



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 294 275 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1  
Patentgesetz der DDR  
vom 27.10.1983

5(51) C 12 N 1/00

in Übereinstimmung mit den entsprechenden  
Festlegungen im Einigungsvertrag

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

|      |                                                                                                               |      |          |      |          |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|----------|------|----------|
| (21) | DD C 12 N / 340 609 5                                                                                         | (22) | 14.05.90 | (44) | 26.09.91 |
| (71) | Akademie der Wissenschaften, Otto-Nuschke-Straße 22/23, O - 1080 Berlin, DE                                   |      |          |      |          |
| (72) | Teich, Walter, Dr. rer. nat.; Skrowny, Horst, Dipl.-Chem., DE                                                 |      |          |      |          |
| (73) | Akademie der Wissenschaften, Institut für Biotechnologie, Patentbüro, Permoserstraße 15, O - 7050 Leipzig, DE |      |          |      |          |
| (74) | siehe (73)                                                                                                    |      |          |      |          |
| (54) | Verfahren zur Reduzierung der Zahl an Fremdkeimen bei der Kultivierung von Mikroorganismen                    |      |          |      |          |

(55) Kultivierung; Fremdkeime; Grenzwert; Stickstoffverbindung; Kohlenstoffverbindung; Sterilisation; Biomasse; Verbindung

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reduzierung der Zahl an Fremdkeimen bei der Kultivierung von Mikroorganismen, das zur Erzeugung mikrobieller Biomasse oder spezieller Substanzen angewandt werden kann. Erfindungsgemäß wird während der Kultivierung die Stickstoff- und/oder Kohlenstoffversorgung der Mikroorganismen in Abhängigkeit von der Zahl der Fremdkeime oder vorbeugend nach einem bestimmten Rhythmus qualitativ variiert. Die Kultivierung kann diskontinuierlich, semikontinuierlich oder kontinuierlich durchgeführt werden.

## Patentanspruch:

1. Verfahren zur Reduzierung der Zahl an Fremdkeimen bei der Kultivierung von Mikroorganismen, **dadurch gekennzeichnet**, daß während der Kultivierung die Stickstoff- und/oder Kohlenstoffversorgung der Mikroorganismen qualitativ variiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die qualitative Änderung der Stickstoff- und/oder Kohlenstoffversorgung dann erfolgt, wenn ein vorgegebener Grenzwert bezüglich der Zahl an Fremdkeimen überschritten wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die qualitative Änderung der Stickstoff- und/oder Kohlenstoffversorgung vorbeugend nach einem empirisch ermittelten Rhythmus erfolgt.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Luft und/oder die Kohlenstoffverbindung sterilisiert wird.

## Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kultivierung von Mikroorganismen auf der Basis verschiedener Rohstoffe. Sie kann zur Gewinnung mikrobieller Biomasse und mikrobiell erzeugter Substanzen angewandt werden.

## Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die Erzeugung mikrobieller Biomasse und Substanzen erfolgt im industriellen Maßstab nur dann erfolgreich, wenn definierte Prozeßbedingungen eingehalten werden können. Aus diesem Grund sind Fremdkeime bei mikrobiologischen Verfahren unerwünscht, da diese den ursprünglich eingesetzten Mikroorganismus verdrängen können bzw. Prozeßstörungen bewirken. Um dies zu verhindern, werden zahlreiche mikrobiologische Verfahren unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Der Nachteil dieser Verfahren liegt in den hohen ökonomischen Aufwendungen für die Sterilisation der Luft, der Nährlösung, der Substrate und für die Aufrechterhaltung des sterilen Zustandes während der Kultivierung (Apparate-Aufwand).

Werden demgegenüber mikrobielle Verfahren unsteril betrieben, so treten Fremdkeime auf, die, wenn sie eine bestimmte Zahl erreichen, die Ausbeute des Verfahrens reduzieren und die Qualität der herzustellenden Produkte beeinträchtigen bzw. eine weitere Prozeßführung sogar verhindern.

Zur Lösung des Problems ist ein Verfahren bekannt, DT-PS 2645386, bei dem durch Zufügen von Monoperschwefelsäure Fremdkeime inaktiviert werden. Dieses Verfahren hat den Nachteil, daß die Wirksamkeit sehr begrenzt ist (auf wenige Bakterien), zu einer beträchtlichen Salzbelastung des Wassers führt und das Verfahren durch den Zusatzstoff ökonomisch stark belastet. Weiter ist bekannt, Infektionen durch kurzzeitiges Absenken des pH-Wertes zu reduzieren (W. Swyzen, Zuckerind. 112 [1987], 955). Diese Verfahrensweise hat den Nachteil, daß sie nicht sehr wirksam ist, indem das Wachstum der Fremdkeime in den meisten Fällen nur kurzzeitig gehemmt wird.

Auch eine ständige Absenkung des pH-Wertes, wie z. B. bei der Kultivierung von Hefen auf der Basis von Schlempe (R. Braun, J. Meyroth, Die Branntweinwirtschaft 121 [1981], 102) bewirkt keine Lösung des Problems. Aufgrund der großen Menge an Schwefelsäure zur Absenkung des pH-Wertes wird bei diesem Verfahren sowohl die Hefebiomasse als auch das Wasser so stark mit Salz belastet, daß dies zu einer erheblichen ökonomischen Belastung des Verfahrens führt.

## Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist eine Senkung von Produktionsverlusten sowie eine Verringerung der Umweltbelastung.

## Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, durch spezielle Kultivierungsbedingungen die Zahl der Fremdkeime im Kulturmedium zu reduzieren.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß man während der Kultivierung die Stickstoff- und/oder Kohlenstoffversorgung der Mikroorganismen qualitativ variiert. Die Verfahrensweise ist im einzelnen folgende: Zur Kultivierung, die man diskontinuierlich, semikontinuierlich oder kontinuierlich durchführt, werden Mikroorganismen in an sich bekannter Art und Weise kultiviert, wobei man jedoch in Abhängigkeit von der Zahl der Fremdkeime im Kulturmedium die Stickstoff- und/oder Kohlenstoffversorgung der Mikroorganismen qualitativ variiert. Auf der Grundlage des Verwertungsspektrums der jeweils zu kultivierenden Mikroorganismen werden mindestens zwei Stickstoff- und/oder Kohlenstoffverbindungen ausgewählt und wechselseitig in Abhängigkeit von der Zahl an Fremdkeimen in den Fermentor dosiert. Die Dauer der Dosierung für die ausgewählten Verbindungen ergibt sich aus der aktuellen Zahl an Fremdkeimen, wobei diesbezüglich für das betreffende Verfahren ein Grenzwert festgelegt wird.

Beim Überschreiten des Grenzwertes erfolgt dann die qualitative Änderung der Stickstoff- und/oder Kohlenstoffversorgung der Mikroorganismen. Die Zahl der Fremdkeime bestimmt man mittels bekannter Methoden, beispielsweise durch mikroskopisches Auszählen. In einer weiteren Ausgestaltung dieser Verfahrensweise hat es sich als vorteilhaft herausgestellt, die Änderungen der Dosierung der ausgewählten Stickstoff- und/oder Kohlenstoffverbindungen vorbeugend, also nicht in Abhängigkeit von der Zahl der Fremdkeime, in einem bestimmten, für das jeweilige Verfahren empirisch zu ermittelnden Rhythmus durchzuführen.

Weiter kann es für einige Verfahren zweckmäßig sein, die Kultivierung unter den oben genannten Bedingungen so durchzuführen, daß man die Luft und/oder Kohlenstoffverbindung sterilisiert, die Kultivierung ansonsten aber unsteril betreibt.

Im Ergebnis der dargelegten Verfahrensweisen zur Reduzierung der Zahl der Fremdkeime erhält man ein Kulturmedium, das wesentlich weniger Fremdkeime enthält im Vergleich zur üblichen Kultivierung mit qualitativ konstanter Stickstoff- und/oder Kohlenstoffversorgung der Mikroorganismen unter vergleichbaren Bedingungen.

#### Ausführungsbeispiele

##### Beispiel 1

a) In einem Laborfermentor mit einem Bruttovolumen von 15l und einem Masseinhalt von 5kg wurde die Kultivierung einer Hefe unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Hefe: *Candida utilis*

Temperatur: 32°C

pH-Wert: 4,0

Verweilzeit: 4h

Begasung: 400l Luft/h

Nährsalzlösung (Konzentrat):

|                                            |           |                                                          |          |
|--------------------------------------------|-----------|----------------------------------------------------------|----------|
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                   | 35,0 g/l  | $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$               | 0,79 g/l |
| $\text{H}_3\text{PO}_4$ 80 %               | 48,3 ml/l | $\text{ZnCl}_2$                                          | 0,32 g/l |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 25,0 g/l  | $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18 \text{H}_2\text{O}$ | 0,19 g/l |
| $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ | 1,83 g/l  | $\text{NiSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$               | 0,11 g/l |
| $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ | 1,20 g/l  | $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$     | 0,04 g/l |
| $\text{H}_3\text{BO}_3$                    | 1,29 g/l  | $\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$               | 0,04 g/l |

(Von diesem Konzentrat wurde eine adäquate Menge zur Versorgung der Hefen eingesetzt)

Kohlenstoffverbindung: Saccharose (konstant)

Stickstoffverbindung: Ammoniak, Salpetersäure (variabel)

Die Kultivierung wurde wie folgt durchgeführt: In einer sterilen Vorkultivation mittels Schüttelkolben wurde eine ausreichende Menge Hefe erzeugt, im Batch-Verfahren weitergezüchtet und anschließend kontinuierlich kultiviert. Die pH-Regelung erfolgte über einen Regelkreis mittels NaOH- bzw.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Lösung. Die unter diesen Bedingungen erreichte Produktivität betrug 7 g Hefetrockensubstanz/kg h. Die Dosierung der Kohlenstoffverbindung Saccharose blieb während des Versuchs konstant. Demgegenüber wurde in Abhängigkeit von der Fremdkeimzahl (Bakterien) die Stickstoffdosierung qualitativ variiert. Die Zahl der Fremdkeime sollte 10 (Angabe in Bakterien je 100 Hefen) nicht überschreiten (Grenzwert).

Die Zahl der Fremdkeime wurde mikroskopisch alle 4h bestimmt. Die Stickstoffversorgung der Hefezellen erfolgte zunächst mit Ammoniak. Nach 52h Kultivierungsdauer wurde der Grenzwert für die Fremdkeime überschritten und daraufhin die Stickstoffversorgung durch Zusatz von  $\text{HNO}_3$  zur Nährsalzlösung umgestellt. Innerhalb von 12h sank die Zahl der Fremdkeime auf 2. Die Stickstoffversorgung auf der Basis von Nitrat wurde noch weitere 24h aufrechterhalten und danach auf Ammoniak umgestellt. Weitere Bestimmungen der Fremdkeimzahl ergaben eine Überschreitung des Grenzwertes nach 46h. Daraufhin erfolgte wieder eine Umstellung der Stickstoffversorgung auf Nitrat-Stickstoff.

b) Die Kultivierung der Hefe wurde unter den bei a) genannten Bedingungen durchgeführt, nur mit dem Unterschied, daß ein fester Rhythmus bezüglich des Wechsels der Stickstoffversorgung der Hefezellen eingehalten wurde.

Rhythmus (empirisch aus mehreren Versuchen festgelegt):

Ammoniak: 35h Kultivierungsdauer

Salpetersäure: 24h Kultivierungsdauer

Prozeßkontrollen bezüglich der Zahl an Fremdkeimen ergaben, daß mit dieser Verfahrensweise der vorgegebene Grenzwert (10) eingehalten werden konnte.

##### Beispiel 2

In einem Laborfermentor mit einem Bruttovolumen von 15l und einem Masseinhalt von 5kg wurde die Kultivierung einer Hefe unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Hefe: *Brettanomyces spez.*

Temperatur: 34°C

pH-Wert: 4,0

Verweilzeit: 4h

Begasung: 400l Luft/h

Nährsalzlösung: entsprechend Beispiel 1

Stickstoffverbindung: Ammoniak (konstant)

Kohlenstoffverbindung: Saccharose, Essigsäure (variabel)

Die Kultivierung wurde wie folgt durchgeführt: In einer sterilen Vorkultivation mittels Schüttelkolben wurde eine ausreichende Hefemenge erzeugt, im Batch-Verfahren weitergezüchtet und anschließend kontinuierlich unter unsterilen Bedingungen kultiviert. Die Produktivität lag zwischen 5,8–7,3 g Hefetrockensubstanz/kg h. Die Dosierung von Ammoniak zur Versorgung der Hefe mit Stickstoff blieb während des Versuchs konstant. Demgegenüber wurde in Abhängigkeit von der Zahl der Fremdkeime (Bakterien) die Kohlenstoffdosierung qualitativ variiert. Die Zahl der Fremdkeime sollte 15 nicht überschreiten (festgelegter Grenzwert). Die Zahl der Fremdkeime wurde mikroskopisch alle 4 h bestimmt. Nach einer Kultivierungsdauer von 45 h, begonnen wurde die Kultivierung mit der Kohlenstoffverbindung Saccharose, betrug die Zahl der Fremdkeime 15. Daraufhin erfolgte eine Umstellung der Versorgung der Hefe von Saccharose auf Essigsäure. Innerhalb von 18 h sank die Zahl der Fremdkeime auf 4. Die Kultivierung der Hefe auf der Basis von Essigsäure wurde noch 15 h aufrechterhalten und danach wieder auf Saccharose umgestellt.

### Beispiel 3

In einem Laborfermentor mit einem Bruttovolumen von 15 l und einem Masseinhalt von 4 kg wurde die Kultivierung eines Pilzes unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Pilz: *Aspergillus niger*  
 Temperatur: 30°C  
 pH-Wert: 4,0  
 Begasung: 300 l Luft/h (sterilisiert)  
 Nährsalzlösung: wie in Beispiel 1  
 Ergänzung: Zugabe von Maisquellwasser

Kohlenstoffverbindung: Glucose (konstant)  
 Stickstoffverbindung: Ammoniak, Salpetersäure (variabel)

Die Anzucht des Myzels (Inoculum) erfolgte in einer Vorfermentation unter sterilen Bedingungen. Mit dem gezüchteten Pilzmyzel wurde anschließend eine Fed-Patch-Kultivierung unter unsterilen Bedingungen (außer der Luft) über einen Zeitraum von 60 h durchgeführt, wobei während dieses Zeitraums die Stickstoffversorgung, beginnend mit Ammoniak, stündlich entsprechend der oben genannten Verbindungen gewechselt wurde.

Unter diesen Bedingungen konnte die Kultivierung über den gesamten Zeitraum problemlos durchgeführt und der vorgegebene Grenzwert bezüglich der Zahl an Fremdkeimen (Hefen, Bakterien) von  $5 \times 10^6$  Keimen/ml stets unterschritten werden.

Demgegenüber mußte eine unter denselben Bedingungen durchgeführte Kultivierung unter alleiniger Verwendung von Ammoniak als Stickstoffquelle wegen Infektion nach 19 h abgebrochen werden.

Bei Verwendung von Ammoniumnitrat als alleinige Stickstoffquelle mußte die Kultivierung nach 28 h abgebrochen werden.

### Beispiel 4

In einem Laborfermentor mit einem Bruttovolumen von 15 l und einem Masseinhalt von 4 kg wurde die Kultivierung einer Hefe unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Hefe: 3,8  
 Temperatur: 34°C  
 Verweilzeit: 3,5 h  
 Begasung: 400 l Luft/h  
 Nährsalzlösung: entsprechend Beispiel 1

Kohlenstoffverbindung: Schlempe, Saccharose (variabel)  
 Stickstoffverbindung: Ammoniak, Salpetersäure (variabel)

Die Kultivierung wurde wie folgt durchgeführt: In einer sterilen Vorkultivation mittels Schüttelkolben wurde eine ausreichende Menge Hefe erzeugt, im Batch-Verfahren weitergezüchtet und anschließend auf der Basis von Schlempe (aus Ethanolverfahren) und Ammoniak kontinuierlich unter unsterilen Bedingungen kultiviert. Die Bestimmung der Zahl an Fremdkeimen (Bakterien) erfolgte alle 4 h. In Abhängigkeit vom Überschreiten des festgelegten Grenzwertes von 12 ergab sich folgender Wechsel der Dosierungen:

| Kohlenstoff- bzw. Stickstoffverbindung |               | Kultivierungsdauer |
|----------------------------------------|---------------|--------------------|
| Schlempe                               | Ammoniak      | 42 h               |
| Schlempe                               | Salpetersäure | 40 h               |
| Saccharose                             | Ammoniak      | 28 h               |
| Saccharose                             | Salpetersäure | 20 h               |

Danach wurde wieder mit Schlempe/Ammoniak die Kultivierung fortgesetzt.