



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **282 821 A7**

5(51) C 12 N 1/28

## PATENTAMT der DDR

---

(21)	AP C 12 N / 315 597 6	(22)	09.05.88	(45)	26.09.90
------	-----------------------	------	----------	------	----------

---

(71) siehe (73)

(72) Zirkler, Walter, Dr. rer. nat.; Pickert, Henning, Dr. sc. nat.; Triems, Klaus, Dr. rer. nat.; Konieczny, Benno, Dr. rer. nat.; Bauch, Joachim, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Winkler, Monika; Krösche, Sabine, Dipl.-Chem.; Hieke, Wolfgang, Dr. rer. nat.; Lippold, Felix, Dipl.-Ing.; Langner, Jürgen, Dipl.-Chem.; Mäder, Siegfried; Petzold, Gerhard, Dipl.-Ing.; Pigorsch, Klaus; Kaiser, Lothar, Dipl.-Ing., DD

(73) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD

---

(54) **Kultivierungsverfahren für Hefen auf n-Alkane enthaltenden Erdöldestillat bzw. Raffinatfraktionen**

---

(55) Eiweißsynthese; Erdöldestillat; Prozeßführung; Produktivität; Rückführung; Prozeßwasser; Erdöldestillatregenerierung; Waschprozesse; Emulsionsneigung; Inhaltsstoffe, Phasentrennung

(57) Die Erfindung betrifft ein Kultivierungsverfahren für Hefen auf n-Alkane enthaltenden Erdöldestillat- bzw. Raffinatfraktionen. Sie kann in der Biotechnologie, vorwiegend in der Futterhefeindustrie, angewendet werden. Erfindungsgemäß wird die Kultivierung der Hefen zur Erzielung einer hohen Produktivität und einer stabilen Prozeßbeherrschung so durchgeführt, indem die beim Regenerierungsprozeß des mikrobiologisch entparaffinierten Erdöldestillats bzw. Raffinats anfallenden sauren und alkalischen Prozeßwässer gemischt werden, die emulsionsverursachenden, komplexbildenden und biozid wirkenden organischen Verbindungen durch Phasentrennung abgetrennt und die so erhaltene wäßrige Phase der vereinigten Waschwässer wieder in den Fermentationsprozeß zurückgeführt wird. Durch die Abtrennung organischer Inhaltsstoffe, speziell Fettsäuren und Stickstoffheterocyclen aus den Prozeßmedien der Erdöldestillatregenerierung können wesentliche prozeßtechnische Vorteile in den Verfahrensstufen Fermentation, Separation und Erdöldestillatregenerierung erreicht werden.

## Patentanspruch:

Kultivierungsverfahren für Hefen auf n-Alkane enthaltenden Erdöldestillat- bzw. Raffinat-Fractionen, bei dem saure und alkalische Prozeßwässer in den Fermentationsprozeß zurückgeführt werden, **gekennzeichnet dadurch**, daß durch das Mischen der sauren und alkalischen Prozeßwässer im Volumenverhältnis 1:30 bis 1:150 und Abscheiden einer Ölphase aus dem Gemisch, ein CSV-Wert in der Rückführwassermischung von 5g O<sub>2</sub>/l bis 9g O<sub>2</sub>/l eingestellt wird.

## Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein verbessertes Verfahren zur Kultivierung von Mikroorganismen auf flüssigen Kohlenwasserstoffen, und kann in entsprechenden industriellen Anlagen zur Erzeugung von mikrobiellen Biomassen genutzt werden.

## Charakterisierung der bekannten technischen Lösungen

Verfahren zur Kultivierung von Mikroorganismen, insbesondere Hefen, auf n-alkanhaltigen Erdöldestillatfraktionen sind bekannt (WP 105 825). Dabei enthält das teilentparaffinierte Erdöldestillat Stoffwechsel- und Thermolyseprodukte aus dem Kultivierungs- bzw. Aufarbeitungsprozeß zur Gewinnung von Biomasse.

Zur Verwendung des mikrobiologisch entparaffinierten Erdöldestillats bzw. Raffinats als Treibstoffkomponente ist es erforderlich, daß die biogenen Inhaltsstoffe, die aus dem Stoffwandlungsprozeß stammen, entfernt werden. Hierzu sind Verfahren bekannt. Gemäß WP 103 921 werden beispielsweise verfahrensspezifische emulsionsverursachende und emulsionsstabilisierende Stoffe mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Phosphorsäure als Extraktionsmittel aus mikrobiell behandelten Kohlenwasserstoffphasen entfernt. Darunter sind oberflächenaktive Substanzen, die dem Prozeß zugesetzt werden, Stoffwechsel- und Reaktionsprodukte, Mikroorganismen sowie Aschebildner zu verstehen.

Die mit dem Extrakt beladene Ablaufphosphorsäure wird dem mikrobiellen Prozeß als Phosphorquelle wieder zugeführt. Dieser Säureextraktion wird im allgemeinen eine Laugen- oder Wasserwäsche nachgeschaltet. Ein hierzu bekanntes Verfahren wird im WP 99 288 beschrieben, in dem Fettsäuren als verunreinigende Bestandteile der einer Weiterverwendung zuzuführenden Kohlenwasserstoffphase mittels einer Ammoniakwasserwäsche entfernt werden. Das ammoniakalische Raffinationsmittel wird als Stickstoffquelle in den Fermentationsprozeß zurückgeführt.

Bei beiden Verfahren werden die sauren und basischen Raffinationsmittel getrennt mit den aus dem mikrobiologisch behandelten Erdöldestillat extrahierten Inhaltsstoffen in den Kultivierungsprozeß zurückgeführt und können dabei außer einer accessorischen Wirkung und der zusätzlichen stofflichen und energetischen Nutzung auch zu Erscheinungen führen, die für den Fermentations- bzw. Aufarbeitungsprozeß, besonders bei langzeitiger Betriebsführung von Nachteil sind. Dabei ist die Neigung der rückgeführten Medien zur Emulsionsbildung und weiteren prozeßtechnischen Beeinträchtigungen besonders hervorzuheben.

Es ist weiterhin bekannt, daß Erdöldestillate bzw. -raffinate Träger basischer Inhaltsstoffe sind, die fungizide, bakterizide, insektizide und algizide Wirkungen aufweisen können, und darüber hinaus die Fähigkeit besitzen, mit vielen Schwermetallen Komplex- und Doppelsalze zu bilden (ROEMPPS Chemielexikon, z. B. Chinolin), wodurch die Mikroorganismen einerseits durch für sie giftige Verbindungen im Wachstum beeinträchtigt bzw. abgetötet werden, andererseits ihr Wachstum durch Mangel an Nähr- bzw. Spurenelementen behindert wird. Eine Abtrennung der Störkomponenten stößt jedoch insofern auf Schwierigkeiten, da die in der flüssigen Kohlenwasserstoffphase vorliegende Konzentration dieser Verbindungen eine wirtschaftliche Entfernung nicht möglich macht.

Es ist ein Verfahren zur Aufarbeitung von Ablaufphosphorsäure, die bei Reinigungsprozessen der Futterhefeproduktion anfällt, bekannt (WP 248 791), welches durch Zugabe von basischen Verbindungen, vorzugsweise von Natronlauge, eine Reinigung der Säure erreicht, wobei die entstehende Phosphatlösung in anderen Bereichen der Volkswirtschaft eingesetzt wird.

Damit wird jedoch keine Lösung des komplexen Anliegens der Effektivitätserhöhung im Gesamtverfahren der Kohlenwasserstoffkonvertierung bei langwährendem Rückführungsprozeß von wäßrigen Prozeßmedien in den Fermentationsprozeß erreicht und technologische Beeinträchtigungen, wie Emulsionsneigung und hohe organische Belastung des Prozeßwassers nicht beseitigt bzw. zurückgedrängt.

## Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, im Verfahren zur mikrobiellen Eiweißsynthese auf Basis flüssiger n-alkanhaltiger Kohlenwasserstoffgemische die Effektivität des Fermentationsprozesses einschließlich der nachfolgenden Aufbereitungsstufen bei Rückführung von Prozeßwässern zu verbessern.

## Wesen der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die den Fermentationsprozeß und die nachfolgenden Aufbereitungsstufen negativ beeinflussenden Inhaltsstoffe weitgehend aus dem Rückführwasser zu entfernen, ohne wesentliche Beeinträchtigung der Wirkung der den Fermentationsprozeß fördernden Substanzen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß im Kultivierungsverfahren für Hefe auf n-Alkane enthaltenden Erdöldestillat- bzw. Raffinatfraktionen, bei dem saure und alkalische Prozeßwässer in den Fermentationsprozeß zurückgeführt werden, die sauren und alkalischen Prozeßwässer im Volumenverhältnis 1:30 bis 1:150 gemischt werden und nach Abscheiden einer Ölphase aus dem Gemisch, ein CSV-Wert in der Rückführwassermischung von 5g O<sub>2</sub>/l bis 9g O<sub>2</sub>/l eingestellt wird. Es wurde gefunden, daß sich im sauren Prozeßwasser oberflächenaktive Substanzen, wie zum Beispiel im Gesamtprozeß eingesetzte Tenside vom Charakter eines Polypropylenoxid-Polyethylenoxid-Mischpolymerisats, biogen gebildete Triglyceride und basische N-Heterocyclus anreichern.

Ebenso wurde gefunden, daß die in den alkalischen Prozeßwässern vorhandenen sauren Komponenten bei Kreislaufführung angereichert werden, wobei ein Teil emulsionsbildende, ein anderer Teil emulsionsstabilisierende Eigenschaften zeigt. Die Überschreitung einer kritischen Konzentration an angereicherten Komponenten in den zurückgeführten Prozeßwässern, die zu einer Beeinträchtigung des Stoffüberganges in der Fermentation und der Phasentrennung in den nachfolgenden Aufbereitungsstufen führt, wird durch Einstellung eines CSV-Wertes im Bereich von 5 bis 9g O<sub>2</sub>/l bei Vermischung der sauren und alkalischen Prozeßwässer und Abscheiden einer Ölphase vermieden. Die Erfindung soll anhand nachfolgender Beispiele näher erläutert werden.

### Ausführungsbeispiele

#### Beispiel 1

In einem 2200 m<sup>3</sup> Tauchstrahlfermentor mit einem Arbeitsvolumen von 1225 m<sup>3</sup> werden in einem kontinuierlichen Verfahren Hefen der Gattung *Candida maltosa* auf einer Erdöldestillatfraktion vom Siedebereich 513 bis 633 K gezüchtet. Der n-Alkangehalt im Erdöldestillat beträgt 14,1%; die eingesetzte Erdöldestillatmenge 15,2%. Die Verweilzeit im Reaktor beträgt 4,2 h und der pH-Wert des Fermentationsmediums liegt bei 4,1. Die Fermentationstemperatur ist 305 K.

Die Nähr- und Spurensalze werden in Form von zwei Nährsalzlösungen in den Fermentationsprozeß eingeführt, und zwar eine Kaliumchloridlösung und eine Nährsalzlösung, bestehend aus den Salzen Mangancarbonat, Magnesiumsulfat, Kupfersulfat, Zinksulfat, Eisen-III-Chlorid, Schwefelsäure und Wasser.

Dem Fermentationsprozeß wird ein Polypropylenoxid-Polyethylenoxid-Mischpolymerisat in einer Konzentration bis zu 200 mg/l Prozeßwasser zugesetzt.

Die zugeführte Trinkwassermenge beträgt 30 m<sup>3</sup>/h.

Die für das Hefewachstum notwendige Stickstoff- und Phosphorversorgung wird durch die Rückführung des Gemisches aus sauren und basischen Prozeßwässern der DK-Regenerierung sowie durch Zugabe von Phosphorsäure und Ammoniakwasser gewährleistet.

Die Aufkonzentrierung des Fermentorablaufes erfolgt durch eine Aufrauhmung des Vierphasengemisches Erdöldestillat/Biomasse/Prozeßwasser/Luft, wobei 80% des abgetrennten Aufrauhwassers in den Fermentor zurückgeführt werden.

Die verbliebene Biomassesuspension wird mit dem vorstehend genannten Tensid versetzt und durch Fliehkrafttrennung in Separatoren zweistufig bei einer Temperatur von 353–358 K vom größten Teil des Erdöldestillates und von weiterem Prozeßwasser bis zu einer Hefetrockensubstanzkonzentration von 21,8% aufkonzentriert. 70% des dabei anfallenden Prozeßwassers werden in den Fermentor zurückgeführt.

Das abgetrennte Erdöldestillat wird in einem mehrstufigen Raffinationsprozeß wieder für seinen Einsatz als Treibstoffkomponente gereinigt. Dabei wird mit Hilfe einer Wasserwäsche mit 20% Trinkwasser das im Fermentations- und Separationsprozeß zugesetzte Tensid auf einen Gehalt von < 250 mg/l abgereichert. In einem anschließenden Drehscheibeextraktionsprozeß wird das Erdöldestillat im Gegenstrom mit 0,6% 75%iger Phosphorsäure behandelt. Die ablaufende Phosphorsäure besteht im wesentlichen aus einem Gemisch von Phosphorsäure, Kohlenwasserstoffen, oberflächenaktiven Substanzen, Zellresten, Mineralstoffen und Wasser sowie basischen Inhaltsstoffen des Erdöldestillates. Die im mikrobiologisch behandelten Erdöldestillat bzw. Raffinat enthaltenen Fettsäuren werden in der folgenden Ammoniakwasserwäsche durch Mischen mit 2% 7%igem Ammoniakwasser in ihre wasserlöslichen Ammoniumsalze überführt.

Mit Hilfe einer zweistufigen Wasserbehandlung (ED-Wasser-Verhältnis 5:1) und einer Sterilisationsstufe (90 bis 120°C) wird das Erdöldestillat weiter gereinigt und an die Raffinerie abgegeben.

Die Ablaufammoniak- und Waschwässer werden als alkalische Prozeßwässer gesammelt und mit dem aus der Phosphorsäurewäsche anfallenden sauren Prozeßwasser im Volumenverhältnis 35:1 gemischt und einem Phasentrennbehälter zugeführt. Der Abtrenngrad der Ölphase erfolgt soweit, daß der CSV-Wert des in die Fermentation zurückgeführten Prozeßmischwassers 5,2g O<sub>2</sub>/l beträgt. Unter diesen Bedingungen wird im Fermentationsprozeß ein Biomasseausstoß von 385 kg Hefetrockensubstanz pro Pumpe des Fermentors und Stunde erreicht.

#### Beispiel 2

Im Vergleich zu Beispiel 1 wird ein weiterer Produktionsversuch unter den beschriebenen Arbeitsbedingungen durchgeführt. Die alkalischen Prozeßwässer werden mit dem aus der Phosphorsäurewäsche anfallenden sauren Prozeßwasser im Volumenverhältnis 130:1 gemischt und einem Phasentrennbehälter zugeführt. Die Abtrennung der Ölphase erfolgt soweit, daß der CSV-Wert des in die Fermentation zurückgeführten Prozeßwassers 8,7g O<sub>2</sub>/l beträgt. Unter diesen Bedingungen wird im Fermentationsprozeß ein Biomasseausstoß von 372 kg Hefetrockensubstanz pro Pumpe des Fermentors und Stunde erreicht. Unter vergleichbaren Fermentationsbedingungen wurde bei getrennter Rückführung der sauren und alkalischen Prozeßwässer in den Fermentationsprozeß ein Biomasseausstoß von 322 kg Hefetrockensubstanz pro Pumpe des Fermentors und Stunde erreicht.