



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

212 745

Int.Cl.³

3(51)

C 12 N 1/16

C 12 N 1/32

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N/ 2463 352

(22) 22.12.82

(44) 22.08.84

(71) ADW DER DDR, BERLIN, DD

(72) MUELLER, ROLAND, DR. RER. NAT. DIPL.-BIOCHEM.; BABEL, WOLFGANG, DR. SC. DIPL.-ING.;
MARKUSKE, KLAUSDIETER, DR. RER. NAT. DIPL.-CHEM., DD;

(54) VERFAHREN ZUR KULTIVIERUNG VON HEFEN AUF SUBSTRATGEMISCHEN

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kultivierung von Hefen auf Substratgemischen auf dem Gebiet der mikrobiologischen Eiweiß- und Produktgewinnung. Das Ziel der Erfindung besteht darin, den bei der simultanen Verwertung von Substratgemischen möglichen positiven Effekt in Bezug auf Ertrag, Geschwindigkeit usw. zu sichern. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, den Biomasseproduzenten so vorzukultivieren, daß eine simultane Verwertung sofort und mit bestem Effekt möglich wird. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe so gelöst, daß bei simultaner Verwertung von Substratgemischen der eingesetzte Hefestamm auf der nichtkohlenhydratischen Komponente vorkultiviert wird.

Titel der Erfindung

Verfahren zur Kultivierung von Hefen auf Substratgemischen

Anwendungsgebiet der Erfindung

- 5 Die Erfindung betrifft ein biotechnologisches Verfahren zur aeroben Kultivierung von Hefen unter Verwendung von nach dem Auxiliarsubstratkonzept kombinierten Substratgemischen. Die Erfindung wird in das Gebiet der mikrobiologischen Eiweiß- und Produktgewinnung eingegliedert und kann in Anlagen zur Futterhefeherstellung genutzt werden.

10 Die Erfindung ist in die IPK C 12 N einzuordnen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

- 15 Die Kultivierung von Hefen auf Zuckern, Kohlenwasserstoffen und Alkoholen als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zur Erzeugung von Eiweiß im technischen Maßstab ist bekannt.

- 20 Als Eiweißproduzenten werden im wesentlichen Candida- und Saccharomyces-Species eingesetzt. Die gleichzeitige Verwertung von Substraten, die nach dem Auxiliarsubstratkonzept (DD-WP 139 870) kombiniert wurden, wie Methanol/Glucose (Th. Egli 1980, Diss. ETH Nr. 6538; L. Eggeling u. H. Sahn 1981, Arch. Microbiol. 130, 362), Ethanol/Saccharose

(E. Feiler et al. 1980, 2. Symp. Soz. Länder Biotechnologie Leipzig, Posterabstracts) und Parex-Paraffin/Saccharose (B. Heinritz et al. 1982, Z. Allg. Mikrobiol. 22, 535) wurde beschrieben, aber in technischen Verfahren bisher nicht
5 praktiziert. Sie hat den Vorteil der besseren Substratausnutzung (Ertragskoeffizient) und der höheren Produktivität. Diese positiven Effekte treten jedoch nicht in jedem Falle bei simultaner Verwertung ein, da auf dem Wege zur simultanen Verwertung Übergangszustände durchlaufen werden, die zu
10 unterschiedlichen physiologischen Finalzuständen führen können und sogar den angestrebten und möglichen ökonomischen Nutzen verhindern.
Die Ursachen sind vielgestaltig und im allgemeinen nicht erkannt.

15 Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, den bei der simultanen Verwertung von Substratgemischen möglichen positiven Effekt in Bezug auf Ertrag, Geschwindigkeit usw. zu sichern.

Darlegung des Wesens der Erfindung

20 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, den Biomasseproduzenten (Hefe) so vorzukultivieren, daß eine simultane Verwertung sofort und mit bestem Effekt möglich wird. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß die Hefe auf der nichtkohlenhydratischen Komponente, z. B. im
25 Falle von Hansenula polymorpha MH 20 auf Methanol als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle nach anfänglicher batch-Kultivierung bei einer Biomassekonzentration von 2 g/l chemostatisch bei $D = 0,22 \text{ h}^{-1}$ weiterfermentiert wird. Nach mindestens 5-maligem Austausch des Fermentor-
30 inhaltes wird durch Zusp eisung des zweiten Substrates, z. B. Glucose - entsprechend dem ermittelten optimalen Mischungsverhältnis - auf Mischsubstratverwertung umge-

stellt. Die simultane Verwertung der Glucose setzt sofort nach Zugabe ein und ein maximaler Mischsubstrateffekt wird gewährleistet.

Die Erfindung wird nachfolgend näher erläutert.

5 Beispiel

Hansenula polymorpha MH 20 wird in einem für aerobe Kultivierung geeigneten Rührfermentor gezüchtet. Die Temperatur beträgt 37 °C, der pH von 4,5 wird durch Zugabe von 0,3 N NaOH geregelt. Die Nährlösung, die zunächst für 15 g/l Biomassetrockensubstanz bilanziert wurde, hat folgende Zusammensetzung (Angaben in g/l):

	NH ₄ Cl	7,63
	KH ₂ PO ₄	2,81
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,59
15	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,055
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,0375
	MnSO ₄ · 3H ₂ O	0,017
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,022
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,004
20	CoCl ₂ · 4H ₂ O	0,0028
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,0026
	H ₃ BO ₄	0,004
	KJ	0,0026
	Biotin	0,00005
25	Thiamin	0,005
	EDTA	0,45

Als Inokulum für die Fermentation wird eine im Schüttelkolben auf Methanol gezüchtete Kultur von Hansenula polymorpha MH 20 in einer Konzentration von 0,2 g/l eingesetzt und in batch-Fermentation bis zu einer Biomassekonzentration von 2 g/l auf 0,5 % Methanol kultiviert.

Daran schließt sich die kontinuierliche Fermentation an. Die Belüftungsintensität wird so eingestellt, daß die Gelöstsauerstoff-Konzentration im Fermentationsmedium 40 % des Sättigungswertes beträgt.

- 5 Zuerst wird die Kultur bei $D = 0,22 \text{ h}^{-1}$ auf 3,2 g/l Methanol kultiviert. Die Biomassekonzentration stellt sich auf den stationären Wert von 0,6 g/l ein, im Fermentorablauf findet man 0,95 g/l Methanol. Nach 5-maligem Austausch des Fermentorinhaltes wird Glucose in einer Konzentration von 0,75 g/l zugemischt. Die stationäre Biomassekonzentration steigt auf 1,14 g/l an und die Methanol-Konzentration im Ablauf sinkt auf 0,15 g/l ab.
- 10 Kultiviert man *Hansenula polymorpha* MH 20 bei einem $D = 0,22 \text{ h}^{-1}$ auf 2,75 g/l Glucose und geht bei dieser Wachstumsgeschwindigkeit dann auf ein Substratgemisch von 2,26 g/l Methanol und 0,75 g/l Glucose über, so wird bei stationären Bedingungen nur eine Biomassekonzentration von 0,73 g/l erhalten und die Methanol-Konzentration im Fermentorablauf steigt auf 0,7 g/l an.
- 15

Erfindungsanspruch

- 5 1. Verfahren zur Kultivierung von Hefen auf Substratgemischen, dadurch gekennzeichnet, daß zur Sicherung eines maximalen Auxiliarsubstrateffektes bei simultaner Verwertung von Substratgemischen der eingesetzte Hefestamm auf der nicht-kohlenhydratischen Komponente, z. B. Methanol, vorkultiviert wird.
- 10 2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß Hansenula polymorpha MH 20 auf einem Methanol/Glucose-Gemisch fermentiert wird.