

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer: A 697/2015
(22) Anmeldetag: 29.10.2015
(43) Veröffentlicht am: 15.02.2017

(51) Int. Cl.: **C12Q 1/02** (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C12P 5/02 (2006.01)
C12P 13/04 (2006.01)

(56) Entgegenhaltungen:
US 2010252255 A1
WO 2015103497 A1
Sean Michael Scully and Johann Orlygsson,
"Amino Acid Metabolism of Thermoanaerobacter
Strain AK90: The Role of Electron-Scavenging
Systems in End Product Formation," Journal of
Amino Acids, vol. 2015, Article ID 410492, 10
pages, 2015. doi:10.1155/2015/410492
[heruntergeladen vom Internet am 03.05.2016,
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/410492>]

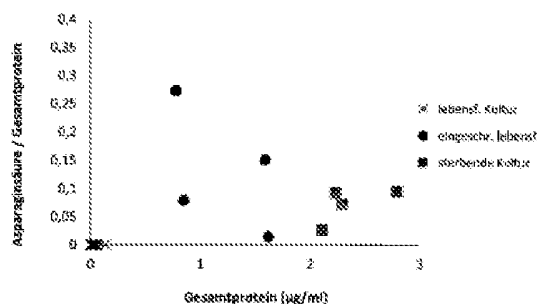
(71) Patentanmelder:
Technische Universität Wien
1040 Wien (AT)

(72) Erfinder:
Bernacchi Sébastien
1060 Wien (AT)
Herwig Christoph
1060 Wien (AT)

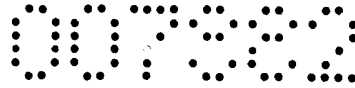
(74) Vertreter:
HÄUPL & ELLMEYER KG
PATENTANWALTSKANZLEI
WIEN

(54) **Zellkulturstatusbestimmung**

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Bestimmen des Status einer Mikrobekultur durch Messen zumindest eines Kulturparameters sowie anschließendes Korrelieren der Messwerte des zumindest einen Kulturparameters mit dem Status der Kultur, dadurch gekennzeichnet, dass in einem mikrobiellen Methanisierungsprozess unter Verwendung eines hydrogenotrophen methanogenen Mikroorganismus vor dem Beginn des Methanisierungsprozesses das spezifische Aminosäuresekretionsmuster des jeweils eingesetzten Mikroorganismus bestimmt wird; während des Prozesses die Konzentration zumindest einer speziellen Aminosäure im Kulturmedium bestimmt wird; und gegebenenfalls zusätzlich der Gesamtproteingehalt im Kulturmedium und der Anteil der zumindest einen Aminosäure am Gesamtproteingehalt bestimmt werden; wonach die Konzentration oder gegebenenfalls der Anteil der jeweiligen Aminosäure am Gesamtproteingehalt mit dem Status der Kultur korreliert wird, um so die Lebensfähigkeit der Kultur abzuschätzen und/oder die Frage zu klären, ob die Methanbildungsrate gaslimitiert oder flüssigkeitslimitiert ist.



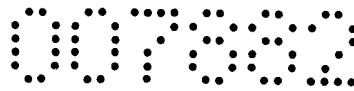
Figur 2



ZUSAMMENFASSUNG

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Bestimmen des Status einer Mikrobekultur durch Messen zumindest eines Kulturparameters sowie anschließendes Korrelieren der Messwerte des zumindest einen Kulturparameters mit dem Status der Kultur, dadurch gekennzeichnet, dass in einem mikrobiellen Methanisierungsprozess unter Verwendung eines hydrogenotrophen methanogenen Mikroorganismus vor dem Beginn des Methanisierungsprozesses das spezifische Aminosäuresekretionsmuster des jeweils eingesetzten Mikroorganismus bestimmt wird; während des Prozesses die Konzentration zumindest einer speziellen Aminosäure im Kulturmedium bestimmt wird; und gegebenenfalls zusätzlich der Gesamtproteingehalt im Kulturmedium und der Anteil der zumindest einen Aminosäure am Gesamtproteingehalt bestimmt werden; wonach die Konzentration oder gegebenenfalls der Anteil der jeweiligen Aminosäure am Gesamtproteingehalt mit dem Status der Kultur korreliert wird, um so die Lebensfähigkeit der Kultur abzuschätzen und/oder die Frage zu klären, ob die Methanbildungsrate gaslimitiert oder flüssigkeitslimitiert ist.

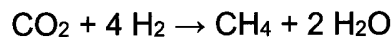
(Fig. 2)



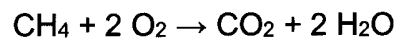
Die Erfindung betrifft die Bestimmung des Kulturstatus von Mikrobenkulturen durch Messen des Aminosäuregehalts.

STAND DER TECHNIK

Im Zuge der stetig wachsenden Produktion erneuerbarer Energie erlangen insbesondere auch biologische Methanisierungsprozesse (BMP) zunehmende Bedeutung. In solchen Prozessen wird CO₂ durch methanogene Mikroorganismen (worunter hierin vor allem Bakterien, Archaeen, Pilze und Algen zu verstehen sind, die mitunter auch kurz als Mikroben bezeichnet werden) zu Methan reduziert:



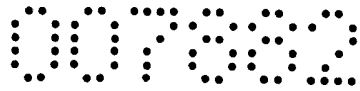
Bei der späteren Verbrennung des Methans zur Energiegewinnung gemäß der Gleichung:



wird erneut Kohlendioxid gebildet, was einen CO₂-neutralen Kreislauf darstellt. Besonders vorteilhaft ist die Kopplung von BMP mit Biomassevergärung, bei der als Hauptprodukte CH₄ und CO₂ anfallen, so dass auch der CO₂-Anteil des Biogases in CH₄ übergeführt werden kann. Das so erhaltene Methan ist in der Regel von hoher Reinheit und kann beispielsweise problemlos in Erdgasnetze eingespeist werden.

Beispiele für BMP finden sich etwa in US 4.883.753, wo Fermentationen von *Methanobacterium thermoautotrophicum* und *Methanococcus thermolithotrophicus* beschrieben werden, sowie WO 2008/094282 A1, worin CO₂ aus der Biomassefermentation mittels methanogener Archaeen zu Methan umgesetzt wird.

Um die Methanisierungsreaktion optimal steuern zu können, ist es erforderlich, den physiologischen Zustand der jeweiligen Mikrobenkultur zu kennen, wie dies die Arbeitsgruppe der Erfinder des vorliegenden Anmeldungsgegenstands in früheren Forschungsarbeiten festgestellt hat; siehe S. Rittmann, A.H. Seifert, C. Herwig, "Quantitative analysis of media dilution rate effects on *Methanothermobacter marburgensis* grown in continuous culture on H₂ and CO₂", Biomass. Bioenerg. 36, 293-301 (2012); A.H. Seifert, S. Rittmann, S. Bernacchi, C. Herwig, "Method for assessing the impact of emission gasses on physiology and productivity in biological methanogenesis", Bioresour. Technol. 136, 747-751 (2013); A.H. Seifert, S. Rittmann, C. Herwig, "Anal-



ysis of process related factors to increase volumetric productivity and quality of biomethane with *Methanothermobacter marburgensis*", Appl. Energ. 132, 155-162 (2014); S. Bernacchi, M. Weissgram, W. Wukovits, C. Herwig, "Process efficiency simulation for key process parameters in biological methanogenesis", AIMS Bioeng. 1(1), 53-71 (2014); sowie WO 2014/128300 A1.

Ein typischer Fermentationsprozess beginnt demgemäß mit der Beschickung des Bioreaktors mit Kulturmedium und einer Anfangskultur des oder der zur Fermentation verwendeten Mikroorganismen, was als "Setup-Phase" bezeichnet wird. In der darauf folgenden sog. "Anfangsphase" wird durch Vermehrung der eingesetzten Mikroorganismen "Biomasse" generiert. Unter letzterem Begriff ist hierin in der Folge die Masse an methanogenen Mikroorganismen zu verstehen, die in der Folge zur oben beschriebenen Umsetzung von CO₂ zu CH₄ eingesetzt wird. Zu diesem Zweck werden der im Reaktor vermehrten und sich weiterhin vermehrenden Biomasse kontinuierlich CO₂, H₂ sowie flüssiges Nährmedium zugeführt.

Im Zuge dieser Forschungen wurden neben üblichen Faktoren wie den Gasdrücken von eingespeistem CO₂ und H₂, der Zufuhr rate des Mediums als Nährstoffquelle, der Konzentration von Nährstoffen und Metaboliten auch die volumetrische Produktivität, auch als spezifische Methanbildungsrate ("methane evolution rate", MER) bezeichnet, sowie die spezifische Methanproduktionsrate (q_{CH₄}) der jeweiligen Kultur als aufschlussreiche Parameter bei der Methanproduktion ermittelt. Diese hängen wie folgt zusammen:

$$\text{MER (mmol/l.h)} = \text{Biomassekonzentration (g/l)} \times q_{\text{CH}_4} \text{ (mmol/g.h)}$$

Somit gibt die volumetrische Produktivität oder Methanbildungsrate MER die molare Menge an Methan an, die pro Liter Kultur und Stunde von einer Mikrobekultur mit definierter Konzentration (in g/l) produziert wird. Die Fähigkeit zur Methanproduktion dieser Kultur wird durch die spezifische Methanproduktionsrate q_{CH₄} ausgedrückt, die ihrerseits die molare Menge an Methan angibt, die von einem Gramm Biomasse pro Stunde produziert wird.



Durch Messung diverser Parameter lassen sich somit Rückschlüsse auf den Zustand der Kultur ziehen, wozu allerdings in der Regel mehrere, in zeitlichem Abstand wiederholte Messungen durchgeführt werden müssen. Demnach besteht ein Bedarf an einem Verfahren zur einfacheren Bestimmung des Zustands der Kultur mittels einmaliger Messungen, d.h. Messungen zu einem einzigen Zeitpunkt. Somit war das Ziel der vorliegenden Erfindung die Entwicklung eines solchen vereinfachten Verfahrens.

OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

Dieses Ziel erreicht die Erfindung durch Bereitstellung eines Verfahrens zum Bestimmen des Status einer Mikrobekultur durch Messen zumindest eines Kulturparameters, ausgewählt aus den Konzentrationen von Nährstoffen und Metaboliten, insbesondere Aminosäuren, im Kulturmedium und Gaspartialdrücken, sowie anschließendes Korrelierens der Messwerte des zumindest einen Kulturparameters mit dem Status der Kultur, **dadurch gekennzeichnet, dass:**

in einem mikrobiellen Methanisierungsprozess unter Verwendung eines hydrogenotrophen methanogenen Mikroorganismus

a) vor dem Beginn des Methanisierungsprozesses das spezifische Aminosäuresekretionsmuster des jeweils eingesetzten Mikroorganismus bestimmt wird;

b) während des Prozesses die Konzentration zumindest einer speziellen Aminosäure im Kulturmedium bestimmt wird; und

c) gegebenenfalls zusätzlich der Gesamtproteingehalt im Kulturmedium und der Anteil der zumindest einen Aminosäure am Gesamtproteingehalt bestimmt werden;

wonach

d) die Konzentration oder gegebenenfalls der Anteil der jeweiligen Aminosäure am Gesamtproteingehalt mit dem Status der Kultur korreliert wird, um so die Lebensfähigkeit der Kultur abzuschätzen und/oder die Frage zu klären, ob die Methanbildungsrate durch den Gasaustausch der Kultur mit der Umgebung limitiert, d.h. "gaslimitiert", oder durch die flüssige Nährstoffzufuhr limitiert, d.h. "flüssigkeitslimitiert", ist.

Die Erfinder haben im Zuge ihrer neuesten Forschungen nämlich überraschenderweise festgestellt, dass nicht nur der Gesamtproteingehalt (d.h. Aminosäuregehalt von vollständig lysierten Zellen), der bekanntermaßen ein Indiz für die Lebensfähig-



keit einer Mikrobekultur darstellt, da bei hohen Proteinkonzentrationen die Lebensfähigkeit der Kultur in der Regel eingeschränkt ist, sondern auch das Vorhandensein einzelner Aminosäuren in der Kultur direkte Rückschlüsse auf den Kulturstatus zulässt.

Es wurde nämlich herausgefunden, dass Mikroorganismen auch im uneingeschränkt lebensfähigen Zustand offenbar bestimmte Aminosäuren in das Kultumedium sekretieren, so dass für jeden Mikroorganismus ein spezifisches Sekretionsmuster im uneingeschränkt lebensfähigen Zustand existiert. Ist dieses spezifische Sekretionsmuster einmal bestimmt, so reicht es aus, während des Methanisierungsprozesses die Konzentration einer bestimmten Aminosäure zu bestimmen, um Rückschlüsse auf den Status der Kultur ziehen zu können – und das in mehrerlei Hinsicht.

Die Ermittlung des spezifischen Sekretionsmusters in Schritt a) umfasst dabei sowohl das Bestimmen, welche Aminosäuren von dem jeweiligen Mikroorganismus im uneingeschränkt lebensfähigen Zustand im Allgemeinen in das umgebende Medium sekretiert werden, sowie das Bestimmen, ob und wie sich die sekretierte Menge der jeweiligen Aminosäure beim Übergang vom gaslimitierten in den flüssigkeitslimitierten Zustand oder umgekehrt ändert. In jenen Fällen, in denen es zu einer solchen Änderung der Aminosäuresekretion kommt, kann in Schritt a) darüber hinaus ein Schwellenwert für diesen Übergang der speziellen Aminosäure(n) bestimmt werden, indem auch der Gesamtproteingehalt bestimmt und der Anteil der Aminosäure am Gesamtproteingehalt sowohl im gaslimitierten als auch im flüssigkeitslimitierten Zustand berechnet wird.

Darüber hinaus kann das spezifische Sekretionsmuster auch Informationen über den Verlauf der Lebensfähigkeit umfassen. So können in Schritt c) auch Schwellenwerte für den Gesamtproteingehalt und/oder für den Anteil einer Aminosäure, die nicht Teil des spezifischen Sekretionsmusters ist, am Gesamtproteingehalt bestimmt werden, d.h. festgestellt werden, ab welchem Gesamtproteingehalt bzw. ab welchem Anteil der jeweiligen Aminosäure am Gesamtproteingehalt eingeschränkte Lebensfähigkeit vorliegt und ab wann eine sterbende Kultur vorliegt. Hierin ist unter eingeschränkter



Lebensfähigkeit ein Anteil an lysierten Zellen von mehr als etwa 15 % und unter einer sterbenden Kultur ein Anteil von mehr als etwa 30 % zu verstehen.

In der Folge reicht es gemäß dem Verfahren der Erfindung aus, zu einem beliebigen Zeitpunkt die Konzentration einer dieser Aminosäuren und gegebenenfalls auch den Gesamtproteingehalt zu diesem Zeitpunkt und den Anteil der jeweiligen Aminosäure daran zu bestimmen, um schlüssige Aussagen bezüglich des Status der Kultur treffen zu können. Weitere Messungen zu späteren Zeitpunkten sind daher nicht unbedingt erforderlich, können aber natürlich durchgeführt werden, um Statusänderungen verfolgen zu können.

In der einfachsten bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird dazu bloß in Schritt b) die Konzentration einer Aminosäure bestimmt, von der in Schritt a) festgestellt wurde, dass sie nicht Teil des spezifischen Sekretionsmusters des Mikroorganismus ist, wobei eine Konzentration dieser Aminosäure > 0 einen Indikator für zumindest eingeschränkte Lebensfähigkeit des Mikroorganismus in der Kultur darstellt, da der Mikroorganismus im uneingeschränkt lebensfähigen Zustand diese Aminosäure ja nicht in das Medium sekretiert.

Wird zusätzlich in Schritt c) der Gesamtproteingehalt und/oder der Anteil der in Schritt b) bestimmten Aminosäure am Gesamtproteingehalt bestimmt und wurde davor in Schritt a) ein spezifischer Schwellenwert dafür bestimmt, zeigt ein Gesamtproteingehalt bzw. ein Anteil der Aminosäure am Gesamtproteingehalt unter dem jeweiligen in Schritt a) bestimmten spezifischen Schwellenwert eingeschränkte Lebensfähigkeit an, und ein Gesamtproteingehalt bzw. ein Anteil der Aminosäure am Gesamtproteingehalt über dem jeweiligen Schwellenwert zeigt eine sterbende Kultur an.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird zusätzlich oder auch alternativ dazu in Schritt b) die Konzentration einer Aminosäure bestimmt, von der in Schritt a) festgestellt wurde, dass sie Teil des spezifischen Sekretionsmusters des Mikroorganismus ist, und in Schritt c) werden der Gesamtproteingehalt im Kulturmedium und der gravimetrische Anteil der in Schritt b) bestimm-

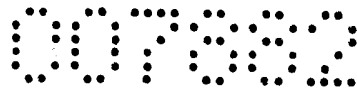


ten Aminosäure am Gesamtproteingehalt bestimmt, wobei der Anteil dieser Aminosäure am Gesamtproteingehalt, in Abhängigkeit davon, ob dieser Anteil unter oder über einem zuvor in Schritt a) bestimmten Schwellenwert liegt, einen Indikator für eine gaslimitierte oder eine flüssigkeitslimitierte Methanproduktion darstellt.

Dies gilt für jedwede Aminosäure, für die in Schritt a) bei der Bestimmung des spezifischen Sekretionsmusters festgestellt wurde, dass bei einer Veränderung der Kulturbedingungen vom gaslimitierten zum flüssigkeitslimitierten Zustand oder umgekehrt eine Änderung der in der Medium sekretierten Menge dieser Aminosäure erfolgt, wobei ein zwischen den beiden unterschiedlichen Mengen liegender Schwellenwert bestimmbar oder festlegbar ist, wie dies in den späteren Beispielen demonstriert wird.

In Kenntnis des Zustands der Kultur kann natürlich durch eine entsprechende Anpassung der Fermentationsbedingungen auf unerwünschte Zustände oder Entwicklungen der jeweiligen Kultur reagiert werden.

Der hydrogenotrophe methanogene Mikroorganismus ist gemäß vorliegender Erfindung nicht speziell eingeschränkt, solange er in der Lage ist, Kohlendioxid zu Methan zu reduzieren. Vorzugsweise ist der methanogene Mikroorganismus gemäß vorliegender Erfindung jedoch ein methanogenes Bakterium und noch bevorzugter eine methanogene Archaea, wie z.B. *Methanobacterium alcaliphilum*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobacterium congolense*, *Methanobacterium defluvii*, *Methanobacterium espanolae*, *Methanobacterium formicicum*, *Methanobacterium ivanovii*, *Methanobacterium palustre*, *Methanobacterium thermaggregans*, *Methanobacterium uliginosum*, *Methanobrevibacter acididurans*, *Methanobrevibacter arbor iphilicus*, *Methanobrevibacter gottschalkii*, *Methanobrevibacter olleyae*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter smithii*, *Methanobrevibacter woesei*, *Methanobrevibacter wolinii*, *Methanothermobacter marburgensis*, *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, *Methanobacterium thermoautotrophicus*, *Methanothermobacter thermoflexus*, *Methanothermobacter thermophilus*, *Methanothermobacter wolfeii*, *Methanothermus sociabilis*, *Methanocorpusculum bavaricum*, *Methanocorpusculum parvum*, *Methanoculleus chikuoensis*, *Methanoculleus submarinus*, *Methanogenium frigidum*, Metha-

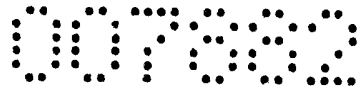


nogenium liminatans, *Methanogenium marinum*, *Methanosarcina acetivorans*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei*, *Methanosarcina thermophila*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanocaldococcus jannaschii*, *Methanococcus aeolicus*, *Methanococcus maripaludis*, *Methanococcus vanniellii*, *Methanococcus voltaei*, *Methanothermococcus thermolithotrophicus* und *Methanopyrus kandleri*. Besonders bevorzugt sind methanogene Archaeen der Spezies *Methanosarcinia barkeri*, *Methanothermobacter marburgensis*, *Methanobacterium thermoautotrophicus*, *Methanocaldococcus jannaschii*, *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, *Methanococcus maripaludis*, die jeweils einzeln oder als Gemisch mehrerer davon einsetzbar sind. Insbesondere gehört die methanogene Archaee der Spezies *Methanothermobacter marburgensis* an, wie z.B. der unter DSM 2133 bei der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) hinterlegte Stamm, der den Ausgangspunkt für die Forschungen der Erfinder darstellte.

Archaeen sind sowohl aufgrund des einfachen Aufbaus ihrer Zellstruktur als auch wegen des Umstands, dass es sich bei einem Großteil um Extremophile handelt, die unter extremen Bedingungen lebensfähig sind, und der daraus resultierenden Stabilität und vergleichsweise einfachen Handhabung der Kulturen sowie der Vorhersagbarkeit ihres Stoffwechsels und Reproduzierbarkeit der Fermentationen besonders bevorzugt.

Unter Verwendung des oben beschriebenen *Methanothermobacter marburgensis*-Stamms als Modellorganismus sind die Erfinder zu den folgenden Ergebnissen gelangt.

In Bezug auf die Lebensfähigkeit wurde für diesen speziellen Organismus in Schritt a) des erfindungsgemäßen Verfahrens festgestellt, dass Asparaginsäure nicht Teil seines spezifischen Sekretionsmusters ist. Zur Bestimmung des Status einer Kultur dieses Mikroorganismus wird nun in Schritt b) die Konzentration von Asparaginsäure bestimmt, wobei durch eine Konzentration > 0 zumindest eingeschränkte Lebensfähigkeit der Kultur angezeigt wird. Dies beruht auf der Feststellung, dass, sobald in einer solchen Kultur Asparaginsäure vorgefunden wird, Zelllyse in mehr oder weniger

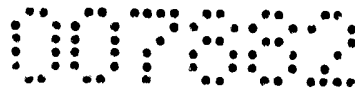


starkem eingesetzt haben muss. In Kenntnis dieses Umstands können nun die übrigen Parameter der Fermentation, wie z.B. Nährstoffzufuhr im Medium, Verdünnung etc., entsprechend angepasst werden, um dem Absterben der Zellen entgegenzuwirken.

Wird in einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens unter Verwendung dieses Stamms von *Methanothermobacter marburgensis* zusätzlich der Gesamtproteingehalt bestimmt, wird durch einen Gesamtproteingehalt $> 0,5$ µg/ml eingeschränkte Lebensfähigkeit und durch einen Gesamtproteingehalt $> 2,0$ µg/ml eine sterbende Kultur angezeigt, da die Erfinder diese spezifischen Schwellenwerte in Schritt a) des Verfahrens der Erfindung festgestellt haben. Eine solch exakte Bestimmung des Kulturstatus in Bezug auf die Lebensfähigkeit anhand des Gesamtproteingehalts war nach dem Stand der Technik bisher unmöglich.

In anderen bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung wird hingegen erneut festgestellt, ob die Methanproduktion durch den Gasaustausch der Kultur mit der Umgebung limitiert, d.h. "gaslimitiert", oder durch die Zufuhr von Nährstoffen im flüssigen Medium limitiert, d.h. "flüssigkeitslimitiert", ist. Hierzu werden in einer Ausführungsform der Gesamtproteingehalt und der Anteil an Alanin daran bestimmt, da bei der Bestimmung des spezifischen Sekretionsmusters dieses Stamms von *Methanothermobacter marburgensis* in Schritt a) festgestellt wurde, dass Alanin – wie auch Glutaminsäure und Glycin – vom Mikroorganismus auch in uneingeschränkt lebensfähigem Zustand sekretiert werden und somit Teil dieses Musters sind. Darüber hinaus wurde in Schritt a) ein Schwellenwert für den Anteil von Alanin am Gesamtproteingehalt beim Übergang von gaslimitierter zu flüssigkeitslimitierter Methanproduktion von 0,5 ermittelt.

Somit wird durch einen in Schritt c) gemessenen gravimetrischen Alanin-Anteil $< 0,5$ eine gaslimitierte Methanproduktion und durch einen Alanin-Anteil $> 0,5$ eine flüssigkeitslimitierte Methanproduktion angezeigt. Diese Ausführungsform beruht auf der überraschenden Entdeckung der Erfinder, dass bei einem flüssigkeitslimitierten Methanisierungsprozess der Mikroorganismus vorwiegend die Aminosäure Alanin pro-

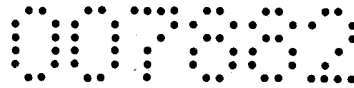


duziert. Sobald der Prozess gaslimitiert wird, d.h. die mit dem Medium zugeführten Nährstoffe nicht vollständig aufgebraucht werden können, sinkt der Anteil an Alanin am Gesamtproteingehalt hingegen unter 50 % ab.

Alternativ oder zusätzlich dazu werden in einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung in Schritt c) der Gesamtproteingehalt und der Anteil an Glutaminsäure daran bestimmt, wobei durch einen Glutaminsäure-Anteil $> 0,5$ eine gaslimitierte Methanproduktion und durch einen Glutaminsäure-Anteil $< 0,5$ eine flüssigkeitslimitierte Methanproduktion angezeigt wird. Die Erfinder haben nämlich ebenso überraschenderweise herausgefunden, dass die Verhältnisse bei Glutaminsäure genau umgekehrt zu Alanin liegen: Solange dem Mikroorganismus mit dem Medium ausreichend Nährstoffe zur Verfügung gestellt werden, d.h. solange ein gaslimitierter Prozess abläuft, wird vorwiegend Glutaminsäure produziert. Werden hingegen Nährstoffe knapp und wird der Prozess dadurch flüssigkeitslimitiert, sinkt der Anteil von Glutaminsäure am Gesamtproteingehalt auf unter 50 % ab.

Die Konzentrationen bzw. Anteile anderer Aminosäuren am Gesamtproteingehalt erlauben solche Aussagen bezüglich des Kulturstatus nicht, wie dies durch die späteren Beispiele belegt wird, zumal im uneingeschränkt lebensfähigen Zustand lediglich eine dritte Aminosäure, nämlich Glycin, in das Medium sekretiert wird, deren Menge sich beim Übergang von gas- zum flüssigkeitslimitierten Zustand nicht signifikant ändert.

In einer besonders bevorzugten Variante der letzteren Ausführungsform des Verfahrens der Erfindung unter Verwendung des obigen *Methanothermobacter marburgensis*-Stamms wird in Schritt c) zusätzlich zum Anteil an Glutaminsäure die Methanbildungsrate bestimmt und auf die Menge an zugeführter Biomasse bezogen, um die spezifische Methanproduktionsrate q_{CH_4} zu berechnen, die in der Folge mit dem Anteil an Glutaminsäure am Gesamtproteingehalt korreliert wird, wodurch ein Übergangszustand zwischen gaslimitierter und flüssigkeitslimitierter Methanproduktion detektierbar wird.



In Kenntnis, ob die Methanisierungsreaktion zum Zeitpunkt der Messung gas- oder flüssigkeitslimitiert ist, können die Feedströme wiederum entsprechend nachgeregelt werden, um für optimale Reaktionsbedingungen zu sorgen.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

Die vorliegende Erfindung wird in der Folge anhand von konkreten Beispielen unter Bezugnahme auf die beiliegenden Zeichnungen näher beschrieben, die Folgendes darstellen.

Fig. 1 zeigt das in Beispiel 1 bestimmte spezifische Expressionsmuster des in den Beispielen eingesetzten Mikroorganismus.

Fig. 2 zeigt den Zusammenhang zwischen dem Anteil an Asparaginsäure und dem Gesamtproteingehalt sowie die daraus ableitbaren Informationen bezüglich der Lebensfähigkeit der Kultur gemäß Beispiel 2 der Erfindung.

Fig. 3 zeigt den Zusammenhang zwischen dem Anteil an Asparaginsäure und dem Gesamtproteingehalt sowie die Nichtableitbarkeit von Informationen bezüglich des Prozessstatus gemäß Vergleichsbeispiel 1.

Fig. 4 zeigt den Zusammenhang zwischen dem Anteil an Glutaminsäure und dem Gesamtproteingehalt sowie die daraus ableitbaren Informationen bezüglich des Prozessstatus gemäß Beispiel 3 der Erfindung.

Fig. 5 zeigt den Zusammenhang zwischen dem Anteil an Alanin und dem Gesamtproteingehalt sowie die daraus ableitbaren Informationen bezüglich des Prozessstatus gemäß Beispiel 4 der Erfindung.

Fig. 6 zeigt den Zusammenhang zwischen dem Anteil an Glycin und dem Gesamtproteingehalt sowie die Nichtableitbarkeit von Informationen bezüglich des Prozessstatus gemäß Vergleichsbeispiel 2.

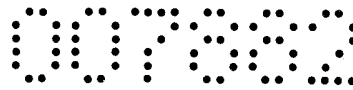


Fig. 7 zeigt den Zusammenhang zwischen dem Anteil an Asparagin und dem Gesamtproteingehalt sowie die Nichtableitbarkeit von Informationen bezüglich des Prozessstatus gemäß Vergleichsbeispiel 3.

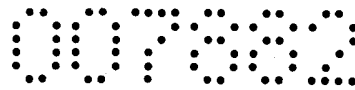
Fig. 8 zeigt den Zusammenhang zwischen dem Anteil an Glutaminsäure und der volumetrischen Produktivität sowie die Nichtableitbarkeit von Informationen bezüglich des Prozessstatus gemäß Vergleichsbeispiel 4.

Fig. 9 zeigt den Zusammenhang zwischen dem Anteil an Glutaminsäure und der spezifischen Methanproduktionsrate sowie die daraus ableitbaren Informationen bezüglich des Prozessstatus gemäß Beispiel 5 der Erfindung.

BEISPIELE

Der in allen Modellversuchen eingesetzte Mikroorganismus war der bei der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) hinterlegte Stamm *Methanothermobacter marburgensis* DSM 2133 und somit eine hydrogenotrophe, thermophile, methanogene Archaea. Die Kultivierung erfolgte in einem 10-l-Biostat-C⁺-Laborreaktor (Sartorius Stedim Biotech AG, Göttingen, Deutschland) mit den in früheren Publikationen der Arbeitsgruppe der Erfinder beschriebenen Parametern (A. H. Seifert, S. Rittmann, S. Bernacchi, C. Herwig, "Process efficiency simulation for key process parameters in biological methanogenesis", AIMS Bioeng. 1(1), 53-71 (2014); S. Rittmann, A. H. Seifert, C. Herwig, "Quantitative analysis of media dilution rate effects on *Methanobacter marburgensis* grown in continuous culture on H₂ and CO₂", Biomass Bioenergy 36, 293-301 (2012); S. Bernacchi, S. Rittmann, A. H. Seifert, A. Krajete, C. Herwig, "Experimental methods for screening parameters influencing the growth to product yield (Y(x/CH₄)) of a biological methane production (BMP) process performed with *Methanobacter marburgensis*", AIMS Bioeng. 1(2), 72-86 (2014)).

Der 10-l-Bioreaktor wurde gravimetrisch gesteuert und die Ernte innerhalb des Reaktionsgefäßes gesammelt. Alle Versuche wurden bei einem Druck von 2 bar durchgeführt. Die Verdünnungsrate des Ausgangsmediums wurde mittels eines gravimetri-



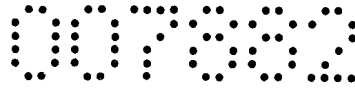
• schen Durchflussreglers auf einen konstanten Wert von $0,05 \text{ h}^{-1}$ geregelt – mit Ausnahme der gezielten Erzeugung von eingeschränkter Lebensfähigkeit und Nicht-Lebensfähigkeit der Zellen, zu welchem Zweck die Verdünnungsrate auf $0,01$ bzw. $0,00 \text{ h}^{-1}$ eingestellt wurde. Die Gaszufuhr wurde auf $0,5$ Volumina pro Reaktionsvolumen pro Minute (l/l.min) mit einem Verhältnis H_2/CO_2 von $4:1$ eingestellt. Die Kultur wurde mit 1.500 U/min gerührt, ein pH von 7 und eine Temperatur von 65°C wurden eingestellt, und das Reaktionsvolumen wurde mit 5 l konstant gehalten (sofern nichts anderes angegeben ist).

Die Spurenelemente wurden bei $6\times$ konstant gehalten und waren daher, wie aus der Literatur bekannt, für die Wachstumsrate nicht limitierend. Der einzige Unterschied zu den literaturbekannten Bedingungen bestand im Austausch der Base gegen eine $1,5 \text{ M}$ NH_3 -Lösung, die sowohl zum Einstellen des pH als auch als Stickstoffquelle diente. Das Ausgangsmedium enthielt daher weiters KH_2PO_4 , NaCl und Spurenelemente in bekannter Zusammensetzung. Die Prozesssteuerung erfolgte unter Verwendung der Software Lucullus (erhältlich von Securecell, Schlieren, Schweiz).

Die Bestimmung des spezifischen Sekretionsmusters und der Aminosäure-Konzentrationen im Kultumedium erfolgte mittels HPLC-Analyse (Thermo Ultimate 3000 mit einer Eclipse Plus C18-Säule und einem Agilent 1200-Fluoreszenzdetektor, alles erhältlich von Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts erfolgte hingegen mittels des Multi-plate-Readers Infinite M200 Pro (Tecan, Männedorf, Schweiz) mit 96-Wells-Microplates (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland) und Bradford-Reagens von Sigma Aldrich sowie einer mittels Rinderserumalbumin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) erstellten Kalibrierkurve.

BEISPIEL 1 – Bestimmung des spezifischen Sekretionsmusters gemäß Schritt a) des erfindungsgemäßen Verfahrens

Methanothermobacter marburgensis DSM 2133 wurde bis zum stationären Zustand kultiviert, wonach Proben gezogen und mittels HPLC analysiert wurden. Das Ergebnis einer Dreifachbestimmung ist in Fig. 1 dargestellt, aus der hervorgeht, dass die-



ser Mikroorganismus im uneingeschränkt lebensfähigen Zustand vier verschiedene Aminosäuren in das Kulturmedium sekretiert, nämlich (in abnehmenden Mengen) Alanin, Glutaminsäure, Glycin sowie Spuren von Asparagin.

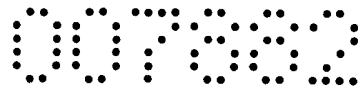
Solange keine anderen Aminosäuren im Kulturmedium vorgefunden werden, ist eine solche Kultur daher als uneingeschränkt lebensfähig anzusehen.

BEISPIEL 2 – Bestimmung von Asparaginsäure gemäß Schritt b) sowie des Gesamtproteingehalts gemäß Schritt c) des erfindungsgemäßen Verfahrens

Als illustratives Beispiel für eine Aminosäure, die nicht Teil des spezifischen Sekretionsmusters dieses Mikroorganismus ist, wurden in Schritt b) des Verfahrens der Erfindung Bestimmungen von Asparaginsäure vorgenommen, und zwar im uneingeschränkt lebensfähigen Zustand (Verdünnungsrate $0,05 \text{ h}^{-1}$), im eingeschränkt lebensfähigen Zustand (Verdünnungsrate $0,01 \text{ h}^{-1}$) und im sterbenden Zustand (Verdünnungsrate $0,00 \text{ h}^{-1}$) der Kultur. Parallel dazu wurde als Schritt c) des Verfahrens in allen Fällen auch der Gesamtproteingehalt bestimmt.

Die Ergebnisse sind in Fig. 2 dargestellt, worin der gravimetrische Anteil an Asparaginsäure am Gesamtproteingehalt über dem Gesamtproteingehalt aufgetragen ist.

Erwartungsgemäß wurde im uneingeschränkt lebensfähigen Zustand keine Asparaginsäure in das Medium sekretiert. Sobald die Lebensfähigkeit Kultur abnahm, wurde hingegen eine variierende Menge an Asparaginsäure im Medium gefunden, aus der allerdings keine Rückschlüsse auf den genauen Zustand der Kultur (eingeschränkt lebensfähig oder sterbend) gezogen werden konnten. Allerdings konnten aus dem Gesamtproteingehalt Schwellenwerte für die Lebensfähigkeit bestimmt werden, und zwar ein Schwellenwert von etwa $0,5 \text{ µg/ml}$ für den Übergang von uneingeschränkter zu eingeschränkter Lebensfähigkeit und ein Schwellenwert von etwa $2,0 \text{ µg/ml}$ für den Übergang von eingeschränkter Lebensfähigkeit zu einer sterbenden Kultur.



Somit kann gemäß vorliegender Erfindung eine eingeschränkte Lebensfähigkeit einer Kultur dieses Mikroorganismus mittels Nachweis der Gegenwart von Asparaginsäure im Kulturmedium festgestellt und das Ausmaß der Einschränkung anhand des Gesamtproteingehalts abgeschätzt werden.

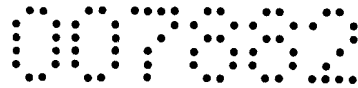
VERGLEICHBSBEISPIEL 1 – Korrelation des Asparaginsäureanteils mit gaslimitiertem oder flüssigkeitslimitiertem Zustand der Kultur

Durch Variation des Verhältnisses zwischen den Feedströmen von Nährstoffmedium und Gaszufuhr wurde jeweils ein gas- und ein flüssigkeitslimiterter Zustand der uneingeschränkt lebensfähigen Kultur herbeigeführt und erneut die Asparaginsäurekonzentration sowie der Gesamtproteingehalt bestimmt. Die Ergebnisse sind in Fig. 3 dargestellt. Die Menge an Asparaginsäure war erwartungsgemäß durchwegs null, während der Gesamtproteingehalt stark schwankte und daher keine Aussagen bezüglich des Zustands der Kultur zuließ.

BEISPIEL 3 – Bestimmung von Glutaminsäure gemäß Schritt b) sowie des Gesamtproteingehalts gemäß Schritt c) des erfindungsgemäßen Verfahrens

Vergleichsbeispiel 1 wurde wiederholt, wobei allerdings anstatt Asparaginsäure, die nicht Teil des spezifischen Sekretionsmusters ist, Glutaminsäure bestimmt wurde, die vom Mikroorganismus im uneingeschränkt lebensfähigen Zustand sekretiert wird. Die Ergebnisse sind in Fig. 4 dargestellt.

Man erkennt, dass der Mikroorganismus im gaslimitierten Zustand vor allem Glutaminsäure sekretiert, wie dies aus dem Anteil von Glutaminsäure am Gesamtproteingehalt von nahezu 1 hervorgeht. Im flüssigkeitslimitierten Zustand wird hingegen wenig Glutaminsäure sekretiert, was aus einem Anteil am Gesamtproteingehalt unter 0,2 geschlossen werden kann. Somit kann für Kulturen dieses Mikroorganismus ein Schwellenwert für den Anteil von Glutaminsäure am Gesamtproteingehalt von etwa 0,5 festgelegt werden und Letzterer als Indikator für den Zustand der Kultur, d.h. gaslimitiert oder flüssigkeitslimitiert, herangezogen werden: Liegt der Anteil an Glutamin-



säure am Gesamtproteingehalt über 0,5, befindet sich die Kultur im gaslimitierten Zustand, liegt er darunter, befindet sie sich im flüssigkeitslimitierten Zustand.

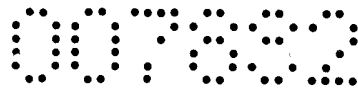
BEISPIEL 4 – Bestimmung von Alanin gemäß Schritt b) sowie des Gesamtproteingehalts gemäß Schritt c) des erfindungsgemäßen Verfahrens

Beispiel 3 wurde wiederholt, wobei allerdings anstatt Glutaminsäure nun Alanin bestimmt wurde, die ebenfalls vom Mikroorganismus im uneingeschränkt lebensfähigen Zustand sekretiert wird. Die Ergebnisse sind in Fig. 5 dargestellt.

Hier liegen die Verhältnisse fast genau umgekehrt als bei Glutaminsäure: Im gaslimitierten Zustand sekretiert der Mikroorganismus nahezu kein Alanin, im flüssigkeitslimitierten Zustand hingegen vorwiegend Alanin, was aus Anteilen am Gesamtproteingehalt zwischen 0,7 und 0,95 geschlossen werden kann. Bei steigendem Gesamtproteingehalt nimmt allerdings die Alanin-Sekretion im flüssigkeitslimitierten Zustand ab und im gaslimitierten Zustand leicht zu. Somit kann für Kulturen dieses Mikroorganismus erneut ein Schwellenwert für den Anteil von Alanin am Gesamtproteingehalt von beispielsweise etwa 0,5 festgelegt werden und Letzterer als Indikator für den Zustand der Kultur, d.h. gaslimitiert oder flüssigkeitslimitiert, herangezogen werden: Liegt der Anteil an Alanin am Gesamtproteingehalt unter 0,5, befindet sich die Kultur im gaslimitierten Zustand, liegt er darüber, befindet sie sich im flüssigkeitslimitierten Zustand.

VERGLEICHBSBEISPIEL 2 – Korrelation des Glycinanteils mit gaslimitiertem oder flüssigkeitslimitiertem Zustand der Kultur

Zur Überprüfung der Verhältnisse im Falle von Glycin, der dritten Aminosäure, von der der Mikroorganismus im uneingeschränkt lebensfähigen Zustand nennenswerte Mengen in das Medium sekretiert, wurden die Beispiele 3 und 4 unter Bestimmung von Glycin wiederholt. Die Ergebnisse sind in Fig. 6 dargestellt.



Man erkennt, dass auf Basis von Glycin keine eindeutigen Rückschlüsse auf den Kulturstatus gezogen werden können, da die Mengen relativ stark variieren. Zwar sind bei steigendem Gesamtproteingehalt wiederum Tendenzen hin zu verstärkter Glycinsekretion im flüssigkeitslimitierten Zustand bzw. kaum noch erfolgreicher Sekretion im gaslimitierten Zustand erkennbar. Angesichts der zuvor festgestellten beginnenden Abnahme der Lebensfähigkeit der Kultur bei einem Gesamtproteingehalt von etwa 0,5 µg/ml ist der Glycinanteil dennoch nicht für zuverlässige Rückschlüsse verwertbar.

VERGLEICHBSBEISPIEL 3 – Korrelation des Asparaginanteils mit gaslimitiertem oder flüssigkeitslimitiertem Zustand der Kultur

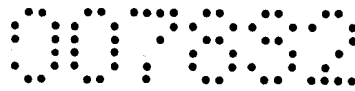
Ähnlich wie in Vergleichsbeispiel 2 liegen die Verhältnisse bei Asparagin, der vierten vom uneingeschränkt lebensfähigen Mikroorganismus in das Medium sekretierten Aminosäure, wie dies in Fig. 7 dargestellt ist. Aufgrund der äußerst geringen sekretierten Mengen ist Asparagin für solche Korrelationen jedoch völlig ungeeignet.

VERGLEICHBSBEISPIEL 4 – Korrelation des Glutaminsäureanteils mit der volumetrischen Produktivität

Zur Untersuchung, ob der Anteil an Glutaminsäure am Gesamtproteingehalt noch weitere Rückschlüsse zulässt, wurde dieser unter Wiederholung von Beispiel 3 mit der volumetrischen Produktivität oder spezifischen Methanbildungsrate MER (in mmol/l.h) verknüpft, d.h. der molaren Menge an Methan, die pro Liter Kultur und Stunde gebildet werden. Fig. 8 zeigt, dass sich mittels dieser Korrelation keine schlüssigen Aussagen treffen lassen.

BEISPIEL 5 - Korrelation des Glutaminsäureanteils mit der spezifischen Methanproduktionsrate

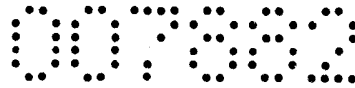
Anders liegen die Verhältnisse jedoch bei Verknüpfung des Glutaminsäureanteils am Gesamtproteingehalt mit der spezifischen Methanproduktionsrate q_{CH_4} , d.h. der mo-



laren Menge an Methan, die von einem Gramm Biomasse pro Stunde produziert wird. Wie aus Fig. 9 zu erkennen, wird bei Auftrag des Glutaminsäureanteils über q_{CH_4} ein Übergangszustand zwischen gaslimitiertem und flüssigkeitslimitiertem Zustand erkennbar, in dem praktisch keine Glutaminsäure in das Medium sekretiert wird.

Hierbei handelt es sich möglicherweise um den Optimalzustand für die Prozessentwicklung der Fermentation dieses Mikroorganismus, in dem sich Zellvermehrung und Methanproduktion die Waage halten, weswegen keine Aminosäure im Überschuss vorliegt und folglich auch keine Sekretion erfolgt.

In Summe ist jedenfalls klar erkennbar, dass die vorliegende Erfindung ein neues Verfahren zur Bestimmung des Zustands einer Kultur methanproduzierender Mikroorganismen bereitstellt, mittels dessen – nach anfänglicher Bestimmung des spezifischen Sekretionsmusters des jeweiligen Mikroorganismus – verschiedenste Zustände einer entsprechenden Kultur mit hoher Zuverlässigkeit bestimmt werden können, wozu im Verlauf des Fermentationsprozesses im einfachsten Fall lediglich die Bestimmung der Konzentration einer einzigen Aminosäure erforderlich ist.



PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Bestimmen des Status einer Mikrobekultur durch Messen zumindest eines Kulturparameters, ausgewählt aus den Konzentrationen von Nährstoffen und Metaboliten, insbesondere Aminosäuren, im Kulturmedium und Gaspartialdrücken, sowie anschließendes Korrelieren der Messwerte des zumindest einen Kulturparameters mit dem Status der Kultur,

dadurch gekennzeichnet, dass

in einem mikrobiellen Methanisierungsprozess unter Verwendung eines hydrogenotrophen methanogenen Mikroorganismus

a) vor dem Beginn des Methanisierungsprozesses das spezifische Aminosäuresekretionsmuster des jeweils eingesetzten Mikroorganismus bestimmt wird;

b) während des Prozesses die Konzentration zumindest einer speziellen Aminosäure im Kulturmedium bestimmt wird; und

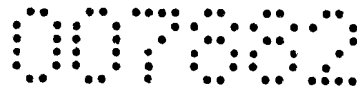
c) gegebenenfalls zusätzlich der Gesamtproteingehalt im Kulturmedium und der Anteil der zumindest einen Aminosäure am Gesamtproteingehalt bestimmt werden;

wonach

d) die Konzentration oder gegebenenfalls der Anteil der jeweiligen Aminosäure am Gesamtproteingehalt mit dem Status der Kultur korreliert wird, um so die Lebensfähigkeit der Kultur abzuschätzen und/oder die Frage zu klären, ob die Methanbildungsrate durch den Gasaustausch der Kultur mit der Umgebung limitiert, d.h. "gaslimitiert", oder durch die flüssige Nährstoffzufuhr limitiert, d.h. "flüssigkeitslimitiert", ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt b) die Konzentration einer Aminosäure bestimmt wird, von der in Schritt a) festgestellt wurde, dass sie nicht Teil des spezifischen Sekretionsmusters des Mikroorganismus ist, wobei eine Konzentration dieser Aminosäure > 0 einen Indikator für zumindest eingeschränkte Lebensfähigkeit des Mikroorganismus in der Kultur darstellt.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich in Schritt c) der Gesamtproteingehalt und/oder der Anteil der in Schritt b) bestimmten Aminosäure am Gesamtproteingehalt bestimmt werden, wobei ein Gesamtprotein-



gehalt und/oder ein Anteil dieser Aminosäure am Gesamtproteingehalt unter einem jeweiligen, in Schritt a) bestimmten spezifischen Schwellenwert einen Indikator für eingeschränkte Lebensfähigkeit darstellt und ein Gesamtproteingehalt und/oder ein Anteil dieser Aminosäure am Gesamtproteingehalt über dem jeweiligen Schwellenwert einen Indikator für eine sterbende Kultur darstellt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt b) die Konzentration einer Aminosäure bestimmt wird, von der in Schritt a) festgestellt wurde, dass sie Teil des spezifischen Sekretionsmusters des Mikroorganismus ist, und

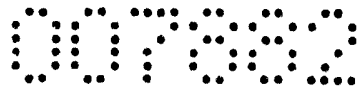
in Schritt c) der Gesamtproteingehalt im Kulturmedium und der Anteil der in Schritt b) bestimmten Aminosäure am Gesamtproteingehalt bestimmt werden, wobei der Anteil dieser Aminosäure am Gesamtproteingehalt, in Abhängigkeit davon, ob dieser Anteil unter oder über einem zuvor in Schritt a) bestimmten Schwellenwert liegt, einen Indikator für eine gaslimitierte oder eine flüssigkeitslimitierte Methanproduktion darstellt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als hydrogenotropher methanogener Mikroorganismus ein Stamm einer methanogenen Archaea eingesetzt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Mikroorganismus ein Stamm von *Methanothermobacter marburgensis* eingesetzt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt b) die Konzentration zumindest einer Aminosäure, ausgewählt aus Alanin, Asparaginsäure und Glutaminsäure, im Kulturmedium bestimmt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration von Asparaginsäure bestimmt wird, wobei durch eine Asparaginsäure-Konzentration > 0 zumindest eingeschränkte Lebensfähigkeit der Kultur angezeigt wird.



9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich in Schritt c) der Gesamtproteingehalt bestimmt wird, wobei durch einen Gesamtproteingehalt $> 0,5 \mu\text{g/ml}$ eingeschränkte Lebensfähigkeit wird und durch einen Gesamtproteingehalt $> 2,0 \mu\text{g/ml}$ eine sterbende Kultur angezeigt wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt b) die Konzentration von Alanin und in Schritt c) der Gesamtproteingehalt und der Anteil an Alanin daran bestimmt werden, wobei durch einen Alanin-Anteil $< 0,5$ eine gaslimitierte Methanproduktion angezeigt wird und durch einen Alanin-Anteil $> 0,5$ eine flüssigkeitslimitierte Methanproduktion angezeigt wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt b) die Konzentration von Glutaminsäure und in Schritt c) der Gesamtproteingehalt und der Anteil an Glutaminsäure daran bestimmt werden, wobei durch einen Glutaminsäure-Anteil $> 0,5$ eine gaslimitierte Methanproduktion angezeigt wird und durch einen Glutaminsäure-Anteil $< 0,5$ eine flüssigkeitslimitierte Methanproduktion angezeigt wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt c) zusätzlich die Methanbildungsrate bestimmt und auf die Menge an zugeführter Biomasse bezogen wird, um die spezifische Methanproduktionsrate q_{CH_4} zu berechnen, die in der Folge mit dem Anteil an Glutaminsäure am Gesamtproteingehalt korreliert wird, wodurch ein Übergangszustand zwischen gaslimiterter und flüssigkeitslimitierter Methanproduktion detektierbar wird.

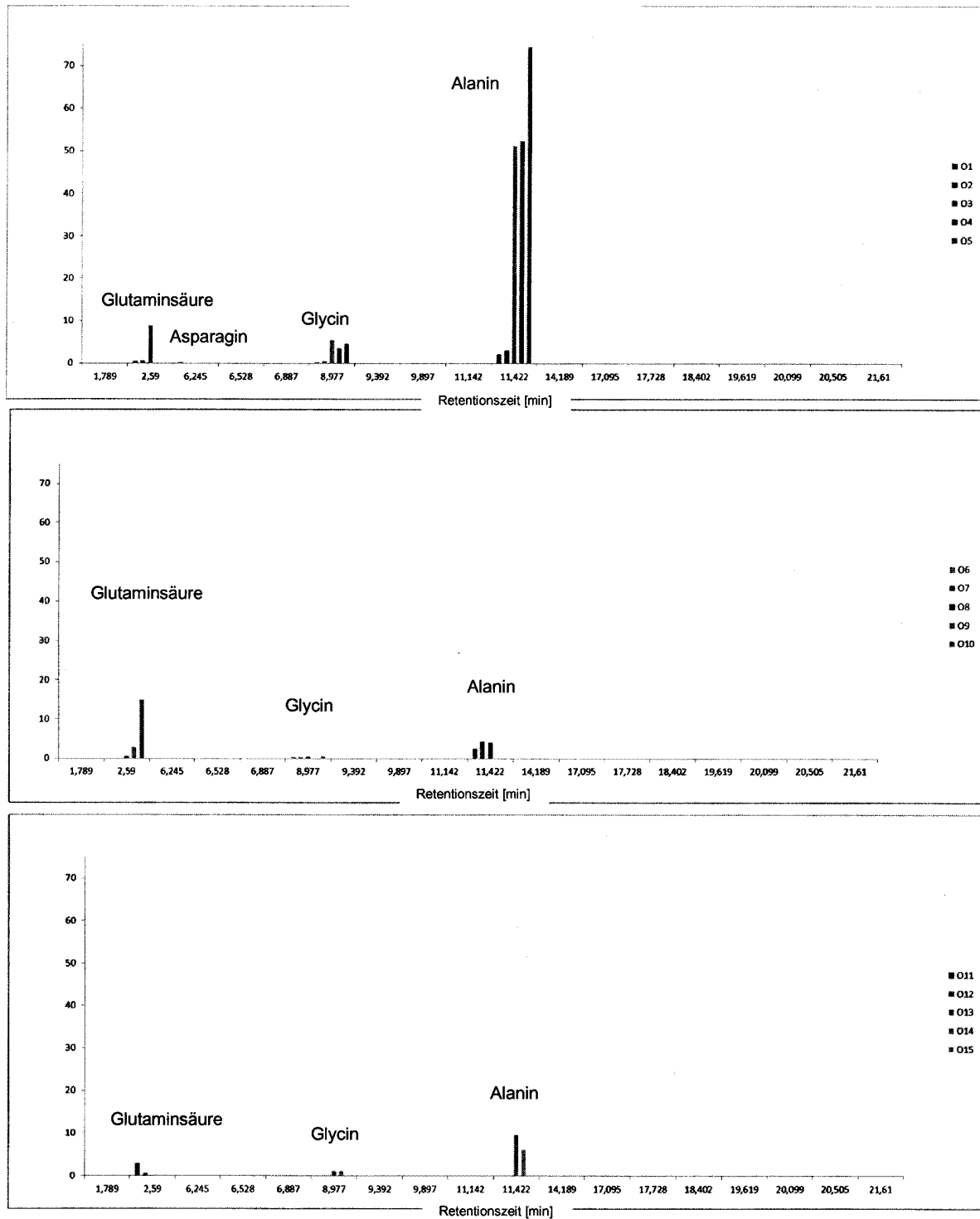
Wien, am 29. Okt. 2015

Technische Universität Wien
vertreten durch

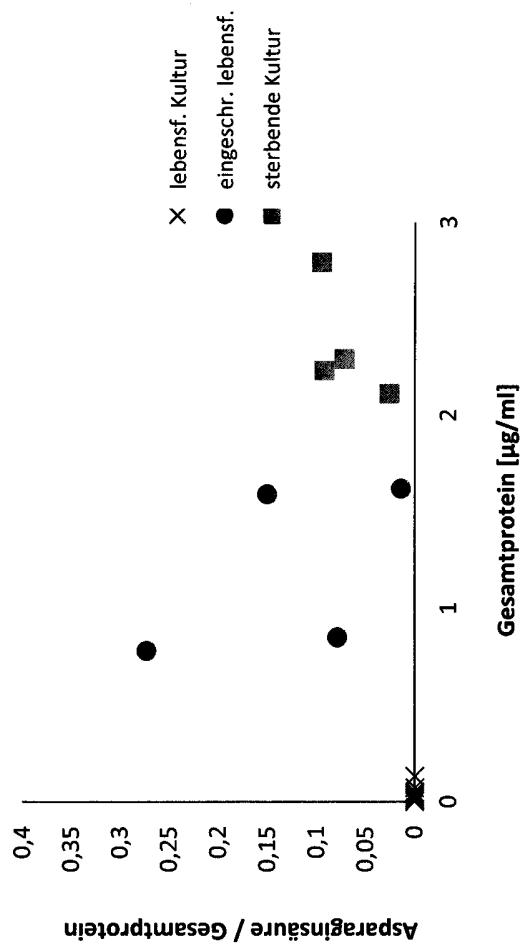
Häupl & Ellmeyer KG
Patentanwaltskanzlei

007882

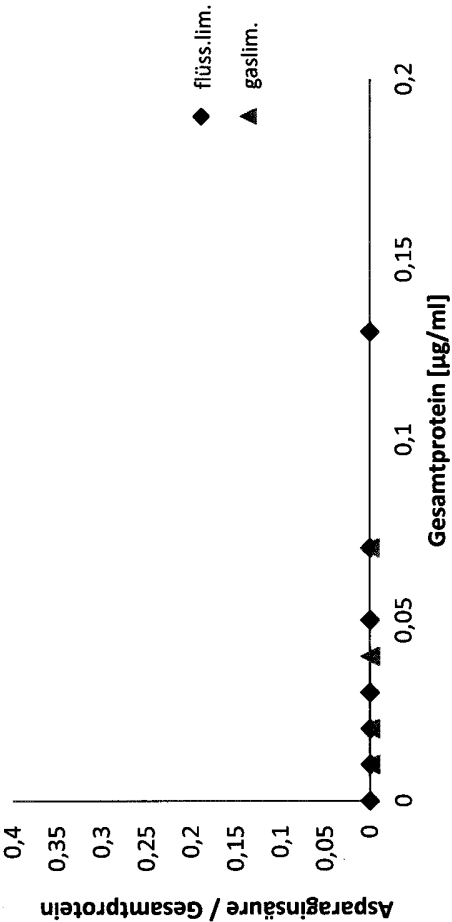
1/9



Figur 1

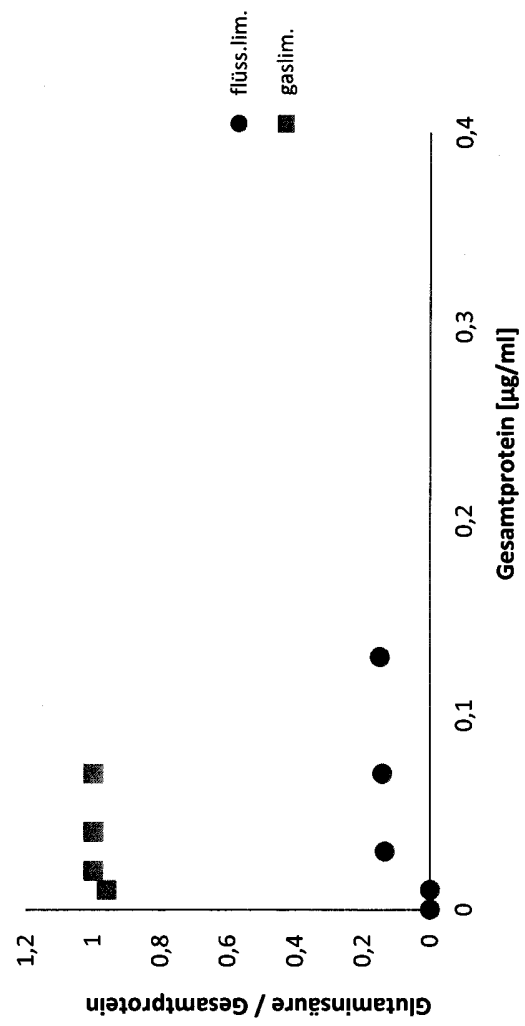


Figur 2

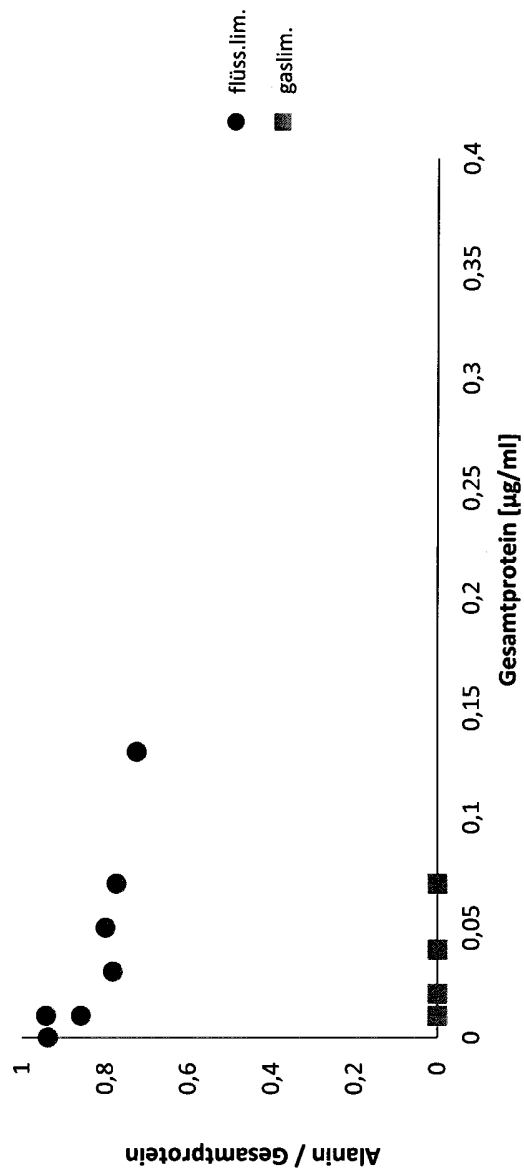


Figur 3

4/9



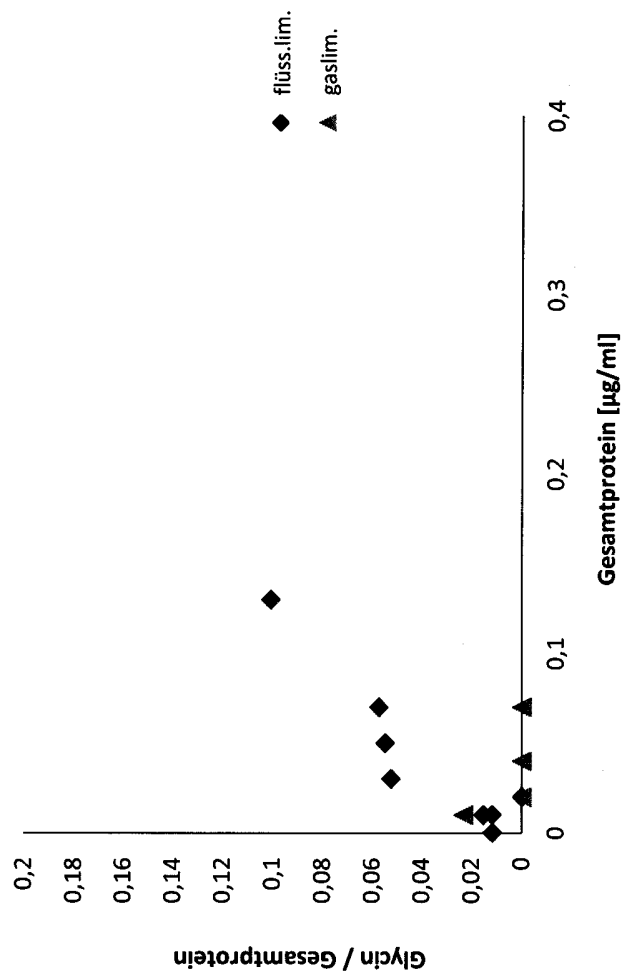
Figur 4



Figur 5

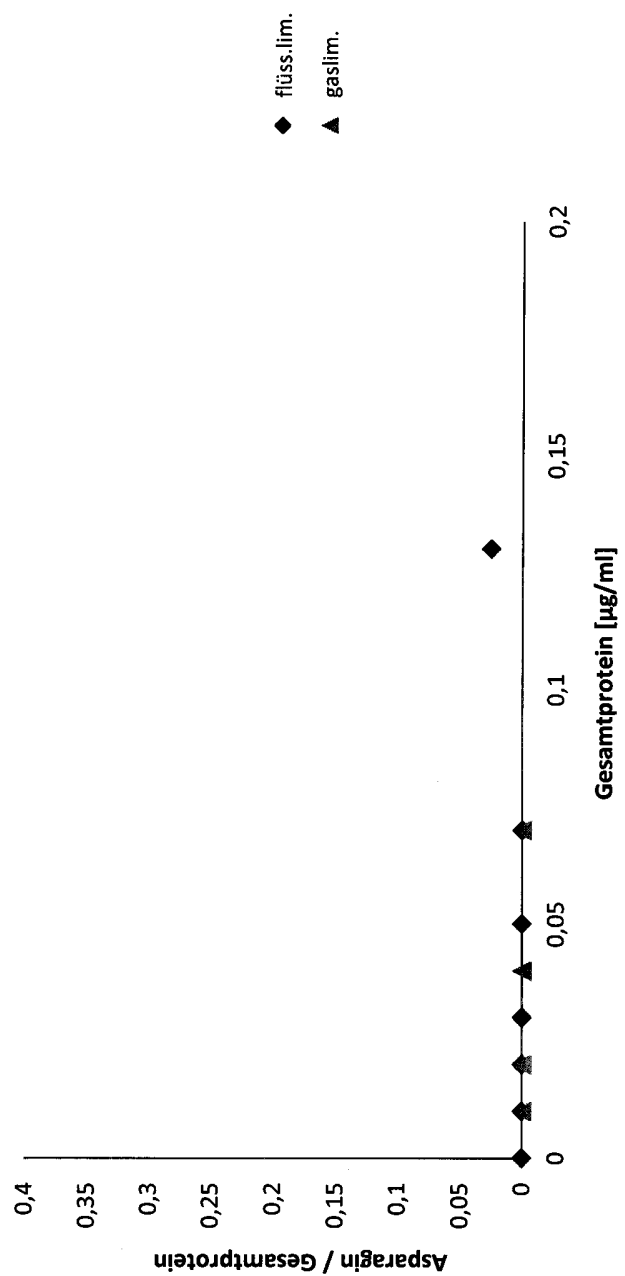
007832

6/9



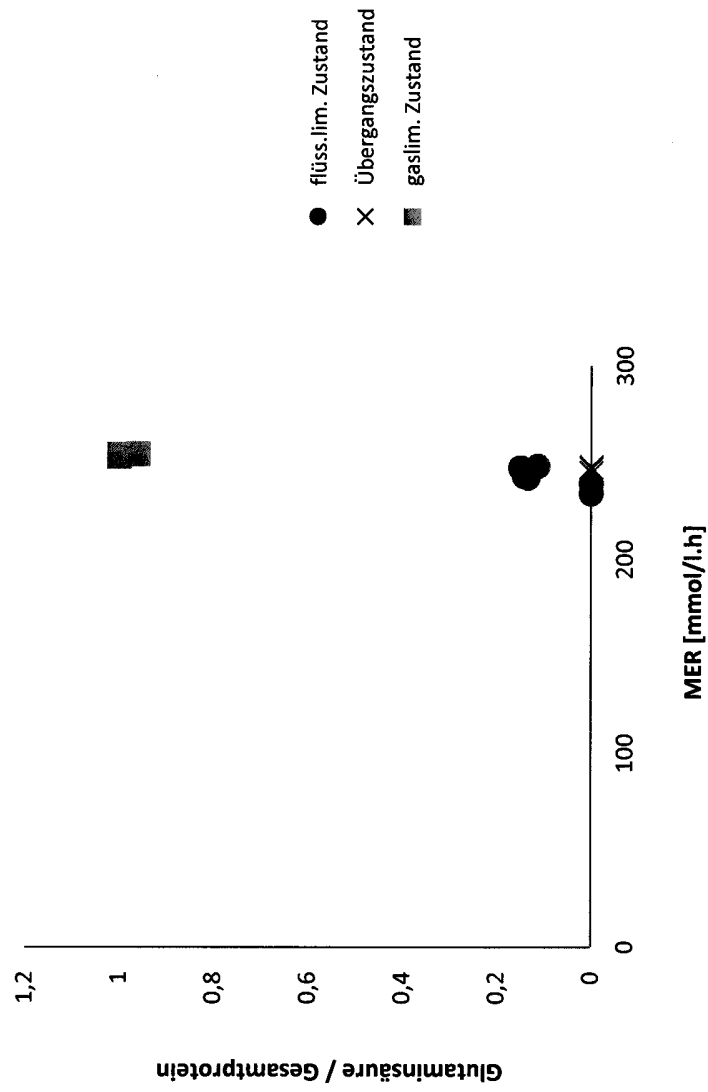
Figur 6

7/9



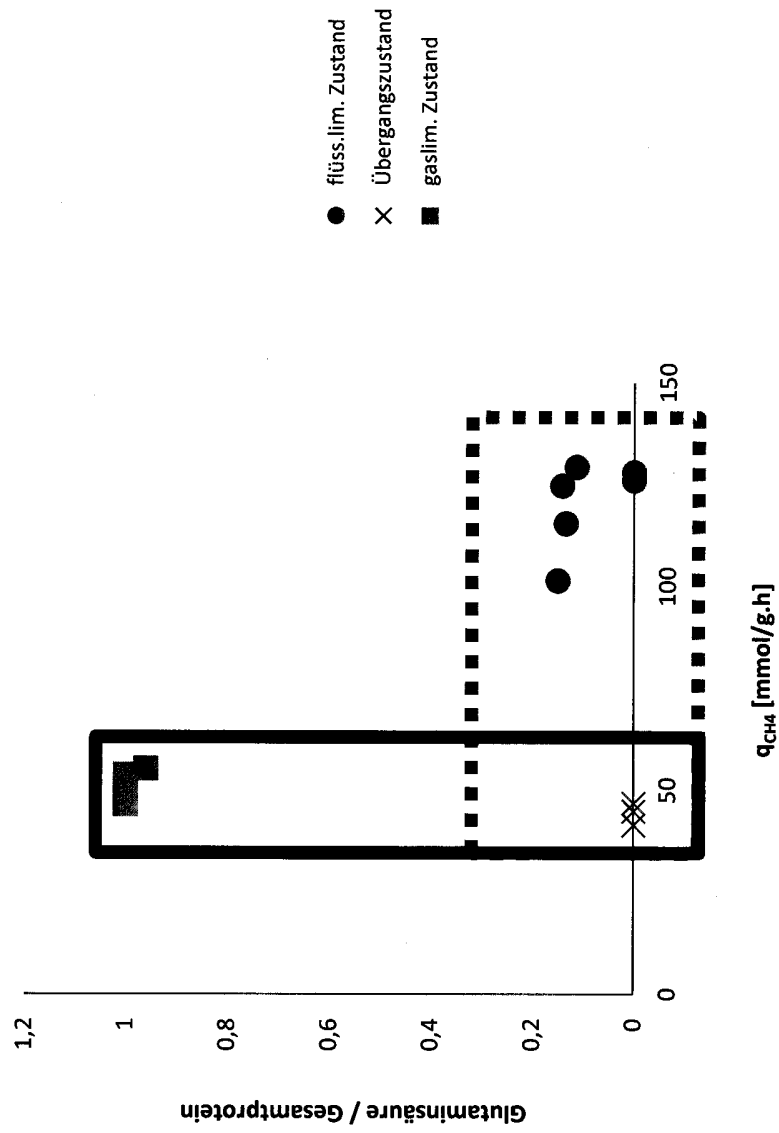
Figur 7

8/9



Figur 8

9/9



Figur 9



Geänderte PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Bestimmen des Status einer Mikrobekultur durch Messen zumindest eines Kulturparameters, ausgewählt aus den Konzentrationen von Nährstoffen und Metaboliten, insbesondere Aminosäuren, im Kulturmedium und Gaspartialdrücken, sowie anschließendes Korrelieren der Messwerte des zumindest einen Kulturparameters mit dem Status der Kultur,

dadurch gekennzeichnet, dass

in einem mikrobiellen Methanisierungsprozess unter Verwendung eines hydrogenotrophen methanogenen Mikroorganismus

a) vor dem Beginn des Methanisierungsprozesses das spezifische Aminosäuresekretionsmuster des jeweils eingesetzten Mikroorganismus bestimmt wird;

b) während des Prozesses die Konzentration zumindest einer speziellen Aminosäure im Kulturmedium bestimmt wird; und

c) optional zusätzlich der Gesamtproteingehalt im Kulturmedium und der Anteil der zumindest einen Aminosäure am Gesamtproteingehalt bestimmt werden;

wonach

d) die Konzentration oder, wenn Schritt c) durchgeführt wird, der Anteil der jeweiligen Aminosäure am Gesamtproteingehalt mit dem Status der Kultur korreliert wird, um so die Lebensfähigkeit der Kultur zu bestimmen und/oder festzustellen, ob die Methanbildungsrate durch den Gasaustausch der Kultur mit der Umgebung limitiert oder durch die flüssige Nährstoffzufuhr limitiert ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt b) die Konzentration einer Aminosäure bestimmt wird, von der in Schritt a) festgestellt wurde, dass sie nicht Teil des spezifischen Sekretionsmusters des Mikroorganismus ist, wobei eine Konzentration dieser Aminosäure > 0 einen Indikator für zumindest eingeschränkte Lebensfähigkeit des Mikroorganismus in der Kultur darstellt.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich in Schritt c) der Gesamtproteingehalt und/oder der Anteil der in Schritt b) bestimmten Aminosäure am Gesamtproteingehalt bestimmt werden, wobei ein Gesamtproteingehalt

und/oder ein Anteil dieser Aminosäure am Gesamtproteingehalt unter einem jeweiligen, in Schritt a) bestimmten spezifischen Schwellenwert einen Indikator für eingeschränkte Lebensfähigkeit darstellt und ein Gesamtproteingehalt und/oder ein Anteil dieser Aminosäure am Gesamtproteingehalt über dem jeweiligen Schwellenwert einen Indikator für eine sterbende Kultur darstellt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt b) die Konzentration einer Aminosäure bestimmt wird, von der in Schritt a) festgestellt wurde, dass sie Teil des spezifischen Sekretionsmusters des Mikroorganismus ist, und in Schritt c) der Gesamtproteingehalt im Kulturmedium und der Anteil der in Schritt b) bestimmten Aminosäure am Gesamtproteingehalt bestimmt werden, wobei der Anteil dieser Aminosäure am Gesamtproteingehalt, in Abhängigkeit davon, ob dieser Anteil unter oder über einem zuvor in Schritt a) bestimmten Schwellenwert liegt, einen Indikator für eine gaslimitierte oder eine flüssigkeitslimitierte Methanproduktion darstellt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als hydrogenotropher methanogener Mikroorganismus ein Stamm einer methanogenen Archaea eingesetzt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Mikroorganismus ein Stamm von *Methanothermobacter marburgensis* eingesetzt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt b) die Konzentration zumindest einer Aminosäure, ausgewählt aus Alanin, Asparaginsäure und Glutaminsäure, im Kulturmedium bestimmt wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration von Asparaginsäure bestimmt wird, wobei durch eine Asparaginsäure-Konzentration > 0 zumindest eingeschränkte Lebensfähigkeit der Kultur angezeigt wird.

004 175 004 374

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich in Schritt c) der Gesamtproteingehalt bestimmt wird, wobei durch einen Gesamtproteingehalt $> 0,5 \mu\text{g/ml}$ eingeschränkte Lebensfähigkeit angezeigt wird und durch einen Gesamtproteingehalt $> 2,0 \mu\text{g/ml}$ eine sterbende Kultur angezeigt wird.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt b) die Konzentration von Alanin und in Schritt c) der Gesamtproteingehalt und der Anteil an Alanin daran bestimmt werden, wobei durch einen Alanin-Anteil $< 0,5$ eine gaslimitierte Methanproduktion angezeigt wird und durch einen Alanin-Anteil $> 0,5$ eine flüssigkeitslimitierte Methanproduktion angezeigt wird.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt b) die Konzentration von Glutaminsäure und in Schritt c) der Gesamtproteingehalt und der Anteil an Glutaminsäure daran bestimmt werden, wobei durch einen Glutaminsäure-Anteil $> 0,5$ eine gaslimitierte Methanproduktion angezeigt wird und durch einen Glutaminsäure-Anteil $< 0,5$ eine flüssigkeitslimitierte Methanproduktion angezeigt wird.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt c) zusätzlich die Methanbildungsrate bestimmt und auf die Menge an zugeführter Biomasse bezogen wird, um die spezifische Methanproduktionsrate q_{CH_4} zu berechnen, die in der Folge mit dem Anteil an Glutaminsäure am Gesamtproteingehalt korreliert wird, wodurch ein Übergangszustand zwischen gaslimitierter und flüssigkeitslimitierter Methanproduktion detektierbar wird.

Wien, am 6. Juli 2016

Technische Universität Wien
vertreten durch:

Häupl & Ellmeyer KG
Patentanwaltskanzlei

W