



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 255 542 A1

4(51) C 12 N 1/32

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 295 725 1

(22) 30.10.86

(44) 06.04.88

(71) VEB Chemieanlagenbaukombinat Leipzig – Grimma, PSF 674, Leipzig, 7010, DD

(72) Scheibe, Peter, Dipl.-Chem.; Findeisen, Eberhart, Dipl.-Phys.; Jesche, Gerhard; Peters, Horst; Voigt, Alexander, DD

(54) Verfahren zur Herstellung nucleinsäurereicher Biomasse

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung nucleinsäurereicher Biomasse aus Bakterien mit Cytochromen in der Atmungskette, insbesondere aus methylotrophen Bakterien mit dem Substrat Methanol. Die Erfindung verfolgt das Ziel, durch spezielle Verfahrensschritte bzw. eine Kontroll- und Steuerungsstrategie eine weitgehende Annäherung der Verdünnungsrate an die maximale Wachstumsrate zu erreichen, den Nucleinsäuregehalt der Biomasse zu erhöhen und die Prozeßstabilität zu sichern. Die erfindungsgemäße Lösung wird durch unterschiedliche Gestaltung von diskontinuierlicher Anzucht und kontinuierlicher Fermentation mittels unterschiedlicher Kontroll- und Reglungsbedingungen erreicht, wobei der Substratzufluß durch Nutzung eines analogen Signals C_{Red} eines Cytochrom C-Gerätes gesteuert wird, das den physiologischen Zustand der Mikroorganismenkultur abbildet. Gleichzeitig halten andere Regeleinrichtungen die Gelöstsauerstoff-, Stickstoff- und Phosphorkonzentration in vorgegebenen Sollwertbereichen konstant. Für diskontinuierliche Anzucht und kontinuierliche Biomasseproduktion werden unterschiedliche C_{Red} -Werte eingestellt. Damit werden höhere Produktivitäten bei niedrigem Substratbedarf und wachsendem Nucleinsäuregehalt erreicht.

Erfindungsanspruch:

Verfahren zur Herstellung nucleinsäurereicher Biomasse aus methylophilen Bakterien, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Kultur diskontinuierlich bei einem C_{Red} -Wert, der den physiologischen Zustand des Cytochrom C der Mikroorganismen abbildet, von 15–20% angezüchtet und kontinuierlich nahe bzw. bei der maximalen spezifischen Wachstumsrate fermentiert wird, wobei der Substratzufluß über das Meßsignal C_{Red} zwischen 20 und 60%, vorzugsweise 20 bis 40% gesteuert wird und gleichzeitig über andere Regeleinrichtungen eine konstante Regelung der Gelöstsauerstoffkonzentration im Bereich von 1–5 ppm, vorzugsweise von 1–3 ppm, der Phosphorkonzentration zwischen 20 und 250 mg/l, vorzugsweise zwischen 30 und 150 mg/l, und der Stickstoffkonzentration im Bereich von 50 bis 300 mg/l, vorzugsweise von 80 bis 150 mg/l, erfolgt, dabei nur ein Teil des Stickstoffbedarfs über die pH-Regelung abgedeckt wird und eine zweite Stickstoffquelle durch Zugabe von anorganischen und/oder organischen Stickstoffverbindungen der Regelung des Stickstoffbedarfs dient.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung nucleinsäurereicher Biomasse aus Bakterien, die Cytochrome in der Atmungskette besitzen, insbesondere aus Methylophilen Bakterien. Die anfallende Biomasse kann für biochemische Zwecke, für die Gewinnung von Pharmavorprodukten und Geschmacksverstärkern eingesetzt werden. Die Erfindung ist in die IPK C 12 N, 1/32 einzuordnen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Über die Verdünnungsrate läßt sich bei einer kontinuierlichen Kultur die spezifische Wachstumsrate zwischen Werten nahe max und Null beliebig einstellen. Unter normalen Fermentationsbedingungen wird aus Gründen der Stabilitätssicherung ein Kultivierungsprozeß jedoch mit einer Sicherheitsreserve hinsichtlich max betrieben. So wird z. B. für die Kultur MB 58 (IMET B 346) ein μ_{max} von $0,17-0,18 h^{-1}$ angegeben (DD-WP 141 529), während die Kultur im technischen Maßstab bei Verdünnungsraten von $D = 0,125-0,143 h^{-1}$ betrieben wird.

In der Patentliteratur werden eine ganze Reihe von Regelstrategien angegeben, um die Prozeßstabilität zu sichern. Für die Kohlenstoffsubstratkonzentration im Fermentationsmedium werden als Regelgröße schnell bestimmbar Milieufaktoren wie z. B. der pH-Wert, die Gelöstsauerstoff-Konzentration oder die Sauerstoffkonzentration im Abgas des Fermentationsmediums angegeben (DE-OS 1953430, DE-AS 2217909, DE-OS 2457044, DE-OS 2546236).

Der Nachteil dieser vorgeschlagenen Lösungen besteht darin, daß die Mikroorganismenkultur durch inhibierend wirkende Kohlenstoffsubstratkonzentrationen in ihrer Leistungsfähigkeit beeinträchtigt werden kann, da keine physiologischen Zustandsgrößen der Zelle erfaßt werden. Die Erfassung solcher Zustandsgrößen ist möglich durch die Anwendung verschiedener spektroskopischer Methoden wie Fluoreszenz- und Luminenzsensanalyse nach erfolgter Adsorption geeigneter Stoffe an die Zelloberfläche (GB-PS 521 16712) oder der spektrophotometrischen Erfassung des Enzyms der Atmungskette Cytochrom C (GB-PS 1284500, DD-WP 154449). Damit ließen sich jedoch bisher die Stabilitätsgrößen der Fermentation nicht entscheidend verbessern. Es ist auch bekannt, daß das Atmungsenzym Cytochrom C charakteristische Absorptionsbanden besitzt, aus deren Intensität und Lage Rückschlüsse auf den physiologischen Zustand von Mikroorganismenkulturen und deren Konzentration im Fermentationsmedium gezogen werden können. Diese Erkenntnisse erlauben es, ein Signal, das den Reduktionsgrad des Cytochrom C widerspiegelt, als Steuergröße zu verwenden (DD-WP 154449). Für methanogene Kulturen liegt dieser C_{Red} -Wert gerätespezifisch z. B. bei mehr als 60%, für den aktiven oder unkontrollierten Zustand der Atmung werden Werte von 6% angegeben (CHANCE in E. Hofmann: Enzyme und Bioenergetik Bd. II Berlin 1984).

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, eine Erhöhung des Nucleinsäuregehaltes der Biomasse und der Produktivität bei der Kultivierung von Mikroorganismen, insbesondere von methylophilen Bakterien auf Methanol als Substrat, zu erreichen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, bei der Kultivierung von Mikroorganismen, die das Enzym Cytochrom C in der Atmungskette besitzen, insbesondere von methylophilen Bakterien, durch spezielle Verfahrensschritte bzw. Steuerungen des Prozesses eine weitgehende Annäherung der Durchflußrate an die maximale spezifische Wachstumsrate der Kultur unter Sicherung der Prozeßstabilität zu erreichen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß die Kultur diskontinuierlich bei einem C_{Red} -Wert, der den physiologischen Zustand des Atmungszyklus Cytochrom C der Mikroorganismen widerspiegelt, von 15–20% angezüchtet und kontinuierlich nahe bzw. bei der maximalen spezifischen Wachstumsrate bei einem erhöhten C_{Red} -Wert von 20 bis 60%, vorzugsweise 20 bis 40%, fermentiert wird. Die Substratdosierung wird ebenfalls über das Cytochrom C Signal geregelt. Die Gelöst-Sauerstoff-, Stickstoff- und Phosphorkonzentration wird in vorgegebenen Konzentrationsbereichen konstant gehalten. Die Gelöst-Sauerstoff-Konzentration wird dabei im Konzentrationsbereich von 1 bis 5 ppm, vorzugsweise im Bereich von 1 bis

3 ppm, der Stickstoffgehalt im Bereich von 50 bis 300 mg/l, vorzugsweise von 80 bis 150 mg/l und der Phosphorgehalt zwischen 20 und 250 mg/l, vorzugsweise von 30 bis 150 mg/l geregelt.

Der Stickstoffeintrag erfolgt sowohl über die pH-Regelung (wäßrige Ammoniaklösung) als auch über eine Nährlösungsregelung mit anorganischen und/oder organischen Stoffverbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Harnstoff u. a.

Durch die erfindungsgemäße Verfahrensweise gelingt es, die Durchflußrate zu erhöhen, den Nucleinsäuregehalt der Biomasse an die obere Grenze der bekannten möglichen Variationsbreite zu verschieben und somit mehr Ausgangsprodukt für Prozesse der Nucleinsäureverwertung zur Verfügung zu stellen. Gleichzeitig wird damit die Stabilität der Fermentation gewährleistet und der Substratverbrauch beibehalten.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung wird nachstehend an einigen Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1

Die methylotrophe Bakterienkultur MB 58 (IMET B 346) wurde mit Methanol in einem 30l-Fermentor vom Typ LFS 130 im kontinuierlichen Prozeß bei folgenden Parametern kultiviert:

Temperatur 30–32°C

pH-Wert 4–5

Durchflußrate 0,125 h⁻¹

Gelöstsauerstoffkonz. 2–2,5 ppm

Stickstoffkonz. 50–300 mg N/l

Phosphorkonz. 20–150 mg P/l

Rest-Methanol-Konz. 0–0,5 g/l

Die Nährlösung wies die für die Kultur MB 58 übliche Zusammensetzung auf, eine 10%ige wäßrige Lösung von reinem Methanol wurde als Substratlösung eingesetzt.

Die pH-Regelung erfolgte mit 12%igem NH₄OH, hergestellt aus reinem NH₄OH. Über eine Summenregelung wurde die Gesamtdosiermenge konstant gehalten. Das Cytochrom C-Signal c_{Red} lag unter diesen Standardbedingungen bei 15–20%.

Unter diesen Prozeßbedingungen wurde eine Biomassekonzentration von 20 g/l gemessen, entsprechend einer Produktivität von $x = 2,5 \text{ g/l} \cdot \text{h}$ bei einem α_x^2 -Wert von 2,87 g Methanol/g BTS ($y_{x/s} = 50,348$) und einem Nucleinsäuregehalt von 7,8–9,0% der TS.

Die Prozeßbedingungen wurden erfindungsgemäß folgendermaßen geändert: Die Kultur wurde zunächst bei einem c_{Red} -Wert von 15–20% diskontinuierlich angezüchtet. Ein Teil des Stickstoffbedarfes wurde über die Regelstrecke der Nährlösungsdosierung (Anwendung der photometrischen Stickstoff-Bestimmung) durch anorganische und/oder organische Ammoniumsalze abgedeckt, der Rest über die pH-Regelstrecke. Die Gelöstsauerstoff-Konzentration wurde zwischen 2 und 3 ppm geregelt, eine Durchflußrate von 0,172 h⁻¹ und ein c_{Red} -Wert von 25–30% am Cytochrom C-Gerät zur Regelung der Substratdosierung eingestellt. Nach 24 Stunden hatte sich ein stabiles Fermentationsregime eingestellt, wobei die Biomassekonzentration 15,5 g/l, die Produktivität 2,65 g/l · h und der Substratverbrauchskoeffizient α_x^s einen Wert von 2,63 ($y_{x/s} = 0,380$) annahm. Der Nucleinsäuregehalt betrug 13,5 bis 15,5% der TS.

Beispiel 2

Bei ansonsten gleichen Bedingungen wie im Beispiel 1 wurde die kritische Durchflußrate entsprechend der maximalen spezifischen Wachstumsrate von 0,18 h⁻¹ eingestellt. Nach ca. 3 Verweilzeitperioden (18 h) stellt sich folgendes Regime ein:

Biomassekonzentration 15,25 g/l

Produktivität 2,7 g/l

Substratverbrauchskoeffizient 2,63

Der Nucleinsäuregehalt betrug 17% der Trockensubstanz.

Beispiel 3

Die Kultivierung der methylotrophen Kultur MB 58 erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben, bei konstanter Gelöstsauerstoff-Konzentration und Regelung von Stickstoff- und Phosphorkonzentration in der Fermentationsbrühe. Der c_{Red} -Wert des Reglers wurde auf 50% erhöht und nach 3 Verweilzeitperioden erfolgte erneut die Bestimmung von x , $\dot{x}$ und α_x^s bei einer Durchflußrate von 0,172 h⁻¹ mit folgenden Ergebnissen:

Biomassekonzentration 15,5 g/l

Produktivität 2,65 g/l · h

Substratverbrauchskoeffizient 2,95

Nucleinsäuregehalt 17,0%