

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **244 761 A1**

4(51) C 12 N 1/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 N. / 285 405 2	(22)	24.12.85	(44)	15.04.87
------	------------------------	------	----------	------	----------

(71)	VEB Gärungschemie Dessau, 4500 Dessau, Joh.-Meier-Straße 12, DD
(72)	Krauße, Detlef, Dipl.-Ing.; Schiller, Erhart; Lauch, Barbara; Behnsch, Hilam, DD

(54) **Verfahren zur Abtrennung von Biomasse**

(57) Das Verfahren sieht eine Abtrennung von Mikroorganismen, speziell Hefen, aus Kulturlösungen der Art vor, daß erfindungsgemäß durch Zugabe einer Lauge, z. B. Natronlauge oder Ammoniakwasser, eine pH-Korrektur auf pH 10 vorgenommen wird. Durch anschließende Dosierung einer definierten Salzkonzentration wird eine Umwandlung kleiner biologischer Zellen in Partikel mit grobdisperssem Ausmaß (Flocken) erreicht. Die Sedimentationsgeschwindigkeit der Teilchen wird dadurch erheblich vergrößert und es erfolgt eine rasche Trennung der Biomasse in der Kulturlösung durch Sedimentation. Das so entstandene Sediment kann mittels bekannter Verfahren, wie Dekantieren, Zentrifugieren usw. gewonnen werden.

ISSN 0433-6461

3 Seiten

Patentanspruch:

1. Verfahren zur Abtrennung von Biomasse, vorzugsweisen Hefen, aus wäßrigen Kulturlösungen, **dadurch gekennzeichnet**, daß nach erfolgter Produktbildung der Mikroorganismus einem pH-Schock durch Zugabe von Lauge und Einstellung eines pH-Wertes von 9–11 unterzogen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Alkalisierungsmittel vorzugsweise Natronlauge oder Ammoniakwasser und als Salz Zinksulfat eingesetzt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Zugabe des Salzes vorzugsweise in einem nach oben konisch verlaufenden Gefäß erfolgt.
4. Verfahren nach Anspruch 1–3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die abgetrennte Biomasse durch Zugabe von Schwefelsäure auf den ursprünglichen pH-Wert eingestellt wird und zu weiteren Fermentationen eingesetzt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Das vorgeschlagene Verfahren dient der Gewinnung und Abtrennung von Hefen, speziell der *Saccharomyces*-Hefen, aus einer Kulturlösung nach erfolgter Produktbildung. Die Erfindung ist in erster Linie dann anzuwenden, wenn das Verfahren auf der Basis zuckerhaltiger Lösungen beruht und der Ethanolherzeugung dient.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

In Prozessen, bei denen biologische Stoffe verwendet werden, beinhalten diese Verfahrensschritte eine biochemische Reaktionsstufe, der fast immer eine Abtrennung der Biomasse von der Fermentationslösung folgt.

Die Abtrennung der Biomasse erfolgt meist auf konventionellem Wege durch energieaufwendige Schritte, wie z. B. die Filtration, Zentrifugation oder Separation (Krauß, D.; DA IHS Köthen 1984). Bei der Ethanolherstellung auf der Basis zuckerhaltiger Rohstoffe erfolgt die Abtrennung der Biomasse von der alkoholischen Phase auf Grund der geringen Dichteunterschiede zwischen Biomasse und Fermentationslösung durch Anlegen eines künstlichen Schwerefeldes. Dieser Schritt ist energetisch sehr aufwendig. Die Fermentationslösung kann dann aufgearbeitet werden. Von immer größer werdender Bedeutung für die Abtrennung von Biomasse aus Kulturlösungen ist die mikrobielle Flockung. Wesentlich für eine effektive Flockung ist die Überführung vorwiegend kolloiddisperser Teilchen in Partikel mit grobdispersen Ausmaßen (Flocken), wodurch die Sedimentationsgeschwindigkeit erheblich vergrößert wird.

Bei der Ethanolherstellung ist das Flockungsphänomen noch nicht gelöst. Aus umfangreichen Versuchen zur Flockungsproblematik haben sich drei bedeutsame Kriterien herausgehoben:

1. die Genetik
2. der Stoffaustausch in der Zellwandregion und
3. Umweltfaktoren (Milieufaktoren)

Bei einem Einsatz von flockulierenden Hefestämmen (Autoflockulation) handelt es sich um eine dauerhafte genetisch bedingte Eigenschaft der Mikroorganismen, die zu einer Verbesserung des Sedimentationsverhaltens führt (DE-OS 2354556, DE-OS 2947411 und DE-OS 2938339). Durch Einflußnahme auf die Zellwand kann das Flockungsverhalten von Hefen wesentlich verbessert werden, besonders durch die Zugabe von Ca^{2+} in das Nährmedium (Rose, A. A., und Gayatissa, P. M., J. Gen. Microbiology, 96, 165–174, 1976) oder durch eine Veränderung des Polysaccharids, des Proteins und der Mineralzusammensetzung (Ca^{++} und K^+) der Zellwände (Amr M. A., Bonaly, R., Moll, M., J. Gen. Microbiology, 128, 2001–2009, 1982). Die Anwendung von speziellen Flockungsmitteln kann ebenfalls eine Flockung von nichtflockulierenden Mikroorganismen hervorrufen. Die Verbesserung der resultierenden Sedimentation hängt dabei vom Flockungsmittel und den eingesetzten Konzentrationen ab. Anderen Verfahren liegt eine wechselseitige Veränderung des pH-Wertes im Medium durch Lauge und anschließender Säurebehandlung zugrunde. Die eingesetzten Mikroorganismen werden dadurch zur Agglutination gebracht (DE-OS 2642944). Oder die Abtrennung der Bakterienbiomasse erfolgt auf der Grundlage der Erhöhung des pH-Wertes auf pH 8–11, Erwärmung der Suspension auf 50–100°C, anschließende Ansäuerung auf pH 2–5 mit nachfolgender Zellseparation (GB 1381306).

Für die Ethanolfermentation ist bekannt, daß eine Flockung der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* durch Zugabe von Nickel als Flockungsmittel mit Erfolg induziert werden kann (Weesk, M. G., Biotechnol. Bioeng., 25, 1983, 687–697 und 699–711).

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist eine einfache Abtrennung von Mikroorganismen, insbesondere Hefen, durch den Einsatz nichttoxischer Flockungsmittel in der Endphase eines Fermentationsverfahrens.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Mikroorganismen aus Fermentationslösungen nach erfolgter Produktbildung entweder im Reaktor, wenn die Anwesenheit von Flocken günstig ist, oder in einer separaten Stufe zwischen Fermentation und Aufarbeitung zur Flockulation anzuregen. Das sich aus der Flockulation bildende Sediment kann mittels einfacher Trennverfahren vom Überstand isoliert werden.

Erfindungsgemäß wird durch plötzliche Änderung des pH-Wertes in einem Fermentationsmedium und einer anschließenden Zugabe von Salzen eine spontane Zusammenlegung von Mikroorganismen erreicht, die bei nichtflockenden Zellen sonst nicht auftreten würde.

Es wurde festgestellt, daß die bei einer industriellen Ethanolherstellung eingesetzten Hefen der Art *Saccharomyces cerevisiae* nach beendeter Produktbildung durch Zugabe von Alkalien, vorzugsweise Natronlauge bzw. Ammoniakwasser und anschließender Zugabe von Salzen ein hohes Sedimentationsvermögen besitzen. Ohne Salzzugabe konnte nach Veränderung des pH-Wertes keine Flockenbildung erkannt werden.

Die Flockung kann entweder im Reaktor oder in einem anderen Absetzbehälter, vorzugsweise in einen nach unten konisch verlaufenden Behälter durchgeführt werden. Die Verdichtung des Sedimentes ist zeitabhängig. Ein Optimum konnte nach 60 bis 90 Minuten beobachtet werden.

Das Sediment kann dann leicht durch herkömmliche Verfahren, z. B. Dekantation vom Überstand getrennt werden.

Durch Waschen des Sedimentes mit einer Mineralsäure, z. B. Schwefelsäure erfolgt eine Deflockulation des Zellmaterials.

Gleichzeitig ist eine Verminderung des Kontaminationsgrades des Sedimentes zu beobachten.

Der Gesamtprozeß der beschriebenen Abtrennung des Zellmaterials durch Flockulation wirkt sich nicht negativ auf die Vitalität des Zellmaterials aus.

Ausführungsbeispiele

1. Beispiel

Ein nichtflockender Hefestamm der Art *Saccharomyces cerevisiae* wurde auf Rübenmelasse gezüchtet, um in einem 24stündigen Prozeß unter Produktionsbedingungen zur Ethanolgewinnung genutzt zu werden. Das Reaktorvolumen betrug 130 m³. Nach der Fermentationszeit von 24 Stunden lagen folgende Endparameter vor:

Temperatur 28–36°C

pH-Wert 5,1

Biomassekonzentration 11,3 g/l

Aus einem Gärbehälter wurde nach Abschluß der Nachgärphase Fermentationsflüssigkeit mit einer Ethanolkonzentration zwischen 9 und 11 Vol.-% entnommen. Nach Zugabe einer Lauge, vorzugsweise NaOH, wurde der pH-Wert der gesamten Lösung auf pH 10 eingestellt. Anschließend wurde die mit Lauge behandelte Fermentationslösung auf mehrere Meßzylinder (Volumen = 100 ml, Durchmesser 25 mm) aufgeteilt. Nach Zusatz eines Salzes wurde die Flüssigkeit in den Meßzylindern durchgeschüttelt. Bereits nach ca. 1 bis 2 Minuten konnte in allen Fällen eine starke Flockung und eine schon sichtbare Phasengrenzfläche erkannt werden. Nach einer Anzahl von Versuchen konnte eine Sedimentationszeit von ca. 1,5 Stunden als optimale Zeit für die Abtrennung nachgewiesen werden.

Im Ergebnis dieser Versuche wurde eine Abtrennung der Biomasse zwischen 65 bis 95%, durchschnittlich zu 75% erreicht.

In angesetzten Parallelversuchen ohne Zusatz von Lauge und Salz konnte in einem Versuchszeitraum von jeweils 24 Stunden keine Flockung beobachtet werden.

2. Beispiel

Ein nichtflockender Hefestamm der Art *Saccharomyces cerevisiae* wurde analog Beispiel 1 kultiviert und nach abschließender Produktbildung behandelt. Als Sedimentationsgefäße wurden Erlenmeyerkolben (500 ml) benutzt. Bei diesen Versuchen war eine Sedimentationszeit von 1 Stunde als Optimum zu erkennen. Die Abtrennung der Biomasse im Sediment betrug gegenüber Beispiel 1 zwischen 70 und 95%, durchschnittlich jedoch 85%.