



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

2008 942

Int.Cl.³

3(51) C 12 N 1/16

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N/ 2347 670

(22) 11.11.81

(44) 22.06.83

(71) AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR; BERLIN, DD

(72) SOYEZ, KONRAD, DR.-ING.; SCHULZE, EBERHARD, DIPL.-ING.; PRAUSE, MICHAEL, DR. SC.; DD;

(73) siehe (72)

(74) ADW DER DDR INST. FÜR TECHN. CHEMIE AG PATENTWESEN 7050 LEIPZIG PERMOSERSTR.

15

(54) VERFAHREN ZUR STEUERUNG DER KULTIVIERUNG VON MIKROORGANISMEN

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Steuerung der Kultivierung von Mikroorganismen in salzhaltigen Medien. Der Erfindung liegt das Ziel der Gewährleistung optimaler Salzkonzentrationen zur Verbesserung technisch-ökonomischer Verfahrenswerte zugrunde. Die Aufgabe besteht darin, eine nach Salzkonzentration beeinflusste Kenn- und Steuergröße zu finden, die zur Steuerung des Fermentationsprozesses und der Produktqualität geeignet ist. Die Aufgabe der Erfindung wird dadurch gelöst, daß als Kenn- und Steuergröße die durch den Salzgehalt bestimmte Leitfähigkeit des Fermentationsmediums verwendet wird. Der Verlauf des biologischen Prozesses wird verbessert, die Korrosion von Anlagenteilen vermindert und eine hohe Qualität des Endproduktes gewährleistet.

Titel

Verfahren zur Steuerung der Kultivierung von Mikroorganismen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Durchführung von
 5 Fermentationsprozessen. Sie ist in der technischen Mikrobiologie anwendbar und in die IPK C 12 N einzuordnen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bekannt, daß der Gehalt des Mediums von Fermentationsprozessen an nichtutilisierbaren Nähr- und Spurensalzen und an deren salzbildenden Komponenten die Wirtschaftlichkeit eines entsprechenden Fermentationsprozesses
 10 beeinflußt.

Zum einen geschieht das direkt durch entsprechende Verluste mit dem Ablauf des Fermentationsmediums aus dem Fermentor
 15 bei kontinuierlichen Prozessen. Dieser Verlust steigt mit steigender Konzentration an. Er beläuft sich auf etwa 2 bis 3% der Aufwendungen für das Substrat.

Zum anderen werden die ablaufenden natürlichen und technischen Prozesse beeinflußt, was ebenfalls Auswirkungen auf
 20 die Wirtschaftlichkeit der Prozesse hat. Solche Einflüsse bestehen insbesondere in folgenden Richtungen:

- 1) Einfluß auf die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Mikroorganismen

Um hohe Wachstumsgeschwindigkeiten realisieren zu
 25 können, ist es erforderlich, Werte einzustellen, die eine Limitation durch Nährsalz verhindern. Dadurch ist erreicht, daß andere Reaktanden, wie etwa Sauerstoff oder Kohlen-

stoff, den Prozeß limitieren. Hohe Salzgehalte haben aber bekanntlich den Nachteil, daß die von den Mikroorganismen tolerierten Höchstgrenzen bei Störungen leicht überschritten werden.

- 5 Niedrige Salzkonzentrationen bringen die Gefahr der Salzlimitation, mit der eine Erhöhung von Verbrauchskennzahlen und eine negative Beeinflussung des Stoffübergangskoeffizienten eintreten können.

- 10 2) Einfluß auf die anorganische Belastung der Fermentationsabwässer.

Damit hängen Probleme der Gestaltung der Abwasserreinigungseinrichtungen zusammen. Diese Aufwendungen steigen mit steigender Salzkonzentration. Man ist deshalb bestrebt, niedrige Werte zu realisieren.

- 15 3) Einfluß auf die Standzeit der Anlagen.

Hier spielen insbesondere die Fragen der Verhinderung der Korrosion bei hohen Salzgehalten und die Verhinderung von Versalzungen von Anlagenteilen eine Rolle.

- 20 Insbesondere treten diese Effekte an solchen Anlagenteilen auf, die Zonen starker Beanspruchung durch die Salzkonzentration, wie etwa an den Salzzuführungsstellen, haben. Ein derartiges System ist der Umlaufreaktor, z.B. der IZ-Tauchstrahlreaktor.

- 25 4) Einfluß auf die Qualität des Endproduktes nach der Aufarbeitung, insbesondere auf den Aschegehalt.

Diesem Einfluß kommt besondere Bedeutung zu, da der Aschegehalt die Eignung der Biomassetrockensubstanz für Ernährungszwecke und den Verkaufserlös der Biomasse beeinflusst bzw. durch seine Höhe der Aufwand für zusätzliche technologische Maßnahmen festgelegt wird.

- 30 Hierbei besteht ebenfalls das Erfordernis zur Realisierung niedriger Restsalzwerte, da dadurch niedrige Aschewerte realisiert werden können.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist eine ökonomische Prozeßführung durch Gewährleistung optimaler Salzkonzentration im Fermentationsmedium, um einen günstigen Verlauf des biologischen Prozesses zu sichern, die Korrosion und Versalzung von Anlagenteilen zu vermindern und eine hohe Qualität des Endproduktes zu gewährleisten.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, eine charakteristische Kenngröße des Fermentationsprozesses zu finden, die von der Salzkonzentration beeinflusst wird und deshalb zur Steuerung des Fermentationsprozesses und der Produktqualität geeignet ist.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß der Fermentationsprozeß durch eine die Salzkonzentration und den Aschegehalt der Biomassetrockensubstanz charakterisierende physikalisch-chemische Eigenschaft des Fermentationsmediums gesteuert wird, wobei als charakteristische Größe die Leitfähigkeit des Fermentationsmediums benutzt wird.

Es wurde gefunden, daß zwischen der Leitfähigkeit des Fermentationsmediums, seinem Salzgehalt und dem Aschegehalt der Biomassetrockensubstanz eine eindeutige Beziehung trotz der komplizierten physikochemischen Verhältnisse im Medium dann besteht, wenn der Salzgehalt durch weniger als 5 Komponenten überwiegend bestimmt wird.

Das ist z.B. bei Fermentationen zur Erzeugung von Biomasse für Futterzwecke der Fall.

Die Erfassung der Beziehung zwischen Leitfähigkeitsmeßwert und Salzkonzentration kann über eine direkte Bestimmung der Leitfähigkeit erfolgen. Es wurde gefunden, daß dabei in Fermentationsmedien von Prozessen zur Biomasseproduktion Leitfähigkeiten zwischen 1...10 mS erreicht werden.

Günstiger anzuwenden ist eine indirekte Methode, die auf der Grundlage des Anzeigewertes des Leitfähigkeitsgerätes arbeitet,

wobei eine Eichung des Meßgerätes nach absoluten Leitfähigkeitswerten entfällt und lediglich der Meßbereich durch den maximalen und minimalen zu erwartenden Salzgehalt festgelegt werden braucht. Folgende Methode ist dazu geeignet:

- 5 Von zwei Proben des Fermentationsmediums, deren Salzgehalt möglichst an den Grenzen des erwarteten Salzgehaltes im Medium liegt, werden sowohl der Salzgehalt auf analytischem Wege, beispielsweise durch Ermittlung des Eindampfrückstandes, als auch der Leitfähigkeitsmeßwert bestimmt und miteinander in Beziehung gesetzt. Jedem nun gemessenen Wert der Leitfähigkeit kann auf Grund dieser Beziehung ein Wert der Salzkonzentration zugeordnet werden. Die ermittelte Beziehung kann von Zeit zu Zeit an etwa veränderte Medieneigenschaften angepaßt werden, erfahrungsgemäß ist bei Biomassebildungsprozessen eine tägliche Eichung ausreichend.
- 10 Die Ermittlung des Zusammenhangs zwischen Aschegehalt der getrockneten Biomasse und dem Leitfähigkeitswert während der Fermentation kann auf die gleiche Weise erfolgen.
- 15 Die Steuerung des Salzgehaltes durch die Leitfähigkeit kann in der Weise erfolgen, daß der dem gewünschten Salzgehalt zugeordnete Leitfähigkeitsmeßwert durch entsprechende Maßnahmen aufrechterhalten wird. Zum Beispiel bestehen solche Maßnahmen darin, daß bei Leitfähigkeitsmeßwerten oberhalb des erwünschten Wertes die Zufuhr von stark salzbildenden
- 20 Teilen der Nährsalzlösung oder die gesamte Nährsalzlösungszufuhr unterbrochen wird oder zeitlich begrenzt eine Erhöhung der Produktivität des Prozesses z.B. durch Erhöhung der Sauerstoffzufuhr bei sauerstofflimitierten Prozessen oder durch eine Erhöhung des Substratangebotes bei kohlenstofflimitierten Prozessen, erfolgt. Eine Erhöhung etwa zu
- 25 niedriger Leitfähigkeitsmeßwerte ist durch Dosierung von zusätzlicher Nährlösung leicht zu erreichen.
- 30 Die Steuerung des Aschegehaltes basiert auf den gleichen Grundlagen. Diese Steuerung ist besonders bei denjenigen
- 35 technologischen Varianten von Biomassebildungsprozessen bedeutungsvoll, die ohne Einrichtungen zur bevorzugt mechanischen Flüssigkeitsabtrennung arbeiten und bei denen der Fermentorablauf der direkten Eindampfung unterworfen wird.

Zur Bestimmung des Leitfähigkeitsmeß- oder -anzeigewertes können bekannte Leitfähigkeitsmeßgeräte benutzt werden, z.B. die handelsüblichen Leitfähigkeitsmeßgeräte LM 201 oder LM 301 des VEB Hydromat Bannewitz. Sie können mit einer automa-
 5 tischen Kompensation des Temperatureinflusses und mit Nullpunktunterdrückung ausgestattet sein. Vorteilhaft ist eine linearisierte Anzeige. Der Meßbereich sollte mindestens 0...10 mS betragen.

Die Leitfähigkeitsmeßzelle sollte so ausgeführt sein, daß
 10 nicht durchströmte Raumteile, sogenannte Toträume, in denen sich Verunreinigungen, insbesondere durch lysierte Biomasse, ergeben können, vermieden werden. Ihre Anbringung sollte direkt im Fermentor, oder unmittelbar am Fermentorausgang erfolgen. Wesentlich ist, daß sie von Fermentationsmedium
 15 durchströmt wird, das repräsentative Eigenschaften bezüglich des Salzgehaltes besitzt.

Die Messung kann bei kontinuierlichen oder diskontinuierlichen Prozessen durchgeführt werden.

Das Verfahren ist für beliebige Mikroorganismen/Substrat-
 20 Kombinationen geeignet.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung soll an hand von 3 Beispielen näher erläutert werden.

Beispiel 1

25 Methanolassimilierende Bakterien des Stammes MB 58 (Hinterlegungsnummer ZIMET Jena: IMET B 346) wurden in einem kleintechnischen Fermentor unter folgenden Bedingungen im kontinuierlichen Prozeß gezüchtet:

Fermentationstemperatur: 305 ± 1 K
 30 pH-Wert: $4,0 \pm 0,1$
 Verweilzeit im Fermentor: 7 ... 9 h
 Konzentration der Biomasse im Fermentor: 40 ... 60 g BTS/l

Es wurde ein Nährlösung folgender Zusammensetzung eingesetzt, wobei die angegebenen Mengen in einem Liter Nährlösung gelöst sind:

	H_3PO_4	-	13,5 g
5	K_2SO_4	-	7,8 g
	$MgSO_4$	-	3,7 g
	$CuSO_4$	-	38,4 mg
	$CoSO_4$	-	33,1 mg
	$MnSO_4$	-	89,3 mg
10	H_3BO_3	-	127,5 mg
	$FeSO_4$	-	143,4 mg
	$ZnSO_4$	-	56,1 mg
	Na_2MoO_4	-	21,3 mg

Die Zufuhr von Stickstoff erfolgt über die pH-Regelung mit NH_4OH .

Während der Fermentation wurden im ungestörten stationären Betrieb für die nachstehend aufgeführten Elemente folgende Konzentrationen im Fermentationsmedium gemessen:

	Element	Konzentration (mg/l)
20	P	30 ... 120
	N	50 ... 300
	K	40 ... 200
	Mg	15 ... 30
	Cu	0,1 ... 0,3
25	Mn	1,0 ... 2,0
	Fe	0,5 ... 1,5
	Zn	2,0 ... 2,5

Die Konzentration der Elemente Bor, Kobalt und Molybdän lag unterhalb der Nachweisgrenze von 0,5 mg/l.

30 Die Gesamtsalzkonzentration wurde analytisch durch Ermittlung des Eindampfrückstandes des Fermentationsmediums bestimmt.

Bei Beginn der Fermentation wurden für zwei ausgewählte Salzkonzentrationen bei jeweils niedrigen und hohen Restkonzentrationen im Fermentationsmedium sowohl der Eindampfrückstand als auch der Leitfähigkeitsanzeigewert bestimmt, miteinander in Beziehung gesetzt und als Eichnormal benutzt. Aus dem Zusammenhang läßt sich eine mathematische Beziehung der Form Gl. (1) bestimmen.

$$(1) \text{ Salzgehalt} = 3,493 + 0,0203 \cdot \text{Leitfähigkeitsanzeige}$$

Die Überprüfung dieser Eichgrade an zusätzlichen Meßpunkten ergab eine genügende Übereinstimmung (Fehler geringer als 5%).

Die Fermentation lief zunächst über einen Zeitraum von 70 Stunden stabil. Die charakteristischen Bilanzwerte dieses Zustandes zeigt Tabelle 1, Spalte 1. Nach dieser Zeit kam es zu einem plötzlichen Abfall des Leitfähigkeitsmeßwertes, wobei sich folgende Werte des neuen Zustandes einstellten (Tabelle 1, Spalte 2). Die Überprüfung der Bedingungen ergab, daß dieser Effekt durch eine verringerte Nährlösungsdosierung infolge sonst nicht feststellbarer Versalzungen der Nährlösungsdosierpumpe verursacht wurde. Durch Erhöhung der Nährlösungsdosiermenge wurde der Leitfähigkeitsmeßwert auf den ursprünglichen Zustand zurückgeführt (Werte nach Tabelle 1, Spalte 3) und die Fermentation unter stabilen Bedingungen fortgeführt.

Tabelle 1: Experimentielle Werte vor und nach einer Störung

Größe	vor der Störung	nach der Störung	nach erfolgter Steuerungsmaßnahme
Leitfähigkeit (Skalenteile)	55	17	53
Salzgehalt analytisch bestimmt (g/l)	4,63	3,88	4,68
Salzgehalt nach Eichgerade (g/l)	4,61	3,84	4,68

Beispiel 2

Es wurde unter den gleichen Bedingungen vorgegangen wie in Beispiel 1. Zusätzlich wurde der Rohaschegehalt von entsprechend einer Aufarbeitungsvariante ohne mechanische Flüssigkeitsabtrennung direkt eingedampftem Fermentorablauf bestimmt und mit der Leitfähigkeitsanzeige auf eine Beispiel 1 analoge Weise in Beziehung gebracht. Als Wertepaare von gemessener Leitfähigkeit (Skalenteile) und analytisch bestimmtem Aschegehalt in der Biomasse (%) ergaben sich: 25/5,00 und 62/6,58.

Der untersuchte Fermentationsprozeß lief zunächst ohne Störungen 90 Stunden lang stabil.

Die charakteristischen Werte dieses Zeitraumes waren: 51 Skalenteile der Leitfähigkeitsanzeige, entsprechend 6,08 % Aschegehalt. Danach wurde die Fermentation durch eine sprunghafte Erhöhung der Nährlösungsmenge gestört. Die Leitfähigkeitsanzeige stieg auf 87 Skalenteile. Analytisch wurde eine Erhöhung des Rohaschegehaltes auf 7,50 % festgestellt.

Durch sofortige Verringerung der Nährlösungsdosierung konnten sowohl der Leitfähigkeitsmeßwert als auch der Rohaschegehalt auf den Bereich vorhergehender Werte zurückgeführt werden. Im neuen stationären Zustand ergab sich eine Anzeige von 47 Skalenteilen und ein analytisch bestimmter Aschegehalt von 6,07 %.

25 Beispiel 3

In einem 30 l Rührfermentor mit einem Arbeitsvolumen von 25 l wird der Hefestamm *Lodderomyces elongisporus* IMET-H 128 bei einem pH-Wert von $4,1 \pm 0,1$ und einer Temperatur von 306 ± 1 K sowie einer Luftzufuhr von 1,5 l/min. gezüchtet. Als Substrat dient ein Erdöldestillat, dessen n-Alkan die Kettenlänge C_9 bis C_{25} , überwiegend C_{12} bis C_{18} , besitzen. Die Siedelage des Destillates beträgt 503 bis 533 K, die Destillatkonzentration im Fermentationsmedium beträgt 14,8 %. Das Verfahren wird mit einer Verweilzeit von 5 h durchgeführt.

Das anorganische Nährmedium enthält in Form von Ammoniak, Phosphorsäure, Kaliumchlorid und Sulfaten 10 mg Fe, 2250 mg N, 10 mg Zn, 1410 mg P_2O_5 , 10 mg Mn, 615 mg K, 1,5 mg Cu, 55 mg Mg auf 1 Liter. Die Dosierung des Nährmediums erfolgte für das Magnesium getrennt von den anderen Komponenten. Der Energieübertrag beträgt 10 W/kg Fermentationsmedium. Dem Fermentorablauf wurden halbstündlich Proben entnommen und einer Leitfähigkeitsmessung unterzogen. Dafür wurde eine Leitfähigkeitsmeßeinrichtung LM 201 des VEB Hydromat Bannewitz benutzt.

Im kontinuierlichen Betrieb wurden Leitfähigkeitswerte von 68 Skalenteilen bestimmt. Die Eichung der Meßeinrichtung erfolgte in der in Beispiel 1 angegebenen Weise.

Nach einer Versuchszeit von 2 Stunden ergab sich ein Abfall des Leitfähigkeitswertes auf 34 Skalenteile. Auf Grund dieser Anzeige wurden die Eingangsströme überprüft. Es zeigte sich, daß die Dosierpumpe für die $MgSO_4$ - Dosierung eine eingeschränkte Förderleistung durch Versalzung aufwies. Während der Reparaturphase an der Dosierpumpe wurde dem Fermentationsmedium Magnesiumsulfat von Hand zugegeben. Als Steuergröße diente die Leitfähigkeitsanzeige.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Steuerung der Kultivierung von Mikroorganismen in kontinuierlich oder diskontinuierlich betriebenen und vorzugsweise mit Umlaufsystemen ausgestatteten Reaktoren, bei dem die Fermentation in salzhaltigen Medien deren Salzgehalt von weniger als 5 Komponenten überwiegend bestimmt wird, durchgeführt wird, gekennzeichnet dadurch, daß als Kenn- und Steuergröße die durch den Salzgehalt bestimmte Leitfähigkeit des Fermentationsprozesses verwendet wird und daß der Leitfähigkeitsmeßwert im Bereich von 0 ... 20 mS konstant gehalten wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Mikroorganismen Hefen vom Stamm *Lodderomyces elongisporus* IMET H 128 und ihre Begleitflora sind und daß die Kultivierung auf Erdöldestillat mit n-Alkanen der Kettenlänge C_9 bis C_{25} und einer Kettenlängenverteilung von vorzugsweise C_{13} bis $C_{17} > 66 \%$, $C_{18} < 25 \%$, $C_{12} < 10 \%$ und einem Siedebereich von vorzugsweise 513 bis 633 K erfolgt.
3. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Mikroorganismen methanolassimilierende Bakterien MB 58 IMET B 346 sind, und daß die Kultivierung auf Methanol erfolgt.