



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 254 214 A1

4(51) C 12 Q 3/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 Q / 278 156 6

(22) 02.07.85

(44) 17.02.88

(71) VEB JENAPHARM, Otto-Schott-Straße 13, Jena, 6900, DD

(72) Wolleschonsky, Erhard, Dr. Dipl.-Phys.; Heimke, Claus, Dipl.-Math.; Christner, Arnulf, Dr. Dipl.-Biol.; Groh, Jürgen, Dr. sc. nat. Dipl.-Math.; Beyer, Dietmar, Dr. Dipl.-Math., DD

(54) Verfahren zur Ermittlung des Prozeßzustandes bei Fermentationsprozessen nach dem fed-batch-Prinzip unter Substratlimitation

(57) Die Erfindung bezieht sich auf die Herstellung von Antibiotika mit einzelligen und mycelbildenden Mikroorganismen unter Verwendung von dimeren, oligomeren und polymeren C- und N-Substraten durch Dosierung. Ziel ist ein Verfahren, durch das die dem aktuellen Leistungsvermögen unter realen Kultivierungsbedingungen entsprechende C-Dosierungsrate bei einer Antibiotikumfermentation bestimmt werden kann. Es wurde ein Dosierungsregime entwickelt, welches die Anwendung von dimeren und oligomeren C-Substraten für solche produktbildenden Mikroorganismen gestattet, die die chemisch unterschiedlichen C-Substratmonomeren nach enzymatischer Hydrolyse nicht simultan verwerten. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß als Substrat Saccharose in Verbindung mit einem Dosierungsregime, das eine Zustandserkennung und den periodisch wiederkehrenden, hochaktiven transient-Zustand des mikrobiellen Prozesses erlaubt, eingesetzt wird.

Erfindungsanspruch:

Verfahren zur Ermittlung des Prozeßzustandes bei Fermentationsprozessen nach dem fed-batch-Prinzip unter Substratlimitation, dadurch gekennzeichnet, daß die Dosierung des limitierenden Substrates unterbrochen wird, und/oder daß eine vorgegebene Menge des limitierenden Substrates während der Substratlimitation zugegeben wird und daß jeweils die Prozeßzustandsänderungen durch Messung eines oder mehrerer der Parameter Gelöstsauerstoffpartialdruck, Wasserstoffionenkonzentration, Kohlendioxidpartialdruck, Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalt in der Abluft bestimmt wird, wobei die Meßwerte analog oder vorzugsweise digital verarbeitet werden und die Dosiermenge und/oder die Pausen- und Arbeitszeit für die Dosierung des limitierenden Substrates, insbesondere Mischsubstrates anlagen- und prozeßbezogen bestimmt wird und als Grundlagen für die Steuerung der Dosierate dient.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Zustandserkennung und -einschätzung bei Fermentationsverfahren nach dem fedbatch Prinzip unter Substratlimitation insbesondere bei Fermentationsprozessen zur Herstellung von Antibiotika mit einzelligen und mycelbildenden Mikroorganismen unter Verwendung von dimeren, oligomeren und polymeren C- und N-Substraten durch Dosierung.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Herstellung von Antibiotika kann bekanntlich durch Kultivierung von einzelligen oder mycelbildenden Mikroorganismen mit Nährmedien nach dem batch-, semi-batch-, fed-batch- und repeated fed-batch-Prinzip erfolgen (T. Yamane, S. Hirano, J. Ferment. Technol. 55, 158 bis 165, 1977; Yoshida, F., Yamane, T., Nakamoto, K.-J., Biotech. Bioeng. XV, 257 bis 270, 1973; R. C. Jones, R. M. Anthony, European J. Appl. Microbiol. 4, 87 bis 92, 1977; Pirt, S. J. J. Appl. chem. Biotechnol. 24, 415 bis 427, 1974).

Die durch diese Prinzipien den Kulturen kontinuierlich oder diskontinuierlich zugeführten Substrate sind C- und/oder N-Substrate im monomeren bis polymeren Zustand.

Bei der Dosierung von monomeren, chemisch gleichartigen C-Substraten erfolgt das Zustandekommen eines quasi-steady-state-Zustandes der Kulturen und die Anpassung der Biomassekonzentration an den durch technische Lösungen realisierten Leistungseintrag der Fermentoren ungestört durch konkurrierende C-Monomere. Dieses läßt sich in gleicher Weise durch eine Substratdosierung mit technisch relevanten, dimeren bis polymeren C-Substraten erreichen, wenn diese vorher in die chemisch gleichartigen Monomeren durch chemische Hydrolyse oder durch den enzymatischen Aufschluß durch die Mikroorganismen überführt worden sind.

Der Nachteil des geschilderten Standes der Technik besteht darin, wenn technisch relevante oder gut verfügbare C-Substrate für die Dosierung zur Anwendung kommen, die aus chemisch unterschiedlichen Monomeren bestehen. In diesem Fall wird der für eine optimale Antibiotikumproduktion notwendig quasi-steady-state-Zustand durch Vorliegen von Substrathierarchien und unterschiedlichen Transportgeschwindigkeiten durch die Zellmembran der produktbildenden Mikroorganismen gestört. Aus der Sicht der Prozeßführung ist bekannt, daß mikrobielle Produktbildner sehr empfindlich sind und bereits auf geringe Änderungen der Umweltbedingungen stark reagieren.

Die gegenwärtig angeordneten Sensoren zur Messung physikalisch-technischer und physikalisch-chemischer Parameter in der flüssigen und gasförmigen Phase des Fermentors beschreiben die Milieubedingungen der Mikroorganismen nur verhältnismäßig grob. (A. Einsele, Swiss Pharma 3 (1981), Nr. 1 bis 2, Seite 17 bis 19). Die Arbeiten zur Entwicklung von Sensoren, die die Konzentrationen der reduzierten Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid, Adenosintriphosphat oder Ribonucleinsäure messen können, sind im Gange. Es sind jedoch weitere Verbesserungen erforderlich, um auch on-line-Messungen in den Zellen und im Routinebetrieb durchführen zu können. Die zur Zeit unbefriedigende Situation bei on-line-Messungen für Sterilfermentationsprozesse bezüglich Genauigkeit und Langzeitstabilität bietet keine ausreichende Basis, um die an der Zelle herrschenden Umweltbedingungen meßtechnisch exakt zu erfassen und um deren Änderungen quantitativ zu beschreiben. Zur Zeit verwendet man in der Biotechnologie idealisierte Fermentormodelle, die als wesentliche Bedingung einen homogenen Reaktor voraussetzen. Diese nichtstrukturierten Modelle sind nicht in der Lage, genaue Informationen über die momentanen und örtlichen Umweltänderungen zu liefern, unter denen die Mikroorganismen leben. Mit zunehmendem Reaktorvolumen werden damit die Unterschiede zwischen den aktuell herrschenden Umweltbedingungen, denen die Zellen an den verschiedenen Orten ausgesetzt sind und den gemittelten Verhältnissen mit denen man in den idealisierten Modellen rechnet immer größer. Bei Kulturlösungen mit nichtnewtonischem Fließverhalten ist es außerdem nicht möglich, durch das meist angewendete Prinzip der geometrischen Ähnlichkeit die Misch- und Transportparameter in den einzelnen Maßstabgrößen invariant zu halten. Insbesondere ändern sich die Gasgeschwindigkeit und die Schergeschwindigkeitsverteilung im Fermentor. Bei Antibiotikumverfahren führt das gegebenenfalls zu morphologischen Veränderungen der Mikroorganismen. Dadurch werden gleichfalls Stofftransporteigenschaften in der Kette bis zum Zellinneren unkontrollierbar variiert. Diese Zustandsänderungen entziehen sich einer exakten Darstellung bzw. quantitativen Darstellung im Modell unter realen Kultivierungsbedingungen.

Die auftretenden Inhomogenitäten sind mit einer Verminderung des Leistungsvermögens verbunden, die auch mit unerwünschten Nebenproduktsynthesen zusammenhängen können.

Die Effizienz des Verfahrens ist somit in einer bestimmten Fermentorgröße nur durch aufwendige Anpassungsexperimente ermittelbar.

Die zur Festlegung eines Dosierungsregimes verwendeten analytischen Daten aus Probemessungen ermöglichen auch nur eine grobe Einschätzung des Versorgungszustandes, so daß eine präzise Beurteilung des Grades der Limitation der Zellen — wie sie für Mischsubstratdosierungen notwendig ist — nicht gegeben ist.

Aus den genannten Gründen ist eine Regelung der Substratdosierung mit den bekannten technischen Mitteln nicht befriedigend durchführbar. (Scheigere, K. Chem. Ing. Tech. 55 (1983) Nr. 12, S. 915 bis 924 und Chem. Ing. Tech. 56 (1984) Nr. 8, S. 579 bis 589).

Die Anwendung adaptiver Regelungsstrategien setzt die Kenntnis geeigneter Zustandserkennungsverfahren, die repräsentative Informationen über den Kultivierungszustand zu definierten Zeitpunkten liefern, voraus. Die industriell genutzten Verfahren mit Substratdosierung zur Herstellung von Antibiotika basieren auf einem in dem jeweiligen Maßstab durch aufwendige Versuche empirisch mit den beschriebenen Mitteln gewonnenen Dosierungsregime in Abhängigkeit von der Fermentationszeit.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens, durch das die dem aktuellen Leistungsvermögen unter realen Kultivierungsbedingungen entsprechende C-Dosierungsrate bestimmt werden kann, die als Grundlage für die rechnergestützte Substratnachdosierung dient.

Gleichzeitig ermöglicht es die Anpassung der einzelnen Substratversorgung zur ökonomischen Verwertung bei gegebener Biomassekonzentration für den gesamten Prozeßverlauf.

Ein weiteres Ziel besteht in Effektivitätsaussagen bei scale-up-Untersuchungen.

Der Zweck der Erfindung besteht darin, eine Antibiotikumfermentation mit vergleichbaren oder gesteigerten Leistungen auch dann zu erreichen, wenn dimere oder oligomere C-Substrate dosiert werden, für deren Monomere Substrathierarchien oder/und unterschiedliche Metabolisierungsgeschwindigkeiten bei den antibiotikumbildenden einzelligen oder mycelbildenden Mikroorganismen bestehen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Dosierregime zu entwickeln, welches die Anwendung von dimeren und oligomeren C-Substraten für solche produktbildenden Mikroorganismen gestattet, die die chemisch unterschiedlichen C-Substratmonomeren nach enzymatischer Hydrolyse nicht simultan verwerten. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß als Substrat Saccharose in Verbindung mit einem Dosierungsregime, das eine Zustandserkennung und den periodisch wiederkehrenden, hochaktiven transient-Zustand des mikrobiellen Prozesses erlaubt, eingesetzt wird.

Es wurde überraschend gefunden, daß durch ein rechnergestütztes Saccharosedosierregime die simultane Verwertung von Fruktose im Beisein von Glucose bei mycelbildenden, penicillinproduzierenden Mikroorganismen erzwungen und damit die genetisch fixierte Hierarchie — Glucose vor Fructose — in ihren Auswirkungen aufgehoben werden kann. Bei der Dosierung von Saccharose als dimeres Substrat wird während der Substratlimitation die Effizienz der Verwertung für die Antibiotikumbildung durch den mycelbildenden Mikroorganismus nicht nur durch die genetisch fixierte, bis jetzt nicht aufhebbare Hierarchie — Glucose vor Fructose bzw. C₄-Substrate vor C₃-Substrate — beeinflusst, sondern auch durch die Geschwindigkeit der strukturellen Entwicklung der filamentösen Myzelien während der Antibiotikumbildung. Diese strukturelle Entwicklung betrifft insbesondere das Verhältnis der penicillinbildenden apikalen Bereiche zu den dickwandigen, transportkapazitätsgeminderten basalen Abschnitten (Wittler, R.; Schügerl, K. Dechema Monographien, Bd. 35, 101 bis 114, 1983) Saccharose ist ein Substrat, dessen Energiegehalt geringer als sein Kohlenstoffgehalt (Babel, W., Z. allg. Mikrobiol. 19, 671 bis 677, 1979). Obwohl die Kohlenstoff/Energieverhältnisse der C-Substrate sich nicht im Wirkungsgrad widerspiegeln, werden allgemein Substrate mit Energiemangel mit einem höheren energetischen Wirkungsgrad durch den produktbildenden Mikroorganismus verwertet als Substrate mit Energieüberschuß (Heinritz, B. et al. Z. allg. Mikrobiol. 22, 535 bis 544, 1982).

Die Komplexität dieser aufgezeigten Sachverhalte macht deutlich, daß es fraglich ist, ob durch ein Substratdosierregime den Mikroorganismen ein Regime aufgezwungen werden kann, der sich in einer gesteigerten, konstanten Biosyntheseleistung äußert.

Das Wesen des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß die für den Mikroorganismus bemerkbaren wichtigen C-Konzentrationsschwankungen, d. h. physiologisch relevanten Änderungen der Umweltbedingungen, in ihren Auswirkungen — als Reaktion der Zelle unter den herrschenden Bedingungen — ausgewertet werden. Dabei werden vorzugsweise Impulshöhe der C-Dosierung, Dosierungsdauer und -pause sowie Konzentrationsprofil in ihren Wirkungen und nach entsprechenden Auswertungen zur Charakterisierung und Beschreibung des Zustandes der Gesamtkultur herangezogen.

Die so gewonnene Antwortfunktion (Informationen über Limitationszustand für Substrate aus dem Primärstoffwechsel) bildet das Kriterium für die Beeinflussung der Stellgrößen unter den realen Kultivierungsbedingungen im industriellen Maßstab. Es dient der Formulierung und Aktualisierung der Steueralgorithmen für die Sauerstoffversorgung durch Drehzahl, Systemdruck und Luftdurchsatz, für die Saccharosedosierung (Dosierregime) durch Arbeits-, Pausenzeit und Dosagemenge der

Dosiereinrichtung und für die Biomassekonzentration durch Festlegung des Erntezeitpunktes, des Verdünnungseffektes und ggf. durch Maßnahmen zur Wachstumsbeeinflussung.

Ausführungsbeispiel

- Der zu beurteilende Fermentationsprozeß läuft in einer hochinstrumentierten Fermentationsanlage ab, die über die erforderlichen on line-Meßmöglichkeiten verfügt.

Die Daten der Meßstellen $u_{s(1)} \dots u_{s(n)}$ dienen zur Prozeßeinschätzung.

Damit dieses im laufenden Prozeß in rationeller Form geschehen kann, wird die Einschätzung durch Prozeßrechentchnik bzw. durch Prozeßmikrorechentchnik unterstützt.

Zu diesem Zweck werden die Meßsignale in Form digitaler Meßdaten bereitgestellt, die vom Rechner zur Weiterverarbeitung genutzt werden können. Der zu beurteilende Fermentationsprozeß basiert auf mehreren Substratzuführungen. Dabei handelt es sich um gasförmige, flüssige Substrate oder notwendige Zuschlagstoffe wie Entschäumer oder pH regulierende Reagenzien. Die Prozeßbeurteilung erfolgt unter Verwendung der Substratzuführung $s(1) \dots s(n)$.

Zur Erzeugung der die Beurteilungsgrundlage bildenden Datenmengen werden die Substratzuführungen charakteristisch für einen bestimmten Zeitpunkt verändert. Dies geschieht so, daß gewisse Änderungen parallel zueinander, phasenverschoben zueinander oder in sequentieller Abfolge erfolgen. Vorzugsweise werden sprungförmige Substratzuführungen benutzt. Die Daten der Meßstellen $u_{s(1)} \dots, u_{s(n)}$ werden in der Zeitspanne der Prozeßreaktionsdauer registriert.

Ergänzt um die Datenmenge zur Charakterisierung des Ausgangszustandes vor Manipulationsbeginn und der Datenmenge zur Dokumentation des Prozeßzustandes nach Manipulationsende erhält man die Gesamtdatenmenge zur Beurteilung des aktuellen Prozeßzustandes.

Die Zustandseinschätzung zum gegebenen Zeitpunkt erfolgt durch Auswertung der Meßdatenprofile, der Antwortimpulsformen — höhen und — breiten von integralen, differentiellen abgeleiteten typischen Daten des aktuellen Parameterstandes erreicht. Durch maschinelle Registrierung der Daten werden auch die Grundlagen für die prozeßüberprüfende Beurteilung gelegt.

Analoge Meßwerte erfordern die Datenspeicherung mit ausreichender Empfindlichkeit und die manuelle Folgenauswertung nach den gleichen Prinzipien.
- Der Produktionsfermenter ist ein Rührkessel mit einem geplanten fluiden Nährmedium, das mit einem produktbildenden Penicilliumstamm inokuliert wird. In fermenterbezogener Weise wird durch die Rührereinrichtung und Sterilluftzuführung die Sauerstoffversorgung der Penicilliumkultur und der CO_2 -Abtransport aus der fluiden Phase über die Ablufteinrichtung realisiert. Die für eine stetige maximale Produktbildung notwendige Homogenität des Mediums und die Erzeugung der stammspezifischen, genetisch und phänotypisch bedingten, morphologischen Eigenschaften an Myzels werden durch die Rührerkonstruktion und -geschwindigkeit erreicht. Die Technik dieser Arbeitsschritte entspricht dem bekannten und realisierbaren Stand der Technik. Die Benzylpenicillinfermentation verläuft nach dem fed batch-Prinzip. Neben der optimalen Sauerstoffversorgung ist die Saccharosedosierrate die wichtigste Führungsgröße. Dabei erfolgt die Dosierung auf der Basis einer realisierbaren Technologie quasikontinuierlich. Im Gegensatz dazu wird die gepulste Dosierung durch die zyklische Abfolge von Dosierungszeitspanne und Pausenzeitspanne geführt. In diesem Zusammenhang kommen andere Substratnachdosierungen nicht in Betracht. Die Zustandserkennung des Systems basiert im Zusammenhang mit der Impulsdosierung auf dem Meßwert pO_2 und der Meßwertfolge aus der Abgasanalytik. Die kritische untere Grenze für die Sauerstoffversorgung ist bei einem pO_2 -Wert von 20% erreicht. Die Wahl der Dosierungs- und Pausenzeiten erfolgt unter Beachtung der stammspezifischen Eigenschaften des mikrobiellen Produzenten und einer an den jeweiligen Leistungseintrag angepaßten Biomassekonzentration durch die Vorgabe eines Dosierungsregimes. Dabei beträgt die vom Leistungseintrag abhängige Saccharosedosierrate $1,4 \text{ g/l} \times \text{h}$ und die Arbeitszeitspanne verhält sich zur Pausenzeitspanne wie 1:30. Zur Zustandsbeurteilung wird das Sauerstoffkonzentrationsprofil mikrorechenttechnisch als Wertfolge gespeichert und dem entsprechenden Fermentationsabschnitt mit gepulster C-Substratdosierung zugeordnet. Mit zunehmendem Kulturalter ergibt sich eine Rückkopplung aus der Konstanz oder Nichtkonstanz der Abfolge der Sauerstoffkonzentrationsprofile zum Verhältnis von Dosierungs- und Pausenzeit.