



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **262 872 A1**

4(51) C 12 N 1/16
C 12 N 1/20
C 12 P 21/60

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 305 756 4 (22) 06.08.87 (44) 14.12.88

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto Muehsche-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72) Babel, Wolfgang, Prof. Dr. sc. nat.; Müller, Roland, Dr. rer. nat., DD

(54) **Verfahren zur Synthese proteinreicher mikrobieller Biomasse**

(55) Bakterien, Hefen, Heterotrophe Substrate, Chemostatische Kultivierung, Kohlenstofflimitation, Mischungsverhältnis, Substrate, Kombination, Energetische Optimierung, Biomasseausbeute, Proteingehalt

(57) Das Verfahren betrifft die Herstellung von eiweißreicher mikrobieller Biomasse, indem heterotrophe Substrate einzeln oder im Gemisch durch Zugabe einer energie- bzw. reduktionsäquivalente liefernden Verbindung energetisch optimiert werden, so daß Wachstum und Vermehrung durch das Kohlenstoffaufkommen limitiert und nicht durch die zur Verfügung gestellte Energie limitiert werden. Bei Bakterien kann der Reinproteingehalt bei Verwendung von Acetat als Kohlenstoffquelle in der Kombination mit Glucose als Energielieferant auf etwa 60 % gesteigert werden und bei Hefen beim Wachstum auf einer Mischung von Hexadecan bzw. Ethanol plus Formiat sowie Hexadecan plus Isopropanol auf etwa 44 % bzw. sogar etwa 55 %.

Erfindungsansprüche:

1. Verfahren zur Synthese proteinreicher mikrobieller Biomasse durch aerobe chemostatische Kultivierung von Bakterien und Hefen auf heterotrophen Substraten, gelöst in mineralischen Nährmedien, **gekennzeichnet dadurch**, daß einem heterotrophen Substrat oder Substratgemischen, bestehend aus Substraten mit gleichen physiologischen Funktionen, ein energie- bzw. reduktionsäquivalente lieferndes Substrat zugeführt wird, so daß die Vermehrung durch das Kohlenstoffangebot und nicht wie bei heterotrophen Substraten (oder Substratgemischen) üblich durch die zur Verfügung gestellte Energie limitiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß Substrate so kombiniert und in einem Mischungsverhältnis zur simultanen Verwertung angeboten werden, daß der Biomassertrag für die gegebene Kombination und den benutzten Stamm quantitativ und qualitativ maximal ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Energiespender bevorzugt Verbindungen verwendet werden, die aus dem Prozeß der Energiespendung hochveredelt hervorgehen und in dieser Form gewonnen werden können.

Anwendungsgebiet

Die Erfindung betrifft ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung eiweißreicher Biomasse durch aerobe kontinuierliche Vermehrung von Bakterien und Hefen auf Gemischen von kohlenstoffheterotrophen Substraten. Die mikrobielle Biomasse kann als Tierfutter, als Quelle von Eiweiß für die menschliche Ernährung oder von Enzymen für analytische Zwecke genutzt werden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Für die Erzeugung mikrobieller Biomasse als Tierfutter oder als Quelle von Eiweiß für die menschliche Ernährung werden sog. heterotrophe Substrate rein oder in Form von Abprodukten der chemischen Industrie bzw. Landwirtschaft eingesetzt. Solche heterotrophen Substrate sind Zucker (Hexosen, Pentosen), Säuren (Essigsäure), Alkohole (Ethanol, Methanol), Kohlenwasserstoffe (Erdöldestillat, z. B. Parax, oder Methan). Sie werden meist allein, aber auch in Form von nichtbeabsichtigten Mischungen (z. B. Sulfitablauge) oder bewußt kombinierten Gemischen verwendet (WP-DD 139870). Der aerobe Wachstums- und Vermehrungsprozeß wird chemostatisch geführt. Die im Ergebnis eines solchen Prozesses entstehende Biomasse hat eine bestimmte Zusammensetzung. Das Verhältnis der makromolekularen bzw. polymeren Hauptbestandteile (Kohlenhydrate, Lipide, Proteine, Nucleinsäuren) ist bei einer gegebenen Mikroorganismenspezies u. a. abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit (Durchflußrate), von der Art der Limitation und der Kohlenstoff und Energiequelle. Die Wachstumsgeschwindigkeit wirkt sich vor allem auf den RNS-Gehalt aus (Maaløe, O., N. O. Kjeldgaard: Control of macromolecule synthesis. Benjam Inc., New York, Amsterdam 1966), so daß, wenn der Proteingehalt als Rohprotein bestimmt wird, der Eindruck entsteht, der Proteingehalt sei bei höherer Wachstumsgeschwindigkeit (Durchflußrate) größer. Tatsächlich ist der Reinproteingehalt nahezu unabhängig von der Geschwindigkeit. Er ist am höchsten, wenn der kontinuierliche Prozeß über die Kohlenstoff- und Energiequelle (heterotrophes Substrat) limitiert wird. Zur Abhängigkeit des Proteingehaltes von der Kohlenstoff- und Energiequelle bei einer gegebenen Mikroorganismenspezies und unter sonst gleichen Bedingungen gibt es keine systematischen Untersuchungen, so daß auch keine Kenntnisse über eine etwaige Kausalität zwischen der Art (Qualität) des heterotrophen Kohlenstoffsubstrates und Proteingehalt existieren. Bekannt ist, daß bei Verwendung von Acetaldehyd allein oder in Kombination mit einer anderen wasserlöslichen sauerstoffhaltigen Kohlenstoffquelle der Rohproteingehalt bei *Candida utilis* und *Brettanomyces spec.* um bis zu 10% höher ist (DD-WP 240026) als bei Hefen, die auf Rübenzucker, Hexosen und Pentosen, Ethanol und Essigsäure sowie auf einem Gemisch Saccharose/Ethanol gewachsen sind (s. DD-WP 142452, Alroy, Y. u. S. Tannenbaum: Biotechnol. Bioeng. X, 239, 1973; Litfield, J.H.: Science 219, 740, 1983); Goldberg, I.: Single Cell Protein. Springer Verlag Berlin 1985. Der Rohproteingehalt von Hefen auf diesen Substraten liegt bei 52 bis 58%. Alleinige Bedingung für den erhöhten Proteingehalt gemäß DD WP 240026 ist die Anwesenheit von Acetaldehyd als Kohlenstoff- und Energiequelle.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Erzeugung von mikrobieller Biomasse zu entwickeln, das einen hohen Proteingehalt in der Biomasse garantiert.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, mikrobielle Biomasse hohen Eiweißgehaltes unter Verwendung heterotropher Substrate, jedoch ohne Acetaldehyd als Kohlenstoff- und Energiequelle zu benutzen. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe so gelöst, daß einem heterotrophen Substrat ein weiteres zugemischt wird, das in der Mischung lediglich als Energie- und/oder Reduktionsäquivalente-Lieferant fungiert, so daß bei chemostatischer heterotrophes Substrat limitierter Kultivierung Wachstum und Vermehrung nicht mehr wie allgemein für heterotrophe Substrate zutreffend

durch das Energieangebot, sondern von Kohlenstoff kontrolliert wird. Wird gleichzeitig dafür gesorgt, daß der Stickstoff überschüssig bleibt, dann wird der auf dem Wege der Metabolisierung des Kohlenstoffsubstrates gebildete zentrale Precursor maximal, d. h. bis zur Kohlenstoffmetabolismus determinierten Grenze, in dem energieaufwendigen Prozeß der Proteinsynthese verbraucht. Dadurch steigt der Proteingehalt über den mit den verschiedenen heterotrophen Substraten, wenn sie allein oder in Gemischen eingesetzt werden, möglichen, wobei der RNS-Gehalt praktisch konstant ist und bei Hefen um etwa 8% liegt, wenn die energetisch optimierten Gemische bei den gleichen Geschwindigkeiten wie die Einzelsubstrate, die auch in Mischungen Kohlenstoff- und Energiequelle zugleich sind, chemostatisch in Zellsubstanz konvertiert werden. Im allgemeinen (bei Einzelsubstraten bzw. Mischungen von Substraten mit physiologisch gleichen Funktionen) bedeutet hohe Proteinausbeute nicht maximale Wachstumsausbeute. Letztere wird erreicht, indem vermehrt energiemoderate Makromoleküle bzw. Polymere (z. B. Lipide, Kohlenhydrate) synthetisiert werden. Bei Verwendung von energetisch aufgebesserten Substratgemischen sind Wachstums- und Proteinausbeute gekoppelt. Abhängig vom verwendeten Produktstamm kommen als Energie- bzw. Wasserstoff-Donor verschiedene Verbindungen in Frage, u. a. auch Ameisensäure wie experimentell nachgewiesen worden ist (DD-WP 213946). Sie ist auch zur Steigerung des Proteingehaltes geeignet. In einem Massenprozeß dürfte Ameisensäure jedoch aus Gründen des Preises und der Verfügbarkeit, insbesondere aber weil ihr Kohlenstoff als CO₂ unvermeidbar verloren geht, keine Bedeutung bzw. nur unter bestimmten Bedingungen erlangen. Vorteilhaft ist es, Substanzen zu verwenden, die materiell nicht verloren gehen, sondern nachdem sie als Energiequelle „ausgebeutet“ worden sind, (vielleicht sogar hochveredelt) wieder gewonnen werden können.

Als besonders geeignete Substanzen hierfür erwiesen sich Glucose bei der Vermehrung von Bakterien auf Acetat als einziger Kohlenstoffquelle, und Formiat bzw. Isopropanol bei der Vermehrung von Hefen auf Kohlenhydraten, Alkoholen und Kohlenwasserstoffen, insbesondere in der Kombination Hexadecan/Formiat, Ethanol/Formiat und Hexadecan/Isopropanol. Bei der Vermehrung der Bakterien, z. B. von *Acinetobacter calcoaceticus* auf Acetat betrug der Proteingehalt 45%. Nach Wachstum auf einer Acetat-/Glucose-Mischung betrug der Reineiweißgehalt etwa 60%, wobei die Wachstumsausbeute von etwa 0,4 g/g auf etwa 0,63 g/g gestiegen war. Dies bedeutet eine Erhöhung der Proteinsynthese um etwa 100% absolut. Im Falle von Hefen, demonstriert am Beispiel *Candida maltosa*, betrug der Reineiweißgehalt bei Wachstum auf Hexadecan bzw. Ethanol 38% bzw. 32%. In der Kombination mit Formiat als zusätzlicher Energiequelle konnte der Eiweißgehalt auf etwa 44% der Trockensubstanz und bei der Kombination Hexadecan/Isopropanol sogar auf 55% gesteigert werden. Da gleichzeitig auch die Wachstumsausbeute gesteigert wird, ist die absolute vermehrte Menge an Protein entsprechend größer. Diese Steigerungen werden erreicht bei gleichen Geschwindigkeiten, so daß „über alles“ auch die Raum/Zeit-Ausbeuten erhöht sind.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Acinetobacter calcoaceticus ZIMET 11089 wird in einem für aerobe Kultivierung geeignetem Rührfermentor bei 30°C gezüchtet, der pH-Wert von 6,8 wird durch NaOH bzw. HCl konstant gehalten, die Gelöstsauerstoffkonzentration war größer als 20%. Die kontinuierliche Kultivierung (Limitation über die Kohlenstoffquelle) erfolgte auf Na-Acetat bzw. einer Mischung von Na-Acetat und Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle in einem Mineralmedium folgender Zusammensetzung (in mg/l):

NH ₄ Cl	3400
KH ₂ PO ₄	310
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	20
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	15
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	5
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,44
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	0,82
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,78
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,25

Bei einer Verdünnungsrate von 0,14 h⁻¹ lag die Biomasseausbeute auf Acetat bei 0,38 g/g, der Reineiweißgehalt betrug 46%. Bei simultaner Verwertung von Acetat und Glucose, angeboten in einem Mischungsverhältnis von 2,6:1 (in Mol), betrug die Wachstumsausbeute 0,63 g/g Acetat, der Reineiweißgehalt lag in diesem Falle bei 63%.

Beispiel 2

Wird *Acinetobacter calcoaceticus* 69 IV, wie im Beispiel 1 angegeben, bei einer Verdünnungsrate von 0,31 h⁻¹ kultiviert, so werden auf Acetat allein 0,41 g Biomasse pro g Acetat mit einem Reineiweißgehalt von 44% erhalten. Auf der entsprechenden Mischung von Acetat und Glucose werden 0,64 g Biomasse pro g Acetat mit einem Reineiweißgehalt von 59% erhalten.

Beispiel 3

Candida maltosa spez. wird in einem für aerobe Kultivierung geeigneten Rührfermentor bei 32°C, einem pH-Wert von 5,2 und einer Gelöstsauerstoff-Konzentration von mindestens 40% gezüchtet. Die chemostatische Kultivierung (Limitation der Kohlenstoff-Quelle) erfolgt auf Hexadecan allein bzw. einer Mischung von Hexadecan und Formiat als Kohlenstoff- und Energiequelle in einem Mineralmedium folgender Zusammensetzung (in mg/l):

NH ₄ Cl	7630
KH ₂ PO ₄	2810
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	590
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	55
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	38

MnSO ₄ · 3 H ₂ O	17
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	22
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	4
CoCl ₂ · 4 H ₂ O	2,8
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	2,6
H ₃ BO ₄	4
KJ	2,6
Biotin	0,05
Thiamin	5
EDTA	450

Bei einer Verdünnungsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$ lag die Biomasseausbeute auf Hexadecan bei $0,94 \text{ g/g}$, der Reinproteingehalt betrug 38%. Bei simultaner Verwertung von Hexadecan und Formiat, angeboten in einem Mischungsverhältnis von 1:9,6 (in Mol), steigt die Biomasseausbeute auf $1,26 \text{ g/g}$ Hexadecan, der Reinproteingehalt in dieser Biomasse beträgt 44%.

Beispiel 4

Candida maltosa wird wie unter Beispiel 3 beschrieben, bei einer Verdünnungsrate von $0,12 \text{ h}^{-1}$ kultiviert. Als Kohlenstoff- und Energiequelle dienen Ethanol bzw. Ethanol und Formiat. Auf Ethanol wurde dabei eine Biomasseausbeute von $0,60 \text{ g/g}$ erreicht, der Reinproteingehalt betrug 32%. Bei simultaner Verwertung von Ethanol und Formiat, angeboten in einem Mischungsverhältnis von 1:2,5 (in Mol), steigt die Biomasseausbeute auf $0,76 \text{ g/g}$ Ethanol, der Reinproteingehalt dieser Biomasse beträgt 44%.

Beispiel 5

Candida maltosa spez. wird wie unter Beispiel 3 beschrieben auf Hexadecan kultiviert. Der pH-Wert betrug 4,5 und die Verdünnungsrate $0,12 \text{ h}^{-1}$. Bei simultaner Anwesenheit von Isopropanol, angeboten in einem Mischungsverhältnis von 1:60 (in Mol), steigt die Biomasseausbeute auf $1,04 \text{ g/g}$ Hexadecan an, der Reinproteingehalt in dieser Biomasse beträgt 48%.

Beispiel 6

Candida maltosa spez. wird wie unter Beispiel 5 beschrieben, aber auf einem Mischungsverhältnis Hexadecan:Isopropanol von 1:300 (in Mol) kultiviert. Die Biomasseausbeute steigt unter diesen Bedingungen auf $1,13 \text{ g/g}$ Hexadecan an, der Reinproteingehalt in dieser Biomasse beträgt 55%.