

597

*Sonderdruck aus der Fachzeitschrift*

# **„Der Champignon“**

*1000 Berlin 19, Marathonallee 8*

*Jahrgang 13, Nr. 143, Berlin, Juli 1973*

# Neues Verfahren der industriellen und nicht industriellen Brutherstellung für die Produktion von Speisepilzen auf der Basis von fermentiertem Substrat

von W. Huhnke, R. v. Sengbusch, F. Zadražil

Die heute übliche Methode der Brutherstellung für die Produktion von Speisepilzen, speziell *Agaricus bisporus*, hat LEMKE 1972 eingehend beschrieben. Wir wiederholen daher hier nur die wesentlichen Grundprinzipien des bekannten Verfahrens. Es werden die Nachteile und Gefahren dieses Verfahrens beschrieben und anschließend unser neues Verfahren der Brutherstellung vorgestellt.

Das klassische Verfahren der Brutherstellung beginnt mit der Keimung von Sporen des Kulturpilzes oder der Mycelerzeugung aus steril entnommenen „Gewebestücken“ von Fruchtkörpern. Die ersten Entwicklungsstadien führen über Wasser- oder Agarkulturen in Reagenzgläsern oder Petrischalen zu Mikrokulturen auf Getreidekörnern in Kolben oder Flaschen. Der gesamte Vorgang vollzieht sich nach den Grundsätzen der modernen mikrobiologischen Technologie.

Das Produkt ist die Basisbrut.

In der anschließenden Phase wird daraus die Gebrauchs- oder Produktionsbrut hergestellt:

1. Als Brut- oder Nährsubstrat werden Getreidekörner verschiedener Arten benutzt.
2. Die Körner werden in Wasser kurz gekocht oder gequollen.
3. Sie werden „oberflächlich“ getrocknet und es wird Kalk ( $\text{CaCO}_3$ ) und Gips hinzugefügt.
4. Das Material wird im Autoklaven,

bei mindestens  $121^\circ\text{C} = 1 \text{ atü}$  sterilisiert.

5. Anschließend wird es auf Impftemperatur unter  $30^\circ\text{C}$  abgekühlt

6. und mit „steriler“ Basisbrut (siehe oben) beimpft.

7. Nach dem Beimpfen durchspinnt das Mycel das Nährsubstrat im Brutraum bei geeigneten, kontrollierten Klimaverhältnissen.

8. Die völlig durchspinnene Brut wird bis zum Versand und zur Verwendung bei etwa  $0^\circ\text{C}$  kühl gelagert.

Ab Punkt 4, der Sterilisierung, bis einschließlich Punkt 8, der Lagerung, bis zur Verwendung der Brut dürfen keine Fremdinfectionen erfolgen. Für den Anbau-Erfolg ist es weiterhin wichtig, daß vom Durchspinnen über den Transport bis zur Verwendung als Spickmaterial alle schädlichen Einflüsse, zum Beispiel hohe Temperaturen, Verletzung der Umhüllung und andere mehr, streng vermieden werden.

Die Phase der Produktionsbrut-Herstellung erfordert einen erheblichen Aufwand an Apparaten, steril belüfteten und klimatisierten Räumen und stellt hohe Ansprüche an mikrobiologisch-technisch ausgebildetes Personal; das heißt, die Anforderungen, die sich bei der Herstellung der Basisbrut noch in kleineren Dimensionen halten, vergrößern sich auf das Vielfache und wachsen ins Überdimensionale, wenn große Mengen Produktionsbrut (zum Beispiel 1 bis 10 Millionen kg) hergestellt werden sollen.

Man kann schätzen, daß Betriebe, die 1 Million kg Brut erzeugen, mehr als 3 Millionen DM investieren müssen.

Trotz der zweifellos sehr sorgfältigen Arbeit der Bruthersteller haben wir wiederholt feststellen müssen, daß die im Handel befindliche Brut nicht immer den an sie zu stellenden Qualitätsanforderungen entspricht. (Sengbusch, R. v. 1973.) Wir fanden in Brutlieferungen mehr oder weniger häufig Unsterilitäten. Im Einzelfall waren bis zu 50 % der Einheiten einer Sendung mit Blauschimmel befallen.

Aufgrund der außerordentlich hohen Ansprüche, welche die modernen Verfahren der industriellen oder halbindustriellen Bruterzeugung an die Technik, an die apparative Ausrüstung, sowie an die Beherrschung der mikrobiologischen Techniken durch das Personal, einschließlich der notwendigen Kontrollmaßnahmen, stellen, kann man nicht unbedingt mit einem absolut fehlerfreien Produktionsablauf rechnen.

Die mit den heute üblichen Methoden hergestellte Brut ist, bedingt durch den großen Aufwand, relativ teuer. In der Pilzproduktion ist man bestrebt, die anfallenden Brutkosten zu senken. Insbesondere Großbetriebe sind interessiert an einer Verringerung der Produktionskosten durch niedrige Brutkosten.

Bei der Einführung des TILL-Verfahrens (Till, O., 1962) haben wir selbst die Eigenerzeugung der Brut aufnehmen müssen, weil bei diesem voll steril arbeitenden Verfahren die im Handel befindliche Brut wegen häufiger Unsterilität nicht zu verwenden war.

Wir beschäftigen uns heute mit der Frage, ob es möglich ist, Verfahren zu entwickeln, welche die Nachteile der heutigen Brutherstellung nicht besitzen:

1. Hohe Ausrüstungskosten und besonders qualifiziertes Personal,

2. dadurch bedingte teure Herstellungskosten der Pilze (rund 5 bis 10 % des Bruttogeldertrages der Pilzernte),

3. gelegentliche Unsterilitäten,

4. relativ langsames Mycelwachstum.

Um zu verstehen, wie wir zu unserem neuen Verfahren der Brutherstellung gekommen sind, geben wir einen kurzen Überblick über diejenigen unserer Champignon-Forschungsarbeiten, welche direkt oder indirekt die Problematik der Brutherstellung berühren.

Bei Beginn unserer Versuche, welche die Verbesserung des klassischen Anbauverfahrens, sowohl auf der Basis von Pferdemit als auch auf der von synthetischem Kompost auf Strohbasis, zum Ziel hatten, wurde die Bedeutung der Erhöhung der Impfstellenzahl erkannt. Diese Erkenntnis führte zur Entwicklung des Aktivmycel-Spickverfahrens (Huhnke, W., u. Sengbusch, R. v., 1960). Das Prinzip dieses Verfahrens besteht darin, daß steril hergestellte Brut auf geeignetem Substrat (Kompost oder TILL-Substrat) zwischenvermehrt wird und danach mit einer etwa 10fach größeren, nun unsterilen, Brutmenge gegenüber normal zum Spicken des Substrats für die Pilzproduktion benutzt wird. Das Ergebnis sind schnellere, höhere und sichere Erträge als bei der üblichen Beimpfung mit relativ geringen Mengen normaler klassischer Körnerbrut (Huhnke, W., 1961).

Aber weder die Verbesserung der klassischen Substratherstellung noch die Anwendung des Aktivmycel-Spickverfahrens führten zu einer Revolutionierung des Anbausystems oder zu wesentlichen Ertragssteigerungen.

Einen bedeutenden Fortschritt brachte die Entwicklung des TILL-Verfahrens (Huhnke, W., Lemke, G., und Sengbusch, R. v., 1967). Bei diesem Verfahren wird das Substrat steril hergestellt, und das anschließende Beimpfen und Durchwachsen des Mycels bis zum Decken erfolgen unter absolut sterilen

Bedingungen. Dieses „Steril-Anbauverfahren“ brachte mit 40 % und mehr Pilzausbeute vom Substratgewicht einen beachtlichen Fortschritt in der Ertragsleistung gegenüber allen bisherigen Anbauverfahren; dazu die Unabhängigkeit vom Pferdemit als Grundlage für das Nährsubstrat.

Für die Anwendung in der Praxis erwies sich das Verfahren aber als zu aufwendig, sowohl in den Kosten als auch in den hohen Anforderungen der sterilen Arbeitstechnik. Die absolute Sterilität ist nur unter den gleichen Schwierigkeiten zu erreichen, wie wir diese bei der Brutherstellung sehen.

Einen neuen Weg zeigte das Fermentations-Anbauverfahren nach HUHNE (Huhnke, W., 1972). Dabei wird TILL-Substrat auf etwa 100° C erhitzt (partielle Sterilisierung), danach mit spezifischen thermophilen Mikroorganismen beimpft und mittels des sich anschließenden kontrollierten Fermentationsprozesses im Substrat ein antibiotischer Effekt gegenüber den Konkurrenzorganismen des Champignons bewirkt. Das fermentierte Substrat kann nun in offener unsteriler Technik weiter behandelt werden. Außerdem wird das Wachstum des eingeimpften Champignonmycels in fermentiertem Substrat deutlich gefördert.

Das Fermentationsverfahren liefert Erträge von 25 bis über 30 % des Substratgewichts. Weitere Vorteile unter anderem: Zeitgewinn durch den Fortfall der Kompostierung und zusätzliche Kulturzeitverkürzung bei Anwendung des Aktivmycelspickverfahrens, wobei Spicken und Decken in einem Arbeitsgang erfolgen.

Das Verfahren der Fermentation des Substrats nach HUHNE wurde zum Modell und gab den Anstoß, nach dessen Prinzipien ein neues Verfahren für die Brutherstellung zu entwickeln. Zunächst studierten wir die verschiedenen Wirkungen der Fermentation auf das Brutsubstrat und stellten fest, daß

1. auch bei Brutsubstrat eine anaerobe Fermentation mit thermophilen „Mikroorganismen“ im Anschluß an eine „Sterilisierung“ die Ausschaltung der konkurrierenden Pilzflora zur Folge hat,

2. nach der Sterilisation und anschließenden Fermentierung im fermentierten Getreide-Körnermaterial vorhandenes Mycel von Konkurrenzpilzen abgetötet ist und vorhandene Pilzsporen praktisch am Keimen gehindert werden,

3. auf autoklaviertem Körnermaterial Pilzsporen überleben und keimen können,

4. nach dem Autoklavieren aufgebraachte Sporen keimen und Pilzmycel sich entwickelt,

5. bei Beimpfung von autoklavierten als auch von fermentierten Körnern mit Pilzmycel dieses auf beiden Substraten wächst,

6. die erhöhte Geschwindigkeit des Mycelwachstums auf fermentierten Körnern eine gute Belüftung erfordert,

7. während des Wachsens des Pilzmycels das Wachsen bzw. die Vermehrung von Bakterien gehemmt sein kann,

8. je schneller sich das Kulturpilzmycel entwickelt, das Bakterienwachstum um so eher aufhört,

9. die Wuchsgeschwindigkeit des Mycels der verschiedenen Pilzarten sehr unterschiedlich ist,

10. wenn das zum Beimpfen benutzte Pilzmycel, zum Beispiel vom relativ langsam wachsenden *Agaricus bisporus*, mit Mycel anderer schnellspinnender „Unkraut“- bzw. „Konkurrenz“-Pilze, wie zum Beispiel Schimmel, verunreinigt ist, die Konkurrenzpilze die Oberhand gewinnen können,

11. auf nur autoklaviertem Brutsubstrat sich neben dem Mycel des zu kultivierenden Pilzes sowohl Sporen als auch Mycel von Konkurrenzpilzen entwickeln können, das heißt, „auto-

klavierte“ Brut muß vor der Verwendung auf Freiheit von Konkurrenzorganismen geprüft sein,

12. bei der Brutherstellung nach der „Fermentationsmethode“ der apparative und personelle Aufwand sehr viel geringer ist als bei der „Autoklaviermethode“,

13. fermentierte Brut, die ursprünglich mit autoklavierter Brut beimpft wurde und bei der Prüfung „unkrautfrei“ ist, noch einige Male auf fermentiertem Körnersubstrat vermehrt werden kann,

14. es sich empfiehlt, die Beimpfung mit einem prozentual höheren Anteil von Brut vorzunehmen, wenn die Pilzarten langsames Mycelwachstum als normal haben,

15. wenn das Körnerbrutsubstrat vollkommen vom Mycel durchwachsen ist, die Bakterien der „Fermentierbrut“ nicht als Konkurrenzorganismen anzusehen sind,

16. fermentierte Brut, aufgrund der geringeren Infektionsgefahr durch Konkurrenzorganismen, in größeren Einheiten erzeugt werden kann (autoklavierte Brut wird wegen der Infektionsgefahr immer noch in kleinen Einheiten beimpft und hergestellt).

Diese Ergebnisse unserer Versuche ergeben die Grundlage für ein neues Verfahren der Bruterzeugung auf Getreidekörnern und gegebenenfalls auch auf anderen Substraten.

Es beginnt damit, daß Getreidekörner oder andere geeignete Substrate nach der üblichen Zugabe von Kalk und Gips + etwa 100 % Wasser, entweder mit 121 °C autoklaviert oder mit 100 °C gekocht oder erhitzt werden.

Nach dieser Vorbehandlung werden dem Substrat thermophile Mikroorganismen zugemischt. In einfacher Weise durch Zugabe von zerkleinertem Stroh oder Heu (diese Materialien sind natürliche Trägerstoffe von Mikroorganismen, aus denen die thermophilen Mikroorganismen während des Fer-

mentationsprozesses heraus selektiert werden) oder in fortgeschrittener Technik durch Zugabe von spezifischem Impfmateriale, welches bei optimalen Fermentationsbedingungen vorselektiert worden ist und in aktiven Kulturen oder konserviert im Lager bereit gehalten werden kann.

Nach der Beimpfung wird die semi-aerobe Fermentation bei kontrollierten, gesteuerten Temperaturen, etwa 55 bis 60 °C, in geschlossenen Behältern (Gefäße, Beutel oder dergleichen) für mehrere Tage, im Optimum vier Tage, durchgeführt. Abschließend wird das fermentierte Substrat auf unter 30 °C abgekühlt und mit Pilzmycel des Kulturpilzes beimpft, wobei dieses Mycel nach dem klassischen Verfahren „steril“ oder auch nach dem neuen Fermentationsverfahren sauber hergestellt sein kann.

Die Beimpfung selbst sollte in einem „Reinluftraum“ vorgenommen werden, so daß verhindert wird, daß Konkurrenzorganismen mit auf das fermentierte Brutssubstrat gelangen.

Das anschließende Durchwachsen des Substrats vom Mycel kann bei kleinen Einheiten bei passiver Belüftung erfolgen, große Einheiten sollte man aktiv belüften. Die Filterung der Luft ist selbstverständlich.

Gelegentliches Schütteln des wachsenden Substrats kann das Anwachsen beschleunigen und zu einer lockeren Struktur beitragen. Das schnelle Durchwachsen des Mycels auf fermentiertem Substrat erlaubt es, in kurzer Zeit den gleichen Vermehrungsprozeß zu wiederholen und dadurch schneller und größere Brutmengen als bisher beim klassischen Verfahren zu gewinnen.

Unsere bisherigen Versuchsergebnisse deuten an, daß die Brutherstellung nach dem neuen Fermentationsverfahren gegenüber dem bisher üblichen sterilen Verfahren bedeutsame Vorteile aufweist. Dies betrifft vor allem

die Möglichkeit, die Gebrauchs- oder Produktionsbrut anstelle der heute gewohnten Kleinstmengen von 1 bis 3 kg-Einheiten in recht großen Einheiten herzustellen.

Weiter besteht die berechtigte Hoffnung, daß die Brut in Zukunft in kontinuierlichem Verfahren erzeugt werden kann. Die kontinuierliche Arbeitsweise wird dadurch möglich, daß es unter gewissen Voraussetzungen nicht notwendig ist, die Diskontinuität, welche sich beim Autoklavieren des Brutsubstrats mit 121 °C und Überdruck zwangsläufig ergibt, in Kauf zu nehmen, sondern es genügt die Erhitzung auf etwa 100 °C drucklos; denn die Aufgabe des Erhitzens ist nicht so sehr die totale Abtötung aller Sporen, sondern in erster Linie die Abtötung des Mycels konkurrierender Pilze. Die restlichen Sporen werden durch das wirksame Prinzip der anschließenden Fermentation an der Keimung gehindert.

Der Fermentationsprozeß, mit seinen spezifischen Ansprüchen, läßt sich in rotierenden Trommeln mit Flüssigkeitsmantel wirkungsvoll steuern. Die anschließende Anwuchsphase kann in weiteren rotierenden Trommeln den Temperatur- und Belüftungsansprüchen des wachsenden Mycels optimal angepaßt erfolgen.

Die insgesamt verbesserten technologischen Möglichkeiten der Brutherstellung nach der neuen Fermentationsmethode könnten zur Rationalisierung und damit größeren Wirtschaftlichkeit der Bruterzeugung gegenüber dem klassischen Verfahren entscheidend beitragen und müßten sich letzten Endes in einer Verbilligung der Brut für den Anbauer auswirken.

Bei der Entwicklung des neuen Verfahrens wurden die Versuche zur Bruterzeugung, mit dem relativ langsam spinnenden und bezüglich Nährstoffen anspruchsvollen Champignon (*Agaricus bisporus*) und dem schnell spinnenden, relativ anspruchslosen Pilz

Pleurotus, Typ Florida FovoSe® (Zadrazil, F., u. Schneiderei, M., 1972), durchgeführt. Das Verfahren erwies sich sowohl für den langsam spinnenden, anspruchsvollen Champignon, als auch für den schnellspinnenden Pleurotus als geeignet. Bei dem letzteren ist der Myceldurchwuchs nach der neuen Methode, je nach Anwuchstemperatur, bereits in drei bis sechs Tagen abgeschlossen und als Produktionsbrut gebrauchsfertig.

Um die praktische Brauchbarkeit der „fermentierten“ Brut im Anbau unter Beweis zu stellen, haben wir einen Versuchsanbau zwecks Ertragsvergleich zwischen „autoklavierter“ steriler Brut und „fermentierter“ Brut von *Agaricus bisporus* durchgeführt. Für diesen Versuch wurde der eigene blonde Stamm „X1“ (Züchtung FRITSCHKE, Max-Planck-Institut), benutzt. Zur Erzeugung der Versuchsbrut diente steril angezogenes Impfmateriale dieses Stammes, einheitlich für beide Brutherstellungsverfahren. Der Anbau erfolgte auf nach dem HUNNKE-Fermentationsverfahren hergestellten Substrat in 2 × 15 Kisten mit je 0,5 Quadratmeter Erntefläche und 25 kg (= 50 kg/m<sup>2</sup>) Substratfüllung.

Der Myceldurchwuchs während der zwei Wochen Anwuchszeit verlief für beide Brutherstellungsarten völlig normal, ohne sichtbare Unterschiede. Auch die erste Erntewelle brachte mit 8,561 kg/m<sup>2</sup> für die „steril“ erzeugte Brut und 8,639 kg/m<sup>2</sup> für die „fermentierte“ Brut praktisch keine Ertragsdifferenzen. Im weiteren Ernteverlauf lagen die Ertragskurven stets parallel und auf gleicher Höhe (Tabelle 1).

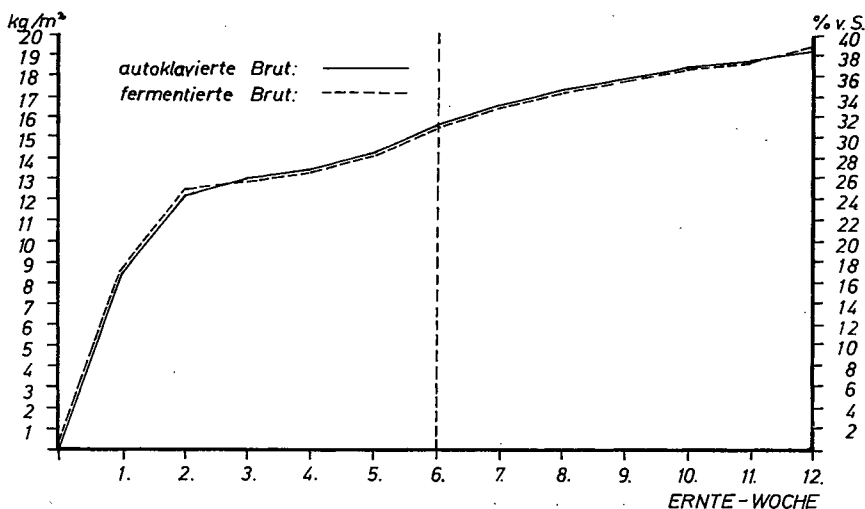
Nach den heute allgemein üblichen sechs Erntewochen betrug das Ergebnis:

„sterile“ Brut = 15,8 kg\*/m<sup>2</sup> = 31,6 % vom Substratgewicht

„fermentierte“ Brut = 15,6 kg\*/m<sup>2</sup> = 31,2 % vom Substratgewicht

(\* = abgeschnittene Pilze)

Tabelle 1



Ertragsvergleich zwischen „autoklavierter“ und „fermentierter“ Brut

Beide Brutarten desselben Zuchtstammes haben also praktisch den gleichen Pilzertrag erbracht. Die Brauchbarkeit von „fermentierter“ Brut wurde damit bestätigt.

Der absolut gesunde Kulturzustand des Versuchs nach sechs Erntewochen, bei beiden Brutarten, erlaubte es, den Versuch bis zu 12 Erntewochen fortzusetzen. Durch die zeitliche Ausdehnung des Versuchs sollte geprüft werden, ob gegebenenfalls in der „fermentierten“ Brut doch noch latent vorhandene Konkurrenzorganismen sich allmählich entwickeln und ertragsschädigend auswirken könnten. Bis zum Versuchsende folgte die „fermentierte“ Brut der Vergleichsbrut auf gleicher Ertragshöhe (Tabelle 1). Bei Versuchsschluß, nach zwölf Wochen, waren die Kulturen beider Brutarten noch gleichwertig gesund. Das Endergebnis nach zwölf Wochen betrug:

„sterile“ Brut =  $19,4 \text{ kg}^*/\text{m}^2 = 38,8\%$  vom Substratgewicht

„fermentierte“ Brut =  $19,4 \text{ kg}^*/\text{m}^2 = 38,8\%$  vom Substratgewicht.

Auch das Endergebnis bestätigt, daß die nach dem neuen „Fermentationsverfahren“ hergestellte Produktionsbrut die in der praktischen Pilzerzeugung zu fordernden Ertragsleistungen voll erfüllt.

Methodisch wird man an dem neuen Verfahren noch weiterarbeiten müssen, besonders wenn man „fermentierte“ Brut in größerem Umfang verwenden will.

\*

Wir danken Frau Schneiderei für die technische Betreuung bei der Entwicklung dieses neuen Brutherstellungsverfahrens.

Literatur

Huhnke, W. und Sengbusch, R. v. 1960  
Das Aktivmycel-Spickverfahren als Grundlage für das Aktivmycel-Anbauverfahren.

Deutsche Gartenbauwirtschaft, 8. Jg., Heft 11

Huhnke, W. 1961

Erfahrungen bei der Verwendung des Aktivmycel-Anbauverfahrens.

Deutsche Gartenbauwirtschaft, 9. Jg., 11 : 237-239

Huhnke, W., Lemke, G. und Sengbusch, R. v. 1967

Die III. Phase der Entwicklung des Champignon-Anbauverfahrens auf nicht kompostiertem sterilem Nährsubstrat.

Die Gartenbauwissenschaft, 32. Band, 6 : 485-502

Huhnke, W. 1972

Die Weiterentwicklung des Champignon-Anbauverfahrens auf nicht kompostiertem Nährsubstrat.

Mushroom Science VIII : 503-515

Lemke, G. 1972

Praktische Erfahrungen bei der Champignon-Brutherstellung.

Der Champignon, 126 : 5-23

Sengbusch, R. v. 1973

Ist eine Qualitätskontrolle bei Champignonbrut notwendig?

Der Champignon, 137 : 5-7

Till, O. 1962

Champignonkultur auf sterilisiertem Nährsubstrat und die Wiederverwendung von abgetragenen Kompost.

Mushroom Science V : 127-133

Zadražil, F. und Schneiderei, M. 1972

Die Grundlagen für die Inkulturnahme einer bisher nicht kultivierten Pleurotus-Art.

Der Champignon, 135 : 25-32