



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

215 332

Int.Cl.³ 3(51) C 12 N 1/02

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N/ 2506 934

(22) 06.05.83

(44) 07.11.84

(71) PAEDAGOGISCHE HOCHSCHULE "WOLFGANG RATKE" KOETHEN;DD;

(72) BOEHM, HEINZ, PROF. DR. SC. NAT.;BUERGER, STEFFEN, DIPL.-PAED.;BENKWITZ, FRANK, DIPL.-PAED.;DD;

(54) VERFAHREN ZUR QUANTITATIVEN ODER PARTIELLEN SEDIMENTATION VON MIKROORGANISMEN

(57) Die Erfindung „Verfahren zur quantitativen oder partiellen Sedimentation von Mikroorganismen“ bezieht sich auf die Biomasseproduktion schwer aus ihren Medien abtrennbarer Mikroorganismen der verschiedensten Anwendungsgebiete und ist damit ein Verfahren der Biotechnologie. Sie verfolgt das Ziel, für diese Mikroorganismen ein in jeder Dimension praktikables Sedimentationsverfahren zu empfehlen, das bei geringem Aufwand die quantitative oder aber partielle Abtrennung der Organismen von ihrem Medium erlaubt, ohne ihren organismischen Charakter einerseits und den Charakter des Mediums andererseits entscheidend zu verändern. Die Erfindung basiert auf der Applikation von Kalziumionen bei pH-Werten über 6 bei solchen Organismensuspensionen, wobei die Organismen rasch aggregieren und als Organismenflocken dann sedimentieren. In Abhängigkeit von der eingebrachten Menge an Kalziumionen läßt sich die Sedimentation quantitativ oder partiell realisieren.

zudem noch als besonders produktiv erwiesen haben, so führen die genannten Verfahren in der Regel zu unbefriedigenden Ergebnissen bzw. versagen ganz.

So lassen sich für coccale Grünalgen und für mittlere und kleinste Bakterien keine Durchlaufzentrifugen mehr verwenden. Diskontinuierliches Zentrifugieren ist zwar möglich, erfordert aber höchste Umdrehungsgeschwindigkeiten und beschränkt sich dann auf kleine Suspensionsmengen. Daraus ergibt sich ein rapider Kostenanstieg bei wachsender Störanfälligkeit der hochbelasteten technischen Systeme.

Normale Filter vermögen Partikelchen mit Durchmessern unter $15 \mu\text{m}$ nicht mehr zurückzuhalten. Spezialfilter, wie z. B. Membranfilter, eignen sich dazu, sind jedoch entsprechend teuer, anspruchsvoll in der Handhabung und auf kleine Suspensionsmengen beschränkt. Die Flockung mit Aluminiumsalzen sedimentiert kleinste Partikelchen nicht mehr quantitativ. Zudem ist die so ausgeflockte Biomasse mit einem hohen Salzanteil belastet. Er läßt sich zwar durch Säurebehandlung des Sediments herauslösen, was jedoch zusätzliche Arbeitsgänge und einschneidende Veränderungen des biologischen Materials zur Folge hat. Die Flotation gestattet zwar das Aufschäumen kleinster Partikelchen, arbeitet aber ebenfalls nicht quantitativ und bringt das biologische Material verfahrensbedingt mit hydrophoben Chemikalien und Detergentien für die Schaumbildung in Kontakt. Durch die in den Patentschriften DD 129 622, DD 145 279 und DE-OS 2 063939 vorgeschlagenen Verfahren lassen sich suspendierte Teilchen zwar sedimentieren, jedoch stets bei Einsatz von 2 oder mehreren Substanzen und einer dazu erforderlichen pH-Regulierung durch weitere Agenzien. Offensichtlich ist also, daß für die Separation kleinster Organismen mit Zelldurchmessern unter $15 \mu\text{m}$ und mit einem spezifischen Gewicht, das dem des Wassers ähnlich ist, quanti-

tativ arbeitende Verfahren zu ihrer Abtrennung vom umgebenden Medium, die nur eine Wirkkomponente besitzen, nicht verfügbar sind.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung verfolgt das Ziel, für solche Mikroorganismen, die sich mit herkömmlichen Verfahren nur unter hohen Aufwendungen oder bei Beeinträchtigung ihrer Biomasse vom umgebenden Medium abtrennen lassen, eine Verfahrensweise zu empfehlen, die bei geringstem Aufwand eine quantitative Sedimentation des biologischen Materials ermöglicht, das Material bis hin zu seiner organismischen Natur nicht belastet, verfälscht oder verändert und das von den Mikroorganismen zu trennende Medium nur unwesentlich und deshalb leicht korrigierbar beeinflusst.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren vorzustellen, das bei Einsatz einer geringen Chemikaliendosis einer einzigen Substanz unter definierten Bedingungen eine quantitative oder partielle Sedimentation ansonsten schwer abtrennbarer Mikroorganismen bewirkt, ohne deren biologische Aktivität einschneidend zu beeinträchtigen, ihre organismische Natur zu verändern, ihre stoffliche Zusammensetzung zu verfälschen und das im Überstand des Sediments verbleibende Medium irreversibel zu belasten. Diese Aufgabe wird dadurch gelöst, daß in wässrige Organismensuspensionen Kalziumionen eingebracht werden, deren Anteil maximal 5% der zu fällenden Biomasse beträgt.

Bei pH-Werten über pH 6, Normaldruck, Unterdruck oder Überdruck und Temperaturen der behandelten Suspension zwischen 5 ° und 50 °C aggregieren die Zellen der Mikroorganismen-Suspension unter dem Einfluß der Kalziumionen in großer Zahl, so daß flockige Gebilde entstehen, die rasch zu Boden sinken und schließlich ein vom Medium scharf abgegrenztes Sediment bilden, das ausschließlich aus den aggregierten Organismen besteht, also keinen vom Fällungsmittel herührenden kristallinen Substanzanteil enthält. Turbulenz verkleinert die entstandenen Organismenflocken zunächst, ohne sie jedoch aufzulösen. Wird die Turbulenz unterbunden, formieren sich die Flocken erneut zu großen Einheiten, deren Durchmesser mehrere Millimeter erreichen kann. Diese Flocken lassen sich sofort, aber auch nach Stunden oder sogar Tagen als Organismenschlamm abziehen oder vom überstehenden Medium über Filter geringen Anspruchs, mittels feinmaschiger Siebe oder durch langsames Zentrifugieren kontinuierlich oder diskontinuierlich abtrennen und bis zu pastöser Konsistenz konzentrieren. Der Überstand ist nach Regeneration der im Kultivationsprozeß verbrauchten Nährstoffe und nach damit verbundener Korrektur des pH-Wertes erneut als Nährmedium für eine weitere Organismengeneration verwendbar.

Ausführungsbeispiele

1. Ausführungsbeispiel

Ein Unterwasser-Lichtfermentor wird zur autotrophen Kultivierung entwicklungssynchronen Zellmaterials der Species *Chlorella vulgaris*, Stamm BÖHM/BORNS, 1972/1 verwendet. Nach 8 Stunden Lichtzeit und 4 Stunden Dunkelzeit enthält er 1000 l einer vollsynchronen Autosporensuspension mit einem Trockenmassegehalt von 1 g/l und einer Autosporen-

zahl von 10^8 Zellen pro cm^3 . Der pH-Wert des anorganisch zusammengesetzten Nährmediums beträgt 6,9, die Kultivations-temperatur 37°C . Es wird unter Normaldruck gearbeitet und mit Luft begast, die 2% CO_2 enthält. Um eine quantitative Sedimentation des Zellmaterials zu erreichen, wird der Fermentor mit 50 g Kalziumionen beschickt und weiterhin belüftet. Nach 10 Minuten wird die Belüftung unterbrochen, die Sedimentation der zu Flocken aggregierten Autosporen beginnt. 20 Minuten danach bilden die ausgeflockten Zellen eine vom Medium scharf abgegrenzte Schicht im Basisteil des Fermentors, die sich als Organismenschlamm gut vom Nährmedium abtrennen läßt. Das Nährmedium bleibt im Fermentor, wird regeneriert und mit HNO_3 , die gleichzeitig als N-Quelle dient, auf einen Start-pH-Wert von 5,4 gebracht. Der Organismenschlamm kann durch Filtern über technischem Filterpapier für grobe Niederschläge, z. B. mit Papier der Sorte 6 MN des VEB Spezialpapierfabrik Niederschlag, DDR, oder Sorte 1406 der Firma "Schleicher und Schüll, BRD, bzw. durch Zentrifugation bei niedriger Geschwindigkeit weiter konzentriert werden, oder aber direkt durch Mischung mit kohlenhydrathaltigen Mehlen und nachfolgendem Extrudieren für Fütterungsexperimente verwendet werden. Teile des Organismenschlammes lassen sich durch Ansäuern auf einen unter 5,8 liegenden pH-Wert völlig entfloccen, so daß sie erneut für Kultivationszwecke als Inokulum einsetzbar sind.

2. Ausführungsbeispiel

Zellmaterial der Species *Chlorella fusca*, Varietät *vacuolata*, wird im Unterwasser-Lichtfermentor wie im 1. Ausführungsbeispiel synchron kultiviert, wobei jedoch die Kultivations-temperatur nur 33°C beträgt. Um während der Dunkelzeit Atmungsverluste zu vermeiden, werden am Ende der Lichtzeit die reifen Mutterzellen, die 2 g Trockenmasse pro Liter

Zellsuspension erbringen, mittels Kalziumionen zur Flockung gebracht und sedimentiert. Bei einem Fermentorvolumen von 1 m^3 sind dafür 100 g Ca-Ionen erforderlich. Da die Kultur einen pH-Wert von 5,7 aufweist, wird mit CaCl_2 gearbeitet und mittels konzentrierter NaOH der für die Flockung erforderliche pH-Wert von 7,0 eingestellt. Das geflockte und sedimentierte Zellmaterial wird wie im 1. Ausführungsbeispiel entweder konzentriert weiterverarbeitet oder aber als Organismenschlamm unmittelbar verwendet. Damit die Regeneration der Kultur gesichert ist, wird ein entsprechender Anteil des Organismenschlammes unverändert in den Fermentor zurückgeführt und dort nach Einstellen des pH-Wertes auf 6,0 mittels HNO_3 im Dunkeln wie üblich zur Sporulation gebracht, so daß am Ende der Kultivationszeit eine intakte Autosporensuspension vorliegt, mit der ein neuer Kultivationszyklus initiiert werden kann.

3. Ausführungsbeispiel

In einem Sonnenlicht-Kunstlichtfermentor wird die Species *Scenedesmus quadricauda* kontinuierlich kultiviert, wobei die optische Dichte der Zellsuspension als Leitparameter für eine dem Trockenmassezuwachs adäquate Verdünnung dient. Die quasikontinuierliche Ernte der Organismensuspension erfolgt im Rhythmus der Verdünnungsschritte und entspricht nach dem Überlaufprinzip der Menge der zur Verdünnung zugeführten Nährlösung. Da die Zellsuspension des kontinuierlich anfallenden Erntegutes einen pH-Wert von 5,7 hat, erfolgt die Flockung des Zellmaterials durch automatische Zuführung von gesättigter Kalziumlauge, die bei 20°C 1,7 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pro Liter enthält und den pH-Wert der Zellsuspension bei 10%igem Anteil in den basischen Bereich verschiebt, so daß die Flockung des Zellmaterials sich augenblicklich vollzieht. Das

geflockte Erntegut kann wie in den Ausführungsbeispielen 1 und 2 weiter konzentriert oder aber als Organismenschlamm unmittelbar verwendet werden.

4. Ausführungsbeispiel

In einem diskontinuierlich arbeitenden Fermentor werden bei optimaler Sauerstoffzufuhr mittels eingestrahelter Luft Hefezellen der Species *Saccharomyces cerevisia* bei 30 °C und einem pH-Wert von 3,8 kultiviert. Als Kohlenstoffquelle dient Zuckerrübenmelasse. Nach entsprechender Kultivationszeit liefern die Organismen 10 g Trockenmasse pro Liter Zellsuspension. Durch Zuführen von 0,5 g Ca-Ionen pro Liter Zellsuspension und Modifizieren des pH-Wertes zum Neutralbereich über die verwendete Kalziumverbindung selbst oder Zusatzbehandlung mit NaOH bzw. KOH erfolgt unmittelbar die Flockung der Hefezellen und ihre rasche Sedimentation, wenn die Belüftung eingestellt ist. Die Abtrennung des Zellmaterials als Organismenschlamm und seine Weiterverarbeitung kann ähnlich erfolgen wie in den vorher skizzierten Ausführungsbeispielen.

5. Ausführungsbeispiel

Eine bei 34 °C und einem pH-Wert von 3,0 mit Glukose als Kohlenstoffquelle betriebene Bakterienkultur der Gattung *Micrococcus* wird im Dunkeln energisch belüftet, so daß nach 16 Stunden sich die Zellzahl auf $5 \cdot 10^9$ Zellen pro cm^3 erhöht hat und der Gehalt an Trockenmasse 3,4 g pro Liter beträgt. Da *Micrococcus*-Arten sehr kleinzellig sind und meist nur Zelldurchmesser um oder unter 1 μm erreichen, lassen sie sich schlecht zentrifugieren und nur mit Membranfiltern vom Medium trennen. Deshalb wird die Zellsuspension zum

Erntetermin mit 100 ml Kalziumlauge pro Liter versetzt. Dadurch erreicht die Suspension pH-Werte um 7, und die Bakterienzellen aggregieren zu Flocken, so daß sie mit geringen Drehzahlen quantitativ abzentrifugiert oder aber über weiche oder mittlere Papierfilter vom Medium abgetrennt werden können. Ihre Verwendung als Organismenschlamm ist ebenfalls möglich.

Erfindungsansprüche

1. Verfahren zur quantitativen Sedimentation von Mikroorganismen, gekennzeichnet dadurch, daß in wässrigen Medien suspendierte Mikroorganismen durch die Zugabe von Kalziumionen und einem pH-Wert über 6,0 zur Aggregation veranlaßt werden und auf diese Weise Flocken bilden, die dann sedimentieren, so daß man die Organismen vom umgebenden Medium entweder unmittelbar als Organismenschlamm oder durch Anwendung solcher Trennverfahren, die ohne dieser Vorbehandlung versagen, quantitativ abzondern vermag, ohne ihre organismische Natur einerseits und den Charakter ihres Mediums andererseits entscheidend zu verändern.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Kalziumionen durch Einsatz jeder beliebigen Kalziumverbindung in gelöster, suspendierter oder fester Form verfügbar gemacht werden.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, gekennzeichnet dadurch, daß durch Zuführung eines Bruchteils der zur quantitativen Sedimentierung von Mikroorganismen erforderlichen Kalziumionen eine partielle Sedimentation realisiert wird.
4. Verfahren nach Punkt 1, 2 und 3, gekennzeichnet dadurch, daß man den zur Sedimentation erforderlichen pH-Wert entweder durch geeignete Kalziumverbindungen allein oder durch ihre Kombination mit basisch reagierenden flüssigen, gasförmigen oder festen Substanzen realisiert.
5. Verfahren nach Punkt 1, 2, 3 und 4, gekennzeichnet dadurch, daß man durch entsprechende pH-Variation die von Kalziumionen bewirkte Sedimentation von Mikroorganismen einmal oder wiederholt aufhebt oder praktiziert.