



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENT SCHRIFT

(19) DD (11) 241 916 A1

4(51) C 12 N 1/00
C 12 P 39/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 N / 281 899 8	(22)	21.10.85	(44)	07.01.87
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD
(72)	Wendlandt, Karin-Dagmar, Dr. rer. nat.; Pätz, Reinhard, Dr. rer. nat.; Wandt, Angelika, Dipl.-Biol.; Skrownny, Horst, Dipl.-Chem.; Brühl, Edda, Dipl.-Ing.; Heine, Michael, Dipl.-Ing.; Hubald, Monika, Dr. rer. nat., DD

(54) Verfahren zur Gewinnung von Biomasse

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Biomasse durch Kultivierung von Hefen oder Hefen und Bakterien auf der Basis von niedermolekularen Kohlenhydraten, Fettsäuren, Alkoholen und Aldehyden als Einzel- oder Kombinationssubstrate. Die Erfindung gehört in das Gebiet der mikrobiologischen Eiweißgewinnung. Die Erfindung verfolgt das Ziel, ein Verfahren zur Gewinnung von Biomasse zu entwickeln, das eine stabile Prozeßführung unter unsterilen Bedingungen bei Einsatz verschiedener Kohlenstoffquellen, vorzugsweise Essigsäure enthaltender Substrate, ohne Anwendung von Wachstoffsstoffen, bei wahlweise hohen extrazellulären Konzentrationen der Kohlenstoffquelle mit hohen Produktivitäten ermöglicht. Es wurde gefunden, daß diese Zielstellung realisiert werden kann, wenn die Hefestämme H 196 – ZIMET 43 735 und H 197 – ZIMET 43 736 einzeln oder im Gemisch, auch zusammen mit anderen Kohlenstoff-/Mikroorganismenkombinationen, kontinuierlich unter unsterilen Bedingungen bei einer Temperatur vorzugsweise von 32 °C bis 38 °C und einem pH-Wert vorzugsweise von 4,4 bis 5,5 kultiviert werden. Als Kohlenstoffquellen können neben reinen Substraten auch landwirtschaftliche und industrielle Abprodukte, wie Gülle, Maisquellwasser, Silisickersaft, Grünfütterpreßsaft, Melasse, Brändenfett u. a. eingesetzt werden.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Gewinnung von Biomasse durch Kultivierung von Hefen und Bakterien auf der Basis von niedermolekularen Substraten wie Kohlehydraten, Fettsäuren, Alkoholen und Aldehyden als Einzel- oder Kombinationssubstrate, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Hefen Stämme der Art *Pichia membranaefaciens* und der Gattung *Metschnikowia* einzeln oder im Gemisch kontinuierlich mit einer Durchflußrate von maximal $0,35 \text{ h}^{-1}$ bei einer Temperatur von 20°C bis 45°C und einem pH-Wert von 3,5 bis 6,5 unter Normal oder erhöhtem Druck kultiviert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet durch** die Verwendung der in der Stammsammlung des ZIMET Jena unter der Bezeichnung H 196 ZIMET 43735 hinterlegten Stammes von *Pichia membranaefaciens* und/oder H 197 ZIMET 43736 von *Metschnikowia* spez.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung gehört in das Gebiet der mikrobiologischen Eiweißgewinnung.

Die Erfindung kann eingesetzt werden in Anlagen, in denen flüssige Kohlenstoffquellen mit Hilfe von Hefen mikrobiologisch umgesetzt werden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Verfahren zur Kultivierung von Mikroorganismen insbesondere Hefen, auf der Grundlage von flüssigen Kohlenstoffquellen, z.B. Essigsäure, sind bekannt.

Dabei werden in der überwiegenden Mehrheit Hefen der Gattung *Candida utilis* eingesetzt. Diese Hefen werden in der Regel bei 30°C bis 38°C , pH = 3,5 bis 5,5 kultiviert, sie zeichnen sich durch eine hohe Wachstumsgeschwindigkeit aus. Nachteilig beim Einsatz dieser Hefen ist ihre relativ große Empfindlichkeit gegenüber extrazellulären Acetatkonzentrationen. Bei niedrigen pH-Wert (pH = 4) ist zwar die Assimilationsgeschwindigkeit der Essigsäure größer als bei hohem pH-Wert (pH = 6), aber gleichzeitig nimmt die Toleranz gegenüber der Essigsäurekonzentration im Fermentationsmedium ab (D. PÖHLAND, M. RINGPFEIL, U. BEHRENS, Zeitschr. Allgemein. Mikrobiol. **6** [1966], 387–95). So wurde z. B. bei einer Absenkung des pH-Wertes von 6,8 auf 4,5 eine Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit um 23% festgestellt, aber die Ausbeuten sanken um 18%, wenn die Acetatkonzentration von nahezu Null auf ca. 2 g/l erhöht wurde, bei 5 g/l Acetat im Medium betrug die Verringerung der Ausbeute 36% (M. RYCHTERA, V. GREGR, Contin. Cultiv. Microorganisms, Proc. 7th Symp. Prague, July 10 bis 14, 1978; Prague 1980). Auch auf andere Hefen wirkt die nichtutilisierte Essigsäure stark toxisch. Das Wachstum von *Saccharomyces ellipsoideus* wird bei einer Konzentration von 10 g/l Essigsäure vollständig inhibiert (W. V. GRUESS, Advances Enzymol. **3** [1943], 349 bis 386). Bei *Candida methanolica* und *Torulopsis methanolvenscens* werden den starke Abhängigkeiten der Länge der Lagphasen in diskontinuierlichen Prozessen von der Anfangskonzentration an Acetat festgestellt: bei 18 bis 20 g/l Acetat in der Kulturflüssigkeit betrug die Länge der Lagphase 12 bis 18 h (S. GOTO, R. OKAMOTO, T. KUWAJIMA, A. TAKAMATSU, J. Ferment. Technol. **54** [1976], 213 bis 224).

Der starke Inhibierungseffekt der Essigsäure wird auch durch die Angabe von optimalen Konzentrationen für diskontinuierliche Prozesse unterstrichen: für *Candida utilis* liegen diese Werte bei 0,3 g/l (T. URAKAMI, Hakko Kogaku Kaishi **59** [1981], 501 bis 511). Außer der hohen Empfindlichkeit gegenüber extrazellulärer Essigsäurekonzentrationen weisen die dargestellten Hefen noch einige Nachteile auf: es ist nicht bekannt, ob sie höhere Fettsäure $>(\text{C}_2)$ verwerten bzw. als Cosubstrat tolerieren, außerdem benötigen die Hefen *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces ellipsoideus*, *Candida methanolica* und *Torulopsis methanolvenscens* Wachstumsstoffe (J. A. BARNETT, R. W. PAYNE, D. JARROW, „YEASTS“ characteristics and identification, Cambridge University Press, Cambridge, London, New York, New Rochelle, Melbourne, Sydney, 1983). Verfahren zur Kultivierung von Mischpopulationen, die aus Bakterien und/oder Hefen bestehen können, sind in der Literatur ebenfalls bekannt.

In der Patentschrift DD 146616 wird die Gewinnung von Biomasse aus Gülle mittels einer aus einer biologischen Gülleaufbereitungsanlage eines Schweinemast- und Zuchtkombinates gewonnenen Bakterienmischpopulation, der Hefe *Candida utilis* oder dem methanolutilisierenden Bakterienstamm MB 58 IMET B 346 beschrieben. Als zusätzliches Kohlenstoffsubstrat zur Gülleflüssigkeit werden Methanol, Essigsäure oder Melasse vorgeschlagen. Der Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, daß es auf dem Einsatz einer undefinierten Bakterienmischkultur basiert, deren Selektion von den jeweiligen Standort- und Betriebsbedingungen der Gülleaufbereitungsanlage abhängig, daher wenig reproduzierbar und nicht zur Nacharbeit geeignet ist. Im Falle des Einsatzes von *Candida utilis* bestehen die bereits behandelten Nachteile der geringen Toleranz gegenüber der Essigsäurekonzentration im Fermentationsmedium. Der Bakterienstamm MB 58 IMET B 346 hingegen toleriert zwar Essigsäure in niedrigen Konzentrationen, nutzt aber die Essigsäure nicht zum Wachstum, so daß wertvolle C-Bestandteile der Gülleflüssigkeit nicht genutzt werden.

Eine gemeinschaftliche Kultivierung von Bakterien auf Methanol und einer Hefe mit einem weiteren Kohlenstoffsubstrat wird auch in der Patentschrift DD 141529 vorgeschlagen. Dabei werden Hefen der Gattungen *Candida*, *Torulopsis* und *Hansenula* verwendet.

Die Fermentation in Gegenwart der Hefen hat die Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit der Methanolutilisierenden Bakterien zum Ziel, sie dienen also lediglich als Wachstumsstimulatoren für den Methanolprozeß.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung verfolgt das Ziel, ein Verfahren zur Gewinnung von Biomasse zu entwickeln, das eine stabile Prozeßführung unter unsterilen Bedingungen bei Einsatz verschiedener Kohlenstoffquellen, vorzugsweise Essigsäure enthaltender Substrate, ohne Anwendung von Wuchsstoffen, bei wahlweise hohen extrazellulären Konzentrationen der Kohlenstoffquelle mit hohen Produktivitäten ermöglicht.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, eine Produktionskultur zu selektieren und einzusetzen, die verschiedene Kohlenstoffquellen verwertet, nicht wuchsstoffbedürftig ist, eine große Wachstumsgeschwindigkeit besitzt, gegebenenfalls hohe extrazelluläre Konzentrationen der Kohlenstoffquelle toleriert und mit noch anderen Kohlenstoff-/Mikroorganismenkombinationen gemeinsam kultiviert werden kann.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß Hefestämme der Art *Pichia membranaefaciens* und der Gattung *Metschnikowia* einzeln oder im Gemisch oder zusammen mit einer weiteren Kohlenstoff-/Mikroorganismenkombination in Kultivierungsverfahren verwendet werden, bei denen Hefen oder Hefen und Bakterien auf der Basis von niedermolekularen Kohlenhydraten, Fettsäuren, Alkoholen und Aldehyden als Einzel- oder Kombinationssubstrate kontinuierlich mit einer Durchflußrate von maximal $0,35 \text{ h}^{-1}$ bei einer Temperatur von 20°C bis 45°C und einem pH-Wert von 3,5 bis 6,5 unter Normal oder erhöhtem Druck unter unsterilen Bedingungen kultiviert werden.

Besonders vorteilhaft ist die Verwendung der in der Stammsammlung des ZIMET Jena unter der Bezeichnung H 196 ZIMET 43735 hinterlegten Stammes von *Pichia membranaefaciens* und/oder H 197 ZIMET 43736 von *Metschnikowia* spez.

Die Hefestämme wurden mittels konventioneller Selektionsmethoden aus einem ungeschützten kontinuierlichen Fermentationsprozeß mit Essigsäure als einziger Kohlenstoffquelle bei einer Temperatur von 32°C und einem pH-Wert von 6,3 isoliert.

Die Zusammensetzung der Nährlösung war pro Liter aqua destillata (für 1 g Biomasse) folgende:

H_3PO_4 (80%ige)	0,028 ml
KH_2PO_4	35 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	25 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,785 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1,825 mg
$\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1,20 mg
ZnCl_2	0,322 mg
$\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,036 mg
$\text{NiSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,109 mg
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18 \text{H}_2\text{O}$	0,186 mg
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,883 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,041 mg
H_3BO_3	1,286 mg
$\text{CrCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,077 mg
CH_3COOH (80%ig)	4,4 ml

Stickstoff wurde in Form von Ammoniumionen über die pH-Regelung dem Kulturmedium zugeführt.

Der Hefestamm H 196, taxonomisch bestimmt als *Pichia membranaefaciens*, wurde in der Hinterlegungsstelle der ZIMET-Kultursammlung im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der Akademie der Wissenschaften der DDR hinterlegt und unter der Nummer ZIMET 43735 registriert.

Der Hefestamm H 196 — ZIMET 43735 wird durch folgende Merkmale charakterisiert:

Zellmorphologie:

Nach einem Wachstum von 2 Tagen auf Malzextrakt-Agar pH 5,4 und einer Bebrütungstemperatur von 30°C sind die Zellen oval, länglich-oval oder teilweise zylindrisch. Die Zellen sind abgerundet bis abgeflacht.

Die Zellen liegen einzeln, in Paaren oder in einem Pseudomycel vor.

Die Größe der Zellen beträgt $(2 \text{ bis } 5) \times (4,5 \text{ bis } 8) \mu\text{m}$ bzw. in Flüssigkultur auf Glucose $(3 \text{ bis } 5,5) \times (5 \text{ bis } 10) \mu\text{m}$.

Koloniemorphologie:

— Nach 2 Tagen Wachstum auf Glucose-Agar pH 5,4 bei 30°C werden von dem Stamm kreisförmige, mittelgroße (Durchmesser 0,5 bis 3 mm) filzig-rauhe Kolonien mit einem glatten Rand gebildet, deren Struktur leicht gekörnt ist. Die Farbe ist weiß bis beige und die Form konvex.

— Auf Malz-Agar pH 5,4:

Die Form der Kolonien nach 2 Tagen Wachstum bei 30°C ist leicht unregelmäßig. Der Rand der Kolonien ist mycelartig auswachsend und etwas heller. Der Durchmesser beträgt 0,5 bis 3 mm. Die Form der Kolonien ist flacher und die Struktur grobkörnig. Die Farbe der Kolonien ist weiß bis beige.

Weitere Merkmale:

Die Hefe ist nicht tamin- oder wuchsstoffbedürftig.

Sie wächst in einem Temperaturbereich von 20°C bis 45°C , vorzugsweise aber bei $32\text{--}38^\circ\text{C}$, und in einem pH-Bereich von 3,5 bis 6,5, optimal bei einem pH-Wert von 4,4–5,5. Der Hefestamm H 196 — ZIMET 43735 zeigt eine gute Assimilationsfähigkeit z. B. für folgende Stoffe: D-, L-Lactat, Succinat, Glycerin, Ethanol, Glucose, Lysin, Essigsäure. Für die Kultivierung wird ein Nährmedium eingesetzt, das als Kohlenstoffquelle niedermolekulare Kohlenhydrate bzw. niedere und höhere Fettsäuren in reiner Form oder als Bestandteile enthält.

Der Hefestamm H 197, taxonomisch bestimmt als *Metschnikowia spec.*, wurde in der Hinterlegungsstelle der ZIMET-Kultursammlung im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der Akademie der Wissenschaften der DDR hinterlegt und unter der Nummer ZIMET 43736 registriert. Dieser Hefestamm wird durch folgende Merkmale charakterisiert:

Zellmorphologie:

Nach einem Wachstum von 2 Tagen auf Malzextrakt-Agar pH-Wert 5,4 und einer Bebrütungstemperatur von 30°C sind die Zellen vielgestaltig: sphäroid bis ellipsoid. Die Zellen liegen einzeln vor; nach 2 Tagen beginnende Pseudomycelbildung. Die Größe der Zellen beträgt $(2 \text{ bis } 3) \times (4 \text{ bis } 6) \mu\text{m}$ und in Flüssigkultur auf glucosehaltigem Nährmedium $(3 \text{ bis } 4) \times (5 \text{ bis } 6) \mu\text{m}$.

Koloniemorphologie:

- Nach 2 Tagen Wachstum auf Glucose-Agar pH 5,4 bei 30°C werden vom Stamm kreisförmige, mittelgroße (0,5 bis 2,5 mm Durchmesser) ganzrandige, fein-amorphe, konvexe Kolonien gebildet. Die Oberfläche ist glatt, leicht glänzend, und die Farbe ist weiß. Nach 4 Tagen bildet sich Pseudomycel.
- Die gleiche Beschreibung trifft auch für das Wachstum auf Malz-Agar pH 5,4 zu.

Weitere Merkmale:

Die Hefe ist vitamin- oder wuchsstoffbedürftig. Auf einen Einsatz von Vitaminen oder Wuchsstoffen kann aber verzichtet werden, wenn im Fermentationsprozeß ein weiterer Wuchsstofflieferant — wie z. B. der Hefestamm *Pichia membranaefaciens* H 196 — ZIMET 43735 in Anteilen von 5 bis 50 %, vorzugsweise 10-30 %, gezüchtet wird. Bei Kultivierung des Hefestammes H 197 — ZIMET 43736 auf Gölle, Silosickersaft, Brüdenfett, Melasse, Maisquellwasser vermag dieser ohne zusätzliche Vitamin- oder Wuchsstoffbeigaben zu wachsen. Der Hefestamm H 197 — ZIMET 43736 zeigt eine gute Assimilationsfähigkeit z. B. für folgende Stoffe: Glucose, D-Galaktose, Sorbose, Xylose, Saccharose, Maltose, Cellobiose, Succinat, Citrat, Glycerin, Ethanol, Lysin, Essigsäure.

Für die Kultivierung wird ein Nährmedium eingesetzt, das als Kohlenstoffquelle niedermolekulare Kohlenhydrate bzw. niedere und höhere Fettsäuren in reiner Form oder als Bestandteile von Abprodukten (z. B. Gölle, Silosickersaft, Brüdenfett, Melasse, Maisquellwasser) enthält. Die Kultivierung der Hefe erfolgt in einem Temperaturbereich von 25 bis 40°C, vorzugsweise bei 32–38°C, und in einem pH-Bereich zwischen 4,0 und 6,5, vorzugsweise zwischen 4,5 bis 5,0.

Die aus den Hefen gewonnene Biomasse besitzt ein gutes Sedimentationsverhalten und Qualitätskennzahlen (z. B. Rohproteingehalt 45–48 %) die ihren Einsatz als Futtermittel oder auch als organischen Dünger empfehlen. Durch gemeinsame Kultivierung mit anderen Kohlenstoff-/Mikroorganismen (Bakterien)-Kombinationen kann der Rohproteingehalt der Biomasse noch erhöht werden.

Durch die nachfolgenden Beispiele wird die Erfindung näher erläutert.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

In einen Rührfermentor werden 5 l vorgezuchtetes Impfmateriel der Hefen H 196 — ZIMET 43735 und H 197 — ZIMET 43736 mit einer Konzentration von 3 bis 4 g/l eingesetzt. Die Temperatur wird auf 38°C, der pH-Wert auf 5,5 eingestellt. Das Medium wird mit 75 l/h Luft begast. Es erfolgt eine diskontinuierliche Kultivierung bis zum Erreichen einer Hefekonzentration von 15 g/l. Während dieses Wachstumsprozesses wird der pH-Wert mit 10%iger Schwefelsäure geregelt. Das Nährmedium hatte (für 1 g Biomasse) folgende Zusammensetzung:

pro 1 l aqua destillata:

H ₃ PO ₄ (80%ige)	0,028 ml
KH ₂ PO ₄	35 mg
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	25 mg
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,785 mg
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	1,825 mg
FeCl ₂ · 4 H ₂ O	1,200 mg
ZnCl ₂	0,322 mg
CoSO ₄ · 7 H ₂ O	0,036 mg
NiSO ₄ · 7 H ₂ O	0,109 mg
Al ₂ (SO ₄) ₃ · 18 H ₂ O	0,186 mg
Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	0,883 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,041 mg
H ₃ BO ₃	1,286 mg
CrCl ₃ · 6 H ₂ O	0,077 mg
CH ₃ COOH (80%ige)	4,4 ml

Diese Nährlösung und Ammoniumchlorid werden dem Fermentationsmedium sukzessive so zugesetzt, daß folgende Konzentrationsgrenzen in der Kulturflüssigkeit eingehalten werden: P (als Phosphat): 30 bis 200 mg/l, N (als Ammoniumion): 30 bis 300 mg/l, Essigsäure 0 bis 6 g/l. Anschließend wird weiter kontinuierlich kultiviert mit einer Durchflußrate $D = 0,25 \text{ h}^{-1}$. Die pH-Regelung erfolgt während dieses Prozesses mit 10%iger NH₄OH-Lösung. Die Phosphat-, Ammoniumstickstoff- und Essigsäurekonzentration wird in den o. g. Grenzen gehalten. Unter diesen Bedingungen werden im stabilen kontinuierlichen Prozeß Hefekonzentrationen von 21,9 g/l entsprechend einer Produktivität von 5,48 g/l · h erzielt. Zwischen den beiden Hefen stellt sich ein konstantes Zellzahlverhältnis ein: 30 % H 196, 70 % H 197.

Beispiel 2

Die Kultivierung der Hefen H 196 und H 197 erfolgt wie im Beispiel 1 beschrieben.

Nachdem sich ein stabiler kontinuierlicher Prozeß eingestellt hat, wird die Durchflußrate auf $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$ vermindert und die Nährlösung teilweise durch Gölle (mit ca. 17 g/l wasserdampfllüchtiger Fettsäuren) ersetzt. Dadurch wird ein Nährmedium folgender Zusammensetzung in den Fermentor dosiert: anorganischer Stickstoff: 2,9 g/l, Essigsäure: 19,1 g/l, Propionsäure: 6,9 g/l, Buttersäure: 6,7 g/l, Acetaldehyd: 1,6 g/l. Die pH-Regelung erfolgt mit 10%iger Schwefelsäure. Unter diesen Bedingungen werden im stabilen kontinuierlichen Prozeß Hefekonzentrationen von 21,3 g/l entsprechend einer Produktivität von 3,2 g/l · h

Beispiel 3

Die Kultivierung der Hefen H 196 und H 197 erfolgt wie im Beispiel 1 beschrieben.

Nachdem sich ein stabiler kontinuierlicher Prozeß eingestellt hat, wird die Durchflußrate auf $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$ verringert und die Nährlösung teilweise durch Gülle (mit ca. 17 g/l wasserdampfflüchtiger Fettsäuren) und Silosickersaft (mit 20,4 g/l wasserdampfflüchtiger Fettsäuren) ersetzt. Die Mischung erfolgt so, daß in den Fermentor ein Nährmedium folgender Zusammensetzung dosiert wird: anorganischer Stickstoff: 2,4 g/l, Essigsäure: 19,8 g/l, Propionsäure: 7,0 g/l, Buttersäure: 6,9 g/l, Acetaldehyd: 1,8 g/l. Die pH-Regelung erfolgt mit 10%iger Schwefelsäure. Unter diesen Bedingungen werden im stabilen kontinuierlichen Prozeß Hefekonzentrationen von 22,5 g/l entsprechend einer Produktivität von 3,4 g/l · h erreicht.

Beispiel 4

In einen Rührfermentor werden 5 l vorgezuchtetes Impfmateriel der Kultur MB 58 mit einer Konzentration von 3–4 g/l eingesetzt. Die Temperatur wird auf 32°C, pH-Wert auf 4,1 eingestellt. Das Medium wird mit Luft begast. Es erfolgt eine diskontinuierliche Kultivierung bis zum Erreichen einer Bakterienkonzentration von 20 g/l. Während des Wachstumsprozesses wird der pH-Wert mit 5%iger NH_3 -Lösung geregelt. Die Zusammensetzung der Nährlösung erfolgt wie im Beispiel 1 beschrieben, nur ohne Essigsäure. Nach Erlangen eines stabilen kontinuierlichen Prozesses, wird eine Durchflußrate von $D = 0,125 \text{ h}^{-1}$ eingestellt. Dem Kulturmedium werden danach 500 ml einer Hefesuspension, bestehend aus den Hefen H 196 und H 197, zugesetzt. Das 30%ige Methanolsubstrat wird mit 5% Essigsäure versetzt.

Unter diesen Bedingungen wird in einem stabilen kontinuierlichen Prozeß eine Biomassekonzentration von 25,0 g/l entsprechend einer Produktivität von 3,1 g/l · h erreicht.

Zwischen den Bakterien- und den Hefestämmen stellt sich ein konstantes Zellzahlverhältnis ein: 80% MB 58, 20% H 196 und H 197.