0	53,0
100	100	8,0	19,0	21,5	54,0
110	110	9,0	20,0	22,0	54,5
25	120	9,5	21,0	22,0	55,0
130	130	9,0	22,0	22,5	55,5
140	140	9,0	23,0	23,0	56,0
150	150	9,5	23,5	23,0	56,0
30	160	10,0	24,0	23,0	56,0
170	170	10,0	24,5	23,5	56,5
180	180	10,5	25,0	23,5	56,5

Erläuterung zu Tabelle 1

35

(0): Blindprobe

(1): 30 g Pectinex® 3 X/100 kg vorentsafte Maische

(2): 60 g Celluclast® 1,5 L/100 kg vorentsafte Maische

(3): 30 g Pectinex® 3 X + 60 g Celluclast® 1,5 L/100 kg vorentsafte Maische

40

(4): 77,4 g SPS-ase-Zubereitung/100 kg vorentsafte Maische

Pectinex® 3 X: 2'550 MOU/g

SPS-ase-Zubereitung: 988 MOU/g

45

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

Behandlung von vorentsafte Apfelmaische aus gelagerten Äpfeln (Jonathan und Boskop):

50 Die Äpfel wurden in einer Bucher-Zentralmühle (4 mm) zerkleinert und die Maische nach einer Behandlung mit Pectinex® (20 g Pectinex® 1 X/100 kg Äpfel, 1 h bei Raumtemperatur) mit einer horizontalen Bucherpresse gepreßt bis 78 % Saft erhalten worden waren.

0,667 kg der erhaltenen vorentsafte Maische wurden in 1,333 kg Wasser von 50 °C suspendiert. Die oben angegebene SPS-ase-Zubereitung wurde während des Rührrens zugesetzt (10 g/100 kg vorentsafte Maische). Nach einer Gesamtrührzeit von 2 h wurde die Maische mit einer Hafico HP5M-Presse gepreßt. Man erhielt 1,510 kg "Saft" mit 5,5° Brix.

Beispiel 2

Industrielle Behandlung von vorentsafte Apfelmaische:

60 Zu 6000 kg vorentsafte Apfelmaische, die aus einer üblichen Anlage zur Fruchtsaftherstellung erhalten worden waren (Bucher-Zentralmühle 6 mm, Maischebehandlung 10 g Pectinex® 1 X/100 kg Äpfel, Bucher HP

5000 Presse) wurden 12000 l heißes Wasser (Kondensat aus dem Konzentrator) gegeben und eine Mischtemperatur von 55 °C erreicht. Dann wurden 1,2 kg der oben angegebenen SPS-ase-Zubereitung zugesetzt. Nach 2-stündigem leichten Rühren wurde die Masse mit einer Bucher HP 5000-Presse, ähnlich einer Presse wie sie zur Herstellung von normaler Apfelmaische verwendet wird gepreßt. Das Gewicht der Trester betrug

5 3700 kg und man erhielt 14300 l Saft mit 4,5° Brix.

Die folgenden Beispiele 3 bis 12 wurden allgemein wie Beispiel 2 durchgeführt, wobei jedoch die aus der folgenden Tabelle ersichtlichen Parameter auftraten.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

(Es folgt eine Tabelle)

Beispiel	% PDM*) bezogen auf das Gewicht des Rohmaterials	Verteilung von PDM*) vorneinstaffeln	Märische Presse (Bucher HP 5000)	Wassermenge (kg)	Temperatur der viskosen Masse (°C)	SPS-ase-Zubereitung (g/t PDM*)	Zeit der Emulsionierung (min)	Rührzeit (min)	Trennmittel (kg)	Saftrinne (kg)	Saftrinzentration (g/Brix)	
5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	6000	14 000	
3	75	6 120	14 000	50	200	240	0	240	0	horizontale Presse (Bucher HP 5000)	3 280	16 840
4	70	6 000	4 000	27	200	200	65	65	65	horizontale Presse (Bucher HP 5000)	3 400	6 600
5	83,3	12 280	25 000	45	200	180	180	180	180	horizontale Presse (Bucher HP 5000)	3 680	33 600
6	75	1 695	2 800	36	300	120	120	120	120	Dekanter (Westfalia)	1 280	3 215
7	75	1 890	3 500	40	200	200	120	120	10	Dekanter (Westfalia)	1 468	3 922
8	68	31,9	61	50	400	400	90	90	90	Bandpresse (Ensink)	13,8	79,1
9	68,3	990	1 800	58	400	400	90	90	90	Bandpresse (Bellmer Winkelpresse)	390	2 400
10	69	1 500	2 000	56	400	400	90	90	90	Bandpresse (Willmes Continupak)	1 150	2 350
11	68	4 500	1 500	40	100	100	90	90	0	horizontale Presse (Bucher HP 5000)	1 480	7 020
12	50	5 000	1 000	20	100	100	90	90	90	horizontale Presse (Bucher HP 5000)	1 200	4 800
												8,8

**PATENTANSPRÜCHE**

5

- 10 1. Verfahren zur enzymatischen Behandlung von vorentsfteteter Maische aus Früchten oder Gemüsen durch Zusatz eines wässrigen Mediums unter Bildung einer viskosen Masse und Zusatz einer Enzymzubereitung, umfassend Cellulasen, Hemicellulasen und Pectinasen zu der viskosen Masse, wobei vorzugsweise die Behandlungstemperatur in üblicher Weise zwischen 10 °C und 65 °C, insbesondere zwischen 15 °C und 30 °C oder zwischen 45 °C und 55 °C, liegt, vorzugsweise die Behandlungszeit zwischen 10 Minuten und 15 Stunden, insbesondere zwischen 30 Minuten und 3 Stunden, liegt, vorzugsweise der pH-Wert während der Behandlung in üblicher Weise der natürliche pH-Wert ist und entionisiertes Wasser als wässriges Medium verwendet wird und vorzugsweise die Extraktionsflüssigkeit von einem vorherigen Pressen der Maische als wässriges Medium verwendet wird, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Enzymzubereitung eine Carbohydrase-Zubereitung, die eine durch Selektionieren eines Mikroorganismus des Stammes Aspergillus aculeatus CBS 101.43 und/oder Aspergillus japonicus IFO 4408 auf einem Fermentationsmedium, dessen Hauptkohlenstoffquelle ein flüssiges Polysaccharid (SPS) ist, das insbesondere aus einem pflanzlichen Rohprotein, vorzugsweise entfettetem Sojamehl, erhalten wurde, gebildete Carbohydrase zum Abbau von löslichen Polysacchariden (SPS-ase), die fähig ist zum Abbau von Soja-SPS unter geeigneten Bedingungen zu Abbauprodukten, die sich an Protein in einem wässrigen Medium in einem geringeren Ausmaß anlagern, als sich das Soja-SPS vor dem Abbau an das gleiche Protein unter entsprechenden Bedingungen anlagern würde, in einer Menge mindestens entsprechend einer MOU-Aktivität von 10 MOU-Einheiten/kg vorentsfteteter Maische enthält, sowie eine Maische aus Äpfeln, Birnen, schwarzen oder roten Johannisbeeren, Pfirsichen, Aprikosen, Beeren, Trauben, Zitrusfrüchten, tropischen Früchten, Karotten, Kartoffeln, Sellerie, Paprika, Erbsen, Tomaten, Kohl oder Zwiebeln einsetzt.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Carbohydrase eingesetzt wird, die fähig ist, Soja-SPS in einem wässrigen Medium zu Abbauprodukten abzubauen, die sich an pflanzliches Protein in dem wässrigen Medium in geringerem Maße anlagern, als Soja-SPS vor dem Abbau sich an das gleiche pflanzliche Protein in dem wässrigen Medium angelagert hätte.
- 25 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Carbohydrase eingesetzt wird, die fähig ist, Soja-SPS in einem wässrigen Medium mit einem pH-Wert, der nicht mehr als 1,5 von 4,5 abweicht, zu Abbauprodukten abzubauen, die sich an Sojaprotein in dem wässrigen Medium in einem geringeren Ausmaß anlagern, als das Soja-SPS sich vor dem Abbau an das Sojaprotein in dem wässrigen Medium angelagert hätte.
- 30 4. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Carbohydrase eingesetzt wird, die fähig ist, Soja-SPS zu Abbauprodukten abzubauen, die sich an pflanzliches Protein in einem Ausmaß von weniger als 50 %, insbesondere weniger als 20 %, anlagern, als Soja-SPS sich vor dem Abbau an das pflanzliche Protein in dem wässrigen Medium angelagert hätte.
- 35 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Carbohydrase-Zubereitung in einer Menge entsprechend einer MOU-Aktivität zwischen 10 und 2000 MOU-Einheiten/kg vorentsfteteter Maische zusetzt.

50

Hiezu 1 Blatt Zeichnung

Ausgegeben

25. 2.1994

Int. Cl. 5: A23L 2/34

Blatt 1

