DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

(12) **Wirtschaftspatent**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **234 029 A1**

4(51) **C 12 N 1/28**

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 N / 272 573 5	(22)	15.01.85	(44)	19.03.86

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD
(72) Müller, Hans-Georg, Dr. sc. Dipl.-Biol.; Blasig, Rosel, Dipl.-Biol.; Huth, Joachim, Dipl.-Biol.; Honeck, Horst, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Nowak, Siegfried, Prof. Dr. habil. Dipl.-Chem.; Günschel, Hubert, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Bauch, Joachim, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Heidenreich, Günter, Dipl.-Ing.; Eckart, Volker, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Lübbert, Gustav-Adolf, Dipl.-Chem.; Dzingel, Gerhard, Dipl.-Chem., DD

(54) Verfahren zur biotechnologischen Nutzung paraffinhaltiger Substrate der Petrolchemie

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Nutzung paraffinhaltiger Substrate. Sie hat das Ziel, ein Verfahren zu entwickeln, bei dem paraffinhaltige Substrate eingesetzt werden, die in anderen Industriezweigen als Abprodukte anfallen. Erfindungsgemäß werden als paraffinhaltige Substrate Hydrospaltrückstände der Hydrospaltung von Vakuumdestillaten von Erdöl mit einem Siedepunkt > 350 °C, einem n-Alkangehalt von mindestens 10 % und einer Kettenlänge von etwa 15 bis 50 C-Atomen direkt oder gelöst eingesetzt. Anwendungsgebiet ist die mikrobiologisch-biotechnologische Industrie, speziell die mikrobiologische Erdölkonvertierung.

ISSN 0433-6461

5 Seiten

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur biotechnologischen Nutzung paraffinhaltiger Substrate der Petrolchemie, wobei Mikroorganismen in einem Mineralsalzmedium in bekannter Art und Weise in Gegenwart eines molekularen Sauerstoff enthaltenden Gases und einer paraffinhaltigen C-Quelle bei intensiver Durchmischung aller Phasen kultiviert werden und mikrobielle Biomasse, Enzyme und Stoffwechselprodukte oder Metabolite sowie die partiell oder vollständig entparaffinierte organische Phase zur weiteren Nutzung zurückgewonnen werden, **dadurch gekennzeichnet,** daß als paraffinhaltige Substrate Hydrospaltrückstände der Hydrospaltung von Vakuumdestillaten von Erdöl mit einem Siedepunkt > 350 °C, einem n-Alkan-Gehalt von mindestens 10 % und einer Kettenlänge von 15 bis 50 C-Atomen eingesetzt werden.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß die paraffinhaltigen Substrate dem Fermenter direkt oder gelöst in einer vom Mikroorganismus vollständig, partiell oder nicht verwertbaren organischen Phase zugeführt werden.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet,** daß die organische Phase, die zum Lösen der paraffinhaltigen Substrate eingesetzt wird, vorzugsweise teilweise oder vollständig aus in herkömmlichen Verfahren eingesetzten Erdölfraktionen bzw. -destillaten, oder aus der teilweise oder vollständig entparaffinierten organischen Phase, die aus dem Fermenterablauf zurückgewonnen wurde, oder einem Gemisch aus beiden Komponenten besteht.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Nutzung paraffinhaltiger Substrate auf Erdölbasis mit Hilfe von Mikroorganismen. Neben der Produktion von Futtereiweiß gestattet das Verfahren die Herstellung bzw. Isolation spezieller Enzyme und Stoffwechselprodukte der verwendeten Mikroorganismen wie Lipiden, Steroiden, Nukleotiden, Vitaminen, Amino-, Fett- und anderer organischer Säuren sowie die Rückgewinnung der als Substrat eingesetzten Fraktion in vollständig oder partiell entparaffinierter Form. Das Verfahren findet Anwendung in der mikrobiologisch-biotechnologischen Industrie und Forschung, speziell in der mikrobiologischen Erdölkonvertierung.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Anwendung mikrobiologisch-biotechnologischer Verfahren zur Produktion von Futtereiweißpräparaten bzw. spezieller Enzyme, Metabolite oder anderer Zellinhaltsstoffe hat in den letzten Jahrzehnten große Bedeutung erlangt. Nicht unwesentlich ist dabei der Anteil der Verfahren, die auf der Verwertung von Erdöl bzw. Destillaten oder Fraktionen davon als Kohlenstoff- und Energiequelle für das Wachstum der Mikroorganismen beruhen.

Bei der Entwicklung entsprechender Verfahren galt bisher das Hauptaugenmerk der mikrobiellen Entparaffinierung von Gasöl-, Diesel- und Petroleumfraktionen des Erdöls bzw. der Verwertung der bei der chemischen Entparaffinierung dieser Fraktionen anfallenden Paraffingemische, die vorzugsweise n-Alkane mit Kettenlängen von etwa 10–20 C-Atomen enthalten:

- British Petroleum Company Ltd., London: DD-AP 50 519; 50 521; 50 522; 52 325; 55 304; 55 632 und 64 674; GB-PS 1 059 887; 1 168 832; 1 206 466; 1 241 957 und 1 332 912
- Societe nationale elf aquantaine Paris et Institut Francaise du Petrole Ruell Malmaison, Frankreich: GB-PS 1 500 430
- Hasegawa Company Ltd., Tokyo, Japan: GB-PS 1 365 689
- Kyowa Hakko Kogyo Co Ltd. Tokyo, Japan: GB-PS 1 063 250 und 1 211 771
- Asahi Kasei Kabushiki Kaisha, Osaka, Japan: GB-PS 1 223 946.

Bedingt durch die Verknappung und Verteuerung von Rohöl auf dem Weltmarkt wurden in den letzten Jahren verstärkt Verfahren entwickelt, bei denen billigere und von anderen Zweigen der petrolchemischen Industrie in geringerem Maße beanspruchte Fraktionen, vorzugsweise solche mit höheren Siedelagen eingesetzt werden, die n-Alkane mit Kettenlängen bis zu 35 C-Atomen enthalten und die von den verwendeten Mikroorganismen mit ähnlich guten ökonomischen Koeffizienten umgesetzt werden.

Der höhere Gehalt an langkettigen n-Alkanen wird vorzugsweise dadurch erzielt, daß bei der Herstellung der als Substrat zu verwendenden Erdölfraktion sowohl die untere als auch die obere oder beide Siedegrenzen zu höheren Temperaturen hin verschoben werden. Die in entsprechenden Patenten beanspruchten maximalen Kettenlängen für n-Alkane erreichen

- 22 C-Atome: Atlantic Richfield Company, Pennsylvania, USA (GB-PS 1 274 885)
  VEB PCK Schwedt, DDR und Wissenschaftliches Allunionsforschungsinstitut für die Synthese von Eiweißstoffen, Moskau, SU (DD-WP 151 963)
- 23 C-Atome: Hoechst AG, BRD (GB-PS 1 452 019)
- 25 C-Atome: Kyowa Hakko Kogyo Co Ltd. Tokyo, Japan (BRD-OS 1 642 631)
- 35 C-Atome: VEB PCK Schwedt, DDR und Wissenschaftliches Allunionsforschungsinstitut für die Synthese von Eiweißstoffen, Moskau, SU (DD-WP 155 080).

Ein anderer Trend zur Verhefung sehr langkettiger n-Alkane besteht in der Einbringung fester n-Alkane in den Fermenter, vorzugsweise in reiner Form oder als Gemisch in mechanisch zerkleinerter Form, gelöst in nicht toxischen oder leicht flüchtigen oder vom Mikroorganismus verwertbaren Lösungsmitteln oder in emulgierter oder dispergierter Form (DD-WP 243 200 und 256 789; US-PS 3 337 413).

Von entscheidendem Nachteil für diese Entwicklungen ist es, daß einerseits der relative n-Alkangehalt von Rohölfraktionen mit steigender Kettenlänge stark abnimmt und daß andererseits die Löslichkeit bzw. Emulgierbarkeit fester n-Alkane sehr gering ist.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur biotechnologischen Nutzung paraffinhaltiger Substrate zu entwickeln, die in anderen Industriezweigen als Abprodukte anfallen. Die herkömmlichen Substrate bzw. Benzin-, Petroleum-, Diesel- und Gasölfraktionen sollen dadurch in stärkerem Maße für die Verwendung in anderen Zweigen der petrolchemischen Industrie freigesetzt werden. Gleichzeitig sollen die paraffinhaltigen Substrate nach partieller oder vollständiger Entparaffinierung zur Weiterverwendung in der Petrolchemie eingesetzt werden können.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Mikroorganismen werden in bekannter Art und Weise in einem Mineralsalzmedium, das alle für das Wachstum erforderlichen Mineralsalze enthält, in Gegenwart eines molekularen Sauerstoff enthaltenden Gases und einer organischen Phase, die als Wachstumssubstrate n-Alkane in gelöster Form enthält, bei intensiver Durchmischung kultiviert. Die Mikroorganismen sind unter

diesen Bedingungen befähigt zu wachsen, d. h. Eiweiße und andere Zellbestandteile, Enzyme mit speziellen katalytischen Funktionen sowie zahlreiche Metabolite zu synthetisieren.
Erfindungsgemäß werden dabei als n-Alkane ganz oder teilweise paraffinhaltige Substrate eingesetzt, die aus Hydrospaltrückständen der Hydrospaltung von Vakuumdestillaten von Erdöl mit einem Siedepunkt > 350 °C, einem n-Alkangehalt von mindestens 10 % und einer Kettenlänge von ca. 15 bis 50 C-Atomen bestehen.
Sie entstehen beim Leuna-Verfahren zur Hydrospaltung von Vakuumdestillat (Schneider et al. Chem. Techn. **33** (10) 508–512, 1981), das eingeführt wurde, um die stoffliche Verwertung des Erdöls durch tiefere Spaltung zu verbessern und dadurch den im herkömmlichen Verfahren anfallenden Heizölanteil zu senken.
Für die bei dem genannten Prozeß anfallenden Hydrospaltrückstände (ca. 12 % des eingesetzten Vakuumdestillates) gibt es gegenwärtig zwar praktikable Lösungen zur anderweitigen Nutzung (MÜLLER, E., Mitteilungsblatt Chemische Gesellschaft, Dezember 1984), die Möglichkeiten zu einer biotechnologischen Hochveredelung dieser Fraktion wurde bisher jedoch noch nicht geprüft.
Die Zugabe der paraffinhaltigen Substrate zum Fermenter erfolgt erfindungsgemäß direkt oder gelöst. Hochviskose und feste paraffinhaltige Substrate werden vor ihrer Zugabe zum Fermenter in einer organischen Phase gelöst, die von den verwendeten Mikroorganismen vollständig, teilweise oder nicht verwertet werden kann, auf diese aber nicht toxisch oder hemmend wirkt.
Bevorzugt werden die paraffinhaltigen Substrate vor der Zugabe zum Fermenter in einer Erdölfraktion, vorzugsweise einer Benzin-, Petroleum-, Diesel- oder Gasölfraktion gelöst, wie sie in bisher üblichen Verfahren zur Futtereiweißproduktion auf Erdölbasis eingesetzt wurden, um dadurch die genannten Fraktionen partiell durch die genannten paraffinhaltigen Substrate zu ersetzen. Die aus dem Fermenterablauf abgetrennte entparaffinierte organische Phase wird teilweise oder vollständig wiederverwendet, um die als Substrat dienenden paraffinhaltigen Substrate zu lösen und in dieser Form in den Fermenter einzubringen. Dadurch wird eine weitere Senkung des Bedarfes an den herkömmlichen Substratfraktionen erzielt. Eine weitere technologische Variante ist die Zudosierung der C-Quelle in Form von 2 Teilströmen direkt in den intensiv durchmischten Fermenter, wobei der eine Teilstrom aus bisher üblichen und zu substituierenden Erdölfraktionen besteht und der andere Teilstrom die paraffinhaltigen Hydrospaltrückstände enthält.
Der Vorteil des Verfahrens besteht darin, daß paraffinhaltige Substrate verwendet werden, für deren Veredlung gegenwärtig noch keine praktikable biotechnologische Lösung gefunden werden konnte. Durch den Einsatz dieser paraffinhaltigen Substrate können bisher üblicherweise eingesetzte Rohstoffe partiell oder vollständig für andere Nutzungszwecke freigesetzt werden. Außerdem können diese paraffinhaltigen Substrate nach partieller oder vollständiger Entparaffinierung zur Weiterverwendung in der Petrolchemie eingesetzt werden. Die Erfindung wird nachstehend an einigen Beispielen erläutert.

Ausführungsbeispiel

Candida maltosa EH 15 D wurde in einem Mineralsalzmedium, das NH_4^+-Ionen als Stickstoffquelle und alle anderen für das Wachstum erforderlichen Nährelemente im Überschuß, sowie einen Zusatz von 0,1 % Difco-Bacto-Yeast-Extract enthielt, auf n-Alkan-haltigen Kohlenwasserstoffgemischen bis zur C-Limitation des Wachstums im Batch-Verfahren kultiviert. Die Reaktionsbedingungen waren wie folgt:
- Fermenter mit Schikanen, Gesamtvolumen 10 l,
  beschickt mit 4,0 kg Nährsalzlösung und 0,5 kg Kohlenwasserstoffgemisch.
- Rührung 1800 ± 100 rpm
- Temperatur 32 ± 0,5 °C
- Belüftung 0,75 ± 0,05 VVm
- *p*H-Statierung up-scale mit 2,5 N NaOH auf *p*H 4,0 + 0,05–0,3
- Inokulum ca. 40 ml einer auf Parex II (einem n-Alkangemisch im Kettenlängenbereich von 10 bis 20 C-Atomen) angezogenen Schüttelkultur, entsprechend einem Starttiter von ca. 3×10^6 Zellen/ml.

Als Parameter wurden bestimmt:
- Protonenausscheidung der Kultur aus dem Laugeverbrauch zur *p*H-Statierung als komplexes on-line-Signal zur Bestimmung von Substratverbrauch und Biomassezuwachs nach DD-PS C 12 Q / 252 251 6.
- Biomassetrockengewicht nach Filtration auf Membranfilter, Waschen mit 2×5 ml Isoporopanol:Hexan:1 N H_2SO_4 (40:40:1) zur Ablösung von anhaftenden Restalkanen und anschließender Vakuumtrocknung.
- Proteingehalt der Biomasse nach LOWRY et al. (1951)
- Abnahme der Konzentration der freien NH_4^+-Ionen mit einer modifizierten Kjeldahl-Methode
- Abnahme der n-Alkan-Konzentration nach Phasentrennung, Harnstoffadduktion der organischen Phase mittels Gaschromatographie.

Als Substrate dienten eine Roh-Dieselkraftstoff-Fraktion (Roh-DK), ein Vakuumdestillat-Hydrospaltrückstand (VD-HSR) sowie Gemische aus beiden Komponenten, bzw. VD-HSR gelöst in biologisch entparaffiniertem Roh-DK (BEP):

	Siedebereich	n-Alkangehalt	Kettenlängenbereich
Roh-DK	240–360 °C	12,3 %	C_{9-24}-Alkan
BEP	240–360 °C	kleiner 1 %	–
VD-HSR	größer 350 °C	15 %	C_{20-40}-Alkan

Alle untersuchten Kenngrößen – Trockengewichts- und Proteinzuwachs sowie n-Alkan- und NH_4^+-Verbrauch – korrelieren während des gesamten Versuches linear mit der Protonenausscheidung der Kultur. Die Ertragskoeffizienten und der Proteingehalt der Biomasse sind für ausgewählte Beispiele in Tabelle 1 zusammengefaßt.
Bei ca. 50%iger Substitution von Roh-DK durch VD-HSR wird eine um etwa 10 % höhere spezifische Biomassebildung (g Trockengewicht/g verbrauchtes n-Alkan) erreicht. Dabei kommt es zusätzlich zu einer leichten Erhöhung des Protein- bzw. Rohproteingehaltes der Biomasse. Bei vollständigem Ersatz des Roh-DK durch VD-HSR (Tab. 1, Nr. 4) werden etwa vergleichbare Werte wie mit Roh-DK erreicht.

Tabelle 1 Biomassebildung durch C. maltosa EH 15 D auf technischen Substraten (DW = Trockengewicht)

Lfd. Nr.	Substrat (g)		Ertragskoeffizienten			Proteingehalt der Biomasse (%)	
	Roh-DK	VD-HSR	Y_H $\frac{g\ DW}{Mol\ H^+}$	Y_{Alkan} $\frac{g\ DW}{g\ Alkan}$	Y_N $\frac{g\ DW}{g\ N}$	Protein n. Lowry	Roh-protein
1	500	–	140	0,85	11,0	48,6	56,8
2	400	100	127	0,77	9,9	56,7	63,0
3	250	250	124	0,98	10,0	54,8	62,5
4	–	200	128	0,67	10,7	46,1	54,4

Das Wachstum erfolgt unter Ausnutzung des gesamten n-Alkan-Spektrums, das in VD-HSR enthalten ist. Die n-Alkane mit 12 bis 30 C-Atomen werden etwa gleich schnell verwertet und gleich gut ausgenutzt. Der Umsatz von n-Alkanen mit mehr als 30 C-Atomen ist mit zunehmender Kettenlänge langsamer, und diese Substrate verbleiben in etwas größeren Restkonzentrationen im Medium (Abb. 1 und 2).

Es ist folglich möglich, beim Einsatz des wesentlich kostengünstigeren Vakuumdestillat-Hydrospaltrückstandes (VD-HSR) im Gemisch mit Roh-DK als Substrat zur SCP-Produktion die gleiche Menge an Protein aus einem verringerten Produktstrom an Biomasse zu gewinnen. Dabei wird der Gesamtsubstratverbrauch deutlich verringert und zusätzlich ein Teil der herkömmlicherweise als Substrat eingesetzten Roh-Diesel-Fraktion durch ein billigeres Abprodukt ersetzt.

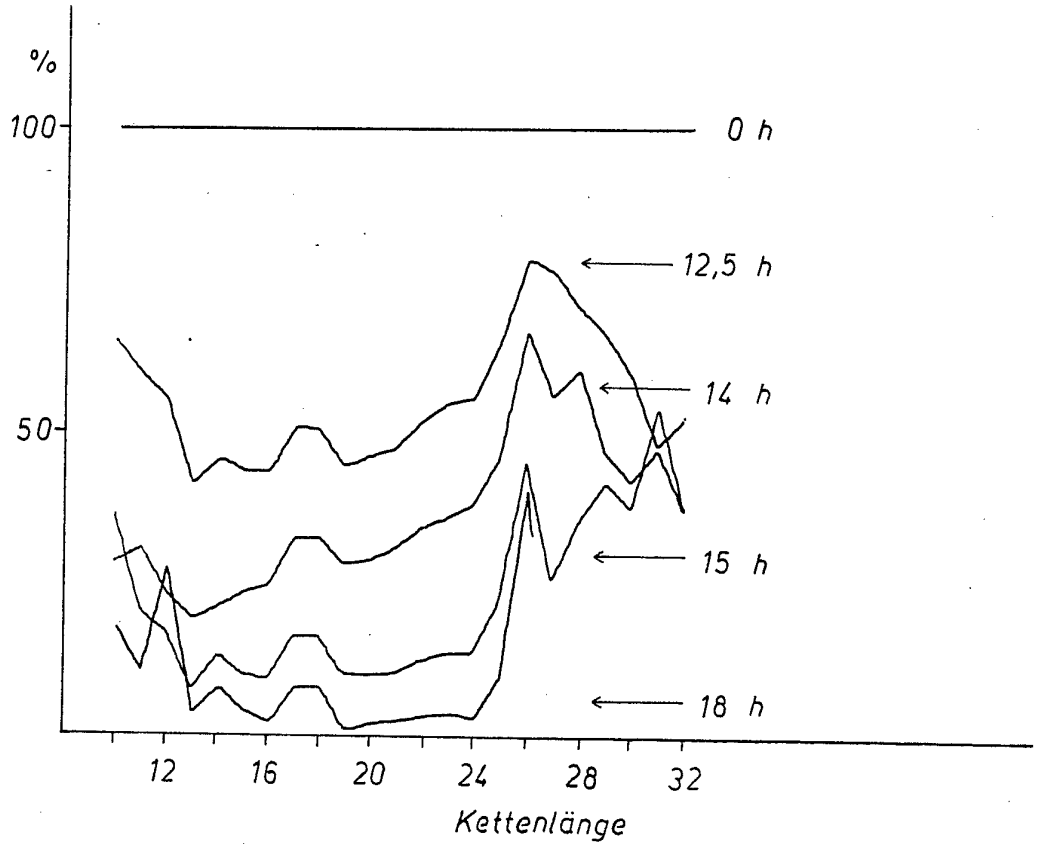


Abb. 1 Zeitlicher Verlauf der Verwertung der einzelnen n-Alkane aus Roh-DK bei der Batch-Fermentation. Gaschromatographische Analyse nach 1maliger Harnstoffadduktion (n-Alkangehalt zu Fermentationsbeginn [0 h] = 100 %)

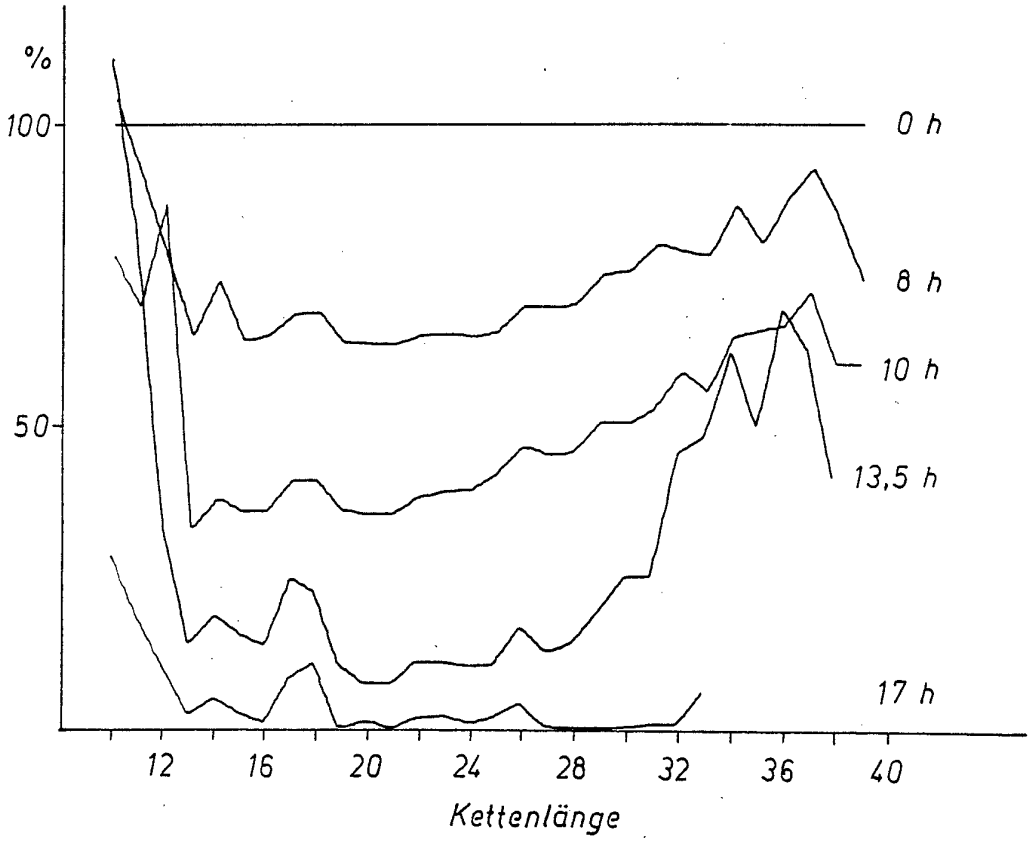


Abb. 2 Zeitlicher Verlauf der Verwertung der einzelnen n-Alkane aus einem Gemisch von Roh-DK und VD-HSR (1:1). Analyse und Auswertung s. Abb. 1.