



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 29 Absatz 1 des Patentgesetzes

ISSN 0433-6461

(11)

206 684

Int.Cl.³

3(51)

C 12 N 1/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21) WP C 12 N/ 2314 293

(22) 03.07.81

(45) 01.02.84

- (71) VEB PETROLCHEMISCHES KOMBINAT SCHWEDT; DD; WNII SINTESBELOK, MOSKAU, SU
(72) LUEBBERT, GUSTAV-ADOLF, DIPL.-CHEM.; HEIDENREICH, GUENTER, DIPL.-ING.;
BAUCH, JOACHIM, DR. DIPL.-CHEM.; GENTZSCH, HERBERT, DR. DIPL.-ING.; DD;
(73) siehe (72)
(74) WILLBRANDT, INGRID VEB PCK SCHWEDT ABT. FPS D. DIREKT. F/E 1330 SCHWEDT/ODER

(54) VERFAHREN ZUR ZUECHTUNG VON MIKROORGANISMEN

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kontinuierlichen Züchtung partiell synchronisierter Mikroorganismen. Sie kann überall dort angewendet werden, wo Mikroorganismen zum Zwecke der Biomassegewinnung, vorwiegend zur Einzellerproteingewinnung, gezüchtet werden. Das Ziel der Erfindung besteht darin, die Qualität und Quantität der Produktströme auszugleichen, Schwankungen in der Heranführung der Roh- und Hilfsstoffe und Verarbeitung der Produkte zu vermeiden, so daß die Fermentoren ständig unter biologisch und technisch ökonomisch günstigen Parametern arbeiten. Die Züchtung wird in mindestens zwei Fermentoren gleichzeitig durchgeführt, wobei die Maßnahmen zur partiellen Synchronisation in den einzelnen Fermentoren zeitlich gesteuert werden, daß die aus dem Synchronisationseffekt resultierenden Oszillationen der Zellwachstumsphasen in jeweils zwei Fermentoren um eine halbe Wellenlänge verschoben sind und/oder daß sich jeweils mindestens zwei Fermentoren entgegengesetzt entweder im Minimumangebot an Kohlenstoffquelle oder Kohlenstoffquellenangebotüberschuß befinden.

Titel der Erfindung

Verfahren zur Züchtung von Mikroorganismen

IPK: C 12 N

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kontinuierlichen Züchtung partiell synchronisierter Mikroorganismen. Die erfindungsgemäße Lösung kann überall dort angewendet werden, wo Mikroorganismen zum Zwecke der Biomassegewinnung, vorwiegend zur Einzellerproteingewinnung, gezüchtet werden.

Die Erfindung gehört in das Gebiet der technischen Mikrobiologie.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es sind zahlreiche Verfahren zur Züchtung von Mikroorganismen zum Zwecke der Biomassegewinnung, insbesondere der Einzellerproteingewinnung, bekannt. Bei industriell angewendeten Verfahren werden dabei aus ökonomischen Gründen hohe Umsatzraten der eingesetzten Kohlenstoffquelle zur Biomasse sowie allgemein günstige Qualitäts- und Verbrauchskennziffern gefordert.

Gemäß Patentschrift DD 140 150 wird diese Zielstellung erreicht, indem die Versorgungszyklen mit Kohlenstoffquelle den Phasen des Zellwachstums bei kontinuierlicher Züchtung alternierend angepaßt werden.

Dieses Verfahren setzt ein möglichst synchrones Zellwachstum im kontinuierlich arbeitenden Fermentor voraus.

Um signifikante synchrone Zellwachstumsphasen im kontinuierlich arbeitenden Fermentor zu erreichen, müssen vorher alle Zellen wachstumssynchronisierenden Einwirkungen unterworfen werden. Diese Einwirkung kann in Form von pH-Wert-Erniedrigungen, Einstellung der Sauerstoffversorgung, Temperaturerhöhung u.s.w. erfolgen.

Diese technische Lösung weist eine Reihe von Besonderheiten auf, die insbesondere bei der Überführung in die industrielle Großproduktion ungünstig in Erscheinung treten.

- Die synchronisationsauslösenden Einwirkungen schaffen über beachtliche Zeiträume im gesamten Fermentor extreme Bedingungen, die in der Zeit der Beeinflussung das Zellwachstum hemmen und damit Produktionsminderungen bewirken.
- Mit der Auslösung des synchronisierten Zellwachstums verläßt den Fermentor ein Produktstrom, der in Analogie zu der Zellwachstumsphase unterschiedliche Qualität hinsichtlich wesentlicher Faktoren wie Nukleinsäure-, Rohprotein- oder Rohfasergehalt, aufweist.
- Der oszillierende Charakter der Qualitätsmerkmale betrifft neben dem Hauptprodukt vor allem die Nebenprodukte oder biologisch behandelten Produkte, wie den Biolipidextrakt und das behandelte Erdöldestillat im Falle der PS DD 140 150.

- Die Zufuhr von allen Nährstoffkomponenten erfolgt alternierend bzw. den Zellwachstumsphasen angepaßt, d. h. dynamisch oszillierend.
- Die den Fermentor verlassende Biomassemenge schwankt bis zu $\pm 20\%$ um einen Mittelwert.
Dieser Umstand hat zur Folge, daß die gesamten Nacharbeitungsstufen im gleichen Rhythmus betrieben werden müßten. In diesem Fall kann es zeitweise bis zu einer ca. 40 %igen Nichtausnutzung investierter Grundmittel kommen.

Zur Vermeidung der genannten Nachteile hinsichtlich der oszillierenden Produktcharakteristika und der Produktmengen wäre die Installation unverhältnismäßig großer Puffer- und Mischeinrichtungen erforderlich. Damit wären jedoch noch nicht die zeitweiligen produktmindernden Nachteile, die aus den extremen Maßnahmen zur Synchronisation des Zellwachstums resultieren, beseitigt.

Außerdem ist dieses Verfahren in den Möglichkeiten der synchronisationsauslösenden Effekte eingeschränkt, da bei vorgegebenen technischen Fermentationssystemen die Anwendung aller relevanten Maßnahmen nur unter erheblichem Aufwand zu erreichen ist oder nicht erfolgen kann.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, die Qualität und Quantität der Produktströme auszugleichen, Schwankungen in der Heranführung der Roh- und Hilfsstoffe und Verarbeitung der Produkte zu vermeiden, so daß die Fermentoren ständig unter biologisch und technisch ökonomisch günstigen Parametern arbeiten.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, ein technisch und ökonomisch günstiges Verfahren zur Zellenzüchtung unter den Bedingungen einer partiellen Synchronisation des Zellenwachstums zu entwickeln.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe so gelöst, daß die Zellenzüchtung gleichzeitig in mindestens 2 vollständig eigenständigen Fermentoreinheiten erfolgt, wobei die Maßnahmen zur partiellen Synchronisation in den einzelnen Fermentoren zeitlich so gesteuert werden, daß die Oszillationen des Zellenwachstums in jeweils zwei Fermentoren um eine halbe Wellenlänge verschoben sind oder daß sich jeweils mindestens zwei Fermentoren entgegengesetzt entweder im Kohlenstoffquellenminimum- oder -normalangebot befinden, daß dabei mindestens zwischen zwei Fermentoren Biomassesuspension ausgetauscht wird und die synchronisationsauslösenden oder verstärkenden Einwirkungen auf dem Weg von einem zum anderen Fermentor erfolgen und die ausgetauschte Menge zwischen Null und dem vollständigen Austausch variiert werden kann.

Die synchronisationsbewirkenden Maßnahmen können nahezu uneingeschränkt ausgeschöpft werden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

In einer halbtechnischen Fermentationsanlage bestehend aus zwei 500 l-Rührkesselfermentoreinheiten wurde Hefe der Gattung *Lodderomyces elongisporus* kontinuierlich auf n-paraffinhaltigem Erdöldestillat gezüchtet.

Die Züchtungsbedingungen entsprachen den aus der Literatur bekannten optimalen Milieu- und Technologieparametern hinsichtlich pH-Wert, Temperatur, Verweilzeit, Sauerstoff- und Erdöldestillatangebot sowie auch hinsichtlich Zugabe der lebensnotwendigen übrigen Nähr- und Spurenelemente.

Jede Fermentoreinheit wurde eigenständig versorgt und bilanziert. Bei einer Verweilzeit von 4,1 - 4,15 stellte sich in beiden Fermentoren eine Biomassekonzentration von 21 - 22 g/l HTS ein. Die kontinuierlich aus dem Fermentor abgezogene Suspensionsmenge betrug 50 - 51 kg/h.

Die Produktionskapazität jedes Fermentors betrug 1 - 1,12 kg Hefetrockensubstanz pro Stunde.

Die Temperatur betrug in der Produktionsphase 32 ± 1 °C der pH-Wert 4,1 - 4,2, die Erdöldestillatkonzentration 13 % mit 16 % n-Paraffin.

Die erforderliche partielle Synchronisation in der Startphase wurde durch Temperaturerhöhung auf 37 °C, über 5 Minuten, Abstellung der Luftzufuhr und gleichzeitige Senkung des pH-Wertes über 15 Minuten auf 2,4 erreicht.

Nach dieser Phase wurde auf Normalbedingungen eingestellt und die Erdöldestillat-Dosierung um 30 % erhöht. Diese Erhöhung der Kohlenstoffsubstratangebote wurde über 5 Stunden beibehalten.

Die Biomassekonzentration erreicht im Verlauf dieser 5 Stunden einen Maximalwert von 25 g/l.

Zu diesem Zeitpunkt wurde mit dem Fermentor 2 analog zum Fermentor 1 verfahren und auf die gleiche Weise die Synchronisation und die anschließende Erdöldestillat-Überdosierung eingeleitet.

Während der Überdosierung im Fermentor 1 wurde im letzten Abschnitt der Sproßminimumphase etwa 60 kg

Biomassesuspension aus dem Produktionsstrom in ein gesondertes Gefäß geleitet, in dem der pH-Wert auf 2,2 eingestellt wird und der nicht belüftet ist. Die in diesem Gefäß gelagerte Biomasse wurde unmittelbar nach Beginn der Überdosierungsphase in den Fermentor 2 gepumpt. Nach Erreichung des Biomassemaximums im Fermentor 1 (5 h nach Start aus dem Synchronisationszustand) wird entsprechend der statistisch überwiegend vorliegenden Alterungsphase der Zellen die Erdöldestillatzufuhr, d. h. das Kohlenstoffquellenangebot, auf 20 % unter dem Normalwert gesenkt. Gleichzeitig wurden die übrigen Nähr- und Spurenelemente entsprechend des sich einstellenden geringeren Verbrauches reduziert. Die C-Quellenmangelphase wurde ebenfalls über etwa 5 h beibehalten bis die Biomassekonzentration einen Wert von 17 g/l erreichte. Beim Erreichen des Minimums im Fermentor 1 wird im Fermentor 2 die Endphase der Überdosierung erreicht. Zu diesem Zeitpunkt wurden wie vorher beim Fermentor 1 60 l Biomassesuspension aus dem Produktstrom eingelagert und gleichzeitig mit der Umstellung auf eine erneute Überschussphase im Fermentor 1 in diesen Fermentor gepumpt. Auf diese Weise wurde rhythmisch im Wechsel eine sofortige hohe Biomassekonzentration bei Umstellung auf die Überschussphase, bei erhöhtem Synchronisationsgrad erreicht und eine optimale Nutzung der angebotenen C- und anderer Nährstoffquellen erreicht. Die Aufbereitung und Zufuhr der Nähr- und Spurensalzlösungen sowie der übrigen Roh- und Hilfsstoffströme konnte kontinuierlich über beide Dosierstrecken erfolgen.

Eine Dosierstrecke arbeitete ständig entsprechend dem Bedarf in der Mangelphase, die zweite Dosierstrecke wurde auf den erhöhten Bedarf in der Überschußphase des C-Quellenangebotes eingestellt. In den Umstellungsphasen wurde lediglich die Ventilstellung automatisch zwischen Dosierung zum Fermentor 1 bzw. Fermentor 2 gewechselt.

Beispiel 2

Im 2. Ausführungsbeispiel des Verfahrens wurde die im ersten Beispiel beschriebene Versuchsanlage wie folgt betrieben:

Es wurde wiederum *Lodderomyces elongisporus* zur Gewinnung von Einzellerprotein auf Erdöldestillatbasis gezüchtet. Die Ausgangsbedingungen entsprachen denen im Beispiel 1. Die beiden Fermentoren wurden jedoch über eine Ringleitung mit zwischengeschaltetem Gefäß zur pH- und Temperaturbeeinflussung kurzgeschlossen. In die Ringleitung wurde eine leistungsstarke Pumpe installiert, mit deren Hilfe die Fermentorinhalte der beiden Fermentoren innerhalb 15 min vollständig gegeneinander ausgetauscht werden konnten.

Nach einer 14stündigen Startphase der beiden Fermentoren im Normalbetrieb wurde der Inhalt des Fermentors 1 über das Zwischengefäß, in dem die Suspension auf einen pH-Wert von 2,0 und eine Temperatur von 38,5 °C eingestellt wurde, in den Fermentor 2 gepumpt. Die mittlere Verweilzeit in dem Zwischengefäß betrug 8,5 min. Gleichzeitig wurde der Inhalt des Fermentors 2 über die Rücklaufleitung in den Fermentor 1 gepumpt, so daß beide Fermentoren jederzeit den gleichen Masseinhalt hatten.

Der Austauschvorgang wurde innerhalb 24 min. abgeschlossen. Im Fermentor 2 wurde nunmehr das C-Quellenangebot

und die Versorgung mit den übrigen Nähr- und Spurensalzen um 30 % erhöht und im Fermentor 1 um 20 % erniedrigt. In dieser Dosierhöhe wurde im folgenden nur noch gearbeitet. Es erfolgte keine weitere Umstellung der Dosiermengen mehr. Alle 5,5 Stunden wurde der oben beschriebene Austauschvorgang sowie die Temperatur- und pH-Beeinflussung im Zwischengefäß wiederholt. Auf diese Weise wurden gute Synchronisationsgrade mit positiven technisch-ökonomischen Ergebnissen in der Verfahrensführung erreicht.

In beiden Beispielen wurde unabhängig von der Betriebsweise ständig aus beiden Fermentoren kontinuierlich Produktstrom entnommen und vereinigt. Auf diese Weise wurden trotz stark unterschiedlicher Prozeßführung in den beiden Fermentoren nahezu konstante Produktmengen und -qualitäten erhalten.

Die Lösung bietet jedoch auch den Vorteil, daß bei getrennter Produktstromaufarbeitung gezielt unterschiedliche Produktqualitäten erhalten werden können.

Die erzielten Verbesserungen in der spezifischen Kohlenstoffnutzung und in der biologischen Leistungsfähigkeit lagen in der Größenordnung zwischen 4 und 8 %.

Erfindungsanspruch

Verfahren zur kontinuierlichen Züchtung partiell synchronisierter Mikroorganismenkulturen, dadurch gekennzeichnet, daß die Züchtung in mindestens zwei Fermentoren gleichzeitig durchgeführt wird, wobei die Maßnahmen zur partiellen Synchronisation in den einzelnen Fermentoren zeitlich gesteuert werden, daß die aus dem Synchronisationseffekt resultierenden Oszillationen der Zellwachstumsphasen in jeweils zwei Fermentoren um eine halbe Wellenlänge verschoben sind und/oder daß sich jeweils mindestens zwei Fermentoren entgegengesetzt entweder im Minimumangebot an Kohlenstoffquelle oder Kohlenstoffquellenangebotüberschuß befinden, daß dabei mindestens zwei Fermentoren im Austausch an Mikroorganismensuspensionen stehen können, wobei die synchronisationsauslösenden oder -verstärkenden Einwirkungen auf dem Weg der Mikroorganismensuspension von einem zum anderen Fermentor vorgenommen bzw. durch den Austausch ausgelöst werden und die Menge an zwischen den Fermentoren ausgetauschter Mikroorganismensuspension zwischen Null und dem vollständigen Austausch variiert werden kann.