



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **256 332 A1**

4(51) **C 12 N 1/14**
C 12 N 9/14

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 298 586 6

(22) 29.12.86

(44) 04.05.88

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD

(72) Klappach, Günter, Dr. rer. nat.; Weichert, Dieter, Dr. rer. nat.; Tannenberger, Klaus, Dipl.-Chem.; Meyer, Dietrich, Prof. Dr. sc. nat., DD

(54) **Verfahren zur Kultivierung von Pilzen zur Gewinnung von mikrobieller Biomasse und Stoffwechselprodukten**

(55) Feststoff-Fermentation, Kultivierung, Pilz, Biomasse, Enzym, Futtermittel, Mischkultur, Stoffwechselprodukt

(57) Das Verfahren ermöglicht die nahezu vollständige Biokonversion polymerer Substrate für die Massenvermehrung des Pilzmycels und die Bildung von Stoffwechselprodukten unter den Bedingungen der Feststoff-Fermentation. Es kann in der Industrie und Landwirtschaft zur Erzeugung von proteinhaltigen Futtermitteln und zur Gewinnung pilzlicher Stoffwechselprodukte angewendet werden. Gequollene feuchte Pflanzenbestandteile werden mit dem Mycel eines zur Bildung von Cellulasen, Hemicellulasen, Amylasen oder Pektinasen fähigen Pilzes beimpft und aerob fermentiert. Als externe Stickstoffquelle werden wasserlösliche Ammoniumsalze und zur Aufrechterhaltung eines pH-Optimums unlösliche Carbonate zugesetzt.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Kultivierung von Pilzen zur Gewinnung von mikrobieller Biomasse und Stoffwechselprodukten unter den Bedingungen der Feststoff-Fermentation, **gekennzeichnet dadurch**, daß gequollene feuchte Pflanzenbestandteile mit Nährstoffen vermischt und mit Sporen und/oder aktivem Mycel eines zur Bildung von Cellulasen, Hemicellulasen, Amylasen und/oder Pektinasen fähigen Pilzes beimpft und unter aeroben Bedingungen bei 25–45°C unter Aufrechterhaltung einer Substratfeuchte von 60–80°C fermentiert werden, wobei der auf die C-Quelle bezogene mögliche Umsatz durch Zugabe von wasserlöslichen Ammoniumsalzen als externer Stickstoffquelle und durch Zugabe von unlöslichen Carbonaten zum Ausgangssubstrat zur Aufrechterhaltung eines für den jeweils eingesetzten Mikroorganismus optimalen pH-Wertes herbeigeführt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß cellulose- und hemicellulosehaltige Materialien wie Getreidestroh, Zuckerstroh, Abfälle der Reis- oder Maisverarbeitung, Rübenschnitzel, Abfälle der Obst- und Gemüseverarbeitung und/oder stärkehaltige Materialien wie Getreide und dessen Verarbeitungsprodukte, Kartoffeln, Cassava, Maniok, Topinambur allein oder in Gemischen eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß die cellulose- und hemicellulosehaltigen Materialien vor ihrem Einsatz einer schonenden Vorbehandlung mit verdünnten Alkalilösungen unterzogen werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß Mischkulturen cellulolytischer, hemicellulolytischer, amylolytischer und/oder pektinolytischer Pilze eingesetzt werden.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Carbonat Erdalkalicarbonate eingesetzt werden.
6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, **gekennzeichnet dadurch**, daß die erzeugte Pilzbiomasse zur Gewinnung von intra- oder extracellulären Enzymen oder anderen Stoffwechselprodukten aufgearbeitet wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein biotechnisches Verfahren zur Kultivierung von Pilzen zur Gewinnung mikrobieller Biomasse und Stoffwechselprodukten unter den Bedingungen der Feststoff-Fermentation. Sie kann in der Industrie und Landwirtschaft zur Erzeugung von proteinhaltigen Futtermitteln, Enzymen, Aromastoffen u. a. pilzlichen Stoffwechselprodukten, zur Erzeugung von Pilzsporen, zum Abbau und zur Kompostierung von Abfällen angewendet werden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Für biotechnische Prozesse gewinnt der Einsatz erneuerungsfähiger Rohstoffe zunehmend an Bedeutung. Damit steht die Aufgabe, auch polymere Substrate der Pflanzenbestandteile, wie Cellulose, Hemicellulose, Stärke, Pektin u. a., die als land- und forstwirtschaftliche Produkte wie Stroh, Holz, Knollen- und Körnerfrüchte sowie Rückstände der Verarbeitung von Getreide, Rüben, Obst und Gemüse anfallen, für eine biotechnische Nutzung zu erschließen. Die Nutzung der o. g. Substrate zur Erzeugung von Hefen setzt den vorherigen Abbau zu Mono- oder Disacchariden voraus. Dies wird durch die hydrolytische Spaltung der polymeren Substrate im Pflanzenmaterial mittels Säuren, Laugen oder Enzymen erreicht. Im DD-WP 201694 wird cellulosehaltiges Material mit verdünnten Mineralsäuren oder Laugen bei höherer Temperatur 0,5–5 Stunden behandelt und dabei werden leicht utilisierbare Spaltprodukte für die anschließende Verhefung erzeugt. Auch in der DE-OS 3307076 wird ein Verfahren zur Erzeugung von Futterhefe und/oder Ethanol beschrieben, das eine vorherige Hydrolyse des cellulosehaltigen Materials mittels verdünnter Mineralsäuren voraussetzt. In der DE-OS 2823123 wird ein Verfahren vorgeschlagen, bei dem die Hydrolyse von polysaccharidhaltigem Abfallmaterial mittels einer Enzymlösung ausgeführt wird. Auch in der DE-OS 3340662 werden Pflanzenabfälle für die Herstellung eines proteinreichen Futtermittels mit einem Aufschlußmittel, das Cellulasen und Hemicellulasen enthält, versetzt und danach einem der Silierung vergleichbaren Prozeß unterworfen.

In allen diesen Verfahren ist es erforderlich, aus den pflanzlichen Polysacchariden niedermolekulare Spaltprodukte zu bilden, die die C-Quelle für die nachfolgende Verhefung darstellen. Dies geschieht in den meisten Fällen in einer separaten Verfahrensstufe und ist mit erhöhten Aufwendungen an Säuren, Laugen oder Enzymen für diese Hydrolyse sowie Anlagen- und Betriebskosten verbunden.

Demgegenüber sind Mikroorganismen mit cellulolytischen, hemicellulolytischen, amylolytischen und pektinolytischen Aktivitäten in der Lage, auf derartigen wasserunlöslichen polymeren Substraten zu wachsen, diese abzubauen und umzusetzen

und Stoffwechselprodukte zu bilden. Vor allem Pilze besitzen prinzipiell die Fähigkeit, diese Leistungen auch unter den Bedingungen der Feststoff-Fermentation zu erbringen. Im Gegensatz zur Submersfermentation, bei der die Nährlösungsbestandteile im Wasser gelöst bzw. dispergiert und die Mikroorganismen suspendiert werden, verzichtet die Feststoff-Fermentation auf die Überschüssige freie wäßrige Phase und läßt die Mikroorganismen auf dem hochgequollenen feuchten Substrat wachsen.

Für die Biokonversion polymerer Substrate mittels Pilzen unter den Bedingungen der Feststoff-Fermentation existieren noch keine technischen Lösungen.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist ein Verfahren zur direkten biotechnischen Verwertung von polymeren Pflanzenbestandteilen, mikrobielle Biomasse und Stoffwechselprodukte unter den Bedingungen der Feststoff-Fermentation zu gewinnen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist ein Verfahren, das den gleichzeitigen Abbau des polymeren Substrates durch die Mikroorganismen, deren Wachstum und Vermehrung und die Erzeugung von Stoffwechselprodukten unter den Bedingungen der Feststoff-Fermentation ermöglicht.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe so gelöst, daß das Pflanzenmaterial auf einen Feuchtegehalt von 60–80% gebracht und mit Nährstoffen für das Wachstum und die Vermehrung der Mikroorganismen versetzt wird, da die im Pflanzenmaterial neben den C-Quellen enthaltenen N-, P-, K- u. a. Quellen nur einen begrenzten Zuwachs erlauben würden, wobei als Stickstoff-Quelle ein wasserlösliches Ammoniumsalz dient.

In Abhängigkeit von den im Pflanzenmaterial enthaltenen polymeren Substraten werden Pilze mit bevorzugt cellulolytischen, hemicellulolytischen und/oder pektinolytischen Aktivitäten ausgewählt und Sporen und/oder aktives Mycel dieser Pilze als Impfmateriel dem Reaktionsgut zugesetzt. Um der während des Prozesses einsetzenden und fortschreitenden Säuerung entgegenzuwirken und einen für das Pilzwachstum sowie die Bildung und Wirkung der extracellulären Enzyme günstigen pH-Wert aufrechtzuerhalten, wird dem Reaktionsgut eine dem erwünschten Umsatzgrad angepaßte Menge eines unlöslichen Carbonates untergemischt. Der Zusatz von Erdalkalicarbonaten zum Ausgangssubstrat hat sich besonders bewährt.

Das Reaktionsgut wird zur Aufrechterhaltung aerober Verhältnisse mit strömender, befeuchteter Luft durchspült, und die Temperatur wird auf dem für den eingesetzten Mikroorganismus optimalen Wert gehalten. Ist der erwünschte Umsatz des polymeren Substrates erreicht, wird die Fermentation abgebrochen, das Reaktionsgut geerntet und zur Gewinnung der mikrobiellen Biomasse, der gebildeten Enzyme oder anderer Stoffwechselprodukte weiterverarbeitet. Bei einigen der eingesetzten Pflanzenbestandteile kann eine schonende Vorbehandlung z. B. mit verdünnten Alkalilösungen und/oder Wasser zur Erhöhung ihrer Akzessibilität nützlich sein, wobei nicht der Abbau der polymeren Substrate zu Spaltprodukten sondern im Falle lignocellulosehaltiger Substrate eine Lockerung des Cellulose-Lignin-Verbandes herbeigeführt wird.

Die Vorteile der erfindungsgemäßen Lösungen bestehen darin, daß durch den Zusatz von löslichen Ammoniumsalzen als externe Stickstoff-Quelle und von unlöslichen Carbonaten zur Aufrechterhaltung eines optimalen pH-Wertes eine nahezu vollständige Biokonversion der polymeren Substrate für die Massenvermehrung des Pilzmycels und die Bildung von Stoffwechselprodukten in einer Prozeßstufe möglich ist. Damit ist eine ökonomische Verwertung dieser Ausgangsmaterialien für die Erzeugung proteinhaltiger mikrobieller Biomasse, Enzymen und Stoffwechselprodukten gegeben. Anhand eines Ausführungsbeispiels wird die Erfindung näher erläutert.

Ausführungsbeispiel

Beispiel

In einem zylindrischen Feststofffermentor von 40l Gesamtvolumen, der mit einer Rührvorrichtung zum Umwälzen des Reaktionsgutes ausgestattet ist, werden unter sterilen Bedingungen 5,1 kg feuchtes Stroh nach Vorbehandlung mit 1%iger NaOH mit einem Wassergehalt von 79% im diskontinuierlichen Prozeß bei 32°C mit dem Pilz *Gliocladium* sp. fermentiert.

Vor dem Beimpfen des Reaktionsgemisches mit 10g Pilzmycel wurde das vorbehandelte feuchte Stroh mit 106g NH_4Cl , 24g KH_2PO_4 , 9g MgSO_4 sowie 92g CaCO_3 intensiv vermischt. Der Fermentor wurde während der Fermentation mit Wasser gesättigter steriler Luft begast. Die spezifische Begasungsintensität betrug 0,03–0,04l Luft/g feuchtes Stroh · Stunde.

Der Verlauf der Kultivierung wurde anhand des CO_2 -Gehaltes im Abgasstrom sowie durch visuelle Beobachtung verfolgt. Nach 24 Stunden war ein deutlicher Pilzbewuchs sichtbar, nach 7 Tagen wurde die Kultivierung beendet.

Das Reaktionsgemisch bestand neben Resten des Ausgangsmaterials vorwiegend aus Pilzmycel. Der Feuchtegehalt war von anfangs 79% auf 84% angestiegen. Das geerntete und getrocknete Endprodukt enthielt 30,1% mikrobielle Trockensubstanz. Der Rohproteingehalt des Endproduktes war 15,4%.