



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 224 867 A1

4(51) C 12 N 1/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 N / 260 836 1	(22)	13.03.84	(44)	17.07.85
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, 2200 Greifswald, Rudolf-Petershagen-Allee, DD
(72)	Uebel, Barbara, Dr. rer. nat.; Büttner, Roland, Dipl.-Biol.; Genz, Ingelore, Dipl.-Päd.; Köhler, Manfred, Prof. Dr. sc. nat. Dipl.-Biol.; Kolyschkow, Angela, Dipl.-Phys., DD

(54)	Verfahren zur substratlimitierenden Steuerung kontinuierlicher Kulturen vom Turbidostat-Typ
------	---

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Steuerung kontinuierlicher Kulturen von Mikroorganismen und anderen Zellen für biotechnische Verfahren zur Stoffwandlung mit Hilfe wachsender Zellen und für die Selektion von Hochleistungsstämmen für solche Verfahren. Die Erfindung bezweckt, die günstigen Eigenschaften von Chemostat- und Turbidostatkulturen zur Erzielung hoher Raum-Zeit-Ausbeuten bei effektivster Substratausnutzung so zu vereinigen, daß die Instabilitäten des Chemostaten bei hohen Wachstumsraten und des Turbidostaten bei Substratlimitation umgangen werden. Das Wesen der Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, daß in einer nach einem der bekannten Turbidostatprinzipien geregelten kontinuierlichen Kultur mindestens ein wachstumsessentieller Nährstoff nicht in der über die Regelung zufließenden Nährlösung enthalten ist, der Kultur gesondert mit konstanter Geschwindigkeit zugeführt und praktisch vollständig verbraucht wird. Durch die Kombination der Selektionswirkungen der beiden bekannten Kultivierungsverfahren bewirkt die Steuerung nach dem erfindungsgemäßen Verfahren bei C-Limitation eine Autoselektion des jeweils effektivsten Stammes für eine Biomasseproduktion und bei anderer Limitation das Verbleiben der leistungsfähigsten Produktbildner in der Kultur.

Verfahren zur substratlimitierenden Steuerung kontinuierlicher Kulturen vom Turbidostat-Typ

Anwendungsgebiet der Erfindung

Verfahren zur substratlimitierenden Steuerung kontinuierlicher Kulturen vom Turbidostat-Typ für biotechnische Stoffwandlungsprozesse mit Hilfe wachsender Zellen und für die Modellierung industrieller Prozeßführungen bei der Verfahrensentwicklung

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Kontinuierliche Verfahren werden für die Produktion von mikrobiellem Eiweiß wie auch für die biotechnische Gewinnung organischer Substanzen wegen der besseren Auslastung der Anlagen und dem günstigen Arbeitsablauf bevorzugt, wenn die erwünschten Leistungen von stabilen, wachsenden Zellpopulationen erbracht werden können.

Wachstum und Stoffwechselleistungen von Mikroorganismen hängen in starkem Maße von den Kultivierungsbedingungen ab, wobei die Wirkung einzelner Faktoren dieser Kultivierungsbedingungen von der Größe anderer zugehöriger Faktoren abhängen kann.

Für die Auswahl von Mikroorganismen für bestimmte Produktionsverfahren ergibt sich daraus folgendes Problem: Werden die Untersuchungen im Labor bei Kultivierungsbedingungen durchgeführt, die von denen des technischen Verfahrens

abweichen, so kann ein Organismus ausgewählt werden, der zwar unter den Laborbedingungen, aber nicht im industriellen Prozeß optimale Leistungen zeigt, während ein anderer Stamm, der unter den Bedingungen des technischen Verfahrens am besten geeignet ist, unter Umständen im Laborversuch nicht als solcher erkannt und daher nicht der kleintechnischen Erprobung zugeführt wird.

Eine bevorzugte Methode bei der Verfahrensentwicklung für biotechnische Verfahren zur Nutzung wachsender Zellen besteht darin, die dafür benötigten Hochleistungsstämme durch Autoselektion in kontinuierlichen Kulturen im Labormaßstab zu gewinnen.

Da in jeder kontinuierlichen Kultur Selektionsprozesse ablaufen, deren Richtung und Wirkung maßgeblich von dem für die Prozeßführung gewählten Steuerungsprinzip abhängt, sind nicht selten leistungsmindernde Veränderungen des Verhaltens der Zellpopulation bei der Überrührung eines Hochleistungsstammes vom Labormaßstab zum Industrieverfahren zu beobachten.

Die im Labormaßstab üblichen Verfahren zur kontinuierlichen Kultur sind Chemostate und verschiedene, nach dem Turbido-statprinzip geregelte Kulturen wie z.B. der pH-Auxostat (pH-Stat). In Chemostatkulturen bewirkt der Selektionsdruck die Auslese desjenigen Stammes, der ein limitierendes Substrat s_L bei einer vorgegebenen Wachstumsgeschwindigkeit am besten ausnutzen kann. Diese Wachstumsgeschwindigkeit liegt stets deutlich unterhalb der von dem jeweiligen Mikroorganismus maximal erreichbaren. Es wird also derjenige Stamm ausgelesen, der diese submaximale Wachstumsrate bei der geringsten Restkonzentration $\bar{s}$ des limitierenden Substrats in der Kulturlüssigkeit erreicht. Eine verbesserte Raum-Zeit-Ausbeute an Biomasse wird nach diesem Selektionsverfahren durch Umwandlung eines größeren Anteils des limitierenden Substrats in Biomasse erreicht, wobei die vom jeweiligen Mikroorganismus erreichbare maximale spezifische Wachstumsrate keinen Einfluß auf das Ergebnis der Selektion hat.

In allen Kulturen vom Turbidostat-Typ müssen sämtliche im Nährmedium enthaltenen wachstumsessentiellen Komponenten im Überschuß vorhanden sein, andernfalls tritt in diesen Kulturen Wachstumsstillstand ein. Der Selektionsdruck in diesen Kulturen bewirkt die Auslese desjenigen Stammes, der unter den gegebenen Bedingungen die höchste spezifische Wachstumsrate zeigt. Hierbei wird eine verbesserte Raum-Zeit-Ausbeute durch erhöhte maximale spezifische Wachstumsrate erreicht, wobei kein Selektionsdruck in Richtung auf günstige Substratausnutzung wirkt.

Die Bildung von Produkten, wie z.B. Aminosäuren, erfordert eine zusätzliche Stoffwechselleistung der Zellen, so daß Stämme mit hoher Produktausscheidung gegenüber Stämmen mit kleinerer Produktbildungsrate meist weniger konkurrenzfähig sind. Kontinuierliche Verfahren zur Produktgewinnung sind daher mit dem Risiko behaftet, daß z.B. durch auftretende Revertanten oder Infektion mit dem Wildstamm der Produktionsstamm durch einen weniger leistungsfähigen Stamm aus der Kultur verdrängt wird. Es wurden daher verschiedene Verfahren entwickelt, die eine stabile kontinuierliche Produktgewinnung ermöglichen. Diese beruhen vorwiegend auf der Züchtung von produktbildenden Stämmen, die gleichzeitig eine Resistenz gegenüber einer wachstumshemmenden Substanz aufweisen. Diese Substanz muß dann der Kultur ständig zugeführt werden, wodurch zusätzliche Kosten und mitunter Probleme bei der Reinigung des Produktes von dieser Substanz auftreten und Kompromisse hinsichtlich der Leistungsfähigkeit des Stammes (Raum-Zeit-Ausbeute der Produktbildung) nötig sind.

Im industriellen Verfahren werden die Kultivierungsbedingungen so gewählt, daß das Produkt aus spezifischer Wachstumsrate und Biomassekonzentration bei der effektivsten Nutzung der teuersten Substrate einen Maximalwert erreicht und weitere spezifische Randbedingungen erfüllt werden. Die beiden zur Wahl stehenden Labormethoden zur kontinuierlichen Kultur erlauben jedoch jeweils nur die Selektion nach einem dieser beiden Effektivitätskriterien.

Literatur

Petschurkin, N. S., Terskov, I. A. "Autoselektionsprozesse in kontinuierlichen Kulturen von Mikroorganismen" (russ.), Nauka, Nowosibirsk, 1973

Martin, G. A., Hempfling, W. P. "A method for the Regulation of Microbial Population Density during Continuous Culture at High Growth Rates", Arch. Microbiol. 107, 41, (1976)

Oltman, L. F., et al. "Modification of the pH-Auxostat Culture Method for the Mass Cultivation of Bacteria", Biotechnol. Bioeng. 20, 921 (1978)

Ziel der Erfindung

Es ist das Ziel der Erfindung, das Risiko bei der Überführung von im Labor isolierten Produktionsstämmen durch Änderung des Steuerprinzips der im Labor- und Technikumsmaßstab für die Selektion genutzten kontinuierlichen Kulturen zu senken und gleichzeitig zur Verkürzung der Entwicklungszeit von biotechnischen Verfahren beizutragen, indem mehrere technisch wichtige Selektionskriterien bei einem Selektionsschritt zur Wirkung gebracht werden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Durch die Erfindung werden die in Chemostaten und Turbidostatkulturen jeweils nur einzeln realisierten technisch günstigen Selektionswirkungen so miteinander vereinigt, daß durch Autoselektion in der erfindungsgemäßen kontinuierlichen Kultur diejenigen Stämme ausgelesen werden, deren Eigenschaften dem komplexen Optimalitätskriterium für technische Verfahren, einer hohen Raum-Zeit-Ausbeute bei effektiver Nutzung ausgewählter Nährstoffe, am besten entsprechen, wobei in bestimmten Fällen eine Verknüpfung mit weiteren technisch-ökonomisch günstigen Selektionswirkungen möglich ist.

Das Wesen der Erfindung besteht darin, eine nach dem üblichen Turbidostatprinzip geregelte kontinuierliche Kultur, bei der sich die Durchflußrate D der Nährlösung auf den Wert der spezifischen Wachstumsrate μ der Biomasse im Fermentor einstellt, dahingehend zu verändern, daß mindestens einer der wachstumsessentiellen oder wachstumsfördernden Nährstoffe (z. B. die C-Quelle) nicht in der über die Regelung gesteuert zufließenden Nährlösung enthalten ist, sondern getrennt von dieser, der Kultur mit konstanter Geschwindigkeit zugeführt wird. Die Biomassekonzentration wird nach dem für die jeweilige Form der Turbidostatkultur üblichen Verfahren auf einen bestimmten Wert x eingestellt. Das Verhältnis der Geschwindigkeit des gesonderten Substratzuflusses zu der Biomassekonzentration x wird vorzugsweise so gewählt, daß bei der zu erwartenden Verdünnungsrate D das gesondert zugeführte Substrat praktisch vollständig verbraucht wird und die im Kulturmedium verbleibende Restkonzentration $\bar{s}_L$ die Wachstumsgeschwindigkeit der Kultur limitiert. Bei dieser Form der Substratlimitation von Turbidostat-Kulturen tritt kein Wachstumsstillstand auf, da durch die kontinuierliche Zufuhr des limitierenden Substrates stets nach einer gewissen, von der spezifischen Wachstumsrate und der Biomassekonzentration abhängigen Zeit derjenige Biomassezuwachs erreicht wird, bei dem die Regelung eine weitere Zugabe von Nährlösung zur Kultur und eine entsprechende Verdünnung derselben auslöst.

Damit bleibt der für Turbidostate charakteristische Selektionsmechanismus erhalten, bei dem die Zellen desjenigen Stammes in der Kultur verbleiben, die unter den gegebenen Bedingungen die höchste spezifische Wachstumsrate μ aufweisen.

Zu den Bedingungen, die den Wert μ stark beeinflussen, gehört bei dieser Kultur (im Unterschied zu üblichen Turbidostaten) die Konzentration $\bar{s}_L$ des limitierenden Substrates s_L in der Suspension, so daß der Selektionsdruck diejenigen Zellen begünstigt, die bei kleinen Konzentrationen

$\bar{s}_L$ hohe spezifische Wachstumsraten erreichen.

Die Konzentration $\bar{s}_L$ im Fließgleichgewicht in dieser Kultur ergibt sich aus folgender Bilanz

$$D \cdot \bar{s}_L = D' \cdot s_{RL}' - D \cdot \bar{x}/Y_L. \quad (1)$$

Dabei bedeuten s_{RL}' die Konzentration des gesondert zugeführten Substrates, D' das Verhältnis F'/V , wobei F' die Geschwindigkeit des konstanten Zuflusses und V das Kulturvolumen ist. Y_L ist die Menge Biomasse, die pro Mengeneinheit an verbrauchtem limitierendem Substrat gebildet wird. Steigen μ und D vorübergehend über den Fließgleichgewichtswert an, dann steigt die Geschwindigkeit des Substratverbrauches $\mu \cdot \bar{x}/Y_L$ und der Substratabführung aus der Kultur $D \cdot \bar{s}$. Bei der gleichbleibenden Zuführungsgeschwindigkeit $D \cdot s_{RL}'$ für das limitierende Substrat muß damit die Gleichgewichtskonzentration $\bar{s}_L$ sinken, wodurch im Bereich limitierender Konzentrationen die spezifische Wachstumsrate μ sinkt und damit auch die Verdünnungsrate D .

Ein Stamm kann demnach eine umso höhere spezifische Wachstumsrate erreichen, je mehr Biomasse er aus der gleichen Menge des limitierenden Substrates bildet (kleinere Verbrauchsgeschwindigkeit) und je kleiner die Restkonzentration $\bar{s}_L$ ist, die er für das Wachstum benötigt (geringere Substratabführung $D \cdot \bar{s}$).

Der für technische Verfahren wesentliche effektive Ausbeutekoeffizient Y_{Le} , der die Menge Biomasse angibt, die pro Mengeneinheit an zugeführtem Substrat gebildet wird, errechnet sich in der Turbidostatkultur mit konstantem Zufluß von s_L zu

$$Y_{Le} = \frac{D \cdot \bar{x}}{s_{RL}' \cdot D'} \quad (2)$$

Wenn also die spezifische Wachstumsrate μ der Kultur durch kleines $\bar{s}_L$ auf einen Wert begrenzt ist, der kleiner als der μ_{max} -Wert für unlimitiertes Wachstum unter sonst gleichen

Kultivierungsbedingungen ist, und sich die Kultur bei vorgewähltem $\bar{x}$ und $s_{RL}^1 \cdot D^1$ auf den unter diesen Bedingungen maximal möglichen Wert von $\mu = D$ einstellt, erreicht Y_{Le} ebenfalls einen Maximalwert. Damit wirkt der Selektionsdruck in dieser Form der kontinuierlichen Kultur so, daß diejenigen Zellen bevorzugt sind und bei einer Autoselektion in der Kultur verbleiben, die

- a) bei der sich einstellenden Konzentration $\bar{s}_L$ des limitierenden Substrates die höchste spezifische Wachstumsrate μ haben,
- b) die vorgegebene Biomassekonzentration $\bar{x}$ bei geringerem Verbrauch an dem limitierenden Substrat s_L , also mit besserer Ausbeute erreichen und
- c) die höchste Raum-Zeit-Ausbeute an Biomasse bei der gegebenen Substratzuführungsgeschwindigkeit liefern.

Damit sind die in Chemostaten und Turbidostaten jeweils nur einzeln wirkenden Selektionskriterien in der erfindungsgemäßen Form der kontinuierlichen Kultur gleichzeitig wirksam.

Wachstumslimitation durch Substratmangel kann zu Verschiebungen des Stoffwechselgleichgewichts und dadurch zur Überproduktion und Ausscheidung bestimmter Zwischenprodukte wie z.B. organische Säuren, Aminosäuren u.a. führen. In den üblichen Chemostatkulturen mit einer solchen Limitation begünstigt der Selektionsdruck die Zellen, die die vorgegebene spezifische Wachstumsrate bei der kleinsten Restkonzentration $\bar{s}_L$ erreichen, wobei die Produktkonzentration nur insofern selektionswirksam werden kann, als sie die Abhängigkeit $\mu = f(\bar{s}_L)$ beeinflusst. Eine hohe Produktbildungsrate kann im Chemostaten für einen Stamm dann ein Selektionsvorteil sein, wenn dieses Produkt das Wachstum konkurrierender Stämme hemmt. In Kulturen mit Turbidostatregelung ist kein gegenüber größeren Schwankungen stabiles Fließgleichgewicht bei wachstumslimitierender Konzentration eines Nährstoffes erreichbar.

Beim Turbidostaten mit konstantem Zulauf von mindestens einer wachstumsessentiellen oder wachstumsfördernden Komponente des Nährmediums, die meist nicht die C-Quelle ist, kann eine hohe Produktbildungsrate unter bestimmten Bedingungen einen direkten Selektionsvorteil bedeuten. Für welche Produkte und welches limitierende Substrat das zutrifft, hängt von der Art des benutzten Turbidostatverfahrens ab. So wird z.B. der Biomassezuwachs im pH-Auxostaten anhand der Menge ausgeschiedener H^+ -Ionen gemessen. Bezeichnet man mit BC die Menge H^+ -Ionen, die zur Ansäuerung von 1 l des zufließenden Nährlösungsgemisches auf den jeweiligen Statier-pH-Wert benötigt wird, dann ist die Biomasse-Konzentration im steady state $\bar{x} = BC \cdot Y_H$. Y_H bezeichnet die Menge Biomasse, bei deren Neubildung 1 mMol H^+ -Ionen ausgeschieden werden. Setzt man diesen für den pH-Auxostaten spezifischen Ausdruck für $\bar{x}$ in (2) ein, dann ist

$$Y_{Le} = \frac{D \cdot BC \cdot Y_H}{s_{RL}' \cdot D'} \quad (3)$$

Dementsprechend können bei vorgegebenen Werten von $s_{RL}' \cdot D'$ und BC aus einer Population von Zellen diejenigen eine höhere spezifische Wachstumsrate und Verdünnungsrate D erreichen, die einen kleineren Y_H -Wert und/oder einen höheren Y_{Le} -Wert aufweisen und besitzen damit einen direkt wirksamen Selektionsvorteil.

Die H^+ -Freisetzung wachsender Zellen setzt sich zusammen aus den im Zusammenhang mit der bei einer NH_4^+ -Aufnahme frei werdenden H^+ -Ionen (5-6 mMol H^+ pro Gramm Hefetrockensubstanz bei NH_4^+ als einziger N-Quelle), einem wesentlich kleineren Anteil aus dem H^+/K^+ -Austausch sowie H^+ -Ionen aus organischen Säuren, die bei dem Statier-pH-Wert der Kultur in dissoziierter Form vorliegen.

Bei C-Limitation und NH_4^+ als einziger N-Quelle variiert Y_H bei Hefen vorwiegend mit dem Stickstoffgehalt der Trocken-

substanz. Bei hohem C-Angebot und Wachstumslimitation durch mindestens eine andere Komponente der Nährlösung können z.B. organische Säuren in größerer Menge ausgeschieden werden. Wenn diese im Kulturmedium dissoziieren, bewirkt die Säureausscheidung einen verringerten Y_H -Wert und damit einen Selektionsvorteil für den Stamm mit der höchsten Säureausscheidungsgeschwindigkeit. Damit kann dieses Kultivierungsverfahren zur Autoselektion von Säureproduzenten und zur Stabilisierung einer säureproduzierenden kontinuierlichen Kultur dienen. Der gleiche Mechanismus bewirkt im pH-Auxostaten mit konstantem, limitierendem Zufluß einen Selektionsvorteil für alle die Produktbildungsprozesse, die mit einer Freisetzung von H^+ -Ionen im Kulturmedium verknüpft sind.

In anderen durch konstanten Zufluß limitierten Auxostaten entstehen Selektionsvorteile für Produktbildner je nach der wachstumsproportionalen Größe, die zur Regelung der Durchflußrate der Kultur benutzt wird.

Ausführungsbeispiele

Beispiel A

Selektion eines Hefestammes für die mikrobielle Eiweißproduktion

Zur Lösung der Aufgabe, aus einer Gruppe von aussichtsreich erscheinenden Hefestämmen den Stamm (oder die stabile Mischpopulation) aufzufinden, der unter bestimmten (technisch-technologisch wünschenswerten) Kultivierungsbedingungen die höchste Raum-Zeit-Ausbeute an rohproteinreicher Biomasse bei möglichst effektiver Nutzung der C-Quelle und des Sauerstoffs erreicht, verfährt man wie folgt:

Für die Lösung der Aufgabe wird ein pH-Auxostat eingesetzt, bei dem die C-Quelle mit konstanter Geschwindigkeit zufließt. Ist NH_4^+ die einzige N-Quelle, dann ist Y_H vorwiegend durch die NH_4^+ -Aufnahme pro Gramm TG bestimmt,

wobei der Selektionsvorteil bei kleinem Y_H , d.h. hohem Rohproteingehalt der Biomasse auftritt.

Die Zugabegeschwindigkeit der C-Quelle wird entsprechend der Bedingung

$$D' \cdot s_{RL}' = \mu_{\max} \cdot BC \cdot Y_H/Y_{Le}$$

festgelegt, wobei $\mu_{\max}$ die maximale spezifische Wachstumsrate ohne C-Limitation bei den gewählten Kultivierungsbedingungen ist. BC wird ausgehend von der Produktivität des Fermentors (O_2 -Eintragsleistung) so gewählt, daß im Fermentor ein dem technischen Verfahren entsprechender Sauerstoffpartialdruck erwartet oder mittels pO_2 -Statierung eingestellt werden kann.

Mit pO_2 -Statierung verbleiben nach ausreichend langer kontinuierlicher Kultivierung (Dauer siehe Diagramme nach Petschurkin u. Terskov, 1973) die Zellen im Fermentor, die bei den vorgegebenen Bedingungen den maximalen Wert für D

$$D = \frac{s_{RL}' \cdot D' \cdot Y_{Ce}}{BC \cdot Y_H} \quad (3a)$$

erreichen. Das sind diejenigen Zellen, die je Menge zugeführter C-Quelle die höchste Raum-Zeit-Ausbeute an Biomasse mit dem kleinsten Y_H -Wert, d. h. bei hoher H^+ -Freisetzung und NH_4^+ -Aufnahme liefern.

Wird der pO_2 -Wert nicht statiert, so sinkt er bei ausreichend hoher Biomassekonzentration auf einen Wert ab, der ebenfalls limitierend auf die spezifische Wachstumsrate wirkt. Es entsteht eine Doppellimitation und ein zusätzlicher Selektionsvorteil für die Zellen, die bei der herrschenden C-Limitation bei dem kleinsten sich einstellenden pO_2 -Wert die höchste spezifische Wachstumsrate aufweisen. Es wird daher für die oben genannte Aufgabe vorzugsweise unter O_2 -Limitation ohne pO_2 -Statierung selektioniert.

Beispiel B

Produktion einer organischen Säure in kontinuierlicher Kultur

In Vorversuchen, z.B. mit Hilfe des erfindungsgemäßen Kultivierungsverfahrens, werden das oder die limitierenden Substrate und der günstigste Stamm für eine gewünschte Säureproduktion mit Hilfe wachsender Zellen in sonst üblicher Weise ermittelt. Als limitierendes, mit konstanter Geschwindigkeit zufließendes Substrat wird vorzugsweise nicht die C-Quelle, sondern beispielsweise die N-Quelle, eventuell in Kombination mit beispielsweise K^+ oder Phosphat gewählt. Die Kultivierungsbedingungen können nach einem für kontinuierliche Kulturen üblichen Verfahren optimiert werden.

Dabei sind, soweit möglich, solche Kultivierungsbedingungen zu wählen, die auch im technischen Prozeß eingehalten werden können.

Es besteht dann die Aufgabe, den technischen Prozeß unter diesen Bedingungen nach dem Regelungsprinzip des pH-Auxostaten mit konstantem, das Wachstum limitierendem Zufluß der ausgewählten Komponenten durchzuführen und auf diese Weise die vorn beschriebene Selektionswirkung zugunsten der effektivsten Produktbildner zu reproduzieren.

Zur Lösung der Aufgabe, für die Produktion einer organischen Säure in einem kontinuierlichen Verfahren solche Bedingungen aufzufinden, unter denen der Produktionsstamm einen Selektionsvorteil gegenüber ähnlichen Stämmen mit geringerer Säureproduktionsleistung besitzt und unter denen nur solche Mutanten, Revertanten oder andere vom ursprünglichen Produktionsstamm abweichenden Formen den Produktionsstamm aus der Kultur verdrängen können, die eine höhere Säureproduktionsleistung als dieser aufweisen, wird vorzugsweise ein pH-Auxostat mit konstantem Zufluß der ausgewählten limitierenden Komponenten des Nährmediums verwendet.

Erfindungsanspruch

Verfahren zur substratlimitierenden Steuerung kontinuierlicher Kulturen vom Turbidostat-Typ für biotechnische Stoffwandlungsprozesse mit Hilfe wachsender Zellen und für die Modellierung industrieller Prozeßführungen bei der Verfahrensentwicklung, durch das in der kontinuierlichen Kultur Selektionsbedingungen entstehen, unter denen diejenigen Zellen in der Kultur einen Selektionsvorteil haben, die einem komplexen Optimalitätskriterium für die industrielle Nutzung, vorzugsweise zur Biomasseproduktion und zur Produktbildung, am besten entsprechen, gekennzeichnet dadurch, daß in einer beliebigen Form einer nach dem Turbidostatprinzip geregelten kontinuierlichen Kultur mindestens eine der wachstumsessentiellen oder wachstumsfördernden Komponenten der üblichen Nährlösung, wie z.B. die C-Quelle oder ein Vitamin, nicht in der über die Regelung zufließenden Nährlösung enthalten ist, sondern getrennt von dieser der Kultur mit einer konstanten Geschwindigkeit zugeführt wird, wobei die Biomassekonzentration nach dem bekannten Prinzip für die jeweilige Form der Turbidostatkultur auf einen solchen Wert eingestellt wird, daß bei der zu erwartenden Verbrauchsgeschwindigkeit der gesondert zugeführten Komponenten eine praktisch vollständige Nutzung derselben und eine Senkung der spezifischen Wachstumsrate μ auf einen Wert unterhalb von $\mu_{\max}$ infolge eines relativen Mangels an der oder den gesondert zugeführten Komponenten der Nährlösung auftritt.