



DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK
AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

PATENTCHRIFT 149 873

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 29 Absatz 1 des Patentgesetzes

(11) 149 873 (45) 05.08.81 Int. Cl.³ 3(51) C 12 N 1/30
G 05 D 27/00
(21) WP C 12 N / 209 771 (22) 15.12.78

-
- (71) siehe (73)
(72) Hilger, Ursula, Dr. Dipl.-Chem., DD; Quarder, Hannelore, Dr. Dipl.-Biol., DD; Scholz, Rudolf, Dr. Dipl.-Chem., DD; Hagen, Erwin, Dr. Dipl.-Chem., DD; Wendlandt, Karin-Dagmar, Dipl.-Chem., DD; Grigorjan, Al'fred N., Dr. Dipl.-Chem., SU; Silant'ev, Lev V., Dr. Dipl.-Chem., SU; Osokina, Natal'ja V., SU
(73) Akademie der Wissenschaften der DDR, Berlin, DD;
Vsesojusnyj naucno-issledovatel'skij institut biosinteza belkovych vescestv, Moskva, SU
(74) Akademie der Wissenschaften der DDR, Institut für technische Chemie, AG Patentwesen, 7050 Leipzig, Permoserstraße 15
-

- (54) Verfahren zur Steuerung des Kultivierungsprozesses von Mikroorganismen
-

(57) Die Erfindung betrifft das Gebiet der mikrobiologischen Industrie, speziell Verfahren zur Steuerung und Regulierung von Prozessen der Kultivierung von Mikroorganismen. Es ist das Ziel der Erfindung, die Steuerung von Kultivierungsprozessen zu vereinfachen und den Zeitaufwand für die Ermittlung der Faktoren, die den Prozeß negativ beeinflussen, zu vermindern. Das Ziel wird erreicht durch ein Verfahren, mit dessen Hilfe das rasche Erkennen und eine beschleunigte Korrektur von Störungen im stabilen Prozeß der mikrobiellen Eiweißsynthese möglich wird. Es beruht auf dem Nachweis im Anstieg der Nitritkonzentration über eine festgesetzte Grenze hinaus.

209771 -1-

Titel:

Verfahren zur Steuerung des Kultivierungsprozesses von Mikroorganismen

Anwendungsgebiet der Erfindung

- 5 Die Erfindung betrifft das Gebiet der mikrobiologischen Industrie, speziell Verfahren zur Steuerung und Regulierung von Prozessen der Kultivierung von Mikroorganismen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

- 0 Es sind Verfahren zur Steuerung von Kultivierungsprozessen nach der Biomassekonzentration (SU-US 302 363), nach der Menge der aktiven Zellen (SU 365 373), nach der Atmungsintensität, nach dem Alkoholgehalt des Abgases (DT-AS 1 080 043), nach der Temperatur des Fermentationsmediums (SU-US 506 611) und nach der Menge des bei der Gärung gebildeten Kohlendioxids bekannt (SU-US 344 352).

- 5 Der Nachteil der genannten Verfahren besteht darin, daß bei Änderung des für die Steuerung verwendeten Prozeßparameters oder Stoffwechselprodukte, z. B. bei Verminderung der Menge des entstehenden Kohlendioxids, zwar eine Störung des technologischen Systems angezeigt wird, aber zur Ermittlung der Ursachen alle prozeßtechnischen Kenngrößen kontrolliert werden müssen, was sehr zeitaufwendig ist.

Ziel der Erfindung

- 7 Der Zweck der Erfindung besteht darin, die Steuerung von Kultivierungsprozessen zu vereinfachen und den Zeitaufwand für die Ermittlung der Faktoren, die den Prozeß negativ be-

einflussen, zu vermindern.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, als Steuergröße ein leicht zu analysierendes Stoffwechselprodukt zu verwenden, das durch die Mikroorganismen bei Abweichungen von den optimalen Prozeßbedingungen ausgeschieden wird und dessen Bildung mit der Änderung bestimmter Prozeßparameter korreliert.

Bei der Kultivierung von Mikroorganismen, z. B. von methan-assimilierenden Bakterien, ist die in das Medium ausgeschiedene Nitritmenge geringer als 0,3 mg N/l, wenn die Ammonium-Stickstoff-Konzentration 20 - 80 mg N/l, die Durchflußrate nahe der kritischen Durchflußrate liegt und durch Einstellung entsprechender Partialdrucke die Sauerstoffkonzentration die Wachstumsrate bestimmt.

Es wurde festgestellt, daß bei inhibierenden Ammonium-Stickstoff-Konzentrationen, limitierenden Konzentrationen der Kohlenstoffquelle und steigendem Limitationsgrad von Sauerstoff, die Nitritkonzentration im Fermentationsmedium über die für einen gegebenen Prozeß zulässige Norm ansteigt. Dabei kann der zunehmende Sauerstofflimitationsgrad entweder durch eine sinkende Durchflußrate oder sinkenden Sauerstoffpartialdruck bedingt sein.

Bei Ansteigen der Nitritkonzentration ist es erforderlich, die Konzentrationen von Stickstoff, Sauerstoff und der Kohlenstoffquelle, den Sauerstoffpartialdruck sowie die Durchflußrate der wäßrigen Nährlösung zu bestimmen und Abweichungen von den Normwerten zu korrigieren.

Der Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, daß bei Abweichungen von den optimalen Prozeßbedingungen die Nitritkonzentration sofort ansteigt und eine Störung des Prozesses signalisiert wird, lange bevor diese Störung an einer Änderung anderer prozeßtechnischer Kenngrößen (z. B. bei Verminderung des Biomasseertrages) ersichtlich wird. Das entstehende Nitrit hat

keinen negativen Einfluß auf das Wachstum der Mikroorganismen, solange nicht inhibierende Konzentrationen größer als 20 mg Nitritstickstoff/l erreicht werden.

5 Dieses Steuerverfahren kann bei kontinuierlichen und diskontinuierlichen Fermentationsprozessen angewendet werden, wobei es ohne Bedeutung ist, ob die Kultivierung bei Normaldruck oder erhöhtem Systemdruck durchgeführt wird.

10 Die Bestimmung der Nitritkonzentration erfolgt kolorimetrisch nach Diazotierung mit Sulfanilsäure und Kupplung mit α -Naphthylamin in einem Reaktionsschritt.

Zur Herstellung des Nachweisreagens werden 2 g Sulfanilsäure in 400 ml 2 n Essigsäure und 0,4 g α -Naphthylaminhydrochlorid unter Erwärmen in 80 ml Wasser gelöst, gemischt und mit 2 n Essigsäure zum Liter ergänzt. Kulturfiltrat und Reagens werden

15 im Verhältnis 1 : 1 (V/V) gemischt, die rotviolette Färbung nach 10 Minuten im Spektralphotometer bei $\lambda = 534$ nm gemessen. Die Farbintensität wird mit der einer Eichkurve verglichen. Als Testsubstanz dient wasserfreies Natriumnitrit. Der Nachweisbereich beträgt 0,03 bis 0,4 mg Nitrit-N/l.

20 Die Nitritbestimmung kann kontinuierlich nach dem Analysprinzip unter Verwendung eines Spekrol des VEB Carl Zeiss Jena mit Durchflußküvette erfolgen.

Beispiel 1

25 Der methanutilisierende Bakterienstamm *Methylococcus capsulatus* sp. wurde im kontinuierlichen Prozeß unter folgenden Bedingungen kultiviert:

Temperatur: 40 °C

pH : 5,6

Begasungsintensität: 40 l/lh

30 Verhältnis Erdgas zu Luft: 1 : 3

Durchflußrate: 0,25 h⁻¹

Die Zusammensetzung der Nährlösung war wie folgt:
(für 1 g Biomasse)

KCl	0,025 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,02 g
H ₃ PO ₄ (80%ig)	0,09 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,3 mg
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0,5 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,5 mg
H ₃ BO ₃	0,3 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,045 mg

Die pH-Regelung erfolgte mit einer 10%igen NH₄OH-Lösung, diese diente zugleich der Stickstoffversorgung der Organismen. Unter diesen Prozeßbedingungen wurde im steady state eine Biomassekonzentration von 10 g/l erreicht. Alle halben Stunden wurde der Nitritgehalt der Kulturflüssigkeit bestimmt. In der 20. Kultivierungsstunde erhöhte sich die Nitritstickstoffkonzentration bis auf Werte von 2,5 mg N/l. Es wurde der Ammonium-Stickstoffgehalt der Kulturflüssigkeit sowie die Begasung überprüft. Die Analysen zeigten, daß die Ammonium-Stickstoffkonzentration 400 mg N/l betrug. Um diesen hohen Stickstoffgehalt des Fermentationsmediums zu vermindern, wurde die pH-Regelung auf eine 10%ige NaOH-Lösung umgestellt. Nach zwei Stunden lag der Ammonium-Stickstoffgehalt wieder innerhalb der optimalen Grenzen, die Nitritkonzentration verringerte sich auf <0,3 mg N/l.

Beispiel 2

Die Kultivierung des methanutilisierenden Bakterienstammes *Methylococcus capsulatus* sp. erfolgte wie im Beispiel 1 beschrieben. In der 47. Kultivierungsstunde stieg der Nitritgehalt der Kulturflüssigkeit auf 3 mg N/l an. Es wurde der Ammonium-Stickstoffgehalt der Kulturflüssigkeit sowie die Begasung überprüft. Dabei wurde festgestellt, daß

die Stickstoffkonzentration innerhalb der optimalen Grenzen lag, das Verhältnis von Erdgas : Luft betrug jedoch 1 : 7. Der Prozeß wurde durch Methan limitiert.

Nach Veränderung des Verhältnisses Erdgas : Luft auf 1 : 4 sank die Nitritkonzentration der Kulturflüssigkeit auf 0,15 mg N/l.

Beispiel 3

Methanutilisierende Bakterien vom Stamme *Methylococcus capsulatus* sp. wurden im diskontinuierlichen Prozeß unter sonst gleichen Bedingungen wie im Beispiel 1 kultiviert. Die Zugabe der Nährsalze erfolgte in Form eines Konzentrates stufenweise.

Die Zelldichte wuchs exponentiell auf 9 g Trockensubstanz/l an, ohne daß ein Anstieg des Nitritgehaltes zu verzeichnen war. Mit einer weiteren Zunahme der Zelldichte stieg auch der Nitritgehalt auf Werte > 1 mg N/l an. Der Ammonium-Stickstoffgehalt der Kulturflüssigkeit wurde überprüft und innerhalb der Norm befunden. Durch Erhöhung des Gaseintrags sank der Nitritgehalt auf $< 0,3$ mg N/l ab. Der aus einer Wachstumskurve nur ungenau bestimmbare Zeitpunkt des Beginns der Gaslimitation konnte so mit hoher Genauigkeit bestimmt werden.

Patentanspruch

1. Verfahren zur Steuerung des Kultivierungsprozesses von Mikroorganismen bei konstanter Temperatur und konstantem pH-Wert, kontinuierlicher Belüftung mit einer Sauerstoffquelle und Durchmischung unter Zufuhr einer flüssigen oder gasförmigen Kohlenstoffquelle in einer wäßrigen Nährlösung, nach einem gebildeten Stoffwechselprodukt, dadurch gekennzeichnet, daß mit dem Ziel der Vereinfachung der Steuerung und Verkürzung der Zeit zur Ermittlung der Faktoren, die die Führung des Prozesses der Kultivierung negativ beeinflussen, die Steuerung des Prozesses nach der Konzentration der gebildeten Nitrite in der Kulturflüssigkeit so durchgeführt wird, daß bei Ansteigen der Konzentration der Nitrite über die für einen gegebenen Prozeß zulässige Norm die Konzentration von Stickstoff in der Kulturflüssigkeit, die Konzentration der Kohlenstoffquelle und des Sauerstoffs in der Kulturflüssigkeit oder im Abgas und die Durchflußrate der wäßrigen Nährlösung im Falle der kontinuierlichen Fermentation, bestimmt werden und sie auf den für den gegebenen Kultivierungsprozeß optimalen Wert eingestellt werden.
2. Verfahren zur Steuerung gemäß Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die optimalen Parameter des Kultivierungsprozesses verschiedener Mikroorganismen in Abhängigkeit ihrer für die normale Entwicklung notwendigen Verbrauchswerte für Stickstoff, Kohlenstoff, Sauerstoff und ihrer Wachstumsgeschwindigkeit einstellt.

3. Verfahren zur Steuerung gemäß Punkt 2, dadurch gekennzeichnet, daß man methanutilisierende Bakterien kultiviert, für die die optimalen Bedingungen sind: Gehalt in der Kulturflüssigkeit an Ammonium-Stickstoff = 20 bis 80 mg/l; $< 0,3$ mg N/l, Durchflußrate der wäßrigen Nährsalzlösung nahe der kritischen Durchflußrate, Limitation des Prozesses durch Sauerstoff.