



AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP A 23 L / 282 854 0	(22)	14.11.85	(44)	04.02.87
(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD				
(72)	Leuchtenberger, Andreas, Dr. Dipl.-Biol.; Wardsack, Christine; Ruttloff, Heinz, Prof. Dr. Dipl.-Lebensmittelchem., DD				
(54)	Verfahren zur enzymatischen Klärung von trubstoffhaltigem Apfelsaft				

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur enzymatischen Klärung von Apfelsaft durch direkten Kontakt von trägerfixiertem Mycel eines pektinolytisch aktiven Schimmelpilzes von der Art *Aspergillus niger*. Erfindungsgemäß wird in einem Fermentationsgefäß trägerfixierte Biomasse angezüchtet. Nach Ablassen der Nährlösung wird diese 8 bis 18 h im Luftstrom getrocknet, zweimal 30 bis 60 min mit sterilem Wasser gewaschen und anschließend für die Apfelsaftbehandlung eingesetzt. Der Depektinisierungsprozeß erfolgt im Verlaufe von 30 bis 60 min bei 28 bis 32 °C und einer Belüftung von 60 bis 120 l/h. Die Wirkung ist am effektivsten bei Einsatz von 0,5 bis 10 ml Apfelsaft je cm² Trägerfläche. Das Mycel kann für die Behandlung von mindestens 5 Chargen Apfelsaft verwendet werden.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur enzymatischen Klärung von trübstoffhaltigem Apfelsaft, **dadurch gekennzeichnet**, daß der trübstoffhaltige Saft solange in kurzzeitigen Kontakt mit trägerfixiertem Mycel eines pektinolytisch aktiven Schimmelpilzes von der Art *Aspergillus niger* gebracht wird, bis das Schutzkolloid Pektin abgebaut und die Trübstoffe zur Auflockung kommen.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß für die Kultivierung der Stamm *Aspergillus niger* R1/214, hinterlegt in der Zentralen Stammsammlung der DDR im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie in Jena unter der Bezeichnung ZIMET 43692, verwendet wird.
3. Verfahren nach den Punkten 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Mycel nach Ablassen der Kulturlösung in einem Fermentor im Luftstrom 8 bis 18 h getrocknet und nachfolgend zwecks Entfernung von Resten des Kulturmediums zweimal mit sterilem Wasser 30 bis 60 min gewaschen wird.
4. Verfahren nach den Punkten 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß Apfelsaft in einer Menge von 0,5 bis 10 ml je cm² Trägeroberfläche eingesetzt wird.
5. Verfahren nach den Punkten 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Behandlung des Saftes bei Temperaturen von 28 bis 32°C erfolgt.
6. Verfahren nach den Punkten 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Behandlungsdauer 30 bis 60 min beträgt.
7. Verfahren nach den Punkten 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Luftzufuhr von 60 bis 120 l/h gewählt wird.
8. Verfahren nach den Punkten 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß das angezüchtete Mycel nach Behandlung von 5 Chargen frischen Apfelsaftes erneuert wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf die Depektinisierung und Klärung von Apfelsaft unter Verwendung von pektinolytisch aktiven Schimmelpilzen der Art *Aspergillus niger*.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Zur Depektinisierung und Klärung von Apfelsaft werden in der obstverarbeitenden Industrie seit Jahren pektinolytische Enzyme mikrobiellen Ursprungs eingesetzt. Ihre Wirkung besteht im wesentlichen darin, daß das um die Trübstoffe des Saftes befindliche Schutzkolloid aus Pektin hydrolytisch gespalten wird, wodurch diese agglomerieren. Durch Zusatz von Schönmitteln wird die Sedimentierung der Trübstoffe beschleunigt. Die fruchtsaftklärende Wirkung pektinolytischer Enzyme, die sich u. a. in einer deutlichen Viskositätsabnahme zeigt, ist von verschiedenen Prozeßbedingungen (z. B. Temperatur, Enzymart und -menge, Saftqualität, pH-Wert) abhängig. Die Optimierung dieser Parameter zwecks Verkürzung der Behandlungszeit sowie Verbesserung der Saftqualität ist Gegenstand verschiedener Patentschriften (DE-OS 2607532, CD-PS 752331). Eine Weiterentwicklung dieser Technologie ist die kontinuierliche Apfelsaftklärung (DD-PS 147500, FR-PS 2112598, US-PS 3795521, DE-OS 2154500). Nachteilig bei den genannten Verfahren ist, daß lösliche Enzyme verwendet werden, die nur einmal zum Einsatz kommen und nach Ablauf des Klärungsprozesses inaktiviert werden.

Eine Möglichkeit zur Eliminierung dieses Nachteils besteht in der Anwendung immobilisierter Enzyme, die nach der Reaktion abgetrennt und für weitere Klärungsprozesse eingesetzt werden können. So gibt es eine Patentschrift von J. H. REYNOLDS (DE-OS 2112749), in der ein Verfahren zur Apfelsaftklärung mit an Polyethylenscheiben fixierter Polygalakturonase beschrieben wird. A. BARANJAK (Acta Aliment. Pol. 8 [1971] 1/2, 11-16) setzt zur Depektinisierung von Apfelsaft eine Polygalakturonase ein, die an poröses Glas immobilisiert worden ist. Weitere diesbezügliche Literaturhinweise sind von HULTIN (Food Technol. 37 [1983] 10, 66-82), LIST u. KNECHTEL (Ind. Obst- u. Gem.-Verwertung 65 [1980] 16, 415-419) sowie SCHAWALLER (Dissertation A, Agrarwiss. Fak. der Humboldt-Univ., Berlin 1983) bekannt. Obwohl es verschiedene Verfahrensentwicklungen mit trägerfixierten Pektinasen gibt, hat sich bisher noch keines im technischen Maßstab bewährt. Wesentliche Gründe dafür sind, daß bei der Immobilisierung ein Teil der Enzymaktivität verloren geht bzw. die Fixierung nicht stabil genug ist, so daß sich aus ökonomischer Sicht gegenüber dem Einsatz löslicher Pektinasen kein Vorteil bietet.

Im Literatur- und Patentschrifttum sind in jüngster Zeit zahlreiche Angaben über die Immobilisierung von Mikroorganismen zum Zwecke der Enzymgewinnung sowie enzymatischer Stoffwandlungsreaktionen zu finden. So gibt es von Ch. DIVIES (DE-OS 2633976) ein Verfahren zur Durchführung von enzymatischen Reaktionen, bei dem in eine Polymerisatmatrix eingeschlossene Mikroorganismen (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrückii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*) zum Einsatz kommen. Als Anwendungsmöglichkeiten werden die Vergärung von Traubensaft, die Umwandlung von L-Apfelsäure in L-Milchsäure, die Gewinnung von Joghurt aus Milch sowie die Abwasserklärung genannt. Ein Verfahren zur Produktion verschiedener Stoffwechselprodukte (z. B. Essigsäure, Zitronensäure, Aminosäuren, alkoholische Getränke) mit trägerfixierten Mikroorganismen wurde von W. ENGELBART u. a. (DD-PS 198322) entwickelt. In ähnlicher Weise wirken Verfahren von ATKINSON u. a. (DE-OS 2845552) sowie KURANE u. a. (DE-OS 2757826). Angaben über die Anwendung immobilisierter Mikroorganismen zum Zwecke der Apfelsaftklärung sind bisher nicht bekannt.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, durch kurzzeitigen Kontakt mit trägerfixiertem Mycel von *Aspergillus niger* eine Depektinisierung und Klärung von Apfelsaft zu erreichen. Dabei sollen die vorher genannten Nachteile, die bei Anwendung löslicher und fixierter pektinolytischer Enzyme auftreten, beseitigt werden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Das Wesen des Verfahrens besteht darin, daß mit trägerfixiertem Mycel des Stammes *Aspergillus niger* R 1/214 — hinterlegt in der Zentralen Stammsammlung der DDR, dem Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie in Jena, unter ZIMET = 43692 — eine Klärung und Depektinisierung von Apfelsaft erfolgt. Dabei ist von Bedeutung, daß auf einem freischwebenden oder fixierten inerten Träger eine kompakte Biomasse vorliegt. Die Anzucht des immobilisierten Mycels kann in Schüttelkolben, Rührfermentoren sowie in Rohrfermentoren erfolgen, wie sie für die Pektinasegewinnung entwickelt wurden (DD-PS 211 808). Dabei sind folgende wesentliche Parameter einzuhalten:

- Konzentration der Sporen/ml Nährlösung 10^2 bis 10^4
- Verhältnis Nährmedium zu Oberfläche des Trägers 0,5 bis 10 ml Medium je cm^2 Trägerfläche
- Belüftung 1 bis 3 l Luft/l Medium/min
- Kultivierung bei 28 bis 32°C über 5 bis 7 Tage.

Die für den Stoffaustausch notwendige Umwälzung des Mediums sowie die Sauerstoffversorgung werden durch Schütteln bzw. durch Belüftung erreicht. Nach Ablassen des Anzuchtmediums wird Apfelsaft zugegeben, der nach einer Verweilzeit von 30 bis 60 min durch neuen Saft ersetzt wird. Das Mycel kann für mehrere Apfelsaftbehandlungen genutzt werden, bevor neues angezüchtet werden muß.

Erfindungsgemäß ist für die Apfelsaftklärung folgender allgemeiner Verfahrensablauf einzuhalten:

In einem Kulturgefäß werden Sporen des Stammes *Aspergillus niger* R 1/214 unter Verwendung eines für die Pektinasesynthese bei Schimmelpilzen geeigneten Nährmediums in Gegenwart eines Trägers aus hitzebeständigem Material zur Auskeimung gebracht. Unter Belüftung lagern sich die Sporen am Träger an und bilden bei 28 bis 32°C innerhalb von 3 bis 7 Tagen eine kompakte Mycelmasse.

Nach Abtrennung des Nährmediums wird das Mycel im Luftstrom getrocknet und zweimal mit sterilem Wasser gewaschen (30 bis 90 min Kontaktdauer). Das so präparierte trägerfixierte Mycel wird dann zur Klärung und Depektinisierung von Apfelsaft eingesetzt. Zu diesem Zwecke wird mit Rohsaft aufgefüllt und bei einer Belüftung von 60 bis 120 l/h 30 bis 60 min fermentiert. Dieser Vorgang läßt sich mehrmals wiederholen. Das Verfahren wird in nachfolgenden Beispielen näher erläutert.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

50 ml eines für die Pektinasesynthese günstigen Standardmediums (5% Glucose, 0,1% Pektin, 0,75% NH_4NO_3 , 0,75% KH_2PO_4 , 0,03% $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,03% MgSO_4 , 0,03% CaCO_3 , 0,03% NaCl , pH 4,5) und 25 cm^2 eines textilen Trägers werden in 200 ml Kulturfラスchen gegeben und mit einer Sporensuspension (10^3 Sporen/ml Kulturmedium) des Stammes *A. niger* R 1/214 beimpft. Bei Kultivierung auf einem Rotationsschüttler (220 U/min) bei 28 bis 32°C werden am 6. Tag in der Fermentationslösung durchschnittlich 600 PG-E/ml gemessen.

Die Kulturlösung wird vom Mycel abgegossen, zweimal mit 50 ml ster. Wasser versetzt und jeweils 30 min geschüttelt. Nach dem Entfernen des 2. Wäschwassers werden 50 ml frischgepreßter Apfelsaft auf das so vorbereitete Mycel gegeben und 1 h bei 28 bis 32°C auf dem Rotationsschüttler fermentiert. Nach 30 min läßt sich eine 89%ige und nach 60 min eine 91%ige Viskositätsniedrigung messen. Bei Wiederholung des Vorganges mit frischem Apfelsaft beträgt der Viskositätsverlust 80% nach 30 min und 88% nach 60 min.

Beispiel 2

In einem Rohrfermentor, der mit einem Zylinderträger aus nichtrostenden V_2A -Gewebe ausgerüstet ist, werden 2 l Standardmedium (s. o.) mit einer Sporensuspension (10^3 Sporen/ml Kulturmedium) von *A. niger* R 1/214 beimpft und bei 28 bis 32°C mit einer Belüftung von 1 bis 3 l Luft/Medium/min kultiviert. Nach 7 Tagen wird die Fermentationslösung, die durchschnittlich ca. 200 PG-E/ml enthält, abgelassen, das Mycel 8 bis 18 h im Luftstrom (40 bis 100 l/min) getrocknet und zweimal mit sterilem Wasser 1 h gewaschen. Das so behandelte Mycel kann nun zur Depektinisierung von Apfelsaft verwendet werden. Dazu füllt man mit 2 l Apfelsaft auf und fermentiert bei 28 bis 32°C sowie einer Belüftung von 60 bis 120 l/h ca. 60 min. Die erzielte Viskositätsniedrigung beträgt nach 1 h 82%, nach 2 h 86% und nach 3 h 88%.

Beispiel 3

Das zur Apfelsaftklärung benötigte trägerfixierte Mycel wird wie unter Beispiel 2 angezogen. Nach erfolgter Behandlung von 2 l Apfelsaft kann dieser nach 1 h abgelassen und durch frischen Apfelsaft ersetzt werden. Die bei der 2. Charge gemessene Viskositätsniedrigung beträgt 81%. Es können etwa 4 bis 5 Wechsel vorgenommen werden, um noch eine Viskositätsniedrigung von 75% zu erreichen.