

Bedeutung der Bioprozessführung auf die Produktion und das Downstreaming von Polygalacturonasen von *Aspergillus sojae*

Schlussbericht zu Nr. 8.2 NKBF 98

Zuwendungsempfänger: Senzyme GmbH	Förderkennzeichen: 0315475A
Vorhabensbezeichnung: Bedeutung der Bioprozessführung auf die Produktion und das Downstreaming von Polygalacturonasen von <i>Aspergillus sojae</i>	
Laufzeit des Vorhabens: 01.01.2009 - 30.06.2011	Berichtszeitraum: 01.01.2009 - 30.06.2011

1. Einführung

1.1 Aufgabenstellung

Ziel des geförderten Verbundvorhabens war, zwei unterschiedliche Methoden der Kultivierung des Ascomyceten *Aspergillus sojae* (kurz As genannt) - die Submersfermentation (kurz SmF genannt) und die Feststofffermentation (kurz SsF genannt) - hinsichtlich ihrer Produktivität bei der Bildung des Enzyms Polygalacturonase (kurz Pg genannt) und ihrer Wirtschaftlichkeit, auch unter Berücksichtigung der Möglichkeiten des Downstream-Processing, zu vergleichen. Zudem sollten verschiedene Wildstämme und Mutanten auf ihr Enzymbildungspotenzial getestet werden.

Die Senzyme GmbH führte im Rahmen ihres Teilvorhabens Untersuchungen zur Herstellung von Pg durch den Wildstamm ATCC 20235 in der SsF durch. Dies umfasste die Optimierung der Kultivierungsbedingungen und das scale-up bis in den Produktionsmaßstab hinein. Des Weiteren wurden Untersuchungen zur Anwendbarkeit und Effizienz verschiedener Downstream-Verfahren und zu Applikationsaspekten der gewonnenen Enzympräparate im Labormaßstab durchgeführt.

Pg wird als technisches Enzym in zahlreichen industriellen Anwendungen eingesetzt. Diese reichen von der Fruchtsaftklärung und Mazzeration, über den Einsatz in Futtermitteln

bis hin zu Anwendungen in der Papierherstellung und der Textilindustrie (Faserbehandlung).

Der Fokus der Senzyme GmbH hinsichtlich der Verwertung der Ergebnisse liegt auf der Anwendung der Pg zur Verflüssigung pflanzlicher Biomasse, wie sie beispielsweise im Rahmen der Biogasproduktion oder der Silierung vor allem bei Verwendung pektinhaltiger Substrate eine Rolle spielt. Ein weiterer Anwendungsaspekt mit direktem Verwertungspotenzial ist die Bekämpfung pektinhaltiger Schäume.

1.2 Voraussetzungen für die Durchführung des Teilvorhabens

Grundlage für die Durchführung des Teilvorhabens der Senzyme GmbH war und ist die langjährige Erfahrung des Unternehmens auf dem Gebiet der Herstellung hydrolytischer Enzyme mit filamentösen Pilzen in der SsF. Die Senzyme GmbH verfügt in diesem Bereich über verschiedene angemeldete und erteilte Geräte- und Verfahrenspatente.

1.3 Planung und Ablauf des Teilvorhabens

Bei der Durchführung des Teilvorhabens wurde der im Projektantrag vorgelegte inhaltliche und zeitliche Plan weitestgehend eingehalten. Im Verlauf ergab sich aber ein Interesse an der vergleichenden Untersuchung zweier Verfahrensvarianten innerhalb der SsF, einem Oberflächenverfahren einerseits und einem Kultivierungsverfahren unter Verwendung eines dreidimensionalen Festbetts andererseits. Im Rahmen der Arbeiten an der zweiten Verfahrensvariante mit drei-dimensionalem Festbett traten besondere Herausforderungen bezüglich der Sicherstellung einer ausreichenden Aerobisierung auf. Deshalb wurde neben dem bereits vorhandenen Laborbioreaktor ein zweiter (zunächst sehr einfacher) Prototyp eines alternativen Bautyps neu konstruiert. Für die Untersuchung der Fermentation in diesem neuen Prototypen wurde eine kostenneutrale Verlängerung des Teilprojekts um 6 Monate gewährt.

1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Beginn des Teilvorhabens

Die SsF im technischen Maßstab zu Produktionszwecken wird in Deutschland noch kaum angewendet, jedoch ist ein beginnender Trend hin zu einer Etablierung dieser Fermentationstechnik erkennbar. Außer der Senzyme GmbH (seit etwa 2006) nutzen in Deutsch-

land z.B. die Prophyta GmbH und die Tufutown.com GmbH SsF-Verfahren mit Pilzen zur Herstellung biotechnologischer Produkte bzw. Nahrungsmittel. In Frankreich stellt Lyven Enzyme durch SsF mit Pilzen im größeren Maßstab her. Enzyme für den Einsatz in Futtermitteln werden in den vereinigten Staaten durch Alltech in Großanlagen im industriellen Maßstab in SsF produziert. Im Jahre 2007 kaufte mit Novozymes einer der weltgrößten Hersteller von Enzymen das Enzymgeschäft von Biocon. Dort werden die Enzyme in SsF produziert. Diesen jüngeren Entwicklungen in der westlichen Welt steht die SsF als traditionell etabliertes Verfahren zur Herstellung von Wirkstoffen in asiatischen Ländern gegenüber. Ein Grund für dieses Ungleichgewicht ist die Lohnkostenverteilung, welche den wirtschaftlichen Betrieb wenig automatisierter Verfahren in Asien ermöglicht.

Eine wissenschaftliche Durchdringung der SsF vor allem unter ingenieur-technischen Gesichtspunkten findet seit etwa den 70er Jahren in wachsendem Maße statt. Seit dieser Zeit sind verschiedene Bioreaktor-Bauformen und Verfahren zur Prozesskontrolle entwickelt worden (siehe z.B. Pandey et al., 2008). Ziel dieser Entwicklungen war auch, Wege zum scale-up der SsF in den Produktionsmaßstab aufzuzeigen.

As wird, neben weiteren filamentösen Pilzen, häufig bei der Fermentation von Koji verwendet. Zur gezielten Pg-Produktion wurden durch weitere Projektteilnehmer (Tari 2007, 2008, 2009) Kultivierungen in SsF vorgenommen und das Enzym charakterisiert. Hierzu wurden die löslichen Enzyme aus dem Fermentationsgut wässrig extrahiert und mittels Three-Phase-Partitioning (TPP) aufgereinigt.

1.5 Zusammenarbeit mit den Projektpartnern

Im Rahmen des Fördervorhabens stellte die Senzyme GmbH den Projektpartnern Sporen (hergestellt nach einem optimierten Verfahren) für deren Untersuchungen zur Verfügung. Umgekehrt wurde der verwendete Wildstamm ACTT 20235 sowie verschiedene Mutanten der Senzyme GmbH von der Jacobs Universität Bremen GmbH und von Guserbiot S.L.U. zur Verfügung gestellt. Der Jacobs Universität Bremen GmbH stellte die Senzyme GmbH zudem Probenmaterial aus der SsF für deren Untersuchungen zum Downstream-Processing zur Verfügung.

Für die Enzymtests wurde nach entsprechenden Voruntersuchungen durch die Projektpartner einheitlich das Verfahren von Nelson (1944) und Somogyi (1937) angewendet. Dazu wurde ein wässriger Extrakt entweder aus frischem oder getrocknetem Fermentationsgut verwendet.

2. Ergebnisdarstellung

2.1 Optimierung der Kultivierungsparameter der SsF

Für die Untersuchung der optimalen Kultivierungsbedingungen für die Bildung von Pg durch den Stamm ACTT 20235 im Labormaßstab wurden folgende Substrate verwendet: Maisschrot, Maisgrieß, Maiskleber, Rapsextraktionsschrot, Weizen (als ganze Körner oder geschrotet), Reis und Reiskleie. Diese Substrate wurden unter den Gesichtspunkten geringer Kosten, Pektingehalt, möglicher Verwendung im Produktionsmaßstab (physikalische Eigenschaften) sowie auf der Basis bisheriger Erfahrungen ausgewählt. Die optimale Wachstumstemperatur wurde in Vorversuchen bestimmt und betrug 30°C.

Die Versuche zur Kultivierung auf den unterschiedlichen Substraten wurden in 100-mL-Glaskolben in Doppelbestimmung durchgeführt. Tabelle 1 zeigt die jeweils erreichten Aktivitäten. Die Materialfeuchten und die Inkubationsdauern wurden variiert. Die Inkubationsdauer hatte im Bereich 3 und 6 Tage keinen Effekt auf den Enzymgehalt.

Substrat	Inkubationsdauer [d]	[U/g FG]
Zuckerrübenschnitzel	6	14,7
Weizen	5	18,7
Weizen : ZRS 10:1	5	15,8
Weizenkleie	4	24,2
Reis	4	9,5
Reiskleie	4	10,4
Rapsschrot	5	10,5
Maisschrot	3	28,9
Mais : ZRS 10:1	3	18,9
Mais: Raps 3:1	3	25,5
Mais : Raps 1:1	3	9,1
Maiskleber	6	7,3

Tabelle 1: Maximale Ausbeuten an PG unterschiedlicher Screeningversuche

Der höchste Enzymgehalt wurde auf geschrotetem Mais erzielt (29 U/gFM nach 3 Tagen). Die weiteren Optimierungsversuche wurden deshalb mit diesem Substrat durchgeführt.

Gemäß früherer Erfahrungen der Senzyme GmbH war bekannt, dass der Anfangsfeuchtegehalt des Substrats für eine erfolgreiche Kultivierung eine wesentliche Rolle spielt. Deshalb wurde ein ANOVA-Test mit Hilfe der Software Design-Expert auf Signifikanz dieses Parameters durchgeführt (getestet wurden 40% und 60% Materialfeuchte). Außerdem wurden die Parameter Inokulumgröße (1×10^5 und 2×10^8 Sporen pro kg FM), Inkubationsdauer (3 und 6 Tage) und die Anwesenheit von feingeriebenen Orangenschalen als Induktor (plus-minus 10% der TM) in den Test mit einbezogen. Die optimalen Versuchspläne wurde mit Hilfe der Software berechnet.

Abbildung 1 zeigt, dass überraschenderweise nur der Feuchtegehalt zu Beginn der Kultivierung einen signifikanten Einfluss auf die Pg-Aktivität hatte. In weiteren Untersuchungen wurde deshalb der optimale Werte der Anfangsfeuchte für die Kultivierung auf Maischrot bestimmt. Dieser Wert betrug 43,5%. Für die weiteren Parameter wurden soweit möglich die wirtschaftlichsten Varianten gewählt.

Response	1	Aktivität			
ANOVA for selected factorial model					
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]					
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Block	33.62	1	33.62		
Model	18702.30	10	1870.23	7.14	0.0001 significant
A-Feuchte	11395.72	1	11395.72	43.50	< 0.0001
B-Inokulum	696.48	1	696.48	2.66	0.1186
C-Inkubation	279.02	1	279.02	1.07	0.3144
D-Induktor	178.20	1	178.20	0.68	0.4192
AB8.53		1	8.53	0.033	0.8586
AC309.62		1	309.62	1.18	0.2899
AD3419.86		1	3419.86	13.06	0.0017
BC2.57		1	2.57	9.796E-003	0.9221
BD754.68		1	754.68	2.88	0.1051
CD1657.62		1	1657.62	6.33	0.0205
Residual	5239.07	20	261.95		
Cor Total	23974.99	31			

The Model F-value of 7.14 implies the model is significant. There is only a 0.01% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

Abbildung 1: ANOVA des Screenings zur Bestimmung der optimalen Kulturbedingungen, erstellt mit „DesignExpert“

2.2 Scale-up: Oberflächenverfahren

Das scale-up in den Produktionsmaßstab wurde auf der Basis des Prinzips eines Oberflächenverfahrens über verschiedene Stufen geführt. Zunächst wurde das Verfahren aus dem Kolbenmaßstab auf die Fermentation in Glaswannen mit einem Volumen von 3 L übertragen. Die Glaswannen wurden innerhalb von Folienbeuteln kontrolliert feucht belüftet und bei 30°C inkubiert. Mit diesem Verfahren konnten Enzymaktivitäten erreicht werden, die mit den Ergebnissen aus den Kolbenversuchen vergleichbar waren.

Im nächsten Schritt wurde das Kultivierungsprotokoll auf einen Schubladenfermenter im Pilot-Maßstab übertragen. Als Substrat diente wiederum Maisgrieß. Es wurden verschiedene Anfangsfeuchten von 40%, 50% und 60% untersucht. Das beste Wachstum und die höchste Ausbeute an Pg wurde bei 40% Anfangsfeuchte nach einer Fermentationszeit von 4 Tagen erzielt (55 U/g_{TM}).

Kultivierungen im Produktionsmaßstab wurden in einer Fermentationskammer untersucht (siehe Abbildung 2), in welcher Luftfeuchte und Temperatur geregelt werden konnten. Es wurde in ca. 700 kg Frischmasse pro Batch unter den zuvor bestimmten optimalen Bedingungen auf Maisgries kultiviert.



Abbildung 2: Klimakammer

Nach einer Fermentationszeit von 4 Tagen wurde das Fermentationsgut in Kammertrockner verbracht und dort getrocknet. Dazu wurde das optimale Trocknungsprotokoll ermittelt. In Proben des getrockneten Materials wurde nach Extraktion mit Wasser eine Pg-Aktivität von zuletzt 45 U/g FM (bezogen auf das frische Fermentationsgut) bestimmt. Hinsichtlich der Ausbeute, lassen sich die Ergebnisse im Produktionsmaßstab mit denen im Kolbenmaßstab vergleichen. Das scale-up auf Basis des Prinzips der Oberflächenkultivierung ist demnach erfolgreich verlaufen.

2.3 Scale-up: Verfahren mit drei-dimensionalem Festbett

Alternativ zu dem Oberflächenverfahren zur Herstellung von Pg mit As, mit dem sehr gute Resultate erzielt werden konnten, wurde ein weiteres Verfahren zur Herstellung des Enzyms im dreidimensionalen, gerührten Festbett untersucht. Aufgrund der unterschiedlichen Festbettgeometrie sind Wärme- und Stoffaustausch bei beiden Verfahrenstypen grundsätzlich verschieden, so dass ein Transfer des Fermentations-Protokolls nicht möglich ist. Dies zeigten bereits frühere Erfahrungen.

Für die durchgeführten Mischversuche bzw. Test-Fermentationen wurde ein Labor-Feststoffbioreaktor vom Typ eines Vertikalmischers eingesetzt (Modell FUNGTRIX, s. Abbildung 3), der für die geplanten Experimente im Rahmen des Teilprojekts neu konfiguriert und in Betrieb genommen wurde.



Abbildung 3: Labor-Feststoffbioreaktor vom Typ FUNGTRIX

Der Fermentationsbehälter besitzt ein Arbeitsvolumen von max. 6 L und ist mit einer Doppelwand zur Temperierung mit Wasser ausgerüstet. Ferner ist der Behälter mit Anschlüssen für Sensoren (seitlich und im Deckel) sowie für die Zu- und Abführung gasförmiger und flüssiger Medien ausgestattet. Die Agitation erfolgt mit Hilfe einer zentral im Behälter angeordneten Schnecke, wobei das Mischwerkzeug grundsätzlich austauschbar ist. Das Bioreaktorsystem kann voll automatisiert (über ein Prozesskontrollsystem) betrieben werden und erlaubt u.a. die Steuerung oder Regulation von pH, Temperatur, pO_2 und Agitation.

Zunächst wurden Mischversuche mit Maisgrieß und einem Feuchtegehalt von ca. 40% durchgeführt, welche im Oberflächenverfahren die besten Ergebnisse erzielt hatten. Hier-

bei zeigte sich bei kontinuierlicher Rührung und maximaler Umdrehung eine zufriedenstellende Durchmischung (Homogenisierung in ca. 30 min) der Substratmasse. Die Mischbarkeit wurde durch Zugabe einer kleinen Menge Rapsextraktionsschrot als Farbin-dikator verfolgt (siehe Abbildung 4).



Abbildung 4: Mischung aus Maisgries, und Rapsschrot (als Indikator, schwarze Partikel).

Die Mischbarkeit der Substratmasse konnte dadurch noch erheblich verbessert werden, dass zusätzliche Mischelemente an der Schnecke in bestimmter Weise angebracht wurden. So wurden Durchmischungszeiten bei maximaler Umdrehung von wenigen Minuten erreicht.

Mit der bezüglich der Oberflächenkultivierung optimierten Substratmischung und weiteren Substratmischungen und Einzelsubstraten sowie bei unterschiedlichen Feuchtegehalten wurden in der Folge zahlreiche Test-Fermentationen durchgeführt. Dazu wurde zunächst das Substrat in den Fermenterbehälter gegeben (4 kg) und anschließend mit Wasser bis zu dem gewünschten Feuchtegehalt (abzüglich des Inokulums) versetzt. Diese Mischung wurde 15 min homogenisiert, bevor sie mit einer Sporensuspension aus *As* beimpft wurde. Die Fermentationen wurden bei 30°C und einer Belüftungsrate von 3,5 L/min durchgeführt, wobei die zugeführte Luft befeuchtet wurde. Der pH-Wert zu Beginn der Fermentation lag bei Werten zwischen 5,7 und 6,0 und wurde nicht geregelt. Die Fermentationen wurden semi-steril durchgeführt. Für jede Test-Fermentation wurde zudem eine Oberflächenkultivierung unter vergleichbaren Bedingungen zur Kontrolle durchgeführt.

In allen durchgeführten Test-Fermentationen zeigten sich erhebliche Schwierigkeiten hinsichtlich einer Veränderung Konsistenz des Substrats sowie der Sauerstoffversorgung während der Kultivierung. In Ansätzen mit Maisgries sowie Kombinationen mit weiteren

Substraten bildete sich bei kontinuierlicher Rührung nach 2-3 Tagen regelmäßig eine feste Substratmasse, die nicht weiter bewegt werden konnte. In dieser Masse war eine ausreichende Sauerstoffversorgung nicht länger gewährleistet, sodass Kontaminationen mit Hefen und Gärungen auftraten (Absinken des pH-Wertes). Eine geringfügige Verbesserung brachte eine periodische Agitation (Mischung alle 4-8 Stunden für 5 min nach einer Ruhephase von 24 h zu Beginn). Hier zeigte sich nach dem 1. Tag ein Mycelrasen auf der Oberfläche des Festbetts. Nach 5 Tagen Fermentation konnten jedoch nur Ausbeuten in Höhe von max. 4% der Ausbeute der jeweiligen parallelen Oberflächenkultur erzielt werden. Auch traten weiterhin Veränderungen in der Konsistenz und Homogenität des Substrats auf. Beispielsweise wurde Maisgrieß mit der Zeit auch bei nur periodischer Durchmischung zermahlen und setzte sich am Boden des Behälters ab, wo er sich verfestigte. Die Zugabe von strukturreichem Material wie Zuckerrübenpressschnitzeln in verschiedenen Mengenverhältnissen führte über die Zeit zu einer Entmischung.

Aufgrund dieser Schwierigkeiten (Entmischung des Substrates, mangelhafte Aerobisierung und somit geringe erzielte Enzymaktivitäten) wurde ein neuer Prototyp eines dreidimensionalen Festbettreaktors gebaut, welcher diese Nachteile beheben sollte. Der Bioreaktor fasste, bei einer Schichtdicke von 15 cm, 12 L Volumen (dies entspricht etwa 5 kg trockenem Maisschrot).

Da sich ein kontinuierliches Rühren zuvor negativ auf das Pilzwachstum ausgewirkt hatte, wurde auf ein intervallgeschaltetes Rührwerk im Prototypen verzichtet. Das Fermentationsgut wurde stattdessen täglich mechanisch aufgelockert. Durch eine Waschflasche befeuchtete Luft wurde in den geschlossenen Raum unter der Kulturmasse mit leichtem Druck eingeblasen (0,3 bar). Die Luft strömte von dort langsam durch ein Siebblech und verteilte sich im Substrat. Die Erwartung war, dass hierdurch die Bildung von Luftkanälen innerhalb des Fermentationsgutes vermieden oder zumindest vermindert werden konnte.

Aufgrund der veränderten Fermentationstechnik mussten die optimalen Kultivierungsbedingungen neu ermittelt werden. Das Substrat wurde durch die Beimischung von Zuckerrübenschnitzeln oder die Verwendung von Spaltmais statt Maisgrieß luftdurchlässiger gestaltet. Die Ansätze wurde hinsichtlich der Schichtdicke und Anfangsfeuchte sowie der Rührintervalle und -intensität variiert. Eine Temperaturregulierung erfolgte nicht.

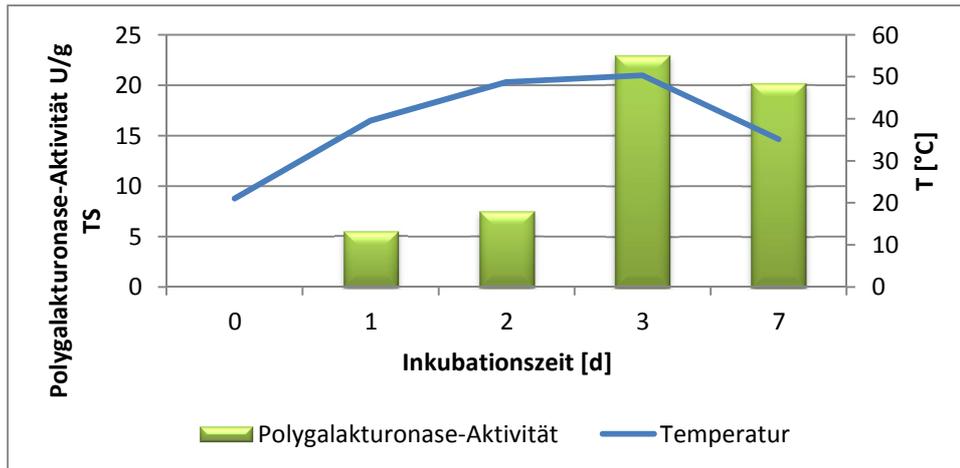


Abbildung 5: Typischer Verlauf der Temperatur und Enzymproduktion im Rührfermenter

Abbildung 5 zeigt ein typisches Beispiel für einen Fermentationsverlauf. Es erfolgte eine stetige Temperaturerhöhung von anfänglich 20°C Raumtemperatur auf 50 °C nach 2 Tagen Inkubation. Dieses Niveau blieb über 24 h erhalten, anschließend sank die Temperatur ab und erreichte nach 7 Tagen wieder ein Niveau von 35 °C. Trotz dieser hohen Temperaturen konnte am 3. Fermentationstag eine maximale Pg-Aktivität von 23 U/g TS gemessen werden. Die höchsten Pg-Aktivitäten konnten mit Maisgries und Zuckerrübenschnitzel im Verhältnis 1:3 sowie einer Startfeuchte von 50% und einer Schichtdicke von 15 cm erreicht werden. Dabei wurde das Substrate alle 24 h aufgelockert und an den letzten beiden Inkubationstagen mit trockener statt feuchter Luft durchströmt. Die maximal gemessene Pg-Aktivität betrug bei dieser Fermentationsweise 26 U/g TM. Dies entspricht etwa 50% der Enzymaktivität nach Fermentation im Oberflächenverfahren.

2.4 Untersuchung von Mutanten

Die Produktionsleistung könnte durch die Verwendung von Mutanten weiter gesteigt werden. Neben den Projektpartnern, stellte auch die Senzyme GmbH Mutanten von *As* her. Dazu wurden Sporen von *As* auf PDA-Agar-Platten 3-30 min mit UV-Licht (270 nm) bestrahlt und die LD 95 auf 25 Minuten bestimmt. Anschließend wurden die Sporen auf Platten, die nur Pektin als C-Quelle enthielten, ausplattiert, 25 min lang mit UV-Licht bestrahlt und anschließend bei 30°C inkubiert. Die Kolonien, die das beste Wachstum zeigten, wurden mit einem Korkbohrer ausgestochen, auf Maisschrot kultiviert und nach 3 Tagen auf ihre Pg-Aktivität hin überprüft (siehe Tabelle 2).

Stamm	U/g FG
Wildtyp	38,9
Mut 1	47,5
Mut 3	28,9
Mut 6	3,3
Mut 8	37,3
Mut 11	26,0
Mut 12	2,0
Mut 1.6	21,5
Mut 1.7	19,1
Mut 1.8	19,3

Tabelle 2: Polygalacturonaseaktivität der hergestellten *A. sojae*-Mutanten auf Maisschrot

Die Pg-Aktivitäten der Mutanten lagen teilweise über denen des Wildtyps (Mutante 1). Sie zeigten jedoch keine so deutliche Verbesserung, dass dies die Auswahl einer Mutante als künftigen Produktionsstamm rechtfertigen würde.

Vom Kooperationspartner Jacobs Universität Bremen wurden weitere Mutanten zur Untersuchung der Pg-Aktivität zur Verfügung gestellt. Diese Mutanten wurden ebenfalls auf Maisschrot, unter den für den Wildtyp optimierten Bedingungen kultiviert, zeigten unter diesen Bedingungen jedoch nur sehr geringe Pg-Aktivitäten (unter 30 U/g FG) und ein schwaches Wachstum.

Im späteren Verlauf des Projektes wurden zwei weitere Mutanten (*Mut 56* von der Jacobs Universität Bremen und *Mut 7_41* von Guserbiot S.L.U.). Auch diese wurden hinsichtlich der Enzymausbeute bei der Kultivierung im Oberflächenverfahren mit dem Wildtyp verglichen.

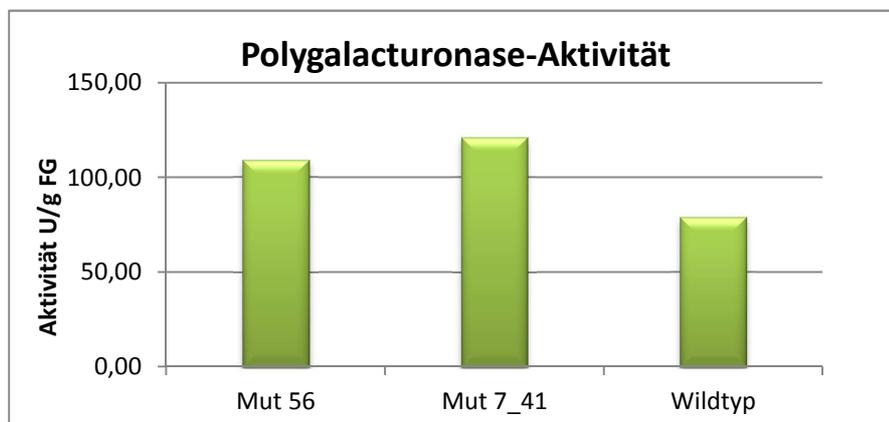


Abbildung 6: Vergleich des Wildtyps mit zwei Mutanten bzgl. der Bildung von PG in Oberflächenkultur.

Hierzu wurden der Wildtyp und die beiden Mutanten 5 Tage lang bei 30°C auf einer Mischung aus Mais und Zuckerrüben sowie auf anderen Substraten kultiviert. Aus dem Fermentationsgut wurde jeweils ein Extrakt hergestellt und die Aktivität der Pg im Extrakt bestimmt. Beide Mutanten zeigten eine signifikant bessere Pg-Ausbeute als der Wildtyp. Bei Verwendung des optimierten Protokolls betragen die Aktivitätssteigerungen 39% (*Mut 56*) bzw. 54% (*Mut 7_41*) (siehe Abbildung 6).

2.5 Optimierung der Extraktion

Zur Verbesserung der Pg-Ausbeute nach Extraktion aus Oberflächenkulturen von *As* wurden Extraktionen bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 30 min (die hinreichende Extraktionsdauer wurde zuvor ermittelt) in unterschiedlichen Medien bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Tabelle 3 zeigt die Resultate.

Puffer	pH	% A.demin pH 7
A. demin	5	93
Citratpuffer	5	103
Phosphat-Citratpuffer	5	116
Essigsäure/Acetatpuffer	5	99
A. demin	6	104
Sørensen Phosphatpuffer	6	111
Citratpuffer	6	90
Phosphat-Citratpuffer	6	113
A. demin	7	100
Sørensen Phosphatpuffer	7	107
Citratpuffer	7	105
Phosphat-Citratpuffer	7	122

Tabelle 3: Relative PG-Aktivität bei Extraktion in verschiedenen Puffern (s. Text)

Die besten Ergebnisse zeigten die beiden Phosphat enthaltenden Puffer. Mit dem Phosphat-Citrat-Puffer konnte bei pH 7 eine Verbesserung der Ausbeute um 22% gegenüber der Referenz mit *A. demin* erzielt werden.

Durch den ersten Extraktionsschritt werden ca. 80% der aus den festen Bestandteilen eluierbaren Enzymaktivität wiedergewonnen. Die anschließende Abtrennung der Feststoffe und Wiederholung der Extraktion unter sonst gleichen Bedingungen liefert eine Ausbeute von weiteren 10-12%. Diese Größenordnungen gelten für alle getesteten Extraktionsmedien in gleichem Maße.

2.6 Ultrafiltration

Um eine Sprühtrocknung (siehe den folgenden Abschnitt) im industriellen Maßstab wirtschaftlich durchführen zu können, muss der Enzymgehalt des Extraktes bereits möglichst hoch sein. Ein bekanntes Konzentrationsverfahren ist der Entzug von Wasser aus dem Extrakt durch Ultrafiltration. Dabei wird der Extrakt im Kreislauf durch eine Keramikmembran mit gewünschter Porengröße gepresst. Für die Versuche wurde eine Labor-Ultrafiltrationsanlage der A3 GmbH eingesetzt (siehe Abbildung 7).



Abbildung 7: Ultrafiltrationsanlage mit einem Fassungsvermögen von 30 Litern

Zur Entwässerung wurde für die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen eine Membran mit 20 kDa Porengröße verwendet. Über der Säule bestand eine Druckdifferenz von 0,5 bar (4,5 gegenüber 5 bar). Mit dem verwendeten As-Extrakt konnten Durchflussraten von bis zu 140 mL/min realisiert werden. Im abgeführten Filtrat war keine Polygalakturonaseaktivität nachweisbar. Somit konnte erwartet werden, dass sich das Enzym im Retentat bei fortlaufender Filtration akkumuliert.

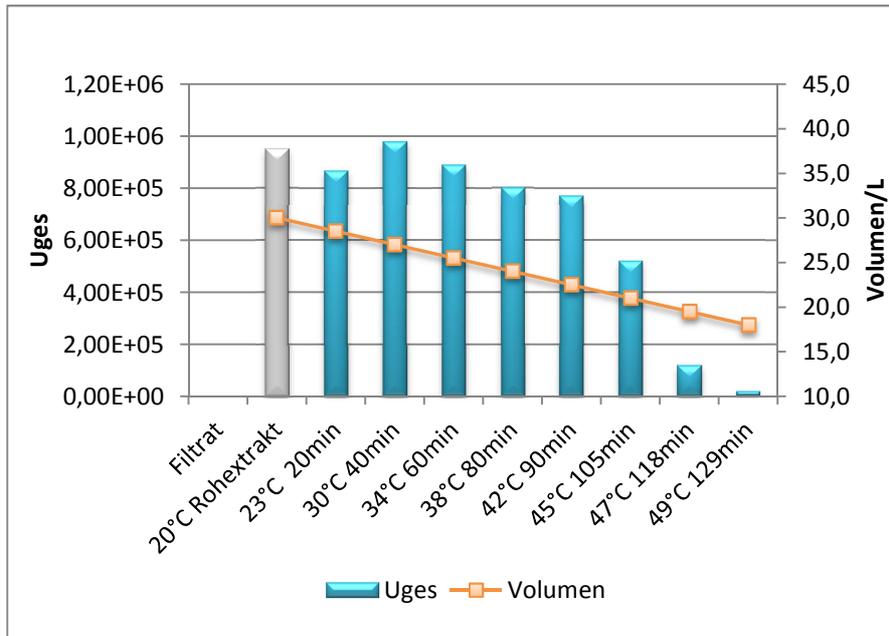


Abbildung 8: Filtrationsverlauf ungekühlt

Während der Versuche mussten Maßnahmen zur hinreichenden Kühlung des Extraktes vorgenommen werden, da sich zeigte, dass die vornehmlich durch die Pumpe entstehende Erwärmung bis auf Temperaturen von 50°C zu einer Inaktivierung der Enzyme führte (siehe die Abbildungen 8 und 9). Um dieser entgegenzuwirken, wurde der Voratsbehälter von außen im Gegenstromprinzip mit kaltem Leitungswasser gekühlt.

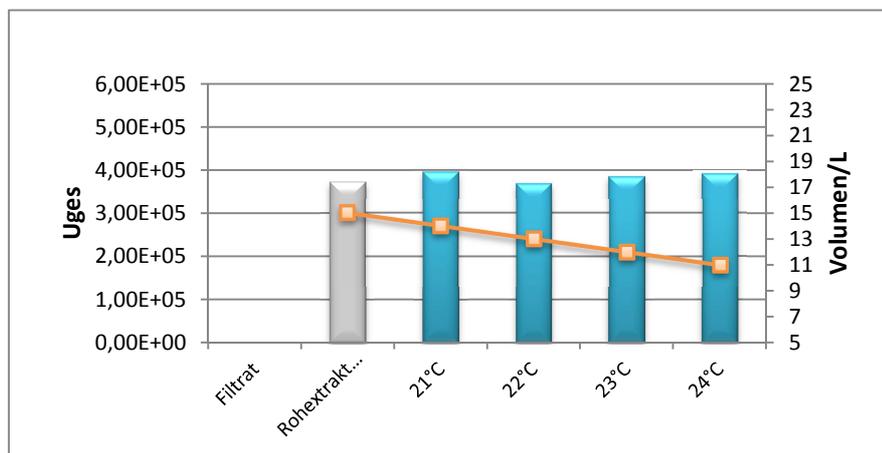


Abbildung 9: Entwässerung des Enzymextraktes unter Kühlung

Ein weiteres Problem stellte die Schaumbildung durch den druckvollen Rückfluss in den Tankbehälter dar. Dies führte mehrfach zu einer Unterbrechung des Filtratflusses.

Mit Hilfe der Ultrafiltration konnte der TS-Gehalt des Extraktes in diesen ersten Versuchen dennoch um 100% gesteigert werden (von 5 % TS auf 10 % TS).

Zur Verbesserung der Entwässerung wurde der Enzymrohextrakt im Folgenden mit einer Membran höherer Porengröße vorfiltriert, um so einen Großteil der enthaltenen Schwebstoffe zu entfernen. Hierzu wurden Säulen von 400 und 800 nm verwendet. Die Enzyme wurden zunächst als getrocknete Feinfraktion ($<125\ \mu\text{m}$) einer Enzymmischung in Wasser/Glycerin (zur Stabilisierung) suspendiert. Der Glyceringehalt betrug anfänglich 60 bzw. 45% (w/v), im Verlauf der Versuche wurde dieser jedoch aus Kostengründen auf 10% (w/v) herabgesetzt. Um die Schaumbildung zu unterbinden fand ein Antischaummittel Verwendung. Ein aufgewickelter Silikonschlauch wurde als Wasserkühlung eingesetzt, um den Vorratsbehälter von innen zu temperieren. Diese Kühlung war sehr erfolgreich, im Laufe einer dreistündigen Filtration stieg die Temperatur um nur $11\ ^\circ\text{C}$ von 20 auf $31\ ^\circ\text{C}$.

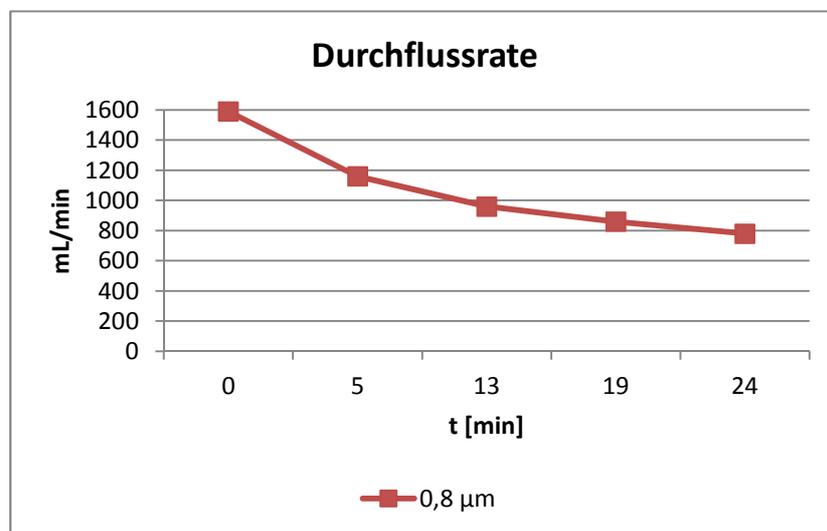


Abbildung 10: Durchflussrate in Abhängigkeit von der Zeit mit 800-nm-Membran

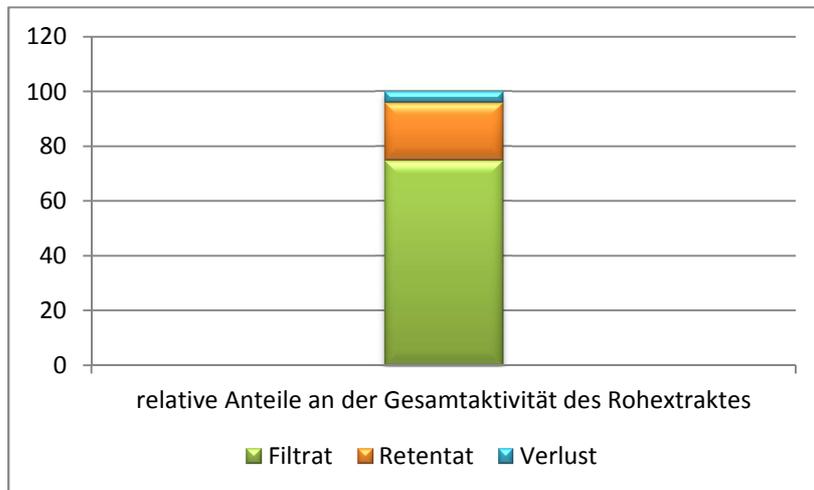


Abbildung 11: Bilanz der Filtration mit 800-nm-Membran

Die Abbildung 10 zeigt die Veränderung der Durchflussrate während der Filtration; diese sinkt kontinuierlich. Dies könnte durch eine gepulste Rückführung des Filtrates verhindert werden. Die Versuchsanlage war jedoch nicht entsprechend ausgerüstet. Die Bilanzierung der Enzymaktivität (siehe Abbildung 11) zeigte einen geringen Verlust an Pg von 6%. Weitere 17% verblieben im Retentat, die Wiederfindung könnte durch nachfolgende Waschschrirte des Retentats verbessert werden.

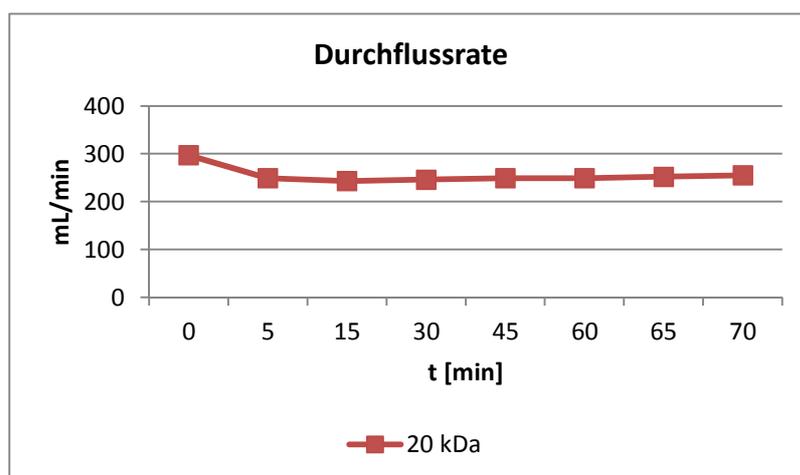


Abbildung 12: Durchflussrate in Abhängigkeit von der Zeit mit 20 kDa-Membran

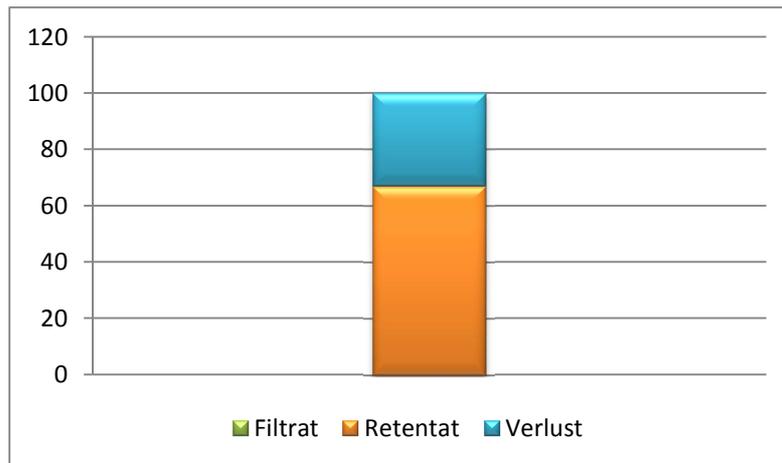


Abbildung 13: Bilanz der Filtration mit 20 kDa-Membran

Das hieraus aufgefangene Filtrat, welches die Enzyme enthält, wurde in einem zweiten Schritt über die 20kDa-Membran entwässert. Die Durchflussrate blieb während der Entwässerung über eine Stunde konstant, eine weitere Einengung des Extraktes war jedoch technisch nicht möglich (siehe Abbildung 12). Der Verlust war in diesem zweiten Filtrationsschritt wesentlich größer und lag bei 32%, somit ergab sich ein Gesamtverlust von 38% während der Filtration (siehe Abbildung 12). Es ergaben sich Hinweise darauf, dass die immer wieder auftretende Schaumbildung zur Denaturierung des Enzyms beiträgt. Vermutlich könnte durch eine Entschäumung die Wiederfindung gesteigert werden.

2.7 Sprühtrocknung

Das Verfahren der Sprühtrocknung bietet die Möglichkeit der Konzentrierung und Haltbarmachung von Enzymen. Ziel der Untersuchungen war hier zu prüfen, ob die PG für die Anwendung dieses Verfahrens generell in Frage kommt und ggfs. optimale Parametereinstellungen der Sprühtrocknung zu identifizieren. Damit verbunden war die Frage einer Voranreicherung im Extrakt. Hierzu wurde das Verfahren der Ultrafiltration angewendet (siehe oben).

Der Versuchsaufbau umfasste einen Labor-Sprühtrockner der Firma BÜCHI GmbH (Modell B-290, siehe Abbildung 14). Die Enzyme wurden aus dem Fermentat wässrig extrahiert und anschließend unter Variation diverser Parameter getrocknet. Hierzu zählten u.a. die

Trocknungstemperatur, die Pumpleistung des Gerätes, der pH-Wert des Extraktes sowie die Zugabe stabilisierender Additive.



Abbildung 14: Sprühtrocknungsanlage von Büchi

Zur weiteren Optimierung wurde der Extraktionsprozess mit unterschiedlichen Mengen an Fermentat durchgeführt. Es wurde 1h bei Raumtemperatur gerührt und der Extrakt anschließend abgepresst.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt und zeigen, dass es möglich ist, das Verhältnis zwischen Fermentat und Extraktionspuffer ohne nennenswerte Aktivitätseinbußen wesentlich zu verringern. Auch mehrere aufeinander folgende Extraktionen waren in dieser Hinsicht erfolgreich (4x10 g/100 mL, 5x10 g/100 mL). Je weniger Extraktionslösung eingesetzt werden muss, umso ökonomischer ist die Sprühtrocknung. Für die nachfolgenden Versuche wurden daher jeweils Fermentat und Lösungsmittel im Verhältnis 0,4:1 eingewogen.

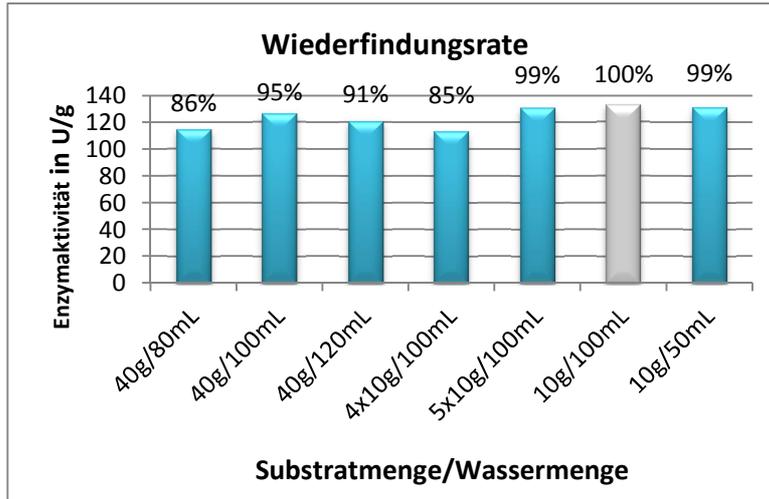


Abbildung 15: Prozentuale Ausbeute der verschiedenen Extraktionsansätze

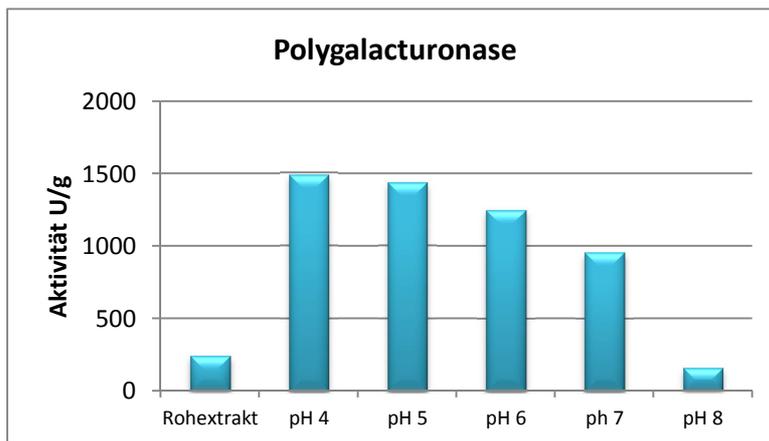


Abbildung 16: Sprühtrocknung bei unterschiedlichen pH-Werten

Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der Sprühtrocknung von Extrakten bei unterschiedlichen pH-Werten. Dabei wurden die höchsten Ausbeuten bei pH-Werten erzielt, die im Bereich des pH-Optimums des Enzyms (pH 4-5) liegen. Bei pH 7 sank die Ausbeute gegenüber dem Optimum bereits um 35 %, bei pH 8 waren nur noch 12 % der maximalen Aktivität nachweisbar.

Als weitere, den Trocknungsprozess beeinflussende Variable wurde die Pumpleistung untersucht. Eine höhere Pumpleistung ermöglicht eine zusätzliche Verringerung der Ausgangstemperatur. Dadurch verläuft die Trocknung schonender (wichtig z.B. bei thermosensitiven Produkten wie Enzymen). Zudem wird der Trocknungsprozess beschleunigt.

Wird die Pumpleistung jedoch zu hoch eingestellt, kann hieraus ein nicht ausreichend getrocknetes Produkt resultieren.

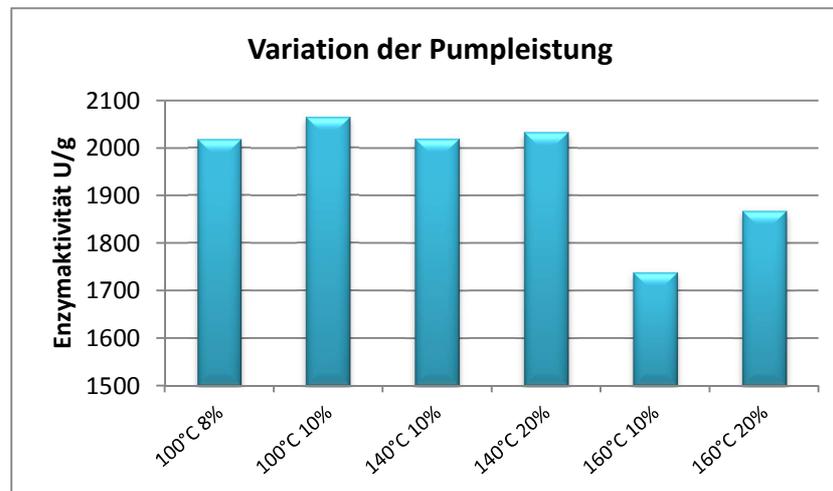


Abbildung 17: Sprühtrocknung bei unterschiedlichen Pumpleistungen und Temperaturen

Die Ergebnisse in Abbildung 17 zeigen, dass eine höhere Pumpleistung bei den ausgewählten Temperaturen generell vorteilhaft war. Bei einer Temperatur von 100 °C war eine höhere Pumpleistung als 10 % nicht möglich, die Probe wurde nicht ausreichend trocken. Die Trocknung der Extrakte wurde im Folgenden bei 140 °C und 20 % Pumpleistung vorgenommen, da sich hierbei sowohl die Ausbeute als auch der Extraktdurchsatz in einem zufriedenstellenden Rahmen bewegten.

Weitere Versuche betrafen eine weitere Optimierung der Eigenschaften des Extraktes hinsichtlich des Sprühtrocknungsprozesses. Beispielsweise wurden verschiedene Abreinigungsmöglichkeiten für die im Rohextrakt enthaltenen Schwebstoffe untersucht. Die folgende Abbildung 18 zeigt, dass ein einfacher Zentrifugationsschritt bisher die beste Ausbeute lieferte.

Zur Untersuchung von Möglichkeiten der Stabilisierung der Pg gegenüber der Belastung durch die Sprühtrocknung wurden unterschiedliche Additive dem Rohextrakt zugemischt. Hierzu zählten u.a. PEG, Stärke, Polygalakturonsäure und Milchpulver. Letzteres zeigte einen geeigneten Stabilisierungseffekt (siehe die Abbildungen 19 und 20).

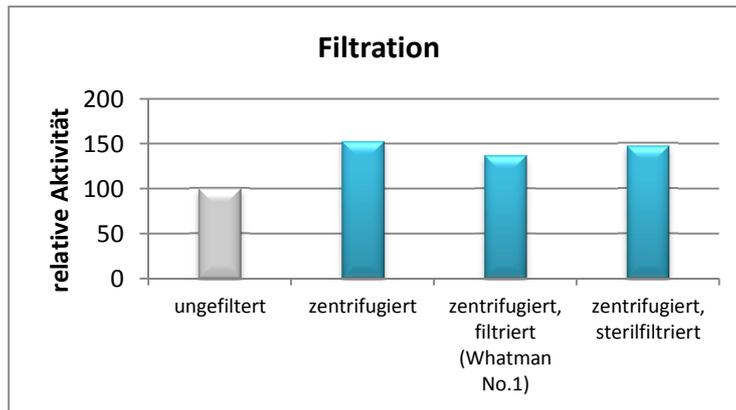


Abbildung 18: Filtration und Sprühtrocknung

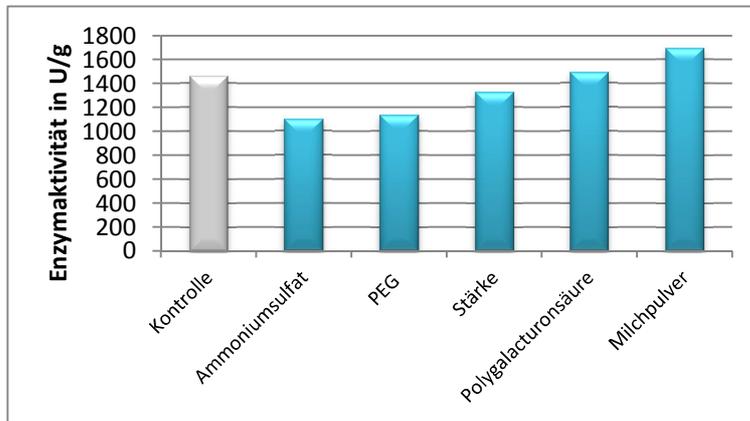


Abbildung 19: Sprühtrocknung unter Zugabe von Additiven

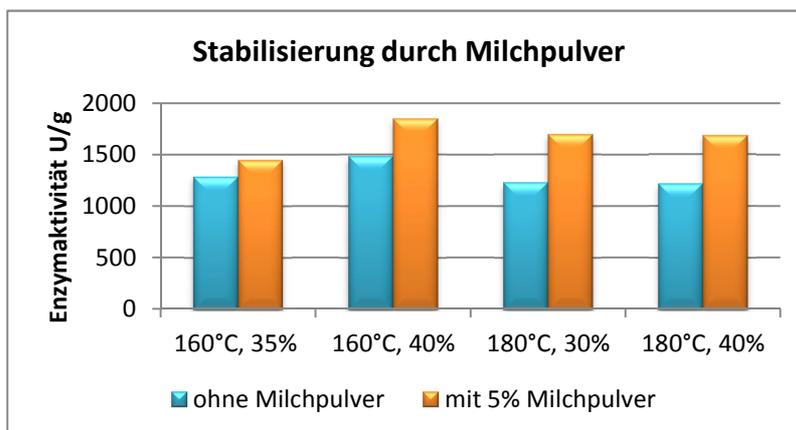


Abbildung 20: Sprühtrocknung mit Milchpulverzugabe

Die erreichte Wiederfindungsrate der Pg im sprühgetrockneten Produkt betrug ca. 70%.

2.8 Flockung

Mit den zerriebenen Samen des Baumes *Moringa oleifera* kann aus verschmutztem Wasser Trinkwasser hergestellt werden, da in den Samen enthaltene Stoffe die Koagulation von Schwebteilchen fördern. Auch für die Klärung von Fruchtsäften, Honig, etc. wird das Pulver verwendet.

In diesem Versuch sollte festgestellt werden, ob das Pulver auch in Enzymextrakten die Ausflockung grober Bestandteile fördert, um einen reineren Enzymextrakt zu erhalten. Dazu wurde ein Enzymextrakt aus As-Fermentat (20 g FM in 100 mL) hergestellt und mit verschiedenen Mengen (10-500 mg/100mL) Moringasamenpulver versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 60 min wurde der Extrakt zentrifugiert und die Optische Dichte bei 610 nm bestimmt. Weiterhin wurde der TS-Gehalt gemessen, sowie die Aktivität der Pg gemessen. Die Enzymextrakte zeigten nach der Inkubationszeit keine Veränderung der Optischen Dichte. Die TS-Gehalte nach Sedimentation unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant vom Rohextrakt, es wurde also durch die Flockung mit Moringa-Samen keine Reinigung des Extraktes erzielt. Die Messung der Pg-Aktivität ergab, bezogen auf den TS-Gehalt der Extrakte, ebenfalls keine signifikanten Veränderungen.

2.9 Reversible Adsorption an Zeolithe

Zeolithe sind natürlich vorkommende oder synthetisch hergestellte Alumosilikate. Diese verfügen über eine sogenannte mikroporöse Grundstruktur, in deren Poren sich natürlicherweise Wasser befindet. Durch die anionische Gerüstladung der Zeolithe sind an der äußeren und inneren Oberfläche Kationen assoziiert, diese liegen häufig in gelöster Form im Kanalsystem der Zeolithe vor und sind somit relativ leicht zugänglich und damit austauschbar. Dieser Eigenschaft der Zeolithe liegt ihrer Anwendung als Ionenaustauscher zugrunde.

Der im folgenden beschriebene Versuch sollte zeigen, ob die Pg aus einem Enzymextrakt an Zeolithe binden kann und so von den anderen löslichen Bestandteilen des Extraktes abtrennbar ist. Anschließend sollte untersucht werden, ob das Enzym vom Zeolith zu eluieren ist und so eine aufgereinigte Enzymlösung erstellt werden kann.

Ein Enzymextrakt wurde auf fünf verschiedene Zeolithe aufgetragen, mit Acetatpuffern unterschiedlicher pH-Werte und verschiedenen NaCl-Konzentrationen sowie PEG-6000-Zusatz eluiert. Die Enzymaktivität des Eluates wurde bestimmt, um zu ermitteln, ob die Enzyme wieder freigesetzt wurden. Weiterhin wurde getestet, ob an Zeolith gebundene Enzyme Aktivität zeigen und ob Polygalakturonsäure bei verschiedenen pH-Werten als Elutionsmittel fungieren kann.

Eingesetzte Zeolithe waren:

Klinophiolith

Zeolith CLP 85+

ZA Sorb

Schaumatox

Doucil 4A

Die getesteten Zeolithe adsorbierten einen Großteil der Pg. Nach Behandlung mit Schaumatox hatte der Enzymextrakt noch 35% der Aktivität, mit dem Zeolith CLP 85 noch 27%, mit ZA Sorb noch 26%, mit Doucil 4A noch 6% und mit Klinophiolith weniger als 1%. In keinem Fall konnte jedoch mit einem folgenden Elutionsschritt PG vom Zeolith wieder gelöst werden. Weder 0,5M Acetatpuffer mit pH-Werten von 5-7 noch die Zugabe von 2,5 M NaCl oder 2,5% PEG führten zu einer erfolgreichen Elution. Dies galt auch für Polygalakturonsäure. Ein Enzymtest mit an Zeolith gebundener Pg zeigte, dass diese durch die ionische Bindung inaktiviert wurde.

Somit waren die verwendeten Zeolithe für eine reversible Adsorption der Pg zum Zwecke der Aufreinigung nicht geeignet.

2.10 Reinigung mittels Ionenaustauscher

Zur Aufreinigung der Pg mittels Ionenaustauscher wurde Rohextrakt mit Hilfe einer 50-kDa-Vivaspin-Membran vorgereinigt und anschließend auf eine Anionenaustauschersäule (Chromabond SPE-SA von Macherey-Nagel). aufgetragen. Zunächst wurde untersucht, welche Puffer geeignet sind, um die Pg an die Säule zu binden.

Tabelle 4 zeigt, dass alle verwendeten Puffer zur Bindung des Enzyms an die Säulenmatrix grundsätzlich geeignet sind. Da aber unter Verwendung von Imidiazol mit einem pH von 5,5 die effektivste Bindung zu beobachten war, wurde dieser Puffer ausgewählt. Zur Elution des Enzyms wurde zunächst ein NaCl-Gradient mit einem Spektrum von 50-1000 mM NaCl untersucht. Dieses Verfahren erwies sich jedoch nicht als geeignet, um die Pg von der Säule zu eluieren. Anschließend wurde daher versucht, die Pg mit Hilfe von Polygalacturonsäure von der Säulenmatrix zu trennen.

Run	PG- Aktivität in U/g FG
Imidazol pH 7,0	251,85
Eluat	0,74
1x Waschen	25,56
Imidazol pH 6,5	336,30
Eluat	0,00
1x Waschen	34,07
Histidin pH 5,5	325,56
Eluat	0,00
1x Waschen	3,70
Methylpiperazin pH 4,5	215,19
Eluat	0,00
1x Waschen	6,30

Tabelle 4: Bindung von Pg an Ionenaustauschersäule

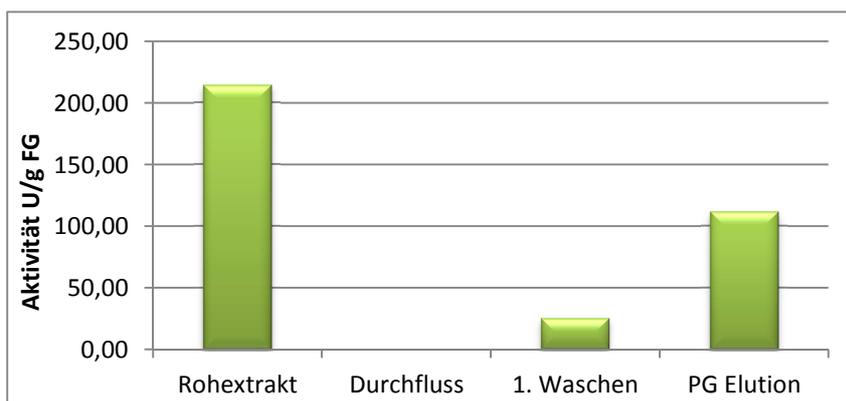


Abbildung 21: Elution von PG von Ionenaustauschersäule

Hieraus ergab sich eine gute Wiederfindungsrate in Höhe von 52% (siehe Abbildung 21).

2.11 Klärung von Fruchtsaft

Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit der praktischen Anwendung der Pg und sollten die Wirksamkeit des sprühgetrockneten Enzympräparats nachweisen. Hierzu wurden Proben naturtrüben Apfelsaftes mit unterschiedlichen Konzentrationen einer wässrigen Lösung zuvor sprühgetrockneter Pg versetzt und über mehrere Stunden bei 30 °C inkubiert und die optische Dichte bei 610 nm photometrisch bestimmt.

Die folgende Abbildung 22 zeigt die deutliche Abnahme der Trübung bei 610 nm bei den mit Enzymextrakt versetzten Proben. Die Kontrolle ohne Enzymzusatz blieb hingegen konstant bei einer OD_{610} um 1,65.

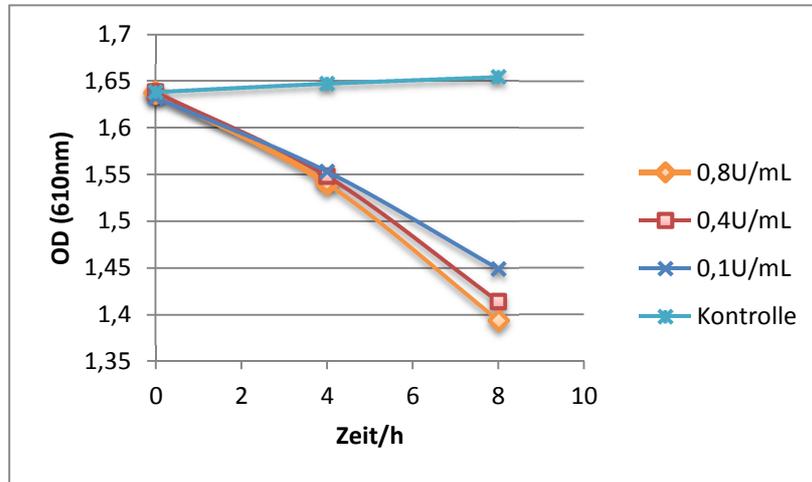


Abbildung 22: Zeitliche Entwicklung OD von Apfelsaft mit Pg

2.12 Verzuckerung von Biomasse

Desweiteren wurde die Verzuckerungsleistung von Biomasse durch das sprühgetrocknete Präparat und den nativen Extrakt überprüft. Hierzu wurde als Substrat Maissilage eingesetzt. Die verwendeten Enzymextrakte wurden so angesetzt, dass die Pg-Aktivitäten in U/g identisch waren.

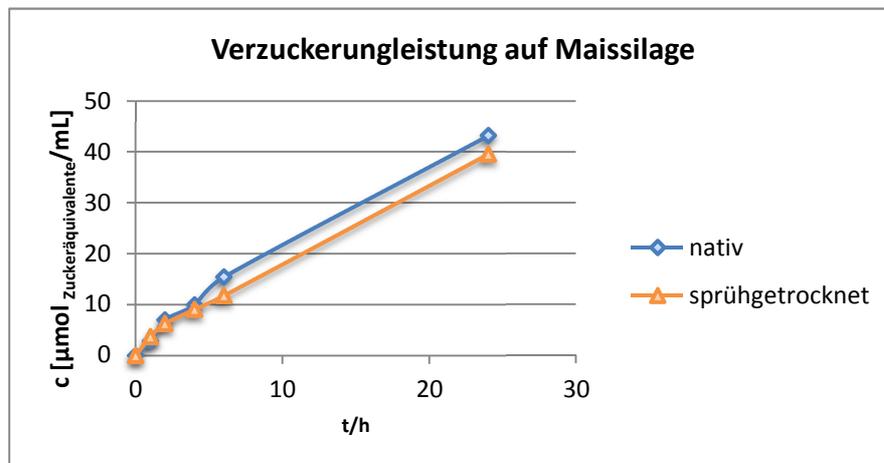


Abbildung 23: Verzuckerungsleistung an Maissilage

Wie Abbildung 23 zeigt, besitzt das sprühgetrocknete Enzymprodukt eine gleichwertige Verzuckerungsleistung wie das native. Somit wurde gezeigt, dass die Sprühtrocknung es ermöglicht, die Pg aus As in wasserlöslicher und aktiver Form zu konservieren.

Zusammenfassung

Die Bilanzierung der untersuchten Downstream-Verfahren ist in einem Fließdiagramm unten dargestellt. Angegeben ist die spezifische Aktivität pro g TS sowie der Verlust der Aktivität, bedingt durch die einzelnen Verfahrensschritte. Diese lassen sich zukünftig weiter optimieren, sodass die Abnahme der Enzymaktivität vermindert werden kann.

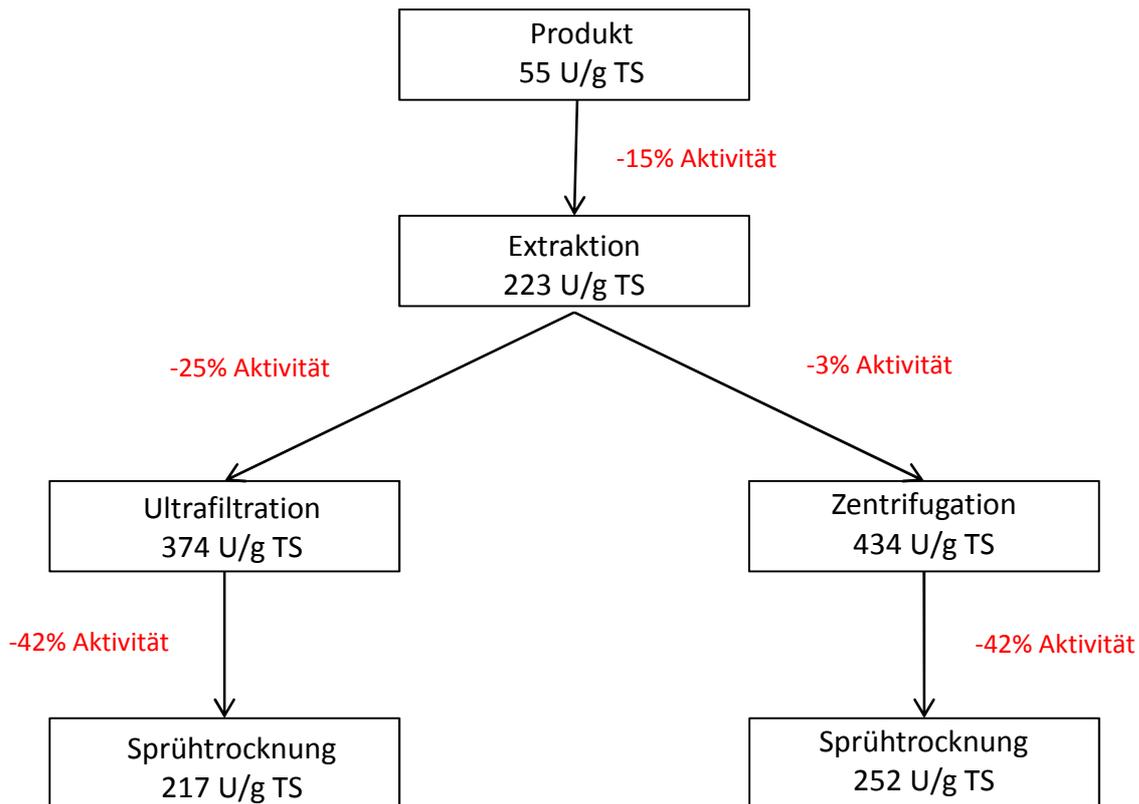


Abbildung 24: Bilanzierung des Downstreaming

Vergleicht man die Produktion an Pg aus der der SsF mit der Tagesproduktion aus der SmF (gem. den Arbeiten des Projektpartners), dann liefert die SsF eine etwa 2,5-fach höhere spezifische Aktivität:

- Tagesproduktion in der Klimakammer (SSF):
 - 17 kU/kg*d
 - 25kg pro m³
 - 50 U/g FG
 - Fermentationsdauer 3 Tage
- Tagesproduktion im Submersfermenter :
 - 5 kU/L*d
 - 1000L pro m³
 - 20 U/mL (nach Tari, C. *et al* (2008))
 - Fermentationsdauer 4 Tage

Nakkeeran et al. (2012) führten einen Vergleich zwischen der Herstellung von PG durch *Aspergillus carbonarius* in SmF und SsF durch. Dabei kamen sie zu dem Ergebnis, dass eine Kombination aus SmF mit einem Membranreinigungsverfahren ökonomisch besonders vorteilhaft ist. Rodriguez-Fernandez et al. (2011) untersuchten die Produktion von PG durch *Aspergillus niger* in SsF und optimierten die Belüftung in einem Laborbioreaktorsystem. Unter optimalen Bedingungen wurden 265 U/g PG erhalten. Die Bildung einer thermostabilen Pg durch *Aspergillus niveus* wurde von Maller et al. (2011) untersucht. Als Substrat dienten dabei Reststoffe aus der Agrarindustrie und als Induktor Citruschalen. Die Autoren verglichen die Kultivierung in SmF und SsF miteinander. Höhere PG-Aktivitäten wurden in der SsF erzielt.

Literatur

Maller, A., Damasio, A.R., da Silva, T.M., Jorge, J.A., Terenzi, H.F. and M.deL. Polizili (2011): Enzyme Res. 289206. Epub 2011 Jun 20.

Nakkeeran E., Gowthaman, M.K., Umesh-Kumar, S. and R. Subramanian (2012): J. Biosci. Bioeng. Jan 24. Epub ahead of print.

Nelson, N. (1944): J. Biol. Chem. 153, 375 ff.

Rodriguez-Fernandez, D.E., Rodriguez-Leon, J.A., de Carvalho, J.C., Sturm, W. and C.R. Soccol (2011): Bioresour. Technol. 102. 10657-10662.

Somogyi, M. (1937): J. Biol. Chem. 117, 117 ff.

Tari, C. (2007): Journal of Biotechnology, 127: 322-334

Tari, C. (2008): Biochemical Engineering Journal, 39: 43-50.

Tari, C. (2011): Food and Bioproducts Processing, DOI: 10.1016/j.fbp2011.08.003

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN -	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel Bedeutung der Prozessführung auf die Produktion und das Downstreaming von Polygalacturonasen von <i>Aspergillus sojae</i>	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Dr. Jürgen Lenz	5. Abschlussdatum des Vorhabens 30.06.2011
	6. Veröffentlichungsdatum März 2012
	7. Form der Publikation -
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Senzyme GmbH Mülheimer Straße 26 D-53840 Troisdorf	9. Ber. Nr. Durchführende Institution -
	10. Förderkennzeichen 0315475A
	11. Seitenzahl 32
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 8
	14. Tabellen 4
	15. Abbildungen 29
16. Zusätzliche Angaben -	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) -	
18. Kurzfassung Die im Rahmen des Teilprojekts durch die Bioreact GmbH durchgeführten Untersuchungen umfassten zahlreiche Aspekte. Im Rahmen der Entwicklung eines Herstellverfahrens für Pg auf Basis der SsF wurden neben einem Substratscreening die Kultivierungsparameter einschließlich der Fermentationsdauer optimiert (u.a. unter Verwendung von ANOVA). Das optimierte Protokoll zur Herstellung von Pg wurde dann über verschiedene Stufen bis in den Produktionsmaßstab hinein vergrößert. In einem entsprechenden Oberflächenverfahren konnten spezifische Aktivitäten an Pg in Höhe von 45 U pro g Trockenmasse. Für die Konservierung in Konvektionstrocknern im Produktionsmaßstab wurde ein geeignetes Trocknungsprotokoll entwickelt. Neben dem Oberflächenverfahren wurden Untersuchungen zur Herstellung von Pg in einem Verfahren mit dreidimensionalem Festbett im Labormaßstab durchgeführt. Hier konnte mit einem neugestalteten, vereinfachten Prototyp eine Pg-Ausbeute von 26 U pro g Trockenmasse erzielt werden. Ein scale-up dieses Verfahrens konnte im Rahmen des Projekts aber nicht mehr durchgeführt werden. Die Untersuchung von Mutanten der Projektpartner brachte für zwei Mutangen eine signifikante Ausbeutesteigerung von 40-50%. Bezüglich des Downstreaming wurden Untersuchungen zur Extraktion, Zentrifugation, Ultrafiltration, Sprühtrocknung, Flockung, Absorption an Zeolithe, Reinigung mittels Ionenaustauscher durchgeführt. Durch eine Hintereinander-Schaltung von Extraktion, Zentrifugation und Sprühtrocknung ließe sich nach derzeitigem Stand ein Aufreinigung der spezifischen Aktivität um den Faktor 4,6 erzielen, durch Hintereinander-Schaltung von Extraktion, Ultrazentrifugation und Sprühtrocknung um den Faktor 4,0. Bezüglich der erzielten spezifischen Aktivität nach Produktion zeigte die SsF eine um den Faktor 2,5 höhere Leistung. Anwendungsseitig wurden erste erfolgreiche Orientierungsversuche zur Fruchtsaftklärung und Saccharifikation von Maissilage.	
19. Schlagwörter Polygalacturonase, Feststofffermentation, Aspergillus sojae	
20. Verlag -	21. Preis -