

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 Mazeration, 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“