



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 29 Absatz 1 des Patentgesetzes

ISSN 0433-6461

(11)

1592 65

Int.Cl.³

3(51) C 12 Q 3/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21) WP C 12 Q/ 2244 07

(22) 08.10.80

(45) 02.03.83

- (71) ADW DER DDR, INSTITUT FÜR TECHNISCHE CHEMIE, LEIPZIG;DD;
(72) WAGLER, DIETRICH,DR. RER. NAT. DIPL.-CHEM.;SCHULZ, HANS-JOACHIM,DIPL.-MATH.;
PRAUSE, MICHAEL,DR. RER. NAT. DIPL.-CHEM.;PETZOLD, GERHARD,DIPL.-CHEM.;DD;
RAASCH, ERNST,DIPL.-ING.;DD;
(73) siehe (72)
(74) ADW DER DDR, INST. F. TECHN. GASE, AG PATENTWESEN, 7050 LEIPZIG, PERMOSERSTR.
15

(54) VERFAHREN ZUR REGELUNG DER KULTIVIERUNG VON MIKROORGANISMEN

(57) Die Erfindung beinhaltet ein Verfahren zur Regelung der Kultivierung von Mikroorganismen. Sie betrifft das Gebiet der technischen Mikrobiologie und hat das Ziel, eine genügend genaue und verzögerungsfrei arbeitende Methode zur Bestimmung der Produktivität der Biomassessynthese zu schaffen und die Dosierung von Nährsalzen und der C-Quelle so zu regeln, daß die Stabilität des Prozesses erhöht und ein minimaler Einsatz von Rohstoffen gewährleistet wird. Das Wesen der Erfindung besteht darin, daß auf der Grundlage eines konstanten spezifischen Verbrauchskoeffizienten (insbesondere für N) durch Bestimmung der vollständigen Bilanz eine Methode zur Ermittlung der Produktivität des Prozesses erarbeitet und eine Vorschrift zur Regelung der Dosierung von Nährlösung und Substrat gegeben wird. Die Erfindung ist anwendbar auf alle Kultivierungsverfahren von Mikroorganismen, die auf der Basis einer beliebigen C-Quelle und einer wäßrigen N- und alle notwendigen Nähr- und Spurensalze enthaltenden Nährlösung arbeiten, und ist unabhängig vom Fermentortyp.

Titel der Erfindung

Verfahren zur Regelung der Kultivierung von Mikroorganismen

Anwendungsgebiet

5 Das Verfahren betrifft das Gebiet der mikrobiologischen Industrie und dient der Produktivitätsbestimmung und der Regelung biotechnologischer Verfahren der Massenkultivierung von Mikroorganismen unter aeroben Bedingungen, wobei die Kultivierung in einem wäßrigen Nährmedium, mit einer beliebigen C-Quelle und in einem beliebigen Fermentortyp erfolgt. Das Verfahren
10 gehört in die IPK C12B.

Charakteristik der bekannten Lösungen

15 In bekannten Verfahren zur Massenkultivierung von Mikroorganismen wird die Produktivität x auf unterschiedliche Weise bestimmt. Verbreitet sind gravimetrische Methoden, die stark fehlerbehaftet sind und mehrere Stunden bis zum Vorliegen des Meßwertes benötigen, nephelometrische Methoden, die insbesondere bei Fermentationen mit einer zweiten flüssigen Phase und bei hohen Zelldichten versagen, und spektralphotometrische Methoden, die nur bei ungestörtem Prozeßverlauf und konstantem Cytochromgehalt in der Zellsubstanz brauchbare Werte liefern. Alle diese Verfahren ermitteln die Produktivität über die Beziehung

$$x = \frac{\dot{x}}{\tau}$$

x = Zelldichte	[g/kg]
τ = Verweilzeit	[h]
$\dot{x}$ = Produktivität	[g/kg·h]

aus der Zelldichte und haben den Nachteil, daß sie nur im stationären Zustand anwendbar sind, so daß gegebenenfalls beträchtliche Verzögerungen eintreten.

Die Dosierung von Substrat und Nährmedium erfolgt in den bekannten Verfahren der Massenkultivierung von Mikroorganismen im allgemeinen in einem festen Verhältnis und in konstanter Menge je nach Verbrauchskoeffizienten und projektierter Produktivität. Um Limitationen einzelner Komponenten zu vermeiden, wird meist zu viel dosiert. Neben dem damit verbundenen Nachteil eines unökonomischen überhöhten Rohstoffeinsatzes und Aschegehaltes des Endproduktes besteht die Gefahr der Inhibition des Mikroorganismenwachstums durch zu hohe Konzentrationen einzelner Nährlösungskomponenten. Es ist weiterhin bekannt, daß die Verbrauchskoeffizienten nicht konstant sind und von den Konzentrationen in der wäßrigen Phase abhängen. Sie erreichen ihren Minimalwert nur in der Nähe limitierender Konzentrationen. Durch Überdosierung tritt neben den bereits erwähnten Nachteilen noch der Nachteil des überhöhten Verbrauchs auf. Eine prozeßtechnisch günstige und ökonomische Fahrweise stellt also die Forderung nach einer Dosierung, deren Resultat stabile und möglichst niedrige Konzentrationen der zu verbrauchenden Komponenten sind. Verfahren zur Regelung der Dosierung des Nährmediums werden in den Patentschriften DE-PS 1080048, DE-OS 2457044, SU-US 452236 und SU-US 506621 beschrieben, ohne das Problem vollständig und allgemein anwendbar lösen zu können.

Der Erfindung am nächsten kommen die technischen Lösungen in den Patentschriften DE-AS 2217909, DE-OS 2418755 und in der Anmeldung WP C12 B/220233.

In der DE-AS 2217909 wird folgendes Verfahren angegeben:

Das Nährmedium enthält unter anderem ein Ammoniumsalz einer starken Mineralsäure. Die C-Quelle wird gemeinsam mit einer der zur Neutralisation der frei werdenden starken Säure erforderlichen Base in Abhängigkeit von der Abnahme der verbrauchten Ammoniumionen dosiert. Der Verbrauch der Ammoniumionen wird an der zur Neutralisation erforderlichen Menge der Base gemessen. Das Verfahren hat den Nachteil, daß es nur anwendbar ist, wenn das Nährmedium außer der an NH_3 gebundenen Mineralsäure keine weitere Mineralsäure enthält. Diese Bedin-

- gung ist aber meist nicht erfüllt, da zur Vermeidung von Sedimentationen das Nährmedium stark angesäuert wird. Die Nährlösung wird nach einem Programm dosiert, so daß eine Anpassung an veränderte Prozeßzustände nicht erfolgen kann.
- 5 In der DE-OS 2418755 wird die Wachstumsgeschwindigkeit der Biomasse dadurch konstant gehalten, daß man die Geschwindigkeit des Verbrauchs von NH_3 konstant hält. Hier wird die strenge Proportionalität zwischen Proteinbildung und NH_3 -Verbrauch ausgenutzt, obwohl das Ursache-Wirkungs-Prinzip nicht
- 10 richtig zugrunde gelegt wird, denn es läßt sich zwar die NH_3 -Dosierung steuern, nicht aber deren Verbrauch, so daß ein sicheres Funktionieren der Regelung nicht garantiert ist. Auf veränderte Umweltbedingungen, die die Wachstumsgeschwindigkeit verändern, wird nicht eingegangen. Es wird zwar erwähnt, daß
- 15 nach einer Änderung des NH_3 -Verbrauchs geeignete Maßnahmen ergriffen werden, um den ursprünglichen Wert des NH_3 -Verbrauchs und damit auch der Wachstumsgeschwindigkeit wieder einzustellen, aber eine konkrete Anleitung zum Handeln wird nicht gegeben.
- 20 Weiterhin wurde bereits vorgeschlagen, die Nährlösungsdosierung zu regeln (WP C12B 220233). Dabei wird die Konzentration an Phosphationen in der Kultivierungslösung als Regelgröße verwendet. Die Konzentration an Phosphat wird zwischen 20 und 60 mg/l gehalten. Dadurch treten eine Prozeßstabilisierung
- 25 und eine Senkung des Rohstoffeinsatzes ein. Beeinträchtigungen der Güte des Verfahrens können aber durch Speicherung des Phosphors in der Biomasse entstehen. Das führt insbesondere zu Fehldosierungen bei proportional zum Phosphor dosierten Salzen.
- 30 Insgesamt haben die bekannten Verfahren den Nachteil, daß eine hinreichend genaue und verzögerungsfreie Methode zur Produktivitätsbestimmung fehlt. Die Dosierung von Nährlösung und Substrat kann insbesondere bei veränderten Prozeßbedingungen nicht so stabil erfolgen, daß Fehldosierungen, die sich sowohl ökonomisch auswirken als auch den Prozeß negativ beeinflussen, vermieden werden können.

Ziel der Erfindung

Die Dosierung von Nährsalzen und Substrat richtet sich nach den spezifischen Verbrauchskennziffern und der Produktivität des Prozesses. Ziel der Erfindung ist eine von der Zelldichtebestimmung unabhängige, verzögerungsfreie und hinreichend genau Methode zur Ermittlung der Produktivität und darauf aufbauend eine solche Dosierung von Nährsalzen und Substrat, die sich veränderten Prozeßbedingungen rasch anpaßt und damit die Stabilität des Prozesses erhöht, einen minimalen Einsatz von Rohstoffen erlaubt, die Verbrauchskoeffizienten und den Aschegehalt minimal hält und damit die Ökonomie des Verfahrens der Kultivierung von Mikroorganismen verbessert.

Darlegung des Wesens der Erfindung

- Aufgabenstellung

Aufgabe der Erfindung ist es, unter Verwendung einer kontinuierlich oder in kurzen Zeitintervallen fast verzögerungsfrei diskontinuierlich meßbaren Größe Bilanzbeziehungen aufzustellen, die eine Produktivitätsbestimmung gestatten und ebenfalls auf der Grundlage von Bilanzbeziehungen eines Bestandteiles der Nährlösung eine Vorschrift für die Dosierung von Substrat und Nährmedium zu erarbeiten.

- Lösungsweg

Grundlage der technischen Lösung ist die Tatsache, daß auf Grund der spezifischen Verbrauchskoeffizienten alle Komponenten des wäßrigen Nährmediums und das Substrat in einem festen Verhältnis dosiert werden können und jedes im Nährmedium befindliche Ion prinzipiell als Leition für eine Regelung verwendet werden kann, das nicht zur Speicherung in der Zellsubstanz neigt und sich somit immer in einem konstanten stöchiometrischen Verhältnis umsetzt. Diese Eigenschaft trifft insbesondere auf den Stickstoff zu. Die Erfindung nutzt das in zweierlei Hinsicht:

1. Aus dem N-Verbrauch wird auf die Biomasseproduktivität geschlossen und

2. wird auf dem N-Verbrauch eine Regelung der Nährlösungs- und Substratdosierung aufgebaut.

Es ist bekannt, daß der Verbrauchskoeffizient α_x^N in bezug auf Rohprotein konstant ist (bei konstantem Rohproteingehalt also auch in bezug auf die Biomasse), so daß mit

$$\alpha_x^N = \frac{r_N}{\alpha_x^N} \quad (1)$$

bei einer vollständigen Bestimmung der N-Bilanz

$$r_N = \frac{1}{m_F} (C_{NH_3}^E \cdot \dot{V}_{NL} - (\dot{V}_{NL} + \dot{V}_L + \dot{V}_W) \cdot C_{NH_3} - V_F \frac{dC_{NH_3}}{dt}) \quad (2)$$

eine Methode zur Ermittlung der Biomasseproduktivität (besser noch der Rohproteinproduktivität, die eigentlich interessiert) gegeben ist. Diese Methode ist mit geringfügig geänderter Bilanzgleichung auch dann durchführbar, wenn außer der zur Regelung verwendeten N-haltigen Nährlösung noch andere N-haltige Eingangsströme (z.B. rückgeführtes Prozeßwasser, NH_3 -Wasser zur pH-Regelung anstelle einer starken Base) vorhanden sind.

15 Verwendete Symbole:

	$C_{NH_3}^E$	Konzentration NH_3 in Nährlösung	[g/l]
	C_{NH_3}	Konzentration NH_3 im Medium	[g/l]
	$\dot{V}_{NL}$	Dosiermenge Nährlösung	[l/h]
	$\dot{V}_L$	Dosiermenge Lauge	[l/h]
20	$\dot{V}_W$	Dosiermenge Wasser	[l/h]
	α_x	Produktivität	[g/kg·h]
	r_N	N-Übergangsgeschwindigkeit	[g/kg·h]
	α_x^N	spez. N-Verbrauch	[g/g]
	m_F	Fermentormasseinhalt	[kg]
25	V_F	Volumen der wäßrigen Phase	[l]

Erfindungsgemäß wird C_{NH_3} entweder kontinuierlich gemessen (mit einem Meßgerät) oder in kurzen Zeitabständen diskontinuierlich bestimmt. Aus den Zeitreihen wird nach einer bekann-

ten Glättungsprozedur (insbesondere Splinefunktionen o. ä.) $\frac{dc_{NH_3}}{dt}$ gebildet, und mit den Meßwerten $\dot{V}_{NL}$, $\dot{V}_L$, $\dot{V}_W$, m_F und V_F werden nach (2) der N-Verbrauch und nach (1) die Produktivität bestimmt.

Mit Kenntnis von x werden weiterhin nach

$$\alpha_x^i = \frac{r_i}{x} \quad (3)$$

r_i = Übergangsgeschwindigkeiten aller Reaktanten die Verbrauchskoeffizienten für Substrat, Sauerstoff und wichtige Ionen bestimmt. Diese Koeffizienten können sich bei veränderter Umwelt (ρ , γ , aktuelle Konzentrationen in Lösung) und veränderter Zusammensetzung der Eingangsstoffe ändern. Limitiert einer dieser Reaktanten den Prozeß, tritt durch die Änderung seines spezifischen Verbrauchskoeffizienten eine Änderung der Produktivität ein. Aus der aktuellen Ermittlung dieser Verbrauchskoeffizienten ergeben sich zwei unmittelbare Vorteile: Die Dosierung der Reaktanten kann den veränderten Bedingungen sofort angepaßt und die Rezeptur der Nährlösung kann korrigiert werden.

Durch die erfindungsgemäße Bestimmung von x wird eine sofortige proportionale Anpassung der Dosiermengen von Substrat und Nährlösung an veränderte Prozeßzustände (verändertes x) möglich. Der gleiche Fall liegt vor, wenn der Prozeß z. B. optimal gesteuert wird und als Ergebnis der Steuermaßnahmen ständig neue optimale Produktivitäten und zugehörige Dosiermengen für Substrat und Nährlösung eingestellt werden müssen.

Für die Regelung der NH_3 -Konzentration im Fermentationsmedium wird der Sollwert der Dosiermenge $\dot{V}_{NL}$ der Nährlösung (N-haltige Komponente) wie folgt berechnet:

$$\dot{V}_{NL} = \left[\frac{\sum \dot{V}}{\left(1 - e^{-\frac{\sum \dot{V}}{V_F} t}\right)} \left(c_{NH_3}^{Soll} - c_{NH_3}^0(t) e^{-\frac{\sum \dot{V}}{V_F} t} \right) + r_N \cdot m_F \right] \frac{1}{c_{NH_3}^E}$$

0

$$\sum \dot{V} = \dot{V}_{NL} + \dot{V}_W + \dot{V}_L \quad [1/h]$$

$$t = \text{Zeit} \quad [h]$$

$$c_{NH_3}^{Soll} = \text{Sollwert } NH_3 \quad [g/l]$$

$$c_{NH_3}^0(t) = \text{Istwert } NH_3 \quad [g/l]$$

Die Zeit wird im Bereich $(0,25\tau < t < 0,75\tau)$ gewählt.

Die vorliegende Erfindung hat den Vorteil, daß auch Nährmedien, die zum Zweck der besseren Löslichkeit der anorganischen Salze zusätzlich Mineralsäure enthalten, eingesetzt werden können. Weiterhin werden Substrat und Nährlösung nicht nur proportional zur Biomassebildung dosiert, sondern insbesondere bei veränderten Prozeßbedingungen dem momentan erforderlichen Verbrauch entsprechend, der sich aus der x-Bestimmung und der Nachführung (Korrektur) der spezifischen Stoffverbräuche ergibt. Das erfindungsgemäße Verfahren besitzt durch die simultane Bestimmung von x allen Verfahren gegenüber, die mit konstantem x oder einem aus der Zelldichte bestimmten arbeiten, den Vorteil, daß es schneller auf Störungen reagiert und nicht erst deren Auswirkungen abwarten muß. Weiter besteht der Vorteil, daß N im Gegensatz zu P nicht zu einer Speicherung in der Biomasse neigt und damit auf Grund des konstanten Verbrauchskoeffizienten α_x^N eine stabilere Regelung möglich ist (das wirkt sich besonders auf die proportional dosierten übrigen Ionen aus).

Durch die Erfindung wird die Konzentration des Stickstoffs im Fermentationsmedium stabil in der Nähe des niedrigen Sollwertes gehalten (der Sollwert wird zweckmäßig im Bereich zwischen 40 und 150 mg/l gewählt), was zur Stabilisierung des Prozesses, zur Senkung des Rohstoffeinsatzes und des Aschegehaltes des Endproduktes und insgesamt zur Verbesserung der Ökonomie des Verfahrens beiträgt.

Im nachfolgenden Beispiel wird die Erfindung näher erläutert:
Beispiel

Es wurde ein Fermentationsversuch mit folgenden Parametern durchgeführt:

30	m_f	10	[kg]	
	V_{Substrat}	0,7	[l/h]	
	V_{NL}	0,5	[l/h]	Die Meßwerte schwankten um diese Mittelwerte wegen der Regelung von V_{NL} und einer Rechenschaltung, die V_W so einstellt, daß $\sum V = \text{const.}$
	V_W	1,2	[l/h]	
35	V_L	0,1	[l/h]	
	τ	4	[h]	
	ϑ	33	[°C]	
	Dauer	50	[h]	Abfragezyklus 1 Messung/15 min
	$c_{NH_3}^E$	6,4	[g/h]	

$c_{\text{NH}_3}^{\text{Soll}}$ 0,08 g/l
 0,085 g/l (Umstellung nach 25 h)
 0,013 g/l (Umstellung nach 40 h)

Die Produktivität schwankte zwischen 2,8 und 3,3 g/kg · h.

- 5 Die Abweichungen zwischen der experimentellen (durch Stichproben über Zelldichtebestimmungen) und der erfindungsgemäßen Bestimmung über die N-Bilanz betrugen durchschnittlich 5%.

- 10 Die Güte der Regelung der NH_3 -Konzentration wird durch folgende Übersicht ausgewiesen:

<u>Regelabweichung</u>	<u>0-1 %</u>	<u>1-2 %</u>	<u>2-3 %</u>	<u>> 3 %</u>
Anteil der Meßwerte	42 %	28 %	17 %	13 %

Patentansprüche

1. Verfahren zur Regelung der Kultivierung von Mikroorganismen mit beliebiger C-Quelle, einem wäßrigen alle notwendigen anorganischen Salze enthaltenden Nährmedium und unter aeroben Bedingungen, gekennzeichnet dadurch, daß die Produktivität der Biomasseproduktion aus der vollständigen Massenbilanz eines genügend genau und verzögerungsfrei meßbaren Bestandteiles des Nährmediums, der sich mit konstantem Verhältnis zur Zellsubstanz umsetzt, bestimmt wird, daß dieses Bestandteil des Nährmediums als Leition für die dazu in festen Verhältnissen stehende Dosierung von Substrat und den übrigen Bestandteilen der Nährlösung verwendet wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß als Leition das Ammonium und als Regelgröße die Konzentration der Ammoniumionen in der wäßrigen Kultivierungslösung verwendet werden.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, gekennzeichnet dadurch, daß als Produktivität die Raum-Zeit-Ausbeute an Rohprotein verwendet wird.
4. Verfahren nach Punkt 1 und 2, gekennzeichnet dadurch, daß der Sollwert für die Dosierung der N-haltigen Nährlösung aus dem Sollwert und dem Istwert der Konzentration der Ammoniumionen in der wäßrigen Kultivierungslösung und der momentanen Produktivität berechnet und daß der Sollwert für

die Konzentration der Ammoniumionen zwischen 40 mg/l und 150 mg/l gewählt wird.

5. Verfahren nach Punkt 1, 2, 3, gekennzeichnet dadurch, daß aus der Produktivität und den Verbräuchen der zur Biomasseproduktion erforderlichen Komponenten die spezifischen Verbrauchskoeffizienten neu bestimmt und daß aufgrund veränderter spezifischer Verbrauchskoeffizienten die Rezepturen für die proportionale Dosierung dieser Komponenten geändert werden.
6. Verfahren nach Punkt 1, 2, 3, 4 und 5, gekennzeichnet dadurch, daß bei Änderung der Substratzusammensetzung (insbesondere bei Paraffingemischen) die Dosiermengen für Substrat den veränderten Bedingungen angepaßt werden.
7. Verfahren nach Punkt 1, 2, 3, 4, gekennzeichnet dadurch, daß ein Teil des wäßrigen Nährmediums zurückgeführt wird und daß darin eventuell vorhandene Mengen des Leitions und anderer Komponenten in der Bilanzierung für die Produktivitätsbestimmung und die Regelung der Nährsalzdosierung berücksichtigt werden.