



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑪ CH 648 345 A5

⑤① Int. Cl.4: C 12 N 1/00
C 12 M 3/00

// A 23 L 1/20 (C 12 N 1/00,
C 12 R 1:645)

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑫① Gesuchsnummer: 7589/79

⑫② Anmeldungsdatum: 20.08.1979

⑫③ Priorität(en): 18.08.1978 US 934683

⑫④ Patent erteilt: 15.03.1985

⑫⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 15.03.1985

⑫⑦ Inhaber:
Butler County Mushroom Farm Incorporated,
Worthington/PA (US)

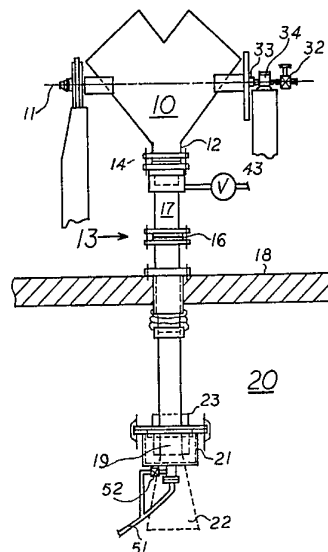
⑫⑦② Erfinder:
Maul, Stephen B., Worthington/PA (US)
Lemke, Paul A., Cabot/PA (US)
Gerner, Walter L., Sarver/PA (US)
Yoder, John B., Butler/PA (US)

⑫⑦④ Vertreter:
Dr. A. R. Egli & Co., Patentanwälte, Zürich

⑫⑤④ Verfahren zur Kultivierung von Zellen auf einem Feststoffsubstrat und Vorrichtung zur Ausführung des Verfahrens.

⑫⑤⑦ Im Verfahren für die Herstellung von Zellkulturen, speziell von Pilzkulturen, wird von Nahrungssubstraten ausgegangen, die in einem kommerziell erhältlichen Mischapparat zusammen mit Wasser und Kalk gemischt und sterilisiert werden. Die Sterilisation geschieht bei Temperaturen von mindestens 122°C. Nach Abkühlen der gemischten und sterilisierten Nahrungssubstrate wird das Inokulum steril in den gleichen Mischapparat eingeführt. Nun wird wiederum gemischt und, falls nötig, nochmals sterilisiert. Nach Ablassen des Dampfdruckes wird der Inhalt im Mischapparat nun unter eine sterile Luftatmosphäre von leichtem Überdruck gebracht. Die inokulierte Mischung wird nun über einen sterilen Anschlussapparat in Kunststoffsäcke zur Inkubation abgefüllt. Die Kunststoffsäcke enthalten einen Atmungstreifen.

Mittels des neuen Verfahrens werden verschiedene Nachteile der herkömmlichen Pilzkultur-Gewinnungsmethoden eliminiert und einige Arbeitsabläufe vereinfacht.



PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Kultivierung von Zellen auf einem Feststoffsubstrat, umfassend die folgenden Verfahrensschritte:

- a) Mischen eines Ansatzes aus teilchenförmigen Nahrungssubstraten und Sterilisieren des Ansatzes bei einer Temperatur von mindestens 122°C,
- b) Abkühlen der sterilisierten Mischung,
- c) Inokulieren der sterilisierten Mischung mit dem sterilisierten Inokulum,
- d) Mischen des sterilisierten Inokulums und der sterilisierten Mischung, um eine inokulierte Mischung zu erhalten, und
- e) Einfüllen der sterilen, inokulierten Mischung in mindestens einen sterilen Behälter zur Inkubation.

2. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass im Verfahrensschritt a) während des Mischens gleichzeitig sterilisiert wird.

3. Verfahren gemäss Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass das genannte Mischen und Sterilisieren 35 bis 120 Minuten dauert.

4. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass vor dem Einfüllen der sterilisierten, inokulierten Mischung dieselbe in verschiedene Teile aufgeteilt wird und jedes Teil in einen sterilen Behälter zur Inkubation eingefüllt wird.

5. Verfahren gemäss Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die genannte inokulierte Mischung in den sterilen Behälter zur Inkubation eingefüllt wird, währenddem eine laminare Strömung von steriler Luft um den Behälter geführt wird.

6. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1, 2 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die genannten teilchenförmigen Nahrungssubstrate Getreide sind und dass die Mischung Wasser und Kalk enthält.

7. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1, 2 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die genannten Inkubationsbehälter flexible Plastiksäcke sind, die einen gasdurchlässigen Streifen aufweisen.

8. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1, 2, 4 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass das genannte Inokulum eine Pilzkultur ist.

9. Vorrichtung zur Ausführung des Verfahrens gemäss Anspruch 1, umfassend die folgenden Vorrichtungs-elemente:

a) einen Drehmischapparat (10) mit Einrichtung zum Erhitzen und zum Auf-Temperatur-halten des Inhaltes auf eine Temperatur von mindestens 122°C, mit Ein- bzw. Auslass und mit mindestens einem Fluidumeinlass,

b) eine Anschlusseinrichtung (13), um den Ein- bzw. Auslass des Drehmischapparates dicht abschliessend daran anzuschliessen, wobei die Anschlusseinrichtung einen ersten und einen zweiten Ventilabschluss umfasst, die zusammen ein bestimmtes Volumen zum Messen und Proportionieren von aus dem Drehmischapparat austretenden Mischungen abschliessen und wobei die Anschlusseinrichtung einen Fluidumeinlass umfasst,

c) eine Haube (21), die über das Austrittsende der Anschlusseinrichtung gelegt werden kann, um in der genannten Anschlusseinrichtung zwischen dem ersten Ventilabschluss und der Haube eine Fluidum-Atmosphäre zu schaffen und zu halten,

d) eine Einrichtung zur Filtrierung und zur Sterilisation von Luft,

e) eine Luftquelle, anschliessbar an den Luftfilter und an die genannten Fluidumeinlässe des Drehmischapparates und der Anschlusseinrichtung, und

f) eine Wasserdampfquelle, anschliessbar an die genannt-

ten Fluidumeinlässe des Drehmischapparates und der Anschlusseinrichtung.

10. Vorrichtung gemäss Anspruch 9, weiter umfassend eine Einrichtung zur Schaffung eines laminaren Stroms steriler Luft am und um das Austrittsende der Anschlusseinrichtung.

11. Vorrichtung gemäss Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Drehmischapparat ein V-förmiger Drehmischapparat ist, der einen Heizmantel aufweist.

10

Die vorliegend beschriebene Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kultivierung von Zellen auf einem Feststoffsubstrat und eine Vorrichtung zur Ausführung des Verfahrens. Speziell betrifft die Erfindung die sterile Kultivierung von Pilzkulturen. Es wird angenommen, dass die Erfindung auch eingesetzt werden kann für die Produktion von Metaboliten und Antibiotika aus anderen Zellgerüsten wie auch für die Kultivierung von Tempeh und Miszo.

Die Herstellung von Pilzkulturen ist bekannt. Beispielsweise wird trockenes Getreide in eine Flasche mit Wasser und Kalziumkarbonat gegeben, mit einem Wattebausch verschlossen und sterilisiert. Nach der Sterilisation wird die Flasche abgekühlt und das Getriedekorn mit Mycelium inokuliert. Die Flasche wird dann wieder verschlossen und zur Inkubation des Myceliums eine entsprechende Zeit lang stehen gelassen (siehe US-PS Nr. 1 869 517). Bei der Kultivierung von Pilzkulturen ist die Sterilisation der Nahrungssubstrate und des Behälters absolut notwendig. Ohne diese Massnahme wachsen neben den Pilzkulturen andere Bakterien oder Arten, die dann das Wachstum der Pilzkulturen verunmöglichen.

Die Produktion von Tempeh ist, speziell in orientalischen Kulturen, seit langer Zeit bekannt. Tempeh wird aus Sojabohnen fermentiert, die mit verschiedenen Spezies von Rhizopus inokuliert werden. Neuere Methoden erlauben es, Tempeh in Plastikbehältern relativ schnell zu fermentieren, wobei die erhaltene Mycelium-Masse die Sojabohnen in Form eines kuchenähnlichen Produktes zusammenbindet.

Verbesserungen betreffend die Kultivierung von Pilzkulturen umfassen das Vorkochen und das Schwellen von Getreidekörnern, um deren Zusammenbacken während der Sterilisation zu verhindern (siehe US-PS Nr. 2 530 318).

Ebenso ist ein Verfahren veröffentlicht worden, bei dem Holzkohleteilchen, die einen Getreideüberzug aufweisen, als Nahrungssubstrate eingesetzt werden (US-PS Nr. 2 677 917). Auch ist der Einsatz von sterilisierten Kunststoffbehältern zur Inkubation von Pilzkulturen und zu deren Verschiffung vorgeschlagen worden (US-PS Nr. 2 851 821).

Gemäss der Methode, die in US-PS Nr. 2 851 821 beschrieben ist, werden lange Kunststoffbehälter mit den gewünschten Nahrungssubstraten gefüllt und dann verschlossen. Beim Verschliessen wird dabei ein gasdurchlässiges Material beim Verschlusssteil des Sackes angebracht. Der Sack und dessen Inhalt werden anschliessend sterilisiert. Dies geschieht entweder in etwa in ähnlicher Art und Weise, wie früher Glasflaschen sterilisiert wurden, oder mittels Bestrahlung. Anschliessend wird der Inhalt der Behälter mit dem gewünschten Inokulum inokuliert und dann inkubiert. Die Vorteile dieser Methode umfassen die Eliminierung der Glasflaschen, die teuer, bruchgefährdet und bei der Handhabung umständlich waren, und erlauben die Ausführung aller Verfahrensschritte in einem Behälter, der nach der Inokulation an den Ort der Inkubation transportiert werden kann, ohne dass die Kultur in einen weiteren Behälter umgefüllt werden muss. Da die Anlagen für die Kultivierung solcher Zellkulturen relativ teuer sowohl bezüg-

lich Errichtung wie auch Betrieb sind, gibt es davon wenige, und sie liegen weit entfernt voneinander. Dies bedingt lange Transportwege für Pilzkulturen. Die Inkubation in Plastikbehältern stellt daher eine substantielle Verbesserung für die Herstellung und den Transport von Pilzkulturen dar. In US-Patentschrift Nr. 3 335 521 werden weitere Verbesserungen bezüglich des Transportes von Pilzkulturen gemacht. Im genannten Patent wird nachgewiesen, dass Champignon-Kulturen in luftdichten Behältern mit Eis verschifft werden können.

Heute werden für Inokulierung und Inkubation von Pilzkulturen bevorzugterweise flexible Kunststoffbehälter verwendet. Dazu sind ebenfalls einige Verbesserungen vorgeschlagen worden: GB-Patent Nr. 1 176 188 schlägt ein Filterelement vor, das in die Wand des Behälters eingebaut ist. Die US-PS Nr. 3 938 658 schlägt ein poröses Filtermedium über Schlitz vor, die in der Wand des Plastiksacks gebildet sind. Schliesslich schlägt die US-PS Nr. 4 063 383 vor, die Pilzkulturen in einem Plastiksack auszuführen, der einen mikroporösen, gasdurchlässigen Streifen aufweist, mit dem der Sack verschlossen wird und an dem er aufgehängt werden kann.

In konventionellen Methoden zur Kultivierung von Pilzkulturen — und dies sowohl beim Einsatz von Glasflaschen wie auch von Plastikbehältern — werden die Getreidesubstrate normalerweise im Behälter sterilisiert. Dadurch wird verhindert, dass im gleichen Behälter ungewollt Bakterien oder andere Mikroorganismen wachsen. Diese Methoden sind jedoch sehr arbeitsintensiv. Die Sterilisation von Flaschen oder Säcken, die mit Nahrungssubstraten gefüllt sind, die Inokulierung der sterilisierten nahrungssubstrathaltigen Behälter und schliesslich das Rühren des Inhaltes der einzelnen Behälter, um das Inokulum während der Inkubation in die Nährlösung einzubringen, erfordern zahlreiche Handarbeit. Ebenso ist bekannt geworden, dass vor einigen Jahren die Somyel Company in Frankreich Versuche, grosse Mengen von Nahrungssubstraten vor dem Abfüllen in einzelne Flaschen zu sterilisieren und zu inokulieren, aufgegeben hat, und dies wegen Kontaminationsproblemen.

Die vorliegend beschriebene Erfindung überwindet diese, dem Stand der Technik inhärenten Probleme und reduziert die Arbeit bezüglich Sterilisation und Inokulation. Ebenso wird die Möglichkeit einer Kontamination während der Inokulation und während der anschliessenden Abfüllung in Säcken minimalisiert. Es ist ebenso ein Zweck der vorliegend beschriebenen Erfindung, die Mischungsverfahrensschritte nach der Inokulation in den einzelnen Behältern zu eliminieren. Ein weiteres Ziel der Erfindung ist es, ein Verfahren zu schaffen, mittels dem Metabolite auch auf Feststoffunterlagen und nicht nur in flüssigen Fermentationslösungen erhalten werden können. Die Erfindung ist auch nützlich in der Herstellung von Fermentationskulturen für Nahrungsmittel, wie beispielsweise Tempeh.

Neben dem Verfahren betrifft die vorliegend beschriebene Erfindung auch eine Vorrichtung, um das Verfahren auszuführen. Speziell betrifft die Erfindung eine Vorrichtung, in der das Nahrungssubstrat sterilisiert und in Masse inokuliert und gemischt wird. Aus dem gleichen Behälter wird dann die sterile, inokulierte Mischung in einzelne sterile Behälter zur Inkubation abgelassen. Das erfindungsgemässe Verfahren und die Vorrichtung ermöglichen es, viele der in den heutigen Kultivierungsmethoden für Zellkulturen auf Feststoffsubstraten unter sterilen Bedingungen auftretenden Hindernisse zu überwinden.

Das erfindungsgemässe Verfahren ist im Anspruch 1 definiert und wird anschliessend im einzelnen näher erläutert. Das Verfahren gemäss dieser Erfindung umfasst in der Regel das Einfüllen der Feststoffsubstratmischung in einen

Mischapparat, vorzugsweise in einen V-Drehmischapparat, in dem das Material unter solchen Drücken und Temperaturen gehalten werden kann, wodurch es sterilisiert wird. Im Falle der Kultivierung von Pilzkulturen besteht eine typische Nahrungssubstratmischung aus 50 bis 60 Gew.-% Getreide und/oder Korn, aus 40 bis 50 Gew.-% Wasser und aus 1 Gew.-% Kalk. Die Komponenten werden gemischt und mittels Einwirkenlassen einer Temperatur von mindestens 122°C sterilisiert. Vorzugsweise wird dafür der Drehmischapparat unter einem Wasserdampfdruck von ungefähr 2 Atmosphären gebracht. Die Temperatur und der Druck werden für 35 bis 120 Minuten aufrechterhalten. Bevorzugterweise geschieht die Sterilisation während einer Dauer von 45 Minuten.

Der Mischapparat und die darin enthaltene Mischung werden anschliessend abgekühlt. Dies geschieht unter einem leichten Überdruck der sterilisierten Luft bis zu einer Temperatur von ungefähr 27°C. Anschliessend wird das Inokulum steril in den Mischapparat gegeben und mit dem Nahrungsmittelsubstrat gut vermischt. Nach Abschluss dieser Vermischung wird der Mischapparat mit einer Sackabfülleinrichtung verbunden. Dies geschieht mittels einer sterilen Anschlussvorrichtung, die eine Abmessungseinrichtung aufweist. Dadurch ist es möglich, gewünschte Mengen inokuliertierter Nahrungsmittelsubstrate in die einzelnen Säcke abzufüllen. Die Abfüllstation selbst wird während des Vorganges mit einem laminaren Strom von steriler Luft umflossen. Dadurch wird verhindert, dass kontaminierendes Material in den Sack oder in die Anschlussvorrichtung gerät. Die vorsterilisierten Säcke, von denen jeder einen gasdurchlässigen Streifen aufweist, werden am Ende der Austrittsleitung der Anschlussvorrichtung angebracht und abgefüllt. Die abgefüllten Säcke werden sofort dicht verschlossen. Sie sind nun bereit für die Inkubation und den Transport des Inhaltes.

Die bevorzugte Ausführungsform der beschriebenen Erfindung eliminiert den schwierigen Verfahrensschritt der Inokulierung jedes einzelnen Behälters oder jeder Flasche, wie er beim Kultivieren von Pilzkulturen bis anhin ausgeführt worden ist. Weiter erlaubt das erfindungsgemässe Verfahren zusammen mit der bevorzugten Vorrichtung eine sterile Mischung für die Nahrungssubstrate und das Inokulum. Dies ist bei der Herstellung von Pilzkulturen, für Kulturen zu Fermentationsprodukten, wie z.B. Tempeh, und für die Kultivierung von verschiedenen anderen Zell-Linien sehr wichtig.

Weitere Vorteile der vorliegend beschriebenen Erfindung werden aus der nun folgenden detaillierten Beschreibung des Verfahrens und des Apparates, das letztere in Verbindung mit der beigelegten Zeichnung, ersichtlich.

Die Fig. 1 auf dem beigelegten Zeichnungsblatt zeigt eine diagrammatische Darstellung des Apparates gemäss der vorliegend beschriebenen Erfindung, und

die Fig. 2 zeigt ein Schema des entsprechenden Luft/Dampf-Systems.

In Fig. 1 stellt 10 einen Drehmischapparat dar. Bevorzugterweise ist der Drehmischapparat 10 ein V-förmiger Mischapparat der Firma Patterson-Kelly, der einen konventionellen Heizmantel aufweist; der letztere ist in Fig. 1 nicht dargestellt. Andere kommerziell erhältliche Mischapparate sind jedoch ebenfalls möglich, wie beispielsweise die Doppelkonus-Apparate. Mischapparate mit Einbauten, wie Bandmischapparate usw., sind jedoch nicht gut geeignet, dies speziell aus Reinigungs- und Sterilisationsgründen. Der Mischapparat 10 rotiert um die Achse 11 und umfasst einen Ein- bzw. Auslass 12, durch den die Nahrungssubstrate sowohl eingeführt wie auch abgelassen werden.

Der Drehmischapparat 10 ist zudem mit einem Fluidumeinlass 33 versehen. Durch diesen Einlass kann u.a. das Inokulum eingeführt werden. Falls das Inokulum als Feststoff oder teilchenförmig vorliegt, wird es jedoch steril durch den Feststoffeinlass 12 eingegeben. Falls das Inokulum als Flüssigkeit vorliegt, wird es steril durch die Leitung 33 eingeführt. Bei beiden Methoden müssen die durch das Inokulum berührten Einlässe vorgängig sterilisiert werden.

Ein- bzw. Auslass 12 ist so gestaltet, dass er mit der Anschlussvorrichtung 13 dicht verbunden werden kann. Beispielsweise kann dies mittels einer Kamlok-Schnellkupplung geschehen. Es können aber auch andere Verbindungsstücke eingesetzt werden; die Voraussetzung dafür ist, dass dieselben bei einem Druck von ungefähr 2 Dampf Atmosphären sterilisiert werden können und dass sie unter diesen Bedingungen dicht abschliessen. Mittels der Anschlusseinrichtung 13 kann das inokulierte Substrat sowohl abgemessen wie auch in die Inkubationssäcke eingefüllt werden. Die Anschlusseinrichtung 13 ist bevorzugterweise aus rostfreiem Stahl ausgeführt. Sie umfasst einen ersten und einen zweiten Ventilabschluss 14 und 16. Die Ventile sind dabei vorteilhafterweise Plattenventile. Der Raum, welcher zwischen den Ventilen 14 und 16 liegt, stellt eine Messkammer 17 dar. Dieses Volumen ist mit Vorteil von ähnlicher Grössenordnung wie dasjenige, das in die einzelnen Säcke für die Inkubation abgefüllt werden soll.

Die Anschlussvorrichtung 13 verläuft in Fig. 1 durch den Boden 18 zur eigentlichen Abfüllstation 20. Diese Abfüllstation ist bevorzugterweise in einem kommerziell erhältlichen, staubfreien Raum der Klasse 100 enthalten. In einem solchen Raum wird normalerweise ein laminarer Strom von sterilisierter Luft aufrechterhalten. Die Abfüllstation 20 umfasst eine Haube 21, die über das Ende 19 der Anschlussvorrichtung gestülpt werden kann. Mittels dieser Haube wird Dampf in die Anschlusseinrichtung 13 zu deren Sterilisation eingeführt. Nach dem Anschluss der Einrichtung 13 wird dieselbe sterilisiert, die Haube 21 weggenommen und die sterilisierten Säcke 22 (gestrichelt dargestellt) über das Austrittsende 19 gestülpt. Die Säcke werden nun abgefüllt. Nahe der Austrittsleitung befindet sich die Sackschliessvorrichtung 23, mittels der unmittelbar nach dem Abfüllen des Sackes derselbe durch Hitze einwirkung dicht verschlossen wird.

Da im Verfahren gemäss der vorliegend beschriebenen Erfindung die einzelnen Säcke 22 nicht im Autoklav behandelt werden müssen, ist es vorteilhaft, wenn dieselben aus Polyäthylen-Bahnen bestehen. Dieses Material kann mittels verschiedener Verfahren sterilisiert werden: Gassterilisation, Sterilisation mittels Elektronenstrahl oder Strahlungssterilisation. Solches Material ist übrigens wesentlich billiger als Polypropylen für die Säcke, die in den Verfahren gemäss dem Stand der Technik eingesetzt werden mussten. Jeder Sack weist einen gasdurchlässigen Streifen auf, der z.B. aus einem synthetischen, gasdurchlässigen Fasermaterial bestehen kann. Ein Beispiel eines solchen Materials ist Tyvek; der Tyvek-Streifen wird gemäss bekannter Methoden auf jeden Sack aufgebracht.

In Fig. 2 wird ein steriles Luft- und Dampfsystem dargestellt. 27 ist die Luftquelle für einen Luftstrom von ungefähr 2 Atmosphären und 28 die Dampfquelle. Die Dampfquelle 28 ist über eine Dampffalle 29 mit dem Mischer 10 verbunden; dies über Leitung 31, Ventil 32 und Dampfeintritt 33. Der Fluidumeintritt 33 im Drehmischapparat 10 umfasst einen drehbaren Anschluss 34, der auf der Achse des Mischapparates liegt. Die Luftquelle 27 ist mit dem gleichen Mischapparat über die Leitung 36 und durch das Ventil 37 verbunden. In der Leitung 36 ist ein Filter 38 positioniert, mittels dem die Luft aus der Quelle 27 sterili-

siert wird. Vorteilhafterweise ist der Filter 38 ein sterilisierbarer Filter, wie beispielsweise der Domnick Hunter Bio-x-Filter oder der Pall Ultipor-Filter. Ähnliche Filter sind jedoch auch geeignet. Der Austritt aus dem Filter 38 ist über die Leitung 39 mit dem Fluidumeintritt 33 des Mischapparates verbunden. Die Leitung 39 weist noch ein Ventil 41 auf. Falls die Luftquelle an den Austritt der Anschlusseinrichtung angeschlossen werden soll, verläuft die entsprechende Leitung durch die Ventile 42 und 43. Das Luft-/Dampf-System 26 umfasst aber auch die Leitung 44 und 46, zusammen mit den entsprechenden Ventilen 47 und 48, zur Belieferung von sterilisierendem Dampf an die Anschlusseinrichtung 13 und zum Luftfilter 38. Als Teil des Systems 26 umfasst die Haube 21 der Abfüllstation 20 einen Kondensatablauf 51 und eine Dampffalle 52.

Bei der bevorzugten Anwendung des erfindungsgemässen Verfahrens zur Kultivierung von Pilzkulturen wird der Mischapparat 10 durch den Einlass 12 mittels festem Nahrungssubstrat gefüllt. Beispiele eines solchen Nahrungssubstratsystems sind Roggenkörner, Kalk und Wasser in konventionellen Anteilen. Beim Einfüllen kann der Mischapparat kalt, aber auch vorgewärmt sein. Nach dem Einfüllen, d.h. mit dem Mischen, wird der Apparat jedoch aufgewärmt. Im vorliegend beschriebenen Fall geschieht das mittels Aufheizen des Inhaltes über den Heizmantel. Geheizt wird solange, bis der Inhalt auf einer Temperatur von mindestens 122°C ist. Zur gleichen Zeit wird aber das Ventil 32 geöffnet, um Dampf in den Mischer zu geben. Der Mischer-Inhalt liegt also während des Vorganges unter einem Wasserdampfdruck von mindestens 2 Atmosphären. Das Mischen unter den genannten Bedingungen dauert zwischen 35 und 125 Minuten; vorteilhafterweise 45 Minuten lang. Eine minimale Sterilisierungszeit ist bekanntlich günstig, da eine Übersterilisation den anschliessenden Wuchs der gewollten Kulturen eher verlangsamt.

Nach Abschluss der Sterilisation wird der Dampfeintritt verschlossen. Der Mischapparat wird abgekühlt, und dies auf eine Temperatur zwischen 10 und 32°C. Vorteilhafterweise wird zur Beschleunigung der Abkühlung Dampf aus dem Mischapparat abgeblasen. Nach Ablassen des Dampfdruckes wird sterile Luft in den Mischapparat wiederum durch den Fluidumeintritt 33 eingefüllt. Im Mischapparat sollte, wenn irgendwie möglich, immer ein Überdruck herrschen. Nach dem Abkühlen wird nun das Inokulum in den Mischapparat eingeführt. Vorteilhafterweise wird das Inokulum, falls dieses als Feststoff vorliegt, durch den Einlass 12 und, falls das Inokulum als Flüssigkeit vorliegt, durch die Leitung 33 steril in den Mischapparat eingeführt. Falls die Zugabe durch den Einlass 12 geschieht, muss derselbe zuerst sterilisiert werden. Dies kann z.B. durch einen Strom steriler Luft aus dem Drehmischapparat durch den hochgestellten Einlass 12 geschehen. Die gleiche Zugabe kann aber auch mittels einem sterilisierten, das Feststoff-Inokulum in sterilisierter Form enthaltenden Behälter geschehen. Dieser Behälter wird dann an den Einlass 12 angeschlossen. Bei diesem Vorgehen ist die Sterilisation des Einlasses 12 mittels eines sterilen Luftstroms nicht nötig. Andere geeignete Feststoffzuführungsmethoden sind auch möglich.

Das Inokulum wird nun mit dem sterilisierten Nahrungssubstrat tüchtig gemischt. Nach Abschluss der Vermischung wird die Anschlusseinrichtung 13 mit dem Auslass 12 verbunden und sterilisiert. Die Sterilisation wird dabei dadurch erreicht, dass der Austritt 19 der Anschlusseinrichtung 13 mit der Haube 21 verschlossen wird und in dem nun verschlossenen Raum Dampf eingeführt wird. Nachdem die Anschlusseinrichtung sterilisiert ist, wird die Haube wieder entfernt und die Säcke über das Entleerungsende 19 der Anschlusseinrichtung 13 gestülpt. Nun wird der Auslass 12

geöffnet, indem das erste Ventil 14 geöffnet wird. Das zweite, d.h. das untere, Ventil 16 ist dabei noch geschlossen. Das inokulierte Nahrungssubstrat füllt nun das Volumen der Kammer 17 auf. Nun wird das erste Ventil 14 wieder geschlossen. Schliesslich wird das zweite Ventil 16 geöffnet, und der Inhalt der Kammer 17 wird in den Sack 22 entleert. Gleichzeitig mit dem Öffnen des zweiten Ventils 16 wird sterile Luft in die Kammer 17 eingeführt, um so den Raum, den das austretende Substrat geschaffen hat, wieder auszufüllen. Es ist auch von Vorteil, wenn während dieses Vorganges dauernd etwas sterile Luft in den Drehmischapparat eingeführt wird, um dort immer einen leichten Über-

druck zu schaffen. Durch den Austritt von inokuliertem Nahrungssubstrat wird ja das Gasvolumen im Drehmischapparat erhöht.

Das Abfüllen der Säcke 22 geschieht mit Vorteil in einem staubfreien Raum, wie dies weiter oben beschrieben worden ist. Es ist jedoch auch möglich, nur die eigentliche Abfüllstation 20 mit einem laminaren Strom von sterilisierter Luft zu umgeben, um so jedes Eintreten von kontaminierenden Stoffen in die Säcke zu verhindern. Nach dem Abfüllen der Säcke wird jeder möglichst schnell verschlossen, so dass der Gasaustausch nachher nur noch über den Atmungsstreifen im Sack geschehen kann.

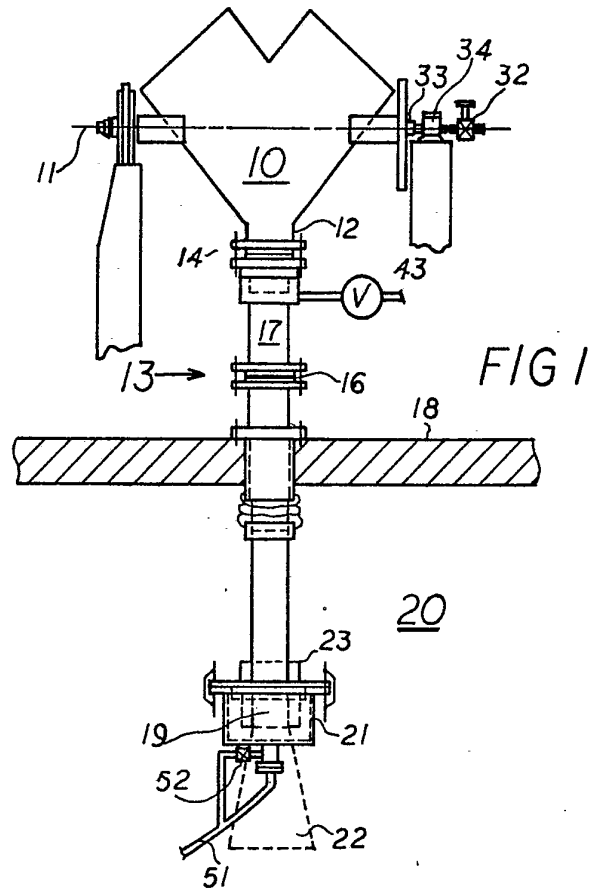


FIG 2

