



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 29 Absatz 1 des Patentgesetzes

ISSN 0433-6461

(11)

1578 65

Int.Cl.³

3(51) C 12 N 1/26

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21) WP C 12 N/ 2231 32

(22) 06.08.80

(45) 15.12.82

- (71) ADW DER DDR, INSTITUT FÜR TECHNISCHE CHEMIE, LEIPZIG;DD;
(72) HEDLICH, ROLF,DR. RER. NAT. DIPL.-BIOL.;WUENSCHÉ, LOTHAR,DR. SC. NAT.;
TRIEMS, KLAUS,DR. RER. NAT. DIPL.-CHEM.;BRENDLER, WALTER,DIPL.-BIOL.;DD;
(73) siehe (72)
(74) ADW DER DDR, INSTITUT FÜR TECHNISCHE CHEMIE, AG PATENTWESEN, 7050 LEIPZIG,
PERMOSERSTRASSE 15

(54) VERFAHREN ZUR GEWINNUNG MIKROBIELLER BIOMASSE

(57)Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erzeugung mikrobieller Biomasse durch kontinuierliche Kultivierung von Mikroorganismenkulturen im ungeschützten Prozeß auf unterschiedlichen Kohlenstoff- und Energiequellen, insbesondere auf Kohlenwasserstoffen, wie z. B. Erdöledestillate, Raffinate und n-Alkangemischen. Der Erfindung liegt die Aufgabe der Erhöhung der Produktivität und der Stabilität des Fermentationsprozesses im unsterilen Prozeß zugrunde. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß geeignete Bakterienstämme simultan mit dem Hefeproduktionsstamm kultiviert werden.

223132

Titel

Verfahren zur Gewinnung mikrobieller Biomasse

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung mikrobieller Biomasse durch kontinuierliche Kultivierung definierter Mikroorganismen im ungeschützten Prozeß auf Substraten, die verschiedene Kohlenstoff- und Energiequellen, insbesondere Kohlenwasserstoffe, wie z.B. Erdöldestillate, Raffinate und n-Alkangemische, enthalten.

10 Die Erfindung ist einzuordnen in die IPK: C 12 B, 1/20.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Kultivierung von Hefen zur Gewinnung von mikrobieller Biomasse auf Kohlenwasserstoffen als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle im ungeschützten Prozeß ist bekannt.

15 Hierbei wird die Biomasse nach bekannten Verfahren erzeugt, z.B. auf der Grundlage von Erdölfraktionen (Destillate, Raffinate) und/oder n-Alkangemischen im Kohlenstoffkettenlängenbereich von C_9 bis C_{35} (DD-PS 105 825) und als Futtermittel in der Tierernährung eingesetzt.

20 Es ist weiterhin bekannt, daß für die schnelle und intensive Verwertung von Kohlenwasserstoffen und anderen mikrobiell verwertbaren Kohlenstoffquellen der Zusatz von Wuchsstoffen (akzessorischen Substanzen) für erforderlich gehalten wird. Nach DD-PS 50 543 erfolgt hierbei die Zugabe
25 von akzessorischen Substanzen durch Verwendung von Hefe-

extrakt, Abfällen der landwirtschaftlichen Produktion, wie Melasse und Schlempe der Fermentationsindustrie, bzw. geringer Mengen wasserlöslicher aliphatischer, leicht assimilierbarer Verbindungen, die entweder Produkte des mikrobiellen Stoffwechsels darstellen oder diesem nahestehen, wie organische Säuren oder Zucker. Die in geringen Mengen zugegebenen akzessorischen Substanzen lösen bekanntlich eine Wachstumsförderung der Mikroorganismen aus. Sie intensivieren bzw. ermöglichen die Umsetzung der Kohlenstoffverbindungen, z.B. der Kohlenwasserstoffe in Biomasse, dienen aber selbst nicht als Kohlenstoffquelle. Die Verwendung von externen Wuchsstoffen bei der Verhefung von Kohlenwasserstoffen im technischen Maßstab ist jedoch ein bedeutender Mangel der bekannten Verfahren. Sie bedeutet zusätzliche technische Aufwendungen und damit ökonomische Belastung des jeweiligen Verfahrens. Außerdem stellen die Wuchsstoffe, wie Hefeextrakt oder die genannten anderen geeigneten Stoffe, günstige Nährmedien für undefinierte Infektionskeime dar.

Es ist, wie bereits festgestellt wurde, bekannt, daß sich im ungeschützten kontinuierlichen Prozeß eine bakterielle Begleitflora einstellt, die unkontrolliert den Prozeßablauf und die Qualität des Endproduktes ungünstig beeinflussen kann. Es ist auch weiterhin bekannt, daß zwischen der Produktionskultur und der Begleitflora vielfältige, z.T. auch symbiontische bzw. mutualistische Wechselbeziehungen auftreten können (HARRISON, D.E.F., 1978: Mixed culture in industrial fermentation processes. Adv. Appl. Microbiol. 24, 129 - 164).

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht in der Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit der Hefen im Fermentationsprozeß bei

gleichzeitiger Sicherung der Stabilität des Prozesses mit weniger Aufwand gegenüber den bisher bekannten Verfahren.

Darlegung des Wesens der Erfindung

- 5 Die Erfindung stellt sich die Aufgabe, durch eine neue Verfahrensführung des Kultivierungsprozesses die für die Intensivierung des Prozesses der Biomasseproduktion erforderlichen wachstumsstimulierenden Substanzen im Prozeß selbst zu erzeugen.
- 10 Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß man in einem ungeschützten Fermentationsverfahren Hefen auf der Basis flüssiger Kohlenwasserstoffe simultan mit ausgewählten Bakterien der Teile 7 und/oder 8 von Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1974) kultiviert.
- 15 Die ausgewählten Bakterien assimilieren keine Kohlenwasserstoffe, so daß sie nicht als Substratkonkurrenten auftreten. Sie assimilieren die Stoffwechsel- und Kooxidationsprodukte des Produktionsstammes sowie die im Prozeß anfallenden Lyseprodukte und entfernen damit
- 20 gleichzeitig im Prozeß anfallende und auf das Wachstum der Hefen inhibierend wirkende Stoffe. Diese ausgewählten Bakterien produzieren wachstumsfördernde Substanzen in solchen Mengen, daß damit die Wachstumsrate der Hefen entscheidend gesteigert wird.
- 25 Erfindungsgemäß wird das Verfahren wie folgt realisiert: In ein bekanntes, für die Kultivierung von Hefen auf flüssigen Kohlenwasserstoffen geeignetes Kulturmedium wird ein bekannter Hefeproduktionsstamm und ein ausgewählter bzw. ein Gemisch ausgewählter Bakterienstämme
- 30 eingeimpft, wobei sich das Verhältnis Hefe:Bakterienzellen bei 10^2 bis 10^4 : 1 bewegt. Die Kultivierung erfolgt kontinuierlich unter ungeschützten Bedingungen nach bekannten Verfahren. Zur Konstanthaltung der Bakterienkonzentration im kontinuierlichen Kultivierungs-
- 35 prozeß werden die Bakterien und das limitierende Sub-

strat nach der Abtrennung der Hefebiomasse aus dem Fermentorablauf mit der wäßrigen Phase zurückgeführt bzw. bei einer Überschreitung der erforderlichen Bakterienkonzentration im Prozeß durch eine kurzzeitige Absenkung des pH-Wertes nach bekannten Verfahren auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

Mit der Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird eine Wachstumsgeschwindigkeit der Hefe von $\mu = 0,32 \text{ h}^{-1}$ erreicht.

- 10 Demgegenüber wird bei einer Kultivierung von Hefen unter Zusatz von Hefeextrakt eine Wachstumsgeschwindigkeit der Hefen von $\mu = 0,28 \text{ h}^{-1}$ erreicht und bei einer Kultivierung von Hefen ohne Zusatz wachstumsfördernder Substanzen nur eine Wachstumsgeschwindigkeit von $\mu = 0,03 \text{ h}^{-1}$ erreicht.
- 15 Der Kultivierungsprozeß verläuft stabil und es ist keine Nachimpfung bzw. externe Zugabe von Wuchsstoffen erforderlich und es verringert sich somit der bei bekannten Verfahren erforderliche Aufwand.

In den nachfolgenden Beispielen wird die Erfindung näher
20 erläutert.

Beispiel 1

- Erlenmeyerkolben (500 ml Fassungsvermögen) mit Belüftungsschikanen werden mit 100 ml einer mineralischen Nährlösung nach Reader beschickt und sterilisiert. Der pH-Wert wird
25 auf 4,2 eingestellt. Nach Zugabe von 15 g/l eines technischen n-Alkangemisches erfolgt das Beimpfen mit der Hefe *Lodderomyces elongisporus*, Stamm IMET H 128 (0,1 g/l HTS) und dem Stamm xB 27 - ZIMET B (0,02 g/l BTS).
- Nach einer Kultivierungszeit von 24 h auf einer Schüttel-
30 maschine bei 30°C wird eine Hefebiomassekonzentration von 6,4 ... 6,8 g/l erreicht. Längere Kultivierung führt zu keiner signifikanten Erhöhung des Wertes. Die Wachstumsgeschwindigkeit beträgt $0,32 \text{ h}^{-1}$.

Beispiel 2

Es wird wie im Beispiel 1 verfahren. Anstelle des ausgewählten Bakterienstammes wird Hefeextrakt (DIFCO yeast extract) zu 0,2 % hinzugefügt. Nach den im Beispiel 1 angegebenen Kultivierungsbedingungen wird eine Hefebiomassekonzentration von 4,4 ... 4,6 g/l und eine Wachstumsgeschwindigkeit von $0,28 \text{ h}^{-1}$ erreicht.

Beispiel 3

Es wird wie im Beispiel 1 verfahren. Die Kulturlösung erhält jedoch weder Hefeextrakt noch einen der ausgewählten Bakterienstämme. Die nach den im Beispiel 1 angegebenen Kultivierungsbedingungen erzielte Biomassekonzentration beträgt 0,15 ... 0,20 g/l, die Wachstumsgeschwindigkeit $0,03 \text{ h}^{-1}$.

Beispiel 4

In einem großtechnischen Rührfermentor mit einem Fassungsvermögen von 250 m^3 bei einem Arbeitsvolumen von 90 t wird in einem einstufigen kontinuierlichen Verfahren der Hefestamm *Lodderomyces elongisporus* IMET H 128 auf einer Erdöldestillat-Fraktion mit dem Siedebereich 220 bis 350°C kultiviert. Der Paraffingehalt im Destillat beträgt 17,2 Masse-%. Die Rührleistung beträgt 200 kW, die Luftmenge $6600 \text{ m}^3/\text{h}$. Die Zusammensetzung des Nährmediums, bezogen auf 1 m^3 , ist folgende:

25 Erdöldestillat	120 kg
Phosphorsäure (75 %)	540 ml
Kaliumchlorid	570 g
Magnesiumsulfat	250 g
Eisenchlorid	15 g
30 Mangansulfat	16 g
Zinksulfat	16 g
Kupfersulfat	1,8 g

Zur Verbesserung des Stoffübergangsverhaltens wird dem Prozeß ein Hilfsstoff vom Charakter eines Propylenoxid-Äthylenoxid-Addukts in einer Konzentration von 650 mg/l wäßrigen Kulturmediums zugesetzt.

- 5 Der pH-Wert wird mit konzentrierter Ammoniaklösung geregelt. Der pH-Wert beträgt $4,1 \pm 0,1$ und die Fermentationstemperatur $33^{\circ}\text{C} \pm 1\%$. Beimpft wird mit einer Suspension des Stammes *Lodderomyces elongisporus* IMET H 128 in einer Menge, daß die Biomassekonzentration bei 1 bis 10 2 kg/m^3 liegt. Gleichzeitig wird eine Suspension, die die Bakterienstämme xB 21 - ZIMET B und xB 27 - ZIMET B zu gleichen Anteilen enthält, zugegeben. Die Anfangskonzentration liegt bei 10^2 bis 10^3 Bakterienzellen/ml. Die Verweilzeit beträgt 4 Stunden. Der Fermentorlauf wird in einem geeigneten Aufrahmgefäß von ca. 60 % 15 des wäßrigen Kulturmediums getrennt. Die Biomassesuspension wird durch Separation zweistufig bei unterschiedlichen Bedingungen entölt und entwässert, wobei Hefetrockensubstanzkonzentrationen im Bereich von 10 bis 20 24 % erreicht werden.

Die abgetrennten wäßrigen Kulturmedien aus der Aufrahmungs- und der Separatorstufe werden in unterschiedlichen Graden, vorzugsweise zwischen 20 und 60 % des gesamten Prozeßwassers, kontinuierlich in den Fermentor 25 zurückgeführt. Bei einer kontinuierlichen Züchtung über einen längeren Zeitraum und bei einer Rückführung von 60 % des wäßrigen Kulturmediums beträgt die Anzahl der Bakterien 10^9 bis 10^{10} Zellen/ml Kulturmedium.

Im kontinuierlich zurückgeführten wäßrigen Medium sind 30 folgende Arten und Mengen von Stoffwechsel- und Lyseprodukten enthalten:

- | | |
|-------------------------|-------------------------------------|
| - Fettsäuren | ca. 150 bis 200 mg/l Prozeßwasser |
| - Polysaccharide | 900 bis 1500 mg/l Glukose/l |
| - Nukleinsäuren | 300 bis 850 mg/l |
| 35 - Eiweißverbindungen | 250 bis 650 mg N _{org.} /l |

Beim Züchtungsprozeß beträgt die Produktivität 3,8 kg t/h. Der Produktionsstamm verhält sich unter den gewählten Bedingungen sehr stabil, ein Nachimpfen der Kultur mit frischer Hefe ist nicht erforderlich. Die Biomassesuspension wird in einem Sprühtrockner getrocknet, mit einem selektiven Extraktionsmittelgemisch von Lipiden und von nichtbiogenen Bestandteilen befreit. Der Rohproteingehalt der gewonnenen Hefe beträgt 65 %, der Restkohlenwasserstoffgehalt 0,1 %.

10 Beispiel 5

In einem Rührfermentor von 30 l wird der Hefestamm *Lodderomyces elongisporus* IMET H 128 bei einem pH-Wert von 4,2, einer Temperatur von 32 bis 34°C und einer Luftzufuhr von 3,6 l/l.min gezüchtet. Als Substrat dient ein n-Alkangemisch der Kettenlänge C₉ bis C₂₄, vorzugsweise C₁₂ bis C₁₈ aus einem Erdöl der Erdölleitung "Freundschaft". Die Siedelage der zugrunde gelegten Destillatfraktion beträgt 230 bis 360°C.

Der Laboratoriumsrührfermentor wird mit dem Hefestamm

in einer wäßrigen Suspension der Konzentration von 1 bis 2 g/kg angeimpft. Außerdem enthält die Suspension den Bakterienstamm xB 21 - ZIMET B in einer Anfangskonzentration von 10² bis 10⁴ Bakterienzellen/ml.

Das Verfahren wird mit einer Verweilzeit von 5 h durchgeführt. Die Menge an n-Alkangemisch im Kulturmedium beträgt 3,6 Masse-%.

Das wäßrige, anorganische Nährmedium enthält in Form von NH₄OH, H₃PO₄, KCl und Sulfaten:

	N	2500 mg	Zn	8 mg
30	P ₂ O ₅	1400 mg	Mn	8 mg
	K	650 mg	Cu	1,2 mg
	Mg	55 mg	H ₂ O	auf 1 l
	Fe	10 mg		

Der Energieeintrag beträgt 10 W/kg Fermentorinhalt. Die Hefetrockensubstanzkonzentration beträgt 14 bis 17 g/l, die Produktivität 3,0 kg/t.h und die Ausnutzung der n-Alkane 95 %.

- 5 Die Aufkonzentrierung des Fermentorauslaufes erfolgt über eine sogenannte Aufrahmrinne, wobei ein Wasserabscheidegrad von 70 % erreicht wird. Das abgetrennte Prozeßwasser wird ohne Sterilisation in den Fermentationsprozeß kontinuierlich zurückgeführt. Hierbei zeigt
- 10 sich in Abhängigkeit vom Rückführungsgrad und von der Dauer des Prozesses eine stabile Ausschüttung von Stoffwechsel- und Lyseprodukten und entsprechende Bakterienentwicklung. Die Stabilität und Aktivität der Produktionskultur ist dadurch gewährleistet. Ein Nach-
- 15 impfen des Hefestammes entfällt. Nach einer konventionellen Aufarbeitung der Biomassesuspension wird eine Biomasse mit einem Rohproteingehalt von 60 % und einem Kohlenwasserstoffgehalt von 0,1 % erhalten.

Erfindungsanspruch

- 5 1. Verfahren zur Gewinnung mikrobieller Biomassen durch kontinuierliche Kultivierung von Hefen im ungeschützten Prozeß auf der Basis flüssiger Kohlenwasserstoffe als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle in Gegenwart eines freien Sauerstoff aufweisenden Gases, dadurch gekennzeichnet, daß die Hefen simultan mit den Bakterienstämmen xB 21 - ZIMET B und/oder xB 27 - ZIMET B kultiviert werden.
- 10 2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß die simultan zum Produktionsstamm kultivierten Bakterien mit der wäßrigen Phase in den Fermentationsprozeß zurückgeführt und somit auf dem wirksamen Konzentrationsniveau gehalten werden.
- 15 3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration der bakteriellen Simultankultur durch zeitweilige Änderung des pH-Wertes im Fermentationsmedium geregelt wird.