(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PATENTSCHRIFT

(12) Ausschließungspatent

(11) DD 286 937 A7

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2
Patentgesetz der DDR
vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 N 1/26
C 12 N 1/16
C 12 R 1/72

DEUTSCHES PATENTAMT

(21)	DD C 12 N / 308 747 3	(22)	06.11.87	(45)	14.02.91

(71) Gärungschemie Dessau GmbH, Johann-Meier-Straße 12, O - 4500 Dessau 1, DE
(72) Teich, Walter, Dr. rer. nat.; Otto, Gerhard, Dipl.-Chem.; Flemming, Ingeborg, Dr. rer. nat.; Bergmann, Horst, Dipl.-Ing.; Leuschner, Konrad; Eisner, Annemarie, Dipl.-Biol.; Löwe, Peter; Sawistowski, Joachim, Dr.; Meyer, Gudrun; Welz, Gerald, Dipl.-Biol., DE
(73) Gärungschemie Dessau GmbH, O - 4500 Dessau 1; Institut für Biotechnologie Leipzig, O - 7010 Leipzig, DE

(54) Verfahren zur Gewinnung von mikrobieller Biomasse

(55) Biomasse; Ausbeute; Rohprotein; C. utilis; Kohlenhydrate
(57) Die Erfindung beinhaltet ein Verfahren zur Gewinnung von mikrobieller Biomasse. Sie betrifft ein Verfahren zur Konvertierung von Kohlenhydraten zu mikrobieller Biomasse, die als Futtermittel verwendet werden kann. Erfindungsgemäß wird zur Herstellung der mikrobiellen Biomasse der Hefestamm TOF 1 ZIMET 43849 eingesetzt, wobei die Kultivierung bei einer Temperatur im Bereich von 30 bis 40 °C und einem *p*H-Wert im Bereich von 3,5 bis 6 erfolgt. Der Fermentorablauf wird in bekannter Art und Weise separiert und getrocknet.

ISSN 0433-6461

4 Seiten

Patentanspruch:

1. Verfahren zur Gewinnung mikrobieller Biomasse auf der Basis von Kohlenhydraten, **gekennzeichnet dadurch,** daß die Kultivierung mit dem Hefestamm TOF 1 ZIMET 43849 durchgeführt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Kultivierung des Hefestammes bei einer Temperatur im Bereich von 30°C bis 40°C durchgeführt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Kultivierung des Hefestammes bei einem *p*H-Wert im Bereich von 3,5 bis 6 erfolgt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kultivierung von Hefen durch aerobe Fermentation unter Verwendung von Kohlenhydraten als Kohlenstoffquelle. Die Erfindung kann in der mikrobiologischen Industrie zur Erzeugung von Futterhefe angewandt werden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Zur Gewinnung mikrobieller Biomasse werden in bestimmten Umfang Kohlenhydrate als Kohlenstoffquelle eingesetzt, wobei entweder reine Substrate (Glucose, Saccharose) oder kohlenhydrathaltige Medien (Melasse, Sulfitablauge, Schlempe) verwendet werden. Die Kultivierung wird mit Wuchshefen unter aeroben Bedingungen durchgeführt. So ist ein Verfahren bekannt, DD-PS 224615, bei dem durch Kultivierung eines Hefestammes mit der Bezeichnung C. utilis auf der Basis eines Gemisches von Saccharose/Melasse unter üblichen Bedingungen Hefebiomasse gewonnen wird. Die Ausbeute beträgt 44,6%, wobei der Rohproteingehalt der Hefebiomasse einen Wert von 55 Ma.-% aufweist. Durch elektromagnetische Behandlung der dem Fermentor zufließenden Medien wird die Ausbeute auf 53,1% gesteigert. Eine ähnliche Ausbeute wird in der Patentschrift DD-PS 142453 angegeben. Durch Kultivierung eines Hefestammes der Bezeichnung C. utilis auf der Basis von Saccharose/Melasse beträgt die Ausbeute 52%. Die genannten Verfahren haben den Nachteil, daß die Ausbeute relativ niedrig liegt und somit der eingesetzte Rohstoff nicht entsprechend genutzt wird.
Nach einem weiteren Verfahren, DD-PS 219036, wird zur Kultivierung der Hefestamm Lodderomyces elongisporus EH 15 eingesetzt und damit eine Ausbeute von 55,6% bei einem Rohproteingehalt von 50 Ma.-% erreicht.
Durch eine spezielle Dosierung von Substrat, Nährlösung und Wasser in die Prozeßstufe Kultivierung kann die Ausbeute auf 69,4% verbessert werden. Der Rohproteingehalt bleibt demgegenüber konstant. Dieses Verfahren hat den Nachteil, daß der eingesetzte Hefestamm einen relativ niedrigen Rohproteingehalt aufweist, der sich auch bei Anwendung der vorgeschlagenen Verfahrensweise nicht verändert. Das Verfahren hat weiter den Nachteil, daß es für technische Anlagen zu kompliziert und deshalb störanfällig ist. Aufgrund derartiger Prozeßstörungen wird die Ökonomie des Verfahrens nachteilig beeinflußt.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist eine Verbesserung des spezifischen Substratverbrauches von Hefen auf der Basis von Kohlenhydraten bei gleichzeitiger Gewährleistung eines hohen Rohproteingehaltes und einer einfachen Verfahrensweise.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, durch Auswahl eines geeigneten Hefestammes eine Verbesserung des spezifischen Substratverbrauches bei gleichzeitiger Gewährleistung eines hohen Rohproteingehaltes und einer einfachen Verfahrensweise zu erreichen. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß ein Hefestamm (Hansenula jadinii) mit der Bezeichnung TOF 1 ZIMET 43849, hinterlegt im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der Akademie der Wissenschaften der DDR, 6900 Jena, Beuthenbergstr. 11, zur Kultivierung eingesetzt wird.
Dieser Hefestamm ist durch folgende Merkmale charakterisiert:
Morphologische Merkmale:
1) Kolonien nach 48 Stunden Wachstum auf Glucoseagar *p*H 5,4; 30°C
   mittelgroß, creme-grau, Rand glatt, Profil konvex. matt glänzend
2) Zellform nach 48 Stunden Wachstum auf Glucoseagar *p*H 5,4; 30°C
   länglich oval bis langgestreckt
   Größe 9,4 × 4,4 µm, (7,5–11) × (3,5–5) µm

Physiologische Merkmale:
Wachstum auf Agar bei 30°C bis 37°C sehr gut
bei 45°C kein Wachstum

Assimilation von:
Galactose, Sorbose, Xylose, Saccharose, Maltose, Trehalose, Methyl-α-D-glucopyreanosid, Cellobiose, Salicin, Arbutin, Raffinose, Melezitose, Mannit, Gluco-σ-lacton, Lactat, Succinat, Na-citrat, Na-gluconat, Nitrat

keine Assimilation von:
Ribose, L-Arabinose, D-Arabinose, Rhamnose, Melibiose, Lactose, Inulin, Stärke, Erythrit, Ribit, Dulcit, Glucitol, Inosit, Arabit, Glucosamin, Glucuronsäure-α-lacton, Xylit
Fermentation (Vergärung) von:
Glucose, Saccharose, Raffinose
keine Fermentation von:
Galactose, Trehalose, Maltose, Cellobiose, Melibiose, Methyl-α-D-glucopyranosid, Melezitose, Lactose, Stärke
Die Kultivierung dieses Hefestammes erfolgt unter aeroben Bedingungen, wobei folgende Parameter eingestellt werden:

Temperatur: 30°C bis 40°C
*p*H-Wert: 3,5 bis 6
Verweilzeit: 2,5 bis 5 h

Als Kohlenstoffquelle werden reine Kohlenhydrate wie z. B. Saccharose und/oder kohlenhydrathaltige Substrate wie z. B. Melasse, Sulfitablauge und Schlempe eingesetzt.
Man führt die Kultivierung unter Berücksichtigung der genannten Parameter in bekannter Art und Weise durch und erhählt einen Fermentorablauf, dessen Hefekonzentration je nach eingesetzter Kohlenstoffquelle und Verfahrensweise (kontinuierlich oder diskontinuierlich) stark variiert. Mit Hilfe von Separatoren erfolgt nach der Kultivierung eine Konzentrierung der Hefesuspension, die danach zur weiteren Wasserabtrennung in eine Vorverdampferstufe dosiert und anschließend in einer Trockenstufe (z. B. Sprühtrockner) getrocknet wird.
Die so hergestellte Hefebiomasse hat einen Rohproteingehalt, der im Bereich von 55 bis 56,5 Ma.-% liegt.
Die mit der dargelegten Verfahrensweise erreichten spezifischen Ausbeutekoeffizienten lagen stets über 56%.

Vergleich des neuen Hefestammes mit dem Stand der Technik in tabellarischer Form

Mikroorganismus/ Literatur	zusätzliche techn. Maßnahmen	RP %	Y %
C. utilis DD-PS 224 615	keine	55	44,6
C. utilis DD-PS 142 453	elektromagn. Behandlung des Mediums	55	53,1
Lodderomyces elongisporus EH 15 DD-PS 219 036	keine	50	55,6
Lodderomyces elongisporus EH 15 DD-PS 219 036	ständige Änderung der der Dosierung	50	69,4
Hefestamm TOF 1 ZIMET 43849 (Hansenula jadinii)	keine	55–56,5	56

RP = Rohproteingehalt
Y = Ausbeutekoeffizient

Beispiel 1
In einem mit einer Begasungsvorrichtung versehenen Rührfermentor mit einem Bruttovolumen von 12 l und einem Masseinhalt von 4,2 kg wurden kontinuierlich Hefen der Bezeichnung TOF 1 ZIMET 43849 auf der Basis von Saccharose gezüchtet. Durch Regelung wurde die Temperatur auf 32°C und der *p*H-Wert auf 4,5 gehalten. Dem Fermentor wurden kontinuierlich wäßrige Saccharoselösung, eine Nährsalzlösung üblicher Zusammensetzung sowie Ammoniakwasser in einer Gesamtmenge von 1200 g/h zudosiert, entsprechend einer Verdünnungsrate von $D = 0{,}286\,h^{-1}$. Die Substratkonzentration betrug im Fermentorzulauf 70 g RS/kg, im Fermentorablauf 0,1 g RS/kg. Unter diesen Bedingungen wurde im Fermentorablauf eine Biomassekonzentration von 4,09 Ma.-% erreicht. Das entspricht einer Produktivität von 11,7 g HTS/kg · h und einem Ausbeutekoeffizienten von Y = 58,5%.
Der Fermentorablauf wurde anschließend zentrifugiert und das erhaltene Hefekonzentrat, ds 17,5 Ma.-% HTS enthielt, bei 105°C getrocknet. Bezogen auf 24 h wurde ein Ausstoß von 1206 g HTS erzielt, die einen Rohproteingehalt von 56,4 Ma.-% und einen Feuchtigkeitsgehalt von 3,0 Ma.-% aufwies.

Beispiel 2
In einem mit einer Begasungsvorrichtung versehenen Rührfermentor mit einem Bruttovolumen von 12 l und einem Masseinhalt von 4,0 kg wurden kontinuierlich Hefen der Bezeichnung TOF 1 ZIMET 43849 auf der Basis von Melasse gezüchtet. Die Fermentationstemperatur betrug 32°C, der *p*H-Wert wurde durch eine Regelung mittels H_2SO_4 auf 4,2 gehalten. Dem Fermentor wurden kontinuierlich wäßrige Nährsalzlösung üblicher Zusammensetzung, Ammoniakwasser sowie Melasse in einer Gesamtmenge von 1000 g/h zudosiert, entsprechend einer Verdünnungsrate von $D = 0{,}25\,h^{-1}$. Die Substratkonzentration betrug im Fermentorzulauf 52 g RS/kg, im Fermentorablauf 0,2 g RS/kg. Unter diesen Bedingungen wurde im Fermentorablauf eine Biomassekonzentration von 3,58 Ma.-% erreicht, was einer Produktivität von 8,95 g HTS/kg · h und einem auf den RS-Gehalt bezogenen Ausbeutekoeffizienten von Y = 69,1% entsprach.
Durch Zentrifugation des Fermentorablaufs wurde ein Hefekonzentrat mit einer Biomassekonzentration von 18 Ma.-% erzeugt. Nach der Trocknung bei 105°C wurde daraus ein Hefetrockenprodukt mit einem Rohproteingehalt von 55,6 Ma.-% und einem Feuchtigkeitsgehalt von 3,6 Ma.-% erhalten. Der auf 24 h bezogene Ausstoß betrug 884 g Hefetrockenprodukt.

Beispiel 3

In einem mit einer Begasungsvorrichtung versehenen Fermentor mit einem Bruttovolumen von 12l und einem Masseinhalt von 4kg wurden kontinuierlich Hefen der Bezeichnung TOF 1 ZIMET 43849 auf der Basis eines Gemisches aus Melasse und reiner Saccharose gezüchtet. Die Fermentationstemperatur betrug 33°C, der *p*H-Wert wurde durch Regelung mittels H_2SO_4 auf einen Wert von 4,5 gehalten. Dem Fermentor wurden kontinuierlich die beiden Kohlenstoffquellen sowie Nährsalzlösung und Ammoniakwasser in einer Gesamtmenge von 1250g/h zudosiert, entsprechend einer Verdünnungsrate $D = 0{,}313\,h^{-1}$. Die Substratkonzentration im Fermentorzulauf, die zu 40% der reinen Saccharose und zu 60% der Melasse entstammte, betrug 84,5g RS/kg, im Fermentorablauf verblieben 0,5g RS/kg. Unter diesen Bedingungen wurde im Fermentorablauf eine Biomassekonzentration von 5,4Ma.-% erreicht, entsprechend einer Produktivität von 16,9g HTS/kg · h. Der auf den RS-Gehalt bezogene Ausbeutekoeffizient betrug 64,3%.
Durch Zentrifugation des Fermentorablaufs wurde ein Hefekonzentrat mit einer Biomassekonzentration von 19Ma.-% gewonnen. Durch Trocknung bei 105°C wurde ein Hefetrockenprodukt mit einem Rohproteingehalt von 56,1Ma.-% und einem Feuchtigkeitsgehalt von 2Ma.-% erhalten. Der auf 24h bezogene Ausstoß betrug 1635g Hefetrockenprodukt.

Beispiel 4

In einem mit einer Begasungsvorrichtung versehenen Rührfermentor mit einem Bruttovolumen von 12l und einem Masseinhalt von 4kg wurden kontinuierlich Hefen der Bezeichnung TOF 1 ZIMET 43849 auf der Basis von Buchenholz-Sulfitablauge bei einem *p*H-Wert von 4,0 und bei einer Temperatur von 33°C gezüchtet. Dem Fermentor wurden außer der Sulfitablauge (RS-Gehalt 46g/l) Nährsalzlösung und Ammoniakwasser zudosiert. Die Gesamtmenge der Dosierung betrug 1000g/h, entsprechend einer Verdünnungsrate von $D = 0{,}25\,h^{-1}$. Die Substratkonzentration betrug im Fermentorzulauf 42g RS/kg, im Fermentorablauf 4,6g RS/kg. Unter diesen Bedingungen wurde im Fermentorablauf eine Biomassekonzentration von 2,24Ma.-% HTS bei einer Produktivität von 5,6g HTS/kg · h erreicht. Der auf den RS-Abbau bezogene Ausbeutekoeffizient betrug Y = 60%.
Der Fermentorablauf wurde anschließend zentrifugiert und das erhaltene Hefekonzentrat, das eine Biomassekonzentration von 17,6Ma.-% enthielt, bei 105°C getrocknet. Der Ausstoß an Hefetrockenprodukt mit einem Rohproteingehalt von 55,8Ma.-% und einem Feuchtigkeitsgehalt von 2Ma.-% betrug 545g innerhalb von 24h.

Beispiel 5

In einem mit einer Begasungsvorrichtung versehenen Rührfermentor mit einem Bruttovol. von 12l und einem Masseinhalt von 4kg wurden kontinuierlich Hefen der Bezeichnung TOF 1 ZIMET 43849 auf der Basis eines Gemisches aus Melasse-Schlempe und Saccharose gezüchtet. Die Fermentationstemperatur betrug 35°C, der *p*H-Wert wurde durch Regelung auf einem Wert von 4,6 gehalten. Dem Fermentor wurde kontinuierlich in einer Menge von 720g/h Melasse-Schlempe zudosiert, der reine Saccharose in einer Konzentration von 48g/kg Melasse-Schlempe zugesetzt worden war. Außerdem wurden in den Fermentor 80g/h Diammoniumhydrogenphosphat dosiert, so daß der Gesamtzulauf zum Fermentor 800g/h betrug, entsprechend einer Verdünnungsrate von $D = 0{,}20\,h^{-1}$. Unter diesen Bedingungen wurde eine Produktivität von 7,3g HTS/kg · h erreicht.
Der Fermentorablauf mit einer Biomassekonzentration von 3,65Ma.-% wurde durch Zentrifugation auf 19Ma.-% konzentriert und anschließend bei 105°C getrocknet. Der Ausstoß an Hefetrockenprodukt mit 55,7Ma.-% Rohprotein und 2,1Ma.-% Feuchtigkeit betrug 708g, bezogen auf 24h.
Im Vergleichsversuch mit Melasse-Schlempe gleicher Zusammensetzung ohne Saccharosezusatz wurde unter gleichen Fermentationsbedingungen eine Produktivität von 2,25g HTS/kg · h und ein auf 24h bezogener Ausstoß von 220g Hefetrockenprodukt der gleichen Qualität erzielt. Damit beträgt der auf den Saccharoseanteil bezogene Ausbeutekoeffizient Y = 58,8%.