



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **266 116 A1**

4(51) **C 12 P 7/52**

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 P / 306 943 0	(22)	14.09.87	(44)	22.03.89
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72)	Schmidt, Joachim, Dr. rer. nat.; Hühn, Hans-Jürgen; Schurig, Karl-Heinz, DD

(54) Verfahren zur Gewinnung von Poly- β -Hydroxybuttersäure

(55) Poly- β -Hydroxybuttersäure, Bakterienbiomasse, Mikrobiologie, Extraktion, Methanol, Fermentation

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Poly- β -Hydroxybuttersäure durch Konvertierung einer methanolhaltigen Miscella, die bei der Vorextraktion der Biomasse als Abprodukt anfällt. Die Erfindung kann in der mikrobiologischen Industrie angewendet werden. Der Einsatz der Miscella der Vorextraktion der PHB-haltigen Biomasse als Substrat zur Fermentation bewirkt eine Erhöhung der Biomasseausbeute und eine Erhöhung des PHB-Gehaltes der Biomasse. Außerdem entfällt dadurch die Notwendigkeit der Aufarbeitung der Miscella der Vorextraktion zu Frischlösungsmitteln.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Gewinnung von Poly- β -hydroxybuttersäure durch Kultivierung von Bakterienbiomasse, Vorextraktion mit einem utilisierbaren Lösungsmittel und extraktiver Entfernung der PHB aus der Biomasse, **gekennzeichnet durch** die Verwendung des miszellahaltigen Lösungsmittels der Vorextraktion als Substrat des Fermentationsprozesses der Biomasse.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die im Lösungsmittel enthaltene Miszella 3–20 Ma.-% Lipide und Farbstoffanteile aus der Biomasse enthält.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet durch** einen Mindestanteil des miszellahaltigen Lösungsmittels von 40 % am Gesamtsubstrateinsatz für den Fermentationsprozeß.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Poly- β -hydroxybuttersäure durch extraktive Entfernung dieses Zellinhaltsstoffes aus Bakterienbiomasse und kann in der mikrobiologischen Industrie angewendet werden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Von verschiedenen Bakterienstämmen wird polymere β -Hydroxybuttersäure als Speicher- und Reservestoff gebildet. Zur Gewinnung dieser PHB werden die entsprechenden Bakterien gewöhnlich in einem wäßrigen Medium, welches Kohlehydrate oder Methanol (EP 15669) als Kohlenstoff- und Energiequelle enthält, kultiviert. Anschließend wird mit einem geeigneten Extraktionsmittel aus der feuchten oder getrockneten Biomasse PHB extrahiert. Neben der gewünschten PHB werden von den PHB-Bildnern unter diesen Fermentationsbedingungen jedoch auch Farbstoffe und Lipide gebildet, die bei der Extraktion der PHB nicht vollständig entfernt werden können und somit das Produkt verunreinigen. Nach EP 15123, EP 58480 und EP 124309 sind Verfahren bekannt, die deshalb eine Vorextraktion der Biomasse mit einem Lösungsmittel, in dem diese Verunreinigungen löslich sind, PHB jedoch unlöslich ist, wie z. B. Methanol oder Aceton vorschlagen. Nach diesen Verfahren wird das zur Vorextraktion benutzte Lösungsmittel entweder verworfen oder destillativ von den Verunreinigungen befreit und erneut zur Extraktion eingesetzt. Wesentliche Nachteile dieser Verfahren sind die damit verbundenen großen Lösungsmittelverluste bzw. hohen Aufwendungen für deren Rückgewinnung.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist eine Vermeidung von Lösungsmittelverlusten und Aufwendungen zur Lösungsmittelrückgewinnung für die Vorextraktion PHB-haltiger Biomasse.

Wesen der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, das anfallende miszellahaltige Lösungsmittel der Vorextraktion ohne weitere Maßnahmen zur Abtrennung von Verunreinigungen im Prozeß wieder einzusetzen. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß die nach dem bekannten Verfahren der Vorextraktion der Biomasse mit Methanol gewonnene Miscella, die mit 5–12 Ma.-% Lipiden bzw. Farbstoffpigmenten beladen ist, in Mengen zwischen 40 Ma.-% und 100 Ma.-%, als Substrat für die fermentative Biomassegewinnung und Produktbildung verwendet wird. Überraschenderweise wurde dabei gefunden, daß die vom Feststoff, der der weiteren PHB-Extraktion zugeführt wird, befreite Miscella trotz ihrer Beladung mit Lipidextrakt und Farbstoffpigmenten bei ihrer Verwendung als Substrat zur weiteren fermentativen Biomassegewinnung zu einer höheren Produktivität, d. h. zu einer größeren Biomasseausbeute als bei der Verwendung reinen Methanols als Substrat unter gleichen Bedingungen führt. Außerdem wurde dabei ein nicht erwarteter Anstieg des PHB-Gehaltes in der Biomasse gefunden. Das erfindungsgemäße Verfahren besitzt gegenüber den bekannten technischen Lösungen den Vorteil der Realisierung einer höheren Biomasseproduktivität gekoppelt mit einem höheren PHB-Gehalt dieser Biomasse ohne zusätzliche Aufarbeitungsschritte, wodurch sich die Gesamtkonomie des Verfahrens deutlich verbessert.

Beispiel 1

In einem Rührfermentor mit einem Arbeitsvolumen von 100 l werden 6 kg vorgezuchtetes Impfmateriel der Kultur *Methylobacter spec.* mit einer Konzentration von 10–15 g BTS/kg eingesetzt. In den Reaktor wird eine mineralische Nährlösung für 8 g BTS/kg und eine Methanolkonzentration von 5 g/kg vorgegeben.

Die Temperatur wird auf 32°C, der pH-Wert auf 6,5 eingestellt. Die Fermentation erfolgt unter aeroben Bedingungen. Nachdem die Biomasse auf 5–8 g BTS/kg angewachsen, bzw. das Methanol verbraucht ist, wird im Feed-Batch-Verfahren weitere mineralische Nährlösung und Methanol zugeführt.

Nach Erreichung einer BTS-Konzentration von 40–60 g BTS/kg wird die Zugabe von mineralischer Nährlösung gestoppt, um eine Limitation des Stickstoffes im Medium zu erreichen. Die sich anschließende Produktbildung erfolgt unter Zuführung von Miscella, bei einer Restkonzentration der Miscella von 1–2 g/kg, bei einer PHB-Konzentration von 65–70% in der BTS erreicht ist.

Ohne den Einsatz der Miscella in der Produktbildungsphase wurden nur PHB-Konzentration von 40–55% erreicht.

Die Substratverbrauchskennziffer, α_x^s , wurde durch den Einsatz von Miscella in der Produktbildungsphase von α_x^s 3–4 kg/kg auf α_x^s 3–3,4 kg/kg verbessert.

Beispiel 2

Unter den gleichen Bedingungen wie im Beispiel 1, aber bei gleichzeitigem Einsatz von 80% Miscella und 20% Methanol in der Biomassewachstumsphase, wurde die Substratverbrauchskennziffer auf α_x^s 2,6–3,0 kg/kg gesenkt.