



(12) Wirtschaftspatent

(11) **DD 248 144 B1**

Teilweise bestätigt gemäß § 18
Absatz 1 Patentgesetz der DDR
vom 27.10.1983

in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) **C 12 P 33/16**
C 12 R 1:32

DEUTSCHES PATENTAMT

| | | | | | |
|------|-----------------------|------|----------|------|----------|
| (21) | DD C 12 P / 266 431 1 | (22) | 20.08.84 | (45) | 03.01.91 |
| | | | | (44) | 29.07.87 |

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72) Große, Hans-Helmut, Dr. rer. nat.; Blei, Lutz, Dipl.-Biol.; Deppmeyer, Volker, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Mener, Michael, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Bocker, Harald, Dr. rer. nat.; Hörhold, Cläre, Dr. sc. nat.; Gottschaldt, Birgit, Dipl.-Chem., DD

(54) **Verfahren zur Herstellung von 1,4-Androstadien-3,17-dion durch fermentativen Sterolabbau**

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von 1,4-Androstadien-3,17-dion durch fermentativen Sterolabbau bei aeroben Kultivierungsbedingungen für zum Sterol-Seitenkettenabbau befähigte Mikroorganismen, beispielsweise für solche aus der Gattung **Mycobacterium**, speziell der Art **Mycobacterium vaccae**, in wäßrigen Fermentationsmedien, die wenigstens eine Kohlenstoffquelle, wenigstens eine Stickstoffquelle sowie neben Mineralsalzen eine Sterol-Tensid-Präparation und einen partikulär vorliegenden polaren Adsorber vom Typ eines organischen Polymeren enthalten, deren Acidität während der 24 Stunden bis 192 Stunden bei Temperaturen zwischen 20°C und 45°C durchgeführten Fermentation im Bereich pH 6 bis pH 8 liegt, **gekennzeichnet dadurch**, daß man die relative Gelöstsauerstoffsättigung der Fermentationslösung, gemessen als pO₂-Wert, über das Regime von Belüftung und Umwälzung dieser Lösung nach 0,5 Stunden bis 45 Stunden unter das 5%- bis 30%-Niveau absenkt und wenigstens 10 Stunden bei diesem Niveau hält.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß man die relative Gelöstsauerstoffsättigung nach 1 Stunde bis 6 Stunden unter das 15%-Niveau absenkt.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß man nach Absenkung der relativen Gelöstsauerstoffsättigung auf einen Niveauwert obiger Kennzeichnung diesen als Sollwert für die restliche Fermentationsdauer beibehält.
4. Verfahren gemäß Anspruch 2 und 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß man die relative Gelöstsauerstoffsättigung auf das 10%-Niveau absenkt und dieses als Sollwert für die restliche Fermentationsdauer beibehält.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1 bis 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß man nach Absenkung der relativen Gelöstsauerstoffsättigung auf einen Niveauwert obiger Kennzeichnung eine Belüftung und Umwälzung der Fermentationslösung in Koinzidenz erfassende Sollwert-Regelung zur Aufrechterhaltung dieses Niveauwertes anwendet.
6. Verfahren gemäß Anspruch 2 und 5, **gekennzeichnet dadurch**, daß man nach Absenkung der relativen Gelöstsauerstoffsättigung auf das 10%-Niveau eine Belüftung und Umwälzung der Fermentationslösung in Koinzidenz erfassende Sollwert-Regelung zur Aufrechterhaltung dieses Niveauwertes anwendet.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum fermentativen Seitenkettenabbau von Sterolen zu 1,4-Androstadien-3,17-dion, welches als Ausgangssubstanz für die Herstellung von Steroidwirkstoffen von Bedeutung ist. Das Anwendungsgebiet der Erfindung liegt also in der pharmazeutischen Industrie und in der technischen Mikrobiologie.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Es ist bekannt, daß Sterole, wie z. B. Sitosterol, Cholesterol, Stigmasterol, Campesterol und Ergosterol, durch Mikroorganismen aus zahlreichen Gattungen, wie z. B. *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Nocardia*, *Microbacterium*, *Protaminobacter*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Corynebacterium* und insbesondere *Mycobacterium* u. a., über das Intermediärprodukt 1,4-Androstadien-3,17-dion (im folgenden kurz ADD genannt) abgebaut werden können. Dieses Produkt wird im Fermentationsmedium nur dann angereichert, wenn keine 9 α -Hydroxylierung erfolgt. Dies wiederum wird u. a. dadurch erreicht, daß Mikroorganismus-Mutanten mit Defekten in der genannten enzymatischen Leistung zur Fermentation verwendet werden.

Das erste Verfahren zur Herstellung von ADD aus Sterolen unter Verwendung von Enzymdefektmutanten (G. D. Searle & Co., US 3684657, 1970, *Mycobacterium spec.* NRRL B-3683) beschreibt bei Einsatz von 1 g Sitosterol je Liter Kulturlösung und einer Fermentationszeit von 186 Stunden bis 216 Stunden theoretische Ausbeuten von 40% ADD, bezogen auf den Anteil des bei der Fermentation umgewandelten Sitosterols.

Die von I. Sauerbaum et. al. (1. Europ. Kongress f. Biotechnologie, Interlaken, 1978, 139–143) angegebene Fermentation von Sitosterol mit *Mycobacterium spec.* NRRL B-3683^{*)} in Gegenwart des unpolaren Adsorbers XAD-2 und des nichtionischen Tensids Tween 20, in der 10 g Sitosterol je Liter Kulturlösung in 96 Stunden zu 80% der Theorie zu einem Gemisch aus ADD und AD umgewandelt werden, ist als die bisher beste Verfahrenslösung anzusehen. Nach diesen Autoren wird hierbei die Produktbildung durch hohe Gelöstsauerstoffkonzentrationen stimuliert und die ADD-Bildung gegenüber der Bildung von 4-Androsten-3,17-dion (AD) begünstigt, wobei als günstigste Bedingung und damit als untere Grenze eine relative Gelöstsauerstoffsättigung der Kulturbrühe von 50% angegeben wird.

Daraus ergeben sich für die Prozeßführung im Fermentor Anforderungen, die hinsichtlich Schäumung, Aufrahmung von Substraten und Biomasse, Scherkraft- und Durchmischungsverhältnissen insbesondere bei Anwesenheit von Adsorbieren in der Fermentationsbrühe ungünstig sind.

^{*)} Nach JP 105289 (Kokai) wurde dieser *Mycobacterium spec.*-Stamm später als *Mycobacterium vaccae* klassifiziert.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, 1,4-Androstadien-3,17-dion in hohen Ausbeuten aus Sterolen herzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein verbessertes Verfahren zur Herstellung von 1,4-Androstadien-3,17-dion mittels mikrobieller Transformation von Sterolen zu beschreiben, in welchem hinsichtlich der Fermentationsführung, insbesondere hinsichtlich der Führung der relativen Gelöstsauerstoffsättigung der Kulturbrühe, eine Lösung realisiert wird, die die Nachteile der bekannten technischen Lösungen vermeidet.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe in ihrem Grundzug wie folgt gelöst:

Sterole wie Sitosterol, Cholesterol, Campesterol, Stigmasterol bzw. Ergosterol oder Gemische dieser Sterole werden in Form von Sterol-Tensid-Präparationen eingesetzt, wobei die Sterolkonzentration bezogen auf den Liter Fermentationsmedium 1 Gramm bis 50 Gramm beträgt. Zur Fermentation werden Mikroorganismen eingesetzt, die zur Steroltransformation unter Bildung des Produkts ADD bzw. des Produktgemisches ADD/AD befähigt sind, beispielsweise solche aus der Gattung *Mycobacterium*, speziell solche aus der Art *Mycobacterium vaccae*.

Die Sterol-Tensid-Präparationen werden nach den an sich bekannten Methoden der Lyophilisierung, Vermahlung oder der Sprühtrocknung gewonnen.

Wie in den Patenten DD-WP 248143A3 und DD-WP 248145A3 beschrieben, kommen als Tenside Verbindungen aus der Gruppe der Polyethylenoxid-Polypropylenoxid-Addukte des N,N'-Tetra-(2-oxopropyl)propyl-N'-(2-oxopropyl)-diethylentriamins mit Molekulargewichten des Polypropylenglykols um 1400 bis 2000 zur Anwendung.

Die wäßrigen Fermentationsmedien enthalten wenigstens eine Kohlenstoffquelle aus der Kollektion Glycerol, Glucose, Saccharose, Stärke und/oder Melasse usw., weiterhin wenigstens eine Stickstoffquelle aus der Kollektion Hefeextrakt, Harnstoff, Ammoniumsalze und/oder komplexe Medienbestandteile (wie z. B. Maisquellwasser, Pflanzenmehle, Fleischextrakt, Hydrolysate) sowie verschiedene Mineralsalze.

Zum Fermentationsmedium wird ein Adsorber gegeben, der vom Typ eines organischen Polymeren ist und polare Gruppen (Copolymerisat aus Styren und Divinylbenzen mit Acrylsäurederivat-Anteil) enthält. Das Mengenverhältnis beträgt zwischen 2 Gramm pro Liter und 200 Gramm pro Liter (siehe wiederum die Schriften DD-WP 248143A3 und DD-WP 248145A3).

Die Zeitdauer der Fermentation beträgt 24 Stunden bis 192 Stunden. Es wird unter aeroben Bedingungen bei Temperaturen von 20°C bis 45°C und pH-Werten im Bereich von pH 6 bis pH 8 kultiviert.

Die Durchführung der Fermentation erfolgt im Rührfermentor oder in Fermentoren mit anderen Umwälzungsprinzipien, z. B. in Air-Lift-Fermentoren.

Für den jeweils verwendeten Fermentor ist eine apparative Charakterisierung vorzunehmen, diese erfolgt für den erfindungsgemäßen Zweck mit Hilfe der Sauerstoff-Transportrate in Abhängigkeit von Belüftung und Umwälzung. Die Messung der Sauerstoff-Transportrate wird in an sich bekannter Weise durchgeführt.

Für den zur Steroltransformation eingesetzten Mikroorganismus werden in Vorversuchen in an sich bekannter Weise (siehe z. B. F. Bergter, Wachstum von Mikroorganismen, G. Fischer Verlag Jena, 1983)

- die Ertragskoeffizienten für die Biomasse aus den bestimmenden Substraten,
- die spezifische Wachstumsrate und
- die spezifische Sauerstoff-Aufnahmerate

bestimmt. Weiterhin wird während des Fermentationsprozesses die relative Gelöstsauerstoffsättigung als pO_2 -Wert der Fermentationsbrühe auf an sich bekannte Weise kontinuierlich gemessen.

Für die zu Beginn des Fermentationsprozesses ablaufende Phase des Biomassewachstums ist auf der Grundlage der für den eingesetzten Fermentor voranstehend ermittelten Abhängigkeit der Sauerstoff-Transportrate der Arbeitspunkt für das Regime von Belüftung und Umwälzung der Fermentationsbrühe zu wählen. Es ist in diesem Zusammenhang nun erfindungswesentlich, durch dieses Regime die relative Gelöstsauerstoffsättigung der Fermentationslösung, gemessen als pO_2 -Wert, nach 0,5 Stunden bis 45 Stunden, vorzugsweise nach 1,0 Stunden bis 6 Stunden, unter das 5%-Niveau bis 30%-Niveau, vorzugsweise unter das 15%-Niveau, abzusenken und wenigstens 10 Stunden bei diesem Niveau zu halten. Diese Vorschrift stützt sich auf den Befund, daß der oxidative Prozeß der Bildung von 1,4-Androstadien-3,17-dion durch mikrobielle Transformation von Sterolen oder Sterolgemischen, vorzugsweise von Sterolgemischen mit Sitosterol als Hauptkomponente, mit überraschend hoher Ausbeute realisierbar ist, obwohl die relative Gelöstsauerstoffsättigung der Kulturbrühe im Verlauf der Fermentation nach Abfall vom Sättigungswert 100 % zeitweise oder ständig weniger als 10% beträgt. Mit dieser Sauerstoffauszehrung tritt ein für die Erzielung hoher ADD-Bildungsraten günstiger physiologischer Zustand der Biomasse ein.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird das Verfahren in der Phase der stationären Biomasse hinsichtlich des Sauerstofftransports, d. h. hinsichtlich Belüftung und Umwälzung der Fermentationsbrühe, in einem auf der Basis einer pO_2 -Sollwertregelung entstehenden Impulsregime durchgeführt. Der pO_2 -Sollwert wird aus dem Bereich von 5% bis 30% gewählt; vorzugsweise wird er auf 10% eingestellt.

Die pO_2 -Sollwertregelung bei einem Sollwert von beispielsweise 10% wird hier wirksam, um das Ansteigen der relativen Gelöstsauerstoffsättigung der Fermentationsbrühe in der Phase der stationären Biomasse zu unterdrücken.

Für das Impulsregime von Belüftung und Umwälzung (z. B. Rührfermentordrehzahl) werden in Koizidenz beider Größen die zwei Zustände

- reduzierter bzw. gestoppter Lufteintrag und verminderte Umwälzung für pO_2 -Istwert \geq pO_2 -Sollwert,
 - Lufteintrag und aktivierte Umwälzung für pO_2 -Istwert $<$ pO_2 -Sollwert
- gewählt.

Die Änderungsbereiche von Umwälzungsparameter und Lufteintrag sind aus der Sauerstofftransport-Charakteristik des jeweils eingesetzten Fermentors zu bestimmen.

Im Extremfall ist diese Ausführungsform dahingehend modifiziert, daß das Impulsregime bereits in der Phase des Biomassewachstums wirksam wird. Diese Verfahrensvariante ist dadurch gekennzeichnet, daß der pO_2 -Wert der Fermentationsbrühe unmittelbar nach Fermentationsbeginn infolge Zuluftstop unter das Sollwertniveau, beispielsweise unter das 10% Niveau, abfällt, womit die pO_2 -Sollwertregelung mittels koinzidierender Intensivierung von Belüftung und Umwälzung bei Sollwertunterschreitung frühzeitig beginnt. Mit dieser Prozeßführung werden in besonders vorteilhafter Weise Aufrahmungs- und Schäumungsprobleme vermieden und günstige Kontakt- und Durchmischungsbedingungen für die Festphasen (Adsorber, Sitosterol, Biomasse) gewährleistet. Gleichzeitig werden hohe ADD-Ausbeuten realisiert. Bei Durchführung des Verfahrens im technischen Maßstab, beispielsweise im 10 m^3 -Rührfermentor, wird das voranstehende Impulsregime entsprechend der vorteilhaften technischen Realisierung modifiziert. Bevorzugte Ausführungsvarianten sind dann

- kontinuierliche, beispielsweise lineare Anhebung der Drehzahl bis zu einer festgelegten Obergrenze bei Unterschreitung des pO_2 -Sollwerts und Intensivierung des Luftertrags beginnend mit dem Erreichen des oberen Drehzahl-Plateaus;
- Drehzahlabsenkung und Reduzierung bzw. Stop des Luftertrags bei Überschreitung des pO_2 -Sollwerts oder
- Beibehaltung einer durchgängig konstanten Drehzahl und Durchführung des Impulsregimes nur für die Fermentorzuluft.

Die verfahrensgemäße Lösung hat folgende Vorteile:

Durch die Entwicklung des vorliegenden Verfahrens zur Herstellung von ADD über den mikrobiellen Sterolabbau, welches während langer Abschnitte der Prozeßdauer durch niedrige Werte der relativen Gelöstsauerstoffsättigung der Fermentationsbrühe gekennzeichnet ist, werden hohe Produktausbeuten bei gleichzeitig verbesserter Fermentationsführung ohne Schäumung und Aufrahmung von Biomasse, Adsorber und Sitosterol gewährleistet.

Ein zusätzlicher Vorteil wird in der Einsparung von bereitzustellender Fermentorzuluft und Elektroenergie gesehen.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung soll an Beispielen näher erläutert werden:

Beispiel 1

Aus einer Konserve des Stammes *Mycobacterium vaccae* NRRI B-3683 wird die Impfkultur für die ADD-Fermentation kultiviert. Im ersten Schritt dazu wird eine Schrägagarkultur mittels viertägiger Bebrütung bei 35°C angelegt. Der Nähragar hat je Liter Aqua dest. die Zusammensetzung: Glycerol 20g, Bacto-Pepton 5g, Fleischextrakt 3g, Agar agar 15g. Sein pH-Wert wird im flüssigen Zustand vor der Sterilisation auf 7,0 eingestellt; die Sterilisation dauert 20 Minuten bei 121°C . Anschließend erfolgen zwei submerse Vorkulturstufen. Für die erste submerse Vorkultur wird die Schrägagarkultur mit 5 ml des Kultivierungsmediums für die beiden submersen Vorkulturstufen abgeschwemmt. Dieses Medium hat je Liter Aqua dest. die Zusammensetzung: Hefeextrakt 10g, Glycerol 10g, KH_2PO_4 0,5g, K_2HPO_4 0,5g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1,5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,002g mit pH-Wert-Einstellung auf 7,0 vor der Sterilisation für 20 Minuten bei 121°C .

Aus der Abschwemmung werden 500 ml fassende Rundkolben beimpft, die je 50 ml des letztgenannten Mediums enthalten und 36 Stunden bei 28°C auf dem Rundschwingtisch geschüttelt werden. Jeweils 5 ml der ersten Vorkultur dienen zur Beimpfung von Rundkolben der zweiten Vorkulturstufe mit den Füllbedingungen wie in der ersten Vorkulturstufe, die ebenfalls 36 Stunden bei 28°C geschüttelt werden.

Die anschließende Fermentor-Hauptkultur erfolgt über 94 Stunden mit einem Startvolumen (einschließlich Vorkultur und Sitosterol, ohne Adsorber) von 2,5l in einem Edelstahl-Glas-Rührfermentor mit 4,5l Bruttovolumen bei 31°C .

Die Beimpfungsmenge aus der zweiten Vorkulturstufe bildet 10% des Startvolumens. Zum Liter Fermentationsbrühe werden 140g Adsorber vom Typ eines Copolymerisats aus Styren und Divinylbenzen mit Acrylsäurederivat-Anteil zugesetzt. Der Adsorber wird vorher mit Methanol ausgewaschen und mit Wasser gespült. Die untere Grenze für den Korndurchmesser beträgt 0,4mm. Das Fermentationsmedium der Hauptkultur hat folgende Zusammensetzung je Liter Aqua dest.: Harnstoff 0,125g, Glucose 5g, KH_2PO_4 2g, K_2HPO_4 8g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,002g. Vor der Sterilisation wird der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Die Sterilisation erfolgt durch Autoklavierung des das Medium einschließlich der notwendigen Adsorbermenge enthaltenden Fermentergefäßes während 60 Minuten bei 121°C . Die Sitosterolpräparation wird zweimal 60 Minuten im Dampftopf sterilisiert und in einem Schritt mit der Beimpfung in den auf 31°C rückgekühlten Fermentor eingebracht. Je Liter Fermentationsbrühe werden 15g Sitosterol eingesetzt, dessen Präparation durch Naßvermahlung mit 10% eines Tensids aus der Gruppe der Polyethylenoxid-Polypropylenoxid-Addukte des N,N''-Tetra-(-Oxypropylpropyl)-N'-(2-Oxypropyl)-diethylentriamins mit Molekulargewichten des Polypropylenglycols um 1400 bis 2000 in einer Kolloidmühle erfolgt. Die Hauptkultur-Fermentation wird unter den zu Beginn eingestellten konstanten Bedingungen von 0,33l Luft je Liter Fermentationsbrühe und Minute bei 450 Umdrehungen je Minute (6-Blatt-Rührer) für Belüftung und Rührung durchgeführt. Während der Fermentation wird die relative Gelöstsauerstoffsättigung als pO_2 -Wert (100%-Eichung in der unbeimpften gerührten und belüfteten Fermentationsbrühe) gemessen und registriert; durch Probenahme werden die Kinetik der Biomasse und der ADD-Bildung ermittelt. Bei Beendigung der Fermentation liegt die Ausbeute an ADD bei 5,1 g/l. Die Kinetiken für ADD, Biomasse und pO_2 -Wert sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Beispiel 2

Es wird wie im Beispiel 1 vorgegangen, um die Vorkultur für die ADD-Fermentation zu erhalten. Die Hauptkultur wird in einem Edelstahl-Glas-Rührfermentor mit 4,5l Bruttovolumen bei 28°C durchgeführt. Hinsichtlich der 2,5l betragenden Menge des Startvolumens sind 250ml Impfkultur der zweiten Vorzuchtstufe und 7g/l Sitosterolpräparation inbegriffen, deren Vorbereitung und Zugabe wie im Beispiel 1 abläuft.

Das Fermentationsmedium der Hauptkultur hat je Liter Aqua dest. die Zusammensetzung: Harnstoff 0,25g, Glucose 5g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3g, KH_2PO_4 1g, K_2HPO_4 4g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,002g. Weiterhin werden zum Liter Fermentationsbrühe 60g des Adsorbers von Beispiel 1 zugegeben. Die Sterilisationsbedingungen sind mit Ausnahme der längeren Sterilisationszeit von 90 Minuten mit denen im Beispiel 1 identisch.

Die Hauptkultur-Fermentation beginnt im Zustand der Gelöstsauerstoffsättigung der Fermentationsbrühe, der auch zur Eichung der pO_2 -Sonde benutzt wird. Als Regelschwelle für den pO_2 -Wert werden 10% eingestellt. Die Startdrehzahl beträgt 450 min^{-1} , die Luftzufuhr wird nach der Eichung der pO_2 -Sonde unterbrochen.

Es erfolgt innerhalb von 0,5 Stunden der Abfall des pO_2 -Wertes auf 10% durch Sauerstoffauszehrung infolge der Sauerstoffaufnahme durch die anwachsende Biomasse. Bei Unterschreitung der pO_2 -Regelschwelle wird die Drehzahl auf 700 min^{-1} erhöht und koinzidierend der Zuluftweg freigegeben, den dann die Luftmenge von 0,33 l je Liter Fermentationsbrühe und Minute durchströmt. Nach Erhöhung des pO_2 -Wertes über 10% erfolgt die Rücksetzung der Prozeßbedingungen auf 450 min^{-1} und Zuluftstop.

Dieses Impulsregime zur Einhaltung des pO_2 -Sollwerts von 10% hat den prozeßtechnisch außerordentlich wichtigen Effekt, daß keine Aufrauhmung von Biomasse und Substraten und keine Schäumung zustande kommt. Außerdem ergibt sich ein eingeschränkter Luftbedarf. Nach 92 Stunden Fermentationszeit liegt die Ausbeute an ADD bei 1,87 g/l; nach 164 Stunden (Ende der Fermentation) liegen 3,01 g/l ADD vor. Der Plateauwert der Biotrockenmasse von etwa 2,6 g/l wird um die 30. Fermentationsstunde erreicht. Ab der 130. Fermentationsstunde steigt der pO_2 -Wert auf etwa 20% an, obwohl ohne Lufteintrag und bei 450 min^{-1} gearbeitet wird.

Tabelle 1: Kinetiken für ADD, Biotrockenmasse und pO_2 -Wert bei Nichtanwendung einer pO_2 -Sollwertregelung (Prozeßbedingungen gemäß Ausführungsbeispiel 1)

| t (h) | ADD (g/l) | Biotrockenmasse (g/l) | pO_2 (%) |
|-----------|-----------|-----------------------|------------|
| 0 (n. B.) | 0 | 0,965 | 100 |
| 11 | | | 100 |
| 22 | 0,91 | 2,24 | 68 |
| 24 | | | 42 |
| 30 | | | 23 |
| 35 | | | 20 |
| 43 | | | 10 |
| 46 | 2,42 | 2,86 | 5 |
| 50 | | | 5 |
| 52 | | | 10 |
| 55 | | | 20 |
| 60 | | | 50 |
| 70 | 4,41 | 2,94 | 83 |
| 94 | 5,10 | 2,71 | 100 |

pO_2 -Istwert < 10% für 10 Stunden

pO_2 -Istwert < 20% für 20 Stunden

Tabelle 2: Kinetiken für ADD, Biotrockenmasse und pO_2 -Wert bei Zulaufstop nach Fermentationsbeginn und nachfolgender Anwendung einer pO_2 -Sollwertregelung (Sollwert 10%; sonstige Prozeßbedingungen gemäß Ausführungsbeispiel 2)

| t (h) | ADD (g/l) | Biotrockenmasse (g/l) | pO_2 (%) |
|-----------|-----------|-----------------------|------------|
| 0 (n. B.) | | 0,6 | 100 |
| 0,25 | | | 80 |
| 0,5 | | | 10 |
| 21 | 0,221 | 1,68 | |
| 44 | 0,824 | 2,44 | |
| 68 | 1,447 | 2,55 | |
| 92 | 1,867 | 2,59 | |
| 128 | 2,79 | 2,54 | 10 |
| 164 | 3,01 | 2,03 | 20 |

d. h. die pO_2 -Sollwertregelung setzte ab 0,5 h ein.