



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

ISSN 0433-6461

(11)

210 553

Int.Cl.³ 3(51) C 12 N 1/28

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21) WP C 12 N/ 2316 793

(22) 13.07.81

(45) 13.06.84

(71) VEB PETROLCHEMISCHES KOMBINAT SCHWEDT, DD;
(72) BRENDLER, WALTER, DIPL.-BIOL.; LUEBBERT, GUSTAV-ADOLF, DIPL.-CHEM.;
BAUCH, JOACHIM, DR. DIPL.-CHEM.; GOMOLL, PETER, DIPL.-CHEM., DD;

(54) VERFAHREN ZUR KONTINUIERLICHEN KULTIVIERUNG VON MIKROORGANISMEN

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kontinuierlichen Kultivierung von Mikroorganismen und gehört in das Gebiet der technischen Mikrobiologie. Sie kann in Anlagen, in denen Mikroorganismen gezüchtet werden, zur Anwendung kommen. Ziel der Erfindung ist die kontinuierliche Kultivierung verschiedener Mikroorganismen ohne zusätzliche Biokatalysatoren und Wuchsstoffe, indem alkanassimilierende an Erdöldestillat gebundene und nicht alkanassimilierende Mikroorganismen simultan in einem Fermentor mit einer Durchflußrate, die der Wachstumsrate des schneller wachsenden Mikroorganismus entspricht, kultiviert werden. Die Trennung der Mikroorganismenkulturen erfolgt außerhalb des Fermentors bei gleichzeitiger Rückführung der nicht alkanassimilierenden Mikroorganismen. Als Substrat für die alkanassimilierenden Mikroorganismen wird ein Erdöldestillat, das n-Paraffine der Kettenlänge C₁₀-C₂₀ enthält, verwendet.

Titel der Erfindung

Verfahren zur kontinuierlichen Kultivierung von Mikroorganismen

IPK: C 12 N

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kontinuierlichen Kultivierung von Mikroorganismen und gehört in das Gebiet der technischen Mikrobiologie. Die Erfindung kann in Anlagen, in denen Mikroorganismen gezüchtet werden, zur Anwendung kommen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Kultivierung von Mikroorganismen ist abhängig von der Einhaltung spezifischer äußerer Bedingungen, die durch grundlegende biologische Gesetzmäßigkeiten bestimmt werden. Das Wachstum von Mikroorganismen vollzieht sich in Phasen, was grafisch durch die Wachstumskurve dargestellt werden kann.

Die Wachstumskurve ist in ihren Grundzügen für die verschiedenen Mikroorganismengruppen gleich und kann grob unterteilt werden in lag-Phase, exponentielle Wachstumsphase, stationäre Phase und Absterbephase. In Abhängigkeit von der Zielstellung der Kultivierung werden die Prozeßparameter so gewählt, daß eine bestimmte Wachstumsphase realisiert werden kann, um der Kultur die geforderte physiologische Leistung abzugewinnen. So werden beispielsweise zur Erzeugung von mikrobieller Biomasse solche Wachstumsparameter gewählt, die ständig die größtmögliche Biomassebildung

gewährleisten. Das wird in der exponentiellen Wachstumsphase realisiert. Bei Kultivierungen, die die Gewinnung eines Stoffwechselproduktes zum Ziel haben, müssen unter Umständen solche Bedingungen gewählt werden, die die Einhaltung der stationären Phase gewährleisten, um eine größtmögliche Ausscheidung des Produktes zu ermöglichen.

Für verschiedene Kultivierungen, die mit unterschiedlichen Wachstumsraten betrieben werden, sind demzufolge separate Reaktoren erforderlich, da zur Aufrechterhaltung eines einmal eingestellten Fließgleichgewichtes die Menge an zugeführten Medien gleich der der abgeführten sein muß.

Somit kann bezogen auf das Gesamtvolumen eines Fermentors nur eine Durchflußrate innerhalb eines Fermentors realisiert werden.

Gemäß DD WP 141 528 ist ein Verfahren bekannt, bei dem eine Methanol utilisierende Hefe mit einer zweiten Hefe kultiviert wird, die selbst kein Methanol nutzt. Als Substrat werden n-Paraffine, Alkohol, Fettsäuren oder technische Produkte zugegeben.

In der DD PS 141 529 ist ein Verfahren beschrieben, bei dem Methanol utilisierende Bakterien gemeinschaftlich bei pH 3 - 5 mit einer nicht Methanol utilisierenden Hefe fermentiert werden. Es erfolgt die Zugabe eines zweiten Kohlenstoffsubstrates, das von der Hefe genutzt wird aber nicht oder nur schlecht von den Methanol nutzenden Bakterien genutzt werden kann.

In beiden Verfahren dient die Zugabe von Mikroorganismen, die kein Methanol nutzen der Wachstumsförderung und damit der Erhöhung der Zellausbeute.

Nachteilig ist jedoch, daß für diese Verfahren nur solche Mikroorganismen verwendet werden können, deren Wachstumsrate annähernd gleich ist, da anderenfalls die langsamer wachsende Art bei kontinuierlicher Kultivierung aus dem Fermentor ausgetragen wird.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die kontinuierliche Kultivierung verschiedener Mikroorganismen ohne zusätzliche Biokatalysatoren und Wuchsstoffe.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht in der Schaffung geeigneter Verfahrensbedingungen zur kontinuierlichen Kultivierung von verschiedenen Mikroorganismen mit unterschiedlichen Wachstumsraten.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß zwei unterschiedliche Mikroorganismenformen, alkan-assimilierende an Erdöldestillat gebundene und nicht alkanassimilierende Mikroorganismen, gleichzeitig in einem Fermentor kontinuierlich kultiviert werden, wobei die Durchflußrate des Fermentors der Wachstumsrate des schneller wachsenden Mikroorganismus entspricht.

Die Fermentation wird so gesteuert, daß wahlweise Biomasse, Primärmetaboliten, Sekundärmetaboliten oder Enzyme erzeugt oder mikrobielle Transformationen durchgeführt werden können.

Als alkanassimilierende an Erdöldestillat gebundene Mikroorganismen werden Hefen, Schimmelpilze oder Bakterien, insbesondere alkanassimilierende Hefestämme

der Gattungen Candida oder Lodderomyces und als nicht alkanassimilierende Mikroorganismen Bakterien, Hefen oder Schimmelpilze verwendet.

Als Energiequelle für die alkanassimilierenden Mikroorganismen dient ein Kohlenwasserstoffgemisch, z. B. Erdöldestillat, das n-Paraffine der Kettenlänge $C_{10} - C_{20}$ enthält.

Nach der Abtrennung der Fermentationsprodukte, beispielsweise durch Ölflotation, die außerhalb des Fermentors durchgeführt wird, erfolgt die Rückführung der nicht alkanassimilierenden Mikroorganismen mit der wäßrigen Phase in den Fermentor. Dadurch verlängert sich die Verweilzeit für die nicht alkanassimilierenden Mikroorganismen.

Für jeden einzelnen zurückgeführten Mikroorganismus verdoppelt sich die Verweilzeit. Es erfolgt keine Auswaschung oder Verringerung der nicht alkanassimilierenden Mikroorganismen und somit können beide Mikroorganismenformen, alkanassimilierende an Erdöldestillat gebundene und nicht alkanassimilierende Mikroorganismen kontinuierlich nebeneinander kultiviert werden. Die Verweilzeit für die alkanassimilierenden an Erdöldestillat gebundenen Mikroorganismen ergibt sich aus der für den Fermentor eingestellten Durchflußrate, die der nicht alkanassimilierenden Mikroorganismen ist abhängig von der Durchflußrate des Fermentors und dem Rückführungsgrad der wäßrigen Phase. Je höher der Rückführungsgrad gehalten wird, desto länger ist die Verweilzeit.

Die Vorteile der Erfindung bestehen darin, daß eine Mikroorganismenpopulation kultiviert werden kann, für die die eingestellte Durchflußrate des Fermentors zu groß ist oder die in der stationären Wachstumsphase gehalten werden soll, während ein zweiter Mikro-

organismus simultan mit der unter den gewählten Bedingungen bestmöglichen Wachstumsrate kultiviert wird.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung soll mit den folgenden Ausführungsbeispielen näher erläutert werden ohne sie dabei zu begrenzen.

Beispiel 1:

Eine alkanassimilierende Hefe, *Candida guilliermondii* wurde in einem 5 l Rührfermentor in einem mineralischen Nährsalzmedium und einem Erdöldestillat der Kettenlänge $C_{10} - C_{20}$ in an sich bekannter Weise kontinuierlich kultiviert.

Zu einem bestimmten Zeitpunkt wurden dem Fermentor 100 ml einer Suspension der Hefe *Trichosporon cutaneum* zugegeben. Die Konzentration von *Trichosporon* betrug 5×10^9 Zellen/ml. Im Fermentor wurde danach eine Konzentration von ca. 10^8 *Trichosporon cutaneum* -Zellen/ml bestimmt. Der Fermentor wurde mit einer Durchflußrate von 0,17 kontinuierlich betrieben. Die ausfließende Suspension wurde einer Dekantation unterworfen. Beim Dekantationsprozeß ist die hefehaltige Ölphase als leichte Phase abgetrennt.

Die wäßrige Phase wurde in den Fermentor zurückgeführt. Die Nährsalze wurden so dosiert, daß keine Limitationen an Nährsalzen und Spurenelementen auftreten konnten. Die Konzentrationen beider Mikroorganismenpopulationen sowie die Konzentrationen an Fettsäuren und Kohlenhydraten im Fermentor wurden bestimmt. Für *Candida guilliermondii* wurde die Biomassekonzentration (g/kg) und für *Trichosporon cutaneum* die Zellenzahl/ml bestimmt. Die Angaben für Kohlehydrate und Fettsäuren sind in mg/l gegeben. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1 Mikroorganismenkonzentrationen, Kohlenhydrate und Fettsäuren im Fermentationsmedium bei Rückführung des Fermentationsprozesses

t	Candida quillier- mondii (g/kg)	Trichosporon cuta- neum (Zellen/ml)	Kohlen- hydrate	Fett- säuren
24	13,6		480	25
48	13,1		510	27
72	13,9		530	40
96	14,1	$3,7 \times 10^8$ x ₁)	505	37
120	13,7	$3,1 \times 10^8$	435	22
144	12,9	$2,9 \times 10^8$	290	17
168	13,8	$4,9 \times 10^8$	270	19
192	14,0	$5,2 \times 10^8$	295	20

x₁) bestimmt 10 h nach Zugabe von Trichosporon cutaneum

Wurde der Prozeß ohne Rückführung betrieben, so waren nach 48 h keine Trichosporonzellen mehr, gemessen mit Zählkammer, nachweisbar.

Die Ergebnisse zeigen, daß es durch Anwendung der erfindungsgemäßen Lösung gelang, beide Hefen nebeneinander zu kultivieren. Die Werte an Kohlenhydraten und Fettsäuren verdeutlichen die erzielte Wirkung dieser Simultankultivierung. Trichosporon verwertet die im Prozeß anfallenden unerwünschten Kohlenhydrate, Fettsäuren und andere wertvolle biogene Substanzen, die sonst in das Abwasser gelangen und einen Verlust für das System darstellen würden.

Beispiel 2:

Eine alkanassimilierende Hefe, *Lodderomyces elongisporus*, wurde mit einem Erdöldestillat der Kettenlänge $C_{10} - C_{20}$ als C- und Energiequelle und einer mineralischen Nähr- und Spurensalzlösung unter an sich bekannten Bedingungen kultiviert. Der verwendete Stamm benötigt zur Erlangung seiner vollen Produktivität Biotin. Aus diesem Grunde wurden der Kultur nach 72 h des kontinuierlichen Betriebes 100 ml einer Bakteriensuspension zugeführt. Die Konzentration der Bakteriensuspension betrug 10^{10} Zellen/ml. Diese Bakterien setzen einen Stoff frei, der für den verwendeten Hefestamm einen wachstumsstimulierenden Effekt besitzt. Es wurden 3 Versuche durchgeführt:

1. Kultivierung der Hefe ohne Bakterienzugabe
2. Kultivierung der Hefe mit Bakterienzugabe, ohne Rückimpfung der wäßrigen Phase nach der Trennung
3. Kultivierung der Hefe mit Bakterienzugabe und Rückimpfung der wäßrigen Phase nach der Trennung

Zur Kontrolle des Prozesses wurde die Biomasse der Hefen sowie die Zellenzahl der Bakterien bestimmt.

t	Exp. 1	2	3
	Hefetrockensubstanz	Hefetrockensubstanz	Hefetrockensubstanz
	Bakterien/ml	Bakterien/ml	Bakterien/ml
24	13,8	14,1	13,7
48	13,9	14,0	13,9
72	13,3	13,4 $3,0 \times 10^8$	14,0 $3,2 \times 10^8$
96	14,1	14,0 5×10^6	14,9 $2,9 \times 10^8$
120	19,7	13,8 n. n.	19,7 $4,9 \times 10^8$
	14,0	12,9 n. n.	15,6 $7,3 \times 10^8$
168	12,9	13,7 n. n.	15,1 $9,6 \times 10^8$

Die Ergebnisse zeigen deutlich den positiven Effekt der zugegebenen Bakterien auf die Hefekonzentration im Versuch 3.

Erfindungsanspruch

Verfahren zur kontinuierlichen Kultivierung von Mikroorganismen durch gleichzeitige Fermentation zweier Hefen, wobei die eine Kohlenwasserstoffe assimiliert, gekennzeichnet dadurch, daß die alkanassimilierenden und nichtalkanassimilierenden Mikroorganismen simultan in einem Fermentor mit einer Durchflußrate, die der Wachstumsrate des schneller wachsenden alkanassimilierenden Mikroorganismus entspricht, fermentiert werden und die Abtrennung der Kohlenwasserstoffgebundenen Mikroorganismen mit dem Kohlenwasserstoff außerhalb des Fermentors bei gleichzeitiger Rückimpfung der nichtalkanassimilierenden Mikroorganismen erfolgt, wobei als Mikroorganismen außer Hefen auch Bakterien eingesetzt werden.