



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 293 133 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 N 1/38
C 12 P 1/04
C 12 R 1/02

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 12 N / 338 337 6

(22) 02.03.90

(44) 22.08.91

- (71) Akademie der Wissenschaften, Otto-Nuschke-Straße 22/23, O - 1080 Berlin, DE
(72) Pätz, Reinhard, Dr. rer. nat.; Zirkler, Walter, Dr. rer. nat.; Glindemann, Dieter, Dr. rer. nat.; Skrowny, Horst, Dipl.-Chem.; Pörschmann, Stefanie, Dr. rer. nat.; Pickert, Henning, Dr. sc. nat.; Kreuter, Theodor, Dr. sc. nat., DE
(73) Akademie der Wissenschaften, Institut für Biotechnologie, Permoserstraße 15, O - 7050 Leipzig, DE
(74) siehe (73)

(54) Verfahren zur Erzeugung von biogenen extracellulären Flockungsmitteln

(55) Flockungsmittel; Biopolymer; Induktion; Limitation; Herstellungsverfahren; Bakterien; Acetobacter methanolicus; Durchflußrate

(57) Das mikrobielle Herstellungsverfahren für ein neues Flockungsmittel nutzt die an sich bekannte Bakterienart Acetobacter methanolicus als Produzent flockulativ wirksamer Biopolymere, wobei die Induzierung der Ausschüttung durch eine P-Limitation bewirkt wird. Dabei wird der Kultivierungsprozeß bis an die kritische Durchflußrate gefahren und die P-Dosierung diskontinuierlich so vorgenommen, daß eine Oszillation innerhalb des Limitationsbereiches erreicht wird. Das gewonnene Flockungsmittel ist sowohl gegenüber seinen Produzenten als auch weiteren Mikroorganismen und anderen suspendierten Partikeln wirksam.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Erzeugung von biogenen extracellulären Flockungsmitteln durch Kultivierung von Bakterien, **gekennzeichnet durch**
 - Kultivierung von Bakterien der Art *Acetobacter methanolicus* in einem
 - kontinuierlichen Prozeß nahe der kritischen Durchflußrate sowie
 - Induzierung der Ausschüttung der flockungsaktiven Biopolymeren durch P-Limitation
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet durch** eine Durchflußrate von 0,11 bis 0,13, vorzugsweise von 0,125/h.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet durch** eine P-Konzentration im Bereich von 0 bis 50 mg $\text{PO}_4\text{-P/l}$, vorzugsweise von $< 16 \text{ mg/l}$.
4. Verfahren nach Anspruch 1 und 3, **gekennzeichnet durch** eine diskontinuierliche Dosierung der P-Quelle unter oszillierender Einstellung der P-Limitation, wobei die Oszillationszeiten in der Größenordnung der Verweilzeit liegen sollte.

Anwendung der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf die Herstellung eines Bioflockungsmittels, welches z. B. zur Aufkonzentrierung von Sedimentstoffen, für die Wasseraufbereitung, die Papierindustrie und im medizinischen Bereich einsetzbar ist.

Charakterisierung der bekannten technischen Lösungen

In der Literatur wurde eine Reihe von Verfahren beschrieben, die sich mit der Herstellung von Flockungsmitteln mikrobieller Herkunft befassen. Derartige Flockungsmittel werden für verschiedene Anwendungsbereiche vorgesehen, beispielsweise die Wasseraufbereitung, den Einsatz für medizinische Zwecke, die Papierproduktion u. ä. Die verwendeten Mikroorganismen, Pilze und Bakterien weisen ein großes Spektrum hinsichtlich ihrer taxonomischen Zugehörigkeit auf, und die flockulativ wirkenden Verbindungen selbst sind entweder nicht näher hinsichtlich ihrer Natur charakterisiert, oder werden als Proteine, Polysaccharide oder auch Fettsäuren angegeben.

Im US-Patent 4.258.132 wird die Herstellung einer agglutinierenden Substanz aus *Dermatiacea* beansprucht. Die Kultivierung der Mikroorganismen erfolgt bei einer Verweilzeit von 72 Stunden, überdies tritt Gelbindung während der Fermentation auf, was sich ungünstig auf das mikrobielle Wachstum und die prozeßtechnische Beherrschung auswirkt. Darüber hinaus ist eine mehrstufige Aufarbeitung erforderlich.

Im US-Patent 4.514.560 wird ein aggregierendes Polysaccharid, das von *Aureobacidium* synthetisiert wird, beschrieben. Auch bei diesem vorgeschlagenen Verfahren wird das Endprodukt durch eine zeit- und chemikalienaufwendige Aufarbeitung erhalten; der Kultivierungsprozeß ist ebenfalls nur mit einer geringen Raum-Zeit-Ausbeute verbunden.

Dieses Material ist allen Verfahren eigen, die zur Problematik der Erzeugung von aggregationsfördernden Biopolymeren im Stand der Technik bekannt sind: selbst in batch-Fahrweise kann der Prozeß nur mit langen Reaktionszeiten im Fermentor realisiert werden und weist somit stets eine schlechte Raum-Zeit-Ausbeute aus.

Handelt es sich bei den Polymeren um intracelluläre Verbindungen, ist ein Gewinnungsverfahren mit einer Lyse der Produzenten verbunden. So wird gemäß EP 149514 ein Flockungsmittel gewonnen, das durch thermische oder chemische Lyse verschiedener Kulturen (*Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *Bacillus cereus* oder *E. coli*) hergestellt wird. Die Kultivierungszeiten betragen bis zu 270 Stunden. Somit ist auch hier nur eine geringe Raum-Zeit-Ausbeute zu verzeichnen, die Lyse selbst erfordert entsprechende Maßnahmen, die die Ökonomie des Verfahrens belasten.

Mit dem US-Patent US 4.649.110 ist auch ein Verfahren bekannt, bei dem der zu den Cyanobakterien gehörende Stamm *Phorandium* sp. kultiviert wird und sowohl die Zellinhaltsstoffe nach einer Lyse als auch ausgeschiedene Polymere als flockungsaktive Komponente verwendet werden können. Dabei ist eine spezielle Führung der Ca-Ionenkonzentration erforderlich, die während des exponentiellen Wachstums der Bakterien hoch ist und zur Induzierung der Ausschüttung der Polymeren reduziert wird. Auch bei diesem Verfahren sind für die mikrobielle Gewinnung der Flockungsmittel mehrere Tage Kultivierungsdauer angeführt, sodaß eine niedrige Raum-Zeit-Ausbeute resultiert. Für die Realisierung eines industriellen Flockungsverfahrens sind die im Stand der Technik bekannten Gewinnungsverfahren nicht geeignet.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, unter hoher Raum-Zeit-Ausbeute ein mikrobielles Flockungsmittel kostengünstig herzustellen.

Wesen der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, leistungsfähige Mikroorganismen auszuwählen und die erforderlichen Prozeßbedingungen anzugeben, unter denen flockungsaktive Verbindungen in das Kulturmedium ausgeschüttet werden. Erfindungsgemäß erfolgt dies durch Kultivierung von Bakterien der Art *Acetobacter methanolicus* in einem kontinuierlichen Prozeß nahe der kritischen Durchflußrate, wobei die Induzierung der Ausschüttung flockungsaktiver Biopolymere durch P-Limitation erfolgt.

Die Eignung von Bakterien der Art *Acetobacter methanolicus* als Produzent für extracelluläre flockungsaktive Biopolymere ist völlig überraschend.

Es ist bekannt, daß Stämme dieser Art nur über eine minimale Anzahl elektronegativer Ladungsträger verfügen, was zum Versagen aller bekannten Flockungsmittel führt, deren Wirkungsweise auf Brückenbindungseffekte beruhen. Suspensionen, die Bakterien von *Acetobacter methanolicus* enthielten, weisen eine hohe Koagulationsstabilität auf. Destabilisierung und damit Sedimentation der Bakterien konnte bislang nur erreicht werden, wenn eine thermische und/oder Alkalibehandlung erfolgte. Auch eine Koagulation mit Lectinen war nicht erfolgreich. Selbst der Versuch einer heterologen Aggregation der Stämme von *A. methanolicus* mittels *E. coli*-Bakterien führte nur in Einzelfällen zum Erfolg, jedoch ohne technisch ausnutzbaren Wirkungsgrad.

Der Fachmann hatte aus seinen langjährigen Untersuchungen keinerlei Hinweise dafür entnehmen können, daß diese Stämme als Produzenten eines mikrobiellen Flockungsmittels erfolgreich einsetzbar sein könnten.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß im Gegensatz zu dieser Auffassung Stämme der genannten Art dann flockungsaktive Biopolymere in das Medium eines unter optimalem Biomassewachstum laufenden kontinuierlichen Kultivierungsprozesses ausschütten, wenn durch P-Limitation eine derartige Ausschüttung induziert wird und der Kultivierungsprozeß nahe der kritischen Durchflußrate gefahren wird. Der vorteilhafte Parameterbereich hierfür beträgt 0,11 bis 0,13/h, vorzugsweise 0,125/h.

Die für eine Induzierung der Biopolymerausschüttung erforderliche P-Limitation wird durch eine Phosphatkonzentration von $< 16 \text{ mg PO}_4\text{-P/l}$ erreicht. Die Dosierung der P-Quelle kann erfindungsgemäß vorteilhafterweise diskontinuierlich erfolgen, um bei P-Limitation eine endliche, nicht inhibitorische Substratkonzentration aufrechtzuerhalten. Dabei wird eine Ausschüttung der flockulierend wirkenden Polymeren erreicht, der Prozeß der Biomassebildung selbst jedoch nicht negativ beeinflusst. Da die P-Limitation nur kurzzeitig wirksam zu sein braucht, kann bei nahezu maximaler Wachstumsgeschwindigkeit der Mikroorganismen eine hohe Produktivität der Biomassebildung durch einen hohen Anteil aktiver Biomasse beibehalten werden.

Es hat sich als besonders vorteilhaft erwiesen, wenn unter Verwendung von Phosphorsäure als P-Quelle die Regelung des pH-Wertes erfolgt und durch eine diskontinuierliche Dosierung eine Oszillation der Phosphatkonzentration in einem Konzentrationsbereich von 0 bis $50 \text{ mg PO}_4\text{-P/l}$ erreicht wird. Dabei wird der Limitationsbereich $< 16 \text{ mg PO}_4\text{-P/l}$ durchlaufen und die Biopolymerausschüttung ausgelöst. Bei Erreichen der unteren Grenzkonzentration ist unverzüglich Phosphorsäure zu dosieren. Die Oszillationszeiten sollten dabei in der Größenordnung der Verweilzeit liegen.

Das Flockungsmittel kann auf bekannte Art und Weise durch Fällung mit quarternären Ammoniumverbindungen, durch Membrantrennverfahren bzw. durch Eindicken im Vakuum aufkonzentriert werden.

Für spezielle Anwendungsfälle, z. B. in der Abwasserreinigung, ist eine Aufkonzentrierung des Flockungsmittels nicht unbedingt erforderlich, da die Konzentration in der Kulturflüssigkeit einen direkten Einsatz erlaubt.

Die überraschendste und technisch bedeutsamste Wirkung bei seinem Einsatz besteht in der Fähigkeit, Stämme von *A. methanolicus* zu flocken und dadurch eine Eigensedimentation hervorzurufen. Damit ist eine wesentliche Verbesserung ihrer Aufkonzentrierbarkeit verbunden. Darüber hinaus ist es gegenüber vielen anderen Mikroorganismen und dispersen Feststoffen wirksam.

Die Erfindung soll durch die folgenden Beispiele näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Bakterien des Stammes *Acetobacter methanolicus* IMETB346 werden beim pH-Wert von 4,1 und bei 32°C mit einer Durchflußrate von $0,11 \text{ h}^{-1}$ kontinuierlich aerob kultiviert. Die Nährlose weist folgende Zusammensetzung auf (Bedarf Element pro g Biomasse):

Element	mg/g BTS	Verbindung
K	10	KCl
P	20	H_3PO_4
Mg	2,500	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
Cu	0,200	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
Fe	0,337	$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
Zn	0,154	ZnCl_2
Mn	0,464	MnSO_4
Co	0,0075	$\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
Ni	0,0228	$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
Cr	0,0150	$\text{CrCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
Al	0,0150	$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$
Ca	0,1499	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
B	0,2250	H_3BO_4
Mo	0,0163	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2$

Als C-Quelle wird eine 15 Vol.-%ige Methanollösung (Restmethanolkonzentration im Fermentor $0,1 \text{ g/l}$) als C-Quelle zugesetzt. Zur Auslösung der Flockungsmittelausschüttung wird die aktuelle Phosphatkonzentration von 100 mg/l (bezogen auf 5 g/l BTS) auf 16 mg/g reduziert. Die unter diesen Bedingungen extracellulär ausgeschiedene Polysaccharidmenge beträgt 96 mg/g BTS . Die Wirksamkeit des Bioflockungsmittels wird turbidimetrisch gegenüber Kaolin bestimmt und liegt in der gleichen Größenordnung wie für das synthetische Flockungsmittel Poly-DMDAAC.

Beispiel 2

In einer kontinuierlichen Fermentation werden Bakterien des Stammes *Acetobacter methanolicus* IMET 11402 bei einer Durchflußrate von $D = 0,125 \text{ h}^{-1}$, einem pH-Wert von 4,1 und bei 32°C kultiviert. Nährlösung und Methanol als C-haltiges Substrat werden, wie in Beispiel 1 angegeben, eingesetzt. Die P-Konzentrationen der Nährlösung wird durch diskontinuierliche Dosierung der Phosphorsäure so gesteuert, daß sich die Phosphatkonzentration im Bereich von 0 bis 50 mg/l oszillierend bewegt. Bei Erreichen des unteren Grenzwertes wird sofort Phosphorsäure dosiert. Die Oszillationszeit beträgt 8 Stunden. Unter diesen Bedingungen werden 140 mg exocelluläres Biopolymer pro g BTS erhalten. Es entsprach in seiner Wirksamkeit Flockungsmittel nach Beispiel 1.