

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK
AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

PATENTSCHRIFT 158255

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

Int. Cl.³

(11) 158 255

(44) 05.01.83

3(51) C 12 N 1/00

(21) WP C 12 N / 229 174 2

(22) 13.04.81

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Berlin, DD

(72) Kerns, Gerhard, Dr.rer.nat. Dipl.-Chem.; Weichert, Dieter, Dr.rer.nat. Dipl.-Chem.;
Tannenberger, Klaus, Dipl.-Chem.; Klappach, Günter, Dr.rer.nat. Dipl.-Chem., DD

(73) siehe (72)

(74) AdW der DDR, Institut für technische Chemie, Arbeitsgruppe Patentwesen, 7050 Leipzig,
Permoserstraße 15

(54) Entschäumer für Fermentationsprozesse

(57) Die Erfindung betrifft Entschäumer für Fermentationsprozesse, bei denen Mikroorganismen oder ihre Stoffwechselprodukte als Nahrungsmittel, insbesondere für die menschliche Ernährung, genutzt werden. Es ist das Ziel der Erfindung, durch Schaumbildung verursachte Störungen im Fermentationsprozeß zu verhindern, sowie Flotationserscheinungen und Inhomogenitäten des Fermentationsmediums auszuschalten. Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, durch Einsatz von Substanzen, die auf Mikroorganismen nicht nachteilig wirken, eine Langzeitwirkung im Fermentationsprozeß besitzen und bei der Applikation der Fermentationsprodukte unbedenklich sind, das Schaumbildungsvermögen zu reduzieren. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe so gelöst, daß als Entschäumer eine wäßrige oder unter Verwendung anderer mit Wasser mischbarer organischer Lösungsmittel hergestellte Lösung eines Mischpolymerisates eingesetzt wird, wobei es sich um Mischpolymerisate von zyklischen Acetalen der Paare 1,4 Butylenglykolformal/Diethylenglykolformal, 1,4 Butylenglykolformal/Ethylenglykolformal, 1,5 Pentamethylenglykolformal/Diethylenglykolformal und 1,5 Pentamethylenglykolformal/Ethylenglykolformal, die durch die modifizierbare Struktur dem jeweiligen Fermentationssystem angepaßt in Konzentrationen von 5 bis 20 mg/kg Medium entschäumend wirken und sowohl für aerobe als auch anaerobe Fermentationen verwendet werden können, handelt.

Titel

Entschäumer für Fermentationsprozesse

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft Entschäumer für Prozesse der Submerszüchtung von Mikroorganismen. Besonders geeignet ist die vorliegende Erfindung für solche Fermentationsprozesse, bei denen die Mikroorganismen oder deren Stoffwechselprodukte als Nahrungsmittel, insbesondere für die menschliche Ernährung, verwendet werden. Sie kann in die IPK C 12 N eingeordnet werden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bekannt, daß bei nahezu allen Verfahren zur Züchtung von Mikroorganismen eine Schaumbildung eintritt. Diese Schaumbildung ist besonders stark ausgeprägt, wenn das Nährmedium zur Züchtung von Mikroorganismen komplexe Bestandteile wie beispielsweise Maisquellwasser, Weizenkleie, Melasse oder andere Pflanzen oder Tierbestandteile in vorbehandelter oder unvorbehandelter Form enthält.

Bei intensiven mikrobiologischen Prozessen, welche eine hohe spezifische Belüftungsrate erfordern, um den notwendigen Stoffaustausch zwischen der Gasphase und der wäßrigen Phase zu erreichen, ist die Schaumbildung ebenfalls besonders ausgeprägt.

Intensive Schaumbildung kann aber auch bei mikrobiologischen Prozessen auftreten, die anaerob durchgeführt werden, aber merklich Gas, wie zum Beispiel CO_2 , entwickeln.

- Da diese Schaumbildung bekanntermaßen sich nachteilig auf die sichere Beherrschung und Durchführung des jeweiligen Fermentationsprozesses auswirkt, wurden zur Bekämpfung dieser Schaumbildung verschiedene Verfahren entwickelt. Beispiels-
- 5 weise werden Substanzen mit schaumzerstörender Wirkung dem Fermentationsmedium zugesetzt. So fügten J.M. NYSTROM und A.L. ALLEN; Biotechnology and Bioengineering Symposium No. 6; 1976, bei der Cellulasefermentation mittels Pilzen Polypropy-
- 10 lenglykol mit einem Molekulargewicht von etwa 2000 als Entschäumer zu.
- Für die Schaumbekämpfung bei Fermentationsprozessen sind auch andere Tenside bzw. Tensidgemische sowie Fette und Öle mit schaumzerstörender Wirkung bekannt, beispielsweise Fettalko-
- 15 hole, Silikonöle, Pflanzenöle, Blockpolymerisate aus Ethylenoxid und Propylenoxid und deren Derivate (DE-OS 2723139).
- Die bisher bekannten Entschäumer haben jedoch den Nachteil, daß sie nicht als Beimengungen in Substanzen für die menschliche Nahrung geeignet sind und gleichzeitig in sehr geringer Konzentration schaumzerstörend wirken und gleichzeitig wirt-
- 20 schaftlich aus den Abwässern beseitigt werden können.
- So wird beispielsweise Rapsöl oder Sonnenblumenöl als Entschäumer bei solchen Verfahren eingesetzt, wo mikrobielles Eiweiß oder mikrobielle Stoffwechselprodukte für die menschliche Nahrung verwendet werden. Diese Pflanzenöle haben je-
- 25 doch den Nachteil, daß die schaumzerstörende Wirkung schwach ausgeprägt ist und daß somit große Mengen dieser Substanzen zur Schaumbekämpfung benötigt werden, welche bei den erforderlichen Konzentrationen zu technologischen Nachteilen im Fermentationsprozeß führen. So wird die Sedimentation der
- 30 Biomasse, beispielsweise in Form von Pilzmycel, durch den emulgierten Entschäumer erschwert. Ebenfalls wird die Abtrennung von Stoffwechselprodukten, beispielsweise von Enzymen mittels Ultrafiltration, Dialyse oder Gelfiltration erschwert.
- 35 Silikonöle haben den Nachteil, daß sie die Stoffübertragungseigenschaften des Fermentationsmediums verschlechtern.
- Alle diese Nachteile der bisher bekannten Mittel zur Schaumbekämpfung sind bekannt.

Deshalb wurde ein Verfahren entwickelt, bei welchem völlig ohne Zugabe von schaumzerstörender Substanz unter der Voraussetzung fermentiert wird, daß der Fermentationstank nur teilweise beschickt wird (DE-OS 2734 290). Dieses Verfahren
5 erfordert jedoch erhöhte Investkosten und ist somit ökonomisch unvorteilhaft.

Es sind auch verschiedene Vorrichtungen zur mechanischen Schaumbekämpfung bekannt. Beispielsweise dient ein als Scherpaar ausgebildetes Stator-Rotor-System (DD-PS 137942;
10 DD-PS 137943), oder ein Rotor mit Hohlwelle (DE-OS 2719112) zur Bekämpfung des Schaumes. Diese Vorrichtungen zur mechanischen Schaumbekämpfung haben jedoch den Nachteil, daß sie nicht in allen Fermentoren einsetzbar sind und daß sie bei sehr starker Schaumentwicklung nicht in der Lage sind, den
15 Schaum zu zerstören.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, die durch Schaumbildung verursachten Störungen des Fermentationsprozesses sowie Schäden an Anlagenteilen unabhängig von der Art des Kultivierungsbehälters zu vermeiden, das Fermentorvolumen effektiv auszunutzen sowie Inhomogenitäten und Flotationerscheinungen des Fermentationsmediums auszuschalten, ohne das durch Art und Menge des schaumzerstörenden Mittels nachteilige Wirkungen in der Fermentation als auch bei der Weiterverarbeitung und Verwendung der Fermentationsprodukte entstehen.
20
25

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, durch Auswahl und Einsatz von Substanzen, die auf Mikroorganismen nicht nachteilig wirken, eine Langzeitwirkung im Fermentationsprozeß besitzen und bei der Applikation der Fermentationsprodukte unbedenklich sind, das Schaumbildungsvermögen zu reduzieren. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe so gelöst, daß überraschen
30 eine Substanzklasse gefunden wurde, die als Entschäumer bei

sehr geringen Konzentrationen hohe Entschäumerwirkung besitzt und auch bei der Nachverarbeitung und der Verwendung des Fermentationsproduktes keine nachteilige Wirkung zeigt.

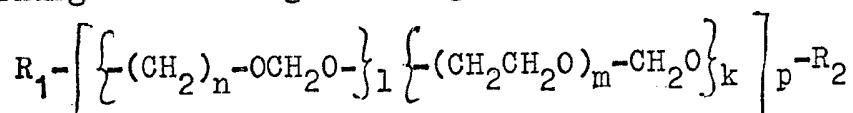
Die chemische Struktur der erfindungsgemäß beschriebenen

- 5 Substanzklasse gestattet den acidolytischen Abbau, was zur besonderen Erleichterung ihrer Beseitigung im Prozeßabwasser führt. Es handelt sich erfindungsgemäß um Polyformale, die durch ionische Polymerisation folgender Monomerenpaare zyklischer Formale erhalten werden:

- 10 1,4 Butylenglykolformal/Diethylenglykolformal, 1,4 Butylenglykolformal/Ethylenglykolformal, 1,5 Pentamethylenglykolformal/Diethylenglykolformal und 1,5 Pentamethylenglykolformal/Ethylenglykolformal.

- Die genannten Monomerenpaare stellen stets die Kombination
15 einer hydrophoben mit einer hydrophilen Substanz dar, wodurch Mischpolymerisate in Abhängigkeit von der Monomerenzusammensetzung mit mehr oder weniger hydrophoben oder hydrophilen Eigenschaften in gradueller Abstufung erhalten werden, was zur optimalen Anpassung an das jeweilige Entschäumerproblem aus-
20 genutzt wird.

Die erfindungsgemäß beanspruchten Polyformale mit Entschäumerwirkung weisen folgende allgemeine Strukturformel auf:



wobei gilt:

- 25 $R_1 = OH$
 $R_2 = H, (CH_2)_i OH; i = 2-10, CH_2 - (CHOH)_i - CH_2 OH; i = 1-4,$
 $C_i H_{2i+1} CO; i = 1-30$
 $n = 4; 5$
 $m = 1; 2$
 30 $k; 1 = \% \text{ Anteile der Monomeren im statistisch alternierenden Mischpolymerisat ; } k = 100-1$
 $p = 2-10\,000; \text{ Durchschnittspolymerisationsgrad}$

Die hohe Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Polyformale kommt insbesondere durch die den Entschäumereffekt auslösenden ge-

ringen Einsatzmengen zum Ausdruck. In der Regel genügen 5 bis 10 mg Polyformal in 1 kg Fermentationsmedium, um Schaum wirkungsvoll zu zerstören oder in seiner Entwicklung stark zurückzudrängen.

- 5 Die Zugabe der genannten Entschäumer zum Fermentationsmedium erfolgt wegen der besseren Dosierung und Verteilung in gelöster oder emulgierter Form. Als Lösungsmittel dienen je nach der gewählten Polymerenzusammensetzung Wasser oder mit Wasser mischbare organische Lösungsmittel, wie beispielsweise Ethanol. Vorteilhaft hat sich die separate Zugabe der Entschäumerlösung nach Bedarf erwiesen, deren Steuerung dabei mittels bekannter Regeleinrichtungen für den Entschäumerzusatz erfolgt.

Beispiel 1

- 15 In einem Rührfermentor mit 30 l Gesamtvolumen und einem Durchmesser von 260 mm wird ein Pilz der Gattung *Trametes versicolor* diskontinuierlich unter sterilen Bedingungen wie folgt kultiviert:
Die Durchmischung des Fermentationsmediums erfolgt mit einem
- 20 Sechsstab-Scheibenrührer von 90 mm Durchmesser. Zur Vermeidung einer Trombenbildung ist der Fermentor bewehrt. Die Rührerdrehzahl wird auf 1200 Umdrehungen pro Minute eingestellt die Begasungsintensität über Bodenbegasung beträgt 1200 l Luft/h; die Fermentorfüllmenge beträgt 14 kg.
- 25 Die wäßrige Nährlösung setzt sich folgendermaßen zusammen:
Ein Liter Lösung enthält:

1,04 g	KH_2PO_4	7,5 mg	$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
0,42 g	$(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$	3 mg	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
2,0 g	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3 mg	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
30 0,75 g	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	3 mg	CoCl_2
2,0 g	Hefeextrakt	1,5 mg	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
0,75 g	peptisches Pepton		
30,0 g	Rohrzucker		

- Die Beimpfung des Fermentationsmediums erfolgte in bekannter
- 35 Weise mittels einer Mycelsuspension.

- Die Temperatur wird auf 30° C eingestellt, der pH-Wert auf 4,5. Die Messung des pH-Wertes erfolgt mittels dampfsterilisierter Glaselektrode, welche direkt im Fermentor eingebaut ist. Die Konstanthaltung des pH-Wertes wird durch die geregelte Zugabe von 10 %igen wäßrigen Ammoniak gesichert. Die einsetzende Schaumbildung wird mit Hilfe eines Regelkreises bekämpft, der aus Leitfähigkeitselektroden zur Schaumsignalisierung und einer geeigneten Dosiervorrichtung zur Zugabe des Entschäumers besteht.
- 10 Als Entschäumer diene eine 1 %ige wäßrige Emulsion des erfindungsgemäßen Mischpolymerisates aus 60 Gew. % 1,4 Butylenglykolformal und 40 Gew. % Diethylenglykolformal mit einem Durchschnittsmolekulargewicht von 10 000, die als stabile Emulsion durch Einleiten von erhitztem Wasserdampf hergestellt wurde.
- 15 Nach Beendigung der Fermentation ließ sich die Biomasse in Form des Pilzmycels von der wäßrigen Phase durch einfache Filtration abtrennen. Insgesamt betrug der Verbrauch an 1 %iger Entschäumerlösung 9,5 ml, das entspricht einer Endkonzentration im Fermentationsmedium von 7,2 mg/l.
- 20

Beispiel 2

- Für die Herstellung von Cellulase-Enzymlösung wird in einem 30 l Rührfermentor der Pilzstamm Gliocladium sp. in 20 l eines Nährmediums, das Cellulosepulver, alkalisch aufgeschlossenes Grünmehl und Nährsalze enthält über 5 Tage unter sterilen Bedingungen diskontinuierlich kultiviert.
- 25 Am 2. und 3. Tag setzt starke Schaumbildung ein, die durch Elektroden unterhalb des Fermentordeckels signalisiert und durch automatische Zugabe von Entschäumer bekämpft wird. Als Entschäumer wird erfindungsgemäß eine 2 %ige Lösung in Ethanol/Wasser 1 : 1 eines Mischpolymerisates aus 55 Gew. % 1,4 Butylenglykolformal und 45 Gew. % Diethylenglykolformal mit einem Durchschnittsmolekulargewicht von 25 000 eingesetzt. Der Gesamtbedarf an diesem Entschäumer beträgt für den Ansatz 8 ml der 2 %igen Lösung, das entspricht einem Durchschnittsbedarf von 8 mg Entschäumer pro Liter Medium.
- 35

Nach Abtrennung des Pilzmycels durch einfache Filtration, wurde ein cellulasehaltiges Kulturfiltrat gewonnen, das durch Ultrafiltration problemlos ohne nachteilige Wirkung auf die Enzymaktivität aufkonzentriert werden konnte.

5 Beispiel 3

In einem 40 l Fermentor wurde ein Inokulum der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* anaerob gezüchtet bis in den 20 l Medium 4 g HTS/l als Ausgangsmaterial für die diskontinuierliche aerobe Züchtung der Hefe zur Verfügung standen.

- 10 Vor dem Beginn erfolgte eine 4stündige Belüftung. Anschließend wurde stündlich eine um 10 % gesteigerte Menge an Nährlösung, beginnend mit 160 ml, zugegeben. Die Nährlösung enthielt 140 g utilisierbare Kohlehydrate durch Melassezusatz und war durch Schwefelsäurezusatz auf pH 3 - 3,5 angesäuert worden. Die
- 15 Nährlösung enthält anorganische Nährstoffe für 18 g HTS/l sowie 100 mg Ammoniumstickstoff pro Liter. Die restliche Stickstoffversorgung erfolgt über die pH-Regelung mittels wäbrigem Ammoniak.

Die diskontinuierliche Züchtung der Hefe wurde bei folgenden

- 20 Bedingungen durchgeführt:

pH-Wert 4,5; Fermentationstemperatur 30° C; spezifische Begasung 30 - 50 l Luft/kg . h; Rührerdrehzahl 1000 m⁻¹. Kontrolliert wurden außerdem Gelöst-O₂-Konzentration und Ethanolkonzentration im Medium. Nach 13 Stunden war die Biomassekonzentration auf 14,5 g HTS/kg angestiegen und die Fermentorfüllung betrug 24 kg.

- Die während des Prozesses auftretende starke Schaumentwicklung wurde durch die im Beispiel 1 erläuterte Schaumsignalisierung und Vorrichtung zur Schaumbekämpfung auf ein bestimmtes unteres Niveau gehalten. Für die Schaumregulierung kam
- 30 eine 1 %ige wäßrige Suspension eines Mischpolymerisates aus 45 Gew. % 1,4 Butylenglykolformal und 55 Gew. % Diethylenglykolformal mit einem Durchschnittsmolekulargewicht von 5000 zum Einsatz. Insgesamt wurden während der 13stündigen Kultivierung 16 ml der 1 %igen Entschäumerlösung verbraucht, damit betrug die wirksame Konzentration 7 - 8 mg Polyformal pro kg.
- 35

Beispiel 4

In einem für aerobe Fermentationen unter erhöhtem Druck geeigneten Rührreaktor von 10 l Fassungsvermögen wurde die kontinuierliche Züchtung der Hefe *Candida utilis* auf der C-Quelle Melasse/Ethanol ohne jegliche Schaumbildung bei hoher Raum-
5 Zeit-Ausbeute unter den nachfolgend beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

Bei einer Füllmasse von 6 kg wurde unter kontinuierlichen Fermentationsbedingungen bei einem Verdünnungsgrad von $D = 0,3$
10 h^{-1} , einer Fermentationstemperatur von $32^{\circ} C$, einem pH-Wert von 4,5, einem Druck von $3,03 \cdot 10^5$ Pa, einer ständigen Begasung mit Luft, einer Gelöst- O_2 -Konzentration von $- 2$ mg/kg Fermentationsmedium und unter ständigem Rühren wurde dem Fermentor eine Nährlösung folgender Zusammensetzung zugeführt:

15	4,3 g K_2HPO_4	0,024 g $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$
	5,0 g H_3PO_4 80 %ig	0,036 g $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$
	1,74 g $MgSO_4$	0,012 g $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$
	0,09 g NaCl	0,015 g $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$

Die aufgeführten Salze befanden sich zusammen mit der C-Quelle in 1 Liter Nährlösung mit dem pH-Wert von 3,5. Der Anteil der C-Quelle im Liter betrug 137 g in Form eines Gemisches aus Melasse/Ethanol im Verhältnis 1 : 0,5.

Die Stickstoffversorgung des Prozesses erfolgte ausschließlich durch die pH-Wert-Regelung mit wäbrigem Ammoniak der Konzentration 120 g NH_3 /l. Der wäbrige Ammoniak enthielt außerdem den erfindungsgemäß beanspruchten Entschäumer in Form von 1,6 g/l des wasserlöslichen Mischpolymerisates aus 60 Gew. % Diethylenglykolformal und 40 Gew. % 1,4 Butylenglykolformal mit einem Durchschnittsmolekulargewicht von 6000. Bei der erzielten Produktivität von 25 g HTS/kg . h betrug der durchschnittliche spezifische Ammoniakverbrauch ca. 25 ml/kg . h, damit ergab sich als wirksame Entschäumerkonzentration 10 -
30 11 mg/kg Fermentationsmedium.

Nach Separation der Hefezellen aus dem 82,5 g Trockenhefe enthaltenden Ablauf, liegt ein zellfreies Prozeßwasser vom pH-Wert 5 - 5,5 mit nahezu der genannten Menge Entschäumer pro Liter vor.

Bei der Zuführung dieses Prozeßwassers in die Abwasser-
aufbereitung, kann durch Ansäuern auf einen pH-Wert von
2 bei 20 bis 30° C eine säurekatalysierte Spaltung des als
Entschäumer eingesetzten Polyacetals in wenigen Minuten
5 erreicht werden.

Die niedermolekularen Spaltprodukte wie Aldehyd und Diol
können in der vorliegenden geringen Konzentration bekann-
termaßen leicht in einer biologischen Abwasserreinigung
abgebaut werden.

Erfindungsanspruch

1. Entschäumer für Fermentationsprozesse, bei denen die Mikroorganismen oder deren Stoffwechselprodukte insbesondere auch für die menschliche Ernährung genutzt werden, gekennzeichnet dadurch, daß eine wäßrige oder unter Verwendung anderer mit Wasser mischbarer organischer Lösungsmittel, beispielsweise Ethanol, hergestellte Lösung oder Emulsion eines Mischpolymerisates eingesetzt wird, wobei das Mischpolymerisat aus den Monomerenpaaren 1,4 Butylenglykolformal/Diethylenglykolformal, 1,4 Butylenglykolformal/Ethylenglykolformal, 1,5 Pentamethylenglykolformal/Diethylenglykolformal und 1,5 Pentamethylenglykolformal/Ethylenglykolformal in einem beliebigen Mischungsverhältnis jedoch vorzugsweise in einem solchen besteht, daß Wasserlöslichkeit gerade noch oder partiell vorhanden ist, einen mittleren Polymerisationsgrad von 2 bis 10000 besitzt und im Konzentrationsbereich von 5 bis 100mg/pro kg Medium, bevorzugt 5 bis 20 mg pro kg Medium wirksam ist.
2. Entschäumer für Fermentationsprozesse nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß diese im Prozeßwasser durch Säurekatalyse in biologisch leicht abbaubare Spaltstücke überführt werden.