

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK
AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

PATENTSCHRIFT 149 081

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

Int. Cl.³

(11) 149 081 (44) 24.06.81 3(51) C 12 N 1/26
(21) WP C 12 D / 219 008 (22) 12.02.80

-
- (71) VEB Chemieanlagenbaukombinat Leipzig/Grimma, Stammbetrieb, Betrieb Wissenschaftlich-Technisches Zentrum, Außenstelle Böhlen, DD
- (72) Beck, Dieter, Dipl.-Chem.; Biedermann, Wolfgang, Dr. Dipl.-Chem.; Franke, Günter, Dipl.-Ing.; Heinze, Günther, Dr. Dipl.-Chem.; Listewnik, Hans-Frieder, Dipl.-Ing.; Placht, Karl, Dipl.-Ing., DD
- (73) siehe (72)
- (74) VEB Chemieanlagenbaukombinat Leipzig/Grimma, Stammbetrieb, Betrieb Wissenschaftlich-Technisches Zentrum, Außenstelle Böhlen, Büro für Schutzrechte, 7202 Böhlen
-

(54) Verfahren zur Gewinnung von Einzellerprotein

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von mikrobiellem Eiweiß, vorzugsweise Einzellerprotein auf der Basis von Kohlenwasserstoffen und Methanol. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, durch geeignete Maßnahmen und Einsatzprodukte die Stoffumwandlung so durchzuführen, daß eine höhere Ausnutzung der Einsatz- und Hilfsprodukte ermöglicht wird. Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß eine in an sich bekannter Weise auf Erdöldestillat bzw. Kohlenwasserstoffen gezüchtete Biomasse extraktiv mit Methanol oder einem Methanol-Kohlenwasserstoffgemisch, wobei die Kohlenwasserstoffe im Siedebereich von 40 bis 120 °C liegen können, gereinigt wird und daß dieses zur Extraktion verwendete Methanol vom Extrakt bzw. dem Kohlenwasserstoffgemisch durch Zugabe von Wasser getrennt wird und zur Erzeugung einer zweiten Biomasse als Substrat eingesetzt wird. Die bei der Aufkonzentrierung der Biomasse anfallenden Stickstoffverbindungen, Nährsalze und Spurenelemente enthaltenden wäßrigen Phasen werden ganz oder teilweise als Einsatzwasser für die Biomassegewinnung genutzt. Gleichfalls wird der in hydrophilen Lösungsmittel gelöste Extraktteil als Fermentationshilfsmittel zur zweiten Biomassegewinnung genutzt.

a) Titel der Erfindung

Verfahren zur Gewinnung von Einzellerprotein

b) Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von
5 mikrobiellem Eiweiß, vorzugsweise Einzellerprotein auf
der Basis von Kohlenwasserstoffen und Methanol.

Die Erfindung kann in Anlagen eingesetzt werden, in
denen Biomasse mittels Lösungsmittlextraktion unter
Verwendung von Methanol oder Lösungsmittelgemischen,
10 deren eine Komponente Methanol ist, gereinigt wird.
Die Erfindung ist einzuordnen in die IPK C 12d 13/06

c) Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die durch Züchtung auf kohlenwasserstoffhaltigen Sub-
straten (z. B. Erdöldestillatfraktionen im Siedebe-
15 reich des Dieselkraftstoffes oder reine n-Alkane) an-
fallenden Bakterien oder Hefen enthalten nach ihrer
Ernte aus dem Fermentorablauf, der Anreicherung und
gegebenenfalls Trocknung immer noch unerwünschte
Substratanteile, d. h. Kohlenwasserstoffe und bio-
20 gene lipophile Zellinhaltsstoffe, die vor Verwen-
dung dieser Biomassen als Futtermittel bzw. vor ihrer
Weiterverarbeitung, z. B. zur Herstellung von Eiweiß-
isolaten, entfernt werden müssen.

Die Entfernung dieser Substanzen kann nach ver-
schiedenen Verfahren erfolgen, die entweder nach dem

Waschen und/oder Separieren der wässrigen Mikroorganismensuspension oder nach dem Trocknen eine Extraktion beinhalten.

5 Es sind verschiedene Verfahren bekannt, in denen die feste Biomasse nach dem Trocknen zur Entfernung der Kohlenwasserstoffe und unerwünschten lipophilen Stoffwechselprodukte mit Lösungsmitteln extrahiert wird. Als Extraktionsmittel dienen demgemäß vorzugsweise Kohlenwasserstoffe oder polare Lösungsmittel einzeln
10 oder in Mischung.

Nach DD-AP 53 984, DD-WP 108 114, DD-WP 108 320 und DD-AP 64 018 sind die zur Verwendung vorgeschlagenen Lösungsmittel neben Hexan, Heptan und leichten bis
15 mittleren Benzinfraktionen als unpolare Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelkomponenten vor allem die niederen Alkohole C₁ bis C₃, Aceton und Chlorkohlenwasserstoffe als polare Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelanteile bekannt.

20 Zwei moderne Verfahren zur Entfernung von Kohlenwasserstoffen und biogenen lipophilen Zellinhaltsstoffen durch Extraktion der getrockneten Biomassesuspension beruhen darauf, daß entweder Mischungen aus Kohlenwasserstoffen und Methanol oder reines Methanol als Extraktionsmittel angewendet wird. Die Verwendung
25 dieses Lösungsmittels bzw. Lösungsmittelgemisches führt zu einer nahezu vollständigen Entfernung der genannten Fremdstoffe aus der getrockneten Biomasse. Den bekannten Verfahren zur Reinigung getrockneter Biomassen ist gemeinsam, daß nach der Extraktion eine
30 destillative Aufarbeitung der Miszella erfolgt und die reinen Lösungsmittel wieder in den Prozeß zurückgeführt werden. Dadurch tritt eine starke energetische Belastung des Gesamtprozesses auf. Speziell die polaren Lösungsmittelbestandteile, die für eine effektive Reinigungsoperation unbedingt erforderlich sind, besitzen hohe Verdampfungswärmen, die zum Beispiel bei Methanol etwa das Dreifache der Verdampfungs-

wärme von Kohlenwasserstoffen beträgt.

Weiterhin treten hohe Verluste an Salzen und wasserlöslichen Zellinhaltsstoffen auf.

d) Ziel der Erfindung

- 5 Ziel der Erfindung ist es, ein energetisch günstigeres Verfahren zu schaffen, bei dem eine bessere Ausnutzung der Roh- und Hilfsstoffe erfolgt und eine Verminderung von Abprodukten und Verlusten eintritt.

e) Darlegung des Wesens der Erfindung

- 10 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, durch geeignete Maßnahmen und Einsatzprodukte die Stoffumwandlung so durchzuführen, daß eine höhere Ausnutzung der Einsatz- und Hilfsprodukte ermöglicht wird.
- 15 Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß in einer ersten Stufe eine in an sich bekannter Weise auf kohlenwasserstoffhaltigen Substraten gezüchtete Biomasse gereinigt, aufbereitet und mit Methanol oder einem Kohlenwasserstoff-Methanol-Gemisch extrahiert wird und das zur Extraktion verwendete Methanol oder
- 20 die hydrophile Komponente des Kohlenwasserstoff-Methanol-Gemisches in einer zweiten Stufe einer Fermentation unterzogen wird, indem die methanolhaltigen Wässer in einer solchen Menge einem Fermentor mit oder ohne mechanischer Turbulenzerzeugung zugeführt werden,
- 25 daß der Methanolgehalt 5 Ma.-% nicht übersteigt und die für das Wachstum notwendigen, teilweise enthaltenen Kationen wie Natrium, Kalium, Ammonium, Magnesium, Calcium, Eisen, Zink, Mangan und Anionen wie Phosphat, Sulfat, Nitrat und Chlorid im erforderlichen Umfange
- 30 ergänzt werden. Der Fermentor wird wahlweise unter sterilen oder unsterilen Bedingungen mit der methanolverwertenden Kultur beimpft. Gleichzeitig können die im Methanol gelösten Extraktbestandteile als Ferment-

tationshilfsmittel dienen. Bei Zufuhr von Luft, sauerstoffangereicherter Luft oder Sauerstoff und bei einer Temperatur von 20 - 45° C entsteht eine Biomasse mit einem Rohproteingehalt von mindestens 50 Ma.-% .

- 5 Nach der Ernte kann die Zellmasse abgetrennt, weiterverarbeitet und zum Zwecke einer gemischten Produktqualität mit der Biomasse der ersten Stufe gemischt werden, während die flüssige Phase ganz oder teilweise in den Prozeß zurückgeführt wird.
- 10 Das für die zweite Fermentation zur Ergänzung benötigte Wasser kann gegebenenfalls aus der ersten Stufe des Verfahrens (Aufrahmung, Separation) herangeführt werden, da dieses bereits teilweise die für die gegebenenfalls erforderliche Ergänzung der für die Fermentation erforderlichen Nähr- und Spurensalze enthält.
- 15 Die Abtrennung des Methanols nach dem Extraktionsprozeß in der ersten Stufe erfolgt durch Brechung der erhaltenen Extraktphase mit Wasser, wobei die wässrige Phase das nahezu gesamte Methanol enthält und anschließend
- 20 direkt in einen Fermentationsprozeß eingebracht wird, in welchem das Methanol als C-Quelle dient. Je nach eingesetztem Mikroorganismus besteht die Möglichkeit diese methanolhaltige wässrige Phase als Substrat oder Substratanteil zu verwenden.
- 25 Eine andere Variante der Erfindung besteht in der Extraktion mit Methanol-Kohlenwasserstoff-Gemischen in der ersten Stufe, wobei die Kohlenwasserstoffe im Siedebereich von 40 - 120° C liegen können und die Kohlenwasserstoffkomponente wiederaufbereitet wird.
- 30 Dabei wird die aus der Extraktion ablaufende Mizzella destillativ in Extrakt, der aus dem Prozeß ausgeschleust wird, und in die Kohlenwasserstoffkomponente des Lösungsmittels, die wieder zur Extraktion zurückgeführt wird, getrennt. Die Hauptmenge des eingesetzten Methanols geht aufgrund der höheren Affinität an die Biomasse. Nach einer mechanischen Lösungsmittelabtrennung, wobei

das Lösungsmittelgemisch wieder dem Extraktionsprozeß
zugeführt wird, erfolgt die thermische Lösungsmittel-
abtrennung. Die entstehenden Brüden werden in der er-
sten Stufe kondensiert, mit Wasser gebrochen und die
5 wäßrige von der Kohlenwasserstoffkomponente des
Lösungsmittels freie das Methanol enthaltende Phase
der zweiten Stufe zugeführt.

Als Mikroorganismen für die zweite Stufe, können Bak-
terienstämme der Arten *Methylomonas methanolica*, *Pseu-*
10 *domonas methanica*, verschiedene Vertreter der Gattung
Pseudomonas, *Corynebakterien* verschiedener Spezies,
Mischkulturen methanolverwertender Bakterien, auch in
Mischung mit nichtmethanolverwertenden Bakterien, obli-
gat methylo trope Bakterien sowie methanolassimilierende
15 Hefen eingesetzt werden.

d) Ausführungsbeispiel

Die Erfindung soll nachstehend anhand von zwei Aus-
führungsbeispielen näher erläutert werden.

Beispiel 1

20 In einem kontinuierlich arbeitenden Rührwerkskolonnen-
extraktionsapparat von 150 mm Durchmesser und 6 m
Länge werden pro Stunde 25 kg sprühgetrocknete Bio-
masse, die durch Züchtung von *Candida tropicalis* auf
kohlenwasserstoffhaltigem Substrat (Leichtöl mit einem
25 n-Alkangehalt von 16,8 Ma.-%) erhalten wurde, im Gegen-
strom im Verhältnis 1 : 1 mit Benzin vom Siedebereich
50 - 80°C extrahiert, im Gleichstrom werden 5 kg/h
Methanol dosiert. Nach der Lösungsmittelaustreibung
werden die anfallenden Brüden gemeinsam mit der Mis-
30 zella mit der gleichen Menge Wasser versetzt, wobei
sich die Mischung in 2 Phasen teilt. Die schwere Phase
enthält 15,2 Ma.-% Methanol. Diese wurde kontinuierlich
einem 600 -Liter - Bioreaktor zugeführt, der eine
methylo trope Kultur enthält. Bei 35°C, einer Umdrehungs-
zahl des Rührers von 850 min⁻¹, einem pH-Wert von 7,0

und einer Durchflußrate von $0,33 \text{ h}^{-1}$ wird der Gleichgewichtszustand aufrechterhalten, so daß bei einem Zellausbeutekoeffizienten von 0,48 (g Trockenmasse pro g Methanol) und einer Produktivität von $7,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ gearbeitet werden konnte. 50 % des Separationswassers wurden nach Abtrennung der Mikroorganismen in den Reaktor bei gleichzeitiger Reduzierung der Menge der eingeführten Nährlösung zurückgeführt. Nach dem Trocknen der Mikroorganismensuspension wurde ein Feststoff erhalten, der zu 71 % aus Rohprotein, 3,8 % aus Fett und 3,4 % aus Asche bestand.

Beispiel 2

Im Extraktor nach Beispiel 1 werden 25 kg auf erdöldestillathaltigen Substraten gezüchtete Trockenhefe im Verhältnis 1 : 1 mit Methanol extrahiert. Extraktphase und Brüden werden vereinigt, kontinuierlich mit 15 kg/h Wasser versetzt und die ca. 65 % Methanol enthaltende schwere Phase einem Bioreaktor von 4 m^3 Inhalt kontinuierlich zugeführt. Bei einer Durchflußrate von $0,37 \text{ h}^{-1}$ und einer Produktivität von $7,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ wurde der Gleichgewichtszustand aufrechterhalten. Die Separationswässer wurden zu 50 % in den Reaktor zurückgeführt.

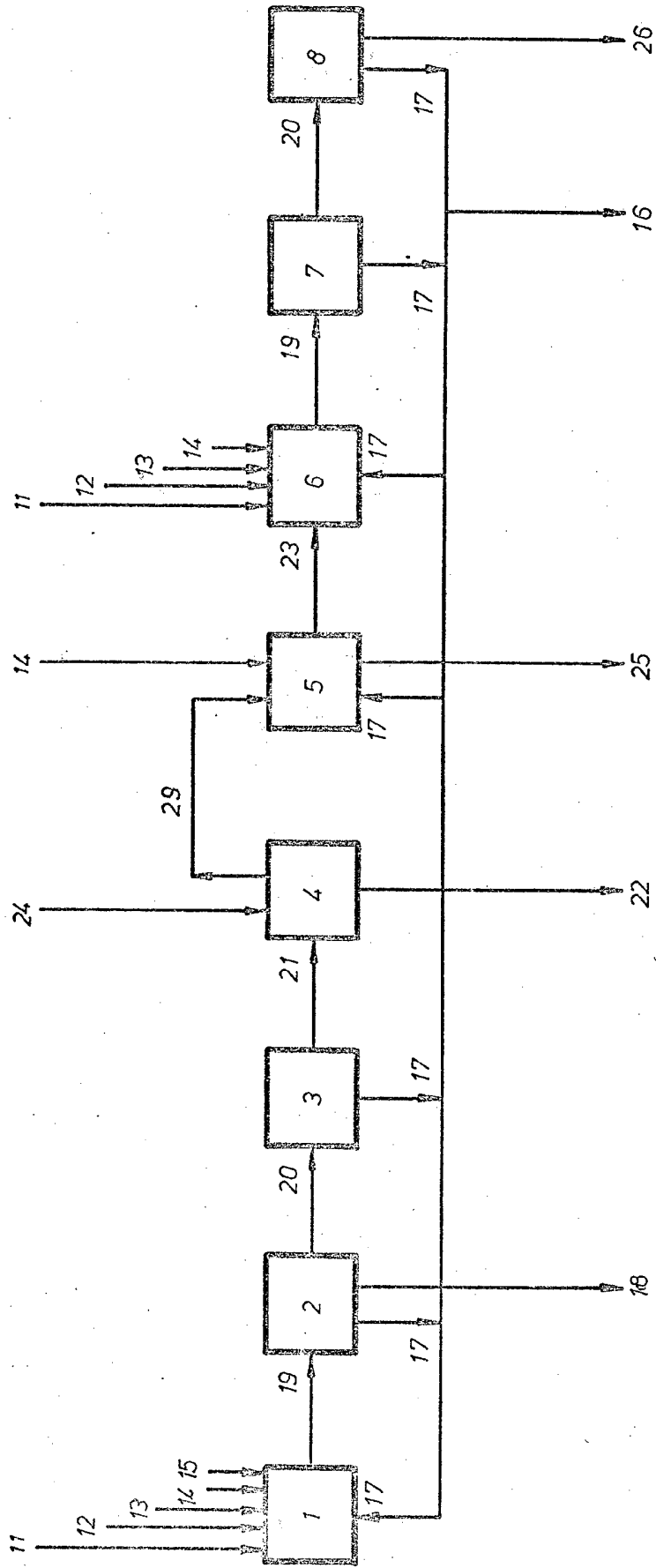
Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Gewinnung von Einzellerprotein gekennzeichnet dadurch, daß in einer ersten Stufe in an sich bekannter Weise auf Erdöldestillaten bzw. Kohlenwasserstoffen Biomasse gezüchtet und extraktiv mit Methanol oder einem Methanol-Kohlenwasserstoff-Gemisch, wobei die Kohlenwasserstoffe im Siedebereich von 40 - 120°C liegen, gereinigt wird, danach das zur Extraktion verwendete Methanol vom Extrakt bzw. vom Kohlenwasserstoffgemisch durch Wasserzugabe abgetrennt und die dabei entstehende Methanol, Nährsalze sowie lipophile Bestandteile enthaltende wässrige Phase einer zweiten Stufe, bestehend aus Fermentation, mechanischer und thermischer Wasserabtrennung zugeführt wird und ganz oder teilweise als Substrat der Fermentation dient.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß ein Teil der in der ersten Stufe bei der Aufkonzentrierung anfallenden wässrigen organischen Stickstoffverbindungen sowie Nähr- und Spurensalze enthaltenden Phase als Einsatzwasser für die zweite Stufe dient, wobei dieses Einsatzwasser in üblicher Weise durch erforderliche Nährsalze ergänzt werden kann und daß die bei der Abtrennung der Mikroorganismen aus der zweiten Stufe anfallenden wässrigen Phasen ganz oder teilweise in den Prozeß zurückgeführt werden.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, gekennzeichnet dadurch, daß der im hydrophilen Lösungsmittel gelöste Extraktteil als Fermentationshilfsmittel in der zweiten Stufe genutzt wird.

4. Verfahren nach Punkt 1 bis 3 gekennzeichnet dadurch, daß die getrockneten Biomassen aus den zwei Stufen gemischt werden.

- Hierzu 2 Blatt Zeichnungen -

Figur 1



Figur 2

