



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 255 546 A1

4(51) C 12 Q 1/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 Q / 295 724 3

(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; Schäfer, Angelika; Basset, Gabriele, Dipl.-Ing., DD

(54) Verfahren zur gezielten Beeinflussung der Fahrweise mikrobieller Verfahrensstufen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur gezielten Beeinflussung der Fahrweise mikrobieller Verfahrensstufen zur Erzeugung und Aufarbeitung von Mikroorganismen, die Cytochrome im Atmungssystem aufweisen, insbesondere zur Erzeugung und Aufarbeitung von acidophilen und neutrophilen methylotrophen Bakterien in der Stufe der Fermentation. Aufgabe der Erfindung ist die Gewinnung von Führungsgrößen für die gezielte Beeinflussung des Fermentationsprozesses sowie die Schaffung einer einfachen Regelstrategie hinsichtlich der Erzeugung von Produkten mit bestimmten gewünschten Eigenschaften, wie z. B. Proteingehalt, Nukleinsäuregehalt, Viskosität und Extrahierbarkeit. Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß zur Erzeugung unterschiedlicher Produkte eine stufenweise sprunghafte Änderung des C_{Red} -Sollwertes vorgenommen wird, der jedoch in jedem Fall $\geq$ dem Reduktionsgrad von 6 % sein soll. Damit wird eine schnelle und wenig aufwendige Umstellung des Fermentationsprozesses auf unterschiedliche Produkte möglich.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur gezielten Beeinflussung der Fahrweise mikrobieller Verfahrensstufen zur Erzeugung und Aufarbeitung von Mikroorganismen, die Cytochrome im Atmungssystem aufweisen, insbesondere von acidophilen und neutrophilen methylotrophen Bakterien in der Stufe der Fermentation unter Anwendung eines Cytochrom-C-Photometers, **gekennzeichnet dadurch**, daß zur Gewinnung unterschiedlicher Produkte mit bestimmten gewünschten Eigenschaften, wie Protein- und Nukleinsäuregehalt, Viskosität und Extrahierbarkeit im diskontinuierlichen und/oder kontinuierlichen Betrieb eine stufenweise sprunghafte Änderung des C_{Red} -Sollwertes vorgenommen wird, der in jedem Fall jedoch $\geq$ dem Reduktionsgrad von 6% sein soll.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Änderung des C_{Red} -Sollwertes in Schritten in 1 bis 50%, vorzugsweise in Schritten von 6 bis 25% vorgenommen wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur gezielten Beeinflussung der Fahrweise mikrobieller Verfahrensstufen zur Kultivierung und Aufarbeitung von Mikroorganismen, insbesondere von acidophilen und neutrophilen Bakterien in der Stufe der Fermentation. Die Erfindung ist in der mikrobiologischen Industrie anwendbar. Sie ist in die IPK C 12 P, 1/00 einzuordnen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die meisten Methoden zur Optimierung mikrobieller Verfahrensstufen beruhen auf der Erfassung schnell bestimmbarer Milieufaktoren, z. B. des pH-Wertes, des pO_2 , der Konzentration von Nährlösungsbestandteilen und anderen Hilfsstoffen, der Abgasanalyse und dem daraus berechenbaren Stoffumsatz. Aus diesen Informationen wird gewöhnlich die Dosierung der entsprechenden Stoffströme abgeleitet (Rotenburger Symposium, 1978, Fermentationstechnik Firma B. Braun Melsungen AG, Vortrag von NYESTE, u. a. S. 141; DD-WP 10006; DD-WP 159011; SU-PS 791771). Die genannten Methoden beruhen alle auf der Messung makroskopischer Größen ohne Berücksichtigung zellphysiologischer Aspekte der Kultur. Zunehmend werden zelluläre Kulturfaktoren in neuen Optimierungsmethoden berücksichtigt. So erfolgt ein Mikroorganismennachweis über die Biolumineszenz von ATP nach Zellzerstörung oder durch Berücksichtigung des Proteinanteils (GB-PS 2116709, DE-AS 2365796). Eine Fluoreszenz- und Lumineszenzanalyse nach Adsorption geeigneter Stoffe an die Zelloberfläche (GB-PS 2116712, GB-PS 2095830, SU-PS 959112) wird ebenso eingesetzt wie die spektrophotometrische Untersuchung von Zellbestandteilen, insbesondere des Cytochrom C (DD-WP 154449).

Nach CHANCE (in Hofmann, Dynamische Biochemie, Teil II, Berlin 1984, S. 124) lassen sich die Stadien der Zellatmung in Abhängigkeit vom Reduktionsgrad der verschiedenen Komponenten der Atmungskette darstellen. Komponenten der Atmungskette sind neben Pyridinnucleotiden, Flavoproteiden, auch Cytochrome, darunter das Cytochrom C. Dem aktiven oder unkontrollierten Zustand der Zellatmung entspricht für das Cytochrom C ein Reduktionsgrad von 6%. Dieser C_{Red} -Wert, der den physiologischen Zustand der Mikroorganismenkultur charakterisiert, ist dadurch gekennzeichnet, daß ein dem Anteil an Cytochrom C in der reduzierten Form proportionales Meßsignal gewonnen wird.

Bekannt sind auch elektronenmikroskopische Untersuchungsmethoden, die allerdings sehr aufwendig sind (SU-PS 1010126), auch andere Methoden wie die elektrophoretische Beweglichkeit oder die Säure-Basen-Titration werden in der Literatur genannt (DE-OS 1642821, DD-WP 226902). Der Nachteil vieler der Methoden, die zelluläre Aspekte berücksichtigen ist, daß sie aufwendig und für die Optimierung und Steuerung zu teuer sind. Noch komplizierter wird es, wenn auf der Grundlage eines Kultivierungsprozesses gezielt unterschiedliche Produkte mit bestimmten Eigenschaften gewonnen werden sollen. Je einfacher sich die Umstellung eines solchen Prozesses gestaltet, desto größer sind die Chancen einer technischen Realisierung mit ökonomischem Effekt.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Gewinnung von Führungsgrößen für die Beeinflussung des Fermentationsprozesses von Mikroorganismen mit Cytochromen in der Atmungskette, insbesondere von methylotrophen Mikroorganismen, hinsichtlich der Erzeugung von Produkten mit bestimmten gewünschten Eigenschaften, wie z. B. Proteingehalt, Nukleinsäuregehalt, Viskosität und Extrahierbarkeit.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist die Schaffung einer möglichst einfachen Regelstrategie, um die Fahrweise mikrobieller Verfahrensstufen bei der Kultivierung und Aufarbeitung von Mikroorganismen mit Cytochromen im Atmungssystem, insbesondere von methylotrophen Bakterien, in der Stufe der Fermentation so zu beeinflussen, daß in einem kontinuierlichen Prozeß Produkte mit unterschiedlichen gewünschten Eigenschaften erzeugt werden können. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß zur Regelung der Fahrweise der Fermentation der spektrophotometrisch ermittelte C_{Red} -Wert, der den physiologischen Zustand der Mikroorganismenkultur charakterisiert, genutzt wird. Durch eine stufenweise, sprunghafte Änderung in Form einer Erhöhung bzw. Erniedrigung des C_{Red} -Sollwertes während des Fermentationsprozesses wurde eine unkomplizierte Möglichkeit zur Gewinnung ganz unterschiedlicher Produkte bzw. von

Produkten mit bestimmten gewünschten Eigenschaften in Abhängigkeit vom eingesetzten Stamm gefunden. Der C_{Red} -Sollwert sollte dabei in jedem Fall größer bzw. gleich dem Reduktionsgrad von 6% sein. Die Änderung des C_{Red} -Sollwertes wird zwischen 1 und 50% variiert, vorzugsweise liegt die Schrittweite der Änderung des C_{Red} -Sollwertes bei dessen Einsatz als Steuergröße der Substratdosierung bei 6 bis 25% bzw. Skalenteilen von 100. Zweckmäßigerweise wird der C_{Red} -Sollwert als Steuergröße fest vorgegeben und dient allein oder im Zusammenwirken mit anderen Regelgrößen im Rahmen der Regelungsstrategie des Fermentationsprozesses als Führungsgröße.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung soll nachstehend an Ausführungsbeispielen näher erläutert werden:

Beispiel 1

Die Kultur MB 58 (IMET B 346) wurde zur Gewinnung proteinreicher Futterbiomasse eingesetzt. Kurzzeitig sollte ohne Verlust an Produktivität und großer Änderung des Prozeßregimes nukleinsäurereiche Biomasse als Vorprodukt zur Verfügung gestellt werden.

In einem Laborfermentor vom Typ LFS 130 wurde das System MB 58 (IMET B 346)/Methanol unter folgenden Bedingungen kontinuierlich fermentiert:

Temperatur	30–32 °C
pH-Wert	4–5
Durchflußrate	0,125 h ⁻¹
Gelöst-Sauerstoff-Konz.	2 ... 3 ppm
Stickstoff-Konz.	50 ... 300 mg N/l
Phosphor-Konz.	50 ... 150 mg P/l
Rest-Methanol-Konz.	0 ... 0,5 g/l
Methanollösung	10%ig
Ammoniak	12%ig

Als Nährlösung wurde die für MB 58 übliche Nährlösung eingesetzt. Zur Messung bzw. Regelung des C_{Red} -Wertes der Kultur wurde ein spezielles Cytochrom C-Photometer gemäß DD-WP 154545 eingesetzt, das gleichzeitig die Cytochrom-C-Konzentration bzw. Biomassekonzentration bestimmt. Gerätespezifisch bedingt, ergab sich dabei z. B. für den aktiven Zustand der Atmung ein anderer als der von CHANCE genannte Wert für den Reduktionsgrad.* Unter diesen Prozeßbedingungen wurde bei einer Biomassekonzentration von 20 g/l eine Produktivität von 2,5 g/l · h bei einem $\alpha_{\frac{s}{x}}$ -Wert von 2,87 g Methanol/g Biomasse ($Y_{x/s} = 0,348$) erreicht. Der Rohproteingehalt betrug 75%, der Nukleinsäuregehalt 7,8–8,2%. Bei Änderung des C_{Red} -Sollwertes der Cytochrom C-Substrat-Regelung auf 30% ergab sich folgende Biomassezusammensetzung:

Rohproteingehalt	67 %
Nukleinsäuregehalt	13,5 %

Beispiel 2

Mit der neutrophilen methylotrophen Kultur MB 53 (ZIMET 10775) wurde proteinreiche Biomasse hergestellt. Der Prozeß sollte auf Polysaccharidproduktion umgestellt werden.

Die proteinreiche Biomasse wurde unter folgenden Bedingungen kontinuierlich produziert:

Temperatur	33–35 °C
pH-Wert	6–7
Durchflußrate	0,25 h ⁻¹
Gelöst-Sauerstoff-Konz.	1 ppm
Stickstoff-Konz.	50 ... 300 mg/l
Phosphor	50 ... 150 mg/l
Rest-Methanol-Konz.	0 ... 0,02 g/l
der C_{Red} -Wert betrug	18 %.

Bei einer Biomassekonzentration von 17,1 g/l und einer Produktivität von 4,5 lag der Rohproteingehalt bei 72%, bei einem Substratverbrauchscoeffizienten von 2,22 ($Y_{x/s} = 0,450$). Bei Erhöhung des C_{Red} -Wertes auf 40–45% bei ansonsten gleichen Bedingungen, kam es zur Polysaccharidausschüttung. Das Polysaccharid hatte die folgende Elementarzusammensetzung (in % der Trockensubstanz):

C	32,7 ... 37,9 %
H	4,2 ... 5,4 %
N	20,3 ... 0,4 %

* Der Sollwert der Cytochrom C-Substrat-Regelung wurde auf 20% eingestellt.