



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 269 861 A1

4(51) C 12 M 1/34

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 M / 311 897 1

(22) 31.12.87

(44) 12.07.89

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Patentabteilung, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
 (72) Große, Hans-Helmut, Dr. rer. nat.; Hilliger, Matthias, Dr. rer. nat.; Bormann, Ernst-Joachim, Dr. sc. nat., DD

(54) Vorrichtung zur Regelung des Sauerstoff-Partialdruckes in Fermentoren

(55) Fermentor, O₂-Limitation, pO₂-Regelung, O₂-Eintrag, O₂-Aufnahmeregulation, pH-Sollwertführung, Überträgercharakteristik, Drehzahlverstellung

(57) Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Regelung des pO₂-Werts in biologischen Fermentationsprozessen, insbesondere mit dem Ziel der Vermeidung unphysiologischer pO₂-Werte (pO₂-Limitation) in der Kulturlösung. Es liegt ihr die Aufgabe zugrunde, die pO₂-Regelung durch interne Anpassung der O₂-Aufnahme einer biologischen Kultur an den gegebenen O₂-Eintrag des Fermentors so durchzuführen, daß die Tolerierung von Substratüberschüssen bzw. die Einsparung von energieeintragssteigernden technischen Maßnahmen gewährleistet wird. Erfindungsgemäß wird dies dadurch erreicht, daß ein Koppler, bestehend aus pO₂-pH-Übertrager, Erfassungseinheit $\Delta pO_2/\Delta t$, pH-Festsollwertgeber und Drehzahlverstellung, das Zusammenwirken von pO₂-Regler und pH-Regler bzw. von pO₂-Regler und Drehzahl-Regler insbesondere gemäß einer direkten oder invertierenden Überträgercharakteristik und der Stellgliedansteuerungen (Laugepumpe, Säurepumpe, Rührermotor) übernimmt. Dabei verursacht die biologische Kultur durch das im Koppler vorliegende automatische Selbstkopplungsprinzip der Zustandsgrößen pO₂-Wert und pH-Wert der Kulturlösung die Verschiebung des pH-Werts entsprechend des aktuellen pO₂-Werts und bewirkt somit die Herstellung der O₂-Balance durch die eigenverursachte Änderung des pH-Milieus.

Patentansprüche:

1. Vorrichtung zur Regelung des Sauerstoff-Partialdruckes in Fermentoren, **gekennzeichnet** durch die hierarchische Zusammenfassung von pO_2 -Regler (11), pH-Regler (6) und Drehzahl-Regler (4) durch den aus Übertrager (15), Erfassungseinheit $\Delta pO_2/\Delta t$ (16), pH-Festsollwertgeber (18) und Drehzahleinstellung (17) bestehenden übergeordneten Koppler (1), der als Stellmaßnahmen der pO_2 -Regelung die Verschiebung des pH-Werts der Kulturlösung (14) und die Drehzahlabsenkung nach Übergang in die pO_2 -unabhängige pH-Festsollwertregelung realisiert, wobei der pH-Regler (6) und der Drehzahl-Regler (4) einen elektronischen Eingang für die Auslösung der Betriebsart externe Sollwertvorgabe besitzen und bei Unterschreitung des vorgewählten pO_2 -Grenzwerts die Verschiebung des pH-Werts der Kulturlösung mittels externer Sollwertvorgabe für den pH-Regler (6) entsprechend der Charakteristik des Übertragers (15) erfolgt.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, **gekennzeichnet** durch die Realisierung des pH-Profiles durch den mit pO_2 -abhängiger Sollwertvorgabe arbeitenden pH-Regler (4) über die Korrekturmittel-Stellglieder Säurepumpe (8) und/oder Laugepumpe (9).
3. Vorrichtung nach Anspruch 1, **gekennzeichnet** durch die Erweiterung des Kopplers (1) durch die Einheiten Druckverstellung und/oder Zuluft-Volumenstrom-Verstellung.
4. Vorrichtung nach Anspruch 1, **gekennzeichnet** durch einen Übertrager (15) mit direkter oder invertierender Charakteristik.
5. Vorrichtung nach Anspruch 1, 2, 3 und 4, **gekennzeichnet** durch die Realisierung des Kopplers (1) und der Regler mittels Prozeßinterface (3) und Rechner (2).

Hierzu 4 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Regelung des Sauerstoff-Partialdruckes (pO_2 -Wert) in Fermentoren bei aeroben Kultivierungen von Mikroorganismen, Zellen usw. Da die O_2 -Versorgung essentielle Bedeutung für das Verhalten natürlich vorkommender bzw. selektierter oder genetisch manipulierter biotechnologisch eingesetzter Mikroorganismen hat, liegt das Anwendungsgebiet der Erfindung in der biotechnologischen Industrie bzw. in der technischen Mikrobiologie.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die physiologisch angemessene Versorgung aerob fermentierter biologischer Kulturen mit dem Substrat O_2 ist Voraussetzung für die effektive Umsetzung anderer essentieller Substrate (C-, N-, P-Quellen, Spurenelemente) in aktive Biomasse (Review: BUCKLAND, B. C.: The translation of scale in fermentation processes: The impact of computer process control, BIO/TECHNOLOGY, 1984, Heft 10).

O_2 -Limitationsfreiheit im Sinne einer nicht prozeßeinschränkenden O_2 -Versorgung liegt u. a. vor, solange der pO_2 -Wert der Kulturlösung den kritischen pO_2 -Wert des verwendeten Fermentationsorganismus nicht unterschreitet (MOSER, A.: Bioprozeßtechnik-Berechnungsgrundlagen der Reaktionstechnik biokatalytischer Prozesse, Springer-Verlag, Wien, 1981, 51-96).

Nach dem Stand der Technik werden folgende physikalisch-reaktortechnische Steuer- bzw. Stellgrößen einzeln oder kombiniert benutzt, um die pO_2 -Sollwertregelung oberhalb des kritischen pO_2 -Werts durchzuführen:

- Erhöhung der Umwälzungsgeschwindigkeit der Kulturlösung (z. B. Drehzahlerhöhung),
- Erhöhung des Zuluft-Volumenstroms bzw. Beimischung von reinem O_2 ,
- Temperaturniedrigung,
- Erhöhung des Fermentor-Innendrucks;
- Verdünnung der Kulturlösung mit sterilem Wasser.

Zu den substanzseitigen Steuer- bzw. Stellgrößen gehören

- die Zugabe von O_2 -reichen chemischen Verbindungen,
- die limitierte Zudosierung externer Substrate,
- die Menge des frischen Austauschmediums in Abstimmung mit der Zyklusdauer bei zyklischen Fermentationen.

Die Realisierung dieser physikalisch-reaktortechnischen Maßnahmen zur Ermöglichung der effektiven Umsetzung von deponierten Substraten beinhaltet als Nachteile

- den erhöhten Bedarf an elektrischer Leistung bzw. von Kühlwasser,
- den Bedarf an peripherer (kontaminationssicherer) Geräte- und Stelltechnik oder im Extremfall
- eine aufwendige konstruktive Umgestaltung der Fermentoren mit einem ausreichenden Variabilitätsbereich der für den O_2 -Eintrag wichtigen Reaktorbetriebsparameter.

Bezüglich der substanzreichen Steuer- bzw. Stellgrößen sind die wechselnde Chargenqualität industrieller Substrate, der extensive Aufwand zur Realisierung reproduzierbarer Substratdosierungsstrategien usw. nachteilig.

Als Instrumentierung von Fermentoren sind Meß- und Regelvorrichtungen für die Zustandsgrößen Temperatur, pH-Wert, pO_2 -Wert, Schaum, Druck usw. in Verbindung mit den Stellgliedern für die Rührerdrehzahl (Motor), den Förderstrom im Außenkreislauf (Pumpe), den Zuluft-Volumenstrom (Kompressor), den O_2 -Anteil der Zuluft (Mischer), Korrekturmittel (Pumpen für Säure, Lauge, Entschäumer) Stand der Technik (PRAEVE, P. und Mitautoren: Handbuch der Biotechnologie, Oldenbourg-Verlag München/Wien, 1984, 173-212).

Bisher sind über die Anwendung spezieller Fermentations-Prozeßtypen hinaus nur Vorrichtungen zur Regelung des pO_2 -Wertes bekannt, die die Verbesserung des O_2 -Eintrages von Fermentoren kausal durch die energieaufwendige Extensivierung physikalisch-technischer Maßnahmen erzwingen (US-Patent 4468155). Dabei geht die Entwicklung bis zur Abarbeitung kaskadenartig gestaffelter Parametererhöhungen als gewichtige Stellmaßnahmen der pO_2 Sollwertregelung.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung beinhaltet das Ziel, während aerober Fermentationen u. a. mit hohen Biomassen in den Fermentoren eine Regelung des Sauerstoff-Partialdruckes zu realisieren.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung zur Regelung des Sauerstoff-Partialdruckes in Fermentoren anzugeben, die die Tolerierung von relativen Überschüssen anderer Substrate bzw. die Absenkung der Werte physikalisch-technischer Fermentor-Betriebsparameter und damit Energie- und Kosteneinsparungen ohne Eintreten einer O_2 -Limitation erlaubt.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe dadurch gelöst, daß die nach an sich bekannten Prinzipien arbeitenden pO_2 -Regler 11, pH-Regler 6 und Drehzahlregler 4 (anstelle dessen auch Zuluft-Regler oder Druck-Regler) durch einen übergeordneten Koppler 1 erweitert und hierarchisch zugeordnet werden. Der pH-Regler 6 und der Drehzahlregler 4 besitzen über die üblichen Ein- und Ausgänge hinaus einen zusätzlichen elektronischen Eingang für den Start der Betriebsart externe Sollwertvorgabe. Der pH-Regler 6 und der Drehzahl-Regler 4 steuern die Säurepumpe 8, die Laugenpumpe 9 bzw. den Rührerantriebsmotor 12 des Fermentors 13, der die Kulturlösung 14 enthält.

Der Koppler 1 umfaßt den Übertrager 15, die Erfassungseinheit $\Delta pO_2/\Delta t$ 16, die Drehzahleinstellung 17 und den pH-Festsollwertgeber 18 als funktionelle Elemente. Der Übertrager 15 realisiert die pH-Sollwertführung in Ableitung vom pO_2 -Wert entsprechend der direkten oder invertierenden Charakteristik (Figur 3a und 3b). Die Funktion der Vorrichtung ist dadurch charakterisiert, daß der Übertrager 15 dem aktuell in der Kulturlösung gemessenen pO_2 -Wert nach Absinken desselben unter den am pO_2 -Regler 11 vorgewählten Schwellwert S 1 einen aktuellen pH-Sollwert zuordnet und diesen dem pH-Regler 6 in Form des elektrischen Eingangssignals in der Betriebsart externe Sollwertvorgabe vorschreibt. Der pH-Regler 6 steuert in an sich bekannter Weise die Korrekturmittel-Stellglieder Laugenpumpe 9 und Säurepumpe 8 und bewirkt die Anpassung des aktuellen pH-Wertes der Kulturlösung 14 im Fermentor 13 an den vom pO_2 -Wert und die Übertragungscharakteristik vorgegebenen aktuellen pH-Sollwert. Somit verursacht der Abfall des pO_2 -Wertes unterhalb des Schwellwertes S 1 infolge wachstumsbedingter Zunahme des O_2 -Verbrauches der biologischen Kultur eine dieselbe verminderte definierte Absenkung bzw. Anhebung des pH-Wertes der Kulturlösung 14 (Selbstkopplung) im Anschluß an die Phase des pH-Freilaufs, die durch pO_2 -Werte größer als S 1 gekennzeichnet ist. Auf die beschriebene Weise verursacht der Koppler 1 mittels kulturspezifische selbstgekoppelter pH-Verschiebung ohne Erhöhung der Rührerdrehzahl, des Zuluft-Volumenstroms oder des Fermentorendruckes, daß der pO_2 -Wert das stationäre Minimum als Ausdruck der mit dem erreichten pH-Wert verbundenen Balance zwischen festem O_2 -Eintrag des Fermentors und O_2 -Verbrauch der wachsenden Kultur annimmt. Die Übertragungscharakteristik wird so vorgegeben, daß das pO_2 -Minimum größer als der kulturspezifische kritische pO_2 -Wert ist.

Die Vorrichtung kann in einer anderen Variante der Erfindung auch so ausgeführt werden, daß anstelle der Regler 11, 6 und 4 die zugehörigen Meßverstärker (pO_2 -Meßverstärker 10, pH-Meßverstärker 7 und Drehzahlmeßverstärker 5) mit einem übergeordneten Prozeßinterface 3 sowie einem Rechner 2 verbunden werden.

Überraschenderweise wird die Aktivität der Biomasse durch die eigenverursachte Verschlechterung ihrer O_2 -Aufnahme nicht negativ, wie z. B. in Form des Wachstumsstops, beeinflusst. Die Stationarität des Wachstums tritt erst mit der Limitation anderer Substrate ein.

Die Erfassungseinheit $\Delta pO_2/\Delta t$ gibt nach Erreichen des Wertes $\Delta pO_2/\Delta t = 0$ die in der Koppler-Untereinheit pH-Festsollwertgeber 18 vorgewählte und gespeicherte pH-Schwelle frei. Die pH-Schwelle wird als fester Sollwert der weiteren pH-Regelung aktiviert, wenn der pO_2 -abhängige aktuelle pH-Wert durch den Übertrager 15 infolge pO_2 -Anstiegs dieselbe oder das zusammen mit ihr vorgewählte Toleranzintervall erreicht. Damit endet die Funktion des Übertragers 15.

Mit der Aktivierung des festen pH-Sollwertes wird die Betriebsart externe Sollwertvorgabe des Drehzahl-Reglers 4 (bzw. des Zuluft- oder Druckreglers) gestartet und die Koppler-Untereinheit Drehzahleinstellung 17 übernimmt die Sollwertvorgabe, beginnend mit der bislang schon realisierten Drehzahl und endend bei der Minimaldrehzahl, die der pO_2 -Sollwertregelung an der vorgewählten Schwelle S 2 des pO_2 -Reglers 11 entspricht. Somit steht die Drehzahlerhöhung (bzw. die Vergrößerung des Zuluft-Volumenstroms oder die Druckerhöhung) als Absicherungsmaßnahme auch in der Phase der pO_2 -Regelung über die pH-Verschiebung zur Verfügung. Grundsätzlich hat jedoch die regulativ begründete Sollwertregelung über die pH-Wert-Verschiebung den Vorrang vor der Verbesserung des O_2 -Eintrages des Fermentors 13 durch Intensivierung der Durchmischung usw.

Die erfinderische Lösung hat folgende Vorteile:

Durch die Entwicklung der vorliegenden Vorrichtung ist die Ablösung technisch-apparativer Regelungen unter Benutzung mehrerer Stellgrößen (Kaskadenregelung) zur Vermeidung der O_2 -Limitation gegeben. Damit ist bei vorhandener Fermentorkonfiguration und üblicher Peripherie die Durchführung von Hochleistungsfermentationen ohne weitere Kosten für Energie, Kühlwasser usw. gewährleistet. Als zusätzlicher Vorteil wird gesehen, daß die Potenz zur Einbeziehung weiterer Maßnahmen zur pO_2 -Sollwertregelung voll erhalten bleibt.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung soll durch folgende Ausführungsbeispiele anhand von Zeichnungen erläutert werden.
Es zeigen:

- Fig. 1: den Gesamtaufbau der Vorrichtung
Fig. 2: den Aufbau des Kopplers
Fig. 3a: die Charakteristik des direkten Übertragers
Fig. 3b: die Charakteristik des invertierenden Übertragers.

Beispiel 1:

Gemäß Figur 1 besteht die Vorrichtung aus dem Koppler 1, der die Instrumentierung des Fermentors 13 bezüglich pO_2 -Regler 11, pH-Regler 6 und Drehzahl-Regler 4 verknüpft bzw. hierarchisch ordnet. Die jeweiligen Regler sind dem pO_2 -Meßverstärker 10, dem pH-Meßverstärker 7 und dem Drehzahl-Meßverstärker 5 nachgeordnet. Sie verarbeiten die elektronisch aufbereiteten Meßsignale, deren Pegel 0V bis 10V bzw. 0mA bis 20mA beträgt. Der pH-Regler 6 kontrolliert über diskrete oder kontinuierliche Ausgänge die Säurepumpe 8 und die Laugenpumpe 9 zur Einstellung des pH-Wertes der Kulturlösung 14. Der Drehzahlregler 4 schreibt dem Rührer-Antriebsmotor 12 die Drehzahl vor. Der Koppler 1 besteht gemäß Figur 2 aus dem Übertrager 15, der Erfassungseinheit $\Delta pO_2/\Delta t$ 16, der Drehzahleinstellung 17 und dem pH-Festsollwertgeber 18. Dabei hat der Übertrager 15 entsprechend Figur 3a und 3b entweder eine direkte oder eine invertierende Charakteristik.

Die Erfassungseinheit $\Delta pO_2/\Delta t$ 16 ist als Differenzierer mit Grenzwertmeldung bei variabel wählbarem Grenzwert für $(\Delta pO_2/\Delta t)$ aufgebaut. Die Triggerung des pH-Festsollwertgebers 18 erfolgt durch einen Komparator mit variabler Hysterese. Der Bereich für den einzustellenden festen pH-Sollwert liegt zwischen $pH = 4,0$ und $pH = 8,0$; die Hysterese beträgt maximal $\Delta pH = 0,8$. Die Drehzahleinstellung 17 ist als motorgekoppeltes Potentiometer ausgeführt, wobei dessen Motor vom pO_2 -Regler 11 angesteuert wird und der Spannungswert des Potentiometers dem Drehzahl-Regler 4 den externen Sollwert vorgibt.

Die direkte Charakteristik des Übertragers 15 entsteht im einfachsten Fall durch Zuleitung des Ausgangssignals des pO_2 -Meßverstärkers 10 zum Eingang für die externe Sollwertvorgabe des pH-Reglers 6. Dabei ist der Eingang für den Pegel 0V bis 10V bzw. 0mA bis 20mA ausgelegt. Als Modifikation dieser direkten Einspeisung des pO_2 -Signals zur Vorgabe des pH-Sollwerts tritt die Addition oder Subtraktion einer konstanten oder variablen Spannung bzw. eines konstanten oder variablen Stroms zum bzw. vom Ausgangssignal des pO_2 -Meßverstärkers 10 hinzu. Die Variation des addierten oder subtrahierten Pegels im Bereich 0V bis 5V bzw. 0mA bis 10mA entspricht der vorgewählten Variationsbreite des pO_2 -Wert für die pH-Wert-Änderung.

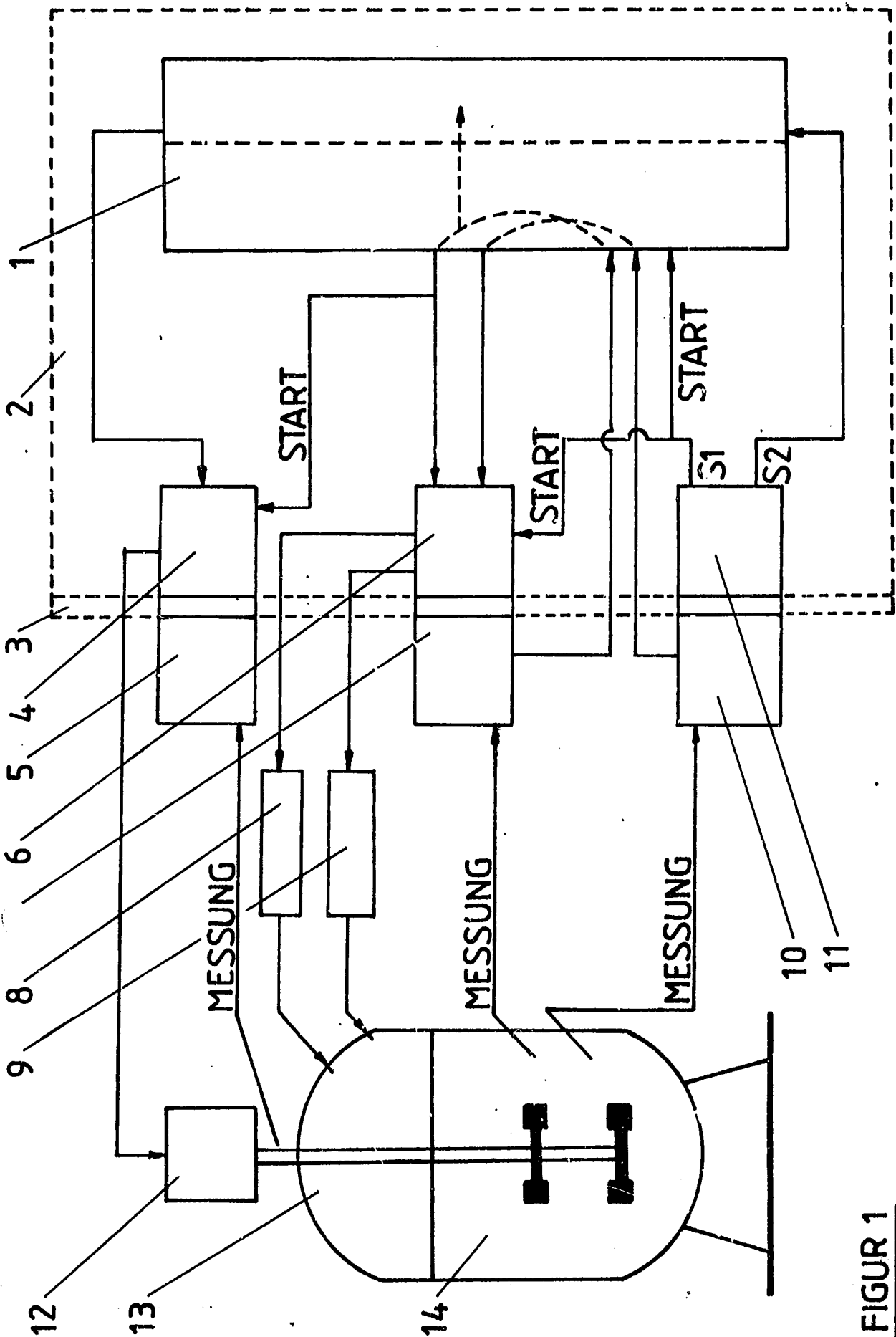
Alternativ zur direkten Charakteristik wird die invertierende Charakteristik des Übertragers 15 durch einen mit wählbarer Verstärkung arbeitenden Inverter für das Ausgangssignal des pO_2 -Meßverstärkers 10 erzeugt. Im bevorzugten Fall erfolgt die Inversion mittels Subtrahierer, indem das Eingangssignal der externen Sollwertvorgabe des pH-Reglers 6 durch Subtraktion des aktuellen Ausgangssignals des pO_2 -Meßverstärkers 10 vom Maximalpegel 10V bzw. 20mA gebildet wird.

Der funktionelle Ablauf der Vorrichtung beginnt, wenn der pO_2 -Wert der Kulturlösung 14 die am pO_2 -Regler 11 vorgewählte Schwelle S1 unterschreitet. Vorher befindet sich die Fermentation im pH-Freilauf. Das Ausgangssignal des pO_2 -Reglers 11 zur Meldung der Grenzwertunterschreitung pO_2 -Wert S1 startet mittels Relaisumschaltung den Übertrager 15, der entsprechend seiner beiden Charakteristika die pO_2 -abhängige Einstellung des pH-Wertes der Kulturlösung 14 durch Vorgabe des pH-Sollwerts in Abhängigkeit vom anfallenden pO_2 -Signal bewirkt. Gleichlaufend ermittelt die Erfassungseinheit $\Delta pO_2/\Delta t$ 16 die Änderung des pO_2 -Werts und startet nach Erreichen der Stationarität (pO_2 -Minimum) des pH-Festsollwertgebers 18, womit dessen vorgewählte pH-Schwelle sowie deren Toleranzintervall freigegeben werden. Der pH-Festsollwertgeber 18 stoppt die Funktion des Übertragers 15, wenn der pH-Wert der Kulturlösung 14 dessen vorgewählte pH-Schwelle bzw. das mit ihr vorgegebene Toleranzintervall erreicht.

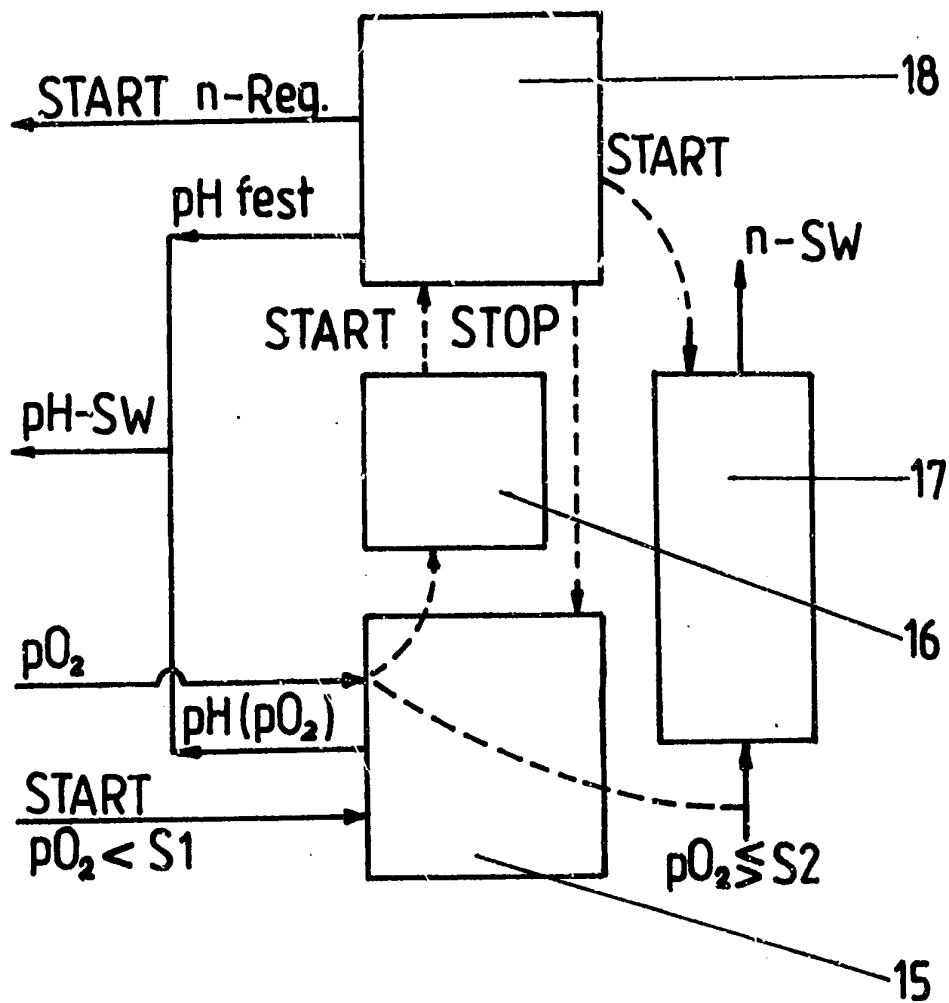
Gleichzeitig startet er die Drehzahlregelung im Zusammenwirken zwischen pO_2 -Regler 11 (an der Schwelle S2) und der Drehzahleinstellung 17. Dabei ergibt sich eine im Vergleich zur Startdrehzahl erniedrigte Drehzahl, die der Führung der Fermentation bei $pO_2 = S2$ entspricht. Wird der Wert $pO_2 = S2$ während der pO_2 -Regelung durch pH-Verstellung erreicht, erfolgt analog dazu die Drehzahlerhöhung als Absicherungsmaßnahme bei unveränderter Priorität der Stellmaßnahme pH-Verschiebung durch den Übertrager 15.

Beispiel 2:

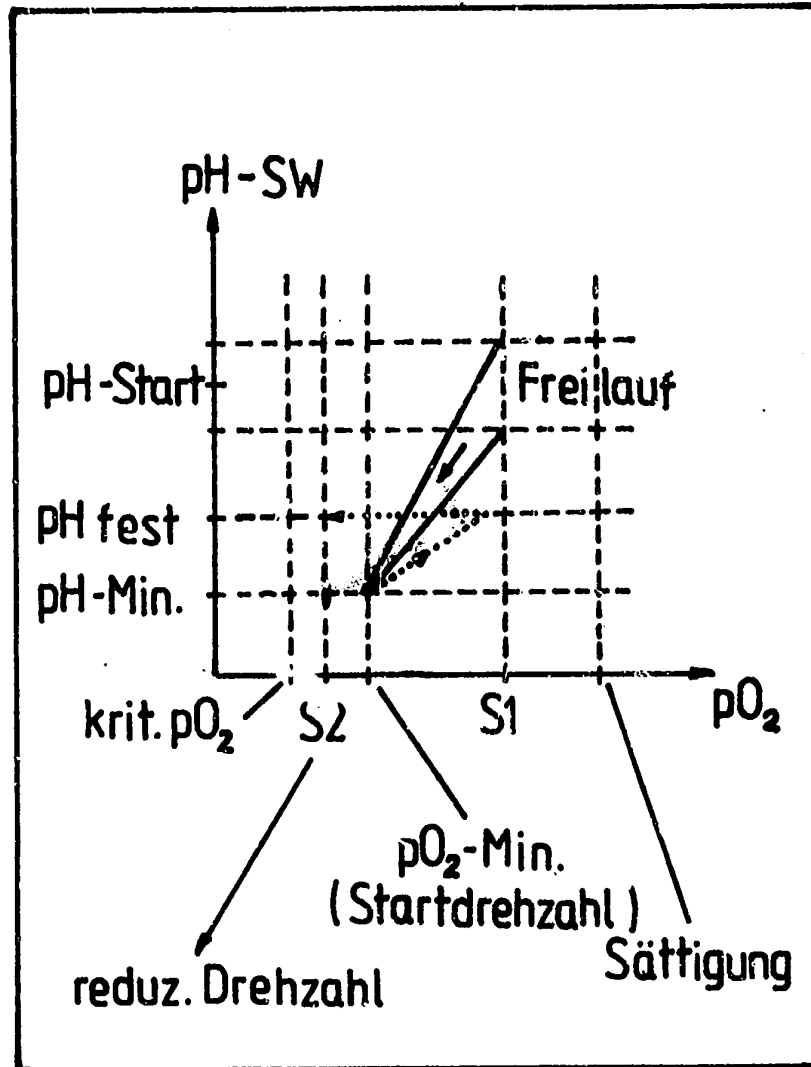
Gemäß Figur 1 gehen die Signale des pO_2 -Meßverstärkers 10, pH-Meßverstärkers 7 und Drehzahl-Meßverstärkers 5 über das serielle Prozeßinterface 3 zum Rechner 2, der die hierarchische Verknüpfung der Regler (pO_2 -Regler 11, pH-Regler 6 und Drehzahl-Regler 4) enthält sowie deren Funktion realisiert und die Stellglieder Säurepumpe 8, Laugenpumpe 9 und Rührer-Antriebsmotor 12 aktiviert.



FIGUR 1

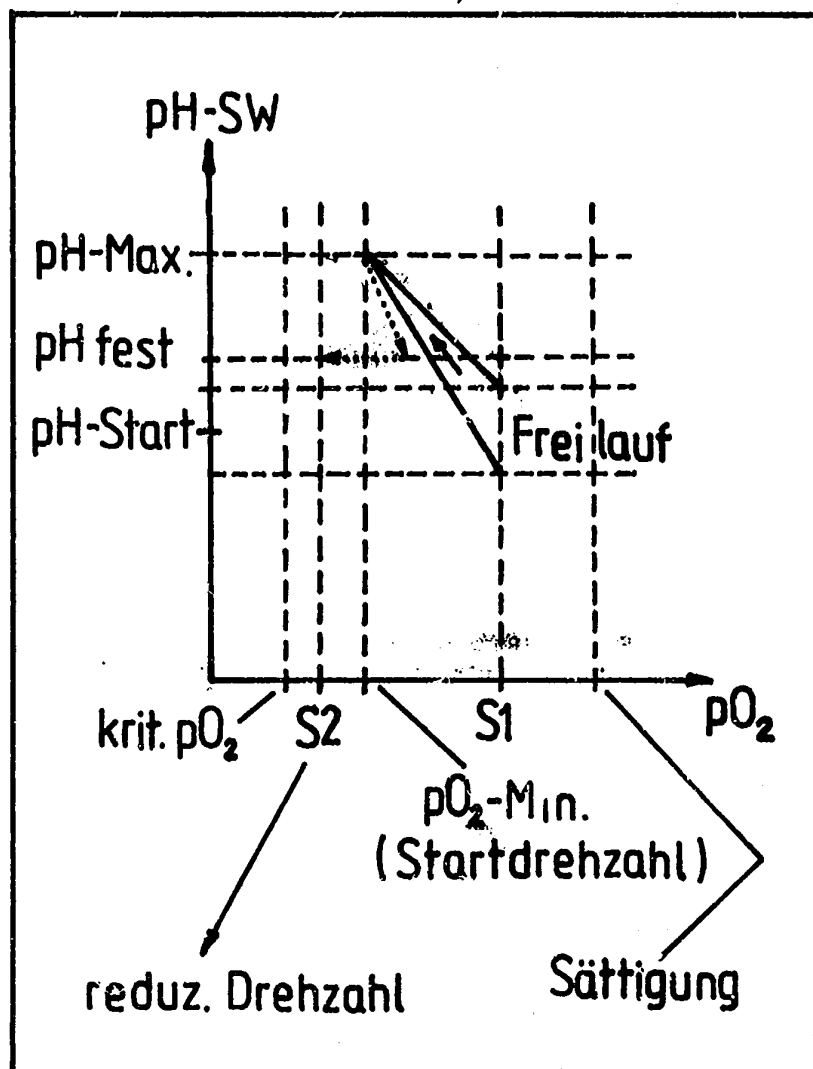


FIGUR 2



Direkte Charakteristik des Übertragers 15

FIGUR 3a



Invertierende Charakteristik des Übertragers 15

FIGUR 3b