



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **248 140 A1**

4(51) C 12 M 1/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 M / 263 813 3

(22) 05.06.84

(44) 29.07.87

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD

(72) Bauer, Eckhard, Dr. rer. nat.; Große, Hans H., Dr. rer. nat.; Berg, Hermann, Prof. Dr. rer. nat.; Jacob, Hans-Egon, Dr. rer. nat., DD

(54) **Fermentationsverfahren**

(57) Die Erfindung „Fermentationsverfahren“ wird auf dem Gebiet der Biotechnologie angewendet. Ziel der Erfindung ist die Stimulierung von Fermentationsprozessen. Das Verfahren arbeitet mit induktiver Einkopplung von elektrischen Feldern in Fermentationskulturen. Durch das elektrische Feld werden die Mikroorganismen so beeinflusst, daß Modifikationen im Stoffwechsel eintreten, die zu vermehrter Produktion von gewünschten Substanzen führen.

Erfindungsanspruch:

Fermentationsverfahren mit Elektrostimulation von Fermentationsprozessen durch Züchtung von Mikroorganismen unter aeroben bzw. anaeroben Kulturbedingungen in einem Nährmedium mit entsprechenden Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie Mineralsalzen bei einer Temperatur von 20 bis 37°C, in einer Zeitdauer von 1 bis 7 Tagen und anschließender Aufarbeitung, **gekennzeichnet dadurch**, daß in die Fermentationskultur ständig oder phasenweise ein elektrisches Feld induktiv eingekoppelt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Fermentationsverfahren mit Elektrostimulation, welches in der technischen Mikrobiologie benutzt werden kann.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist ein Verfahren und Vorrichtung zur Elektrostimulation mikrobieller Reaktionen (Europapaten 0041373/A 1) bekannt. Hier wird die Aufgabe gelöst, die Reaktionsraten bei Fermentationsprozessen zu erhöhen. Das umfaßt die Produktzunahme pro Zeiteinheit, — pro Volumeneinheit, — pro Substrateinheit und — pro Biomasseeinheit.

Das Verfahren wird wie folgt durchgeführt: Die Fermentationskultur (bestehend aus Mikroorganismen, Substraten und Nährstoffen) steht im galvanischen Kontakt mit zwei Elektroden, an die eine alternierende oder gepulste hochfrequente elektrische Spannung gelegt wird. Die infolge der elektrischen Leitfähigkeit der Fermentationsbrühe fließenden Ströme verursachen die elektrische Stimulation der Fermentationskultur, die ihren Ausdruck in gesteigerten mikrobiellen Reaktionsraten findet. Die Arbeitsfrequenzen liegen im Bereich 1 kHz bis 1 MHz, aber auch der erweiterte Bereich 100 Hz bis 10 MHz ist geeignet. An der unteren Grenze können störende Elektrolyseerscheinungen an den Elektroden auftreten. Als Vorrichtung dienen ein Paar von Elektroden aus Draht oder plattenförmigem Material in der Kulturbrühe und ein Signalgenerator. Folgende Parameter lassen sich bei den Experimenten variieren: Elektrodenoberfläche, Elektrodenabstand, Volumen zwischen den Elektroden, Stromdichte, Strom pro Volumeneinheit Kulturbrühe, Feldstärke zwischen den Elektroden, Leistung pro Volumeneinheit zwischen den Elektroden, Frequenz.

Damit erzielt man die folgende Wirkung: Es wird der Produktertrag pro Einheit Substrat und pro Zeiteinheit für den produktbildenden Mikroorganismus auf vorgeschriebenen Nährmedien (verbesserte Konversion, Zeitverkürzung der Fermentation) gesteigert. Die Verwertung eigentlich nicht geeigneter Substrate kann katalysiert werden und die Anzahl der Fermentationsläufe wird im zur Verfügung stehenden Zeitraum vergrößert.

Die bekannte Erfindung hat die folgenden Nachteile:

Es wird zwar die Produktbildung von Mikroorganismen beeinflusst, ihre technische Nutzung ist aber durch störende Elektrolyseerscheinungen und durch die Passivierung der Elektrodenoberfläche eingeengt. Nachteilig ist außerdem, daß bei der Arbeit mit offenen Elektroden innerhalb von Metallfermentoren besondere Vorsichtsmaßnahmen ergriffen werden müssen.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat die Elektrostimulation von Fermentationsprozessen zum Ziel. Unter Stimulation wird dabei eine Maßnahme verstanden, durch die bei der Herstellung von Produkten in der mikrobiellen Fermentation quantitative und qualitative Parameter der biochemischen und biophysikalischen Teilschritte im Sinne der Erhöhung der Produktausbeute beeinflusst werden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die technische Aufgabe zugrunde, ein Fermentationsverfahren zu beschreiben, mit dem durch Elektrostimulation von Fermentationskulturen Änderungen im Metabolismus als Antwort der Mikroorganismen auf elektrische Felder erreicht werden.

Diese Aufgabe wird durch folgendes Verfahren gelöst:

Der Fermentationsprozeß erfolgt in bekannter Weise unter aeroben oder anaeroben Kulturbedingungen in einem Nährmedium mit geeigneten Kohlenstoff- und Stickstoffquellen, sowie Mineralsalzen. Die Temperatur im Kultivierungsgefäß liegt zwischen 20 und 37°C, der Fermentationsprozeß dauert 1 bis 7 Tage. Die Aufarbeitung erfolgt ebenfalls in bekannter Weise.

Erfindungsgemäß wird die Stimulierung durch Anlegen eines induktiv eingekoppelten elektrischen Feldes während des gesamten Fermentationsprozesses oder eines Teils desselben durchgeführt. Im letzteren Falle wird das elektrische Feld während einzelner Kultivierungsphasen in Abhängigkeit von Prozeßanalysedaten angelegt. Als Resultat verändern sich u. a.

Enzymbildungsraten, wodurch z. B. im biochemischen Ablauf die Produktbildung beschleunigt wird. In vorteilhafter Weise werden in die Kulturbrühe keine Elektroden eingeführt, sondern die wirksamen elektrischen Impulse werden induktiv von außen in das Medium eingekoppelt.

Die Durchführung des Verfahrens erfordert das Anlegen einer stabilisierten Spannungsquelle (≤ 15 V) über einen elektronischen Schalter, der die Einzelimpuls- und Pausendauern bestimmt, an ein Helmholtzspulenpaar.

Ausführungsbeispiele

An Ausführungsbeispielen wird das Verfahren erläutert.

- Es wird eine 60stündige Parallelferrmentation in zwei gerührten, geometrisch gleichen Glas-Fermentoren mit 4,5 Litern Arbeitsvolumen durchgeführt. Eines der beiden Fermentationsgefäße ist zur Realisierung der induktiven Feldeinkopplung außen mit 2 Helmholtzspulen versehen. An diese Spulen wird eine von einem geeigneten Generator erzeugte pulsierende Gleichspannung mit folgenden Parametern gelegt: Impulszüge von 5 ms Dauer werden nach Pausen von 62 ms periodisch wiederholt. Jeder der mit 15 Hz anliegenden Impulszüge wird aus Einzelimpulsen von je 300 μ s-Dauer und 15 μ s Pause gebildet.

Als Mikroorganismus wird eine Selektante des Antibiotikumbildners IMET JA 3890 b nach geeigneter Vorzucht aus einer Mycelkonserve verwendet. Das 15 Minuten bei 121°C direktdampfsterilisierte und rückgekühlte Nährmedium der auf den Liter Leitungswasser bezogenen Zusammensetzung

Kartoffelstärke	32 g	MgSO ₄	2 g
Glukose	60 g	NaCl	1 g
Sojamehl	16 g	CaCO ₃	6 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	11 g	ZnSO ₄	0,5 g

wird mit 1 g Entschäumer Antdphron NM40 je Liter Kulturmedium versetzt und kontaminationsfrei in die sterilisierten Fermentationsgefäße eingefüllt. Die Sterilisation der mit ca. 1,5l Wasser gefüllten Fermentorgefäße mit angeschlossenen Vorratsbehältern für Dosierungsmedien erfolgt bei 121°C während 45 Minuten im Autoklaven. Vor Einfüllen des Nährmediums wird die Wasservorlage aseptisch entfernt.

Folgendes Fermentationsregime wird realisiert:

- Fermentationstemperatur 29°C
- Belüftung mit 270l Luft pro Stunde
- Startdrehzahl 800 min⁻¹, Erhöhung auf 900 min⁻¹ nach 24 Stunden und auf 1000 min⁻¹ nach 28 Stunden bis zum Ende, um den pO₂-Wert oberhalb von 20% des Sättigungswertes zu halten
- pH-Startwert 7,2; Einhaltung der unteren pH-Regelschwelle von 6,2 mittels automatischer Dosierung von 12%iger NH₄OH-Lösung
- diskontinuierliche Zugabe von jeweils 25g/l Glukose in Form einer 50%igen wäßrigen Lösung bei Unterschreiten des aktuellen Glukosewertes von 10 g/l
- Zudosierung von insgesamt 40 mg PO₄-Phosphor pro Liter Kulturlösung als wässrige KH₂PO₄-Lösung mit 1,25 mg/l · h im Intervall 2 bis 24 Stunden, 1,5 mg/l · h im Intervall 24 bis 28 Stunden, 1,75 mg/l · h im Intervall 28 bis 32 Stunden.

Die Feldeinwirkung dauert vom Beginn bis zum Ende der Fermentation an, der Parallelferrmentor arbeitet ohne angelegtes Feld.

Mit dem Lochplattendiffusionstest werden die in Tabelle 1 gezeigten Werte für den Zeitverlauf der Antibiotikumbildung gefunden. Bei Feldanwesenheit wird die Produktbildungsrate um ca. 10% vergrößert. Der stimulierende Eingriff in den Metabolismus des mikrobiellen Systems mittels Feldinduktion drückt sich auch in der Kinetik der Biotrockenmasse aus, siehe Tabelle 2.

- Es wird eine Parallelferrmentation wie im 1. Verfahrensbeispiel durchgeführt, wobei die Fermentationszeit 141 Stunden beträgt. Die Impulsparameter zur Felderzeugung sind gegenüber Beispiel 1 nicht verändert. Das Nährmedium hat bezogen auf 1l Leitungswasser die Zusammensetzung:

Maisstärke	60 g	NaCl	1 g
Glukose	5 g	CaCO ₃	6 g
Sojamehl	16 g	ZnSO ₄	0,5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	11 g	Antdphron NM 40	0,5 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	2 g	Polypropylenglycol	0,3 g

Im Unterschied zum 1. Verfahrensbeispiel erfolgt keine Phosphatdosierung, es wird ohne Glukosenachfütterung gearbeitet und die Feldeinwirkung findet nur in den Phasen 2 bis 10 Stunden und 24 bis 30 Stunden statt.

Der Lochplattendiffusionstest ergibt einen Zeitverlauf der Antibiotikumbildung nach Tabelle 3.

Die phasenweise Feldanwendung führt ebenfalls zur Steigerung der Produktbildungsrate.

Tabelle 1

Fermentationszeit (h)	Antibiotikum-Konzentration (g/l)	
	Ferrmentor mit Feld	Ferrmentor ohne Feld
8	0,03	0,03
20	0,5	0,32
32	1,76	1,31
44	3,65	2,33
56	4,8	3,88

Tabelle 2

(h)	Fermentationszeit	Biotrockenmasse (g/l)	
	Fermentor mit Feld	Fermentor ohne Feld	
8	3,5	3,2	
20	16,3	15,0	
32	18,7	15,4	
44	20,0	18,9	
56	20,5	16,7	

Tabelle 3

Fermentationszeit (h)	Antibiotikum-Konzentration (g/l)	
	Fermentor mit Feld	Fermentor ohne Feld
21	0,46	0,42
37	1,17	0,97
53	2,0	1,75
69	3,09	2,54
85	4,29	3,63
101	5,1	4,37
117	6,5	4,84
133	7,69	6,34
141	8,0	6,34