



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 297 444 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 M 1/36

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 12 M / 342 606 6

(22) 09.07.90

(44) 09.01.92

(71) siehe (73)

(72) Steppan, Horst, Dipl.-Ing., DE

(73) JENAPHARM GmbH, Otto-Schott-Straße 15, PSF 1 50, O - 6900 Jena, DE

(54) Verfahren und Vorrichtung für eine Folgesteuerung bei aeroben Bioprozessen

(55) Messung; Sauerstoffverbrauch; Dosierung C-Substrat; N-Substrat; pH-Wert; Prozeßabluft; Fermenter 1; Sauerstoffanalysator 2; pO₂-Regler 3; Schaltmodul 3A; Drehzahlsteller 3B; Zeitimpulsgeber 4; Impulszähler 4A; Relais 5A bis 5D; Motor 6; Dosiereinrichtungen 7A bis 7D; pH-Regler; pO₂-Meßfühler 9; pH-Meßfühler 10

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung für eine Folgesteuerung bei aeroben Bioprozessen durch Messung des Sauerstoffverbrauches, Dosierung von C- und N-Substrat sowie Messung des pH-Wertes. Es ist dadurch gekennzeichnet, daß die C-Quellendosierung über ansteuerbare Zeitimpulsgeber und Relais an die O₂-Verbrauchsmeßeinrichtung gekoppelt ist, wobei der dem C-Substrat Verbrauch proportionale Abfall des pH-Wertes über einen pH-Regler durch Zudosierung von N-Substrat kompensiert und auf einen Soll-Wert gehalten wird. Die Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens ist dadurch charakterisiert, daß sie aus einem Fermenter 1 mit Motor 6, einem Sauerstoffanalysator 2 für die Fermenterabluft, einem pO₂-Regler 3 mit angeschlossenem pO₂-Meßfühler 9, einem Schaltmodul 3A, einem ansteuerbaren Drehzahlsteller 3B zur Drehzahlsteuerung des Motors 6, einem ansteuerbaren Zeitimpulsgeber 4, an dem ein Impulszähler 4A angeschlossen ist, ferner aus Relais 5A bis 5D zur Betätigung von Dosiereinrichtungen 7A bis 7D für die Dosierung von C-Substrat, N-Substrat, Säure und Lauge, sowie einem pH-Regler 8 mit angeschlossenem pH-Meßfühler 10 zur Soll- und Grenzwertregelung besteht.

Patentansprüche:

1. Verfahren für eine Folgesteuerung bei aeroben Bioprozessen durch Messung des Sauerstoffverbrauches, Dosierung von C- und N-Substrat sowie Messung des pH-Wertes, **dadurch gekennzeichnet**, daß die C-Quellendosierung über ansteuerbare Zeitimpulsgeber und Relais an die O₂-Verbrauchsmeßeinrichtung gekoppelt ist, wobei der dem C-Substrat-Verbrauch proportionale Abfall des pH-Wertes über einem pH-Regler durch Zudosierung von N-Substrat kompensiert und auf einen Sollwert gehalten wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß bei Überschreitung eines oberen bzw. unteren pH-Grenzwertes zusätzlich Säure bzw. Lauge zudosiert wird.
3. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie aus einem Fermenter (1) mit Motor (6), einem Sauerstoffanalysator (2) für die Fermenterabluft, einem pO₂-Regler (3) mit angeschlossenem pO₂-Meßfühler (9), einem Schaltmodul 3A, einem ansteuerbaren Drehzahlsteller 3B zur Drehzahlsteuerung des Motors (6) einem ansteuerbaren Zeitimpulsgeber (4) an dem ein Impulszähler (4A) angeschlossen ist, ferner aus Relais (5A bis 5D) zur Betätigung von Dosiereinrichtungen (7A bis 7D) für die Dosierung von C-Substrat, N-Substrat, Säure und Lauge, sowie einem pH-Regler (8) mit angeschlossenem pH-Meßfühler (10) zur Soll- und Grenzwertregelung besteht.

Hierzu 2 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und Vorrichtung für eine Folgesteuerung „O₂-Verbrauch–C-Quellenangebot–pH-Verlauf–N₂-Quellenangebot“.

Anwendungsgebiet sind Bioprozesse, vorzugsweise submerse aerobe Fermentationsprozesse von Zellen, wie z. B. Mikroorganismen, aber auch pflanzliche und tierische Zellen im fluiden Medium.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die Dosierung von Nährstoffen bei Bioprozessen, wie C-Quelle (z. B. Saccharide) und N-Quelle (z. B. NH₄-Verbindungen, proteinhaltige Naturprodukte u. a.) im kontinuierlichen oder im Satzbetrieb (fed batch) während des Prozesses sowie die Regelung des pH-Wertes in Verbindung mit Säure- und Lauge-Vorlage sind Stand der Technik. (Ullmanns Encyklopädie d. Techn. Chemie; 4. Auflage Verlag Chemie Weinheim, Bd. 4: Verfahrensentwicklung und Planung von Anlagen, Dokumentation sowie Bd. 5: Analysen- und Meßverfahren)

Für die Nährstoffdosierung werden zumeist Dosierungen verwendet, die im Dauerbetrieb oder nach manuell einstellbaren Zeitprogrammen arbeiten und nicht unmittelbar mit dem Prozeß gekoppelt sind. (Siehe obengenannte Literaturstelle)

Die Mängel eines derartigen Systems sind allgemein bekannt: Wachstum des Mikroorganismus und Dosierregime sind nicht direkt miteinander verknüpft, es gibt keine Rückkopplung zwischen Wachstum und Dosierung. Dadurch bedingte Fehldosierungen führen zu Instabilität im Prozeß; die Folgen sind Wachstumsstörungen, Fehlreaktionen im Stoffwechsel der Mikroorganismen, z. T. auch irreversibel; im Ergebnis Ausbeuteminderung, ferner Informations-, Qualitäts- und Zeitverlust in der biotechnologischen Forschung.

Mit dem Anstieg des Wachstums nach Beginn eines Bioprozesses steigt bei aeroben Organismen zunächst der Bedarf an C-Quelle (z. B. Glukose, Saccharose) und – metabolisch an diesen gekoppelt – der Bedarf an Luftsauerstoff (O₂) an.

Mit dem C-Quellen-Verbrauch steht wiederum der N-Quellen-Verbrauch in einem physiologisch bestimmten Zusammenhang. Im Ergebnis dieser C- und N-Verwertung entstehen saure bzw. basische Metaboliten, die an das Medium abgegeben werden und deren dynamisches Verhältnis – es bestimmt den pH-Verlauf im Prozeß – ein Maß für die Gleichgewichtslage bei der Verwertung dieser Substrate darstellt. Unter anderem ist dieser Sachverhalt Gegenstand verfahrensspezifischer Untersuchungen mit dem Ziel, eine experimentell und möglichst auch mathematisch-theoretisch optimierte Prozeßstrategie zu formulieren. Eine systematische Kopplung dieser Verbräuche an den realen Wachstumsprozeß in Echtzeit ist derzeit nicht befriedigend realisiert.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, bei aeroben Bioprozessen durch Verwendung einer Vorrichtung unter Einbeziehung der pH-Regelung die C- und N-Substratdosierung an den Sauerstoffverbrauch zu koppeln.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Bei Bioprozessen, speziell bei aeroben Prozessen, kommt der C- und N-Quellen-Dosierung – zumeist Lösungen von Mono- oder Disacchariden sowie anorganische N-Verbindungen bzw. lösliche oder dispergierte Proteinsysteme, wie z. B. Maisquel'wasser, Sojamehl u. a. – eine große Bedeutung zu.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die rein manuell bzw. durch manuell eingestellte Zeitimpulsgeber betätigten Dosiereinrichtungen für C- und N-Substrat durch ein System von Vorrichtungen und ein Verfahren zur Prozeßsteuerung zu ersetzen.

Erfindungsgemäß ist das Verfahren für eine Folgesteuerung bei aeroben Bioprozessen durch Messung des Sauerstoffverbrauches, Dosierung von C- und N-Substrat sowie Messung des pH-Wertes dadurch gekennzeichnet, daß die C-Quelldosierung über ansteuerbare Zeitimpulsgeber und Relais an die O₂-Verbrauchsmeßeinrichtung gekoppelt ist, wobei der dem C-Substrat Verbrauch proportionale Abfall des pH-Wertes über einen pH-Regler durch Zudosierung von N-Substrat kompensiert und auf einen Sollwert gehalten wird.

Bei Überschreitung eines oberen bzw. unteren pH-Grenzwertes, wird zusätzlich Säure bzw. Lauge zudosiert.

Die Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 ist dadurch charakterisiert, daß sie aus einem Fermenter 1 mit Motor 6, einem Sauerstoffanalysator 2 für die Fermenterabluft, einem pO₂-Regler 3 mit angeschlossenem pO₂-Meßfühler 9, einem Schaltmodul 3A, einem ansteuerbaren Drehzahlsteller 3B zur Drehzahlsteuerung des Motors 6, einem ansteuerbaren Zeitimpulsgeber 4, an dem ein Impulszähler 4A angeschlossen ist, ferner aus Relais 5A bis 5D zur Betätigung von Dosiereinrichtungen 7A bis 7D für die Dosierung von C-Substrat, N-Substrat, Säure und Lauge sowie einem pH-Regler 8 mit angeschlossenem pH-Meßfühler 10 zur Soll- und Grenzwertregelung besteht.

Erfindungsgemäß wird entsprechend Fig. 1 die C-Quellen-Dosierung an den O₂-Verbrauch gekoppelt, indem der von einem Gasanalysator abgenommene O₂-Gehalt der Prozeßabluft ($\leq 20,9\%$) zur Ansteuerung eines Zeitimpulsgebers verwendet wird, der wiederum eine Dosiereinrichtung bedient.

In einer anderen Variante Fig. 2 wird die Schalthäufigkeit eines pO₂-konzentrationsabhängigen Schaltmoduls für die Ansteuerung der Dosiereinheit (Dosierpumpe) genutzt.

Mit dem Anstieg des Wachstums nach Beginn des Prozesses steigt bei aeroben Organismen vor allem der Bedarf an C-Quelle (z. B. Glukose, Saccharose) und daran gebunden, der Verbrauch an Luftsauerstoff (O₂) an, d. h. die Prozeßabluft verarmt an O₂. Das dabei ansteigende Differenzsignal Zuluft–Abluft bewirkt über entsprechende Baugruppen eine höhere Dosierrate. Mit sinkendem O₂-Verbrauch bei zunehmend stationär verlaufender Wachstumskurve wird auch die Dosierrate wieder gesenkt. Im Ergebnis des C-Stoffwechsels werden vom Mikroorganismus saure Metaboliten in das Medium abgegeben, gleichbedeutend mit einem Absinken des pH-Wertes unter den vorgegebenen Sollwert.

Das hierdurch entstehende Differenzsignal (ΔpH) bewirkt die Ansteuerung einer weiteren Dosierpumpe mit N-Quelle (z. B. Maisquellwasser, NH₄OH-Lösung). Deren Verstoffwechselung setzt basische Metabolite frei, die den pH-Wert ansteigen lassen, bis schließlich dessen Sollwert wieder erreicht ist.

Mit der Vorgabe eines (optimierten) pH-Sollwertes steuert der Mikroorganismus automatisch die optimale (und somit ökonomische) Verwertung von C- und N-Quelle; Mangelsituationen auf der einen und Überdosierungen auf der anderen Seite werden minimiert: Fehlregulationen und die damit verbundenen Ausbeute- und Qualitätsminderungen können weitgehend vermieden werden.

Ferner lassen sich mit Hilfe dieses Systems Prozeßstrategien für die biotechnologische Forschung formulieren, die in relativ kurzer Zeit für ausgewählte Randbedingungen eine möglichst optimale Verfahrensvariante liefern.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung soll durch die folgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

Beispiel 1

Die Abluft des Fermenters 1 wird einem Sauerstoff (O₂-) Analysator 2 zugeführt. Aus dem Meßsignal des O₂-Gehaltes der Abluft und dem konstanten Wert für die Normalatmosphäre (20,9% O₂) wird ein Differenzsignal ΔO_2 gebildet, dessen Größe die Impulsdauer Δt des von dessen Signal angesteuerten Zeit-Impulsgebers 4 bestimmt: $\Delta t \sim O_2$

Dem Zeit-Impulsgeber ist ein Impulszähler 4A angeschlossen. Der Impulsgeber 4 steuert über ein Relais 5B die Dosiereinrichtung 7B für das C-Substrat, beeinflusst somit O₂-verbrauchsabhängig die Dosiermenge an C-Substrat und paßt sie automatisch dem Wachstumsverlauf des Mikroorganismus und somit dem C-Substrat-Bedarf an. Mit dem erhöhten C-Substrat-Bedarf ist der N-Substrat-Verbrauch korreliert. Dessen Ankopplung an den C-Substrat-Verbrauch geschieht folgendermaßen: Das dem Fermenter 1 über pH-Meßfühler 10 entnommene Meßsignal für den pH-Istwert (pH_I) wird einem pH-Regler 8 eingegeben. Erhöht sich der C-Substrat-Verbrauch durch den Mikroorganismus, so entstehen im allgemeinen vermehrt saure Metabolite, die ein Absinken des pH-Wertes bewirken. Bei Unterschreiten eines vorwählbaren Sollwertes pH_S dosiert der Regler über ein Relais 5C N-Substrat aus der Dosiereinrichtung 7C zu; die bei der Verstoffwechselung des N-Substrates anfallenden basischen Metabolite bewirken einen Anstieg des pH-Wertes; wird der Sollwert pH_S überschritten, dosiert der Regler 8 über das Relais 5B wieder C-Substrat zu.

Unter Berücksichtigung der Trägheit von Bioprozessen und zur Erhöhung der Prozeßsicherheit ist am Regler 8 eine Schaltfunktion integriert, an dieser sind 2 Grenzwerte vorwählbar: oberer Grenzwert $pH_{S+} \geq pH_S$ und unterer Grenzwert $pH_{S-} \leq pH_S$.

Bei Überschreitung dieser Grenzwerte werden vom Regler 8 bei $pH > pH_{S+}$ Säure durch die Dosiereinrichtung 7A und $pH < pH_{S-}$ Base durch die Dosiereinrichtung 7D über die Relais 5A bzw. 5D zudosiert, bis $pH_{S+} \geq pH_I > pH_{S-}$ gilt. Die weitere Einregelung $pH_S < pH_I < pH_{S+}$ und $pH_S > pH_I > pH_{S-}$ erfolgt dann wieder mit der Ansteuerung der Vorlage 7B für C-Substrat über Relais 5B bzw. Vorlage 7C für N-Substrat über Relais 5C.

Mit Hilfe der 3 Werte pH_{S+} , pH_S und pH_{S-} sowie mit der Wahl der Relation

$$\frac{(\text{C- und N-Substrat-Konzentration}) \text{ Start}}{(\text{C- und N-Substrat}) \text{ Dosierung}}$$

kann mit relativ geringem Aufwand eine Optimierung von Bioprozessen erfolgen und eine On-line-Fahrweise „O₂-Verbrauch → C-Substrat-Dosierung → pH-Verlauf N-Substrat-Dosierung → Wachstum → O₂-Verbrauch“ realisiert werden (Fig. 1).

Beispiel 2

Das Meßsignal für den gelösten Sauerstoff wird dem Fermentor 1 über den pO₂-Meßfühler 9 entnommen und dem pO₂-Regler 3 aufgegeben.

Bei Unterschreitung des pO₂-Sollwertes aktiviert die hierdurch gebildete Stellgröße (y) ein Schaltmodul 3A (Relais).

Dieses Modul steuert einerseits über einen Drehzahlsteller 3B den Motor 6 auf die höhere Drehzahl n_E , andererseits wird über das Relais 5B die Dosiereinrichtung 7B für C-Substrat eingeschaltet. Aufgrund der erhöhten Drehzahl steigt der O₂-Übergang von der Gasphase in die Flüssigphase des aeroben Kulturmediums und folglich erhöht sich auch der pO₂-Wert wieder.

Bei Erreichen bzw. Überschreiten des pO₂-Sollwertes werden durch das Schaltmodul 3A die Drehzahl des Motors 6, auf die Grunddrehzahl n_G geschaltet und die Dosiereinrichtung 7B über Relais 5B wieder abgestellt. Je höher das Wachstum und damit der O₂-Verbrauch sind, desto größer wird $Y = \frac{pO_{2\text{ Soll}} - pO_{2\text{ Ist}}}{n_E}$ und damit erhöhen sich Häufigkeit und Dauer der Aufschaltphase des Schaltmoduls 3A („erhöhte Drehzahl“ n_E). Dieses Regime sichert eine dem Wachstum angepaßte O₂- und C-Substrat-Versorgung.

Durch Variation von Substratkonzentration und Fördermenge (Volumenstrom) der Dosierlösung kann der Prozeß mit einem Minimum an Zeitaufwand weiter optimiert werden.

Außerdem wird in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben, der N-Substratbedarf über den pH-Regler 8 in Verbindung mit den Relais 5C, 5A und 5D, sowie den Dosiereinrichtungen 7C (C-Substrat) 7A (Säure) und 7D (Base) flexibel an den C-Substrat-Verbrauch gekoppelt (Fig. 2).

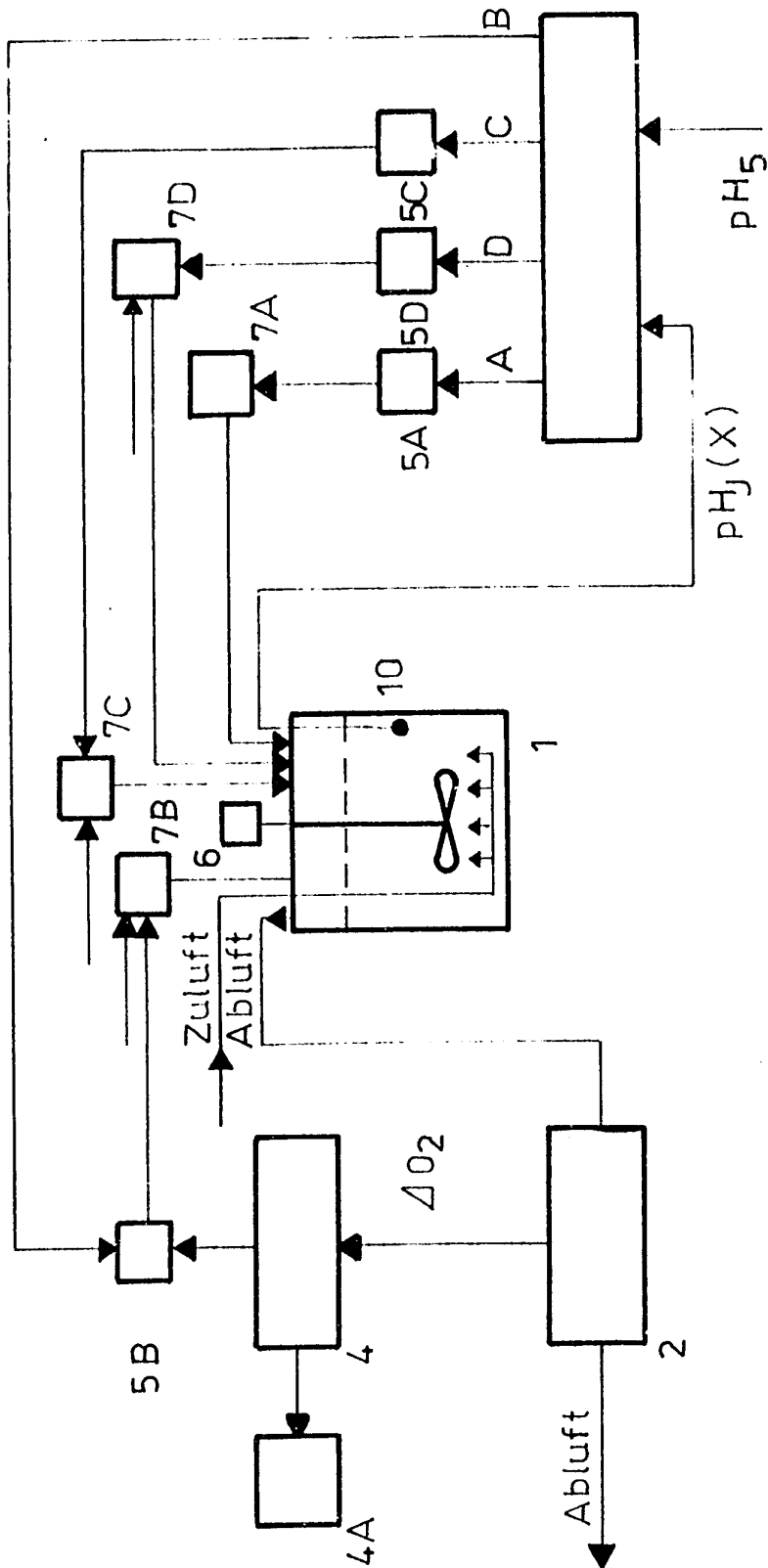
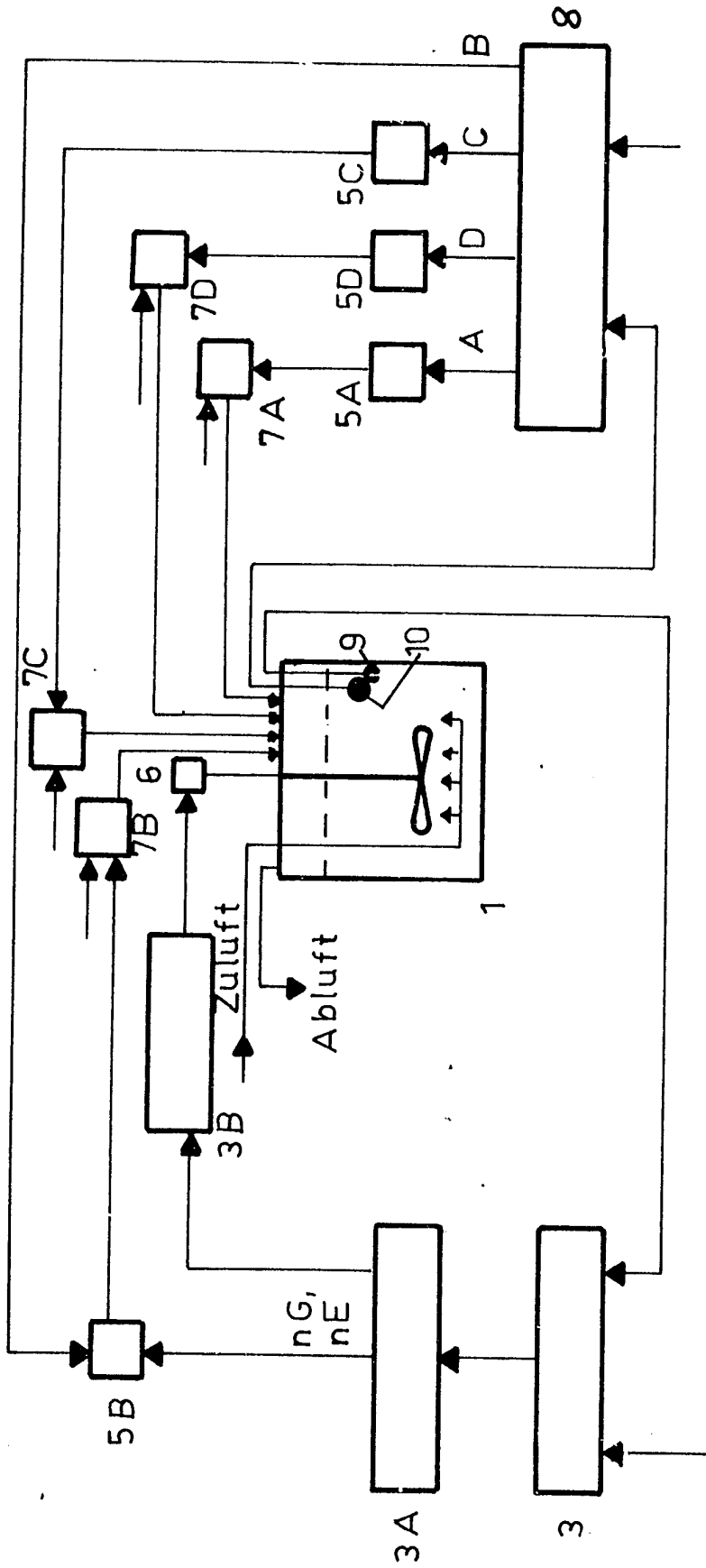


Fig. 1



A... D : s. Fig.1

Fig.2