

Versuche zur mikrobiellen Eiweißzeugung aus pflanzlichen und tierischen Kohlehydraten

Von A.G. Meiering, F.A. Azi und K.F. Gregory,
Guelph, Kanada*)

DK 663.1:636.085

In einem interdisziplinären Forschungsprogramm wurde das Ziel verfolgt, eine technisch einfache Gäranlage für die Gewinnung mikrobiellen Eiweißes aus Nebenprodukten der Nahrungsmittelindustrie oder aus pflanzlichen Kohlehydraten zu entwickeln. Dabei dienten das Modell der Molkevergärung und das Prinzip der Waldhofgäranlage als Ausgangsbasis. In ausgedehnten Versuchen wurde nachgewiesen, daß eine Strahlenpilzkultur in einem Tapiokasubstrat mit ungefilterter Luftzufuhr bei hoher Temperatur und niedrigem pH-Wert wachsen und mit einfachen Filtriergeräten getrennt werden kann. Fütterungsversuche mit Ratten hatten ein positives Ergebnis.

1. Einleitung

Die mikrobielle Eiweißzeugung aus Nebenprodukten der Lebensmittelindustrie oder aus Abgasen der Petrochemie sind Beispiele für neubeschrittene Wege der Abfallverwertung [1 bis 5]. Ähnliche Verfahren, die mit ursprünglichen pflanzlichen Kohlehydraten arbeiten, bieten beachtliche Entwicklungsmöglichkeiten in den verschiedenen Zweigen der Nahrungsmittelproduktion. Größere Aufmerksamkeit erfährt gegenwärtig die Zellulosevergärung mit vorherigem verfahrenstechnischem Aufschluß oder auch mit Spezialkulturen, die mit eigenen Enzymen die Zellulosemoleküle spalten können [2, 6, 7]. Spezialkulturen könnten neue Wege der Abfallverwertung für Massentierhaltungen eröffnen. Unkomplizierte Gäranlagen und -verfahren bieten die Möglichkeit der Eiweißanreicherung für pflanzliche Kohlehydratfuttermittel im landwirtschaftlichen Betrieb oder in der Futtermittelindustrie [8 bis 11].

Thermophile Strahlenpilze, die Kolonien aus fadenförmigem Myzel bilden, eignen sich aus technischen Gründen am ehesten für einfache Gäranlagen. Ihre Enzyme greifen eine größere Anzahl von Kohlehydraten einschließlich Stärke und in einigen Fällen auch Zellulose an. Sie wachsen bei Temperaturen über 40 °C und pH-Werten unter 3,5, einem Milieu, in dem mit dem Luftstrom eingebrachte Fremdkeime keine Konkurrenz in der Gäranlage bieten können. Die Anlage kann daher ohne komplizierte Geräte und ohne den für sterilen Betrieb notwendigen Aufwand auskommen. Außerdem genügen einfache Filtrieranlagen mit grobporigen Filtern zur Abtrennung der Biomasse. Weitere genetische Arbeiten sind allerdings erforderlich, um stabile und für den menschlichen und tierischen Organismus ungefährliche Mutanten mit hohem Nährwert zu entwickeln.

Im Jahre 1971 wurde an der Universität Guelph ein interdisziplinäres Forschungsprogramm aufgestellt, das sich mit der mikrobiellen Eiweißzeugung aus Tapioka, einer tropischen Wurzelfrucht, befaßte. Nebenher lief ein Programm der Molkevergärung, das in Zusammenarbeit mit der milchverarbeitenden Industrie im Streben nach einer sinnvollerer Abfallverwertung begonnen wurde.

Das im folgenden Artikel beschriebene Forschungsprojekt über mikrobielle Eiweißproduktion wurde vom International Development and Research Centre als Vertragsforschung finanziert. Zusätzliche Forschungsmittel wurden vom National Research Council der kanadischen Bundesregierung zur Verfügung gestellt.

*) Dr. A.G. Meiering ist Associate Professor für Food Engineering in der School of Engineering der University of Guelph, Ontario, Kanada. Dr. F.A. Azi war wissenschaftlicher Mitarbeiter in der gleichen Abteilung und ist jetzt Mitglied der Engineering Division des Ministry of Agriculture and Natural Resources in Enugu, Nigeria. Dr. K.F. Gregory ist Professor im Department of Microbiology der University of Guelph und Koordinator des Forschungsprojektes "Microbial Protein Production".

Das Tapioka-Projekt wurde im Rahmen eines Forschungsvertrages mit dem International Development and Research Centre und in Zusammenarbeit mit dem Centro International de Agricultura Tropical in Angriff genommen und hatte die Erzeugung eines vollwertigen Schweinefutters auf Tapiokabasis für die mittel- und süd-amerikanische Landwirtschaft zum Ziel.

2. Entwicklung der Gäranlage

In Anlehnung an das Waldhofprinzip [12] wurde der in **Bild 1** dargestellte Typ einer Gäranlage konstruiert, die sowohl mit Molke als auch mit dem Tapiokasubstrat betrieben wurde. Durch eine zentral angeordnete Rohrwellen d wird die Luft in dieser Anlage über ebenfalls aus Rohren gefertigte Rotorarme h an die Austrittsstellen hinter den Rotorblättern g geleitet, aus denen sie in fein verteilten Blasen in das Substrat gesaugt wird. Der Rotor fungiert gleichzeitig als Belüftungsaggregat und als Rührwerk für den Umlauf des Gärmediums. Die Fließrichtung ist innerhalb des doppelwandigen Zentralrohrs i , das mit Dampf als Heizaggregat und mit Wasser als thermostatisch gesteuertes Kühlaggregat dient, nach unten gerichtet. Die Rotationsbewegung des außen zwischen Zentralrohr und Behälterwand aufwärts fließenden Gärmediums wird aus Mischungsgründen erst auf halbem Wege durch Umlenkbleche aufgehoben. Nach den ersten Versuchen mit einem Labormodell mit einem 2 l großen Gärraum wurden weitere Anlagen mit 20 l, 120 l, 200 l und 3000 l Gärraum im gleichen Abmessungsverhältnis von $d_F/h_0 = 0,58$ gebaut. Daneben wurde eine Anlage zum Abtrennen der Strahlenpilzkulturen zur Praxisreife entwickelt.

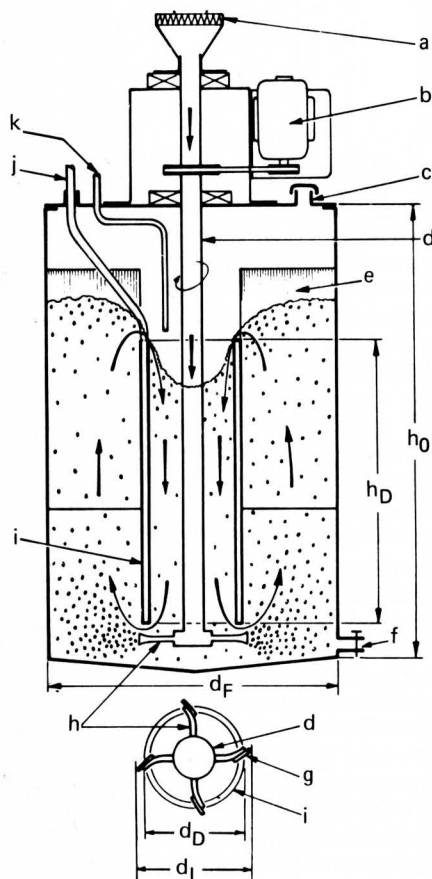


Bild 1. Gärbehälter.

- | | |
|---------------------|--|
| a Filter | g Rotorblätter |
| b Motor und Antrieb | h Rotorarme |
| c Auslaßventil | i doppelwandiges Zentralrohr |
| d Hohlwelle | j Anschlüsse für Heiz- und Kühlleitungen |
| e Umlenkbleche | k Substratzufuhr |
| f Auslaß | |

Die Belüftungskapazität des Rotors wurde in der 20-Liter-Anlage getestet. Luftdurchsatz Q und Leistungsaufnahme P , die sich mit den gemessenen Daten leicht als folgende empirische Gleichungen [13]

$$Q = c_1 d_1^4 n^3 \quad (1)$$

$$P = c_2 d_1^4 n^{2,5} \quad (2)$$

definieren lassen, sind in **Bild 2** in Abhängigkeit von der Rotordrehzahl mit dem Rotordurchmesser als Parameter dargestellt. Die Ergebnisse der mit Wasser durchgeführten Versuche zeigten, daß der auf das Flüssigkeitsvolumen bezogene Luftdurchsatz sowohl mit der Drehzahl als auch mit der Höhe des Flüssigkeitsspiegels im Gärraum zunahm [13, 14]. Letztere Tendenz galt selbstverständlich nur bis zum Erreichen eines Gleichgewichtes zwischen Druckpotential des Rotors und Flüssigkeitshöhe.

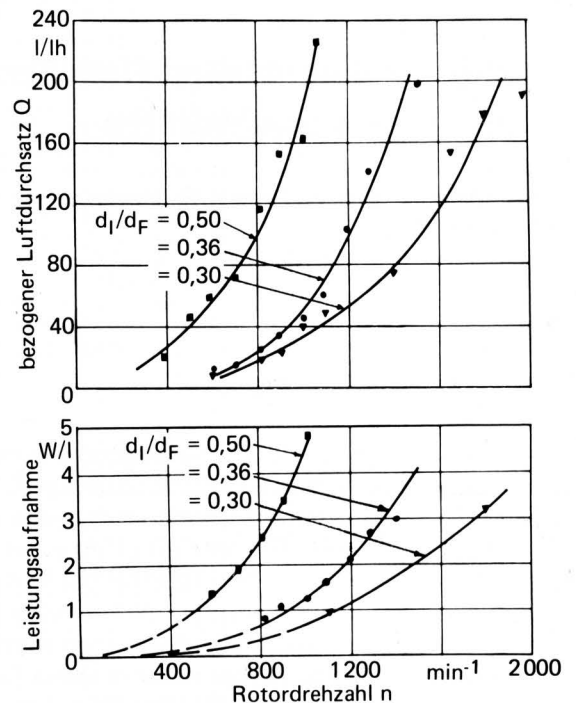


Bild 2. Auf das Flüssigkeitsvolumen bezogene Werte von Luftdurchsatz und Leistungsaufnahme in Abhängigkeit von der Rotordrehzahl mit dem Rotordurchmesser als Parameter.

Gärraum 20 l, Medium: Wasser,
Maße der Anlage: $h_0 = 0,45$ m $d_F = 0,3$ m
 $h_D = 0,30$ m $d_D = 0,1$ m

Bild 3 zeigt, daß die Leistungsaufnahme pro Liter Medium bei gleichem bezogenen Luftdurchsatz mit dem Rotordurchmesser zunimmt. Gleichzeitig verringert sich die absolute Geschwindigkeit der Rotorblätter. Bei einem Rotordurchmesser von $d_1/d_F = 0,36$ wurde für Füllhöhen zwischen $0,67 h_0$ und $0,75 h_0$ ein zufriedenstellendes Umlaufen und Mischen des Mediums in Verbindung mit einem genügend hohen Luftdurchsatz in einem Drehzahlbereich zwischen $n = 800$ und 1600 erreicht. Höhere Drehzahlen kleinerer Rotoren würden die konvektiven Austauschvorgänge durch günstigere Nu-Zahlen und kleinere Blasengrößen, die eine größere spezifische Oberfläche schaffen, verbessern. Sie würden aber auch höhere Scherkräfte an den Rotorblättern erzeugen, die besonders im Anfangsstadium der Gärung das Wachstum der wegen ihrer fadenförmigen Struktur empfindlichen Strahlenpilze gefährden.

Die Leistungsaufnahme des mittleren Rotors mit $d_1/d_F = 0,36$ war um 5 % höher als beim kleineren Rotor mit $d_1/d_F = 0,3$ bzw. um 10 % bis 18 % niedriger im Vergleich zum größeren Rotor mit

$d_1/d_F = 0,5$. Prinzipiell die gleichen Ergebnisse wurden auch mit Molke und Tapiokasubstrat gemessen [13, 14]. Nach Berücksichtigung aller Faktoren wurde ein Rotordurchmesser von $d_1/d_F = 0,36$ für alle unterschiedlich großen Gäranlagen des Forschungsprogramms gewählt.

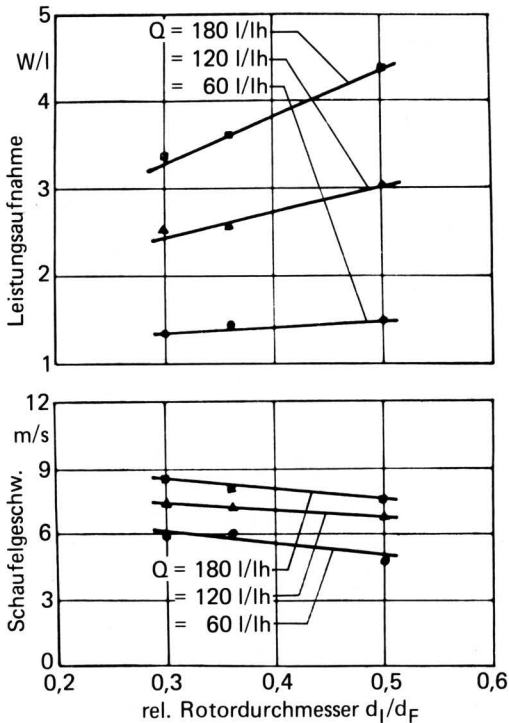


Bild 3. Auf das Flüssigkeitsvolumen bezogene Leistungsaufnahme und Geschwindigkeit der Rotorblätter in Abhängigkeit vom Rotordurchmesser mit dem Luftdurchsatz als Parameter, Wasser, Maße des Gärbehälters wie in Bild 2.

3. Gärversuche

Bei den Gärversuchen wurden insgesamt zwei verschiedene Kulturen (*Kluyveromyces fragilis* (Jörgensen) Van der Walt und *Aspergillus fumigatus* I-21 A) und drei verschiedene Substrate (Molke, Tapiokasubstrat und Rohrzuckerlösung) benutzt. Die Molke bestand aus einer wasserähnlichen klaren Flüssigkeit mit einem Laktosegehalt von 50 g/l und geringen Proteinresten. Das Tapiokasubstrat enthielt 13,3 kg fein gemahlene Tapiokawurzeln in 100 l Wasser. Nach dem Mahlen wurden zunächst 50 l Wasser zugesetzt. Diese Mischung wurde für eine Zeit von 15 min mit Dampfheizung im Fermenter auf 75 °C erhitzt, um die Stärke zu verkleistern und fungistatische Effekte der Wurzelmasse zu beseitigen. Danach wurden weitere 50 l Wasser zugesetzt, um die gewünschte Kohlehydratkonzentration von 40 g/l und eine Anfangstemperatur von nahe 45 °C einzustellen. Das Tapiokasubstrat wurde in mehreren Versuchen durch eine Rohrzuckerlösung ersetzt. Dieses geschah aus Kostengründen und aus Verfahrensgründen bei der Bestimmung der Biomassenerträge und chemischen Analyse. Die Rohrzuckerkonzentration wurde auf vergleichbare Werte von 40 g/l bis 50 g/l eingestellt. Zur Mineralstoffversorgung wurden anorganische Salze, Harnstoff und "Corn Steep Liquor" in den in **Tafel 1** angegebenen Mengen zugesetzt.

In den meisten Versuchen wurde mit der Hefe *Kluyveromyces fragilis* (Jörgensen) Van der Walt und Molke gearbeitet, um möglichst zahlreiches Datenmaterial über das Leistungsvermögen der Gäranlage im Chargenbetrieb zu gewinnen. Parallel dazu liefen die Versuche mit Rohrzucker und Tapioka, die aus Frischhaltungsgründen jeweils kurzfristig aus der Karibik nach Toronto eingeflogen werden mußte. Aus den so gewonnenen Versuchsergebnissen ließen sich Schlußfolgerungen für ein Durchlaufverfahren ableiten, die dann in einer geringen Anzahl von Versuchen überprüft wurden.

Der aufbereiteten Molke wurden zu Gärbeginn etwa 3 % Impfsupstrat zugesetzt. Elektronische Steuergeräte sorgten für einen konstanten pH-Wert von 4,5 und konstanter Substrattemperatur während der Gärung. Bei der Molkegärung wurde die angesaugte Luft durch ein Filter aus Baumwollfasern geleitet (siehe Bild 1).

Nährstoff	Molke	Tapioka-	Rohrzucker-
	g/l	g/l	g/l
KH ₂ PO ₄	—	0,5	0,5
(NH ₄) ₃ PO ₄	5,0	—	—
FeNH ₄ (SO ₄) ₂ · 12 H ₂ O	1,0	—	—
Harnstoff	—	3,5	3,5
Corn Steep Liquor	50,0	—	50,0
Kohlehydrate ¹⁾	50,0	40,0	40,0–50,0

¹⁾ von Mikroben verwertbar

Tafel 1. Anfangsnährstoffkonzentration der Gärmedien [9, 13].

Eine nicht sporenbildende Mutante I-21 A von *Aspergillus fumigatus* wurde als Prototyp einer Strahlenpilzkultur für Tapiokasubstrat entwickelt [8, 9, 11]. Das Sporenbildungsvermögen war durch eine "Deletion Mutation" vollständig eliminiert worden. Dadurch wurde die Gefahr von Sporeninfectionen bei Mensch und Tier, die zu Allergien und Aspergillosis führen könnten, beseitigt. Die Möglichkeit einer Infektion mit Myzelfragmenten, die während der Gärung oder des Trennvorganges als Aerosole in die Atemwege eindringen könnten, bleibt bei dieser Kultur allerdings bestehen. Genetische Arbeiten, die auch zu einer sicheren Beseitigung dieser Gefahr führen, befinden sich in einem weit fortgeschrittenen Forschungsstadium.

Bei der Tapioka- und Rohrzuckervergärung mit der *A. fumigatus* I-21 A-Kultur wurde dem präparierten Medium Impfsupstrat in einer Menge von 7 % bis 10 % zugesetzt. Die Gärung verlief bei konstantem pH-Wert von 3,5 und konstanter Substrattemperatur von 45 °C. Als Säurezusatz wurde H₂SO₄ verwendet. Ein Luftfilter war nicht erforderlich, weil die in der angesaugten Luft enthaltenen Fremdkeime unter diesen Gärbedingungen nicht wachsen können.

Schaumbildung trat nur vereinzelt in geringem Ausmaß bei Gärbeginn auf und konnte bei der Molke durch geringe Zusätze von einem in der Lebensmittelverarbeitung benutzten Mittel und bei der Tapioka- und Rohrzuckervergärung, die ausschließlich mit Strahlenpilzen erfolgte, mit kleinen Zugaben von Baumwollöl oder Maisöl unterdrückt werden. Für die meisten Versuche wurden die Gäranlagen mit 20 l und 120 l Gärraum benutzt. Ihre Ergebnisse wurden in den größeren Anlagen mit 200 l und 3 000 l Gärraum, die für Fütterungsversuche mit Schweinen gebaut wurden, bestätigt.

Während des Gärablaufs wurden in regelmäßigen Abständen Substratproben aus der Anlage entnommen, um die Viskosität zu messen und die Wachstumsrate der Mikroben und die Eiweißproduktion zu analysieren [8, 9, 11]. Gleichzeitig wurde die Sauerstoffkonzentration im Gärraum gemessen. Der Einfluß der Gärung auf den Luftdurchsatz und die Leistungsaufnahme des Rotors wurde in der 20 l-Anlage, die mit einem Durchflußmeßgerät für Luft und einem Meßgerät für das Drehmoment der Rotorwelle ausgerüstet war, gemessen. Dafür wurden zum Teil Proben aus den größeren Gäranlagen entnommen und in dieser Anlage getestet.

Der Futterwert der *A. fumigatus* I-21 A-Kultur wurde in Rattenversuchen, die sich über 90 Tage erstreckten, mit einer Standardration verglichen [8, 9, 15]. In ausgedehnten klinischen und histologischen Untersuchungen wurden anschließend die Auswirkungen verschieden hoher Myzelgehalte in der Futtermation auf den tierischen Organismus analysiert. Eine Infektion der Atemwege wurde bei keinem Tier festgestellt.

4. Gärungskinetik

Das Leistungsvermögen einer Gäranlage läßt sich durch die Wachstumsrate der Mikroben und den Grad der Substratverwertung charakterisieren. Die Kinetik des Wachstumsprozesses wird von mehreren biologischen und technischen Größen beeinflusst, von denen Gärtemperatur, Rotordrehzahl und Nährstoffkonzentration die wichtigsten verfahrenstechnischen Parameter darstellen. Eine detaillierte Analyse aller biochemischen Reaktionen und Stoffwechselvorgänge ist bisher nicht möglich. Das Mikrowachstum läßt sich aber unter den folgenden Einschränkungen in einem technischen Modell beschreiben:

1. Substratmischung und -begasung mit Luft durch den Rotor reichen aus, um eine homogene Nährstoff- und Sauerstoffkonzentration und damit einheitliche Wachstumsbedingungen im gesamten Gärraum herzustellen. Die durch den Gasaustausch bedingten Volumenänderungen des Substrates haben keinen signifikanten Einfluß auf Substratvolumen und -konzentrationen.
2. Alle biochemischen Reaktionen finden in der Wachstumsphase der Gärung statt und alle Mikroben haben ein normales Wachstum, bis ein essentieller Nährstoff verbraucht ist.
3. Die Geschwindigkeit der biochemischen Reaktionen folgt dem Gesetz von Michaelis-Menton und die Wachstumsrate läßt sich nach dem Gesetz von Monod formulieren [16].
4. Gärtemperatur und Rotordrehzahl ändern sich in einem Bereich, in dem die Stoffwechselabläufe lediglich modifiziert werden und reversibel bleiben. Dieser Bereich erreicht nicht die kritischen Grenzen, nach deren Überschreitung mechanische oder physiologische Schäden an den Mikroben auftreten.

Zeitliche Konzentrationsänderungen der Mikroben, des Kohlehydratnährstoffes und der Sauerstoffkonzentration im Substrat lassen sich unter diesen Bedingungen mit folgendem Gleichungssystem beschreiben [13, 17, 18]:

$$\frac{dX_m}{dt} = (y_g - D) X_m \quad (3a)$$

$$\frac{dX_C}{dt} = D (X_{C0} - X_C) - \frac{y_g}{Y_C} X_m \quad (3b)$$

$$\frac{dX_{OS}}{dt} = K_A (X_{OB} - X_{OS}) - Y_D \quad (3c)$$

Im absätzigen Verfahren werden keine signifikanten Stoffmengen zugeführt oder entnommen, so daß Gl.-System (3) mit $D = 0$ sich zu

$$\frac{dX_m}{dt} = y_g X_m \quad (4a)$$

$$\frac{dX_C}{dt} = -\frac{1}{Y_C} y_g X_m \quad (4b)$$

$$\frac{dX_{OS}}{dt} = K_A (X_{OB} - X_{OS}) - Y_D \quad (4c)$$

reduzieren läßt, wobei der Ertragswert des Kohlehydratnährstoffes y_g , der Sauerstoffbedarf der Mikroben Y_D und die spezifische Wachstumsrate y_g durch folgende Beziehungen definiert sind:

$$y_g = y_m \frac{X_C}{X_C + K} \quad (5)$$

$$y_C = -\frac{dX_m}{dX_C} \quad (6)$$

$$Y_D = M_0 R_0 y_g X_m \quad (7)$$

Die Einflüsse der Rotordrehzahl n und der Gärtemperatur T_s auf die Koeffizienten im System (4) wurden im absätzigen Gärverfahren bestimmt und durch folgende empirisch hergeleitete Formeln beschrieben:

$$X_{OB} = b_1 \frac{1}{T_s} \quad (8)$$

$$y_m = A_0 \exp\left(-\frac{E}{R T_s}\right) \left(\frac{n}{n_0}\right)^u \quad (9)$$

$$K = A_1 \exp\left(\frac{E_1}{R T_s}\right) \quad (10)$$

$$y_C = (a_1 - b_2 T_s) \left(\frac{n}{n_0}\right)^v \quad (11)$$

$$K_A = c_3 \left(a_2 + b_3 \frac{1}{T_s}\right) \left(\frac{n}{n_0}\right)^w \quad (12)$$

$$R_0 = c_4 \left(b_4 \frac{1}{y_C} - a_3\right) \quad (13)$$

Der durchschnittliche Massenübergangskoeffizient für Sauerstoff K_A besteht aus einer konvektiven Komponente und einer Oberflächenkomponente. Er reagiert daher sehr empfindlich auf Änderungen der Rotordrehzahl, der Gärtemperatur und der physikalischen und chemischen Eigenschaften des Gärsubstrates wie zum Beispiel Viskosität und Dissoziierungsgrad. Die Arrhenius-Funktionen in Gl. (9) und (10) beschränken sich selbstverständlich auf den Wachstumsbereich in der Nähe der Optimaltemperatur. Einzelheiten der Misch- und Fließvorgänge sowie der Blasenbildung und ihre Einflüsse auf den mikrobiellen Stoffwechsel, den Wärme- und Stoffaustausch zwischen Luft und Gärmedium innerhalb des Mediums und zwischen Medium und Mikroben wurden nicht untersucht.

Im Laufe des Versuchsprogrammes wurde festgestellt, daß die Viskosität des Gärmediums mit dem Mikrowachstum nach der Beziehung

$$\nu = \nu_0 \exp(c_5 t) \quad (14)$$

zunimmt. Diese Entwicklung wird in stärkehaltigen Substraten von einer gegenläufigen Änderung von anfänglich höherer Viskosität, die bis zur Hydrolysierung der Stärke stark abnimmt, überlagert. Mit Gl. (14) und der Formel für den Luftdurchsatz [19]

$$Q \sim d_f^3 n^{2,5} \nu^{-0,5} \quad (15)$$

läßt sich der Ausdruck

$$Q = c_7 d_f^3 n^{2,5} \exp(-c_5 t) \quad (16)$$

ableiten, der den Einfluß des Mikrowachstums auf die Entwicklung des Luftdurchsatzes während des Gärverlaufs charakterisiert. Danach nimmt im absätzigen Gärverfahren der Luftdurchsatz und damit das Gesamtsauerstoffangebot und die spezifische Austauschfläche des Sauerstoffüberganges mit fortschreitender Gärzeit ab, wenn die Rotordrehzahl nicht erhöht wird. Ein solcher Effekt wurde regelmäßig bei der Gärung mit der Strahlenpilzkultur *A. fumigatus* I-21 A festgestellt. Gl. (12) wurde daher bei der Simulation, die mit Hilfe numerischer Methoden auf einer Digitalrechenanlage vorgenommen wurde, mit einem Faktor $\exp(-c_8 X_m)$ multipliziert. Bei der Molkevergärung mit der Hefe *K. fragilis* konnte dieser Effekt vernachlässigt werden.

Kontinuierlich arbeitende Gäranlagen sind meistens im stationären Zustand, so daß $dX_m/dt = 0$, $dX_C/dt = 0$ und $dX_{OS}/dt = 0$. Gl.-System (3) wird reduziert auf:

$$y_g = D \quad (17a)$$

$$X_m = \frac{1}{y_g} D y_C (X_{Co} - X_C) \quad (17b)$$

$$Y_D = K_A (X_{OB} - X_{OS}) \quad (17c)$$

Einsetzen von Gleichung (5) in (17a) und von Gleichung (17a) in (17b) sowie Auflösung von Gleichung (17c) nach X_{OS} führen zu:

$$D = y_m \left(\frac{X_C}{K + X_C} \right) \quad (18a)$$

$$X_m = y_C (X_{Co} - X_C) \quad (18b)$$

$$X_{OS} = X_{OB} - \frac{1}{K_A} Y_D \quad (18c)$$

Substitution von X_C in Gl. (18b) mit Gl. (18a) und Multiplikation mit D ergibt den Ausdruck

$$D X_m = D y_C \left(X_{Co} - K \frac{D}{y_m D} \right) \quad (18d)$$

für die stündliche Zellmasseproduktion der Gärkultur im kontinuierlichen Verfahren [17]. Differentiation von Gl. (18d) nach D und Einsetzen von $d(X_m D)/d D = 0$ ergibt

$$D_{max} = y_m \left[1 - \left(\frac{K}{X_{Co} - K} \right)^{1/2} \right] \quad (18e)$$

als Beziehung für die maximale Substratzufuhr, bevor unvergorenes Substrat mit dem Entnahmestrom aus der Anlage austritt. Gl.-System (18) beschreibt die Funktionen einer im stationären Zustand kontinuierlich arbeitenden Gäranlage. Sauerstoff wird zum begrenzenden Wachstumsfaktor, wenn $X_{OS} \rightarrow 0$ und die Stabilität des Systems verlangt, daß die Bedingung $y_m > D$ eingehalten wird [13].

5. Gärungsergebnisse und -simulation

Prozeßkonstanten und -faktoren wurden in einer Serie von Versuchen nach dem diskontinuierlichen Verfahren bestimmt. Beispiele für die graphische Auswertung der spezifischen Wachstumsrate y_g und des Ertragswertes des Kohlehydratnährstoffes y_C sind in Bild 4 und 5 dargestellt. Die maximale spezifische Wachstumsrate y_m und die Sättigungskonstante K wurden mit Hilfe von Gl. (5), die sich auch als

$$\frac{1}{y_g} = \frac{K}{y_m X_C} + \frac{1}{y_m} \quad (19)$$

schreiben läßt, ebenfalls auf graphischem Wege anhand einer mit den Koordinaten $1/y_g$ und $1/X_{Co}$ erstellten Kurve bestimmt. Mehrere Versuche mit unterschiedlicher Anfangskonzentration des Kohlehydratnährstoffes waren erforderlich, um einen Kurvenverlauf extrapolieren zu können, aus dem die Werte $1/y_m$ am Schnittpunkt mit der $1/y_g$ -Achse und das Steigungsmaß K/y_m abgelesen wurden.

Die Arrheniusfunktion in Gl. (9) kann als

$$\log y_m = \log A_0 - \frac{E}{R} \frac{1}{T_s} \log e \quad (20)$$

geschrieben werden. Nach dieser Funktion läßt sich mit Versuchswerten für $1/T_s$ und $\log y_m$ eine Kurve herstellen, nach der sich mit

$$\frac{E}{R} = \frac{d(\log y_m)}{d(1/T_s) \log e} \quad (21)$$

die Aktivierungsenergie E und der Häufigkeitsfaktor A_0 bestimmen lassen. Ein ähnliches Verfahren wurde auch für Gl. (10) angewendet. Die Sättigungskonzentration des Sauerstoffes wurde gemessen und nach Gl. (8) definiert. Werte des Respirationskoeffizienten R_0 wurden dem Schrifttum entnommen und nach Gl. (13) modifiziert [20]. Der durchschnittliche Massenübergangskoeffizient des Sauerstoffes wurde nach der Sulfitoxidationsmethode gemessen und nach der Gleichung

$$K_A = \frac{\ln(X_{OB} - X_{OS})_1 - \ln(X_{OB} - X_{OS})_2}{t_2 - t_1} \quad (22)$$

berechnet [13]. Die Konstante c_8 im Korrekturfaktor für Gl. (12) bei der Gärung mit *A. fumigatus* I-21 A wurde so ausgewählt, daß sich beim Vergleich von Meßergebnissen und Simulationsergebnissen eine größtmögliche Übereinstimmung ergibt.

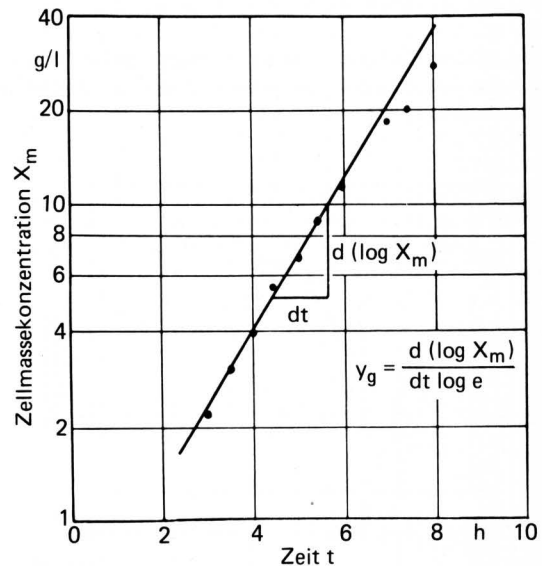


Bild 4. Graphische Ermittlung der spezifischen Wachstumsrate für *K. fragilis* in Molke [13]. Anfangskonzentration des Kohlehydratnährstoffes Laktose: $X_{Co} = 50$ g/l. Gärtemperatur: $T_s = 32$ °C.

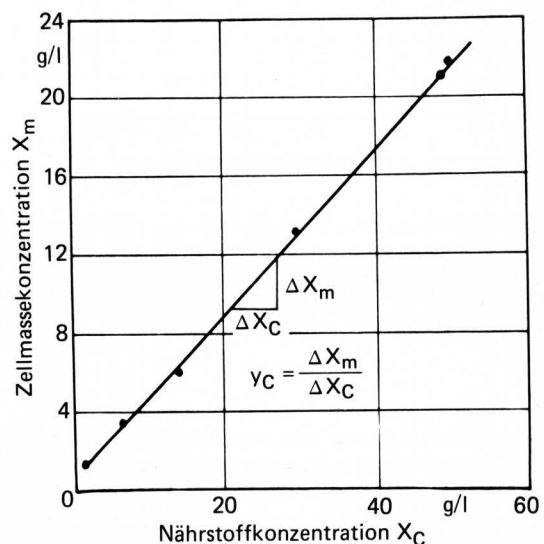


Bild 5. Graphische Ermittlung des Ertragswertes von Laktose bei der Molkevergärung durch *K. fragilis* [13]. Anfangskonzentration des Kohlehydratnährstoffes Laktose: $X_{Co} = 50$ g/l. Gärtemperatur: $T_s = 32$ °C.

Der Einfluß der Gärtemperatur auf die spezifische Wachstumsrate y_g ist in Bild 6 dargestellt. Der Temperatureinfluß auf die maximale spezifische Wachstumsrate y_m , die Sättigungskonstante K , den Ertragswert des Kohlehydratnährstoffes y_C und den durchschnittlichen Übergangskoeffizienten für Sauerstoff K_A ist aus Bild 7 ersichtlich. Tafel 2 enthält die wichtigsten bei der Molkevergärung mit *K. fragilis* bestimmten Konstanten.

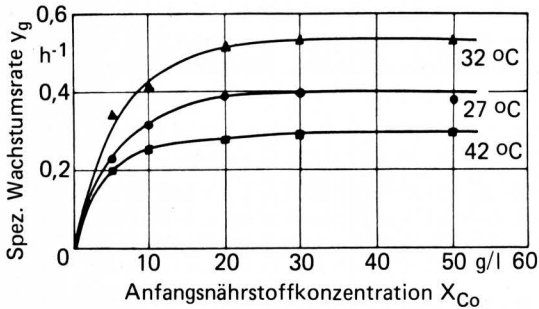


Bild 6. Spezifische Wachstumsrate von *K. fragilis* in Molke in Abhängigkeit von der Anfangskonzentration des Nährstoffs Laktose bei verschiedenen Gärtemperaturen [13].

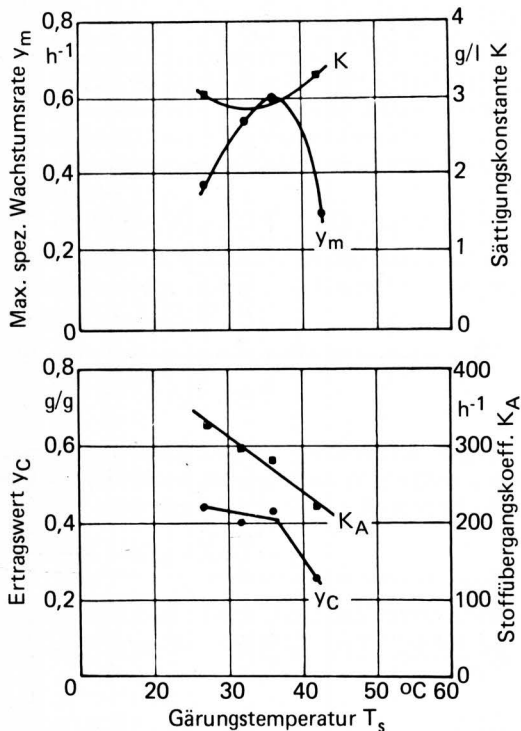


Bild 7. Maximale spezifische Wachstumsrate y_m , Sättigungskonstante K , Ertragswert des Kohlehydratnährstoffes y_C und durchschnittlicher Übergangskoeffizient für Sauerstoff K_A bei der Molkevergärung mit *K. fragilis* in Abhängigkeit von der Gärtemperatur [13]. Laktose: $X_{Co} = 50 \text{ g/l}$

Meßdaten und die als Kurven ausgezogenen Simulationsergebnisse typischer Gärversuche mit *K. fragilis* und *A. fumigatus* I-21 A sind in Bild 8 und 9 dargestellt. Bild 8 zeigt, daß die Hefekultur den Kohlehydratnährstoff Laktose nach einer exponentiellen Wachstumsphase von 8 Stunden restlos aufgezehrt hatte. Die Strahlenpilzkultur benötigte 20 Stunden, um den im Substrat enthaltenen Rohrzucker vollständig zu verbrauchen. Bei der Hefe wurde ein Ertrag an Biomasse von 21 g/l und beim Strahlenpilz von 14 g/l gemessen. Die Sauerstoffkonzentration im Medium nahm in beiden Fällen in etwa gleichem Maße ab. Das langsamere

Wachstum der Strahlenpilzkultur läßt sich mit der höheren Gärungstemperatur und der höheren absoluten Geschwindigkeit der Rotorblätter begründen. Die Wachstumsrate wäre in der Nähe des Temperaturoptimums von 40 °C deutlich höher gewesen.

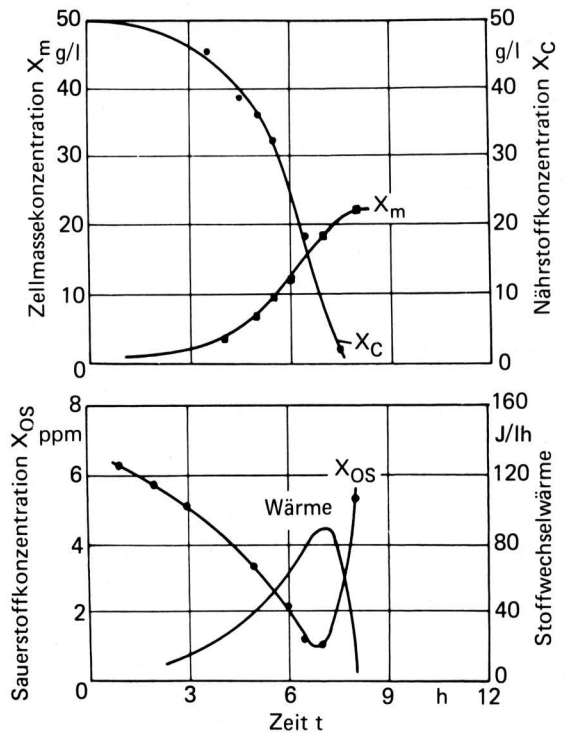


Bild 8. Verlauf von Zellmassekonzentration X_m , Nährstoffkonzentration X_C , Sauerstoffkonzentration X_{OS} und Stoffwechselwärme bei der Vergärung von Molke durch *K. fragilis* [13]. $X_{Co} = 50 \text{ g/l}$; $T_s = 32 \text{ °C}$; $n = 1400 \text{ min}^{-1}$ bzw. $v = 13,2 \text{ m/s}$, Gärraum 120 l

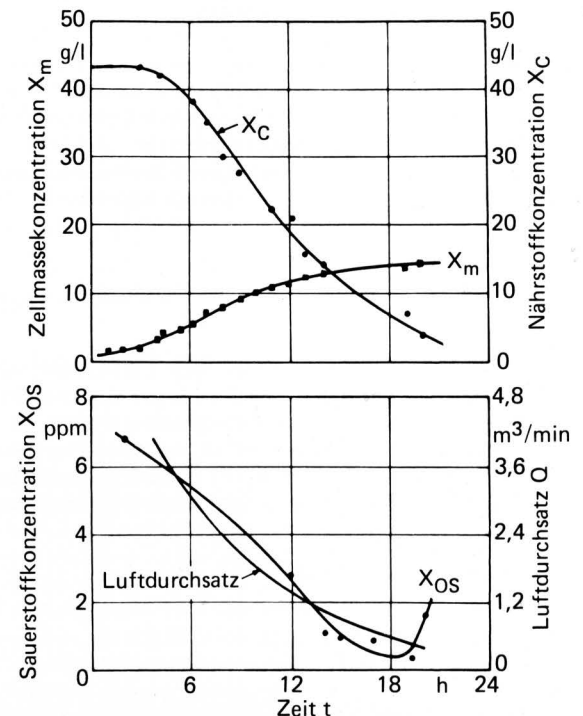


Bild 9. Verlauf von Zellmassekonzentration X_m , Nährstoffkonzentration X_C , Sauerstoffkonzentration X_{OS} und Luftdurchsatz Q bei der Vergärung von Rohrzuckersubstrat durch *A. fumigatus* I-21 A [13]. $X_{Co} = 42 \text{ g/l}$; $T_s = 45 \text{ °C}$; $n = 800 \text{ min}^{-1}$ bzw. $v = 21,0 \text{ m/s}$; Gärraum 3000 l

Die von der Hefekultur produzierte Wärmemenge wurde errechnet und ist in Bild 8 dargestellt. Ihr Maximum betrug 88 J/l h. Auch der Luftdurchsatz bei der Vergärung des Rohrzuckersubstrates mit der Strahlenpilzkultur wurde mit Gl. (16) ermittelt und ist in Bild 9 angegeben.

Konstante	Meßwert	Einheit	Konstante	Meßwert	Einheit
A_0	318000	h^{-1}	b_2	$2,68 \cdot 10^{-3}$	$grad^{-1}$
A_1	0,000013	g/l	b_3	6000	grad/h
E	33694	J/mol	b_4	33,3	m mol/g
E_1	31353	J/mol	c_3	4,65	—
R	8,31	J/mol grad	c_4	0,74	—
a_1	0,52	—	u	0,67	—
a_2	115	h^{-1}	v	0,53	—
a_3	42,5	m mol/g	w	1,67	—
b_1	175	ppm/grad	—	—	—

Tafel 2. Konstanten bei der Molkevergärung mit *K. fragilis* [13]. Gültigkeitsbereich: $T_s = 27$ °C bis 36 °C. $n = 1400$ bis 1680 min^{-1} in der 120-Liter-Anlage mit $d_I/d_F = 0,36$.

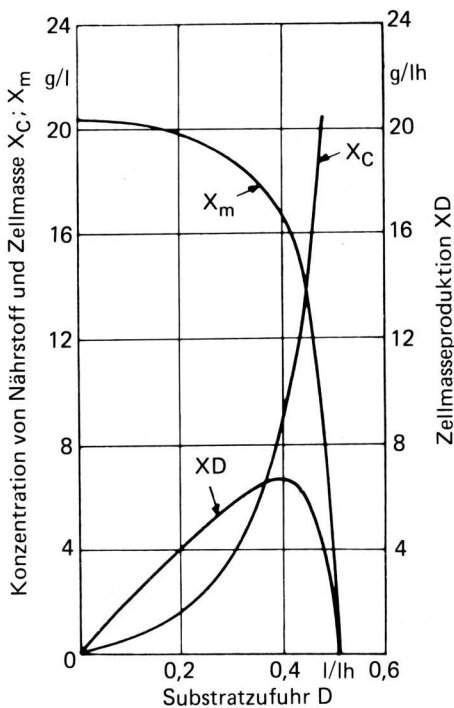


Bild 10. Durch Simulation ermittelte Werte für Zellmassekonzentration X_m , Nährstoffkonzentration X_c und Zellmasseproduktion XD in Abhängigkeit von der Substratzufuhr, kontinuierlich arbeitende Gäranlage mit 120 l, Bedingungen wie bei Bild 8 [13].

Der Gesamtertrag der Hefekultur betrug in dem in Bild 8 dargestellten Beispiel 2,52 kg, was nach Berücksichtigung der Gärzeit und der Behältergröße einer Produktionsrate von $2,63 \text{ kg/m}^3 \text{ h}$ entspricht. Bild 10 zeigt, daß unter vergleichbaren Gärbedingungen nach Gl.-System (18) in einer kontinuierlich arbeitenden Anlage gleicher Größe ein Ertrag von $6,8 \text{ kg/m}^3 \text{ h}$ bei einer stündlichen Substratzufuhr von $D = 0,4 \text{ h}^{-1}$ erzielbar ist [13]. Die Nährstoffe sind dann allerdings erst teilweise vergoren und das austre-

tende Substrat enthält noch Laktose in einer Konzentration von 7 g/l, die in einem nachgeschalteten Gärbehälter vergoren werden müßte. Der Verdopplung der Anlagekosten stünde dann eine 2,6fache Produktion gegenüber, die sich eventuell durch eine optimale Anpassung der Rotordrehzahl und der Behälterabmessungen an die Erfordernisse der Gärkultur noch verbessern läßt.

In der 3000 l-Anlage wurde in 20 Stunden ein Gesamtertrag von 42 kg Biomasse erzielt, was einer Produktionsrate von $0,7 \text{ kg/m}^3 \text{ h}$ entspricht. Auch in diesem Falle würden sich in einer Durchlaufanlage wesentliche Verbesserungen erzielen lassen. Zunächst werden jedoch bessere Mutanten der eingesetzten Mikroorganismen, die sich in der Entwicklung befinden, benötigt. Mit zunehmenden Rotordrehzahlen in den hintereinander angeordneten Gärbehältern einer kontinuierlich arbeitenden Anlage könnte dem mit dem Strahlenpilzwachstum abnehmenden Luftdurchsatz, Bild 11, begegnet werden.

Der auf die erzeugte Biomasse bezogene Energieverbrauch betrug bei dem in Bild 8 gezeigten Beispiel der Vergärung von Molke durch Hefe 4,73 kWh/kg. Bei dem in Bild 9 dargestellten Beispiel der Strahlenpilzvergärung von Rohrzucker ergab sich ein Wert von 4,97 kWh/kg. Der Rohproteingehalt betrug bei der Hefe 40 % bis 45 % und bei den Strahlenpilzen 44 %. Das Aminosäurespektrum des Strahlenpilzes, dessen Nährwert in Rattenversuchen bestimmt wurde, zeigt einen niedrigen Methioningehalt [9, 10, 15]. In den Versuchen wurde getrocknete Tapioka, die mit *A. fumigatus* I-21 A auf Myzelkonzentrationen von 20, 30 und 40 % angereichert war, verfüttert. Die Rationen waren mit Methioninzugaben auf einen wahren Proteingehalt von 10 % aufgebessert.

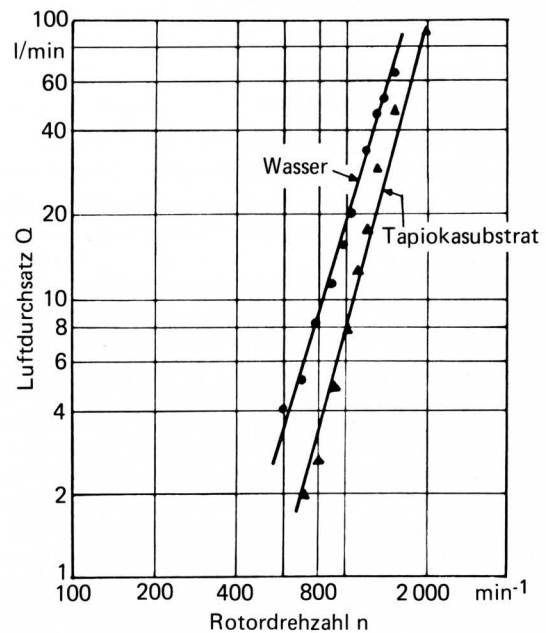


Bild 11. Luftdurchsatz durch Wasser und Tapiokasubstrat in der 20-Liter-Gäranlage in Abhängigkeit von der Rotordrehzahl [13]. Das Substrat wurde nach Abschluß der Gärung aus der 3000 l-Anlage entnommen.

Die Verwertung des Strahlenpilzproteins durch die Versuchstiere war nur unwesentlich geringer als bei der mit Methionin und Tryptophan angereicherten Kasein-Vergleichsration. Die mit *A. fumigatus* I-21 A aufgewertete Tapioka wurde nach einer mäßigen Futteraufnahme in den ersten 3 bis 4 Tagen der insgesamt 90tägigen Fütterungsperiode sehr gut aufgenommen. Die anfänglich nur zögernde Aufnahme ließ sich eindeutig auf Geschmackseinflüsse der Tapioka zurückführen, da bei der Verfütterung reinen Myzels keine Verzögerungen auftraten.

Ausgedehnte klinische und histologische Untersuchungen an 26 Geweben und 12 verschiedene Blutuntersuchungen zeigten keinerlei nachteilige Symptome, die der Verfütterung von Strahlenpilzmyzel angelastet werden müßten. Ein geringfügig höherer Gehalt von Blutharnstoff und etwas höhere Nierengewichte ergaben sich bei der höchsten Konzentration von 40 % Myzel in der Ration. Die Nierenfunktion wurde in diesem Falle näher untersucht und erwies sich als normal. Bei Berücksichtigen aller Resultate ist festzustellen, daß die Verfütterung der mit dem Strahlenpilz *A. fumigatus* I-21 A angereicherten Tapiokaration nach 90 Tagen keine nachteiligen Auswirkungen bei den Versuchstieren erkennen ließ [9]. Da auch in technischer Hinsicht ermutigende Ergebnisse erzielt wurden, wird das Forschungsprojekt fortgesetzt mit dem Ziel, ein Verfahren für die Futtermittelzubereitung mit sicheren und ertragreichen Mikroorganismenkulturen zu entwickeln.

Verwendete Formelzeichen

A_1, A_0	Häufigkeitsfaktoren nach Arrhenius
$a_1 \dots a_3$	empirisch bestimmte Konstanten
$b_1 \dots b_4$	
$c_1 \dots c_8$	
D	stündliche Substratzufuhr
D_{\max}	maximale stündliche Substratzufuhr
d_I	Rotordurchmesser
d_D	Zentralrohrdurchmesser
d_F	Durchmesser des Gärbehälters
E	Aktivierungsenergie
g	Gravitationskonstante
h_0	Höhe des Gärbehälters
h_D	Höhe des Zentralrohres
K	Sättigungskonstante nach Monod
K_A	Durchschnittlicher Massenübergangskoeffizient für Sauerstoff
n	Drehzahl
n_0	Minimaldrehzahl
P	Leistung
Q	Luftdurchsatz
R	allgemeine Gaskonstante
R_0	Respirationskoeffizient
T_s	Substrattemperatur
t	Zeit
u, v, w, z	empirisch bestimmte Konstanten
X_C	Konzentration des Kohlehydratnährstoffes
X_{C_0}	Anfangskonzentration des Kohlehydratnährstoffes
X_m	Zellmassekonzentration der Mikroben
X_{OB}	Sättigungskonzentration des Sauerstoffs
X_{OS}	Sauerstoffkonzentration des Substrates
Y_C	Ertragswert des Kohlehydratnährstoffes
y_g	spezifische Wachstumsrate
y_m	maximale spezifische Wachstumsrate
Y_D	Sauerstoffbedarf der Mikroben
ν	kinematische Viskosität
ρ	Dichte

Schrifttum

Bücher sind durch ● gekennzeichnet

- [1] Kihlberg, R.: The microbe as a source of food. Ann. Rev. Microbiol. Vol. 26 (1972) S. 427/66.
- [2] Humphrey, A.E.: Current developments in fermentation. Chemical Engineering Vol 81 (1974) Nr. 26, S. 98/112.
- [3] Manousselis, G.: Aerobic fermentation of sauerkraut waste waters by yeast. M. Sc.-Thesis, Dept. of Food Science, University of Guelph, 1976.
- [4] Perzow, B.: Fermentation of whey. Paper presented at the Whey Utilization Symposium, Ottawa, 1974.
- [5] Wassermann, A.E. u. J. Hampson: Whey utilization. Growth of *Kluyveromyces fragilis* in whey in a pilot plant. J. Dairy Sci. Vol. KL IV (1961) Nr. 3, S. 307/92.
- [6] Nordström, U.M.: Bark degradation by aspergillus fumigatus. Growth studies. Can. J. Microbiol. Vol. 20 (1974) Nr. 3, S. 283/98.
- [7] Rogers, C.J., E. Coleman, D.F. Spino, T.C. Purcell u. P.V. Scarpino: Production of fungal protein from cellulose and waste cellulose. Environ. Sci. Technol. Vol. 6 (1972) Nr. 8, S. 715/19.
- [8] Reade, A.E. u. K.F. Gregory: High temperature production of protein-enriched feed from cassava by fungi. Appl. Microbiol. Vol. 30 (1975) Nr. 6, S. 897/904.
- [9] Gregory, K.F., A.E. Reade, G.L. Khor, J.C. Alexander, J.H. Lumsden u. G. Losos: Conversion of carbohydrates to protein by high temperature fungi. Food Technol. J. Vol. 30 (1976) Nr. 3, S. 30/35.
- [10] Khor, G.L.: Nutritional and safety evaluations of microbial proteins grown on cassava. M.Sc.-Thesis, University of Guelph, 1974.
- [11] Gregory, K.F., A.G. Meiering, F.A. Azi, J.A.D. Sedgwick, J.D. Cunningham, S.J. MacLean, J. Santos Nunez u. J. Gomez: Establishment of a pilot-plant for the production of fungal protein from cassava. Proceedings of IV. International Symposium on Tropical Root Crops, Cali, Kolumbien, 1976.
- [12] ● Salomons, G.L.: Materials and methods in fermentation. London/New York: Academic Press, 1969.
- [13] Azi, F.A., A.G. Meiering, C.L. Duitschaver u. A.E. Reade: Air injection by selfaspirating impeller in aerobic fermentation. J. Milk and Food Technol. Vol. 38 (1975) Nr. 2, S. 94/99.
- [14] Azi, F.A.: Development of process kinetics in the manufacture of microbial protein and scale up of an unconventional microbial reactor. Ph.D.-Thesis, University of Guelph, July 1976.
- [15] Khor, G.L., J.C. Alexander, J. Santos Nunez, A.E. Reade u. K.F. Gregory: Nutritive value of thermotolerant fungi grown on cassava. J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment. Vol. 9 (1976) Nr. 3, S. 139/43.
- [16] ● Monod, J.: Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes. Paris: Hermann et Cie., 1942.
- [17] ● Rhodes, A. u. D.L. Fletcher: Principles of industrial microbiology. Oxford: Pergamon Press, 1966.
- [18] ● Aiba, S., A.E. Humphrey u. N.F. Millis: Biochemical engineering. London/New York: Academic Press, 1973.
- [19] Tsao, S.T.N.: Vortex behavior in the Waldhof fermentor. Biotechnol. Bioeng. Vol. 10 (1968) S. 177/88.
- [20] ● Weinschank, D.J. u. J.C. Carver: Theory and design of aerobic fermentations. In: Microbial Technology. New York, London: Reinhold Publishing, 1967.