



Republik  
Österreich  
Patentamt

(11) Nummer: **AT 395 847 B**

(12)

# PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1600/89

(51) Int.Cl.<sup>5</sup> : **C05G 3/00**

(22) Anmeldetag: 29. 6.1989

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 8.1992

(45) Ausgabetag: 25. 3.1993

(56) Entgegenhaltungen:

EP-A1-289417 WO-A1 86/04891

(73) Patentinhaber:

BIOCHEMIE GESELLSCHAFT M.B.H.  
A-6250 KUNDL, TIROL (AT).

(72) Erfinder:

PRETTEREBNER ROLF DIPL.ING.  
BREITENBACH, TIROL (AT).

(54) VERWENDUNG VON LACCASE UND LACCASE/ CELLULASE IN DER SPEISEPILZPRODUKTION

(57) Die Erfindung betrifft eine Wirkstoffmischung, bestehend aus dem Enzym Laccase oder einem Laccase/Cellulase-Gemisch in Kombination mit einer organischen Nährstoffquelle, z. B. mikrobieller Biomasse (wie Bakterienbiomasse), oder einer sonstigen proteinreichen Verbindung, z. B. aus der Ölproduktion (wie Sojaextrakte), Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung.

AT 395 847 B

Die Erfindung betrifft eine Wirkstoffmischung, bestehend aus dem Enzym Laccase oder einem Laccase/Cellulase-Gemisch in Kombination mit einer organischen Nährstoffquelle, z. B. mikrobieller Biomasse (wie Bakterienbiomasse), oder einer sonstigen proteinreichen Verbindung, z. B. aus der Ölproduktion (wie Sojaextrakte), Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung.

In der Fermentation anfallende Substanzen, z. B. Kulturfiltrate, Pilzmyzel, Bakterienbiomasse, werden durch eine Nachfermentation in Bakterienbiomasse umgewandelt. Die so gewonnene Bakterienbiomasse kann nach Filtration und schonender Trocknung als Pulver oder Granulat für eine Kompostverbesserung und als Nährstoffquelle eingesetzt werden. Neben einem hohen Gehalt an organischer Substanz, mindestens 50 % in der Trockensubstanz, und erheblichen Nährstoffgehalten, z. B. an Stickstoff (N) mehr als 4 %, Phosphor ( $P_2O_5$ ) mehr als 3 %, Kalium ( $K_2O$ ) mehr als 1 %, sowie ausgewogenem Spurenelementgehalt an Kupfer, Zink, Mangan, Eisen, Molybdän, Bor und anderen, sollte auch der hohe Gehalt an Vitaminen und Siderophoren hervorgehoben werden.

Diese Bakterienbiomasse, eingesetzt in der Kompostierung, ergibt einen hervorragenden Kompostverbesserer, eine ausgewogene Nährstoffquelle für die pilzliche, bakterielle und pflanzliche Entwicklung. Durch eine Kombination der Bakterienbiomasse mit dem Enzym Laccase oder mit einem Laccase/Cellulase-Gemisch werden synergistische Wirkungen erzielt.

Bei Anwendung von proteinreicher, organischer Substanz, z. B. von Sojaextrakten oder sonstiger Ölpreßrückstände mit hohem Eiweißgehalt, statt oder in Kombination mit Bakterienbiomasse werden in Kombination mit dem Enzym Laccase oder mit einem Laccase/Cellulase-Gemisch ebenfalls synergistische Wirkungen erzielt.

In der industriellen Kompostierung, z. B. in der Speisepilzproduktion (Agaricus), wird durch den Zusatz von aktiven, organischen Substanzen mit hohem Proteingehalt bzw. hohem Gehalt an organisch gebundenem Stickstoff (Bakterienbiomasse, Sojaextrakte, Ölpreßrückstände) eine deutliche Verbesserung des Kompostes und des Kompostierungsprozesses erzielt. Ein zusätzlicher Einsatz des Enzyms Laccase oder eines Laccase/Cellulase-Gemisches fördert das Wachstum z. B. bei Speisepilzen (Agaricus) hinsichtlich Menge und Zeit. Die eingesetzten aktiven organischen Substanzen (z. B. Bakterienbiomasse, Sojaextrakte) werden besser umgesetzt, rascher erschlossen und effizienter ausgenutzt.

Es entstehen durch den jeweiligen kombinierten Einsatz von Laccase und/oder Cellulase mit proteinreicher organischer Substanz, z. B. in der Speisepilzproduktion, gezielte bzw. gewünschte Produktionsabläufe. Die Dauer des Erntezyklus, die Erntemenge, die Pilzqualität, der Infektionsdruck und die geschmackliche Qualität der Speisepilze können gesteuert und verbessert werden.

Bei in der „Compost- und Casing-Methode“, z. B. bei Agaricus, üblichen Einmischung von durchwachsenem Champignonkompost in die Deckerde, wird durch die zusätzliche Anwendung des Enzyms Laccase oder eines Laccase/Cellulase-Gemisches in Kombination mit proteinreicher organischer Substanz (z. B. Bakterienbiomasse, Sojaextrakte oder sonstiger Ölsaarückstände) eine synergistische Wirkung hinsichtlich einer Verbesserung von Ertrag, Qualität und Produktionszeit erzielt. Auch bei der Anwendung des Enzyms Laccase oder eines Laccase/Cellulase-Gemisches ohne Kombination mit zusätzlich verabreichter, proteinreicher organischer Substanz wird ein deutlich verbesserter Ertrag, z. B. bei Speisepilzen (Agaricus), im Zuge der „Compost- und Casing-Methode“ erreicht. Bei Anwendung des Enzyms Laccase oder eines Laccase/Cellulase-Gemisches nach dem Decken auf die Deckerde wird ein erhöhter Ertrag, eine schnellere Ernte bei geringerem Infektionsdruck mit ausgezeichneter Qualität erzielt.

Bei Anwendung des Enzyms Laccase oder eines Laccase/Cellulase-Gemisches in Kombination mit proteinreichen organischen Substanzen, z. B. mit Bakterienbiomasse, werden diese Nährstoffe für das Wachstum von Speisepilzen (Agaricus) auch auf bisher für Pilze ungeeigneten Substraten in aufnehmbarer Form angeboten. Diese Eigenschaft bietet für die Speisepilzproduktion sowohl ökologisch als auch ökonomisch völlig neue Bedingungen an.

Das Enzym Laccase kann beispielsweise nach der von G. Sannia, P. Giardina, M. Luna, M. Rossi und V. Buonocore (Biotechnology Letters, Vol. 8, No. 11, 797-800, 1986) beschriebenen Methoden isoliert werden, das Enzym Cellulase kann beispielsweise nach dem von R. Doppelbauer, H. Esterbauer, W. Steiner, R. M. Lafferty und H. Steinmüller (Appl. Microbiol. Biotechnol., 1987, 26: 485-494) beschriebenen Verfahren hergestellt werden.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung erläutern, ohne jedoch ihren Umfang zu beschränken.

#### Beispiel 1:

Es wurden aus einer großtechnischen Champignonproduktionsanlage rein nach Zufall fertige Komposteinheiten gezogen. Zum Spicken des Kompostes wurden bis zu 2 % Bakterienbiomasse (bezogen auf feuchten Kompost = 68-69 % Wasser) verabreicht. Beim Andecken wurden das Enzym Laccase (5 g = 1250 Int. SA-U pro Quadratmeter) oder ein Laccase/Cellulase-Gemisch mit dem Gießwasser ausgebracht.

Folgende synergistische Reaktionen wurden erzielt:

Eine bis zu 5 Tagen frühere Ernte wurde bei der ersten Welle beobachtet. Schon nach der 2. Welle wurden die 100 % der Kontrollvariante durch die Enzym-Kombination Laccase-Cellulase in Verbindung mit der Bakterienbiomasse

überschritten. Den höchsten Ertrag erbrachte die Kombination Laccase mit der Bakterienbiomasse. Gleichzeitig wurde festgestellt, daß gegenüber der Kontrollvariante die enzymbehandelten Varianten weniger Infektionen und die Qualität einen sichtbaren Unterschied aufwiesen. Besonders die mit Laccase und Bakterienbiomasse behandelte Variante erbrachte geschmacklich und geruchlich die besten Resultate. Die genaueren Daten können aus Tabelle 1 und Abbildung 1 ersehen werden.

Beispiel 2:

Aus der gleichen großtechnischen Champignonproduktionsanlage wurden ebenfalls rein nach Zufall fertige Produktionseinheiten gezogen. Es wurde zum Spicken keine Bakterienbiomasse verabreicht. Beim Andecken wurde mit dem Gießwasser gleichzeitig Laccase (5 g = 1250 Int. SA-U pro Quadratmeter) verabreicht, ebenso Laccase/Cellulase.

Es wurde eine Wirkung der Enzyme hinsichtlich Ertragsverbesserung und Ernteverfrühung festgestellt. Die Werte lagen allerdings nicht so hoch wie bei der zusätzlichen Anwendung von Bakterienbiomasse. Eine geringere Anzahl von Infektionen wurde festgestellt, jedoch lagen geschmacklich und geruchlich keine Unterschiede vor. Die Qualität der Pilze wurde durch die Anwendung von Laccase oder eines Laccase/Cellulase-Gemisches deutlich verbessert. Genauere Daten sind aus Tabelle 2 zu ersehen.

Tabelle 1

Erntemengen in kg/m <sup>2</sup> und in % (Beispiel 1):								
Varianten	1. Welle		2. Welle		3. Welle		Summe	
	kg/m <sup>2</sup>	%	kg/m <sup>2</sup>	%	kg/m <sup>2</sup>	%	kg/m <sup>2</sup>	%
Kontrolle	3,069	13,3	12,925	56,2	7,020	30,5	23,014	100,0
Laccase	6,143	26,7 [20,2]	16,334	71,0 [53,8]	7,862	34,1 [26,0]	30,339	131,8 [100,0]
Cellulase	8,961	38,9 [37,2]	10,364	45,0 [43,0]	4,776	20,8 [19,8]	24,101	104,7 [100,0]
Laccase + Cellulase	9,719	42,2 [34,0]	14,077	61,2 [49,2]	4,830	21,0 [16,8]	28,626	124,4 [100,0]

Tabelle 2

Erntemengen in kg/m <sup>2</sup> und in % (Beispiel 2):								
Varianten	1. Welle		2. Welle		3. Welle		Summe	
	kg/m <sup>2</sup>	%	kg/m <sup>2</sup>	%	kg/m <sup>2</sup>	%	kg/m <sup>2</sup>	%
Kontrolle	11,994	53,3	9,463	42,1	1,050	4,6	22,507	100,0
Laccase + Cellulase	12,426	55,2 [48,8]	9,515	42,3 [37,3]	3,536	15,7 [13,9]	25,447	113,2 [100,0]

**PATENTANSPRÜCHE**

5

10 1. Wirkstoffmischung, bestehend aus dem Enzym Laccase oder aus einem Laccase/Cellulase-Gemisch und einer organischen Nährstoffquelle, zur Verbesserung der Speisepilzproduktion.

2. Wirkstoffmischung nach Anspruch 1 zur Verbesserung des Wachstums von Speisepilzen.

15

3. Wirkstoffmischung nach den Ansprüchen 1 und 2 zur Verbesserung des Wachstums von Agaricus.

4. Wirkstoffmischung nach den Ansprüchen 1 bis 3, worin die organische Nährstoffquelle eine proteinreiche Nährstoffquelle, wie Sojaextrakte oder Ölpreßrückstände, ist.

20

5. Wirkstoffmischung nach den Ansprüchen 1 bis 3, worin die organische Nährstoffquelle Bakterienbiomasse ist.

6. Verfahren zur Verbesserung der Speisepilzproduktion durch Einmischung von durchwachsenem Champignonkompost, **dadurch gekennzeichnet**, daß man das Enzym Laccase oder ein Laccase/Cellulase-Gemisch gegebenenfalls in Kombination mit einer zusätzlichen organischen Nährstoffquelle zusetzt.

25

7. Verwendung der Wirkstoffmischung nach den Ansprüchen 1 bis 6 zur Verbesserung der Speisepilzproduktion.

30

Hiezu 1 Blatt Zeichnung

35

40

45

50

55

Abbildung 1:  
Erntemengen in  $\text{kg/m}^2$  (Beispiel 1)

