



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 37 803 T2 2008.02.14**

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 821 057 B1**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12N 1/18 (2006.01)**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 37 803.9**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 202 293.3**

(96) Europäischer Anmeldetag: **22.07.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.01.1998**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **13.06.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.02.2008**

(30) Unionspriorität:  
**96202119 26.07.1996 EP**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:  
**GBI Holding B.V., Delft, NL**

(72) Erfinder:  
**Plomp, Pieter Jan Arnoldus Maria, 2622 EX Delft, NL**

(74) Vertreter:  
**HOFFMANN & EITLE, 81925 München**

(54) Bezeichnung: **Bäckerhefe**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

**[0001]** Die Erfindung betrifft die Herstellung von Backhefe, und insbesondere eine neue Backhefezusammensetzung, sowie ein Verfahren zur Herstellung konzentrierter Hefefermentationsbrühe, die zur Verwendung als neue Backhefezusammensetzung geeignet ist.

### BESCHREIBUNG DES STANDES DER TECHNIK:

**[0002]** Die Herstellung von Backhefe ist bekannt und in der Literatur gut dokumentiert. Gute Beispiele für die Beschreibung der Backhefeherstellungspraxis sind z.B. S. Burrows (1979), Baker's yeast, Economic microbiology, Bd. 4 (A.H. Rose, Herausgeber, Seiten 31–64, Academic Press, New York; G. Reed (1982), Production of baker's yeast, Prescott & Dunn's industrial microbiology, 4. Auflage (G. Reed, Herausgeber), Seiten 593–633; AVI, Westport, CT; S.L. Chen und M. Chiger (1985), Production of baker's yeast, Comprehensive biotechnology, Bd. 3 (H.W. Blanch, S. Drew und D.I.C. Wang, Herausgeber), Seiten 429–461; Pergamon-Press, Oxford; N.B. Trivedi, G.K. Jacobson und W. Tesch (1986), Baker's yeast, Crit. Rev. Biotechnol. 4, 75–110; und R.F. Beudeker, H.W. van Dam, J.H. van der Plaat und K. Vellenga (1990), Developments in Baker's yeast production, Yeast (H. Verachtert und R. De Mot, Herausgeber), Seiten 103–146; Marcel Dekker Inc., New York. Nachstehend wird bestimmten Aspekten der Herstellung und Verwendung von Backhefe, die mit der in dieser Beschreibung beschriebenen Erfindung verbessert werden kann, Aufmerksamkeit gewidmet.

**[0003]** Nach der Herstellung von Saathefe in mehreren Schritten [S.L. Chen und M. Chiger (1985), Production of baker's yeast, Comprehensive biotechnology, Bd. 3 (H.W. Blanch, S. Drew und D.I.C. Wang, Herausgeber), Seiten 429–461; Pergamon Press, Oxford] folgt die Herstellung der sogenannten kommerziellen Hefe. In der Praxis erfolgt dies standardgemäß in Fed-Batch-Fermentationen, wobei im wesentlichen Melasse als C-Substrat und Ammoniak oder Harnstoff als Hauptstickstoffquelle verwendet wird. Die Substrate werden während der Fermentation dem Fermenter zugeführt. Andere Wachstumsvoraussetzungen, wie Phosphat, ein Anteil des Stickstoffs, Salze und Vitamine, werden dem Fermenter zu Beginn der Fermentation oder in den allerersten Stunden der Fermentation zugegeben. Melasse wirkt ebenfalls als Quelle vieler Spurenelemente, die in ausreichender Menge oder sogar im Überschuss durch Zuführen der Melasse als C-Quelle dosiert werden. Die Fermentation dauert zwischen 10 und 20 Stunden und endet mit einer Brühe, die zwischen 4 und 8 % trockene Hefefeststoffe enthält.

**[0004]** Bevor sie verwendet werden kann, muss die Melasse geklärt werden. Das bedeutet, dass die Me-

lasse zur Herabsetzung ihrer Viskosität und um die Melasse pumpbar zu machen, aber auch um Sedimente (Sand, Schmutz, kolloidale Stoffe) vor der Sterilisation und Einführung in den Fermenter zu entfernen, verdünnt wird.

**[0005]** Das Zuführprogramm, das für die Melasse und die Stickstoffquelle verwendet wird, und in gewisser Weise auch die anderen Wachstumsvoraussetzungen werden grundsätzlich als essentielles Wissen betrachtet, und es ist nicht viel über die tatsächlich in industrieller Praxis verwendeten Verfahren veröffentlicht. Es ist jedoch klar, dass die Programme von höchster Bedeutung für die erhaltene Qualität der Endhefe sind. Wie aus S. Burrows (1979), Baker's yeast; Economic microbiology, Bd. 4 (A.H. Rose, Herausgeber), Seiten 31–64; Academic-Press, New York, und der früheren Arbeit von B. Drew, H. von Specht und A.-M. Herbst (1962), Zur Züchtung von Backhefe in konzentrierter Melassewürze, Die Branntweinwirtschaft 102, 245–247, bekannt ist, führen höhere Melasse-Zuführprofile zu aktiverer Hefe, und niedrigere Melasse-Fütterprofile zu weniger aktiver Hefe mit einer längeren Lagerfähigkeit. In heutiger Praxis wird die maximale Zuführrate einerseits durch die Sauerstofftransferrate (OTR) des Fermenters und andererseits durch die kritische Wachstumsrate der Hefe, oberhalb derer die Bildung von Alkohol beginnt, limitiert. Die Bildung von Alkohol ist wegen der erhaltenen schlecht bleibenden Qualität der Hefe und Ausbeuteverlust an Kohlenstoffquelle unerwünscht. Offensichtlich kann ein zu niedriges Melasse-Zuführprofil, bezogen auf die Menge der Hefe in dem Fermenter, zu einer zu geringen Gasaktivität der Hefe führen. Daher wird in H.N. Sher (1962), Continuous process for the production of yeast, US-PS 3 032 476, erwähnt, dass die Wachstumsrate von Hefe über  $0,05 \text{ h}^{-1}$  und sogar über  $0,075 \text{ h}^{-1}$  gehalten werden sollte. Unter der Massgabe eines ökonomisch relevanten Inokulumprozentsatzes bilden so die für eine gute Gasleistung als notwendig erachtete, minimale Wachstumsrate zusammen mit der maximalen Zuführrate, die sich aus den Fermenter-Sauerstofftransferratenbeschränkungen ergibt, die Basis für die maximale Fermentationszeit von 20 Stunden, wie von S.L. Chen und M. Chiger (1985), Production of baker's yeast, Comprehensive biotechnology, Bd. 3 (H.W. Blanch, S. Drew und D.I.C. Wang, Herausgeber), Seiten 429–461; Pergamon Press, Oxford, erwähnt.

**[0006]** Nach der Fermentation werden die Hefezellen durch wiederholte Konzentration und Verdünnung gründlich gewaschen. Typischerweise wird eine Zentrifugenkonzentration zu einer Suspension von etwa 20 % Trockengehalt durchgeführt, und die Suspension wird mindestens einmal auf mehr als 100 % des Originalvolumens verdünnt, was in einer Nicht-Hefe-Trockenkonzentration in der freien Flüssigkeit von weniger als 10 % der Konzentration in der freien flüs-

sigen Phase der Fermentationsbrühe resultiert. So wird eine Rahmhefe (cream yeast) mit einer Hefetrockengehaltkonzentration von 18 bis 22 % erhalten, die entweder direkt als Rahmhefe verkauft wird oder zu Blockhefe oder granulierter Hefe (25 bis 36 % Trockengehalt) verarbeitet oder getrocknet wird, um aktive Trockenhefe oder Instant-Trockenhefe mit bis zu 97 % Hefetrockengehalt zu erhalten. Das extrazelluläre Wasser, das von der Brühe auf diese Weise entfernt wird, beträgt bis zu 50 % für Rahmhefe und bis zu fast 100 % für getrocknete Hefe. Zusammen mit dem Wasser, das zum Wegwaschen nicht-fermentierten Feststoffs von der Melasse benötigt wird, bildet dieses Wasser eine grosse Menge Schmutzwasser, das gehandhabt werden muss. Heutzutage beinhaltet eine vollständige Schmutzwasserbehandlung eine Verdampfungsanlage, die das Schmutzwasser konzentriert und Vinasse ergibt. Unter hohem Energieeinsatz entfernt dieser Schritt etwa 80 bis 95 % des biologischen Sauerstoffbedarfs (BOD) aus dem Schmutzwasserstrom. Der verbleibende BOD wird in einer anaeroben Schmutzwasserbehandlungsanlage und anschliessend in einer aeroben Schmutzwasserbehandlungsanlage behandelt, wieder zu erheblichen Kosten. Diese Kosten werden in Zukunft weiter steigen, da Energie teurer wird und darüber hinaus die Anforderungen an die Behandlung von Abfallstrom aus Umweltgründen steigen.

**[0007]** EP-A-0 229 976 beschreibt schnell agierende Hefesorten mit verbesserter Leistung in süßem, regulärem und magerem Teig. Die Hefesorten werden in Standardverfahren unter Verwendung von Melasse als Kohlenstoffquelle fermentiert.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG:

**[0008]** Die Erfindung betrifft die Herstellung von Backhefe, insbesondere eine neue Hefezusammensetzung, und ein Verfahren zur Herstellung einer konzentrierten Hefefermentationsbrühe, die zur Verwendung als neue Backhefezusammensetzung geeignet ist.

**[0009]** Erfindungsgemäss werden ein Verfahren zur Herstellung und eine neue Backhefezusammensetzung zur Herstellung einer konzentrierten Hefefermentationsbrühe, die zur Verwendung als neue Backhefezusammensetzung geeignet ist und einen Trockenhefefeststoffgehalt von 10 bis 22 %, bevorzugt 13 bis 22 %, noch bevorzugter 16 bis 22 %, und eine wässrige Phase mit den Fermentationskomponenten, die aus Mediumkomponenten und Stoffwechselprodukten der Hefe bestehen, beschrieben. Die erfindungsgemäss Zusammensetzung ist eine Backhefezusammensetzung mit einer zellulären und extrazellulären Wasserphasenkomponente, die durch ein Verfahren erhältlich ist, das folgende Schritte umfasst: (a) das Starten der Fermentation durch Zuführen der Saathefe mit einer geeigneten

Nicht-Melasse-Kohlenstoffquelle und einer Stickstoffquelle und anderen Nährstoffen, die für das Hefewachstum essentiell sind, und (b) Fortführen der Fermentation bis der Trockenhefefeststoffgehalt der Fermentationsbrühe 10 bis 22 % beträgt, worin die Nicht-Melasse-Kohlenstoffzuführrate kontrolliert wird, um Alkoholkonzentrationen von höher als 1 % während der Fermentation zu vermeiden, wobei die Zusammensetzung folgendes enthält:

- Backhefe, die einen Trockenhefefeststoffgehalt von 10 bis 22 % aufweist, und
- eine extrazelluläre Phase, die Hefestoffwechselprodukte und organische Verbindungen und Salze mit einer Konzentration von 0,2 osmol/kg oder mehr enthält.

**[0010]** Dies erfolgt bevorzugt durch (a) das Starten einer (z.B. Fed Batch)-Fermentation durch Zuführen der Saathefe mit einer geeigneten Nicht-Melasse-Kohlenstoffquelle und Stickstoffquelle und anderen Nährstoffen, die für das Hefewachstum essentiell sind, (b) Fortführen der Fermentation bis der Trockenhefefeststoffgehalt der Fermentationsbrühe 10 bis 22 % beträgt, und (c) eine optionale Konzentration der Brühe auf 16 bis 22 %, z.B. durch Zentrifugieren und Verwenden der wässrigen Phase bei der Herstellung einer folgenden Fermentation.

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG:

**[0011]** Das neue Verfahren zur Fermentation und Herstellung von Backhefe im industriellen Massstab beginnt mit einer geeigneten Saathefe, deren Qualität und Menge mehr oder weniger gleich zu konventionell verwendeteter Saathefe sein sollte. Insofern bestehen diesbezüglich keine speziellen Anforderungen. Das erfindungsgemäss Verfahren wird bevorzugt im industriellen Massstab durchgeführt. In der Praxis werden 50 bis 300 m<sup>3</sup>-Fermentoren für die Fed Batch-Fermentation, entweder mit Blasensäule oder gerührt, unter normalem oder erhöhtem Druck verwendet, um adäquate Sauerstofftransferraten zu erhalten, um die wachsende Hefe mit Sauerstoff zu versorgen. Das erfindungsgemäss Verfahren stellt konzentrierte Fermentationsbrühe in bekannten industriellen Backhefefermentern her, ohne sehr hohe Sauerstofftransferkapazitäten zu benötigen. Mit Backhefe ist kommerziell oder industriell hergestellter *S. cerevisiae*-Stamm gemeint.

**[0012]** Das Wachstum im Fermenter wird durch Zuführen einer geeigneten Nicht-Melasse-Kohlenstoffquelle (z.B. Glucose, Fructose, Saccharose, Maltose, Dextrine, Maltotriose, Raffinose oder Alkohol oder jede Mischung hiervon) mit einer ausreichend hohen Kohlenstoffkonzentration in der Zuführung verzögert. Die Konzentration in der Zuführung sollte ausreichend hoch sein, um die benötigte Trockenhefe-Feststoffkonzentration zu erhalten, wobei das benötigte

Startvolumen des Fermenters in Betracht gezogen wird. Typischerweise beträgt die Zuckerkonzentration in der Zuführung 250 g/l oder mehr, der einfachen Handhabung halber jedoch bevorzugt zwischen 400 und 600 g/l Zucker.

**[0013]** Die Stickstoffquelle kann jede konventionelle Stickstoffquelle, die normalerweise in der Backhefeherstellung verwendet wird, oder irgendeine C/N-Quelle, die reich an hydrolysierten Proteinen ist (z.B. Casaminosäuren, Trypton, Pepton, Sojamehl) oder eine Kombination hiervon sein. Die N-Dosis sollte ausreichend hoch sein, um nicht-limitierend zu sein. Die Gesamtzuführung an konsumierbarem Stickstoff kann auf einer Elementarwaage (elemental balance) bestimmt werden, um einen Proteingehalt (Kjeldahl N·6,25) von 40 bis 60 % zu erhalten. Die genaue Konzentration ist weniger essentiell als für die Kohlenstoffquelle. Eine 25 %-ige Ammoniaklösung oder eine andere Stickstoffquelle mit entsprechender Stickstoffkonzentration reicht üblicherweise aus, aber andere Konzentrationen, bevorzugt höhere, können verwendet werden.

**[0014]** Phosphat und andere Nährstoffe, wie Salze und Vitamine, und andere Verarbeitungshilfen in Lebensmittelqualität können gemäss gängiger Praxis, wie in offen zugänglicher Literatur beschrieben, verwendet werden, wobei darauf geachtet wird, dass die Komponenten nicht überdosiert werden.

**[0015]** Alle oben beschriebenen Nährstoffe werden üblicherweise in Form von relativ reinen Komponenten, wie Zuckersirupe, Ammoniak, Phosphorsäure usw., zugegeben, können aber ebenfalls in weniger reiner Form zugegeben werden, solange die Zugabe keine Komponente enthält, die herausgewaschen werden muss, um die erhaltene Hefe für die Anwendung in Lebensmittel oder Nahrung geeignet zu machen. Die Komponenten können auf eine Art kombiniert werden, die die Abbauproduktzusammensetzung der wässrigen Phase der Fermentationsbrühe in bezug auf Geschmack und Aroma des Produkts begünstigen.

**[0016]** Das Zuführen zu dem Fermenter beginnt nach der Zugabe der Saathefe. Zumindest die Kohlenstoff- und Stickstoffquellen werden der Fermentation zugeführt, mit Ausnahme einer kleinen Portion, die beim Start der Fermentation schubweise zugegeben werden kann. Die anderen Nährstoffe, wie die Phosphatquelle, Salze und Vitamine, können ebenfalls entweder in Teilen oder vollständig dem Fermenter zugeführt werden. Die Zuführung dieser Komponenten, entweder separat oder mit der Kohlenstoff- und/oder Stickstoffquelle vermischt, hat den Vorteil, dass sehr hohe Konzentrationen zu Beginn der Fermentation vermieden werden. Es ist jedoch möglich, diese Nährstoffe zu Beginn der Fermentation, insbesondere wenn die Kohlenstoff- und Stickstoffquellen

eine hohe Konzentration aufweisen, zugeben, so dass ein relativ grosses Startvolumen des Fermenters ermöglicht wird.

**[0017]** Das Zuführprogramm für die Kohlenstoffquelle ist so, dass die anfängliche Zuführrate an die Rate angeglichen wird, bei der die Saathefe zu wachsen beginnen kann (am bequemsten ausgedrückt in Wachstumsrate) und dann ansteigt, bis die maximale Zuführrate für die Kohlenstoffquelle erreicht ist. Diese maximale Zuführrate für die Kohlenstoffquelle wird einerseits durch die maximale Sauerstofftransferrate des Fermenters und andererseits durch die kritische Wachstumsrate der Hefe, über der die Produktion von Alkohol beginnt, bestimmt. Wenn letzteres limitierend ist, kann die Zuführrate natürlich weiter aufgrund des Wachstums der Hefe exponentiell erhöht werden bis die Sauerstofftransferrate des Fermenters limitierend wird. Die Zuführrate sollte streng genug kontrolliert werden, um Alkoholkonzentrationen von mehr als 1 vorzubeugen, und bevorzugt sollte die Alkoholkonzentration unter 0,5 bleiben. Nahe dem Ende der Fermentation kann die Zuführrate unter den maximalen Wert verringert werden, um den Verbrauch schlecht fermentierbaren C- und C/N-Substrats oder Alkohols zu erlauben. Die Zuführrate kann insgesamt für eine gewisse Dauer am Ende der Fermentation gestoppt werden, um die Zahl der Keimlinge (Reifen der Hefe) zu reduzieren.

**[0018]** Die Stickstoffzuführung kann auf beliebige Art und Weise durchgeführt werden, z.B. um die Verwendung von Chemikalien zur pH-Kontrolle zu verringern, unter der Massgabe, dass der Stickstoff nicht für das Wachstum der Biomasse limitierend wird. Ähnlich wie die Überfütterung mit dem Kohlenstoffsubstrat führt eine Unterfütterung mit der Stickstoffquelle zu übermässiger Alkoholbildung. Dies kann am leichtesten durch ein Zuführen der Stickstoffquelle proportional zur Kohlenstoffquelle oder höher, insbesondere in den frühen Phasen der Fermentation, vermieden werden. Alternativ kann ein Teil des Stickstoffs vor dem Impfen (seeding) hinzugegeben werden. Die Stickstoffzuführung wird beendet, wenn die insgesamt benötigte Menge Stickstoff dem Fermenter zugeführt wurde, was leicht mit der N-Waage (N-balance) über die Fermentation berechnet werden kann. Dasselbe gilt für die Zuführprogramme der anderen Nährstoffe, wie Phosphat, Salzen oder Vitaminen, wenn diese nicht vor dem Impfen zugegeben werden.

**[0019]** Die Temperatur wird zwischen 20 und 45°C, bevorzugt zwischen 25 und 36°C, gehalten. Der pH-Wert wird zwischen pH 3 und 8, bevorzugt zwischen pH 4 und 7, z.B. bei pH 5,5, gehalten.

**[0020]** Die Fermentation wird fortgeführt bis die benötigte Konzentration an Trockensubstanz erreicht ist, die 10 % oder bevorzugter 13 %, Trockenhefe-

feststoff oder mehr, bevorzugt 16 % Trockenhefefeststoff oder mehr, ist. Mit den verwendeten Zuführgraten bedeutet dies eine Fermentationszeit von typischerweise über 20 Stunden, und noch typischer wird eine Fermentationszeit von 30 bis 50 Stunden notwendig sein. Spezifische Wachstumsraten gegen Ende der Fermentation fallen typischerweise unter  $0,05\text{h}^{-1}$  für eine verlängerte Zeitdauer von mindestens 5 Stunden.

**[0021]** Nach der Fermentation wird die konzentrierte Brühe in ein Aufbewahrungsgefäß transferiert und auf niedrige Temperaturen, bevorzugt 0 bis 10°C, und bevorzugter 0 bis 4°C, gekühlt. Wenn die Trockenmassekonzentration zwischen 10 und 16 % der Hefebiomasse ist, kann ein Zentrifugenkonzentrierungschnitt angewandt werden, der zu einer konzentrierteren Fermentationsbrühe und einer wässrigen Phase führt. Die wässrige Phase wird dann in der nächsten Fermentation als Füllwasser verwendet, so dass die Nährstoffkomponenten gespart werden. Bevorzugt wird kein Waschschritt durchgeführt.

**[0022]** Die erhaltene konzentrierte Fermentationsbrühe ist das erfindungsgemäße neue Backhefeprodukt und ist eine spezielle Rahmhefe, die vom Bäcker auf die gleiche Art und Weise wie konventionelle Rahmhefe verwendet werden kann. Der spezielle Rahm wird entweder direkt als normale oder als stabilisierte spezielle Rahmhefe (EP-A-461 725) verkauft oder verwendet, um Blockhefe oder Trockenhefe, entweder aktive Trockenhefe oder Instant-Trockenhefe, unter Verwendung eines beliebigen geeigneten Verfahrens herzustellen.

**[0023]** Das erfindungsgemäße Verfahren kann darüber hinaus die Zugabe eines Stabilisators umfassen, um eine Hefezubereitung zu erhalten, die für die direkte Verwendung als stabilisierte Rahmhefe geeignet ist.

**[0024]** Das erfindungsgemäße Verfahren kann darüber hinaus das Verarbeiten, um Blockhefe oder granulierte Hefe zu erhalten, oder das Trocknen, um aktive Trockenhefe oder Instant-Trockenhefe zu erhalten, umfassen.

**[0025]** Die spezielle Rahmhefe, die durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellt wird, kann jedoch einfach von konventioneller Rahmhefe unterschieden werden, da die Zusammensetzung der extrazellulären Phase ziemlich verschieden ist. In konventionellem Rahm mit 18 bis 22 % Hefetrockengehalt ist die Gesamtkonzentration der gelösten Feststoffe weniger als 0,1 osmol/kg (gemessen durch Gefrierpunktniedrigung, z.B. mit einem Osmomat 030 von Gonotex) und bevorzugt weniger als 0,025 osmol/kg (für osmol siehe z.B. Webster's new collegiate dictionary). Die Konzentration hängt stark von der Effizienz des Waschschrittes der Rahmhefe ab, wobei

ungewaschener Rahm hohe Konzentrationen und extensiv gewaschene Rahmhefe sehr geringe Konzentrationen enthält. Typischerweise besteht die Zusammensetzung konventionellen Rahms aus nicht-fermentierbaren Komponenten der (Rüben)-Melasse und durch die Zellen hergestellten oder aus den Zellen während der Lagerung freigesetzten Abbauprodukten. Im wesentlichen werden Bernsteinsäure und Essigsäure zusammen mit kleinen Mengen Betain, Pyrrolidincarbonsäure und Kalium- und Natriumsalzen und anderen Salzen in dem für die Zuführung und den Verbrauch der Melasse durch Hefe typischen Verhältnis gefunden. Eine besondere Rahmhefe, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhalten wird, enthält neben den Hefefeststoffen in der extrazellulären Fraktion eine Vielzahl von organischen Substanzen, die von Hefeabbau abgeleitet sind, und organische Substanzen und mineralische Komponenten, die ihren Ursprung im Medium finden. Die Gesamtkonzentration gelöster Feststoffe beträgt über 0,2 osmol/kg, und bevorzugter über 0,4 osmol/kg. Ein Überschussgehalt von Salzen, wie bei der Verwendung von Melasse gesehen, wird typischerweise vermieden. Zusätzlich zu nicht-konsumierten Salzen und anderen Verbindungen im Medium werden viele Hefeabbauprodukte gefunden, die Geschmacks- und Aromaeigenschaften von mit solcher Hefe hergestellten Brotprodukten positiv beeinflussen. Diese Komponenten sind Produkte des Hefeabbaus, die vergleichbar zu der Herstellung von Komponenten während der Fermentation von Teig, wie Glycerin, Bernsteinsäure, Isobuttersäure,  $\alpha$ -Ketoglutarsäure, Aminosäuren, Essigsäure, Vitamine usw., sind. Diese Komponenten können Polysaccharide umfassen, die einfach, z.B. mittels NMR-Techniken, detektiert werden können. Die Konzentrationen dieser Komponenten liegen typischerweise im Bereich von 0,1 bis 1 g/l wässriger Phase oder höher für Komponenten, wie Bernsteinsäure und Pyruvat.

**[0026]** Der eindeutige Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, dass es die Entstehung von Schmutzwasser bei der Herstellung von Rahmhefe vollständig vermeidet, und die Entstehung von Schmutzwasser für andere Hefeformulierungen, wie Block-, granulierte oder Trockenhefe, mehr als halbiert.

**[0027]** Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass keine Notwendigkeit zum Waschen der Hefe aus dem Fermenter in den Separatoren besteht, im Gegensatz zu üblicher Praxis, wo mit Melasse hergestellte Hefe extensiv gewaschen wird, um unerwünschte Komponenten von der Melasse zu entfernen, die aus in der Zuckerfabrik verwendeten Verfahren herrühren. Dies führt nicht nur zu einer weiteren Verringerung des Schmutzwassers, sondern reduziert außerdem wesentlich die Menge des für die Hefeproduktion benötigten Wassers hoher Qualität.

**[0028]** Dies trägt zu einer signifikanten Kosteneinsparung bei, da die Gesamtkosten, die mit der Behandlung des Schmutzwassers und der Verwendung von Trinkwasser zusammenhängen, bis zu 25 % des Herstellungspreises von auf konventionelle Art und Weise hergestellter Backhefe, je nach örtlichen Gegebenheiten, betragen. Es ist wichtig, dass diese Kosteneinsparung in Zukunft nur ansteigen wird, da sie auf Energieeinsparung und Einsparung von sauberem (Trink-) Wasser beruht, wobei davon auszugehen ist, dass beides in Zukunft knapper und teurer wird. Da auch die Anforderungen an die Handhabung von Schmutzwasser aufgrund höherer Anforderungen an die Reinheit von Wasser, das in die Umwelt abgelassen wird, ansteigen werden, werden in Zukunft auch die mit der biologischen Behandlung von Schmutzwasser in Verbindung stehenden Kosten zukünftig steigen. Auch hier hilft das erfindungsgemässen Verfahren, das Ansteigen der Kosten zu vermeiden, die einen substantiellen Einfluss auf die Herstellung von Backhefe haben.

**[0029]** Darüber hinaus werden die aus der Literatur zu erwartenden Probleme durch das hier beschriebene Verfahren überwunden. So wurde überraschend gefunden, dass das in dem erfindungsgemässen Verfahren erhaltene Produkt nicht den Nachteil der geringen Gasaktivität (gassing activity) aufgrund der langen Fermentationszeit bei niedriger Wachstumsrate aufweist. Die neue Hefezusammensetzung, die am Ende der erfindungsgemässen Fermentation erhalten wird, ist aktiv genug, um auf übliche Art und Weise vom Bäcker verwendet zu werden. Die Aktivität ist typischerweise grösser als 10 ml Gas, hergestellt in 3 Stunden von einer Hefemenge, die 1 mg Kjeldahl-Stickstoff in einem normalen mageren Teig enthält (siehe Beispiele). Bevorzugt ist die Gasaktivität einer solchen Hefezubereitung vergleichbar mit der einer üblichen Rahmhefe-Zubereitung.

**[0030]** Ein weiteres Problem, dem Rechnung getragen werden kann, betrifft die Versorgungsenergie, die benötigt wird, um die Integrität der Hefe zu erhalten [D. Herbert (1959); Recent Progress in Microbiology (G. Tunerall, Herausgeber), Seite 381; S.J. Pirt (1965), Proc. R. Soc. Lond. Ser. B 163, 224]. Wie die Energie für das Wachstum, wird sie vom Kohlenstoffsubstrat abgeleitet, aber nicht für die Umsetzung des Kohlenstoffsubstrats in Hefetrockensubstanz verwendet, sondern stattdessen, um die Einheit der Hefezellen beizubehalten [D.W. Tempest und O.M. Neyssel (1984), The status of YATP and maintenance energy as biologically interpretable phenomena, An. Rev. Microbiol. 38, 459–486]. Dies beinhaltet unter anderem die zum Erhalt der Konzentrationsgradienten verschiedener Salze zwischen Zellinterieur und -exterieur benötigte Energie. Ein Konzentrationsanstieg der Biomasse in einem konventionellen Verfahren mit Melassen als Substrat würde zu einem signifikanten Ausbeuteverlust führen. Solch ein Aus-

beuteverlust wird nicht gefunden, da übermässige Salzkonzentrationen vermieden werden.

**[0031]** Ein ebenfalls klarer Vorteil besteht darin, dass die in diesem Verfahren erhaltene besondere Rahmhefe immer noch eine hohe Konzentration an Hefeabbauprodukten, die in konventioneller Rahmhefe herausgewaschen oder überhaupt nicht produziert werden, enthält. Diese im Produkt bewahrten Abbauprodukte verbessern den Nährwert und auch den Geschmack und das Aroma der mit der Hefe hergestellten Produkte.

**[0032]** Die Erfindung erstreckt sich nicht nur auf die besondere Rahmhefe, die durch das erfindungsgemässen Verfahren erhältlich ist, sondern auch auf andere Hefezubereitungen, die von solch einer besonderen Rahmhefe abgeleitet werden können (z.B. Blöcke, granulierte Hefe, aktive Instant-Trockenhefe), Mehlteige, die solche Hefezubereitungen enthalten, und hiervon abgeleitete Backwaren.

**[0033]** Die erfindungsgemässen Zusammensetzung kann zur Herstellung von Rahmhefe mit einem Rahmhefetrockengehalt von 16 bis 22 % verwendet werden, und kann ebenfalls zur Herstellung verdichteter Hefe mit einem Hefetrockengehalt von 26 bis 38 % verwendet werden, oder sie kann zur Herstellung von Trockenhefe oder aktiver Trockenhefe mit einem Hefetrockengehalt von 90 bis 98 verwendet werden.

## BEISPIELE

Im Fermentationsprozess verwendete Nährstoffe:

Kohlenstoffquelle:

**[0034]** Als Kohlenstoffquelle kann eine 60 %-ige Glucoselösung verwendet werden. Alternativ kann ein kommerzieller Zuckersirup verwendet werden, der 58 % Trockensubstanz enthält, von denen 47 % Glucose, 0,1 % Fructose, 5 % Disaccharide, 2 % Trisaccharide und 4 % andere Komponenten sind.

Stickstoffquelle:

**[0035]** Als Stickstoffquelle kann eine 50 %-ige Harnstofflösung oder auch eine 25 %-ige Ammoniaklösung oder eine Kombination einer 25 %-igen Ammoniaklösung und einer Tryptondosis oder einer Mischung ausgewählter Aminosäuren verwendet werden.

Phosphatquelle:

**[0036]** Als Phosphatquelle wird am zweckmässigsten Phosphorsäure oder auch Mono- oder Diammoniumphosphat verwendet.

Salze, Spurenelemente und Vitamine:

Andere Fermentationsparameter:

**[0037]** Für den Fall, dass Kohlenstoffsubstrate (als Teil der gesamten Zuführung zur Fermentation), die keine Salze, Spurenelemente oder Vitamine enthalten, verwendet werden, müssen diese zugegeben werden. In der Literatur ist reichlich Information über die Zusammensetzung der Wachstumsmedien verfügbar. Die Zusammensetzung hängt grundsätzlich von der Art und dem Verfahrenstyp ab, wobei darauf geachtet werden sollte, die Zusätze so gering wie möglich zu halten, um Kosten zu sparen.

**[0038]** Eine nützliche Zugabe pro kg Glucoseäquivalente ist: 24 g  $K_2SO_4$ ; 12 g  $MgSO_4 \cdot 7$  aq; 1,6 g  $CaCl_2 \cdot 2$  aq; 25 mg Vitamin B1; 1,25 mg Vitamin B2, 95 mg Vitamin B5; 12 mg Vitamin B6; 0,5 mg Biotin; 5,8 mg p-Aminobenzoësäure; 40 mg Nikotinsäure; 40 mg Nikotinamid; 1,44 g Inositol; 1.025 mg  $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6$  aq; 192 mg  $ZnSO_4 \cdot 7$  aq; 30 mg  $CuSO_4 \cdot 7$  aq; 17 mg  $MnSO_4 \cdot aq$ ; 23 mg  $H_3BO_3$ ; 23 mg  $Na_2MoO_4 \cdot 2$  aq; 11 mg KI; 43 mg Ribitol.

Fermentationsrezept:

Zugaben:

**[0039]** Unter Verwendung der oben genannten Medien kann eine Fermentation mit folgenden Gesamtzugaben für ein Endvolumen von 6 l entworfen werden: 55 g Trockenhefefeststoff-Saathefe; 2.950 g Glucoseäquivalente; 125 g N, 44,5 g  $P_2O_5$ -Äquivalente mit Zusatz von Salzen, Spurenelementen und Vitaminen, wie oben beschrieben.

Zuführprogramm:

**[0040]** Die Kohlenstoffquelle wird derart zugeführt, dass die spezifische Wachstumsrate von 0,08 auf 0,21  $h^{-1}$  über 6 Stunden Fermentation ansteigt. Danach wird die Kohlenstoffquellenzuführrate exponentiell erhöht, bis die maximale Zuführrate zum Fermenter erreicht ist (abhängig von der maximalen OTR des Fermenters). Von da an wird die Kohlenstoffzuführrate konstant gehalten, bis die insgesamt benötigte Menge Kohlenstoff zu dem Fermenter zugeführt wurde. In einem Standardfermenter wird hierfür üblicherweise 40 bis 50 Stunden Fermentation benötigt.

**[0041]** Der Stickstoff wird im Verhältnis zur Kohlenstoffzuführung oder bei konstanter Zuführrate bis zum Ende der Fermentation zugeführt. Wenn nötig, kann die Zuführung früher gestoppt werden, wodurch die Möglichkeit geschaffen wird, die Stickstoffkonzentrationen in der Brühe zu Beginn der Fermentation zu erhöhen, um die Stickstoffassimilation für die Arten, die dies benötigen, zu verbessern.

**[0042]** Der pH wird konstant bei pH 5,5 gehalten, die Temperatur wird konstant bei 32°C gehalten. Die Belüftung wird derart durchgeführt, dass die Konzentration an gelöstem Sauerstoff 2 % des Sättigungswertes oder mehr beträgt.

Fermentation mit einem Konzentrationsschritt:

**[0043]** Das Verfahren kann wie oben beschrieben durchgeführt werden. Die Zuführung wird über 20 Stunden fortgeführt, was zu 12 % Hefetrockengehalt führt. Die Fermentationsbrühe wird in einem Separator konzentriert, was zu einer besonderen Rahmhefe von 20 % Hefetrockengehalt und etwa 0,4 kg wässriger Phase führt. Die wässrige Phase wird in der nächsten Fermentation als Startphase der Fermentation verwendet. Die Zugabe der Komponenten des Mediums, insbesondere der Salze, kann mit den bereits in der wässrigen Phase des Separators vorhandenen Mengen erniedrigt werden. In einer Serie aufeinanderfolgender Fermentationen wird die Zusammensetzung des besonderen Rahmhefeprodukts im Gleichgewicht sein und etwa gleich sein wie für das Produkt ohne Trennungsschritt.

Produktcharakterisierung:

Zusammensetzung der extrazellulären Wasserphase:

**[0044]** Die chemische Zusammensetzung der Hefe ist normaler Backhefe sehr ähnlich. Ein Trockengehalt von 16 % wurde erhalten. Die Zusammensetzung der extrazellulären Wasserphase ist jedoch deutlich verschieden, was z.B. im NMR-Spektrum des Überstandes der besonderen Rahmhefe, die wie in diesem Beispiel beschrieben hergestellt wurde, gesehen werden kann, wenn reine Glucose als Kohlenstoffsubstrat in einem 45 Stunden-Fermentationsprozess verwendet wird. Wir haben festgestellt, dass, im Gegensatz zu konventioneller Rahmhefe, die Menge an Bernsteinsäure und Polysacchariden im erfindungsgemäßen Produkt, wie zuvor beschrieben, neben einer Vielzahl von Komponenten erhöht wurde. Ein osmotischer Wert von 0,8 osmol/kg wurde, im Vergleich zu osmotischen Werten von 0,025 osmol/kg oder weniger für Standardrahmhefe, erhalten.

Gastest (gassing test) im Teig:

**[0045]** Um die Gasaktivität (gassing activity) zu untersuchen, wurde ein normaler Magerteig hergestellt. In bezug auf die Mehlmenge enthält der Teig 55 % Wasser, 2 % Salz und 0,45 % Trockenhefefeststoffe. Der Teig wird auf normale Art und Weise vermischt, um einen richtig entwickelten Teig zu bekommen, und dann in eine Vorrichtung zum Messen der Gaspro-

duktion, wie im wesentlichen von Burrows und Harrison (1959) beschrieben, bei 28°C gebracht, und für bis zu 3 Stunden inkubiert. Die Menge des entstandenen Gases wird zurückgerechnet auf die Menge des Gases, die, wie nach Kjeldahl bestimmt, von einer Hefemenge in 3 Stunden hergestellt wird, die 1 mg Stickstoff enthält. Nach Rückrechnung betrug die Gasmenge 14 ml. Die Gasmenge, die von regulärer Rahmhefe unter diesen Bedingungen hergestellt wurde, beträgt 15 ml.

### Patentansprüche

1. Backhefezusammensetzung, die einen zellulären und extrazellulären Wasserphasenbestandteil aufweist, erhältlich durch ein Verfahren enthaltend: (a) Starten der Fermentation durch Füttern von Saathefe mit einer geeigneten Nicht-Melasse-Kohlenstoffquelle und einer Stickstoffquelle und anderen Nährstoffen, die für das Hefewachstum essentiell sind, und (b) Fortführen der Fermentation, bis der Trockenhefefeststoffgehalt der Fermentationsbrühe 10 bis 22% beträgt, wobei die Nicht-Melasse-Kohlenstofffütterungsrate kontrolliert wird, so dass eine Alkoholkonzentration von mehr als 1 % während der Fermentation unterdrückt wird, worin die Zusammensetzung folgendes enthält:  
 – Backhefe, die einen Trockenhefefeststoffgehalt von 10 bis 22% aufweist, und  
 – eine extrazelluläre Phase, die Hefestoffwechselprodukte und organische Verbindungen und Salze mit einer Konzentration von 0,2 osmol/kg oder mehr enthält.

2. Verfahren zur Herstellung einer Hefefermentationsbrühe, die zur direkten Verwendung als Backhefezusammensetzung gemäß Anspruch 1 geeignet ist, dadurch gekennzeichnet, dass es (a) das Starten der Fermentation durch Füttern der Saathefe mit einer geeigneten Nicht-Melasse-Kohlenstoffquelle und einer Stickstoffquelle und anderen Nährstoffen, die für das Hefewachstum essentiell sind, und (b) Fortführen der Fermentation, bis der Trockenhefefeststoffgehalt der Fermentationsbrühe 10 bis 22% beträgt, umfasst.

3. Verfahren gemäß Anspruch 2, umfassend das Füttern der Saathefe mit der Nicht-Melasse-Kohlenstoffquelle mit einer anfänglichen Geschwindigkeit, die den Beginn des Hefewachstums ermöglicht, und dann das Steigern der Zuführrate der Kohlenstoffquelle, so dass eine maximale Kohlenstoffquellenzuführrate erreicht wird, während die Alkoholkonzentration bei nicht mehr als 1% bei einer Temperatur von 20 bis 45°C und einem pH von 3 bis 8 gehalten wird.

4. Verfahren gemäß den Ansprüchen 2 bis 3, das das Fortführen der Fermentation bis zu einem Trockenhefefeststoffgehalt der Fermentationsbrühe von 10 bis 22% umfasst, entweder unter Erhalt der maxi-

malen Kohlenstoffquellenzuführrate oder unter Erhalt dieser Zuführrate für ein Zeitintervall gefolgt von einer Verringerung der Kohlenstoffquellenzuführrate, so dass ein Verbrauch des schwer fermentierbaren Kohlenstoffsubstrates und/oder Alkohols erzielt wird.

5. Verfahren gemäß Anspruch 3, worin die Fermentationszeit mehr als 20 Stunden beträgt.

6. Verfahren gemäß Anspruch 2, worin die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Hefe am Ende der Fermentation weniger als  $0,05 \text{ h}^{-1}$  für eine erweiterte Periode von mindestens 5 Stunden ist.

7. Verfahren gemäß Anspruch 2, welches weiterhin eine Konzentrierung der Fermentationsbrühe auf 16 bis 22% Trockenfeststoffgehalt umfasst.

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, worin die wässrige Phase, die durch die Konzentration erhalten wird, in einer folgenden Fermentation verwendet wird.

9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2 bis 8, welches außerdem die Zugabe eines Stabilisators umfasst, um eine Hefezubereitung zu erhalten, die zur direkten Verwendung als stabilisierte Rahmhefe (cream yeast) geeignet ist.

10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2 bis 9, welches außerdem eine Weiterbehandlung, um Blockhefe oder granulierte Hefe zu erhalten, oder Trocknen, um aktive Trockenhefe oder Instant-Trockenhefe zu erhalten, umfasst.

11. Mehlteig, der die Hefezusammensetzung gemäß Anspruch 1 enthält.

12. Gebackenes Produkt, das unter Verwendung des Mehlteiges gemäß Anspruch 11 hergestellt ist.

13. Verwendung der Zusammensetzung gemäß Anspruch 1 in der Brotherstellung.

14. Verwendung der Zusammensetzung gemäß Anspruch 1, um eine Rahmhefe mit einem Hefetrockenfeststoffgehalt von 16 bis 22% herzustellen.

15. Verwendung der Zusammensetzung gemäß Anspruch 1 zur Herstellung von Presshefe mit einem Hefetrockenfeststoffgehalt von 26 bis 38%.

16. Verwendung der Zusammensetzung gemäß Anspruch 1 zur Herstellung einer Trockenhefe oder aktiven Trockenhefe mit einem Hefetrockenfeststoffgehalt von 90 bis 98%.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen