DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

(12) Wirtschaftspatent

(19) DD (11) 276 104 A1

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

4(51) C 12 N 1/14

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 320 509 5 (22) 06.10.88 (44) 14.02.90

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72) Klappach, Günter, Dr. rer. nat.; Tannenberger, Klaus, Dipl.-Chem.; Schröter, Helga; Weichert, Dieter, Dr. rer. nat., DD

(54) Verfahren zur Gewinnung von Pilzsporen mittels Feststoff-Fermentation

(55) Feststoff-Fermentation, Mikropilze, Sporulation, Mischsubstrat, Pilzsporen, Kultivierung, Pilzmycel

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Pilzsporen. Sie kann in der Industrie und Landwirtschaft zur Erzeugung von Sporeninokolum angewendet werden. Erfindungsgemäß werden Hydrolasen bildende Mikropilze auf einem wasserquellbaren Substratgemisch bei einer Temperatur von 20 bis 45 °C unter sterilen Bedingungen kultiviert. Wobei sich das Substratgemisch aus leicht utilisierbaren, die C-Quelle liefernden, Substratkomponenten und schwer utilisierbaren Substratkomponenten, die als inerter Träger für die Ausbildung einer porösen oberflächenreichen Struktur erforderlich sind, zusammensetzt.

ISSN 0433-6461

3 Seiten

Patentanspruch:

1. Verfahren zur Gewinnung von Pilzsporen mittels Feststoff-Fermentation, **dadurch gekennzeichnet**, daß Hydrolasen bildende Mikropilze auf einem wasserquellbaren Mischsubstrat bestehend aus einem schwerabbaubaren Feststoffsubstrat und einem leichtabbaubaren Feststoffsubstrat, bei einer Substratfeuchte von 40 bis 80% in einem Temperaturbereich von 20 bis 45°C unter sterilen Bedingungen kultiviert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als schwerabbaubares Feststoffsubstrat, zerkleinertes Getreide- oder Rapsstroh, zerkleinertes Holz oder Baumwollfasern, verwendet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als leichtabbaubares Feststoffsubstrat, Getreidekleie, Getreidemehl oder ähnliche Nachfolgeprodukte des Getreidemahlens, Rüben- oder Kartoffelschnitzel, verwendet wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß Hydrolasen bildende Mikropilze der Gattungen Geotrichum, Aspergillus, Trichoderma, Chaetomium, Fusarium, Penicillium, Gliocladium, Rhizopus in Mono- oder Mischkultur eingesetzt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Pilzsporen. Sie kann in der Industrie und Landwirtschaft zur Erzeugung von Sporeninokulum angewendet werden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Mikropilze gewinnen in der Biotechnologie auf Grund ihrer Fähigkeiten zur Nutzung unterschiedlicher Substrate und zur Bildung einer Vielzahl von Stoffwechselprodukten zunehmend an Bedeutung. Das Wachstum und die Vermehrung von Pilzen zum Aufbau ihrer Zellsubstanz, die Bildung von Enzymen, insbesondere Hydrolasen, die Bildung von primären und sekundären Stoffwechselprodukten sowie der Einsatz von Pilzmycel oder Pilzsporen als Biokatalysatoren für Stoffwandlungen sind Beispiele, die diese Trendeinschätzung belegen. Als Impfmaterial für alle diese Fermentationsprozesse werden vegetatives Pilzmycel oder Pilzsporen eingesetzt. Pilzsporen werden durch Submers- oder Emerskultivierung des Pilzmycels und dessen Sporulation erzeugt. Daß die Oberflächen-Kultivierung für die Sporengewinnung günstige Bedingungen bietet, geht daraus hervor, daß selbst bei flüssigen Nährmedien das Pilzmycel als Schwimmschicht kultiviert und zur Sporulation gebracht wird oder das Medium durch Agarzusatz verfestigt wird, sodaß eine planare Nährbodenfläche definierter Größe entsteht. In der US-PS 4385831 wird die Gewinnung von Sporen einer Aspergillus-niger-Mutante auf einem Agarmedium beschrieben, die dann als Impfmaterial für die Citronensäurefermentation eingesetzt werden. Die zur Verfügung stehende Oberfläche des Agarmediums begrenzt den Mycelbewuchs und damit auch die auf diese Weise erreichbare Sporenausbeute. Um die zum Beimpfen eines Produktionsfermentors erforderliche Menge an Sporen zu produzieren, ist eine Vielzahl von Agar-Anzuchtplatten erforderlich. Die hiermit verbundenen Arbeitsgänge sind sehr aufwendig, umständlich, mit Contaminationsgefahren verbunden und somit für eine Massenproduktion von Pilzsporen kaum realisierbar.
In FR-PS 8508555 wird deshalb zur Vergrößerung der für den Mycelbewuchs zur Verfügung stehenden Fläche eine Apparatur mit zahlreichen porösen Scheiben beschrieben. Der hierfür erforderliche Aufwand steht jedoch nicht im Verhältnis zur erreichten Sporenausbeute.
Weiterhin ist bekannt, wie durch Kultivierung von Pilzmycel auf angefeuchteter Weizenkleie oder Gemischen aus Zuckerrübenschnitzeln und Weizenkleie Sporen als Impfmaterial gewonnen werden können. Die dabei erreichten Sporenausbeuten von etwa 10^9 Sporen/g Trockensubstanz deuten auf Limitationen hin. Für die Kultivierung höherer Substratschichten (bis max. 300 mm) wird eine spezielle Vorrichtung mit Zwangsbelüftung des Fermentationsgutes über perforierte Rinnen, Roste oder Segmente vorgestellt. Die hier für die Sporenproduktion eingesetzten Substrate führen zur Verdichtung, Verklebung und mangelhaftem Gasaustausch, sodaß auch hier nur die oberste Substratschicht eine hinreichende gute Mycelentwicklung zuläßt. Tiefere Substratschichten werden aus diesen Gründen kaum für die Mycelentwicklung und Sporenbildung nutzbar, sofern nicht aufwendige apparative Einrichtungen eingesetzt werden. (K.A. Kalunjanz, L.I. Golger; Mikrobielle Enzympräparate; Fachbuchverlag, Leipzig, 1984)

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein biotechnisches Verfahren zur Massenvermehrung von Pilzmycel zu entwickeln, mit dem die Erzeugung von Sporen in hoher Ausbeute möglich ist.

Wesen der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, geeignete Substrate auszuwählen und einzusetzen, mit denen unter den Bedingungen der Feststoff-Fermentation eine hohe Sporenausbeute erzielt werden kann.
Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß man Hydrolasen bildende Mikropilze auf einem wasserquellenden Substratgemisch mittels Feststoff-Fermentation bei einer Temperatur von 20 bis 45°C unter sterilen Bedingungen kultiviert.
Das Substratgemisch setzt sich zusammen aus leicht utilisierbaren Komponenten und aus schwer utilisierbaren bzw. inerten Komponenten.

Als leicht utilisierbare Komponenten werden stärke- und/oder hemicellulosehaltige Materialien, wie sie als Neben- oder Abprodukte bei der Verarbeitung von Getreide, Hülsenfrüchten, Ölsaaten, Kartoffeln, Rüben, Obst- und Gemüse anfallen eingesetzt und dienen als C-Quelle.
Als schwer utilisierbare Substratkomponenten werden vorteilhafter Weise Hammermühlen gemahlenes Getreide-, Raps- und Reisstroh, Reishülsen, Holzspäne oder Baumwollfasern eingesetzt.
Die schwer utilisierbaren Substratkomponenten haben die Aufgabe, die poröse Struktur des Schüttgutes bei der Feststoff-Fermentation auch bei fortschreitender Mycelentwicklung und bei ansteigender Substratfeuchte aufrecht zu erhalten, um die O_2-Versorgung und die CO_2-Entfernung zu gewährleisten sowie die Verdichtung und Aggregierung des Fermentationsgutes in Grenzen zu halten. Insbesondere wird durch diese wasserquellbare Substratkomponente ein Schüttgut mit sehr großer innerer Oberfläche erzeugt, sodaß in dem Substratgemisch für den Mycelbewuchs eine sehr viel größere Oberfläche zur Verfügung gestellt wird.
Diesem Substratgemisch werden in erforderlichem Umfang mikro- und Makroelemente wie N, P, K, Mg, Ca, Zn, Fe, u.a. in Form von Mineralsalzen zugegeben. Weiterhin werden durch Befeuchten mit Wasser auf 40 bis 80% Substratfeuchte die Voraussetzungen für ein gutes Wachstum der eingeimpften Mikropilze geschaffen.
Unter den Bedingungen der Feststoff-Fermentation kommt es auf dem gequollenen feuchten Substratgemisch zu raschen Massenvermehrung des Pilzmycels bei nahezu vollständiger Ausnutzung der leichtutilisierbaren Substratkomponenten, sodaß die verhältnismäßig schnell einsetzende C-Limitation die Sporulation auslöst.
Für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens eignen sich alle Hydrolasen bildende Mikropilze, insbesondere der Gattungen Geotrichum, Aspergillus, Trichoderma, Chaetomium, Fusarium, Penicillium, Gliocladium, Rhizopus in Mono- oder Mischkultur.
Nach 60 bis 120stündiger Fermentation bei 20 bis 45°C in einem Feststoff-Fermentor können nach dem erfindungsgemäßen Verfahren sehr hohe Sporenausbeuten, bezogen auf die Gewichtseinheit Trockensubstanz des eingesetzten Substratgemisches von 10^{10} Sporen/g Trockensubstanz erzielt werden.
Sofern nicht das schonend getrocknete Fermentationsgut der Feststoff-Fermentation als sporenhaltiges Material weiter verwendet wird, können die Sporen aus dem feuchten Fermentationsgut durch Auswaschen abgetrennt werden. Ein geringerer Teil der gebildeten Sporen kann auch aus der Abluft des Fermentors durch Filtration gewonnen werden.
Die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens bestehen darin, daß durch das Substratgemisch und die Bedingungen der Feststoff-Fermentation eine Massenproduktion von Pilzsporen möglich wird und das die Stoffwechselleistungen von neuerlich daraus kultiviertem Pilzmycel, wie z. B. das Enzymbildungsvermögen, in vollem Umfang erhalten bleiben, während bei submers produzierten Sporen diese Fähigkeiten häufig verlorengehen.
In dem nachfolgendem Beispiel ist die Erfindung näher erläutert.

Beispiel
In einem zylindrischen Feststoff-Fermentor von 40l Gesamtvolumen, der mit einer Einrichtung zum Rühren und einer Verdüsungseinrichtung für die Zugabe des Inokolums ausgerüstet ist, werden ein Gemisch aus 2kg Trockensubstanz (TS) hammermühlengemahlenem Weizenstroh von 0,2–1,0cm Partikelgröße und 2kg TS Weizenmehlnachfolgeprodukt eingebracht. Im Gemisch wird die Substratfeuchte auf 65% eingestellt. Nach der Sterilisation werden 100ml Inokolumsuspension des Pilzes Aspergillus terreus mit $1,2 \cdot 107$ Sporen/ml mit dem Substratgemisch gut vermischt. Danach wird bei einer Temperatur von 32°C und einem *p*H-Wert von 3,5 bis 6,0 stationär fermentiert. Das Fermentationsgut weist eine mittlere Schüttdichte von 0,1g TS/ml auf und wird während der Fermentation axial mit steriler wassergesättigter Luft begast. Der Verlauf der Kultivierung wird visuell und am CO_2-Abgasgehalt verfolgt. Nach 120Std. wird die Fermentation beendet. Die Sporen lassen sich über geeignete Filter leicht durch Auswaschen abtrennen.
Bezogen auf die utilisierbare Substrattrockenmasse beträgt die Sporenausbeute $1,9 \cdot 10^{10}$ Sporen/g TS.