



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2 Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

211 921

Int.Cl.³

3(51) A 23 J 1/18

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21) WP A 23 J/ 2450 477

(22) 19.11.82

(45) 25.07.84

(71) ADW DER DDR, BERLIN, DD; VNII BIOSINTEZA BELKOVYCH VESCESTV, MOSKVA, SU
(72) TRIEMS, KLAUS, DR.RER.NAT. DIPL.-CHEM.; FAULHABER, ENGELBERT, DR.RER.NAT.
DIPL.-CHEM.; DITTRICH, BARBARA, DR.RER.NAT. DIPL.-CHEM., DD

(54) VERFAHREN ZUR GEWINNUNG VON BIOMASSE MIT VERMINDERTEM NUKLEINSAEUREGEHALT

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Biomasse mit vermindertem Nukleinsäuregehalt auf Basis n-alkanhaltiger Kohlenwasserstoffgemische und Hefen auf dem Gebiet der Biotechnologie. Das Ziel der Erfindung besteht in der Gestaltung eines Verfahrens zur Gewinnung von Biomasse mit einem verminderten Nukleinsäuregehalt, das eine breite und ernährungsphysiologisch günstige Anwendung der Biomasse als Futtermittelkomponente in der Tierernährung ermöglicht. Der Erfindung liegt hierbei die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu entwickeln, das die Herstellung einer Biomasse mit vermindertem Nukleinsäuregehalt ohne zusätzliche technisch-ökonomische Maßnahmen zur Qualitätssicherung erlaubt. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe so gelöst, daß die im Fermentationsprozeß gewonnene Biomasse/Kohlenwasserstoffgemisch/Prozeßwasser/Luft-Suspension durch einen nachfolgenden Aufräumungsprozeß von einem Teil des Prozeßwassers befreit wird und danach bei Anwesenheit eines oberflächenaktiven Hilfsstoffes erwärmt und die eingestellte Temperatur eine bestimmte Zeit bei einem erhöhten pH-Wert gegenüber dem in der Fermentation gehalten wird. Das unter dieser Kombination von Maßnahmen innerhalb des Gewinnungsverfahrens der Biomasse gewonnene Endprodukt stellt eine wertvolle Futtermittelkomponente in der Tierernährung dar.

Titel der Erfindung

Verfahren zur Gewinnung von Biomasse mit vermindertem Nukleinsäuregehalt

Anwendungsgebiet der Erfindung

5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Biomasse mit vermindertem Nukleinsäuregehalt, die durch eine mikrobielle Konvertierung von n-alkanhaltigen Kohlenwasserstoffgemischen, insbesondere Erdöldestillaten bzw. -raffinaten mit Hefen gewonnen werden. Sie kann in
10 der mikrobiologischen Industrie angewendet werden

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Wesentliche Qualitätsmerkmale mikrobiell gewonnener Biomasse werden durch das eingesetzte Substrat, den eingesetzten Produktionsstamm und durch die Züchtungsbedingungen
15 bei aeroben, nicht geschützten Fermentationsprozessen bestimmt. Das betrifft solche charakteristischen Eigenschaften, wie den Rohprotein- und Vitamingehalt, den Spurenelementgehalt und insbesondere den Nukleinsäuregehalt. Bei
20 dem zuletzt genannten Merkmal ist davon ausgegangen worden, daß erhöhte Nukleinsäuregehalte in mikrobiellen Biomassen aus ernährungsphysiologischen Aspekten bei ihrem Einsatz als Tierfutterkomponente nicht günstig sind. Mikroorganismen sind aufgrund ihres relativ hohen Phosphorgehaltes

besonders gute Nukleinsäureträger.

Zur Erniedrigung des Nukleinsäuregehaltes in Biomassen bietet der Stand der Technik eine Vielzahl von Verfahren an, die durch eine gezielte Nachbehandlung der Biomasse eine Herabsetzung des Nukleinsäuregehaltes bewirken. Hierbei wird die Nukleinsäureentfernung mittels alkalischer Extraktion mit und ohne Zerstören der Zellen durch mechanische Einflüsse sowie mit und ohne Temperaturerhöhung durchgeführt. Das Ziel solcher Operationen ist dabei meistens die Gewinnung eines Eiweißkonzentrates (Lovland, J. Harper, J. M. und Frey, A. L. Lebensmittelwissenschaft und -technologie 9, 131 bis 142 (1976)).

Diese Verfahren bedeuten die Einführung von zusätzlichen Maßnahmen in das entsprechende Biomassegewinnungsverfahren und stellen eine ökonomisch-technische Belastung dar.

Es sind nur wenige Verfahren bekannt, wo durch geeignete Wahl der Züchtungs- und Aufarbeitungsparameter der Biomasse innerhalb des Gewinnungsverfahrens der Biomasse selbst eine Reduzierung des Nukleinsäuregehaltes bewirkt wird. Das betrifft die Zugabe von Hilfsstoffen mit Inhibitorwirkung für die Nukleinsäurebildung im Fermentationsprozeß. Außer der zusätzlichen Zugabe eines Hilfsstoffes können damit auch weitere Nebenreaktionen bei der Biomassezüchtung ausgelöst werden.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist ein Verfahren zur Gewinnung von Biomasse mit einem verminderten Nukleinsäuregehalt, das eine breite und ernährungsphysiologisch günstige Anwendung der Biomasse als Futtermittelkomponente in der Tierernährung erlaubt.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu entwickeln, das die Herstellung einer Biomasse mit vermindertem Nukleinsäuregehalt ermöglicht, ohne daß zusätzliche
5 technisch-ökonomische Maßnahmen zur Qualitätssicherung der Biomasse notwendig sind und der Wertstoffgehalt an Eiweiß und Vitaminen voll erhalten bleibt.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe so gelöst, daß die im
10 Fermentationsprozeß gewonnene Biomasse/Kohlenwasserstoffgemisch/Prozeßwasser/Luft-Suspension durch einen anschließenden Aufrahmungsprozeß von einem Teil des Prozeßwassers befreit und erwärmt wird und eine bestimmte Zeit bei dieser Temperatur gehalten wird und gleichzeitig der pH-Wert der Suspension gegenüber dem in der Fermentation erhöht
15 wird.

Die Anwendung von erhöhten Temperaturen bewirkt bei Mikroorganismen einen größeren Einfluß auf den gesamten Stoffwechselmechanismus, d. h. sowohl auf den Mineralstoffwechsel als auch auf den Zellstoffwechsel. Eine Beeinflussung von
20 Enzymsynthesen und -aktivitäten und die Synthese sowie der Abbau von Aminosäuren und organischen Säuren ist festzustellen. Die Mikroorganismen erfahren eine Vielzahl von Veränderungen physikalischer und chemischer Art. Es kommt zu einer Beeinflussung des physiologischen Zustandes und
25 der chemischen Zusammensetzung der Biomasse. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Mikroorganismenzelle in der Lage ist, Stoffe zu speichern und solche Stoffe bei Limitationen zu nutzen. Überraschenderweise wurde dabei gefunden, daß es bei diesen Vorgängen graduelle Beeinflussungen bei Anwesenheit von oberflächenaktiven Substanzen und je nach der Führung des Temperatur- und Zeit- sowie pH-Niveaus des Mediums
30 gibt. Diese Permeabilität der Biomasse bei Erwärmung unter Anwesenheit von einem oberflächenaktiven Stoff und einer pH-Wert-Veränderung kann durch die Vorgänge einer Thermolyse, Autolyse, enzymatischen Permeabilisierung und außerdem der
35

Permeabilisierung bei Einfluß eines Tensides erfolgen.

Der letztere Einfluß ist mit entscheidend für die vollkommene Permeabilität der Biomasse. Nach der Erwärmung der Biomassesuspension ist die Biomasse merklich geschrumpft und deformiert. Für die Qualität der Biomasse als auch für die anderen im System befindlichen Stoffe ist von großer Bedeutung, unter welchen konkreten Bedingungen das Verfahren arbeitet. Bei zu langer Erwärmung der Biomasse kommt es zu erheblichen Verlusten an Biomasse und zur Beeinflussung der anderen Stoffe im System.

Es wurde desweiteren überraschenderweise gefunden, daß bei Vorliegen eines Systems Biomasse/Kohlenwasserstoffgemisch/Prozeßwasser/Luft, erhalten durch die nichtgeschützte, aerobe Züchtung einer Hefe auf einem Kohlenwasserstoffgemisch im Siedebereich von 513 K bis 633 K und einer Teilentwässerung der Suspension durch einen nachfolgenden Aufrahmungsprozeß durch Zusatz eines Tensides bei gleichzeitiger Erwärmung der Suspension auf 338 K bis 363 K, vorzugsweise 353 K bis 358 K und der Haltung der Temperatur über 5 bis 40 Minuten, vorzugsweise 10 bis 25 Minuten sowie einem pH-Wert des Mediums zwischen 5 und 6 ein erhöhter Austritt von Nukleinsäuren aus der Biomasse in das Prozeßwasser erreicht wird, so daß die im Verfahren gewinnbare Biomasse einen verminderten Nukleinsäuregehalt aufweist.

Das führt zu einer entscheidenden Qualitätssteigerung der Biomasse und damit zur Verbesserung der Applikation des Produktes als Futtermittelkomponente aus ernährungsphysiologischer Sicht. Die technisch-ökonomischen Aufwendungen sind dabei gegenüber anderen zusätzlichen Maßnahmen im Verfahren zur Herabsetzung des Nukleinsäuregehaltes gering. Die in das Prozeßwasser abgegebenen Nukleinsäuren dienen gleichzeitig als Substrat für eine den Gesamtprozeß fördernde, sich auf einem bestimmten Niveau befindliche bakterielle Begleitflora, indem diese akzessorischen Substanzen für das Wachstum der Produktionskultur bereitstellt. Eine Stabilität der Wachstumsgeschwindigkeit und der Wertstoffgewinnung, vor allem das Rohprotein-

und Vitamingehaltes der Biomasse, ist dabei festzustellen. An den nachstehenden Beispielen ist die Erfindung näher erläutert.

Beispiel 1

5 In einem Versuchsrührfermentor mit einem Gesamtvolumen von 250 m³ und einem Arbeitsvolumen von 90 t werden in einem ungeschützten, aeroben und kontinuierlichen Prozeß Hefen des Stammes *Lodderomyces elongisporus* -IMET H 128 auf einer Erdöldestillatfraktion vom Siedebereich 513 K bis 633 K ge-
 10 züchtet. Der n-Alkangehalt im eingesetzten Erdöldestillat beträgt 16,5 Ma.-%. Die Fermentationstemperatur ist 306 K, der pH-Wert beträgt 4,2. Die spezifische Begasungsintensität beträgt 6300 m³/h, die Energieaufnahme 250 kW. Die Verweilzeit beträgt 5 Stunden. Die Nähr- und Spurensalze werden in
 15 Form von zwei Lösungen in den Fermentationsprozeß eingetragen. Hierbei beinhaltet die 1. Nährlösung eine 15 %ige Kaliumchloridlösung, die 2. Nährlösung eine aus den Medien Magnesiumsulfat, Kupfersulfat, Zinksulfat, Mangansulfat, Eisen-III-chlorid, Phosphorsäure und Wasser bestehende Salzlösung. Ent-
 20 sprechend der im kontinuierlichen Prozeß angestrebten Produktivität und den nachfolgenden spezifischen Verbrauchswerten werden die notwendigen Dosiermengen an Nährlösungen zugegeben. Spezifische Verbrauchskennziffern der Nähr- und Spurensalze:

Element	spezifischer Verbrauchswert g Element/kg Hefetrockensubstanz
P	18
K	20
Mg	0,94
Fe	0,02
30 Cu	0,03
Mn	0,16
Zn	0,22

In das wäßrige Kulturmedium wird zur Intensivierung des Fermentationsprozesses ein Hilfsstoff von der Struktur eines Propylenoxid-ethylenoxidaddukts in einer Konzentration von 600 mg/l wäßriges Kulturmedium zugegeben.

5 Es ergibt sich im Fermentationsprozeß eine Produktivität von 3,6 kg Hefetrockensubstanz/t.h.

Das Vierphasengemisch Erdöldestillat/Biomasse/Prozeßwasser/Luft wird in einem geeigneten Trennapparat einem Aufrahmungsprozeß unterzogen, wobei 60 % des Prozeßwassers abgetrennt werden kann. Neben weiteren Stoffwechselprodukten, wie Eiweißbruchstücken, Fettsäuren, kohlehydrathaltigen Substanzen enthält das abgetrennte Prozeßwasser auch 230 mg Nukleinsäuren/l Prozeßwasser. Zur restlichen Erdöldestillat/Biomasse/Prozeßwasser/Luft-Suspension führt man wiederum ca. 0,8 g des vorstehend genannten Hilfsstoffes zu und erwärmt die Suspension auf 353 K bis 358 K, wobei diese Temperatur 15 Minuten einwirkt. Durch diese Maßnahme werden gleichzeitig Inhaltsstoffe der Hefezellen, vorzugsweise Kaliumionen, ausgeschieden, so daß ohne Zugabe weiterer Hilfsmittel ein Anstieg des pH-Wertes der Suspension auf pH 5,8 erreicht wird. Unter diesen Bedingungen erfolgt eine bevorzugte Extraktion der Nukleinsäuren, und der Gehalt an Nukleinsäuren im Prozeßwasser beträgt dann 810 mg/l.

25 Dieser Anteil entspricht einer Abnahme des Nukleinsäuregehaltes in der Hefebiomasse um ca. 20 %.

Die aufkonzentrierte Biomasse-Suspension wird durch Vakuum-eindampfung weiter angereichert und anschließend in einem Düsenprühtrocknungsprozeß getrocknet.

30 Durch eine extraktive Reinigung der Hefetrockensubstanz in einer Gegenstromdreh Scheibenextraktionsanlage bei 313 K mit einem Extraktionsmittelgemisch Benzin-Ethanol-Wasser (80-19-1 Vol-%) werden die restlichen Kohlenwasserstoffe und der größte Teil der Lipide aus der Biomasse entfernt. Das Extraktionsmittelgemisch wird durch eine zweistufige thermische Trocknung aus der Biomasse entfernt und ein Endprodukt mit einem hohen Rohproteingehalt, einem verminderten Nukleinsäuregehalt und einer hohen Verdaulichkeit erhalten.

Charakteristische Kennzahlen der Biomasse, bezogen auf
Trockenprodukt (Ma.-%)

	Aussehen: beige bis hellbraun	Rohproteingehalt: 62,1
	Besatz: ohne	Lysingehalt: 7,8
5	Gefüge: nicht klumpig	Methioningehalt: 1,5
	Geruch: arteigen	Nukleinsäuregehalt: 7,2
	Aschegehalt: 6,4	Phosphorgehalt: 1,3
	Feuchtegehalt: 8,2	biologische Wertigkeit: 88

10 Beispiel 2

Die Gewinnungsbedingungen für die aufkonzentrierte Biomassesuspension nach dem Aufrahmungsprozeß entsprechen denen im Beispiel 1. Im Prozeßwasser nach der Aufrahmung des Erdöldestillat/Biomasse/Prozeßwasser/Luft-Gemisches sind 260 mg Nukleinsäure/l Prozeßwasser. Der Einfluß der Erwärmungstemperatur und ihrer Dauer bei Anwesenheit eines oberflächenaktiven Hilfsstoffes und einem gleichzeitig angestiegenen pH-Wert in Form eines Kombinationsregimes von Maßnahmen für die Nukleinsäureausschüttung aus der Biomasse zeigt folgendes Untersuchungsbild. Hierbei wurde eine durch Aufrahmung erhaltene aufkonzentrierte Biomassesuspension durch die Behandlung im Temperaturbereich 313 K bis 363 K in einem Umlaufthermostaten beeinflusst. Durch Rühren wurde ein Temperatúrausgleich und eine Homogenität der Versuchssuspension herbeigeführt. Das Aufgerahmte wurde vorher mit 0,6 g Propylenoxidethylenoxidaddukt/kg Aufgerahmtes in Form einer 10 %igen Lösung versetzt. Durch weitgehend gleiche Versuchsbedingungen wurden Fremdeinflüsse reduziert. Die Phasenzusammensetzung des Aufgerahmten betrug 2,34 Ma.-% Hefetrockensubstanz, 19,87 Ma.-% Erdöldestillat und 77,79 Ma.-% Prozeßwasser.

Nach der Behandlung der Suspension in Abhängigkeit von der Temperatur und Zeit wurden die Prozeßwässer durch Zentrifugation der Suspension bei 15 000 U/min und Filtration über eine G 5-Fritte zur Abtrennung der Biomasse gewonnen. In den Prozeßwässern wurde der Nukleinsäuregehalt UV-spektralphotometrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle wiedergegeben.

Im Vergleich sind die Nukleinsäurewerte von demselben Produkt aus dem technischen Versuch aufgeführt.

Tabelle: Nukleinsäuregehalt in Abhängigkeit von der Behandlungstemperatur und -zeit von Biomassensuspension

Probebezeichnung	Behandlungsbedingungen	Nukleinsäuregehalt (mg Nukleinsäure/ l Prozeßwasser)	pH-Wert
Prozeßwasser aus Aufrahmung		260	4,2
Prozeßwasser aus Aufkonzentrierung durch Wärme/Zeit-Behandlung		895	5,8
Aufgerahmte Biomassesuspension	<u>30 min = t</u> pH-Wert: 5,4 bis 5,8		
	313 K	410	4,6
	323 K	462	4,8
	333 K	775	5,2
	343 K	826	5,6
	353 K	889	5,8
	363 K	898	5,9
	<u>353 K = T</u>		

Probebezeichnung	Behandlungsbedingungen	Nukleinsäuregehalt (mg Nukleinsäure/ l Prozeßwasser)	pH-Wert
5	10 min	821	5,2
	20 min	905	5,8
	30 min	912	5,9
	40 min	914	5,9

10 Aus den Versuchsergebnissen ist die eindeutige Abhängigkeit der Nukleinsäureausschüttung aus der Biomasse in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit unter den Bedingungen einer den Permeabilisierungsprozeß unterstützenden Tensidzugabe vor der Erwärmung und einer pH-Werterhöhung des Mediums sichtbar.

Beispiel 3

15 Bei Anwendung der im Beispiel 1 angegebenen prinzipiellen Fermentations-, Aufarbeitungs- und Reinigungsbedingungen unter den Bedingungen der Maßstabsvergrößerung bei Nutzung eines zweitägigen Produktionstauchstrahlfermentors mit einem Bruttovolumen von 2200 m³ sowie einer Erwärmungstemperatur von 353 K bis 358 K der durch eine Aufrahmung vor-
20 entwässerten Biomassesuspension über einen Zeitraum von 25 Minuten, werden folgende Nukleinsäurewerte in den abgetrennten Prozeßwässern erhalten:

25	Prozeßwasser nach der Aufrahmung des Vierphasengemisches	215 mg Nukleinsäure/l Prozeßwasser
	Prozeßwasser nach der Erwärmung der Biomassesuspension	910 mg Nukleinsäure/l Prozeßwasser

Das erzeugte Endprodukt weist folgende charakteristische Kennzahlen auf:

Charakteristische Kennzahlen der Biomasse, bezogen auf Trockenprodukt (Ma.-%)

5	Aussehen:	beige bis hellbraun	Rohproteingehalt:	62,6
	Besatz:	ohne	Lysingehalt:	7,4
	Gefüge:	nicht klumpig	Methioningehalt:	1,4
	Geruch:	arteigen	Nukleinsäuregehalt:	6,7
			Phosphorgehalt:	1,1
			biologische Wertigkeit:	87

10

M

Erfindungsanspruch

Verfahren zur Gewinnung von Biomasse mit vermindertem Nukleinsäuregehalt, die durch Züchtung von Hefen auf n-alkanhaltigen Kohlenwasserstoffgemischen, insbesondere Erdöldestillaten bzw. -raffinaten erhalten wird und die durch einen Aufrahmprozeß vorentwässert wurde, dadurch gekennzeichnet, daß die vorentwässerte Biomassesuspension mit einem nichtionogenem Tensid vom Typ Propylenoxid - Ethylenoxid - Addukt in einer Menge von 0,2 bis 1,2 g/m³ Biomassesuspension versetzt, auf 338 K bis 363 K erwärmt und diese Temperatur 5 bis 40 Minuten gehalten wird, wobei in bekannter Weise in einem pH-Bereich von 5 - 6 gearbeitet wird.