



**Wirtschaftspatent**

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

**203 745**

Int.Cl.<sup>3</sup>

3(51) C 12 N 1/00

**AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN**

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N/ 2360 274

(22) 21.12.81

(44) 02.11.83

(71) AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR, BERLIN, DD

(72) HAENSEL, REINER, DR. RER. NAT.; HEDLICH, ROLF, DR. RER. NAT.; SCHNEIDER, JOERG, DR. RER. NAT.;  
BRANDT, KARL-HEINZ, DIPL.-ING.; DD;  
LEMKE, MARION, DIPL.-BIOL.; FLEMMING, INGEBORG, DR. RER. NAT.; DD;

(73) siehe (72)

(74) ADW DER DDR INST. F. TECHN. CHEMIE AG PATENTWESEN 7050 LEIPZIG PERMOSERSTR. 15

**(54) VERFAHREN ZUR GEWINNUNG VON BIOMASSE**

(57) Die Erfindung betrifft ein biotechnologisches Verfahren zur Kultivierung von Hefen durch aerobe Fermentation unter ungeschützten Bedingungen. Das Ziel der Erfindung ist die Kultivierung von Hefen auf kohlenhydrathaltigen Substraten und/oder Essigsäure als C-Quelle bei höheren Temperaturen und hohen Produktivitäten. Die erzeugte Biomasse soll einen hohen Rohproteingehalt aufweisen. Das Ziel wird durch die kontinuierliche Kultivierung des Hefestammes *Lodderomyces elongisporus* EH 60 ZIMET 43671 erreicht, wobei als Kultivierungsbedingungen ein Temperaturbereich von 35 bis 43°C, vorzugsweise zwischen 38 und 41°C, ein pH-Bereich von 2,5 bis 4,5, vorzugsweise zwischen 3,5 bis 4,2 und Durchflußraten von 0,2 bis 0,6 h<sup>-1</sup>, vorzugsweise zwischen 0,3 und 0,4 h<sup>-1</sup> zu realisieren sind. Die spezifischen Ertragskoeffizienten betragen 0,48 bis 0,51 g Hefetrockenmasse pro g Saccharose und der Rohproteingehalt bewegt sich zwischen 55 und 57%. Die Erfindung kann in der mikrobiologischen Industrie zur Erzeugung von mikrobiellem Eiweiß genutzt werden.

Titel

Verfahren zur Gewinnung von Biomasse

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein biotechnologisches Verfahren  
5 zur Kultivierung von Hefen durch aerobe Fermentation un-  
ter Verwendung von kohlenhydrathaltigen Substraten und  
Essigsäure als C-Quelle. Die Erfindung wird in das Gebiet  
der mikrobiologischen Eiweiß- und Produktgewinnung einge-  
gliedert und kann in Anlagen zur Futterhefeherstellung ge-  
10 nutzt werden.

Die Erfindung ist in die IPK C 12 N einzuordnen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die industrielle Kultivierung von Hefen auf kohlenhydrat-  
haltigen Substraten zur Gewinnung von Biomasse ist bekannt.  
15 Es werden sowohl Hydrolysate von Pflanzen und Abwässern der  
Zelluloseindustrie als auch Rohrohrzucker als Substrate  
eingesetzt. Als Mikroorganismus wird hauptsächlich die Hefe  
Candida utilis eingesetzt. Als Begleitorganismen treten  
bei der Futterhefezüchtung auf Melasse oder Sulfitablaugen  
20 Candida tropicalis oder Candida mycoderma auf. Wie aus der  
Literatur bekannt ist, hat die Verweilzeit der Mikroorga-  
nismen im stationären Zustand der kontinuierlichen Fermen-  
tation bzw. die Durchflußrate einen entscheidenden Einfluß  
auf die Hefeausbeute und Zusammensetzung der Hefe.

(Die Hefen, Bd. II, Verlag Hans Carl Nürnberg  
G. Sobkowicz, Food Waste 1976, 42 - 57 (C.A. 88/150532)  
G. Frommholz et al. Chem. Techn. 30 (1978) 4, 180 - 185)

In den heute gebräuchlichen technischen Verfahren zur  
5 Futterhefefproduktion wird mit Verweilzeiten von etwa 40 h  
bei der Fermentation von Melasse und 5 h bei der Ferment-  
ation von Sulfitablaugen gearbeitet. Als günstiger pH-  
Wert hinsichtlich Ausbeute und Infektionsanfälligkeit  
wurde für die Melassefermentation ein Wert zwischen 3,8  
10 und 4,2 und für die Sulfitablaugenfermentation ein Wert  
zwischen 4,8 und 5,2 ermittelt. Untersuchungen zur Ab-  
hängigkeit der Ausbeute von der Temperatur ergaben, daß  
die optimale Temperatur der Verhefung im Bereich von 33 bis  
36° C liegt. Bei Temperaturen von über 40° C tritt eine  
15 Schädigung der Hefezellen ein, so daß es zu einer Wachstums-  
hemmung und damit zu einer Ausbeuteminderung kommt. Bei Ein-  
haltung der optimalen Parameter werden bei der Futtereiweiß-  
produktion auf Basis von Melasse Ausbeuten bis 52 % erzielt,  
wobei der Rohproteingehalt der Futterhefe 48 bis 52 % be-  
20 trägt.

#### Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, die Kultivierung von  
Hefen bei höheren Temperaturen und hohen Produktivitäten  
unter gleichzeitiger Gewährleistung der biologischen Stabi-  
25 lität während des Kultivierungsprozesses durchzuführen.  
Die erzeugte Biomasse soll sich durch einen hohen Rohpro-  
teingehalt auszeichnen.

#### Wesen der Erfindung

Es ist die Aufgabe der Erfindung, einen schnellwüchsigen  
30 Hefestamm auszuwählen, der in der Lage ist, hohe Zulauf-  
konzentrationen der Kohlenstoffquelle bei hohen Verdün-  
nungsraten und Temperaturen in eiweißreiche Biomasse um-  
zuwandeln. Die Aufgabe wird gelöst mit einem Hefestamm

der Gattung *Lodderomyces elongisporus*. Dieser Stamm trägt die Bezeichnung EH 60 - ZIMET 43671 und wurde in der Hinterlegungsstelle der IMET-Kulturensammlung im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der Akademie der Wissenschaften der DDR, 6900 Jena, Beuthenbergerstr. 11, hinterlegt.

Dieser Hefestamm ist durch folgende Merkmale charakterisiert:

Er weist im Temperaturbereich über 37° C eine relativ hohe Wachstumsgeschwindigkeit auf und zeigt eine gute Assimilationsfähigkeit für verschiedene Zucker, Alkohole und organische Säuren. Er wächst in kontinuierlicher Kultivierung in Form von mittelgroßen, ovalen Zellen, die leicht separierbar sind. Auf glukosehaltigen Nährböden bildet der Stamm runde ganzrandige, konvexe, leicht gelbliche Kolonien mit halbmatter glatter Oberfläche.

Für die Kultivierung wird ein Nährmedium eingesetzt, daß als C-Quelle niedermolekulare Kohlenhydrate in reiner Form oder als Bestandteile von Abprodukten (Melasse, Schlempe, Maisquellwasser, Sulfitablaugen u.a.), Essigsäure oder deren Gemische (Essigsäure/Saccharose) und mineralische Bestandteile enthält. Die Hefe ist vitamin- oder wachsstoffbedürftig. Auf einen Einsatz von Vitaminen oder Wuchsstoffen kann aber verzichtet werden, wenn im Fermentationsprozeß ein zweiter Wuchsstofflieferant - wie z.B. der Hefestamm *Hansenula fabianii* H 180 ZIMET 43672, der ebenfalls unter der vorgenannten Bezeichnung in der Hinterlegungsstelle der IMET-Kulturensammlung hinterlegt wurde, in Anteilen von 5 bis 50 % vorzugsweise 10 bis 20 % gezüchtet wird.

Bei Kultivierung des Hefestammes EH 60 - ZIMET 43671 auf Melasse, Maisquellwasser oder Schlempe vermag dieser ohne zusätzliche Vitamin oder Wuchsstoffbeigaben zu wachsen. Der Zubereitung der mineralischen Nährsalzlösung werden folgende Bedarfswerte zugrunde gelegt:

100 mg N/ g HTS  
27,8 mg P/ g HTS  
26 mg K/ g HTS  
2,1 mg Mg/ g HTS  
5 0,3 mg Fe/ g HTS  
0,15 mg Mn/ g HTS  
0,15 mg Zn/ g HTS  
0,03 mg CU/ g HTS

Die Kultivierung der Hefe erfolgt in einem Temperaturbereich  
10 von 35 bis 45° C und einem pH-Bereich zwischen 2,5 und 4,5  
unter ungeschützten Bedingungen. Mit dieser Kultur können  
Durchflußraten bis 0,63 h<sup>-1</sup> realisiert werden. Zum Zweck  
einer ausreichenden Sauerstoffversorgung der Kultur wird  
das Fermentationsmedium mit Luft einer Intensität von  
15 100 bis 200 l kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> begast, wobei die Bedingungen für  
den O<sub>2</sub> - Übergang so eingestellt werden, daß ständig die  
Gelöstsauerstoffkonzentration 10 bis 20 % des Maximalwertes  
beträgt.

Die gewonnene Biomasse besitzt einen Rohproteingehalt von  
20 55 bis 57 %.

Die Erfindung wird an vier Beispielen erläutert.

#### Beispiel 1

In einem für aerobe Fermentation geeigneten Reaktor von  
13 l Inhalt werden 4 kg eines Nährmediums folgender Zu-  
25 sammensetzung pro Liter zugeführt:

50 g Saccharose  
1,45 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
1,5 ml 85 %ig H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>  
525 mg MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O  
30 50 mg FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O  
17 mg ZnSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O  
17 mg MnSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O  
3,08 mg CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O

Das Nährmedium wird mit konzentrierter Schwefelsäure auf einen pH-Wert von 2 eingestellt. Nach Zudosierung von Ammoniakwasser bis zum Erreichen eines pH-Wertes von 4,0 und einer Temperierung auf 39° C wird dem Fermentorinhalt das Inoculum eines Hefegemisches von 85 % *Lodderomyces elongisporus* EH 60 ZIMET 43671 und 15 % *Hansenula fabiani* H 180 ZIMET 43672 zur Beimpfung so zugesetzt, daß gleichzeitig das ursprüngliche Nährmedium eine Masse von 5 kg hat. Bei gleichzeitiger Begasung und Durchmischung wird die diskontinuierliche Anzucht der Kultur bis zur Auszehrung der Saccharose fortgeführt. Danach wird mit der kontinuierlichen Fermentation begonnen. Die Saccharosekonzentration des Umlaufes beträgt dabei 40 gl<sup>-1</sup>, die mineralische Nährlösung entspricht der Zuckermenge. Die Kultivierung wird bei einer Verdünnungsrate von 0,35 h<sup>-1</sup>, einem konstanten pH-Wert von 4,0 und einer Temperatur von 39° C vorgenommen. Die pH-Regelung erfolgt mit Ammoniakwasser. Nach Einstellung des stationären Zustandes wird eine Ablaufkonzentration von 19,8 g HTS pro Liter erreicht, das einem spezifischen Saccharoseverbrauch von 2,02 g Saccharo pro Gramm HTS entspricht.

### Beispiel 2

Die diskontinuierliche Anzucht wird bis auf die Temperatur unter den gleichen Bedingungen wie im Beispiel 1 durchgeführt. Die Temperatur beträgt in diesem Fall 42° C. Bei der anschließend durchgeführten kontinuierlichen Fermentation werden folgende Bedingungen gewählt:

pH-Wert: 4,0  
Temperatur: 42° C  
Durchflußrate: 0,33 h<sup>-1</sup>

Die Umlaufkonzentration an Saccharose und mineralischer Nährsalzlösung und die Versuchsdurchführung sind die gleichen wie im Beispiel 1. Es wird im Ablauf eine HTS-Konzentration von 18,5 gl<sup>-1</sup> erreicht, der spezifische Saccharoseverbrauch beträgt 2,16 gl<sup>-1</sup>.

### Beispiel 3

Die Kultivierung wird unter den gleichen Bedingungen, wie im Beispiel 1 angegeben, durchgeführt, jedoch wird als C-Quelle Melasse und zur Beimpfung ein Inoculum der Hefe  
5 *Lodderomyces elongisporus* EH 60 ZIMET 43671 eingesetzt. Nach Einstellung des stationären Zustandes wurde eine Ablaufkonzentration von 19,5 g HTS pro Liter erreicht.

### Beispiel 4

Einem 13 l-Fermentor werden 4 kg Nährmedium mit nachfolgender Zusammensetzung zugeführt:

10 g Essigsäure  
23 g Saccharose  
0,87 g  $K_2SO_4$   
0,9 ml 85 %ig  $H_3PO_4$   
15 315 mg  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$   
30 mg  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$   
10,2 mg  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$   
10,2 mg  $MnSO_4 \cdot 5 H_2O$   
1,85 mg  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$

20 Nach vorheriger Einstellung eines pH-Wertes von 2 mit konzentrierter Schwefelsäure, wird Ammoniak bis zum Erreichen eines pH-Wertes von 4,0 zudosiert und der Fermentorinhalt auf 38° C temperiert. Zur Beimpfung wird das Inoculum eines Hefegemisches von 80 % *Lodderomyces elongisporus* EH 60 ZIMET  
25 43671 und 20 % *Hansenula fabianii* H 180 ZIMET 43672 so zugesetzt, daß das ursprüngliche Nährmedium eine Masse von 5 kg hat. Die diskontinuierliche Anzucht der Kultur wird bei gleichzeitiger Begasung und Durchmischung bis zur Auszehrung der Saccharose und Essigsäure fortgeführt. Anschlies-  
30 send wird mit der kontinuierlichen Fermentation begonnen. Die Konzentration des Essigsäure/Saccharose-Gemisches im Zulauf beträgt  $40 \text{ g l}^{-1}$ , wovon 30 % Essigsäure sind, die mineralische Nährlösung ent-

spricht der Konzentration des Substratgemisches. Die Kultivierung wird bei einer Verdünnungsrate von  $0,34 \text{ h}^{-1}$ , einem konstanten pH-Wert von 4,0 und einer Temperatur von  $38^\circ \text{ C}$  vorgenommen. Die pH-Regelung erfolgt mit Ammoniakwasser. Nach Einstellung des stationären Zustandes wird  
5 eine Ablaufkonzentration von 19,5 g HTS pro Liter erreicht, das einem spezifischen Substratverbrauch von 2,05 g Saccharose/Essigsäure (70/30) pro Gramm HTS entspricht.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Gewinnung von mikrobiellem Eiweiß durch Kultivierung von Hefen auf der Basis von Kohlenhydraten (wie z.B. Saccharose), kohlenhydrathaltigen  
5 Abprodukten (wie Melasse, Sulfitablauge), Essigsäure und deren Gemische als Kohlenstoffquelle in Gegenwart einer mineralischen Nährlösung und Wuchsstoffen (wie z.B. Hefextrakt, Biotin) oder eines zweiten Mikroorganismus als Wuchsstofflieferant, der ein Bakterium  
10 oder eine Hefe sein kann, gekennzeichnet dadurch, daß der Hefestamm *Lodderomyces elongisporus* EH 60 ZIMET 43671 bei einem pH-Wert von 2,5 bis 5,0, vorzugsweise bei pH 3,5 bis 4,2, bei einer Temperatur von 30 bis 45° C, vorzugsweise zwischen 38 und 41° C und bei Durchflußraten von 0,2 bis 0,6 h<sup>-1</sup>, vorzugsweise bei 0,3  
15 bis 0,4 h<sup>-1</sup> kultiviert wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß als wuchsstoffliefernder Mikroorganismus der Hefestamm *Hansenula fabianii* H 180 ZIMET 43672 eingesetzt wird.
- 20 3. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß bei kohlenhydrathaltigen Kohlenstoffquellen, die auch Wuchsstoffe enthalten, keine zusätzlichen Wuchsstoffe eingesetzt werden.