



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **255 545 A1**4(51) C 12 Q 1/02  
C 12 N 1/32**AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN**

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 Q / 295 723 5

(22) 30.10.86

(44) 06.04.88

(71) VEB Chemieanlagenbaukombinat Leipzig – Grimma, PSF 674, Leipzig, 7010, DD

(72) Scheibé, Peter, Dipl.-Chem.; Findeisen, Eberhart, Dipl.-Phys.; Jesche, Gerhard; Gnoth, Manfred; Rosenheinrich, Dieter, Dipl.-Jur., DD

(54) **Kontrolle und Steuerung des Kultivierungsprozesses von Mikroorganismen**

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kontrolle und Steuerung des Kultivierungsprozesses von Mikroorganismen, die Cytochrom C im Atmungssystem enthalten, insbesondere der kontinuierlichen Fermentation von methylophilen Mikroorganismen mit dem Substrat Methanol bei einer Verweilzeit nahe/gleich der maximalen spezifischen Wachstumsrate. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, durch eine spezielle Kontrolle und Steuerung des Fermentationsprozesses eine Annäherung an die maximal mögliche Wachstumsrate zu erreichen und die Produktivität bei Sicherung der Stabilität der Kultivierung und möglichst geringer Änderung des Substratverbrauchs zu erhöhen. Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß die Kultivierung bei konstanter Gelöstsauerstoffkonzentration geführt wird, Stickstoff- und Phosphorkonzentration in vorgegebenen Sollwertbereichen geregelt werden und die Substratdosierung mittels eines Cytochrom C-Gerätes gesteuert wird. Dabei entspricht der Sollwert des Cytochrom C-Reduktionsgrades dem Reduktionsgrad  $C_{red}$ , der bei Optimierung auf die Zielgrößen Produktivität und Substratverbrauch erhalten wird und für den aktiven Zustand der Atmungskette charakteristisch ist.

## Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Kontrolle und Steuerung des Kultivierungsprozesses von Mikroorganismen, die Cytochrom C im Atmungssystem enthalten, insbesondere der kontinuierlichen Kultivierung von methylo trophen Mikroorganismen mit dem Substrat Methanol, mittels bekannter Regelkreise und einem Cytochrom C-Meßgerät, bei Annäherung an die maximale spezifische Wachstumsrate, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Kultivierung bei konstanter Gelöstsauerstoffkonzentration im Bereich von 1 bis 5 ppm, vorzugsweise zwischen 1 und 3 ppm, einer Stickstoffkonzentration im Bereich von 50 bis 300 mg N/l, vorzugsweise 80 bis 150 mg N/l, und einer Phosphorkonzentration zwischen 20 und 250 mg P/l, vorzugsweise zwischen 30 und 150 mg P/l, geführt wird, die Substratdosierung mittels eines Meßsignals  $C_{red}$  gesteuert wird, das den physiologischen Zustand der Mikroorganismenzellen am Reduktionszustand des Cytochrom C widerspiegelt, dieser Reduktionsgrad im Meßbereich von 5 bis 70%, vorzugsweise 5 bis 25%, eingestellt wird und gleich oder größer ist als der  $C_{red}$ -Wert, der für ein optimales Wachstum hinsichtlich Produktivität und Substratverbrauchskoeffizienten ermittelt wurde.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß ein Teil des Stickstoffbedarfs durch die Zugabe von anorganischen und/oder organischen Ammoniumsalzen zur Nährlösung abgedeckt wird.

## Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kontrolle und Steuerung des Kultivierungsprozesses von Mikroorganismen, insbesondere von methylo trophen Bakterien, über das Atmungsenzym Cytochrom C und ist anwendbar in der Biotechnologie. Die Erfindung ist in die IPK C 120, 1/00 einzuordnen.

## Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Von großer Bedeutung für die Ökonomie biotechnologischer Verfahren ist die Raum-Zeit-Ausbeute. Sie ist deshalb vielfach Zielgröße der Optimierung, wobei eine Reihe weiterer Faktoren zuberücksichtigen sind, so die Bedarfs- und Verbrauchskennziffern wie Substrat- und Nährstoffbedarf, Sauerstoffbedarf, aber auch die Qualität der anfallenden Biomasse. Um eine stabile Prozeßführung zu sichern, wird nicht bei der maximalen spezifischen Wachstumsrate, sondern bei einer niedrigeren Wachstumsrate fermentiert. So wird die maximale spezifische Wachstumsrate z. B. für den Bakterienstamm MB 58 (IMET B 346) mit 0,17 bis 0,18 h<sup>-1</sup> angegeben, entsprechend einer Verweilzeit von 5,5 Stunden (DD-WP 141529). Diese Wachstumsrate läßt sich mit den bisher üblichen Regel- und Kontrollstrategien, etwa entsprechend der DD-WP 157346 nur kurzfristig erreichen, sodaß gewöhnlich 7 bis 8 Stunden Verweilzeit, entsprechend einer spezifischen Wachstumsrate von  $\mu = 0,143$  bis 0,125 h<sup>-1</sup> fermentiert wird.

Bisher angewendete Regelstrategien gehen von der Biomasse- oder Substratkonzentration (DD-WP 157346), der Stickstoffverbrauchsgeschwindigkeit (DD-WP 211124) bzw. der Einstellung von Konzentrationssollwerten als Steuergrößen aus, wie des Phosphors (DD-WP 155329) oder des NH<sub>3</sub>-Stickstoffs (DD-WP 159265). Der Nachteil aller vorstehend genannten Strategien besteht in der alleinigen Erfassung makroskopischer Eigenschaften der Mikroorganismenkultur. Durch die Einführung des Cytochrom C-Signals zur Erfassung des physiologischen Zustandes und der Biomassekonzentration (GB-PS 1284500, DD-WP 154449, DD-WP 154545) gelingt es, diese Nachteile zu überwinden und mittels geeigneter Regelstrategien den Substratverbrauch zu senken. Es gelang jedoch bisher nicht, die Kultivierung stabil für Verweilzeiten nahe bzw. gleich der maximalen spezifischen Wachstumsrate für längere Zeiträume zu realisieren.

Es ist auch bekannt, daß das Atmungsenzym Cytochrom C charakteristische Absorptionsbanden besitzt, aus deren Intensität und Lage Rückschlüsse auf den physiologischen Zustand von Mikroorganismenkulturen und deren Konzentration im Fermentationsmedium möglich sind. Diese Erkenntnisse wurden in den Patenten DD-WP 154449 und DD-WP 223371 umgesetzt in Regelstrategien für die Substratdosierung. Nach DD-WP 154449 wird ein den Zustand des Cytochrom C charakterisierendes Meßsignal als Steuergröße verwendet, wobei unter optimalen Bedingungen der Zustand der Fermentationskultur durch den Reduktionsgrad der Atmungskette des Cytochrom C im beschriebenen Verfahren gekennzeichnet ist (E. Hofmann, Dyn. Biochemie Bd. 2, Akademie Verlag Berlin 1984).

## Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Senkung der Verweilzeiten und die Erhöhung der Biomasseausbeute bei im wesentlichen konstantem Substratverbrauch für Kultivierungsprozesse von methylo trophen Mikroorganismen.

## Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren der Kontrolle und Regelung des Fermentationsprozesses von Mikroorganismen, die das Enzym Cytochrom C in der Atmungskette haben, insbesondere von methylo trophen Bakterien, zu entwickeln, das eine stabile kontinuierliche Fermentation über lange Zeiträume mit Durchflußraten nahe der maximalen spezifischen Wachstumsrate ermöglicht.

Erfindungsgemäß wurde die Aufgabe dadurch gelöst, daß mittels mehrerer bekannter Regelkreise und eines Cytochrom C-Meßgerätes die kontinuierliche Kultivierung der methylophilen Bakterien auf dem Substrat Methanol bei konstanter Gelöstsauerstoffkonzentration geführt wird, Stickstoff- und Phosphorkonzentration in vorgegebenen Sollwertbereichen geregelt werden und die Substratdosierung mittels eines Meßsignals  $C_{red}$  gesteuert wird, das den physiologischen Zustand der Mikroorganismenzellen am Reduktionsgrad des Cytochrom C widerspiegelt. Dieser Sollwert ist etwas höher als der  $C_{red}$ -Wert, der für ein optimales Wachstum hinsichtlich Produktivität und Substratverbrauchscoeffizienten ermittelt wird und für den aktiven Zustand der Atmungskette charakteristisch ist. Bei methylophilen Bakterien, z.B. für die Kultur MB 58 (IMET B 346), liegt der aktive Zustand bei einem Reduktionsgrad des Cytochrom C von 5 bis 10%. Bei einer Fermentation mit einem Reduktionsgrad des Cytochrom C im Bereich von 5 bis 10%, vorzugsweise im Bereich von 5 bis 25% und gleichzeitiger Regelung des Stickstoff- und Phosphorgehaltes im Bereich von 50 bis 300 mg N/l, vorzugsweise von 80 bis 150 mg N/l und 20 bis 250 mg P/l, vorzugsweise 30 bis 150 mg P/l sowie einer Regelung der Gelöstsauerstoffkonzentration im Bereich von 1 bis 5 ppm, vorzugsweise 1 bis 3 ppm, wurde die Durchflußrate bis an die maximale spezifische Wachstumsrate, z.B. für das System MB 58 (IMET B 346)/Methanol auf  $0,18\text{ h}^{-1}$ , erhöht und der Prozeß über mehr als 50 Verweilzeiten stabil gefahren. Bisher war die Realisierung solcher Durchflußraten nur kurzzeitig stabil möglich. Der Stickstoffeintrag erfolgt sowohl über die pH-Regelung, vorzugsweise mit Ammoniak, und über die vom Stickstoffmeßgerät angesteuerte Regelung, vorzugsweise mit anorganischen und/oder organischen Stickstoffverbindungen, wie z.B. Ammonsulfat, Ammoniumchlorid oder Harnstoff. Die Gesamtdurchflußmenge durch den Fermentor und damit die Verweilzeit wurde über eine Verweilzeitregelung konstant gehalten.

### Ausführungsbeispiele

Die Erfindung wird nachstehend an einigen Ausführungsbeispielen erläutert:

#### Beispiel 1

Die methylophile Bakterienkultur MB 58 wurde mit Methanol als Substrat in einem 30l Fermentor vom Typ LFS 130 im kontinuierlichen Prozeß unter folgenden Bedingungen kultiviert:

|                               |                       |
|-------------------------------|-----------------------|
| Temperatur                    | 30–35 °C              |
| pH-Wert                       | 4 bis 5               |
| Durchflußrate                 | $0,125\text{ h}^{-1}$ |
| Gelöstsauerstoffkonzentration | 2 bis 3 ppm           |
| Stickstoffkonzentration       | 50 bis 300 mg N/l     |
| Phosphorkonzentration         | 20 bis 150 mg P/l     |
| Restmethanolkonzentration     | 0 bis 0,5 g/l         |

Die Nährlösung wies die für die Kultur MB 58 übliche Zusammensetzung auf und enthielt keine Stickstoffquelle. Als Methanollösung wurde eine wäßrige Lösung von reinem Methanol mit 10 Ma.-% eingesetzt. Die pH-Regelung erfolgte mit wäßriger Lösung von reinem Ammoniak (12 Ma.-%). Über eine Summenregelung wurde die Gesamtdosiermenge konstant gehalten. Ohne Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens entspricht der Reduktionsgrad  $C_{red}$  des Cytochrom C unter diesen Bedingungen einem Wert von 20 bis 30%. Die Biomassekonzentration betrug 20 g/l bei einer Produktivität von  $2,5\text{ g/l} \cdot \text{h}$  und einem

$\alpha \frac{S}{X}$ -Wert von 2,87 g Methanol/g Biomasse ( $Y_{X/S} = 0,348$ ).

Die vorstehend genannten Prozeßbedingungen wurden erfindungsgemäß folgendermaßen geändert:

Ein Teil des Stickstoffbedarfs wurde über die Regelstrecke der Nährlösungsdosierung (Anwendung einer photometrischen Stickstoffbestimmung) durch anorganische und/oder organische Ammoniumsalze abgedeckt, der Rest über die pH-Regelstrecke. Mittels eines weiteren photometrischen Meßgerätes mit angeschlossener Regelstrecke wurde die Phosphorkonzentration in der Fermentationslösung auf 100 mg P/l eingestellt. Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde zwischen 2 und 3 ppm geregelt, eine Durchflußrate von  $0,172\text{ h}^{-1}$  und ein Reduktionsgrad  $C_{red}$  von 10 bis 15% am Cytochrom C-Gerät zur Regelung der Substratdosierung eingestellt.

Nach 24 Stunden hatte sich ein stabiles Fermentationsregime eingestellt, die Biomassekonzentration betrug 15,5 g/l, die Produktivität lag bei  $2,65\text{ g/l} \cdot \text{h}$  und der Substratverbrauchscoeffizient

$\alpha \frac{S}{X}$  betrug 2,63 ( $Y_{X/S} = 0,380$ ). Unter diesen Bedingungen ließ sich sowohl eine Produktivitätserhöhung als auch eine Substratverbrauchssenkung im Vergleich zur standardmäßigen Versuchsdurchführung erreichen.

#### Beispiel 2

Zur Überprüfung der Stabilität des Kultursystems MB 58/Methanol wurde unter gleichen Bedingungen wie im Beispiel 1 die ritische Durchflußrate, entsprechend der maximalen spezifischen Wachstumsrate von  $0,18\text{ h}^{-1}$ , eingestellt. Die Biomassekonzentration betrug 15,25 g/l bei einer Produktivität von  $2,7\text{ g/l} \cdot \text{h}$ , der Substratverbrauchscoeffizient nahm geringfügig zu, er betrug 2,70 ( $Y_{X/S} = 0,37$ ) bei gleichem  $C_{red}$ -Wert wie im Beispiel 1.

### Beispiel 3

Die Kultivierung der methylotrophen Kultur MB 58 (IMET B346) erfolgt wie im Beispiel 1 beschrieben bei konstanter Gelöstsauerstoffkonzentration sowie Regelung von Stickstoff- und Phosphorgehalt in der Fermentationsbrühe. Der Reduktionsgrad  $C_{\text{red}}$  des Cytochrom C wurde auf 50 % erhöht, indem über ein Regelsystem mehr Methanol als Substrat in den Fermentor dosiert wurde. Die Durchflußrate betrug  $0,172 \text{ h}^{-1}$ . Die Ermittlung der fermentationspezifischen Daten nach drei Verweilzeiten ergab eine Biomassekonzentration von  $15,5 \text{ g/l}$  entsprechend einer Produktivität von  $2,65 \text{ g/l} \cdot \text{h}$ . Der

Substratverbrauchskoeffizient  $\alpha \frac{\text{S}}{\text{X}}$  stieg auf 2,9 an.