

(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **278 461 A1**

4(51) C 12 N 1/00

PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 323 649 5 (22) 22.12.88 (44) 02.05.90

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72) Teich, Walter, Dr. rer. nat.; Otto, Gerhard, Dipl.-Chem.; Pätz, Reinhard, Dr. rer. nat.; Krawatzki, Christa, DD

(54) **Verfahren zur Inaktivierung von Mikroorganismen**

(55) Verfahren, Mikroorganismen, Inaktivierung, Essigsäure, Kultivierung

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Inaktivierung von Mikroorganismen. Die erfinderische Lösung besteht darin, daß man die zu inaktivierende Mikroorganismensuspension bei einer Temperatur von 20 bis 45°C mit Essigsäure vermischt und nach einer Einwirkungszeit von 5 bis 60 Minuten erneut einer Kultivierung unterzieht, wobei das Verfahren ein- oder mehrstufig durchgeführt werden kann. Das vorliegende Verfahren führt zu einer Verringerung des energetischen und apparativen Aufwandes bei der Inaktivierung von Mikroorganismen.

Patentanspruch:

1. Verfahren zur Inaktivierung von Mikroorganismen, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die zu inaktivierende Mikroorganismensuspension mit Essigsäure bei einer Temperatur im Bereich von 20 bis 45°C vermischt und nach einer Einwirkungszeit von 5 bis 60 Minuten erneut einer Kultivierung unterzieht.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Essigsäurekonzentration nach der Vermischung im Bereich von 0,5 bis 10 Ma.-% liegt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß in der Mikroorganismensuspension ein pH-Wert im Bereich von 2 bis 4,5 eingestellt wird.

Hierzu 1 Seite Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Inaktivierung von Mikroorganismen. Sie ist anwendbar zur Herstellung mikrobieller Biomasse (beispielsweise für die Herstellung von Einzellarprotein).

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Für verschiedene mikrobiologische Verfahren, z. B. für die Kopplung mikrobieller Systeme nach dem Prinzip der Kaskade, kann es vorteilhaft sein, die jeweils eingesetzten Mikroorganismen nach der Kultivierung zu inaktivieren. Die üblichen Verfahren zur Sterilisation und Desinfektion (Wallhäußer, K.-H., Sterilisation, Desinfektion, Konservierung, Stuttgart, 1978) sind aus ökonomischen und toxikologischen Gründen nicht anwendbar. Aus diesem Grund wurden mehrere Verfahren entwickelt, mit deren Hilfe suspendierte Mikroorganismen inaktiviert bzw. abgetötet werden können.

So ist ein Verfahren bekannt, DE-OS 2645386, bei dem zur Inaktivierung von Bakterien Monoperschwefelsäure eingesetzt wird. Das Verfahren hat den Nachteil, daß der Einsatz dieser Substanz die Ökonomie des Verfahrens, besonders beim Vorliegen großer Mengen an Mikroorganismensuspension, stark belastet und außerdem die Abwasserqualität verschlechtert. Es ist daher nur für spezielle Fälle geeignet.

Nach einem anderen Verfahren, GB 1563392, wird Formaldehyd zur Abtötung von Bakterien eingesetzt. Die Verwendung von Formaldehyd ist problematisch (toxikologische Bedenken). Die in dieser Patentschrift außerdem genannten Verfahren wie Hitzeschock (50–60°C) und pH-Schock haben folgende Nachteile:

- a) der pH-Schock ist wenig wirksam und führt zu einer starken Salzbelastung des Abwassers
- b) der Hitzeschock reduziert die Zellausbeute und bewirkt eine starke Belastung des Abwassers mit organischen Substanzen.

Nach einem weiteren Verfahren, DD-PS 256330, wird eine Abtötung von Mikroorganismen durch Vermischen einer Mikroorganismensuspension mit heißer Schlempe erreicht. Das Verfahren hat den Nachteil, daß Schlempe nicht überall verfügbar und aufgrund ihrer komplexen Zusammensetzung nur begrenzt einsetzbar ist.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist eine Verringerung des Aufwandes an thermischer Energie, eine Reduzierung des apparativen Aufwandes und eine Senkung der Abwasserbelastung bei der Inaktivierung von Mikroorganismen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, durch den Einsatz spezieller Hilfsstoffe den energetischen und apparativen Aufwand sowie die Belastung des Abwassers bei der Inaktivierung von Mikroorganismen zu reduzieren.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß man die jeweils vorliegenden Mikroorganismensuspension mit Essigsäure vermischt und anschließend erneut einer Kultivierung unterzieht.

Die Verfahrensweise ist im einzelnen folgende: Der Fermentorablauf einer Kultivierungsstufe wird bei einer Temperatur im Bereich von 30 bis 45°C mit Essigsäure vermischt und 5 bis 60 Minuten unter diesen Bedingungen belassen. Die Essigsäurekonzentration wird so eingestellt, daß sie im Bereich von 0,5 bis 10 Ma.-% liegt. Den pH-Wert, der einen Wert im Bereich von 2 bis 4,5 haben soll, stellt man mit der zugefügten Essigsäure ein. Im Bedarfsfall kann zur Einstellung des pH-Wertes auch eine Mineralsäure zusätzlich zur Essigsäure verwendet werden, beispielsweise Schwefelsäure.

Der inaktivierte Fermentorablauf wird anschließend einer Prozeßstufe Kultivierung zugeführt, in der man mit aktiven Mikroorganismen eine Kultivierung in bekannter Art und Weise ein- oder mehrstufig durchführt.

In den folgenden Beispielen wird das erfindungsgemäße Verfahren näher erläutert.

Beispiel 1

In einem Fermentor 1 mit einem Bruttovolumen von 30l wurden kontinuierlich Hefen der Art *C. utilis* bei einem pH-Wert von 4 und bei einer Temperatur von 32°C gezüchtet (Figur 1). Die Masse des Fermentorinhaltes betrug 12kg. Durch die Zuleitung 7, 8

und 9 wurden dem Fermentor 1 400 g/l einer Lösung mit 25 Ma.-% Saccharose, 200 g/h einer Nährsalzlösung üblicher Zusammensetzung und 840 g/h Wasser zudosiert. Die Belüftung erfolgte durch die Zuleitung 6. Weiterhin wurde dem Fermentor 1 über die Rückföhrleitung 15 inaktivierter Fermentorablauf in einer Menge von 1 560 g/h zugeföhrt, der eine Biomassekonzentration von 5,1 Ma.-% und eine Essigsäurekonzentration von 3,85 Ma.-% aufwies. Die Essigsäure diente zusammen mit der Saccharose als Kohlenstoffquelle. Der Gesamtzulauf zum Fermentor 1 betrug somit 3 kg/h, entsprechend einer Verdünnungsrate von $D = 0,25 \text{ h}^{-1}$. Unter diesen Bedingungen wurde eine Produktivität, bezogen auf die gebildete Biomasse, von 6,6 g Hefebiomasse/kg h erzielt.

Der Fermentorablauf enthielt eine Biomassekonzentration von 5,3 Ma.-%. Dieser Fermentorablauf wurde in zwei gleichgroße Teilströme geteilt. Der eine Teilstrom wurde über die Zuleitung 13 in einer Menge von 1,5 kg/h der Inaktivierungsvorrichtung 3 zugeföhrt, dort mit einer Menge von 60 g Essigsäure/h vermischt und 40 Minuten bei einer Temperatur von 35°C in der Inaktivierungsvorrichtung 3 belassen. Bei dem sich einstellenden pH-Wert von 3,0 wurden auf diese Art und Weise 95,3% der zugeföhrtten Hefezellen inaktiviert. Der gesamte inaktivierte Fermentorablauf wurde über die Leitung 15 in den Fermentor 1 zurückgeföhrt.

Der andere Teilstrom wurde in einer Menge von 1,5 kg/h über die Leitung 14 der Trennstufe 4 zugeföhrt. Hier erfolgte eine Konzentrierung der Biomasse auf 17,3 Ma.-%. Das abgetrennte Wasser wurde in einer Menge von 1 040 g/h über die Leitung 17 abgeföhrt. Das Hefekonzentrat wurde über die Leitung 18 in eine Trockenvorrichtung 5 dosiert und dort bei 110°C getrocknet. Man erhielt eine Ausbeute eines Trockenproduktes 19 von 1 980 g, bezogen auf 24 Stunden, das einen Feuchtigkeitsgehalt von 4 Ma.-% aufwies. Über die Leitung 20 wurde Wasserdampf abgeföhrt.

Beispiel 2

In einem Fermentor 1 mit einem Bruttovolumen von 30 l und einem Fermentorinhalt von 12 kg wurden kontinuierlich Hefen der Art *C. utilis* bei einem pH-Wert von 4 und bei einer Temperatur von 35°C gezüchtet (Figur 2). Durch die Zuleitung 7 und 8 wurden dem Fermentor 1 550 g/h einer Lösung mit 25 Ma.-% Saccharose und 265 g/h einer üblichen Nährsalzlösung zudosiert. Durch die Zuleitung 6 wurde Luft eingetragen. Weiterhin wurde dem Fermentor 1 über die Leitung 15 inaktivierter Fermentorablauf in einer Menge von 2 185 g/h zugeföhrt, der eine Biomassekonzentration von 11,6 Ma.-% und eine Essigsäurekonzentration von 3,9 Ma.-% aufwies. Bei einer Verdünnungsrate von $D = 0,25 \text{ h}^{-1}$ wurde eine Produktivität, bezogen auf die gebildete Biomasse, von 9,05 g Hefebiomasse/kg h erzielt. Der Fermentorablauf enthielt Biomasse in einer Konzentration von 12,07 Ma.-%. Dieser Fermentorablauf wurde in zwei unterschiedliche Teilströme geteilt. Der größere Teilstrom wurde über die Zuleitung 13 in einer Menge von 2,1 kg/h der Inaktivierungsvorrichtung 3 zugeföhrt. Zugleich wurde der Inaktivierungsvorrichtung 3 über die Leitung 10 Essigsäure in einer Menge von 85 g/h zudosiert und mit dem Fermentorablauf vermischt. Bei einer Temperatur von 35°C und einem pH-Wert von 3 wurde der Fermentorablauf 40 Minuten in der Inaktivierungsvorrichtung belassen, wodurch 95% der Hefezellen inaktiviert wurden. Der gesamte inaktivierte Fermentorablauf wurde über die Leitung 15 in den Fermentor 1 zurückgeföhrt.

Der andere Teil des Fermentorablaufes wurde nach einer Sterilisationsbehandlung über die Leitung 21 direkt einer Flüssigverföderung zugeföhrt. Es wurde auf diese Weise ein Produktausstoß von 21,6 kg, bezogen auf 24 Stunden, erhalten, wobei die Konzentration der Hefebiomasse 12 Ma.-% betrug. Das entspricht einer Menge von 2,6 kg Hefetrockensubstanz.

Beispiel 3

In einer zweistufigen Fermentationsanlage, bestehend aus zwei Fermentoren 1 und 2 mit einem Bruttovolumen von je 30 l, wurden kontinuierlich Hefen der Art *C. utilis* gezüchtet. Durch Regelung wurde in beiden Fermentoren eine Temperatur von 33°C und ein pH-Wert von 4,2 eingestellt. Die Belüftung der Fermentoren erfolgte durch die Zuleitung 6 (Figur 3). In den Fermentor 1 wurde über die Leitung 7 eine Lösung mit 40 Ma.-% Saccharose in einer Menge von 415 g/h dosiert. Außerdem wurden über die Leitungen 8 und 9 200 g/h Nährsalzlösung bzw. 2 385 g/h Wasser dosiert, so daß der Gesamtzulauf zu Fermentor 1 3 000 g/h betrug, was einer Verdünnungsrate von $D = 0,25 \text{ h}^{-1}$ entsprach. Unter diesen Bedingungen wurde im Fermentor 1 eine Produktivität von 7,1 g Hefebiomasse/kg h bei einem Ausbeutekoeffizienten, bezogen auf Saccharose, von 51,3% erreicht. Der Ablauf der ersten Fermentationsstufe, der Hefebiomasse in einer Konzentration von 2,84 Ma.-% enthielt, wurde anschließend in einer Menge von 3 000 g/h kontinuierlich einer Inaktivierungsvorrichtung 3 zugeföhrt. Gleichzeitig wurden über die Leitung 10 100 g Essigsäure/h eingetragen und mit dem Fermentorablauf vermischt. Der so behandelte Fermentorablauf wurde bei einer Temperatur von 35°C und bei einem pH-Wert von 3,1 für die Dauer von 40 Minuten in der Inaktivierungsvorrichtung belassen, wodurch eine Inaktivierung von 92,5% der Hefezellen bewirkt wurde.

Der inaktivierte Fermentorablauf wurde anschließend in einer Menge von 3 100 g/h über die Leitung 16 in den Fermentor 2 überföhrt. Zusätzlich wurde dem Fermentor 2 über die Zuleitungen 7 und 8 eine Lösung mit 40 Ma.-% Saccharose in einer Menge von 250 g/h sowie 200 g/h einer üblichen Nährsalzlösung zudosiert. Der Gesamtzulauf zu Fermentor 2 betrug 3 550 g/h, was bei einer Füllmasse von 13 kg einer Verdünnungsrate von $D = 0,273 \text{ h}^{-1}$ entsprach. Die Kultivierung der Hefebiomasse erfolgte in der zweiten Fermentationsstufe somit auf der Basis von Saccharose und Essigsäure. Unter diesen Bedingungen wurde in der zweiten Fermentationsstufe eine Produktivität, bezogen auf neu gebildete Hefebiomasse, von 7,45 g Hefebiomasse/kg h erreicht.

Der Ablauf der zweiten Fermentationsstufe, der Hefebiomasse in einer Konzentration von 5,13 Ma.-% enthielt, wurde anschließend in einer Menge von 3,55 kg/h über die Leitung 12 der Trennstufe 4 zugeföhrt. Nach Abtrennung einer Wassermenge von 2,55 kg/h, die über die Leitung 17 abgeföhrt wurde, erhielt man 1 000 g/h Hefebiomasse mit einer Konzentration von 18,2 Ma.-%, die danach über Leitung 18 der Trockenstufe 5 zugeföhrt wurde. Nach einer Trocknung bei 110°C erhielt man ein Hefetrockensprodukt 19 mit einem Feuchtigkeitsgehalt von 3,5 Ma.-% in einer Ausbeute von 4,5 kg, bezogen auf 24 Stunden. Über die Leitung 20 wurde Wasserdampf aus der Trockenstufe 5 abgeföhrt.

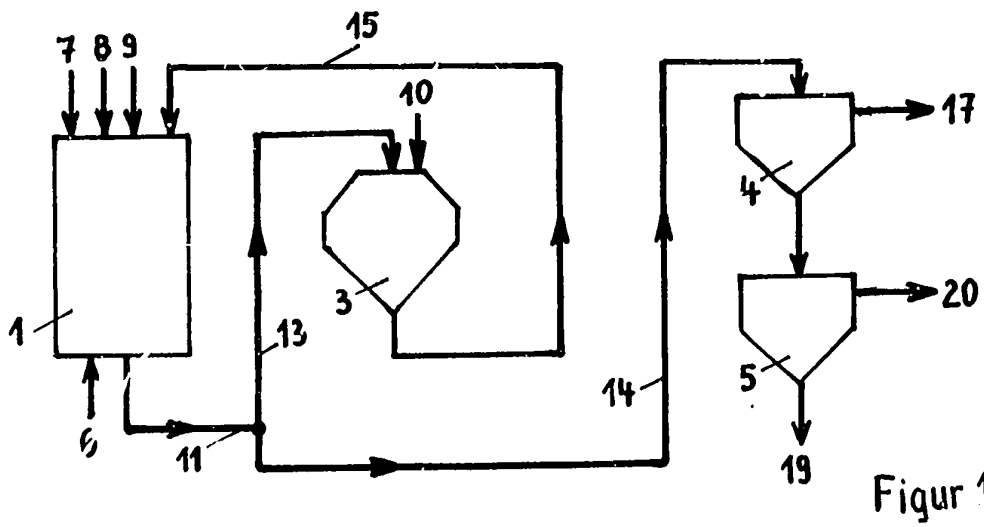
Beispiel 4

In einer zweistufigen Fermentationsanlage, bestehend aus zwei Fermentoren 1 und 2 mit einem Bruttovolumen von je 30 l, wurden kontinuierlich Hefen der Art *C. utilis* gezüchtet. Durch Regelung wurde in beiden Fermentoren eine Temperatur von 33°C und ein pH-Wert von 4,2 eingestellt. Die Belüftung der Fermentoren erfolgte durch die Zuleitung 6 (Figur 3). In den Fermentor 1 wurde über die Leitung 7 eine Lösung mit 40 Ma.-% Saccharose in einer Menge von 290 g/h dosiert. Außerdem wurden über die

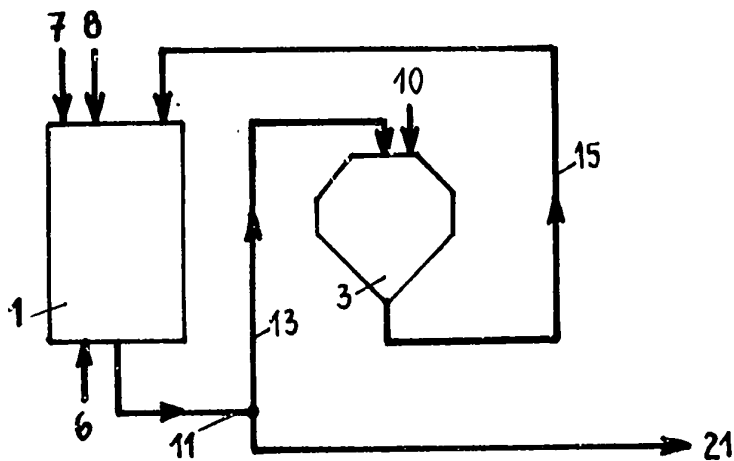
Leitungen 8 und 9 150 g/h Nährsalzlösung bzw. 2560 g/h Wasser dosiert, so daß der Gesamtzulauf zu Fermentor 1 3000 g/h betrug, was einer Verdünnungsrate von $D = 0,25 \text{ h}^{-1}$ entsprach. Unter diesen Bedingungen wurde im Fermentor 1 eine Produktivität von 5 g Hefebiomasse/kg h bei einem Ausbeutekoeffizienten, bezogen auf Saccharose, von 51,7% erreicht. Der Ablauf der ersten Fermentationsstufe, der Hefebiomasse in einer Konzentration von 2 Ma.-% enthielt, wurde anschließend in einer Menge von 3000 g/h einer Inaktivierungsvorrichtung 3 zugeführt. Gleichzeitig wurden über die Leitung 10 65 g Essigsäure/h eingetragen und mit dem Fermentorablauf vermischt. Der so behandelte Fermentorablauf wurde bei einer Temperatur von 42°C und bei einem pH-Wert von 3,5 für die Dauer von 15 Minuten in der Inaktivierungsvorrichtung belassen, wodurch eine Inaktivierung von 91,3% der Hefezellen bewirkt wurde.

Der inaktivierte Fermentorablauf wurde anschließend in einer Menge von 3065 g/h über die Leitung 16 in den Fermentor 2 überführt. Zusätzlich wurden dem Fermentor 2 über die Zuleitungen 7 und 8 eine Lösung mit 40 Ma.-% Saccharose in einer Menge von 150 g/h sowie 155 g/h einer üblichen Nährsalzlösung zudosiert. Der Gesamtzulauf zu Fermentor 2 betrug 3370 g/h, was bei einer Füllmasse von 13 kg einer Verdünnungsrate von $D = 0,259 \text{ h}^{-1}$ entsprach. Die Kultivierung der Hefebiomasse erfolgte in der zweiten Fermentationsstufe somit auf der Basis von Saccharose und Essigsäure. Unter diesen Bedingungen wurde in der zweiten Fermentationsstufe eine Produktivität, bezogen auf neu gebildete Hefebiomasse, von 4,69 g Hefebiomasse/kg h erreicht.

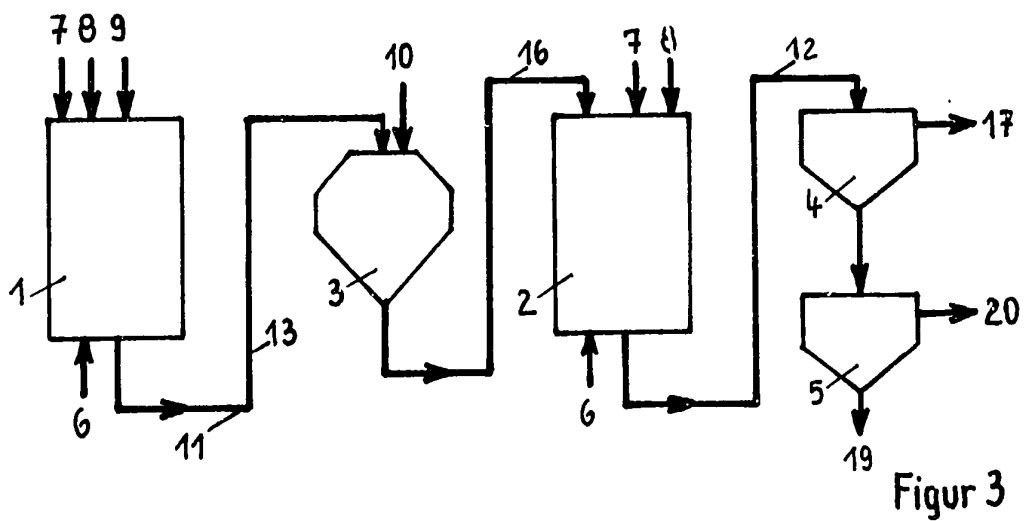
Der Ablauf der zweiten Fermentationsstufe, der Hefebiomasse in einer Konzentration von 3,6 Ma.-% enthielt, wurde anschließend in einer Menge von 3,37 kg/h über die Leitung 12 der Trennstufe 4 zugeführt. Nach Abtrennung einer Wassermenge von 2,7 kg/h, die über die Leitung 17 abgeführt wurde, erhielt man 672 g/h Hefebiomasse mit einer Konzentration von 18 Ma.-%, die danach über Leitung 18 der Trockenstufe 5 zugeführt wurde. Nach einer Trocknung bei 110°C erhielt man ein Hefetrockenprodukt 19 mit einem Feuchtigkeitsgehalt von 3 Ma.-% in einer Ausbeute von 3 kg, bezogen auf 24 Stunden. Über die Leitung 20 wurde Wasserdampf aus der Trockenstufe 5 abgeführt.



Figur 1



Figur 2



Figur 3