



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäÙ § 5 Absatz 1 des Aenderungsgesetzes
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

155 080

Int.Cl.³

3(51) C 12 N 1/28

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veroeffentlicht

(21) WP C 12 N/ 201 947 (22) 08.11.77 (44) 12.05.82

- (71) VEB PETROLCHEMISCHES KOMBINAT SCHWEDT, DD
(72) KOZLOVA, LIDIJA, DR.; VELIKOSLAVINSKAJA, OLGA; KATRUSCH, RADIJ; RJABCUK, VALERIJA; SU;
GENTZSCH, HERBERT, DR. DIPL.-ING.; LUEBBERT, GUSTAV-ADOLF, DIPL.-CHEM.;
HIEKE, WOLFGANG, DR. DIPL.-CHEM.; BAUCH, JOACHIM, DR. DIPL.-CHEM.; DD;
REITER, URSULA; DD;
(73) VEB PETROLCHEMISCHES KOMBINAT SCHWEDT, DD; WISSENSCHAFTLICHES ALLUNIONSFORSCHUNGSINSTITUT
FUER DIE BIOSYNTHESE VON EIWEISSSTOFFEN, MOSKAU, SU
(74) DIPL.-CHEM. WERNER LEWNA, VEB PETROLCHEMISCHES KOMBINAT SCHWEDT, ABT. SCHUTZRECHT,
1330 SCHWEDT

(54) VERFAHREN ZUR GEWINNUNG VON LYSINREICHER HEFE

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von lysinreicher Biomasse. Es wurde gefunden, daß durch Regulierung der Kohlenwasserstoffquelle bei gleichzeitiger Regulierung der Elemente der Kulturflüssigkeit eine Biomasse mit erhöhtem Eiweiß- und Lysingehalt erreicht wird. Eine entscheidende Rolle spielt dabei die Zusammensetzung der Elemente der wasserlöslichen Nährstoffe in der Kulturflüssigkeit. Man reguliert die Zusammensetzung der wasserlöslichen Nährstoffe wie folgt in mg/l: N=50-450 Fe=2-8 P=40-120 Zn=2-8 K=40-120 Mn=2-8 Mg=10-40 Cu=1-5. Die Zusammensetzung der n-Alkane im Kohlenwasserstoffgemisch reguliert man so, daß die Anzahl der n-Alkane C₈-C₁₈ 50-100% der Gesamtmenge der n-Alkane C₈-C₃₅ betraegt.



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

155 080

Int.Cl.³

3(51) C 12 N 1/28

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N/ 201 947

(22) 08.11.77

(44) 12.05.82

- (71) VEB PETROLCHEMISCHES KOMBINAT SCHWEDT, DD
(72) KOZLOVA, LIDIJA, DR.; VELIKOSLAVINSKAJA, OLGA; KATRUSCH, RADIJ; RJABCUK, VALERIJA; SU; GENTZSCH, HERBERT, DR. DIPL.-ING.; LUEBBERT, GUSTAV-ADOLF, DIPL.-CHEM.; HIEKE, WOLFGANG, DR. DIPL.-CHEM.; BAUCH, JOACHIM, DR. DIPL.-CHEM.; DD; REITER, URSULA; DD;
(73) VEB PETROLCHEMISCHES KOMBINAT SCHWEDT, DD; WISSENSCHAFTLICHES ALLUNIONSFORSCHUNGSINSTITUT
(74) FUER DIE BIOSYNTHESE VON EIWEISSSTOFFEN, MOSKAU, SU
DIPL.-CHEM. WERNER LEWNA, VEB PETROLCHEMISCHES KOMBINAT SCHWEDT, ABT. SCHUTZRECHT, 1330 SCHWEDT

(54) VERFAHREN ZUR GEWINNUNG VON LYSINREICHER HEFE

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von lysinreicher Biomasse. Es wurde gefunden, daß durch Regulierung der Kohlenwasserstoffquelle bei gleichzeitiger Regulierung der Elemente der Kulturflüssigkeit eine Biomasse mit erhöhtem Eiweiß- und Lysingehalt erreicht wird. Eine entscheidende Rolle spielt dabei die Zusammensetzung der Elemente der wasserlöslichen Nährstoffe in der Kulturflüssigkeit. Man reguliert die Zusammensetzung der wasserlöslichen Nährstoffe wie folgt in mg/l: N=50-450 Fe=2-8 P=40-120 Zn=2-8 K=40-120 Mn=2-8 Mg=10-40 Cu=1-5. Die Zusammensetzung der n-Alkane im Kohlenwasserstoffgemisch reguliert man so, daß die Anzahl der n-Alkane C₈-C₁₈ 50-100% der Gesamtmenge der n-Alkane C₈-C₃₅ betragt.

Zur PS Nr. 155 080.....

ist eine Zweitschrift erschienen.

(Teilweise bestätigt gem. § 18 Abs. 1 d. Änd.Ges.z. Pat.Ges.)

Titel der ErfindungVerfahren zur Gewinnung von lysinreicher Hefe

IPK: C 12 d

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf die mikrobiologische Industrie und beinhaltet ein Verfahren zur Gewinnung von Biomasse aus Mikroorganismen, die Eiweiß und essentielle Aminosäuren mit erhöhtem Lysingehalt enthält.

Die Biomasse erhält man durch Hefekultivierung auf der Grundlage von Kohlenwasserstoffen, die n-Alkane $C_8 - C_{35}$ enthalten, z. B., auf Erdöldestillat-Petroleum, Diesel- oder Ölfractionen des Erdöls oder den aus ihnen extrahierten n-Alkanen $C_8 - C_{35}$.

Mikrobielles Eiweiß verwendet man als Eiweißzusatz für Nahrungs- und Futtermittel. Das Eiweiß der Mikroorganismen enthält alle essentiellen Aminosäuren:

Lysin, Methionin, Tryptophan, Phenylalanin, Histidin, Threonin, Valin, Leucin und Isoleucin.

Diese Aminosäuren werden nicht durch den menschlichen und tierischen Organismus synthetisiert und müssen mit der Nahrung oder dem Futter zugeführt werden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Zur Anreicherung der Nahrungs- oder Futtermittel mit Eiweiß und essentiellen Aminosäuren, insbesondere mit Lysin, sind Verfahren zur Gewinnung von Biomasse, die mit Eiweiß angereichert ist sowie Verfahren zur Gewinnung der einzelnen essentiellen Aminosäuren und Verfahren zur Gewinnung von Lysin bekannt, z. B. beschrieben in den Patenten der UdSSR Nr. 171 727, 258 225,

322 888 und Nr. 443 595, der USA Nr. 3.888.736, Großbritannien Nr. 1017.584.

Nach den bekannten Verfahren erhält man Biomasse, die mit Eiweiß angereichert ist oder eine Biomasse, die in der Kulturflüssigkeit einzelne essentielle Aminosäuren enthält. Dabei verwendet man zur Gewinnung von Aminosäuren Mikroorganismenstämme, die einer speziellen Bearbeitung unterworfen wurden und kultiviert sie unter sterilen Bedingungen auf komplizierten und teureren Nährmedien.

Als bekannten Stand der Technik kennt man ein Verfahren zur Gewinnung von Biomasse mit hohem Eiweißgehalt durch Kultivierung von Mikroorganismen auf der Grundlage von Kohlenwasserstoffen entsprechend dem UdSSR-Patent Nr. 443.595 und dem DDR-Patent Nr. 105 825, Kl. C 12 c 11/18.

In bekannten Verfahren erhält man eine Biomasse, mit einem hohen Eiweißgehalt von 55 % durch Einsatz des Stammes "Candida guilliermondii D" bei Züchtung auf Kohlenwasserstoffen. Ein Nachteil des bekannten Verfahrens ist, daß ein positiver Effekt nur bei der Kultivierung dieses Stammes erreicht wird. Dabei gestattet es das Verfahren nicht, ein mit Lysin angereichertes Eiweiß zu gewinnen. Das erfindungsgemäße Verfahren zur Gewinnung von Biomasse gestattet im Unterschied zu den bekannten Verfahren die Gewinnung von Biomasse mit erhöhtem Eiweißgehalt bis 60 - 65 %, unabhängig vom eingesetzten Hefestamm.

Das erfindungsgemäße Verfahren gestattet es, im Prozeß der Kultivierung nicht nur eine eiweißreichere Biomasse zu gewinnen, sondern auch die Aminosäurezusammensetzung des Eiweißes so zu regulieren, daß der Gesamtgehalt der essentiellen Aminosäuren 25 - 30 %, bezogen auf Trockenbiomasse, und der Lysingehalt 10 - 13 % des Gesamtgehaltes der Aminosäuren in der Biomasse beträgt.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht in der Gewinnung einer Biomasse mit erhöhtem Gehalt an Eiweiß und essentiellen Amino-

säuren, wobei in der Eiweißzusammensetzung ein erhöhter Lysingehalt vorliegen soll.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gewonnene Biomasse soll gleichzeitig als Eiweiß- und als Lysinzusatz für Nahrungs- und Futtermittel dienen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die technische Aufgabe besteht darin, Verfahrensparameter aufzufinden, die die Gewinnung einer Biomasse mit erhöhtem Gehalt an Eiweiß- und Lysin, unabhängig vom eingesetzten Hefestamm, ermöglichen.

Es wurde überraschenderweise gefunden, daß durch Regulierung der Elemente der Nährflüssigkeit eine Biomasse mit erhöhtem Eiweiß- bzw. Lysingehalt erreicht wird.

Eine entscheidende Rolle spielt dabei die Zusammensetzung der Elemente der wasserlöslichen Nährstoffe in der Kulturflüssigkeit. Als Kohlenstoffquelle dienen zur Kultivierung von Mikroorganismen nach dem erfindungsgemäßen Verfahren Kohlenwasserstoffe, die n-Alkane mit einer Kohlenstoffkette von $C_8 - C_{35}$ enthalten oder gereinigte n-Alkane mit gleicher Kettenlänge $C_8 - C_{35}$.

Zur Gewinnung von Biomasse mit erhöhtem Lysin- und Eiweißgehalt reguliert man die Zusammensetzung der n-Alkane im Kohlenwasserstoffgemisch so, daß die Anzahl der n-Alkane $C_8 - C_{18}$ 50 - 100 % der Gesamtmenge der n-Alkane $C_8 - C_{35}$ beträgt.

Gleichzeitig reguliert man mit der Zusammensetzung der Kohlenstoffquelle den Gehalt an wasserlöslichen Nährstoffen: Stickstoff, Phosphor, Kalium, Magnesium, Eisen, Zink, Mangan und Kupfer so, daß ihr Gehalt in der Kulturflüssigkeit für jedes Element in folgenden Grenzen liegt:

in mg/l

N = 50 - 450	Fe = 1 - 8
P = 40 - 120	Zn = 2 - 8
K = 40 - 120	Mn = 2 - 8
Mg = 10 - 40	Cu = 1 - 5

Die Mikroorganismen, z.B. des Hefestammes Candida, wurden in kontinuierlichen Prozessen in Fermentoren der Größen 30 l, 200 l, 10 m³ und 250 m³ unter Rühren und Belüftung mit einem pH-Wert im Medium von 3 - 7 und einer Temperatur von 29 - 34 °C kultiviert.

Die Intensität der Belüftung des Mediums betrug 30,0 - 300 m³/m³. Stunde, die Verweilzeit betrug 2 - 5 Stunden. Als Kohlenstoffquelle wurden n-Alkane mit einer Kettenlänge der Kohlenstoffatome von C₈ - C₃₅ oder Erdölfraktionen, die n-Alkane C₈ - C₃₅ enthalten, z.B. Dieselfraktionen eingesetzt. Die Kohlenstoffquelle wurde so ausgewählt, daß in der Zusammensetzung der n-Alkane C₈ - C₃₅ der n-Alkangehalt C₈ - C₁₈ 25 %, 50 %, 70 % und 100 % und der n-Alkangehalt C₁₉ - C₃₅ entsprechend 75 %, 50 %, 30 % und 0 % betrug.

Die Kohlenwasserstoffkonzentration im Nährmedium betrug 2,5 - 10 %, umgerechnet auf n-Alkane C₈ - C₃₅.

Das wäßrige Nährmedium enthielt P, N, K, Mn, Fe, Zn, Mg und Cu. Andere Mineralnährstoffe sowie Wachstumsstimulatoren hatten keinen Einfluß auf die Anreicherung des Eiweißes und der essentiellen Aminosäuren in der Biomasse. Nährlösung wurde dem Fermentor so zugeführt, daß die Konzentration der notwendigen Elemente in der Kulturflüssigkeit in weiten Grenzen von 0 - 5000 mg/l verändert werden konnte. Als Neutralisationsmittel wurde verdünnte Alkalilauge oder Ammoniakwasser verwendet.

Die Menge der dem Fermentor zugeführten Nährmedien war gleich der Menge aus dem Fermentor abgezogenen mikroorganismenhaltigen Kulturflüssigkeit.

Die Kulturflüssigkeit mit den Mikroorganismen wurde kontinuierlich in ein Dekantationsgefäß eingeleitet, in dem eine Trennung in zwei Schichten erfolgte. Die untere Schicht, das wäßrige Medium, wurde kontinuierlich in den Fermentor zurückgeführt. Die obere Schicht, ein 4-Komponentensystem wurde nach bekannten Verfahren separiert. Dabei wurden drei Phasen abgetrennt: Biomasse, die eine geringe Menge Wasser und Kohlenwasserstoffe enthält, eine wäßrige Phase und eine Kohlenwasserstoffphase. Die wäßrige Phase wurde in den Fermentor zurückgeführt. Die erste Phase wurde der Eindickung, Trocknung und Extraktion mit organischen Lösungsmitteln zugeführt. Der Lipid- und Kohlenwasserstoffextrakt wurde nach der Destillation der Lösungsmittel zur Gewinnung einzelner Lipidfraktionen verwendet, die abgetrennten Kohlenwasserstoffe wurden in den Fermentor zurückgeführt. Die Kohlenwasserstoffphase, die in der Separation abgetrennt wurde, wurde bei der Kultivierung von Mikroorganismen auf Basis von n-Paraffinen in den Fermentor zurückgeführt oder bei der Kultivierung auf Basis von Erdöldestillaten einer speziellen Reinigung unterworfen. Die gereinigte Kohlenwasserstofffraktion mit verringertem n-Alkangehalt wurde als Kraftstoff mit verbesserter Qualität verwendet. Die bei der Hefekultivierung gewonnene Biomasse sowie das Endprodukt, das nach der Extraktion der Hefe mit Lösungsmitteln gewonnen wurde, wurden hinsichtlich Rohprotein und Aminosäuren analysiert. Es wurde festgestellt, daß sich bei der Kultivierung der Hefe in der Biomasse 50 - 65 % Rohprotein und 6 - 13 % Lysin, umgerechnet auf den Gesamtgehalt an Aminosäuren, anreichern. Dabei wurde ermittelt, daß der Gehalt an Rohprotein und Aminosäuren in der Biomasse reguliert werden kann.

- In der Hefe reichert sich 60 - 65 % Rohprotein mit 10 - 13 % Lysin, bezogen auf die Gesamtmenge der Aminosäuren bei der Kultivierung auf Kohlenwasserstoffen an, die 50 - 100 % n-Alkane $C_8 - C_{18}$ vom Gemisch der n-Alkane $C_8 - C_{35}$ enthalten.

Der Gehalt an wasserlöslichen Verbindungen in der Kulturflüssigkeit mußte dabei in bestimmten Grenzen liegen und zwar:

N = 50 - 450 mg/l	Fe = 2 - 8 mg/l
P = 40 - 120 mg/l	Zn = 2 - 8 mg/l
K = 40 - 120 mg/l	Mn = 2 - 8 mg/l
Mg = 10 - 70 mg/l	Cu = 1 - 5 mg/l

Im Ergebnis der Extraktion mit Lösungsmitteln zur Entfernung von Kohlenwasserstoffen und Biolipiden stieg der Eiweißgehalt in der wasserfreien Biomasse von 60 - 65 % auf 70 - 75 %, der Gehalt an essentiellen Aminosäuren von 25 - 30 % auf 35 - 40 % und der Lysingehalt von 10 - 13 % auf 15 - 18 %.

- Die Hefe enthielt 50 - 57 % Rohprotein, 13 - 19 % essentielle Aminosäuren, 6 - 9 % Lysin, bezogen auf die Summe der Aminosäuren, bei Kultivierung auf Kohlenwasserstoffen, die 90 - 100 % n-Alkane $C_{19} - C_{35}$ vom Gemisch der n-Alkane $C_8 - C_{35}$ enthalten bei Verringerung oder Erhöhung eines oder mehrerer Elemente in der Kulturflüssigkeit an N, P, K, Mg, Fe, Zn, Mn und/oder Cu gegenüber den angegebenen Grenzen.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Candida guilliermondii wurde in einem 30 l-Fermentor unter Rühren und Belüftung kultiviert.

Die Drehzahl des Rührers betrug 1200 U/min, die zugegebene Luftmenge $150 \text{ Nm}^3/\text{m}^3$. Stunde.

Die Fermentortemperatur lag bei $32 - 34 \text{ }^\circ\text{C}$, der pH-Wert bei $4 - 4,2$, die Verweilzeit betrug 4 Stunden. Als Kohlenstoffquelle wurde Erdöldestillat mit den Siedegrenzen $200 - 320 \text{ }^\circ\text{C}$ verwendet, das 17 % n-Alkane $\text{C}_8 - \text{C}_{35}$ enthielt, wobei 70 % der n-Alkane aus $\text{C}_8 - \text{C}_{18}$ bestanden und 30 % n-Alkane $\text{C}_{18} - \text{C}_{35}$.

Die Kohlenwasserstoffkonzentration betrug im Nährmedium 3 % bezogen auf n-Alkane $\text{C}_8 - \text{C}_{35}$.

Das wäßrige Nährmedium enthielt N, P, K, Fe, Zn, Mn und Cu in solchen Konzentrationen, daß ihr Gehalt in der Kulturflüssigkeit bei der Kultivierung in folgenden Grenzen in mg/l lag:

N	= 50 - 450	Fe	= 2 - 8
P	= 40 - 120	Zn	= 2 - 8
K	= 40 - 120	Mn	= 2 - 8
Mg	= 10 - 40	Cu	= 1 - 5

Die bei der Kultivierung erhaltene Biomasse enthielt:

- Rohprotein (% der trockenen Biomasse)	63,8
- Summe der essentiellen Aminosäuren (% der trockenen Biomasse)	25,3
- Lysin (% bezogen auf die Summe der Aminosäuren)	12,5

Beispiel 2

Die Hefe *Candida guilliermondii* wurde analog dem Beispiel 1 kultiviert.

Im Unterschied zum Beispiel 1 lag der Gehalt eines Elementes - des Kaliums - in der Kulturflüssigkeit bei 5 - 30 mg/l und damit niedriger als in den o. g. Grenzen. Der Gehalt der übrigen Elemente, die für die erhöhte Synthese des Eiweißes und Lysins notwendig sind, lag im normalen Bereich. Die bei der Kultivierung gewonnene Biomasse enthielt:

- Rohprotein (Ma.-% der trockenen Biomasse) - 56,3
- Summe der essentiellen Aminosäuren - 16,7
(Ma.-% der trockenen Biomasse)
- Lysin (Ma.-% bezogen auf die Summe der Aminosäuren) - 8,7

Beispiel 3

Die Hefe *Candida guilliermondii* wurde analog dem Beispiel 1 kultiviert.

Der Unterschied bestand darin, daß als Kohlenstoffquelle Erdöldestillat mit den Siedegrenzen 240 - 360 °C verwendet wurde, das 20 % n-Alkane C₈ - C₃₅ in der Zusammensetzung 25 % n-Alkane C₈ - C₁₈ und 75 % n-Alkane C₁₉ - C₃₅ enthielt. Die Kulturflüssigkeit enthielt die notwendigen Elemente in der erforderlichen Menge.

Die bei der Kultivierung anfallende Hefe enthielt:

- Rohprotein (Ma.-% der trockenen Biomasse) - 55,2
- essentielle Aminosäuren - 15,3
(Ma.-% der trockenen Biomasse)
- Lysin (Ma.-% bezogen auf die Summe der Aminosäure) - 7,6

Erfindungsanspruch

Verfahren zur Gewinnung von lysinreicher Biomasse durch Kultivierung von Mikroorganismen, vorzugsweise Hefen, auf Kulturmedien, die als Kohlenstoffquelle Kohlenwasserstoffe enthalten, welche teilweise oder vollständig aus n-Alkanen bestehen, bei Anwesenheit von N, P, K, Mg, Mn, Zn, Fe und Cu im Kulturmedium, gekennzeichnet dadurch, daß zur Erhöhung des Eiweißgehaltes und des Gehaltes an essentiellen Aminosäuren, insbesondere Lysin, in der Biomasse die Kultivierung der Mikroorganismen auf Kohlenwasserstoffen erfolgt, die n-Alkane $C_8 - C_{35}$ enthalten, von denen der Anteil an $C_8 - C_{18}$ -n-Alkanen in den Grenzen 50 - 100 % reguliert wird und der Gehalt der Elemente in der Kulturflüssigkeit in den folgenden Grenzen liegt:

N	= 50 - 450 mg/l	Fe	= 2 - 8 mg/l
P	= 40 - 120 mg/l	Zn	= 2 - 8 mg/l
K	= 40 - 120 mg/l	Mn	= 2 - 8 mg/l
Mg	= 10 - 40 mg/l	Cu	= 1 - 5 mg/l