



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **225 436 A1**

4(51) C 12 N 1/18

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 264 654 3

(22) 28.06.84

(44) 31.07.85

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1086 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD

(72) Knackmuss, Kurt-Peter, Dr. rer. nat.; Feiler, Erhard, Dr. rer. nat.; Wandt, Angelika, Dipl.-Biol., DD

(54) Verfahren zur Abreicherung unerwünschter Fremdorganismen in kontinuierlichen Backhefeprozessen

(57) Ziel der Erfindung ist es, eine Backhefe mit hohem Reinheitsgrad herzustellen und durch Bakterien, Wuchshefen oder Schimmelpilze verursachte Kontaminationen gering zu halten. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß man in einem kontinuierlich betriebenen Fermenter nach Unterbrechung der Dosierströme den pH-Wert auf $\leq 2,5$ absenkt und die Luftzufuhr stoppt sowie nach einem Zeitraum $\geq 0,5$ h, unmittelbar nach Einstellung der Ausgangswerte für pH und Luftzufuhr, den kontinuierlichen Prozeß weiter betreibt.

Titel

Verfahren zur Abreicherung unerwünschter Fremdorganismen
in kontinuierlichen Backhefeprozessen

Anwendungsgebiet der Erfindung

- 5 Die Erfindung betrifft die Herstellung von Backhefe und wird zweckmäßigerweise in der Backhefeindustrie verwendet.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

- 10 Auf Grund der Züchtungsweise von Backhefe läßt sich eine gewisse Kontamination mit Fremdorganismen nicht vermeiden. Eine Vielzahl von Mikroorganismen ist fähig, die in dem verwendeten Substrat Melasse enthaltenen Zucker und Wachstumsstoffe zu assimilieren und somit in Konkurrenz mit dem verwendeten Backhefestamm zu treten.
- 15 Die Verwendung der Backhefe als Nahrungsmittelzusatz erfordert jedoch einen möglichst geringen Gehalt an Fremdorganismen. Außerdem bewirken Kontaminationen eine Verschlechterung wesentlicher Qualitätsmerkmale der Backhefe, wie z. B. eine Verringerung des Gärvermögens in saccharose- und maltose-
- 20 haltigen Teigen (Triebkraft) sowie eine Erniedrigung der Lagerstabilität.

- Als Schadorganismen bei der Backhefezüchtung werden in der Literatur vor allem einige Säurebildner, wie z. B. Essigbakterien und verschiedene Wuchshefen, wie Torula-, Candida- und Macoderma-Arten (Kahmhefen) genannt, welche oft sehr
- 25

schnellwüchsig sind und Backhefe verdrängen. Ferner können Kontaminationen durch Schimmelpilze, wie z. B. *Penicillium*- und *Aspergillus*-Arten auftreten. Die Kontaminationsgefahr ist ein Grund für die Anwendung diskontinuierlicher Züchtungsprozesse, der sogenannten Zulaufverfahren. In ihnen wird mit einer Reinzuchthefer mit einer hohen Konzentration angeimpft und das Hefewachstum möglichst rasch in Gang gebracht. Dadurch hat die Backhefe im Fermentor eine derartige zahlenmäßige Überlegenheit, daß ein Aufkommen von Fremdorganismen vermindert wird. Außerdem wird der Prozeß nach 2 bis 4 Verdopplungen der Backhefen beendet und das Fermentationssystem vor einem neuen Prozeßbeginn sterilisiert.

Das Risiko des Auftretens von Kontaminationen in nennenswertem Umfang ist ein wesentlicher Grund dafür, daß sich kontinuierliche Backhefeverfahren noch nicht durchgesetzt haben. Es bestehen erhebliche Schwierigkeiten, eine kontinuierlich arbeitende Anlage über einen längeren Zeitraum infektionsarm zu halten. Auch wenn dieses Problem durch technische Entwicklungen in den letzten Jahren prinzipiell lösbar geworden ist, rechtfertigen die durch eine sterile kontinuierliche Fermentation verursachten höheren Kosten noch nicht die Entwicklung kontinuierlicher Backhefeprozesse auf dieser Basis.

Es ist ein Verfahren bekannt (DE OS 26 45 386), bei dem Bakterien in Hefesuspensionen durch Zusatz von Monoperschwefelsäure oder ihrer wasserlöslichen Salze abgetötet werden. Auch durch eine Behandlung gekühlter Hefesuspensionen mit Schwefelsäure oder Salzsäure bei einem pH < 2,5 sollen Bakterien inaktiviert werden (White, J., *Yeast Technology*, London 1954, 232). Ebenso ist die Säurewäsche eine mitunter in der Backhefeindustrie verwendete Methode, um aus Versandhefe erneut eine Reinzuchtkultur bereitzustellen.

Die erwähnten Methoden führen zwar zur selektiven Abtötung bakterieller Kontaminationen, jedoch werden Fremd-

hefen und Schimmelpilze nicht oder nur geringfügig durch diese Maßnahmen geschädigt. Außerdem können diese Methoden nicht in kontinuierlichen Backhefeprozessen verwendet werden, sondern dienen der nachträglichen Keimverminderung nach einem beendeten Fermentationsprozeß.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, in einem kontinuierlich betriebenen Backhefeprozeß den Anteil an Bakterien, Fremdhefen und Schimmelpilzen zu vermindern und somit eine Backhefe mit konstanten Qualitätsmerkmalen zu erzeugen.

Wesen der Erfindung

Die Erfindung stellt sich die Aufgabe, durch Einstellung und Einhaltung spezieller Verfahrensbedingungen unerwünschte Fremdorganismen im kontinuierlichen Fermentationsprozeß abzutöten bzw. so zu inhibieren, daß sie aus dem Fermentor ausgeschwemmt werden.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe dadurch gelöst, daß in einem kontinuierlich betriebenen Backhefeprozeß nach Unterbrechung der Nährlösungsdosierung in den Fermentor gleichzeitig der pH auf einen Wert $\leq 2,0$ abgesenkt und die Luftzufuhr unterbrochen wird sowie nach einem Zeitraum von ≥ 30 min unmittelbar nach Wiedereinstellung der Ausgangsparameter ein kontinuierlicher Prozeß weiterbetrieben wird.

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* toleriert Änderungen des pH-Wertes in einem weiten Bereich. Entsprechende Stämme weisen ein gutes Wachstum in einem pH-Bereich von 4,0 bis 5,5 auf.

Überraschenderweise hat sich gezeigt, daß diese Hefen bei pH-Werten $\leq 2,0$ bei gleichzeitiger Einstellung anaerober Fermentationsbedingungen zwar kein erkennbares Wachstum mehr aufweisen, daß sie jedoch auch über einen Zeitraum von mehreren Stunden nicht irreversibel inaktiviert werden. Somit sind sie in der Lage, unmittelbar nach Erhöhung

des pH-Wertes auf 4,0 oder darüber und Wiederherstellung partiell aerober Fermentationsbedingungen weiterzuwachsen.

5 Andererseits werden sowohl Bakterien als auch die sich vor allem oxidativ vermehrenden Wuchshefen und Schimmelpilze durch einen niedrigen pH-Wert in Verbindung mit einer raschen Einstellung anaerober Milieubedingungen abgetötet oder derart nachhaltig inaktiviert, daß sie bei Weiterführung der kontinuierlichen Fermentation aus dem Fermentor ausgeschwemmt werden.

10 Die kombinierte pH-Absenkung und Drosselung der Sauerstoffzufuhr läßt sich im Verlauf eines kontinuierlichen Backhefeprozesses mehrfach wiederholen. Sie wird durchgeführt, wenn mikrobielle Kontrollen des laufenden Fermentationsprozesses einen Anstieg des Infektionsgehalts über
15 eine zulässige, vorher festgelegte Grenze ergeben.

Beispiel 1

In einem mit Rührung versehenen Fermentor mit einem Bruttovolumen von 15 l, dessen Füllmasse 10 kg beträgt, werden
20 7 l destilliertes Wasser mit einem pH-Wert von 4,5 sowie 125 ml eines heißgeklärten Melassesubstrates mit einem Gehalt von 200 g/l Zucker, 12 g/l Ammoniumsulfat, 3,5 g/l Diammoniumhydrogenphosphat und 6 g/l Hefeextrakt vorgelegt.

Bei einer Temperatur von 30 °C wird mit 740 g Naßhefe (27 % Trockengehalt) angeimpft, die Fermentorfüllmasse
25 durch Auffüllen mit destilliertem Wasser auf 10 kg gebracht und unter Rühren soviel Luft zugeführt, daß der Gelöstsauerstoffgehalt im Fermentationsmedium im Verlauf von 30 min auf einen Wert von 0,4 ppm abfällt.

Nach einsetzendem Biomassewachstum wird eine dosierpumpen-
30 gesteuerte Substrat- und Wasserzulaufregelung über die kontinuierlich mittels Streulichtphotometer und Flammenionisationsdetektor gemessenen Biomasse- und Ethanol-

konzentrationen in Betrieb genommen. Dieses System arbeitet derart, daß bei Überschreiten eines Sollwertes von 20 g/l Biomassetrockensubstanz dem Prozeß solange Wasser zudosiert wird, bis dieser Wert wieder erreicht ist. Bei Unterschreiten eines Sollwertes von 0,2 g/l Ethanol wird dem Prozeß solange Melassesubstrat zugeführt, bis dieser Wert wieder erreicht ist. Durch eine Füllmasseablaufregelung wird dabei die Fermentorfüllmasse auf 10 kg konstant gehalten.

10 Nach 72 h Fermentationszeit erfolgten Plattentests mit einer Probe aus dem Fermentationsmedium auf G 5,4 und P 6,6. Dabei zeigten sich etwa 80 % Saccharomyceskolonien, etwa 15 % Fremdhefen und 5 % Bakterienkolonien.

15 Nach der Probeentnahme zu einem Zeitpunkt, an dem die aktuelle Ethanolkonzentration im Fermentationsmedium einen Wert von 0,21 g/l aufwies und somit keine Melasse-dosierung erfolgte, wurde durch Schwefelsäuredosierung der pH-Wert innerhalb 1 min auf pH = 1,8 abgesenkt, die Luftzufuhr abgestellt und die Rührerdrehzahl auf 150 U/min verringert.

20 Nach 1,5 h wurde durch Dosierung von konzentriertem Ammoniakwasser der pH-Wert innerhalb 1 min auf 4,5 erhöht und gleichzeitig Luftzufuhr und Rührerdrehzahl auf den Ausgangswert gebracht. Nach wenigen Minuten begann ein erneutes Mikroorganismenwachstum im Fermentor. Weitere Plattentests nach 3 h Fermentationszeit mit G 5,4 und P 6,6 ergaben einen Anteil von 95 % Saccharomyces-Kolonien, 4,5 % Fremdhefen und 0,5 % Bakterien.

Beispiel 2

30 400 g Backhefe wurden mit 100 ml Nährlösung und destilliertem Wasser bei einem pH von 4,0 in einem mit regelbarer Rührung versehenen Fermentor derart suspendiert, daß die Fermentorfüllmasse 16 kg betrug. Die Nährlösung bestand aus 120 g/l heißgeklärter Rübenzuckermelasse,

7 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,1 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ und 3,5 g/l Hefeextrakt.

- 5 Bei einer Fermentationstemperatur von 30 °C und einem pH von 4,0 wurde eine Zulauftrate der Nährlösung in den Fermentor von 1,6 l/h bei konstanter Fermentorfüllmasse eingestellt. Ein Flammenphotometer bestimmte kontinuierlich die Ethanolkonzentration und hielt über eine Drehzahlregelung des Rührers diese Konzentration auf einem Sollwert von 1 g/l.
- 10 Nach 72 h kontinuierlicher Prozeßfahrweise erfolgte eine Unterbrechung der Substratzufuhr, eine Probeentnahme aus dem Fermentationsmedium und die Durchführung von Plattentests auf G 4,5 und P 6,6. Dabei zeigten sich etwa 80 % Saccharomyces-Kolonien, etwa 15 % Fremdhefen und 5 % Bakterienkolonien.
- 15 Unmittelbar nach der Probeentnahme wurde der pH-Wert im Fermentor mit H_2SO_4 innerhalb 1 min auf pH = 1,5 abgesenkt und die Luftzufuhr unterbrochen. Nach 1,5 h erfolgte eine Wiederherstellung der ursprünglichen Fermentationsbedingungen und eine Weiterführung der kontinuierlichen Fermentation.
- 20 Erneute Plattentests einer nach weiteren drei Stunden kontinuierlichen Fermentation entnommenen Probe zeigten, daß nur noch 1 Hefetyp sowie 3 Bakterientypen mit einem Gesamtanteil von 2 % der Gesamtzellzahl fähig waren, Kolonien zu bilden.
- 25

Erfindungsanspruch

Verfahren zur Abreicherung unerwünschter Fremdorganismen in kontinuierlichen Backhefeprozessen, dadurch gekennzeichnet, daß während des Fermentationsprozesses für die Dauer von
5 0,5 bis 3,0 h, vorzugsweise 1,0 bis 2,0 h, der pH-Wert auf 1,0 bis 2,5, vorzugsweise 1,5 bis 2,0, abgesenkt und gleichzeitig die Luftzufuhr unterbrochen wird.