DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

(12) Wirtschaftspatent

(19) DD (11) 273 853 A1

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

4(51) C 12 N 1/16

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 317 602 3 (22) 06.07.88 (44) 29.11.89

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

(72) Schierz, Volkmar, Dr.-Ing.; Prause, Michael, Dr. sc.; Hühn, Jürgen; Schurig, Karl-Heinz; Welz, Gerald, Dipl.-Biol.; Bergmann, Horst, Dipl.-Ing.; Löwe, Peter, Dipl.-Ing., DD

(54) Verfahren zur Anzucht von Brennereihefe

(55) Verfahren, Gärhefen, Gärleistung, Ethanolsynthese, Gäraktivität, aerob, anaerob, Substratdosierung, Biomasse, Enzym kontinuierlich, diskontinuierlich

(57) Die Erfindung beinhaltet ein Verfahren zur Anzucht von Brennereihefe mit optimaler Gärleistung mit dem Ziel, die Effektivität des diskontinuierlich oder kontinuierlich geführten Gärprozesses wesentlich zu steigern.
Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst, indem die Substratdosierung (Zucker und Sauerstoff) während der Hefeanzuchtphase kontinuierlich und/oder periodisch erfolgt, die Dosierdauer und -menge entsprechend der gebildeten Biomasse- und/oder Enzymmenge eingestellt wird. Eine so angezüchtete Hefe hat eine um 20–30% höhere und über mehrere Tage konstante Gärleistung gegenüber herkömmlichen Züchtungsverfahren.

ISSN 0433-6461

3 Seiten

Patentanspruch:

1. Verfahren zur Anzucht von Brennereihefe auf der Basis von zuckerhaltigen Substraten, insbesondere von solchen, welche die Gärung hemmende Stoffe enthalten, z. B. konzentrierte, ungeklärte Melassen, mittels asynchronen oder synchronen Zellkulturen, **gekennzeichnet dadurch,** daß während der Hefeanzucht, die in Wachstums- und Enzymbildungsphase der Hefe unterteilt wird, die Substratzufuhr kontinuierlich und/oder periodisch erfolgt, die Dosierdauer und Menge entsprechend der zu bildenden Biomasse und/oder Enzymmenge (Gärenzyme) eingestellt wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch,** daß die Dauer der Wachstums- bzw. Enzymbildungsphase der Hefe jeweils 0,25 bis 2,0 Verdopplungszeiten der Hefe beträgt.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch,** daß die Zuckerkonzentration während der Wachstumsphase zwischen 0,1 bis 1 g/l und während der Enzymbildungsphase zwischen 1 bis 30 g/l, vorzugsweise zwischen 5 bis 10 g/l, eingestellt wird.
4. Verfahren nach Punkt 1 bis 3, **gekennzeichnet dadurch,** daß die Gelöstsauerstoffkonzentration zwischen 0,2 bis 1,0 ppm, vorzugsweise >0,5 ppm während der Hefewachstumsphase und <0,5 ppm während der Enzymbildungsphase, eingestellt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung ist in allen Spiritusfabriken, die Ethanol fermentativ mit Hilfe von Gärhefen und unter Einsatz von Kohlenhydraten, vorzugsweise Melasse als C-Quelle produzieren, anwendbar.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Effektivität der Ethanolsynthese hängt wesentlich von der Anstellhefemenge und der Gäraktivität der Hefe ab. Die Anzucht der Stellhefe (Brennereihefe) erfolgt aerob und in den meisten Fällen nach dem Verschnittverfahren. Nach der Ernte eines Teiles der reifen Hefe wird das Züchtungsgefäß mit Substrat (zuckerhaltiger Rohstoff), Nährsalz und Wasser gefüllt und der Züchtungsprozeß beginnt erneut. Dieser Prozeß wird in einem zeitlich konstanten Rhythmus wiederholt.
Durch die einmalige Zugabe der Reaktanden ergeben sich zwangsläufig zu Beginn der Anzuchtphase Konzentrationswerte, deren Höhe zu einer negativen Beeinflussung der Gäraktivität und Menge der erzeugten Hefe führen kann. Das trifft insbesondere für die Zuckerkonzentration (Glukose) zu. Saccharomyces cerevisiae gärt bei hohen Zuckerkonzentrationen (>1 g/l) auch bei ausreichendem Sauerstoffangebot (Katabolit-Repression). Das dabei gebildete Ethanol hemmt das Wachstum der Hefe. Man erreicht deshalb nicht in jeder Hefeanzuchtphase die maximal mögliche Hefemenge und Gäraktivität der Hefe. Deshalb ist die Gärleistung der Hefe nicht optimal.
Die genannten Faktoren wirken sich im folgenden Gärprozeß bezüglich Gärzeit, erreichbarer Ethanolkonzentration und Ausbeute an Substrat bezogen auf gebildeten Ethanol ungünstig aus und beeinflussen somit die Ökonomie des Gesamtverfahrens entscheidend.
In DE-OS 3441085 wird ein Verfahren zur Erhöhung der biologischen Aktivität bzw. der Stoffwechseltätigkeit von Mikroorganismen mit elektrischem Strom als Stimulator beschrieben. Man verwendet dazu pulsartigen Wechselstrom von 0,01–20 A und einer Spannung von 1–1000 V.
Bei Verwendung hoher Stromstärken können die Mikroorganismen ihre Lebensfähigkeit verlieren. Die biologische Aktivität der Mikroorganismen besteht in der Assimilation und in ihrer Vermehrung sowie der Dissimilation, bei der Stoffwechselprodukte gebildet werden. Vermutlich wird in diesem Verfahren hauptsächlich die Dissimilation gefördert.
Das Verfahren zum Aktivieren des Stoffwechsels von Mikroorganismen DE-OS 3150749, bei deren aerober und anaerober Submerszüchtung beinhaltet die mehrfache Umwälzung des Fermentorinhalts in einer Homogenisierungsmaschine.
Die Erfindung DD-PS 66402 beschreibt ein Verfahren zur kontinuierlichen Züchtung von Brennereihefe für die nachfolgende kontinuierliche Gärung. Die Züchtung erfolgt in einer zweitstufigen Propagationsanlage, deren erste aerob arbeitende Stufe Zulauf aus Maische mit niedrigem Extraktgehalt und gegebenenfalls gesiebter Schlempe erhält, deren zweite Stufe mit gesondertem, extraktreichem Zulauf versehen, unter anaeroben Bedingungen arbeitet.
Insgesamt haben die Verfahren zur Erhöhung und Stabilisierung der Gärleistung von Brennereihefe mehr oder weniger große Mängel, indem zur Erzielung eines in der Regel bescheidenen Nutzeffektes ein relativ hoher technischer und energetischer Aufwand betrieben werden muß und nicht selten geschieht das auf Kosten der Qualität und Quantität der Endprodukte in der Gärstufe, wie Ethanol und Bodensatzhefe.
Oft ist der Rohproteingehalt der Bodensatzhefe niedrig und damit verbunden der erzielbare ökonomische Effekt bei Einsatz als Futterhefe für die Tierernährung gering. Außerdem ist ein mehrfacher Wiedereinsatz der Bodensatzhefe als Inoculum in Frage gestellt.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung ist, den Gärprozeß zu stabilisieren, den Verbrauch an eingesetztem Substrat bezogen auf erzeugten Ethanol zu senken, die Gärzeit zu verkürzen, die Qualität der Bodensatzhefe zu verbessern, Nebengärungen und Infektionen weitgehend auszuschließen und damit die Ökonomie des Verfahrens entscheidend zu verbessern sowie das Verfahren automatisierbar zu gestalten.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Bekannt ist, daß bei hohen Glukosekonzentrationen Saccharomyces cerevisiae auch unter aeroben Bedingungen gärt. Glukose entsteht beim enzymatischen Aufschluß von zuckerhaltigen Rohstoffen (Polysaccharide) in Monosaccharide (Hexosen) in fast jedem Fall. Je nach der Höhe der Glukosekonzentration im Anzuchtmedium wird die Glukose von der Hefe in Biomasse und Ethanol umgewandelt. Das gebildete Ethanol hemmt das Wachstum der Hefezellen. Nur bei Glukosekonzentrationen nahe der Limitatinosgrenze wird kein Ethanol mehr gebildet und es erfolgt eine rein oxidative Nutzung der Glukose. Die Zellen wachsen mit maximal spezifischer Wachstumsrate. Eine auf diese Art und Weise gezüchtete Hefe ist nicht oder erst nach mehreren Stunden Regeneration unter Zugabe von Zucker wieder gärfähig.
Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, eine Gärhefe mit optimaler Gärleistung aerob zu züchten und die Substrate Zucker und Sauerstoff während der Anzuchtphase entsprechend der gebildeten Biomasse- und Enzymmenge zu dosieren.
Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst, indem innerhalb einer Hefeanzuchtphase die Substratdosierung dem Wachstum und der Enzymbildung der Hefe angepaßt wird. Dazu wird zu Beginn der Anzuchtphase die Zuckerkonzentration zwischen 0,1–1 g/l, vorzugsweise $<0{,}5$ g/l, und die Gelöstsauerstoffkonzentration zwischen 0,2–1 ppm, vorzugsweise $>0{,}5$ ppm, eingestellt. Die Zuckerzugabe erfolgt während dieser Zeit in kleinen Mengen oder kontinuierlich. Die Luftzugabe wird nach der Gelöstsauerstoffkonzentration geregelt. Diese Einstellung wird 0,25–2 Verdopplungszeiten der Hefe beibehalten. Während dieser Zeit erfolgt das Hefewachstum mit maximaler spezifischer Wachstumsrate. Anschließend erfolgt eine einmalige Zugabe einer größeren Zuckermenge. Die Zuckerkonzentration im Fermentationsmedium soll mindestens 5 g/l betragen. Die Luftmenge wird nach der Gelöstsauerstoffkonzentration, die vorzugsweise $<0{,}5$ ppm, geregelt. Diese Einstellung wird 0,25 bis 2 Verdopplungszeiten der Hefe beibehalten. Während dieser Zeit werden bei geringen spezifischen Wachstumsraten der Hefe vorwiegend Gärenzyme gebildet. Die Züchtung der Stellhefe kann diskontinuierlich in einem und kontinuierlich in einem, vorzugsweise in zwei Gefäßen, erfolgen. Eine nach diesem kontinuierlichen Züchtungsverfahren erzeugte Hefe ist für die Einleitung einer nachfolgenden kontinuierlichen Gärung geeignet.
Das beschriebene Verfahren ist weitgehend automatisierbar. Als Steuergrößen dienen dazu die Biomassekonzentration und ausgewählte Enzymkonzentrationen, z. B. Invertase oder Alkoholdehydrogenase.

Ausführungsbeispiel

In einem Rührfermentor werden 100 l Maische, bestehend aus Wasser, Hefe, Melasse und Nährsalze angesetzt. Die Maische wird belüftet (Gelöstsauerstoffkonzentration zwischen 0,5–1 ppm) und die Temperatur Sollwert 32 °C geregelt. Im vierstündigen Rhythmus werden 40 l reife Hefemaische für den Gärprozeß entnommen und anschließend wird der Fermentor wieder mit Wasser, Nährsalz und Melasse aufgefüllt. Die Melassedosierung erfolgt in zwei Varianten:
Variante I: Einmalige Melassezugabe (Menge s. Tab. 1) zu Beginn der Anzuchtphase.
Variante II: Kontinuierliche Melassezugabe von Beginn der Anzuchtphase zwei Stunden lang und anschließend einmalige Melassezugabe (Menge s. Tab. 1).
Die gemittelten Versuchsergebnisse sind in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1: Gemittelte Versuchsergebnisse für die Varianten I und II
(Die Versuchsdauer für die Hefeanzucht betrug 96 Stunden. Mit der in jeder Anzuchtphase gezüchteten Hefe wurde ein Gärversuch von 16 h Dauer angesetzt. Die angegebenen Werte beziehen sich jeweils auf Anzucht- bzw. Gärungsende.)

		Variante I	Variante II
Anzuchtstufe:			
Hefekonzentration	g/l	7,7	9,5
Ethanolkonzentration	g/l	19,4	21,9
Zuckerkonzentration	g/l	2,1	2,1
Melassemenge pro 4 h	kg	2,4	2,6
spez. Verbrauchswert Zucker/Ethanol	g/g	2,53	2,5
Gärstufe:			
Hefekonzentration	g/l	12,0	13,2
Ethanolkonzentration	g/l	65,6	81,9
Zuckerkonzentration	g/l	23,2	9,8
Kohlendioxidmenge	g/16 h	53,3	61,7
spez. Verbrauchswert Zucker/Ethanol	g/g	2,23	2,03