(19) **BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

PATENTSCHRIFT

(12) **Ausschließungspatent**

(11) **DD 294 038 A5**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) **C 12 N 3/00**
A 23 C 19/32
C 12 R 1:80

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 12 N / 340 187 8 (22) 27.04.90 (44) 19.09.91

(71) Akademie der Wissenschaften, Patentabteilung, Otto-Nuschke-Straße 22/23, O - 1080 Berlin, DE
(72) May, Rudolf, Dr. rer. nat.; Große, Hans-Helmut, Dr. rer. nat.; Künkel, Waldemar, Dr. sc. nat.; Kunze, Bernd, DE
(73) Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, O - 6900 Jena, DE
(74) Akademie der Wissenschaften, ZIMET, Beutenbergstraße 11, O - 6900 Jena, DE

(54) Verfahren zur Herstellung pilzlicher Starterkulturen für Fermentationsprozesse

(55) pilzliche Starterkulturen; Pilzsporen; angefeuchtetes Festsubstrat; poröse Pellets; Naturfrucht-Mehle bzw. -Schrote oder Häckselgut; Zuschlagstoffe; Starterkulturen für fermentative Produktbildungs- und Reifungsprozesse; Lebensmittelindustrie

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung pilzlicher Starterkulturen in Form von Pilzsporen. Sie verfolgt das Ziel, solche Starterkulturen für fermentative Produktbildungs- und Reifungsprozesse (vorzugsweise in der Lebensmittelindustrie) in effektiver Weise herzustellen. Die dieser Zielstellung zugrunde liegende Aufgabe wird in der Weise gelöst, daß Mycel von sporulierenden Pilzen unter aeroben, kontaminationsfreien Bedingungen auf angefeuchtetem Festsubstrat kultiviert wird, wobei als Festsubstrat poröse Pellets mit einer Dichte von 0,2 g/cm³ bis 2,0 g/cm³ eingesetzt werden, die aus Naturfrucht-Mehlen oder -Schroten, aus Schnitzel- oder Häckselgut unter Einbezug von Zuschlagstoffen wie Malzextrakt oder Melasse zusammengepreßt worden sind. Nach der vorgeschlagenen Methode lassen sich pilzliche Starterkulturen im Vergleich zu den bisherigen Verfahren wesentlich kostengünstiger herstellen.

ISSN 0433-6461

3 Seiten

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung pilzlicher Starterkulturen für Fermentationsprozesse durch Kultivierung sporulierender Fungi unter aeroben, kontaminationsfreien Bedingungen auf angefeuchtetem Festsubstrat und durch Ernte der gebildeten Konidiosporen entweder trägergebunden oder mittels Abschwemmung, **gekennzeichnet dadurch,** daß man zur Kultivierung aus Naturfrucht-Mehlen oder -Schroten, aus Schnitzel- oder Häckselgut und aus Zuschlagstoffen zusammengepreßte, poröse Pellets verwendet, die eine Dichte von 0,2 g/cm^3 bis 2,0 g/cm^3 aufweisen.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch,** daß man die Pellets obiger Kennzeichnung aus solchen Mehlen oder Schroten bzw. aus solchem Häckselgut herstellt, die bzw. welches durch Vermahlung oder Zerschrotung von Getreidekörnern, von Hülsenfrüchten oder von Teilen von Kulturpflanzen entstehen bzw. entsteht.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch,** daß man die Pellets obiger Kennzeichnung unter Zusatz von Malzextrakt und/oder Melasse als Zuschlagstoffe herstellt.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1 bis 3, **gekennzeichnet dadurch,** daß man zur Kultivierung Pellets obiger Kennzeichnung verwendet, die bei einer äußeren Oberfläche zwischen 0,5 cm^2 und 60 cm^2 eine Dichte von 0,5 g/cm^3 bis 1,5 g/cm^3 aufweisen.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1 bis 4, **gekennzeichnet dadurch,** daß man zur Kultivierung Pilzmycel von Diaporthe carpinicola, Penicillium camembertii, Penicillium roquefortii, Penicillium chrysogenum bzw. Penicillium notatum heranzieht.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Pilzsporen. Diese werden als Starterkulturen bei Fermentationsprozessen für die biotechnologische Herstellung von Wirkstoffen (wie Penicillin) und beispielsweise in Käsereien bei der mikrobiellen Reifung von Weichkäse, Sauermilchkäse und Schnittkäse verwendet.
Das Anwendungsgebiet der Erfindung liegt somit primär in der pharmazeutischen und in der Lebensmittelindustrie.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Konidiosporen von Pilzen, die als Starterkulturen für Fermentationsprozesse dienen, werden bisher vorwiegend durch emerse Kultivierung dieser Pilze gewonnen, da in Submerskulturen nur selten Konidiosporen auftreten (DAHLBERG, Ann. Rev. Phytopathol. **20** [1982], 281–301; UGALDE u. PITT, Trans. British Myzol. Soc. **83** [1984], 547–555). Die emerse Kultivierung der Pilze erfolgt hierbei in entsprechenden Kulturgefäßen auf Nährmedien, die durch Agarzugabe verfestigt worden sind. Da in diesem Falle häufig stärkere Myzelrasen gebildet werden, die Ernte der Sporen aus den Kulturgefäßen durch Abschwemmen mit Lösungen (einschließlich Anwendung von mechanischen Hilfsmitteln) aufwendig ist und da die so gewonnenen Sporensuspensionen Myzelien sowie Nährbodenbestandteile enthalten, werden anstelle der Agarmedien neuerdings bevorzugt natürliche Festsubstrate eingesetzt. Bei emerser Kultivierung der Pilze auf derartigen Festsubstraten läßt sich überdies ein höherer Sporenertrag bei vereinfachtem Sporenerntemodus erzielen; die an den Festsubstraten fixierten Sporen sind besser konservierbar, und die Sporensuspensionen liegen in einem qualitativ besseren Zustand vor.
Als natürliche Festsubstrate werden vor allem geschälte und zerkleinerte Getreidekörner verwendet (LARROCHE u. GROS, Appl. Microbiol. Biotechnol. **24** [1986], 134–139; Patent DD 260837). Intakte Körner werden von vielen Pilzen jedoch kaum besiedelt. Zur Erzielung eines guten Pilzwachstums und hoher Sporenerträge müssen diese mechanisch behandelten Körner (wie beispielsweise Graupen) noch mit Nährstoffen benetzt werden, da die Myzelien vieler Pilze nicht in das kompakte Korn hineinwachsen können und damit ein großer Teil der im Korn vorhandenen Nährstoffe nicht zugänglich ist. Der intensive mechanische Aufschluß der Kornstruktur zu Schrot- und mehlartigen Produkten ermöglicht zwar ein gutes Pilzwachstum auch ohne Zuschlagstoffe, aber solche Substrate sind für Festsubstratfermentationen nicht geeignet (zu geringe innere Oberfläche). Die Nachteile dieser technischen Lösungen entstehen einmal dadurch, daß für die Benetzung der natürlichen Festsubstrate besondere Vorrichtungen notwendig sind, da beispielsweise Körner nur langsam Flüssigkeiten aufsaugen. Zum anderen müssen diese relativ feinkörnigen natürlichen Festsubstrate während der Kultivierung der Pilze häufig bewegt werden, um Verklumpungen zwischen Pilzmyzel und Substrat zu vermeiden. Auf verklumpten Festsubstraten ist die Sporenernte erschwert, und auch der Sporenertrag ist geringer. Andererseits schädigt eine zu intensive Umwälzung des Substrates das Myzelwachstum und die Sporulation.
Weiterhin ist die Anzucht von Penicillium roquefortii-Sporen unter Verwendung von kleinen Brotwürfeln als Festsubstrat beschrieben worden (MOEBUS u. TEUBER, Kieler milchwirtschaftliche Forschungsberichte **38** [1986], 255–264). Dieses Verfahren ist jedoch durch vergleichsweise hohe ökonomische Aufwendungen gekennzeichnet. In technologischer Hinsicht ist in ihm außerdem das Problem der strukturellen Instabilität der eingesetzten Substrate noch nicht befriedigend gelöst.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, pilzliche Starterkulturen für fermentative Produktbildungs- und Reifungsprozesse in effektiver Weise herzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein unaufwendiges Verfahren zur Züchtung von pilzlichen Starterkulturen für fermentative Produktbildungs- und Reifungsprozesse zu beschreiben, welches die Nachteile der bekannten Verfahren, die von natürlichen Festsubstraten ausgehen, vermeidet.
Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe in ihrem Grundzug gelöst, indem sporulierende Fungi unter aeroben, kontaminationsfreien Bedingungen auf sterilisiertem, angefeuchtetem Festsubstrat – und zwar auf porösen Pellets, die eine Dichte von 0,2 g/cm³ bis 2,0 g/cm³ aufweisen und aus Naturfrucht-Mehlen oder -Schroten, aus Schnitzel- oder Häckselgut unter Beifügung von Zuschlagstoffen gepreßt worden sind – kultiviert. Als Zuschlagstoffe werden hierbei solche an sich bekannten Substanzen wie Malzextrakt und/oder Melasse eingesetzt. Die Pellets werden aus den genannten Bestandteilen nach Befeuchtung zusammengepreßt. Sie sind nach der Trocknung bis auf einen Feuchtigkeitsgehalt von 10% bis 15% für einen langen Zeitraum (wenigstens für 9 Monate) lagerfähig.
Zu Beginn der Kultivierung werden die so hergestellten Pellets nach erfolgter Sterilisierung mit dem jeweiligen Pilz-Inokulum versetzt. Gleichzeitig wird durch Zugabe von – vorzugsweise durch Besprühen mit – sterilem Wasser bzw. von/mit steriler wäßriger Lösung, so beispielsweise mit Malzextraktlösung, die Feuchte der Pellets so bemessen, daß eine solche Myzel-Entwicklung gewährleistet wird, die nach einer Kultivierung bei Temperaturen im Bereich von 15°C bis 35°C und für die Dauer von 600 Stunden maximal eine gute Sporulation ermöglicht. Zur Kultivierung können gleichermaßen Roux-Kolben wie Fermentoren herangezogen werden. Während der Kultivierung werden die porösen Pellets in moderater Weise gerührt bzw. umgeschüttet. Diese Maßnahme wirkt einer Aggregation der Pellets entgegen, ohne daß dabei zwischenzeitlich die Ausbildung des Pilzmyzels sowie nachfolgend der Sporulationsprozeß beeinträchtigt werden.
Nach dem dargelegten Verfahren können in effektiver Weise pilzliche Starterkulturen gewonnen werden, wenn zur Kultivierung Myzel u. a. von Diaporthe carpinicola, von Penicillium camembertii, von Penicillium roquefortii, von Penicillium chrysogenum, von Penicillium notatum herangezogen wird.
In ihrer weiteren Ausgestaltung ist die Erfindung noch dadurch gekennzeichnet, daß die verfahrensgemäßen porösen Pellets aus solchen Mehlen oder Schroten bzw. aus solchem Häckselgut hergestellt werden, die bzw. welches durch Vermahlung oder Zerschrotung bzw. durch Zerstückelung von Getreidekörnern, von Hülsenfrüchten oder von Teilen von Kulturpflanzen (so von Getreidestroh oder von Kartoffelschnitzeln) entstehen bzw. entsteht.
Zur Kultivierung werden in der weiteren Ausgestaltung der Erfindung vorteilhaft Pellets obiger Kennzeichnung eingesetzt, die bei einer äußeren Oberfläche zwischen 0,5 cm² und 60 cm² eine Dichte von 0,5 g/cm³ bis 1,5 g/cm³ sowie einen Feuchtigkeitsgehalt von 10% bis 13% aufweisen.
Poröse Festsubstrate (Pellets) werden von vielen Pilzen völlig durchwachsen und damit im Vergleich zu natürlichen Festsubstraten besser verwertet. Dementsprechend erfolgt die Sporulation nicht nur an der Oberfläche, sondern auch im Inneren der Pellets und bewirkt so eine Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute bei der Gewinnung von Pilzsporen. Für die Herstellung poröser Pellets eignen sich nicht nur vollwertige Naturstoffe, sondern es können z. B. auch billige mehlartige Nebenprodukte der Mühlenindustrie verarbeitet werden. Notwendige Zuschlagstoffe lassen sich bei der Herstellung homogen und unaufwendig zumischen.
Poröse Pellets vereinfachen durch ihre Saugfähigkeit das Einbringen von Impflösungen. Solche Pellets können bei der Herstellung größer dimensioniert werden als die natürlichen Festsubstrata.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1
100 g Weizenmehl-Pellets (mittlere Dichte bei 1,39 g/cm³; Oberfläche zwischen 4,6 cm² und 5,0 cm²; Feuchtigkeitsgehalt 12%) werden in einen Roux-Kolben gegeben und zweimal für 45 Minuten im Abstand von 24 Stunden bei 121°C im Autoklaven sterilisiert. Nach Abkühlung auf 25°C werden die Pellets mit 20 ml einer Konidiosporen-Suspension (10^6 Sporen/ml) von Penicillium camembertii mittels einer Dosiervorrichtung beimpft. Die Kultivierung erfolgt bei 25°C und dauert 336 Stunden. Die Umwälzung der Pellets beginnt nach 72 Stunden durch Drehen des Roux-Kolbens unter Schütteln und wiederholt sich im Rhythmus von 48 Stunden bis zur 192. Kultivierungsstunde. von der 192. bis zur 336. Stunde werden die Pellets nicht mehr bewegt.
Am Ende der Kultivierung wird bei Verwendung von P. camembertii IMET 43823 ein Ertrag von 9×10^{10} Konidiosporen pro Roux-Kolben erhalten.
Die versporten Pellets werden aseptisch aus dem Roux-Kolben entnommen und unter kontaminationsfreien Bedingungen mittels Homogenisierung sowie sterilem destillierten Wasser zu Starterkulturen der an sich bekannten Konsistenz verarbeitet. Die Keimfähigkeit und Lagerfähigkeit der von den Pellets erhaltenen Konidiosporen unterscheidet sich nicht von Konidiosporen, die auf natürlichen Festsubstraten angezogen werden.

Beispiel 2
100 g zylindrisch geformte Gerstengraupenschrot-Pellets (mittlere Dichte 1,14 g/cm³, mittlere äußere Oberfläche 8 cm², Feuchtigkeitsgehalt 10%) werden in einen Roux-Kolben eingefüllt und zweimal für 45 Minuten im Abstand von 24 Stunden bei 121°C im Autoklaven sterilisiert.
Nach Abkühlung auf 25°C werden die Pellets mit 50 ml einer Konidiosporensuspension (4×10^7 Sporen/ml) einer Penicillium chrysogenum-Hochleistungsselektante (für die Benzylpenicillin-Bildung) mittels einer Dosiervorrichtung beimpft. Die Kultivierung erfolgt bei 25°C für die Dauer von 240 Stunden. Die Pellets werden nach jeweils 96, 144 und 192 Stunden durch mehrmaliges Drehen des Roux-Kolbens umgewälzt. Am Ende der Kultivierung wird ein Ertrag von $1,5 \times 10^7$ keimfähiger Konidiosporen pro Gramm Pellet (Feuchtgewicht) erhalten.
Die versproten Pellets sind als Starterkulturen der submersen Benzylpenicillin-Fermentation geeignet. Durch Zugabe von sterilem dest. H_2O und mittels Schütteln lassen sich die Pellets zu flüssigen Starterkulturen suspendieren. Diese werden unter kontaminationsfreien Bedingungen in den Vorzuchtfermenter bzw. die erste Schüttelkolbenpassage eingebracht.