



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 276 887 A1

4(51) C 12 P 33/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 P / 301 085 6	(22)	25.03.87	(44)	14.03.90
(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Patentabteilung, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD				
(72)	Gottschaldt, Birgit, Dipl.-Chem.; Große, Hans-Helmut, Dr. rer. nat.; Hörhold, Cläre, Prof. Dr. sc. nat.; Blei, Lutz, Dr. rer. nat.; Wetzker, Monika, Dipl.-Biol.; Plonka, Gunter, Dr. rer. nat.; Werner, Wilja, Dipl.-Ing.; Kropik, Erhard, DD				
(54)	Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von 1,4-Androstadien-3,17-dion aus Sterolen				

(55) mikrobielle Steroltransformation, zugefütterte Fermentation, Hauptprodukt (ADD), Zudosierung, Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphatquelle, pH-Zeitprofil, pO_2 -Sollwertregelung, Laugendosierung, hohe Raum-Zeit-Ausbeute, konstante Steroldurchsatzrate

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Steroltransformation durch zugefütterte Fermentation, wobei durch fermentativen Seitenkettenabbau als Hauptprodukt 1,4-Androstadien-3,17-dion (ADD) entsteht, das als Ausgangssubstanz für die Herstellung von Steroidwirkstoffen dient. Die Erfindung basiert auf der Zudosierung von direkt metabolisierbaren Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphatquellen sowie von Sterol zur aktiven Beherrschung von Dauer und Intensität der Steroltransformationsphase. Dies wird dadurch erreicht, daß die Struktur des pH-Zeitprofils (Minima, Abfallgeschwindigkeit) bzw. das Zeitprofil der Stellglied-Realisierungshäufigkeit zur diskreten pO_2 -Sollwertregelung als Indikatoren für den Beginn und die Intensität der Dosierungen benutzt werden. Dabei werden als Maßnahmen für die untere Begrenzung des pH-Wertes die Laugendosierung oder die angepaßte Reduzierung der Dosierungen zur Nichtunterschreitung der pH-Untergrenze einbezogen. Die dargestellte Führung des Verfahrens ergibt hohe Raum-Zeit-Ausbeuten des Produktes ADD infolge hoher und über einen langen Zeitraum konstanter Steroldurchsatzraten.

Patentaansprüche:

1. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von 1,4-Androstadien-3,17-dion aus Sterolen durch aerobe Fermentation mit Hilfe von Mikroorganismen der Gattung *Mycobacterium* im Temperaturbereich von 20°C bis 45°C, bei pH-Werten von pH 4 bis pH 8 über einen Zeitraum von 24 Stunden bis 192 Stunden, **gekennzeichnet durch** die Nachdosierung von sowohl Sterolen als auch Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphorsubstraten in Abhängigkeit von pH-Wert und/oder des pO₂-Wertes und/oder der Konzentration des jeweiligen Substrates im Fermentationsmedium.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet durch** den Beginn der Nachdosierung spätestens 5 Stunden nach dem Durchlaufen des pH-Minimums bzw. dem Anstieg des pH-Wertes um pH 0,1 bis pH 1.
3. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet durch** den Beginn der Nachdosierung spätestens 5 Stunden nach dem Abfall der Stellglied-Realisierungshäufigkeit der pO₂-Sollwertregelung um 20%, bezogen auf das Maximum.
4. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet durch** die Nachdosierung von Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphorsubstraten sowie Sterolen maximal entsprechend der Abnahmegeschwindigkeit.
5. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet durch** den Beginn der Nachdosierung spätestens zum Zeitpunkt, an dem die gemessene Konzentration des jeweiligen Substrates auf ein Zehntel des Startwertes abgefallen ist.
6. Verfahren nach Punkt 1, 2, 3, 4 und 5, **gekennzeichnet durch** die Substratnachdosierung in einem solchen Maße, daß sie zu einem maximalen pH-Wert-Abfall und pH 0,1 pro Stunde führt und mit dem Erreichen des unteren pH-Schwellenwertes, bevorzugt aus dem Bereich pH 4,5 bis pH 6,5, die Laugezudosierung und/oder die Reduzierung der Substratdoserraten auf das Niveau einsetzt, das die Einhaltung des pH-Schwellenwertes gewährleistet.
7. Verfahren nach Punkt 1, 2, 3, 4, 5 und 6, **gekennzeichnet durch** den Einsatz von Sitosterol, Cholesterol, Campesterol, Stignasterol und Ergosterol oder Gemischen aus mindestens zwei dieser Sterole.
8. Verfahren nach Punkt 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 7, **gekennzeichnet durch** Bestimmung des Zeitpunktes der Ausfermentierung der zugesetzten Kohlenstoff-Substrate nach dem Abbruch der Zudosierung von Substraten entweder in Abhängigkeit vom Durchlaufen des pH-Minimums oder einem mindestens 20%igen Abfall der Stellglied-Realisierungshäufigkeit der pO₂-Sollwertregelung oder vom Abfall der Substratkonzentrationen für Sterol und freie Kohlenstoffquellen auf den direkt gemessenen Wert Null.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum mikrobiellen Seitenkettenabbau von Sterolen zu 1,4-Androstadien-3,17-dion (ADD). Diese Verbindung ist Ausgangssubstanz für die Herstellung von Steroidwirkstoffen. Das Anwendungsgebiet der Erfindung liegt in der pharmazeutischen Industrie und in der Biotechnologie.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Wie bereits vorgeschlagen wird die Herstellung von ADD und AD als Intermediärprodukte des Sterolabbaues durch mikrobielle Fermentation vorgenommen. Dabei werden *Mycobacterium vaccae* NRRL B-3683 sowie daraus isolierte Selektanten verwendet. Das Fermentationsmedium enthält zu Fermentationsbeginn jeweils freie bzw. komplexe Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphatquellen sowie ein Sterol bzw. Sterolgemisch bis 50g/l, einen Adsorber vom Typ eines organischen Polymeren, der polare Gruppen, vorzugsweise Acrylsäurederivate, enthält und weiterhin ein nichtionisches Tensid aus der Gruppe der Polyethylenoxid-Polypropylenoxid-Blockcopolymeren oder auch aus der Gruppe der Polyethylenoxid-Polypropylenoxid-Addukte des N,N'-Tetra-(2-oxypropylpropyl)-N'-(2-oxypropyl)-diethylen-triamins. Der Fermentationsprozeß wird im Falle der ADD-Fermentation so im Rührfermentor durchgeführt, daß die technische Realisierung der pO₂-Sollwertregelung (bei einem ausbeutebegünstigenden Niveau der relativen Gelöstsauerstoffkonzentration) über die koinzidierende Variation von Rührung und Belüftung in der Weise erfolgt, daß Schäumung und Entmischung der Kulturlösung als Störfaktoren der reproduzierbaren Prozeßführung ausgeschaltet werden.

Der Biotransformation von Sterolen bzw. Sterolgemischen mittels Chargenfermentation haftet der Nachteil an, daß der Durchsatz des Transformationssubstrates pro Zeiteinheit und damit die Raum-Zeit-Ausbeute nur von den gewählten Anfangsbedingungen (Komposition des Fermentationsmediums) bestimmt werden, da diese Menge und physiologischen Zustand der mikrobiellen Biomasse und somit die Länge des Fermentationsabschnitts mit hoher Produktbildungs- bzw. Transformationsrate festlegen. Das besondere Merkmal der Chargenfermentation besteht somit darin, daß auf die aktive Beeinflussung der Produktionsbildungsrate und der Dauer des Transformationsprozesses verzichtet wird.

Für die Chargenfermentation von Sterolen zu ADD beträgt der bisher erreichte Maximalwert der durchschnittlichen ADD-Produktbildungsrate 1,79 Gramm ADD pro Liter Kulturlösung in 24 Stunden.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung beinhaltet das Ziel, hohe Sterolmengen pro Zeiteinheit in ADD umzusetzen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein verbessertes Verfahren zur Umwandlung von Sterolen in ADD zu beschreiben, bei dem die Nachteile der bekannten technischen Lösungen vermieden werden.

Erfindungsgemäß wird das realisiert, durch die Zudosierung von direkt metabolisierbaren Nährstoffen zur Fermentationslösung während der Transformationsphase, insbesondere von Kohlenstoff-Quellen wie beispielsweise Glukose den Stickstoff- und Phosphorsubstraten sowie den als Ausgangssubstrat eingesetzten Sterolen bzw. Sterolgemischen in Abhängigkeit vom pH-Wert und/oder des pO_2 -Wertes sowie und/oder der Konzentration des jeweiligen Substrates im Fermentationsmedium. Dabei haben die Spezifik des verwendeten Adsorbers bzw. des Tensids untergeordnete Bedeutung.

Das Verfahren wird in seinem Grundzug wie folgt durchgeführt:

Sterole wie Sitosterol, Cholesterol, Campesterol, Stigmasterol bzw. Ergosterol oder Gemische aus wenigstens zwei dieser Sterole werden in Konzentrationen von 1 Gramm je Liter bis 50 Gramm je Liter als Sterolpräparation aerob mit Mikroorganismen fermentiert, die zur Steroltransformation unter Bildung von ADD befähigt sind, wie z. B. Stämme der Gattung *Mycobacterium*, insbesondere *Mycobacterium vaccae* IMET SK 113 eingesetzt. Die Sterolpräparationen werden entweder nach bekannten Verfahren (Lyophilisierung bzw. Vermahlen, beispielsweise in Korundmühlen) oder nach dem in unserer Anmeldung DD 232 166 beschriebenen Sprühtrocknungsverfahren gewonnen. Es wird in Medien fermentiert, die Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie Mineralsalze enthalten. Die Fermentation erstreckt sich über 24 Stunden bis 192 Stunden und wird bei 20°C bis 45°C bei pH-Werten im Bereich von pH4 bis pH8 durchgeführt. Man setzt dem Fermentationsansatz von Beginn an oder nach einem Zeitintervall bis zu 48 Stunden bis zu 10 Gramm je Liter eines Tensids sowie einen Adsorber in einem Mengenverhältnis von 2 Gramm je Liter bis 200 Gramm je Liter zu. Als Adsorber bzw. Tensid sind die von uns bereits beschriebenen oder andere in der Technik bekannte Substanzen gemeint. Der Adsorber wird nach beendeter Fermentation mittels an sich bekannter Trennmethoden wie Filtration, Zentrifugation oder Separation von der ausfermentierten Kulturlösung einschließlich Biomasse und ggf. nicht umgesetztem Sterol abgetrennt. Anschließend wird das am Adsorber befindliche Produkt ADD zusammen mit dem Begleitprodukt AD durch Behandlung mit einem organischen Lösungsmittel, vorzugsweise Methanol, eluiert und durch an sich bekannte Verfahrensschritte wie Säulenchromatographie, präparative HPLC oder Umkristallisation von Nebenprodukten wie 21-Hydroxy-20-methyl-4-pregnen-3-on und/oder 21-Hydroxy-20-methyl-1,4-pregnadien-3-on gereinigt. Während der Fermentation wird die untere Grenze des pO_2 -Wertes, die größer oder minimal gleich 10% gewählt wird, mittels Sollwertregelung über die Stellgrößen Rührerdrehzahl und Luftmenge eingehalten. Das Vorgehen zur Festlegung des Regimes von Belüftung und Umwälzung der Fermentationslösung im Zusammenhang mit dem Erreichen der pO_2 -Untergrenze in der Wachstumsphase ist auch bereits beschrieben worden.

Ab Fermentationsbeginn werden der pH-Wert, der pO_2 -Wert und die Realisierungshäufigkeit der Stellgliedtätigkeit der pO_2 -Sollwertregelung in an sich bekannter Weise gemessen und registriert. Mit der Realisierungshäufigkeit der Stellgliedtätigkeit der pO_2 -Sollwertregelung ist die Anzahl der Drehzahlumschaltungen und der gegebenenfalls damit gleichlaufenden Belüftungsintervalle je Stunde gemeint.

Das Ende der mikrobiellen Wachstumsphase unter bevorzugter Verwertung der Startdepots an direkt metabolisierbaren Nährstoffen, insbesondere der C-Quellen, wird verfahrensgemäß durch den Übergang der Fermentationskultur in die rasche Alkalisierung und/oder den Abfall der Stellglied-Realisierungshäufigkeit zur pO_2 -Sollwertregelung angezeigt. Somit liegen als Indikatoren für den Beginn der Substratnachdosierung das pH-Minimum und/oder das Maximum der Stellglied-Realisierungshäufigkeit in der ersten Fermentationsphase vor.

Der Start der Nachdosierung von Substraten erfolgt im Intervall zwischen dem Zeitpunkt des pH-Minimums bzw. des Maximums der Stellglied-Realisierungshäufigkeit und dem Zeitpunkt, wenn ein pH-Anstieg um 0,1 bis 1 (bezogen auf das pH-Minimum) und/oder ein mindestens 20%iger Abfall der Stellglied-Realisierungshäufigkeit (bezogen auf deren Maximum) erfolgt ist. Es werden direkt metabolisierbare Kohlenstoff-Substrate wie Glukose oder Saccharose und Stickstoff- bzw. Phosphat-haltige Verbindungen sowie Sterol nachdosiert. Im weiteren Ausbau des Verfahrens erfolgt die Dosierung der Substrate bis zum Erreichen der unteren pH-Schwelle im Bereich zwischen 4,5 und 6,5 so, daß der pH-Abfall maximal 0,1 pro Stunde beträgt. Mit dem Erreichen des pH-Schwellenwertes, beispielsweise pH5,8, wird die Dosierung so vermindert, daß kein weiterer Abfall des pH-Wertes eintritt, bzw. es wird bei unveränderter Dosierungslänge zur Aufrechterhaltung des Schwellenwertes in an sich bekannter Weise Lauge zudosiert. Zur Beendigung der Fermentation werden die Substratdosierungen eingestellt und der Ansatz maximal 24 Stunden weitergeführt. Als Indikatoren für die Ausfermentierung dienen wahlweise das Durchlaufen eines pH-Minimums oder ein mindestens 20%iger Abfall der Stellglied-Realisierungshäufigkeit, bezogen auf den Mittelwert der Dosierungsphase, oder die direkte Messung des Zeitverlaufes der Substratkonzentrationen.

Die eingesetzte Adsorbormenge wird so bemessen, daß die eingestellte Produktbildungsrate während der gesamten Fermentationszeit ohne Beeinträchtigung durch Adsorptionskapazität bzw. -geschwindigkeit realisiert wird.

Das Verfahren wird vorteilhaft wie folgt ausgeführt:

a) Impfkultur

Für die Fermentation zu ADD wird vorzugsweise *Mycobacterium vaccae* IMET SK 113 oder eine der daraus inzwischen verfügbaren Selektanten verwendet. Die Kultivierung erfolgt in Medien, die als Kohlenstoffquelle beispielsweise Glycerol, Glukose, Saccharose, Stärke und/oder Molasse usw., als Stickstoffquelle beispielsweise Hefeextrakt, Harnstoff, Ammoniumsalze, Maisquellwasser, Pflanzenmehle und/oder andere komplexe Medienbestandteile (wie z. B. Fleischextrakt, Hydrolysate usw.) sowie außerdem Mineralsalze verschiedener Zusammensetzungen enthalten. Der pH-Wert liegt um den Neutralpunkt. Die Bebrütungstemperatur beträgt vorzugsweise 20°C bis 45°C, die Bebrütungsdauer 12 bis 77 Stunden. Mit 2,5% bis 20% der so erhaltenen Submerskultur wird das Fermentationsmedium beimpft, das die gleiche oder eine andere Zusammensetzung wie die Impfkultur haben kann.

b) Fermentation

Dem Fermentationsmedium, das neben Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphorsubstraten, Mineralsalze enthält, wird feuchter Adsorber zweckmäßigerweise bereits vor der Sterilisation zugegeben. Die Adsorbermenge liegt zwischen 2 Gramm je Liter und 200 Gramm je Liter. Die Menge ist sowohl von der Kapazität und der Adsorptionsgeschwindigkeit des ausgewählten Adsorbers als auch von der eingesetzten Sterolmenge und der damit zu erwartenden Produktmenge abhängig. Als Adsorber kommen vorteilhaft Copolymerisate aus Acrylsäureester, Ethylvinylbenzen und Divinylbenzen mit einer Korngröße oberhalb 0,4 mm zum Einsatz.

Die Sterolpräparation wird als feinverteilte Suspension als Gesamtmenge (1 Gramm je Liter bis 50 Gramm je Liter) oder portionsweise sofort oder zeitlich versetzt nach dem Beimpfen zugegeben. Auch eine Sterilisation der Gesamtmenge mit dem Medium ist möglich.

Das Tensid wird in Mengen etwa von 0,5 Gramm je Liter bis 10 Gramm je Liter entweder zusammen mit dem Sterol bzw. in Form einer Sterol-Tensid-Präparation oder ebenfalls als Gesamtmenge oder portionsweise sofort oder zeitlich versetzt nach dem Beimpfen zugegeben.

Die Prozeßkontrolle zur ADD-Bildung bzw. zum Verbrauch der Sterole erfolgt durch bekannte analytische Verfahren, wie z. B. durch HPLC-, GC-, DC-Bestimmung der durch Butylacetat aus dem Fermentationsmedium extrahierten Sterole als auch durch HPCL-, GC- oder DC-Bestimmung der vom Adsorber eluierten Produkte. Hierzu wird eine Probe aus dem Fermentationsansatz entnommen, der Adsorber gegebenenfalls durch Sieben abgetrennt, mit Wasser von anhaftenden Bakterien und Mediumsbestandteilen gewaschen und nutschenfeucht ausgewogen. Eine definierte Menge wird mit 80- bis 100%igem Methanol eluiert. Durch HPCL-, GC- oder DC-Trennung, gekoppelt mit UV-Messung, kann als Produktgemisch, das vorwiegend aus ADD und/oder AD sowie den entsprechenden C₂₂-Alkoholen (21-Hydroxy-20-methyl-4-pregnen-3-on und/oder 21-Hydroxy-20-methyl-1,4-pregnadien-3-on) als Nebenprodukten besteht, quantitativ analysiert werden.

Die technische Durchführung der Fermentation erfolgt so, daß das Absinken des pO₂-Wertes etwa unter dem Schwellenwert von 10% verhindert wird, indem im Rührfermentor diskrete Drehzahlumschaltungen begleitet von Belüftungsphasen als Stellmaßnahmen realisiert werden. Dieses technische Regime kommt dem Belangen der Minimierung des Adsorberabtriebes, der natürlichen Schaumbekämpfung und damit der Verhinderung der Entmischung der Kulturlösung entgegen.

In der bevorzugten Ausführungsform wird das Verfahren so durchgeführt, daß maximal 5 Stunden nach dem Durchlaufen des pH-Minimums kontinuierlich Glukose bzw. Saccharose und Ammoniumsulfat bzw. Harnstoff im Kohlenstoff-Stickstoff-Verhältnis bis maximal 10 dosiert werden. Gleichlaufend erfolgt die diskrete oder kontinuierliche Zugabe von bis zu 50 Gramm Sterol je Liter z. B. in diskreten Gaben von 2 bis 10 Gramm je Liter. Die Dosierungsgeschwindigkeit der Substrate wird so gewählt, daß der pro Stunde eintretende pH-Abfall nicht größer als 0,1 wird.

Die verfahrensgemäße Lösung hat folgende Vorteile:

Durch die Entwicklung des vorliegenden Verfahrens zur Steroltransformation mittels zugeführter Fermentation, welches während langer Abschnitte der Prozeßdauer durch die Nachdosierung von frei metabolisierbaren Nährstoffen bzw. Sterol gekennzeichnet ist, werden hohe Raum-Zeit-Ausbeuten des Produktes ADD infolge hoher und über einen langen Zeitraum konstanter Steroldurchsatzraten erreicht.

Weiterhin wird durch die Zugabe aller Substrate in Abhängigkeit vom pO₂-Sollwert ein extensiver Sauerstoffeintrag und damit die Erhöhung des Adsorberabtriebes und weitere Maßnahmen zur Schaumbekämpfung bzw. Verhinderung der Entmischung der Kulturlösung vermieden.

Als zusätzlicher Vorteil wird die Variabilität bei der Auswahl von Adsorber bzw. Tensid gesehen.

Ausführungsbeispiele

1. *Mycobacterium vaccae* (IMET SK 113) wird auf Schrägagar folgender Zusammensetzung 48 Stunden bis 120 Stunden bei 28°C kultiviert:

20g Glycerol, 5g Bacto-Pepton, 3g Fleischextrakt, 15g Agar-Agar ad 1000ml Aqua dest.; pH 7,0.

Mit den entsprechenden Zellen je eines Röhrchens werden 500-ml-Stehrundkolben mit je 50ml Nährlösung folgender Zusammensetzung beimpft:

10g Glucose, 10g Hefeextrakt, 0,5g KH₂PO₄, 0,5g K₂HPO₄, 1,5g (NH₄)₂HPO₄, 0,2g MgSO₄ · 7 H₂O, 0,01g FeSO₄ · 7 H₂O, 0,002g ZnSO₄ · 7 H₂O, Aqua dest. ad 1000ml; pH 7,0.

Nach 36stündigem Schütteln bei 28°C wird diese erste Submerskultur bei einem Impfverhältnis von 1:10 zur Beimpfung einer zweiten Submerskultur verwendet, deren Nährlösung folgende Zusammensetzung hat:

20g Glucose, 10g Hefeextrakt, 0,05g KH₂PO₄, 0,5g K₂HPO₄, 1,5g (NH₄)₂HPO₄, 0,2g MgSO₄ · 7 H₂O, 0,01g FeSO₄ · 7 H₂O, 0,002g ZnSO₄ · 7 H₂O, Aqua dest. ad 1000ml; pH 7,0.

Nach 42stündigem Schütteln bei 28°C wird ein Edelstahl-Glas-Rührfermentor mit 4,5l Bruttovolumen mit 500ml der zweiten Submerskultur beimpft. Die Fermentationslösung hat folgende Zusammensetzung:

43g eines Sterolgemisches mit einem Gesamtsterolgehalt von 92%, 10,75g Glucose, 10,75g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{O}_4\text{H}_5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,44g Harnstoff, 2,95g KH_2PO_4 , 14,90g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 4,42g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,03g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,005g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 400g nutschenfeuchter Adsorber EP 60 (CKB Bitterfeld) sowie 6,5g des nichtionischen Tensids B9 (VEB Chem. Kom. BUNA), Aqua dest. ad 1700ml; pH 7,0.

Das Startvolumen einschließlich Vorkultur und Adsorber beträgt 2,3l.

Nach der Beimpfung wird bei einer Prozeßtemperatur von 31 °C die relative Gelöstsauerstoffsättigung als pO_2 -Wert in der gerührten und belüfteten Fermentationsbrühe als 100%-Wert geeicht. Als Regelschwelle für den pO_2 -Wert werden 25% eingestellt. Die Basisdrehzahl beträgt 450 min^{-1} bei unterbrochener Luftzufuhr. Bei Unterschreitung der pO_2 -Regelschwelle wird die Drehzahl auf 700 min^{-1} erhöht, gleichzeitig der Zuluftweg geöffnet und der Ansatz mit einer Luftmenge von 2l je Liter Fermentationsbrühe und Minute bis zum Erreichen der Regelschwelle von 25% belüftet.

Der Verlauf der Fermentation wird kontrolliert anhand des pH-Verlaufes oder der Realisierungshäufigkeit bzw. des Realisierungsniveaus der Stellgliedertätigkeit der pO_2 -Sollwertregelung.

Nach 22h werden nach Durchlaufen des pH-Minimums $0,73 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1}$ Glucose sowie $0,63 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kontinuierlich nachdosiert.

Gleichlaufend dazu erfolgt die Zugabe von 21,7g des gleichen Sterolgemisches in diskreten Gaben von etwa je 7 bis 8g. Die Nachdosierung von Substraten wird abgebrochen nach 46stündiger Fermentation. Das Endvolumen beträgt 2,7l. Die Ausfermentation der frei metabolisierbaren C- bzw. N-Quellen und damit der Endpunkt der Fermentation ist nach Durchlaufen des pH-Minimums nach 71h erreicht. Die Ausbeute an ADD liegt bei 9,4g/l. Daneben werden 1,12g/l AD sowie 2,04g/l $\Delta^{1,4}$ -C₂₂-Alkohol analytisch nachgewiesen. Die Produktbildungsrate liegt bei $3,2 \text{ g ADD/l} \cdot 24 \text{ h}$.

2. Die Anzucht von *Mycobacterium vaccae* IMET SK 113 erfolgt analog zu Beispiel 1. Die Kultivierungsdauer der zweiten Submerskultur wird verlängert auf 48 Stunden. Die Bedingungen zu Anfang der Fermentation im Edelstahl-Glas-Rührfermentor hinsichtlich Beimpfung, Sterolmenge, Zusammensetzung des Fermentationsmediums, Prozeßtemperatur und anfänglicher Prozeßkontrolle werden analog zu Beispiel 1 eingehalten. Nach Durchlaufen des pH-Minimums bei 22 Stunden werden Glucose mit einer Geschwindigkeit von $1,04 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1}$ und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mit $0,31 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1}$ nachdosiert. Wiederum erfolgt gleichlaufend dazu die Zugabe von insgesamt 21,7g Sterolgemisch in drei Gaben von je 7 bis 8g. Die Zudosierung der Substrate wird abgebrochen nach 46stündiger Fermentation. Das Ende des Prozesses wird angezeigt durch Auftreten eines scharfen pH-Minimums zwischen 50. und 55. Fermentationsstunde. Die Ausbeute an ADD liegt hier nach 55 Stunden bei 9,4g/l. Daneben werden 1,68g/l ADD sowie 1,72g/l $\Delta^{1,4}$ -C₂₂-Alkohol analytisch nachgewiesen. Die Produktbildungsrate beträgt $4,1 \text{ g ADD/l} \cdot 24 \text{ h}$.