



(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGESESSKRIFT (11) 144642 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

- (21) Ansøgning nr. 3600/75 (51) Int.Cl.³ C 12 M 1/00
(22) Indleveringsdag 8. aug. 1975
(24) Løbedag 8. aug. 1975
(41) Alm. tilgængelig 15. feb. 1976
(44) Fremlagt 26. apr. 1982
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. -
(30) Prioritet 14. aug. 1974, 35754/74, GB 19. maj 1975, 21288/75, GB
30. jul. 1975, 35754/74, GB 30. jul. 1975, 21288/75, GB
(71) Ansøger IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED, London SW1P 4QG, GB.

(72) Opfinder Frank Cornelius Roesler, GB.

(74) Fuldmægtig Firmaet Chas. Hude.
-

(54) Fremgangsmåde til kontinuerlig
aerob fermentering af en kultur
og apparat til udøvelse af frem-
gangsmåden.

DK 144642 B

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til kontinuerlig aerob fermentering af en kultur i et fermenteringsapparat, hvori en kultur tilføres et vækstbegrænsende næringsstof samt et apparat til udøvelse af fremgangsmåden og af den i indledningen til krav 3 angivne art.

Mange aerobe fermenteringsprocesser udføres fortrinsvis i industriel skala som kontinuerlige processer og næringsstoffer indeholdende en carbonkilde og organiske og/eller uorganiske næringsstofkilder bliver kontinuerligt leverede til et fermenteringsapparat med en hastighed, der i hovedsagen er den samme som den, ved hvilken kulturen fjernes fra apparatet. Carbonkilden og de forskellige organiske og/eller uorganiske næringsstoffer kan leveres til apparatet hver for sig, eller alle eller de fleste af dem kan leveres sammen. F.eks. er ammoniak en passende nitrogenkilde og kan leveres til fermenteringsapparatet som en separat tilførsel. De andre uorganiske næringsstoffer og carbonkilden kan leveres samlet. I sådanne processer adskilles mikroceller fra kulturen uden for fermenteringsapparatet, og det tilbageblevne medium kan kombineres med friske næringsstoffer, som er leveret til apparatet.

I kontinuerlige fermenteringsprocesser må kulturmediet, hvori en organisme indpodes, være således, at nogle af de krævede næringsstoffer, f.eks. nitrogen, fosfor, magnesium eller jern eller carbonkilden, må være til stede i sådanne mængder, at væksten begrænses i forhold til de andre bestanddele af mediet. Dette kan anvendes til at regulere kulturens vækst. Næringsstoffet, som er til stede i vækstbegrænsende mængder, betegnes som det vækstbegrænsende næringsstof.

Industrielle fermenteringsprocesser udføres fortrinsvis i store apparater. Egnede fermenteringsapparater indbefatter sådanne, der fremgår af GB patent nr. 1.353.008 og US patent nr. 3.405.920. I sådanne fermenteringsapparater leveres det vækstbegrænsende næringsstof til kulturen ved et enkelt eller et ringe antal steder, således at betydelige mængder af det vækstbegrænsende næringsstof kommer ind i kulturen ved disse

steder. Derfor vil koncentrationen af dette næringsstof i kulturen være større i umiddelbar nærhed af disse steder end andre steder. Derved opstår der mulighed for, at, i et område med større koncentration af det vækstbegrænsende næringsstof, et andet næringsstof er fuldstændig opbrugt af mikroorganismerne, der er til stede i kulturen, før alt det beregnede, begrænsende næringsstof er konsumeret. Under sådanne omstændigheder vil i dette område det andet næringsstof effektivt blive det begrænsende næringsstof, ofte til skade for kulturens vækst. Indføringen af store mængder af det begrænsende næringsstof ved ethvert givet sted resulterer i, at mikroorganismer, der befinder sig i nærheden af dette sted, temporært udsættes for store koncentrationer af det begrænsende næringsstof. Dette kan være skadeligt for mikroorganismene, f.eks. ved en proces ifølge GB patentskrift nr. 1.370.892.

Ved at fremgangsmåden til kontinuerlig aerob fermentering af en kultur i et fermenteringsapparat, hvori en kultur tilføres et vækstbegrænsende næringsstof, ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at det vækstbegrænsende næringsstof tilføres kulturen på flere steder, dog mindst ét sted pr. m³ effektiv volumen af kulturen, opnår man den hovedfordel, at man ved fremgangsmåden undgår, at der i et fermenteringsapparat under en aerob fermentering dannes områder, hvori et andet næringsstof konsumeres fuldstændigt, før beholdningen eller tilføringen af det beregnede vækstbegrænsende næringsstof er blevet opbrugt.

En foretrukken udførelsesform er angivet i den kendetegnende del af krav 2, idet opfindelsen er særlig nyttig, når det vækstbegrænsende næringsstof er carbonkilden, og når dets virkning er, at man undgår, at der dannes områder, hvori kulturen vokser under effektiv oxygenbegrænsning, dvs., at alt den rådige oxygen er blevet opbrugt i et område, hvori beholdninger fra carbonkilden stadig er til rådighed. I ansøgningen vil sådanne områder blive benævnt som områder med "oxygenskygge".

I en aerob fermentering vil mængden af næringsstof, som leveres ved ethvert sted, sædvanligvis være den, der støkiometrisk svarer til den mængde af oxygen, som kan optages af kulturen. I processen ifølge GB patentskrift nr. 1.370.892 med methanol som det begrænsende næringsstof overstiger mængden af methanol, der ved enhver stilling leveres gennem hvert enkelt leveringsorgan, såsom dyser eller åbninger, fortrinsvis ikke 15 l/h, og er fortrinsvis 2-6 l/h. Meget passende bliver hastigheden af methanolindsprøjtning fra hvert afgivelsesorgan bestemt med hensyn til den lokale til rådighed værende oxygen, som vil afhænge af trykket og dermed af positionen i fermenteringsapparatet.

Fermenteringsapparatet kan være af forskellig art, f.eks. en tank, hvori en cirkulation af kulturen frembringes ad mekanisk vej eller ved at blæse luft ind deri. Fortrinsvis er det et fermenteringsapparat af den art, som er beskrevet i GB patentskrift nr. 1.353.008 eller nr. 1.508.976 eller DK patentskrift nr. 141.338 indbefattende et stigrør og et faldrør, som er forbundet ved deres øvre og nedre ender, og hvori cirkulation af kultur rundt i systemet forårsages ved indblæsning af en oxygenindeholdende luftart, såsom atmosfærisk luft, ind i den nedre del af stigrøret. Nærværende opfindelse er meget anvendelig ved aerob-fermenteringer og kan nyttigt udnyttes ved bakteriel fermentationer, såsom processerne ifølge GB patentskrift nr. 1.370.892 for kultivering af methanoludnyttende stammer af bakterier af arterne *Pseudomonas methylotropha*, *Microcyclus polymorphum*, *Hyphomicrobium variabile* og *Pseudomonas rosea*, kulturer af et antal stammer, som er til rådighed fra National Collection of Industrial Bacteria (NCIB), Torry Research Station, Aberdeen, Skotland, UK - NCIB nr. 10508-17 og 10592-612.

Det vækstbegrænsende næringsstof leveres til fermenteringsapparatet ved et gennemsnit på mindst ét leveringssted pr. kubikmeter af det effektive volumen af fermenteringsappara-

tet, fortrinsvis ved 3-6 steder pr. kubikmeter. Ved det effektive volumen af apparatet menes det volumen, som er optaget af kulturen, og i hvilket luftbehandling, næringsstofudnyttelse og vækst af mikroorganismerne, som befinder sig i kulturen, finder sted.

Det effektive volumen for mikroorganismevækst er den del af volumenet, i hvilket gennem masseoverførelse fra luftbobler en positiv opløst oxygenspænding (partialtryk af oxygen) kan vedligeholdes.

Hvis fermenteringsapparatet er et enkelt-tanks fermenteringsapparat er det effektive volumen i virkeligheden hele det volumen af tanken, som er optaget af kulturen. I et apparat af den art, der er beskrevet i GB patentskrift nr. 1.353.008 og 1.508.976 og DK patentskrift nr. 141.338, indbefatter det stigrøret og kan i nogle tilfælde indbefatte hele eller dele af faldrøret.

Fortrinsvis blandes methanolen med recirkuleret næringsstof, før den leveres til fermenteringsapparatet. Det foretrækkes også, at det methanolindeholdende stof leveres til kulturen gennem snævre åbninger, f.eks. inden for størrelsesområdet 2-6 mm diameter ved en hastighed over 3 m/sek., fortrinsvis over 6 m/sek.

En særlig egnet udførelsesform for et apparat til udøvelse af fremgangsmåden og af den i indledningen til krav 3 angivne art er ifølge opfindelsen ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 3 angivne. I dette apparat ifølge opfindelsen kan det vækstbegrænsende næringsstof leveres til kulturen ved hjælp af forskellige former for sprøjtesystemer, der er fremstillet af rør. Et praktisk anvendeligt arrangement består af et antal i hovedsagen lodrette rør, som er fordelt i fermenteringsapparatet ved hjørnerne af en eller flere regulære polygoner og forbundet med mindst én fælles kilde for næringsstof eller vækstbegrænsende næringsstof, idet væggen af hvert lodret rør er perforeret med huller, hvis frekvens varierer

passende langs opadgående eller nedadgående strømningslinier for strømmende kultur, idet på hinanden følgende huller i strømningslinien er anbragt i afstand i rørets omkredsretning i et regulært mønster.

5 I dette arrangement er antallet af i hovedsagen lodrette rør, fortrinsvis fra 4-16, fordelt ved hjørnerne af en eller flere koaksiale regulære figurer. Disse rør er fortrinsvis forbundet med et eller flere cirkulære rør med større udboring, som omslutter den regulære polygon eller polygonerne og er forbun-

10 det med en leveringskilde, der indeholder det vækstbegrænsende næringsstof. De lodrette rør kan også være forbundet med et antal af sådanne cirkulære leveringsrørsystemer, f.eks. tre, som er fordelt med ensartet afstand langs med højden af de lodrette rør og forbundet med forskellige leveringskilder.

15 De cirkulære rør er fortrinsvis anbragt ved de nedre ender af de lodrette rør.

I dette arrangement forøges den lodrette afstand mellem niveauerne for successive huller passende opad i retning af strømmen af kultur i fermenteringsapparatet. Imidlertid er

20 der i gennemsnit fortrinsvis fra et til fire huller pr. meter højde af de lodrette rør. I stigrøret i et fermenteringsapparat ifølge GB patentskrift nr. 1.353.008 eller nr. 1.508.976 eller DK patentskrift nr. 141.338, og som er 50 m højt, kan hvert lodret rør have fra 50-200 huller, fortrins-

25 vis ca. 100 huller. For tre lodret anbragte systemer kan antallet af huller pr. rør passende være 55, 30 og 15 i de tre niveauer respektive.

Når det beskrevne arrangement er installeret i stigrøret for et fermenteringsapparat ifølge GB patentskrift nr. 1.353.008

30 eller nr. 1.508.976 eller DK patentskrift nr. 141.338, og hvis det indbefatter en enkelt polygon, kan dets diameter fortrinsvis være mellem 0,55 og 0,75 gange stigrørets diameter, hvis dette er cylindrisk.

Når arrangementet indbefatter to koaksiale polygoner, er diameteren af den indre polygon fortrinsvis imellem 0,4 og 0,65 gange stigrøret, medens diameteren af den ydre polygon er imellem 0,65 og 0,9 gange. Når stigrøret indeholder skovle eller andre indvendige organer, er disse fortrinsvis arrangeret til, at de ikke danner nogen hindring for de lodrette rør. Hullerne i rørene er fortrinsvis af en diameter mellem 2 og 6 mm og er fortrinsvis anbragt omkring rørvæggen i et regulært mønster, f.eks. en skruelinie, eller alternativt pegende indad og udad i forhold til akse for apparatets beholder.

Foruden det nævnte arrangement kan andre geometriske arrangementer for sprøjtesystemer anvendes, f.eks. spiralrør eller ringe.

Et foretrukket arrangement for sprøjtesystemet til brug i et fermenteringsapparat ifølge GB patentskrift nr. 1.353.008, GB patentskrift nr. 1.508.976 og DK patentskrift nr. 141.338 indbefatter et enkelt lodret hovedrør anbragt centralt i fermenteringsapparatets løfterør og forbundet med et flertal vandrette sprøjteorganer, gennem hvilke det vækstbegrænsende næringsstof leveres til kulturen. Sprøjteorganerne er anbragt ved et antal niveauer langs længden af hovedrøret, og der findes et antal sprøjteorganer ved hvert niveau. Når løfterøret indeholder ledeskovle som beskrevet i det følgende, anbringes sprøjterørene i radiale slidser i ledeskovlene, hvorved det sikres, at det vækstbegrænsende næringsstof indføres i kulturen i regioner, hvor der er en høj strømningshastighed på grund af de snævre tværsnitsarealer i stigrøret, som forårsages af ledeskovlene.

I et fermenteringsapparat, hvor stigrøret er en ring, der omslutter faldrøret, kan et lignende arrangement af radiale vandrette sprøjteorganer bruges, men deres fælles levering vil være ringformede eller lodrette rør, gennem hvilke det vækstbegrænsende næringsstof pumpes til de enkelte sprøjteorganer.

Stigrørene for fermenteringsapparater ifølge GB patentskrift nr. 1.353.008, nr. 1.508.976 og DK patentskrift nr. 141.338 består fortrinsvis af rækker af ledeskovle til at kontrollere strømmen af kultur. Disse skovle kan f.eks. være anbragt med mellemrum på 1,2 m i løfterøret. Fortrinsvis lukker hver ledeskovl ca. 5/6 af tværsnitsarealet af stigrøret efterladende kun 1/6 af arealet åbent til gennemstrømning af kulturen. Det åbne areal kan være fordelt over et antal radiale slidser, f.eks. 16, hver af hvilke kan lukke halvdelen af dets areal og derved opnåelse af en passende slidsvide. Når slidserne er dækket, foretages dette på en sådan måde, at der dannes indre og ydre åbne zoner med ens eller i hovedsagen ens areal. Åbningerne i de massive ledeskovle behøver ikke at være radiale slidser, men kan være åbninger af enhver form, forudsat at skovlen indsnævrer gennemgangen gennem stigrøret til et tværsnitsareal, der er tilstrækkelig lille til at opnå den nødvendige forøgede hastighed, passende en hastighed på over 1 m/sek.. F.eks. kan åbningerne i ledeskovlene være cirkulære. I alle tilfælde foretrækkes det, at sprøjteorganerne er anbragt således, at de indsprøjter det vækstbegrænsende næringsstof i regioner for strømning med høj hastighed gennem ledeskovlsåbningerne.

Når stigrøret er delt i sektioner, den ene lodret over den anden, og disse sektioner har forskelligt tværsnitsareal og danner et "kar" og en "tud", er ledeskovlene installeret i begge sektioner.

I det følgende forklares opfindelsen under henvisning til tegningen, hvor

fig. 1 viser organerne til levering af næringsstof i et apparat til udøvelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen, set fra siden i perspektiv,

fig. 2 et snit igennem et apparat, hvori organerne til levering af næringsstof kan installeres,

fig. 3 et apparat til udøvelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen i en anden udførelsesform, hvori organerne til levering

af næringsstof kan installeres,

fig. 4 et stigrør til apparatet ifølge fig. 3, set fra oven,

fig. 5 et snit efter linien y-y i fig. 4,

5 fig. 6 et snit igennem apparatet ifølge fig. 2 forsynet med ledeskovle,

fig. 6A den del af fig. 6, som er omsluttet af en stiplede cirkel mærket C i større målestok, og

10 fig. 7 et snit igennem stigrøret til apparatet ifølge fig. 3 forsynet med skovle og et stel monteret deri.

Apparatet, der er vist i fig. 1, består af seks lodrette mediumsfordelingsrør 1, som er anbragt i hjørnerne af en regulær sekskant og forbundet med tre mediumsleveringsrør 2, der er anbragt ved forskellige højder langs rørene 1's længde.

15 Det laveste leveringsrør er forbundet med de nederste ender af fordelingsrørene 1. Hvert af leveringsrørene 2 har en cirkulær del, som er forbundet med fordelingsrørene 1 med en udadragende del, der er forbundet med et ikke vist mediumsleveringsrør. Fordelingsrørene 1 og de cirkulære dele af leveringsrørene 2 er perforeret med et flertal ikke viste huller.

20 Disse huller findes med mellemrum langs hele højden af fordelingsrørene 1, idet de er tættere sammen henimod de nedre ender af rørene end ved de øvre ender, således at den lodrette afstand imellem på hinanden følgende huller forøges op-

25 af langs rørene. På hinanden følgende huller er ikke anbragt lodret over hinanden, men er fordelt omkring rørenes omkreds dannende et passende mønster, f.eks. en skruelinie. På de cirkulære dele af leveringsrørene 2 er der anbragt huller med i hovedsagen ens vandret afstand fra hinanden, og disse

30 huller kan også være fordelt omkring den lodrette sektion af røret, f.eks. ved skiftevis at vende indad og udad i forhold til akse for fermenteringsbeholderen.

Fermenteringsbeholderne, der er vist i fig. 2 og 3, har hver et stigrør 6 og et faldrør 5. I begge eksempler er stigrøret 6 delt i to sektioner, den ene lodret over den anden, og den nedre sektion eller "kar" 4 er af større tværnsnitsareal end den øvre sektion eller "tud" 3. "Karret" 4 og "tuden" 3 er forbundet med hinanden ved hjælp af et forbindelsesstykke 7. I begge tilfælde har faldrøret 5 to sektioner den ene lodret over den anden, og den øvre sektion eller "choke" 8 har større tværnsnitsareal end den nedre sektion eller "afløb" 10.

10 "Tuden" 3 åbner ind i "choke" 8, medens den nedre ende af "afløb" 10 kommunikerer med "kar" 4. Luft sprøjtes ind i den nedre del af "kar" 4 gennem sprøjterør 11 og forårsager, at kultur, som befinder sig i hvert apparat, hæves opad i stigrøret og flyder over ind i "choke" 8 og derefter føres ind i 15 "afløb" 10. Kulturer opfylder hvert apparat op til niveauet A-A, og området over niveauet B-B i "choke" optages af boblende kultur. Det er fra området over niveauet B-B i "choke" 8, at luftarter udskilles fra kulturen og undslipper gennem porten 12 ved den øvre ende af hvert apparat. "Tuden" 3 og 20 "choke" 8 og også "afløbet" 10 og "karret" 4 er anbragt koaksialt. I apparatet ifølge fig. 2 omslutter "tud" 3 "choke" 8, og "kar" 4 omslutter "afløb" 10, medens i apparatet ifølge fig. 3 det omvendte er tilfældet, og "choke" og "afløb" omslutter stigrøret 6.

25 Figurerne 4 og 5 viser dele af stigrøret 6 i apparatet ifølge fig. 3 med en indretning til udøvelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen anbragt deri. I dette tilfælde har apparatet kun ét leveringsrør, som kommer ind i apparatet ved punktet 9.

30 Under driften af et apparat ifølge fig. 2 eller 3 leveres kulturmedium indeholdende carbonkilde og uorganiske næringsstoffer til kulturen i stigrøret 6 gennem leveringsrøret 2 og fordelingsrørene 1, idet det føres ind til kulturen gennem hullerne i leveringsrøret 2 og fordelingsrørene 1 ved i hovedsagen samme hastighed som kulturen bortfjernes ved et 35 punkt eller ved punkter, som ikke er vist på tegningen.

Ved systemet, der er vist i fig. 7, indeholder stigrøret 6 en række af lag af ledeskovle 13, som er anbragt med lodret afstand. Hver ledeskovl er delt i segmenter ved hjælp af slidser 14. Det lodrette hovedrør, gennem hvilket næringsstoffet kommer ind i apparatet, er vist ved 17 og er anbragt centralt i stigrøret 6. Sprøjterør 15 strækker sig radialt ud fra røret 17 ved hver ledeskovl og er anbragt i slidserne 14.

I systemet, der er vist i fig. 6 og 6A, omslutter stigrøret 6 faldrøret 5, og det geometriske arrangement af ledeskovle og sprøjterør adskiller sig derved fra det, der er vist i fig. 7. Imidlertid er systemet principielt det samme. Apparatet ifølge fig. 6 og 6A indeholder en række ledeskovle 18, som har en indbyrdes lodret afstand, og hver ledeskovl er delt i segmenter ved hjælp af slidser 19. Det vækstbegrænsende næringsstof kommer ind i apparatet gennem et flertal lodrette rør 21, hvoraf to passerer gennem hver slids 19, idet de er indbyrdes forbundet ved hjælp af et sprøjterør 20. Næringsstoffet passerer fra sprøjterørene 20 gennem huller 22, fig. 6A, ind i kulturen, når den strømmer ved forøget hastighed gennem slidserne 19. I systemet, der er vist i fig. 6 og 7, kan successive lag af ledeskovle være forsat i forhold til hinanden, således som det er beskrevet i GB patentskrift nr. 1.508.976. I dette tilfælde, nemlig i systemet ifølge fig. 6, må de lodrette rør 21 være bøjet for at optage forsetningen af lagene af ledeskovle.

P a t e n t k r a v .

1. Fremgangsmåde til kontinuerlig aerob fermentering af en kultur i et fermenteringsapparat, hvori en kultur tilføres et vækstbegrænsende næringsstof, k e n d e t e g n e t ved, at det vækstbegrænsende næringsmedium tilføres kulturen på flere steder, dog mindst ét sted pr. kubikmeter effektivt volumen af kulturen.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det vækstbegrænsende næringsstof er en carbonkilde, som kan assimileres af mikroorganismene, og at mængden af vækstbegrænsende næringsstof, som leveres ved ethvert sted, stø-
5 kiometrisk svarer til den lokalt tilgængelige levering af oxygen.

3. Apparat til udøvelse af fremgangsmåden ifølge krav 1 og 2 til kontinuerlig aerob fermentering af en kultur, hvori et vækstbegrænsende næringsstof tilføres en kultur, k e n d e-
10 t e g n e t ved organer til kontinuerlig levering af et vækstbegrænsende næringsstof ved flere steder, men med et gennemsnit på mindst ét sted pr. kubikmeter af apparatets effektive volumen.

Fremdragne publikationer:

DE fremlæggelsesskrift nr. 2243003
NO patent nr. 52772
US patenter nr. 2822319, 3405920.

FIG. 1.

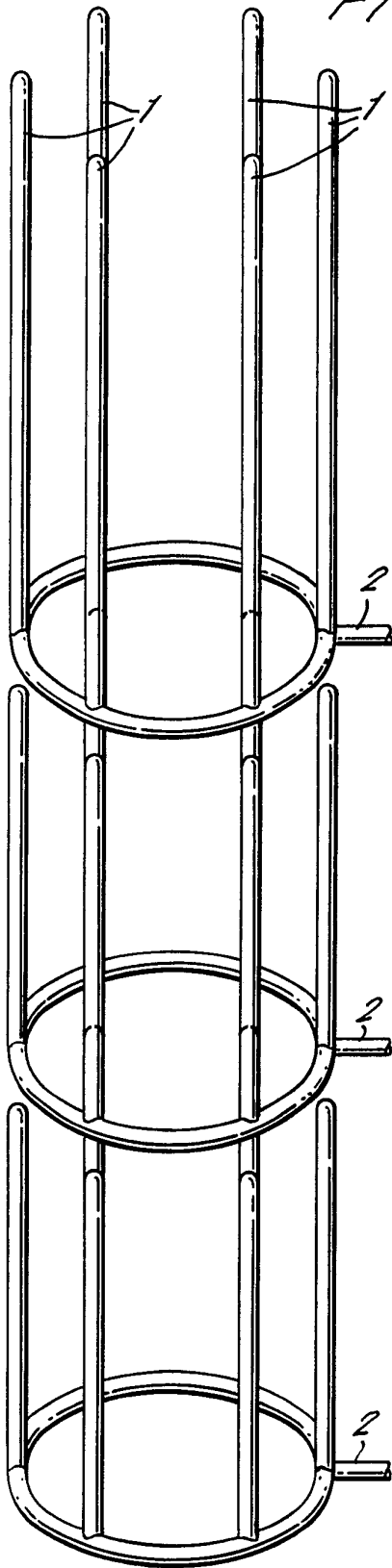
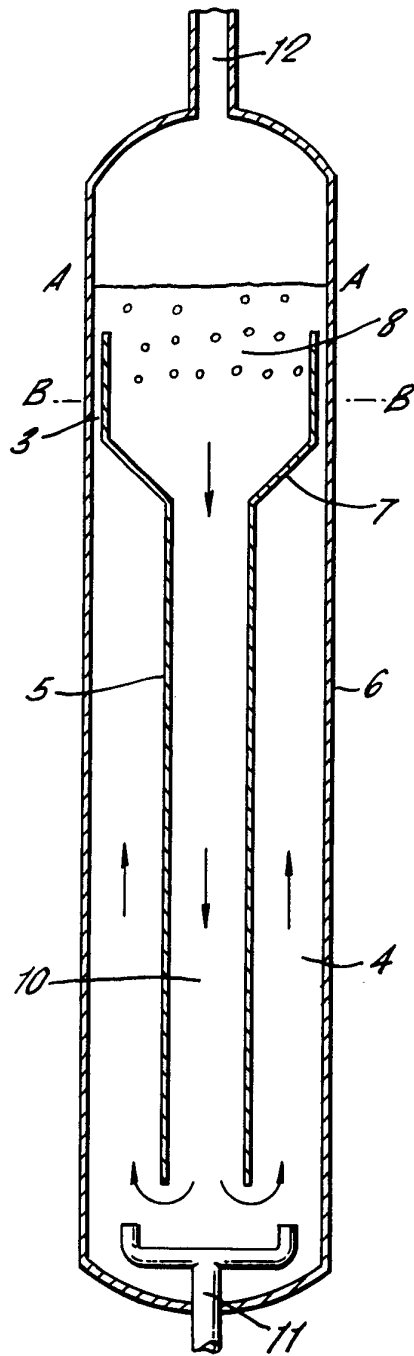


FIG. 2.



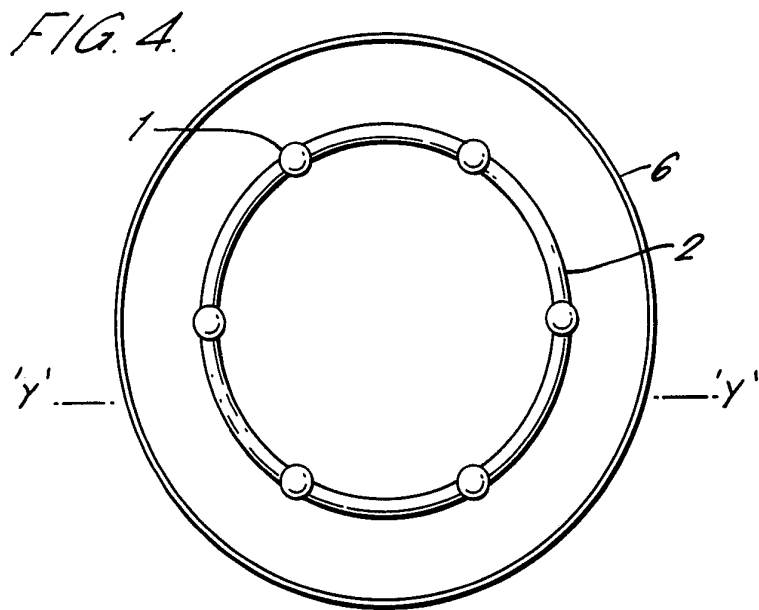
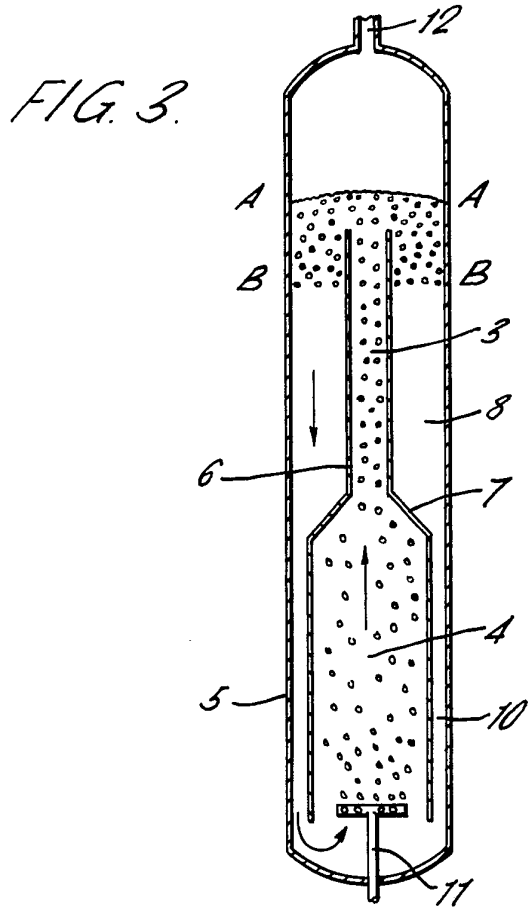


FIG. 5.

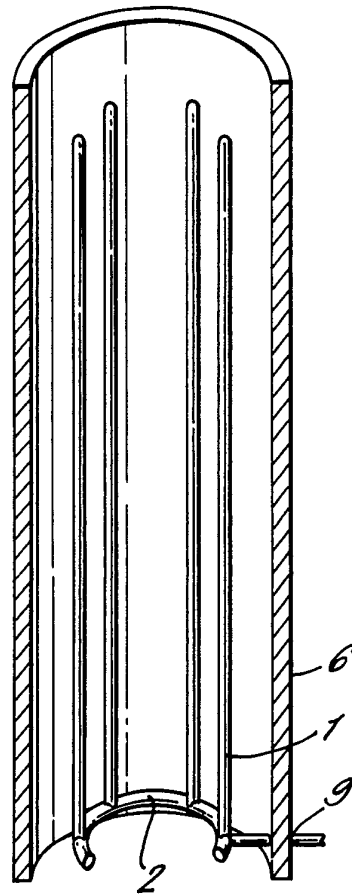


FIG. 6.

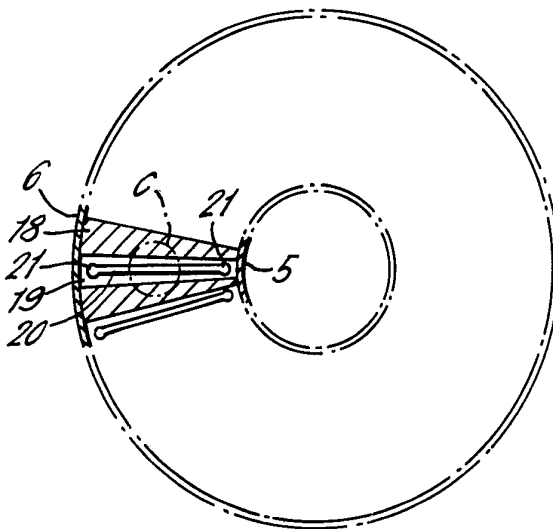


FIG. 6A.

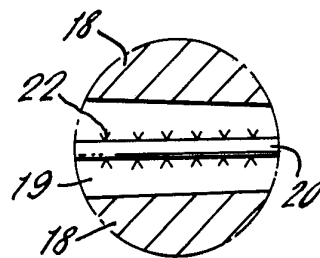


FIG. 7.

