



Nederland

⑫ A **Terinzagelegging** ⑪ **8402744**

⑲ NL

- ⑤4 **Werkwijze voor het winnen van een het coenzym B₁₂ producerende fermentbouillon.**
- ⑤1 Int.Cl⁴: C12P 19/42.
- ⑦1 Aanvrager: Richter Gedeon Vegyészeti Gyar R.T. te Boedapest, Hongarije.
- ⑦4 Gem.: Ir. G. Jacobson c.s.
Octrooibureau Los en Stigter B.V.
Weteringschans 96
1017 XS Amsterdam.

- ②1 Aanvraag Nr. 8402744.
- ②2 Ingediend 7 september 1984.
- ③2 Voorrang vanaf 16 september 1983.
- ③3 Land van voorrang: Hongarije (HU).
- ③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: 321083 .
- ⑥2 - -

- ④3 Ter inzage gelegd 16 april 1985.

De aan dit blad gehechte afdruk van de beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en) bevat afwijkingen ten opzichte van de oorspronkelijk ingediende stukken; deze laatste kunnen bij de Octrooiraad op verzoek worden ingezien.

Werkwijze voor het winnen van een het coenzym B₁₂ producerende fermentbouillon.

De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het winnen van een het coenzym B₁₂ en andere corrinoïden (bijvoorbeeld de factor III) producerende fermentbouillon. In de werkwijze volgens de uitvinding maakt men gebruik van een
5 nieuwe, mesofiele, methaan-producerende gemengde micropopulatie en voor de anaerobe septische fermentering bekende precursors en ten dele bekende voedingsstofcomponenten.

Ofschoon de volgens de onderhavige werkwijze gebruikte precursors en de afzonderlijke componenten van het
10 voedingsmedium bekend zijn, is echter hun aantal en hun hoeveelheid wezenlijk kleiner, hun verhouding anders dan tot nu toe voor fermentatieve bereiding van B₁₂ toegepast.

De volgens de uitvinding bereide fermentbouillon kan gedroogd of warmtebehandeld en in deze vorm als voedings-
15 middel of voedingsmiddeltoevoeging (Premix) worden gebruikt, verder kan desgewenst uit de fermentbouillon het vitamine B₁₂ (cyanocobalamine) voor humaan en veterinair medisch gebruik worden gewonnen.

Bekend is, dat het vitame B₁₂ bij zijn winning door
20 fermentatie in de gekweekte cellen niet in vrije toestand aanwezig is, doch in de vorm van een verbinding met corrinestructuur (coenzym B₁₂), waarbij het centrale kobaltatoom van het corrineskelet geen cyanogroep, doch een desoxyadenosylgroep draagt.

25 In de onderhavige beschrijving wordt de uitdrukking werkzame stof gebruikt voor het mengsel van de werkzame corrinoïden, het coenzym B₁₂ en de factor III (Barker et al.: Biol. Chem. 235, 480 /1960/).

Het inoculum kan een "voor het aanleggen van nieuwe,
30 steriele cultures toegepast virus, microorganisme, een celsuspensie of een plantaardig orgaan, een weefsel of een cel zijn" (Straub, F.B.: Biológiai Lexikon II, ongewijzigde naderuk blz. 287, Akadémiai Kiadó Budapest, 1978). Het volgens de uitvinding gebruikte inoculum bevat een anaerobe, septische, mesofiele, methaan-producerende gemengde micropopu-
35 latie.

8402744

Precursors (tussenproducten) zijn uitgangsverbindingen, waaruit in verloop van de biologische reacties het eindproduct ontstaat (zie ebenda III, blz. 437, bijvoorbeeld 5,6-dimethylbenzimidazool, kobaltchloride, enzovoorts).

5 De voedingsbodem is het voor het kweken van de microorganismen bereide voedingsmedium. De voedingsbodem bevat in opneembare toestand alle zodanige voedingsstoffen, die het microorganisme gedurende het kweken nodig heeft (zie ebenda IV, blz. 249, bijvoorbeeld methanol, ammoniumwaterstof-
10 carbonaat, magnesiumchloride, enzovoorts). In de onderhavige beschrijving dient onder de uitdrukking voedingsmedium verstaan te worden het medium, dat de voedingsstoffen en met deze tezamen de precursors bevat.

Voedingsstoffen zijn de voor de micropopulatie van
15 levensbelang zijnde chemische stoffen (bijvoorbeeld de koolstof- en de stikstofbronnen). Het methanol heeft in de onderhavige uitvinding een dubbele functie: het is enerzijds de koolstofbron voor de biosynthese en levert bovendien de voor het ontstaan van de gemengde micropopulatie vereiste energie.

20 Er is sprake van een halfcontinue fermentatie wanneer de mesofiele, methaan-producerende gemengde micropopulatie voortdurend wordt gevormd, het wegnemen van de fermentatiebouillon en de toevoeging van voedingsstoffen echter periodiek, bij voorkeur dagelijks een of twee keer plaatsvindt.

25 De volgens de uitvinding plaatsvindende halfcontinue "gehandhaafde" fermentatie heeft een tweeledig doel: de samenstelling van de nieuwe, mesofiele, methaan-producerende gemengde micropopulatie wordt over langere tijd (tenminste een jaar) bewaard; in deze culture is het werkzame stofgehalte
30 betrekkelijk gering. Voor het andere wordt aan de "gehandhaafde" fermentatie periodiek - bij voorkeur dagelijks een- of tweemaal - startfermentatiebouillon voor de "producerende" discontinue fermentatie onttrokken. Dit laatste heeft een hogere werkzame stofgehalte. Onder discontinue "producerende"
35 fermentatie (batchfermentatie) wordt hier een discontinue procedure verstaan, waarbij als startfermentatiebouillon de nieuwe, mesofiele, methaan-producerende gemengde micropopulatie bevattende fermentatiebouillon wordt gebruikt.

Voor de bereiding van het coenzym B₁₂ zijn vanwege
40 zijn betekenis talrijke fermentatiemethoden en opwerkingstech-

nologieën bekend. Het grootste gedeelte van deze methoden zijn anaerobe, steriele methoden, die het voordeel hebben, dat er specifiek meer coenzym B_{12} wordt geproduceerd. Nadelig is echter, dat de kosten aanmerkelijk hoger zijn en dat gecompliceerde inrichtingen dienen te worden toegepast. Ook bestaat het gevaar voor een cultuurinfectie.

De biosynthese van het coenzym B_{12} werd door J. Florent en L. Nimet (H.J. Pepper en D. Perlman: Microbial Technology, 2e ed., vol. I, 497-519) samengevat.

10 Bekend is, dat ca. twee decennia geleden coenzym B_{12} werd bereid uit de in de afvalwaterslib aanwezige voedingsstoffen met behulp van de eveneens daar aanwezige bacteriën door fermentatie. Eventueel werd de afvalwaterslib aangevuld door verscheidene andere voedingsstoffen. De werkwijze heeft 15 het grote voordeel, dat deze onder septische omstandigheden kan worden uitgevoerd. Nadelig is echter, dat voor elke fermentatie een grote hoeveelheid afvalwaterslib naar het fermentatiebedrijf dient te worden getransporteerd vanaf de afvalwaterzuiveringsstations. De samenstelling van de afvalwaterslib, alsmede zijn bacteriepopulatie zijn aan schommelingen 20 onderhevig en niet in de laatste plaats konden er ook "wilde stammen" in de afvalwaterslib aanwezig zijn, die het ontstaan of beter gezegd, de beoogde vorming van een stabiele bacteriepopulatie onmogelijk maakten.

25 In het Hongaarse octrooischrift No. 153.740 wordt een nieuwe methode voor de bereiding van het coenzym B_{12} langs anaerobe, septische weg voorgesteld. Volgens deze methode wordt aan het desbetreffende voedingsstoffen bevattende voedingsmedium slechts eenmaal afvalwaterslib toegevoegd, waarbij na tenminste vijf keer verder enten een gemengde populatie ontstond, die reeds op zichzelf in staat was 30 de functie van het inoculum over te nemen en coenzym B_{12} in een hoeveelheid van 6-6,2 mg/l fermentbouillon te produceren. Bij deze zogenaamde "afvalwaterslibvrije" methode diende 35 echter tenminste vijf keer verder geënt te worden (overgeënt, op een vers medium overdragen), dat wil zeggen, dat de aanpassing van de in de afvalwaterslib aanwezige microorganismen aan de productie van B_{12} tijdrovend is, de microorganismen weinig coenzym B_{12} produceren en een groot aantal verscheidene voedingsstoffen vereisen, met het gevolg, dat de 40

8402744

werkwijze duur is.

Voor de bereiding van het coenzym B₁₂ via anaerobe septische fermentatie en ter verhoging van de opbrengst zijn talrijke verdere methoden bekend (bijvoorbeeld Amerikaanse octrooischrift Nos. 3.954.971 en 3.979.259); deze werden alle voor het enige doel uitgewerkt, namelijk voor het intensiveren van de bovengenoemde "afvalwaterslibvrije" methoden.

Een mesofiele, methaan-producerende gemengde micro-populatie werd voor het eerst in het Hongaarse octrooischrift No. 167.658 beschreven. Deze bestaat uit de in "Ungarisches Landesinstitut für Gesundheitswesen (OKI)" onder Nos. 00076, 00077, 00078 en 00079 gedeponeerde volgende stammen: *Corynebacterium* sp. (aanduiding 24 A 1), *Corynebacterium* sp. (aanduiding 62 B 9), *Lactobacillus* sp. (aanduiding 244B/C 1) en *Propionibacterium* sp. (aanduiding 239 A1/6). Gebleken is, dat aan voedingsbodems, die van de gebruikelijke afwijkende voedingsstoffen bevatten, deze anaerobe, mesofiele, methaan-producerende gemengde populatie echter slechts lastig te adapteren is, er dient immers 6-7 keer verder geënt te worden, waarbij een verdere entingscyclus ca. zeven dagen in beslag neemt. Om een fermentatie op deze gemengde micropopulatie te bewerkstelligen, zijn in industrieel opzicht 50-50 dagen vereist, dat wil zeggen dat het geheel tijdrovend en kostbaar is.

De tot nu toe bekende fermentatiemethoden voor het winnen van het coenzym B₁₂ onder toepassing van anaerobe, mesofiele, methaan-producerende microorganismen hebben gemeen, dat zij een groot aantal (18-20) verschillende voedingsmedium-componenten in aanzienlijke hoeveelheden vereisen. Verder zijn sommige van deze componenten, bijvoorbeeld melasse, biergisthydrolysaat, leverextract, maiswater en sulfietloogpoeder, van natuurlijke oorsprong, en derhalve is hun samenstelling aan schommeling onderhevig. Op grond hiervan is de productie van coenzym B₁₂ onvermijdelijk aan schommelingen onderhevig. Een ander deel van de voedingsstoffen, bijvoorbeeld glycine en barnsteenzuur, zijn duur.

Ter opheffing van deze nadelen bestaat de doelstelling van de uitvinding thans daarin, aantal en hoeveelheid van de voedingsstoffen te verminderen, de toepassing van natuurlijke voedingsstoffen te vermijden en daarbij de werkzame stofproductie op gelijke hoogte te houden en doelmatig nog te

8402744

verhogen.

Gevonden werd thans, dat door toepassing van een een nieuwe anaerobe, mesofiele, methaan-producerende micropopulatie bevattend inoculum en de tegelijkertijd toegepaste half-
5 continue zich handhavende en een discontinue productiefementatie het aantal der voedingsstoffen ongeveer tot de helft, de specifieke voedingsstoffenbehoefte naargelang de de voedingsstof met 10-30% en de specifieke kosten (kosten/werkzame stof) met 20-25% verlaagd konden worden, van de vijf natuur-
10 lijke voedingsstoffen vier weggelaten konden worden, de dure voedingsmediumcomponenten glycine en barnsteenzuur overbodig zijn, het maiswater desgewenst door de warmtebehandelde (gehydrolyseerde) oplossing van het maiswater resp. door maisafval (bij de alcoholbereiding ontstane afvalstof) resp. zijn
15 hydrolysaat kan worden vervangen en gelijktijdig de werkzame stofproductie met 20-30% toeneemt.

De werkwijze volgens de uitvinding onderscheidt zich als volgt van de bekende methoden:

- voor het starten van de fermentatie wordt een een nieuwe
20 anaerobe, mesofiele, methaan-producerende gemengde micropopulatie bevattend inoculum gebruikt;
- van het aanzetten van het inoculum duurt het slechts 14-15 dagen totdat het uitgangsmateriaal voor de discontinue producerende fermentatie kan worden onttrokken; dit nam bij de
25 tot nu toe bekende methoden 40-50 dagen in beslag;
- er wordt een nieuw voedingsmedium toegepast, waarbij het aantal van de voedingsstoffen ca. de helft van de gebruikelijk toegepaste voedingsstoffen uitmaakt en hun hoeveelheid (met uitzondering van methanol en het in zeer geringe hoeveelheid vereiste o-xylidine) met ongeveer 10-30% kan worden
30 verlaagd;
- in plaats van maiswater verdient zijn gehydrolyseerde oplossing of met maisafval vermengd maiswater of het hydrolysaat van het mengsel de voorkeur.

35 In de volgende tabel worden de voedingsstoffenbehoefte en de geproduceerde hoeveelheid aan coenzym B₁₂ voor de bekende methode volgens het Hongaarse octrooischrift No. 183.549 en voor de methode volgens de uitvinding aangegeven. De vergelijkingsgegevens zijn dimensieloos, hun grondslag zijn de
40 waarden volgens de bekende methode, hetgeen telkens als 1

84 0 2 7 4 4

werd beschouwd.

TABEL

Componenten	Werkwijze volgens Hongaars octrooi-schrift 183.549	volgens de uitvinding
Methanol	1	1,11
Maiswater	1	0,78
5 Ammoniumwaterstofcarbonaat	1	0,78
Ammoniumsulfaat	1	0,92
Magnesiumchloride	1	0,98
Kobaltchloride	1	0,69
5,6-Dimethylbenzimidazool	1	0,80
10 o-Xylidine	1	1,75
Natriumwaterstofsulfiet	0	1,0
Hydrolysaat van biergist	1	0
Industrieel leverextract	1	0
Melasse	1	0
15 Sulfietloogpoeder	1	0
Ammoniumhydroxyde	1	0
Diammoniumwaterstoffosfaat	1	0
Glycine	1	0
Barnsteenzuur	1	0
20 Natriumtripolyfosfaat	1	0
Aceton	1	0
Dagelijkse werkzame stofproductie	1	1,3

Het doel van de uitvinding is derhalve een werkwijze voor de bereiding van een onder anaerobe, septische om-
 25 standigheden het coenzym B₁₂ producerende fermentatiebouillon onder toepassing van een nieuw anaeroob, mesofiel, methaan-producerend inoculum met gemengde micropopulatie en onder toepassing van een methanol, precursors en ten dele bekende voedingsstofcomponenten bevattend nieuw voedingsmedium. Voor de
 30 werkwijze volgens de uitvinding is het kenmerkend, dat men
 a) 6-8 dagen lang 5-15 vol.% van de anaerobe, mesofiele, methaan-producerende gemengde micropopulatie bevattende inoculumfermentatiebouillon wegneemt en een gelijk volume van een maiswater-hydrolysaat en/of maisafval of hydrolysaat
 35 ervan en andere bekende voedingsstofcomponenten in geringer

84 0 2 7 4 4

aantal en hoeveelheid bevattend voedingsmedium als vervanging toevoegt en de verwijderde fermentatiebouillon indien gewenst opwerkt,

b) na het bereiken van een methanolassimilatiesnelheid van tenminste 0,15-0,2 g methanol/l fermentatiebouillon per uur het verwijderen van de fermentatiebouillon op dezelfde wijze voortzet, echter ammoniumsulfaat en o-xyldine bevattend voedingsmedium wordt toegevoegd, de fermentering 6-8 dagen wordt voortgezet en desgewenst de verwijderde fermentatiebouillon wordt opgewerkt,

c) na het bereiken van een assimilatiesnelheid van 0,2-0,3 g methanol/l fermentatiebouillon per uur (na beëindiging van de omzetting van de inoculumfermentatiebouillon in de zich in stand houdende fermentatiebouillon) het wegnemen van de fermentatiebouillon en de toevoeging van het voedingsmedium op de onder b) beschreven wijze wordt voortgezet, waarbij het wegnemen van de fermentatiebouillon gedurende enige dagen wordt onderbroken, en

d) aan de weggenomen 5-15 vol.% zich in stand houdende fermentatiebouillon op de eerste dag de onder b) genoemde voedingsstoffen en desgewenst op de tweede dag slechts methanol, maiswater of maiswaterhydrolysaat en ammoniumcarbonaat wordt toegevoegd en na de fermentatie de producerende fermentbouillon wordt opgewerkt, en

e) de stappen c) en d) dagelijks worden herhaald.

Volgens de uitvinding gaat men in bijzonderheden aldus te werk, dat men van de onder punt a) van voorbeeld I beschreven inoculum fermentbouillon dagelijks 5-15 vol.%, bij voorkeur ca. 10 vol.% verwijdert. Deze fermentbouillon bevat weinig werkzame stof, waarbij echter de werkzame stofconcentratie met verloop van tijd toeneemt. De verwijderde hoeveelheid kan opgewerkt worden. Aan het achtergebleven inoculum voegt men de in water resp. methanol van 30-35°C opgeloste componenten van het voedingsmedium toe:

- methanol,
- gehydrolyseerde oplossing van maiswater,
- ammoniumwaterstofcarbonaat,
- magnesiumchloride,
- kobaltchloride,

- 5,6-dimethylbenzimidazool en
- natriumwaterstofsulfiet.

In plaats van de gehydrolyseerde oplossing van het maiswater kan ook maiswater of warmtebehandeld maisafval, des-
5 gewenst in een mengsel met maiswater of zijn gehydrolyseerde oplossing, worden gebruikt.

De verwijdering van ca. 10 vol.% fermentbouillon en de toevoeging van voedingsmedium worden gedurende 6-8 dagen voortgezet. In deze tijd wordt het productievermogen van de
10 gemengde populatie voor coenzym B₁₂ telkens beter; dat kan door analyse van het werkzame stofgehalte van de fermentbouillon alsmede door meting van de snelheid van de methanolassimilatie (hierna: methanolylse) gevolgd worden. Wanneer de snelheid van de methanolylse de drempelwaarde van per uur 0,2 g/
15 l fermentbouillon bereikt, worden aan het voedingsmedium naast de boven reeds gemelde stoffen nog ammoniumsulfaat en o-xyli-
dine toegevoegd. De verwijdering van fermentbouillon en de toevoeging van voedingsmedium worden nog ongeveer 7-10 dagen lang voortgezet. In deze tijd bereikt de methanolylsesnelheid
20 een waarde van 0,3 g methanol/l fermentbouillon per uur; deze waarde is voor de evenwichtstoestand van de halfcontinue fermentatie kenmerkend. De in de halfcontinue bedrijf gehouden, zichzelf staande houdende fermentbouillon bevat ongeveer
15-16 mg/l werkzame stof. De halfcontinue zich staande houden-
25 de fermentering kan tenminste gedurende een jaar worden voortgezet; men neemt eenvoudigweg iedere dag ca. 10 vol.% fermentbouillon weg en voegt in plaats daarvan het gelijke volume van het met ammoniumsulfaat en o-xylidine aangevulde voedingsmedium toe.

30 Nadat de zichzelf staande houdende fermentatie zijn evenwichtstoestand heeft bereikt, wordt de verwijderde fermentbouillon niet meer opgewerkt of verworpen, maar discontinu, chargegewijs gedurende een tot twee dagen nagefermenteerd (producerende fermentering).

35 De chargegewijs producerende fermentering wordt als volgt uitgevoerd. Aan de van de zich in stand houdende fermentbouillon verwijderde fermentbouillon voegt men een voedingsmedium toe, dat met uitzondering van magnesiumchloride en natriumwaterstofsulfiet dezelfde voedingsstoffen bevat,
40 waarbij de hoeveelheden van geval tot geval anders kunnen

8402744

zijn. Desgewenst voegt men aan de producerende fermentering op de tweede dag alleen maar methanol, maiswater (of de verder bovenaangegeven andere stoffen) en ammoniumwaterstofcarbonaat toe. De chargegewijze nafermentering wordt binnen twee dagen 5 beëindigd en de fermentbouillon bevat, afhankelijk van de start van de halfcontinue fermentering alsmede de aard en de hoeveelheid van de voedingsstoffen, 26-32 mg/l werkzame stof.

De werkwijze volgens de uitvinding heeft de volgende voordelen.

- 10 - De tijd, waarin het inoculum in de zich staande houdende fermentbouillon wordt omgezet, is in verhouding kort.
 - Door het feit, dat minder natuurlijke voedingsstoffen worden gebruikt, schommelt de werkzame stofproductie (van de zich in stand houdende en producerende fermentering) nauwelijks.
- 15 - Door vermindering van het aantal en de hoeveelheid van de voedingsstoffen is de methode economischer.
 - Ofschoon het voedingsmedium minder voedingsstoffen in geringere hoeveelheid bevat, is de per tijdseenheid produceerbare hoeveelheid werkzame stoffen ca. 20-30% groter dan in 20 het geval van de bekende methoden.
 - Door de vermindering van het aantal van de voedingsstoffen en in het bijzonder door het weglaten van natuurlijke voedingsstoffen, is de winning van de werkzame stof uit de fermentbouillon eenvoudiger.

25 De werkwijze volgens de uitvinding wordt aan de hand van de volgende voorbeelden nader beschreven, maar is niet tot deze voorbeelden beperkt.

Voorbeeld I

a) Bereiding van het inoculum.

30 In een laboratoriumglasfermentatieinrichting van 10 l nuttig volume worden 6000 ml tot 30-32°C voorgewarmd leidingwater overgebracht. De volgende, op de juiste wijze voorbereide (zie verder onder) voedingsstoffen werden toegevoegd:

- 35 ml methanol,
- 35 100 ml hydrolysaat uit 50 g maiswater,
- 30 g ammoniumwaterstofcarbonaat,
- 1,0 g magnesiumchloride,
- 0,05 g kobaltchloride,
- 0,03 g 5,6-dimethylbenzimidazool,
- 40 0,30 g natriumwaterstofsulfiet.

8402744

Na toevoeging van de componenten wordt het voedingsmedium grondig gehomogeniseerd en vervolgens met leidingwater van de bovengenoemde temperatuur tot 8000 ml aangevuld. Dan worden aan de voedingsbodem 2000 ml naverrotte afvalwaterslib
5 toegevoegd, die aan de anaerobe naverrotting van de stadsafvalwaterzuiveringsstations vers werd verwijderd. Het mengsel werd geroerd, de glasfermentatieinrichting met behulp van een rubberstop gesloten en dan in een thermostaat van 32-34°C geplaatst.

10 Vervolgens wordt elke dag (na eerst te zijn gehomogeniseerd) een monster van 50 ml volume afgenomen. Dan wordt 35 ml methanol toegevoegd, een verder monster van 200 ml volume wordt genomen en de fermentatie na afsluiten van de fermentatieinrichting voortgezet.

15 Na zeven dagen fermenteren bij constante temperatuur verkrijgt men de fermentbouillon van de eerste generatie.

Bij het monster, dat verkregen is voor de toevoeging van methanol, worden de pH-waarde en de methanolconcentratie van de fermentbouillon bepaald. Het monster, dat getrokken is
20 na de methanoltoevoeging van 200 ml wordt overgebracht in een bij 32-34°C gethermostatiseerde gasometer en de snelheid van de biogasproductie gemeten. Het monster wordt uit de gasometer bij toevoeging van de volgende dosis methanol in de fermentatieinrichting teruggebracht.

25 Op de zevende dag van de fermentatie vindt een schaalvergroting van 1:5 plaats: in een fermentatieinrichting met een nuttig volume van 50 l worden 30 l op 30-32°C voorverwarmd leidingwater overgebracht. Aan het water worden de op dezelfde wijze voorbereide voedingsstoffen toegevoegd:

30 175 ml methanol,
 500 ml gehydrolyseerde oplossing van 250 g maiswater,
 150 g ammoniumwaterstofcarbonaat,
 5 g magnesiumchloride,
 0,25 g kobaltchloride,
35 0,15 g 5,6-dimethylbenzimidazool,
 1,5 g natriumwaterstofsulfiet.

Na toevoeging van de voedingsstoffen wordt het voedingsmedium met leidingwater van de bovengenoemde temperatuur tot 40 l aangevuld. Dan wordt de totale hoeveelheid van de
40 zeven dagen oude fermentatiebouillon (eerste generatie) aan

8402744

het versbereide voedingsmedium toegevoegd. Na intensief homogeniseren wordt de fermentatieinrichting afgesloten, terwijl de anaerobe fermentatie bij 32-34°C nog eens gedurende zeven dagen wordt voortgezet. Ook in deze tijd worden dagelijks
5 50 ml als monster genomen en 175 ml methanol toegevoegd. Na de toevoeging wordt een monster van 200 ml genomen. Van het monster worden de pH-waarde, methanolconcentratie en snelheid van de biogasvorming op de bovenbeschreven wijze bepaald. De na de tweede zeven dagen van de fermentatie verkregen ferment-
10 bouillon is de zogenaamde tweede generatie.

Op de zevende dag van de tweede generatie wordt 10% van de fermentbouillon (5,0 l) verwijderd en door het gelijke volume voedingsbodem van de volgende samenstelling vervangen:

	5000	ml 30-32°C warm leidingwater,
15	175	ml methanol,
	50	ml gehydrolyseerde oplossing van 25 g maiswater,
	15	g ammoniumwaterstofcarbonaat,
	0,25	g kobaltchloride,
	0,15	g 5,6-dimethylbenzimidazool,
20	0,10	g natriumwaterstofsulfiet.

Na grondig homogeniseren wordt de fermentatieinrichting afgesloten. De fermentatie wordt gedurende een dag bij 32-34°C voortgezet.

Op de bovenbeschreven wijze ontstaat het nieuwe, een
25 anaerobe, mesofiele, methaan-producerende gemengde micropopulatie bevattende inoculum. De stammen van de micropopulatie zijn bij het Hongaarse Nationale Bureau voor Gezondheidszorg onder Nos. 00076, 0079 en 00272 gedeponerd. In de genoemde volgorde gaat het om de stammen *Corynebacterium* sp. (aandui-
30 ding 24 A 1); *Propionibacterium* sp. (aanduiding 239 A₁/6); *Methanococcus* sp. (aanduiding MC-017). Voor het inoculum is het karakteristiek, dat de pH-waarde bij 5,4-5,8 ligt en de biogasproductie 0,5-0,8 l biogas/l fermentbouillon per dag bedraagt.

35 Het inoculum is thans geschikt voor het opnieuw aanmaken van de zich in stand houdende fermentbouillon. Aangezien telkens ca. 10 vol.% van de inoculumfermentbouillon wordt verwijderd en opgewerkt, wordt de verwijderde hoeveelheid vervangen door toevoeging van gelijk volume voedings-
40 oplossing. Deze culture kan op deze halfcontinue wijze ge-

8402744

durende lange tijd onveranderd in stand gehouden worden. In de eerste dagen wordt een monster genomen, waarvan het werkzame stofgehalte wordt bepaald volgens het Hongaarse octrooi-schrift No. 167.658; het werkzame stofgehalte bedraagt

5 7,3 mg/l.

De voedingsstoffen worden als volgt bereid. Voor de warmtebehandeling van het maiswater wordt maiswater met een droge stofgehalte van ca. 45 gew.% met de gelijke hoeveelheid leidingwater verdund, tot koken verhit en gedurende 15 min
10 gekookt. Na het afkoelen wordt de oplossing tot zijn oorspronkelijke volume aangevuld. De op deze wijze bereide verse oplossing is het maiswaterhydrolysaat.

Het voor de bereiding van het inoculum bestemde maiswater wordt voor de toepassing op zijn microbiologische ge-
15 schiktheid onderzocht. Daartoe worden in een laboratoriumglasfermentatieinrichting van 10 l nuttig volume 9 l tot 30-32°C voorverwarmd water ingebracht, gevolgd door toevoeging van de volgende voedingsstoffen:

	50	ml methanol,
20	50	g van het te onderzoeken maiswater (ongehydrolyseerd, zonder warmtebehandeling) met 45% droge stofgehalte,
	30	g ammoniumwaterstofcarbonaat,
	1	g magnesiumchloride,
25	0,05	g kobaltchloride,
	0,03	g 5,6-dimethylbenzimidazool,
	0,20	g natriumwaterstofsulfiet.

Na het door elkaar mengen van het voedingsmedium wordt in de producerende fermentatieinrichting 300 ml ferment-
30 bouillon overgebracht, het volume wordt met tot 30-32°C voorverwarmd leidingwater tot 10 l aangevuld. De opening van de fermentatieinrichting wordt afgesloten met een rubberstop, waarna de fermentatieinrichting bij 32-34°C wordt gethermostatiseerd. Dagelijks wordt geroerd, 50 ml methanol toege-
35 voegd, en een monster van 200 ml genomen, waarvan de snelheid van de biogasvorming wordt gemeten. Wanneer op de vierde dag van de fermentatie de biogasvorming tenminste 0,3-0,6 l gas/l fermentbouillon per uur bedraagt, is het maiswater geschikt voor de bereiding van het inoculum na de beschreven
40 warmtebehandeling.

84 0 2 7 4 4

Het 5,6-dimethylbenzimidazool wordt in de voorgeschreven hoeveelheid methanol opgelost en aan het voedingsmedium toegevoegd. De overige voedingsstoffen worden onmiddellijk toegevoegd.

5 b) De halfcontinue zich in stand houdende systeem.

Van de in de fermentatieinrichting met 50 l nuttig volume bereid inoculum wordt dagelijks ca. 10% verwijderd en opgewerkt. Deze hoeveelheid wordt door het gelijke volume van het zichzelf staande houdende medium vervangen, dat op de volgende wijze wordt bereid.

5 l water wordt tot 30-35°C verwarmd, gevolgd door toevoeging van de volgende voedingsstoffen:

300 ml methanol
50 ml gehydrolyseerde oplossing uit 25 g maiswater,
15 17,5 g ammoniumwaterstofcarbonaat,
0,5 g kobaltchloride,
0,03 g 5,6-dimethylbenzimidazool (dat tevoren in 10 ml methanol werd opgelost),
0,15 g natriumwaterstofsulfiet.

20 Na het homogeniseren wordt het voedingsmedium overgebracht in de inoculum bevattende 50 l-fermentatieinrichting, waarna de fermentatieinrichting wordt afgesloten en de fermentatie bij 32-34°C wordt voortgezet. Van de dagelijks verwijderde 5 l wordt een monster getrokken, waarvan de pH-waarde, 25 werkzame stofgehalte en het methanolgehalte worden bepaald.

Op de zesde-achtste dag van de fermentatie met het zich in stand houdende medium bereikt de methanolhyse een snelheid van 0,2 g methanol/l fermentbouillon per uur. Nu voegt men aan het bovengenoemde voedingsmedium 5 g ammoniumsulfaat 30 en 0,2 g o-xylidine toe. Het o-xylidine wordt eerst in 15 ml methanol opgelost.

Vervolgens wordt de dagelijks verwijderde fermentbouillon, de vervanging ervan door het ammoniumsulfaat en o-xylidine bevattende voedingsmedium dagelijks herhaald. Daar- 35 door wordt de inoculumfermentatie geleidelijk in de zichzelf in stand houdende fermentatie omgezet, waarvan het werkzame stofgehalte 17,5 mg/l bedraagt.

c) De chargegewijze producerende fermentatie.

De aan de halfcontinue zich in stand houdende fermentatie 40 tatie onttrokken 5 l fermentbouillon wordt ter wille van de

8402744

verhoging van het werkzame stofgehalte onderworpen aan een nafermentatie. Voor dit doel worden aan de fermentbouillon de volgende voedingsstoffen toegevoegd:

- 45 g methanol,
- 5 3,5 g maiswater (droge stofgehalte 45%),
- 2,5 g ammoniumwaterstofcarbonaat,
- 1,5 g ammoniumsulfaat,
- 0,005 g kobaltchloride,
- 0,01 g 5,6-dimethylbenzimidazool,
- 10 0,01 g o-xylidine.

Het 5,6-dimethylbenzimidazool en het o-xylidine worden tevoren opgelost in 5 ml methanol, zodat de totale hoeveelheid methanol 50 ml bedraagt. Na de toevoeging van de voedingsstoffen wordt de fermentatieinrichting afgesloten en 15 gedurende een dag bij 32-34°C bewaard. De volgende dag worden de volgende voedingsstoffen toegevoegd:

- 20 ml methanol,
 - 2,5 g maiswater (droge stofgehalte 45%),
 - 1,5 g ammoniumwaterstofcarbonaat.
- 20 Na het homogeniseren wordt bij 32-34°C nog eens een dag gefermenteerd. Daarna heeft de fermentbouillon een werkzame stofgehalte van 26 mg/l.

Voorbeeld II

Op de in voorbeeld I beschreven wijze wordt een 25 halfcontinue zichzelf in stand houdende fermentatie uitgevoerd. Het werkzame stofgehalte van de fermentbouillon bedraagt 17,5 mg/l. De cyclische verwijdering van de fermentbouillon en de toevoeging van het voedingsmedium wordt gedurende vier dagen onderbroken. Dit geschiedt als volgt: op 30 een bepaalde dag van de fermentatie wordt slechts 1 l fermentbouillon onttrokken. In de volgende vier dagen worden dagelijks 450 ml methanol en in 250 ml leidingwater van 30-35°C met daarin de volgende opgeloste voedingsstoffen toegevoegd:

- 50 g gehydrolyseerde oplossing van maiswater,
- 35 30 g ammoniumwaterstofcarbonaat,
- 10 g ammoniumsulfaat,
- 0,5 g magnesiumchloride,
- 0,15 g kobaltchloride,
- 0,10 g 5,6-dimethylbenzimidazool,

0,10 g o-xylidine,

0,10 g natriumwaterstofsulfiet.

Gedurende de vier dagen wordt geen fermentbouillon onttrokken. Op de vijfde dag wordt het halfcontinue bedrijf 5 wederom aangevangen, dat wil zeggen dagelijks worden 5 l onttrokken en in plaats daarvan 500 ml methanol alsmede in 5 l water van 30-32°C opgeloste volgende voedingsstoffen toegevoegd:

	50	g	gehydrolyseerde oplossing van maiswater,
10	17,5	g	ammoniumwaterstofcarbonaat,
	5	g	ammoniumsulfaat,
	0,5	g	magnesiumchloride,
	0,05	g	kobaltchloride,
	0,03	g	5,6-dimethylbenzimidazool,
15	0,2	g	o-xylidine,
	0,15	g	natriumwaterstofsulfiet.

In het vervolg worden onttrekking van fermentbouillon en toevoeging van het voedingsmedium op de beschreven wijze dagelijks een keer uitgevoerd. De daarbij verkregen ferment-
20 bouillon heeft een werkzame stofgehalte van 24,6 mg/l.

De uit de zichzelf in stand houdende fermentatie-inrichting dagelijks ontnomen 5 l fermentbouillon worden terverhoging van het werkzame stofgehalte volgens punt c) van voorbeeld I nagefermenteerd. Na 48 uur discontinue fermenta-
25 tie bedraagt het werkzame stofgehalte 32 mg/l.

Voorbeeld III

In dit voorbeeld wordt aangetoond, dat het warmtebehandelde (gehydrolyseerde) maiswater werkzamer is dan ruw maiswater.

30 Er wordt op de in voorbeeld Ib) beschreven wijze gewerkt met dit verschil, dat men bij de 5 l voedingsstoffenoplossing niet de (uit 25 g maiswater bereide) gehydrolyseerde oplossing gebruikt, maar het ruwe maiswater, en wel in een hoeveelheid van 50 g (45%), dat wil zeggen dubbel zo veel. De
35 zich in stand houdende fermentbouillon bevat dan 17,0 mg/l werkzame stof, de volgens voorbeeld Ic) nagefermenteerde charge 25,0 mg/l. Het werkzame stofgehalte is vervolgens praktisch hetzelfde als volgens voorbeeld Ib) en Ic), ofschoon de dubbele hoeveelheid maiswater werd gebruikt.

Voorbeeld IV

- Er wordt op de in voorbeeld Ib) beschreven wijze gewerkt met dit verschil, dat men in de halfcontinue fermentatieinrichting een voedingsstoffenmedium toevoegt niet uit 5 25 g maiswater van 45% droge stofgehalte bereide 50 ml hydrolysaat, maar de gehydrolyseerde oplossing van 75 g maisafval met een droge stofgehalte van 30% in 75 ml water. De warmtebehandeling (hydrolyse) van het maisafval wordt op dezelfde wijze uitgevoerd als die van het maiswater (zie voorbeeld I).
- 10 Bij de nafermentering volgens voorbeeld Ic) wordt in plaats van het daar toegevoegde maiswater 5,25 g (eerste dag) resp. 2,25 g (tweede dag) maisafval toegevoegd. Na twee dagen nafermenteren bedraagt het werkzame stofgehalte van de fermentbouillon 25,2 mg/l.
- 15 Het voorbeeld laat zien, dat het maiswater resp. zijn hydrolysaat ook door warmtebehandeld maisafval kan worden vervangen.

C O N C L U S I E S

1. Werkwijze voor de bereiding van een onder anaerobe, septische omstandigheden het coenzym B₁₂ producerende fermentbouillon onder toepassing van een nieuw, anaeroob, mesofiel, methaan-producerend inoculum van gemengde micropopulatie en
5 onder toepassing van een methanol, precursors en ten delen bekende voedingsstofcomponenten bevattend nieuw voedingsmedium, m e t h e t k e n m e r k, dat men

 a) gedurende 6-8 dagen 5-15 vol.% van de anaerobe, mesofiele, methaan-producerende gemengde micropopulatie bevat-
10 tende inoculumfermentbouillon onttrekt en door het gelijke volume van een maiswater-hydrolysaat en/of maisafval of het hydrolysaat ervan en overige bekende voedingsstofcomponenten in een geringer aantal en hoeveelheid bevattend voedingsmedium toevoegt en de onttrokken fermentbouillon desgewenst opwerkt,

15 b) na het bereiken van een methanolassimilatiesnelheid van tenminste 0,15-0,2 g methanol/l fermentbouillon per uur het verwijderen van de fermentbouillon op dezelfde wijze voortzet, echter ammoniumsulfaat en o-xylidine bevattend medium toevoegt, de fermentering gedurende 6-8 dagen voort-
20 zet en desgewenst de verwijderde fermentbouillon opwerkt,

 c) na het bereiken van een assimilatiesnelheid van 0,2-0,3 g methanol/l fermentbouillon per uur (na beëindiging van de omzetting van de inoculumfermentbouillon in de zich in stand houdende fermentbouillon) het verwijderen van de fer-
25 mentbouillon en de toevoeging van voedingsmedium op de onder b) beschreven wijze voortzet, waarbij men eventueel het verwijderen van de fermentbouillon gedurende enkele dagen onderbreekt, en

 d) aan de verwijderde 5-15 vol.% zichzelf in stand
30 houdende fermentbouillon op de eerste dag de onder b) genoemde voedingsstoffen en desgewenst op de tweede dag alleen methanol, maiswater of maiswaterhydrolysaat en ammoniumcarbonaat toevoegt en na de fermentatie de producerende fermentbouillon opwerkt en

35 e) de stappen c) en d) dagelijks herhaalt.

2. Werkwijze volgens conclusie 1 voor de bereiding van een charge (batch) producerende fermentbouillon, m e t h e t k e n m e r k, dat men

a) na het bereiken van een assimilatiesnelheid van 0,2 g methanol/l fermentbouillon per uur dagelijks 5-25 vol.% van de zich in stand houdende fermentbouillon verwijdt en door het gelijke volume van een maiswaterhydrolysaat en/of 5 maisafvalhydrolysaat en andere bekende voedingsstofcomponenten in een geringer aantal en hoeveelheid bevattend voedingsmedium toevoegt, en desgewenst het verwijderen van de fermentbouillon gedurende enige dagen onderbreekt en de verwijderde fermentbouillon opwerkt,

10 b) aan de verwijderde 5-15 vol.% fermentbouillon op de eerste dag de onder a) genoemde voedingsstoffen en desgewenst op de tweede dag alleen maar methanol toevoegt en de verkregen charge fermentbouillon opwerkt, en

c) de stappen a) en b) dagelijks herhaalt.

15 3. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, met het kenmerk, dat men in de halfcontinue zich in stand houdende fermentatie als voedingsstoffen methanol, de gehydrolyseerde oplossing van maiswater, ammoniumwaterstofcarbonaat, ammoniumsulfaat, magnesiumchloride, en natriumwaterstofsul-
20 fiet, en als precursors kobaltchloride, 5,6-dimethylbenzimidazool en eventueel o-xyldine toepast.

4. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, met het kenmerk, dat men in de producerende discontinue fermentatie als voedingsstoffen methanol, maiswater, ammoniumwater-
25 stofcarbonaat, ammoniumsulfaat en de bekende precursors toepast.

5. Werkwijze volgens een der voorgaande conclusies 1 of 2, met het kenmerk, dat men in plaats van de gehydrolyseerde oplossing van maiswater gehydrolyseerde maisaf-
30 val of gehydrolyseerde maiswateroplossing tezamen met maisafval toepast.

6. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat men in plaats van maiswater of zijn gehydrolyseerde oplossing gehydrolyseerd maisafval toepast.