(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PATENTSCHRIFT

(12) Ausschließungspatent

(11) DD 298 283 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 Q 3/00

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 Q / 323 963 3	(22)	27.12.88	(44)	13.02.92

(71) siehe (73)
(72) Helmke, Claus, Dipl.-Math.; Wolleschensky, Erhard, Dr. Dipl.-Phys.; Conrad, Annette, Dipl.-Biol.; Porwol, Karin, Dipl.-Biol.; Schubert, Anneliese; Macha, Dorothea; Treise, Karin, DE
(73) JENAPHARM GmbH, Otto-Schott-Straße 15, O - 6900 Jena, DE

(54) Verfahren zur Steuerung des Beginns kohlenstoffsubstratgeführter mikrobieller Produktbildungen

(55) Steuerverfahren; Produktbildungsprozesse, mikrobielle; Zufütterungsprinzip, zyklisch; Kohlenstoffsubstratimpulse; Verwertungsintensität; Sollprofil

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Steuerung des Beginns kohlenstoffsubstratgeführter mikrobieller Produktbildungsprozesse nach dem Zufütterungs- und zyklischen Zufütterungsprinzip. Es werden Kohlenstoffsubstratimpulse mit prozeßangepaßten Substratmengen in das Kulturmedium eingetragen. Der gemessene und der beobachtete Verlauf der Verwertungsintensität eines jeden Substratimpulses wird zu dem prozeßspezifischen Sollprofil des Verwertungsverlaufes in Relation gesetzt. Das Verfahren wird dann weitergeführt, wenn die Anzahl der auftretenden Verwertungsphasen die des Sollprofiles nicht unterschritten haben, wobei die Verwertungsphasen jeweils durch Zunahme und Abnahme der Verwertungsintensität markiert sind. Es werden solange Substratimpulse zudosiert, wie der jeweilige Verlauf der Verwertungsintensität im Vergleich zum Sollprofil in der Anzahl der Verwertungsphasen und in den Relationen der Verwertungsphasenzeitspannen abweicht.

ISSN 0433-6461

3 Seiten

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Steuerung des Beginns kohlenstoffsubstratgeführter mikrobieller Produktbildungen, **dadurch gekennzeichnet,** daß bei mikrobiellen Produktbildungsprozessen nach dem Zufütterungs- und dem zyklischen Zufütterungsprinzip Kohlenstoffsubstratimpuls in das Kulturmedium eingetragen werden und der gemessene und der beobachtete Verlauf der Verwertungsintensität jedes Substratimpulses zu dem prozeßspezifischen Sollprofil des Verwertungsverlaufes in Relation gesetzt wird und die Inbetriebnahme der mikrobiellen Produktbildung dann weitergeführt wird, wenn der Anzahl der auftretenden Verwertungsphasen die des Sollprofiles nicht unterschritten haben, wobei Verwertungsphasen jeweils durch Zu- und Abnahme der Verwertungsintensität markiert sind, und zur Inbetriebnahme solange Substratimpulse zudosiert werden, wie der jeweilige Verlauf der Verwertungsintensität im Vergleich zum Sollprofil in der Anzahl der Verwertungsphasen und in den Relationen der Verwertungsphasenzeitspannen abweicht.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß als Beobachtungsgrößen zur Beurteilung des Verlaufes der Verwertungsintensität digital und/oder analog ausgewertete Meßeinrichtungen für Wasserstoffionenkonzentration und/oder Gelöstsauerstoffpartialdruck und/oder Sauerstoffgehalt in der Abluft und/oder Kohlendioxyd in der Abluft und/oder aus diesen Größen gefolgerte Größen, die zumindest eine der vorgenannten Größen als Bestandteil enthalten, verwendet werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet,** daß die im Kulturmedium und/oder als Zufütterungssubstrate Nährsubstrate eingesetzt werden, die sämtlich oder teilweise komplexer Natur sind.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Bevorzugtes Anwendungsgebiet sind mikrobielle Produktbildungsprozesse nach dem Zufütterungs- und zyklischen Zufütterungsprinzip, bei denen der mikrobielle Produktbildner in der Zufütterungskomponente des oder der Kohlenstoffsubstrate limitiert versorgt wird und über die definierte Versorgung mit Kohlenstoffsubstraten der Produktbildungsablauf geführt wird.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Bei den in der Regel mehrstufig gestalteten Prozessen zur mikrobiellen Produktbildung dienen die dem Produktbildungsabschnitt vorgelagerten Maßnahmen der Bereitstellung einer genügend großen Menge an mikrobiellem Produktbildner. Die Anzuchtstufen dienen gleichfalls der Ausprägung von Stoffwechseleigenschaften und vorteilhafter morphologischer Eigenschaften für die Prozeßführung. Die Inbetriebnahme der mikrobiellen Produktbildung erfolgt gegenwärtig nach

- Zeitprogramm,
- Zeitprogramm und Kontrollanalytik zu Substratlimitationen,
- physikalisch/chemischen Eigenschaften der Submerskulturen,
- mikrobiologisch/morphologischen Beurteilungen.

Die Inbetriebnahmemethoden haben folgende Nachteile:

- Sie ermöglichen nur unzulänglich den Bezug auf den Entwicklungsstand der verfügbaren Biosynthesekapazität,
- Rückstände an verwertbaren Kohlenstoffquellen aus den Anzuchtphasen werden nicht definiert abgebaut,
- die Kontrolle des Substratverwertungsverhaltens fehlt,
- Verfahrensübertragungen in andere Reaktoren und in andere Reaktormaßstäbe werden nur unzureichend unterstützt,
- industrielle Fermentationen benutzen vorrangig komplexe Nährsubstratquellen mit Schwankungen in deren Zusammensetzung und daraus erwachsenden Anpassungsbedarf in der Prozeßführung – eine Seite, die bei Anwendung der gegenwärtigen Inbetriebnahmemaßnahmen nur mangelhafte Unterstützung erfährt,
- Prozeßanpassungen bei Nährstoffkomponenten- und/oder Zufütterungskomponentenaustausch sind unzureichend unterstützt.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es:

- leistungsstarke, robuste mikrobielle Produktbildungsprozesse zu schaffen,
- kohlenstoffsubstratgeführte Produktbildungen optimal vorzubereiten,
- die Reproduzierbarkeit der Fermentationen und damit deren Ökonomie zu verbessern,
- alle Formen von Prozeßanpassungen und -umstellungen zu beschleunigen und unproduktive Materialaufwendungen zu reduzieren,
- variierende Auswirkungen der Prozeßvorgeschichte störungsausgleichend für die Produktbildung zu kompensieren,
- Reaktorgegebenheiten, Kulturlösungsbeschaffenheiten und Verwertungscharakteristika der Produktbildner so in die Inbetriebnahme einzubeziehen, daß das Verfahren selbstanpassenden Charakter erhält.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, für kohlenstofflimitierte mikrobielle Produktbildungsprozesse ein Verfahren zur Steuerung des Beginns der kohlenstoffsubstratgeführten Produktbildungen zu schaffen, indem das Verwertungsverhalten des Produktbildners kontrolliert geführt und auf die prozeßspezifischen Verwertungserfordernisse eingestellt wird. Dabei soll im Komplex der erforderliche Ausprägungsgrad des mikrobiellen Stoffverwertungsvermögens und die Beseitigung von Kohlenstoffresiduen aus den Anzuchtphasen des mikrobiellen Produktbildners erreicht werden. Es ist somit die Aufgabe der Steuerung, für prozeßgerechte Übergänge von den Anzuchtphasen der mikrobiellen Produktbildner zu den Produktbildungsphasen zu sorgen und dieses in konzentrierter Sicht für die Kohlenstoffsubstratverwertung zu gestalten. Überraschenderweise bilden diese Maßnahmen zur Verwertungsprofilierung darüber hinaus den Ausgangspunkt für drastisch leistungsgesteigerte Produktbildungsabläufe und damit für Ertragssteigerungen in der Produktausbeute der Fermentationen. Die verwendeten biotechnologischen Reaktoren für den aseptischen Betrieb besitzen Einrichtungen zur Zuführung des oder der Kohlenstoffsubstrate und zur Messung und/oder Beobachtung des Verlaufes der Verwertungsintensität.
Erfindungsgemäß werden zur Lösung der Aufgabe Kohlenstoffsubstratimpulse in das Kulturmedium eingetragen, deren Substratmengen prozeßangepaßt gewählt werden, so daß sich im Verlaufsprofil der Verwertungsintensität deutlich ausgeprägte Verwertungsphasen abzeichnen. Verwertungsphasen sind jeweils durch Zunahme und Abnahme der Verwertungsintensität markiert. Die Maßnahmen zur Steuerung basieren auf dem Vergleich zwischen dem aktuell gemessenen Verlauf und den Merkmalen des prozeßzugeordneten Sollverlaufes der Verwertungsintensität, der die Struktur des Verwertungsverhaltens der Produktbildungskultur repräsentiert, die keine sich störend auswirkenden Kohlenstoffsubstratquellen enthält. Ergibt es sich, daß der gemessene Intensitätsverlauf bei der Verwertung eines Substratimpulses verglichen mit dem Sollverlauf eine geringere Anzahl von Verwertungsphasen enthält, dann müssen die Operationen zur Steuerung des Beginns der Produktbildung abgebrochen werden, da nicht alle Substratbestandteile einer Verwertung unterzogen werden, und es müssen die vorgelagerten Maßnahmen zur Ausprägung der Stoffverwertung komplettiert werden. Ein solches Erscheinungsbild ist nur in Havariefällen zu erwarten, es muß aber unbedingt behandelt werden, da sonst in der Folge störende Substratpufferungen resultieren. Die Substratimpulse sind solange zu wiederholen, wie es gegenüber dem Sollprofil zusätzliche Verwertungsphasen gibt und wie verlängerte Verwertungsphasen auftreten. Mit der Impulsfolge werden in kontrollierter Form Substratpuffer im Kulturmedium abgebaut, so daß das Verwertungsverhalten auf das Sollverhalten zugeführt wird.

Ausführungsbeispiel

Das Verfahren zur Steuerung der Inbetriebnahme der Produktbildung wird am Beispiel einer Penicillinfermentation demonstriert. Die Fermentation wird in Form einer Submerskultur in einem 3-m^3-Rührkessel durchgeführt. Als mikrobieller Produktbildner kommt eine Selektante von Penicillium crysogenum zum Einsatz. Dessen Selektion und Anzucht erfolgt über Lyophilkonserve, Emersanzucht in Petrischalen, Eprouvettenkulturen mit Streßmedien, Schüttelkulturen, Gerste-Reis-Kultur, durchläuft zwei Impffermentationsstufen und als Produktbildungskultur die primäre Wachstumsphase. Anschließend erfolgt die Fermentation auf der Basis unlimitierter Sauerstoffversorgung und limitierter Versorgung mit Kohlenstoffsubstrat. Die Sauerstoffzufuhr erfolgt über Belüftung und Rührung, miteinander Rührgeschwindigkeit von 135 U/Min. und einem Luftdurchsatz von 1,6 Nm^3. Ferner wird der Prozeß bei einem *p*H-Wert von 6,5 und einer Fermentationstemperatur von 25°C geführt. Diese Werte bleiben in der Phase der Produktbildungsinbetriebnahme unverändert. Als einziges Kohlenstoffsubstrat wird Saccharose zudosiert. Dafür steht an der Fermentationsanlage eine Nachdosierungseinrichtung zur Verfügung, die Zudosierungen unter aseptischen Bedingungen ermöglicht. Die Saccharose wird als wäßrige Lösung (450 g Saccharose in 1 l Lösung) zugeführt. Als weitere Zudosierungen sind während der Fermentationsphase Ammonsulphat, Ammoniak und Phenylessigsäure erforderlich, die zu Konzentrationskorrekturen in der Kulturlösung dienen. Diese Zugaben werden durch Wertermittlungen aus der Kulturlösungsanalytik geführt, die den Prozeß begleitet. Die Beobachtung des Verlaufes der Verwertungsaktivität erfolgt mit Hilfe eines pO_2-Sensors in der Kulturlösung. Dabei wird eine Verstärkung der Verwertungsaktivität durch Verringerung des pO_2-Wertes, eine Abschwächung der Verwertungsaktivität durch Erhöhung des pO_2-Wertes ausgewiesen. Eine direkte Messung der Verwertungsaktivität wird nicht vorgenommen. Die Kohlenstoffsubstratimpulse bestehen aus Saccharoselösung, die von der Beschaffenheit des Zufütterungssubstrates ist. Zur Anwendung kommen 61-Impulse, die über die Nachdosierungseinrichtung der Fermentationsanlage in die Kulturlösung eingetragen werden. Die Produktbildungsinbetriebnahme erfolgt zur 30. Fermentationsstunde. Das Sollprofil des Verwertungsverlaufes besteht aus 2 Verwertungsphasen von jeweils gleicher Dauer, bei einer zulässigen Abweichung von ± 5%. Die Verwertung des ersten Substratimpulses liefert 3 Verwertungsphasen und hat eine Gesamtverwertungsdauer von 2 Stunden. Die Verwertung des 2. Impulses erfolgt mit einer um 50% verlängerten Verwertungsphase im Vergleich zur ersten. Erst der 3. Substratimpuls liefert einen Verwertungsverlauf, der den Sollvorgaben gerecht wird. Mit ihm ist dann das Ende der Inbetriebnahme der Produktbildung erreicht.