



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12G 1/02, 1/073, C12C 11/09, C12N 11/04</p>	<p>A2</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/06527 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. Februar 1999 (11.02.99)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/04726 (22) Internationales Anmeldedatum: 29. Juli 1998 (29.07.98) (30) Prioritätsdaten: 197 32 710.9 30. Juli 1997 (30.07.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTITUT FÜR MIKROTECHNIK MAINZ GMBH [DE/DE]; Carl-Zeiss-Strasse 18-20, D-55129 Mainz (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LÖWE, Holger [DE/DE]; Anna-Seghers-Strasse 3, D-55276 Oppenheim (DE). POMMERSHEIM, Rainer [DE/DE]; Elsa-Brandström-Strasse 77, D-55124 Mainz (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: INSTITUT FÜR MIKROTECHNIK MAINZ GMBH; Carl-Zeiss-Strasse 18-20, D-55129 Mainz (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>	
<p>(54) Title: AGENT FOR PRODUCING AND/OR PROCESSING ALCOHOLIC BEVERAGES, IN PARTICULAR WINE OR SPARKLING WINE, AND USE OF SAID AGENT</p>		
<p>(54) Bezeichnung: MITTEL ZUR HERSTELLUNG UND/ODER BEHANDLUNG ALKOHOLHALTIGER GETRÄNKE, INSBESONDERE WEIN ODER SCHAUMWEIN, SOWIE DESSEN VERWENDUNGEN</p>		
<p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to an agent used in the production and/or processing of alcoholic beverages, in particular wine or sparkling wine. This agent is composed of microcapsules which each have an enveloping membrane that encloses the capsule interior completely. The capsule interior contains cells of at least one species of micro-organism, such as yeast or lactic acid bacteria, and/or one or more enzymes. The invention seeks to produce microcapsules having the following characteristics: ability to permanently immobilize the cells or enzymes; presence of enveloping membranes with adjustable transparency and mechanical stability, in accordance with need; liquefiable content of the microcapsules. To this end, the envelope membrane is composed of at least two radially superimposed layers. Each layer encloses all the layers arranged beneath it completely. The invention also relates to the use of this agent in the production of beer and low-molecular alcohols.</p>		
<p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung beschreibt ein Mittel zur Herstellung und/oder Behandlung alkoholhaltiger Getränke, insbesondere Wein oder Schaumwein, das aus Mikrokapseln besteht, die jeweils eine das Kapselinnere vollständig umschließende Hüllmembran aufweisen. Das Kapselinnere weist Zellen mindestens einer Spezies von Mikroorganismen, wie Hefen oder Milchsäurebakterien, und/oder ein oder mehrere Enzyme auf. Die Aufgabe der Erfindung, Mikrokapseln bereitzustellen, die die Zellen bzw. Enzyme dauerhaft immobilisiert, bei denen die Durchlässigkeit und die mechanische Stabilität der Hüllmembran gezielt einstellbar sind, und bei denen der Inhalt der Mikrokapseln verflüssigbar ist, wird dadurch gelöst, daß die Hüllmembran mindestens zwei radial übereinander angeordnete Schichten aufweist. Jede Schicht umschließt alle radial darunter angeordnete Schichten vollständig. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung des Mittels zur Herstellung von Bier und niedermolekularen Alkoholen.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidsschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**Mittel zur Herstellung und/ oder Behandlung alkoholhaltiger Getränke,
insbesondere Wein oder Schaumwein, sowie dessen Verwendungen**
Beschreibung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Mittel zur Herstellung und/ oder Behandlung alkoholhaltiger Getränke, insbesondere Wein oder Schaumwein, gemäß des Oberbegriffs des Hauptanspruchs sowie auf dessen Verwendungen.

Bei der Herstellung von alkoholhaltigen Getränken, insbesondere von Wein oder Schaumwein, werden unterschiedliche Spezies von Mikroorganismen, insbesondere Hefen zur alkoholischen Gärung, eingesetzt. Zur Optimierung der Ergebnisse werden dem Produkt oder Vorstufen davon weitere Spezies von Mikroorganismen und Enzyme zugesetzt. So dienen beispielsweise Milchsäurebakterien dem Abbau von Äpfelsäure und Pektinasen der Beschleunigung der Mostklärung.

Der Prozeß der alkoholischen Gärung kann durch Maßnahmen, wie rasches Abkühlen, Zusatz von Schwefeldioxid oder Filtration, unterbrochen werden. Diese Verfahren zur Inaktivierung der Hefen sind jedoch aufwendig, nur ungenau steuerbar und können die Qualität des Produktes beeinträchtigen. Damit gestaltet sich auch ein zeitlich versetzter Einsatz unterschiedlicher Spezies von Hefen als aufwendig.

Nach der Behandlung beispielsweise eines Weines mit Milchsäurebakterien zur Reduzierung des Säuregehaltes müssen die zugesetzten Mikroorganismen abgetrennt werden, was bei den vergleichsweise kleinen Milchsäurebakterien über Membranfiltration stattfindet. Jedoch ist hierbei eine vollständige Entfernung der Mikroorganismen nicht immer gewährleistet. Im Wein verbliebene Milchsäurebakterien können Glucose zu Essigsäure umwandeln und so den Wein verderben.

Enzyme, wie Proteasen zum Abbau von Peptiden und Proteinen, werden dem Produkt oder Vorstufen hiervon in flüssiger Form zugesetzt. Die Inaktivierung von Enzymen erfolgt in der Regel durch Erhitzen, womit eine Beeinträchtigung des Produktes einhergehen kann sowie eine Wiederverwertung der zum Teil teuren Enzyme ausscheidet.

Es sind Mittel zur Flaschengärung bei der Schaumweinherstellung bekannt, die aus in Alginat-Kügelchen immobilisierten Hefen bestehen (G. Troost et. al., Sekt, Schaumwein, Perlwein, Stuttgart 1995 sowie DE 39 08 997 A1). Hiermit konnte das zeitaufwendige manuelle Abrütteln des feinen Hefedepots durch das rasche Absinken der Alginat-Kügelchen in der Sektflasche ersetzt werden. Nachteilig solcher Mittel, bei denen die Kügelchen nicht von einer zellenfreien Hüllmembran umgeben sind, ist jedoch, daß sie keine hohe mechanische Stabilität aufweisen und ein Auswachsen, insbesondere relativ kleiner Mikroorganismen, nicht ausreichend verhindern können, womit nach der Abtrennung der Kügelchen Mikroorganismen im Produkt zurückbleiben können. Eine Mehrfachverwendung solcher Mittel ist damit nur schwer realisierbar. Weiterhin sind Enzyme aufgrund ihrer geringen Größe in solchen Alginat-Kügelchen in der Regel nicht immobilisierbar.

In der US 4,996,150 wird ein Verfahren zur Mikroverkapselung von Biokatalysatoren, vorzugsweise Hefen, sowie deren Verwendung zur kontinuierlichen Herstellung von Ethanol beschrieben. Die Biokatalysatoren sind in einer Matrix aus einem anionischen Polysaccharid und einem kationischen Polymer enthalten. Auch hier weisen die Mikro kapseln keine zellenfreie Hüllmembran auf, so daß ein Auswachsen von Hefen nicht ausreichend verhindert werden kann. Darüber hinaus ist eine ausreichend sichere Immobilisierung kleinerer Biokatalysatoren, wie Enzyme, kaum möglich.

Die US 4,659,662 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung alkoholischer Getränke oder Bioalkohol unter Verwendung von Hefen enthaltenden Mikro kapseln. Die Hefen können in einem Matrixmaterial eingebettet sein, daß zusätzlich von einer Hüllmembran umgeben ist, die jedoch gleich dem Matrixmaterial ist. Als Beispiel werden in Calcium-Alginat immobilisierte Hefen genannt. Die Hüllmembran besteht jedoch nur aus einer Schicht und ist zudem von Zellen durchsetzt, d. h. nicht zellenfrei. Daher kann ein Auswachsen der Hefen nicht ausreichend verhindert werden und eine ausreichend langzeitstabile Immobilisierung von Enzymen ist kaum möglich.

Die DE 34 32 923 C2 betrifft Biokatalysatoren mit immobilisierten Zellen, die von einer einschichtigen, zellenfreien Hüllmembran umgeben sind. Die das Kapselinnere umschließende und für die Zellen nicht durchlässige Hüllmembran kann aus einem ionisch oder kovalent vernetzten Gel bestehen.

3

Als Verwendungsbeispiel wird die Sektherstellung angeführt. Vorzugsweise besteht die Hüllmembran aus der selben Substanz wie das Matrixmaterial im Kapselinneren. Hierzu werden das Vernetzungsmittel, beispielsweise Calcium-Ionen, im Überschuß enthaltende Kügelchen, hier aus Calciumalginat, nochmals in eine zellenfreie, die Hüllmembran bildende Substanz, hier Alginat-Lösung, gegeben. Von Nachteil hierbei ist, daß eine Verflüssigung des Kapselinhalts ohne ein Auflösen der Hüllmembran nicht möglich ist. Insbesondere bei Enzymen ermöglicht jedoch ein verflüssigtes Kapselinneres den Erhalt der natürlichen Konformation und damit der Aktivität des Enzyms. Darüber hinaus lassen sich mit solchen Hüllmembranen die Anforderungen, wie gezielte Einstellbarkeit der Durchlässigkeit und eine ausreichend hohe mechanische Stabilität, kaum erreichen.

Die Aufgabe der Erfindung liegt darin, ein Mittel zur Herstellung und/ oder Behandlung von alkoholischen Getränken, insbesondere Wein oder Schaumwein, gemäß des Oberbegriffs des Hauptanspruchs zur Verfügung zu stellen, bei dem die Zellen bzw. Enzyme dauerhaft immobilisiert sind, bei dem die Durchlässigkeit und die mechanische Stabilität der Hüllmembran gezielt einstellbar sind, und bei dem der Inhalt der Mikrokapseln verflüssigbar ist.

Weiterhin liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, Verwendungen des erfindungsgemäßen Mittels aufzuzeigen.

Die Aufgabe wird durch ein Mittel mit den Merkmalen des Anspruchs 1 sowie durch die Verwendungen nach den Ansprüchen 20 und 21 gelöst, wobei die Unteransprüche vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung betreffen.

Die zur Herstellung und/ oder Behandlung alkoholischer Getränke, insbesondere Wein oder Schaumwein, eingesetzten Spezies von Mikroorganismen und/ oder Enzyme sind dadurch immobilisiert, daß diese im Innern einer Mikrokapsel enthalten sind, und daß eine Hüllmembran das Kapselinnere vollständig umschließt. Ein Austreten der Mikroorganismen bzw. Enzyme wird dadurch verhindert, daß die Hüllmembran für diese Mikroorganismen bzw. Enzyme nicht durchlässig ist. Um eine Stoffumsetzung zu gewährleisten, ist die Hüllmembran für die umzusetzenden Stoffe (Edukte), wozu auch die für die Mikroorganismen notwendigen Nährstoffe zählen, beispielsweise Glucose, und für zumindest einen Teil der erzeugten bzw.

umgewandelten Stoffe (Produkte), beispielsweise Alkohol und Kohlendioxid, durchlässig. Die Anforderungen an die Durchlässigkeit und die mechanische Stabilität werden durch eine Hüllmembran erfüllt, die mindestens zwei radial übereinander angeordneten Schichten aufweist, wobei jede Schicht alle radial darunter angeordnete Schichten vollständig umschließt. Vorteilhaft sind die einzelnen Schichten ionisch und/ oder kovalent miteinander verbunden.

Erst dieser mehrschichtige Aufbau erlaubt die dauerhafte Immobilisierung der Zellen bzw. Enzyme für die Herstellung und/ oder Behandlung alkoholhaltiger Getränke, wie Wein oder Schaumwein. So wird etwa ein Auswachsen der Hefen und eine hiermit einhergehende Zerstörung der Mikrokapseln effektiv verhindert. Durch die hohe mechanische Stabilität lassen sich die Mikrokapseln auch in größeren Bioreaktoren einsetzen, ohne daß die Mikrokapseln zerdrückt werden oder platzen. Diese erhöhte Stabilität ermöglicht auch das Kapselinnere zu verflüssigen, ohne daß die Mikrokapseln hierdurch mechanisch zu instabil werden. Darüber hinaus kann durch eine geeignete Auswahl der mindestens zwei Schichten die Durchlässigkeit der Hüllmembran gezielt eingestellt werden, was für die Immobilisierung von Enzymen von entscheidender Bedeutung ist.

Bevorzugt weisen nicht nur die äußeren Schichten, sondern auch die innerste Schicht der Hüllmembran keine der im Innern der Mikrokapseln enthaltenen Zellen bzw. Enzyme auf.

Bevorzugt bestehen mindestens zwei Schichten der Hüllmembran aus unterschiedlichen Substanzen. So kann beispielsweise eine äußere Schicht (Stützsicht) aus einer Substanz bestehen, die eine hohe mechanische Stabilität der Mikrokapseln gewährleistet, während eine innere Schicht (Regelschicht) aus einer Substanz besteht, die eine gezielte Einstellung der Durchlässigkeit dieser Schicht und damit der Hüllmembran ermöglicht.

Nach einer vorteilhaften Ausführungsform sind die im Innern der Mikrokapsel enthaltenen Zellen bzw. Enzyme in einer Matrix eingebettet. Diese Matrix kann aus einer Alginat-Verbindung eines mehrwertigen Kations, beispielsweise Calcium, Strontium, Barium, Aluminium oder/ und Eisen aufgebaut sein.

Gemäß einer anderen vorteilhaften Ausführungsform sind die Zellen bzw. Enzyme im Innern der Mikrokapsel in einer Flüssigkeit frei beweglich, was

insbesondere zum Erhalt der natürlichen Konformation der Enzyme von Vorteil ist. Hierdurch bleibt trotz der Immobilisierung die natürliche Aktivität der Zellen bzw. Enzyme erhalten. Werden die Mikrokapseln durch Ausfällung von Tropfen einer die Zellen bzw. Enzyme enthaltenden Lösung mittels eines Vernetzungsmittels hergestellt, kann nach Anbringen der Schichten der Hüllmembran das Kapselinnere wieder verflüssigt werden. Besteht die Substanz der Matrix im Kapselinneren beispielsweise aus Calcium-Alginat, so kann das mehrwertige Metallkation gegen einwertige Kationen, beispielsweise Natrium oder Kalium, ausgetauscht werden, um das Innere der Mikrokapsel wieder zu verflüssigen. Daher ist es bevorzugt, daß mindestens eine Schicht der Hüllmembran aus einer von der die Zellen bzw. Enzyme einbettenden, die Matrix bildenden Substanz unterschiedlichen Substanz besteht. Bei bekannten Mikrokapseln, deren einschichtige Hüllmembran aus der gleichen Substanz wie die Matrix im Kapselinneren besteht, ist diese Verflüssigung des Kapselinneren nicht möglich, da sich hier auch die Hüllmembran auflösen würde.

Bei der Verwendung eines mittels mehrwertiger Kationen vernetzbaren Substanz, beispielsweise Alginat mittels Calcium, ist der Austausch der mehrwertigen Kationen gegen einwertige Kationen weiterhin dadurch von Vorteil, daß mehrwertige Kationen, wie Calcium, in der Regel bei der Weinherstellung unerwünscht sind. So kann beispielsweise eine Matrix aus Calciumalginat durch Einbringen der Mikrokapseln in eine wäßrige Natriumcitrat enthaltende Lösung, was einen Austausch der Calcium-Ionen gegen Natrium-Ionen bewirkt, verflüssigt werden. Diese Mikrokapseln, beispielsweise in der Weinherstellung eingesetzt, binden bevorzugt mehrwertige Ionen aus dem umzusetzenden Substrat, wie Traubensaft, was von vorteilhafter Wirkung ist. Weist die Matrix dieser Mikrokapseln wieder einen zu hohen Gehalt an mehrwertigen Kationen auf, so kann durch Behandlung mit einer einwertigen Kationen enthaltenden Lösung diese wieder regeneriert werden.

Mikrokapseln mit einer Hüllmembran sowohl aus einer Schicht als auch aus mehreren Schichten sind in der Medizin zur Immobilisierung von Zellen bzw. Enzymen bekannt. So wurden Langerhanssche Zellen in einer Mikrokapsel eingeschlossen, deren Hüllmembran aus einer aus Alginat und Poly-L-Lysin bestehenden Schicht aufgebaut war (F. Lim et. al., Science, 210 (1980) 908 - 910). In der EP-A-681834 wurden Mikrokapseln, deren Hüllmembran aus mehreren Schichten aufgebaut ist, zum Einsetzen in Gewebe von Lebewesen

beschrieben. An solche Mikrokapseln werden Anforderungen an die Gewebeerträglichkeit, eine geringe Immunreaktion und an die Einsetzbarkeit in lebendes Gewebe gestellt.

Durch eine Optimierung des Aufbaus von Mikrokapseln mit mehrschichtiger Hüllmembran im Hinblick auf die Herstellung bzw. Behandlung alkoholhaltiger Getränke, lassen sich vorteilhaft entsprechende Mikroorganismen, wie in der alkoholischen Gärung eingesetzte Hefen oder Milchsäurebakterien, und/ oder Enzyme immobilisieren. Insbesondere muß bei der Immobilisierung von Hefen zur alkoholischen Gärung die Stabilität trotz der Produktion von Kohlendioxid und einem raschen Wachstum der Hefezellen gewährleistet sein. Dies wird durch Mikrokapseln mit Hüllmembranen, die mindestens zwei radial übereinander angeordnete Schichten aufweisen, erreicht.

Das erfindungsgemäße Mittel hat gegenüber in der Herstellung von alkoholischen Getränken bekannten Mitteln den Vorteil, daß die eingeschlossenen Zellen bzw. Enzyme dauerhaft immobilisiert sind und sich aufgrund der einfachen Handhabung bequem dosiert zugeben und auch einfach, rasch und vollständig aus dem Produkt entfernen lassen. Damit ist eine gezielte Beeinflussung der einzelnen Herstellungsschritte ohne eine Beeinträchtigung der Qualität des Produktes möglich. Darüberhinaus lassen sich die Zellen bzw. Enzyme enthaltenden Mikrokapseln wiederverwenden, was insbesondere bei teuren Enzymen zu einer Kosteneinsparung führt. Weiterhin ist aufgrund der selbst bei sedimentierten Mikrokapseln zwischen den Kapseln vorhandenen Hohlräumen sowie der leichten Beweglichkeit der Mikrokapseln in einer Flüssigkeit ein guter Stoffaustausch, insbesondere Gasaustausch bei der alkoholischen Gärung, gewährleistet.

Es kann vorteilhaft sein, die Hüllmembran undurchlässig für sich außerhalb der Mikrokapsel befindliche Wirkstoffe und/ oder Mikroorganismen zu gestalten, die die im Kapselinneren enthaltenen Zellen bzw. Enzyme in ihrer Aktivität beeinträchtigen könnten. So produzieren manche Spezies von in der Weinherstellung eingesetzten Hefen Toxine, die für andere Spezies von Mikroorganismen schädlich sind. Durch Verwendung von Mikrokapseln, deren Hüllmembran für solche Toxine nicht durchlässig ist, lassen sich solche Mikroorganismen bzw. Enzyme gemeinsam in beispielsweise der Weinherstellung einsetzen.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform enthalten die Mikro kapseln als Mikroorganismen mindestens eine bei der Weinherstellung eingesetzte Hefespezies.

Nach einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist in den Mikro kapseln mindestens eine Spezies von Milchsäurebakterien enthalten, die beim biologischen Säureabbau zur Weinbehandlung eingesetzt werden.

Verfahren zum Entsäuern von Wein unter Verwendung von in Calcium-Alginat immobilisierten Zellen der Spezies *Leuconostoc oenos* sind aus der US 4,380,552 bekannt. Jedoch weisen diese Kügelchen keine Hüllmembran auf, so daß eine ausreichende Stabilität und ein Auswachsen der Zellen nicht gewährleistet ist.

Als Mittel zur Herstellung bzw. Behandlung von alkoholischen Getränken eignen sich vorteilhaft Mikro kapseln, die insbesondere bei der Wein- oder Schaumweinherstellung eingesetzte Enzyme, wie Pektinasen, Glucanasen, β -Glucosidasen, Proteasen oder/ und Glucose-Fructose-Isomerasen enthalten.

Es kann von Vorteil sein, in einer Mikro kapsel sowohl Zellen als auch ein oder mehrere Enzyme zu immobilisieren. Zum einen kann dies die Handhabung erleichtern, zum anderen kann dies insbesondere dann die Produktivität erhöhen, wenn ein Produkt der Mikroorganismen bzw. Enzyme von den anderen in der Mikro kapsel enthaltenen Mikroorganismen bzw. Enzyme weiter umgesetzt wird. So lassen sich vorteilhaft Spezies von in der Weinherstellung eingesetzten Hefen und deren Behandlungsstoffe, wie Hefezellwandpräparate oder/ und Glucose-Fructose-Isomerasen gemeinsam in einer Mikro kapsel immobilisieren. Neben einer Erhöhung der Aktivität der eingesetzten Hefen lassen sich so die einzusetzenden Mengen der zum Teil teuren Behandlungsstoffe reduzieren.

In einer Mikro kapsel lassen sich auch die Aktivität der immobilisierten Zellen bzw. Enzyme steigernde Stoffe einschließen. So ist beispielsweise bekannt, daß die Aktivität der Milchsäurebakterien mit steigendem Säuregehalt abnimmt. Durch Einschluß eines Kationenaustauschers in eine Milchsäurebakterien enthaltende Mikro kapsel, läßt sich am Ort der Milchsäurebakterien der pH-Wert

durch Austausch von Hydroniumionen gegen beispielsweise Kaliumionen erhöhen und so die Aktivität der Milchsäurebakterien steigern. Weitere Beispiele von die Aktivität steigernden Stoffe sind Vitamine, wie Vitamin B₁, oder wachstumsfördernde Proteine.

Vorzugsweise ist mindestens eine Schicht der Hüllmembran aus mindestens einem Polymer aufgebaut. Als Polymer eignet sich vorteilhaft ein Polyelektrolytkomplex, der aus mindestens einem Polykation und einem Polyanion besteht. Geeignete Polyanionen sind beispielsweise Polyacrylsäure, Polymethacrylsäure, Polyvinylsulfonsäure, Polyvinylphosphonsäure, Alginsäure, Cellulose-Derivate, insbesondere Carboxymethylcellulose oder Cellulose-Schwefelsäureester, Schellack oder Bestandteile von Schellack, wie Aleuritinsäure oder Shellolsäure. Geeignete Polykationen sind beispielsweise Polyethylenimin, Polydimethyldiallylammonium, Poly-L-Lysin oder Chitosan.

Vorteilhaft weisen die Polyanionen bzw. Polykationen einen mittleren Polymerisationsgrad von über 100, vorzugsweise von 100 bis 15.000, auf. Zur gezielten Einstellung der Durchlässigkeit der Hüllmembran werden für die die Durchlässigkeit bestimmende Schicht (Regelschicht) bevorzugt Polymere mit einer engen Molmassenverteilung, beispielsweise synthetische Polyelektrolytkomplexe aus Polyacrylsäure oder Polymethacrylsäure mit Polyethylenimin, verwendet. So wurde die Durchlässigkeit für ein kleines Protein der Größe von etwa 60 kD durch eine Regelschicht aus Polyethylenimin (PEI) (Molmasse 1.000.000) und Polyacrylsäure (PAS) ermittelt. In Tabelle 1 ist der aus den Mikrokapseln diffundierte Anteil des Proteins in Abhängigkeit vom Polymerisationsgrad von PAS nach 60 Stunden Schütteln dargestellt.

Regelschicht	Molmasse von NaPAS	Polymerisationsgrad	Durchlässigkeit nach 60 Stunden
PEI/ PAS	20.000	215	8,4 %
PEI/ PAS	60.000	645	18,9 %
PEI/ PAS	170.000	1828	93,1 %

Tab. 1 Durchlässigkeit der Regelschicht für ein 60 kD Protein in Abhängigkeit von der Molmasse des Polyanions als Natrium-Polyacrylat (NaPAS).

Wie aus Tab. 1 ersichtlich ist, wird die Durchlässigkeit der Regelschicht durch die Polyionen, hier als Polyanion Polyacrylsäure, bestimmt, die einen kleinen Polymerisationsgrad aufweisen, während die Gegenionen, hier als Polykation Polyethylenimin, mit einem hohen Polymerisationsgrad das Gerüst bilden. Bei gleichem Gegenion weisen Polyelektrolytkomplexe mit einem Polyion mit hohem Polymerisationsgrad eine höhere Festigkeit als solche mit niedrigem Polymerisationsgrad auf. Als Gegenionen, die das Gerüst bilden, an das sich die Polyionen mit kleinerem Polymerisationsgrad anlagern, sind Polyionen mit einem Polymerisationsgrad über 50.000 bevorzugt.

Zur Immobilisierung von Enzymen ist mindestens eine Regelschicht mit einem Polymerisationsgrad des Polyanions oder Polykations von 100 bis 1.000 bevorzugt, wobei die das Gerüst bildenden Gegenionen, Polykationen bzw. Polyanionen, höhere Polymerisationsgrade aufweisen. Zur Immobilisierung von Mikroorganismen, wie Hefen, sind dagegen höhere Polymerisationsgrade ausreichend; bevorzugt sind hier Polymerisationsgrade des Polyanions oder Polykations der Regelschicht von 1.000 bis 15.000, wobei auch hier die Gerüst bildenden Gegenionen, Polykationen bzw. Polyanionen, einen höheren Polymerisationsgrad aufweisen. Polyionen mit hohen Polymerisationsgraden haben den Vorteil einer hohen Festigkeit der betreffenden Schicht.

Für die die Festigkeit bestimmende Schicht (Stützschiicht) werden vorteilhaft Polyelektrolytkomplexe synthetischer Polykationen bzw. Polyanionen mit hohen Polymerisationsgraden von über 10.000 verwendet. Vorteilhaft lassen sich auch natürliche Polykationen und -anionen, wie Alginsäure und Chitosan oder Cellulose-Derivate, verwenden, bei denen sich eine breite Molmassenverteilung nicht störend auswirkt.

In der Tabelle 2 sind Beispiele für Substanzen der Schichten der Hüllmembran aufgeführt, wobei in der ersten Zeile jeweils angegeben ist, ob sich dieser Aufbau bevorzugt zur Immobilisierung von Hefen und/ oder Enzymen eignet. Der Kern kann zur Immobilisierung ein Alginat aufweisen, das nach Anbringen der Schichten verflüssigt werden kann. In den Spalten der Tab. 2 ist jeweils der Schichtaufbau von Innen nach Außen angegeben. Mit einer größeren Anzahl an Schichten, beispielsweise 4 oder mehr Schichten, kann eine noch höhere Stabilität der Hüllmembran erzielt werden.

	Hefen	Hefen	Hefen oder/ und Enzyme	Hefen oder/ und Enzyme	Enzyme	Enzyme
1. Schicht	PEI/ CMC	PEI/ CMC	Chit/ PAS	Chit/ PAS	PEI/ PAS	PEI/ PAS
2. Schicht	PEI/ CMC	PEI/ CMC	Chit/ CMC	Chit/ CMC	PEI/ CMC	PEI/ CMC
3. Schicht		PEI/ CMC		Chit/ CMC		PEI/ Alg

Tab. 2 Beispiele für den Schichtaufbau der Hüllmembran bei immobilisierten Hefen und/ oder Enzymen (Alg = Alginat, Chit = Chitosan, CMC = Carboxymethylcellulose, PAS = Polyacrylsäure, PEI = Polyethylenimin).

Darüber hinaus eignen sich als Polymere für den Aufbau einer Schicht der Hüllmembran auch Naturkautschuk, Polystyrol oder/ und Polymethylmethacrylat oder deren Gemisch mit einem oder mehreren Polyelektrolytkomplexen.

Die Erfindung betrifft auch zwei Verwendungen des erfindungsgemäßen Mittels. So läßt sich das Mittel zur Herstellung von Bier verwenden. Hierfür sind Mikrokapseln mit Zellen von einer oder mehrerer in der Bierherstellung eingesetzter Spezies von Hefen zu verwenden. Ebenso läßt sich das Mittel zur Herstellung niedermolekularer Alkohole, wie Methanol oder/ und Ethanol, verwenden, wobei Mikrokapseln mit für die Alkoholerzeugung in hohen Ausbeuten geeigneten Hefen Verwendung finden.

Zur Herstellung und/ oder Behandlung von beispielsweise Wein unter Verwendung des erfindungsgemäßen Mittels sind die Mikrokapseln in einen Trauben-, Beeren- und/ oder anderen Fruchtsaft, beispielsweise Apfelsaft, oder einen Wein, einzubringen. Die Mikrokapseln verbleiben solange in der Lösung, bis die teilweise oder vollständige Umsetzung, beispielsweise die alkoholische Gärung, stattgefunden hat. Anschließend werden die Mikrokapseln aus der Lösung entfernt.

Gegenüber bekannten Verfahren, bei der die eingesetzten Mikroorganismen bzw. Enzyme abfiltriert werden müssen, weist dieses Verfahren den entscheidenden Vorteil auf, daß sich die im Herstellungs- bzw. Behandlungsprozeß eingesetzten Zellen bzw. Enzyme im letzten Schritt des Verfahrens einfach, rasch und vollständig entfernen lassen. Damit ist die

Verweilzeit der Mikroorganismen bzw. Enzyme in der Lösung sehr genau einstellbar.

Aufgrund der Größe der Mikrokapseln, bevorzugt sind Durchmesser von einem halben bis wenigen Millimetern, lassen sich die Mikrokapseln einfach und vollständig aus der Lösung entfernen. Hierfür eignen sich mechanische Verfahren, beispielsweise mittels eines Siebes, oder Dekantieren der überstehenden Flüssigkeit nach vorheriger Sedimentation der Mikrokapseln. Bei diesen Arten der Entfernung werden die Mikrokapseln nicht zerstört, so daß diese ggf. nach zwischenzeitlicher Aufbewahrung in einer Nährlösung wiederverwendet werden können. Insbesondere bei teuren Enzymen können hierdurch Produktionskosten gesenkt werden.

Vorteilhaft wird die Lösung zumindest im Bereich der Mikrokapseln so temperiert, daß die Zellen bzw. Enzyme eine optimale Aktivität aufweisen, wobei eine mögliche Beeinflussung der Qualität des Produktes zu berücksichtigen ist.

Es lassen sich verschiedene in Mikrokapseln immobilisierte Mikroorganismen bzw. Enzyme gleichzeitig oder/ und zeitlich versetzt einsetzen. Bei einem zeitlich versetzten Einsatz lassen sich die verschiedenen Mikrokapseln nacheinander der Lösung zugeben und gemeinsam entfernen oder die Verfahrensschritte Einbringen, Verweilen, Entfernen werden mit der selben Lösung unter Verwendung verschiedener in Mikrokapseln immobilisierter Zellen bzw. Enzyme nacheinander mehrfach durchlaufen. Der Einsatz unterschiedlicher Mikroorganismen bzw. Enzyme kann somit gezielt zur Erhöhung der Komplexität etwa eines Weines genutzt werden.

Als Bioreaktor zur Herstellung von niedermolekularen Alkoholen, insbesondere Ethanol, oder alkoholischen Getränken, insbesondere Wein oder Schaumwein, kann ein Fließbettreaktor, in dem die erfindungsgemäßen Mittel enthalten sind, verwendet werden. Geeignete Reaktortypen werden auch in Lüders, 'Technologie mit immobilisierten Hefen', Brauwelt 1994, 57 aufgezeigt.

Der Bioreaktor kann auch mindestens eine Röhre aufweisen, in der die Mikrokapseln enthalten sind. Vorteilhaft sind die beiden Öffnungen der Röhre mit die Mikrokapseln zurückhaltenden Sieben verschlossen. Hierdurch entfällt

ein Abtrennen der Mikrokapseln aus der umgesetzten Lösung. Der Durchmesser geeigneter Röhren liegt bevorzugt im Bereich von einem bis mehreren Zentimetern.

Die umzusetzende Flüssigkeit wird durch die Röhre geleitet, wobei mehrere Röhren parallel oder/ und in Serie miteinander verbunden sein können. Bei einem gleichzeitigen Einsatz von verschiedenen in Mikrokapseln immobilisierten Mikroorganismen bzw. Enzymen sind Röhren gleichen Inhaltes bevorzugt parallel miteinander verbunden, wobei Gruppen von parallel miteinander verbundenen Röhren unterschiedlichen Inhaltes in Serie zusammengeschlossen sind. Es kann auch vorteilhaft sein, einzelne Röhren in Serie miteinander zu verbinden, so daß die Lösung die Röhren nacheinander durchfließt.

Zur Optimierung der Aktivität der eingesetzten Mikroorganismen bzw. Enzyme ist es vorteilhaft das Innere der Röhren, also die Mikrokapseln und die sie umgebende Lösung, zu temperieren. Hierzu weist eine einzelne Röhre oder Gruppen von Röhren vorteilhaft einen gemeinsamen temperierbaren Mantel auf. Durch Kühlung der in den Röhren eingeschlossenen Mikrokapseln läßt sich die Aktivität der Zellen bzw. Enzyme gezielt erniedrigen.

In einer Anlage zur Herstellung von niedermolekularem Alkoholen, insbesondere Ethanol, die mindestens einen Bioreaktor enthält, gelangt die zu vergärende, glucosehaltige Flüssigkeit aus dem Vorratstank in den Mischer. Dort wird sie mit dem Rückfluß aus dem Erhitzer gemischt und dann in den mit Mikrokapseln befüllten Bioreaktor geführt, wo die eigentliche Umwandlung von Kohlenhydraten in Alkohol stattfindet. Der Alkohol wird dann im Heizbehälter und in der Destillierkolonne abgetrennt und im Auffanggefäß für das Hauptprodukt gesammelt. Die Trennung des Alkohols von der restlichen Flüssigkeit geschieht unter Ausnutzung des unterschiedlichen Siedepunktes. Die Restflüssigkeit aus dem Erhitzer kann nach dem Abkühlen im Wärmetauscher wieder im Mischer mit frischer Flüssigkeit angereichert werden und erneut in den Bioreaktor gelangen. Um eine übermäßige Glucoseverdünnung der sich im Kreislauf befindlichen Flüssigkeit zu vermeiden, wird ein Teil des wässrigen Anteils regelmäßig entfernt und als Nebenprodukt in einem Auffanggefäß gesammelt.

Eine Anlage zur Herstellung alkoholischer Getränke weist einen stark vereinfachten Aufbau auf. Die zu vergärende Flüssigkeit wird aus einem Vorratsgefäß in einen erfindungsgemäßen Bioreaktor geführt, wo die Flüssigkeit verweilt oder durch beispielsweise einen Röhrenreaktor zirkuliert. Das alkoholhaltige Produkt wird nach einer für eine teilweise oder vollständige Umsetzung erforderlichen Zeit aus dem Bioreaktor in ein Auffanggefäß geleitet.

Weitere Einzelheiten der Anlagen lassen sich dem nachfolgenden Beschreibungsteil entnehmen, in dem anhand der Zeichnung ein Ausführungsbeispiel näher erläutert ist. Die beigefügte Figur zeigt den schematischen Aufbau einer kontinuierlichen Anlage zur Alkoholherstellung. Die zu vergärende Flüssigkeit wird aus einem Vorratsbehälter (1) in einen Mischer (2) geführt, wo sie sich mit der aus dem Erhitzer (4) rückfließenden Flüssigkeit vermischt. Dieses Gemisch wird im Bioreaktor (3) von in dem erfindungsgemäßen Mittel immobilisierten Hefen zu Alkohol umgesetzt. Die alkoholhaltige Flüssigkeit wird in einen Erhitzer (4) geführt. Aus ihm wird eine Alkohol enthaltende Gasphase in eine Destillierkolonne (5) geleitet. Dort wird der im Vergleich zu Wasser verschiedene Siedepunkt des Alkohols zur Anreicherung des Alkohols ausgenutzt, der im Auffanggefäß für das Hauptprodukt (6) gesammelt wird. Der alkoholarme Teil der vorgegärten Flüssigkeit wird aus dem Erhitzer herausgeführt, in einem Wärmetauscher (8) gekühlt und in den Mischer (2) zurückgeleitet. Damit die sich im Kreislauf befindliche Flüssigkeit einen Mindestgehalt an umzusetzenden Stoffen, insbesondere Glucose, behält, wird ein Teil des wässrigen Anteils regelmäßig aus dem Erhitzer (4) entfernt und als Nebenprodukt in einem Auffanggefäß (7) gesammelt.

Beispiel zur Herstellung von Mikrokapseln:

5 g Natriumalginat (Fa. Kelco, Hamburg) wurden in 700 ml Wasser gelöst. In diese Lösung wurde anschließend 70 g Trockenhefe (Oenoform, Fa. Erbslöh, Geisenheim) eingerührt. Diese Suspension wurde in eine 0,6 %-ige Calciumchlorid-Lösung getropft. Nach einigen Minuten Aushärtezeit wurden die Hefezellen in einer Calcium-Alginat-Matrix enthaltenden Kügelchen erst mit Wasser und dann mit einer wässrigen 0,05 %-igen Lösung von Polyethylenimin (mittlere Molmasse 1 Mio., Fa. Fluka) und anschließend mit einer wässrigen 0,06 %-igen Lösung von Carboxymethylcellulose (mittelviskos, Fa. Fluka) gewaschen. Anschließend wurden die so erhaltenen Mikrokapseln mit Wasser gewaschen und dann nochmals in die Polyethylenimin- und die Carboxymethylcellulose-Lösung eingebracht. Nach dem Spülen mit Wasser wurden die Mikrokapseln in Wasser gelagert. Die Mikrokapseln wiesen eine zweischichtige Hüllmembran auf, wobei jede Schicht aus dem Polyelektrolytkomplex Polyethylenimin/ Carboxymethylcellulose bestand. Dadurch, daß erst die Zellen aufweisenden Calcium-Alginat-Kügelchen hergestellt wurden und anschließend die Schichten der Hüllmembran aufgebracht wurden, wiesen die Schichten der Hüllmembran keine Hefezellen auf, die aus den Mikrokapseln herauswachsen könnten. Die so immobilisierten Hefen wiesen die gleiche Aktivität wie in unbeschichteten Calcium-Alginat-Kügelchen immobilisierte Hefen auf.

Patentansprüche

1. Mittel zur Herstellung und/ oder Behandlung alkoholhaltiger Getränke, insbesondere Wein oder Schaumwein,

bestehend aus Mikrokapseln, die jeweils mindestens eine das Kapselinnere vollständig umschließende Hüllmembran aufweisen, wobei das Kapselinnere Zellen mindestens einer Spezies von Mikroorganismen und/ oder ein oder mehrere Enzyme umfaßt, und

wobei die Hüllmembran für die im Kapselinneren eingeschlossenen Zellen bzw. Enzyme nicht durchlässig ist, und

wobei die Hüllmembran für die von den Zellen bzw. Enzymen umzusetzenden Edukte und für zumindest einen Teil der von den Zellen bzw. Enzymen umgesetzten Produkte durchlässig ist.

dadurch gekennzeichnet,

daß die Hüllmembran mindestens zwei radial übereinander angeordnete Schichten aufweist, wobei jede Schicht alle radial darunter angeordnete Schichten vollständig umschließt.

2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens zwei Schichten der Hüllmembran aus unterschiedlichen Substanzen bestehen.
3. Mittel nach einem Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die im Innern der Mikrokapsel enthaltenen Zellen bzw. Enzyme in einer Matrix eingebettet sind.
4. Mittel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix eine Alginate-Verbindung eines mehrwertigen Kations aufweist.

5. Mittel nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Schicht der Hüllmembran aus einer von der die Zellen bzw. Enzyme einbettenden, die Matrix bildenden Substanz unterschiedlichen Substanz besteht.
6. Mittel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix im Innern der Mikrokapsel verflüssigt ist.
7. Mittel nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Schichten kovalent oder/ und ionisch miteinander verbunden sind.
8. Mittel nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Hüllmembran für außerhalb der Mikrokapsel befindliche Wirkstoffe und/ oder Mikroorganismen, die die im Kapselinneren enthaltenen Zellen bzw. Enzyme in ihrer Aktivität beeinträchtigen, nicht durchlässig ist.
9. Mittel nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß im Inneren der Mikrokapsel Zellen mindestens einer Spezies von in der alkoholischen Gärung, vorzugsweise bei der Weinherstellung, eingesetzten Hefen enthalten sind.
10. Mittel nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß im Inneren der Mikrokapsel Zellen mindestens einer Spezies von im biologischen Säureabbau bei der Weinbehandlung eingesetzten Milchsäurebakterien enthalten sind.

11. Mittel nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß im Inneren der Mikrokapsel ein oder mehrere Enzyme aus der Gruppe der Pektinasen, Glucanasen, β -Glucosidasen, Proteasen oder/ und Glucose-Fructose-Isomerasen enthalten sind.
12. Mittel nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß im Inneren der Mikrokapsel Zellen von mindestens einer Spezies von Mikroorganismen und mindestens ein Enzym enthalten sind.
13. Mittel nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß im Inneren der Mikrokapsel Zellen mindestens einer Spezies von in der Weinherstellung eingesetzten Hefen sowie mindestens ein Hefezellwandpräparat oder/ und eine Glucose-Fructose-Isomerase enthalten sind.
14. Mittel nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß im Inneren der Mikrokapsel neben den Zellen bzw. Enzymen mindestens ein die Aktivität der Zellen bzw. Enzyme steigernder Stoff enthalten ist.
15. Mittel nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Schicht der Hüllmembran aus mindestens einem Polymer aufgebaut ist.
16. Mittel nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Polymer ein Polyelektrolytkomplex ist.

17. Mittel nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß der Polyelektrolytkomplex mindestens ein Polyanion aus der Gruppe Polyacrylsäure, Polymethacrylsäure, Polyvinylsulfonsäure, Polyvinylphosphonsäure, Alginsäure, Cellulose-Derivate, insbesondere Carboxymethylcellulose oder Cellulose-Schwefelsäureester, Schellack oder Bestandteile von Schellack, wie Aleuritinsäure oder Shellolsäure, und mindestens ein Polykation aus der Gruppe Polyethylenimin, Polydimethyldiallylammonium, Chitosan oder Poly-L-Lysin aufweist.
18. Mittel nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Polyanion oder das Polykation einen mittleren Polymerisationsgrad von 100 bis 15.000 aufweist, wobei das Polykation bzw. Polyanion als Gegenion einen mittleren Polymerisationsgrad von über 50.000 aufweist.
19. Mittel nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Polymer Polystyrol, Polymethylmethacrylat oder/ und Naturkautschuk oder deren Gemisch mit einem oder mehreren Polyelektrolytkomplexen ist.
20. Verwendung eines Mittels nach einem der Ansprüche 1 bis 19 zur Herstellung von Bier, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikrokapseln Zellen einer oder mehrerer in der Bierherstellung eingesetzter Spezies von Hefen enthalten.
21. Verwendung eines Mittels nach einem der Ansprüche 1 bis 19 zur Herstellung von niedermolekularen Alkoholen, vorzugsweise von Ethanol, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikrokapseln Zellen einer oder mehrerer Hefespezies enthalten, die die Erzeugung des Alkohols in hohen Ausbeuten ermöglichen.

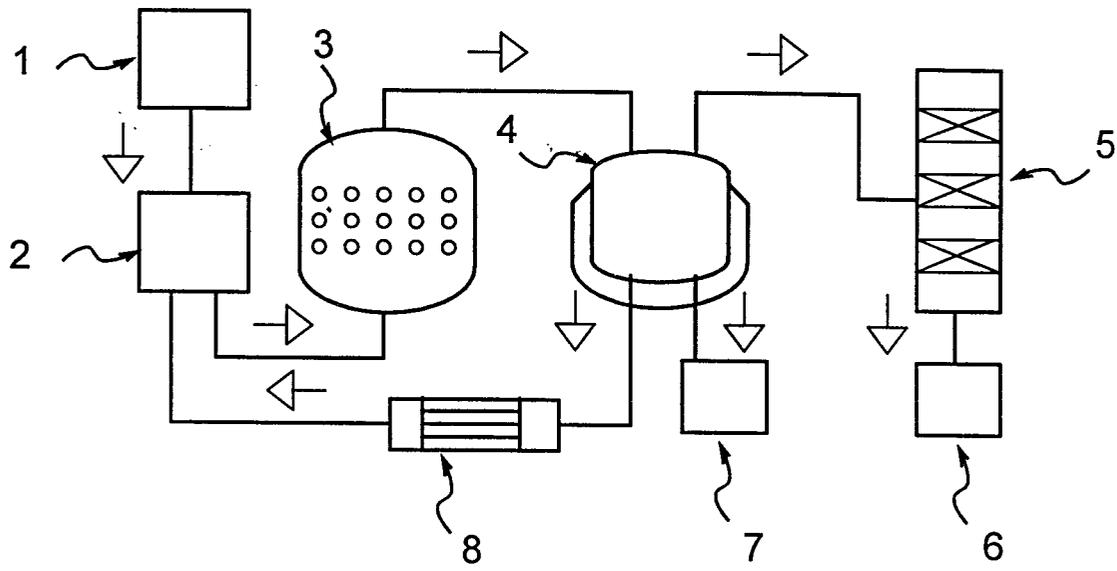


Fig. 1