



(12) Wirtschaftspatent

Teilweise bestätigt gemäß § 18 Absatz 1  
Patentgesetz

(19) **DD** (11) **201 147 B1**

4(51) C 12 N 1/26

**AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN**

---

|      |                       |      |          |      |          |
|------|-----------------------|------|----------|------|----------|
| (21) | WP C 12 N / 233 861 2 | (22) | 05.10.81 | (45) | 05.08.87 |
|      |                       |      |          | (44) | 06.07.83 |

---

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD  
(72) Triems, Klaus, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Faulhaber, Engelbert, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Wünsche, Lothar, Dr. sc. Dipl.-Biol.; Iske, Uwe, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Gentzsch, Herbert, Dr. Dipl.-Ing.; Bauch, Joachim, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Lübbert, Gustav-Adolf, Dipl.-Chem., DD

---

(54) **Verfahren zur Gewinnung von eiweißreichen nukleinsäure armen Biomassen**

---

## Patentansprüche:

1. Verfahren zur Gewinnung von eiweißreichen nukleinsäurearmen Biomassen, die durch Züchtung von Hefen auf Kohlenwasserstoffgemischen, insbesondere Erdöldestillaten bzw. -raffinaten mit einem Kohlenwasserstoffkettenlängenbereich  $C_9$  bis  $C_{30}$  erhalten werden, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Verweilzeiten des Kulturmediums im Fermentationsprozeß 3,5 bis 5,0 Stunden, bei einer Fermentationstemperatur von 31 bis 34°C betragen und daß der spezifische Verbrauchswert für Phosphor im Fermentationsprozeß 12 bis 18 g P/kg Hefetrockensubstanz beträgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Verweilzeit des Kulturmediums im Fermentationsprozeß 4 Stunden beträgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Fermentationstemperatur 33°C beträgt.
4. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der spezifische Verbrauchswert für Phosphor im Fermentationsprozeß 15 bis 17 g P/kg Hefetrockensubstanz beträgt.

## Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von eiweißreichen nukleinsäurearmen Biomassen, die durch eine mikrobielle Konvertierung von Kohlenwasserstoffgemischen, insbesondere Erdöldestillaten bzw. -raffinaten mit einem n-Kohlenstoffkettenlängenbereich von  $C_9$  bis  $C_{30}$  mit Hefen gewonnen werden. Sie kann in der mikrobiologischen Industrie angewendet werden und ist in die IPK C 12 N einzuordnen.

## Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Mikrobielle Biomassen, die durch Kultivierung von Mikroorganismen, z. B. auf der Basis von Kohlenwasserstoffgemischen, insbesondere n-alkanhaltigen Erdöldestillaten bzw. -raffinaten des Kohlenstoffkettenlängenbereiches  $C_9$  bis  $C_{30}$  gewonnen werden, werden bekanntlich im Fermentationsprozeß erzeugt. Entsprechende Verfahren sind in DE-OS 1417560, DE-OS 1470484, DE-OS 1470490, DE-OS 1470517 und DD-WP 105825 beschrieben.

In den genannten Verfahren wird die Raum-Zeit-Ausbeute des Fermentationsprozesses von der Wachstumsgeschwindigkeit der eingesetzten Mikroorganismen als Produktionsstämme, dem angewendeten Fermentortyp und den angewendeten Fermentationsbedingungen bestimmt.

Die Qualität der gewonnenen Biomassen wird durch die spezifischen Eigenschaften des Produktionsstammes, sowie durch die Fermentations- und Aufarbeitungsbedingungen zur Gewinnung von Biomassen beeinflusst. Die wesentlichen Qualitätskennziffern mikrobieller Biomasse, der Rohprotein- und Nukleinsäuregehalt, werden durch das Regime des angewendeten Fermentationsprozesses bestimmt. Es ist gleichzeitig bekannt, daß Fermentationen mit Hefen oder Bakterien zu Biomassen führen, die sich signifikant im Rohprotein- und Nukleinsäuregehalt unterscheiden. So ist der Rohproteingehalt bei Bakterien meist größer als bei Hefen, aber zugleich ist der Nukleinsäuregehalt der gewonnenen Biomasse ebenfalls höher. Erhöhte Nukleinsäuregehalte in mikrobiellen Biomassen sind aus ernährungsphysiologischen Gründen unerwünscht. Deshalb sind aus der Literatur zur Gewinnung von mikrobiellen Biomassen und Eiweißkonzentraten eine große Zahl von Verfahren bekannt, die die Entfernung der Nukleinsäuren zum Ziele haben.

Diese Verfahren zur Entfernung bzw. Erniedrigung des Nukleinsäuregehaltes aus Biomassen bedeuten einen zusätzlichen technisch-ökonomischen Aufwand für das Biomassegewinnungsverfahren. (Lovland, J., Horper, J.M. und Frey, A.L. Lebensm.-Wiss. u. -Technologie 9, 131–142 [1976]).

Außer den Verfahren, die einen zusätzlichen technologischen und damit ökonomischen Aufwand zur Entfernung bzw. Erniedrigung des Nukleinsäuregehaltes in Biomassen notwendig machen, gibt es auch ein Verfahren zur Reduzierung des Nukleinsäuregehaltes von Mikroorganismen, nach dem in der Wachstumsphase befindliche Mikroorganismen mit Sauerstoff und einem wäßrigen Nährmedium in Berührung gebracht werden, wobei in letzteren ein Inhibitor enthalten ist. Solche Inhibitoren stellen Antibiotika, Analoge von Aminosäuren, Analoge von Purin- oder Pyrimidinbasen oder Kohlendioxid dar. Eine Senkung der Nukleinsäurekonzentration um maximal 60% des Ausgangswertes ist möglich.

Bei diesem Verfahren resultiert aus der Zugabe eines Hilfsstoffes in den Fermentationsprozeß ein erhöhter technologischer und ökonomischer Aufwand, wobei diese Zugabe auch zu anderen Beeinträchtigungen des Prozeßablaufes führen kann.

## Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist ein Verfahren, das die kostensparende und ohne erhöhten technologischen Aufwand durchzuführende Herstellung einer als Futtermittel geeigneten Biomasse erlaubt.

**Darlegung des Wesens der Erfindung**

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu entwickeln, das die Produktion einer Biomasse mit hohem Rohprotein- und geringem Nukleinsäuregehalt ermöglicht.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß im Fermentationsprozeß eine günstige Verweilzeit des Kulturmediums im Fermentor bei einer gleichfalls günstigen Fermentationstemperatur und einem bestimmten Phosphat-Gehalt im Nährmedium angewendet wird.

Auf der Grundlage der Tatsache, daß die Wachstumsrate bzw. Verweilzeit von Mikroorganismen im Fermentationsprozeß einen entscheidenden Einfluß auf die Höhe des Rohprotein- und Nukleinsäuregehaltes ausübt, wurde bei Hefen und Kohlenwasserstoffgemischen, insbesondere Erdöldestillaten bzw. Raffinaten als Substrat, gefunden, daß für den Erhalt einer hohen Produktivität sowie eines hohen Rohproteingehaltes in der Futterhefe bei gleichzeitig niedrigem Nukleinsäuregehalt in der Größenordnung von 4,0 bis 8,0% Verweilzeiten von 3,5 bis 5 Stunden, vorzugsweise 4 Stunden, bei einer Fermentationstemperatur von 31°C bis 34°C, vorzugsweise 33°C, angewendet werden müssen.

Gleichzeitig wurde festgestellt, daß der Nukleinsäuregehalt von Hefen durch den angebotenen Phosphor im Nährmedium beeinflusst werden kann. So hat sich für den Erhalt niedriger Nukleinsäurewerte in Kombination mit den vorher genannten Maßnahmen ergeben, daß ein Phosphorgehalt in der Futterhefe von 1,1 bis 1,7%, vorzugsweise 1,3 günstig ist. Das entspricht einem spezifischen Verbrauchswert in der Fermentation von 12 bis 18g/kg Hefetrockensubstanz, wobei in wäßrigem Kulturmedium eine Phosphatkonzentration von <20 mg P/l angestrebt werden sollte. Durch die Kombination vorstehend genannter Prozeßbedingungen in der Fermentation wird eine Biomasse erhalten, die einen hohen Proteinwert von ≥ 60% und einen verminderten Nukleinsäurewert von ≤ 8% aufweist und als Futtermittelkomponente geeignet ist.

**Ausführungsbeispiel**

Am nachstehenden Beispiel ist die Erfindung näher erläutert.

**Beispiel 1**

In einem Rührfermentor mit einem Gesamtvolumen von 250m<sup>3</sup> und einem Arbeitsvolumen von 90t werden in einem kontinuierlichen Verfahren Hefen des Stammes *Lodderomyces elongisporus* auf einer Erdöldestillatfraktion vom Siedebereich 240 bis 360°C gezüchtet. Der n-Alkangehalt im eingesetzten Erdöldestillat beträgt 16,3%. Die Fermentationstemperatur ist 33°C, der pH-Wert 4,2. Die spezifische Begasungsintensität beträgt 6400m<sup>3</sup>/h, die Energieaufnahme 260kW. Die Verweilzeit beträgt 4,5 Stunden. Die Nähr- und Spurensalze werden in Form von zwei Nährsalzlösungen in den Fermentationsprozeß eingeführt, eine 15%ige wäßrige Kaliumchloridlösung und eine saure Salzlösung, bestehend aus Magnesiumsulfat, Kupfersulfat, Zinksulfat, Mangansulfat, Eisen-III-Chlorid, Phosphorsäure und Wasser.

Die spezifischen Verbrauchskennziffern lauten:

| Element<br>g E/kg HTS | Spez. Elementbedarf | eingesetzter Rohstoff  |
|-----------------------|---------------------|------------------------|
| P                     | 17,5-18             | Phosphorsäure, 74,5%ig |
| K                     | 20                  | Kaliumchlorid          |
| Mg                    | 0,94                | Magnesiumsulfat        |
| Fe                    | 0,02                | Eisen-III-chlorid      |
| Cu                    | 0,02-0,03           | Kupfersulfat           |
| Mn                    | 0,16                | Mangansulfat           |
| Zn                    | 0,22                | Zinksulfat             |

In das wäßrige Kulturmedium wird zur Intensivierung des Fermentationsprozesses eine Hilfskombination von der Struktur Propylenoxid-ethylenoxidaddukt-/Polyethylen glykol in einer Konzentration von 600mg/l wäßriges Kulturmedium zugegeben. Die Produktivität des Fermentationsprozesses beträgt 3,6kg/HTS/t · h.

Durch Aufrauhmung erfolgt aus dem Vierphasengemisch Erdöldestillat/Biomasse/Prozeßwasser/Luft eine Abscheidung von 60% des Prozeßwassers. Zur Erdöldestillat/Biomasse/Prozeßwasser-Suspension gibt man ca. 0,8g der genannten Hilfsstoffkombination zu und erhitzt die Suspension auf 80 bis 85°C. Mittels zweier Industrie-Separatoren wird das entparaffinierte Erdöldestillat weitgehendst und weiteres Prozeßwasser abgetrennt.

Die aufkonzentrierte Biomasse wird durch Vakuum eindampfung weiter angereichert und anschließend in einem Sprühtrocknungsprozeß getrocknet. Die Prozeßwässer aus der Aufrauhmung und ca. 40% der in der Separation abgetrennten wäßrigen Phase werden in den Fermentationsprozeß zurückgeführt.

Durch eine extraktive Reinigung der Trockenbiomasse in einer kontinuierlichen Drehscheibenextraktionsanlage bei 40°C mit einem Extraktionsmittelgemisch Benzin-Äthanol-Wasser (80-19-1 Vol.-%) werden die restlichen Kohlenwasserstoffe und der Hauptteil der Lipide aus der Biomasse entfernt. Das Extraktionsmittel wird anschließend aus der extrahierten Biomasse durch eine zweistufige thermische Trocknung entfernt. Das erhaltene Endprodukt zeichnet sich durch einen hohen Rohproteingehalt, einen verminderten Nukleinsäuregehalt und eine hohe Rohproteinverdaulichkeit aus.

Kennwerte der Biomasse, bezogen aus Trockenprodukt:

|           |                     |                     |        |
|-----------|---------------------|---------------------|--------|
| Aussehen: | beige bis hellbraun | Rohproteingehalt:   | 62,3 % |
| Besatz:   | ohne                | Lysingehalt:        | 7,6 %  |
| Gefüge:   | nicht klumpig       | Methioningehalt:    | 1,4 %  |
| Geruch:   | arteigen            | Nukleinsäuregehalt: | 7,1 %  |
|           |                     | Phosphorgehalt:     | 1,2 %  |

### Beispiel 2

Im Vergleich zu Beispiel 1 wird ein weiterer Versuch unter den geschilderten Arbeitsbedingungen durchgeführt. Zum Unterschied beträgt die Verweilzeit des Kulturmediums im Fermentor 3,3h, die Fermentationstemperatur 28°C und der spezifische Phosphorverbrauchswert 21,0g/kg Hefetrockensubstanz.

Die Produktivität des Fermentationsprozesses beträgt 2,9kg HTS/t · h.

Die unter den genannten Prozeßbedingungen erhaltene extrahierte Biomasse weist folgende Kennwerte auf:

Kennwerte der Biomasse, bezogen auf Trockenprodukt:

|           |                     |                     |        |
|-----------|---------------------|---------------------|--------|
| Aussehen: | beige bis hellbraun | Rohproteingehalt:   | 60,8 % |
| Besatz:   | ohne                | Lysingehalt:        | 6,5 %  |
| Gefüge:   | nicht klumpig       | Methioningehalt:    | 1,3 %  |
| Geruch:   | arteigen            | Nukleinsäuregehalt: | 8,4 %  |
|           |                     | Phosphorgehalt:     | 1,8 %  |

### Beispiel 3

In einem Rührfermentor von 30l wird der Hefestamm *Yarrowia lipolytica* bei einem pH-Wert von 4,1 und bei einer Temperatur von 33°C gezüchtet. Als Substrat dient ein Erdöldestillat im Siedebereich 240–360°C mit einem n-Alkanspektrum zwischen C<sub>9</sub> bis C<sub>25</sub>.

Der Versuch wird mit einer Verweilzeit von 4,3h durchgeführt. Die Erdöldestillatmenge beträgt 16% mit einem n-Alkangehalt von 15,1%. Das wäßrige anorganische Nährmedium enthält Ammoniak und in Form von Phosphaten, Chloriden und Sulfaten Nähr- und Spurensalze. Die spezifischen Verbrauchskennziffern lauten:

| Element | spez. Elementbedarf<br>g/kg HTS |
|---------|---------------------------------|
| P       | 16,8                            |
| K       | 21,0                            |
| Mg      | 1,1                             |
| Fe      | 0,03                            |
| Cu      | 0,02                            |
| Mn      | 0,18                            |
| Zn      | 0,25                            |

Der Prozeß wird zur Intensivierung des Stoffüberganges bei Anwesenheit eines Hilfsstoffes von der Struktur eines Propylenoxid-Ethylenoxidadduktes in einer Konzentration von 250mg/l wäßrigen Kulturmediums durchgeführt.

Der Prozeß verlief in stationären Zustand bei einer Produktivität von 3,2kg HTS/t · h und einer Ausnutzung der im Erdöldestillat vorhandenen n-Alkane von 55%. Die erhaltene Biomassesuspension wurde durch einen Aufrahmungs- und anschließenden Separationsprozeß aufbereitet und durch einen Sprühtrocknungsprozeß getrocknet. Durch eine extraktive Reinigung der Trockenbiomasse im Laboratorium bei 40°C mit einem Extraktionsmittelgemisch Benzin-Methanol-Wasser (80-19-1 Vol.-%) wurden die restlichen Kohlenwasserstoffe und der Hauptteil der Lipide aus der Biomasse entfernt. Die erhaltene extrahierte Biomasse ist durch folgende Kennwerte charakterisiert (Angaben, bezogen auf Trockenprodukt).

|           |           |                     |        |
|-----------|-----------|---------------------|--------|
| Aussehen: | bräunlich | Rohproteingehalt:   | 63,1 % |
| Gefüge:   | pulvrig   | Lysingehalt:        | 6,9 %  |
| Geruch:   | arteigen  | Methioningehalt:    | 1,5 %  |
|           |           | Nukleinsäuregehalt: | 7,4 %  |
|           |           | Phosphorgehalt:     | 1,4 %  |

### Beispiel 4

Im Vergleich zu Beispiel 3 wird ein weiterer Versuch unter den angegebenen Arbeitsbedingungen bei Einsatz des Hefestammes *Pichia quilliermondii* durchgeführt. Zum Unterschied beträgt die Verweilzeit des Kulturmediums im Fermentor 4,6h, die Fermentationstemperatur 33,3°C und der spezifische Phosphorverbrauchswert 17,5g/kg Hefetrockensubstanz. Die Produktivität des Fermentationsprozesses beträgt 3,0kg HTS/t · h.

Die Kennwerte der erhaltenen Biomasse, bezogen auf Trockenprodukt, lauten:

|           |           |                     |        |
|-----------|-----------|---------------------|--------|
| Aussehen: | bräunlich | Rohproteingehalt:   | 63,7 % |
| Gefüge:   | pulvrig   | Lysingehalt:        | 7,1 %  |
| Geruch:   | arteigen  | Methioningehalt:    | 1,3 %  |
|           |           | Nukleinsäuregehalt: | 7,1 %  |
|           |           | Phosphorgehalt:     | 1,2 %  |