



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 287 729 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 N 1/28

DEUTSCHES PATENTAMT

in der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 N / 332 646 4	(22)	14.09.89	(44)	07.03.91
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71) siehe (73)

(72) Ruhland, Günter, Dipl.-Ing.; Unger, Horst, Dr. sc.; Jahn, Otto, Dr. rer. nat.; Drechsler, Ramona; Pileger, Ingrid, Dr. agr.; Herrmann, Christof, Dipl.-Biol., DE

(73) Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der DDR, Forschungszentrum für Bodenfruchtbarkeit Müncheberg, Wilhelm-Pieck-Straße 72, O - 1278 Müncheberg, DE

(54) Verfahren zur Erhöhung der Biomasse bei der Kultivierung rhizoeffektiver Bakterien

(55) Fermentation; Wachstumsaktivatoren; Verfahren; Suppline; rhizoeffektive Bakterien; Alkane; Biomasse
(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erhöhung der Biomasse bei der Kultivierung rhizoeffektiver Bakterien. Ziel der Erfindung ist es, durch den Einsatz bestimmter Suppline in Form von Alkanen eine Steigerung der Zellausbeute bei rhizoeffektiven Bakterien, ohne die C- und N-Bilanz der Nährlösung insgesamt zu verändern, zu erreichen. Erfindungsgemäß wird dies dadurch erreicht, daß der Kulturlösung für die Fermentation der Gattungen *Cytophaga spec.*, *Arthrobacter spec.*, *Pseudomonas spec.*, *Agrobacterium spec.* und *Flavobacterium spec.* Alkane in den Konzentrationen von 50–100 Mikroliter pro Liter Kulturlösung zugesetzt werden. Der Zusatz erfolgt nach der Sterilisation der Kulturlösung vor oder nach Beimpfen der Kultur. Die Erfindung kann in der Pflanzenproduktion für Bakterienimpfpräparate zur Beschleunigung und Steigerung des Wurzelwachstums angewendet werden.

Patentanspruch:

1. Verfahren zur Erhöhung der Biomasse bei der Kultivierung rhizoeffektiver Bakterien, dadurch gekennzeichnet, daß der Kulturlösung Suppline in Form von Alkanen zugesetzt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Alkane
Pentadecan – Alkan $C_{15}-CH_3(CH_2)_{13}CH_3$
Hexadecan – Alkan $C_{16}-CH_3(CH_2)_{14}CH_3$
Oktadecan – Alkan $C_{18}-CH_3(CH_2)_{16}CH_3$ oder
eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Alkane in den Konzentrationen von 50–100 Mikroliter pro Liter Fermentationslösung, vorzugsweise 80 Mikroliter pro Liter Fermentationslösung, eingesetzt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß rhizoeffektive Bakterien der Gattungen
Flavobacterium spec.
Arthrobacter spec.
Cytophaga spec.
Pseudomonas spec. oder
Agrobacterium spec.
verwendet werden.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Kohlenstoff/Stickstoff-Status der Nährlösung unverändert bleibt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erhöhung der Biomasse bei der Kultivierung rhizoeffektiver Bakterien. Die Erfindung kann in der Pflanzenproduktion für Bakterienimpfpräparate zur Beschleunigung und Steigerung des Wurzelwachstums angewendet werden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die Frage der Steigerung der Zellausbeute durch physikalische, chemische oder biologische Beeinflussung des Fermentationsvorganges spielt bei allen Optimierungsverfahren in der mikrobiologischen Industrie eine entscheidende Rolle. Die biologische Steuerung und Optimierung geschieht in erster Linie durch eine Veränderung der Nährlösung bzw. durch die Zugabe von Supplinen oder Wachstumsfaktoren (Aminosäuren, Vitamine, Purine). Die Bedürftigkeit der Bakterien an diesen Supplinen ergibt sich aus genetischen Defekten oder dem Unvermögen der Mikroorganismen, bestimmte zum Grundbestand der Zelle gehörenden Verbindungen selbst zu synthetisieren. Die in der Erfindung verwendeten Suppline gehören bisher nicht in die Kategorie der Bakterienwuchsstoffe oder Wachstumsaktivatoren.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist ein Verfahren, mit dem es möglich ist, die Zellausbeute bei rhizoeffektiven Bakterien durch Zusatz von bestimmten Suppline 1, ohne die C- und N-Bilanz der Nährlösung zu verändern, zu steigern. Das Verfahren soll sich durch minimierten materiell-technischen und finanziellen Aufwand auszeichnen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, durch den Einsatz bisher nicht bekannter Suppline für rhizosphäre Bakterien, ohne Veränderung der C- und N-Bilanz der Nährlösung eine Steigerung der Zellausbeute im Schüttelkolben und im Fermenter zu erzielen.

Erfindungsgemäß wird dies dadurch erreicht, daß der Kulturlösung für die Fermentation der Gattungen Flavobacterium spec., Arthrobacter spec., Cytophaga spec., Pseudomonas spec. und Aerobacterium spec. Alkane (Kettenlänge C_{15} bis C_{18}) in den Konzentrationen von 50–100 Mikroliter pro Liter Kulturlösung zugesetzt werden. Der Zusatz erfolgt nach der Sterilisation der Kulturlösung vor oder nach Beimpfen der Kultur.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung soll anhand der nachfolgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

Beispiel 1 (Kontrollvariante)

Die Fermentation der rhizosphären Bakterien läuft jeweils über eine Dauer von 3 Tagen bei einer Temperatur von 25 Grad Celsius im Fermentor (Totalvolumen 5000 ml) ab.

Das Produktionsmedium besteht dabei aus:

- 20g/l Melasse
- 20g/l Maisquellwasserhydrolysat
- 1g/l KH_2PO_4
- 2g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
- 5g/l NaCl

Die Sterilisation der Nährlösung erfolgt außerhalb des Fermentors als Standkultur bei 121 Grad Celsius in einem Zeitraum von 30 min. Der pH-Wert nach der Sterilisation beträgt 7,0–7,2. Die Beimpfung des Fermentors erfolgt danach mit einer 48 Stunden alten mediumsgleichen Vorkultur aus Schüttelkolben. Die Inokulummenge beträgt 10 Vol.-%. Die Biomasse wurde durch Zentrifugation abgetrennt, die Trockengewichtsbestimmung erfolgte im Zentrifugenröhrchen 3 Stunden bei 105 Grad Celsius. Die Trockengewichte sind das Ergebnis von Dreifachbestimmungen.

Ergebnis	Gattung	Trockengewicht (g/l)
72 Stunden Kultur	Flavobacterium	5,22
	Arthrobacter	10,13
	Cytophaga	3,05
	Pseudomonas	9,36
	Agrobacterium	5,55

Beispiel 2

Es wird analog Beispiel 1 verfahren, wobei nach Beimpfung des Fermentors 6×10^{-4} mg Biotin pro Liter Fermentationslösung steril zugegeben werden. Biotin wirkt stark zellvermehrend und ist ein gängiger Wachstumsstoff.

Ergebnis	Gattung	Trockengewicht (g/l)
72 Stunden Kultur	Flavobacterium	6,00
	Arthrobacter	11,00
	Cytophaga	3,55
	Pseudomonas	10,48
	Agrobacterium	6,35

Biotin erhöht die Zellausbeute um 10–15%.

Beispiel 3

Es wird analog Beispiel 1 verfahren, wobei nach Beimpfung des Fermentors 3×10^{-2} mg p-Aminobenzoesäure pro Liter Fermentationslösung steril zugegeben werden. p-Aminobenzoesäure ist ein spezifischer Bakterienwuchsstoff.

Ergebnis	Gattung	Trockengewicht (g/l)
72 Stunden Kultur	Flavobacterium	4,95
	Arthrobacter	9,50
	Cytophaga	2,92
	Pseudomonas	10,30
	Agrobacterium	6,01

p-Aminobenzoesäure vermindert die Zellausbeute bei Flavobacterium, Arthrobacter und Cytophaga bis zu 5%, während bei Pseudomonas und Agrobacterium die Zellausbeute um 8–10% gesteigert wird.

Beispiel 4

Es wird analog Beispiel 1 verfahren, wobei nach Beimpfung des Fermentors 80 Mikroliter Pentadecan (Alkan $C_{15}-CH_3(CH_2)_{13}CH_3$) pro Liter Fermentationslösung steril zugegeben werden.

Ergebnis	Gattung	Trockengewicht (g/l)
72 Stunden Kultur	Flavobacterium	6,80
	Arthrobacter	12,78
	Cytophaga	3,85
	Pseudomonas	11,40
	Agrobacterium	6,71

Pentadecan steigert die Zellausbeute bis zu 30%, bei Pseudomonas und Agrobacterium bis zu 22%.

Beispiel 5

Es wird analog Beispiel 1 verfahren, wobei nach Beimpfung des Fermentors 60 Mikroliter Hexadecan (Alkan $C_{16}-CH_3(CH_2)_{14}CH_3$) pro Liter Fermentationslösung steril zugegeben werden.

Ergebnis	Gattung	Trockengewicht (g/l)
72 Stunden Kultur	Flavobacterium	6,36
	Arthrobacter	12,58
	Cytophaga	3,88
	Pseudomonas	11,51
	Agrobacterium	6,77

Hexadecan steigert die Zellausbeute bis zu 26%.

Beispiel 6

Es wird analog Beispiel 1 verfahren, wobei nach Beimpfung des Fermentors 100 Mikroliter Octadecan (Alkan $C_{18}-CH_3(CH_2)_{16}CH_3$) pro Liter Fermentationslösung steril zugegeben werden.

Ergebnis	Gattung	Trockengewicht (g/l)
72 Stunden Kultur	Flavobacterium	6,52
	Arthrobacter	12,45
	Cytophaga	3,75
	Pseudomonas	11,23
	Agrobacterium	6,68

Octadecan steigert die Zellausbeute bis zu 25%.