



AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

PATENTSCHRIFT 140 150

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(11) 140 150 (44) 13.02.80 Int. Cl.³ 3(51) C 12 N 1/26
C 12 N 1/32
C 12 R 1/72
(21) WP C 12 D / 208 284 (22) 05.10.78

-
- (71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Berlin, DD
(72) Bley, Thomas, Dipl.-Math.; Glombitza, Franz, Dr. Dipl.-Chem.;
Heinritz, Brigitte, Dipl.-Chem.; Stichel, Evamaria,
Dipl.-Chem., DD
(73) siehe (72)
(74) Akademie der Wissenschaften der DDR, Institut für technische
Chemie, Arbeitsgruppe Patentwesen, 705 Leipzig,
Permoserstraße 15
-

(54) Verfahren zur Gewinnung von Biomasse

(57) Das erfindungsgemäße Verfahren kann zur Gewinnung von Biomasse aus verschiedenen Kohlenstoffsubstraten eingesetzt werden. Durch die erfindungsgemäße technische Lösung wird eine Senkung des Rohstoffeinsatzes in günstigen Fällen um ca. 30%, eine Verbesserung der Qualität der Biomasse und im Falle der Erdöldestillatkonvertierung eine Verbesserung der Qualität des Dieselkraftstoffes durch eine Senkung des Stockpunktes erreicht. Die Neuheit des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in der alternierenden allmählichen Änderung der Konzentration der Kohlenstoff- und Energiequelle in einem der Dauer der Phasen des Zellzyklus angepassten Rhythmus bei Konstanthaltung der Durchflußgeschwindigkeit der kontinuierlichen phosphatlimitierten Kultivierung von Mikroorganismen. Das erfindungsgemäße Verfahren kann vorzugsweise bei der Erdöldestillatkonvertierung eingesetzt werden. Es kann ebenfalls überall dort angewandt werden, wo mit einem Überschuß der Kohlenstoff- und Energiequelle gearbeitet wird.



Titel:

Verfahren zur Gewinnung von Biomasse

Anwendungsgebiet der Erfindung:

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von mikro-
 5 bieller Biomasse. Die erfindungsgemäße Lösung kann überall dort
 eingesetzt werden, wo bei der kontinuierlichen Kultivierung von
 Mikroorganismen eine Begrenzung des Mikroorganismenwachstums
 durch die Kohlenstoff- und Energiequelle unmöglich ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann ebenfalls auf einstufige
 10 kontinuierliche Produktsynthesen, bei denen in der Produktbil-
 dungsphase ein Überschuß der Kohlenstoff- und Energiequelle not-
 wendig ist, übertragen werden.

Die Erfindung ist in die IPK C 12 D einzuordnen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen:

- 15 Es ist ein Verfahren zur Gewinnung von Futterhefe bekannt
 (DD-WP 105 825), bei welchem in zwei Stufen gearbeitet wird.
 In der ersten Stufe wird eine Hefe der Art Candida guilliermondii
 auf Erdöldestillat mit einer Verweilzeit von ca. 5 Stunden aerob
 kultiviert. Anschließend wird der Fermentorablauf in einen zweiten
 20 Fermentor geleitet und die Kultivierung unter den gleichen Bedin-
 gungen wie in der ersten Stufe weitergeführt.

Folgende Ergebnisse werden mit diesem Verfahren erzielt:

- | | |
|--|-----|
| 1. Produktivität (g/kg.h): | 2,6 |
| 2. spezifischer ED-Verbrauch: | 1,3 |
| 25 $\frac{dS}{dx}$ (g/g) | |
| 3. ED-Anteil am Fermentations-
medium (Ma%) | 10 |
| 4. n-Paraffin im ED (Ma%): | 38 |
| 5. Verweilzeit (h): | 10 |

- | | | |
|----|--|-----|
| 6. | Rohproteingehalt der Hefe (%): | 54 |
| 7. | Stockpunkt des ED nach der 2. Fermentation (°C): | -30 |
- 5 In einem weiteren bekannten Verfahren zur Gewinnung von Biomasse (DD-WP 129 804) wird durch Phosphat- bzw. Zinkionenlimitation bei der kontinuierlichen Kultivierung von Mikroorganismen auf Erdöldestillat, Paraffinen bzw. Methanol in Umlaufreaktoren mit unbegasteten Kreislaufsystemen gegenüber den anderen bekannten Ver-
- 10 fahren eine Senkung des Verbrauchs der spezifischen Nährstoffe um ca. 40% erzielt. Der spezifische Nährstoffbedarf liegt jedoch nicht unter den in Rührkesselreaktoren erzielbaren Werten. Nachfolgend die Ergebnisse, die mit diesem Verfahren erzielt werden:
- | | | |
|----|--|------|
| 15 | 1. Produktivität (g/kg.h): | 3,5 |
| | 2. ED-Anteil im Fermentationsmedium (%): | 20 |
| | 3. Paraffine im ED (Ma%): | 18 |
| | 4. Verweilzeit (h): | 4 |
| 20 | 5. $\epsilon \frac{O}{x^2}$ (g O ₂ /g HTS): | 2,75 |

Ziel der Erfindung:

Ziel der Erfindung ist die Senkung des Rohstoffeinsatzes, die Erhöhung des Rohproteingehaltes in der Biomasse und die Senkung des Stockpunktes von Dieselkraftstoff bei dessen Verwendung als

25 Kohlenstoffquelle.

Wesen der Erfindung:

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, durch eine gezielte Prozeßführung, die in den bekannten Verfahren relativ hohen Rohstoffeinsätze zu senken, die Qualität der Biomasse durch die Erhöhung des Rohproteingehaltes zu verbessern sowie die Qualität des Dieselkraftstoffs durch Erniedrigung des Stockpunktes zu erhöhen.

Darlegung des Wesens der Erfindung:

- Das Ziel wird durch eine alternierende allmähliche Änderung der Kohlenstoffsubstratkonzentration im Fermentationsmedium in einem der Dauer der Phasen des Zellzyklus angepaßten Rhythmus (Heinritz 5 B., Dissertation zur Promotion A, Leipzig 1978) bei Konstanthaltung der Durchflußgeschwindigkeit der kontinuierlichen Kultivierung unter Phosphationenlimitation oder unter Sauerstofflimitation mit sehr geringem Phosphatüberschuß erreicht.
- Der Fermentationsprozeß kann ebenfalls durch solche Bestandteile 10 des Nährmediums limitiert werden, die eine geringe Reaktion des Fermentationsprozesses auf eine alternierende Änderung der Kohlenstoffsubstratdosierung gewährleisten.
- Durch die allmähliche Senkung der Konzentration der Kohlenstoff- und Energiequelle in der Einzelzellphase wird die Reservestoff- 15 bildung in dieser Phase vermieden.
- Das erfindungsgemäße Verfahren kann wie folgt realisiert werden. Zunächst wird ein kontinuierlicher Fermentationsprozeß unter Phosphatlimitation oder unter Sauerstofflimitation mit geringem Phosphatüberschuß realisiert, so daß sich im Fermentationsmedium 20 ständig eine Konzentration von kleiner 50 mg Phosphor/l einstellt. Danach wird der Fermentationsprozeß einer plötzlichen Änderung eines Fermentationsparameters, z.B. der Drosselung der Luftzufuhr oder der Erniedrigung des pH-Wertes, im Zeitraum von ca. 15 min unterzogen.
- 25 Dies führt zu einer partiellen Synchronisation der Funktionen der Zellen der Mikroorganismenpopulation. Dies hat eine periodische Änderung der Prozeßkennziffern zur Folge. Die Periode der Änderungen liegt im Bereich von mehreren Stunden und beträgt etwa das 2 1/2-fache der Verweilzeit der kontinuierlichen Kultivierung.
- 30 In einer Wachstumsphase konstanter Dauer, die beispielsweise bei der Kultivierung von *Candida guilliermondii* auf Erdöldestillat ca. fünf Stunden dauert, steigt die Biomassekonzentration im Fermentationsmedium über den stationären Wert. In dieser Wachstumsphase wird eine vorgegebene Menge Kohlenstoffsubstrat dosiert.
- 35 Bei der Erdöldestillatkonvertierung richtet sich die vorgegebene Substratdosierung nach dem Paraffingehalt des Erdöldestillats.
- In der sich an die Wachstumsphase anschließenden Einzelzellphase, die bei der Kultivierung von *Candida guilliermondii* auf Erdöl-

destillat bei einer konstanten Verweilzeit von 4,6 Stunden
ca. sieben Stunden dauert, sinkt die aktuelle Biomassekonzentration allmählich. Die Kohlenstoffsubstratdosierung wird deshalb um die Hälfte reduziert, um eine Reservestoffbildung der
5 Mikroorganismen zu vermeiden.

Zur Konstanthaltung der Verweilzeit in dieser Phase wird die Wasserdosierung erhöht. Anschließend wird die Kohlenstoffsubstratdosierung in einem der Dauer der Phasen des Zellzyklus angepassten Rhythmus verändert. Die plötzliche Änderung eines Fermentationsparameters wird zur Erhaltung der partiellen Synchronisation der Funktion der Zellen der Population mehrmals wiederholt.
10 Im Ergebnis der Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens erzielt man eine Senkung des spezifischen Verbrauchs der Rohstoff- und Energiequelle von ca. 30%, einen um ca. 10% höheren Rohpro-
15 teingehalt in der Biomasse und eine signifikante Senkung des Stockpunktes des verwendeten Dieselkraftstoffes gegenüber den bisher bekannten Verfahren.

Die Erfindung wird durch folgende Beispiele erläutert:

Beispiel 1:

- 20 In einem kontinuierlich arbeitenden Rührkesselreaktor werden Hefen der Art *Candida guilliermondii* auf Erdöldestillat (ED) als einziger Kohlenstoffquelle gezüchtet.
Die Fermentationsparameter sind:

Verweilzeit:	4,6 h
25 Substratangebot:	5 h 20 Ma% ED = 190 ml/h 7 h 10 Ma% ED = 100 ml/h
n-Paraffingehalt des ED:	12 Ma% (gaschromatographisch)
Wasser- und Laugendosierung:	5 h 300 ml/h 7 h 400 ml/h
30 Temperatur:	32 °C
pH-Wert:	4,2
Masseinhalt des Fermentors:	4,0 kg

In den Fermentor werden neben dem Substrat Erdöldestillat, dem Wasser und der Lauge zur pH-Regelung stündlich 300 ml Nährlösung zugeführt.

Die Nährlösung enthält je Liter:

- 20 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 1,8 g K_2SO_4
 0,75g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
 5 0,7 g H_3PO_4 (80%)

sowie die Spurenelemente Eisen, Zink, Kupfer, Mangan in ausreichenden Mengen.

Durch die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens stellten sich die in der Tabelle angegebenen Prozeßkennziffern ein:

10	1. Produktivität (g/kg.h):	2,45
	2. Rohproteingehalt der Hefe (%):	57
	3. ED-Anteil im Fermentationsmedium (Ma%):	13,5
15	4. Paraffin im ED (Ma%):	12
	5. Durchflußrate (h^{-1}):	0,22
	6. $\frac{d}{x} \text{O}_2$ (g O_2 /g HTS):	2,71
	7. $\frac{d}{x} \text{CO}_2$ (g CO_2 /g HTS):	2,12
	8. $\frac{d}{x} \text{S}$ (g Paraffin/g HTS):	1,0
20	9. $\frac{d}{x} \text{P}$ (mg P/g HTS):	9,1
	10. ED nach Fermentation ($^{\circ}\text{C}$):	-32

In einem Vergleichsbeispiel wurde unter den gleichen Bedingungen gearbeitet, jedoch mit der bisher bekannten Methode einer gleichbleibenden Substratzufuhr von 20 Ma% ED und einer gleichbleibenden Wasser- und Laugendosierung von 300 ml/h.

Dabei wurden zum Vergleich folgende Ergebnisse erzielt:

1. Produktivität (g/kg.h): 2,37
2. Rohproteingehalt der Hefe 50
(%):
3. ED-Anteil im Fermentations- 20
5 medium (Ma%):
4. Paraffin im ED (Ma%): 12
5. Durchflußrate (h^{-1}): 0,22
6. $d_x^{O_2}$ (g O_2 /g HTS): 2,63
7. $d_x^{CO_2}$ (g CO_2 /g HTS): 2,23
- 10 8. d_x^S (g Paraffin/g HTS): 1,07
9. d_x^P (mg P/g HTS): 9,1
10. ED nach Fermentation ($^{\circ}C$): -20

Beispiel 2:

- In einem kontinuierlich arbeitenden Rührkesselreaktor wurden
- 15 Hefen der Art *Candida guilliermondii* D auf Erdöldestillat (ED) als einziger Kohlenstoffquelle gezüchtet.
Die partielle Synchronisation des Organismenwachstums wurde durch ein viertelstündiges Abstellen der Luftzufuhr, das in Zeitabständen von etwa 40 Stunden wiederholt wurde, hergestellt.
 - 20 Die Erdöldestillatdosierung sowie die Wasser- und Laugendosierung wurden im Rhythmus, der der Dauer der Phasen des Zellzyklus angepaßt wurde, alternierend verändert.

- | | | |
|------------------------|-----|----------------------|
| alternierende Erdöl- | 5 h | 20 Ma% ED = 240 ml/h |
| destillatdosierung: | 7 h | 10 Ma% ED = 120 ml/h |
| 25 Wasser- und Laugen- | 5 h | 400 ml/h |
| dosierung: | 7 h | 500 ml/h |

Bei der Fermentation wurden folgende Parameter eingestellt:

Durchflußgeschwindigkeit	0,26 h ⁻¹
Temperatur	32 °C
pH-Wert	4,2 (pH-Regelung mit 3%-iger Natronlauge)
5 Luftmenge	105 l Luft/kg.h
Masseinhalt des Fermentors	3,8 kg
Paraffinkonzentration im ED	18 Ma%

In den Fermentor wurden neben dem Erdöldestillat, dem Wasser
und der Lauge zur pH-Regelung stündlich 400 ml Nährlösung zu-
10 geführt. Die Nährlösung enthält je Liter:

20 g (NH₄)₂SO₄
0,75 g MgSO₄ x 7 H₂O
1,8 g K₂SO₄
0,78 g H₃PO₄ (80%)

15 sowie die Spurenelemente Eisen, Zink, Kupfer und Mangan in aus-
reichenden Mengen.

Durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens wurde eine
mittlere Produktivität von 2,6 g HTS/kg.h, ein mittlerer spezi-
fischer Substratverbrauchskoeffizient von 0,96 g Paraffin/g HTS,
20 ein mittlerer Sauerstoffverbrauch von 2,55 g Sauerstoff/g HTS
sowie ein mittlerer spezifischer Phosphorverbrauch von 9,9 mg
Phosphor/g HTS erzielt.

Die Hefetrockensubstanz hatte dabei einen mittleren Eiweißge-
halt von 62 Prozent.

25 Beispiel 3:

In einem kontinuierlich arbeitenden Rührkessereaktor wurden
Hefen der Art Candida guilliermondii D auf Glukose als einziger
Kohlenstoffquelle gezüchtet. Die partielle Synchronisation
des Organismenwachstums wurde durch ein viertelstündiges Ab-
30 stellen der Luftzufuhr, das in Abständen von ca. 40 Stunden
wiederholt wurde, hergestellt.

Die Fermentationsparamter waren:

	Durchflußgeschwindigkeit:	0,19 h ⁻¹
	Temperatur:	32 °C
	pH-Wert:	4,2 (pH-Regelung mit 15%-iger NaOH)
5	Luftmenge	100 l Luft/kg.h
	Masseinhalt des Fermentors:	4.25 kg
	alternierende Dosierung	6 h 400 ml/h
	der Glukoselösung:	6 h 200 ml/h
	alternierende Wasser-	6 h 0 ml/h
10	dosierung:	6 h 200 ml/h

In den Fermentor wurden neben der Glukoselösung, Lauge und Wasser stündlich 400 ml Nährlösung zugeführt.

Die Nährlösung enthielt je Liter:

- 20 g (NH₄)₂SO₄
- 15 0,75 g MgSO₄ x 7 H₂O
- 1,8 g K₂SO₄
- 0,78 g H₃PO₄ (80%)

sowie die Spurenelemente Eisen, Kupfer, Zink und Mangan in ausreichenden Mengen.

- 20 Durch Anwendung der erfindungsgemäßen Lösung stellte sich eine mittlere Produktivität von 2,7 g HTS/kg.h, ein mittlerer Glukoseverbrauch von 2,06 g Glukose/g HTS, ein mittlerer Sauerstoffverbrauch von 1,17 g Sauerstoff/g HTS sowie ein mittlerer Phosphorverbrauch von 9,78 mg Phosphor/g HTS ein.
- 25 Ohne Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens wurden vergleichsweise folgende Prozeßkennziffern erreicht:

- Produktivität: 2,8 g HTS/kg.h
- spezifischer Glukoseverbrauch: 2,62 g Glukose/g HTS
- spezifischer Sauerstoffverbrauch: 1,28 g O₂/g HTS
- 30 spezifischer Phosphorverbrauch: 9,43 mg Phosphor/g HTS

Durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens wurde eine Verbesserung des spezifischen Kohlenstoffsubstratverbrauchs um 23 Prozent erreicht. Dabei bleiben die Produktivität, der spezifische Sauerstoffverbrauch und der spezifische Phosphor-
5 verbrauch annähernd konstant

Beispiel 4:

In einem kontinuierlich arbeitenden Rührkesselreaktor wurden Hefen der Art *Candida guilliermondii* D auf Glukose als einziger Kohlenstoffquelle gezüchtet. Die partielle Synchronisation der
10 Funktionen der Zellen in der Population wird durch eine viertelstündige Reduzierung der Luftzufuhr, die in Abständen von ca. vierzig Stunden wiederholt wird, hergestellt.

Die Fermentationsparameter waren:

	Durchflußgeschwindigkeit:	0,18 h ⁻¹
15	Temperatur:	32 °C
	pH-Wert:	4,2 (pH-Regelung mit 15%-iger NaOH)
	Luftmenge:	93 l Luft/kg.h
	Masseinhalt des Fermentors:	4,5 kg
20	alternierende Dosierung der Glukoselösung:	5 h 120 ml/h 7 h 60 ml/h
	alternierende Wasser-	5 h 0 ml/h
	dosierung:	7 h 60 ml/h

In den Fermentor wurden neben der Glukoselösung, Lauge und
25 Wasser stündlich 680 ml Nährlösung zugeführt.

Die Nährlösung enthielt je Liter:

11,5 g (NH₄)₂SO₄
0,49 g MgSO₄ x 7 H₂O
1,2 g K₂SO₄
0,39 g H₃PO₄ (80%)

sowie die Spurenelemente Eisen, Kupfer, Zink und Mangan in ausreichenden Mengen.

Durch Anwendung der erfindungsgemäßen Lösung stellte sich eine mittlere Produktivität von 2,14 g HTS/kg.h, ein mittlerer spezifischer Substratverbrauch von 1,96 g Glukose/g HTS, ein mittlerer spezifischer Sauerstoffverbrauch von 1,3 g Sauerstoff/g HTS sowie ein mittlerer spezifischer Phosphorverbrauch von 9,54 mg Phosphor/g HTS ein.

Ohne Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der phosphorlimitierte, kontinuierliche Fermentationsprozeß durch folgende Prozeßkennziffern gekennzeichnet:

Produktivität: 2,2 g HTS/kg.h
spezifischer Substratverbrauch 2,76 g Glukose/g HTS
spezifischer Sauerstoffverbrauch 1,29 g O₂/g HTS
spezifischer Phosphorverbrauch 9,54 mg Phosphor/g HTS

Die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahren bewirkt somit eine Verbesserung des spezifischen Verbrauches der Kohlenstoffquelle von ca. 30 Prozent bei Konstanz der Produktivität, des spezifischen Sauerstoffverbrauchs sowie des spezifischen Phosphorverbrauchs.

Patentanspruch

1. Verfahren zur Gewinnung von Biomasse durch kontinuierliche Kultivierung von Mikroorganismen auf flüssigen Kohlenwasserstoffen, Kohlehydraten oder Alkoholen in Gegenwart eines wässrigen Nährmediums und eines freien Sauerstoff enthaltenden Gases unter Phosphatlimitation oder Sauerstofflimitation mit geringem Phosphatüberschuß, dadurch gekennzeichnet, daß nach Einstellung einer partiellen Synchronisation der Mikroorganismen die Zuführung der Kohlenstoff- und Energiequelle, bei Konstanthaltung der Verweilzeit, im Rhythmus der Dauer der Phasen des Zellwachstums periodisch verändert wird, wobei in der Wachstumsphase die für die Erzielung der gewünschten Zellkonzentration erforderlichen Menge zugeführt wird und in der Einzelzellphase diese Menge bis auf die Hälfte reduziert wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß die partielle Synchronisation des Wachstums der Mikroorganismen durch Erniedrigung des pH-Wertes, Reduzierung der Luftzufuhr oder Veränderung der Temperatur erreicht wird.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die in der Einzelzellphase verringerte Zuführung der Kohlenstoff- und Energiequelle durch eine erhöhte Zuführung von Wasser zur Konstanthaltung der Durchflußrate ausgeglichen wird.