



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **278 355 A1**4(51) **C 12 N 1/28**
C 12 N 1/16

PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 N / 323 624 5	(22)	22. 12. 88	(44)	02. 05. 90
------	-----------------------	------	------------	------	------------

(71) VEB Petrolchemisches Kombinat Schwedt, Schwedt (Oder), 1330, DD

(72) Samsonova, Ida, Dr. Dipl.-Biol., SU; Böttcher, Fritz, Prof. Dr. Dipl.-Biol., DD; Klinner, Ulrich, Dr. sc. Dipl.-Biol., DD; Brendler, Walter, Dr. Dipl.-Biol., DD; Rohbeck, Hartmut, DD; Lübbert, Gustav-Adolf, Dipl.-Chem., DD; Wittkowski, Wieland, DD; Bauch, Joachim, Dr. Dipl.-Chem., DD; Heidenreich, Günther, Dipl.-Ing., DD; Langner, Jürgen, Dipl.-Chem., DD; Lippold, Felix, Dipl.-Ing., DD; Petzold, Gerhard, Dipl.-Chem., DD; Gesche, Manfred, Dipl.-Chem., DD; Zander, Jürgen, Dipl.-Ing., DD; Pigosch, Klaus, DD; Lehmann, Werner, Dipl.-Chem., DD

(54) **Verfahren zur Gewinnung von Hefebiomasse**

(55) kontinuierliche Kultivierung, Hefebiomasse, Erdöldestillat, n-Alkane, aerob, Genetik, Hefestamm, Candida maltosa PCK 1, IMET 43891

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Hefebiomasse durch kontinuierliche Kultivierung von Hefen auf der Basis von n-Alkanen. Das Ziel der Erfindung, die Gewinnung einer eiweißreichen Qualitätsbiomasse bei Gewährleistung einer hohen Produktivität und Identität der verwendeten Mikroorganismen sowie Einschränkung des Kohlenstoff- und Energieverbrauches, wird erreicht, indem zur Gewinnung von Hefebiomasse durch aerobe kontinuierliche Züchtung in einem Kulturmedium, welches als Kohlenstoff- und Energiequelle n-alkanhaltige Erdöldestillate enthält, als Mikroorganismus der Hefestamm Candida maltosa PCK 1, IMET 43891, der mittels genetischer Methoden unter den Bedingungen der kontinuierlichen Kultur konstruiert wurde, verwendet wird.

Patentanspruch:

Verfahren zur Gewinnung von Hefebiomasse durch aerobe kontinuierliche Züchtung eines Mikroorganismus in einem Kulturmedium welches als Kohlenstoff- und Energiequelle n-alkanhaltige Erdöldestillate enthält, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Mikroorganismus der Hefestamm *Candida maltosa* PCK 1, IMET 43891, der mittels genetischer Methoden unter den Bedingungen der kontinuierlichen Kultur konstruiert wurde, verwendet wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Hefebiomasse durch kontinuierliche Kultivierung von Hefen auf der Basis von n-Alkanen. Die Erfindung gehört in das Gebiet der technischen Mikrobiologie und kann in Anlagen zur Erzeugung von mikrobieller Biomasse genutzt werden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es sind verschiedene Verfahren zur Gewinnung eiweißreicher Biomasse durch Kultivierung von Hefen unter Verwendung von n-Alkanen bzw. n-alkanhaltigen Erdöldestillaten als Kohlenstoff- und Energiequelle bekannt.

Gemäß DD-WP 105 825 wird zur Produktion von Biomasse der Hefestamm *Lodderomyces elongisporus* ZIMET H128 verwendet. In diesem Verfahren können bei einer Durchflußgeschwindigkeit von $0,25\text{ h}^{-1}$ und einer Erdöldestillatkonzentration von 10–20% entsprechend dem n-Alkangehalt Produktivitäten bis 6 g/kg/h erreicht werden.

Weitere Verfahren sind beschrieben in DE-OS 141 7560, DE-OS 1470484, DE-OS 1470517.

Alle diese Verfahren sind dadurch gekennzeichnet, daß eine Hefe in einem Fermentor in einer Nährsalzlösung unter ungeschützten Bedingungen kultiviert wird.

Es wird dabei angenommen, daß auf Grund des herrschenden Selektionsdruckes der eingesetzte Stamm während der Langzeitkultivierung genetisch konstant und innerhalb der Population dominant bleibt.

Die genannten Fermentationsverfahren weisen eine Reihe von Nachteilen auf. Sie gestatten unter gegebenen technischen und technologischen Bedingungen nur eine durch die biologischen Eigenschaften des eingesetzten Mikroorganismus bedingte begrenzte Produktivität. Eine Steigerung der Produktivität ist dann nur möglich durch Einsatz von neuen Hefestämmen mit verbesserten Eigenschaften. Ein weiterer Nachteil ist, daß die eingesetzten Hefen im Fermentor von schneller wachsenden Hefen verdrängt werden können. Dabei kann es sich sowohl um Mutanten des eingesetzten Stammes als auch um Infektionen handeln. Dadurch ist die im Produktionsprozeß geforderte Produktqualität und -identität nicht gewährleistet, was ebenfalls zu Ertragsschwankungen und Fehlchargen führen kann. Eine ausreichende biologische Kontrolle, die auch die Überprüfung der Identität des Hefestammes mit einschließt, ist außerordentlich aufwendig.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht in der Gewinnung einer eiweißreichen Qualitätshefebioromasse auf der Basis n-Alkane enthaltender Erdöldestillate bei Gewährleistung einer hohen Produktivität und Identität der verwendeten Mikroorganismen sowie Einschränkungen des Kohlenstoff- und Energieverbrauches.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht in der Verbesserung der prozeßrelevanten Eigenschaften eines Hochleistungsstammes bei der Anwendung für die kontinuierliche Gewinnung von Biomasse mit erhöhtem Rohproteingehalt bei gleichzeitiger Gewinnung von entparaffiniertem Dieseldkraftstoff, wobei die Stabilität des biologischen Systems während der gesamten Kultivierungsdauer über einfache und effektive Kontrollmaßnahmen gewährleistet sein soll.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Gewinnung eiweißreicher Hefebioromasse durch kontinuierliche Kultivierung eines Hochleistungshefestammes mit n-Alkane enthaltenden Erdöldestillaten als Kohlenstoff- und Energiequelle.

Erfindungsgemäß wird dazu der Hefestamm *Candida maltosa* PCK 1 eingesetzt, der durch genetische Methoden unter den Bedingungen der kontinuierlichen Kultur konstruiert wurde.

Dieser Mikroorganismus wurde am 9.9. 1988 im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der Akademie der Wissenschaften der DDR unter der Nummer IMET 43891 hinterlegt.

Es wurde gefunden, daß der Stamm PCK 1 in der kontinuierlichen Fermentation mit n-Alkanen unter vergleichbaren Bedingungen eine höhere Raum – Zeit – Ausbeute aufweist als der Stamm H 128. Außerdem verdrängt er den Stamm H 128 bei gleichzeitiger Kultivierung in einem Fermentor aus der Kultur. Für diese Verdrängung genügt bereits die Inokulierung von 1 ml Suspension des Stammes PCK 1 zu einer 5l-Laborfermentorkultur des Stammes H 128.

Der erfindungsgemäße Stamm ist durch folgende Merkmale charakterisiert:

Die Submerskultur in Würze zeigt nach einer Kultivierungsdauer von 24–36 Stunden bei einer Temperatur von 32°C ovale Zellen mit einer Größe von $2-6 \times 3-10\text{ }\mu\text{m}$. Pseudomycelbildung tritt bis zu einer Kultivierungszeit von 36h nicht auf, nach einer Kultivierungsdauer von mehr als 48h treten häufiger langgestreckte Zellen auf.

Der Hefestamm *Candida maltosa* PCK 1 bildet auf Malzextraktagar cremefarbene Kolonien mit rauher, zum Zentrum hin eingesenkter Oberfläche.

Auf einem biotinfreien Minimalagar bildet diese Hefe nach einer Bebrütungszeit von mehr als 48 h kleine, rosa bis rot gefärbte Kolonien von höchstens 1 mm Durchmesser. Sie unterscheidet sich hierdurch von anderen *Candida maltosa*-Stämmen, z. B. dem Stamm H 128, der nach neueren taxonomischen Untersuchungen nicht zur Art *Lodderomyces elongisporus* gehört, sondern einen Stamm von *Candida maltosa* darstellt.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal ist das Wachstum auf der Basis von Kohlenwasserstoffen, die im Siedegrenzenbenzin enthalten sind.

Dazu werden die Hefen auf Minimalmediumagar ohne C-Quelle ausplattiert, während das Siedegrenzenbenzin über Filterpapier in den umgedrehten Deckel der Petrischale pipettiert und die C- und Energiequelle somit über die Gasphase angeboten wird. Im Unterschied zu anderen *Candida maltosa*-Stämmen wachsen unter diesen Bedingungen Kolonien.

Die Kombination dieser beiden Merkmale bleibt auch bei langzeitiger kontinuierlicher Kultivierung unter ungeschützten Bedingungen konstant und gestattet somit auf einfache Weise die Differenzierung des Stammes *Candida maltosa* PCK 1 vom Stamm *Candida maltosa* H 128 sowie anderen Wildstämmen.

Der Stamm *Candida maltosa* PCK 1 wächst in mineralischer Nährsalzlösung mit Kohlenwasserstoffen als einziger C- und Energiequelle ohne Zusatz von Vitaminen und Hefeextrakt. Als C-Quelle dient ein breites Spektrum von n-Alkanen.

Der Stamm PCK 1 zeichnet sich durch eine hohe Wachstumsrate auf n-alkanhaltigen Medien aus, wodurch er gegenüber Substratkongruenten überlegen ist. Das Verfahren kann unter Anwendung beliebiger bekannter Techniken der kontinuierlichen Kultivierung durchgeführt werden.

Am zweckmäßigsten wird das Verfahren mit folgenden Prozeßparametern realisiert:

Fermentationstemperatur	30–34°C
pH-Wert:	3,5–5,5
Erdöldestillatkonzentration	100–200 ml/l

Obwohl der Stamm PCK 1 im Plattentest eine höhere Biotinbedürftigkeit zeigt als der Stamm H 128 ist die Fermentation ohne eine zusätzliche Gabe von Biotin möglich, wobei sogar der Stamm H 128 überraschenderweise durch den Stamm PCK 1 aus der kontinuierlichen Kultur verdrängt wird.

Während der Fermentation kann die Stabilität des biologischen Systems leicht kontrolliert werden, indem die genannten charakteristischen Merkmale (rosafarbene Kolonien auf biotinfreiem Minimalagar: Wachstum auf Bestandteilen von über die Gasphase angebotenem Testbenzin) kontrolliert werden.

Die Anwendung der erfindungsgemäßen Lösung, Produktion von Futterhefe auf der Basis n-alkanhaltiger Erdöldestillate mit Hilfe des Hefestammes *Candida maltosa* PCK 1, bietet gegenüber anderen Hefen, z. B. *Candida maltosa* H 128, eine Reihe von Vorteilen. Das betrifft die höhere Produktivität als mit anderen Stämmen unter vergleichbaren Bedingungen, die biologische Stabilität des Prozesses auf Grund der Dominanz des Stammes PCK 1 gegenüber anderen kohlenwasserstoffverwertenden Hefen mit der daraus folgenden garantierten Produktidentität sowie die einfache Durchführbarkeit einer effektiven biologischen Prozeßkontrolle.

Ausführungsbeispiele

1. Die Stämme *Candida maltosa* ZIMET H 128 und *Candida maltosa* PCK 1 IMET 43891 werden in einem Laborfermentor unter an sich bekannten Bedingungen mit n-alkanhaltigem Erdöldestillat als C- und Energiequelle bei einer Durchflußrate von $D = 0,25 \text{ h}^{-1}$ kontinuierlich kultiviert. Dazu wurde der Fermentor mit gleichen Mengen von Suspensionen beider Hefen, die im Schüttelkolben auf Vollmedium vorkultiviert worden waren, beimpft. In bestimmten Intervallen wurden aus dem Laborfermentor Proben entnommen und auf biotinfreiem Minimalmediumagar üblicher Zusammensetzung mit Glukose als C- und Energiequelle ausgespatelt. Nach einer Bebrütungsdauer von 72 h bei 32°C wurde der Anteil von rosafarbenen Kolonien auf den Platten bestimmt.

Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt:

t (h kont. Betrieb)	Anteil rosa Kolonien (%)
0	12,16
1	16,56
13	19,44
25	82,00
37	65,79
49	89,43
61	98,40
73	> 99

Die Tabelle zeigt, daß der Anteil der auf biotinfreiem Minimalagar rosafarbene Kolonien bildenden Zellen im Verlaufe der kontinuierlichen Kultivierung zugenommen hat und die Zellen des anderen Typs faktisch eliminiert werden. Zu einem späteren Zeitpunkt wiederholte vorgenommene Kontrollen zeigten dieselben Verhältnisse. Der relativ geringe Anteil rosafarbener Kolonien auf den Platten aus frühen Versuchsstadien ist auf Biotinreserven in den Zellen zurückzuführen, die aus dem zur Vorkultur verwendeten Vollmedium herrühren und die Manifestierung des rosa Kolonietyps verhindern.

2. In einem Laborfermentor wird der Hefestamm *Candida maltosa* PCK 1 in einer mineralischen Nährsalzlösung mit einem n-alkanhaltigen Erdöldestillat als C- und Energiequelle kontinuierlich kultiviert.

Die Kultivierung wurde unter folgenden Parametern durchgeführt:

T: 32°C

pH: 4,2

D: 0,25h⁻¹

C_{ED}: 147,0g/kg

Unter identischen Bedingungen wurde ebenfalls der Stamm *Candida maltosa* H 128 kultiviert. Die Ergebnisse beider Versuche sind im Vergleich in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

	CK 1	H 128
Biomassekonzentration (g/kg)	17,2	15,6
Produktivität (g/kg/h)	4,3	3,9
spezifischer n-Alkanverbrauch	1,05	1,16