



DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK
AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

PATENTSCHRIFT 158178

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 29 Absatz 1 des Patentgesetzes

(11) 158 178

(45) 05.01.83

Int. Cl.³

3(51) C 12 N 1/26

(21) WP C 12 N / 223 634

(22) 01.09.80

(71) AdW der DDR, Institut für technische Chemie, Leipzig, DD

(72) Hadeball, Wolf, Dr.rer.nat. Dipl.-Chem.; Jechorek, Mirko, Dipl.-Ing.; Ringpfeil, Manfred, Prof. Dr.sc.nat. Dipl.-Chem.; Schneider, Jörg, Dr.rer.nat. Dipl.-Chem., DD

(73) siehe (72)

(74) AdW der DDR, Institut für technische Chemie, Arbeitsgruppe Patentwesen, 7050 Leipzig, Permoserstraße 15

(54) Verfahren zur Kultivierung von Mikroorganismen

(57) Das Verfahren zur Kultivierung von Hefen auf Methanol betrifft das Gebiet der technischen Mikrobiologie. Das Ziel der Erfindung besteht darin, durch die Zugabe landwirtschaftlicher und industrieller Abprodukte die Wachstumsgeschwindigkeit und die Ausbeute der Hefen zu erhöhen sowie die Ökonomie dieser Verfahren zu verbessern, daß die Kultivierung unter ungeschützten Bedingungen und ohne Zusatz von Wachstumsstoffen durchgeführt werden kann. Das Wesen der Erfindung besteht darin, daß Methanol utilisierende Hefen unter Zusatz landwirtschaftlicher und industrieller Abprodukte, vorzugsweise Melasse, Molke, Gülle, Schlempe und Sulfitablauge allein oder in Kombination derselben in einem Konzentrationsbereich von 2 bis 98 Vol-% kultiviert werden. Gleichzeitig wird durch die Fermentationsbedingungen gewährleistet, daß die Züchtung unter ungeschützten Bedingungen durchgeführt werden kann. Die Erfindung betrifft das Anwendungsgebiet der Zellsubstanzsynthese.

2 2 3 6 3 4

Titel

Verfahren zur Kultivierung von Mikroorganismen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung gehört in das Gebiet der mikrobiologischen
5 Eiweißgewinnung und Produktgewinnung, in die IPK C 12 B.
Die Erfindung kann eingesetzt werden in Anlagen, in denen
Futterhefe (aus Methanol) hergestellt wird.

Bekannte technische Lösungen

Verfahren zur Kultivierung von Hefen auf Methanol sind in
10 großer Zahl bekannt. Charakteristisch für diese Verfahren
ist, daß Wachstumsstoffe zum Fermentationsprozeß zugesetzt
werden müssen und dieser unter sterilen Bedingungen durch-
geführt werden muß. Außerdem weisen Methanol utilisierende
Hefen meist relativ geringe Wachstumsgeschwindigkeiten und
15 einen hohen spezifischen Methanolbedarf auf. So wird nach
der GB - PS 1 342 744 eine Hefe der Gattung Candida mit
Methanol bei einem pH-Wert von 4,0 bis 5,0 und einer Tempe-
ratur von 30 bis 40° C unter Zusatz von Hefeextrakt oder
Thiamin-Hydrochlorid und Biotin kultiviert. Nach der GB - PS
20 1 423 642 wird eine Hefe der Art Candida alcomigas mit
Methanol bei 30° C und pH = 4,7 unter sterilen Bedingungen
unter Zusatz von Biotin und Thiamin-Hydrochlorid diskonti-
nuierlich kultiviert. In verschiedenen japanischen Patent-
schriften (JA-PS 76 009 031, JA-PS 76 019 029, JA-PS
25 76 019 030, JA-PS 76 009 834, JA-PS 77 017 114) wird die
diskontinuierliche Züchtung verschiedener Spezies der Gat-
tungen Torulopsis, Picchia, Hansenula, Saccharomyces und

Candida mit Methanol als einziger Kohlenstoffquelle unter Zusatz von Wuchsstoffen und unter sterilen Bedingungen beschrieben.

- 5 Weiterhin ist die Kombination von zwei Hefen bekannt (DD-PS 211 271), wobei eine nicht Methanol utilisierende Hefe, die auf einem zweiten Kohlenstoffsubstrat wächst, die Wuchsstoffe für die Methanol utilisierende Hefe bildet. In allen beschriebenen Züchtungsverfahren ist außerdem die Zugabe von Nähr- und Spurensalzen für das Wachstum der Methanol utilisierenden Hefen notwendig.

Ziel der Erfindung

- 15 Das Ziel der Erfindung besteht darin, die Nähr- und Spurensalze und/oder die Wuchsstoffe, die für die Methanol utilisierenden Hefen essentiell sind, während der Kultivierung durch die Zugabe anderer billiger Stoffe teilweise oder vollständig zu ersetzen und gleichzeitig einen stabilen Fermentationsprozeß unter nichtsterilen Bedingungen zu gewährleisten und die Wachstumsgeschwindigkeit und Ausbeute der Methanol utilisierenden Mikroorganismen zu erhöhen.

Wesen der Erfindung

- 20 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, anstelle von Wuchsstoffen, Nähr- und Spurensalzen, die für das Wachstum Methanol utilisierender Hefen essentiell sind, billige Abprodukte der Industrie und Landwirtschaft, die diese
- 25 Wuchsstoffe, Nähr- und Spurensalze enthalten, zu verwenden. Gleichzeitig soll der Fermentationsprozeß so gestaltet werden, daß bei der Fermentation von Methanol mittels Hefen bei Zusatz dieser Abprodukte ein Wachstumsvorteil der Hefen gegenüber unerwünschten Infektionen besteht.
- 30 Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß zur Züchtung von Methanol utilisierenden Hefen wäßrige landwirtschaftliche Abprodukte gegeben werden, die utilisierbare Kohlenstoffverbindungen, Wuchsstoffe sowie Nähr- und Spurensalze enthalten. Zu den landwirtschaftlichen Abprodukten, die das Wachstum und die Ausbeute der Methanol
- 35

utilisierenden Hefen erhöhen, gehören Melasse, Molke, Gülle, Sulfitablauge und Schlempe (Melasse-, Getreide-, Mais- und Kartoffelschlempe). Durch die Anwesenheit utilisierbarer Kohlenstoffverbindungen und der Wachstumsstoffe wird die Wachstumsgeschwindigkeit der Methanol utilisierenden Hefen in Abhängigkeit von der Menge des Abproduktes bis zu 70 % und die Ausbeute an Biomasse bis zu 30 % erhöht. Ein Zusatz von Wirk- und Wachstumsstoffen, die für das Hefewachstum notwendig sind, ist dabei nicht erforderlich. Der Anteil der Abprodukte im Fermentationsmedium beträgt zwischen 2 und 98 Volumen-Prozent. Darüber hinaus wurde überraschender Weise gefunden, daß im ungeschützten Fermentationsprozeß praktisch keine Infektionen von Bakterien auftreten.

Als Methanol utilisierende Hefen eignen sich die Gattungen Candida, Torulopsis, Hansenula, Saccharomyces, Picchia und Klöckera.

Nachfolgende Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern:

Beispiel 1

a) Der Methanol utilisierende Hefestamm Hansenula polymorpha sp. wurde im ungeschützten kontinuierlichen Prozeß unter folgenden Bedingungen kultiviert:

Temperatur: 40° C
pH-Wert: 3,4

In 1 l Getreideschlempe wurden 40 ml CH₃OH gelöst. Die Fermentation erfolgte in einem 12 l-Rührfermentor. Der Stickstoff wurde über die pH-Regelung als Ammoniak zugeführt; eine Zugabe weiterer essentieller Elemente war nicht erforderlich. Die Restkonzentration an Methanol im Fermentor betrug weniger als 1,0 g/l. Als Ergebnis wurde eine spezifische Wachstumsrate von 0,168 h⁻¹ und eine Biomassekonzentration von 14,5 g/l erzielt. Das entspricht einem spezifischen Methanolverbrauch von 2,20 g CH₃OH/g TS oder einer Biomasseausbeute von 45 %. Der Anteil von Bakterien im Fermentor war äußerst gering; auf ca. 50 Hefezellen wurde eine Bakterienzelle beobachtet.

- b) Wird hingegen der Hefestamm *Hansenula polymorpha* sp. unter Verwendung von 0,5 g Hefeextrakt/l und der für diesen Stamm essentiellen Nähr- und Spurensalze anstelle der Getreideschlempe kultiviert, so werden maximal erreicht:

5

Spezifische Wachstumsrate: $0,114 \text{ h}^{-1}$
 Hefekonzentration: 11 g/l
 Spezifischer Methanol-
 verbrauch: 3,2 g Methanol/g HTS

- 10 c) Unter gleichen Bedingungen wie b), jedoch ohne Zusatz von Hefeextrakt findet kein Wachstum statt.

Beispiel 2

Der Methanol utilisierende Hefestamm *Hansenula polymorpha* sp. wurde im kontinuierlichen Prozeß unter folgenden Bedingungen kultiviert:

15

Temperatur: 40° C
 pH-Wert: 3,4

Die Nährlösung enthält pro 1 l:

	K_2SO_4	3000 mg
20	MgSO_4	1000 mg
	H_3PO_4	4 ml
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	75 mg
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	175 mg
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$	25 mg
25	$\text{MnSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$	60 mg
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	20 mg
	$\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	23 mg
	H_3BO_3	50 mg
	NaCl	200 mg
30	Methanol	40 ml
	Getreideschlempe	150 ml

Die pH-Regelung erfolgte mit 5 %iger NH_4OH -Lösung. Die Fermentation wurde in einem 12 l-Rührfermentor durchgeführt. Die Restkonzentration an Methanol im Fermentor betrug weniger als 1,0 g/l. Es wurden folgende Ergebnisse erreicht:

Spezifische Wachstumsrate = $0,127 \text{ h}^{-1}$
 Hefekonzentration = 13 g/l

Das entspricht einem spezifischen Methanolverbrauch von $2,50 \text{ g CH}_3\text{OH/g HTS}$ oder einer Ausbeute von 40 %.

10 Beispiel 3

Der Methanol utilisierende Hefestamm *Hansenula polymorpha* sp. wurde im kontinuierlichen Prozeß unter folgenden Bedingungen kultiviert:

15 Temperatur: 40°C
 pH-Wert: 3,4

In 1 l Sulfitablaue wurden 40 ml CH_3OH gelöst. Die Fermentation erfolgte in einem 12 l-Rührfermentor.

Die pH-Regelung erfolgte mit Ammoniak. Die essentiellen Nähr- und Spurensalze für das Biomassewachstum wurden in gleichen Mengenverhältnissen wie im Beispiel 2 zugegeben. 20 Die Restkonzentration an Methanol im Fermentor betrug weniger als 0,5 g/l.

Es wurden folgende Ergebnisse erreicht:

25 Spezifische Wachstumsrate: $0,157 \text{ h}^{-1}$
 Hefekonzentration: 14 g/l
 Spezifischer Methanolverbrauch: $2,3 \text{ g Methanol/g HTS}$

Beispiel 4

a) Der Methanol utilisierende Hefestamm *Pichia ambrosiae* MH 26 ZIMET H 43667 wurde im kontinuierlichen Prozeß unter folgenden Bedingungen kultiviert:

5 Temperatur: 40° C
pH-Wert: 4,2

In 1 l Getreideschlempe wurden 40 ml CH_3OH gelöst. Die Fermentation erfolgte in einem 12 l-Rührfermentor. Der Stickstoff wurde über die pH-Regelung als Ammoniak zugeführt; eine Zugabe weiterer essentieller Elemente oder Wachstumsstoffe war nicht erforderlich. Die Restkonzentration an Methanol im Fermentor betrug zwischen 0 und 0,5 g/l. Als Ergebnis wurde eine spezifische Wachstumsrate von $0,270 \text{ h}^{-1}$ und eine Biomassekonzentration von 19,6 g/l erzielt. Das entspricht einem spezifischen Methanolverbrauch von $2,2 \text{ g CH}_3\text{OH/g HTS}$ oder einer Biomasseausbeute von 45,5 %.

b) Wird hingegen der Hefestamm *Pichia ambrosiae* MH 26 ZIMET H 43667 unter Verwendung der im Beispiel 2 aufgeführten Nährlösung und einer Zugabe von 0,5 g Hefextrakt/l zu dieser Nährlösung kultiviert, so werden erreicht:

25 Spezifische Wachstumsrate: 0,250 h⁻¹
Hefekonzentration: 15 g HTS/l
Spezifischer Methanolverbrauch: 2,6 g CH₃OH/
g HTS

2 2 3 6 3 4

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Kultivierung einer methylotrophen
Hefe auf Methanol dadurch gekennzeichnet, daß landwirt-
schaftliche und/oder industrielle Abprodukte, welche
5 essentielle Wirkstoffe, Nähr- und Spurensalze sowie
 utilisierbare Kohlenstoff- und Energiequellen enthal-
 ten, vorzugsweise Melasse, Molke, Gülle, Schlempe
 und Sulfitablauge allein oder in Kombination derselben,
 in einem Konzentrationsbereich von 2 bis 98 Volumen-
10 prozent, in der Fermentation zugesetzt werden.