



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **225 859 A3**

4(51) C 12 N 1/32

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21)	WP C 12 N / 245 969 4	(22)	15.12.82	(45)	07.08.85
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, 1199 Berlin, Rudower Chaussee 5, DD; Vsesojusnyi naučno issledo vatel'skij institut biosinteza belkovych veščestv – Moskva Z – 4, B. Komunističeskaja 27, SU				
------	---	--	--	--	--

(72)	Hadeball, Wolf, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Jechorek, Mirko, Dipl.-Ing., DD				
------	--	--	--	--	--

(54) Verfahren zur Kultivierung von Mikroorganismen

(57) Das Verfahren zur Kultivierung von Hefen auf Methanol betrifft das Gebiet der technischen Mikrobiologie. Das Ziel der Erfindung besteht darin, durch eine entsprechende Wahl der Fermentationsbedingungen die Fermentation von Methanol durch methylotrophe Hefen so zu gestalten, daß eine sonst übliche Zugabe von Wuchsstoffen zur Fermentation entfallen kann. Das Wesen der Erfindung besteht darin, daß die aktuelle Biomassekonzentration im Fermentor oberhalb einer stammspezifischen kritischen Biomassekonzentration gehalten wird. Das wird erreicht durch:

1. Variation der Durchflußrate im Turbidostat,
2. Aufhebung bzw. Verschiebung der Limitationsgrenze im Chemostat,
3. eine Kombination der Punkte 1 und 2.

Durch die Erfindung wird die Ökonomie der Fermentation von methylotrophen Hefen auf Methanol verbessert. Die Erfindung betrifft das Anwendungsgebiet der Zellsubstanz- und Produktsynthese.

Titel

Verfahren zur Kultivierung von Mikroorganismen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Bio-
5 masse durch Kultivierung von Hefen auf Methanol als einziger
Energie- und Kohlenstoffquelle. Die Erfindung gehört in das
Gebiet der mikrobiologischen Eiweißgewinnung und Produkt-
gewinnung und kann in Anlagen, in denen Futterhefe herge-
stellt wird, eingesetzt werden. Die Erfindung ist in die
10 IPK C 12 N einzuordnen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Verfahren zur Kultivierung von Mikroorganismen auf Methanol
sind in großer Zahl bekannt. Während etwa bis Mitte der 70er
Jahre die Methanol-Fermentation mit Hilfe von Bakterien im
15 Vordergrund stand, gewinnt in jüngster Zeit die Methanol-
konvertierung in SCP mittels Hefen zunehmende Bedeutung.
Bisher sind eine Reihe von Arten fakultativ methylotropher
Hefen bekannt und in die Gattungen Candida, Hansenula,
Kloeckera, Pichia, Saccharomyces und Torulopsis einzuordnen.
20 Charakteristisch für alle diese methylotrophen Hefen ist,
daß Wachsstoffe zum Fermentationsprozeß zugesetzt werden
müssen. Diese Wachsstoffe können in reiner Form, z. B. als
Biotin, Thiamin-Hydrochlorid, Pyridoxin u. a. oder als
komplexe Medien (Hefeextrakt, Maisextrakt, Malzextrakt oder
25 Pflanzen- bzw. Fruchtpressmassen u. ä.) zum Fermentations-
medium zugegeben werden.

Diese für methylotrophe Hefen notwendigen Wuchsstoffe üben in der Hefezelle die Funktion von Coenzymen aus.

So wird nach der GB - PS 1 342 744 eine Hefe der Gattung Candida mit Methanol unter Zusatz von Hefeextrakt oder
5 Thiamin-Hydrochlorid und Biotin kultiviert. Nach der
GB - PS 1 423 642 wird eine Hefe der Art Candida alcomigas mit Methanol unter Zusatz von Thiamin-Hydrochlorid und Biotin diskontinuierlich kultiviert. In verschiedenen japanischen Patentschriften (JA - PS 76 009 031,
10 JA - PS 76 019 029, JA - PS 76 019 030, JA - PS 76 009 834, JA - PS 77 017 114) wird die diskontinuierliche Züchtung verschiedener Spezies der Gattungen Torulopsis, Pichia, Hansenula, Saccharomyces und Candida mit Methanol als einziger Kohlenstoffquelle unter Zusatz von Wuchsstoffen
15 beschrieben.

Weiterhin gibt es Versuche, den Wuchsstoffbedarf der methylotrophen Hefen durch die Kombination zweier Hefen zu decken, wobei eine nicht methylotrophe Hefe, die auf einem zweiten Kohlenstoffsubstrat wächst, die Wuchsstoffe
20 bildet, die für die methylotrophe Hefe essentiell sind (DD - PS 211 271). Bereits vorgeschlagen (WP C 12 N/223 634) wurde die Substitution der essentiellen Wuchsstoffe methylotropher Hefen durch billige landwirtschaftliche und industrielle Abprodukte (Melasse, Molke, Gülle, Schlempe
25 und Sulfitablauge allein oder in Kombination derselben).

Allen Verfahren gemeinsam ist die Zugabe bzw. Zuführung der Wuchsstoffe von außen bzw. über die Fremdproduktion einer zweiten Hefe. Bisher sind keine methylotrophen Hefen bekannt, die ohne die Zuführung von Wuchsstoffen
30 mit gleicher Wachstumsgeschwindigkeit, Biomasseausbeute und Produktqualität der Hefetrockensubstanz wachsen.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, die Züchtung methylo-
tropher Hefen im kontinuierlichen Prozeß ohne die Zugabe
von Wuchsstoffen, Biostimulatoren, Wachstumsbeschleunigern
5 bei mindestens gleicher Wachstumsgeschwindigkeit, Biomasse-
ausbeute und Qualität der methylo-trophen Hefen wie bei der
Zugabe dieser Stoffe zum Prozeß zu realisieren.

Wesen der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die Züchtung
10 methylo-tropher Hefen so zu gestalten, daß eine Zugabe von
Wuchsstoffen, Biostimulatoren, Wachstumsbeschleunigern u. ä.
nicht erforderlich ist, ohne daß die Wachstumsgeschwindig-
keit, Biomasseausbeute und Qualität der methylo-trophen Hefe
gemindert wird. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch
15 gelöst, daß die Bedingungen der Fermentation so gewählt
werden, daß die Biomassekonzentration im Fermentor oberhalb
einer Grenze gehalten wird, die man als kritische Biomasse-
konzentration bezeichnen kann. Oberhalb dieser Konzentra-
tion ist die Wachstumsgeschwindigkeit der methylo-trophen
20 Hefen unabhängig von der Biomassekonzentration im Fermentor
und mindestens so hoch wie bei der Kultivierung der Hefen
unter Zusatz von Wuchsstoffen. Unterhalb dieser Grenze ist
ein langsames Wachstum zu beobachten und es besteht eine
Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit von der Biomasse-
25 konzentration. Diese Abhängigkeit ist in der Abbildung 1
dargestellt.

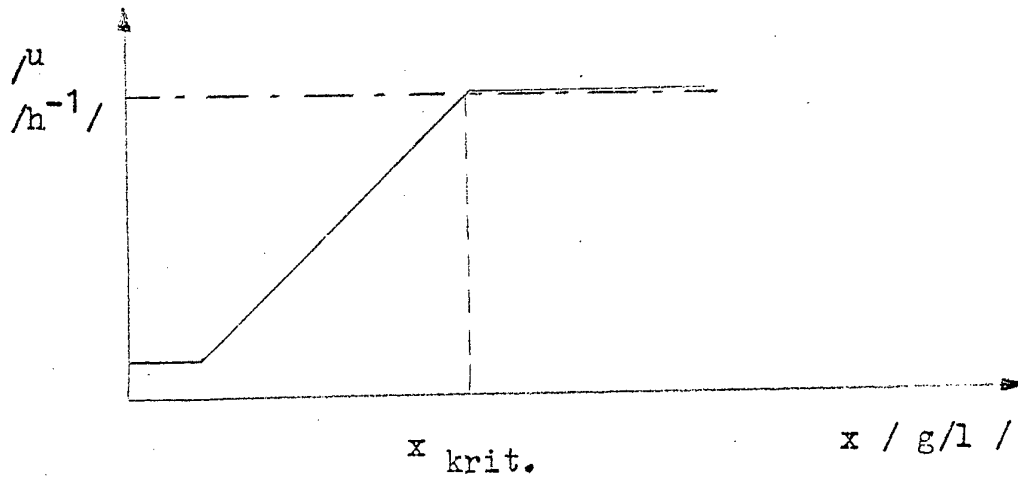


Abbildung 1: Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit von der Biomassekonzentration

———— ohne Wuchsstoffzugabe
- - - - mit Wuchsstoffzugabe

15 Die methylotrophen Hefen erzeugen einen gewissen Teil der Coenzyme bzw. Vitamine selbst. Insofern als die Menge dieser Produkte der Biomasse proportional ist, wird auch die Wachstumsgeschwindigkeit eine starke Abhängigkeit von der Biomassekonzentration aufweisen.

20 Anstelle der Biomassekonzentration in der Abbildung 1 könnte also auch die Konzentration der Produkte stehen, die von den methylotrophen Hefen selbst gebildet werden.

Die Eigenproduktion der Coenzyme bzw. Vitamine durch die methylotrophen Hefen ist nicht gleich. Verschiedene
25 Spezies der Hefen können unterschiedliche Mengen an Coenzymen bzw. Vitaminen synthetisieren. Demzufolge ist auch die kritische Biomassekonzentration von der Art der methylotrophen Hefe abhängig.

Nach Ermittlung der kritischen Biomassekonzentration kann
30 der Prozeß der kontinuierlichen Züchtung von methylotrophen Hefen so gestaltet werden, daß die aktuelle Bio-

massekonzentration im Fermentor immer oberhalb dieser kritischen Konzentration gehalten wird. Das erreicht man durch

1. eine konstante Biomassekonzentration durch Variation der Durchflußrate im Turbidostat
2. die Aufhebung bzw. Verschiebung der Limitationsgrenze des limitierenden Substrates im Chemostat
3. eine Kombination der Punkte 1 und 2

Beispiel 1:

- 10 Der Methanol utilisierende Hefestamm *Hansenula polymorpha* sp. wurde im kontinuierlichen Prozeß unter folgenden konstanten Bedingungen kultiviert:

Temperatur: 38 °C

pH-Wert: 4,5

- 15 Bei zwei verschiedenen Verweilzeiten wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Verweilzeit Hefeextrakt Biomassekonzentration Produktivität

	<u>/h/</u>	<u>/l g/l/</u>	<u>/g HTS/l/</u>	<u>/g HTS/l . h/</u>
20	8,0	-	Ausschwemmung	-
	8,0	+	13,6	1,70
	11,8	+	19,7	1,67
	11,8	-	19,2	1,63

- 25 Durch eine Erhöhung der Verweilzeit von 8 auf 11,8 Stunden konnte erreicht werden, daß die Fermentation von *Hansenula polymorpha* sp. im kontinuierlichen Prozeß ohne die Zugabe von Wachsstoffen bei sonst gleichen Ergebnissen bezüglich Produktivität, Biomasseausbeute und Produktqualität realisiert wurde.

Beispiel 2:

Der Methanol utilisierende Hefestamm *Pichia ambrosiae* MH 26 ZIMET H 43667 wurde im kontinuierlichen Prozeß unter folgenden konstanten Bedingungen kultiviert:

5 Temperatur: 40 °C
 pH-Wert: 3,4
 Verweilzeit: 6,0 h

10 Für zwei verschiedene Sauerstoffübergangsgeschwindigkeiten (r_{O_2}), die über die Luftmenge und die Rührerdrehzahl eingestellt wurden, wurden folgende Ergebnisse erzielt:

r_{O_2}	Hefeextrakt	Biomasse- konzentration	Produktivität
/kg O ₂ /l . h/	/l g/l/	/g HTS/l/	/g HTS/l . h/
5	-	Ausschwemmung	-
15 5	+	10,7	1,79
10	+	20,5	3,42
10	-	21,8	3,63

20 Durch eine Erhöhung der Sauerstoffübergangsgeschwindigkeit von 5 auf 10 kg O₂/l . h konnte erreicht werden, daß die Fermentation von *Pichia ambrosiae* MH 26 ZIMET H 43667 im kontinuierlichen Prozeß ohne die Zugabe von Wuchsstoffen bei gleichen und besseren Ergebnissen bezüglich Produktivität, Biomasseausbeute und Produktqualität realisiert wurde.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Gewinnung von Biomasse durch Kultivierung von Hefen auf der Basis von Methanol als einziger Kohlenstoffquelle gekennzeichnet dadurch, daß die Hefen
5 ohne Wachststoffe oberhalb einer stammspezifischen kritischen Biomassekonzentration, oberhalb der keine Abhängigkeit zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und Biomassekonzentration besteht, gezüchtet werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch, daß
10 die Biomassekonzentration oberhalb der kritischen Konzentration durch Variation der Durchflußrate im Turbido-
stat konstant gehalten wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch, daß
15 die Biomassekonzentration durch Aufhebung der Limitation des limitierenden Substrats im Chemostat bis über die kritische Konzentration angehoben wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch, daß
20 die Biomassekonzentration oberhalb der kritischen Konzentration durch Variation der Durchflußrate und durch
Aufhebung der Limitation des limitierenden Substrats
gehalten wird.