



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 294 276 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 N 1/00
C 12 N 1/16

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 N / 340 632 7	(22)	14.05.90	(44)	26.09.91
(71)	Akademie der Wissenschaften, Otto-Nuschke-Straße 22/23, O - 1080 Berlin, DE				
(72)	Teich, Walter, Dr. rer. nat.; Skrowny, Horst, Dipl.-Chem., DE				
(73)	Akademie der Wissenschaften, Institut für Biotechnologie, Permoserstraße 15, O - 7050 Leipzig, DE				
(74)	siehe (73)				

(54) Verfahren zur Verringerung der Zahl an Fremdkeimen bei der Kultivierung von Mikroorganismen

(55) Kultivierung; Fremdkeime; Nitrat; Salzgehalt; Biomasse; Umwelt

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kultivierung von Mikroorganismen, das zur Erzeugung mikrobieller Biomasse oder speziellen Verbindungen angewandt werden kann. Erfindungsgemäß wird zur Kultivierung ein nitratverwertender Mikroorganismus eingesetzt, als einzige Stickstoffverbindung Nitrat in den Fermentor dosiert und ein pH-Wert gleich/größer 3 eingestellt. Die Kultivierung kann diskontinuierlich, semikontinuierlich oder kontinuierlich durchgeführt werden.

Patentanspruch:

1. Verfahren zur Verringerung der Zahl an Fremdkeimen bei der Kultivierung von Mikroorganismen, **dadurch gekennzeichnet**, daß
 - a) nichtverwertende Mikroorganismen zur Kultivierung eingesetzt werden,
 - b) Nitrat als alleinige Stickstoffquelle zur Kultivierung eingesetzt und
 - c) ein pH-Wert größer/gleich 3,0 eingestellt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der pH-Wert beim Anwachsen von Fremdkeimen bis zu deren Inaktivierung um mindestens eine Einheit abgesenkt und/oder die Kultivierungs-Temperatur um mindestens 5°C erhöht wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Absenkung des pH-Wertes um mindestens eine Einheit und/oder die Erhöhung der Kultivierungs-Temperatur um mindestens 5°C periodisch durchgeführt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Kultivierung mit sterilisierter Luft durchgeführt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kultivierung von Mikroorganismen auf der Basis verschiedener Rohstoffe. Sie kann zur Gewinnung mikrobieller Biomasse und mikrobiell erzeugter Substanzen angewandt werden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die Erzeugung mikrobieller Biomasse und Substanzen erfolgt im industriellen Maßstab nur dann erfolgreich, wenn definierte Prozeßbedingungen eingehalten werden können. Aus diesem Grund sind Fremdkeime bei mikrobiologischen Verfahren unerwünscht, da diese den ursprünglich eingesetzten Mikroorganismus verdrängen können bzw. Prozeßstörungen bewirken. Um dies zu verhindern, werden zahlreiche mikrobiologische Verfahren unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Der Nachteil dieser Verfahren liegt in den hohen ökonomischen Aufwendungen für die Sterilisation der Luft, der Nährlösung, der Substrate und für die Aufrechterhaltung des sterilen Zustandes während der Kultivierung (Apparate-Aufwand). Werden demgegenüber mikrobielle Verfahren unsteril betrieben, so treten Fremdkeime auf, die, wenn sie eine bestimmte Zahl erreichen, die Ausbeute des Verfahrens reduzieren und die Qualität der herzustellenden Produkte beeinträchtigen bzw. eine weitere Prozeßführung sogar verhindern.

Zur Lösung des Problems ist ein Verfahren bekannt, DT-PS 2645386, bei dem durch Zufügen von Monoperschwefelsäure Fremdkeime inaktiviert werden. Dieses Verfahren hat den Nachteil, daß die Wirksamkeit sehr begrenzt ist (auf wenige Bakterien), zu einer beträchtlichen Salzbelastung des Wassers führt und das Verfahren durch den Zusatzstoff ökonomisch stark belastet. Weiter ist bekannt, Infektionen durch kurzzeitiges Absenken des pH-Wertes zu reduzieren (W. Swyzen, Zuckerind. 112 [1987], 955). Diese Verfahrensweise hat den Nachteil, daß sie nicht sehr wirksam ist, indem das Wachstum der Fremdkeime in den meisten Fällen nur kurzzeitig gehemmt wird. Auch eine ständige Absenkung des pH-Wertes, wie z. B. bei der Kultivierung von Hefen auf der Basis von Schlempe (R. Braun, J. Meyroth, die Branntweinwirtschaft 121 [1981], 102) bewirkt keine Lösung des Problems. Aufgrund der großen Menge an Schwefelsäure zur Absenkung des pH-Wertes wird bei diesem Verfahren sowohl die Hefebiomasse als auch das Wasser so stark mit Salz belastet, daß dies zu einer erheblichen ökonomischen Belastung des Verfahrens führt.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist eine Senkung von Produktionsverlusten sowie eine Verringerung der Umweltbelastung.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, durch spezielle Kultivierungsbedingungen die Zahl der Fremdkeime bei der Kultivierung von Mikroorganismen zu verringern.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß zur Kultivierung nitratverwertende Mikroorganismen eingesetzt werden, Nitrat als alleinige Stickstoffverbindung in den Fermentor dosiert und ein pH-Wert gleich/größer 3 eingestellt wird. Die Verfahrensweise ist im einzelnen folgende:

Zur Kultivierung, die man diskontinuierlich, semikontinuierlich oder kontinuierlich durchführt, werden Mikroorganismen, Pilze, Hefen oder Bakterien, eingesetzt, die in der Lage sind, Nitratstickstoff zu verwerten. Der Nitratstickstoff wird in Form von Salpetersäure gemeinsam mit der Nährlösung in den Fermentor dosiert. Es können aber auch die Salze der Salpetersäure, außer dem Ammoniumsalz, verwendet werden. Als Kohlenstoffverbindungen werden Kohlenhydrate (z. B. Glucose, Fructose, Saccharose, Melasse und technische Zuckerlösungen), Alkohole (z. B. Methanol und Ethanol) und organische Säuren (z. B. Essigsäure) eingesetzt. Geeignete Substrate stellen auch bei bestimmten industriellen Verfahren anfallenden Abwässer wie z. B. Schlempe, Sulfitablauge und Molke dar. Der der verwertbare Kohlenstoffgehalt dieser Abwässer oft zu gering ist, um den Sauerstoffeintrag moderner Fermentoren auszuschöpfen, hat es sich mitunter als zweckmäßig erwiesen, den verwertbaren Kohlenstoffgehalt durch Zusätze zu erhöhen.

Die Kultivierung führt man bei einem pH -Wert von gleich/größer 3 durch, wobei der konkrete pH -Wert vom jeweils vorliegenden mikrobiologischen System und der tolerierbaren Zahl an Fremdkeimen abhängig ist. Die Nährsalzlösung wird wie üblich hergestellt und entsprechend dem Nährsalzbedarf der Mikroorganismen dosiert. Der erforderliche Sauerstoff wird dem Fermentor mittels Luft, reinem Sauerstoff oder mit Sauerstoff angereicherter Luft zugeführt.

Bei besonders hoher Belastung der Luft mit Fremdkeimen hat es sich als günstig herausgestellt, diese vorher zu sterilisieren. Unter den dargelegten Bedingungen erhält man bei der Kultivierung eine Mikroorganismensuspension, die wenig Fremdkeime enthält, so daß eine stabile Kultivierung möglich ist. Auch bezüglich der Salzbelastung können in einigen Fällen wesentliche Verbesserungen erreicht werden, beispielsweise bei der Kultivierung von Hefen auf der Basis von Schlempe.

Nimmt die Zahl der Fremdkeime dennoch, z. B. infolge von Prozeßstörungen, zu, so hat sich folgende weitere Ausgestaltung der oben dargelegten Verfahrensweise als geeignet erwiesen. Zusätzlich zu den bereits genannten Maßnahmen wird der pH -Wert um mindestens eine Einheit gesenkt und/oder die Fermentations-Temperatur um mindestens 5°C erhöht, bis eine ausreichende Inaktivierung der Fremdkeime erreicht ist. Anschließend werden die ursprünglichen Werte wieder eingestellt. Für Verfahren, die eine große Sicherheit bezüglich der Einhaltung einer möglichst niedrigen Zahl an Fremdkeimen benötigen, hat es sich als günstig herausgestellt, die genannte pH -Wert-Absenkung und/oder Temperaturerhöhung vorbeugend in einem bestimmten Rhythmus, also periodisch, durchzuführen. Die Intervalle für diese periodischen Änderungen hängen vom jeweiligen mikrobiologischen System in Verbindung mit seinem Umfeld ab und müssen daher empirisch ermittelt werden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

- a) In einem Laborfermentor mit einem Bruttovolumen von 15l und einem Masseinhalt von 5kg wurde die Kultivierung einer Hefe unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Hefe: *Candida utilis*

Temperatur: 32°C

pH -Wert: 5,0

Verweilzeit: 4h

Begasung: 400l/h (Luft, nicht steril)

Stickstoffversorgung: HNO_3 (wird der Nährsalzlösung zugemischt, so daß N-Versorgung der Hefezellen gewährleistet ist)

Substrat: Saccharose

Nährsalzlösungskonzentrat:

KH_2PO_4	35,0 g/l	ZnCl_2	0,322 g/l
H_3PO_4 80 %	48,3 ml/l	$\text{Al}_2\text{SO}_4 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$	0,186 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	25,0 g/l	$\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,109 g/l
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,833 g/l	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,041 g/l
$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,201 g/l	$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,036 g/l
H_3BO_3	1,286 g/l		
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,786 g/l		

(von diesem Konzentrat wurde eine adäquate Menge zur Versorgung der Hefen eingesetzt)

Die Kultivierung wurde wie folgt durchgeführt: In einer sterilen Vorkultivierung wurde eine ausreichende Menge der oben genannten Hefe hergestellt, im Batch-Verfahren weiter angereichert und anschließend unter nicht sterilen Bedingungen kontinuierlich kultiviert.

Unter Einhaltung der genannten Kultivierungsbedingungen wurden dem Fermentor 215g/h einer 30-%-Saccharoselösung und 135g/h eines Gemisches, bestehend aus Nährsalzlösung mit zugemischter Salpetersäure und Wasser, zugeführt, so daß eine Verdünnungsrate von $D = 0,25\text{h}^{-1}$ realisiert werden konnte. Unter diesen Bedingungen wurde eine Produktivität von 7g Hefetrockenmasse/kg erreicht.

Zur Kontrolle der Fremdkeime wurden täglich 3 Untersuchungen mittels Plattentests durchgeführt.

Ergebnis:

(Angabe = Anzahl Bakterienkolonien je 100 Hefekolonien)

nach 5 Tagen Kultivierung: 3

nach 7 Tagen Kultivierung: 3

- b) Parallelversuch zur Demonstration des Effektes

Es wurde ein Parallelversuch mit veränderter Stickstoffversorgung, aber sonst gleichen Bedingungen durchgeführt. Anstelle von Salpetersäure wurde Ammoniak eingesetzt.

Ergebnis:

nach 1 Tag Kultivierung: 28

nach 2 Tagen Kultivierung: 510

nach 3 Tagen Kultivierung: Die Kultivierung mußte wegen einer Bakterien-Infektion abgebrochen werden.

Beispiel 2

- a) In einem Laborfermentor mit einem Bruttovolumen von 15l und einem Masseinhalt von 4kg wurde die Kultivierung einer Hefe unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Hefe: *Candida utilis*

Temperatur: 32 °C

pH-Wert: 4,5

Verweilzeit: 4 h

Begasung: 250l Luft/h (nicht sterilisiert)

Stickstoffversorgung: HNO_3

Substrat: Schlempe aus einer Ethanol-Gärung

Nährsalzlösung entsprechend Beispiel 1

Die Kultivierung wurde wie folgt durchgeführt: In einer sterilen Vorkultivierung mittels Schüttelkolben wurde eine ausreichende Hefemenge erzeugt, im Batch-Verfahren weitergezüchtet und anschließend kontinuierlich unter unsterilen Bedingungen kultiviert. Unter Einhaltung der genannten Parameter wurde dem Fermentor ein Gemisch, bestehend aus Schlempe und Nährsalzlösung, in einer Menge von 1000g/h zugeführt, so daß die Verdünnungsrate $D = 0,25 \text{ h}^{-1}$ betrug. Die Schlempe wurde unverdünnt eingesetzt. Unter diesen Bedingungen erhielt man eine Konzentration von 15,8g Hefetrockensubstanz/kg Fermentorablauf, was einer Produktivität von 3,95g Hefetrockensubstanz/kg h entspricht. Die Kontrolle der Fremdkeime erfolgt wieder mittels Plattentest. Als Maß für den Salzgehalt wurde die Sulfatkonzentration verwendet (Angabe in g SO_4^{2-} /kg separierter Fermentorablauf)

Ergebnisse:

1. Fremdkeime

nach 5 Tagen Kultivierung: 8

nach 7 Tagen Kultivierung: 11

2. Salzkonzentration: 1,6g/kg

- b) Parallelversuch zur Demonstration des Effektes

Es wurde ein Parallelversuch mit veränderter Stickstoffversorgung und pH-Wert, aber sonst gleichen Bedingungen durchgeführt. Anstelle der Salpetersäure wurde Ammoniak eingesetzt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle

Kultivierungsdauer	pH-Wert	Fremdkeime	Salzkonzentration
2 Tage	4,5	148	2,8
5 Tage	4,5	950	2,8
2 Tage	4,0	87	12,6
5 Tage	4,0	680	12,6
2 Tage	3,5	19	15,1
5 Tage	3,5	80	15,1

Die Werte in der Tabelle zeigen deutlich die Unvereinbarkeit zwischen fremdkeimarmen Kultivierung und Reduzierung der Umweltbelastung mit Salz bei Anwendung der üblichen Kultivierung von Mikroorganismen am Beispiel des Substrates Schlempe.

Beispiel 3

In einem Laborfermentor mit einem Bruttovolumen von 15l und einem Masseinhalt von 5kg wurde die Kultivierung einer Hefe unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Hefe: *Candida utilis*

Temperatur: 32 °C

pH-Wert: 4,0

Verweilzeit: 4 h

Begasung: 450l Luft/h (nicht sterilisiert)

Stickstoffversorgung: HNO_3

Substrat: Schlempe mit Zusatz von Melasse

Die Anzucht der Hefe erfolgte gemäß Beispiel 1. Unter Einhaltung der obengenannten Parameter wurde dem Fermentor ein Gemisch, bestehend aus Schlempe (80 Ma.-%), Melasse (4 Ma.-%) und Nährsalzlösung, in einer Menge von 1250g/h zugeführt. Der unter diesen Bedingungen erhaltene Fermentorablauf enthielt 24g Hefetrockensubstanz/kg, was einer Produktivität von 6g Hefetrockensubstanz/kg h entspricht. Die Zahl der Fremdkeime betrug:

nach 2 Tagen 4

nach 5 Tagen 7

nach 7 Tagen 8

Beispiel 4

Die Kultivierung wurde gemäß Beispiel 2 durchgeführt, wobei jedoch aufgrund eines Pumpenausfalls die Kultivierung für 6h unterbrochen werden mußte. Danach ergab eine mikroskopische Untersuchung, daß eine Infektion erfolgt war. Diese wurde folgendermaßen beseitigt:

Der pH-Wert wurde sofort nach der mikroskopischen Feststellung der Infektion um eine Einheit auf 3,5 mittels Schwefelsäure abgesenkt (für 8h).

Ergebnis:

Zahl der Fremdkeime 4

Durch periodisches Absenken des pH-Wertes alle 48h um eine Einheit konnte die Zahl der Fremdkeime über einen Zeitraum von 2 Wochen kleiner als 10 gehalten werden.

Beispiel 5

In einem Laborfermentor mit einem Bruttovolumen von 15l und einem Masseinhalt von 4 kg wurde die Kultivierung eines Pilzes folgendermaßen durchgeführt:

Pilz: *Aspergillus niger*

Temperatur: 30°C

pH-Wert: 4,0

Begasung: 300l Luft/h (nicht sterilisiert)

Substrat: Glucose

Stickstoffversorgung: HNO_3

Nährsalzlösung: entsprechend Beispiel 1

Ergänzung: Zugabe von Maisquell-Wasser

Die Anzucht des Myzels erfolgte in einer Vorfermentation unter sterilen Bedingungen. Die weitere Kultivierung wurde als Fed-Batch unter unsterilen Bedingungen über einen Zeitraum von 55h durchgeführt, wobei eine Konzentration von 19,8g Trockensubstanz/kg am Ende der Kultivierung vorlag.

Das Pilzmyzel wurde durch Filtration von der wäßrigen Phase abgetrennt und anschließend im Filtrat mittels Plattentests die Zahl der Fremdkeime bestimmt.

Ergebnis:

2×10^8 Keime je g TS (Fremdkeime: Hefen)

In einem Parallelversuch wurde anstelle von Nitrat-Stickstoff Ammoniak zur Stickstoff-Versorgung der Zellen eingesetzt und unter sonst gleichen Bedingungen kultiviert. Nach 18h mußte die Kultivierung infolge einer Bakterieninfektion abgebrochen werden.

Beispiel 6

In einem Laborfermentor mit einem Bruttovolumen von 15l und einem Masseinhalt von 4 kg wurde die Kultivierung eines Pilzes folgendermaßen durchgeführt:

Pilz: *Aspergillus niger*

Temperatur: 30°C

pH-Wert: 3,8

Begasung: 300l Luft/h (sterilisiert)

Substrat: Schlempe

Stickstoffversorgung: HNO_3

Nährsalzlösung: entsprechend Beispiel 1

Die Anzucht des Myzels erfolgte in einer Vorfermentation unter sterilen Bedingungen. Die Kultivierung wurde danach unter unsterilen Bedingungen (außer Luft) als Batch über einen Zeitraum von 30h durchgeführt, wobei eine Konzentration von 10,8g Trockensubstanz/kg am Ende der Kultivierung vorlag.

Das Pilzmyzel wurde durch Filtration von der wäßrigen Phase abgetrennt und anschließend im Filtrat mittels Plattentest die Zahl der Fremdkeime bestimmt.

Ergebnis:

$0,5 \times 10^8$ Keime je g TS (Fremdkeime: Hefen)

In einem Parallelversuch wurde anstelle von Nitrat-Stickstoff Ammoniak zur Stickstoff-Versorgung der Zellen eingesetzt und unter sonst gleichen Bedingungen kultiviert. Nach 14h mußte die Kultivierung infolge einer Bakterieninfektion abgebrochen werden.