

**Kultivierung von Bodenbakterien  
der Spezies *Sinorhizobium meliloti*  
und die Aufarbeitung ihrer  
Signalmoleküle**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
an der Technischen Fakultät  
der Universität Bielefeld**

**vorgelegt von**

**Dipl. Biol. Bodo Kohring**

**im November 2001**

*Wenn der zur lebhaften Beobachtung aufgeforderte Mensch mit der Natur einen Kampf zu bestehen anfängt, so fühlt er zuerst einen ungeheuren Trieb, die Gegenstände sich zu unterwerfen. Es dauert aber nicht lange, so dringen sie dergestalt gewaltig auf ihn ein, daß er wohl fühlt wie sehr er Ursache hat auch ihre Macht anzuerkennen und ihre Einwirkung zu verehren. Kaum überzeugt er sich von diesem wechselseitigen Einfluß, so wird er ein doppelt Unendliches gewahr, an den Gegenständen die Mannigfaltigkeit des Seins und Werdens und der sich lebendig durchkreuzenden Verhältnisse, an sich selbst aber die Möglichkeit einer unendlichen Ausbildung, indem er seine Empfänglichkeit sowohl als sein Urteil immer zu neuen Formen des Aufnehmens und Gegenwirkens geschickt macht.*

**Johann Wolfgang von Goethe**  
**Jena, 1807**

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Erwin Flaschel gilt mein großer Dank nicht nur für die Möglichkeit, an seinem Lehrstuhl für Fermentationstechnik die vorliegende Arbeit anfertigen zu dürfen. Ohne seine große Unterstützung wäre der Aufenthalt in Argentinien nicht möglich gewesen. Und meine Pläne zur Existenzgründung im Bereich in-situ-Mikroskopie hat er immer vorbehaltlos gefördert. Außerdem war er immer für ein klärendes wissenschaftliches Gespräch zu erreichen, um Licht ins Dunkel der biotechnologischen Verfahrenstechnik zu bringen.

Ein großes Dankeschön richte ich auch an Herrn PD. Dr. Karsten Niehaus, der das Korreferat dieser Arbeit übernommen hat. Er ist ein von mir sehr geschätzter Diskussionspartner in allen wissenschaftlichen Belangen und hat mir immer wieder die faszinierenden Aspekte der Forschung mit symbiotischen Systemen vor Augen geführt.

Herrn Prof. Dr. Alfred Pühler möchte ich dafür danken, dass er den Aufenthalt in Argentinien mit gefördert hat. Außerdem bin ich ihm für die vielen Gelegenheiten dankbar, die er mir an seinem Lehrstuhl für Genetik geboten hat, um unsere laufenden Arbeiten zu präsentieren, mir Einblicke in die Projekte seines Lehrstuhls zu gewähren und um mit seinen Wissenschaftlern zu kooperieren.

Ein großes Dankeschön geht auch an Herrn Prof. Dr. Antonio Lagares und Herrn Prof. Dr. Jose Luis Boiardi der Universidad Nacional de La Plata in der República Argentina. In ihren Instituten durfte ich für viereinhalb Monate einen Teil der Experimente durchführen, die in dieser Arbeit aufgeführt sind. Ich denke gerne an die Zeit in Argentinien zurück. Muchas gracias, Señores!

Mein Dank gilt auch allen Kollegen am Instituto de Bioquímica y Biología Molecular und am Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales der Universidad Nacional de La Plata, mit denen ich während dieser Zeit zusammengearbeitet habe und die mich immer wie einen der ihren behandelt haben. Muchas gracias, amigos!

Frau Dr. Caren Wegener und Steffi Schröder vom Lehrstuhl für Genetik sage ich Danke für die Hege und Pflege der von mir eingesetzten Bodenbakterienstämme.

Ein ganz besonderer Dank gilt unserem Dipl.-Ing. Thomas Schäffer, ohne dessen technischen Beistand wohl manche Fermentation nicht erfolgreich und mancher Computerabsturz unvermeidlich gewesen wäre.

In dankbarer Erinnerung bleibt mir immer unser Mechanikermeister Achim Baldus, der leider so plötzlich aus unserem Kreis genommen wurde. Seine Arbeiten bestachen immer durch ihre perfekte Ausführung.

Für Sabine Klusmann, Dr. Justine Wittler, Dr. Usama Ibrahim Gabra Beshay, PD. Dr. Ing. Karl „Mr. Multititel“ Friehs, Dr. Jörg „Hetzel“ Hettwer, Dr. Ralf „Vati“ Neitzel, Dr. Joe „Po-Pax“ Risse, Dr. Thorsten „The Ox“ Schmidt und Dr. Carsten „Vossi“ Voss aus der Fermentationstechnik gibt es ein Extra-Dankeschön. Es war mir immer eine Freude, mit euch zusammenzuarbeiten. Danke Freunde!

Bei allen anderen Kollegen am Institut für Fermentationstechnik, mit denen ich während der Anfertigung dieser Arbeit zusammengearbeitet habe, möchte ich für das angenehme Betriebsklima bedanken.

Nicht zuletzt gilt mein großer Dank Siegi Kohring, die immer an mich geglaubt hat und mich auch in schwierigen Zeiten vorbehaltlos unterstützte. Danke !

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Ziele der Arbeit .....	4
<b>2</b>	<b>Theoretischer Hintergrund</b> .....	<b>5</b>
2.1	Die Bedeutung der Leguminosen-Rhizobien Symbiosen für die Welternährung .....	5
2.2	Anwendung von Starterkulturen in der Landwirtschaft .....	7
2.3	Die Futterpflanze Luzerne ( <i>Medicago sativa</i> ) .....	8
2.4	Das Bodenbakterium <i>Sinorhizobium meliloti</i> .....	9
2.5	Die Bedeutung der Symbiose von Luzerne und <i>Sinorhizobium meliloti</i> für die Landwirtschaft Argentiniens und Uruguays .....	10
2.6	Säuretoleranz von Luzerne und <i>Sinorhizobium meliloti</i> .....	11
2.7	Die Oberflächenmatrix von <i>Sinorhizobium meliloti</i> und ihre Bedeutung für die Symbiose .....	15
2.8	Die Entwicklung der Symbiose zwischen <i>Sinorhizobium meliloti</i> und Luzerne ( <i>Medicago sativa</i> ) .....	16
2.9	Die Nod-Faktoren .....	19
2.10	Die Expression der nod-Gene .....	23
2.11	Die Kultivierung von Rhizobien im technischen Maßstab .....	31
2.12	Die Herstellung von Lipochitooligosacchariden (LCOS) .....	35
2.13	Das Wachstum von Mikroorganismen .....	36
2.14	Die Produktbildung .....	39
2.16	Die Bilanzierung von Fermentationsprozessen .....	41
2.17	Die Aufarbeitung von Biomolekülen .....	49
2.18	Die Adsorption .....	54
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>61</b>
3.1	Verwendete Bakterienstämme und Plasmide .....	61
3.2	Verwendete Nährstofflösungen .....	63
3.3	Grundlegende Kultivierungs- und Analysemethoden .....	66
3.4	Untersuchungen zur Adsorption von Lipochitooligosacchariden an lipophile Matrices .....	72
3.4.1	Extraktion von Nod-Faktoren mit einer Wirbelschicht-Adsorptionssäule aus Schüttelkolbenkulturen von <i>S. meliloti</i> 1021pEK327 .....	73
3.4.2	Kinetische Untersuchungen zur Adsorption von Nod-Faktoren an Amberlite <sup>®</sup> XAD-2 pract. Harzperlen .....	76
3.5	Fermentationen und Aufarbeitung .....	79
3.5.1	Fermentationen von <i>Sinorhizobium meliloti</i> im 1 L- und 2 L-Maßstab .....	80
3.5.2	Aufarbeitung und Analyse der Nodulationsfaktoren aus Fermentationen im 1 L- und 2 L-Maßstab .....	84
3.5.3	Fermentationen im 20 L-Maßstab zur Gewinnung von Nodulations-Faktoren .....	89
3.5.4	Gewinnung und Analyse der Nodulations-Faktoren aus Fermentationen im 20 L-Maßstab .....	93
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>97</b>
4.1	Auswirkungen verschiedener pH-Werte auf <i>S. meliloti</i> LPU63 .....	97
4.1.1	Satzprozesse von <i>S. meliloti</i> LPU63 bei variierenden pH-Werten .....	97
4.1.2	Kontinuierliche Fermentationen von <i>S. meliloti</i> LPU63 und <i>S. meliloti</i> 2011 mit Absenkung des pH-Wertes .....	102

## **Inhaltsverzeichnis**

---

4.2	Kultivierungen von <u>Sinorhizobium meliloti</u> -Stämmen in Melassemedien .....	110
4.2.1	Kultivierungen von <u>Sinorhizobium meliloti</u> im Schüttelkolben mit Melasse-Nährlösungen .....	110
4.2.2	Fermentationen im 2 L-Maßstab mit Zufütterung von <u>S. meliloti</u> LPU63 .....	121
4.2.3	Einfluss des Mediums auf die Exopolysaccharidsynthese und Agglutination von <u>S. meliloti</u> LPU63 bei Zulaufkultivierungen .....	127
4.2.4	Ungeregelte und geregelte Zulaufkultivierungen im 2 L Maßstab von <u>S. meliloti</u> LPU63 .....	137
4.3	Produktion und Aufarbeitung von Nodulations-Faktoren aus <u>Sinorhizobium meliloti</u> 1021pEK327 .....	146
4.3.1	Die Bedeutung von Medien und Mediumkomponenten für das Wachstum und die Nod-Faktor-Synthese von <u>S. meliloti</u> 1021pEK327 .....	146
4.3.2	Die Auswahl einer Adsorptionsmatrix für die in-Prozess-Adsorption von Nod-Faktoren .....	154
4.3.3	Der Verlauf der Adsorption von Nod-Faktoren an Amberlite <sup>®</sup> XAD-2 pract. ....	159
4.3.4	Adsorption von Nod-Faktoren aus <u>S. meliloti</u> 1021pEK327-Kulturen in Gegenwart lipophiler Harzkugeln .....	168
4.3.5	Fermentationen im 20 L-Maßstab zur Gewinnung von Nodulations-Faktoren .....	178
4.3.6	Die Produktbildung von <u>S. meliloti</u> 1021pEK327 im herkömmlichen Satzbetrieb und im Bypass-Verfahren .....	187
4.3.7	Aufreinigung von Nod-Faktor-Lyophilisaten mittels präparativer RP <sub>18</sub> -Chromatographie .....	197
4.3.8	Analyse der Produkte aus einem Satzprozess mit nachfolgender Aufreinigung und einem Bypass-Verfahren .....	200
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>208</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>211</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>234</b>
7.1	Programme zur Steuerung der Zufütterungspumpe beim Infors-Fermenter .....	234
7.2	Verwendete Chemikalien .....	235
7.3	Verwendete Geräte, Materialien und Ausrüstung .....	236
7.4	Abkürzungen .....	239
7.5	Verwendete Formelzeichen .....	241
<b>8</b>	<b>Curriculum vitae .....</b>	<b>244</b>
<b>9</b>	<b>Schriftenverzeichnis .....</b>	<b>245</b>

### 1 Einleitung

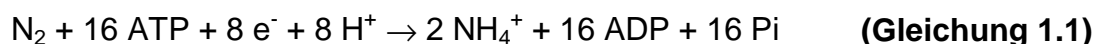
Der Gehalt an Stickstoff im Ackerboden ist in der Landwirtschaft der bedeutendste limitierende Parameter für einen ertragreichen Anbau fast aller Kulturpflanzen. Die Verfügbarkeit von Stickstoff ist die Voraussetzung für qualitativ hochwertige und proteinreiche Futter- und Nahrungsmittel. In den entwickelten Agrarindustrien wird die Stickstoffversorgung des Bodens durch die Produktion von mineralischen Stickstoffdüngern mittels Haber-Bosch-Verfahrens und den zum Teil im Übermaß vorhandenen organischen Stickstoffquellen in Form tierischer Exkremente aus einer intensiven Viehwirtschaft sichergestellt. In vielen Ländern der tropischen und subtropischen Regionen der Erde kann aber nicht auf diese Stickstoffquellen zurückgegriffen werden, um die Ausbeute der landwirtschaftlichen Nutzflächen zu steigern oder um potentielle Bodenflächen einer landwirtschaftlichen Nutzung zugänglich zu machen.

Für diese Anwendungsfelder stellt die biologische Stickstofffixierung (**BNF = Biological Nitrogen Fixation**), auch im Hinblick auf eine nachhaltige (s. Def. Nachhaltigkeit, Kasten) landwirtschaftliche Technologie, die derzeit sinnvollste Alternative und Ergänzung zur Verwendung von mineralischen Stickstoffdüngern in der Landwirtschaft dar. Die biologische Grundlage vieler Anwendungen der BNF in der Landwirtschaft ist die Symbiose (gr.: sym = zusammen und bios = leben →

#### **Nachhaltigkeit, nachhaltige Entwicklung (sustainable development)**

Definition: "Unter dauerhafter (nachhaltiger) Entwicklung verstehen wir eine Entwicklung, die den Bedürfnissen der heutigen Generation entspricht, ohne die Möglichkeiten künftiger Generationen zu gefährden, ihre eigenen Bedürfnisse zu befriedigen und ihren Lebensstil zu wählen. Die Forderung, diese Entwicklung 'dauerhaft' zu gestalten, gilt für alle Länder und Menschen. Die Möglichkeit kommender Generationen, ihre eigenen Bedürfnisse zu befriedigen, ist durch Umweltzerstörung ebenso gefährdet wie durch Umweltvernichtung und durch Unterentwicklung in der Dritten Welt" (Brundtland-Bericht, S. XV, Weltkommission für Entwicklung und Umwelt "World Commission on Environment and Development (**WCED**)", 1987)

Lebensgemeinschaft; Dose, 1990) zwischen Kulturpflanzen aus der Ordnung *Fabales* (= *Leguminosae*) und Bodenbakterien der phylogenetisch weit verzweigten Familie der *Rhizobien* (gr.: rhizos = Wurzel). Die Bakterien (Mikrosymbionten) induzieren die Bildung von Knöllchen (= Noduli) an den Wurzeln ihrer Wirtspflanzen (Makrosymbionten), in denen sie sich dann einnisten und als Bakterioide differenzieren. In diesen Noduli sind die Bakterioide in der Lage, den Stickstoff (N<sub>2</sub>) aus der Luft zu fixieren und mit einem Nitrogenase-Enzymkomplex in Ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) umzuwandeln, wie in **Gleichung 1.1** gezeigt:



So stellen die *Rhizobien* den für die Leguminosen lebenswichtigen Stickstoff in einer nutzbaren Form zur Verfügung. Im Gegenzug versorgt die Pflanze die Mikrosymbionten mit allen notwendigen Nährstoffen und Energieequivalenten, die sie zum Überleben und zur Stickstofffixierung in den Noduli benötigen.

Die BNF bildet aus ökonomischer wie auch ökologischer Sicht im Sinne einer nachhaltigen Landwirtschaft eine äußerst sinnvolle Alternative: i) zur Versorgung der Ackerböden mit dem auch für andere Kulturpflanzen, insbesondere Cerealien,

lebensnotwendigen Stickstoff, ii) zur Regeneration ausgelaugter landwirtschaftlicher Nutzflächen und iii) zur Erstkultivierung stickstoffarmer, potentieller Ackerböden. Allein in Argentinien und Uruguay wurden 1998 die Leguminosen Luzerne auf ca. 4,5 Mill. ha und die Sojabohne auf 8,2 Mill. ha (FAO Statistiken, 1998: <http://apps.fao.org>) angebaut. Aber bei der Kultivierung der Luzerne hat es in beiden Ländern während der letzten 10 Jahre Ertragseinbußen von mehr als 20 % gegeben. Diese Entwicklung ist umso bedenklicher, da es in Argentinien und Uruguay seit Jahrzehnten kleine, mittelständische und große Unternehmen gibt, die *Rhizobien*-Starterkulturen (Inokula) für die Landwirtschaft produzieren, um mit deren Hilfe gezielt den endogenen Titer an *Rhizobien* in den Luzerneanbauflächen zu erhöhen und so für eine hohe Nodulationsquote, damit für effektive Stickstofffixierung in der Symbiose und damit letztendlich für hohe Ernteerträge beim Luzerneanbau zu sorgen.

Doch der Ertrag von Leguminosen und *Rhizobien* in der Landwirtschaft ist von vielen biologischen, geologischen und klimatischen Faktoren abhängig. So kann ein niedriger pH Wert des Bodens und die damit zusammenhängenden Faktoren eine Etablierung der Symbiose zwischen Pflanze und Mikroorganismus erheblich stören oder verhindern und zu erheblichen Ertragseinbußen beim Anbau der Leguminosen führen. Der Wettbewerb symbiontisch effizienter und ineffizienter Bodenbakterien im Erdreich und bei der Besiedelung der Pflanzen beeinflusst die Ertragsleistung der Leguminosen ebenso wie die Fähigkeit der *Rhizobien*, sich den vorherrschenden Umweltbedingungen anpassen zu können. Ziel eines von der Europäischen Union geförderten Forschungsprojektes (Titel: „Improvement of Symbiosis Between *Rhizobium meliloti* and Alfalfa in Acid Soils of Argentina and Uruguay, Nr.: TS3\*-CT94-0265) war es deshalb, die Ursachen der Ertragseinbußen beim Luzerneanbau zu erforschen und geeignete Bakterienstämme zu finden, die, als Starterkulturen eingesetzt, eine hohe Wettbewerbsfähigkeit gegenüber den endogenen Bakterien im Boden aufweisen und tatsächlich eine effiziente Nodulation und Stickstofffixierung gewährleisten.

Basis der Etablierung einer Symbiose zwischen Leguminose und *Rhizobium* ist die „Kommunikation“ zwischen Pflanze und Bodenbakterium. „Sprachmittel“ sind chemische Botenstoffe oder Signalmoleküle, die von beiden Symbiosepartnern synthetisiert und in ihre Umgebung sekretiert werden, wobei sich die Moleküle der Pflanze und des Bakteriums in ihrer chemischen Struktur deutlich voneinander unterscheiden. Signalmoleküle dienen unter anderem zur Anlockung des Mikrosymbionten und dem Erkennen und Unterscheiden zwischen einem symbiotischen oder pathogenen Organismus. Darüber hinaus lösen die Botenstoffe in beiden Symbionten Prozesse aus, die die Etablierung der Symbiose, d.h. das Anhaften der Bakterien an die Wurzel, die Knöllchengenese, die Infektion der Noduli durch die Bakterien und die Umwandlung zu den stickstofffixierenden Bakteroiden, ermöglichen (Mc Khann *et al.*, 1994).

Aus wissenschaftlicher Sicht von besonderer Bedeutung sind die von den *Rhizobien* produzierten Botenstoffe, Nodulationsfaktoren (Nod-Faktoren) genannt. Es sind je nach *Rhizobien*-Stamm unterschiedlich dekorierte Glycolipide. Allein durch Auftragung dieser Nod-Faktoren auf die Wurzeln der Wirtspflanze kann die Bildung der Knöllchen induziert werden, die Gegenwart der Bakterien ist dabei nicht erforderlich. Dabei reichen schon Konzentrationen von  $10^{-10}$  M bis  $10^{-7}$  M an Nod-Faktoren aus, um die beschriebenen Effekte auszulösen (Ardourel *et al.*, 1994,

Truchet *et al.*, 1991, Ehrhardt *et al.*, 1992). Aufgrund der Wirkungsweise von Nod-Faktoren können sie als Pflanzenwachstumsregulatoren oder Phytohormone eingestuft werden, obwohl sie anhand ihrer molekularen Struktur nicht in die bekannten Klassen der Cytokinine, Auxine, Ethylen, Abscisinsäure und Gibbereline einzuordnen sind (Raven, 2000).

Ein besonderes Interesse verdienen die Nod-Faktoren der *Rhizobien* in neuerer Zeit auch deshalb, weil sie in Experimenten mit Pflanzen (Pflanzenzellen) anderer Gattungen, deren Wurzeln die *Rhizobien* nicht besiedeln (Nicht-Wirtssysteme), verschiedene Effekte erzeugten. Diese reichen von Aktivierung der pflanzeigenen Abwehrreaktionen (Niehaus *et al.*, 1997a) bis zur Rettung entwicklungsdefekter Pflanzenembryonen (De Jong *et al.*, 1993). Und Experimente mit tierischen Modellsystemen scheinen darauf hinzudeuten, dass Nod-Faktoren oder Nod-Faktoren-Derivate eine biologische Funktion auch in tierischen Systemen besitzen können (Semino *et al.*, 1995).



## 1.1 Ziele der Arbeit

Aus dem oben Dargestellten geht hervor, dass sowohl die Bodenbakterien der Familie *Sinorhizobium* als auch die von ihnen synthetisierten Nod-Faktoren für den Einsatz in der Landwirtschaft und für die Forschung einen besonderen Stellenwert besitzen. Aus den bisher erzielten Forschungsergebnissen lassen sich drei Fragen ableiten, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden:

- 1) Das Verhalten von *Sinorhizobium meliloti* LPU63 im Rührkessel bei unterschiedlichen pH-Werten im Hinblick auf die Anwendung dieser Mikroorganismen in sauren Böden sollte analysiert werden. In Satzkulturen und im kontinuierlichen Betrieb sollte das Wachstum des Stamms *Sinorhizobium meliloti* LPU63 bei variierenden pH-Werten beobachtet werden. Gibt es Unterschiede zwischen *Sinorhizobium meliloti* LPU63 und dem Wildtypbakterienstamm *Sinorhizobium meliloti* 2011 im Verhalten bei einer Ansäuerung des die Bakterien umgebenden Milieus? Welche Effekte üben wechselnde pH-Bedingungen auf die Bodenbakterien, insbesondere auf die Synthese von Nod-Faktoren bei *Sinorhizobium meliloti* LPU63 aus?
- 2) Im Hinblick auf die Produktion von Starterkulturen für die Landwirtschaft in Argentinien und Uruguay sollte eine in der Komposition unkomplizierte, preisgünstige und ertragreiche Nährlösung auf der Basis lokal verfügbarer Rohstoffe entwickelt werden. Dieses Kultivierungsmedium sollte mit den im Rahmen des EU-Projektes TS3\*-CT94-0265 (s. oben) in Argentinien und Uruguay isolierten säuretoleranten *Sinorhizobium meliloti* Stämmen LPU63 und CE15 und mit dem Derivat des Wildtypstamms *Sinorhizobium meliloti* 2011 getestet werden. Es sollten Vergleichsexperimente mit anderen Nährlösungen durchgeführt werden. Experimente im Rührkesselreaktor sollten zeigen, welche Fermentationsstrategien sich eignen, um mit *Sinorhizobium meliloti* LPU63 maximale Biomasseausbeuten zu erzielen.
- 3) Die biotechnologische Produktion und Aufarbeitung von Signalmolekülen (Nodulationsfaktoren) mit dem Nod-Faktor überexprimierenden Stamm *Sinorhizobium meliloti* 1021p(EK327) sollte im Hinblick auf die steigende Nachfrage nach Nod-Faktoren in Forschung und Anwendung weiter optimiert werden. Die Verwendung eines Vollmediums bei der Produktion von Nod-Faktoren sollte getestet werden. Im Gegensatz zu den bisher genutzten Verfahren zur Produktion und Aufarbeitung der Nod-Faktoren (Kohring, 1995a) sollte die Adsorption der Nod-Faktoren-Moleküle an lipophile Harzperlen in den Fermentationsprozess integriert werden. Dazu sollte die Suspension mit Bodenbakterien während des Kultivierungsprozesses durch eine mit Adsorberharz gefüllte Wirbelschichtkolonne (= Adsorptions-Bypass) geschickt werden. Die im Schüttelkolben durchgeführten Experimente zur Anwendung der integrierten Aufarbeitung sollten auf den 30 L – Produktionsmaßstab übertragen werden. Die erhaltenen Produkte aus einem Satzprozess im Rührkessel mit herkömmlicher Aufarbeitung der Nod-Faktoren und aus einem Prozess mit integrierter Bypass-Säule sollten miteinander verglichen werden. Die Adsorptionskinetik des verwendeten Harzes sollte untersucht werden.

## 2 Theoretischer Hintergrund

### 2.1 Die Bedeutung der Leguminosen-Rhizobien Symbiosen für die Welternährung

In den tropischen und subtropischen Regionen leben ca. 90 % der gesamten Weltbevölkerung. Und diese wird nach konservativen Schätzungen spätestens im Jahr 2025 die 8-Milliarden-Menschen Grenze überschritten haben. (Bøckman *et al.*, 1990). Es gilt, insbesondere in diesen Regionen, den täglichen Nährstoffbedarf an Nahrungs- und Futtermitteln, und das bedeutet im überwiegenden Maß an Pflanzen, zu decken. Durch den Anbau von Pflanzen in den Tropen und Subtropen werden derzeit ca. 80 % des dort nachgefragten Ernährungsbedarfs an Kalorien und Proteinen erzeugt (Vance, 1997). Die weiter stark wachsende Bevölkerung in diesen Regionen verlangt von der Landwirtschaft höhere Ausbeuten, um die steigenden Nachfragen nach pflanzlichen Lebensmitteln zu decken. Diese Produktivitätssteigerung der Landwirtschaft in den Tropen und Subtropen kann bei vielen Pflanzen nur durch einen verstärkten Eintrag von Stickstoff in die landwirtschaftlichen Nutzflächen erzielt werden (Bøckman *et al.*, 1990).

Schon jetzt nimmt der Bedarf an mineralischen Stickstoffdüngern für die Landwirtschaft in diesen Ländern jährlich um durchschnittlich 4,1 % zu (Heidenreich, 1998), bei den Industrienationen liegt die Zunahme der Nachfrage nach mineralischen Stickstoffdüngern derzeit bei 1,3 % pro Jahr. Dies entspricht weltweit insgesamt einer Zunahme von 80-90 Mill. Tonnen an mineralischem Stickstoffdünger pro Jahr (Peoples *et al.*, 1995a). Im Hinblick auf die technisch aufwendige, kosten- und energieintensive Herstellung von mineralischen Stickstoffdüngern mit Hilfe des Haber-Bosch-Verfahrens, die hohen Importkosten für mineralische Stickstoffdünger bei fehlenden eigenen Produktionskapazitäten, die oft nur rudimentär vorhandenen Strukturen und Organisationen in der Landwirtschaft der Staaten in den tropischen und subtropischen Regionen, technisch unterentwickelten Ackerbaumethoden und mangelnden Devisen, sind die Farmer in den Tropen und Subtropen auf andere Methoden zur Anreicherung des Stickstoffgehalts in ihren Ackerböden angewiesen.

Hier bietet die biologische Stickstofffixierung (BNF), nach neuesten Theorien eine Entwicklung archaischer Mikroorganismen in Folge eines aufkommenden Mangels an gebundenem anorganischen Stickstoff (Kasting *et al.*, 2001, Navarro-González *et al.*, 2001), mit ihren Kapazitäten zur Bindung von  $\frac{1}{2}$  aus der Luft ein wichtiges ökonomisches und ökologisch nachhaltiges Potential, um einen bedeutenden Teil des notwendigen Stickstoffeintrags in das Ökosystem sicherzustellen. Schätzungen zur Folge beläuft sich der jährliche weltweite Stickstoffeintrag durch die BNF in den Boden auf ca. 139 - 170 Mill. Tonnen N (Peoples *et al.*, 1995a). Die für die Landwirtschaft bedeutendsten Lebensgemeinschaften zwischen *Leguminosen* und Rhizobien sind in **Tabelle 2.1** zusammengefasst. Pflanzen wie die Luzerne, der Weiß- oder Wiesenklee in der Symbiose mit Rhizobien liefern nicht nur ein äußerst proteinreiches Grünfutter für die Viehzucht. Mit 9.000 kg Trockensubstanz je ha liefert z.B. die Luzerne auch ein nährstoff- und ertragreiches Trockenfutter für die Winterfütterung (Edlin, 1969) und kann so als sinnvoller Ersatz für Tiermehl als Futterzusatz dienen. Als Gründünger eingesetzt und untergepflügt, kann mit diesen Pflanzen als Zwischenfrucht ein Stickstofftransfer von 25-110 kg N·ha<sup>-1</sup> in den Boden erreicht werden (Vance, 1997). Nach Abzug der Kosten für den Anbau von Luzerne als Zwischenfrucht bedeutet dies für einen amerikanischen Landwirt mit einer 150 ha

## 2 Theoretischer Hintergrund

großen Getreidebaubetrieb eine jährliche Einsparung von 2.600 US \$ an mineralischem Stickstoffdünger (Peterson *et al.*, 1991). Beim gemischten Getreide / Leguminosenanbau (Mohrenhirse / Sojabohne; *Sorghum bicolor* / *Glycine max*) können durch die Leguminose bis zu 57 % Stickstoff auf das Getreide übertragen werden (Fujita *et al.*, 1992).

**Tabelle 2.1** Beispiele für bedeutende Bakterien-Pflanzen-Systeme der biologischen Stickstofffixierung in der Landwirtschaft (Nach Peoples *et al.*, 1995 a und b, Pueppke, 1996, van Rhijn *et al.*, 1995 und FAO Statistiken, 1998: <http://apps.fao.org>)

Makrosymbiont (Pflanze)	Mikrosymbiont (Bakterium)	Stickstoff-Fixierung (kg·ha <sup>-1</sup> )	Welt-Produktion 1999 ×10 <sup>6</sup> Mt·a <sup>-1</sup>
Erdnuß ( <i>Arachis hypogaea</i> )	<i>Rhizobium cowpea</i>	37-206	31,964
Erbse ( <i>Pisum sativa</i> )	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	17-244	7,072
Linse ( <i>Lens culinaris</i> )	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	10-192	3,146
Sojabohne ( <i>Glycine max</i> )	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> , <i>Bradyrhizobium elkanii</i> , <i>Sinorhizobium fredii</i>	57-254	156,19
Kichererbse ( <i>Cicer arietinum</i> )	<i>Mesorhizobium ciceri</i>	3-141	9,336
Stangenbohne ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> , <i>Rhizobium tropi</i> , <i>Rhizobium etli</i>	0-125	4,473
Lupine ( <i>Lupinus angustifolius</i> )	<i>Rhizobium lupini</i>	32-288	1,715
Luzerne ( <i>Medicago sativa</i> )	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	90-386	Keine Daten verfügbar
Dicke, Pferde-, Sau- bohne ( <i>Vicia faba</i> )	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	53-330	3,370
Augenbohne ( <i>Vigna unguiculata</i> )	<i>Sinorhizobium fredii</i> , <i>Rhizobium</i> sp. NGR 234	9-201	3,273
Wiesen- oder Rotklee ( <i>Trifolium pratense</i> )	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	69-373	Keine Daten verfügbar
Weißklee ( <i>Trifolium repens</i> )	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	54-291	Keine Daten verfügbar

Durch die zusätzlichen bodenverbessernden Effekte von Leguminosen als Zwischenfrucht konnte beim Maisanbau (*Zea mays*) im Wechsel mit der Straucherbse (*Cajanus cajan*) eine Ertragssteigerung von 353% erreicht werden (Peoples *et al.*, 1992). Luzerne, Erdnuß und Steinklee (*Melilotus*) bieten in Symbiose mit geeigneten Bakterienstämmen zudem die Möglichkeit, auch in trockenen, salzhaltigen, aber stickstoffarmen Regionen angebaut zu werden und dort zur Verbesserung der Bodenqualität beizutragen (Zahran, 1999).

### 2.2 Anwendung von Starterkulturen in der Landwirtschaft

Fehlen beim Luzerneanbau in den Ackerböden die für die Etablierung einer Symbiose notwendigen Rhizobien, so können diese in Form von Starterkulturen (Inokula) dort ausgebracht werden. Die Produktion geeigneter Starterkulturen kann dabei mit einfachen technischen Mitteln, sprich Fermentern, erfolgen (Gulati, 1980b).

Für die Applikation der Rhizobien gibt es verschiedene Techniken, mit der die produzierten Starterkulturen auf die landwirtschaftlichen Nutzflächen ausgebracht werden können (Höflich *et al.*, 1985). In fast allen Anwendungen werden die Starterkulturen zusammen mit den Leguminosen-Samen bei der Aussaat in den Boden gebracht:

- a) Die einfachste Technologie ist die Ausbringung von flüssigen Präparaten. Die produzierte Starterkultur wird in flüssigkeitsdichten, aber atmungsaktiven und sterilen Plastiksäcken verpackt und direkt in die Furche neben die Pflanzensamen getropft oder auf die Luzerne-Samen gesprüht, bevor diese in den Boden gelangen. Inzwischen besitzen die Flüssigpräparate bei 20 - 25 °C eine Lagerfähigkeit von bis zu 14 Monaten und halten dabei einen Lebendzelltiter von  $2 \cdot 10^9$  bis  $5 \cdot 10^9$  Zellen·mL<sup>-1</sup>. Es besteht auch die Möglichkeit, die Leguminosensamen mit dem Inokulum zu besprühen und diese anschließend zu trocknen (Lambert *et al.*, 1998). Dieses Verfahren erlaubt nach Ausbringung der Samen einen Bakterientiter von bis zu  $8,8 \cdot 10^5$  Bakterien / Samen (Smith, 1998).
- b) Die Gefriertrocknung (Lyophilisation) von produzierten Starterkulturen ist technisch sehr aufwendig und kostenintensiv. Zwar ist das gewonnene Präparat einfach und über einen längeren Zeitraum zu lagern und zu transportieren. Das Präparat muss aber erst wieder in Lösung gebracht werden und die Bakterientiter im Boden nach Ausbringung des Inokulums bleiben deutlich hinter denen anderen Technologien zurück (Mareèková, 1983).
- c) Die am häufigsten angewendete Technik ist die Ausbringung von festen Präparaten. Dabei werden die produzierten Starterkulturen mit verschiedenen sterilisierten Trägern (Torf, Braunkohle, Gips, Zellulose oder Tonmineralien) vermengt. Die Überlebensrate hängt sehr stark vom verwendeten Trägermaterial ab. Mit Torf als Trägermaterial konnten *Sinorhizobium meliloti*-Titer von  $\geq 10^8$  Zellen·g<sup>-1</sup> Präparat erzielt werden (Höflich *et al.*, 1987). Die Lagerzeit beträgt bei diesem Verfahren maximal 6 Monate. Die Verwendung von Torf aus ökologischer Sicht ist allerdings bedenklich, da viele der Torfabbaugebiete (Moore) inzwischen als ökologisch bedeutsame Biotop eingestuft werden und deshalb der Torfabbau in diesen Gebieten reduziert oder eingestellt wurde.

Welche Schwierigkeiten aber entstehen können, wenn die positiven Ergebnisse der Wissenschaft über BNF in landwirtschaftliche Projekte umgesetzt werden sollen und wie kompliziert es ist, bei den einzelnen Farmern ein hohes Maß an Akzeptanz für diese nachhaltige landwirtschaftliche Technologie zu schaffen, zeigt nicht nur die Abschlusserklärung zur zweiten europäischen Konferenz über Stickstofffixierung (Legocki *et al.*, 1997). Die Komplexität bei der Etablierung einer Symbiose zwischen Pflanze und Mikrosymbiont und die zahlreichen Parameter, die bei der Anwendung der Starterkulturtechnik z.B. im Erdnußanbau (*Arachis hypo-*

gaea) eine Rolle spielen, dürfen nicht vernachlässigt werden. Dies verdeutlicht das Stickstofffixierungs-Projekt in Zimbabwe (Broerse *et al.*, 1996), wo Kleinbauern im Rahmen eines Entwicklungshilfeprogrammes mit Rhizobien-Inokula versorgt wurden, um den Ertrag ihrer Nutzpflanzen zu steigern. Ein schlechtes Saatgut der Leguminose, Phosphatmangel im Boden der Anbaugelände und Pflanzenkrankheiten sorgten trotz des wiederholten Einsatzes von Starterkulturen für niedrige Ernteerträge. Die geringen Erlöse für das Produkt Erdnuß im Verhältnis zu den verursachten Kosten ließen das Projekt letztendlich scheitern.

Auf der anderen Seite zeigen Projekte in Entwicklungsländern wie Thailand das Potential bei der Etablierung der Starterkulturtechnik für eine höhere Ausbeute der Rhizobien-Leguminosen-Symbiose (Hall *et al.*, 1995). Je nach Ausbildungsstand der Bauern, den Umweltbedingungen beim Anbau und der qualifizierten Unterstützung durch die Landwirtschaftsexperten konnte der Ertrag beim Sojabohnenanbau (*Glycine max*) unter Verwendung von Rhizobien-Starterkulturen um bis zu 49 % gesteigert werden, was bei den einzelnen Farmern letztlich in einer Einkommenssteigerung von 311 % resultierte.

### 2.3 Die Futterpflanze Luzerne (*Medicago sativa*)

Die Luzerne, in **Abbildung 2.1** gezeigt, wird auch Schnecken-, Sichel- oder Hopfenklee genannt (engl., span.: alfalfa, lat.: *Medicago sativa*) und gehört zur Familie der *Fabaceae* (Schmetterlingsblütler = Papilionaceae).



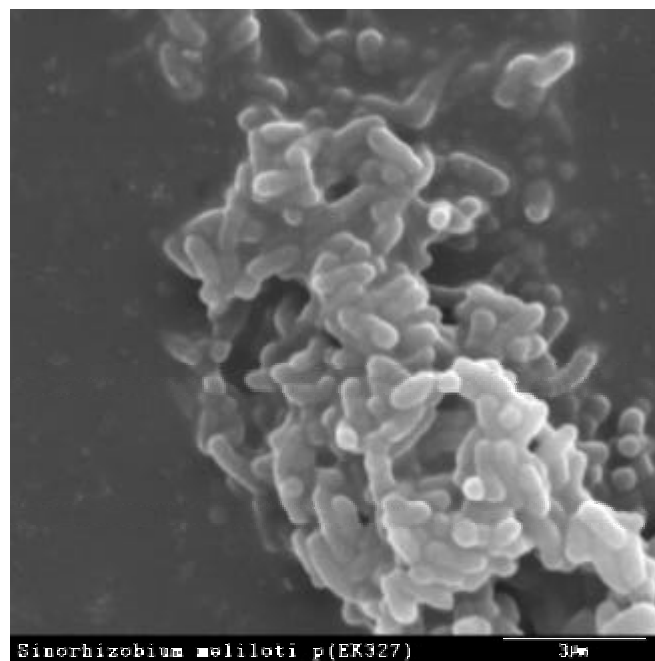
---

**Abbildung 2.1** Luzerne (*Medicago sativa*) zur Blütezeit im September auf einer Anbaufläche in der argentinischen Pampa (Abbildung mit freundlicher Genehmigung durch Herrn Prof. Dr. Antonio Lagares, La Plata, Argentina)

Diese Familie wird zur Ordnung der Fabales (Leguminosae) gezählt, die insgesamt drei Familien mit insgesamt 20.000 Arten umfasst (Straßburger, 1983). Die mehrjährige, krautige, blau bis blauviolett blühende Pflanze wird bis zu einem Meter hoch, ihr Wurzelwerk kann bis zu zwei Meter in den Boden ragen. Die Blüten sind in Trauben angeordnet, die in den Blattachseln der oberen Sprossachsen entstehen. Die einzelnen Blätter der dreizähligen Blattfiedern sind an ihrer Spitze gezähnt und stachelspitzig. Die Fruchtstände der Luzerne sind unbewehrte Hülsen, die schneckenförmig aufgedreht sind und 2 - 3 Windungen besitzen (Geisler, 1991). Die Blütezeit der Luzerne dauert in Mitteleuropa von Juni-August (Schmeil, 1982), in Argentinien und Uruguay von September bis November. Die Heimat der Luzerne liegt in Asien (Südrußland – Tibet, Garcke, 1972), doch wie viele andere Leguminosen wird sie inzwischen auf der ganzen Welt kultiviert.

### 2.4 Das Bodenbakterium *Sinorhizobium meliloti*

Bodenbakterien der Gattung *Sinorhizobium*, die in **Abbildung 2.2** dargestellt sind, werden zur alpha-Subgruppe der Proteobakterien gezählt. Sequenzanalysen der kleinen Untereinheit der ribosomalen RNA oder 16-s-rRNA haben zu einer Neuordnung der Rhizobiaceae geführt, die derzeit fünf Gattungen umfasst: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* und *Sinorhizobium* (Young *et al.*, 1996). Zur letztgenannten Gattung des phylogenetisch weit verzweigten Stammbaums der Rhizobien wird auch das Bodenbakterium *Sinorhizobium meliloti* (früher *Rhizobium meliloti*) gerechnet.



---

**Abbildung 2.2** Gentechnisch modifizierte Bodenbakterien des Stamms *S. meliloti* 1021 pEK327 im Elektronenmikroskop. Der weiße Balken am rechten unteren Bildrand entspricht einer Länge von 3  $\mu\text{m}$ . Die Bakterien wurden aus dem Pellet einer Kultivierung in Minimalmedium präpariert.

Das Genom von *Sinorhizobium meliloti* besteht aus insgesamt drei Replikons, einem Chromosom mit einer Größe von ca. 3,65 Megabasenpaaren (Mbp) und zwei Megaplasmiden mit Größen von 1,35 Mbp (pSym-a, pSym) und 1,68 Mbp (pSym-b, pExo) (Casse *et al.*, 1979; Honeycutt, *et al.*, 1993; Capela *et al.*, 1999 und Barloy-Hubler *et al.*, 2000). Der Anteil von Guanin und Cytosin in der DNA von *Sinorhizobium meliloti* liegt bei 62 – 63 Mol % (Jordan, 1984). Die Gene zur Synthese der Nod-Faktoren sind auf dem Megaplasmid 1 (pSym-a) lokalisiert, auf dem auch Gene, die zur Stickstofffixierung benötigt werden, liegen (Kondorosi, E. *et al.*, 1984).

*Sinorhizobium meliloti* gehört zu den Gram-negativen Bakterien, ist stäbchenförmig, besitzt eine Länge von 1,2-3 µm und einen Durchmesser von 0,5 bis 0,9 µm. Seine Beweglichkeit erhält das Bodenbakterium durch zwei bis sechs peritrich angeordnete Flagellen (Jordan, 1984). Das Bodenbakterium ist ein chemorganotropher Organismus. *Sinorhizobium meliloti* sekretiert in der Regel unabhängig von den verwendeten Nahrungsquellen alkalische Substanzen in die Umgebung. Neben dem von *Sinorhizobium meliloti* bevorzugten Polyol D-Mannit kann der Organismus auch D-Arabitol und D-Sorbitol sowie verschiedene Zucker wie Sucrose, D-Glucose, D-Galactose, D-Fructose und auch Succinat als Kohlenstoffquellen verstoffwechseln (Martinez-de Drets, *et al.*, 1974; Elkan *et al.*, 1982). Als Stickstoffquellen dienen dem Organismus Aminosäuren und dabei bevorzugt Glutaminsäure (Trinick, 1982), aber auch Nitrat-, Nitrit- und Ammoniumsalze. *Sinorhizobium meliloti* ist außerdem auch in der Lage, Harnstoff umzusetzen (Miksch *et al.*, 1994). Auf divalente Kationen ist *Sinorhizobium meliloti* angewiesen, Magnesiumkonzentrationen von  $\leq 0,1$  mM und Calciumkonzentrationen  $\leq 0,025$  mM beeinträchtigen die Viabilität und das Wachstum der Bodenbakterien in einem erheblichen Maß (Trinick, 1982).

Das Bodenbakterium ist aerophil, denn es besitzt eine Atmungskette mit Sauerstoff als terminalem Elektronenakzeptor, zeigt aber schon bei einem Sauerstoffpartialdruck von  $1,103 \cdot 10^3$  Pa ein unlimitiertes Wachstum (Bushby, 1982). Die Verdopplungszeit von *Sinorhizobium meliloti* unter optimalen Wachstumsbedingungen liegt bei 2,5 - 4 Stunden. Der pH-Wert der Nährlösung für ein optimales Wachstum sollte bei  $\cong 6,8$  liegen. Insbesondere Biotin (Streit *et al.*, 1996), aber auch Thiamin und Panthotensäure als Vitaminzugaben in einer Nährlösung wirken sich positiv auf die Wachstumsgeschwindigkeit und die Etablierung der Symbiose mit Luzerne aus (Vincent, 1970). Die optimale Temperatur zur Kultivierung von *Sinorhizobium meliloti* liegt bei 26-30 °C

*Sinorhizobium meliloti* wird zu der Gruppe Rhizobien gezählt, die nur einen engen Wirtsbereich besitzen. Zu den neun Pflanzenarten, mit denen *Sinorhizobium meliloti* neben der Luzerne (Alfalfa, *Medicago sativa*) eine Symbiose eingehen kann, gehören neben anderen *Medicago*-Arten auch alle Süßklee (*Mellitus*)- und Bockshornklee (*Trigonella*)-Arten (Pueppke, 1996).

### 2.5 Die Bedeutung der Symbiose von Luzerne und *Sinorhizobium meliloti* für die Landwirtschaft Argentinien und Uruguays

Die Luzerne ist eine der ertragsstärksten, kleeartigen Futterpflanzen. Sie wird außerdem als Fruchtfolgeglied zur Bodenverbesserung (Gründüngung) angebaut und gilt als Gesundungsfrucht für Hackfrüchte. Ihr Eiweißgehalt in der Trockenmasse kann bis zu 20 % betragen. Deshalb wird die Luzerne auch oft als „Königin der

Futterpflanzen“ bezeichnet. Geschmack und Nährwertgehalt von Fleisch und Milch bei Rindern werden durch die Fütterung der Tiere mit der Luzerne nachhaltig positiv beeinflusst. Die Symbiose aus Luzerne und *Sinorhizobium meliloti* ist in der Lage, je nach Bakterienstamm und Pflanzensorte, Umwelt- und Wachstumsbedingungen 90 - 386 kg·ha<sup>-1</sup> und Jahr an Stickstoff zu fixieren. (Peoples *et al.*, 1995a). Weltweit wird die Luzerne auf 32 Mio. ha kultiviert (Michaud *et al.*, 1987).

Die gesamte landwirtschaftliche Nutzfläche in Argentinien und Uruguay erstreckt sich über 184,03 Mio. ha. Zum Vergleich: Deutschlands gesamte landwirtschaftliche Nutzfläche umfasst 17,37 Mio. ha, das entspricht 9,44 % der argentinischen Fläche. In Argentinien und Uruguay entfallen davon alleine auf den Anbau mit der Weide- und Gründüngerpflanze Luzerne 4,5 Mio. ha (1998), was einen Anteil von 2,4 % an der gesamten landwirtschaftlichen Nutzfläche beider Länder ausmacht. In Deutschland werden 35.000 ha Anbaufläche mit Luzerne kultiviert (0,2 %; FAO-Statistiken: <http://www.fao.org>, 1998 und Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, 1999). Die Luzerne dient als Futterpflanze sowohl für die Ernährung von Rindern als auch von Schafen. Aber ihr Anbau ist in den letzten 70 Jahren in den beiden südamerikanischen Ländern Argentinien und Uruguay um ca. 30 % reduziert worden. Ursache hierfür waren ökonomische Gründe und ungeeignete Kultivierungsmethoden, u.a. ein massiver Maisanbau ohne Fruchtfolge in den 80-iger Jahren auf den Anbauflächen für Luzerne, der zu einer zunehmenden Ansäuerung und Auslaugung des Bodens geführt hat und einen erneuten, ertragreichen Anbau von Luzerne auf diesen Böden verhinderte (Michelena *et al.*, 1989; Hijano *et al.*, 1995).

### 2.6 Säuretoleranz von Luzerne und *Sinorhizobium meliloti*

Es gibt viele abiotische Faktoren wie Temperatur, Feuchtigkeit, Mineralgehalt und geologische Struktur des Bodens, die einen ertragreichen Anbau von Kulturpflanzen beeinflussen. Der pH-Wert des Ackerbodens spielt bei der Etablierung der Symbiose zwischen *Sinorhizobium meliloti* und *Medicago sativa* eine entscheidende Rolle. Mit zunehmendem Säuregehalt im Boden nimmt auch die Aluminium- und Mangantoxizität zu (Fortescue, 1980; Jaffe *et al.*, 1994). Außerdem sinkt die Verfügbarkeit von Phosphor, Calcium, Magnesium und Kalium mit abnehmendem pH-Wert für Pflanze und Mikroorganismus (von Uexküll *et al.*, 1995). In Südamerika sind schätzungsweise 57 % der gesamten Landmasse mit sauren Böden (pH < 5,5) bedeckt (253 Mio. ha Ultisole und 423 Mio. ha. Oxisole; von Uexküll, 1995). Doch bereits pH-Werte zwischen 6,5 und 5,5, wie sie bei der Analyse von Bodenproben in Luzerneanbaugebieten Argentinien und Uruguays ermittelt wurden (Del Papa *et al.*, 1999), beeinflussen die Produktivität der Symbiose zwischen Luzerne und *Sinorhizobium meliloti* nachhaltig negativ.

Die niedrigen pH-Werte des Ackerbodens und die damit verknüpften Faktoren haben dabei nicht nur Auswirkungen auf den Makrosymbionten wie ein verringertes Wurzel- und Sproßwachstum (Marschner, 1991; Yokota *et al.*, 1995). Insbesondere der Mikrosymbiont der Luzerne, *Sinorhizobium meliloti*, der zu den säuresensitiven Rhizobienarten gezählt wird (Graham *et al.*, 1994), ist in vielfältiger Weise von den Bedingungen in saurem Milieu betroffen.



So beeinflusste ein niedriger pH-Wert das Anhaftungsverhalten des Stamms *Sinorhizobium meliloti* L5-30 an junge Keimlinge von Luzerne negativ (Caetano-Anollés *et al.*, 1989). Es konnte in Experimenten nachgewiesen werden, dass die Adsorption von *Sinorhizobium meliloti* an den Wurzelhaaren von jungen Luzernepflanzen auch abhängig war von der Konzentration an  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen im umgebenden Milieu. Die Viabilität der Bodenbakterien sank bei pH-Werten  $\leq 6,0$ .

Die Daten von Caetano-Anollés konnten mit dem säuretoleranten *Sinorhizobium meliloti* Inokula-Stamm WSM 419 aus Sardinien bestätigt werden, der zudem eine höhere Überlebensrate bei einem pH-Wert von 4,0 aufwies, wenn der  $\text{CaCl}_2$ -Spiegel im Medium bei 3 mM (gegenüber 0 und 0,3 mM) lag. Flüssigkulturen von WSM 419 mit niedrigem pH-Wert zeigten bei der Addition von 3 mM  $\text{CaCl}_2$  außerdem eine um den Faktor 10 höhere Produktion an EPS als Kontrollexperimente mit nur 0,3 mM  $\text{CaCl}_2$  (Dilworth *et al.*, 1999). Die vermehrte EPS-Synthese allein ist aber nicht für das Überleben der Zellen verantwortlich. Versuche mit *exoR* Mutanten, die das EPS überexprimierten, wiesen kein höhere Säuretoleranz auf (Tiwari *et al.*, 1998).

Das Verhalten gegenüber niedrigeren pH-Werten variierte bei verschiedenen Isolaten von *Sinorhizobium meliloti* deutlich. So zeigten Stämme der Bodenbakterien aus dem Irak, Sardinien, Uruguay und Westaustralien signifikante Unterschiede im Wachstumsverhalten und in der Nodulationeffizienz (Howieson *et al.*, 1988). Dabei wiesen die Bodenbakterien, die von einem stärker sauren Habitat ( $\text{pH} \leq 5,4$ ) isoliert wurden, eine höhere Säuretoleranz in nachfolgenden Experimenten auf als jene Bakterien, die nur aus schwach ( $\text{pH} \geq 6,0$ ) oder mittelsauren ( $\text{pH} 5,5 - 6,0$ ) Böden isoliert wurden. Die Säuretoleranz der isolierten Stämme war auch in diesen Experimenten zudem von der im Medium vorhandenen Konzentration an bivalenten Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  abhängig.

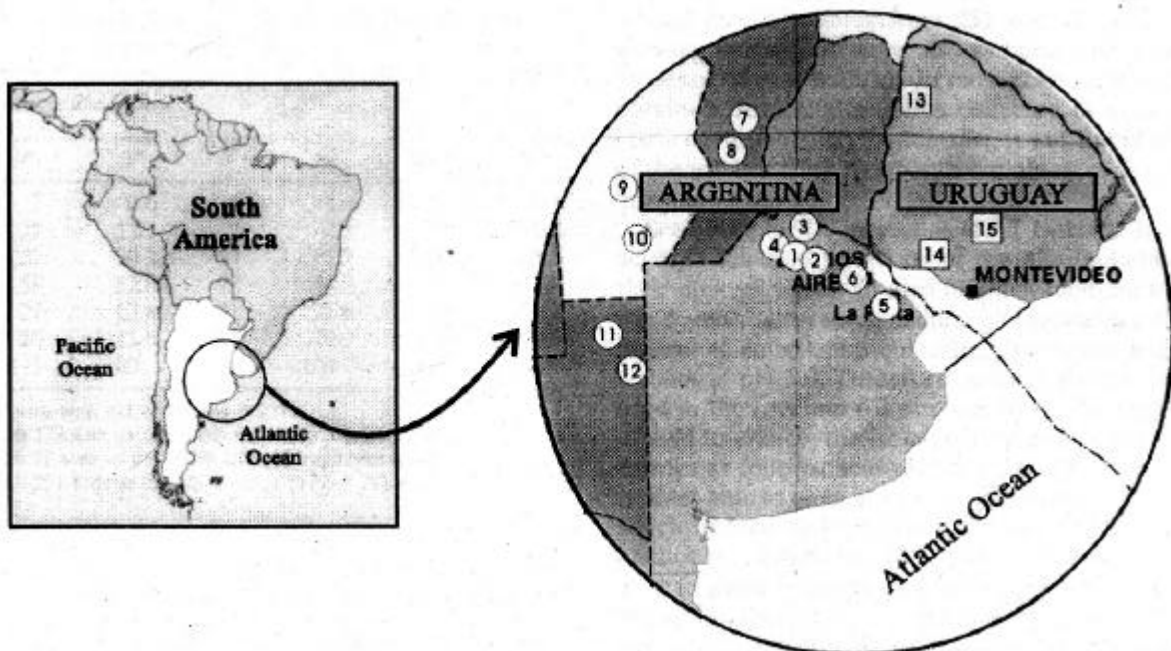
Die durchschnittliche Generationszeit des in der Landwirtschaft eingesetzten Stamms *Sinorhizobium meliloti* WSM 419 erhöhte sich in dem schmalen Fenster zwischen pH 6,5 und 6,1 um den Faktor 10 von 5 auf über 50 h (Glenn *et al.*, 1994). In Versuchen konnte gezeigt werden, dass einige Stämme von *Sinorhizobium meliloti* Mechanismen besitzen, um an die sauren Bedingungen im Boden zu adaptieren (**Adaptive Acid Tolerance Response, ATR**). Durch Tn5-Mutagenese konnte nachgewiesen werden, dass an der adaptiven Säuretoleranz von *Sinorhizobium meliloti* mindestens 20 Gene beteiligt sind. Die durch Tn5-Mutagenese veränderten *SinoRhizobien*-Stämme waren nicht mehr in der Lage, in einem sauren Milieu den intrazellulären, neutralen pH-Wert stabil zu halten (O'Hara *et al.*, 1989).

An den Säuretoleranzmechanismen beteiligt ist unter anderem ein Zwei-Komponenten Sensor-Regulator-System (*ActS / ActR*) bei *Sinorhizobium meliloti*. Die Gene von *ActR / ActS* werden unter neutralen pH-Bedingungen nicht synthetisiert und weisen Homologien zu anderen Regulator-Sensor-Systemen auf (Tiwari *et al.*, 1996). Dieses Sensor-Regulator-System wird für die Induktion der ATR verantwortlich gemacht.

Daneben existieren noch mindestens zwei weitere regulatorische Systeme, die in der ATR aktiv sind und für das Wachstum bei niedrigen pH-Werten essentiell sind. Das durch einen niedrigen pH-Wert induzierte Gen *phrR* ist an der Regulation der Expression anderer ATR-Gene beteiligt. Ein weiteres System, das bis jetzt noch

nicht identifiziert werden konnte, kontrolliert die Expression des Strukturgens *lpiA*, dessen Funktion bis jetzt ebenfalls noch nicht aufgeklärt werden konnte (Glenn *et al.*, 1999).

Eine weitere Ursache für das unzureichende Wachstum der Luzerne auf den sauren Böden Argentiniens und Uruguays ist das Vorhandensein von Luzerne nodulierenden Rhizobien (**A**lfa**f**a **N**odulating **R**hizobia; ANR) im Boden, die nur eine geringe biologische Stickstofffixierung in der Symbiose mit Luzerne aufweisen, aber eine hohe Säuretoleranz (AT = **A**cid **T**olerance) gegenüber Boden-pH-Werten  $\leq 6.0$  zeigen und die außerdem eine hohe Wettbewerbsfähigkeit (Dowling *et al.*, 1986) bei der Besiedelung der Wurzeln von Luzerne gegenüber anderen ANR aufweisen. Bei der Isolierung von 466 Luzerne nodulierenden Rhizobien (ANR) in Zentral-Argentinien und Uruguay (s. **Abbildung 2.3**) konnten 15 Stämme isoliert werden, die unter Laborbedingungen noch bei einem pH-Wert von 5,0 in Flüssigkultur ein Wachstum aufwiesen. Die genetische Analyse dieser Stämme mittels MBOREP1- und BOXC1-PCR ergab, dass diese Stämme nicht in die Art *Sinorhizobium meliloti* eingeordnet werden konnten. Die 15 AT-Rhizobien zeigten untereinander nur eine geringe genetische Divergenz und sind eng mit dem ebenfalls säuretoleranten Stamm *Rhizobium* Or191 aus Oregon verwandt (Eardly *et al.*, 1992). Die AT-Isolate aus Argentinien und Uruguay wie auch der Stamm aus Oregon waren im Gegensatz zu *Sinorhizobium meliloti* Stämmen in der Lage, sowohl die Luzerne als auch die Stangenbohne (*Phaseolus vulgaris*) zu nodulieren (Del Papa, 1999).



**Abbildung 2.3** Geografische Lage der Fundorte von Rhizobien-Isolaten der im Rahmen des EU-Projektes „Improvement of Symbiosis Between *Rhizobium meliloti* and Alfalfa in Acid Soils of Argentina und Uruguay“ (Nr.: TS3\*-CT94-0265) durchgeführten Bodenproben. Die Orte 6 (Castelar, Boden pH-Wert: 5,89) und 14 (Colonia; Boden pH-Wert, 6,32) sind die Fundorte der in dieser Arbeit verwendeten Stämme SmLPU63 (Castelar) und SmCE15 (Colonia) (Abb. aus del Papa, 1999)

Bei der Charakterisierung der symbiontisch effizienten Stämme der Isolate aus sauren Böden Argentiniens und Uruguays konnte mittels partieller Sequenzierung der 16S rDNA gezeigt werden, dass die Stämme dieser Gruppe ausschließlich zur Art *Sinorhizobium meliloti* gehörten. Die weitere genetische Charakterisierung mittels IS-Fingerprinting der einzelnen *Sinorhizobium meliloti*-Isolate ergab, dass diese Stämme eine erhebliche genetische Divergenz aufwiesen, einige der Bakterien aber eine nahe Verwandtschaft zu den in diesen Regionen verwendeten Starterkultur-Stämmen besaßen.

Die isolierten Sinorhizobien-Stämme aus Argentinien und Uruguay wiesen mit zunehmender Azidität im Medium ebenfalls eine deutlich längere Verdopplungszeit auf (Segundo *et al.*, 1999). Von den Sinorhizobien-Isolaten zeigten alle Stämme unter sauren Bedingungen (pH 5,6) eine verzögerte Nodulation, so dass erst nach 9 Tagen sämtliche Pflanzenwurzeln Knöllchen aufwiesen gegenüber einer 100 %-igen Besiedelung in nur 7 Tagen unter neutralen Bedingungen. Innerhalb der Gruppe der effizienten Mikrosymbionten gab es noch erheblich Unterschiede in der Leistungsfähigkeit ihrer BNF.

Der Stamm *Sinorhizobium meliloti* LPU63, isoliert in Castelar (s. **Abbildung 2.3**, Standort Nr. 6), nahe Buenos Aires (Stadt) aus einem Boden mit einem pH-Wert von 5,89, erwies sich als der Stamm mit der höchsten Wettbewerbsfähigkeit gegenüber anderen Stämmen bei der Nodulation von Luzernewurzeln sowohl bei neutralen als auch bei saureren pH-Werten ( $\geq 5,6$ ). LPU63 war außerdem der Stamm mit der höchsten Stickstofffixierungsleistung unter neutralen und sauren Bedingungen, bezogen auf den Stickstoffanteil der Trockenmasse von *Sinorhizobium meliloti* LPU63 nodulierten Luzernepflanzen.

Der Erfolg der Symbiose zwischen der Luzerne und *Sinorhizobium meliloti*, ist damit entscheidend vom Vorhandensein geeigneter Stämme von *Sinorhizobium meliloti* abhängig. Die Bodenbakterienstämme, die in der Landwirtschaft als Starterkulturen eingesetzt werden sollen, müssen für einen ertragreichen Anbau der Luzerne deshalb drei wichtige Bedingungen erfüllen:

- (i) Die Sinorhizobien müssen eine optimale Überlebensrate auch unter extremen Umweltbedingungen in den jeweiligen Anbaugebieten der Luzerne aufweisen
- (ii) Die Stämme sollten eine hohe Wettbewerbsfähigkeit gegenüber den endogenen Bodenbakterien bei der Besiedlung der Wurzeln von Luzerne zeigen
- (iii) Für ein optimales Pflanzenwachstum ist eine hohe Effizienz bei der biologischen Stickstofffixierung in der Symbiose mit der Luzerne durch die Bodenbakterien Voraussetzung

Um Bodenbakterien mit diesen Eigenschaften zu erhalten, gibt es verschiedene Ansätze. Bei dem von der Europäischen Union (EC) geförderten Forschungsprojekt „Improvement of Symbiosis Between *Rhizobium meliloti* and Alfalfa in Acid Soils of Argentina und Uruguay“ (Projekt-Nr.: TS3\*-CT94-0265), sollten effiziente *SinoRhi*-zobien-Stämme aus den sauren Böden der Anbauregionen von Luzerne isoliert, analysiert und jene selektiert werden, die für eine Produktion von Starterkulturen

verwendet werden können, um damit den Ertrag der Futterpflanze Luzerne zu erhöhen.

Ein anderer Ansatz besteht in der gentechnischen Optimierung von *Sinorhizobium meliloti*. Castillo (Castillo *et al.*, 1999) konnte zeigen, dass durch die Duplikation der homologen symbiontischen Gene *nodD1*, *nodABC* und *nifN* in den Bakterien mit Hilfe von Plasmiden die Anzahl der Wurzelknöllchen je Pflanze um den Faktor 2,5 erhöht werden konnte. Die in der Symbiose mit den gentechnisch veränderten Bodenbakterien kultivierten Pflanzen wiesen ein doppelt so hohes Trockengewicht auf und der Stickstoffgehalt in den Pflanzen war um den Faktor 2,8 gesteigert. Durch die gezielte Einbringung von zusätzlichen Kopien der Gene *dctABD* / *nifA* konnte die Biotrockenmasse von Luzerne um 12,9 % gesteigert werden (Bosworth *et al.*, 1994).

### 2.7 Die Oberflächenmatrix von *Sinorhizobium meliloti* und ihre Bedeutung für die Symbiose

Eine besondere Bedeutung besitzt die äußere Zellhülle von *Sinorhizobium meliloti*, sie aus einer komplexen Matrix verschiedener Zuckerderivate aufgebaut ist. Die **Lipopolysaccharide** (LPS) (Kannenberg *et al.*, 1998), deren Lipidanteile in der äußeren Zellmembran verankert sind, Phospholipide und Proteine bilden dabei die Grundstruktur der äußeren Membran.

Bei den wasserlöslichen **Exopolysacchariden** (EPS) gibt es zwei unterschiedliche Basisstrukturen, das EPS I oder Succinoglucan und das EPS II oder Galactoglucan (Keller *et al.*, 1990). Das EPS I ist aus einer verzweigten Grundeinheit zusammengesetzt, die aus sieben Glucose- und einem Galactosemolekül besteht und mit je einem Acetyl-, Succinyl- und Pyruvatrest dekoriert ist (Reinhold *et al.*, 1994). Von diesem Succinoglucan (EPS I) gibt es bei *Sinorhizobium meliloti* zwei Fraktionen, eine niedermolekulare (LMW), die aus Monomeren, Tri- und Tetrameren der Grundeinheiten aufgebaut ist und eine hochmolekulare (HMW) Fraktion, die ebenfalls aus den gleichen Grundeinheiten besteht, die aber aufgrund ihres Polymerisierungsgrades Molmassen von  $10^6$  bis  $10^7$  Da erreichen kann (Gonzales *et al.*, 1996). Auch vom EPS II gibt es hoch- und niedermolekulare Fraktionen. Das EPS II besteht nur aus zwei Bausteinen, Galactose, die einen Pyruvat-Rest trägt und die über eine  $\alpha$ -(1-3)-glycosidische Bindung mit einer O-acetylierten Glucose verbunden ist (Leverly *et al.*, 1991).

Die neutralen und anionischen zyklischen  $\beta$ -1,2-Glucane mit einem Polymerisierungsgrad von 13-40 werden im periplasmatischen Raum synthetisiert und teilweise in das die Zelle umgebende Medium abgegeben. Die Menge der von *Sinorhizobium meliloti* exkretierten zyklischen  $\beta$ -1,2-Glucane hängt stark von der Zusammensetzung des Nährmediums ab und die Exkretion selbst ist an die Wachstumsphase (logarithmisch oder stationär) gekoppelt (Geiger *et al.*, 1991; Michaud *et al.*, 1995).

Zur äußeren Matrix bei Rhizobien zählen außerdem noch die mit der Zelloberfläche assoziierten **kapsulären Polysaccharide** = KPS. Sie bestehen zum überwiegenden Teil aus 3-Deoxy-D-manno-2-Octulonsäure bzw. 2-Keto-3-deoxy-Oktulonsäure = **kdo** (Reuhs *et al.*, 1993; Petrovics *et al.* 1993) und weisen strukturelle

Analogien zu den Gruppe II K-Antigenen (auch kapsuläre Polysaccharide) von *Escherichia coli* auf.

Alle an der Zusammensetzung dieser Matrix beteiligten Moleküle haben einen Einfluß auf die erfolgreiche Besiedelung der Wirtspflanzen und auf die Wettbewerbsfähigkeit gegenüber anderen endogenen Sinorhizobien-Stämme im Boden (Niehaus, 1997). Bei der Adhäsion der Bakterien an die Pflanzenwurzel spielen die verschiedenen Zuckermoleküle eine entscheidende Rolle.

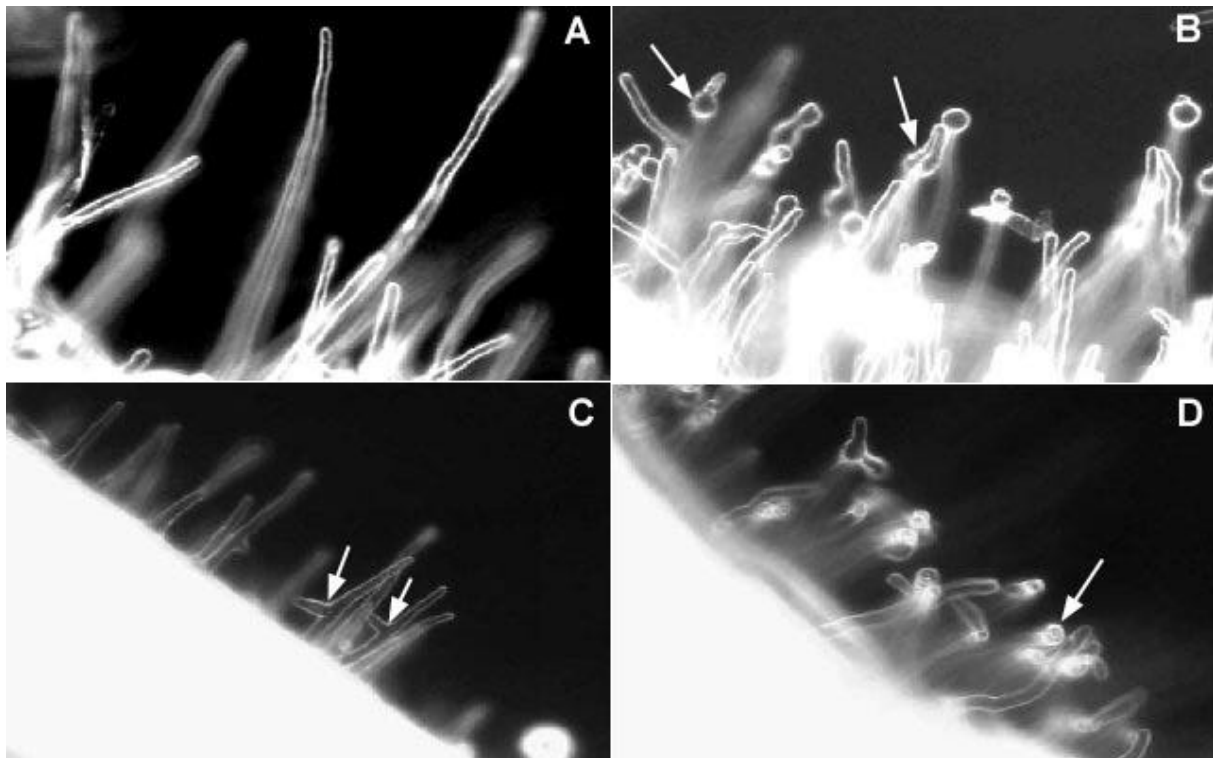
So zeigte eine LPS-Mutante von *Sinorhizobium meliloti* nur eine reduzierte Knöllchenbildung gegenüber dem Wildtyp an der Primärwurzel von Luzerne-Keimlingen und wies bei Konkurrenz durch den Wildtypstamm 2011 in einem Mischinokulum eine äußerst geringe Wettbewerbsfähigkeit bei der Knöllcheninfektion auf (Lagares *et al.*, 1992).

EPS I-defekte Mutanten von *Sinorhizobium meliloti* lösten bei den Wirtspflanzen eine Abwehrreaktion aus und führten zur verzögerten Infektion von Wurzelknöllchen (Niehaus *et al.*, 1993). Die niedermolekulare Fraktion von EPS I scheint bei der Infektion von Luzerne-Wurzelhaaren eine Signalfunktion zu besitzen (Niehaus, 1999). Eine Mutante, die keine HMW-EPS I mehr herstellen kann, ist in der Etablierung der Symbiose mit Luzerne allerdings nicht beeinträchtigt (Becker *et al.*, 1995).

*Sinorhizobium meliloti*-Mutanten, die keine zyklischen  $\beta$ -1,2-Glucane mehr synthetisierten, induzierten zwar noch die Knöllchenbildung, waren aber nicht in der Lage, diese zu infizieren (Geremia *et al.*, 1987). Zudem schienen die zyklischen  $\beta$ -1,2-Glucane im periplasmatischen Raum an der Osmoregulation der Zellen beteiligt zu sein (Miller *et al.*, 1986). Und auch Mutanten, deren KPS-Synthese gestört ist, zeigen auf Luzerne einen Fix<sup>-</sup>-Phänotyp, können die Knöllchen nicht mehr infizieren (Kereszt *et al.*, 1998).

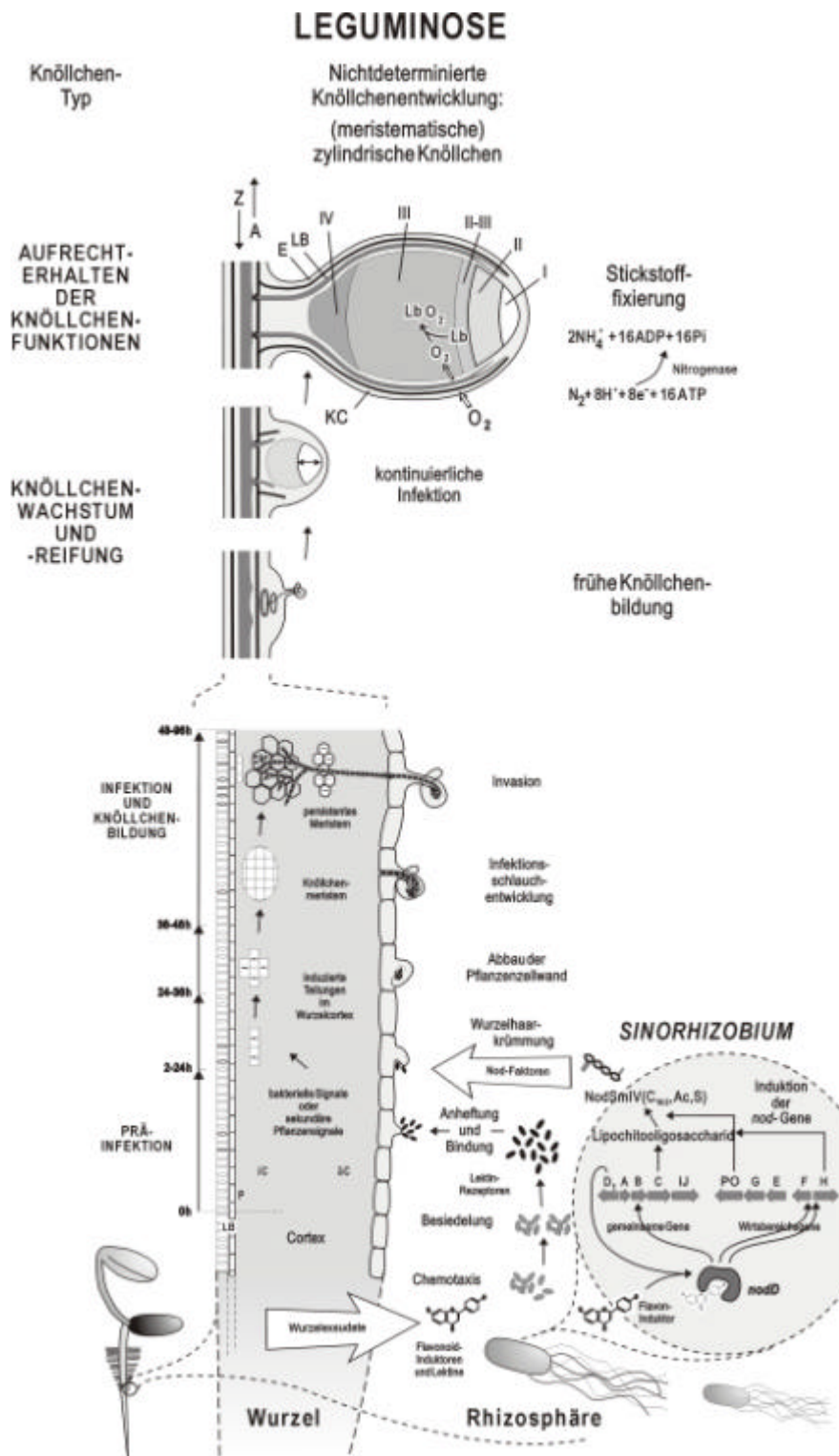
### 2.8 Die Entwicklung der Symbiose zwischen *Sinorhizobium meliloti* und Luzerne (*Medicago sativa*)

Die Etablierung der Symbiose zwischen der Luzerne und dem Bodenbakterium *Sinorhizobium meliloti* bis zum stickstofffixierenden Knöllchen vollzieht sich in mehreren Schritten, die in **Abbildung 2.5** dargestellt sind. Durch die Wurzelexsudate der Luzerne werden die frei im Boden lebenden Bakterien chemotaktisch angezogen. Außerdem löst das in den Wurzelexsudaten enthaltene Luteolin die Expression der Gene für die Nod-Faktoren-Synthese in den Sinorhizobien aus (Broughton *et al.*, 2000). Es erfolgt die Anheftung der Bakterien an die Wurzelhaare der Luzerne. Die gebildeten Nod-Faktoren dienen als Botenstoffe zur Erkennung des Mikrosymbionten durch den Pflanzenwirt und induzieren außerdem in den Pflanzen die Organogenese eines Knöllchens an den Wurzeln der Luzerne. Äußerlich erkennbar ist die Wirkung der Nod-Faktoren bereits nach wenigen Stunden an Veränderungen der Wurzelhaare, die in **Abbildung 2.4** gezeigt sind (Heidstra *et al.*, 1994). Über Infektionsschläuche, die sich vom Wurzelhaar in Richtung des Knöllchenmeristems ausbilden, wandern die Bakterien zu diesen Zellen und infizieren sie. In den Zellen differenzieren sich die Rhizobien zu den stickstofffixierenden Bakteroiden (Gage *et al.*, 1996).



**Abbildung 2.4** Veränderung der Wurzelhaarstruktur von *Medicago sativa*-Keimlingen nach Applikation eines Nod-Faktoren-Extrakts aus einer Fermentationslösung des Stammes *Rhizobium spec.* LPU83 (Del Papa et al., 1999) auf die Keimlingswurzel. Vergrößerung: 400-fach. A: Gerade, senkrecht von der Wurzel abstehende Wurzelhaare eines sechs Tage alten, unbehandelten Luzernekeimlings ca 7 mm von der Wurzelspitze der Primärwurzel entfernt; B-D: Auf die hier abgebildeten Bereiche der der Primärwurzeln von fünf Tage alten Luzernekeimlingen wurde eine wässrige Nod-Faktor-Lösung ( $10^{-5}$  M) von LPU 83 aufgetropft (Einwirkzeit: 24 h) B) **Root Hair Deformation**: Runde und keulenförmige Verdickungen (Peile) der Wurzelhaare; C) **Root Hair Branching** Wurzelhaarverzweigung (Pfeile); D) **Root Hair Curling** (Wurzelhaarkrümmung zum sog. Shepherd's crook = Hirtenstab (Pfeil) (Fisher et al., 1992; Heidstra et al., 1994)

Deren Nährstoffversorgung wird über das Leitbündelsystem des Wurzelknöllchens sichergestellt. Den notwendigen Sauerstoff ( $O_2$ ) erhalten die *SinoRhizobien* dann über einen pflanzlichen Sauerstofftransporter, das Protein Leghämoglobin. Freier Sauerstoff würde die Nitrogenase-Enzymkomplexe, die für die Reduktion des Luftstickstoffs ( $N_2$ ) zu Ammonium ( $NH_4^+$ ) (O'Gara et al., 1976) notwendig sind, zerstören. Aus diesem Grund erscheinen stickstofffixierende Knöllchen im Mikroskop rötlich, da das Leghämoglobin wie der im menschlichen Blut vorkommende Sauerstofftransporter Hämoglobin ebenfalls eine Häm-Gruppe mit einem zentralen Eisenatom trägt, das die rote Farbgebung dieser Substanzen verursacht. Der Ammoniumstickstoff wird von der Leguminose in Aminosäuren eingebaut und über das Leitbündelsystem vom Knöllchen in die ganze Pflanze verteilt.



**Abbildung 2.5** Ablauf der Entwicklung eines nichtdeterminierten Wurzelknöllchens am Beispiel der Symbiose zwischen *Medicago sativa* und *Sinorhizobium meliloti* (modifiziert nach Kapp, 1996)

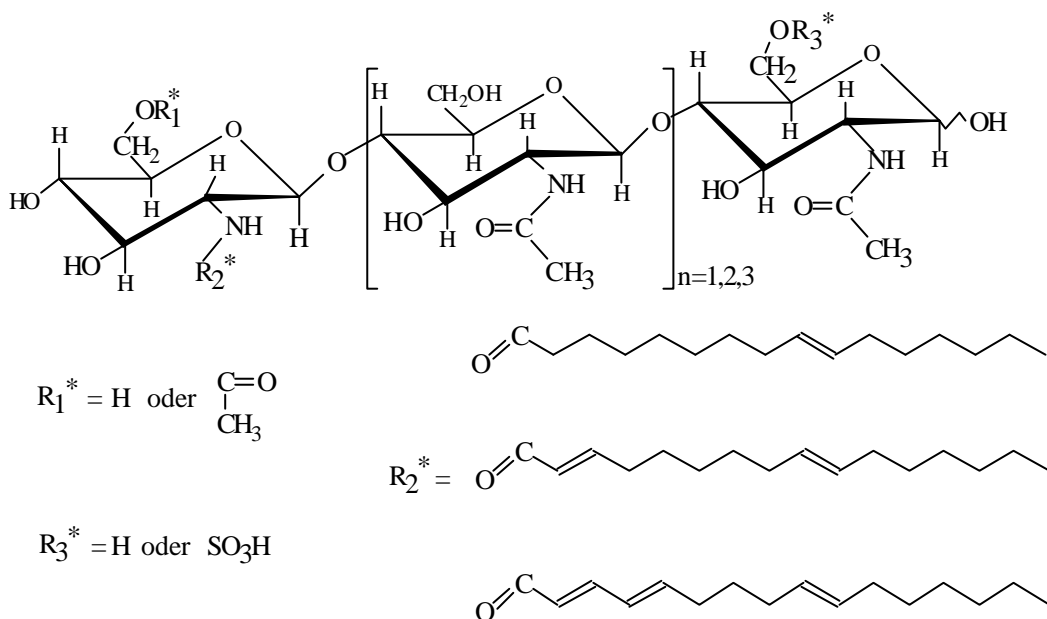
Das durch vier Zonen (I - IV) unterteilte kölbchenförmige Wurzelknöllchen der Luzerne in **Abbildung 2.5**, oben wird als nicht-determiniert bezeichnet, da in ihm verschiedene Vorgänge im Gegensatz zu den determinierten Noduli (Gualtieri *et al.*,

2000) parallel ablaufen. In der Zone (I) findet ein ständiges Wachstum des Knöllchenmeristems statt, die Infektion der Pflanzenzellen durch die Rhizobien erfolgt in Zone (II), der Bereich der symbiontisch aktiven Bakterioide (III) und die Seneszenzzone (IV) sterben die alten Zellen langsam ab. Im determinierten Knöllchen wird erst das Knöllchen ausgebildet, dann erfolgt die Infektion und anschließend die Stickstofffixierung, wie bei der Sojabohne (*Glycine max*)).

### 2.9 Die Nod-Faktoren

#### Der Aufbau der Nod-Faktoren

Wie bereits oben geschildert, besitzen die Nod-Faktoren als chemische Botenstoffe für die Kommunikation des Bodenbakteriums mit der Pflanze und als Induktor für die Prozesse zur Ausbildung der Wurzelknöllchenstrukturen in der Etablierung der Symbiose eine entscheidende Bedeutung. *Sinorhizobium meliloti* kann verschiedene Formen an Nod-Faktoren synthetisieren. Die chemischen Strukturen der von diesem Bodenbakterium produzierten Lipochitooligosaccharide (LCOS) sind in **Abbildung 2.6** zusammengefasst.



**Abbildung 2.6** Chemische Strukturen der von *Sinorhizobium meliloti* synthetisierten Nod-Faktoren

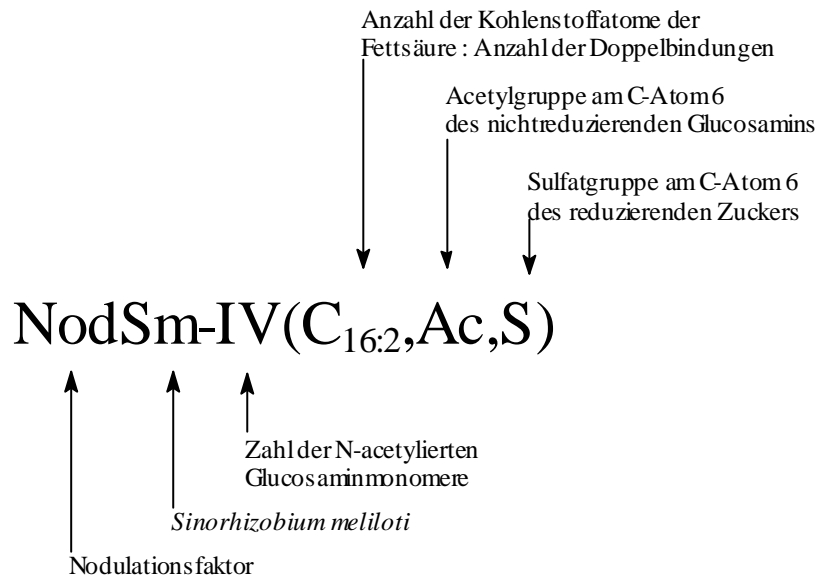
Die Glykolipide basieren auf einem Zuckerrückgrat, das aus drei bis fünf N-acetylierten Glucosamin-(GlcNAc)-Monomeren aufgebaut ist. Die Zuckerderivateinheiten sind  $\beta$ -1-4-O-glykosidisch miteinander verbunden. Am Stickstoff des Glucosamins am nichtreduzierenden Endes der Zuckerkette ist eine Fettsäure mit 16 Kohlenstoffatomen N-acetyliert. Die Fettsäure kann an den Positionen  $\Delta^9$ ,  $\Delta^{2,9}$  und  $\Delta^{2,4,9}$  einfach, zweifach oder dreifach ungesättigt sein. Das C-Atom 6 am reduzierenden Glucosamin kann O-sulfatiert sein. Das C<sub>6</sub>-Atom des nichtreduzierenden Endes



## 2 Theoretischer Hintergrund

ist oftmals O-acetyliert. Das Spektrum der produzierten Nod-Faktoren gibt Hinweise auf die Wirtsspezifität des jeweiligen Rhizobienstamms (Schultze *et al.*, 1996). Aus der molekularen Struktur der Nod-Faktoren ergibt sich eine Nomenklatur, die auf dem 3. Kongress der „Internationalen Gesellschaft für Molekularbiologie der Pflanzen“ (Tucson (AZ), USA, 6.-11. Oktober 1991) festgelegt wurde, die in **Abbildung 2.7** beschrieben ist.

Die Molekülstruktur und Dekoration des einzelnen Nod-Faktors entscheidet über den Wirtsbereich in der Gruppe der Leguminosen, mit dem das jeweilige Bodenbakterium eine Symbiose eingehen kann (Dénarié *et al.*, 1993). So konnte Schultze (Schultze *et al.*, 1992) nachweisen, dass der von Roche (Roche *et al.*, 1991b) beschriebene Tetramer Nod-SmIV(C<sub>16:2</sub>,Ac,S) im Wurzelhaartest seine spezifische Aktivität bei *Medicago sativa* und *Melilotus albus* bereits bei einer Konzentration von 10<sup>-9</sup> - 10<sup>-11</sup> M entfaltet. Bei *Vicia faba* bedurfte es einer bis zu 10.000-fach höheren Konzentration (10<sup>-7</sup> M), um im gleichen Test Veränderungen den Wurzelhaare zu beobachten.



**Abbildung 2.7** Beispiel für die Nomenklatur eines von *Sinorhizobium meliloti* synthetisierten Nod-Faktors, wie er von Roche erstmalig beschrieben wurde (Roche *et al.*, 1991b).

Dies führt zu der Annahme, dass die Wirtspflanze spezifische Bindungsstellen besitzt, die in der Lage sind, die unterschiedlichen Strukturen der Nod-Faktoren aus den verschiedenen Rhizobien-Stämmen zu erkennen und damit entweder eine Besiedlung durch den Mikrosymbionten zu ermöglichen oder bei Inkompatibilität eine Abwehrreaktion auszulösen, die das Eindringen ungeeigneter Bodenbakterien in die Pflanze verhindern soll. Mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Nod-Faktoren war es möglich, bei *Vicia sativa* Bindungsstellen für Nod-Faktoren an der Wurzelhaarspitze zu lokalisieren (Gadella *et al.*, 1997), ihre genaue Struktur und Funktionsweise konnte bis heute aber noch nicht aufgeklärt werden. Was beobachtet werden konnte, war ein schneller Abbau der Nod-Faktoren durch Enzyme der Pflanzenzellen bei der Luzerne (Stäehelin *et al.*, 1995). Diese Induktion des Abbaus war von der jeweiligen Struktur des Nod-Faktors abhängig.

Es bleibt also zu beachten, dass *Sinorhizobium meliloti*, das nur einen engen Wirtsbereich mit neun Pflanzenarten besitzt, dennoch wie der Stamm *Rhizobium spec.* NGR234, der über 70 Leguminosen-Arten nodulieren kann (Price *et al.*, 1992), immer noch in der Lage ist, eine ganze Molekülfamilie an Nod-Faktoren zu synthetisieren (Schultze *et al.*, 1996), obwohl nur wenige Nod-Faktoren aus dieser LCOS-Familie für die Etablierung der Symbiose mit den Wirtspflanzen benötigt werden. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass sich *Sinorhizobium meliloti* von einem Stamm mit einem ehemals sehr breiten Wirtsbereich wie *Rhizobium spec.* NGR234 zu einem Organismus weiter entwickelt hat, der in seiner ökologischen Nische nur noch bestimmte Pflanzenarten noduliert, die Gene zur Synthese der Nod-Faktoren für die „Alt-Wirte“ aber noch nicht vollständig verloren hat. Außerdem kann angenommen werden, dass die Pflanzen ebenfalls eine Auswahl treffen und nur jene Bodenbakterienarten, die sie an ihren Signalmolekülen, den Nod-Faktoren, unterscheiden können, aufnehmen, die eine optimale Stickstofffixierung gewährleisten.

### **Die Nod-Faktoren als Wirkmoleküle in Nicht-Wirtssystemen**

Das ökonomische Interesse an der Produktion von Nod-Faktoren ist nicht erst gestiegen, seit es Projekte in der Landwirtschaft gibt, Starterkulturen (Inokula) von Rhizobien biotechnologisch produzierte Nod-Faktoren beizumengen, um so die Effizienz der Bakterien bei der Knöllchenbildung zu erhöhen (Liphatech Inoculants S.A., Frankreich, unveröffentlichte Daten). Ebenso bedeutend sind die Beobachtungen über Wirkungen von Oligosacchariden, Lipo-Chitooligosacchariden (LCOS) und Nod-Faktoren in Nicht-Wirtssystemen bei Pflanzen (Long, 1996) und in tierischen Modellsystemen, die eine Produktion dieser Stoffe im technischen Maßstab sinnvoll erscheinen lassen.

Bei den bisher beobachteten Effekten dieser niedermolekularen Moleküle in Nicht-Wirtssystemen kann zwischen zwei Wirkungen der LCOS unterschieden werden. Zur einen Gruppe zählen die Reaktionen auf die Zucker und Zuckerderivate, die eine Abwehrreaktion zur Folge haben. Solche Moleküle bezeichnet man als „Elicitoren“. Zu der anderen Gruppe zählen jene Effekte, die eine wachstums- oder entwicklungsfördernde Reaktion nach Applikation der LCOS nach sich ziehen, wie es in Pflanzen auch durch Gabe von „Phytohormonen“ beobachtet werden kann. Zu berücksichtigen ist dabei, dass die Veränderungen schon bei Anwendung der LCOS im nano- bis picomolaren Bereich ( $10^{-9}$  -  $10^{-12}$  M) beobachtet werden können und dass die Effekte von der jeweiligen chemischen Struktur des LCOS abhängig sind.

Wurden Elicitoren (Elicitor; elicit; engl. = entlocken, auslösen, hervorrufen, Breitsprecher *et al.*, 1990) ursprünglich als jene Komponenten bezeichnet, die eine Akkumulation von Phytoalexinen in Pflanzen hervorrufen, so ist die Definition inzwischen weiter gefasst. Unter dem Begriff Elicitoren sind all jene chemischen, niedermolekularen Substanzen zusammengefasst, die in Pflanzen eine typische Abwehrreaktion auslösen. Viele dieser Reaktionen basieren auf einer schnellen Transkriptionsaktivierung spezifischer Gene, die als Pflanzenabwehrgene oder an die Pflanzenabwehr gekoppelte Gene bezeichnet werden. Typische Beispiele für diese Abwehrreaktionen sind die Synthesen von Genen zur Phytoalexin-Biosynthese, zur Bildung lytischer Enzyme, wie Chitinasen und Glucanasen oder Peroxidasen (Scheel *et al.*, 1990). Allen Reaktionen gemein ist ihre antimikrobielle Wirkung.

So konnte gezeigt werden, dass ein Hexa-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-D-Glucitol aus der Zellwand des Pilzes *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* die Akkumulation von Glycolin bei der Sojabohne (*Glycine max*) bewirkt (Sharp *et al.*, 1984).

Suspensionskulturen von Reiszellen (*Oryza sativa*) zeigen bei Zugabe von N-Acetylchitooligosacchariden, also Molekülen, die auch das Grundgerüst der Nod-Faktoren bilden, eine vorübergehende Depolarisierung ihrer Membran um bis zu 30 mV (Kuchitsu *et al.*, 1993).

Bei Zugabe einer 100 nM Nod-Faktor-Lösung zu Suspensionskulturen aus Tomatenzellen (*Solanum lycopersicum*) stieg der pH-Wert des Kulturmediums um bis zu 0.35 Einheiten an (Stahelin *et al.*, 1994). Der gleiche Effekt konnte auch bei Suspensionskulturen von Tabak (*Nicotiana tabacum*) beobachtet werden, die mit einem Gemisch von Nod-Faktoren aus *Sinorhizobium meliloti* beimpft wurden (Baier *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu reagierten in dieser Arbeit die Suspensionskulturen von Luzerne (*Medicago sativa*) sogar mit einer leichten Ansäuerung des Mediums. Dies wurde durch die Beobachtung bestätigt, dass in den Wurzelhaarzellen von Luzerne bei Gabe von Nod-Faktoren eine Alkalinisierung meßbar ist, jedoch nicht durch Zugabe von GlcNAc-Oligomeren (Felle *et al.*, 1996).

Der temperatursensitiven Karotten- (*Daucus carota*)-Zelllinie ts 11, erzeugt durch chemische Mutagenese, fehlt im Gegensatz zum Wildtyp eine 32 kDa-Endochitinase. Aus diesem Grund sind Zellen dieser Linie nicht mehr in der Lage, das Globularstadium in der Embryogenese zu verlassen und in die Herz-Form somatischer Karotten-Embryonen zu differenzieren. Mit der Addition von Nod-Faktoren aus *Rhizobium leguminosarum* zu Suspensionskulturen dieser Zelllinie wurde dieser Effekt aufgehoben und die Embryonen konnten sich weiter entwickeln (de Jong *et al.*, 1993). Daraus lässt sich ableiten, dass bei der Ausdifferenzierung zu Karottenembryos durch die Endochitinase Moleküle freigesetzt werden, die in ihrer Struktur denen der Nod-Faktoren analog und für den Ablauf der Embryogenese von entscheidender Bedeutung sind.

Das Wachstum von Tabakprotoplasten konnte mit Hilfe von synthetischen Nod-Faktoren stimuliert werden. Damit wurde die Funktion der Auxine und Cytokine, die zur Klasse der Pflanzenwachstumsregulatoren oder „Phytohormone“ gehören, in den Tabakpflanzenzellen durch die LCOS substituiert (Röhrig *et al.*, 1995). Diese Ergebnisse wurden ergänzt durch die Beobachtung, dass in Tabakzellen ein Protein isoliert werden konnte, welches hohe Homologien zu *ENOD40* aufweist, einem Gen, das in *Medicago sativa* oder *Glycine max* (Sojabohne) in der frühen Phase der Knöllchen-Organogenese exprimiert wird. Die Expression von *ENOD40* in den Pflanzen wird nachweislich durch die Nod-Faktoren induziert (van de Sande *et al.*, 1996). Außerdem wiesen transgene Tabakpflanzen, die das *nodA* und *nodB* Gen aus *Sinorhizobium meliloti* enthielten, Veränderungen in Wachstum und Entwicklung auf. Dies ist ein Hinweis darauf, dass in Tabak Substrate vorhanden sein müssen, die von *nodA* und *nodB* modifiziert und als Pflanzenwachstumsregulatoren fungieren können (John *et al.*, 1993, Schmidt *et al.*, 1993).

Embryonalzellen des südafrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) exprimieren in der kurzen Phase zwischen Midblastula- und Neurulation-Stadium das Gen *DG42*, das für die Weiterentwicklung des Embryos von entscheidender Bedeutung ist. Das Genprodukt von *DG42* ist an der Synthese von Chitooligosacchariden

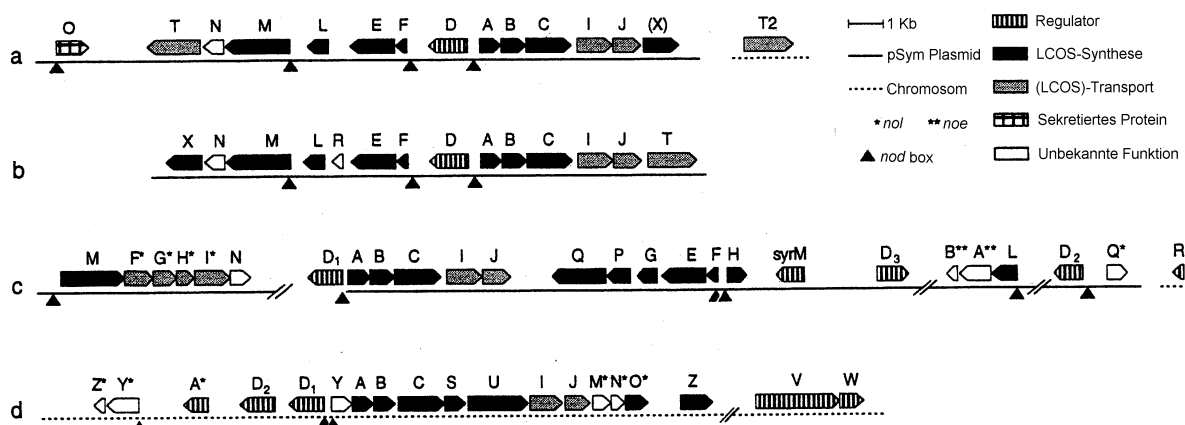
## 2 Theoretischer Hintergrund

beteiligt, wie sie in vergleichbarer Struktur (Nod-Faktoren) auch in Rhizobien durch das Gen *nodC* polymerisiert werden (Semino *et al.*, 1995, Atkinson *et al.*, 1992). *NodC* weist eine hohe Homologie zu *DG42* auf, ebenso wie zu Genen, die in der Maus (*Mus musculus*) und im Zebrafisch (*Brachydanio rerio*) nachgewiesen werden konnten (Semino *et al.*, 1996).

### 2.10 Die Expression der *nod*-Gene

#### Die *nod*-Gene

Die Funktionen der Gene bei der Nod-Faktoren-Synthese von *Sinorhizobium meliloti* sind überwiegend aufgeklärt. Die Gene (*nod*, *nol* und *noe*) sind, wie **Abbildung 2.8 c** zeigt, auf sechs Operons verteilt, die auf dem kleineren der beiden Megaplasmide (pSym, bzw pSym-a) lokalisiert sind (Hynes *et al.*, 1986). Lediglich das Gen für den negativen Regulator der Nod-Faktor-Synthese, *nolR*, befindet sich auf dem Chromosom des Bodenbakteriums. Es lassen sich drei funktionelle Gruppen bei den Genen unterscheiden: die Synthesegene, deren Produkte den strukturellen Aufbau der Nod-Faktoren katalysieren, die Transportgene, deren Proteine für den Transport der LCOs und deren Vorstufen verantwortlich sind und die regulatorischen Gene, die die Transkription der anderen *nod*, *nol* und *noe* Gene aktivieren.



**Abbildung 2.8** Physikalische Karte der Nodulationsgene *nod*, *nol* und *noe* bei verschiedenen Rhizobien und eine grobe Funktionszuweisung. Die Pfeile zeigen die offenen Leserahmen der Gene von a) *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* [Stamm 248] b) *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* [Stamm ANU843], c) *Sinorhizobium meliloti* [Stamm 2011 und AK41] und d) *Bradyrhizobium japonicum* [Stamm USDA110] (Schema modifiziert nach Spaink, 1995).

Die Gene *nodABC* wurden ursprünglich als common (engl. = gemeinsam) *nod* Gene bezeichnet, weil sie in allen Rhizobien in hoch konservierter Form nachgewiesen werden konnten. Neuere Arbeiten von Roche (Roche *et al.*, 1996) zeigten aber, dass die Genprodukte der *nodABC* Gene in den einzelnen Rhizobienarten deutlich voneinander abweichende Affinitäten zu den Metaboliten des Nod-Faktoren-Syntheseweges aufwiesen. Dagegen könnten die Gene *nodMN* zu den common *nod* Genen gezählt werden, da *nodMN* Doppelmутanten von *Sinorhizobium meliloti* z.B.

durch die Transformation der *nodMN* Gene aus *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Nod-Faktoren synthetisierten, die keine strukturellen Unterschiede zum Wildtyp aufwiesen und diese Stämme ein Nodulationsverhalten vergleichbar mit dem Wildtyp aufweisen (Baev *et al.*, 1992). Aus diesem Grund ist die Bezeichnungsweise common irreführend und sollte nicht mehr verwendet werden.

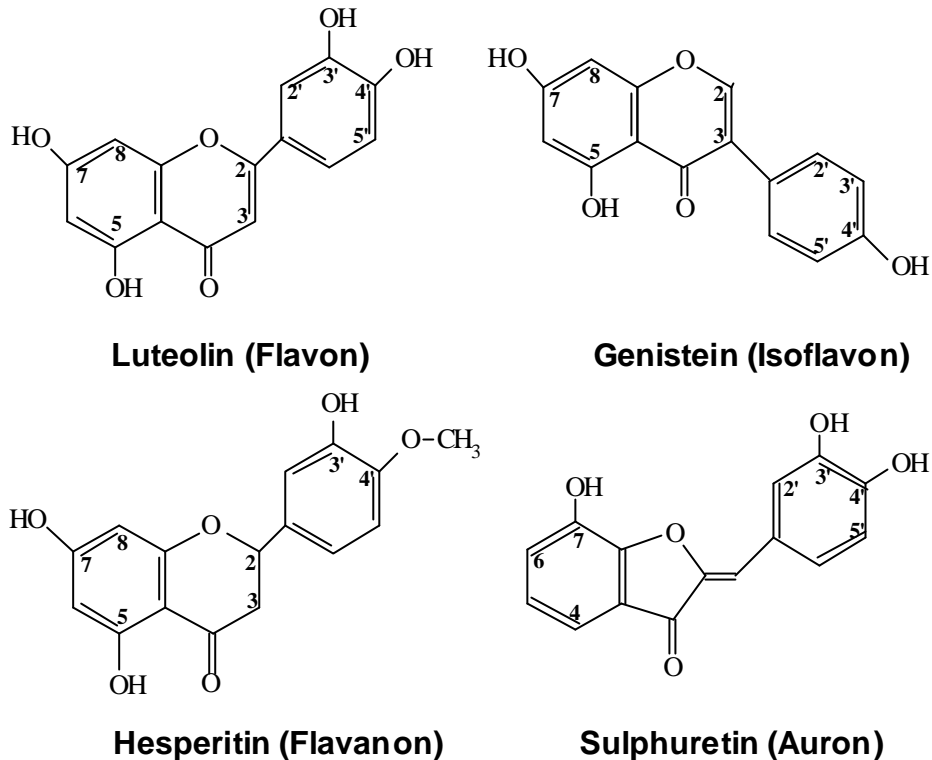
Mit dem Kürzel hsn (**h**ost **s**pecific **n**odulation) werden die Gene bezeichnet, die für die Wirtsspezifität der einzelnen Rhizobienarten determinieren. Sie codieren für die Enzyme, die das GlcNAc-Grundgerüst so modifizieren, dass die daraus resultierenden Nod-Faktoren nur von bestimmten Wirtspflanzen als Startsignal für die Etablierung der Symbiose erkannt werden und so den Wirtsbereich der Rhizobien bestimmen. Zu den hsn Genen werden bei *Sinorhizobium meliloti* z.B. die Gene *nodPQH* gezählt, die für die Anbindung einer Sulfatgruppe ans reduzierende Ende der LCOS verantwortlich sind. Diese Modifizierung der Nod-Faktoren wird nur bei *Sinorhizobium meliloti* und bei *Rhizobium tropicii* CFN 299 gefunden. Letztgenannter Stamm synthetisiert wiederum nur Pentamere, dessen Stickstoff am nichtreduzierenden Ende neben einer C(18:1)-Fettsäure eine Methylgruppe besitzt (Denarié *et al.*, 1996).

### **Die Induktion der Nod-Faktoren-Synthese**

Die Expression der *nod*-Gene wird durch die Wurzelexsudate der Luzerne induziert. Die in den Exsudaten enthaltenen Flavonoide (Flavone, Flavanone, Isoflavone und Aurone, dargestellt in **Abbildung 2.9**, sind Sekundärmetabolite des zentralen Phenylpropanoid-Stoffwechselweges und für die Aktivierung der regulatorischen *nodD* Gene verantwortlich. Luteolin, ein Tetrahydroxyflavon, in **Abbildung 2.9** links oben gezeigt, war das erste Flavonoid, das aus den Exsudaten von Luzernekeimlingen aufgereinigt werden konnte.

Es gelang der Nachweis für die Induktion der *nod*-Gene bei *Sinorhizobium meliloti* durch Luteolin (Peters *et al.*, 1986). Mit dem synthetischen 7,3',4'-Trihydroxyflavon konnte sogar eine stärkere Expression der *nodABC* Gene gegenüber Luteolin erreicht werden (Maillet *et al.*, 1990).

Die Aufnahme von Luteolin durch die Bakterienzelle ist von mehreren Faktoren abhängig, insbesondere vom pH-Wert. So nahmen die Bakterien bei einem pH von 7,4 nur ca. 37 % der Luteolinmenge auf, die von den Rhizobien bei pH 5,0 inkorporiert wurde (Hubac *et al.*, 1994). Es wurde von Hubac postuliert, dass die lipophile Oberflächenmatrix von *Sinorhizobium meliloti* an dem Aufnahmeprozess beteiligt ist. Unter sauren Bedingungen (pH 5,0) liegt Luteolin als nichtionisiertes und daher eher hydrophobes Molekül vor und besitzt deshalb eine höhere Affinität zu den lipophilen Oberflächenmolekülen von *Sinorhizobium meliloti*. Diese Ergebnisse werden auch durch die Beobachtungen von Recourt (Recourt *et al.*, 1989) untermauert, der bei *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* ebenfalls eine Akkumulation von Naringenin, den Induktor der *nod*-Gene bei diesem Stamm, im Cytoplasma unter sauren Bedingungen (pH 5.0) registrierte.



**Abbildung 2.9** Das Tetrahydroxyflavon Luteolin aus der Luzerne und der Färberdistel (*Reseda luteola*) und weitere Flavonoide, die aus den Wurzelexudaten der Wirtspflanzen von *Sinorhizobium meliloti* isoliert werden konnten

### Die Regulation der Expression von Nod-Faktor-Synthesegenen

Die Expression der Gene für die Nod-Faktoren-Synthese ist bei *Sinorhizobium meliloti* über einen komplexen Mechanismus reguliert. Es sind insgesamt fünf Proteine an dieser Regulation beteiligt, von denen vier auf dem pSyma-Plasmid lokalisiert sind (*nodD1-D3* und *syrM*; Mulligan *et al.*, 1989) und das *nolR* Gen (Cren *et al.*, 1995) auf dem Chromosom von *Sinorhizobium meliloti*. *Sinorhizobium meliloti* besitzt im Gegensatz zu den meisten anderen Rhizobienarten mehrere Kopien der *nodD* Gene (van Rhijn *et al.*, 1995), die sich nicht nur in ihrer Affinität zu den Flavonoiden aus den Wurzelexsudaten der Luzerne unterscheiden.

Die positiven Regulatoren der Nod-Faktoren-Synthese *nodD1* - 3 und *syrM* werden aufgrund ihrer Homologien alle zur *lysR* Familie (bakterielle Aktivator-Gene) gezählt (Henikoff *et al.*, 1988). Gemeinsam ist diesen Proteinen ein konservierter N-Terminus und ein sogenanntes Helix-Turn-Helix-Motiv, das eine DNA-bindende Funktion beinhaltet. Der C-Terminus variiert bei den einzelnen Mitgliedern der *lysR*-Familie stark. Daraus lässt sich ableiten, dass er bei den *nodD1* + 2 Proteinen als Bindestelle für die Flavonoide fungieren kann. Die Aminosäuresequenzen von *nodD1* und *nodD2* weisen eine höhere Übereinstimmung auf (87 % identische Aminosäuren) als *nodD1* zu *nodD3* (77%) und *nodD2* zu *nodD3* (79 %) (Rushing *et al.*, 1991). Zur *nodD* Familie weist *syrM* eine geringere, aber signifikante Ähnlichkeit von 30 % auf.

Die Gene *NodD1* und *nodD2* werden von *Sinorhizobium meliloti* konstitutiv exprimiert. Das *nodD1* Genprodukt wird durch das Flavonoid Luteolin aktiviert und kann dann an einer der *nod boxes* (s. **Abbildung 2.10**), die in *Sinorhizobium meliloti* gefunden wurden, binden. Die *nod box* ist eine in allen Rhizobien hoch konservierte, 49 bp lange DNA-Sequenz 26-28 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart der *nod* Operons (Rostas *et al.*, 1986). Das *nodD1* Protein kann aber auch durch die in **Abbildung 2.9** gezeigten Flavonoide Genistein und Sulphuretin aktiviert werden (Györgypal *et al.*, 1991). *NodD2* wird 7,4'-Dihydroxyflavon, Fustin oder Hesperitin aus den Wurzelexsudaten von Luzerne induziert, jedoch nicht durch Luteolin (Maillet *et al.*, 1990, Györgypal *et al.*, 1991). *NodD2* aktiviert durch die Bindung an die *nod boxes* ebenfalls die Transkription der *nod*, *nol* und *noe* Gene.

*NodD3* ist ein starker positiver Regulator der Nod-Faktoren-Synthese und bindet auch an den *nod boxes* (Kondorosi, E. *et al.*, 1989). Das *nodD3* Gen selbst steht unter einer komplexen Kontrolle. So zeigten Rhizobien, die Plasmide mit zusätzlichen Kopien von *nodD3* und *syrM* besitzen, eine hohe konstitutive Expression der *nod*, *nol* und *noe* Gene auch ohne Induktion mittels Flavonoide oder Wurzelexudaten (Kondorosi, E., *et al.* 1991). Ebenso resultierte eine hohe Kopienzahl von *syrM* in einer konstitutiven Expression der *nod* Gene. Die Expression der *nod* Gene und damit die Synthese der Nod-Faktoren konnte in diesen Organismen noch weiter durch die Addition von Flavonoiden gesteigert werden (Maillet *et al.*, 1990). Maillet und Kondorosi gingen in ihrem Modell zudem von einer Autoregulation des *nodD3* Gens durch das eigene Genprodukt aus.

Die Ergebnisse von Swanson (Swanson *et al.*, 1993) dagegen zeigten zum einen, dass die Expression von *nodD3* tatsächlich unabhängig von der Induktion durch Luteolin ist. Außerdem stimulierte *syrM* in *nodD3*-Mutanten auf niedrigem Niveau seine eigene Expression. Die Stärke der Expression von *syrM* auf höherem Niveau war von der Anzahl an *nodD3*-Proteinen in der Zelle abhängig. Für die Expression von *nodD3* ist die Gegenwart von *syrM* Genprodukten erforderlich, *syrM* allein kann die Transkription der *nod* Gene nicht aktivieren. Das von Swanson aufgestellte Regulationsmodell über *nodD3* und *syrM* geht von einem sich positiv verstärkenden Kreislauf zwischen *nodD3* und *syrM* aus.

---

GCATCCATATCGCAGATGATCGTTATCCAAACAATCAATTTACCAATCTTGCAGAGTCCTATTAGAG

---

**Abbildung 2.10**

DNA-consensus-Sequenz (*nod box*) von *Sinorhizobium meliloti* stromaufwärts von Operons der *nod*-Gene. Die Balken oberhalb der Sequenz markieren die Bindungsstellen der aktivierten *nodD*-Gene, die DNA wird an dieser Stelle zu einer Schleife gebogen (Fischer *et al.*, 1993)

Die negative Regulation der Nod-Faktoren-Synthese erfolgt über das *nolR* Gen. Das Genprodukt von *nolR* besitzt ebenfalls ein Helix-Turn-Helix Motiv, wie es bei anderen prokaryotischen, regulatorischen Proteinen zu finden ist, z.B. beim Repressor *xyIR* von *Bacillus subtilis*, den *nodD* Genen oder dem *nahR* Gen von *Pseudomonas putida*. Mit dieser DNA-Bindesequenz lagert sich *nolR* als Dimer an die Bindungsstelle für die RNA-Polymerase des Gens *nodD1* (überlappend auch an

die von *nodABC*) und an das Operon von *nodD2* an und unterbindet damit die Transkription der positiven Regulatoren (Kondorosi, E. et al, 1991a). Welche Faktoren die Expression von *nolR* selbst regulieren, ist derzeit noch nicht bekannt. Gebundener Stickstoff in der Umgebung des Bodenbakteriums könnte aber ein regulierender Faktor sein. Die negative Regulation der *nod*, *nol* und *noe* Gene durch *nolR* wird wahrscheinlich für eine optimale Nodulation von *Medicago sativa* durch *Sinorhizobium meliloti* benötigt (Broughton et al., 2000).

### **Die an der Synthese der Nod-Faktoren beteiligten Gene**

An der Synthese und Sekretion der Nod-Faktoren bei *Sinorhizobium meliloti* sind, wie in **Abbildung 2.8** zu erkennen, zumindest 20 Gene beteiligt, die sich auf dem pSym-Plasmid befinden (Kondorosi, E., 1984). Daneben werden Vorstufen für die Synthese der Nod-Faktoren-Moleküle (Fettsäuren, Zucker, Acetat, Sulfat) über andere Stoffwechselwege bereitgestellt.

Bei *nodM* handelt es sich um eine D-Glucosamin-Synthase, die die Amino-Gruppe von Glutamin auf Fructose-6-phosphat überträgt und damit den Grundbaustein des Zuckerrückgrates der Nod-Faktoren bildet. Auch *nodN*, das im gleichen Operon wie *nodM* lokalisiert ist, ist an der Synthese von D-Glucosamin beteiligt, denn sowohl *nodM* als auch *nodN* Mutanten zeigten eine stark verminderte Aktivität im Wurzelhaarkrümmungstest. Dieser Aktivitätsverlust konnte durch die Supplementierung mit D-Glucosamin zum Teil wieder aufgefangen werden. (Baev et al., 1992).

Die postulierten Syntheseschritte, vom Glucosamin-6-phosphat zum aktivierten UDP-GlcNAc, konnten bis jetzt nicht Gen-Produkten der *nod*, *nol* oder *noe* Gen-Operons zugeordnet werden. Eine Möglichkeit besteht in der Aktivierung des Glucosamin-6-phosphat durch die Enzyme, die von *Sinorhizobium meliloti* auch für andere Stoffwechselwege in den Mikroorganismen bereitgestellt werden.

Das Gen *nodC* codiert für eine UDP-GlcNAc-Transferase und ist damit für die Polymerisierung des Zuckerrückgrates aus den UDP-GlcNAc-Einheiten verantwortlich (Atkinson et al., 1992). Das *nodC*-Gen weist dabei eine hohe Homologie zu den Chitin-Synthasen von Hefen auf (Debellé et al., 1992). Die Transferase aus *Sinorhizobium meliloti* produziert überwiegend Chitotetraosen (ca. 70 %) und nur zu ca. 30% Pentosen (der Anteil an Triosen ist  $\leq 3$  %). Damit weist das Enzym ein vollkommen anderes Produktverhältnis von Tetraosen zu Pentosen auf als die Genprodukte von *nodC* Genen aus *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* bzw. *Rhizobium loti* (30:70, Tetraosen: Pentosen), (Kamst et al., 1997). Da die Länge des Zuckerrückgrates auch über die Aktivität der Nod-Faktoren in den Wirtspflanzen entscheidet (Schultze et al, 1992), ist damit das Gen *nodC* in *Sinorhizobium meliloti* nicht als *common nod* Gen einzustufen.

*NodB* deacetyliert die Aminogruppe des endständigen Zuckers nur am nichtreduzierenden Ende des Chitooligosaccharid-Rückgrates, um so die Ankopplung der Fettsäure durch *nodA* an diese Aminogruppe zu ermöglichen (s. unten). Dabei akzeptiert *nodB* *in vitro* Chitooligosaccharide verschiedener Polymerisationsgrade, modifiziert aber keine GlcNAc-Monomere (John et al, 1993). Zur Chitin-Deacetylase des Pilzes *Mucor rouxii* weist *nodB* aus *Sinorhizobium meliloti* eine Ähnlichkeit von 35 % auf, zum *nodB* Gen aus *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*



78 %. Die Chitin-Deacetylase des Pilzes akzeptiert wie bei der Nod-Faktoren-Synthese in Rhizobien nur  $\beta$ -1-4-verknüpfte N-Acetylglucosaminoligomere und setzt bevorzugt Tetraosen um (Kafetzopoulos, 1993).

Das Genprodukt *nodL* in *Sinorhizobium meliloti* ist eine O-Acetyltransferase, die spezifisch eine Acetat-Gruppe an die Hydroxylgruppe des C6-Atoms am nichtreduzierenden Ende des Nod-Faktors ankoppelt (Baev *et al.*, 1992a). Zur Galactosid-Acetyltransferase aus *Escherichia coli* weist das *nodL* Gen aus *Sinorhizobium meliloti* eine Homologie von 37 % auf, das *nodL* Gen von *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* besitzt sogar eine Kongruenz von 83% zum *E. coli* Gen (Surin *et al.*, 1988). In *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* erfüllt *nodL* die gleiche Aufgabe wie in *Sinorhizobium meliloti*, *in vitro* ist das Enzym aus diesem Stamm zudem in der Lage, Chitin-Oligosaccharide, Lipochitooligosaccharide und N-Acetylglucosamin zu acetylieren (Bloemberg *et al.*, 1994; 1995).

*NodE* und *nodF* sind an der Synthese der Fettsäurekette, d.h. an der Kondensation, Reduktion und Dehydratation beteiligt (Demont *et al.*, 1993). Dabei weist *nodE* Homologien zu  $\beta$ -Ketoacyl-Synthetasen auf, während *nodF* aufgrund seiner Struktur zu den **Acyl-Carrier-Proteinen (ACP)** gezählt werden muss. Werden *nodE* und *nodF* durch Mutation ausgeschaltet, wird an Stelle der C<sub>16</sub>-Fettsäure die in der Bakterienzelle die ubiquitär vorkommende 11-Oktadecensäure (C<sub>18</sub>) eingebaut. Ein Effekt, der auch bei *Rhizobium leguminosarum* zu beobachten ist (Spaink *et al.*, 1991).

*NodG*, das sich nur bei *Sinorhizobium meliloti* und nicht bei anderen Rhizobien nachweisen lässt, zeigt eine hohe Homologie zu einer 3-Oxoacyl-(ACP)-Reduktase (Sheldon *et al.*, 1990), doch konnten bei Deletionen von *nodG* keine messbaren Änderungen in der Struktur der Fettsäurekette bei Nod-Faktoren nachgewiesen werden. Vermutlich wird eine Deletion von *nodG* durch andere Enzyme von *Sinorhizobium meliloti* mit ähnlicher Funktion ausgeglichen.

*NodA* koppelt die Fettsäure an die entstandene Aminogruppe (s. oben) am nichtreduzierenden Ende der GlcNAc-Kette (Röhrig *et al.*, 1994). *NodA* von *Sinorhizobium meliloti* weist dabei nicht nur eine höhere Affinität zu C<sub>16</sub>-Fettsäuren auf als zu länger-kettigen Carbonsäuren, sondern es erfolgt *in vitro* auch bevorzugt die Ankopplung an ein Tetrasaccharid (Atkinson *et al.*, 1994). Ein Ausschalten des *nodA*-Gens von *Sinorhizobium meliloti* führt zu *nod*<sup>-</sup>-Mutanten, die Acylierung des GlcNAc-Rückgrates kann nicht durch andere Acyltransferasen des Bakteriums übernommen werden. Die Komplementierung der *nodA*<sup>-</sup>-Mutanten durch *nodA* aus *Rhizobium tropici* in *Sinorhizobium meliloti* führte zu einer verzögerten und abgeschwächten Nodulierung von *Medicago sativa*. Dies bestätigt die Spezifität der *nodA* Genprodukte für die in den verschiedenen Rhizobien strukturell unterschiedlichen Fettsäuren (Debellé *et al.*, 1996). *NodA* koppelt in *Rhizobium tropici* nur cis  $\Delta^{11}$ -Oktadecensäure oder Palmitinsäure an das Zuckerrückgrat.

Die Gene *nodH*, *nodP* und *nodQ* sind für eine der wirtsspezifischen Modifikation an den Nod-Faktoren, die O-Sulfatierung des Zuckers am reduzierenden Terminus des Moleküls, verantwortlich. Die Gene *nodP* und *nodQ* agieren in der Nod-Faktor-Synthese als ATP-Sulfurylase und als APS-Kinase und wandeln in zwei Schritten einen Sulfat-Rest unter Einsatz von ATP in die aktivierte Form um (PAPS). Sequenzabgleiche haben gezeigt, dass *nodP* und *nodQ* Homologien zu *cysD* und *cysN* aus *E. coli* aufweisen, die für eine ATP-Sulfurylase codieren (Schwedock *et al.*,

1990). Das Gen *nodH* weist signifikante Homologien mit Sulfotransferasen aus Ratten und Rindern auf und ist für den Transfer der aktivierten Sulfuryl-Gruppe (PAPS) an das Kohlenstoffatom 6 des reduzierenden Zuckers verantwortlich (Roche *et al.*, 1991).

Die Funktion der Gene *noIFGHI* ist noch nicht ganz verstanden, aber es handelt sich hierbei um membranständige Proteine aus der Familie der Resistance / Nodulation / Cell Division (RND) und der Membrane Fusion Protein (MFP). Die Aufgabe der Genprodukte von *noIFGHI* liegt höchstwahrscheinlich in der Translokation der Nod-Faktoren oder deren Vorstufen durch die zwei Membranen der Gram negativen Rhizobien (Baev, N., *et al.*, 1991, Saier, H.M., *et al.*, 1994). An der Sekretion der Nod-Faktoren bei *Sinorhizobium meliloti* sind außerdem die Gene *nodI* (ATP bindendes Protein) und *nodJ* (Membrane Protein) beteiligt (Denarie, *et al.*, 1996). Für *Rhizobium leguminosarium* bv. *viciae* und *Bradyrhizobium japonicum* konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Genprodukte *nodIJ* Ähnlichkeiten zu *kpsT* und *kpsM* Proteinen aus *E.coli* und zu *bexA* und *bexB* Enzymen aus *Haemophilis influenza* besitzen, die in diesen Organismen als Transportsysteme der inneren Membran für die Translokation von Zuckern, Aminosäuren und Oligopeptide dienen (Vázquez *et al.*, 1993).

Noch ungeklärt sind bis heute die Funktionen von *noeAB*, *noIQ*. Doch nach der vollständigen Sequenzierung des kompletten Genoms von *Sinorhizobium meliloti* im Sommer 2000 (Barloy-Hubler *et al.*, 2000) könnten auch diese Lücken durch Sequenzabgleiche geschlossen werden.

Aus diesen Daten ergibt sich das in **Abbildung 2.11** dargestellte, von Schultze und Kondorosi (Schultze *et al.*, 1996) postulierte Schema für den Ablauf der Nod-Faktorsynthese. Noch nicht abschließend geklärt bei der Nod-Faktorsynthese sind die Fragen, welche Faktoren die Kettenlänge des Zuckerrückgrates oder die Zahl der ungesättigten Fettsäuren in der Acyl-Kette bestimmen, ebenso mit welcher Häufigkeit die Nod-Faktoren mit Acetyl- und Sulfatgruppen dekoriert werden. Einen Einfluss auf die chemischen Strukturen der LCOS könnten die Wachstumsbedingungen auf die *SinoRhizobien* beim Ablauf der Synthese von Nod-Faktoren ausüben, was Demont (Demont *et al.*, 1993) bereits für die Absättigung der Fettsäuren mit Protonen postulierte.

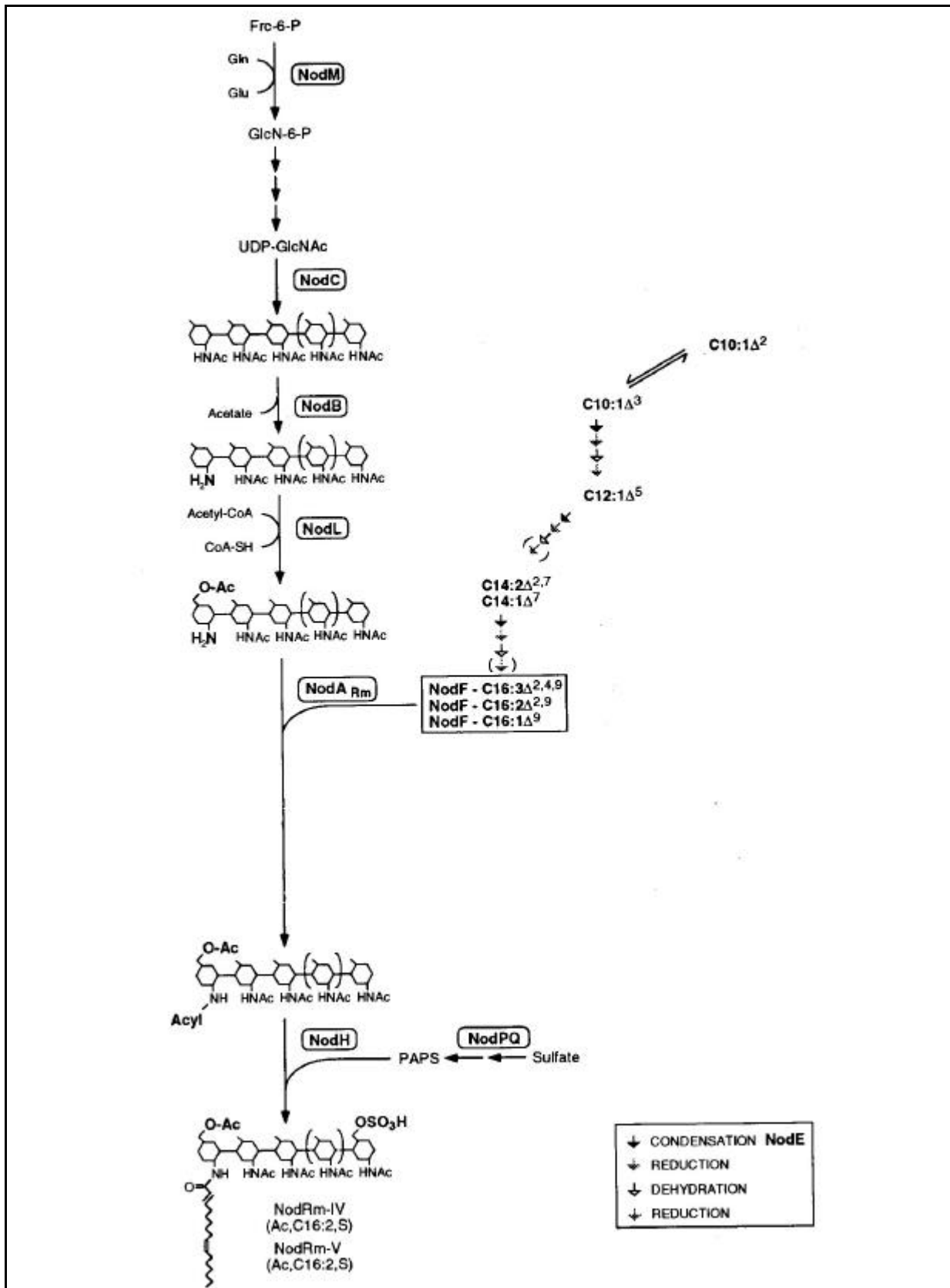


Abbildung 2.11

Postulierter Syntheseweg der Nod-Faktoren-Synthese bei *Sinorhizobium meliloti* (Schema modifiziert nach Schultze *et al.*, 1996) mit den Funktionszuweisungen der einzelnen *nod*-Gene

### 2.11 Die Kultivierung von Rhizobien im technischen Maßstab

#### ***Fermentationsmedien für Sinorhizobium meliloti***

Wichtige Aspekte für die breite Anwendung von Starterkulturen (Inokula) mit Bodenbakterien in der Landwirtschaft sind die Verfügbarkeit von preisgünstigen Nährlösungen (Medien) und einfache Verfahren zur Herstellung der Starterkulturen. Aus diesem Grund wird schon seit Jahrzehnten nach alternativen Kompositionen von Medien für die Produktion von Rhizobien-Inokula gesucht, mit denen die geforderten Ansprüche an die Qualität der Starterkulturen hinsichtlich erzielbarer Bakterientiter und Lagerfähigkeit dennoch erfüllt werden können. Hierbei kommen insbesondere Medienbestandteile in Betracht, die in anderen Herstellungsprozessen als Begleitstoffe anfallen und aufgrund ihres Nährstoffgehalts für die Anzucht von Rhizobien geeignet erscheinen.

Verschiedene Pflanzenextrakte haben sich als geeignete Basis für ein Nährmedium für die großtechnische Produktion von Rhizobien erwiesen (Somasegaran, 1994). Proteinreicher Pflanzensaft (brauner Pflanzensaft), der bei der großtechnischen Extraktion eiweißreicher Pflanzenblätter anfällt, kann als Mediumbestandteil für die Komposition preiswerter Medien verwendet werden. Angereicht mit  $K_2HPO_4$  (0,01 %),  $CaCO_3$  (0,2 %) und Melasse (0,75 %), konnte mit dem Pflanzensaft aus der Goabohne (*Psophocarpus tetragonolobus*) und der Kuhbohne (*Vigna sinensia*) bei der Kultivierung von *Sinorhizobium meliloti* eine Zellzahl von  $2\text{-}3\cdot 10^{10}$  Zellen je mL erreicht werden (Chanda *et al.*, 1986). Mit dieser Nährlösung konnten vergleichbare Werte wie mit dem erheblich teureren, im Labor verwendeten Standardmedium auf Basis von Hefeextrakt  $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , Mineralien und  $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  Mannitol (YEM-Medium) erreicht werden.

Ebenso wurden die bei der Lebensmittelproduktion von Erbsen (*Pisum sativum*) anfallenden Hülsen und die Pflanzen der als Gewässserunkraut bekannten Wasserhyazinthe (*Eichhornia crassipes*) als Ausgangsstoff für die Entwicklung preiswerter Medien verwendet (Gulati *et al.*, 1979). Die Schoten bzw. Pflanzen wurden getrocknet, die pulverisierten Pflanzenteile mit 5 %-iger Essigsäure hydrolysiert, die Extrakte der Hydrolyse mit gleichen Teilen Hefe-Extrakt-Lösung vermischt und mit Mannitol supplementiert (Gulati *et al.*, 1980a). Mit dieser Mediumzusammensetzung konnte in Schüttelkolbenexperimenten ein vergleichbares Wachstum von schnell und langsam wachsenden Rhizobien wie in reinem YEM-Medium erzielt werden. Die peptid- und aminosäurereichen Pflanzenhydrolysate konnten den in der Herstellung erheblich teureren Hefeextrakt damit partiell ersetzen. In einem für den Landwirtschaftseinsatz konzipierten einfachen Airlift-Reaktor konnten mit dem Erbsenhülsen-Wasserhyazinthen-Medium und dem schnellwachsenden Stamm *Rhizobium trifolii* 7004 im Satzbetrieb Trockenmassen von ca.  $8,96\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , bzw.  $8,0\cdot 10^9$  Zellen je mL produziert werden (Gulati, 1980b). Damit wurden vergleichbare Werte wie in einem konventionellen Rührkesselreaktor erreicht ( $10,3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , bzw.  $8,5\cdot 10^9$  Zellen je mL).

Molke, ein Produkt, das bei der Käseherstellung anfällt, eignet sich ebenfalls als Medienbestandteil für die preiswerte Herstellung von Rhizobien-Inokula. Mit einer Nährlösung, die  $22\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  entwässerte Cheddarkäse-Molke,  $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  Hefeextrakt und  $0,5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $K_2HPO_4$  enthielt, konnte in einem 5-Liter-Fermenter nach 48 h eine Lebendzellzahl von  $1\cdot 10^{10}$  (Colony forming units; cfu) je mL erzielt werden (Bissonnette *et*

al., 1986). Damit wurden die Ergebnisse im Vergleich zu einem YEM-Standardmedium um den Faktor 2 übertroffen. Entscheidend für die Verwendung der Käsemolke ist, dass *Sinorhizobium meliloti* geeignete Enzymsysteme zur Aufnahme und Katabolisierung von Disacchariden besitzt (Stowers, M.D. et al, 1985). Bei der Cheddarkäse-Molke bestehen 70 - 75 % der Trockenmasse aus Lactose.

Extrakte von Malz-Keimlingen (MSE) wurden in Satz- und in kontinuierlichen Fermentationen zur Biomasseproduktion von *Sinorhizobium meliloti* eingesetzt (Boiardi et al., 1985). Das MSE-Medium wurde mit Glycerin als Kohlenstoffquelle ( $= 10 \text{ gL}^{-1}$ ), verschiedenen Salzen und Spurenelementen supplementiert. So ange-reichert, konnte mit diesem Medium (MSE: 40 % (v/v)) in einem Satzprozess inner-halb von 36 h eine Biomasse von  $1,4 \cdot 10^{10} \text{ cfu mL}^{-1}$  produziert werden. Ein vergleich-bares Medium, das an Stelle von MSE  $4 \text{ gL}^{-1}$  Hefeextrakt enthielt, lieferte im glei-chen Zeitraum  $1,1 \cdot 10^{10} \text{ cfu mL}^{-1}$ .

### **Melasse als Komponente für Fermentationsmedien**

Melasse ist ein Produkt, das bei der Gewinnung von Speisezucker bzw. Weiß-zucker (Sucrose, Saccharose) anfällt. Weltweit wird Sucrose industriell aus zwei Pflanzen gewonnen, der Zuckerrübe (*Beta vulgaris ssp. vulgaris var. altissima*) und dem Zuckerrohr (*Saccharum officinarum*). Dabei stammen 70 % der weltweiten Weißzuckerproduktion von ca. 110 Mio. metrischen Tonnen (Mt) pro Jahr aus dem Zuckerrohr und 30 % aus der Zuckerrübe (Thier, 1996). In den Verarbeitungsprozes-sen beider Pflanzen wird Melasse als dunkelbraunes, zähflüssiges Endprodukt bei der Kristallisation des Zuckers abgeschieden. Aus 100 kg Zuckerrüben werden in optimierten Produktionsverfahren 11 - 12 kg Weißzucker und 3 - 6 kg Melasse gewonnen, aus 100 kg Zuckerrohr 10 - 11 kg Weißzucker und 3 - 4 kg Melasse. Die im Produktionsprozess erzeugte Melasse wird in Europa zu 100 % verwertet (Tier-futtermittelzusatz (70 %), Backhefe-, Industriealkoholproduktion (11 %) und Lebens-mittelindustrie, pharmazeutische Industrie (19 %)) (Thier, 1996). In Südamerika dagegen wird nach der Zuckergewinnung nur ein Teil der Zuckerrohrmelasse einer Weiterverwertung im Land zugeführt. Der Rest wird auf dem Weltmarkt für Melassen gehandelt und überwiegend nach Europa und in die U.S.A. exportiert. Gründe für den Export der südamerikanischen Melasse sind die extensive Viehwirtschaft, die auf dieses hochwertige Nahrungsergänzungsmittel für die Fleischtierhaltung nicht angewiesen ist und die mit Ausnahme der Industriealkoholproduktion (Brasilien) nur schwach entwickelte Industrie für die Melasseverwertung in Südamerika.

Argentinien gehört mit einer Produktionsquote von 1,57 Mio. metrischen Ton-nen Weißzucker im Jahr 1999 zu den zwanzig größten Sucroseproduzenten weltweit (Quelle: Food and Agriculture Organization of the United Nations: FAO Statistiken: <http://www.fao.org>). Hauptanbauggebiete des auf 241.000 ha ausschließlich kultivier-ten Zuckerrohrs sind die Provinzen Tucumán (61,5 %), Jujuy und Salta (36,9 %). Das Zuckerrohr wird in 23 Fabriken verarbeitet, von denen 15 in Tucumán, 3 in Jujuy, 2 in Salta und 3 in Santa Fé und Misiones liegen (Quelle: Statistiken des Centro Azucare-ro Argentino: <http://www.centrozucarero.com.ar>). Uruguay produzierte im Jahr 1999 mit Zuckerrohr (3.400 ha) 11.000 Mt an Weißzucker. Zum Vergleich, der südameri-kanische Nachbar Brasilien ist der größte Zuckerrohrproduzent weltweit mit einer Zuckerrohranbaufläche von 4,95 Mio. ha und einer Produktionsmenge von 17,69 Mio. Mt im Jahr 1999.

## 2 Theoretischer Hintergrund

Handelsmelassen sowohl aus der Zuckerrübe als auch aus dem Zuckerrohr besitzen einen eingestellten Trockensubstanzanteil von 74 - 76 %. Die aus dem Zuckerproduktionsprozess kommenden Melassen werden mit Wasser auf diese Trockensubstanzwerte verdünnt, um eine optimale Fließ- und Lagerfähigkeit der Melassen zu gewährleisten. Der Inhalt der Melassen setzt sich aus 47 - 48 % Gesamtzuckeranteil,  $\approx$  30 % Nichtzuckerstoffen und  $<$  26 % Wasseranteil zusammen. Die Zuckerstoffe in den Melassen aus Zuckerrübe und Zuckerrohr sind in **Tabelle 2.2** aufgeführt.

**Tabelle 2.2** Mittlerer Kohlenhydratanteil von Rohr- und Rübenmelasse (75 % Trockensubstanzgehalt) in % (nach Higginbotham *et al.*, 2000)

Bestandteil	Rohrmelasse	Rübenmelasse
Saccharose	35	48
Glucose	6	0,4
Fructose	8	0,6
Kestosen	1 - 2	0,1 - 0,3
Raffinose	Spuren	0,5 - 2,0
Andere Oligosaccharide	Spuren	1
Galactinol	-	0,1 - 0,3
Derivate reduzierender Zucker (nicht fermentierbare Stoffe)	4	1
„Gums“, Stärke, Lävan	3	1
Dextran, Cellulose	1	3
Wachse, Vanillin, Lignin	$<$ 0,2	$<$ 0,2
Hexit, myo-Inosit, Mannit, Polymere	Spuren	0,1-0,3

Handelsmelassen aus der Zuckerrübenproduktion besitzen einen neutralen bis leicht alkalischen pH-Wert (7,0 - 9,0), Zuckerrohrmelassen sind dagegen sauer (pH 5,0 - 6,5). Der größte Unterschied zwischen Zuckerrohr- und Zuckerrübenmelasse sind die Anteile an Sucrose und Invertzucker (Glucose-Fructose-Gemisch), wie die Werte in **Tabelle 2.2** zeigen.

Im Hinblick auf eine Verwendung von Melasse als vollwertigem Medium für die Kultivierung von Mikroorganismen ist bei den Nichtzuckerstoffen der Anteil an stickstoffhaltigen Verbindungen von Interesse. Dabei unterscheiden sich die Melassen aus Zuckerrohr und Zuckerrübe in der Zusammensetzung dieser Komponenten, die in **Tabelle 2.3** aufgeführt sind.

**Tabelle 2.3** Gehalt an stickstoffhaltigen organischen Verbindungen in Rohr- und Rübenmelasse (75 % Trockensubstanzgehalt) in % (nach Higginbotham *et al.*, 2000)

Komponenten	Rohrmelasse	Rübenmelasse
Stickstoffhaltige Verbindungen	3 - 6	8 - 12
Rohprotein (Kjeldahl-N Faktor = 6,25)	4 - 5	7 - 12
Betain	0	3 - 4
Glutaminsäure	Spuren	2 - 3
Aminosäuren, Pyroglutaminsäure, Peptide, Nucleinsäuren	0,3 - 0,5	2 - 3
Aminosäure/Zucker-Komplexe	3 - 4,5	0,5 - 1,5

Daneben enthalten die Melassen geringe Mengen an stickstofffreien Säuren (Oxal-, Bernstein-, Ameisen-, Essig- und Propionsäure), Mineralien wie die Kationen  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  und  $Na^+$ , die Anionen  $Cl^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $NO_3^-$  und  $NO_2^-$ , die Spurenelemente Eisen, Zink, Mangan, Kobalt und auch verschiedene Vitamine wie Biotin, Thiamin, Inosit, Pantothersäure und Nicotinsäure (Schiweck, 1995).

Neben möglichen, wachstumshemmenden Effekten durch die in der Melasse enthaltenen organischen flüchtigen Säuren (Essig-, Ameisen- und Propionsäure) können bei der Verwendung von Melasse in der Fermentationsindustrie die während der Zuckerfabrikation beigefügten Hilfs- und Zusatzstoffe ein Problem bei der Kultivierung von Mikroorganismen darstellen (Fattohi, 1995). Bei den Zusatzstoffen handelt es sich um Entschäumer-, Desinfektions-, Flockungs-, Belagverhinderungs- und Netzmittel. Chemisch gehören die Substanzen zu den partiellen Fettsäureestern von Polyhydroxy-Verbindungen, Ethoxylaten, Ethoxy-Propoxylaten sowie zu den ethoxylierten Fettalkoholen und Methylglycosidester von Kokosölfettsäuren (Olbrich, (1979); Potokar *et al.*, 1982).

### **Melassen in Fermentationsprozessen von Mikroorganismen**

Als Medienbestandteil oder vollwertiges Medium für die Kultivierung verschiedenster Mikroorganismen werden Zuckerrohr- und Zuckerrübenmelassen schon seit vielen Jahrzehnten in der Industrie eingesetzt (Sommer, 1992). Der Hauptanteil entfällt dabei auf die Industrialkoholproduktion mit Hefen (Doelle *et al.*, 1990, Gough *et al.*, 1996; Sheoran *et al.*, 1998) und die Produktion von Backhefen. Dabei dient die Produktion von *Saccharomyces cerevisiae* in Melassemedien nicht nur der Herstellung von Bäckerhefen selbst (Win *et al.*, 1996), es sollen mit ihr auch Produkte wie die Invertase für die Lebensmittelindustrie hergestellt werden (Vitolo *et al.*, 1995).

Aber auch in anderen Produktionsprozessen mit verschiedensten Mikroorganismen wie bei der Zitronensäureherstellung (Ettler *et al.*, 1991), der Glutaminsäure- bzw. Glutamatproduktion oder der Gewinnung der Aminosäure Lysin werden Melassen verwendet (Decker, 1998). Zuckerrübenmelassen wurden z.B in einer Konzentration von 9 % (w/v) als einzige Kohlenstoffquelle für die Produktion von Vitamin B<sub>2</sub> (Riboflavin) mit *Mycobacterium phlei* eingesetzt (Ghozlan, 1994). Die dabei verwendete Melasse wurde vor der Fermentation gefiltert und über einen Kationentauscher geleitet, um die das Wachstum der Organismen störenden Schwermetallionen und

die schlammigen Rückstände der Melasse zu eliminieren. Eine unbehandelte 5 %-ige (w/v) Zuckerrübenmelasselösung wurde in Zulaufkultivierungen von *Azotobacter vinelandii* zur Herstellung von Poly-(Hydroxybutyrat-Co-Hydroxyvalerat) eingesetzt (Page *et al.*, 1992).

Mit dem Bakterium *Propionibacterium acidipropionici* wurden mit Zuckerrüben- und Zuckerrohrmelassen das Vitamin B<sub>12</sub> (Cobalamin) und Propionsäure produziert. In einem Zwei-Stufen-Fermentationsprozess synthetisierten die Mikroorganismen 17,7 g Propionsäure·L<sup>-1</sup> in der ersten Stufe, was unter den eingestellten Bedingungen (Raumgeschwindigkeit: 0,25·h<sup>-1</sup>) eine Ausbeute von 0,50 g Propionsäure je Gramm Kohlenhydrate ergab. In der zweiten Stufe wurden 49 mg Vitamin B<sub>12</sub>·L<sup>-1</sup> bei einer Raumgeschwindigkeit von 0,03·h<sup>-1</sup> synthetisiert (Quesada-Chanto *et al.*, 1994). Und zur Herstellung von Xanthan durch das pflanzenpathogene Bodenbakterium *Xanthomonas campestris* wurde eine Zuckerrohrmelasse bis zu einer Konzentration von 60 % (w/v) zum Medium gegeben (Abd El-Salam *et al.*, 1994)

Neben Käsemolke, Bäckerhefe, Malzkeimlingen und Hefe-Extrakt ist auch Melasse als Mediumsbestandteil (Kohlenstofflieferant) in Experimenten zur Herstellung von Rhizobien-Starterkulturen für die Landwirtschaft getestet worden (Balatti *et al.*, 1998). Es konnten mit dem Melassemedium nach 48 h Lebendzellzahlen von 5·10<sup>9</sup> Zellen mL<sup>-1</sup> erhalten werden. Die produzierten Kulturen wiesen nach 180 Tagen noch einen Lebendtitel von 3 - 8·10<sup>8</sup> Zellen·mL<sup>-1</sup> auf.

### 2.12 Die Herstellung von Lipochitooligosacchariden (LCOS)

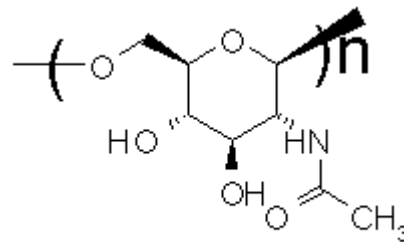
Für die Entwicklung eines Prozesses zur großtechnischen Produktion von Nod-Faktoren gibt es verschiedene Ansätze. Eine Möglichkeit besteht in der kompletten chemischen Synthese dieser komplexen Glykoconjugate. Betrachtet man die chemische Struktur der Nod-Faktoren, so wird deutlich, dass die besondere Herausforderung bei einem solchen Verfahren in der Varietät der verschiedenen Substituenten (Acetat, Sulfat, Fettsäure) am Chitooligosaccharid und in der regio- und stereospezifischen Anordnung der einzelnen Molekülbausteine liegt. Diese Anforderungen an das zu synthetisierende Produkt erfordern deshalb eine Vielzahl einzelner Syntheseschritte (Wang *et al.*, 1993; Ikeshita *et al.*, 1994) unter zum Teil extremen Reaktionsbedingungen (-78 °C, 3 Tage Reaktionsdauer für einen Syntheseschritt). Außerdem sind die Endausbeuten dieser Verfahren mit Werten von ≤ 1 % (Nicolaou *et al.*, 1992) extrem niedrig. Die große Zahl der Syntheseschritte, die geringen Ausbeuten und der Einsatz teurer Grundchemikalien lassen eine vollständige chemische Synthese aus prozessökonomischen Gründen nicht sinnvoll erscheinen.

Ein weiterer Ansatz zur großtechnischen Produktion von COS und LCOS besteht in der Transformation von heterologen Bakterienstämmen für die Hochzell-dichtefermentation mit Genen für die Nod-Faktor-Synthese aus Rhizobien (Banfalvi *et al.*, 1989). Mit einem rekombinanten *E. coli*-Stamm konnten tatsächlich hohe Konzentrationen von 270 mg·L<sup>-1</sup> an sulfatierten und acetylierten COS, Gemische aus Tetrameren und Pentameren, erzielt werden (Samain *et al.*, 1999). Doch erforderte dieses Verfahren zur Aufreinigung der COS aus den Zellen einen hohen Aufwand, da die Abtrennung der COS von Zelltrümmern und löslichen Bestandteilen (Proteine, Glycolipide, Lipide u.ä.) der *E. coli*-Zellen durchgeführt werden musste.



Bis zum heutigen Zeitpunkt ist es noch nicht gelungen, das komplette Nod-Faktoren-Synthese-Gencluster heterolog zu exprimieren. Die Ursachen liegen vor allem in der großen Zahl der Gene, die an der Nod-Faktoren-Synthese beteiligt sind und die alle in einen fremden Organismus transferiert werden müssten. Außerdem kann z.B. *E. coli* die Vorstufen der Fettsäure, die an das Zuckerrückgrat angekoppelt werden soll, nicht bereitstellen. Die notwendige Acylierung zum Erhalt eines funktionstüchtigen Nod-Faktors könnte erst nach Aufreinigung der COS erfolgen.

Daraus resultiert eine weitere Möglichkeit zur großtechnischen Produktion von Nod-Faktoren: die Kombination von chemischen und biologischen Verfahren. Denkbar wäre eine Hydrolyse von Chitin, das in **Abbildung 2.12** dargestellt ist. Chitin ist ein in der Natur vielfach vorkommendes  $\beta$ -1-4-verknüpftes GlcNAc-Polymer z.B. in den Schalen von Krebstieren, dem Exoskelett von Insekten, und in der Zellwandstruktur von Pilzen, mit dem Ziel, COS mit unterschiedlichem Polymerisationsgrad (Tri-, Tetra- und Pentamere) zu erhalten. Die COS könnten *in vitro* mit den Enzymen der *nod* Gene modifiziert werden. Die Herstellung der entsprechenden Enzyme würden durch heterologe Organismen erfolgen mit einer entsprechend hohen Ausbeute an *nod* Genprodukten. Zu prüfen wäre, ob die enzymatische Modifizierung der COS in einem Schritt mit einem Multienzymansatz erfolgen könnte, oder ob aufgrund der Reaktionsbedingungen die einzelne Enzyme für ihre optimale Produktivität einen Mehrstufenprozess verlangen.



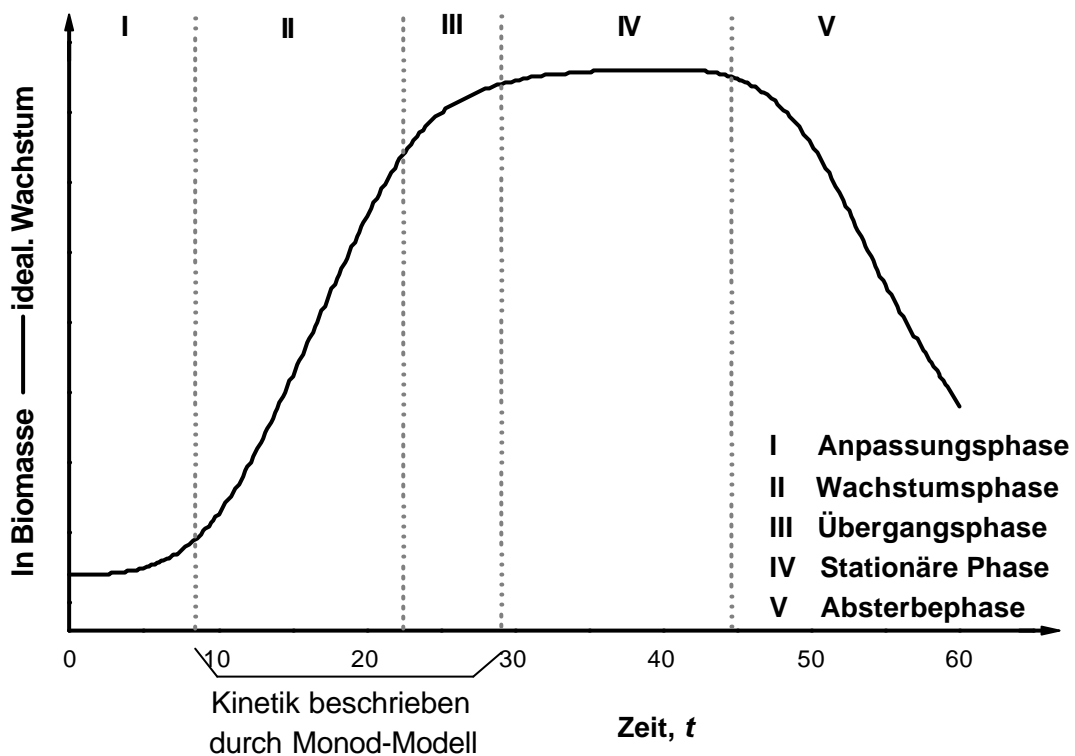
---

**Abbildung 2.12** Chemische Struktur von Chitin, das aus Krebstieren, Insekten oder Pilzen gewonnen wird

Derzeit stellt die Produktion von Nod-Faktoren mit Rhizobien die sinnvollste Alternative dar. Durch den Einsatz rekombinanter Bodenbakterien mit einer deregulierten Nod-Faktor-Synthese war es möglich, die Ausbeute an Nod-Faktoren um den Faktor 1000 zu erhöhen (Schultze *et al.*, 1992).

### 2.13 Das Wachstum von Mikroorganismen

Eine wichtige Basis aller biotechnologischen Prozesse ist die Eigenschaft der verwendeten Mikroorganismen, sich bei Erreichen einer bestimmten Größe spontan zu teilen, die Biomasse in einer Lösung damit zu vermehren und so die Zahl „biologischer“ Produktionseinheiten in einem definierten Arbeitsvolumen zu multiplizieren. Der in **Abbildung 2.13** gezeigte Ablauf eines spontanen, idealen Vermehrungsprozess wird in fünf Bereiche eingeteilt:



**Abbildung 2.13** Wachstumsverlauf einer sich in idealer Weise spontan teilenden Kultur (Modell modifiziert nach Chmiel., 1991a)

In Phase I, der Anpassungsphase (engl.= *lag phase*), adaptieren die Organismen an die neuen Bedingungen in der Nährlösung, es ist in dieser Phase nur ein minimaler Anstieg der Biomasse zu beobachten. Je nach Organismus und Zusammensetzung der Nährlösung kann die Phase I Stunden, aber auch Tage andauern. In der zweiten, exponentiellen Phase setzen die Organismen in dem Medium das Substrat um, wachsen und vermehren sich. In der Übergangsphase III wird durch die abnehmende Konzentration des Substrats die Wachstumsgeschwindigkeit limitiert und die Biomassekonzentration in der Lösung nähert sich asymptotisch einem maximalen Wert an. Die in der stationären Phase IV befindlichen Organismen teilen sich nur noch in dem Ausmaß, in dem auch Zellen absterben. Eine Zunahme an Biomasse in dieser Phase ist nicht mehr feststellbar. Mit dem im Medium noch vorhanden Substrat erhalten die Organismen zum überwiegenden Teil nur noch ihre lebensnotwendigen Stoffwechselfunktionen aufrecht. In der letzten Phase V, der Absterbephase, verfügen die Organismen über keinerlei Nährstoffe mehr und sterben ab.

Während sich die Kinetiken der Phasen II und III **der Abbildung 2.13** für alle Organismen sehr gut durch das Monod-Modell (Chmiel, 1991a) beschreiben lassen, gibt es für die Phasen I, IV und V nur vereinzelte Modelle für einige, ausgewählte Organismen. Für die Phase unlimitierten Wachstums, bei dem im der Nährlösung alle notwendigen Substrate im Übermaß vorhanden sind, lässt sich eine direkte Proportionalität zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit ( $r_x$ , **Gleichung 2.1 a**) und der

## 2 Theoretischer Hintergrund

---

Konzentration der Biomasse ( $X$ ) feststellen. Der Proportionalitätsfaktor ist die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit ( $m$  Gleichung 2.1 b):

$$r_x = \frac{dX}{dt} = m X \quad \text{oder} \quad m = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (\text{Gleichungen 2.1 a + b})$$

Nach dem Modell von Monod ergibt sich die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit ( $m$ ) nach Gleichung 2.2 wie folgt:

$$m = m_{max} \cdot \frac{S}{S + K_S} \quad (\text{Gleichung 2.2})$$

wobei  $S$  die Konzentration des limitierenden Substrats (in der Regel die Hauptkohlenstoffquelle wie die Sucrose in der Zuckerrübenmelasse),  $\mu_{max}$  die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit und  $K_S$  die Sättigungs- oder Affinitätskonstante des limitierenden Substrats sind. Die Zahl für  $K_S$  ergibt sich aus dem Wert jener Substratkonzentration, bei der die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit ( $\mu$ ) die Hälfte ihres Maximalwertes erreicht. Je niedriger der Wert für  $K_S$  ausfällt, desto größer ist die Affinität des verwendeten Mikroorganismus' zum eingesetzten Substrat. Ist  $S \gg K_S$ , so erfolgt das Wachstum der Mikroorganismen anhand Gleichung 2.3 mit nahezu maximaler spezifischer Wachstumsgeschwindigkeit ( $\mu_{max}$ ) und ist somit formal eine Reaktion nullter Ordnung in Bezug auf das limitierende Substrat, da:

$$\frac{S}{S + K_S} \cong 1 \rightarrow m \cong m_{max} \quad (\text{Gleichung 2.3})$$

Die Integration von Gleichung 2.1 ergibt für  $\mu = \text{konstant}$ :

$$\ln \frac{X_t}{X_0} = m (t - t_0) \quad \text{oder} \quad X_t = X_0 \cdot e^{m t} \quad (\text{Gleichungen 2.4 a + b})$$

mit  $X_0$  = Biomassekonzentration zum Ende der Anpassungsphase und  $X_t$  = Biomassekonzentration zum Zeitpunkt  $t$

Aus Gleichung 2.4 a lässt sich so die Zeit ermitteln, in der sich die Biomasse einer Kultur verdoppelt ( $X_t = 2 \cdot X_0$ ) und diese entspricht letztendlich der durchschnittlichen Verdopplungs- (Generations-)zeit ( $t_D$ ) einzelner Organismen in einer Kultur:

$$t_D = \frac{\ln 2}{m} \quad (\text{Gleichung 2.5})$$

Die Verdopplungsgeschwindigkeit ( $n_D$ ) ergibt sich aus dem Kehrwert der Generationszeit ( $t_D$ ):

$$n_D = \frac{1}{t_D} = \frac{m}{\ln 2} \quad (\text{Gleichung 2.6})$$

### 2.14 Die Produktbildung

In vielen biotechnologischen Prozessen ist nicht die Bildung von Biomasse selbst das Ziel des Verfahrens, sondern wie bei der Synthese von Nod-Faktoren durch *Sinorhizobium meliloti* ein von den Organismen hergestelltes Produkt. Nach Gaden jr. (Moser, 1981; Schügerl, 1985) werden die Produktbildungsprozesse in ihrer Abhängigkeit vom Wachstum und Stoffwechsel der eingesetzten Mikroorganismen in vier Typklassen eingeteilt:

- Typ 0) Das Produkt wird von ruhenden Zellen gebildet, die für ihren Erhaltungsstoffwechsel nur wenige Nährstoffe benötigen und so letztendlich als lebende Enzymträger fungieren wie bei der Steroid-Transformation durch *Fusarium culmorum* (Kolek, 1999)
- Typ I) Das gebildete Produkt ist Ergebnis der direkten Umsetzung eines vorgelegten Substrats durch den Primärstoffwechsel des eingesetzten Mikroorganismus (z.B. die Oxidation der Sucrose aus Melasse zu Ethanol durch Hefezellen; Gough *et al.*, 1996)
- Typ II) Das gewünschte Produkt entsteht indirekt aus dem Primärstoffwechsel wie bei der Aminosäureproduktion durch *Corynebacterium glutamicum* (Sahm *et al.*, 1995)
- Typ III) Die Produktbildung erfolgt unabhängig von Wachstum und primärem Stoffwechsel. Die Synthese von Vitamin B<sub>12</sub> durch *Propionibacterium acidipropionici* (Quesada-Chanto *et al.*, 1994) und die native Synthese der Nod-Faktoren durch *Sinorhizobium meliloti* sind Beispiele für diesen Typ der Produktbildung

Die Abhängigkeit der Produktbildungsgeschwindigkeit ( $r_p$ ) bzw. der spezifischen Produktbildungsgeschwindigkeit ( $p$ ) von der Biomassekonzentration ( $X$ ) oder von der Wachstumsgeschwindigkeit ( $r_x$ ) für eine Substratkonzentration von  $S > 0$  lassen sich durch folgende allgemeine Gleichungen beschreiben:

$$r_p = \frac{dP}{dt} = k_1 \cdot X + k_2 \cdot r_x \quad \text{oder} \quad p = k_1 + k_2 \cdot m \quad \text{(Gleichungen 2.7 a + b)}$$

$$\text{mit} \quad p = \frac{r_p}{X} \quad \text{und} \quad m = \frac{r_x}{X} \quad \text{(Gleichungen 2.8 a + b)}$$

wobei  $k_1$  ein wachstumsunabhängiger Proportionalitätsfaktor und  $k_2$  der Proportionalitätsfaktor für die wachstumsabhängige Produktbildung ist (Mutzall, 1994). Mit den **Gleichungen 2.7 a + b** wird somit die Produktbildung nach Typ II wiedergegeben, da die Synthese des Produkts in den Mikroorganismen in diesem Fall sowohl von der vorhandenen Biomassekonzentration ( $X$ ), als auch von der Wachstumsgeschwindigkeit ( $r_x$ ) abhängig ist.

Aus der Beschreibung der Produktbildung nach Typ I ergibt sich dagegen, dass die Produktbildung direkt mit dem Primärstoffwechsel zusammenhängt und keine Assoziation zur Biomassekonzentration ( $X$ ) besteht, somit der Proportionalitätsfaktor  $k_1=0$  ist und sich **Gleichung 2.7 a** somit zu:

$$r_p = k_2 \cdot r_x \quad \text{(Gleichung 2.9)}$$

vereinfacht, die Produktbildungsgeschwindigkeit also ausschließlich von der Wachstumsgeschwindigkeit ( $r_x$ ) der Mikroorganismen abhängig ist.

Bei der Bildung von Sekundärmetaboliten, wie bei der nativen Synthese der Nod-Faktoren aus niedermolekularen Bausteinen, ist die Produktbildungsgeschwindigkeit nicht an den Primärstoffwechsel gekoppelt, sondern hängt nur von der vorhandenen Biomassekonzentration ( $X$ ) ab (Typ III). In diesem Fall wird  $k_2 = 0$  und daraus folgt für  $r_p$ :

$$r_p = k_1 \cdot X \quad (\text{für } S > 0) \quad \text{(Gleichung 2.10)}$$

Eine Produktbildung des Typs III kommt immer dann zum Stillstand, wenn in den Zellen eines der für die Synthese des Produkts erforderlichen Substrate (wie z.B. Fructose-6-P oder  $C_{10:1}\Delta^2$ -Fettsäuren bei der natürlichen Nod-Faktor-Synthese von *Sinorhizobium meliloti*) verbraucht sind.

### **Die Produktivität eines biotechnologischen Prozesses**

Eine Kennzahl zur Beurteilung der Ökonomie eines diskontinuierlich geführten Prozesses in der Biotechnologie ist die Aussage über die Produktivität des Verfahrens. Sie beschreibt die Menge an Produkt, die innerhalb eines Zeitraumes in Abhängigkeit des Verfügung stehenden Arbeitsvolumens im Bioreaktor gebildet wird (Moser, 1981). Der absolute Wert der in einem definierten Arbeitsvolumen hergestellten Produktmasse im beschriebenen Verfahrenszeitraum wird als Raum-Zeit-Ausbeute bezeichnet.

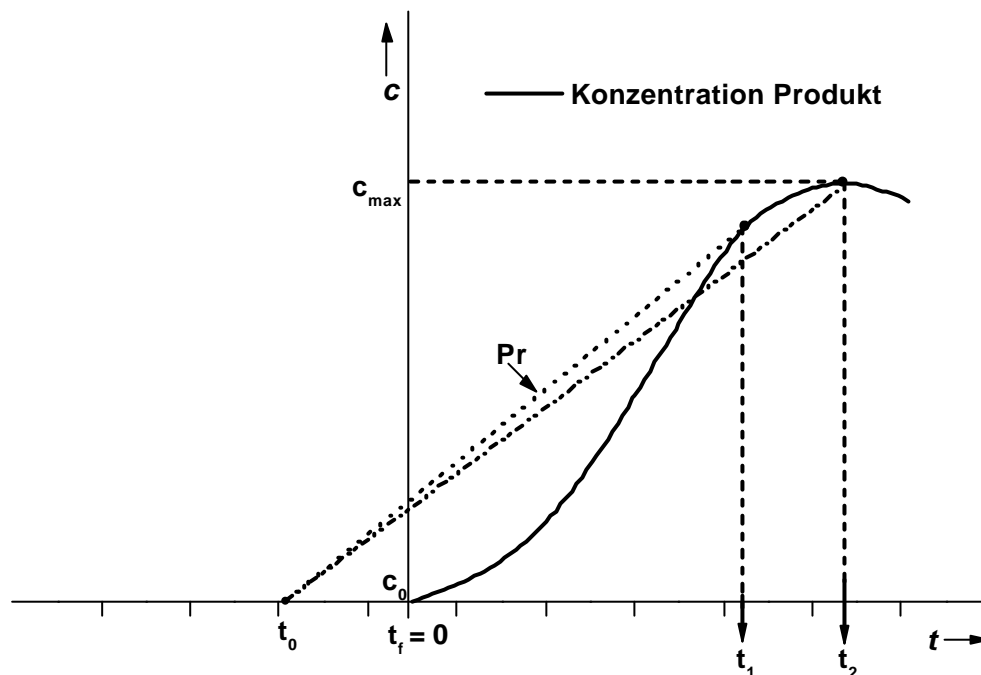
Das Produkt eines biotechnologischen Prozesses kann dabei die Biomasse der eingesetzten Mikroorganismen und / oder die in ihr enthaltenen Stoffe selbst sein (Bodenbakterien, die als Starterkulturen für die Landwirtschaft hergestellt werden) oder Substanzen, die von den Organismen in das Medium abgegeben werden (Signalmoleküle: Nod-Faktoren).

Grafisch lässt sich die maximale Produktivität eines diskontinuierlich geführten Prozesses aus der **Abb. 2.14** wie folgt ermitteln: vom Zeitpunkt  $t_0$  aus wird eine Tangente an die Kurve von Produktkonzentration / Zeit gelegt. Der Berührungspunkt von Tangente und Produktkonzentrations-Zeit-Kurve gibt den Prozesszeitpunkt mit der maximalen Produktivität an.

Mathematisch ausgedrückt ergibt sich die maximale Produktivität eines diskontinuierlich geführten Prozesses damit folgendermaßen:

$$Pr_{dk,max} = \frac{c_{t_1} - c_0}{|t_0 + t_f| + t_1 - t_f} \quad \text{(Gleichung 2.11)}$$

Handelt es sich bei den in diskontinuierlichen Prozessen hergestellten Produkten um Substanzen mit einer hohen Wertschöpfung im Vergleich zu den durch die Fermentation anfallenden Kosten, so wird bei einigen Verfahren erst zum Zeitpunkt  $t_2$  (**Abbildung 2.14**) abgebrochen, an dem das Substrat in der Fermentationslösung vollständig verbraucht und die maximal mögliche Produktkonzentration  $c_{max}$  erreicht ist. Doch aus **Abbildung 2.14** wird deutlich, dass eine Verbindung von  $t_0$  zu  $t_2$  eine flachere Steigerung besitzt als jene Tangente von  $t_0$  zu  $t_1$  und somit die Produktivität eines solchen Prozesses submaximal wird, was sich auch aus **Gleichung 2.11** ergibt.



**Abbildung 2.14**

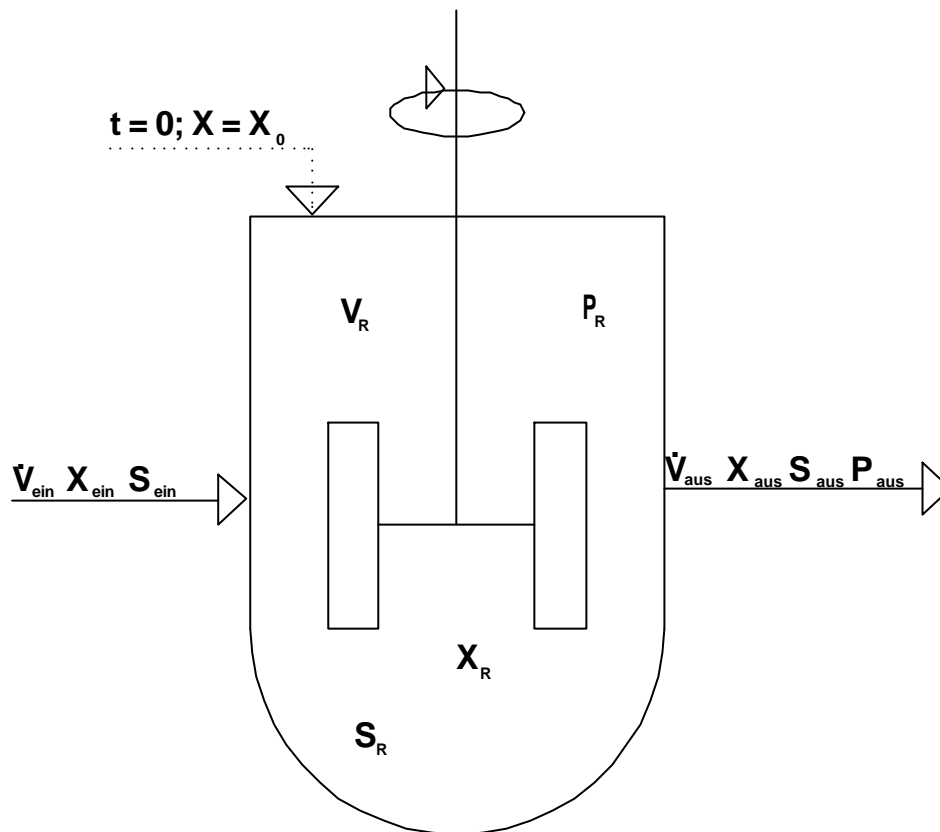
Grafische Darstellung zur Ermittlung der Produktivität eines diskontinuierlich geführten Prozesses.  $c$ : Konzentrationsachse;  $Pr$ : Produktivität;  $t$ : Zeitachse;  $t_0$ : Startzeitpunkt Prozess;  $t_f$ : Start Fermentation;  $t_1$ : Zeitpunkt eines diskontinuierlich geführten Prozesses mit max. Produktivität;  $t_2$ : Zeitpunkt eines diskontinuierlich geführten Prozesses mit maximaler Produktausbeute.  $t_0 - t_f$  = Totzeit: Zeitraum zur Vorbereitung der Fermentation: Ernten des Produkts, Reinigen des Fermenters, Neubeschickung mit Medium, Sterilisation, usw. (Grafik abgeleitet nach Moser, 1981)

## 2.16 Die Bilanzierung von Fermentationsprozessen

### *Die Betriebsweisen eines Rührkesselreaktors*

Beim Betrieb eines Rührkesselreaktors (s. **Abbildung 2.15**) zur Kultivierung von Mikroorganismen wird zwischen drei Verfahrensweisen unterschieden: dem Satzbetrieb oder diskontinuierlichen Betrieb (engl.= *batch*), dem Zulauf-, Zufütte-

rungsverfahren oder semikontinuierlichen Betrieb (engl. = *fed batch*) und dem kontinuierlichen Betrieb (engl. = **Continuous-Flow Stirred-Tank Reactor; C(F)STR**; (Mutzall, 1994). In dieser Arbeit wird in Abhängigkeit von der biotechnologischen Fragestellung jedes dieser drei Verfahren angewendet. Im folgenden wird auf die Eigenheiten der unterschiedlichen Betriebsweisen eingegangen.



**Abbildung 2.15**

Schaubild eines Rührkesselreaktors mit Variablen der wichtigsten Parameter für eine Bilanzierung eines Prozesses.  $P$ : Produktkonzentration;  $S$ : Substratkonzentration;  $t$ : Zeit;  $V$ : Volumenstrom;  $X$ : Konzentration Biomasse; Indices:  $R$ : Reaktor;  $\text{ein}$ : in den Reaktor einströmend;  $\text{aus}$ : aus dem Bioreaktor herausfließend

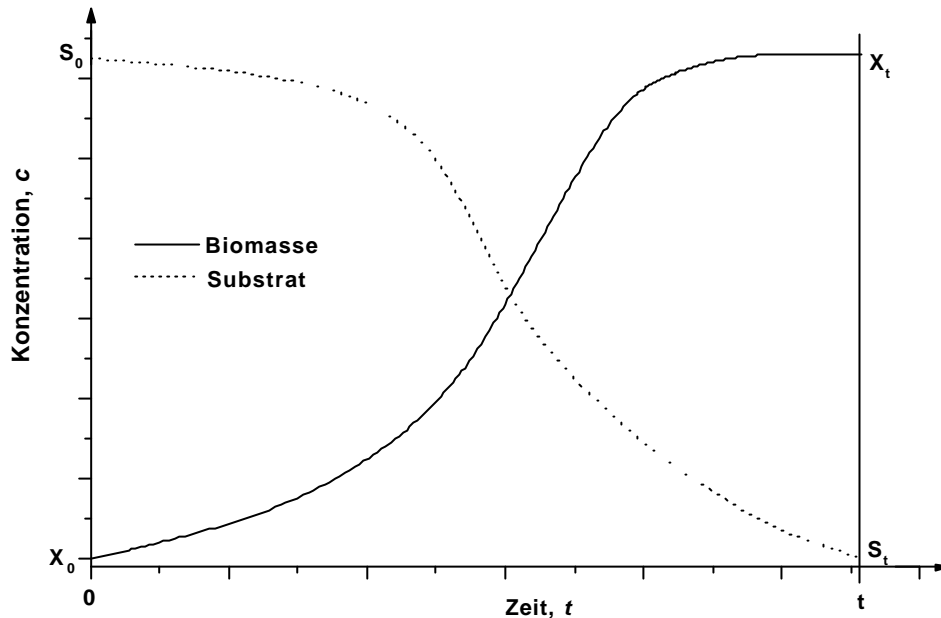
### **Der Satzbetrieb eines Rührkessels**

Beim Satzbetrieb wird durch Animpfen eines definierten Volumens des zuvor sterilisierten Mediums ( $V_R$ ) mit einer Vorkultur ( $X_0$ ) zum Zeitpunkt  $t_0$  der Prozess gestartet. Innerhalb eines festgelegten Prozesszeitraums nehmen die im Reaktorvolumen  $V_R$  befindlichen Organismen ( $X_R$ ) das dort vorhandene Substrat ( $S_R$ ) auf und setzen es mit ihrem Stoffwechsel um ( $S_R \rightarrow 0$ ). Die Zellen wachsen und teilen sich und die Biomasse im Rührkessel ( $X_R$ ) nimmt zu, wie **Abbildung 2.16** verdeutlicht. Es kann von den Organismen (ein) Produkt(e) ( $P_R$ ) gebildet werden, das Ziel eines jeden biotechnologischen Prozesses:

**Substrat(e) + Mikroorganismen (Zellen) ® Produkt(e) + mehr Mikroorganismen (Zellen)**

## 2 Theoretischer Hintergrund

In einigen Fällen sind aber die Mikroorganismen selbst das Ziel (Produkt) der Fermentationen, wie z.B. bei der Herstellung von Hefeextrakt (Varavinit *et al.*, 1997) und der Produktion von Starterkulturen für die Landwirtschaft.



**Abbildung 2.16** Verlauf der Konzentrationen von Substrat (S) und Biomasse (X) während eines Satzbetriebes in einem Rührkessel

Die Bilanz eines diskontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktors für das Zellwachstum ergibt sich nach dem Monod-Modell für ein limitierendes Substrat zu:

$$r_{v,x} = \frac{dX}{dt} = \mathbf{m} X = \mathbf{m}_{max} \cdot \frac{S}{K_s + S} \cdot X \quad \text{(Gleichung 2.12)}$$

unter der Voraussetzung, dass der Substratverbrauch direkt an das Wachstum gekoppelt ist:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \mathbf{m}_{max} \cdot X \frac{S}{K_s + S} \quad \text{(Gleichung 2.13)}$$

mit

$$Y_{X/S} = \frac{r_{v,x}}{r_{v,s}} = -\frac{dX}{dS} \quad \text{(Gleichung 2.14)}$$

Bei der Annahme, dass der Ausbeutekoeffizient streng konstant ist ( $Y_{X/S} = \text{konst.}$ ), gibt dieser auch das integrale Verhältnis zwischen Biomasse und Substrat wieder:



$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad \text{(Gleichung 2.15)}$$

Somit lässt sich die Konzentration der Biomasse auch als Funktion der Restkonzentration an Substrat ausdrücken:

$$X = X_0 + Y_{x/s} \cdot (S_0 - S) \quad \text{(Gleichung 2.16)}$$

Die Satzkultivierung ist in der Biotechnologie-Industrie immer noch das am häufigsten angewandte Produktionsverfahren, da es verschiedene Vorteile besitzt:

Ein diskontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor im Satzbetrieb weist nur eine geringe Kontaminationsgefahr aufgrund der im Vergleich zu den anderen Betriebsweisen kurzen Prozesslaufzeit auf. Die Investitions- und Betriebskosten sind aufgrund eines einfacher strukturierten Aufbaus von Reaktor und der meist simpleren Peripherie zum Teil erheblich niedriger als beim Zulaufverfahren und beim kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor. Aufgrund der definierten Kultivierungszeiten für Satzbetriebe sind hohe Umsätze realisierbar (Schügerl, 1985).

Aus produktionstechnischer Sicht weist der Satzbetrieb aber auch Nachteile auf: es entstehen lange, unproduktive Totzeiten durch das ständig wiederkehrende Befüllen, Sterilisieren, Entleeren und Reinigen des Reaktors. Durch das häufigere Sterilisieren im Gegensatz zu länger andauernden Kultivierungsverfahren werden der Reaktor und die in ihm befindlichen Sonden und anderen Baugruppen häufiger thermisch stark belastet. Für jeden neuen Satzprozess müssen neue Vorkulturen angezogen werden, was ebenfalls einen zusätzlichen Zeitaufwand zur Folge hat. Aufgrund eines oftmals niedrigeren Automatisierungsgrades bei unregelmäßigen Satzbetrieben erhöht sich der personelle Aufwand bei Prozessführung und -überwachung.

### **Der semikontinuierliche Betrieb eines Rührkessels mit Substratzufütterung**

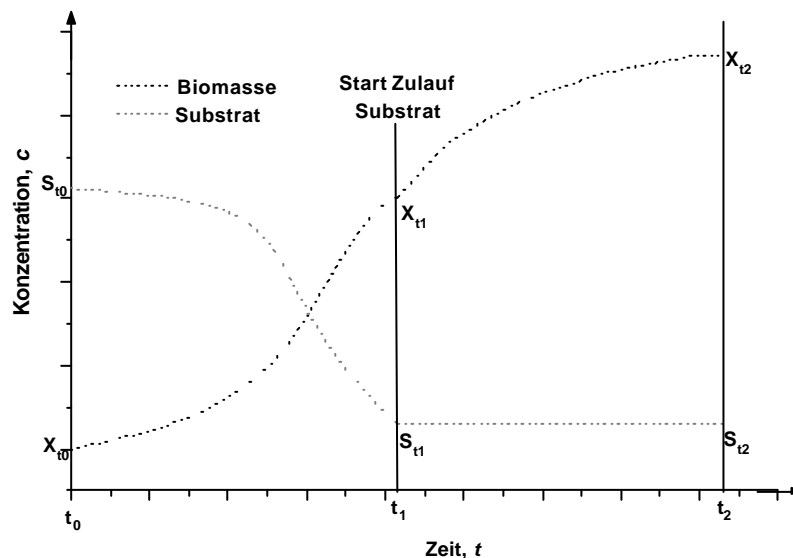
Der semikontinuierliche Betrieb (Zulaufverfahren) eines Rührkessels bietet die Möglichkeit, in demselben maximalen Arbeitsvolumen  $V_R$  wie im Satzbetrieb auf Grund einer anderen Prozessführung höhere Ausbeuten an Biomasse  $X_R$  und / oder Produkt  $P_R$  zu erzielen. Im Gegensatz zum diskontinuierlich betriebenen Rührkessel wird beim Zulaufverfahren die Kultivierung mit einem geringeren Volumen als im Satzbetrieb gestartet. Ist der Zeitpunkt erreicht, an dem die Substratkonzentration ( $S_R \rightarrow 0$ ) für das Wachstum der Organismen im Rührkessel limitierend wird, wird mit einem Volumenstrom  $V_{ein}$  neues Substrat ( $S_{ein}$ ; oft in Form eines Konzentrates) in den Fermenter gepumpt, wie in **Abbildung 2.17** zu sehen ist. Der Zulauf von frischem Medium / Mediumkonzentrat kann dabei auf unterschiedliche Weise erfolgen:

Die Konzentration des elementaren, limitierenden Substrats (zumeist die Hauptkohlenstoffquelle) im Rührkessel wird direkt über eine Sonde oder quasi *on-line* über ein Fließ-Injektions-Analyse-(FIA)-System (Nandakumar *et al.*, 1999) bestimmt. Bei Erreichen eines gewählten Sollwerts an Substratkonzentration im

Medium wird automatisch über eine vorgegebene Regelungstrategie neues Medium zudosiert. *On-line* Messsonden und Analysensysteme gibt es derzeit aber nur für wenige Substrate wie Glucose und Glutamat (White *et al.*, 1995).

Andere Parameter wie der Sauerstoffpartialdruck in der Fermenterlösung, die Zusammensetzung des Luftgemisches im Abgasstrom eines Fermenters, der pH-Wert der Fermentationsbrühe oder die Biomassekonzentration im Medium liefern indirekt ebenfalls eine Aussage über den Substratverbrauch in der Nährlösung. Da diese Parameter *on-line* über geeignete Sensorsysteme (pO<sub>2</sub>-Elektrode, pH-Elektrode, Trübungssonde oder *in-situ*-Mikroskope (Bittner *et al.*, 1998) im Prozess (*in situ*) und zeitnah (*on-line*) erfasst werden können, kann die Regelung der Zufütterungspumpe auch über die Signale dieser Sensoren erfolgen (Schmidt, 1998). Eine Zufütterung wird dann aktiviert, wenn z.B. die Sauerstoffsättigung im Medium auf Grund eines Nährstoffmangels wieder ansteigt und ein vorgegebener Sollwert des pO<sub>2</sub> erreicht wird (s. auch Programm unter 7.1) oder wenn die Trübungsmessung als Maß für die Biomassekonzentration im Fermenter einen zuvor festgelegten Wert erreicht hat.

Die einfachste Methode der Zulaufkultivierung ist eine zeitgesteuerte Dosierung von frischem Medium. Der Startpunkt der Zufütterung (s. **Abbildung 2.17**,  $t_{\text{Start}} = t_1$ ) kann dabei z. B. anhand von Daten zuvor durchgeführter Satzprozesse festgelegt werden. Der Startpunkt der Zufütterung ergibt sich aus den Wachstumskurven der Mikroorganismen, bei der sie im Satzprozess in die Übergangsphase gewechselt (s. **Abbildung 2.16**). Ab dieser Phase wird die Wachstumsgeschwindigkeit der Mikroorganismen limitiert, weil sie durch die Substratkonzentration in der Nährlösung kontrolliert ist (s. oben). Die Startbedingungen für die Satzprozesse und die für Satzphase der Zulaufkultivierung  $X_{t_0, \text{Satz}} = X_{t_0, \text{Zulauf}}$ ,  $S_{t_0, \text{Satz}} = S_{t_0, \text{Zulauf}}$  sowie die Fermentationsbedingungen (pH, Lufteintrag, Rührerdrehfrequenz usw.) sollten für eine genaue Festlegung des Startzeitpunkts identisch sein.

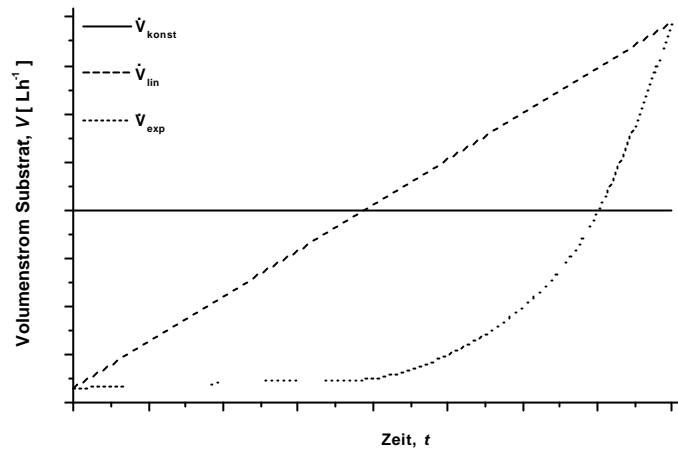


**Abbildung 2.17**

Idealer Verlauf von Biomasse- und Substratkonzentration in einem halbkontinuierlichen Rührkessel mit Substratzufütterung

## 2 Theoretischer Hintergrund

Die Zufütterung frischen Mediums kann mit einem konstanten Volumenstrom  $V$  erfolgen, der Volumenstrom kann aber auch linear oder exponentiell ansteigen, wie in **Abbildung 2.18** gezeigt.



**Abbildung 2.18** Darstellung der verschiedenen Volumenstromgradienten bei einer zeitgesteuerten Zufütterungsstrategie von frischem Substrat im Zulaufverfahren

Bei der Bilanzierung eines Zulaufverfahrens muss beachtet werden, dass ab dem Zeitpunkt  $t_1$  (s. **Abbildung 2.17**) mit einem Volumenstrom  $V_{ein}$  frisches Substrat ( $S_{ein}$ ) zu dem Startvolumen an Medium im Fermenter ( $V_{R,t0}$ ) gelangt und so das Arbeitsvolumen im Reaktor über die Zeit zunimmt ( $V_R = V_{R,t0} + V_{ein} \cdot t$ ). Die Volumenzunahme muss bei der Bilanzierung der Biomasse und des Substrats berücksichtigt werden:

$$\frac{d(V_R \cdot X)}{dt} = V_R \cdot r_{V,X} \quad \text{und} \quad \frac{d(V_R \cdot S)}{dt} = \dot{V} \cdot S_0 - V_R \cdot r_{V,S} \quad \text{(Gleichungen 2.17, a + b)}$$

Für ein Wachstum nach Monod-Kinetik (s. **Gleichung 2.12**) und unter der Annahme, dass  $Y_{X/S}$  (s. **Gleichung 2.14**) wieder konstant ist, lassen sich die Bilanzgleichungen für die Biomasse (**Gleichung 2.18**) und das Substrat (**Gleichung 2.19**) differentiell wie folgt darstellen:

$$\frac{d(V_R \cdot X)}{dt} = X \cdot \frac{dV_R}{dt} + V_R \cdot \frac{dX}{dt} = V_R \cdot \mu X \quad \text{(Gleichung 2.18)}$$

$$\frac{d(V_R \cdot S)}{dt} = S \frac{dV_R}{dt} + V_R \frac{dS}{dt} = \dot{V}_{ein} \cdot S_{ein} - V_R \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu X \quad \text{(Gleichung 2.19)}$$

Bei einem konstanten Volumenstrom ( $V = \text{konst.}$ ) ist die Veränderung des Flüssigkeitsvolumens im Reaktor ( $V_R$ ) bekannt:

$$V_R = V_{R,t_0} + \dot{V}_{ein} \cdot t \quad \text{(Gleichung 2.20)}$$

Damit lässt sich die Bilanz der Biomasse nach **Gleichung 2.18** auch schreiben als:

$$\frac{dX}{dt} = \mathbf{m} X - \frac{\dot{V}_{ein}}{V_R} = \left( \mathbf{m} - \frac{\dot{V}_{ein}}{V_{R,t_0} + \dot{V}_{ein} \cdot t} \right) \cdot X \quad \text{(Gleichung 2.21)}$$

Vorteile besitzt das Zulaufverfahren nicht nur auf Grund der oftmals höheren Biomassekonzentrationen, die in dem gleichen Endarbeitsvolumen ( $V_R$ ) des Reaktors wie im Satzprozess erzielt werden kann. Mit einer geeigneten Zufütterungsstrategie können für die Organismen optimierte Wachstums- und Produktbildungsabläufe in der Zulaufkultivierung erreicht werden.

Die Nachteile des Zulaufverfahrens gegenüber dem Satzprozess liegen in dem gesteigerten Aufwand durch die erforderliche, umfangreichere Steuerungs- und Regelungsperipherie (Pumpen, Meßsonden, Steuer- und Regelungssoftware) und die damit verbundenen höheren Investitions- und Betriebskosten im Vergleich zu einem im Satzbetrieb geführten Bioreaktor. Durch die längere Prozesslaufzeit erhöht sich außerdem das Risiko einer Kontamination mit Fremdkeimen.

### **Die kontinuierliche Kultivierung ohne Zellrückhaltung**

Der Ablauf eines Fermentationsprozesses in einem kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor ohne Zellrückhaltung lässt sich in zwei Bereiche gliedern: in der ersten, instationären Phase lassen sich die Abläufe mit denen eines diskontinuierlich betriebenen Rührkessels vergleichen. Zu einem definierten Reaktorvolumen  $V_R$  an Nährlösung wird zum Zeitpunkt  $t_0$  ein Inokulum  $X_0$  gegeben. Das im Rührkessel vorhandene Substrat  $S_R$  wird von der Biomasse umgesetzt, die Zellen wachsen und vermehren sich und bilden ein Produkt.

Im zweiten Teil der Kultivierung, ehe das im Reaktor vorhandene Substrat komplett umgesetzt worden ist ( $S_R = 0$ ) und die Organismen die stationäre Phase vollständig erreicht haben, führt man dem Fermenter mit einem definierten Volumenstrom  $\dot{V}_{ein}$  frisches, steriles Medium mit den Konzentrationen  $S = S_{ein}$  und  $X_{ein} = 0$  zu. Gleichzeitig entzieht man dem Rührkessel mit einem gleich großen Volumenstrom  $\dot{V}_{aus}$  Fermentationsbrühe aus dem Reaktor.

$$\dot{V}_{ein} = \dot{V}_{aus} = \dot{V} \quad \text{(Gleichung 2.22)}$$

Der Volumenstrom  $\dot{V}$  sollte so justiert werden, dass der abgeführte Biomasseverlust  $X_{aus}$  durch das Biomassewachstum im Fermenter ausgeglichen wird ( $X_R/t = \text{konst.}$ ). Diese Phase der kontinuierlichen Kultivierung, bei der die Biomassekonzentration im Reaktor ( $X_R$ ) konstant gehalten wird, wird als stationärer Zustand (engl. = *steady state*) oder auch als Chemostat (Mutzall, 1994) bezeichnet. Den Fluß durch den Fermenter ( $\dot{V}$ ), bezogen auf das Arbeitsvolumen  $V_R$ , wird in der Biotech-

nologie Raumgeschwindigkeit  $D$  (engl. = *space velocity*, oftmals auch Verdünnungsgeschwindigkeit; engl. = *dilution rate*; s. **Gleichung 2.23, a**) genannt. Der Kehrwert dieser Größe ist die Raumzeit ( $t$ ) oder Verweilzeit (**Gleichung 2.23, b**), jene Größe, die vor allem in der Verfahrenstechnik verwendet wird:

$$D = \frac{\dot{V}}{V_R} \quad [h^{-1}] \quad \text{oder} \quad t = \frac{V_R}{\dot{V}} \quad [h] \quad \text{(Gleichung 2.23 a und b)}$$

Die Bilanz der Biomasse ( $X$ ) im stationären Zustand eines kontinuierlich betriebenen Rührkessels kann durch die **Gleichung 2.24** beschrieben werden:

$$r_{V,X} = \frac{dX}{dt} = \mu X - D \cdot X = 0 \quad \rightarrow \quad \mu X = D \cdot X \quad \text{(Gleichung 2.24)}$$

Die Biomassebilanzierung lässt sich damit vereinfachen zu **Gleichung 2.25** und es ergibt sich die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit ( $\mu$ ) der Kultur in der stationären Zustand des kontinuierlich betriebenen Bioreaktors direkt aus der eingestellten Raumgeschwindigkeit ( $D$ ) oder ihrem Kehrwert, der Raumzeit ( $t$ ):

$$D = \frac{1}{t} = \mu = r_{X,X} \quad \text{(Gleichung 2.25)}$$

Unter der Voraussetzung, dass aufgrund einer als ideal angenommenen Durchmischung alle Flüssigkeitselemente im Reaktor die gleiche Zusammensetzung besitzen und so die Konzentrationen aller Stoffe während des stationären Zustands im Reaktor konstant bleiben, erlaubt die Justierung von  $D$  (und damit auch die von  $\mu$ ) die gezielte Beobachtung physiologischer Phänomene des untersuchten Organismus' bei konstanten Bedingungen. So können unter den stationären Bedingungen des Chemostaten die Einflüsse einzelner Stellgrößen wie z.B. der pH-Wert auf eine Bodenbakterienkultur und die Auswirkungen dieser Millieuänderung auf die Produktion bestimmter Metabolite (Nod-Faktoren) genauer beobachtet werden, da alle anderen Parameter im Rührkessel nicht variieren.

Dieser Vorteil gegenüber einem Satzprozess oder dem Zulaufverfahren muss allerdings mit dem Nachteil erkauf werden, dass eine erheblich größere Menge an steriler Nährlösung bereitgestellt werden muss, was diese Prozessführung erheblich kostenaufwendiger gestaltet. Zudem dauert es bei der Kultivierung von *Sinorhizobium meliloti* einige Tage, bis sich der stationäre Zustand im Reaktor eingestellt hat, und damit erhöht sich die Gefahr von Kontaminationen auf Grund der langen Betriebsdauer. Eine weitere Voraussetzung für vergleichbare Experimente ist eine hohe genetische Stabilität des eingesetzten Organismus während der längeren Verfahrenszeit.

### 2.17 Die Aufarbeitung von Biomolekülen

Ziel eines Aufarbeitungsverfahrens von biotechnologisch hergestellten Produkten muss es sein, die gewünschten Stoffe in möglichst wenigen Verfahrensschritten mit einer hohen Ausbeute und in einem kostenoptimierten Prozess zu erhalten. Die Aufarbeitung von Wertstoffen aus einem Fermentationsprozess wird oftmals dann erleichtert, wenn die produzierenden Mikroorganismen die gewünschten Zielmoleküle im Anschluss an deren Synthese in das sie umgebende Medium sekretieren, wie es bei der Nod-Faktorensynthese durch *Sinorhizobium meliloti* geschieht. Ein Aufbrechen der Zellen entfällt, um an die gewünschten Produkte zu gelangen. So enthält bei Auswahl geeigneter Nährlösungen und Fermentationsstrategien die Fermentationsbrühe neben dem Produkt nur wenige verunreinigende Bestandteile, die eine weitere Aufarbeitung erschweren. Nachteil des Ausschleusens aus der Zelle in die Fermentationsbrühe sind aber die große Volumina, in denen die Zielsubstanz (oftmals nur in geringer Konzentration) vorliegt. Um das Aufarbeitungsverfahren für sekretierte Substanzen ökonomisch zu gestalten, sollte deshalb als erster sinnvoller Schritt die Aufkonzentrierung der Zielmoleküle vorgenommen werden.

Für diesen Vorgang der Aufkonzentrierung gibt es in der Biotechnologie verschiedene Verfahren (Chmiel, 1991). Bei einigen dieser Verfahren erfolgt zuvor die Abtrennung der Produktlösung von Biomasse und Zelltrümmern mittels Zentrifugation oder Querstrom-Ultrafiltration (Kohring, 1995b). Bei bekannter Größe der Zielmoleküle können durch Auswahl von Filtermembranen mit entsprechender Ausschlussgröße bei letztgenannter Methode ein Großteil an Verunreinigungen schon zurückgehalten werden. Vorteil dieses Verfahrens ist die hohe Wiederverwendbarkeit von Filtermembranen und eine Reduktion der Verunreinigungen um bis zu 80 % (Kohring, 1995a).

Eine weitere Möglichkeit für die Aufkonzentrierung besteht in der Flüssig/Flüssig-Zweiphasen-Extraktion der Fermentationslösung, z.B. mit geeigneten organischen Lösungsmitteln. Bei diesem Verfahren wird der Effekt ausgenutzt, dass sich das Zielprodukt im dem ausgewählten organischen Lösungsmittel besser löst als in dem wässrigen Milieu der Fermentationsbrühe. Für die Gewinnung der Nod-Faktoren wurde dieses Verfahren angewendet, als Lösungsmittel wurde n-Butanol verwendet (Schultze *et al.*, 1992, Roche, 1991). Mit diesem Verfahren konnte jedoch nur eine Volumenreduktion um den Faktor 3 - 5 erreicht werden, und das Produkt war noch stark verunreinigt.

In der biotechnologischen Verfahrenstechnik zur Aufarbeitung von Fermentationslösungen setzen sich in den letzten Jahren immer häufiger Verfahren durch, bei denen die Wechselwirkungen zwischen einer festen Phase (Adsorbens) und dem in einer Lösung befindlichen Stoff (Adsorptiv) ausgenutzt werden. Die Adsorbens-Phasen können Membranen sein, die aufgrund ihrer speziell strukturierten oder imprägnierten Oberflächen eine hohe Affinität zu den Zielmolekülen aufweisen (Schmidt, L. *et al.*, 1993). Oder es handelt sich um Partikel mit sphärischer oder unregelmäßiger Geometrie, die zu der Lösung gegeben werden, aus der das Adsorptiv dann extrahiert werden soll (Schmidt, V. *et al.*, 1993; Bartels *et al.*, 1958).

Je spezifischer die Affinität zwischen Adsorbens und Zielmolekül ist, desto weniger Verfahrensschritte im weiteren Aufarbeitungsprozess zum Erhalt eines

reinen Produkts sind notwendig. Diese spezifische Affinität kann auch durch eine reversible Modifikation des Adsorptivs erreicht werden. Mit der Ankopplung des histidinreichen Fusionskomplements Hisactophilin aus dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* an das grün fluoreszierende Protein (GFP) konnte eine hohe spezifische Bindung an Metallchelate-Adsorbentien ( $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Sepharose) erreicht werden (Flaschel *et al.*, 1998). Bei der Aufarbeitung von Fermentationsüberständen mit Hisactophilin-GFP konnte so in einem einzigen Aufarbeitungsschritt mit Hilfe von Metallchelate-Affinitätsadsorbentien das Zielprotein in hoher Reinheit erhalten werden (Wittler, 2000).

Beim Einsatz von Fest-Flüssig-Zweiphasensystemen zur Extraktion von Nod-Faktoren aus Kultur- oder Fermentationsüberständen ergibt sich die besondere Herausforderung durch die amphipathische Struktur der Nod-Faktoren mit den hydrophoben ( $\text{C}_{16}$ -Fettsäure) und hydrophilen (Sulfat-, Acetatgruppen) Anteilen im Molekülaufbau. Eine weitere Schwierigkeit liegt in der geringen Konzentration, mit der die Nod-Faktoren von *Sinorhizobium meliloti* produziert und sekretiert werden, die zwischen  $0,03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  -  $0,06 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  für den Produktionsstamm Sm1021pEK327 im 24-h Satzbetrieb liegt (Kohring, 1995a).

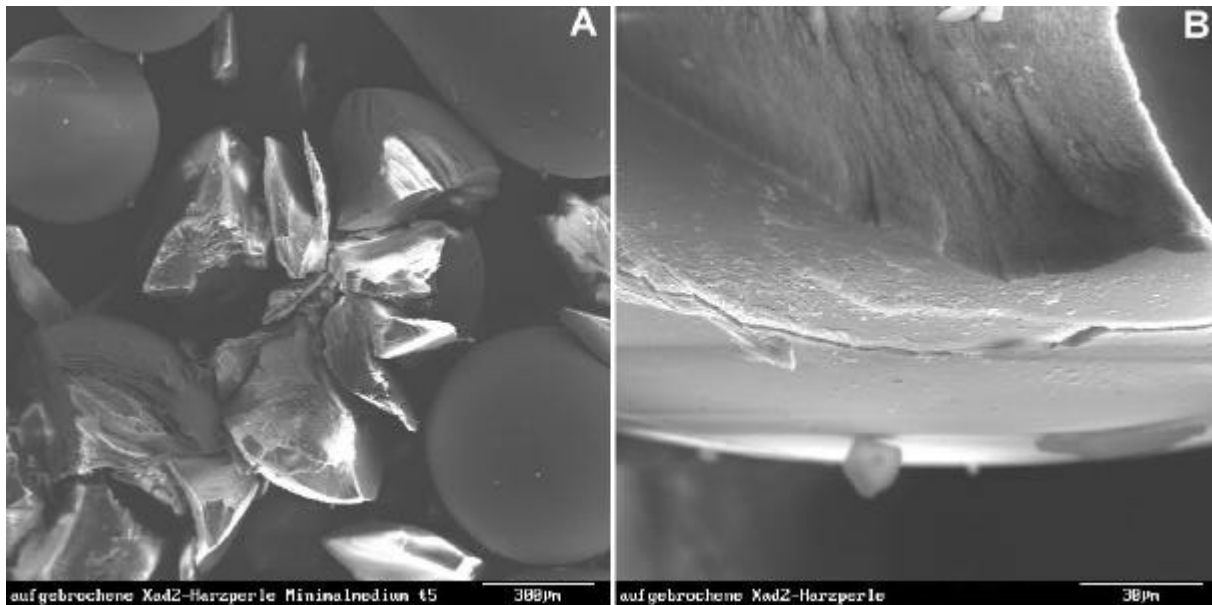
### Sphärische Adsorberharze

Als geeignetes Material zur Adsorption von Nod-Faktoren aus Kulturüberständen haben sich sphärische, lipophile Adsorberharze erwiesen (Ehrhardt *et al.*, 1995). Bei diesen ersten Versuchen zur Aufkonzentrierung von Nod-Faktoren wurden  $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  eines Poly-(Styrol/Divinylbenzol)-Copolymers verwendet (Bio-Beads SM16: spezifische Oberfläche  $300 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ , Porengröße 9 nm, Größenverteilung der Harzkugeln 0,3 - 1,18 mm). Das Material wurde zu einem zentrifugierten Kulturüberstand von *Sinorhizobium meliloti* gegeben und dieser Ansatz für vier Stunden gerührt. Die anschließende Elution der adsorbierten Nod-Faktoren vom Harz erfolgte mit Methanol.

Auch bei den Adsorberharzen der Bezeichnung Amberlite<sup>®</sup> XAD von Rohm & Haas (Philadelphia, USA) handelt es sich um Copolymere aus Poly-Styrol/Divinylbenzol. Die aus Nanopartikeln gepressten, kugelförmigen Harzperlen des Typs XAD-2 pract. (**Abbildung 2.19**) besitzen eine Größenverteilung im Durchmesser von 0,30 mm bis 0,84 mm. Die spezifische Oberfläche von XAD-2 pract. ist  $330 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ . Die durchschnittliche Porengröße liegt bei 9 nm. Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 pract. wird seit Jahrzehnten in verschiedensten Prozessen eingesetzt. Die Anwendungen reichen von der Aufkonzentrierung von Aromastoffen aus Weinen und Gewürzen (Zhou *et al.*, 1996, Menon, 2000), der Extraktion von nutzbaren Verbindungen aus Mikroalgenbiomassen für Pharmazie und Lebensmittelindustrie (Schulze, 2000) über die Extraktion von Edelmetallionen aus wässrigen Lösungen mit Hilfe von imprägniertem Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 pract. (Villaescusa *et al.*, 1997) und der Extraktion von Humus-Substanzen aus Torfmoor- und Seewasser (Hejzlar *et al.*, 1994, Lepane, 1999) bis zu Anwendungen in der Medizin zur Adsorption toxischer Substanzen aus dem Blut (Derzsiova *et al.*, 1999; Mydlik *et al.*, 1997).

Auch bei der Isolierung und Extraktion glykosidischer Verbindungen wurde Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 pract. bereits eingesetzt. So konnten mit dem Adsorberharz glykosidisch gebundene Aromakomponenten aus dem Fruchtmark der Dattelpflaume

extrahiert werden (Morales *et al.*, 2000). Ebenso wurden mit Hilfe von Amberlite® XAD-2 pract. glykosidische Vorstufen von Aromaverbindungen aus Ingwer isoliert, die in den Pflanzenwurzeln synthetisiert werden (Sekiwa *et al.*, 1999).



**Abbildung 2.19**

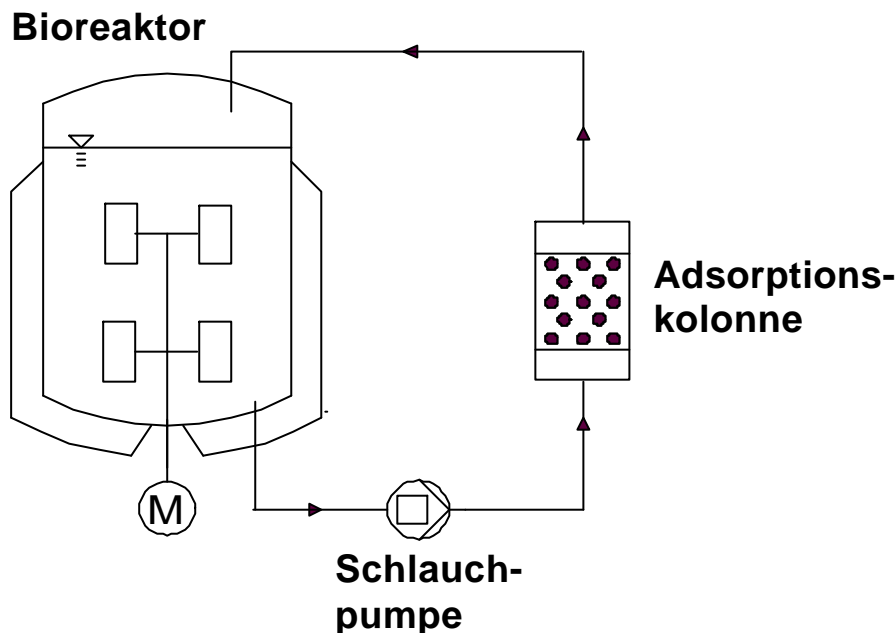
Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Amberlite® XAD-2 pract. Harzperlen. A) In der Mitte des Bildes ist eine aufgebrochene Harzkugel zu sehen. Der weiße Balken am rechten unteren Bildrand entspricht einer Länge von 300 µm. B) Innere Struktur einer Amberlite® XAD-2 pract. Harzkugel (Länge weißer Balken = 30 µm)

### **Die Wirbelschicht-Adsorptionskolonne**

Eine Möglichkeit, die Prozesszeit eines Aufarbeitungsverfahrens zu verkürzen, ist die Integration des Aufkonzentrierungsschritts des Zielproduktes in die Kultivierungsphase eines Fermentationsprozesses (Born *et al.*, 1996). Die einfachste Möglichkeit besteht dabei in der Zugabe des Adsorbens zur Fermentationslösung. Um aber die im Anschluss an die Fermentation anstehende Trennung von Harz, Kulturüberstand und Bakterienzellen für die weitere Aufarbeitung zu erleichtern, ist eine räumliche Trennung zwischen Harzperlen und Rührkesselreaktor aus prozesstechnischen Überlegungen vorteilhaft (Breccia *et al.*, 1999). Bei einer hohen Fragilität von sphärischen Harzperlen, wie bei Amberlite® XAD-2 pract. in **Abbildung. 2.19, A** zu sehen, ist eine räumliche Trennung von Adsorbens und Reaktor außerdem deshalb sinnvoll, weil damit das Harz vor den mechanischen Kräften des Rührorgans im Bioreaktor geschützt und so ein Auseinanderbrechen der Partikel verhindert wird. Technisch umgesetzt werden kann dies durch die Ankopplung einer separaten Adsorptionskolonne an den Fermenter, in die das Adsorberharz gefüllt wird. Eine solche Anordnung ist in **Abbildung 2.20** dargestellt. Die Fermentationsflüssigkeit wird z. B. mit Hilfe einer, die Bakterienzellen schonenden, Schlauchpumpe durch die Extraktionskolonne gefördert. Nach Ende des Fermentationsprozesses kann die Reinigung der Harzperlen von Resten der Fermentationsbrühe und die Elution der Zielprodukte direkt in der Säule erfolgen.



Bei der Adsorptionskolonne muss je nach technischer Auslegung der Apparatur zwischen verschiedenen Betriebsarten unterschieden werden. Eine Säule, deren Innenvolumen aus einem dicht gepackten Bett verschieden großer Partikel besteht und die von unten nach oben mit einem Fluid mit der Volumenstromdichte  $v$  angeströmt wird, wobei die Lage der Harzkugeln sich nicht verändern kann, wird als polydisperse Schüttung oder Festbett (engl.= *fixed bed*) bezeichnet. Beim Durchströmen einer Adsorptionskolonne im Festbettbetrieb mit einer Fermentationslösung muss berücksichtigt werden, dass es in den vorhandenen Toträumen der Schüttung Ablagerungen von Mikroorganismen und / oder Zellfragmenten in der Kolonne kommen kann. Dies führt zur Abreicherung der Bakterien in der Fermentationslösung und ruft letztendlich eine Verstopfung der Säule hervor (Wittler, 2000). Aus diesem Grund sind für die Extraktion von Stoffen aus Lösungen mit Mikroorganismen oder Zellen Verfahren geeigneter, in denen eine Schüttung expandieren kann (Thömmes *et al.*, 1995; Callewaert *et al.*, 1999 und Hu, *et al.*, 2000).



**Abbildung 2.20** Schematische Darstellung eines Versuchsaufbaus zur Fermentation mit paralleler Extraktion (Bypass) von Stoffen aus einer Fermentationslösung

Ist die Volumenstromdichte der mobilen Phase  $v$  bei der Durchströmung der Säule von unten nach oben größer als die Lockerungsgeschwindigkeit  $u_L$ , und besitzt die Säule über der Schüttung ein Freivolumen, dann fluidisiert die zuvor fest gepackte Schüttung und die Partikel verteilen sich in einem größeren Volumen in der Säule. Diese Betriebsweise der Adsorptionskolonne wird expandiertes Bett, Fließbett (engl.= *fluidized bed*) oder auch Wirbelschicht genannt. Die Expansion der Wirbelschicht  $f$  wird durch das beobachtbare Verhältnis der Festbetthöhe ( $h_0$ ) zur Höhe der Wirbelschicht in der Säule ( $h$ ) wiedergegeben:

$$f = \frac{h}{h_0} \quad \text{(Gleichung 2.26)}$$

Der Lückengrad  $e$  der Wirbelschicht ergibt sich aus der Bilanz des Adsorbens:

$$h_0(1 - e_0) = h(1 - e) \quad \text{bzw.} \quad f = \frac{1 - e_0}{1 - e} \quad \text{(Gleichungen 2.27 a + b)}$$

Mit  $e_0$  = Lückengrad des Festbetts

Umgeformt wird daraus erhalten:

$$e = 1 - \frac{1 - e_0}{f} \quad \text{oder} \quad e = 1 - \frac{h_0(h - h_0)}{h} \quad \text{(Gleichung 2.28, a + b)}$$

Je nach Volumenstromdichte  $v$  ergibt sich in der Wirbelschicht ein relativer Lückengrad  $e$  zwischen den Partikeln von  $e_0 \approx 0,4$  (Wert für eine regellose Kugelschüttung) und  $e < 1$  (Mersmann, 1986). Erreicht die Volumenstromdichte  $v$  des verwendeten Fluids die sog. Austragsgeschwindigkeit  $u_\infty$  und nimmt damit der Lückengrad  $e$  nach den **Gleichungen 2.29 a + b** den Wert 1 an:

$$v = u_\infty \quad \Rightarrow \quad e = 1 \quad \text{(Gleichungen 2.29 a + b)}$$

so werden die Partikel aus der Säule ausgeschwemmt, wenn der Austritt der Partikel am Säulenausgang nicht durch geeignete Materialien wie Kunststoffgaze oder feinmaschige Edelstahl Drahtgewebe verhindert wird. Faktoren, die die Expansion einer Schüttung beeinflussen können, sind zum einen die Stoffeigenschaften des Adsorbens wie die Dichte und der Partikeldurchmesser (Wright *et al.*, 1999), die die Fallgeschwindigkeit ( $u_T$ ) der Adsorbenskörner in der Säule bestimmen. Andererseits wird die Expansion der Wirbelschicht auch durch die Leerrohrgeschwindigkeit ( $u$ ) und die Viskosität des Fluids ( $h$ ) (Nesbitt *et al.*, 1998) bestimmt. Den Zusammenhang dieser Größen stellt die Beziehung von Richardson und Zaki (Richardson *et al.*, 1954) in **Gleichung 2.30** dar:

$$e^n = \frac{u}{u_T} \quad \text{(Gleichung 2.30)}$$

Mit  $n$  = Richardson-Zaki-Koeffizient. Der Koeffizient ist von den hydrodynamischen Bedingungen abhängig. Richardson und Zaki erhielten für Partikel mit einem Durchmesser  $d_P > 100 \mu\text{m}$  bei verschiedenen Viskositäten des Mediums folgende Beziehung (**Gleichung 2.31**):

$$n = 4,65 + 19,5 \cdot \frac{d_P}{D_S} \rightarrow (Re < 0,2) \quad \text{(Gleichung 2.31)}$$

Die Fallgeschwindigkeit  $u_R$  kann aus der Stokes Gleichung (**Gleichung 2.32**; Karau *et al.* 1997) ermittelt werden:

$$u_T = \frac{d_P^2 (\mathbf{r}_F - \mathbf{r}_P) \cdot \mathbf{g}}{18 \cdot h} \quad \text{(Gleichung 2.32)}$$

**2.18 Die Adsorption**

**Die Grundlagen der Adsorption**

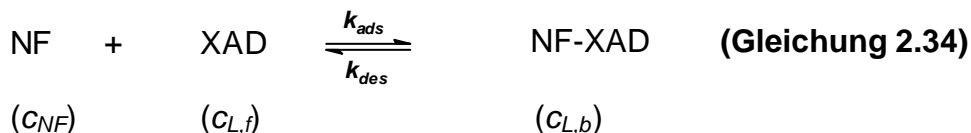
Da die Adsorption ein freiwillig ablaufender Vorgang ist, erfordert sie nach der Gibbs-Helmholtz-Gleichung (**Gleichung 2.28**) (Becker *et al.*, 1990) ein negatives Vorzeichen der freien Reaktionsenthalpien:

$$\Delta G_{ads} = \Delta H_{ads} - T \cdot \Delta S_{ads} < 0 \quad \text{(Gleichung 2.33)}$$

Wenn Adsorptivmoleküle bei der Adsorption in einem relativ geordneten Zustand an der Adsorbensoberfläche fixiert werden, entspricht dies im Allgemeinen einem negativen Wert bei der Adsorptionsentropie ( $\Delta S_{ads} < 0$ ). Damit folgt aus **Gleichung 2.28**, dass Adsorptionsprozesse fast stets exotherm verlaufen ( $\Delta H_{ads} < 0$ ) (Kümmel *et al.*, 1990). Adsorptionsvorgänge, die wie bei der Adsorption der Nod-Faktoren an Amberlite® XAD-2 pract. auf van-der-Waals'schen Wechselwirkungen (Dipolkräfte, Dispersionskräfte, Induktionskräften) beruhen, bezeichnet man dabei als Physisorption oder physikalischer Adsorption. Die Wechselwirkungsenergien erreichen bei der Physisorption nur selten Energiebeträge von  $> 50 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Da, wie oben beschrieben, die Adsorptionsvorgänge in der Regel exotherm verlaufen, nimmt die adsorbierte Stoffmenge entsprechend dem Le Chatelier'schen Prinzip in diesen Prozessen mit steigender Temperatur ab. So konnte Grzegorzcyk (Grzegorzcyk *et al.*, 1996) zeigen, dass bei der Adsorption von Phenylalanin an Amberlite® XAD-4, einem chemisch identisch aufgebauten Adsorberharz zu Amberlite® XAD-2 pract. mit einer größeren spezifischen Oberfläche ( $750 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ ), die Beladung um nahezu 50 % reduzierte wurde, wenn in den Versuchen die Temperatur von  $+4^\circ\text{C}$  auf  $+50^\circ\text{C}$  erhöht wurde.

**Das Adsorptionsgleichgewicht**

Um Adsorptionsvorgänge in einer Wirbelschicht zu beurteilen, sind die Betrachtung des Adsorptionsgleichgewichtes, einer Anwendung der klassischen Thermodynamik auf die Adsorption und der Adsorptionskinetik, die den zeitlichen Verlauf der Bindung des Adsorptivs an das Adsorbens beschreibt, von entscheidender Bedeutung. Für Systeme, bei denen eine Komponente (Nod-Faktoren) an ein Adsorbens (Amberlite® XAD-2 pract.) bindet, kann der Vorgang der Adsorption als Gleichgewichtsreaktion dargestellt werden:



mit  $k_{ads}$  = Geschwindigkeitskonstante der Adsorption,  $k_{des}$  = Geschwindigkeitskonstante der Desorption,  $c_{NF}$  = Konzentration der Nod-Faktoren in der Lösung,  $c_{L,f}$  = Konzentration freier Liganden beim Harz,  $c_{L,b}$  = Konzentration der Liganden, die Nod-Faktor-Moleküle gebunden haben. Der Gleichgewichtszustand ist erreicht, wenn gilt:

$$\frac{dc_{L,b}}{dt} = k_{ads} \cdot c_{NF} \cdot c_{L,f} - k_{des} \cdot c_{L,b} = 0 \quad \text{(Gleichung 2.35)}$$

Bezogen auf die Beladung bedeutet dies:

$$\frac{dc_{L,b}}{dt} = k_{ads} \cdot c_{NF} \cdot \left[ \frac{V_S}{V_P} \cdot (q_m - q_b) \right] - k_{des} \left( \frac{V_S}{V_P} \cdot q_b \right) = 0 \quad \text{(Gleichung 2.36)}$$

mit  $q_m$  = Beladungskapazität des Harzes,  $q_b$  = Konzentration belegter Plätze,  $V_S$  = Gesamtvolumen des Adsorbens (inklusive Poren),  $V_P$ : Gesamtporenvolumen des Adsorbens

Die Konstante für das Adsorptionsgleichgewicht  $K$  ergibt sich mit der Restkonzentration an Nod-Faktoren in der Lösung im Gleichgewicht ( $c_{NF,eq}$ ) und der Beladung des Harzes im Gleichgewicht ( $q_{b,eq}$ ) zu:

$$K = \frac{k_{ads}}{k_{des}} = \frac{q_{b,eq}}{(q_m - q_{b,eq}) \cdot c_{NF,eq}} \quad \text{(Gleichung 2.37)}$$

Das Beladungsverhältnis im Gleichgewicht ( $f_{eq}$ ) lässt sich beschreiben durch:

$$f_{eq} = \frac{q_{b,eq}}{q_m} = \frac{c_{NF,eq}}{\frac{1}{K} + c_{NF,eq}} = \frac{K \cdot c_{NF,eq}}{1 + K \cdot c_{NF,eq}} \quad \text{(Gleichung 2.38)}$$

Die **Gleichung 2.38** beschreibt eine Sättigungsfunktion, die als Langmuir-Isotherme (s. **Abbildung 2.20**) bezeichnet wird und deren Funktion analog zur Gleichung von Michaelis-Menten, bzw. zu der von Monod ist (s. dazu auch **Gleichung 2.3**). Der Kehrwert der Gleichgewichtsadsorptionskonstanten ( $1/K$ ) ergibt sich aus dem zugehörigen Wert der Gleichgewichtskonzentration an Nod-Faktoren ( $c_{NF,eq}$ ) bei halbmaximaler Sättigung der Liganden des Harzes ( $q_{b,eq} / 2$ ).

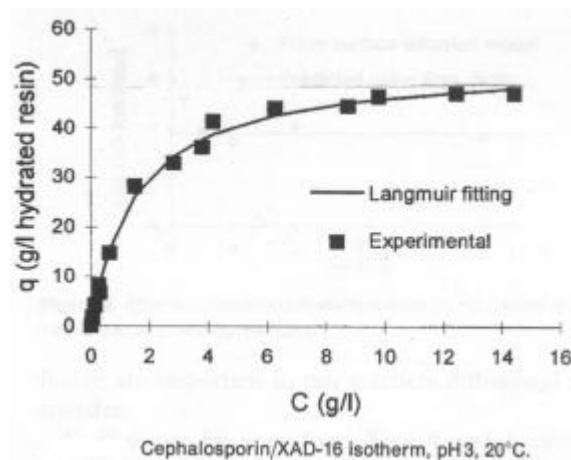


Abbildung 2.20

Adsorptionsisotherme von Cephalosporin an Amberlite® XAD-16 ( aus Yang et al., 1999)

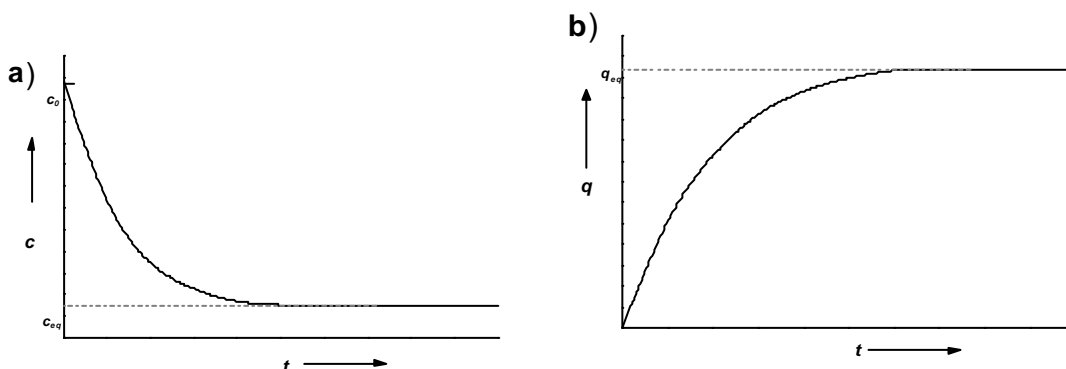
Als besonders geeignet für die technische Anwendung erweisen sich nach den oben dargestellten Gleichungen somit Systeme von Adsorbens und Adsorptiv, deren Isothermen eine starke positive Anfangssteigung aufweisen ( $\rightarrow K = \text{hohe Werte}$ ), wie es z. B. bei der von Ma (Ma *et al.*, 1996) beschriebenen Adsorption von Dichlorphenol und Dimethylphenol an Aktivkohle der Fall ist.

### Die Kinetik der Adsorption

Um die Kinetik der Adsorption von Nod-Faktoren an eine adsorptive Matrix wie Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 pract. zu beurteilen, wurden in dieser Arbeit Experimente basierend auf dem Modell eines Differenzialkreislaufadsorbers, wie er von Kümmel (Kümmel *et al.*, 1990) beschrieben wird, durchgeführt. Dabei wird das Lösungsvolumen ( $V$ ), in dem das Adsorptiv enthalten ist, kontinuierlich durch eine separat angeordnete Adsorptionskolonne mit der Adsorbensmasse ( $m_A$ ) gepumpt. Die Lösung, die am Ausgang der Säule austritt, wird in das Reservoir zurückgeführt. Zu definierten Zeitpunkten wurden dem Lösungsreservoir des Versuchsaufbaus Proben entnommen, und die Konzentration der darin enthaltenen LCOS zum Zeitpunkt  $t$  ( $c_t$ ) bestimmt. Die Differenz dieses Werte zu der Ausgangskonzentrationen an Nod-Faktoren bei Start des Experiments ( $c_0$ ), multipliziert mit dem Quotienten aus  $V/m_A$  ergibt dann die Beladung der lipophilen Harzkugeln mit Nod-Faktoren zum Zeitpunkt  $t$  ( $q_t$ ), wie in **Gleichung 2.39** dargestellt. Dies gilt unter der Voraussetzung, dass die im Reservoir nicht mehr nachweisbaren Nod-Faktoren vollständig an das Adsorberharz gebunden haben.

$$q_t = \frac{V}{m_A}(c_0 - c_t) \quad \text{(Gleichung 2.39)}$$

Die Darstellung der Adsorptionskinetik kann in Form zweier Grafiken erfolgen, bei der entweder die Konzentration des noch in der Reservoirlösung befindlichen Adsorptivs ( $c$ ) oder die Beladung ( $q$ ) als Funktion der Zeit ( $f(t)$ ) aufgetragen wird, wie in **Abbildung 2.21 ,a +b** gezeigt:

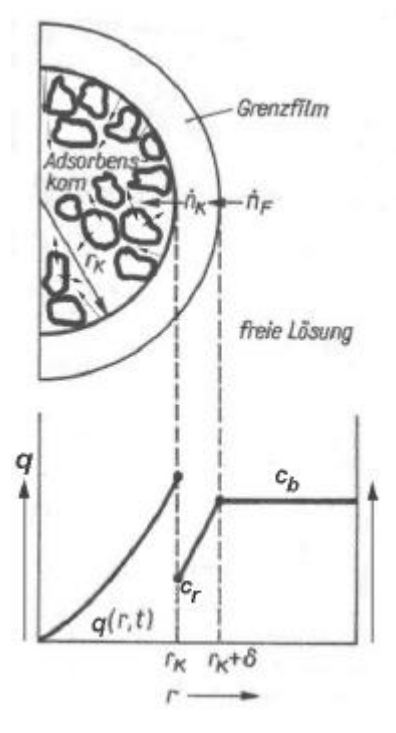


**Abbildung 2.21** Kinetische Kurven eines Adsorptionsprozesses mit der Wiedergabe eines Konzentrations-Zeit-Verlaufs (a) und einem Beladungszeit-Verlauf (b)

### Modelle zur Beschreibung der Adsorption

Der zeitliche Ablauf eines Adsorptionsprozesses von einem Substanz (Nod-Faktor) aus einer als ideal durchmischte geltenden Lösung (wässrige Lösung) an einen Feststoff (poröses, sphärisches Harz) kann nach dem in **Abbildung 2.22** dargestellten Modell grundsätzlich in drei Schritte gegliedert werden:

- 1) Der erste Schritt ist die Diffusion des Adsorptivs vom äußeren Bereich des Grenzfilms, der sich um die Adsorbenspartikel bildet, an den Rand des Adsorbenskorns (äußerer Stofftransport, Filmdiffusion)
- 2) Der zweite Schritt umfasst die Vorgänge, die den Transport des Adsorptivs ins Innere des porösen Adsorbenskorns (Korndiffusion) durch die Diffusion in der Porenflüssigkeit (Porendiffusion) und / oder durch die Diffusion im adsorbierten Zustand entlang der inneren Oberfläche (Oberflächendiffusion) beschreiben (innerer Stofftransport)
- 3) Der eigentliche Vorgang der Adsorption / Desorption ist durch die energetischen Wechselwirkungen der Adsorptivteilchen mit den aktiven Zentren der Adsorbensoberfläche gekennzeichnet (Komplexbildung)



**Abbildung 2.22**

Modell für die Adsorption eines Stoffes an ein poröses Adsorbekorn.  $c_b$ : Konzentration des Adsorptivs in der freien Lösung,  $c_r$ : Konzentration des Adsorptivs am Kornrand,  $r$ : Radius;  $r_K$ : Radius des Adsorbens-Korns,  $\delta$  Grenzfilmdicke;  $q$ : Beladung  $n_F$ : molare Stoffstromdichte in der Flüssigkeit;  $n_K$ : molare Stoffstromdichte im Korn,  $t$ : Zeit

Bei der Betrachtung von Adsorptionsvorgängen werden in der Regel als geschwindigkeitsbestimmende Schritte der Adsorption nur die Punkte 1 und 2 angesehen.

hen, da der dritte Teilschritt im Vergleich zu 1 und 2 bei vielen Adsorptionsvorgängen gewöhnlich sehr schnell abläuft.

Während die Filmdiffusion durch die hydrodynamischen Verhältnisse, die im Reaktor vorliegen, beeinflusst werden kann (Thömmes *et al.*, 1995), ist der Stofftransport im Adsorbenskorn unabhängig von diesen hydrodynamischen Verhältnissen. Einen Einfluss sowohl auf die Filmdiffusion als auch auf die Porendiffusion besitzt allerdings der Kornradius, da er über die Veränderung der Stoffaustauschfläche und den Diffusionsweg auf die Transportvorgänge einwirkt (Karau *et al.*, 1997).

Der Transport eines Stoffs im Adsorbenskorn (innerer Stofftransport) wird in der Regel parallel sowohl durch die Porendiffusion als auch durch die Oberflächendiffusion bestimmt (Yoshida *et al.*, 1994; Ma *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1999), die jeweiligen Anteile dieser Phänomene lassen sich nur schwer voneinander trennen. Zur Vereinfachung wird für die Erstellung eines kinetischen Modells des Stofftransports einer der beiden Mechanismen als dominant angenommen.

### Die Filmdiffusion

Wie in **Abbildung 2.22** zu sehen, wird für das Modell der Filmdiffusion angenommen, dass die Konzentration des Adsorptivs in unmittelbarer Nähe der äußeren Oberfläche des Adsorbenskorns niedriger ist als in der freien Lösung. Dies gilt aber nur, so lange sich ein Gleichgewichtszustand noch nicht eingestellt hat. Für den Stofftransport wird ein linearer Konzentrationsgradient angenommen, der sich über die Grenzschicht der Dicke  $d$  ausbildet und als treibende Kraft des Stofftransports wirkt. Für die molare Stoffstromdichte ( $n_F$ , Stoffstrom pro Einheit der äußeren Partikeloberfläche) gilt nach dem 1. Fickschen Gesetz:

$$n_F = \frac{1}{A_s} \cdot \frac{dn}{dt} = -D_L \cdot \frac{dc}{dd} \quad \text{(Gleichung 2.40)}$$

mit  $D_L$  Diffusionskoeffizient des Sorptivs in der wässrigen Phase

Der Gradient lässt sich unter den angenommenen Bedingungen durch **Gleichung 2.41** beschreiben:

$$\frac{dc}{dz} = \frac{c_b - c_r}{d} \quad \text{(Gleichung 2.41)}$$

Damit lässt sich die Bilanz des äußeren Stofftransports nach den **Gleichungen 2.40 + 2.41** auch ausdrücken als:

$$\frac{dn}{dt} = \frac{D_L}{d} \cdot A_s \cdot (c_b - c_r) \quad \text{(Gleichung 2.42)}$$

Unter der vereinfachenden Abnahme, das das existierende Porenvolumen in der Bilanz vernachlässigt werden kann, ergibt sich mit dem Stoffübergangskoeffizienten  $k_F$ :

$$k_F = \frac{D_L}{d} \quad \text{(Gleichung 2.43)}$$

die folgende Gleichung:

$$\mathbf{e} \cdot V_R \cdot \frac{dc}{dt} = k_F \cdot A_S \cdot (c_b - c_r) \quad \text{bzw.} \quad \mathbf{e} \cdot \frac{dc}{dt} = k_F \cdot a_V \cdot (c_b - c_r) \quad \text{(Gleichung 2.44, a + b)}$$

wobei für die für die volumenbezogene Oberfläche  $a_V$  gilt:

$$a_V = \frac{A_S}{V_R} = \frac{3m_A}{r_K \cdot r_K \cdot V_R} = \frac{3V_A}{r_K \cdot V_R} \quad \text{(Gleichung 2.45)}$$

mit  $V_R$  = Leervolumen der Adsorptionskolonne

Bezogen auf das relative Lückenvolumen ( $\mathbf{e}$ ) nach **Gleichung 2.46**:

$$\mathbf{e} = \frac{V_e}{V_R} = \frac{V_R - V_A}{V_R} = 1 - \frac{V_A}{V_R} \quad \text{(Gleichung 2.46)}$$

ergibt sich somit folgender Zusammenhang für  $a_V$ :

$$a_V = \frac{6}{d_K} \cdot (1 - \mathbf{e}) \quad \text{(Gleichung 2.47)}$$

### Die Porendiffusion

Für ein sphärisches Adsorbens Korn, wie es in **Abbildung 2.22** skizziert ist, und für das eine homogene Verteilung der Adsorptionsplätze (Liganden) angenommen wird, setzt sich im stationären Zustand die Bilanz im Porenraum des Adsorbenspartikels aus der Bilanz des diffundierenden Adsorptivs und der Bilanz der Wechselwirkungen zwischen den Liganden des Kornes und den Adsorptivmolekülen zusammen. Unter der Betrachtung einer differentiellen Schale des Adsorbenskorns bedeutet dies nach dem 1. Fickschen Gesetz:

$$\left( -D_{eff} \cdot \frac{dc}{dr} \cdot 4\mathbf{p} \cdot r \right)_r - \left( -D_{eff} \cdot \frac{dc}{dr} \cdot 4\mathbf{p} \cdot r^2 \right)_{r+dr} = r_{V,ads}^r \cdot 4\mathbf{p} \cdot r^2 \cdot dr \quad \text{(Gleichung 2.48)}$$

oder anders geschrieben:

$$\frac{D_{eff} \left[ r^2 \cdot \frac{dc}{dt} \Big|_{r+dr} - r^2 \cdot \frac{dc}{dt} \Big|_r \right]}{dr} = r^2 \cdot r_{V,ads}^r \quad \text{(Gleichung 4.49)}$$

mit  $D_{eff}$  = Effektiver Diffusionskoeffizient des Adsorptivs im Adsorbenspartikel und  $c$  = Konzentration des Adsorptivs an der radialen Position des Kornes  $r$ . Die Reaktionsgeschwindigkeit der Adsorption / Desorption  $r_{V,ads}^r$  lässt sich analog zu **Gleichung 2.30** durch folgenden Ausdruck wiedergeben:



$$r_{V,ads}^r = -\frac{dc}{dt} = k_{ads} \cdot c_{NF} \cdot c_{L,f} - k_{des} \cdot c_{L,b} = k_{ads} \left[ c_{NF} \cdot c_{L,f} \cdot \frac{c_{L,b}}{K} \right] \quad \text{(Gleichung 4.50)}$$

Dabei ist aber zu beachten, dass die hier verwendeten Konzentrationen sich auf die jeweilige radiale Position im Adsorbenspartikel beziehen.

### **Betrachtung eines diskontinuierlichen Adsorptionsprozesses (Adsorptionsreaktion geschwindigkeitsbestimmend)**

Dargestellt werden soll der Fall, dass der eigentliche Adsorptionsvorgang geschwindigkeitsbestimmend ist. Für diesen Fall wird die Annahme getroffen, dass sich eine Menge  $n_0$  mol an Nod-Faktoren zu Beginn des Adsorptionsprozesses in einer Lösung befindet. Die Nod-Faktoren sind bei dieser Betrachtung gleichmäßig im gesamten verfügbaren Flüssigkeitsvolumen  $V_L$  verteilt. Das lipophile Adsorbentharz Amberlite® XAD-2 pract. besitzt eine Beladungskapazität  $q_m$ . Für die Anfangskonzentration an Nod-Faktoren gilt dann:

$$c_0 = \frac{n_0}{V_l} \quad \text{(Gleichung 2.51)}$$

Die Adsorptionskinetik wird durch folgende Formel beschrieben:

$$-\frac{dc}{dt} = k_{ads} \cdot c_{NF} \cdot \left[ \frac{V_s}{V_p} \cdot (q_m - q_b) \right] - k_{des} \cdot \frac{V_s}{V_p} \cdot q_b \quad \text{(Gleichung 2.52)}$$

wobei  $c_{NF}$  die Konzentration der Nod-Faktoren und  $q_b$  die Konzentration der belegten Plätze im lipophilen Harz wiedergibt. Die allgemeine Bilanz:

$$V_l \cdot \frac{dc}{dt} = V_s \frac{dq}{dt} \quad \text{(Gleichung 2.53)}$$

ergibt für die Kalkulation der Beladung:

$$\frac{dq}{dt} = \frac{V_s}{V_p} \cdot \frac{dc}{dt} \quad \text{(Gleichung 2.54)}$$

Mit den Anfangsbedingungen  $c_{NF} = c_0$  und  $q_b = 0$  bei  $t = 0$  lässt sich diese Bilanz numerisch integrieren. Ansonsten wird aus der allgemeinen Bilanz erhalten:

$$V_l \cdot (c_0 - c) = V_s \cdot q \quad \text{oder} \quad c = c_0 - \frac{V_s}{V_l} \cdot q \quad \text{(Gleichungen 2.55, a + b)}$$

Damit lässt sich letztendlich die Beladungsgeschwindigkeit  $r_{ads}$  wie folgt ermitteln:

$$r_{ads} = \frac{dq}{dt} = \frac{V_s}{V_p} \cdot k_{ads} \cdot \left\{ \frac{V_l}{V_s} \left( c_0 - \frac{V_s}{V_l} \cdot q \right) \cdot (q_m - q) - \frac{V_l}{V_s} \cdot \frac{q}{K} \right\} \quad \text{(Gleichung 2.56)}$$

### 3 **Material und Methoden**

Die Mehrzahl der in dieser Arbeit vorgestellten Experimente wurden am Lehrstuhl für Fermentationstechnik der Technischen Fakultät, Universität Bielefeld durchgeführt. Die kontinuierlichen Kultivierungen von Bodenbakterien in Minimalmedium bei variierenden pH-Werten und ein Teil der Experimente zur Kultivierung von säuretoleranten Sinorhizobien in Melassemedien erfolgten im Rahmen des von der EU geförderten Forschungsprojektes „Improvement of Symbiosis Between *Rhizobium meliloti* and Alfalfa in Acid Soils of Argentina and Uruguay“ an den Fakultäten für Biochemie und Molekularbiologie für Fermentationstechnik der Universidad Nacional de La Plata, Republica Argentina.

Bei allen Experimenten, in deren Rezeptur Wasser angegeben ist, wurde entweder Reinstwasser aus einer Seralpur-Anlage Pro 90 CN (Bielefeld, Deutschland) oder zweifach destilliertes Wasser (La Plata, Argentina) verwendet. Nur für Fermentationen im 30 L Maßstab wurde desionisiertes Wasser aus einer Umkehrosioseanlage der Hausversorgung entnommen.

Die Listen mit den in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräten und Programmen sind im Anhang aufgeführt.

#### 3.1 **Verwendete Bakterienstämme und Plasmide**

##### **Bakterienstämme**

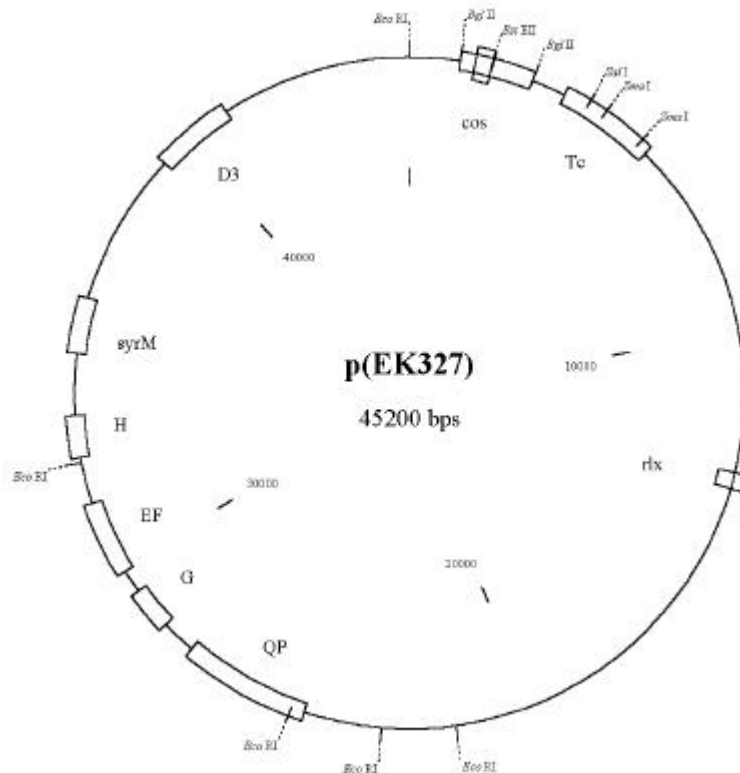
In dieser Arbeit wurden vier verschiedene Bodenbakterienstämme der Art *Sinorhizobium meliloti* verwendet. Ihre wichtigsten Eigenschaften sind in der **Tabelle 3.1** zusammengefasst.

**Tabelle 3.1** Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und ihre wichtigsten Eigenschaften

<b>Stammbezeichnung</b>	<b>Eigenschaften</b>	<b>Herkunft und Referenz</b>
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
<i>S. meliloti</i> 2011	Derivat des Wildtyps <i>S. meliloti</i> SU47, Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup> on <i>Medicago sativa</i> , Sm <sup>+</sup> , geringere Schleimbildung, Melanin <sup>-</sup>	Australien, (Meade <i>et al.</i> 1979)
<i>S. meliloti</i> CE 15	Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup> on <i>Medicago sativa</i> , Sm <sup>+</sup> , Melanin <sup>-</sup>	Uruguay, (Del Papa <i>et al.</i> , 1999)
<i>S. meliloti</i> LPU 63	Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup> on <i>Medicago sativa</i> , Sm <sup>+</sup> , Melanin <sup>+</sup>	Argentinien, (Del Papa <i>et al.</i> , 1999)
<i>S. meliloti</i> 1021 pEK327	Sm <sup>+</sup> , geringere Schleimbildung, Derivat des Wildtyps SU47; Melanin <sup>-</sup> , enthält Cosmid-Vektoren mit <i>nod</i> -Genen zur Überproduktion von Nod-Faktoren	Frankreich, (Schultze <i>et al.</i> , 1992)

**Das Plasmid pEK327**

Um eine starke Überexpression der Nodulationsgene in *Sinorhizobium meliloti* zu erreichen, wurde eine genomische Bibliothek des Stamms *S. meliloti* AK631 (Banfalvi *et al.*, 1989) mit dem Cosmid-Vektor pLAFRI (Friedman *et al.*, 1982) angelegt. Die Cosmide wurden in den Stamm JM57 eingeführt, ein Derivat des Stamms JM57, dem der *nod*-Repressor fehlt und der eine *nodC-lacZ* Fusion auf dem Megaplasmid pSym-a trägt (Kondorosi, E. *et al.*, 1989). Die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität aller Transkonjuganten wurde bestimmt. Der Stamm mit dem Plasmid pEK327 aus **Abbildung 3.1** wies bei den Tests die höchste Aktivität auf. Dieses Cosmid wurde dann wiederum in den Stamm *S. meliloti* 1021 (Meade *et al.*, 1982) eingebracht. Schon mit 1.000-fach niedriger dosierten, sterilen Kulturüberständen vom Stamm *S. meliloti* 1021pEK327 konnten beim Wurzelhaarverformungstest (Root Hair Deformation Assay = *rhd*) im Gegensatz zu dem Cosmid freien Sm1021 Reaktionen an den Wurzelhaaren beobachtet werden. Dies lässt auf eine um den Faktor 1.000 höhere Produktion an Nod-Faktoren schließen. Das Plasmid ist abgeleitet vom Klonierungsvektor pRK290 (23,1 kb groß; Ditta *et al.*, 1980), in den ein 1,6 kb großes *Bgl II*-Fragment mit einer  $\lambda$ -cos site (Gen-Kassette für das Verpacken des Plasmids in  $\lambda$ -Phagenköpfe) integriert wurde.



**Abbildung 3.1** Genetische Organisation des Cosmid-Vektors pEK327. *bps*: Basenpaare; *rlx* relaxation complex site (Gen für konjugative Mobilisierung; Startpunkt des Plasmid-Transfers); *Tc*: Tetrazyklinresistenz-Genkassette; *cos*:  $\lambda$ -cos site; *D3*, *syrM*, *H*, *E*, *F*, *G*, *QP*: regulatorische und Wirtsspezifität vermittelnde Nodulationsgene von *S. meliloti* (s. **Abbildung 2.8**); *BglII*, *BstEII*, *EcoRI*, *Sall*, *SmaI*: Schnittstellen für die gleichnamigen Restriktionsendonukleasen

**3.2 Verwendete Nährstofflösungen**

**Melassen**

Für die Experimente mit Melassemedien wurden fünf eingestellte Handelsmelassen ( $\cong$  75 % Trockenmasse; Begriff Handelsmelassen s. Thier, 1996) aus vier Ländern verwendet, die in **Tabelle 3.2** aufgeführt sind. Die Zuckerrohrmelasse aus Brasilien wurde für diese Arbeit freundlicherweise vom Institut für Zuckertechnologie in Braunschweig zur Verfügung gestellt, alle anderen Melassen wurden als Proben direkt von den Herstellern geliefert. Die Zusammensetzungen von Zucker- und Nichtzuckerstoffen in Rohr- und Rübenmelassen ergeben sich aus den **Tabellen 2.2 und 2.3** im theoretischen Teil. Quantitative Abweichungen einzelner Melasse-Inhaltsstoffe in den jeweiligen Chargen der in dieser Arbeit verwendeten Handelsmelassen von den in den Tabellen angegebenen Durchschnittswerten liegen nach Analysen des Instituts für Zuckertechnologie in Braunschweig zwischen 1 % und 2 % (Dr. Thielicke, Institut für Zuckertechnologie, Braunschweig, pers. Mitteilung). Die in dieser Arbeit verwendeten Melassen wurden bei +4 °C gelagert.

**Tabelle 3.2** Produktionsort, Herstellungsjahr, verwendeter Pflanzenrohstoff, Farbe, pH-Werte und Osmolalitäten der in dieser Arbeit verwendeten Melassen. Grau unterlegt ist die Zeile, in der die Zuckerrübenmelasse aus Lage aufgeführt ist, mit welcher der überwiegende Teil der Kultivierungsexperimente und alle Fermentationen durchgeführt wurden (bei Verwendung anderer Melassen ist dies in der Beschreibung der Versuche vermerkt).

Land	Herstell./ Region	Produktions- jahr	Pflanze	Farbe einer 20 g·L <sup>-1</sup> - Lösung	pH-Wert einer 20 g·L <sup>-1</sup> - Lösung	Osmolalität einer 20 g·L <sup>-1</sup> - Lösung in osmol/kg
Argentinien	PROIMI / Tucuman	1996	Zucker- rohr	Dunkel- braun	6,03	0.069
Brasilien	- / Pernam- buco	1986	Zucker- rohr	Fast schwarz	5,32	0.068
Deutschland	Pfeiffer & Langen, Lage / OWL	1996	Zucker- rübe	Hell- braun	7,56	0.070
Deutschland	Pfeiffer & Langen Elsdorf / Rheinl.	1996	Zucker- rübe	Hell- braun	8,72	0.086
Uruguay	- / Artigas	1996	Zucker- rohr	Dunkel- braun	5,28	0.063

#### **Nährstofflösungen / Medien**

##### **Trypton-Extrakt-/Hefeextraktmedien (TY-Medium)**

TY-Medium:	5 g	Trypton-Extrakt
	3 g	Hefeextrakt
	0,4 g	CaCl <sub>2</sub>
10-fach-Konzentrat TY-Medium:	50 g	Trypton-Extrakt
	30 g	Hefeextrakt
	4 g	CaCl <sub>2</sub>

mit desionisiertem Wasser auf einen Liter auffüllen, mit 10 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> oder 2N KOH auf pH 6,8 einstellen und bei +121 °C und 1,5 bar für 20 min autoklavieren

##### **Melassemedien (Mel)**

a) Melassemedium (20 g·L <sup>-1</sup> ): (→ 2 %)	20 g	Zuckerrüben- oder Zuckerrohrmelasse
	0 - 1,2 g	Harnstoff als Stickstoffquelle
b) Melassemedium (30 g·L <sup>-1</sup> ): (→ 3 %)	30 g	Zuckerrüben- oder Zuckerrohrmelasse
	1,5 g	Harnstoff
c) Melassemedium (40 g·L <sup>-1</sup> ): (→ 4 %)	40 g	Zuckerrüben- oder Zuckerrohrmelasse
	2 g	Harnstoff
d) 10-fach-Konzentrat Melasse:	300 g	Zuckerrübenmelasse
	15 g	Harnstoff

mit desionisiertem Wasser auf einen Liter auffüllen, mit 10 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> oder 2N KOH auf pH 6,8 einstellen und bei +121 °C und 1,5 bar für 20 min autoklavieren

##### **Mannitol-Minimalmedium (MMM o. Min)**

MMM (Lösung 1):	10 g	D-Mannit (Mannitol)
	2 g	Di-Natriumsuccinat
	1 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	1 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

mit desionisiertem Wasser auf 0,5 L auffüllen, mit 10 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> oder 2N KOH auf pH 6,8 einstellen und bei +121 °C und 1,5 bar für 20 min autoklavieren

### 3 **Material und Methoden**

---

MMM (Lösung 2):	1 g	L-Natriumglutamat
	0,6 g	NH <sub>4</sub> Cl
	0,2 g	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	0,125 g	MgCl <sub>2</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	0,1 g	Na-Citrat
	0,02 g	Fe-(III)-NH <sub>4</sub> -Citrat x H <sub>2</sub> O

mit desionisiertem Wasser auf 0,5 L auffüllen, mit 10 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> oder 2N KOH auf pH 6.8 einstellen und bei +121 °C und 1,5 bar für 20 min autoklavieren. Nach dem Autoklavieren werden die Lösungen 1 + 2 zusammengegeben. Dazu kommen je 1mL sterilfiltrierte

MMM (Spurenelementlösung):	123,0 g	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	87,0 g	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	0,338 g	MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
	0,247 g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
	0,288 g	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	0,1 g	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O
	0,056 g	CoSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	0,048 g	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O

mit Wasser auf 1 L auffüllen und bei 121°C und 1,5 bar für 20 min autoklavieren.

MMM (Vitaminlösung):	20 mg	(+)-Biotin
	10 mg	Panhotensäure
	10 mg	Thiamin-Hydrochlorid

in 10 mL Wasser + 1 Tropfen KOH (5N) ansetzen. Die Vitaminlösung wird sterilfiltriert, je 1 mL in sterile 1,5 mL Eppendorfgefäße abgefüllt und bis zur ihrer Verwendung bei -30 °C gelagert. Zu 1 L sterilisierter Nährlösung werden nach dem Abkühlen 1 mL Vitaminlösung unter der Reinraumwerbank beigegeben. Für die Fermentationen im 20 L Maßstab wurden 40 mg Biotin, 20 mg Panhotensäure und 20 mg Thiamin-Hydrochlorid in 10 mL Wasser + 1 Tropfen KOH (5N) angesetzt, ebenfalls sterilfiltriert und für die Injektion in den Fermenter unter der Reinraumwerbank in eine sterile 10 mL Einmalkanüle aufgezogen.

Zur Herstellung von Nährböden mit den oben aufgeführten Medien werden den Lösungen je Liter 15 g Agar vor dem Sterilisieren beigemischt.

<u>Luteolinlösung</u>	57 mg	Luteolin
-----------------------	-------	----------

in 10 mL EtOH + 1 Tropfen KOH (5n) lösen → 20 mM. Die sterilfiltrierte Lösung wurde ebenfalls auf sterile Eppendorfgefäße verteilt und die Aliquots bis zur Verwendung bei -30 °C gelagert. Für Fermentationen zur Produktion von Nod-Faktoren im 20 L Maßstab wurden 11,5 mg Luteolin in 10 mL EtOH + 1 Tropfen KOH (5n) gelöst, sterilfiltriert und unter der Reinraumwerbank in eine sterile 10 mL Einmalkanüle für die Injektion in den Fermenter aufgezogen.

Antibiotikalösung I 50 mg bzw. 75 mg Tetracyclin

in 10 mL EtOH lösen, sterilfiltrieren, auf sterile Eppendorfggefäße verteilen und bis zur Anwendung bei -30 °C lagern. Für Fermentationen im 20 L Maßstab wurden 100 mg Tetrazyclin in 10 mL EtOH gelöst, sterilfiltriert und unter der Reinraumwerkbank in eine sterile 10 mL Einmalkanüle für die Injektion in den Fermenter aufgezogen.

Antibiotikalösung II 4 g bzw. 6 g Streptomycin

in 10 mL Wasser lösen, sterilfiltrieren, auf sterile Eppendorfggefäße verteilen und bis zur Anwendung bei -30 °C lagern.

### 3.3 Grundlegende Kultivierungs- und Analysemethoden

#### *Anlegen von Stammbänken der verwendeten Bakterienstämme*

Abstriche der von einem TY-Nährboden abgenommenen Stämme wurden in 50 mL Mannitol-Minimal-Medium (*S. meliloti* 1021pEK327), in Melasse- oder TY-Medium (*S. meliloti* 2011, *S. meliloti* CE15 und *S. meliloti* LPU63) bei +28 °C angezogen. Das Medium für *S. meliloti* 1021pEK327 enthielt 7,5 mg·L<sup>-1</sup> Tetrazyclin, die Nährlösungen für *S. meliloti* 2011, *S. meliloti* CE15 und *S. meliloti* LPU63 400 mg·L<sup>-1</sup> Streptomycin. In ein steriles Kryo-Röhrchen wurden zu je 750 μL einer logarithmisch wachsenden Bakterienkulturen (Bestimmung des Wachstumsverlaufs der Kulturen über die Optische Dichte, OD<sub>580</sub>) unter der Reinraumwerkbank 250 μL einer 87 %-igen sterilisierten Glycerinlösung (≅ 22 % (v/v) Glycerin mL<sup>-1</sup>) gegeben. Das Röhrchen wurde verschlossen und auf dem Vortex für 5 s gemischt, die Kryoröhrchen nach 10 min Standzeit in flüssigem Stickstoff (-196 °C) schockgefroren. Die Bodenbakterien wurden in den Kryoröhrchen anschließend bei -80°C bis zu ihrer Verwendung aufbewahrt.

#### *Schüttelkolbenkultivierungen*

Sämtliche Kultivierungen im Schüttelkolben wurden in 300 mL Schott Duran Kulturkolben mit (Deutschland) und ohne Schikanen (Argentinien) mit Alukappe durchgeführt. Für die Vorkultur wurden 400 μL einer aufgetauten -80°C-Glyzerinkultur des jeweiligen Sinorhizobien-Stamms zu 10 mL des jeweils verwendeten Mediums in ein steriles Kulturröhrchen mit Alukappe (Vol. 20 mL) pipettiert. Das Medium enthielt entweder 400 mg·L<sup>-1</sup> Streptomycin (*S. meliloti* 2011, *S. meliloti* LPU63 oder *S. meliloti* CE15) oder 5 - 7,5 mg·L<sup>-1</sup> Tetrazyclin (*S. meliloti* 1021pEK327). Die Kulturröhrchen wurden ü.N. bei +28 °C und einer Schüttlerfrequenz von 500 min<sup>-1</sup> auf dem Reagenzglasschüttler angezogen. Das Animpfen von 100 mL sterilem, ebenfalls antibiotikahaltigem Medium mit 5 mL aus der Kulturröhrchen-Vorkultur erfolgte unter der Reinraumwerkbank. Die Kultivierungen erfolgten bei +28 °C ohne Licht, einer Kreisfrequenz der Exzeterschüttler von 150 min<sup>-1</sup> mit einer Amplitude von 25 mm in Deutschland bzw. bei 100 min<sup>-1</sup> und einer Amplitude von 20 mm in Argentinien. Proben zur Bestimmung der OD<sub>580</sub> und / oder zur Biotrockenmassebestimmung aus den Kolben wurden unter der Reinraumwerkbank gezogen.

#### **Bestimmung der optischen Dichte bei 580 nm ( $OD_{580}$ ) von Bakterienkulturlösungen**

Die Bestimmung der optischen Dichte wurde bei 580 nm im Spektral-Photometer bei Raumtemperatur durchgeführt. Als Referenzlösung wurde jeweils das in den Experimenten verwendete Nährmedium eingesetzt. Bei einem hohem Biomasseanteil in der Lösung wurden das Volumen der Probe mit dem entsprechenden Medium so verdünnt, dass der Messbereich der verdünnten Probe bei der Bestimmung der optischen Dichte  $OD_{580}$  zwischen 0,1 und 1,0 lag. Die Parallelmessung von zwei Proben erfolgte bei Raumtemperatur im Kunststoff-Halbmikroküvetten ( $V = 1,5$  mL).

#### **Bestimmung der Zelltrockenmasse von Bakterienkulturlösungen**

Die Bestimmung von Zelltrockenmassen aus Schüttelkolbenkulturen und Fermentationsprozessen erfolgte in 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen. Die Eppendorf-Gefäße wurden dafür einen Tag im Exsikkator bei Normaldruck und Raumtemperatur unter Kieselgel equilibriert. Nach der Leergewichtsbestimmung der Gefäße ( $m_{\text{Gefäß, leer}}$ ) auf der Analysenwaage wurden 1,5 mL Probelösung eingefüllt und das Gewicht der Lösung gemessen. Die Eppendorf-Gefäße wurden bei einer Umdrehungszahl von  $14.000 \text{ min}^{-1}$  ( $\rightarrow 16.000 \text{ g}$ ) für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, erneut wurden 1,5 mL Probe in das Eppendorf-Gefäß gefüllt, das Füllgewicht der Probelösung wieder bestimmt und unter den oben aufgeführten Bedingungen zentrifugiert. Auch der zweite Überstand wurde dekantiert, ein letztes Mal 1,5 mL Lösung abgewogen und erneut zentrifugiert. Der dritte Überstand wurde ebenfalls vollständig dekantiert. Die geöffneten Eppendorfgefäße mit der feuchten Biomasse aus 3-x 1,5 mL Kulturlösung ( $\cong 4,5 \text{ mL} \rightarrow \Sigma m_{\text{Flüssigkeit}}$ ) wurden dann für 24 h bei  $90^\circ\text{C}$  im Blockthermostat getrocknet, für einen weiteren Tag im Exsikkator equilibriert und anschließend auf der Analysenwaage ( $m_{\text{Gefäß, getr.}}$ ) gewogen. Die Biotrockenmassen der Proben ergeben sich aus **Gleichung 3.1**:

$$ZTM = \frac{m_{\text{Gefäß getr.}} - m_{\text{Gefäß leer}}}{\Sigma m_{\text{Flüssigkeit}}} [g \cdot kg^{-1} \text{ Flüssigk.}] \text{ bzw. } [g \cdot L^{-1} \text{ Flüssigk.}] \text{ (Gleichung. 3.1)}$$

mit

$m$ : Masse und  $ZTM$ : Zelltrockenmassekonzentration

Da die Wägungen der Zelltrockenmassen ausschließlich aus Proben wässriger Lösungen erfolgten und unter Berücksichtigung der Annahme, dass die Dichte ( $\rho$ ) wässriger Lösungen  $\cong 1 \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$  entspricht, wurde für die Konzentrationsangaben der Biotrockenmasse in dieser Arbeit die gebräuchlichere Einheit [ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ] verwendet.



**Kalkulation der Biotrockenmasse aus Werten der optischen Dichte OD<sub>580</sub>**

Aus den Daten von Fermentationen mit *Sinorhizobium meliloti*, in denen sowohl die Biotrockenmasse, als auch die optische Dichte (OD<sub>580</sub>) gemessen wurden, konnten Umrechnungsfaktoren berechnet werden, mit denen sich eine Abschätzung der Zelltrockenmasse oder der optischen Dichte OD<sub>580</sub> vornehmen lässt, wenn jeweils nur einer der beiden Parameter im Experiment bestimmt wird. In der nachfolgend gezeigten **Tabelle 3.3** (nächste Seite) sind die Umrechnungsfaktoren für die unterschiedlichen Medien aufgeführt. Dabei muss berücksichtigt werden, dass sich in allen Nährstofflösungen ab einer optischen Dichte (OD<sub>580</sub>) von ≥ 10 die Umrechnungsfaktoren deutlich ändern, was in der Aufstellung der Tabelle berücksichtigt wurde. Die in **Tabelle 3.3** dargestellten Werte sind gemittelte Faktoren der Quotienten aus optischer Dichte zu Zelltrockenmasse von jeweils zwei Fermentationen mit *S. meliloti* 1021pEK327 bzw. *S. meliloti* LPU63.

**Tabelle 3.3** Umrechnungsfaktoren zur Abschätzung der Zelltrockenmasse (Biomasse) oder der optischen Dichte (OD<sub>580</sub>) von *S. meliloti* Kulturen

Optische Dichte (OD <sub>580</sub> )	Mannitol-Minimal-Medium (MMM)		Melassemedium 3 % (w/v)		Trypton-Yeast-Medium (TY)	
	Kalk. von OD <sub>580</sub> aus ZTM [-]	Kalk. von ZTM aus OD <sub>580</sub> [g·L <sup>-1</sup> ]	Kalk. von OD <sub>580</sub> aus ZTM [-]	Kalk. von ZTM aus OD <sub>580</sub> [g·L <sup>-1</sup> ]	Kalk. von OD <sub>580</sub> aus ZTM [-]	Kalk. von ZTM aus OD <sub>580</sub> [g·L <sup>-1</sup> ]
< 10	x 2,88	x 0,35	x 2,88	x 0,35	x 2,76	x 0,36
≥ 10	x 4,61	x 0,22	x 2,58	x 0,38	x 3,31	x 0,30

**Bestimmung der Lebendzellzahl von Bakterienkulturlösungen**

Flüssig-Proben aus Fermentationen und Kultivierungsexperimenten wurden in 1:10 Verdünnungsschritten (1:1·10<sup>4</sup> – 1:1·10<sup>7</sup>) mit sterilem, im Experiment verwendeten, Medium verdünnt. Als Nährböden wurde Agarplatten mit dem auch im Experiment verwendeten Medium (ohne Antibiotikum) gewählt. Bei optischen Dichten (OD<sub>580</sub>) von 0,1 - 1,5 wurden 50 µL der Verdünnungsstufen 10<sup>-4</sup> und 10<sup>-5</sup>, bei einer OD<sub>580</sub> von 1,5 - 4,0 wurden 50 µL der Verdünnungsstufen 10<sup>-5</sup> und 10<sup>-6</sup> und bei OD<sub>580</sub>-Werten ≥ 4 wurden 50 µL der Verdünnungsstufen 10<sup>-6</sup> und 10<sup>-7</sup> auf den Nährböden unter der Reinraumwerkbank ausplattiert. Die Platten wurden anschließend bei +28 °C bebrütet. Die Auszählung der gebildeten Kolonien erfolgte nach vier Tagen. Die Lebendzellzahl errechnet sich nach diesem Verfahren mit **Gleichung 3.2**:

$$cfu = \frac{N \cdot 20}{V_s} \quad [Zellen \cdot mL^{-1}] \quad \text{(Gleichung 3.2)}$$

mit *cfu*: Kolonie bildende Zellen (*colony forming units*); *N*: Anzahl Kolonien auf der Platte; *V<sub>s</sub>*: Verdünnungsstufe

**Bestimmung der Viskosität von Kulturüberständen**

Für die Messungen wurde ein temperierbares Mikro-Kugelfallviskosimeter der Fa. Haake verwendet. Grundprinzip ist die Messung der Fallgeschwindigkeit einer goldbeschichteten Eisenkugel in einem schrägstehenden Glasröhrchen (Glasspritze), das mit der Probelösung gefüllt war. Die Messungen erfolgten bei +25 °C. In die Spritze ( $V = 300 \mu\text{L}$ ) wurde die Kugel eingelegt, der die Spritze verschließende Stempel eingeführt und die Flüssigkeit in das Fallrohr mit dem Spritzenstempel bis zum Eichstrich eingesaugt. Noch vorhandene Luftblasen in der Lösung wurden durch das Hin- und Herbewegen der Eisenkugel mittels Dauermagneten aus der Lösung gedrängt. Bestimmt wurde die Fallgeschwindigkeit in Millisekunden. Bei den Proben handelte es sich um zentrifugierte Fermentationsüberstände aus verschiedenen Kultivierungsprozessen, die bis zur Messung bei -30° C gelagert wurden. Die zuvor aufgetauten Überstände wurden in einem Wasserbad vor der Messung für 15 min bei +25 °C temperiert. Die Messungen einer Probe wurden jeweils fünfmal wiederholt. Die dynamische Viskosität der einzelnen Proben ergibt sich aus **Gleichung 3.3**:

$$h = K \cdot (r_1 - r_2) \cdot \Delta t \quad [\text{mPa} \cdot \text{s}] \quad \text{(Gleichung 3.3)}$$

mit

**h** dynamische Viskosität in mPa·s

**K** Konstante in mPa·cm<sup>3</sup> / g

**r<sub>1</sub>** Dichte der Kugel (7,8 g·cm<sup>-3</sup>)

**r<sub>2</sub>** Dichte der Testsubstanz (H<sub>2</sub>O bei +25 °C: 0,997043 g·cm<sup>-3</sup>; Rauscher et al, 1986)

**Dt** Fallzeit der Testsubstanz ( = H<sub>2</sub>O: 4,135 s)

Die Konstante **K** wird über die Umformung von **Gleichung 3.3** ermittelt:

$$K_{25^\circ\text{C}} = \frac{h_E}{(r_1 - r_2) \cdot \Delta t} = \frac{0,89}{(7,8 - 0,997043) \cdot 4,135} = 0,0316 \left[ \frac{\text{mPa} \cdot \text{cm}^3}{\text{g}} \right] \quad \text{(Gleichung 3.4)}$$

mit  $\eta_E$  = dynamische Viskosität der Testflüssigkeit (H<sub>2</sub>O bei +25°C = 0,89; Lire, 1992)

#### **Analytische Umkehrphasen-(RP)-C<sub>18</sub>-HPLC**

1,0 mL der zu untersuchenden Lösung wurden in ein steriles Eppendorfgefäß gefüllt und bei 14.000 min<sup>-1</sup> für 10 min zentrifugiert. 700 µL des Überstands wurden in eine Gewindeflasche mit Teflon- / Gummiseptum gefüllt.

Verwendete Chromatographiesäule                      Vertex-Stahlsäule: 250 mm Länge x 4mm I.D.

Verwendetes Säulenmaterial                      Licospher 100-RP<sub>18</sub> endcapped  
Partikelgröße:                      5 µm  
Porengröße:                      10 nm

Injektionsvolumen                      200 µL

200 µL Probelösung wurden pneumatisch mittels Sechs-Wege-Ventil des verwendeten Autosamplers auf die Chromatographiesäule injiziert. Die Chromatographieläufe erfolgten unter isokratischen Bedingungen über 24 min mit einem Eluenten bestehend aus: 36 % (v/v) Acetonitril / 64 % (v/v) Wasser + 40 mMol Ammoniumacetat. Der gemessene Volumenstrom (V) der HPLC-Pumpe betrug 1,0 mL·min<sup>-1</sup>. Die Chromatographiesäule wurde nach Analyse der Probe für 12 min mit 100%-iger Acetonitril-Lösung zur deren Reinigung gespült und dann für weitere 9 min als Vorbereitung für den nächsten HPLC-Lauf mit dem Eluenten equilibriert (V = 1,0 mL·min<sup>-1</sup>). Die Ansteuerung der Pumpen und des Autosamplers erfolgte über eine Steuerungs-(CIM-)Box. Die Analyse des Eluats über 25 min erfolgte im UV-vis-Spektrometer bei 220 nm. Die Daten des UV-Detektors wurden an eine Datenaufzeichnungs-(CSI-)Box weitergeleitet. CIM- und CSI-Box waren an einen PC (80386-Prozessor (INTEL), 33 MHz, 4 MB Arbeitsspeicher) gekoppelt. Dieser war mit Programmen zur Steuerung der HPLC-Aggregate, zur Datenaufzeichnung und -auswertung (Apex Chromatography Workstation, Modell M625-4, Version 2.06; Autochrom Inc., Milford) ausgestattet.

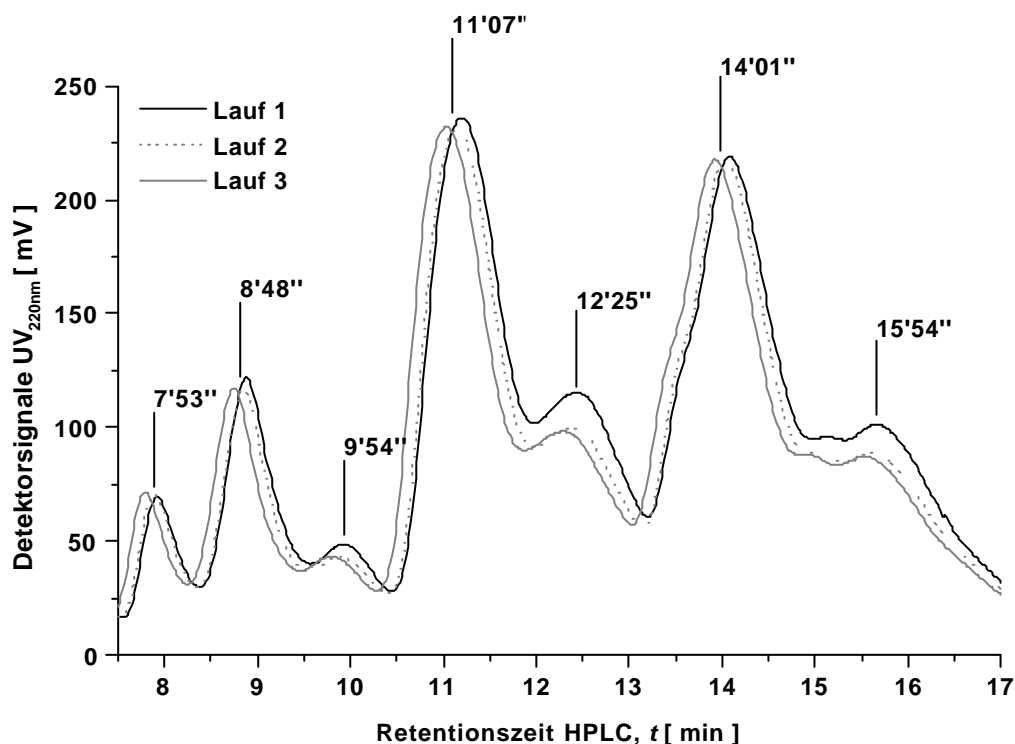
#### **Quantifizierung von Nod-Faktoren mittels analytischer RP<sub>18</sub>-HPLC**

Zur quantitativen Bestimmung der Konzentration an Nod-Faktoren in Lösungen, Kulturüberständen und anderen Lösungen wurden 3 mg aufgereinigte, lyophilisierte Nod-Faktoren aus einem Satzprozess mit dem Stamm *S. meliloti* 1021pEK327 in 3 mL 36 % (v/v) Acetonitril / 64 % (v/v) Wasser mit 40 mMol Ammoniumacetat gelöst, anschließend bei 16.000 g für 8 min in der Eppifuge zentrifugiert und jeweils 700 µL des Überstands in eine 1,5 mL Gewindeflasche mit Teflon- / Gummiseptum gefüllt. Die Analyse der Proben erfolgte in der Umkehrphasen C<sub>18</sub>-HPLC (s. oben) unter den dort beschriebenen Bedingungen. Es wurden drei Chromatographieläufe mit drei Nod-Faktor-Lösungen (Konz.: je 1 mg·mL<sup>-1</sup>) durchgeführt. Die Berechnung der Peakflächen im Bereich von 7,5 min - 15,5 min Retentionszeit der Chromatogramme (s. Abb.) erfolgte durch die Integration der Peaks mit Hilfe der Chromatogramm-Auswerteprogramms der Apex Chromatography Workstation, Modell M625-4, Version 2.06 (Autochrom Inc., Milford). Die Chromatogramme sind in **Abbildung 3.2** dargestellt, die Summen der Peakflächen in **Tabelle 3.4**.

**Tabelle 3.4** Größe der Peakflächen durch die Integration der Peaks im Bereich der Retentionszeiten von 7,5 min – 17 min der Standardlauf-Chromatogramme aus **Abbildung 3.2**

Lauf-Nr.	S Peakflächen 7,5 - 17 min, A [ mVs ]
1	46.527,10
2	46.389,29
3	48.866,22
<b><math>\bar{A}</math></b>	<b>47.260,87</b>

Aus der Integration der einzelnen Peakflächen im Bereich von 7,5 min bis 17 min in **Abbildung 3.2** ergibt sich als Mittelwert aus den drei Standardläufen nach **Tabelle 3.4** eine Gesamtpeakfläche von 47.260,87 mV·s. Somit entspricht  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  an Nod-Faktoren unter den oben beschriebenen HPLC-Bedingungen einer Peakfläche von  $47.260,87 \text{ mV}\cdot\text{s}$  ( $1.000 \text{ mV}\cdot\text{s} @ 2,1 \times 10^{-2} \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1} \text{ NF}$ ). Der Umrechnungsfaktor wurde für alle Produktmengenabschätzungen von Nod-Faktoren in dieser Arbeit verwendet.



**Abbildung 3.2** RP<sub>18</sub>-Chromatogramme von drei Standardläufen mit einer Konzentration von  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  an Nod-Faktoren. Die Zahlen geben die Retentionszeiten der markierten Peaks in min und s an, die für die Flächenbestimmung herangezogen wurden.

**3.4 Untersuchungen zur Adsorption von Lipochitooligosacchariden an lipophile Matrices**

**Test verschiedener Adsorptionsmatrices für die Extraktion von Nod-Faktoren aus einer wässrigen Lösung**

Für diesen Vergleichstest wurden 3 sphärische, lipophile Adsorptionsmatrices (Toyopearl® Phenyl 650M, Amberchrom® cg-161 ms und Amberlite® XAD-2 pract.) und ein Vergleichsadsorbens aus gebrochenem Material (Bakerbond Phenyl SPE) verwendet. In der nachfolgenden **Tabelle 3.5** sind die Eigenschaften der verschiedenen Adsorptionsmatrices zusammengefasst:

**Tabelle 3.5** Eigenschaften verschiedener hydrophober Adsorptionsmatrices. Grau unterlegt ist das Adsorbens, mit dem in dieser Arbeit der Großteil der Extraktionen von Nod-Faktoren aus wässrigen Lösungen erfolgte

Name	Amberchrom <sup>a</sup> Cg-161 ms	Amberlite <sup>a</sup> XAD-2 pract.	Toyopearl Phenyl 650 M	Bakerbond Phenyl SPE
Hersteller	TOSOHAAS	Rohm&Haas	TOSOHAAS	J.T.Baker
Chemische Struktur	Styrol-Polymer	Co-Polymer aus Styrol-Divinylbenzol	Co-Polymer aus Ethylen-glycol und Methacrylat	Silicagel
Morphologie	sphärisch	sphärisch	sphärisch	Gebrochen
Ø Partikel	80 - 160 µm	300 - 840 µm	40 - 90 µm	35 - 40 µm
Größe Poren	150 Å	90 Å	1000 Å	300 Å
Oberfläche	900 m <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup>	330 m <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup>	900 m <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup>	100 m <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup>

Die Versuche mit den verschiedenen Adsorbentien erfolgten bei Raumtemperatur. Es wurden jeweils 2 g des entsprechenden Adsorbentharzes in eine 10 mL Plastikkartusche zwischen 2 Hart-Polyethylenfritten gefüllt. Die gefüllten Säulen wurden mit 2 mL H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend mit 2 mL MeOH equilibriert. In 25 mL H<sub>2</sub>O wurden 12,5 mg Nod-Faktor-Lyophilisat (0,5 mg·mL<sup>-1</sup>) gelöst. Nach der Equilibrierung der verschiedenen Adsorbentmaterialien wurde jeweils 1 mL Nod-Faktorlösung auf das Harzbett gegeben. Mit einer Spritze, die luftdicht auf das obere Ende der Kartusche gesetzt wurde, konnte durch langsames Einblasen von Luft mit der Spritze in den Kartuschenraum die Flüssigkeit tropfenweise durch das Harzbett gepresst werden. Der Durchlauf wurde aufgefangen und zwei weitere Male durch das Adsorbentharzbett gepresst. Der dritte Durchlauf wurde aufbewahrt. Danach wurde das Harz in den Kartuschen 1 x mit 2 mL H<sub>2</sub>O gewaschen. Auch das Waschwasser wurde aufgefangen. Danach erfolgte die erste Elution mit 1 mL MeOH. Die zweite Elution wurde mit 1 mL AN durchgeführt. Von den aufgefangenen Lösungen (1 mL Durchlauf, 2 mL H<sub>2</sub>O (Waschen), 1 mL MeOH (Eluat 1) und 1 mL AN (Eluat 2)) wurden anschließend je 700 µL in Schraubdeckelgläschen für die analytische HPLC gefüllt. Für die Analyse dieser Proben wurde eine Chromatographiesäule (Vertex-Stahlsäule, 130 mm Länge, 4 mm I.D. Ø) verwendet, die mit der Umkehrphase Polyogoprep 100-30 C<sub>18</sub> gefüllt war. Es wurden 50 µL Probe auf die Säule injiziert. Der Eluent bestand aus 100 % MeOH. Der Eluent wurde mit

einem Volumenstrom ( $V$ ) von  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  durch die Säule gepumpt. Die Detektion des Probenstroms erfolgte mittels UV-vis-Detektor bei 220 nm.

#### 3.4.1 Extraktion von Nod-Faktoren mit einer Wirbelschicht-Adsorptionssäule aus Schüttelkolbenkulturen von *S. meliloti* 1021pEK327

Für die Adsorption von Nod-Faktoren aus Kulturlösungen mit *S. meliloti* 1021pEK327 wurden Kunststoffzentrifugenbecher so modifiziert, dass sie als Adsorptionskolonnen in den Schüttelkolben-Experimenten eingesetzt werden konnten, wie in **Abbildung 3.3, B** zu sehen ist.



**Abbildung 3.3** Modifiziertes Greinerröhrchen zur Extraktion von Nod-Faktoren. A) Bauteile der Adsorptionssäule: 1-Kontermutter für Auslassflansch; 2-Auslassflansch mit Auslassdüse; 3-Säulenkörper; 4-Polyamidgewebe (Auslass); 5-Fixierring für Polyamidgewebe; 6 Polyamidgewebe (Einlass); 7-Schraubdeckel mit Einlassdüse. B) Zusammengesetzte Säule mit 12 g Amberlite® XAD2 pract. Füllung

Zentrifugenröhrchen	50 mL Volumen (nominell) mit spitzem Boden, Standsockel und Schraubdeckel, Polypropylen (188271) (Greiner, Frickenhausen)
	I.D.: 26,5 mm
	Länge Adsorptionsraum: 94 mm
	Volumen Adsorptionsraum: 51,8 mL

Der Adsorptionsraum entspricht nach **Abbildung 3.3** dem Volumen zwischen Einlass- und Auslassgitter. Das verwendete Polyamidgitter für die Rückhaltung der Harzperlen im Säuleninneren besaß folgende Eigenschaften:

### 3 Material und Methoden

---

Polyamid-Gewebe PA-150/38  
Maschenweite 150  $\mu\text{m}$   
Faserdicke 38  $\mu\text{m}$   
(Spörl, Sigmarinendorf)

Das sphärische Adsorberharz, das zur Extraktion von Nod-Faktoren aus Kulturlösungen mit Sm1021pEK327 eingesetzt werden sollte, wies neben den in **Tabelle 3.5** bereits beschriebenen Charakteristika noch die folgenden Eigenschaften auf:

Dichte (trocken): 1,08  $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$   $\rightarrow$  Feuchteanteil  $\cong$  51 %  
Porenvolumen: 0,65  $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$   
Volumen 12 g Amberlite<sup>®</sup>: ca. 16 mL  
XAD-2 (feucht) gepackt

In drei Erlenmeyer-Weithalskolben ( $V = 500 \text{ mL}$ ), nachfolgend mit **X** (Amberlite XAD-2 pract. Füllung), **O** (Leersäule ohne Füllung) und **C** (Control) bezeichnet, wurden wie in **Abbildung 3.4** je eine leere Adsorptionssäule eingehängt. Der Kolben wurde mit einem Kunststoffdeckel, der mit zwei Bohrungen für die Schlauchzu- und -abführung versehen war, verschlossen und mit einer selbst angefertigten Kappe aus mehrlagiger, verstärkter Aluminiumfolie versehen. Die so ausgestatteten Kolben wurden sterilisiert. Nach der Sterilisation wurde unter der sterilen Werkbank der Kolben X geöffnet und in dessen Säule 12 g Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 pract. gefüllt. Dies entspricht einer Konzentration von 40 g Harzperlen $\cdot\text{L}^{-1}$  Kulturflüssigkeit.

Die Säule wurde verschlossen, und in den dazugehörigen Kolben wurden zuerst 150 mL EtOH p.A. gefüllt. Die Säule wurde wieder in den Kolben eingehängt, und der Alkohol mit einem Volumenstrom von  $V = 31,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  für 20 min durch die Säule gepumpt. Anschließend wurde die Säule für weitere 15 min mit sterilem Wasser gespült. In alle drei Kolben X, O und C wurden dann 300 mL Minimalmedium mit 5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Tetrazyklin gefüllt. Anschließend wurde in jeden Kolben 5 mL einer ü.N.-Kultur von *S. meliloti* 1021pEK327 im Minimalmedium mit 7,5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Tetrazyklin pipettiert.

Flüssigkeitsvolumen im Kolben 300 mL  
Schlauchlänge ü.a. 1530 mm  
Schlauchinnendurchmesser 3 mm (Silikon)  
Pumpenschlauchdurchmesser 2,54 mm (Ismapren)

Die Kultivierung der Bodenbakterien erfolgte bei +28 °C auf einem Exzenter-Schüttler bei einer Rotationsfrequenz von 150  $\text{min}^{-1}$ . Bei den Kolben mit der Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 pract.-Säule (X) und dem Kolben mit der Säule ohne Harzfüllung (O) wurde der Schlauch zu Beginn des Experiments wie in **Abbildung 3.4** zu sehen, in die Pumpe eingelegt und zum Zeitpunkt  $t = 0 \text{ h}$  eingeschaltet. Die Kulturflüssigkeit wurde dann während des zwei Tage dauernden Versuchs permanent durch die Säulen gepumpt. Der geförderte Volumenstrom lag bei  $V = 31,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Durch die Säule des dritten Kolbens (C) wurde keine Kulturflüssigkeit gepumpt, dieser Ansatz diente als paralleler Kontrollansatz.



**Abbildung 3.4** Versuchsaufbau zur Adsorption von Nod-Faktoren aus Kulturen von *Sinorhizobium meliloti* Sm1021pEK327 und zur Bestimmung des Adsorptionsverhaltens von Nod-Faktoren an lipophilen Harzkugeln. FI: Flüssigkeit; K: Kolben mit Aluminiumfolie ummantelter Abdeckkappe; P: Schlauchpumpe mit fixiertem Ismapren-Schlauchstück; S: Silikonschlauch und XS: Adsorptionssäule

Im Abstand von 12 – 14 h wurden jedem Kolben unter der Reinraumwerkbank 2 x 1 mL Proben entnommen und diese in 1,5 mL Eppendorf-Gefäß pipettiert. Von der einen Probe wurde die optische Dichte ( $OD_{580}$ ) bestimmt. Die zweite Probe wurde 10 min bei  $14.000 \text{ min}^{-1}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine 1,5 mL Gewindeflasche mit Teflon- / Gummiseptum für die analytische  $RP_{18}$ -HPLC gefüllt. Die Analyse des Überstände erfolgte unter den dort beschriebenen Bedingungen. Nach 48 - 54 h wurde die Kultivierung der Bakterien beendet. Zur Abtrennung der Biomasse wurden die 300 mL Kulturflüssigkeit der Kolben O und C für 50 min bei  $9.600 \text{ min}^{-1} \rightarrow 17.000 \text{ g}$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. In dieser Zeit wurden die Säulen dieser Kolben (O und C) mit 12 g Amberlite® XAD-2 pract. Harzkugeln gefüllt und, wie für die Säule aus Kolben X beschrieben, equilibriert. Nach Entfernen des Wassers aus den Kolben O und C wurden die zentrifugierten Überstände der Kulturen O und C in ihre Kolben zurückgefüllt.

Die Kultur aus Kolben X wurde verworfen und dieser mit 300 mL Wasser aufgefüllt. Dann wurden für 24 Stunden die zentrifugierten Überstände durch die Säulen der Kolben C und O gepumpt. Auch bei dieser Extraktion der Signalmoleküle lag der Volumenstrom wieder bei  $V = 31,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Durch die Säule des Kolbens X wurde für 30 min Wasser gepumpt, um die noch in dieser Säule vorhandenen Mikroorganismen auszuwaschen. Das Wasser im Kolben wurde anschließend gegen frisches Wasser ausgetauscht und der Schlauch von der Pumpe abgekoppelt. Nach Ende der Nod-Faktor-Adsorption aus dem zellfreien Überständen der Kulturen O und C wurde die Flüssigkeit aller drei Kolben entsorgt und alle Kolben wurden mit 300 mL



frischem Wasser aufgefüllt. Mit einem Volumenstrom von  $V = 15,75 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  wurde das Wasser durch die Säule gepumpt, um die Harzperlen zu waschen. Die Elution der Nod-Faktoren erfolgte anschließend mit 5 mL EtOH in den Säulen. Dazu wurde der Schraubdeckel der Säulen geöffnet, der Alkohol auf das Bett der Harzperlen pipettiert und der EtOH mit einem Volumenstrom von  $V = 2,9 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  für 10 min durch das Bett der Harzkugeln gepumpt. Die Ethanol-Eluate wurden im Anschluss in der analytischen RP<sub>18</sub>-HPLC untersucht.

#### ***Präparation des Adsorbens für Aufnahmen im Raster-Elektronenmikroskop***

Mittels abgeschnittener Pipettenspitze wurde jeweils 1 mL Kulturflüssigkeit mit Harzperlen aus einer Schüttelkolbenkultur von *S. meliloti* 1021pEK327 in Melasse- oder Minimalmedium entnommen. Die Probe wurde langsam zur Sedimentation in ein 2 mL Eppendorf-Gefäß pipettiert. Der Kulturüberstand wurde vorsichtig entfernt und die Harzkugeln mit 2 mL 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 überschichtet und leicht geschwenkt. Der Überstand wurde abgesaugt und die Harzperlen dann mit 1,5 mL einer 2,5 %-iger Glutaraldehydlösung in 50 mMol Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 überschichtet. Nach dreißig Minuten wurde die Fixierlösung entfernt. Mit einer aufsteigenden Reihe ethanolischer Lösungen (25 %, 40 %, 75 % und 100 % EtOH, jeweils 1,5 mL) wurden die Harzperlen entwässert. Die Entwässerungszeit betrug je Lösung 30 min. Anschließend erfolgte eine Trocknung über 2 h bei Raumtemperatur. Die so vorbehandelten Harzperlen wurden mittels Klebefolie auf den Targets für die REM fixiert. Die Targets wurden anschließend im Vakuum mit Gold bedampft.

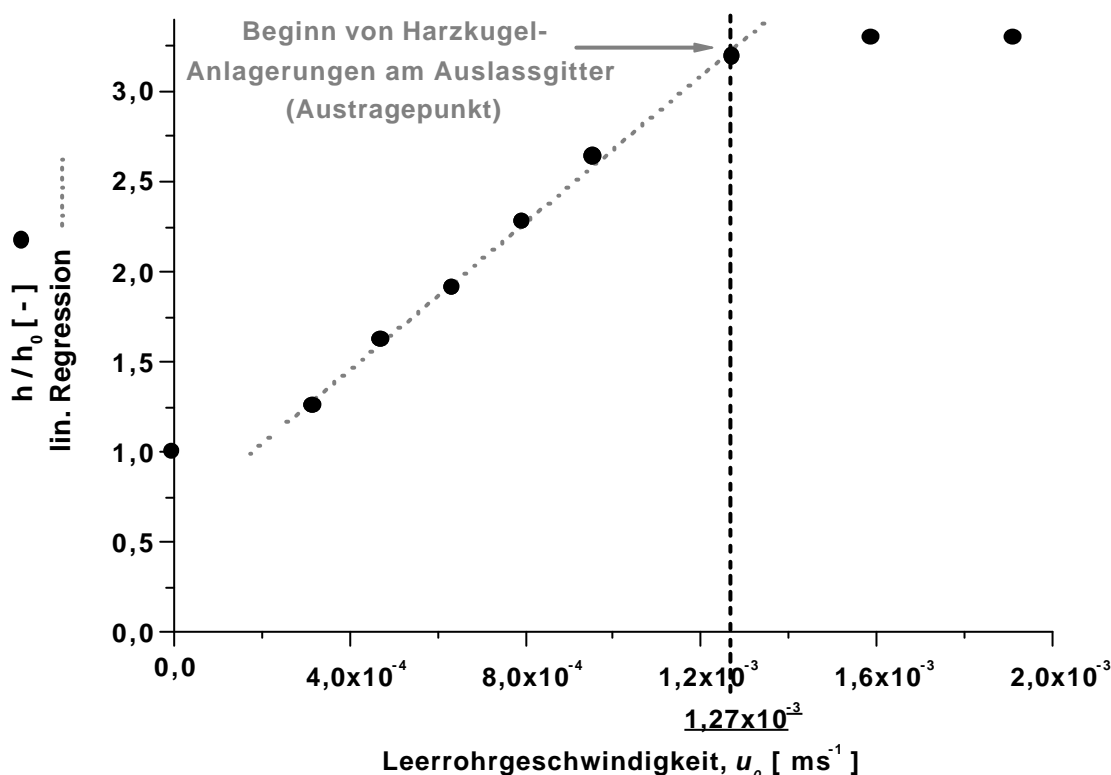
#### ***3.4.2 Kinetische Untersuchungen zur Adsorption von Nod-Faktoren an Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 pract. Harzperlen***

Für die nachfolgenden Experimente im Schüttelkolben wurde die gleiche Versuchsanordnung wie in **Abbildung 3.4** und der gleiche Säulentyp aus **Abbildung 3.3** verwendet, die auch in den Experimenten zur Extraktion von Nod-Faktoren aus Bodenbakterienkulturen eingesetzt wurden.

##### *a) Bestimmung der Matrix-Betthöhe in Abhängigkeit vom Volumenstrom*

Da in einem Teil der Experimente zur Bestimmung des Adsorptionsverhaltens von Nod-Faktoren an Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 pract. mit unterschiedlichen Pumpgeschwindigkeiten bei identischen Volumina an Harzkugeln in der Säule gearbeitet wurde, ist die Expansion des Harzkugelbetts in Abhängigkeit vom Volumenstrom der flüssigen Phase für die Bewertung der Experimente von Bedeutung. Aus diesem Grund wurden zwei Adsorptionskolonnen mit 12 g feuchten Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 pract. Harzkugeln beladen und wieder verschlossen. Die Säulen wurden wie in **Abbildung 3.4** senkrecht in den 500 mL Kolben eingehängt, die mit 300 mL Wasser gefüllt waren. Die Pumpe wurde angeschaltet und für 10 min laufen gelassen. Nach 10 min wurde bei weiter fördernder Pumpe die Höhe des expandierten Betts gemessen. Das Experiment wurde mit verschiedenen Volumenströmen ( $V = 10,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $15,75 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $21 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $26,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $31,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $42 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $52,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  und  $63 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) durchgeführt

Die in **Abbildung 3.5** dargestellten Resultate zur Expansion der Amberlite® XAD-2 pract. Schüttung ermittelten Messwerte für die Betthöhe der Adsorptionsmatrix müssen unter dem Vorbehalt betrachtet werden, dass sich die Säulen bei den hier gezeigten Messungen in senkrechter Ruhelage befanden. Bei den Experimenten zur Extraktion der Nod-Faktoren aus Kulturüberständen und zur Messung des Adsorptionsverhalten von Nod-Faktoren an Amberlite® XAD-2 pract. wurden die Säulen in den Kolben aufgrund der Versuchsdurchführung auf dem Exzentrerschüttler Zentrifugalkräften ausgesetzt. Die dabei auf die in der Säule enthaltenen Harzperlen wirkenden Querbeschleunigungen verhinderten die in der **Abbildung. 3.5** gezeigte Ablagerung der kleineren Partikel am Auslassgitter der Säule bei einer linearen Strömungsgeschwindigkeit von  $u \geq 1,27 \cdot 10^{-3} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ . Durch die gleichzeitig auftretende Neigung der Säulen an die schräge Kolbenwand und bei Rotationsgeschwindigkeiten des Exzentrerschüttlers von  $150 \text{ min}^{-1}$  lassen die hier erzielten Werte für die Expansion des Harzkugelbettes nur zur groben Orientierung auf die Verhältnisse der nachfolgend beschriebenen Versuche, die auf dem Exzentrerschüttler durchgeführt wurden, übertragen (Hadulla *et al.*, 1995).



**Abbildung 3.5** Expansion der Harzkugelschüttung in den Adsorptionssäulen in Abhängigkeit von der linearen Strömungsgeschwindigkeit. Volumen der Säulen: 51,8 mL, Schüttung: 12 g Amberlite® XAD-2 pract. (Vol. 16 mL), Temperatur: +4 °C, verwendetes Fluid: Wasser

b) *Variation der eingesetzten Menge an Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 pract.*

In die drei Adsorptionssäulen der Kolben wurden 12 g, 6 g und 3 g feuchtes Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 pract. gefüllt. Durch die mit dem Harz gefüllten Säulen wurden zur Equilibrierung der Harzperlen 100 mL EtOH und anschließend mit 100 mL Wasser gepumpt ( $V = 10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Unter der Reinraumwerkbank wurden in jeden Kolben 300 mL eines aufkonzentrierten, ultrafiltrierten Fermentations-überstandes ( $C_{NF} = 2,61\cdot 10^{-1} \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) aus einem Satzprozess mit *S. meliloti* 1021pEK327 gefüllt. Die Kolben wurden mit dem Deckel verschlossen und auf einem Exzentrerschüttler platziert. Die Schläuche wurden in die Pumpe eingelegt und der Fermentationsüberstand wurde mit einem Volumenstrom von  $V = 31,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  durch die Säulen gepumpt. Zur Vermeidung von Kontaminationen der ultrafiltrierten Fermentationsüberstände wurden die Adsorptionsexperimente in einem Kühlraum (+4 °C) durchgeführt. Eine Probenahme ( $V = 1 \text{ mL}$ ) in 1,5 mL Eppendorfgefäße erfolgte zu den Zeiten:  $t = 0 \text{ h}$ , 1 h, 2 h, 3 h, 5 h, 8,25 h, 23 h und 49 h. Die Proben wurden bei  $14.000 \text{ min}^{-1}$  für 10 min zentrifugiert und 700  $\mu\text{L}$  des Überstandes in Schraubdeckelgläschen mit Teflon-/ Gummiseptum für die analytische RP<sub>18</sub>-HPLC gefüllt.

c) *Variation der eingesetzten Nod-Faktor-Konzentrationen*

In alle Adsorptionskolonnen der drei zuvor sterilisierten Kolben wurden je 12 g feuchtes Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 pract. unter der Reinraumwerkbank gefüllt und, wie oben beschrieben, equilibriert. In den ersten Kolben wurden steril 300 mL eines ultrafiltrierten, aufkonzentrierten Fermentationsüberstandes ( $C_{NF} = 1,23\cdot 10^{-1} \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) aus einem Satzprozess mit *S. meliloti* 1021pEK327 gefüllt, in den zweiten Kolben kam eine Mischung aus 150 mL Fermentationsüberstand und 150 mL steriles H<sub>2</sub>O ( $C_{NF} = 6,15\cdot 10^{-2} \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) und in dem dritten Kolben wurden 75 mL Fermentationsüberstand mit 225 mL sterilem Wasser ( $C_{NF} = 3,08\cdot 10^{-2} \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) vermischt. Der weitere Versuchsablauf erfolgte wie unter b) beschrieben. Der Volumenstrom ( $V$ ) wurde auf  $31,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  eingestellt. Die Probenahme erfolgte zu den Zeitpunkten  $t = 0 \text{ h}$ ; 0,75 h; 1,25 h; 2,17 h; 3 h; 5 h; 9 h; 23,67 h; 32 h und 46,33 h.

d) *Variation der Volumenstroms*

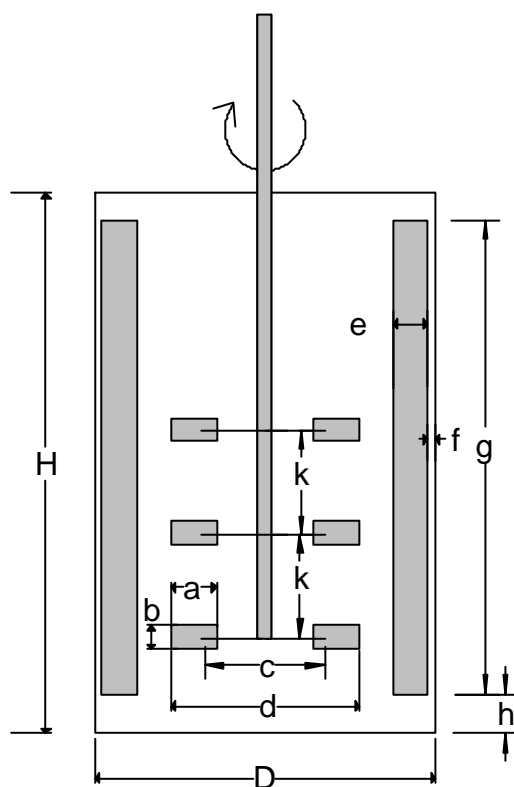
Die drei Säulen wurden mit je 12 g feuchtem Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 pract. gefüllt und equilibriert. In die Kolben wurden dann je 300 mL eines aufkonzentrierten ultrafiltrierten Fermentationsüberstandes ( $C_{NF} = 4,13\cdot 10^{-2} \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) aus einem Satzprozess mit *S. meliloti* 1021pEK327 gegeben. Das Experiment erfolgte unter den in Experiment b) beschriebenen Bedingungen. Variiert wurden in diesem Versuch die Volumenströme, die bei ( $V$ ) =  $63 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $31,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  und  $15,75 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Die Probenahme erfolgte zu den Zeitpunkten  $t = 0 \text{ h}$ ; 0,5 h; 1 h; 2 h; 3 h; 6 h; 9 h und 23 h. Auch bei diesem Experiment erfolgte die Zentrifugation der gezogenen Proben und ihre anschließende Analyse in der RP<sub>18</sub>-HPLC unter den oben angegebenen Bedingungen.

Bestimmt wurde bei allen Experimenten die Menge der in der Lösung verbliebenen Nod-Faktoren durch Ausmessung der Flächen aller Peaks mit einer Retentionszeit zwischen 7,5 und 17 min.

#### 3.5 Fermentationen und Aufarbeitung

##### **Die Geometrie der in dieser Arbeit verwendeten Bioreaktoren**

Die **Abbildung 3.6** skizziert die grundlegende Geometrie der in dieser Arbeit verwendeten Rührkesselreaktoren. In **Tabelle 3.6** sind die dazugehörigen Abmessungen der einzelnen Bauteile von den in dieser Arbeit verwendeten Bioreaktoren zusammengefasst. Der MBR-30 L-Bioreaktor wurde ausschließlich für die Produktion von Nod-Faktoren mit dem Produktionsstamm Sm1021pEK327 verwendet. Mit dem B.Braun Biostat B 2 L-Fermenter wurden die Satzprozesse zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens von SmLPU63 in Minimalmedium bei unterschiedlichen pH-Werten sowie Zufütterungsexperimente und Satzprozesse von SmLPU63 in Melassemedium durchgeführt. Der Infors Labfors 2 L-Fermenter diente ebenfalls zu Zulauf-Fermentationsexperimenten mit dem Stamm SmLPU63 in Melasse- und TY-Medium. Die kontinuierlichen Fermentationen mit den Stämmen *S. meliloti* LPU63 und *S. meliloti* 2011 wurden in Argentinien mit einem 1 L New Brunswyk Bioflo C30 Fermenter durchgeführt.



---

**Abbildung 3.6** Skizze eines Bioreaktors mit den wichtigsten Bauelementen. Die Bemaßungen der Elemente a-k der einzelnen Fermenter sind der **Tabelle 3.6** zu entnehmen (Abbildung mit freundlicher Genehmigung durch Herrn Dipl.-Ing. T. Schäffer, Universität Bielefeld)

**Tabelle 3.6** Geometrische Abmessungen der wichtigsten Bauteile aller in dieser Arbeit verwendeten Bioreaktoren

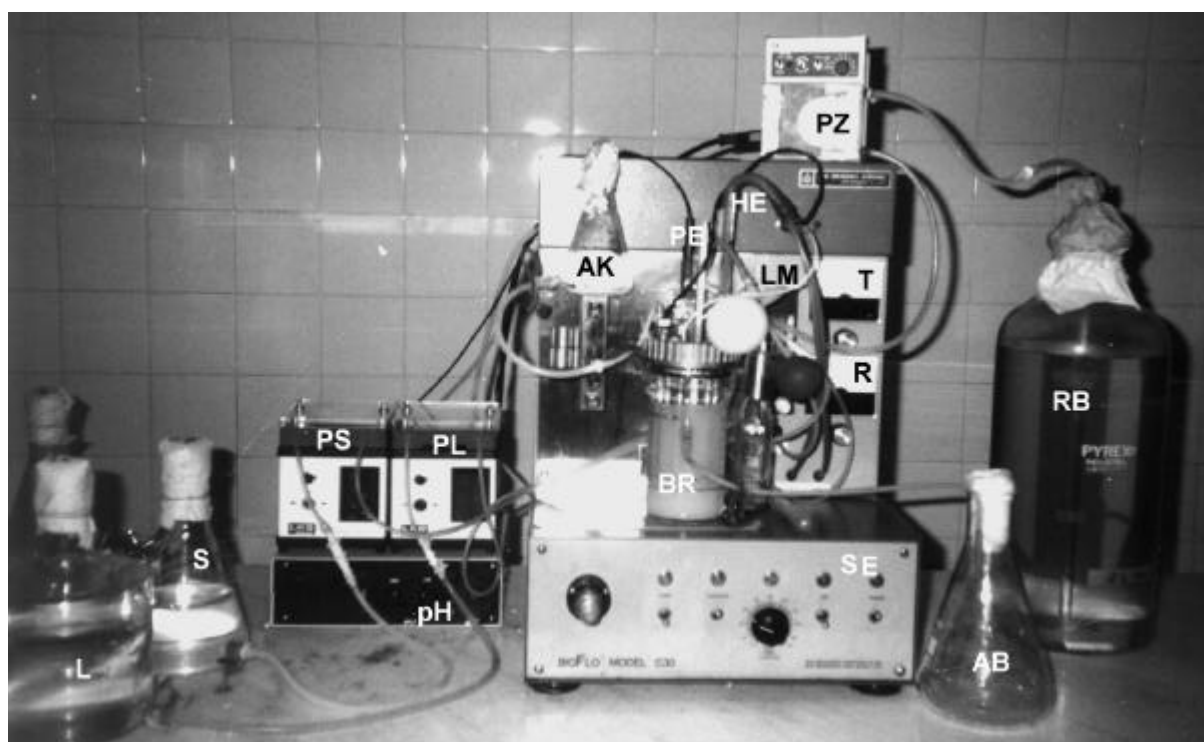
Hersteller Typ	B. Braun Biostat B. 2 L	Infors Labfors 2 L	MBR Laborreaktor 30 L	New Brunswyk BioFlo C30 1 L
<b>Baugruppe</b>				
Reaktordurchmesser (D)	130 mm	120 mm	240 mm	95 mm
Reaktorhöhe (H)	240 mm	370 mm	700 mm	140 mm
Rührerdurchmesser (d)	52 mm	46 mm	79 mm	70 mm
Breite der Blätter (a)	13,5 mm	11 mm	20 mm	12 mm
Höhe der Blätter (b)	10,5 mm	11 mm	14 mm	9 mm
Scheibendurchmesser (c)	32 mm	30 mm	50 mm	60 mm
Anzahl der Blätter	6	6	6	4
Anzahl der Rührer	2	3	3	1
Abstand d. Bodenrührers v. Boden	30 mm	40 mm	120 mm	2 mm
Abstand d. 2. Rührers v. Boden	105 mm	73 mm	240 mm	---
Abstand zwischen den Rührern (k)	75 mm	33 mm 75 mm	je 120 mm	---
Abstand Rührerblatt-Luftvertei- lung	7 mm	30 mm	60 mm	5 mm
Rührwellendurchmesser	10 mm	8 mm	20 mm	---
Anzahl Stromstörer	4	3	4	4
Höhe (g)	130 mm	350 mm	550 mm	80 mm
Breite (e)	10 mm	15 mm	20 mm	6 mm
Wandabstand (f)	4 mm	3 mm	5 mm	1 mm
Abstand v. Fermenterboden (h)	40 mm	20 mm	5 mm	25 mm

#### 3.5.1 Fermentationen von Sinorhizobium meliloti im 1 L- und 2 L-Maßstab

##### Der 1 L Bioreaktor von New Brunswyk

Der Bioreaktor zur kontinuierlichen Kultivierung von Bodenbakterien aus **Abbildung 3.7** bestand aus einem 1 L Glasgefäß mit außen liegendem Schraubgewinderand, über das der aus Stahl gefertigte Fermenterdeckel (integrierte O-Ring-Dichtung) mit dem Glasgefäß fixiert wurde. Das Glasgefäß besaß an der Seite eine Auslassöffnung, durch die ein Überlaufrohr in den Fermenter eingebracht wurde. Die Position des Überlaufrohrs wurde so justiert, dass die Flüssigkeit im Fermenter ein Volumen von  $V = 500 \text{ mL}$  nicht überstieg. Durch die mit O-Ringen versehenen Öffnungen im Fermenterdeckel wurden die pH-Elektrode, die Zu- und Abluftstrecke, ein Quecksilber-Glasthermometer, das Steigrohr für die Probenahme, das Heizelement und ein PT-100 Fühler in den Fermenter eingeführt. Die Steuereinheit des Fermenters besaß analoge Regler für Temperatur und Rührerdrehzahl. Das Rührorgan bestand aus einem Magnetscheibe mit vier Propellerblättern. Der Antrieb erfolgte kontaktlos über einen rotierenden

Dauermagneten in der Steuereinheit. Die Luftzufuhr wurde über eine externe, elektrisch betriebene Pumpe gewährleistet, der Luftmengenbeitrag in den Rührkessel wurde über ein Nadelventil an einem Schwebekörperdurchflussmesser justiert. In Zu- und Abluftstrecke war jeweils ein Sterilfilter integriert. Die Kontrolle des pH-Wertes erfolgte über eine durch den Reaktordeckel in den Fermenter eingebrachte pH-Elektrode, die an ein externes analoges pH-Meter angeschlossen war. Das pH-Meter regulierte auch die Ansteuerung der Schlauchpumpen für die Zugabe von Säure (10 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) und Lauge (2N KOH). Die Schläuche von Säure und Lauge mündeten über einen Y-Adapter in ein Zulaufrohr, dass ebenfalls über den Fermenterdeckel in den Bioreaktor führte.



**Abbildung 3.7** New Brunswick Bioflo C30 Fermentationseinheit zur kontinuierlichen Fermentation von Sm2011 und SmLPU63. AB: Überlaufbehälter; AK: Animpfkolben; BR: Bioreaktor; HE: Heizelement; L: Laugenbehälter; LM: Luftmengenmesser; PE: pH-Elektrode; pH: pH-Meter; PL; Schlauchpumpe für Lauge; PS: Schlauchpumpe für Säure; PZ: Schlauchpumpe für die Zufütterung; R: Rührerdrehzahlanzeige; RB: Reservoirbehälter für das Zulaufmedium; S: Säurebehälter; SE: Steuereinheit; T: Temperaturanzeige

#### ***Die 2 L-Bioreaktoren von B. Braun und Infors***

Die 2 L Rührkessel der B. Braun und Infors Fermentationseinheiten bestanden aus einem Glasgefäß mit Doppelmantel. Die aus Edelstahl gefertigten Fermenterdeckel enthielten Bohrungen mit Schraubgewinde und integrierten O-Ring-Dichtungen für die Durchführung der Zu- und Abluftstrecke (Abluftstrecke mit integrierter Kühlung), pH- und pO<sub>2</sub>-Elektrode, dem Steigrohr für die Probenahme (und Zufütterung; Infors) und der Einlage von Silkonsepten, die, mit Hilfe von Verschlussstopfen fixiert, zum Anstich des Inokulums und der Lösungen dienten. Eine Öffnung in beiden Rührkesseln wurde durch einen weiteren Edelstahl-

Blindstopfen verschlossen. Sie diente zur Befüllung des Fermenters mit dem Medium. Beim B. Braun Fermenter führten vier mit dem Deckel verschweißte Röhrchen in den Rührkesselraum, durch welche die Zugabe von Säure, Lauge, Antischaum und Zufütterungsmedium erfolgten. Der Infors Bioreaktor besaß nur zwei dieser Durchführungen, durch die Säure und Lauge gepumpt wurde. Die Zugabe des Antischaummittels erfolgte beim Infors Fermenter durch eine der beiden, innen hohle, Antischaumsonde. Das Zufütterungsmedium wurde mittels verschließbarer T-Verbindung über die Probenahmestrecke in den Fermenter gepumpt. Das Glasgefäß des B. Braun Bioreaktors besaß an der Seite unterhalb des Fermenterdeckels 4 zusätzliche Bohrungen im Glasgefäß, die durch Blindstopfen aus PEEK und Silikondichtungen verschlossen waren. In alle Zu- und Abluftstrecken aus Silikonschlauch wurden Sterilfilter (Porengröße Filtermembran: 0,2 µm) zur Vermeidung von Kontaminationen eingesetzt.

Die Rührerwelle des B. Braun Fermenters wurde durch einen Elektromotor angetrieben, dessen Flansch auf die Verzahnung der Rührerwelle gesteckt wurde. Diese war über eine Gleitringdichtung im Deckel montiert. Beim Infors Fermenter erfolgte der Antrieb der Rührerwelle über eine Magnetkupplung.

Beide 2 L Rührkessel waren an digitale Steuer- und Regeleinheiten gekoppelt, die zum einen die Datenaufzeichnung der verschiedenen Parameter (pH, pO<sub>2</sub>, Rührerdrehzahl, Temperatur, Signal Antischaumsonde und Pumpenlaufzeiten) gewährleistete und die diese Daten an einen angeschlossenen PC (INTEL-Prozessor: Pentium I; 120 MHz Taktfrequenz; 32 MB Arbeitsspeicher) weiterleitete (beim B. Braun Fermenter erfolgte die Kommunikation zwischen Steuereinheit und Computer über ein zwischengeschaltetes Interface). Die Steuer- und Regeleinheiten dienten außerdem zur Regelung der Pumpen, der Temperatur des Doppelmantels (integriertes Heiz- und Kühlelement) und des Antriebs. Die Eingabe der einzelnen Parameter erfolgte über die Steuerungssoftware auf dem Prozessrechner (MFCS-win; B. Braun und Windows IRIS NT; Infors) welche ebenso wie die Zusatzprogramme zu zeit-, pH- und pO<sub>2</sub>-abhängigen Zufütterungsstrategie an die Steuer- und Regeleinheiten übertragen wurden. An den Steuer- und Regelkonsolen beider Fermenter waren auch je vier Schlauchpumpen für die Zugabe von Säure, Lauge, Antischaum und Zufütterungsmedium montiert. Am Gehäuse der Einheiten war außerdem ein Luftmengenmesser mit Schwebekörper und manuell justierbarem Nadelventil zur Regulierung des Luftmengendurchflusses montiert.

#### **Anzucht der Vorkulturen für Fermentationen im 1 L- und 2 L-Maßstab**

Die Anzucht des Inokulums für die 1 L- und 2 L- Fermentationen erfolgte in zwei Schritten. 10 mL des in den Fermentationen verwendeten Mediums wurden unter der Reinraumwerkbank in ein steriles Kulturröhrchen mit Alu-Kappe gefüllt. Dazu wurden 400 µL einer aufgetauten -80 °C-Kultur des jeweils verwendeten Bakterienstamms (*S. meliloti* LPU63 oder *S. meliloti* 2011) pipettiert. Die Nährlösung im Kulturröhrchen enthielt 400 mg·L<sup>-1</sup> bzw. 600 mg·L<sup>-1</sup> Streptomycin. Die Bakterien wurden ü.N. auf dem Rotationsschüttler (Frequenz: 500 min<sup>-1</sup>) bei +28 °C inkubiert. 5 mL dieser ü.N. Kultur wurden zu 100 mL (50 mL) frischem Medium in einen 300 mL Animpfkolben mit drei Schikanen (kontinuierliche Kultivierung im 1 L Maßstab: ohne Schikane), Schlaucholive und Animpfnadel (Schott, Duran / Eigenanfertigung) gegeben. Die Kultivierung der Inokula erfolgte ü.N. bei +28 °C auf dem

Exzentrerschüttler (Frequenz:  $150 \text{ min}^{-1}$ ). Vor dem Animpfen der Fermenter mit den Vorkulturen wurden deren optische Dichten  $OD_{580}$  bestimmt.

#### **Probenahmen bei den 1 L- und 2 L-Tischfermentern**

Die Probenahme bei allen Tischfermentern erfolgte über Steigrohre, die über eine entsprechende Durchführung am jeweiligen Fermenterdeckel in den Rührkessel hineinragten, in zuvor mit einer 70 % (v/v) EtOH-Lösung sterilisierte Schraubglasgefäße (25 mL Vol.). Die Steigrohre waren über einen abklemmbaren Silikonschlauch mit einem Reservoirgefäß verbunden. In das wurde die Probe ( $V \cong 15 \text{ mL}$ ) mit Hilfe eines ebenfalls an das Reservoirgefäß gekoppelten Schlauch mit Sterilfilter und 30 mL Einmalspritze gesaugt. Nach dem Abklemmen der Probenahmeleitung wurde die Probenflüssigkeit über ein im Reservoirgefäß befindliches Steigrohr mit Hilfe der Spritze in das sterilisierte Probenahmegefäß gepresst. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde der Schlauch zum Probenahmegefäß nach jeder Probenahme ebenfalls abgeklemmt und dessen Ende in eine 70 % (v/v) EtOH-Lösung getaucht.

#### **Satzkultivierungen von S. meliloti LPU63 im 2 L-Fermenter bei verschiedenen pH-Werten**

Diese Kultivierungen wurden im 2 L B.Braun Biostat B. Fermenter mit MMM durchgeführt. Vor dem Einbau in den Fermenter erfolgte die Eichung der pH-Elektrode mit Eichlösungen des pH-Wertes 7,0 und 4,0. D-Mannitol, Natrium-Succinat, di-Kalium-hydrogen- und Kalium-di-hydrogenphosphate für 1,5 L Medium wurden zu 0,5 L Wasser in die Zufütterungsflasche gegeben. Die Medienbestandteile von Lösung 2 des MMM für 1,5 L Fermentationsmedium wurden in 1 L  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und anschließend in den Fermenter gegossen. Zusammen mit den über Silikonschläuche an den Fermenter angeschlossenen Flaschen für Säure, Lauge, Antischaum und Zufütterung wurde der komplett bestückte Rührkessel autoklaviert (20 min,  $121^\circ\text{C}$  und 1,4 bar). Nach dem Abkühlen des Fermenters erfolgte der Anschluss des Fermenters an die Steuereinheit. Anschließend wurde die gesamte Lösung aus der Zufütterungsflasche mit Hilfe der Schlauchpumpe in den Rührkessel gefördert. Dann erfolgte die Nullpunkteichung der  $p\text{O}_2$ -Elektrode. Nach ca. 30 min Begasung des Fermenters mit Luft wurde die 100 % Punkt-Eichung der  $p\text{O}_2$ -Elektrode vorgenommen. Mit Zugabe von  $\text{H}_3\text{PO}_4$  bzw. KOH wurde der für das jeweilige Experiment vorgesehene pH-Wert (7,0; 6,6; 6,2; 5,9 und 5,6) eingestellt. Dann erfolgte die Inokulation des Fermenters mit einer 100 mL ü.N. Vorkultur von SmLPU63 in  $\text{MMM} + 600 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Streptomycin. Die Fermentationen wurden bei  $+28^\circ\text{C}$ , einer Rührerdrehfrequenz von  $250 \text{ min}^{-1}$ , einem Lufteintrag von  $3 \text{ NL}\cdot\text{min}^{-1}$  für 47,5 - 51 h durchgeführt. Dem Fermenter wurden zur Bestimmung der optischen Dichte  $OD_{580}$ , der Zelltrockenmasse und zur offline pH-Messung 10 mL Proben entnommen. Die *offline* pH-Messung der Kulturproben aus der Fermentation wurde parallel an zwei Labor-pH-Metern vorgenommen. Diese pH-Meter wurden zuvor mit denselben Eichlösungen (pH 7,0 und 4,0) kalibriert, mit denen auch die Eichung der Fermenter-pH-Elektrode vorgenommen wurde.



#### ***Kontinuierliche Fermentationen mit S. meliloti LPU63 und 2011***

Die kontinuierlichen Fermentationen wurden mit einem analogen 1 L New Brunswick Scientific BioFlo C30 Bioreaktor am Institut für Fermentationstechnik (CINDEFI) der Universidad Nacional de La Plata (Republica Argentina) durchgeführt.

Der Fermenter wurde mit 450 mL Mannitol-Minimal-Medium (MMM) befüllt und zusammen mit den Flaschen für Säure und Lauge und dem Glasbehälter mit 20 L Zufütterungsmedium im Autoklaven bei 121 °C für 25 min sterilisiert. Nach der Sterilisation erfolgte die Zugabe der zuvor sterilfiltrierten Vitamin- und Luteolinlösung (2 µM) mit Hilfe einer Einmalspritze über das im Fermenterdeckel und der Reservoirflasche befindlichen Gummisepten. Der 20 L Reservoirbehälter mit dem frischen Medium wurde über eine Schlauchleitung mit angeschlossener Animpfnadel mit dem Bioreaktor verbunden. Das Volumen der Vorkultur, mit der die 450 mL Medium im Fermenter angeimpft wurden, betrug 50 mL.

Die Kultivierung wurde bei +28 °C, einem Start-pH von 6,8 und einer Frequenz des Rührers von 300 min<sup>-1</sup> durchgeführt. Der Lufteintrag betrug 0,5 NL·min<sup>-1</sup>. Die Zulaufpumpe für frisches Medium wurde 24 h nach der Inokulation des Fermenters eingeschaltet. Die Pumpe wurde auf einen Volumenstrom  $V = 30 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$  eingestellt, was einer Raumgeschwindigkeit (Verdünnungsgeschwindigkeit) von  $D = 0,06 \text{ h}^{-1}$  (= 1,44 d<sup>-1</sup>) entsprach. Jeden Tag wurde dem Fermenter eine Probe von 40 mL entnommen. Der pH-Wert der Probe wurde mit einem externen Labor pH-Meter überprüft. Zudem erfolgte eine Bestimmung der Zelltrockenmasse und der optischen Dichte OD<sub>580</sub>. Nachdem sich die Raumgeschwindigkeit  $D = 0,06 \text{ h}^{-1}$  und der pH-Wert der Kultur (6,8) nach vier Tagen auf die vorgegebenen Werte eingestellt hatten, erfolgte die Entnahme von 250 mL Kulturflüssigkeit zur Aufkonzentrierung der in ihr enthaltenen Nod-Faktoren (s. oben) über das Steigrohr aus dem Bioreaktor. Anschließend wurde der Fermenter mit frischem Medium aus der Zufütterungsflasche wieder aufgefüllt (Volumenstrom  $V = 30 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ ), bis das Volumen von 500 mL Fermentationsbrühe wieder erreicht war. Stufenweise wurde dann der pH-Wert über die nächsten drei Tage um jeweils 0,2 Einheiten auf pH 6,2 abgesenkt. Für vier weitere Tage erfolgte wieder die Kontrolle von pH-Wert, OD<sub>580</sub> und ZTM. Nach dem elften Tag wurde die kontinuierliche Fermentation der Bakterien beendet. Die 500 mL Fermentationsbrühe wurden für die Extraktion der Nod-Faktoren bei 6.000 min<sup>-1</sup> für 1 h zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde eingefroren und 200 mL des Überstandes wurden zur Extraktion der in ihm enthaltenen Nod-Faktoren eingesetzt.

#### ***3.5.2 Aufarbeitung und Analyse der Nodulationsfaktoren aus Fermentationen im 1 L- und 2 L-Maßstab***

##### ***Extraktion von Nod-Faktoren aus Fermentationsüberständen mittels Festphasenextraktion***

Die Equilibrierung der Festphasenextraktionskartuschen (Megabond-Elut C<sub>18</sub>; Varian): 12 mL Kartuschenvolumen, 2 g Matrix) erfolgte mit 10 mL MeOH und anschließend mit 10 mL Wasser (Volumenstrom  $V = 2,9 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ). 200 mL mikrofiltrierter Fermentationsüberstand (Nitrozellulosefilter, Porengröße 3 µm) wurden in den Reservoirbehälter aus **Abbildung 3.8** gefüllt, mit 10 mL MeOH

≅ 4,8 % (v/v) versetzt, kurz geschüttelt und mit der Festphasenextraktionssäule über ein Fallrohr verbunden. Der Überstand wurde mit einer Schlauchpumpe durch die Extraktionssäule in den Abfallbehälter gepumpt (Volumenstrom,  $V = 2,9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Nachdem der Fermentationsüberstand vollständig durch die Kartusche gelaufen war, wurde diese mit 2 x 10 mL Wasser gewaschen und die Nod-Faktoren anschließend mit 2 mL Acetonitril von der  $C_{18}$ -Matrix eluiert (Volumenstrom,  $V = 2,9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Das Volumen von 2 mL Acetonitril wurde insgesamt 3 x je Elution durch die Kartusche laufen gelassen.

#### ***Analytische ( $RP_{18}$ ) HPLC der Fermentationsüberstände aus kontinuierlichen Fermentationen***

Die Analyse der Proben aus den kontinuierlichen Fermentationen in Argentinien wurden mit einer HPLC-Anlage von Beckman (Pump Unit 126 und UV-vis Detector 166) durchgeführt. Das aufkonzentrierte Eluat der Nod-Faktoren aus 200 mL Fermentationsüberstand (2 mL) wurde bei  $14.000 \text{ min}^{-1}$  für 10 min zentrifugiert und anschließend je 400  $\mu\text{L}$  auf fünf sterile 1,5 mL Eppendorfgefäße verteilt. Zum Vergleich wurden 0,107 mg Nod-Faktoren aus einem Satzprozess mit Sm1021pEK327 in 1 mL 5% (v/v) Acetonitril : 95 % (v/v) Wasser gelöst, bei  $14.000 \text{ min}^{-1}$  für 10 min zentrifugiert und auf drei Aliquots á 330  $\mu\text{L}$  verteilt.



---

**Abbildung 3.8** Versuchsaufbau zur Extraktion von Nod-Faktoren aus ultrafiltrierten Überständen von Satz- und kontinuierlichen Fermentationen mit dem säuretoleranten Bodenbakterium SmLPU63. R: Reservoir mit Belüftungsöffnung; SPE: Festphasenextraktionskartusche; P: Schlauchpumpe; C: Abfallbehälter

### 3 Material und Methoden

Alle Chromatographieläufe wurden mit folgender Säule durchgeführt:

Verwendete Chromatographiesäule Vertex-Stahlsäule: 250 mm Länge x 4 mm I.D.  
Verwendetes Säulenmaterial Licospher 100-RP<sub>18</sub> endcapped  
Partikelgröße: 5 µm  
Porengröße: 10 nm

Der UV-vis-Detektor der in Argentinien vorhandenen HPLC-Anlage von Beckman wies eine deutlich geringere Auflösungsvermögen auf als der Applied Biosystems Detektor am Lehrstuhl für Fermentationstechnik, Universität Bielefeld. Aus diesem Grund wurde in der analytischen RP<sub>18</sub>-HPLC dort zur Erzielung einer möglichst hohen Auflösung der einzelnen Peaks die Elution nicht isokratisch mit 36 % (v/v) Acetonitril (AN) / 64 % (v/v) H<sub>2</sub>O + 40 mM Ammoniumacetat durchgeführt, wie unter 3.3 beschrieben. Es wurde statt dessen der in **Tabelle 3.7** dargestellte Gradient mit der Pumpeneinheit verwendet:

**Tabelle 3.7** Gradientenverlauf und Volumenströme in der RP<sub>18</sub>-HPLC zur Analyse der aufkonzentrierten Nod-Faktoren aus den kontinuierlichen Fermentationen (Argentinien)

Vorlagegefäß **Pumpe A**: Wasser

Vorlagegefäß **Pumpe B**: Acetonitril

Zeit, <i>t</i> [ min ]	Pumpe A [ %-Anteil <i>V</i> ]	Pumpe B [ %-Anteil <i>V</i> ]	<i>V</i> [ mL min <sup>-1</sup> ]	Gradientenform
0	83	17	1,55	---
5	83	17	1,55	---
20	0	100	1,55	Linear
22,5	0	100	1,55	---
22,6	83	100	1,55	Linear
25	83	100	1,55	---

Das Volumen der Probeschleife betrug 100 µL. Die Probenaufnahme erfolgte manuell mit einer 1 mL Einmalkanüle über ein externes 6-Wegeventil. Die Detektion des Eluats erfolgte über den UV-vis-Detektor bei 220 nm. Die HPLC-Anlage war an einen PC (286-Prozessor, 16 MHz (INTEL), 1 MB Arbeitsspeicher) gekoppelt. Die Steuerung der Anlage und die Datenaufzeichnung erfolgte über das Programm „System Gold“ der Fa. Beckman

#### **Zulaufkultivierungen von *S. meliloti* LPU63 in TY- und Melassemedium mit unregelmäßiger Zufütterung**

Die Zulaufkultivierungen im 2 L Maßstab wurden im B.Braun- und Infors-Fermenter durchgeführt. 1,5 L des jeweils verwendeten Mediums wurde in den komplett bestückten Fermenter gefüllt. In die Flasche für das Zulaufmedium wurden 450 mL eines Zehnfach-Konzentrat des Mediums angesetzt, das aus 150 g Melasse

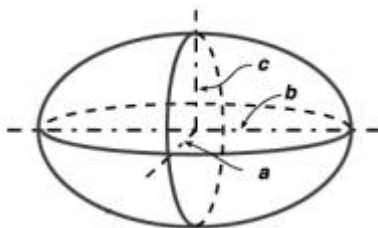
und 7,5 g Harnstoff bzw. 25 g Trypton, 15 g Hefeextrakt und 2 g  $\text{CaCl}_2$  bestand, jeweils auf 0,5 L Wasser aufgefüllt und vor der Sterilisation auf pH 6,8 eingestellt wurde. Anschließend erfolgte die Sterilisation der Fermenter inklusive der über Silikonschläuche angeschlossenen Flaschen für Säure, Lauge, Antischaum und Mediumkonzentrat. Nach der Sterilisation erfolgte die Ankopplung des Wasserkreislaufs der Steuereinheiten für die Temperierung des Fermenters und für die Abluftkühlung, der Anschluss der pH-Elektrode, der  $\text{pO}_2$ -Elektrode, der Antischaumsonden, das Einlegen der Silikonschläuche in die entsprechenden Schlauchpumpen an der Steuereinheiten und das Aufsetzen des Rührermotors. Nach Erreichen des Startparameter für Temperatur, Rührerdrehzahl und pH erfolgte die Anstich des Fermenters mit der Vorkultur über das im Deckel vorhandene Septum. Die Kultivierung erfolgte bei einer Rührerdrehzahl von  $600 \text{ min}^{-1}$ , einer Temperatur von  $+28 \text{ }^\circ\text{C}$ , einem Lufteintrag von  $3 \text{ NL} \cdot \text{min}^{-1}$  und einem pH von 6,8. Die Zuschaltung der Zufütterungspumpe erfolgte von Hand, je nach Experiment in Abhängigkeit von der optischen Dichte zwischen 18-25 h nach Start der Fermentation. Das Zehnfach-Medium-Konzentrat wurde mit einem konstanten Volumenstrom von  $V = 18 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$  in die Fermenter gefördert. Bei allen dem Fermenter entnommenen Proben erfolgte die Messung der optischen Dichte ( $\text{OD}_{580}$ ), die Bestimmung der Zelltrockenmasse (ZTM) und bei einem Teil der Experimente auch die Bestimmung der Lebendzellzahl (cfu). Die Kultivierungen wurden nach drei bzw. vier Tagen beendet, wenn bei Messung der optischen Dichte  $\text{OD}_{580}$  keine signifikante Zunahme der Biomasse mehr feststellbar war.

#### **Lichtmikroskopische Aufnahmen von Proben aus Fermentationen mit *S. meliloti* LPU63**

Zur vergleichenden, optischen Begutachtung der Bodenbakterien in den Zulauf-Kultivierungen mit Melasse- und TY-Medium wurden  $9 \mu\text{L}$  einer unverdünnten Fermentationslösung auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Mikroskopie erfolgte bei 1.000-facher Vergrößerung mit Immersionsöl im Phasenkontrast direkt nach der Probenahme aus dem Fermenter. Einzelbilder von den verschiedenen Proben wurden mit einer digitalen Videokamera aufgezeichnet.

#### **Ermittlung des Zellvolumens von *S. meliloti* LPU63 Zellen**

Zur Berechnung des Zellvolumens wurden Länge und Durchmesser von je 25 einzelnen Zellen eines Mikroskopbildes anhand des im Mikroskopokular vorhandenen Größenmaßstabs ausgemessen. Aus den Einzelwerten wurde der Mittelwert bestimmt und diese Daten für die Kalkulation des Zellvolumens herangezogen.



**Abbildung 3.9** Darstellung eines Rotationsellipsoids. a,b,c: Symmetrieachsen

Die Berechnung des Zellvolumens erfolgte unter der Annahme, dass die einzelnen Zellen einen rotationssymmetrischen Aufbau, wie in **Abbildung 3.9** dargestellt, besitzen mit  $a = c$ . Für die Volumenberechnung wurde die Längsachse (2 b) als Drehachse festgelegt. Das Zellvolumen berechnet sich dann nach **Gleichung 3.5** zu:

$$V_{\text{Zell}} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot a^2 \cdot b \quad \text{(Gleichung 3.5)}$$

mit  $a = \frac{1}{2}$  Durchmesser einer Zelle und  $b = \frac{1}{2}$  Länge einer Zelle

### ***pH-geregelte Zufütterung bei Zulaufkultivierungen von S. meliloti LPU63 in Melassemedium***

Der Stamm *S. meliloti* LPU63 besitzt die Eigenschaft, bei einer Kultivierung in einer Nährlösung auf Basis von Melasse alkalische Substanzen in das ihn umgebende Medium abzugeben. Die Menge der von *S. meliloti* LPU63 ins Medium abgegebenen basischen Substanzen steigt bis zu einem Biotrockenmassegehalt von  $\leq 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  direkt proportional zur Biomassekonzentration im Fermenter an. Da bei den Fermentationen von *S. meliloti* LPU63 in Melassemedium das pH bei konstant 6,8 gehalten wurde, nahm mit zunehmender Bakterienzahl im Rührkessel auch der Verbrauch an  $\text{H}_3\text{PO}_4$  zu. Dieser Effekt wurde für eine an die Säuredosierung gekoppelte Zufütterungsstrategie von SmLPU63 mit einem Melasse 10-fach Konzentrat genutzt. Die Regelung der Zufütterungspumpe wurde direkt an das Laufsignal der Säure-Pumpe gekoppelt (Programm: s. Anhang, **7.1**). Weicht das pH um 0,1 Einheiten vom Sollwert (sp) 6,8 nach oben ab, so wird die Säurepumpe (Acid pump) für  $3 \text{ s} \cdot \text{min}^{-1}$  (Sp 5 = 5 % von 60 Sekunden) angestellt (Sp 5  $\rightarrow$  V = 0,83 mL). Dieser Zyklus wiederholt sich so lange, bis die entsprechende Menge an 10 %-iger  $\text{H}_3\text{PO}_4$  zur Fermentationslösung zugegeben wurde, um den pH-Wert wieder auf 6,8 einzustellen. Parallel zur Aktivierung der Säurepumpe erfolgt auch die Zuschaltung der Zufütterungspumpe (*feed pump*). Um bei geringer Bakterienzahl zu Beginn der Kultivierung keine zu hohen Mengen an Zufütterungsmedium (10-fach Melasse-Konzentrat) in die Fermentationslösung zu pumpen, wird die Gesamtlaufzeit der Säurepumpe (*acid pump.v*) in s als Regelgröße für den Sollwert der Substratpumpe genommen und dieser Wert mit dem Faktor 0,25 multipliziert. Wenn im Verlauf der Fermentation durch die angewachsene Bakterienzahl eine größere Menge an alkalischen Substanzen in das Melassemedium sekretiert wird, steigt der Wert der Gesamtlaufzeit der Säurepumpe zwangsläufig an. Daraus resultiert dann auch eine längere Pumpenlaufzeit der Substratpumpe. Ist eine Gesamtlaufzeit der Säurepumpe

von 400 s erreicht, dann fördert ab diesem Zeitpunkt die Substratpumpe permanent mit einem Volumenstrom von  $V = 18 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  so lange wie die Säurepumpe aktiviert wird.

#### ***pO<sub>2</sub>-geregelt* Zufütterung bei Zulaufkultivierungen von S. meliloti LPU63 in Melassemedium**

Die Bilanz des Gelöstsauerstoffanteils ( $p\text{O}_2$ ) in einer Nährlösung ist ein Maß für die Stoffwechselaktivität der in der Lösung vorhandenen Bodenbakterien. Sinkt der Anteil der wichtigsten Nährstoffe in der Fermentationslösung unter ein bestimmtes Mindest-Niveau, so stellen *Rhizobien* ihren Stoffwechsel um. Diese Umstellung wirkt sich auch auf ihre Aufnahme von Sauerstoff aus der Fermentationsbrühe aus. Der Gehalt an Gelöstsauerstoff im Medium steigt in Folge der Stoffwechselumstellung an, da der Sauerstoffbedarf der Zellen abnimmt. Auf Basis dieser Beobachtung lässt sich die Dosierung von Medium zur Fermentationslösung in einer Zulaufkultivierung in Abhängigkeit vom  $p\text{O}_2$  regulieren (Programm: s. Anhang, 7.1). Die Kultivierung der *S. meliloti* LPU63 findet bei einem konstantem pH von 6,8 und einer Temperatur von +28 °C statt. Gestartet wird mit einer Rührerdrehfrequenz von  $150 \text{ min}^{-1}$ , anders als in den Zulaufkultivierungen mit einem konstanten Volumenstrom der Zufütterungspumpe. Die Regelung wird aktiviert, nachdem der  $p\text{O}_2$  den vorgegebenen Sollwert von 50 % während der Fermentation erstmalig unterschritten hat. Erreicht der  $p\text{O}_2$  einen Wert von nur noch 30%, so wird die Rührerdrehfrequenz um 2 % erhöht. Sinkt der  $p\text{O}_2$  erneut unter die 30% -Grenze, erhöht sich die Drehfrequenz um weitere 2 % usw. Überschreitet der  $p\text{O}_2$  dann den Wert von 50 % in Folge des Nährstoffmangels, so wird die Zufütterungspumpe angeschaltet (Setpoint 20 →  $V = 3,6 \text{ mL}$ ). Die Bakterien setzen das frisch zugefütterte Medium um, verbrauchen dabei wieder Sauerstoff, deshalb sinkt der  $p\text{O}_2$  im Medium dann wieder unter die 50 % Marke und die Regelung setzt erneut ein, sobald das Medium vollständig von den Bakterien aufgebraucht ist und der  $p\text{O}_2$  wieder ansteigt. Diese Regelung wiederholt sich so lange, bis die ca. 450 mL des 10-fach Melasse-Konzentrats zugefüttert worden sind.

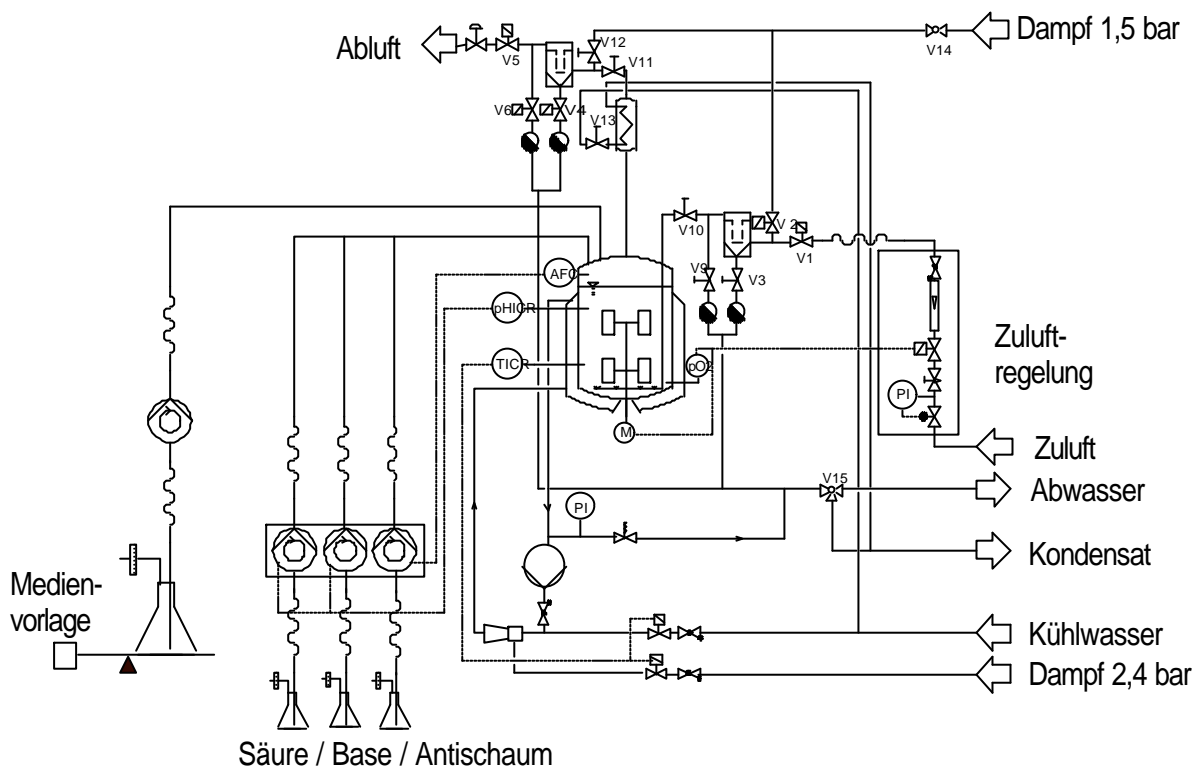
#### **3.5.3 Fermentationen im 20 L-Maßstab zur Gewinnung von Nodulationsfaktoren**

##### **Der 30 L Bioreaktor von MBR**

Die **Abbildung 3.10** zeigt ein Schema des 30 L Bioreaktors und seiner Peripherie, wie er in dieser Arbeit verwendet wurde. In Abänderungen (keine Dampfsterilisierbarkeit) kann dieses Schema auch auf die Tischfermenter angewendet werden, die in dieser Arbeit genutzt wurden.

Der 30 L Fermenter von MBR war aus einem doppelwandigen Stahlgefäß mit einem integrierten, ovalem Schauglas gefertigt. Der Deckel des Fermenters aus Edelstahl enthielt Durchführungen mit integrierten Schraubgewinde für eine Antischaumsonde, einen Druckaufnehmer, Zuluftstrecke und Abluftstrecke mit integrierter Kühlung, für ein Manometer, eine Dampfzuleitung, über ein T-Stück kombiniert mit einer 9 mm I.D. Einlassstrecke, sechs Bohrungen für die Montage von Silikonsepten, die über stählerne Verschlussstopfen in der Bohrung fixiert wurden

und einem verschließbaren Einfüllstutzen für die Medienzugabe. In die Abluftstrecke war ein Ventil zur Regulierung des Fermenterinnendrucks eingebaut. Ein Pt-100 Temperaturfühler und ein dampfsterilisierbares Probenahmeventil führten durch den Fermenterboden. Die sieben 25 mm Normstutzen an der Seite des Fermenters dienen u.a. der Durchführung von pH-Elektrode, pO<sub>2</sub>-Elektrode, Trübungssonde, einem weiteren dampfsterilisierbaren Probenahme-Ventil und einer dampfsterilisierbaren Auslassstrecke (9 mm Ø) in den Rührkessel. Nicht benötigte Stutzen wurden durch Edelstahlanschübe mit integriertem O-Ring und einer Überwurfmutter verschlossen. Die Beheizung und Kühlung des Fermenters erfolgte über den Doppelmantel, in den Dampf (2,5 bar) oder Kühlwasser aus der Hausversorgung zur Temperaturregulierung eingeleitet wurde.



**Abbildung 3.10**

Schematische Darstellung des 30 L MBR-Fermenters. AFC: Regelkreis für die Antischaummitteldosierung; M: Motor; pHICR: pH-Messung und Regelung von Säure- und Laugezugabe; PI: Druckmessung; TICR: Temperaturmessung und -regelung; V: Ventile. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung durch Herrn Dipl.-Ing. T. Schäffer, Universität Bielefeld)

Die Frischluft wurde über eine Schlauchstrecke mit Sterilfilter durch einen Luftmengenmesser und -regler und von dort aus über die dampfsterilisierbare Zuluftstrecke in den Begasungsring des Fermenter geführt. Der Antrieb der Rührerwelle erfolgte von unten durch den Fermenterboden über einen Elektromotor mit Magnetkupplung. Der komplette Fermenter mit Rührermotor, Dampf- und Kühlwasserverteilung war auf einem Gestell mit integrierten Wägesensoren montiert. Eine Pumpeneinheit mit drei Schlauchpumpen sorgte für die Förderung von Säure, Lauge und Antischaum. Diese war mit der Steuer- und Regeleinheit verbunden.

Die Steuer- und Regeleinheit (IMCS 2000) des 30 L Fermenters besaß sowohl analoge als auch digitale Meß- und Regeleinschübe für Temperatur, Druck (im Fermenterinnenraum), Antischaum, pH,  $pO_2$ , Gewicht des Fermenters und Luftmenge. Die Steuereinheit war über VME-BUS Schnittstellen an einen zentralen Prozessrechner gekoppelt, der für die Datenaufnahme und Regelung von insgesamt zwei Fermentern ausgelegt war.

Der Prozessrechner basierte auf einem modularen Steckkartensystem mit einem PME 68-25M Prozessor (Motorola), einer Taktfrequenz von 25 Mhz und einem Arbeitsspeicher von 4 MB. Der Rechner verfügte über ein analoges Eingangsmodul mit 32 Eingängen, zwei analogen Ausgangsmodulen mit je acht Ausgängen, zwei digitalen Ausgangsmodulen mit 32 Ausgängen und einem seriellen Ein- / Ausgangsmodul mit 8 seriellen Schnittstellen. Visualisiert wurden Messdaten und Parameter über ein VT340-Terminal. Der Rechner war mit dem Betriebssystem OS9 ausgestattet, die Fermentersteuerung und -regelung wurde über das Prozessleitsystem CAROLINE II (PCS) geführt, zur Programmierung und Variierung der Steuerung diente ein UMACS-Compiler.

#### **Anzucht der Vorkulturen für Fermentationen im 20 L-Maßstab**

Die Anzucht der Vorkultur für den 30 L MBR-Fermenter erfolgte in zwei Stufen. Zwei Kulturröhrchen mit je 10 mL des in der Fermentation verwendeten Mediums wurde mit 400  $\mu$ L einer aufgetauten  $-80^\circ$  C-Glyzerinkultur des Produktionsstamms *S. meliloti* 1021pEK327 angeimpft. Zu dem Medium wurden  $7,5 \text{ mg L}^{-1}$  Tetrazyklin gegeben und die Kultur wurde bei einer Frequenz von  $500 \text{ min}^{-1}$  auf dem Reagenzglasschüttler über Nacht angezogen. Der Inhalt beider Röhrchen wurde unter der Reinraumwerkbank zu 400 mL sterilem, ebenfalls Tetrazyklin-haltigem ( $7,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) Medium in einen 1.000 mL Animpfkolben mit Schlaucholive, Animpfnadel und 4 Schikanen (Schott, Duran - Eigenanfertigung) gefüllt. Das Inokulum wurde ü.N. bei  $+28^\circ \text{ C}$  auf dem Exzentrerschüttler (Frequenz  $200 \text{ min}^{-1}$ ) kultiviert. Vor dem Animpfen des Fermenters mit der Vorkultur wurde deren optische Dichte  $OD_{580}$  bestimmt.

#### **Satzkultivierungen mit *S. meliloti* 1021pEK327 zur Produktion von Nod-Faktoren im 20 L-Maßstab**

Alle Kultivierungen zur Produktion von Nod-Faktoren, sowohl Satzkultivierungen mit anschließender Adsorption der Nod-Faktoren als auch jene im Bypass-Verfahren mit integrierter Adsorptionskolonne, erfolgten im 30 L MBR-Rührkessel. Vor dem Befüllen des Fermenters mit dem zu sterilisierenden Medium erfolgte die Eichung der pH-Elektrode mit Puffern des pH-Wertes 7,0 und 4,0. Anschließend wurde der Elektrodenkopf durch einen der Normstutzen an der Seite des Bioreaktors in den Rührkessel eingeführt und festgeschraubt. Die Medienbestandteile der Lösungen 1 + 2 des Mannitol-Minimalmediums wurden für 20 L eingewogen, in 4 L  $H_2O$  gelöst und diese Lösung in den Fermenter gegossen. Der Fermenter wurde mit weiteren 16 Litern desionisiertem Wasser aus der Hausleitung auf ca.  $20 \text{ L} \cong 20 \text{ kg}$  Gesamtflüssigkeitsvolumen aufgefüllt (kontrolliert über die Waage des Fermenters). Die Einfüllöffnung wurde mit einem Blindstopfen verschlossen, die Antischaumsonde und die Zuluftstrecke zwecks



Kopfraumbegasung in den Fermenter abgesenkt. Die Sterilisation des Mediums erfolgte bei 121 °C und  $\cong$  1,2 bar für 20 min.

Nach dem Abkühlen auf die Fermentationstemperatur von +28 °C wurden über ein Septum die sterilfiltrierten Zusatzlösungen (Vitamine, Antibiotika u.ä.) mit Einwegspritzen ( $V = 20$  mL) und steriler Metallkanüle in den Fermenter injiziert. Durch ein weiteres Septum wurde die abgeflämmte Dreifach-Anstichnadel für Säure (10 %  $H_3PO_4$ ), Lauge (2N KOH) und Antischaum (PE 8100) gestoßen und verschraubt. Die Antischaumsonde wurde 10 cm über dem Flüssigkeitspegel des Medium justiert. Die Zuluftstrecke wurde für die Begasung des Mediums zurück in die obere Position gebracht und die Luftzufuhr geöffnet. Nach einer halben Stunde erfolgte das Animpfen des Fermenters mit der Vorkultur. Hierfür wurde die Luftzufuhr in den Fermenter kurzfristig unterbrochen. Der Anstich mit der Vorkultur von *S. meliloti* 1021pEK327 wurde über ein weiteres Septum im Fermenterdeckel mit der an dem Vorkulturkolben befindlichen, abgeflämmten Anstichnadel vorgenommen. Die Zuluftstrecke wurde nach Beimpfung des Fermenters wieder geöffnet. Die Satzkultivierungen mit anschließender Aufarbeitung der Nod-Faktoren erfolgten bei einem Lufteintrag von  $10 \text{ NL} \cdot \text{min}^{-1}$ , einer Rührerdrehfrequenz von  $500 \text{ min}^{-1}$  und einem Differenzdruck gegen Luft im Rührkessel von  $p_{inn.} = +0,2$  bar. Die Versuche mit Zuschaltung der Bypasssäule zur Adsorption der Nod-Faktoren im Fermentationsprozess wurden dagegen bei einer Rührerdrehfrequenz von nur  $250 \text{ min}^{-1}$  oder  $300 \text{ min}^{-1}$ , einem Differenzdruck gegen Luft von  $p_{inn.} = 0,0$  bar und einem erniedrigten Lufteintrag von  $4 \text{ NL} \cdot \text{min}^{-1}$  durchgeführt. Alle Fermentationen erfolgten bei einem pH-Wert von 6,8 und bei +28°C.

#### **Trübungsmessung im 30 L-MBR-Fermenter**

Der Einbau der Infrarot-Streulicht-Trübungssonde erfolgte an einem der seitlichen 25 mm Normstutzen des 30 L MBR-Fermenters jeweils vor der Befüllung des Rührkessels mit Medium. Direkt nach Zugabe des Inokulums wurde der Messwertverstärker manuell auf die höchste Empfindlichkeitsstufe eingestellt. Dann erfolgte die Nullpunktjustierung der Trübungssonde über den Kompensations-Regler. Zur Glättung der Messsignale wurde die Integrationszeit auf 10 s gesetzt. Die Ablesung der Trübungswerte (0 - 99,9 % = 0 - 20 mA) erfolgte jeweils zu den Probenahmezeitpunkten. War auf dem Display der Maximalwert von 99,9 % erreicht, wurde die nächstniedrigere Empfindlichkeitsstufe (Stufen: 30, 10, 3, 1) an dem Messgerät eingestellt. Jeder abgelesene Messwert wurde vor seiner Erfassung durch den Faktor der eingestellten Empfindlichkeitsstufe dividiert. Die an dem Gerät vorzunehmende manuelle Umstellung der Verstärkungsstufe während einer Kultivierung ermöglichte keine automatische Aufzeichnung des Trübungssonden-Messsignals über den gesamten Fermentationsprozess durch den Prozessrechner des MBR-Fermenters.

#### **Probenahmen bei den Fermentationen im 30 L-Fermenter**

Die Probenahme am 30 L MBR-Fermenter erfolgte bei Tag manuell über ein mit Dampf sterilisierbares Probenahmeventil in ein mit 70 % (v/v) EtOH-Lösung zuvor sterilisiertes Schraubglasgefäß (25 mL Vol.). Über Nacht wurde die Fermentationslösung automatisch alle drei bzw. vier Stunden über eine mit dem

Fermenter verbundene Schlauchleitung (1 mm I.D.) per zeitgesteuerter Schlauchpumpe in zuvor autoklavierte, bei +4 °C gekühlte 5 mL-Reagenzgläser gepumpt. Die Probenverteilung wurde dabei durch einen Fraktionssammler sichergestellt.

#### **3.5.4 Gewinnung und Analyse der Nodulations-Faktoren aus Fermentationen im 20 L-Maßstab**

##### ***Adsorption von Nod-Faktoren während einer Satzfermentation mittels integrierter Wirbelschichtkolonne***

Die Extraktion der Nod-Faktoren während einer laufenden Fermentation erfolgte mit einer Adsorptionskolonne aus Glas, die in **Abbildung 3.11** dargestellt ist. Die Säule hatte eine Länge von 500 mm und einen Innendurchmesser von 38 mm mit einem Gesamtvolumen von 567,1 mL. Die Säule wurde mit 200 g Amberlite® XAD-2 pract. Harzkugeln (feucht) gefüllt. Die Spezifikation des Harzes sind der **Tabelle 3.5** zu entnehmen. Um einen Austrag der Harzperlen während des Betriebs der Säule zu vermeiden, wurde ein Polyamidgewebe (150 µm Maschenweite, 38 µm Fadenstärke) jeweils zwischen zwei Silikondichtringen am Einlass und am Auslass mit den Edelstahlflanschen (Eigenbau mit Schlaucholiven; I.D.: Einlass 10 mm, I.D. Auslass: 8 mm) fixiert. Das Bett der gepackten Harzperlen besaß ein Volumen von 260 mL. Die Betthöhe der Schüttung betrug 229 mm. Daraus resultierte eine maximal mögliche Expansion von  $h/h_{0,max}$ : 2,18. Die Equilibrierung und Sterilisierung der Säule erfolgte durch Umpumpen einer 70 % (v/v) EtOH-Lösung für 30 min (Volumenstrom,  $V$ : 400 mL·min<sup>-1</sup>). Nach dem vollständigen Abpumpen der EtOH-Lösung aus der Säule wurden die Triclamp-Anschlüsse am Ende von Zu- und Ablaufschlauch abgeflämmt und sofort an die seitlichen Aus- und Einlassöffnungen des 30 L MBR-Fermenters gekoppelt. Die Schlauchpumpe wurde 21,75 h bzw. 25,5 h in Abhängigkeit vom Messwert der optischen Dichte OD<sub>580</sub> bei der jeweiligen Fermentation nach dem Fermentationsstart eingeschaltet und die Ventile der Fermenterzu- und -abführung geöffnet. Der Volumenstrom der Fermentationsflüssigkeit durch die Säule lag bei  $V \cong 50$  mL·min<sup>-1</sup>. Nach Ende der Kultivierungen (43 h bzw. 54 h) wurde die in der Säule verbliebene Fermentationsbrühe in den Bioreaktor zurückgepumpt.

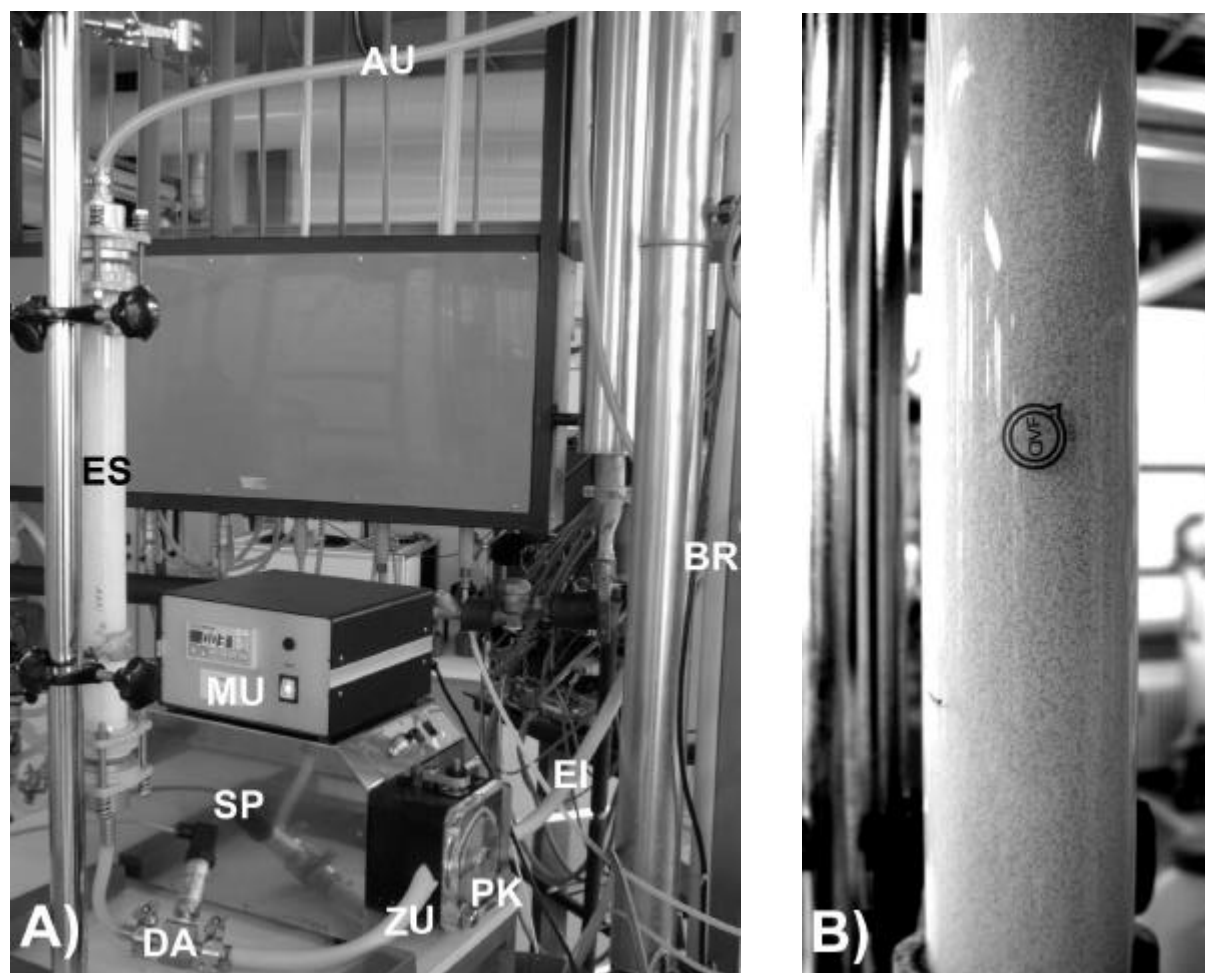
##### ***Biomasseabtrennung mittels Querstrom-Ultrafiltration***

Die in einem Satzprozess erzeugte Fermentationsbrühe ( $V = 20$  L) wurde mit einer Centrassette (Pall Gelman Science) Ultrafiltrationseinheit GH 830 in einem zweistufigen Prozess aufgearbeitet. Verwendet wurden im ersten Schritt zur Biomasseabtrennung vier Filterkassetten mit einem MWCO von 1 MDa. Die Gesamtfilterfläche der vier Kassetten betrug 1,84 m<sup>2</sup>. Die Fermentationsflüssigkeit wurde aus dem Fermenter in eine 25 L Kunststoff-Vorratsflasche gefüllt und von dort mit einem Volumenstrom von  $V = 900$  L·h<sup>-1</sup> durch die Filtermodule gepumpt, das Retentat gelangte zurück in den Behälter mit der Fermentationsbrühe und wurde bis auf ein Volumen von 2 L eingeeengt. Der von der Biomasse abgetrennte Fermentationsüberstand mit einem Volumen von ca. 18 L wurde in einem weiteren Kunststoff-Vorratstank aufgefangen und in einem weiteren Filtrationsschritt mittels zweier Filterkassetten mit einem MWCO von 5 kDa weiter aufgereingt. Das Filtrat

wurde bis zur weiteren Aufarbeitung ( $D_{\text{Lagerung,max}} = 24 \text{ h}$ ) bei +4 °C in einer 20 L Kunststoff-Vorratsflasche gelagert.

#### **Extraktion der Nod-Faktoren aus einer ultrafiltrierten Fermentationslösung**

Für die Extraktion der Nod-Faktoren aus ultrafiltrierten Fermentationsüberständen wurde ein modifizierter Aufbau der in **Abbildung 3.11** gezeigten Anlage verwendet. Im Gegensatz zu dem an die Fermentation gekoppelten Extraktionsprozess wurde an Stelle der dort gezeigten Heraeus-Schlauchpumpe (SP) eine regulierbare Zahnradpumpe von Iwaki verwendet. Schlauchzu- (EI) und -abführung (AU) mündeten in einen 25 L Kunststoffbehälter, der den ultrafiltrierten Fermentationsüberstand enthält.



**Abbildung 3.11**

A) Versuchsaufbau zur Extraktion von Nod-Faktoren aus 20 L Fermentationen im Bypassverfahren. AU: Schlauchverbindung zum Fermenter; BR: Bioreaktor; DA: Druckaufnehmer; EI: zuführende Schlauchleitung aus dem Bioreaktor; ES: Adsorptionssäule (mit Harzkugeln gefüllt); MU: Druckmessumformer; PK: rotierender Pumpenkopf mit sechs Rollen; SP: Schlauchpumpe; ZU: Schlauchzuführung zur Adsorptionskolonne. B) Wirbelschichtkolonne im Betrieb, durchströmt mit einer Fermentationslösung ( $V = 50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ )

Zu dem 18 L Fermentationsüberstand wurden 900 mL EtOH p.A. gegeben, um die Adsorption der Nod-Faktoren zu optimieren. Die Equilibrierung der Säule erfolgte wie oben durch Umpumpen einer 70 % (v/v) EtOH-Lösung für 30 min ( $V \cong 390 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Nach vollständigem Abpumpen der ethanolischen Lösung wurde der Überstand für 24 h durch die Säule gepumpt ( $V \cong 100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \rightarrow \tau \cong 5,67 \text{ min}$ ). Während der Extraktion der Nod-Faktoren aus dem Fermentationsüberstand wurden 1,5 mL Proben zu den Zeiten  $t = 0 \text{ h}$ , 8 h und 24 h entnommen und diese nach der 10-minütigen Zentrifugation bei  $14.000 \text{ min}^{-1}$  in der RP<sub>18</sub>-HPLC analysiert.

#### ***Aufarbeitung der Adsorberharz gebundenen Nod-Faktoren***

Die mit Harzkugeln gefüllte Adsorptionssäule aus **Abbildung 3.11** wurde nach Fermentationsende des Bypass-Verfahrens, bzw. nach Aufkonzentrierung von Nod-Faktoren aus einem ultrafiltrierten Fermentationsüberstand eines Satzbetrieb aus dem Versuchsaufbau entnommen und für 5 min mit desionisiertem Wasser aus der Hausleitung in horizontaler Lage gespült ( $V \cong 300 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Die Säule wurde dabei geschwenkt, um eine optimale Benetzung aller Harzkugeln mit dem Wasser zu erreichen und so eine bestmögliche Reinigung des Adsorberharzes zu gewährleisten. Anschließend wurde die Säule wieder senkrecht aufgerichtet, das in der Säule verbliebene Wasser wurde mit Pressluft herausgeblasen. Dann wurden 200 mL EtOH p.A. von oben auf die Harzperlen gegossen. Das EtOH-Eluat wurde am unteren Auslass der offenen Säule aufgefangen und zwei weitere Male über die Harzkugeln laufen gelassen. Das Eluat wurde dann am Rotationsverdampfer bei Wasserbadtemperatur von +36 °C und einem Unterdruck von 20 mbar auf ein Restvolumen von  $\leq 25 \text{ mL}$  eingengt, im gekühlten EtOH-Bad am Innenrand eines rotierenden Rundkolben eingefroren, anschließend für 20 h gefriergetrocknet und das Lyophilisat bis zur weiteren Aufarbeitung bei -30 °C gelagert. Die Regeneration des Säulenmaterials erfolgte über Umpumpen von Aceton p.A. mit einem Volumenstrom von  $V = 100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  mittels Zahnrad- oder Schlauchpumpe für 1 h durch die Säule. Die Aceton-Fraktion wurde am Rotationsverdampfer eingengt und das aufgefangene Lösungsmittel wiederverwendet. Die Säule wurde verschlossen und bei +4 °C bis zur nächsten Anwendung dunkel gelagert.

#### ***Präparative Umkehrphasen (RP<sub>18</sub>) HPLC zur Aufreinigung der Nod-Faktor-Lyophilisate***

Die Aufreinigung des gewonnenen Lyophilisats aus der Elution der Nod-Faktoren mit den Amberlite® XAD-2 pract. Harzperlen erfolgte mittels präparativer RP<sub>18</sub>-HPLC. Für die HPLC wurde eine Latek- M2-Glassäule mit einer Länge von 500 mm und einem I.D. von 20 mm verwendet. Diese enthielt das präparative RP<sub>18</sub>-Säulenmaterial Polygoprep 100-30 C<sub>18</sub> (Macherey-Nagel). Das Säulenbettvolumen betrug 120 mL. Nach 60-minütiger Equilibrierung der Säule mit 30 % (v/v) MeOH / 70 % (v/v) Wasser wurden das Lyophilisat in 2 mL 30 % (v/v) MeOH / 70% (v/v) Wasser gelöst. Die Rohproduktlösung wurde über eine Einmalkanüle mittels Luer-Adapter auf die Säule appliziert. Die Auftrennung des Eluats erfolgte mit zwei IRIKA-Pumpen über den in **Tabelle 3.8** dargestellten konvexen Gradienten, die Detektion des Flüssigkeitsstroms aus der Säule wie in der analytischen Chromatographie mittels UV-vis-Spektrometers bei 220 nm. Das Eluat der präparativen Chromatographie wurde durch den Fraktionssammler in 12 mL

### 3 *Material und Methoden*

Fraktionen zwischen 27 - 57 Minuten aufgetrennt. 700 µL der einzelnen Fraktionen wurden anschließend mit der analytischen RP<sub>18</sub>-HPLC untersucht (Methode: s. 3.3).

**Tabelle 3.8** Gradientenverlauf und Volumenströme in der präparativen RP<sub>18</sub>-HPLC zur Aufarbeitung von Nod-Faktoren

Vorlagegefäß **Pumpe A**: 30 % (v/v) MeOH / 70 % (v/v) Wasser

Vorlagegefäß **Pumpe B**: 100 % MeOH

Zeit, <i>t</i> [ min ]	Pumpe A [ % - Anteil <i>V</i> ]	Pumpe B [ % - Anteil <i>V</i> ]	<i>V</i> [ mL min <sup>-1</sup> ]	Gradientenform
0	100	0	4,0	---
40	0	100	4,0	Konvex
60	0	100	4,0	Linear
60,1	100	0	4,0	Linear
85	100	0	4,0	Linear

Die Nod-Faktor-Eluate der präparativen RP<sub>18</sub>-HPLC im Zeitraum von 42 - 51 min aus den Aufreinigungsprozessen von Satzfermentation und Bypassfermentation wurden nach der analytischen RP<sub>18</sub>-HPLC im MALDI-ToF Massenspektrometer untersucht.

#### **Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionisation (MALDI) Time-of Flight (ToF)-Massenspektrometrie aufgereinigter Nod-Faktoren**

Für die Probenvorbereitung wurden 10,2 mg Nod-Faktor-Rohprodukt (Lyophilisat) in 1,5 mL 30 % (v/v) MeOH / 70 % (v/v) H<sub>2</sub>O gelöst und mittels präparativer RP-18 HPLC (s. oben) aufgetrennt. Die Fraktionen von 42 - 48 min wurden bis zur Analyse bei -30°C aufbewahrt. 10 mg Matrix DHB wurden in 1mL Acetonitril : MeOH : TFA (1 : 1 : 0,1) gelöst. 5 µL Matrixlösung und 5 µL RP<sub>18</sub>-HPLC-Fraktion wurden gemischt. Auf die Targets des MALDI-ToF-MS wurden je 1 µL des Matrix-Probengemischs aufgetragen. Die Messung fand unter folgenden Bedingungen statt:

Beschleunigungsspannung	19 kV
Anzahl der Laserpulse	10
Reflektionsspannung	20 kV
Vakuum	4x10 <sup>-7</sup> Pa

Vor der Messung der Nod-Faktor-Proben erfolgte die Eichung des MALDI-MS mit den folgenden drei Peptiden:

Angiotensin II	(Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe)	M.W. 1046,5
Substance P	(Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub> )	M.W. 1347,7
Adrenocorticotropic Hormone Fragment 1-17	(Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys)	M.W. 2093,1

Ergänzend dazu wurden noch Vergleichsmessungen mit den Zuckerderivaten Tri-N-Acetyl-chitotriose (M.W. 627,6) und Tetra-N-Acetyl-chitotetraose (830,8) durchgeführt.

### 4 Ergebnisse und Diskussion

Die Resultate der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente und die sich an die Ergebnisse anschließenden Diskussionen sind in drei übergeordnete Teilaspekte gegliedert:

- 4.1 Im ersten Teil werden die Kultivierungen des (semi-)säuretoleranten Bodenbakteriums *S. meliloti* LPU63 im Rührkessel bei verschiedenen pH-Werten im Satzprozess dargestellt. In kontinuierlichen Fermentationen wurde das Verhalten von *S. meliloti* LPU63 im sauren Milieu mit dem des Wildtyps *S. meliloti* 2011 verglichen. Neben dem Wachstumsverlauf der Bodenbakterien wurde ein Schwerpunkt auf die Beobachtung der Nod-Faktoren-Synthese gelegt.
- 4.2 Im Hinblick auf eine Produktion von Starterkulturen (Inokula) für die Landwirtschaft mit (semi-)säuretoleranten Sinorhizobien-Stämmen wird im zweiten Teil die Entwicklung einer Nährlösung für die großtechnische Kultivierung der Bodenbakterien auf Basis unbehandelter Zuckerrohr- und Zuckerrübenmelassen gezeigt. In Zulaufkultivierungen von *S. meliloti* LPU63 in Rührkesselreaktoren wurde das entwickelte Melassemedium mit einem Standardmedium verglichen. Mit dem neuen Medium wurden außerdem verschiedene Zufütterungsstrategien getestet.
- 4.3 Der dritte Teil befasst sich mit der Optimierung von Produktion und Aufarbeitung der Nod-Faktoren aus *S. meliloti* 1021pEK327. Experimente beschreiben den Verlauf der Adsorption von Nod-Faktoren an ein lipophiles sphärisches Harz. Es folgen Versuche zur in-Prozess-Adsorption von Nod-Faktoren aus einer Bakteriensuspension. Schließlich wird das Satzverfahren mit nachgeschalteter Aufkonzentrierung der Nod-Faktoren einem Fermentationsprozess mit integriertem Adsorptionskreislauf gegenübergestellt.

#### 4.1 Auswirkungen verschiedener pH-Werte auf *S. meliloti* LPU63

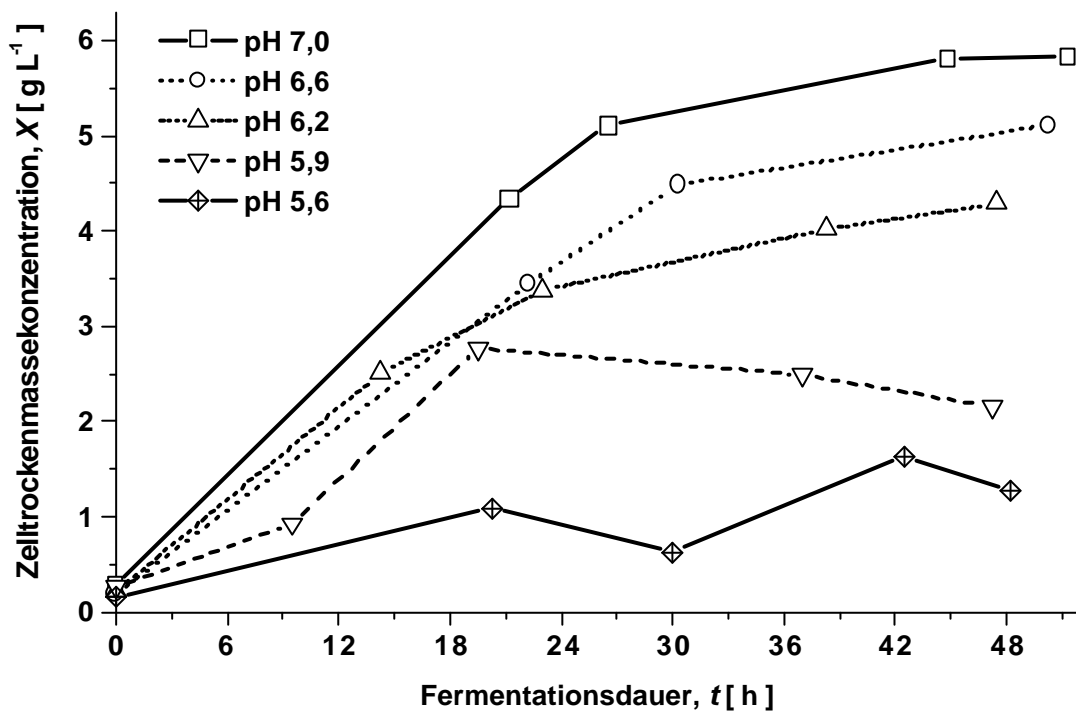
Es werden zuerst die Satzprozesse im 1,5 L-Maßstab von *S. meliloti* LPU63 in einem Mannitol-Minimalmedium bei verschiedenen pH-Werten dargestellt. Daran schließen sich die vergleichenden kontinuierlichen Kultivierungen im 0,5 L-Maßstab mit *S. meliloti* 2011 und *S. meliloti* LPU63 an.

##### 4.1.1 Satzprozesse von *S. meliloti* LPU63 bei variierenden pH-Werten

Das Verhalten von *S. meliloti* LPU63 in Mannitol-Minimalmedium (MMM) bei verschiedenen pH-Werten im Satzprozess sollte untersucht werden. Alle Satzkultivierungen mit *S. meliloti* LPU63 wurden bei den unter 3.5 aufgeführten Bedingungen durchgeführt. Die Anzucht der Vorkulturen erfolgte in 100 mL MMM + 600 mg·L<sup>-1</sup> Streptomycin. Die optischen Dichten der Vorkulturen betragen: pH 7,0 → OD<sub>580</sub> = 9,51; pH 6,6 → OD<sub>580</sub> = 9,165; pH 6,2 → OD<sub>580</sub> = 10,115; pH 5,9 → OD<sub>580</sub> = 10,41; pH 5,5 → OD<sub>580</sub> = 10,2. Die parallel zu der im Fermenter durchgeführten pH-Messung erfolgten Bestimmungen des pH-Wertes über die zwei Labor-pH-Meter

ergaben maximale Abweichungen in allen Fermentationen von  $\leq 0,15$  pH-Einheiten im Vergleich zu den Daten, die zum Probenahmezeitpunkt von der pH-Elektrode im Fermenter angezeigt wurden. Die Kultivierungszeit der Fermentationen variierte zwischen 47,5 - 51 h.

Mit abnehmenden pH-Werten sank der Gehalt an Biotrockenmasse von *S. meliloti* LPU63 in der Fermentationsbrühe stetig, wie in **Abbildung 4.1** zu sehen ist. Bereits bei einer Reduktion des pH-Wertes von 7,0 (ZTM =  $5,83 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) auf 6,6 nahm der Gehalt der Zelltrockenmasse von *S. meliloti* LPU63 nach einer Kultivierungszeit von zwei Tagen um 12 % ( $\Delta \text{ZTM} = 0,72 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) ab. Bei einem pH-Wert von 6,2 reduzierte sich der Biotrockenmassegehalt um 28 % ( $\Delta \text{ZTM} = 1,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) und bei pH-Werten unter 6,0 lagen die Ausbeuten an Biotrockenmasse von *S. meliloti* LPU63 in der Lösung nur noch bei 37 % (pH 5,9) bzw. bei 22 % (pH 5,6) im Vergleich zur Biotrockenmassekonzentration in der Fermentation bei pH 7,0.



**Abbildung 4.1** Biotrockenmassegehalt in Satzkultivierungen mit *S. meliloti* LPU63 bei unterschiedlichen pH-Werten.

Werden die spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten ( $m$ ) in den Satzprozessen betrachtet, so sanken deren Werte mit abnehmendem pH-Wert von  $m=0,129\cdot\text{h}^{-1}$  bei pH 7,0 ( $\rightarrow$  Berechnung von  $m_{\text{pH}7,0}$  für den Zeitraum  $t=0 \text{ h} - 20,3 \text{ h}$ ) bis auf  $m_{\text{pH}5,6}=0,097\cdot\text{h}^{-1}$  ( $\rightarrow$  Berechnung von  $m_{\text{pH}5,6}$  für den Zeitraum  $t=0 \text{ h} - 20,3 \text{ h}$ ). Aus den Werten der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit  $m$  bei pH 5,6 ergab sich für den Zeitraum von 0 h - 20,3 h eine mittlere Generationszeit (MGT) von

7,14 h. Damit lag dieser Wert in dem Bereich, der auch von Segundo (Segundo *et al.*, 1999) für *S. meliloti* LPU63 in Kulturröhrchen mit MMM + 20 mM MES bei pH 5,6 ermittelt wurde (mittlere Generationszeit von  $MGT \cong 7,6$  h), wobei in den gepufferten Systemen im Kulturröhrchen berücksichtigt werden muss, dass der pH-Wert nicht permanent reguliert wurde und es zu Abweichungen vom voreingestellten pH-Wert während der Kultivierung von *S. meliloti* LPU63 von 0,2 - 0,5 Einheiten nach oben in einem mit MES gepufferten System kommen kann, wie del Papa (Del Papa *et al.*, 1999) feststellte. In dem hier gezeigten Satzprozess wurde der pH-Wert ständig bei 5,6 gehalten, die Schwankungen des pH während der Fermentation waren auf ein Minimum von  $\leq 0,1$  pH-Einheiten reduziert. Die Werte der hier dargestellten Satzprozesse und die Experimente im Kulturröhrchen (Segundo *et al.*, 1999) zeigen aber beide, dass die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit ( $\mu$ ) durch einen sauren pH-Wert bei *S. meliloti* LPU63 signifikant reduziert ist. Die kalkulierten Werte für  $\mu$  die aus den Biotrockenmassewerten der Fermentationen erhalten wurden, müssen allerdings unter dem Vorbehalt betrachtet werden, dass sie nur aus der Berechnung zwischen zwei Messpunkten ermittelt wurden.

#### **Änderung der dynamischen Viskosität in Abhängigkeit vom pH-Wert**

In den oben beschriebenen Fermentationen wurde mit abnehmendem pH eine steigende Zähflüssigkeit des Mediums zum Ende der Fermentationsprozesse registriert. Dieser Effekt sollte genauer untersucht werden. Aus diesem Grund wurden die zentrifugierten Fermentationsüberstände, die aus den Proben am Fermentationsende eines jeden Satzprozesses erhalten wurden, im Mikro-Kugelfallviskosimeter bei +25 °C analysiert.

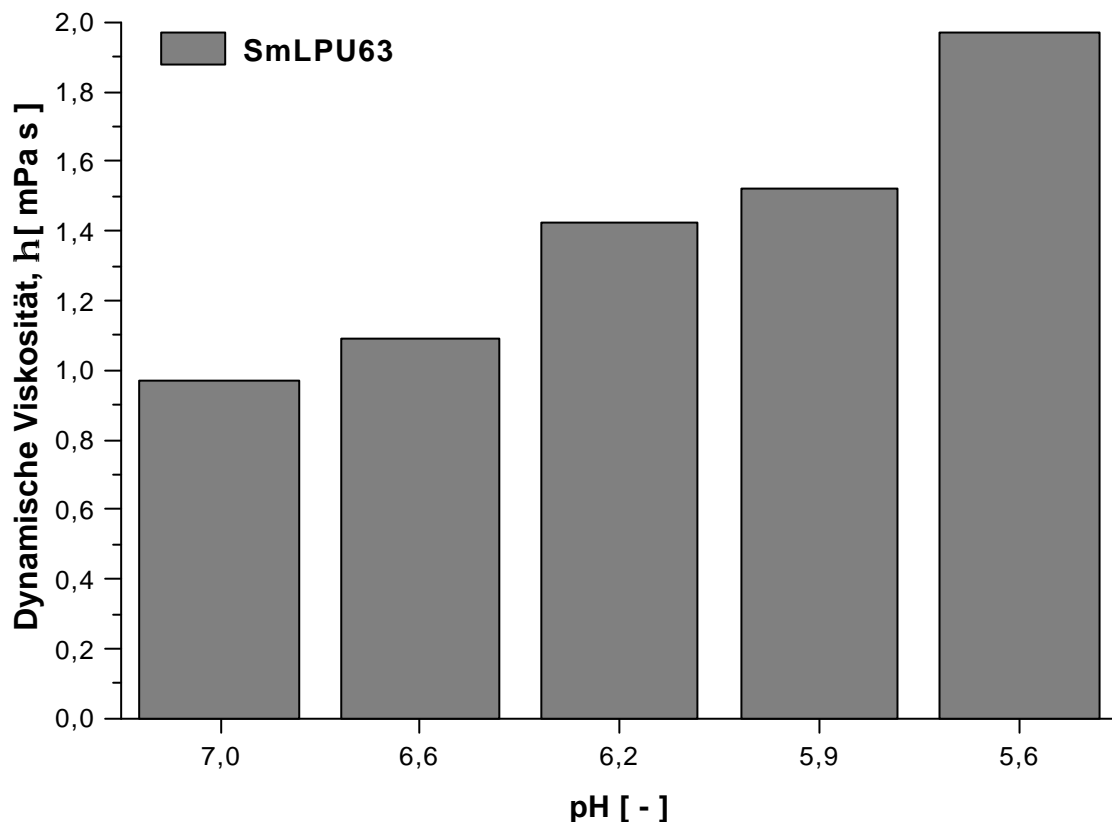
Wie aus **Abbildung 4.2** zu erkennen ist, stieg die dynamische Viskosität bei den Fermentationen bereits bei einem pH-Wert von 6,6 mit  $h_{pH6,6} = 1,091$  des Mediums gegenüber der Kultivierung bei neutralem pH an ( $h_{pH7,0} = 0,973$ ). Bei einem pH-Wert von 5,6 im Medium war die dynamische Viskosität des Fermentationsüberstands um den Faktor 2,02 höher als in der Kultivierung von *S. meliloti* LPU63 bei einem neutralen pH.

Diese Steigerungen in der dynamischen Viskosität der Fermentationsüberstände weisen auf die verstärkte Synthese und Sekretion der Exopolysaccharide von *S. meliloti* LPU63 hin, welche auch mittels ethanolischer Präzipitation in diesen Fermentationsüberständen nachgewiesen werden konnten. Diese Moleküle nehmen nicht nur eine wichtige Funktion bei der Etablierung der Symbiose mit der Luzerne ein (s. 2.7). Die Stärke der extrazellulären Matrix, die aus den verschiedenen Exopolysacchariden zusammengesetzt ist, kann auch als Reaktion auf Umwelteinflüsse wie dem Wechsel in der Konzentration an Salzen in der Umgebung (Miller *et al.*, 1986, Lloret *et al.*, 1995 und 1998) oder dem Absinken des pH-Wertes (Dilworth *et al.*, 1999; Howieson *et al.*, 1988; Cunningham *et al.*, 1984) variieren.

Beide Reaktionen zusammengenommen, die Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit und die verstärkte Exopolysaccharidsynthese, können als wichtige Teile eines Schutzmechanismus´ verstanden werden, um das Überleben der Bodenbakterien unter diesen ungünstigen Umweltbedingungen zu sichern.



Durch welche Faktoren die Reduktion des Wachstums und die massive Synthese der Exopolysaccharide bei *S. meliloti* LPU63 initiiert wird, ist noch nicht geklärt. Diese „Säurestress-Antwort“ der Bodenbakterien könnte aber auch bei diesem Stamm an ein Zweikomponenten Sensor-Regulator-System gekoppelt sein, das Tiwari (Tiwari *et al.*, 1996) für *Sinorhizobium meliloti* beschreibt. Ob aber spezielle „Säure-Schock-Proteine“ als Antwort auf einen niedrigen pH-Wert auch von *Sinorhizobium meliloti* LPU63 exprimiert werden, wie sie von Aarons (Aarons et Graham, 1991) in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* gefunden wurden, konnte bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht nachgewiesen werden.



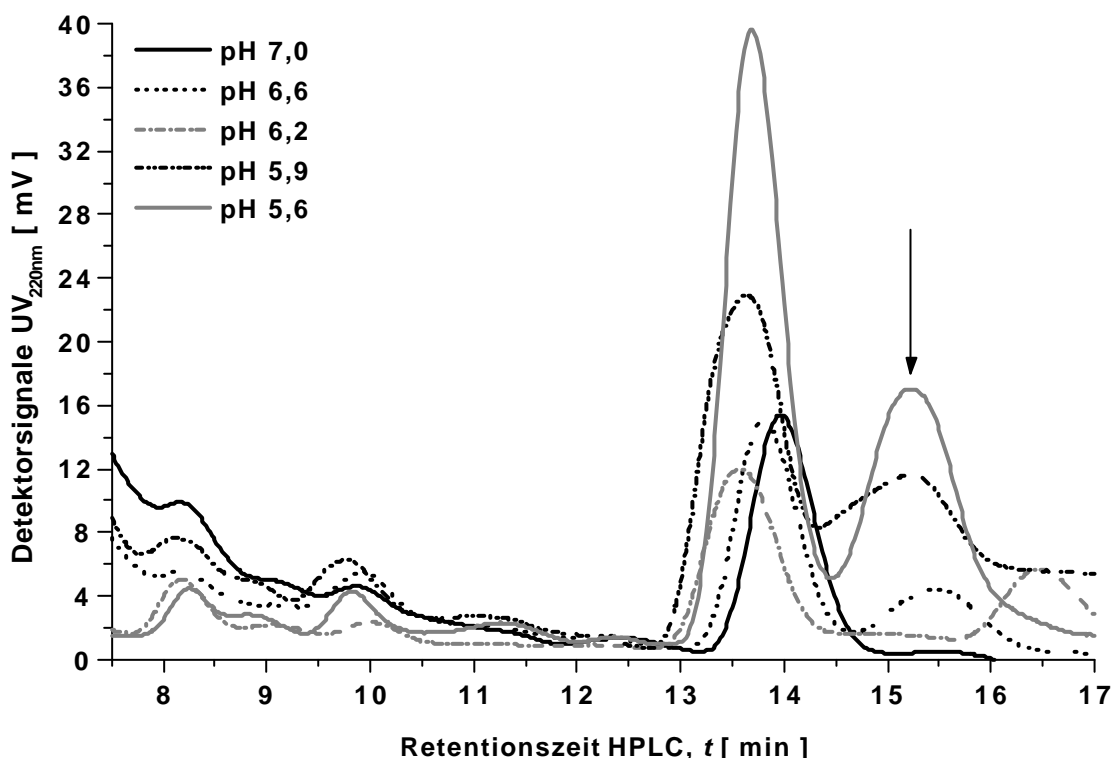
**Abbildung 4.2** Abhängigkeit der dynamischen Viskosität ( $h$ ) vom pH-Wert eines Fermentationsüberstandes aus Fermentationen mit dem Bodenbakterium *S. meliloti* LPU63. Die Bestimmung der dynamischen Viskosität erfolgte mit Proben, die jeweils zum Ende der oben beschriebenen Satzprozesse gezogen wurden. Die Proben wurden bei  $14.000 \text{ min}^{-1}$  zentrifugiert und ihr Überstand bei  $-30 \text{ }^\circ\text{C}$  bis zur Messung gelagert.

Die Regulation der Synthese von Exopolysacchariden ist bei *Sinorhizobium meliloti* aber außer an den pH-Wert auch an andere Faktoren wie der Magnesiumkonzentration (Roblot *et al.*, 1995), einen hypoosmotischen Schock (Dylan *et al.*, 1990) oder den Phosphatgehalt (Zhan *et al.*, 1991) gekoppelt. So zeigte der in dieser Arbeit verwendete, in Argentinien isolierte Stamm *S. meliloti* LPU63 auch unter

neutralen Bedingungen bei der Kultivierung in Melassemedium eine verstärkte Exopolysaccharid-Synthese im Vergleich zur Kultivierung in TY-Medium (s. dazu 4.2.3). Bei diesen Experimenten in Melasse war eine verstärkte Exopolysaccharid-synthese aber nicht an ein starkes Absinken der Wachstumsgeschwindigkeit gekoppelt.

**Nod-Faktoren Synthese von *S.meliloti* LPU63 bei verschiedenen pH-Werten**

Eine dritte Reaktion als Folge der Kultivierung von *S. meliloti* LPU63 in Medien mit niedrigem pH-Wert war die verstärkte Synthese von Nod-Faktoren durch die Bodenbakterien. Insbesondere beim Absinken des pH-Wertes unter 6,0 wurde die Nod-Faktorsynthese deutlich erhöht, die in **Abbildung 4.3** dargestellt ist. Da jeweils 200 mL mikrofiltrierter Fermentationsüberstände aus den Satzprozessen für die Isolierung der Nod-Faktoren eingesetzt wurden, können über die Peakflächen in den Chromatogrammen der Eluate quantitative Aussagen über die Synthese der LCOS bei unterschiedlichen pH-Werten getroffen werden. Vergleicht man die Peakflächen der Nod-Faktoren bei 13'48'', so ist diese bei pH 7,0 mit  $A = 634,26 \text{ mV}\cdot\text{s}$  um 59 % kleiner als bei pH 5,6 mit  $A = 1.551,18 \text{ mV}\cdot\text{s}$ .



**Abbildung 4.3** Nod-Faktorenprofile der Extrakte von zentrifugierten Fermentationsüberständen aus *S. meliloti* LPU63 Satzfermentationen bei verschiedenen pH-Werten

Setzt man die Flächen in Relation zur Biomassekonzentration am Ende des jeweiligen Satzprozesses, so wird der Unterschied noch auffälliger. Bezogen auf  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Biomasse, wiesen die Bodenbakterien bei einem pH-Wert von 5,6 eine 11-fach höhere Syntheseleistung an Nod-Faktoren auf als unter neutralen Bedingungen. Diese erhöhte Nod-Faktoren-Synthese kann auf eine verstärkte Luteolin-Aufnahme unter sauren Bedingungen zurückzuführen sein, wie sie Hubac (Hubac *et al.*, 1994) für *S. meliloti* beschreibt. Dass eine erhöhte Konzentration von Luteolin in der Zelle die Expression der *nod*-Gene verstärken kann, wurde durch Peters (Peters *et al.*, 1986) nachgewiesen. Damit steht das Verhalten von *S. meliloti* LPU63 unter sauren Bedingungen aber im Gegensatz zu den Ergebnissen, die Richardson (Richardson *et al.*, 1988) bei *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* erzielte. Er beobachtete eine abnehmende Expression der *nod*-Gene bei pH-Werten von  $\leq 5,8$ .

Die Analyse der ultrafiltrierten Fermentationsüberstände in **Abbildung 4.3** zeigte, dass *S. meliloti* LPU63 nicht nur eine größere Menge an Nod-Faktoren produzierte, sondern auch eine hydrophobere Variante der Nod-Faktoren bei niedrigeren pH-Werten synthetisierte, dessen Peakmaximum im Chromatogramm bei ca. 15'24'' liegt (beim Chromatogramm der Probe von pH 6,2: 16'30''), bei einem von pH 7,0 fast nicht zu detektieren war. Die Peakfläche bei einem pH von 5,6 betrug  $A_{15'24''} = 989,78 \text{ mV} \cdot \text{s}$  und bei einem pH von 7,0  $A_{15'24''} = 17,36 \text{ mV} \cdot \text{s}$ .

Die exakten chemischen Strukturen der Nod-Faktoren, die sich in dem Peak befinden, der bei 15'24'' sein Maximum besitzt, konnte bis jetzt noch nicht aufgeklärt werden, da eine genauere Analyse mittels Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie u. a. aufgrund der geringen Ausbeuten an Nod-Faktoren-Eluat aus dem 200 mL Kulturüberstand zu diesem Zeitpunkt nicht möglich war. Denkbar für eine genauere chemische Untersuchung der Nod-Faktoren wäre bei diesen geringen Mengen an LCOS eine kombinierte HPLC-MS Analyse von ultrafiltrierten Fermentationsüberständen des Stamms *S. meliloti* LPU63.

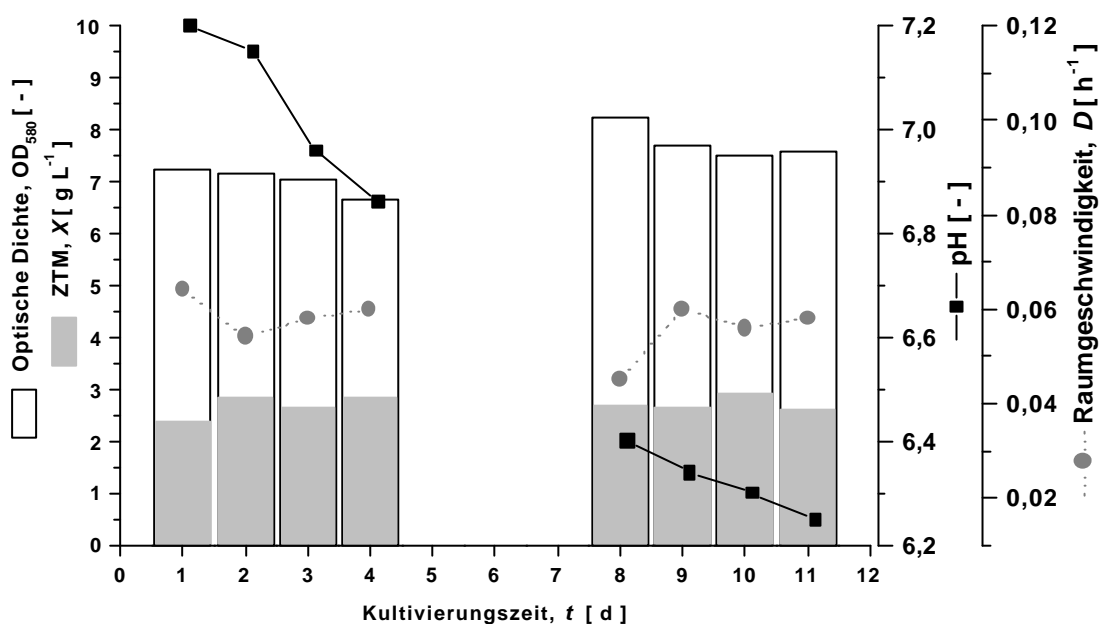
### 4.1.2 Kontinuierliche Fermentationen von *S. meliloti* LPU63 und *S. meliloti* 2011 mit Absenkung des pH-Wertes

In diesen Experimenten sollte gezeigt werden, ob und in welcher Form eine Anpassung des semi-säuretoleranten Stamms *S. meliloti* LPU63 an ein niedrigeres pH erfolgte, wenn dieses in einer kontinuierlichen Kultivierung im Rührkessel stufenweise von 6,8 auf 6,2 abgesenkt wurde. Das Verhalten von *S. meliloti* LPU63 sollte dabei mit dem des Wildtyps *S. meliloti* 2011 verglichen werden. Eine Absenkung des pH unter einen Wert von 6,0 war nicht möglich, da die Verdopplungszeit von *S. meliloti* 2011 unter diesen Bedingungen gegen unendlich anstieg ( $t_D \rightarrow \infty$ ; s. auch Glenn *et al.*, 1994) und dies zum vollständigen Austrag der Bodenbakterien aus dem Fermenter geführt hätte.

In den Vorversuchen zu diesem Experiment wurde mit  $D = 0,06 \text{ h}^{-1}$  die geeignete Raumgeschwindigkeit ermittelt, bei der es nach dem Absenken des pH-Wertes auf 6,2 nicht zur Auswaschung der Biomasse von beiden Stämmen kam. Diese Raumgeschwindigkeit entspricht einem Volumenstrom von  $V = 30 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ , mit dem frisches Medium in den Bioreaktor eingeleitet wurde. Damit wurde in 16,6 h ein

Reaktorvolumen mit einem Volumen von  $V = 500$  mL an frischem Medium ausgetauscht.

Der Wildtyp *S. meliloti* 2011 zeigte in der kontinuierlichen Kultivierung ein nahezu unverändertes Bild nach der Absenkung des pH-Wertes auf 6,2 im Vergleich zu den Daten nach den ersten vier Tagen bei einem pH von 6,8, wie in **Abbildung 4.4** zu sehen ist. Die Werte für die Biotrockenmasse lagen am Ende der Kultivierung nach 11 Tagen um 7,7 % unter den Werten nach 4 Tagen (s. auch Vergleich unten). Auffällig war bei der Kultivierung des Wildtyps *S. meliloti* 2011 der signifikante Anstieg bei den Werten der optischen Dichte  $OD_{580}$  um 13 % im Vergleich zum Wert am 4. Tag bei einem pH von 6,8.



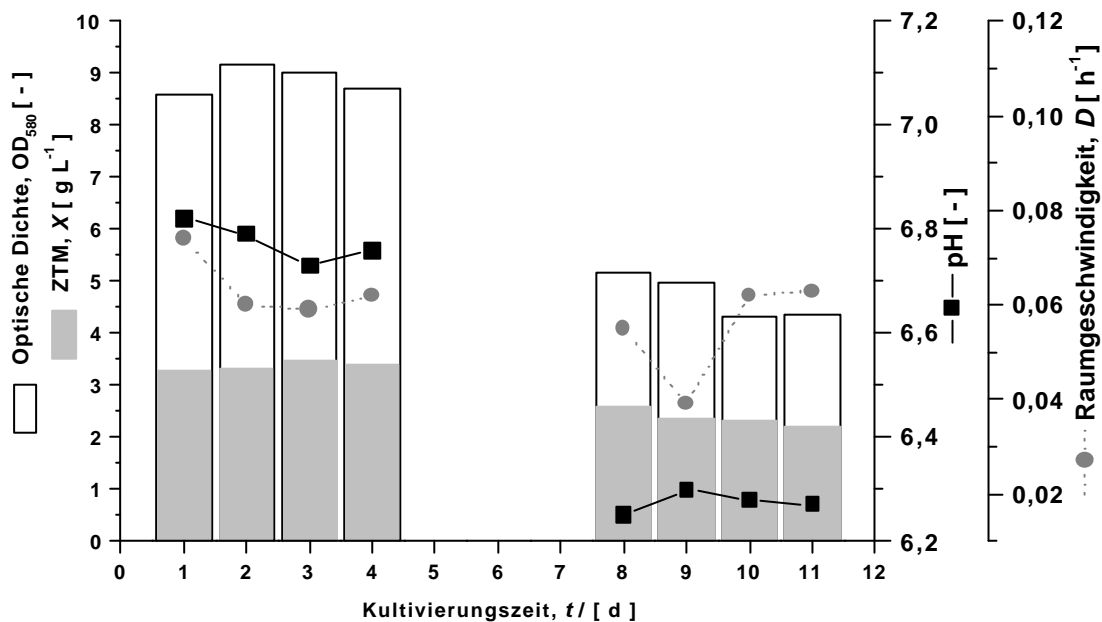
**Abbildung 4.4** Optische Dichte ( $OD_{580}$ ), Zelltrockenmasse, pH-Wert-Verlauf und Raumgeschwindigkeit einer kontinuierlichen Kultur von *S. meliloti* 2011

Die Ursache für die Erhöhung der optischen Dichte ( $OD_{580}$ ) in der Kultur von *S. meliloti* 2011 bei einem pH von 6,2 kann auf einen erhöhten Anteil an Partikeln aus bereits lysierten, toten Zellen in der Fermentationslösung und / oder auf eine Volumenänderung der Zellen zurückgeführt werden, die vermehrte Lichtreflexionen und -streuungen erzeugen, was dann zu höheren  $OD_{580}$ -Werten führte. Eine Lebendzellzahlbestimmung und mikroskopische Begutachtungen der Fermentationsproben, die diese Annahmen bestätigen könnten, wurden bei den kontinuierlichen Fermentationen von *S. meliloti* 2011 und *S. meliloti* LPU63 allerdings nicht durchgeführt.

Diese Resultate bei der Kultivierung des Wildtyps *S. meliloti* 2011 weisen darauf hin, dass dieser Stamm des Bodenbakteriums *Sinorhizobium meliloti* nicht über Mechanismen zur Adaption an die sauren Bedingungen in der Kulturlösung verfügt.

Es kommt nach diesen Daten eher zu einem verstärkten Absterben der Mikroorganismen in der Kultur bei einem pH von 6,2, was sich in der höheren optischen Dichte ( $OD_{580}$ ) widerspiegelt. Eine Zunahme der Viskosität der Fermentationslösung konnte bei *S. meliloti* 2011 unter sauren Bedingungen bei einem pH von 6,2, wie bei der Kultivierung von *S. meliloti* LPU63 zu sehen, konnte nicht beobachtet werden.

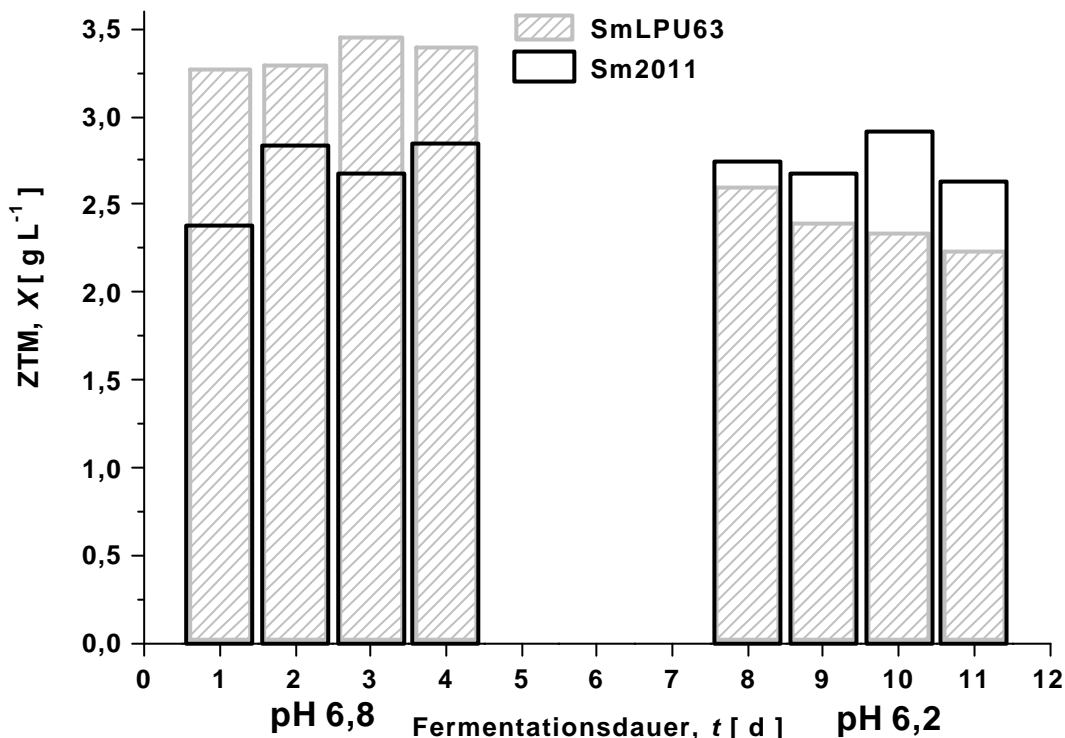
Die in **Abbildung 4.5** dargestellten Ergebnisse ergeben für *S. meliloti* LPU63 in der kontinuierlichen Fermentation bei variierenden pH-Werten ein vollkommen anderes Bild im Vergleich zu den Resultaten, die mit dem Wildtyp *S. meliloti* 2011 im CFSTR erzielt wurden. Sowohl die Biotrockenmasse, als auch die optische Dichte nehmen signifikant um 34 % (ZTM) bzw. um 50 % ( $OD_{580}$ ) nach Absenkung des pH ab. Außerdem konnte eine deutlich erhöhte Viskosität der Fermentationsüberstände am Ende des Experiments bei einem pH-Wert von 6,2 beobachtet werden. Dies wies wie in den Satzprozessen (s. **Abbildung 4.2**) auf die verstärkte Exopolysaccharid-Synthese von *S. meliloti* LPU63 unter den sauren Bedingungen hin.



**Abbildung 4.5** Optische Dichte ( $OD_{580}$ ), Zelltrockenmasse, pH-Wert-Verlauf und Raumgeschwindigkeit einer kontinuierlichen Kultivierung von *S. meliloti* LPU63

Aus dem direkten Vergleich der Biotrockenmassenkonzentrationen in **Abbildung 4.6** geht hervor, dass die Reduktion von ( $X$ ) während der kontinuierlichen Kultivierung von *S. meliloti* LPU63 nach Absenken des pH-Wertes auf 6,2 im Gegensatz zum Wildtyp deutlich stärker ausfällt. Die Resultate der kontinuierlichen Fermentationen mit *S. meliloti* LPU63 bestätigen auch die Messergebnisse mit dem Stamm in den Satzprozessen, die unter 4.1.1 dargestellt sind. Werden die Biotrockenmassen aus den Satzkultivierungen, bei einem pH von 7,0 und 6,2, nach 48 h gegenübergestellt, so wurde dort ebenfalls eine Abnahme in der Biomasse

von  $\cong 28$  % festgestellt, wenn die Fermentation bei einem pH von 6,2 erfolgte. Die Biomassereduktion liegt somit im gleichen Bereich, wie sie bei der kontinuierlichen Fermentation von *S. meliloti* LPU63 gemessen wurde. Der Biotrockenmassekonzentration in der Fermentationslösung des Wildtypstamms *S. meliloti* 2011 bleibt dagegen nach der Absenkung des pH-Wertes nahezu konstant. Mit einem Wert für die Biotrockenmasse von  $ZTM = 2,63 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  bei einem pH von 6,2 liegt dieser nur um 7,7 % unter dem Wert, der nach 4 Tagen kontinuierlicher Kultivierung bei einem pH von 6,8 erzielt wurde.



**Abbildung 4.6** Vergleich der ermittelten Zelltrockenmassen in kontinuierlichen Fermentationen von *S. meliloti* LPU63 und *S. meliloti* 2011 bei pH 6,8 und pH 6,2

Im stationären Zustand des kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktors mit ( $dX / dt = 0$ ) lässt sich die Wachstumsgeschwindigkeit  $r_{v,x}$  über die eingestellte Raumgeschwindigkeit ( $D$ ) und die gemessene Biomassekonzentration ( $X$ ) nach **Gleichung 4.1** ausdrücken durch:

$$r_{v,x} = D \cdot X \quad \text{(Gleichung 4.1)}$$

Eine Umstellung im Wachstumsverhalten von *S. meliloti* LPU63 bei einem abnehmenden pH lässt sich somit direkt aus der gemessenen Biomassekonzentration ableiten. Da die Biomassekonzentration ( $X$ ) bei einem pH-Wert von 6,2 signifikant geringer war als bei einem pH von 6,8, ergibt sich daraus, dass *S. meliloti* LPU63

seine Wachstumsgeschwindigkeit ( $r_{V,X}$ ) nach den **Gleichungen 4.1** unter saureren Bedingungen reduziert:

$$r_{X,pH\ 6,8} = D \cdot X = 0,06\ h^{-1} \cdot 3,41\ g \cdot L^{-1} = 0,205\ g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1} \quad \text{(Gleichung 4.1 a)}$$

und

$$r_{X,pH\ 6,2} = D \cdot X = 0,06\ h^{-1} \cdot 2,24\ g \cdot L^{-1} = 0,134\ g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1} \quad \text{(Gleichung 4.1 b)}$$

Der Wert von  $r_{V,X}$  ist unter (semi-)sauren Bedingungen bei einem pH von 6,2 nach **Gleichung 4.1 b** für *S. meliloti* LPU63 somit um 34,6 % niedriger als in der Kultivierung bei einem nahezu neutralen pH-Wert von 6,8, wie **Gleichung 4.1 a** angibt. Bei *S. meliloti* 2011 war eine derart starke Veränderung der Wachstumsgeschwindigkeit nicht beobachtet worden, der Stamm reduzierte seine Wachstumsgeschwindigkeit nur um 7,7 % von  $r_{V,X}$  (pH 6,8) = 0,171 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> auf  $r_{V,X}$  (pH 6,2) = 0,158 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>.

Da für die Mikroorganismen auf Grund der konstanten Bedingungen im stationären Zustand des kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktors vergleichbare Nährstoffkonzentrationen im Medium sowohl bei pH 6,8 als auch bei pH 6,2 vorliegen, kann unter der Bedingung, dass der Substratverbrauch der Organismen sich mit sinkendem pH nicht ändert, anhand der ermittelten reduzierten Wachstumsgeschwindigkeit ( $r_{V,X}$ ) von *S. meliloti* LPU63 in saurem Milieu angenommen werden, dass die Mikroorganismen unter Säurestress einen erheblich höheren Teil des vorhandenen Substrates nicht mehr für das Wachstum verwenden, sondern diese Nährstoffe bei *S. meliloti* LPU63 in (Erhaltungs-) Stoffwechselwege wie die Exopolysaccharidsynthese, in Transportsysteme für einen aktiven Protonenexport oder in die Nod-Faktoren-Synthese fließen, deren Metabolite letztendlich das Überleben in einem sauren Milieu gewährleisten sollen. Dies wird bei einer differenzierteren Betrachtungsweise des Substratverbrauchs deutlich. Wenn ein Teil der Nährstoffe für endogene (erhaltende) Prozesse benötigt wird, ergibt sich nach **Gleichung 4.2** folgender Zusammenhang für die Substratverbrauchsgeschwindigkeit ( $r_{V,S}$ ):

$$r_{V,S} = \frac{r_{V,X}}{Y'_{X/S}} + m_s \cdot X \quad \text{(Gleichung 4.2)}$$

mit  $m_s$  = Koeffizient des Erhaltungsstoffwechsels und  $Y'_{X/S}$  = wahrer Ausbeutekoeffizient. Der **wahre** Ausbeutekoeffizient  $Y'_{X/S}$  und der aus den messbaren Konzentrationen von Substrat und Biomasse bestimmbare, **scheinbare** Ausbeutekoeffizient  $Y_{X/S}$  lassen sich über die in **Gleichung 4.3** gezeigte Beziehung darstellen:

$$\frac{1}{Y'_{X/S}} = \frac{r_{V,S} - m_s \cdot X}{r_{V,X}} = \frac{1}{Y_{X/S}} - \frac{m_s}{r_{V,X}} \cdot X = \frac{1}{Y_{X/S}} - \frac{m_s}{m} \quad \text{(Gleichung 4.3)}$$

Daraus ergibt sich schließlich die spezifische Substratverbrauchsgeschwindigkeit ( $q_s$ ) zu:

$$q_s = r_{X,S} = \frac{1}{X} \cdot r_{V,S} = \frac{m}{Y_{X/S}} = \frac{m}{Y'_{X/S}} + m_s \quad \text{(Gleichung 4.4)}$$

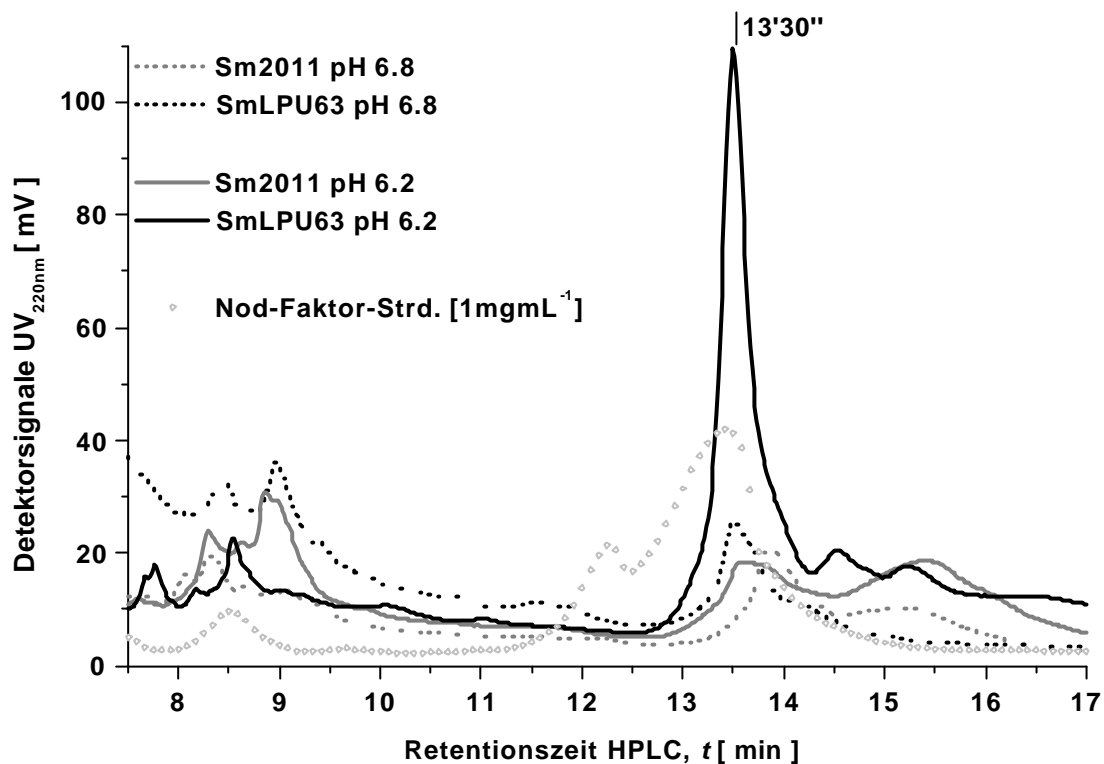
Während der erste Teil auf der rechten Seite in **Gleichung 4.4** den Anteil des Substratverbrauchs beschreibt, der in das Wachstum investiert wird, verdeutlicht der zweite Teil des rechtsstehenden Terms, dass bei einer Betrachtung des Substratverbrauchs für die erhaltenden Stoffwechselfunktionen auch ein Anteil berücksichtigt werden muss. Für die Annahme, dass ein Teil des aufgenommenen Substrats bei *S. meliloti* LPU63 tatsächlich in (erhaltende) Stoffwechselwege fließt, sprechen die beobachtete Steigerung der EPS- und Nod-Faktor-Synthese in den Satzprozessen und kontinuierlichen Fermentationen. Denkbar ist aber auch, dass die Substratverbrauchsgeschwindigkeit nicht konstant bleibt,  $r_{V,S}$  mit dem abnehmenden pH-Wert sinkt  $(-dS/dt)_{pH6,8} > (-dS/dt)_{pH6,2}$  und daraus eine Reduktion des Wachstums folgt, da in den Bakterienzellen für die Wachstumsvorgänge weniger Nährstoffe zur Verfügung stehen. Aussagen darüber kann eine Analytik der Hauptkohlenstoffquelle D-Mannit während der Fermentation geben. Doch der Nachweis für dieses Substrat z.B. über HPLC-Verfahren ist sehr aufwendig und wurde deshalb bei den hier beschriebenen kontinuierlichen Fermentationen von Bodenbakterien in Minimalmedium nicht durchgeführt.

### **Vergleich der Nod-Faktoren von *S. meliloti* LPU63 und *S. meliloti* 2011 bei variierenden pH-Werten**

Neben dem Vergleich des Wachstumsverhaltens von *S. meliloti* LPU63 und *S. meliloti* 2011 bei unterschiedlichen pH-Werten war die Nod-Faktoren-Synthese beider Stämme bei den kontinuierlichen Kultivierungen in Abhängigkeit vom pH-Wert von Bedeutung. Geklärt werden sollte insbesondere der Aspekt, ob der Wildtyp *S. meliloti* 2011 ebenfalls in der Lage ist, seine Synthese an Nod-Faktoren bei sinkendem pH-Wert zu verstärken, wie es für *S. meliloti* LPU63 in den Satzkultivierungen bei variierenden pH-Werten beobachtet werden konnte. Für die Analyse der Nod-Faktoren wurden in Argentinien auf Grund der geringeren Auflösungsfähigkeit des dort vorhandenen UV-Detektors die Substanzen mit einem Lösungsmittelgradienten zur Erreichung einer möglichst breiten Auftrennung der Einzelsubstanzen in der analytischen RP<sub>18</sub>-HPLC eluiert. Die Retentionszeiten der einzelnen Peaks in **Abbildung 4.7** weichen aus diesem Grund von den anderen in dieser Arbeit gezeigten Chromatogrammen mit Nod-Faktoren in der Umkehrphasenchromatographie deutlich ab. Zur besseren Wertung der Ergebnisse wurde zusätzlich ein Chromatogramm einem Nod-Faktor Lyophilisat aus einem Satzprozess mit *S. meliloti* 1021pEK327 aufgenommen. Dazu wurden 1,0 mg des Lyophilisats in 1,0 mL 30 % (v/v) MeOH : H<sub>2</sub>O gelöst und im Gradienten chromatographisch aufgetrennt, wie in **Abbildung 4.7** zu sehen ist.

Die HPLC-Chromatogramme von *S. meliloti* LPU63 und *S. meliloti* 2011 bei einem pH-Wert von 6,8 in **Abbildung 4.7** besitzen ähnliche Profile bis auf geringe zeitliche Verschiebungen der Peakmaxima in den Chromatogrammen, die auf Schwankungen in der Förderleistung der HPLC-Pumpe zurückgeführt werden konnten. Die Analyse der Nod-Faktor-Eluat-Chromatogramme, die bei einem pH-Wert von 6,2 aus beiden Stämmen in der kontinuierlichen Fermentation gewonnen wurden, zeigen dagegen signifikante Unterschiede. Die Peakfläche der Nod-Faktoren bei 13'30" ist um den Faktor 5,4 bei *S. meliloti* LPU63 mit  $A_{13'30"} = 22.800$  mV·s größer als der Nod-Faktoren-Peak beim Wildtyp *S. meliloti* 2011 unter sauren Bedingungen mit  $A_{13'30"} = 4.200$  mV·s.





**Abbildung 4.7** RP<sub>18</sub>-HPLC Chromatogramme der Eluate von *S. meliloti* LPU63 und *S. meliloti* 2011 bei pH 6,8 und pH 6,2. Diese Chromatogramme wurden mit der in Argentinien zur Verfügung stehenden HPLC-Anlage von Beckmann (Typ126/166) und der bei allen analytischen Chromatographien verwendeten RP<sub>18</sub>-Säule (Knauer, Berlin) durchgeführt.

Aus den Ergebnissen der Kultivierungen im Satzbetrieb und der kontinuierlichen Fermentationen folgt, dass der Stamm *S. meliloti* LPU63, der aus einem leicht sauren Boden (pH 5,89) in Argentinien isoliert wurde (Del Papa *et al.*, 1999), im Gegensatz zum Wildtyp *S. meliloti* 2011 sein Verhalten bei auftretendem Säurestress vollständig umstellt. Während der Wildtyp bis zu einem pH von 6,2 weder sein Wachstum in entscheidendem Maß reduziert, noch die Synthese seiner Nod-Faktoren und Exopolysaccharide deutlich verstärkt, reagiert *S. meliloti* LPU63 schon bei einem pH  $\leq$  6,6. Der Stamm reduziert die Wachstumsgeschwindigkeit und gleichzeitig werden verstärkt Exopolysaccharide von dem (semi-) säuretoleranten Stamm *S. meliloti* LPU63 zum Schutz gebildet. Dies ist eine Reaktion, die bei *S. meliloti* 2011 bei einem pH-Wert von 6,2 nicht zu beobachten war. Und sowohl Satzprozesse als auch die kontinuierliche Kultivierung von *S. meliloti* LPU63 haben gezeigt, dass dieser Stamm unter sauren Bedingungen ebenfalls die Synthese seiner Nod-Faktoren erheblich steigert. Die beiden letztgenannten Reaktionen von *S. meliloti* LPU63 können auch die Ursache für die effizientere Besiedelung von *Medicago sativa* durch diesen Stamm bei pH 5,6 im Wettbewerb mit *S. meliloti* 2011 sein, wie sie in der Arbeit von Del Papa (Segundo *et al.*, 1999, Del Papa *et al.*, 1999) beschrieben wurde. Denn sowohl das Vorhandensein von Nod-Faktoren, wie auch

von Exopolysacchariden ist für eine Besiedelung der Luzernewurzel von entscheidender Bedeutung.

Der Stamm *S. meliloti* LPU63 zeigt damit eine Reihe an Reaktionen, die ihm eine höhere Überlebenschance in einem sauren Habitat eröffnen und die gleichzeitig seine Effizienz bei der Besiedelung von Luzernewurzeln durch seine verstärkte EPS- und Nod-Faktorsynthese erhöhen. Damit besitzt er einen deutlichen Wettbewerbsvorteil gegenüber den anderen im Boden befindlichen Sinorhizobien, die solche Umstellungen nicht vornehmen können. All diese Eigenschaften weisen den Stamm *S. meliloti* LPU63 als potentiellen Kandidaten für die Verwendung in Starterkulturen aus, die in Anbaugebieten der Luzerne mit (semi)-saurem Boden ( $\text{pH} \geq 5,6$ ) eingesetzt werden sollen. Auf Grund der Reduktion des Zellwachstums von *S. meliloti* LPU63 bei sauren Bedingungen in seiner Umgebung erscheint es bei einem Einsatz dieses Stamms auf sauren Böden aber sinnvoll, eine Produktion von Starterkulturen mit diesem Stamm bei einem neutralen pH-Wert durchzuführen, um eine möglichst hohe Biomasseausbeute zu erzielen.

### 4.2 Kultivierungen von *Sinorhizobium meliloti* Stämmen in Melassemedien

Für die großtechnische Anzucht von (semi-)säuretoleranten Sinorhizobien, die in der Landwirtschaft Argentiniens und Uruguays als Starterkulturen eingesetzt werden sollen, um das Wachstum der Luzerne auf Ackerflächen mit einem sauren Boden-pH zu fördern, sollte eine preiswerte, technisch mit geringem Aufwand herzustellende und dennoch produktive Nährlösung entwickelt werden. Aus diesem Grund wurden Zuckerrohr- und Zuckerrübenmelassen als Basiskomponenten gewählt, da diese Wertstoffe, die bei der Zuckerproduktion anfallen, mehrere Vorteile gegenüber anderen Nährstoffquellen bieten:

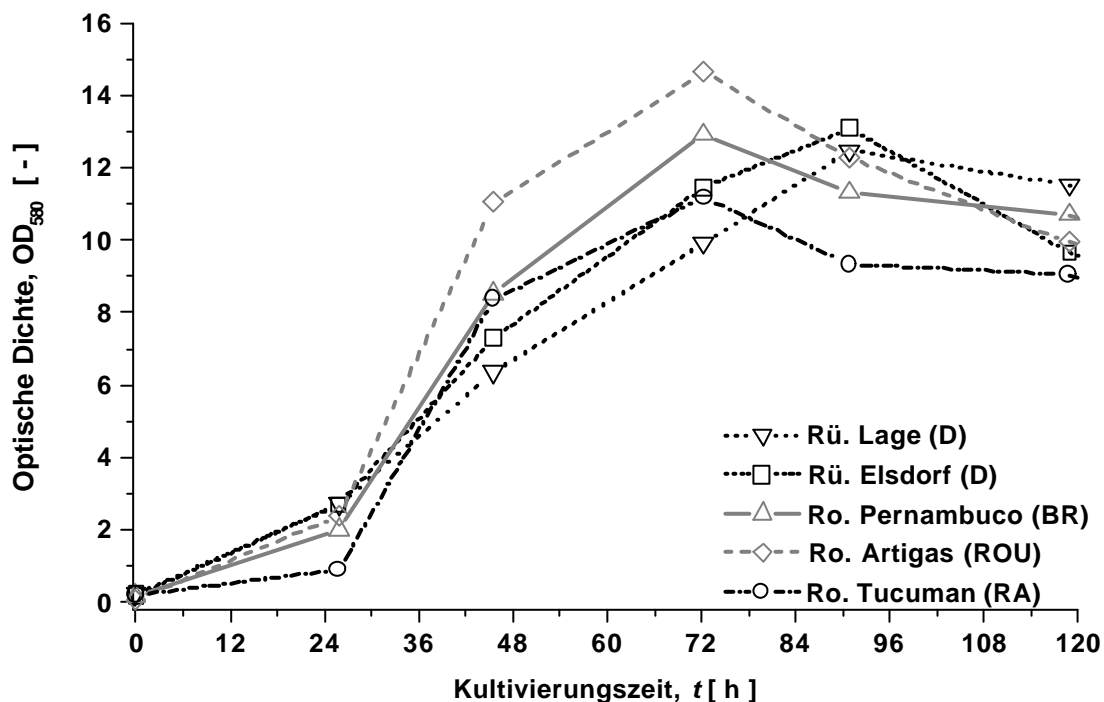
- 1) Die Verfügbarkeit: Mit Argentinien, Uruguay und Brasilien zusammengenommen befindet sich auf dem südamerikanischen Subkontinent der größte Zuckerkrautraum weltweit und damit auch die größte Quelle an Zuckerrohrmelassen in direkter Nähe zu den Anbauflächen der Luzerne (Statistik der FAO, 2000: <http://apps.fao.org/>).
- 2) Der flexible Einsatz: Die gängigen Handelsmelassen sind auch bei Raumtemperatur aufgrund ihres hohen Trockensubstanz- ( $\approx 75\%$ ) und Zuckeranteils ( $\approx 50\%$ ) ohne größere Probleme über längere Zeiträume (= Jahre) mit geringem Aufwand lagerbar. Nachfolgend werden Resultate von Experimenten mit einer Rohrmelasse aus Pernambuco (BR) gezeigt, die belegen, dass selbst nach 9 Jahren Lagerung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  noch hohe Biomasseausbeuten bei der Kultivierung von Bodenbakterien in einem Medium auf Basis dieser Melasse möglich sind. Die verwendete Zuckerrübenmelasse aus Lage (D) der Erntekampagne 1996, bei  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert, lieferte über 5 Jahre gleichbleibende Zellausbeuten bei Versuchen mit dem Wildtypstamm *S. meliloti* 2011 und dem säuretoleranten Bodenbakterium *S. meliloti* LPU63.
- 3) Die Vorbehandlung: Auf eine Vorbehandlung der Melassen wie filtrieren, präzipitieren, zentrifugieren u. ä. kann im Hinblick auf die kostengünstige Gestaltung des gesamten Prozesses verzichtet werden. Wie die nachfolgenden Ergebnisse zeigen werden, war diese für die Kultivierung von Bodenbakterien nicht notwendig, denn auch mit den unbehandelt eingesetzten Melassen konnten sehr hohe Biomasseausbeuten erzielt werden.
- 4) Die Kosten: Im Vergleich zu anderen Vollmedien ist Melasse als Grundstoff extrem kostengünstig. Der Preis für eine metrische Tonne Hefeextrakt lag im Januar 2001 bei ca. 4.900 € (Daten: Hr. Hüttemann, Ohly Deutsche Hefewerke). Im gleichen Zeitraum notierte der Preis für eine metrische Tonne Handelsmelasse aus Zuckerrohr- oder Zuckerrüben bei 87 € (Fr. Eichmann, Kölner Zucker).

#### 4.2.1 Kultivierungen von *Sinorhizobium meliloti* im Schüttelkolben mit Melasse-Nährlösungen

In einer ersten Versuchsreihe sollte die generelle Eignung verschiedener Melassen für die Kultivierung von *Sinorhizobium meliloti* untersucht werden. Dazu

wurden jeweils 2 %-ige Melasselösungen auf Basis von Zuckerrohr- und Zuckerrübenmelassen aus unterschiedlichen Produktionsstandorten in Südamerika und Deutschland (s. **Tabelle 3.2**) hergestellt, die mit jeweils mit  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  Harnstoff supplementiert waren. Die Kultivierungen wurden mit den Bodenbakterienstämmen *S. meliloti* 2011 und *S. meliloti* CE15 in 300 mL Kulturkolben mit Schikanen bei  $+28 \text{ }^\circ\text{C}$  und einer Frequenz von  $150 \text{ min}^{-1}$  des Exzentrerschüttlers. Die Vorkulturen der beiden Stämme wurde ü.N. in  $\text{MMM} + 400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Sm}$  angezogen.

Der Wildtypstamm *S. meliloti* 2011 erreichte bei der Kultivierung in den 2 %-igen Zuckerrohrmelassen bereits nach 72 h sein Wachstumsmaximum, wie in **Abbildung 4.8** zu sehen ist. Dabei konnte mit der Zuckerrohrmelasse aus Artigas (ROU) die höchste optische Dichte mit  $\text{OD}_{580} = 14,64$  erreicht werden, gefolgt von der bereits 10 Jahre gelagerten Melasse aus Pernambuco (BR) mit einer  $\text{OD}_{580}$  von 12,9. Mit der Rohrmelasse aus Tucuman (RA) konnte lediglich ein Maximalwert der optischen Dichte  $\text{OD}_{580}$  von 11,18 erzielt werden. Auch war bei Kultivierung in der argentinischen Melasse die Anpassungsphase ausgedehnter als in den beiden anderen Zuckerrohrmelassen.



**Abbildung 4.8** Kultivierung von *S. meliloti* 2011 in verschiedenen Handelsmelassen (2 %) aus Südamerika und Deutschland.

Das Abknicken der Wachstumskurven bei allen Kulturen in Zuckerrohrmelassen zwischen 48 h und 72 h kann auf eine Umstellung im Stoffwechsel der Bodenbakterien zurückgeführt werden. Rohrmelassen enthalten einen weitaus höheren

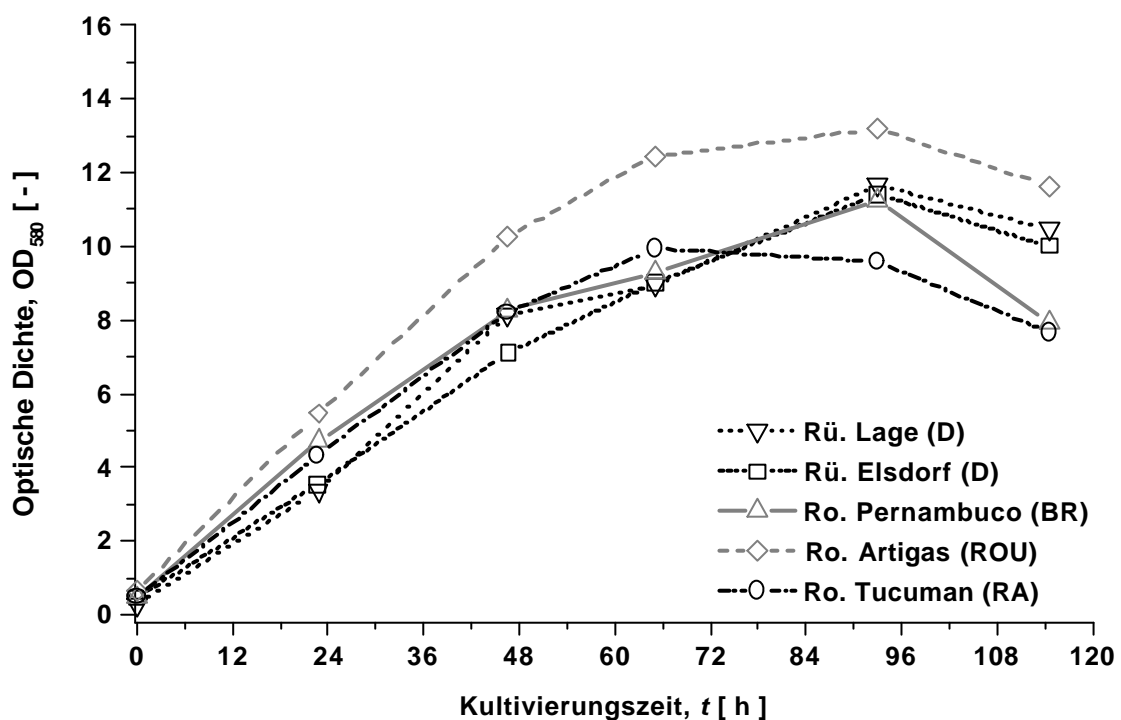
Anteil an Invertzucker in der Trockenmasse, der bei ca. 15 % (w/w) liegt. Wie die **Tabelle 2.2** zeigt, wird die Invertzucker-Konzentration von Rübenmelassen mit ca. 1% (w/w) damit deutlich übertroffen (Higginbotham *et al.*, 2000). Es ist davon auszugehen, dass die Bodenbakterien in den Zuckerrohrmelasselösungen zuerst bevorzugt die Monosaccharide Glucose und Fructose verstoffwechseln, bevor sie die durch Sucrose induzierbare Invertase ( $\beta$ -Glucosidase (EC 3.2.1.21) (Martinez- de Drets, 1970) exprimieren und mit dieser dann das Disaccharid Saccharose in Fructose und Glucose spalten, um die entstandenen C<sub>6</sub>-Zucker wiederum ebenfalls in ihrer Glykolyse (Strasburger, 1983) zu verwerten. Der durch den hohen Invertzuckeranteil ermöglichte Verzicht auf die Expression der Invertase zu Beginn der Kultivierung im Zuckerrohr-Melassemedium resultiert in der beobachteten, schnelleren Wachstumsgeschwindigkeit zu Beginn des Experiments beim Wildtypstamm *S. meliloti* 2011.

Die Kulturen von *S. meliloti* 2011 in einem Medium auf Basis von Zuckerrübenmelasse erreichten ihre maximale Biomassekonzentration in dem 2 %-igen Medium erst 19 h später (Elsdorf; OD<sub>580</sub>:13,08 und Lage; OD<sub>580</sub>: 12,46 nach 91 h). Das langsamere Wachstum und die geringere Biomassekonzentration im Vergleich zu den Kulturen in Zuckerrohrmelassen können auf die Spaltung der Sucrose durch Invertase (s. oben) zurückgeführt werden.

Wie in **Abbildung 4.9** zu sehen ist, lagen die erzielten, maximalen optischen Dichten (OD<sub>580</sub>) in den Experimenten mit dem in Uruguay isolierten Stamm *S. meliloti* CE15 um 9,1 % bei der Zuckerrohrmelasse aus Artigas (ROU) bzw. um 12,2 % bei der Zuckerrübenmelasse aus Lage (D) unter den Resultaten, die in den Kultivierungen von *S. meliloti* 2011 mit den entsprechenden Medien erzielt werden konnten, wie **Abbildung 4.8** zeigt. Auffällig bei den Experimenten mit *S. meliloti* CE15 waren die im Vergleich zu *S. meliloti* 2011 kürzeren Anpassungsphasen bei der Kultivierung in den Melassemedien. Andererseits wurden in den Kultivierungsexperimenten mit *S. meliloti* CE15 im Vergleich zu den Versuchen mit *S. meliloti* 2011 die höchsten Werte in der optischen Dichte (OD<sub>580</sub>) erst nach 91 h erreicht. Die Ausnahme bildete das Experiment mit der Zuckerrohrmelasse aus Tucuman (RA). Die Kultur erreichte ihre höchste Biomassekonzentration bereits nach bereits nach 65 h mit einer maximalen OD<sub>580</sub> von nur 10,0. Danach nahm die optische Dichte in der Kultur bereits wieder ab.

Die beiden Experimentreihen mit *S. meliloti* 2011 und *S. meliloti* CE15 haben gezeigt, dass *Sinorhizobium meliloti* in Nährlösungen, die auf einer 2 %-igen Lösung verschiedener, unbehandelter Zuckerrohr- oder Zuckerrübenmelassen mit 1 g·L<sup>-1</sup> Harnstoff basieren, bis zu optischen Dichten OD<sub>580</sub> von 14,7 kultiviert werden kann. Eine Vorbehandlung der Melasse, wie sie bei Ballatti durchgeführt (Ballatti, 1998) wurde, ist nicht zwingend notwendig, um ein starkes Wachstum der Bodenbakterien zu gewährleisten. In den dargestellten Versuchen konnten mit den verwendeten Melassen höhere optische Dichten (OD<sub>580</sub>) im Schüttelkolben erreicht werden, als Boiardi sie z.B. mit einem Medium auf Basis eines Malzkeimschrotextraktes (OD<sub>580</sub> nach 50 h = 6,0; Boiardi *et al.*, 1985) erzielte. Mit der aus Artigas (ROU) stammenden Zuckerrohrmelasse konnten in beiden Versuchsreihen die höchsten optischen Dichten erreicht werden. Die brasilianische Zuckerrohrmelasse und die beiden Rübenmelassen aus Deutschland lagen bei den OD<sub>580</sub>-Werten auf einem vergleichbaren Niveau, während die argentinische Zuckerrohrmelasse in beiden Reihen die schlechtesten Resultate lieferte.

Die Ursachen für die schlechteren Ergebnisse mit der argentinischen Melasse können einerseits auf wachstumsinhibitorische Substanzen zurückgeführt werden, die Melassen je nach Verarbeitungsverfahren zugegeben werden, um sie z.B. fließfähiger zu halten oder ein Aufschäumen bei der Zuckerherstellung zu vermeiden (Fattohi, 1995). Diese Beimengungen können sich nachteilig auf das Wachstum von Mikroorganismen auswirken, wie Fattohi zeigen konnte. Doch auch ein geringerer Gehalt an einigen essentiellen Nährstoffen wie z.B. das Vitamin Biotin oder an Spurenelementen in der Melasse aus Tucuman (RA) im Vergleich zu den Konzentrationen dieser Stoffe in den anderen verwendeten Melassen könnte zu den niedrigeren Werten in der optischen Dichte ( $OD_{580}$ ) der Kulturen führen.



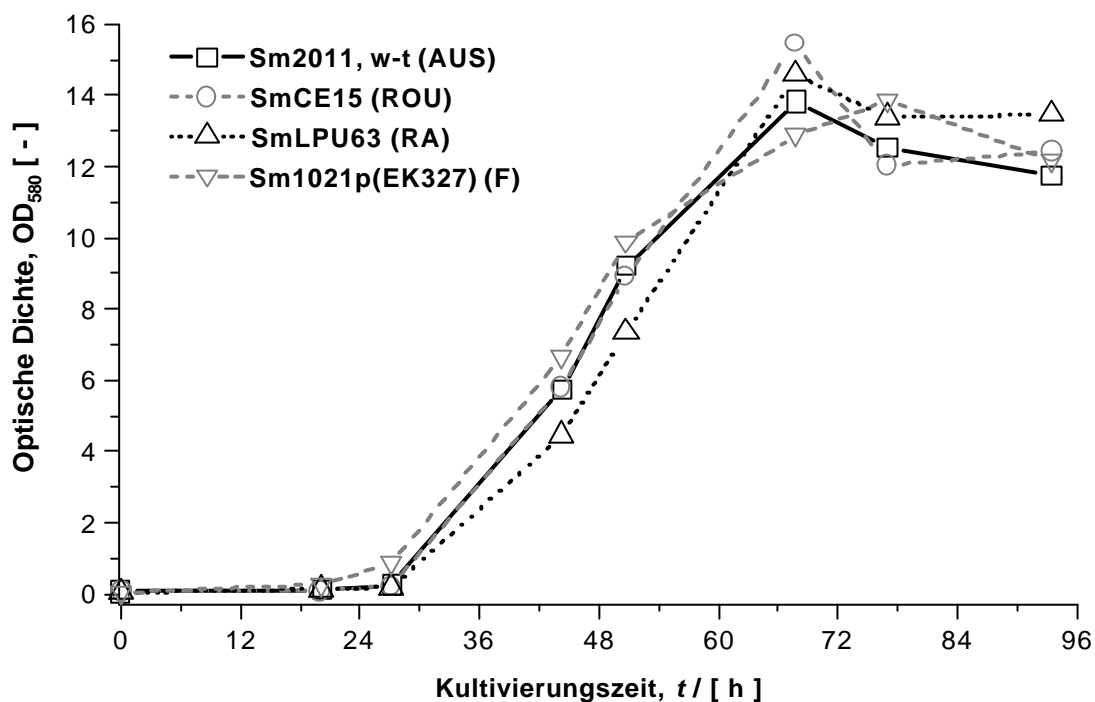
**Abbildung 4.9** Kultivierung von *S. meliloti* CE15 in verschiedenen Handelsmelassen (2 %) aus Südamerika und Deutschland.

Für den Großteil der weiteren Kultivierungsexperimente von *Sinorhizobien* mit Melassemedien musste, trotz der besseren Ergebnisse in den Wachstumsversuchen mit der Zuckerrohrmelasse aus Uruguay, auf die Zuckerrübenmelasse aus dem Zuckerproduktionsstandort Lage als Basis für Melassemedien zurückgegriffen werden. Denn sowohl aus dem Standort Artigas (ROU) wie auch aus Pernambuco (BR) konnten kurz- und mittelfristig keine weiteren Kontingente dieser Zuckerrohrmelassen für die im Folgenden dargestellten Experimente bezogen werden. Wie die Resultate der oben dargestellten Experimente aber gezeigt haben, konnten mit Zuckerrüben-Melassemedien bis zu 90 % der  $OD_{580}$ -Werte im Schüttelkolben erreicht werden, die sich mit der Zuckerrohrmelasse aus Uruguay erzielen ließen.

**Kultivierung verschiedener *S. meliloti* Stämme in einem Melassemedium**

In dem nachfolgenden Experiment sollte das Wachstum verschiedener Sinorhizobien-Stämme in einer identischen 2 %-igen Melassenährlösung miteinander verglichen werden. Diese Versuche wurden mit der in Tucuman (RA) produzierten Zuckerrohrmelasse (s. **Tabelle 3.2**) durchgeführt.

Alle vier Stämme wiesen einen nahezu identischen Verlauf ihrer Wachstumskurven in Melassemedien auf, wie die **Abbildung 4.10** zeigt. Auffällig war die lange Anpassungsphase von ca. 27 h für alle Stämme im Vergleich zu Schüttelkolbenkultivierungen dieser Stämme in anderen Melassemedien.

**Abbildung 4.10**

Schüttelkolbenkultivierung von vier *S. meliloti*-Stämmen in einer 2 %-igen Zuckerrohrmelasselösung. Je 150 mL Melassemedium wurden mit 5 mL von ü.N. Vorkulturen (in TY-Medium ohne Antibiotikum) mit verschiedenen *S. meliloti*-Stämmen angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei +28 °C in 300 mL Kulturkolben ohne Schikanen und einer Kreisfrequenz des Schüttlers von 100 min<sup>-1</sup>.

Nach 68 h erreichten der Wildtyp *S. meliloti* 2011 (OD<sub>580</sub> = 13,82) und die in Südamerika isolierten Stämme *S. meliloti* LPU63 (OD<sub>580</sub> = 14,58) und *S. meliloti* CE15 (OD<sub>580</sub> = 15,44) ihr OD<sub>580</sub>-Maximum und gehen dann in die stationäre Phase über. Der Nod-Faktor-Produktionsstamm *S. meliloti* 1021pEK327 erreicht sein Maximum erst 9 h später (OD<sub>580</sub> = 13,86).

Die Verwertung der in der Melasse enthaltenen Nährstoffe scheint nach den Resultaten dieses Experimentes in allen Stämmen in vergleichbarer Weise zu erfolgen. Die längere Anpassungsphase in diesem Experiment bei allen Stämmen kann auf wachstumsinhibierende Stoffe oder auf das Fehlen essentieller Nährstoffe in der argentinischen Zuckerrohrmelasse zurückgeführt werden. Dennoch konnten im Vergleich zur Kultivierung von *Sinorhizobium meliloti* in Medien mit anderen Rohstoffen in den Versuchen mit dem 2%-igem Melassemedium mit allen Stämmen OD<sub>580</sub>-Werte realisiert werden, die um den Faktor 1,5 bis 2 höher lagen als Kultivierungen mit anderen Vollmedien (Boiardi *et al.*, 1985).

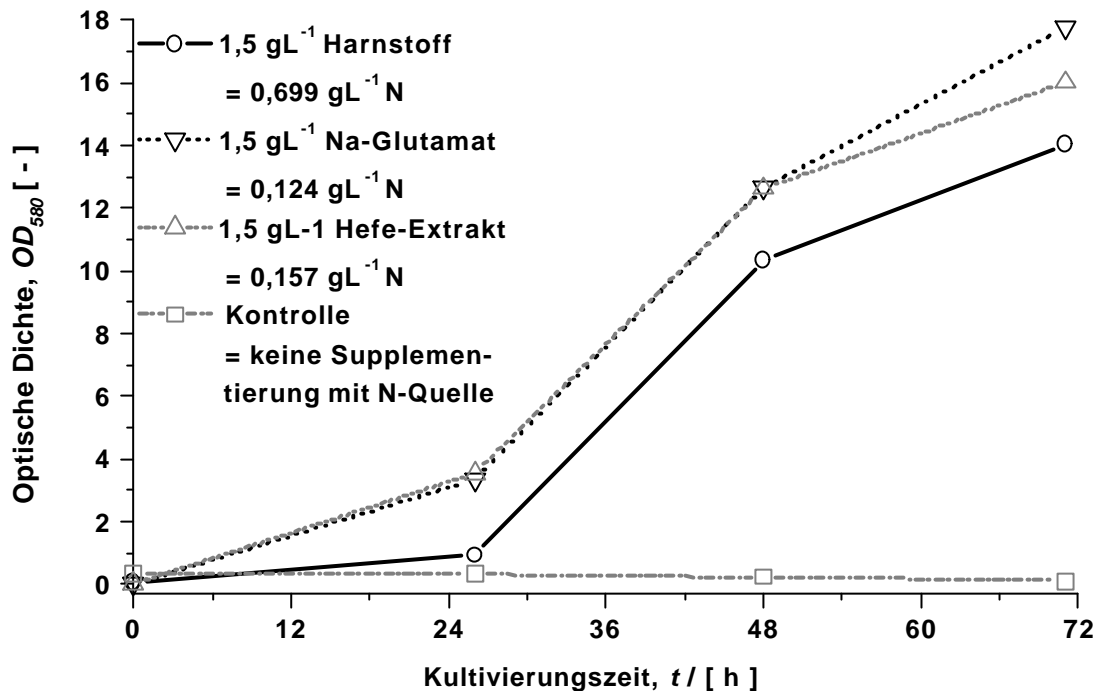
### **Stickstoffquellen für die Supplementierung von Melassemedien**

Die in 2 - 3 %-igen Rohr- und Rübenmelasselösungen enthaltenen Mengen an Stickstoff reichen nicht aus, um die darin zu kultivierenden Bakterien in ausreichendem Maß mit dem essentiellen Nährstoff zu versorgen, wie unter anderem aus der **Tabelle 2.3** hervorgeht. Eine Handelsmelasse aus Zuckerrohr mit ca. 75 % Trockenmasse enthält durchschnittlich nur 0,7 (w/w) % an Stickstoff aus organischen Verbindungen nach Kjeldahl, eine Rübenmelasse 1,5 (w/w) % N, bei Zuckerrüben insbesondere in Form von Betainen, die im Zuckerrohr nicht vorkommt (Higginbotham, 2000). Daneben enthalten die Melassen lediglich noch 0,06 % Nitrat (Zuckerrohr) bzw. 0,25 % in der Zuckerrübe. Aus diesem Grund muss ein Medium auf Basis von einer 2 - 3 %-igen Zuckerrohr- oder Zuckerrübenmelasselösung mit einer preiswerten Stickstoffquelle supplementiert werden. Für die Auswahl einer geeigneten Stickstoffquelle erfolgte eine Anzucht von *S. meliloti* LPU63 mit 100 mL 2% Zuckerrohrmelassemedium (RA) in 300 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei +28 °C und einer Schüttlerfrequenz von 100 min<sup>-1</sup> mit jeweils 1,5 g Harnstoff, 1,5 g Na-Glutamat, 1,5 g Hefeextrakt und einem Kontrollansatz ohne zusätzliche Stickstoffquelle. Alle Medien wurde vor der Sterilisation mit 2N KOH auf einen pH von 6,8 eingestellt. Die Kolben wurden mit je 5 mL einer ü.N. Kultur von *S. meliloti* LPU63 in TY-Medium angeimpft.

Ohne die Ergänzung der Melassenährlösung mit einer Stickstoffquelle war das Bodenbakterium *S. meliloti* LPU63 nicht in der Lage, in einem Melassemedium zu wachsen, wie der Kontrollansatz ohne Stickstoffergänzung in **Abbildung 4.11** zeigt. Mit der Zugabe von 1,5 g · L<sup>-1</sup> Hefeextrakt oder Na-Glutamat konnte der Stickstoffbedarf der Bakterien des Mediums in ausreichendem Maß abgedeckt werden, wie es die Wachstumskurven von *S. meliloti* LPU63 in diesen beiden Kulturen belegten. Obwohl von 1,5 g Supplement der Anteil des Stickstoffs in Na-Glutamat nur 8,3 % (w/w) und in Hefeextrakt nur 10,5 % (w/w) beträgt, wiesen die mit diesen Substanzen ergänzten Kulturen dabei ein schnelleres Wachstum auf als die Bakterien in der mit Harnstoff (46,6 % (w/w) N-Anteil) supplementierten Melasselösung und erreichten höhere Werte in der optischen Dichte (OD<sub>580</sub>) nach 71 h als die mit Harnstoff angezogenen Bakterien. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die in Hefeextrakt enthaltenen Aminosäuren bzw. das Na-Glutamat von *S. meliloti*-Stämmen direkt in ihrem Primärstoffwechsel verwendet werden können (Poole *et al.*, 2000). Für die Nutzung des Harnstoffs muss das Bodenbakterium dagegen zuerst seine Urease-Gene exprimieren (Miksch *et al.*, 1994), um den Harnstoff in CO<sub>2</sub> und NH<sub>4</sub><sup>+</sup> zu spalten. Erst in Form der Ammoniumionen ist der Stickstoff im Bakterienstoffwechsel nutzbar. Dies erklärt einerseits die längere Anpassungsphase der *S. meliloti* LPU63-Kultur, die mit Harnstoff supplementiert wurde, wie in **Abbildung 4.11** zu sehen ist. Auf Grund des



höheren Energieaufwandes zur Synthese der Urease lässt sich damit auch die mit einer optischen Dichte ( $OD_{580}$ ) von 14,04 nach 71 h niedrigere Zelldichte im Medium im Vergleich zur Kultur mit Na-Glutamat (-22 %) und Hefeextrakt (-12,4 %) erklären.



**Abbildung 4.11** Kultivierung von *S. meliloti* LPU63 in 2 %-igem Zuckerrohr-Melassemedium (Tucuman; (RA)) mit Supplementierung verschiedener Stickstoffquellen.

Trotz der geringeren Biomasseausbeute wurde bei der weiteren Kultivierung von Bodenbakterien auf Harnstoff zur Supplementierung der Melasselösung zurückgegriffen, da dieser mit einem Weltmarktpreis von 174 € / metrische Tonne (Hr. Ackermann, SKW Piesteritz, Jan. 2001) die bei weitem preiswertere Alternative im Vergleich zu den beiden anderen getesteten N-Quellen ist. Mit Bahia Blanca (RA) wurde im Januar 2000 zudem eine Fertigungsanlage für Harnstoff mit einer Kapazität von 3.250 metrische Tonnen / Tag in Betrieb genommen. Damit ist der Harnstoff zur Produktion von Starterkulturen in Uruguay und Argentinien auch lokal verfügbar und damit die preisgünstigste N-Quelle. Die Preise für die Alternativen, Na-Glutamat und Hefeextrakt lagen zum gleichen Zeitraum um den Faktor 6 mit 1.075 € je metrischer Tonne für Na-Glutamat (Quelle: Hr. Meier, Helm AG, Hamburg, Nov. 2000) bzw. um den Faktor 28 mit 4.875 € je metrischer Tonne Hefeextrakt (Quelle: Hr. Samkühler, OHLY Deutsche Hefewerke AG, Hamburg, Nov. 2000) über den Weltmarktkosten für Harnstoff.

Bei einer geforderten Mindestkonzentration von  $10^{10}$  Rhizobien je  $m^2$  Ackerboden und der Verwendung eines Flüssig-Inokulums mit einem durchschnittlichen Bakterientiter von  $5 \cdot 10^9$  Zellen·mL<sup>-1</sup> bei Aufbringung, das entspricht einem Sinorhizo-

bien-Titer von  $1 - 2 \cdot 10^{10}$  Zellen·mL<sup>-1</sup> zum Ende der Fermentation, ergibt sich nach den Resultaten der in dieser Arbeit durchgeführten Zulaufkultivierungen (s. **4.2.2** und **4.2.4**) folgende Kalkulation für die Produktion von Starterkulturen für einen 300 ha großen landwirtschaftlichen Betrieb mit Luzerne (*Medicago sativa*) als Nutzpflanze:

Für die gesamte Ackerfläche von 300 ha werden 6.000 L Fermentationsbrühe je Inokulation benötigt. Für Fermentationen im 2 L Maßstab wurden je Zulaufkultivierung 90,0 g·L<sup>-1</sup> Melasse und 4,9 g·L<sup>-1</sup> N-Quelle (Harnstoff) eingesetzt. Für den 6 m<sup>3</sup>-Maßstab ergeben sich daraus bei einem Preis für Zuckerrohrmelasse von 79,4 € je Tonne (Quelle: Fr. Eichmann, Köln Zucker, Nov. 2000), einer benötigten Menge von 1,08 metrische Tonnen·a<sup>-1</sup> Melasse und 58,8 kg·a<sup>-1</sup> an Stickstoffquelle die in **Tabelle 4.1** dargestellten Kosten für die benötigten Nährstoffe:

**Tabelle 4.1** Vergleichende Aufstellung der Kosten der benötigten Nährstoffe für eine Zulaufkultivierung von *S. meliloti* im 6 m<sup>3</sup>-Maßstab bei der Herstellung von 2 Starterkulturen per annum unter der Verwendung verschiedener N-Quellen

	Harnstoff	Na-Glutamat	Hefeextrakt
<b>Kosten Melasse</b>	85,75 €	85,75 €	85,75 €
<b>Kosten N-Quelle</b>	10,23 €	63,21 €	286,65 €
<b>S Kosten</b>	95,98 €	148,96 €	372,40 €

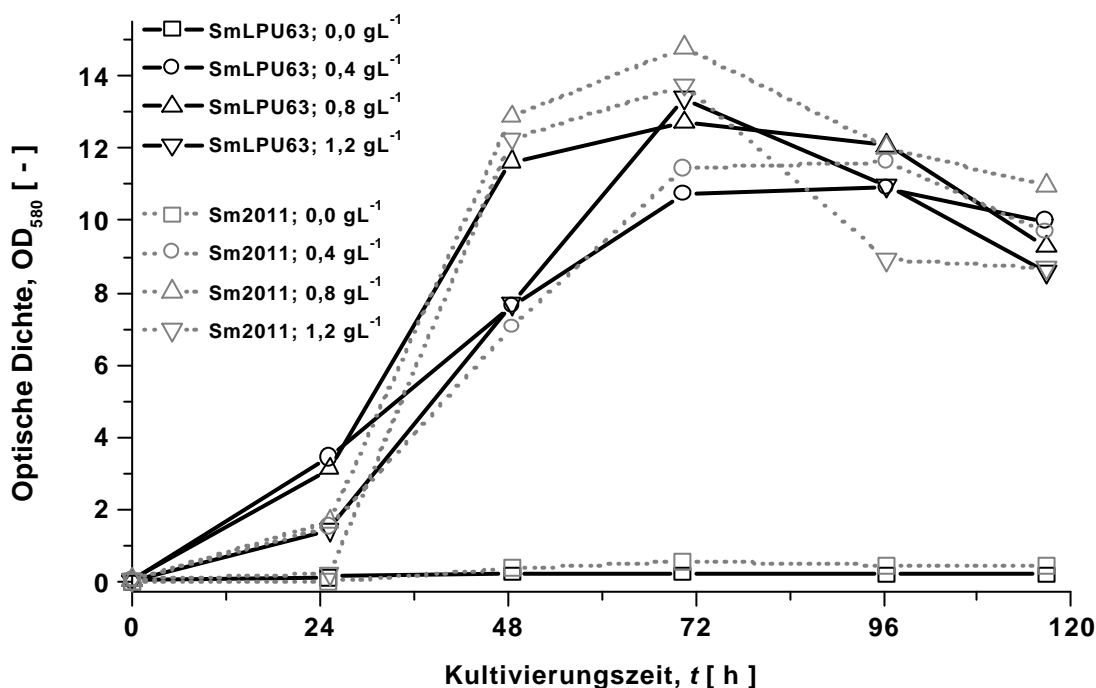
Aus **Tabelle 4.1** wird deutlich, dass allein durch die Verwendung von Harnstoff als Stickstoffquelle eine Ersparnis bei den Rohstoffen von 35,6 % gegenüber einer Kultivierung mit Na-Glutamat und sogar eine Kostenreduktion von 74,2 % gegenüber der Fermentation mit Hefeextrakt als N-Quelle erreicht wird. Bei Fermentationsprodukten mit niedriger Wertschöpfung, zu denen die Starterkulturen gezählt werden müssen, gewinnt eine Kostenabsenkung bei den eingesetzten Rohstoffen an Bedeutung und ist eine der Grundlagen für einen ökonomisch optimierten Kultivierungsprozess.

Nachdem aus den oben genannten Gründen Harnstoff als die geeignete N-Quelle zur Supplementierung einer Melassenährlösung ausgewählt wurde, sollte die optimale Menge dieser Stickstoffquelle je 10 g·L<sup>-1</sup> Melasse für die Kultivierung von *Sinorhizobien* ermittelt werden. Die Kultivierungen in einem 2 % Zuckerrübenmelassemedium (Elsdorf, (D)) mit Harnstoffkonzentrationen von 0,0 g·L<sup>-1</sup> bis 1,2 g·L<sup>-1</sup> erfolgten bei +28 °C in 300 mL Schüttelkolben mit Schikane auf dem Exzenter-schüttler mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 150 min<sup>-1</sup>. Das pH der Medien wurde vor dem Autoklavieren mit 10 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> auf einen Wert von 6,8 eingestellt. Die Kolben wurden mit je 5 mL einer ü.N. Kultur von *S. meliloti* LPU63 und *S. meliloti* 2011 in TY-Medium angeimpft.

Vergleichbar mit den Experimenten in Zuckerrohrmelasse aus **Abbildung 4.11** zeigten auch in einem Medium auf Zuckerrübenmelassebasis die Kulturen von *S. meliloti* LPU63 und *S. meliloti* 2011 nur ein minimales Wachstum im Lauf des 5-tägigen Experiments, wenn keine Supplementierung des Melassemediums mit Harnstoff erfolgte, wie in **Abbildung 4.12** zu sehen ist. Bereits bei Zugabe von 0,4 g·L<sup>-1</sup> Harnstoff zum Medium wurde in nach 72 h eine OD<sub>580</sub> von 10,72 mit

*S. meliloti* LPU63, bzw. eine  $OD_{580}$  von 11,46 mit *S. meliloti* 2011 erreicht. Diese Werte lagen allerdings noch 20 - 23 % unter den Werten, die in den Nährlösungen mit höher dosiertem Harnstoff gemessen werden konnten.

Bei den Kultivierungen von *S. meliloti* LPU63 konnte mit  $1,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  Harnstoff im Medium eine kalkulierte Biotrockenmassekonzentration von  $5,09 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ZTM (s. **Tabelle 3.3**) erreicht werden, die sich aus dem Graphen in **Abbildung 4.12** ergibt. Diese Konzentration nach 72 h lag somit nur geringfügig über dem Wert, der bei einer Harnstoffkonzentration von  $0,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  im Medium zu einer ZTM von  $4,84 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  führte. Beim Stamm *S. meliloti* 2011 lagen nach 72 h in der Nährlösung bei  $1,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  Harnstoff die optische Dichte und die daraus kalkulierte ZTM von  $5,22 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  sogar unter den Werten der Nährlösung mit  $0,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  Harnstoff und einer erzielten Biotrockenmassekonzentration von  $5,62 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .



**Abbildung 4.12**

Kultivierung von *S. meliloti* 2011 und *S. meliloti* LPU63 in 100 mL 2 %-igem Zuckerrübenmelassemedium (Elsdorf, (D)) bei unterschiedlichen Konzentrationen an Harnstoff.

Anhand dieser Resultate wurde in allen weiteren Experimenten mit einer Konzentration von 0,5 g Harnstoff / 10 g Melasse gearbeitet. Weitere Schüttelkolbenexperimente mit *S. meliloti* LPU63 konnten zeigen, das mit einer darüber liegenden Dosierung von Harnstoff keine höheren Zelltrokenmassekonzentrationen erreicht werden können (Daten hier nicht gezeigt).

### **Einfluss der Melassekonzentration auf das Wachstum von *Sinorhizobium meliloti*-Stämmen**

Mit den beiden in Südamerika isolierten Bodenbakterien-Stämmen *S. meliloti* LPU63 und *S. meliloti* CE15 sollte in Schüttelkolbenexperimenten getestet werden, welche Melassekonzentration im Medium sich für die Satzphase einer Zulaufkultivierung im Rührkessel am besten eignet.

In der Melasselösung mit  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  Zuckerrohrmelasse und  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  Harnstoff wuchs *S. meliloti* LPU63, wie **Abbildung 4.13** zeigt, bis zu einer  $\text{OD}_{580}$  von 9,90 bei  $t = 116 \text{ h}$  an, was einer ZTM von  $3,47 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  entsprach. Mit dem Stamm *S. meliloti* CE15 konnte in dem gleichen Medium nach  $t = 116 \text{ h}$  eine ZTM von  $4,75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  erzielt werden. In den Kolben mit einem 3 % Melassemedium wurden deutlich höhere Biomassekonzentrationen mit beiden Stämmen erreicht. Bei *S. meliloti* LPU63 wurde mit einer  $\text{OD}_{580}$  nach  $t = 116 \text{ h}$  von 17,62 eine ZTM von ca.  $6,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  erhalten und mit dem Stamm *S. meliloti* CE15 konnte bei einer  $\text{OD}_{580}$  von 18,22 nach  $t = 125 \text{ h}$  sogar eine Biotrockenmassekonzentration von  $6,92 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  erzielt werden. Damit lagen die maximalen Konzentrationen im 3 %-igen Melassemedium um 45,7 % für *S. meliloti* CE15 und um 92,7 % für *S. meliloti* LPU63 über den erzielten Werten bei der Kultivierung in einer 2 %-igen Melasselösung.

Bei der Kultivierung von *S. meliloti* CE15 konnte in dem Medium mit 4 % Melasse und  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  Harnstoff nach 173 h mit einer  $\text{OD}_{580}$  von 17,88 die Zelldichte gegenüber dem 3 %-igen Ansatz nach 125 h nicht weiter gesteigert werden. Bei *S. meliloti* LPU63 lag die Zelltrockenmassekonzentration in einem Medium mit 4 % Melasse und  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  Harnstoff nach 173 h allerdings mit einer ZTM von  $7,71 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  um 15,2 % über den Werten des Kolbens mit 3 % Melasse und  $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  Harnstoff nach 117 h.

Bei den in der **Abbildung 4.13** gezeigten Kultivierungen der *Sinorhizobien* in der Zuckerrohrmelasse aus Tucuman (RA) fielen erneut die langen Anpassungsphasen auf, die beide Stämme benötigen, bevor die Organismen beginnen, sich zu vermehren. Diese Anpassungsphase von 48 h kann bei den Kultivierungen von *S. meliloti* LPU63 und *S. meliloti* CE15 in 2 % und 3 % Melasse, wie auch in den Experimenten aus **Abbildung 4.10** beschrieben, auf die Verwendung der Melasse aus Tucuman (RA) zurückgeführt werden, in der die *Sinorhizobien* generell ein schlechteres Wachstumsverhalten bei der Kultivierung in der Melasse aus Tucuman (RA) auf.

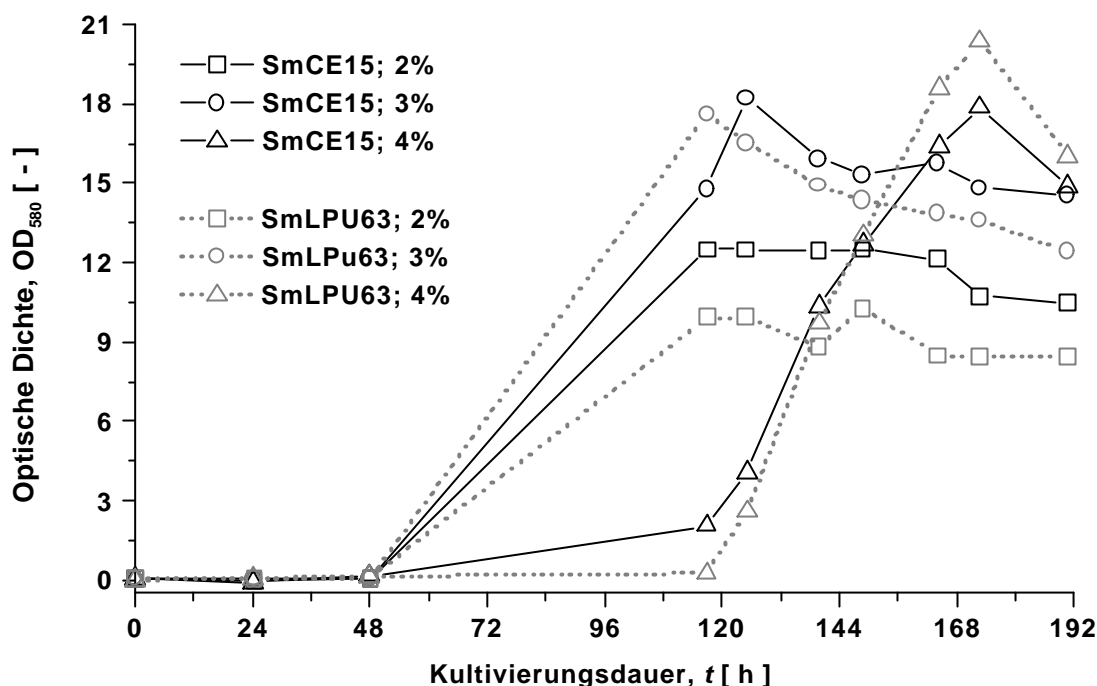


Abbildung 4.13

Schüttelkolbenkultivierung von *S. meliloti* LPU63 und *S. meliloti* CE15 in unterschiedlich konzentrierten Zuckerrohrmelassemedien (Tucuman, RA). 100 mL der unterschiedlich konzentrierten Melassemedien in Schüttelkolben ohne Schikanen wurden mit 5 mL einer ü.N. Vor-  
kultur von *S. meliloti* LPU63 und *S. meliloti* CE15 (in TY-Medium ohne Antibiotikum) angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei einer Schüttlerfrequenz von  $100 \text{ min}^{-1}$  in 300 mL Schüttelkolben ohne Schikane. Die Melasselösungen wurden mit 0,5 g Harnstoff je 10 g Melasse supplementiert.

Doch die Ursache für die insgesamt 120 h andauernde Anpassungsphase der *Sinorhizobien*-Kulturen in dem 4 % Melassemedium in **Abbildung 4.13** ist nicht nur auf die Qualität der argentinischen Zuckerrohrmelasse, sondern auch auf die erhöhte Konzentration an gelösten Stoffen in der 4 %-igen Lösung (hyperosmotische Umgebung) zurückzuführen. Die Bodenbakterien werden gezwungen, auf den erhöhten osmotischen Druck zu reagieren und die Zellen vor einem verstärkten Wasseraustritt zu schützen (Gouffi *et al.*, 1999). Und dies kann zu dem beobachteten, stark verzögerten Wachstum der *Sinorhizobien* in dem 4 % Melassemedium führen.

Aufgrund der um 72 h längeren Anpassungsphase bei der Verwendung eines 4 %-igen Melassemediums im Vergleich mit den geringer konzentrierten Melassemedien und einer nur um max. 15,2 % höheren Biomasseausbeute wurde bei den Kultivierungen von *Sinorhizobium meliloti*-Stämmen im Rührkessel aus produktivitätsspezifischen Aspekten, d.h. zur Erzielung einer hohen Raumzeitausbeute bei einer möglichst kurzen Anpassungsphase, eine Startkonzentration von 3 % Melasse und  $1,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Harnstoff gewählt.

### 4.2.2 Zulaufkultivierungen im 2 L-Maßstab mit S. meliloti LPU63

In den nächsten Abschnitten dieser Arbeit werden Fermentationen mit *S. meliloti* LPU63 in zwei verschiedenen Bioreaktorentypen (Labfors; Fa. Infors und Biostat B; Fa. B. Braun Biotech) bei 2L Arbeitsvolumen durchgeführt. Da deren Ergebnisse miteinander verglichen werden sollten, musste zuvor in einem Test unter identischen Kultivierungsbedingungen geklärt werden, ob und in welchem Umfang die Geometrien und Ausstattungen der beiden Bioreaktoren einen Einfluss auf die Kultivierungsergebnisse mit dem (semi-)säuretoleranten Stamm *S. meliloti* LPU63 in einem 3 %-igen Zuckerrübenmelassemedium ausüben.

Die in **Abbildung 4.14** dargestellten Fermentationen zeigen, dass trotz der unterschiedlichen Reaktorgeometrien und Ausstattungen (s. **Tabelle 3.6**) unter gleichen Fermentationsbedingungen bei der Kultivierung von *S. meliloti* LPU63 im 3 % Melassemedium keine großen Unterschiede im Wachstumsverhalten der Kulturen in in den beiden Bioreaktoren zu erkennen waren. Sowohl die Werte der optischen Dichte ( $OD_{580}$ ) wie auch die Bestimmungen der Zelltrockenmassen zeigten über den gesamten Fermentationsverlauf eine sehr hohe Übereinstimmung. Lediglich bei der ZTM-Bestimmung zum Zeitpunkt  $t = 43$  h differierten die Werte um 20 % ( $7,98 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  zu  $6,44 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) voneinander. Alle Messwerte von  $OD_{580}$  und ZTM wiesen ansonsten einen hohen Korrelationsgrad auf.

Auch die Kurven der Säuredosierung und damit auch der Verlauf der Mediumdosierung verlaufen in beiden Fermentationen bis zum Zeitpunkt  $t = 55$  h nahezu identisch. Dann wird im B. Braun-Fermenter etwas mehr Säure zudosiert, was aber auf den Wachstumsverlauf keinen großen Einfluss mehr ausübte. Signifikantere Unterschiede gab es bei der Anpassung der Sauerstoffsättigung im Medium über die Drehfrequenzregelung des Rührers. Der vorgegebene Sollwert von 55 % wird in diesem Parallelversuch von der Steuerung des Infors-Fermenters insbesondere nach Anspringen der Rührerdrehzahlregelung ( $t = 8,26$  h) präziser eingehalten als beim B. Braun-Fermenter, dessen  $pO_2$  bis auf 45 % absackt, bevor die Regelung bei  $t = 10,71$  h die Rührerdrehfrequenz so anhebt, dass der  $pO_2$  bei 45 % konstant bis  $t = 32,30$  h gehalten wird. Erst dann wurde auch beim B. Braun-Fermenter eine Gelöstsauerstoffkonzentration mit einem durchschnittlichen Wert von ca. 55 % gehalten. Der niedrigere Anteil an Gelöstsauerstoff im Medium von 45 % in der Fermentation mit dem B. Braun-Fermenter wirkte sich aber, wie die Daten in **Abbildung 4.14** zeigten, nicht negativ auf das Wachstumsverhalten der Mikroorganismen im Fermenter aus.

Diese Zulaufkultivierungen von *S. meliloti* LPU63 in einem 3 % Melassemedium mit den beiden unterschiedlichen Bioreaktortypen haben gezeigt, dass die Fermentergeometrien und Ausstattungen der Bioreaktoren bei sonst gleichen Fermentationsbedingungen keinen nennenswerten Einfluss auf den Verlauf der Kultivierung ausüben. Deshalb wurden in den nachfolgenden Versuchsreihen vergleichende Experimente parallel in beiden Reaktortypen durchgeführt.

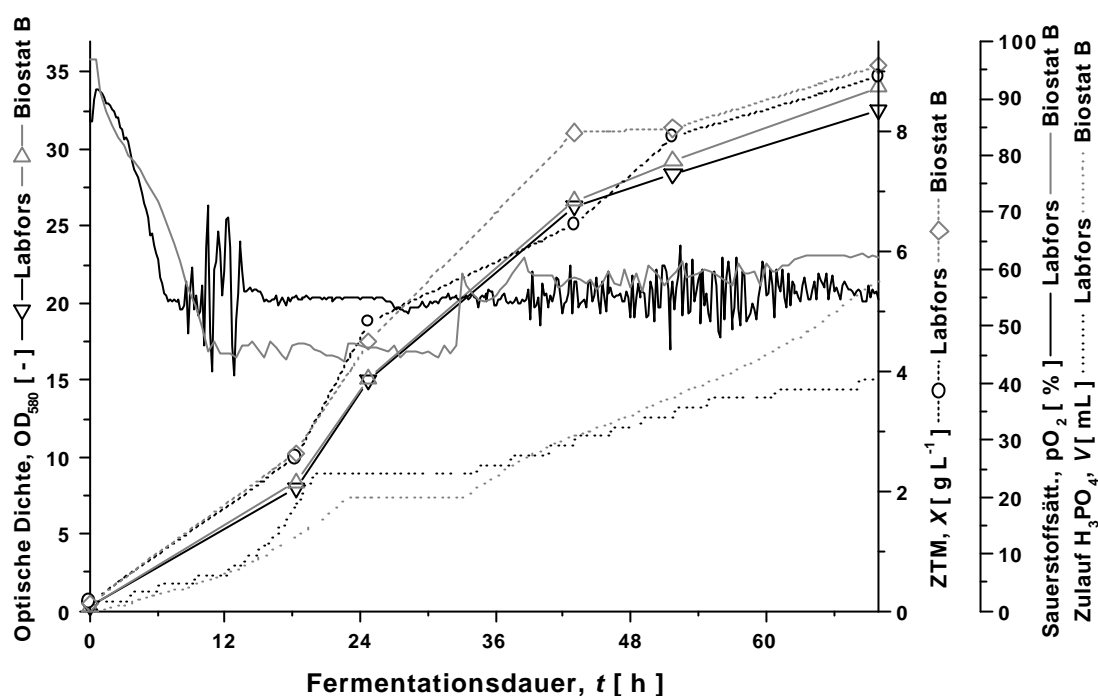


Abbildung 4.14

Vergleichende Zulaufkultivierungen von *S. meliloti* LPU63 mit 3 % Zuckerrübenmelassemedium (Lage, D) in einem Labfors und Biostat B 2 L-Tischfermenter. Die Zulaufkultivierungen erfolgten mit einem Startvolumen von 1,5 L, einer Anfangsrührerdrehfrequenz von  $100\ \text{min}^{-1}$  und einem Lufteintrag von  $3\ \text{NL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Die 200 mL Vorkultur mit *S. meliloti* LPU63, in 3 % Zuckerrübenmelasse +  $400\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Streptomycin ü.N. angezogen (optische Dichte  $OD_{580} = 2,905$ ), wurde aufgeteilt und je 100 mL zum Animpfen beider Fermenter verwendet. Die Zufütterung von 450 mL eines 10-fach-Melassekonzentrat erfolgte über das Signal der Säuredosierung (Programm: s. 7.1). Der  $pO_2$  wurde über die Erhöhung der Rührerdrehzahl geregelt.

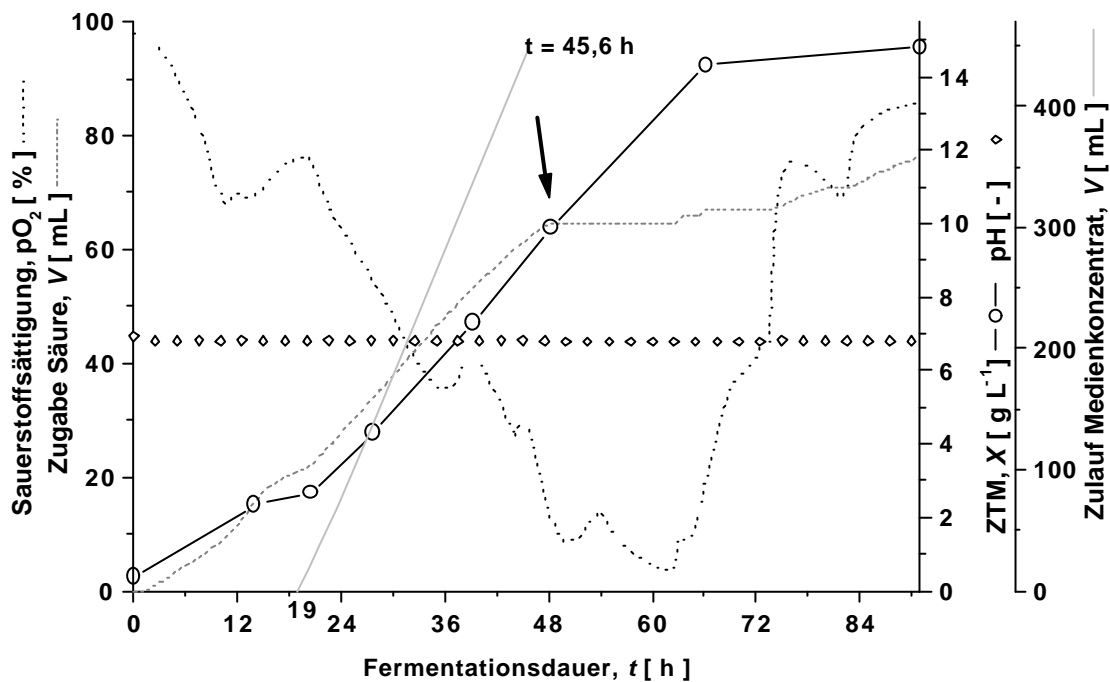
### Zulaufkultivierungen von *S. meliloti* LPU63 in 3 % Melassemedium und TY-Medium

In Satzkultivierungen von *S. meliloti* LPU63 in einem 2 % Zuckerrübenmelassemedium (Lage, D) konnten im 2 L Maßstab nur Biotrockenmassewerte von max.  $4,8\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  realisiert werden (Daten hier nicht gezeigt). Um höhere Ausbeuten an Biomasse mit dem Bodenbakterium zu erzielen, wurde deshalb das Verfahren der Zulaufkultivierung für Fermentationen mit dem (semi)-säuretoleranten Bodenbakterium ausgewählt. Die Kultivierung des Bodenbakteriums in Melassemedium wurde mit einem Zulaufverfahren von *S. meliloti* LPU63 verglichen, dass mit einem Standardmedium zur Anzucht von *Sinorhizobium meliloti*, dem Trypton-Hefeextrakt-(TY)-Medium, durchgeführt wurde. Beide Fermentationen wurden bei ansonsten identischen Bedingungen durchgeführt. Die Zufütterung mit einem 10-fach-Konzentrat an Nährlösung erfolgte in beiden Fermentationen mit einem konstanten Volumenstrom. Der Start der Zudosierung erfolgte in beiden Fermentern parallel, der Startpunkt der Zudosierung  $t_0 = 19\ \text{h}$  wurde anhand des Verlaufs der  $OD_{580}$ -Kurve für die Kultur im Melassemedium festgelegt. Die Fermentationen erfolgten bei einer Rührerdrehfre-

## 4 Ergebnisse und Diskussion

quenz von  $600 \text{ min}^{-1}$ . Die Zufütterung von  $450 \text{ mL}$  des 10-fach-Melassemediumkonzentrats startete nach  $19 \text{ h}$  mit einem konstanten Volumenstrom von  $(V) = 18 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ .

Die Wachstumskurve (ZTM) von *S. meliloti* LPU63 bei der Zulaufkultivierung mit 3 % Melassemedium in **Abbildung 4.15** wies in der Satzphase bereits nach  $14 \text{ h}$  ein Plateau auf. Diese Stagnation im Wachstum der Bodenbakterien korreliert in hohem Maß mit dem Verlauf der  $p\text{O}_2$ -Kurve, deren Werte in diesem Zeitraum wieder anstiegen und dem Säureverbrauch, der in diesem Zeitraum abnahm. Beide Aspekte weisen auf eine Stoffwechselumstellung bei *S. meliloti* LPU63 auf Grund einer Nährstofflimitierung hin. Mit der Zudosierung von Mediumkonzentrat ab  $t = 19 \text{ h}$  stieg die Biomassekonzentration im Fermenter wieder an und erreichte nach  $66,25 \text{ h}$  eine Konzentration von  $14,31 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , der sich bis zum Abbruch der Fermentation nach  $91 \text{ h}$  nur noch um  $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  erhöhte.



**Abbildung 4.15**

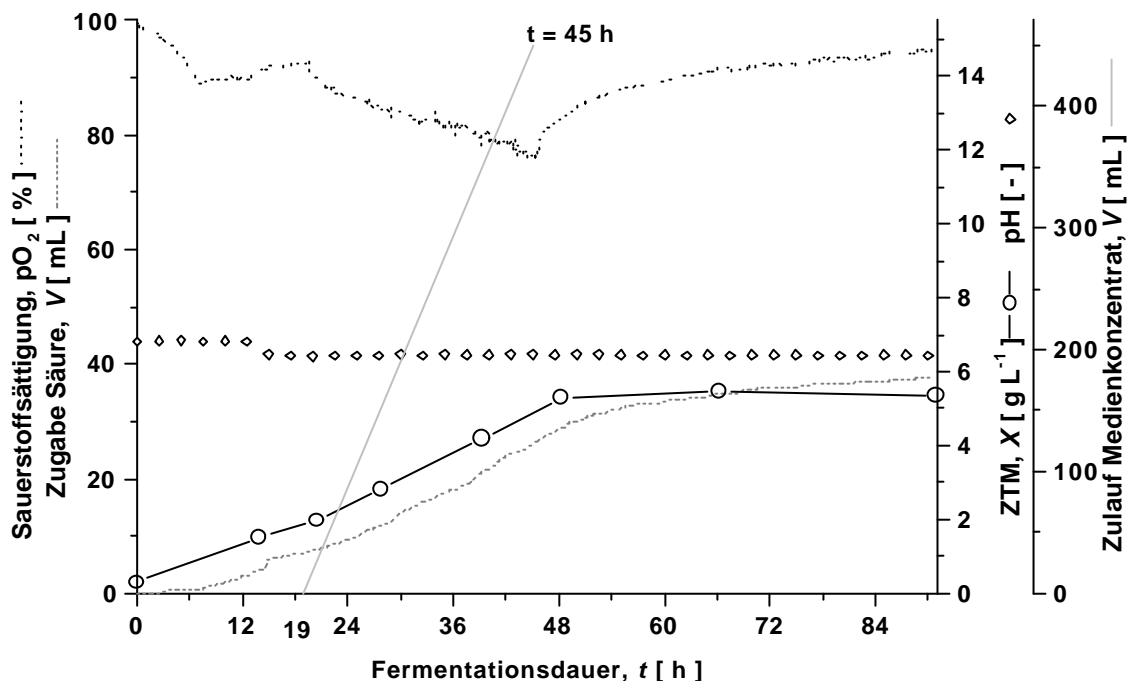
Fermentationsparameter einer Zulaufkultivierung von *S. meliloti* LPU63 im 2 L-Maßstab mit 3 % Zuckerrübenmelassemedium (Lage, D; Biostat B Fermenter). Die Anzucht der Vorkultur erfolgte in  $100 \text{ mL}$  3 % Melassemedium +  $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Streptomycin. Die optische Dichte der Vorkultur bei Inokulation des Fermenters betrug  $\text{OD}_{580} = 9,51$ .

Bei dieser Zulaufkultivierung fiel auf, dass der Verbrauch an Säure bei der pH-geregelten Fermentation bis zu Biotrockenmassewerten von  $\leq 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  parallel zum Verlauf des Wachstums anstieg. Ab  $t = 48 \text{ h}$  erfolgte dann aber keine weitere Dosierung von  $\text{H}_3\text{PO}_4$  zum Medium mehr. Diese Beobachtung bildete die Grundlage für Zulaufkultivierungen von *S. meliloti* LPU63 in Melassemedium, bei denen der



Zufütterungsstrom eines Medienkonzentrats an das Signal der Säurepumpe gekoppelt wurde (s. 4.2.4).

Die Wachstumskurve (ZTM) in **Abbildung 4.16** von *S. meliloti* LPU63 in TY-Medium verlief deutlich flacher als in dem Parallelversuch mit 3 % Melassemedium in **Abbildung 4.15**. Bereits nach  $t = 48$  h erreichten die Mikroorganismen die stationäre Phase mit einer maximalen Biotrockenmassekonzentration von  $5,33 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Auch die Sauerstoffsättigung im Medium war über die gesamte Fermentationsdauer deutlich höher als im Melassemedium: Der  $pO_2$  sank während der Kultivierung nicht unter 70 %, ein Hinweis auf einen signifikant niedrigeren Sauerstoffverbrauch und damit auf eine weitaus geringere Stoffwechselaktivität der Zellen bei der Kultivierung in TY-Medium.

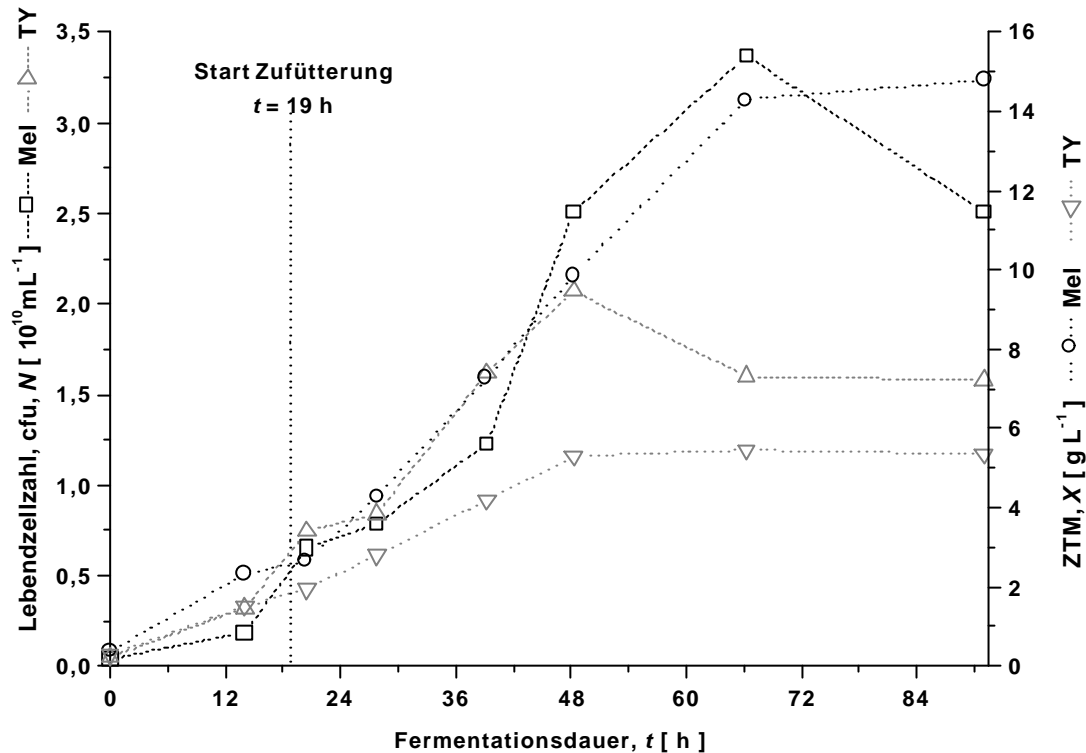


**Abbildung 4.16**

Fermentationsparameter einer Zulaufkultivierung von *S. meliloti* LPU63 im 2 L-Maßstab mit TY-Medium (Labfors-Fermenter). Die Anzucht der Vorkultur erfolgte in 100 mL TY-Medium +  $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Streptomycin. Die optische Dichte der Vorkultur bei Inokulation des Fermenters betrug  $OD_{580} = 10,056$ .

Beim Vergleich der Zelltrockenmassekonzentrationen und Lebendzellzahl von den Fermentationen, die in den **Abbildungen 4.15 + 4.16** dargestellt sind, fällt auf, dass *S. meliloti* LPU63 in Melassemedium nach 66,25 h Fermentationsdauer eine um 110 % höhere Lebendzellzahl (*cfu*) aufwies als in TY-Medium zum gleichen Zeitpunkt, die Biomassekonzentration (ZTM) der Fermentationen aber sogar um 162 % über den Werten der Fermentation in TY-Medium nach 66,25 h lag, wie **Abbildung 4.17** zeigt. Auffällig war außerdem der Abfall in der Lebendzellzahl von

$3,37 \cdot 10^{10}$  cfu·mL<sup>-1</sup> auf  $2,51 \cdot 10^{10}$  cfu·mL<sup>-1</sup> (25,5 %) im späten Stadium der Kultivierung von *S. meliloti* LPU63 in Melassemedium, während die Zellzahl in der stationären Phase von *S. meliloti* LPU63 in TY-Medium konstant blieb.



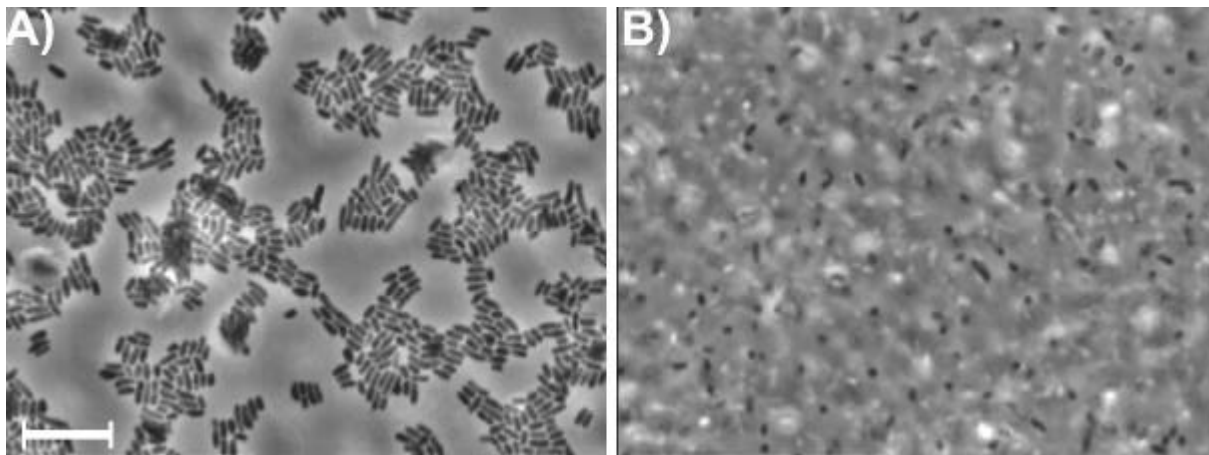
**Abbildung 4.17** Vergleich von Bio- (Zell-)trockenmassekonzentration (ZTM) und Lebendzellzahl (cfu) der Zulaufkultivierungen von *S. meliloti* LPU63 in Melasse- und TY-Medium.

Die Diskrepanz beim Vergleich der Werte der Lebendzellzahlbestimmung und den Daten der Biotrockenmassebestimmung lässt sich bei der lichtmikroskopischen Begutachtung von Fermentationsproben mit *S. meliloti* LPU63 in Melasse- und TY-Medium auflösen. Dazu wurden Proben zum Zeitpunkt  $t = 49,25$  h aus der Zulaufkultivierung entnommen. Unter dem Lichtmikroskop wurden Aufnahmen dieser Proben bei 1.000-facher Vergrößerung unter Immersionsöl mit einem 100x Phasenkontrastobjektiv erstellt.

Schon bei der optischen Betrachtung der Bakterien auf den Mikroskopbildern in **Abbildung 4.18** war der Größenunterschied der Zellen in den beiden Medien erkennbar. Genauere Daten lieferte die Ausmessung von Zellen in beiden Proben. Für die Zellen im Melassemedium wurde eine durchschnittliche Länge von  $4,63 \mu\text{m}$  und ein Durchmesser von  $1,89 \mu\text{m}$  ausgemessen, im TY-Medium waren die Bakterien durchschnittlich nur  $3,36 \mu\text{m}$  lang und  $1,65 \mu\text{m}$  breit. Das ergab nach **Gleichung 3.5** ein durchschnittliches Zellvolumen von  $9,22 \mu\text{m}^3$  für die in Melassemedi-

um kultivierten Zellen und  $4,79 \mu\text{m}^3$  für die in TY-Medium angezogenen Sinorhizobien.

Damit besaßen die Sinorhizobien aus dem Melassemedium ein nahezu doppelt (= 192,4 %) so großes Zellvolumen wie jene Zellen, die in TY-Medium angezogen worden wurden. Aufgrund des deutlich größeren Zellvolumens von *S. meliloti* LPU63 in Melassemedium lassen sich die Unterschiede beim Vergleich von Biotrockenmassebestimmung und Lebendzellzahlbestimmung der Kulturen in Melasse- und TY-Medium erklären, da Biotrockenmasse und Zellvolumen miteinander korrelieren (Bittner *et al.*, 1998). Eine Ursache für das erheblich größere Zellvolumen könnte die verstärkte Einlagerung von Speicherstoffen (Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate) bei der Kultivierung von *S. meliloti* LPU63 in Melassemedium sein, wie es bei Tsien (Tsien, 1982) für frei lebende Bodenbakterien in der späten exponentiellen Phase beschrieben wird.



**Abbildung 4.18** Vergleich der Zellgrößen von *S. meliloti* LPU63 in 3 % Melassemedium (A) und in TY-Medium (B). Die Linie zwischen den weißen Balken am linken, unteren Bildrand entspricht einer Länge von  $20 \mu\text{m}$ .

Werden die Biomassekonzentrationen, die in den Zulaufkultivierungen von *S. meliloti* LPU63 mit 3 % Melassemedium, erzielt wurden, mit anderen Fermentationsergebnissen verglichen, so konnten nur mit der von Chanda (Chanda *et al.*, 1986) beschriebenen Nährlösung aus einem Goabohnenextrakt, supplementiert mit 0,75 % Zuckerrohrmelasse für *S. meliloti* 2756 ähnlich hohe Konzentrationen an Biomasse erzielt werden wie in der oben gezeigten Zulaufkultivierung in einem 3 %-igen Melassemedium. Chanda erreichte in seinen Versuchen ebenfalls Lebendzellzahlen von  $2 - 3,37 \cdot 10^{10} \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ , dies allerdings erst nach 120 h Kultivierungszeit. Da aber insbesondere lange Fermentationslaufzeiten die Produktivität eines Prozesses erheblich absenken, und die Kosten für Medium und Betriebsmittel bei der Herstellung von Inokula eher gering sind, war die Zulaufkultivierung mit Melassemedium gegenüber dem von Chanda angewendeten Verfahren vorzuziehen, da in dieser Arbeit innerhalb von nur 66 h eine vergleichbar hohe Menge an Biomasse hergestellt werden konnte. Bei einer vergleichenden Kalkulation der Produktivität beider Prozesse (Chanda – diese Arbeit) ergeben sich nach **Gleichung 2.11** die folgenden

Produktivitäten, kalkuliert für die maximale Produktkonzentration zum Zeitpunkt  $t_2$  (s. **Abbildung 2.14**):

Annahme: Totzeitraum  $|t_0 - t_f|$ : 20 h; Zellzahl  $t_2 = 3,37 \cdot 10^{10}$  cfu mL<sup>-1</sup>  $\cong 14,3$  g·L<sup>-1</sup> ZTM, Zellzahl  $t_f = 3,99 \cdot 10^8$  cfu mL<sup>-1</sup>  $\cong 0,38$  g·L<sup>-1</sup> ZTM (s. **Tabelle 3.3**)

$$\text{Chanda : } Pr = \frac{14,31 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} - 0,38 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}}{20 \text{ h} + \underline{120 \text{ h}}} = 0,099 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \quad (\text{Gleichung 4.5, a})$$

$$\text{diese Arbeit : } Pr = \frac{14,31 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} - 0,38 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}}{20 \text{ h} + \underline{66,25 \text{ h}}} = 0,161 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \quad (\text{Gleichung 4.5, b})$$

Die Produktivität der in dieser Arbeit vorgestellten Zulaufkultivierung mit *S. meliloti* LPU63 (s. **Gleichung 4.5, a**) liegt somit 61,3 % über jener der Chanda-Kultivierung (s. **Gleichung 4.5, b**). In dem hier gezeigten Zulaufverfahren wurde nach 48 h im Melassemedium mit einer Lebendzellzahl von  $2,51 \cdot 10^{10}$  Zellen je Milliliter im Vergleich zu anderen Fermentationsprozessen eine 2,5-fach höhere Menge an Zellen produziert, als sie z.B. Balatti (Balatti *et al.* 1998) in einem Satzprozess mit einer vorbehandelten Melasse nach 2 Tagen Kultivierung mit  $cfu = 1 \cdot 10^{10}$  mL<sup>-1</sup> erreichen konnte. Die nach 66 h erreichte maximale Lebendzellzahl der hier gezeigten Zulaufkultivierung von  $3,37 \cdot 10^{10}$  cfu·mL<sup>-1</sup> übertraf die von Balatti erreichten Resultate sogar um den Faktor 3,4.

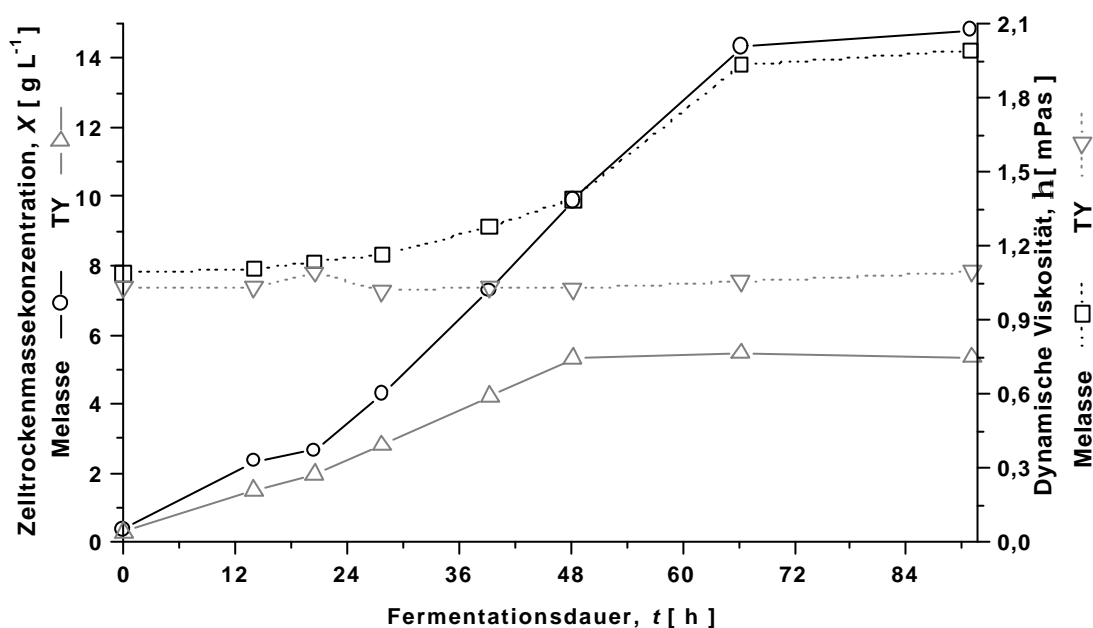
Im Vergleich zu den Kultivierungen von *Sinorhizobium meliloti* in Medien auf Basis von Käsemolke ( $1,0 \cdot 10^{10}$  cfu mL<sup>-1</sup>; Bissonnette, *et al.*, 1986), Malzkeimlingen ( $1,4 \cdot 10^{10}$  cfu mL<sup>-1</sup>; Boiardi *et al.*, 1985) oder Hefeextrakt ( $1,1 \cdot 10^{10}$  cfu mL<sup>-1</sup>; Bioardi *et al.*, 1985) konnte mit dem Melassemedium eine um den Faktor 2 - 3 höhere Lebendzellzahl in der Zulaufkultivierung von *S. meliloti* LPU63 erzielt werden. Im Hinblick auf eine möglichst einfache Gestaltung eines Fermentationsprozesses zur Produktion von Starterkulturen und den in diesen Experimenten bereits erzielten hohen Biomassekonzentrationen mit *S. meliloti* LPU63 erscheint deshalb eine aufwendige Vorbehandlung der Melasse (Inamdar, 1994) auch im Hinblick auf die dadurch entstehenden Kosten und weiteren Verfahren nicht notwendig.

### 4.2.3 Einfluss des Mediums auf die Exopolysaccharidsynthese und die Agglutination von *S. meliloti* LPU63 bei Zulaufkultivierungen

Der während der Zulaufkultivierungen von *S. meliloti* LPU63 in Melassemedium beobachtete Anstieg der Viskosität in der Fermentationslösung und die in **Abbildung 4.18, A** zu erkennende Agglutination der Zellen sollten genauer untersucht werden, um die genaue Ursache für diese Phänomene zu ermitteln. Dazu wurden die dynamischen Viskositäten von zentrifugierten Fermentationsüberständen bestimmt, der Stamm *S. meliloti* LPU63 auf Melasse- und TY-Medium-Nährböden ausplattiert und ein Vergleich von lichtmikroskopischen Aufnahmen der Proben aus den Zulaufkultivierungen in den beiden Medien durchgeführt.

Die Bestimmungen der dynamischen Viskosität ergaben, dass bei der Kultivierung von *S. meliloti* LPU63 in TY-Medium, wie in **Abbildung 4.19** zu sehen, die Werte für  $h$  der Fermentationsüberstände während der gesamten Wachstumsphase sehr niedrig blieben (Ausnahme Messwert:  $t = 20,5$  h). Selbst nach Erreichen der stationären Phase stiegen die Werte im TY-Medium nur geringfügig von  $h_{48,25h} = 1,028$  mPa·s auf  $h_{91h} = 1,095$  mPa·s an.

Im Melassemedium nahm dagegen schon während der ersten 48 h der Zulaufkultivierung die dynamische Viskosität der Fermentationsüberstände von  $h_{0h} = 1,091$  mPa·s auf  $h_{48h} = 1,390$  mPa·s zu, wie **Abbildung 4.19** zeigt. Nach 48 h steigen die Werte noch stärker an und nach 91 h Kultivierungsdauer besitzt der Überstand der Fermentationsbrühe eine nahezu doppelt so hohe dynamische Viskosität wie zu Beginn des Zulaufverfahrens ( $h_{91h} = 1,993$  mPa·s). Die Ursache der Viskositätssteigerung, die Exopolysaccharide von *S. meliloti* LPU63 konnten in den zentrifugierten Fermentationsüberständen durch Ethanol ausgefällt werden.

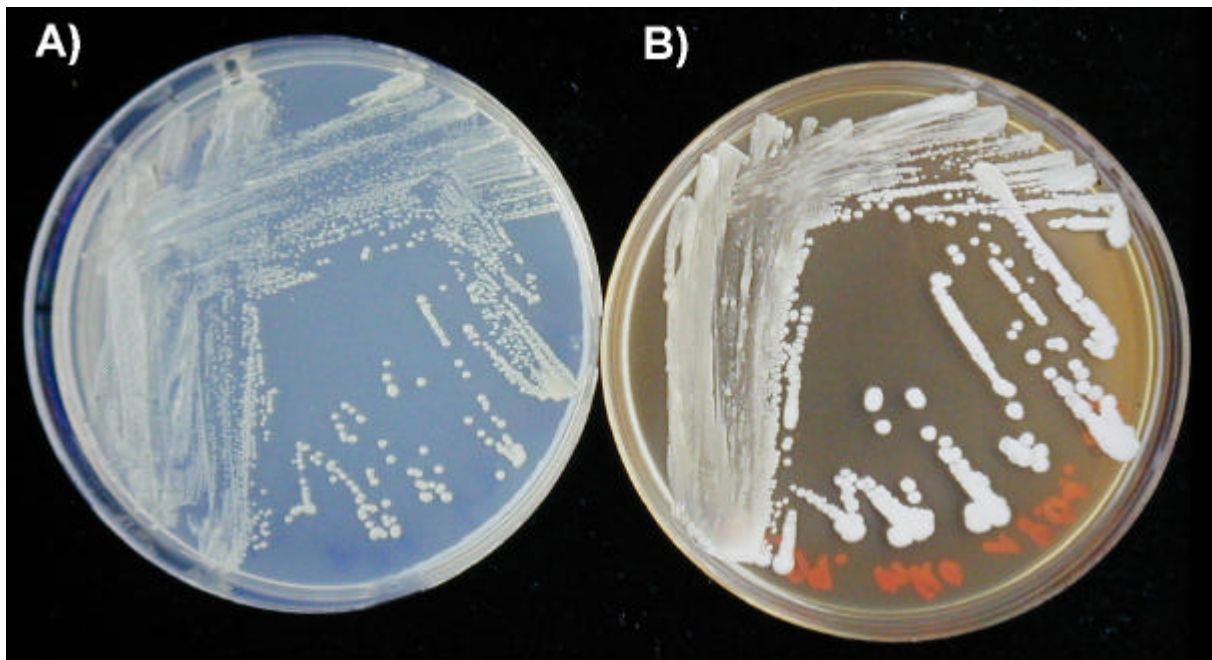


**Abbildung 4.19** Entwicklung der dynamischen Viskosität ( $h$ ) der Fermentationslösungen im Verlauf der Zulaufkultivierungen von *S. meliloti* LPU63 in unterschiedlichen Nährlösungen. TY: Trypton-Hefeextraktmedium, Melasse: 3 % Zuckerrübenmelasse (Lage, D)

Ein weiterer Beleg für die Stärke der Exopolysaccharidsynthese von *S. meliloti* LPU63 in Abhängigkeit des eingesetzten Mediums erfolgte durch das Ausplattieren der Bodenbakterien auf Nährböden mit unterschiedlicher Zusammensetzung. Von 50  $\mu$ L einer aufgetauten *S. meliloti* LPU63 -80°C-Glyzerinkultur, die auf einem MMM-Nährboden über drei Tage bei +28 °C angezogen wurde, erfolgte ein Abstrich mehrerer Kolonien auf einen TY- und einem Melasse-(3 %) Nährboden.

Nach vier weiteren Tagen der Kultivierung von *S. meliloti* LPU63 bei +28 °C wurde eine fotografische Aufnahme der Nährböden angefertigt.

Beim Vergleich der Koloniemorphologien von *S. meliloti* LPU63 auf den verschiedenen Nährböden war erkennbar, dass die Bodenbakterien auf dem Melasse-Nährboden in **Abbildung 4.20, B** eine starke, weiß glänzende Schleimschicht aufwiesen. Die Kolonien in **Abbildung 4.20, A**, die von *S. meliloti* LPU63 auf dem TY-Nährboden gebildet wurden, erschienen dagegen eher blassrosa und matt. Besonders gut zu erkennen war dieser Effekt beim Vergleich von Einzelkolonien auf den beiden Platten, deren Durchmesser auf der Platte mit Melassemedium im Schnitt größer waren als die Durchmesser der auf TY-Nährboden gebildeten Einzelkolonien. Die stark schleimige Morphologie der Kolonien von *S. meliloti* LPU63 auf dem Melasse-Nährboden ist ein sichtbarer Beleg für die verstärkte Synthese und Sekretion von Exopolysacchariden, die bei der Anzucht der Bodenbakterien auf dem TY-Nährboden nicht auftritt.



**Abbildung 4.20** Anzucht von *S. meliloti* LPU63 auf einem TY-Nährboden (A) und einem Melasse-Nährboden (B).

Eine erhöhte Exopolysaccharid-Synthese von *Sinorhizobium meliloti* in Folge eines erhöhten Sucroseangebot auf Nährböden konnte bereits von Somasegaran (Somasegaran *et al.*, 1994) beobachtet werden. Die Stärke dieser Synthese von EPS bei *S. meliloti* variiert aber ebenso wie bei der Exopolysaccharid-Produktion von *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* (Looijesteijn *et al.*, 1999) je nach Kohlenstoffquelle erheblich. Courtois (Courtois *et al.*, 1979) konnte in seinen Arbeiten beobachten, dass durch ein erhöhtes Angebot an Fructose in einer Nährlösung die Exopolysaccharid-Synthese der *Sinorhizobien* um ein Vielfaches gesteigert werden konnte, durch andere Zucker ein solch starker Effekt aber nicht zu beobachten war. Ein erhöhter Fructose-Spiegel könnte in den Zulaufkultivierungen von *S. meliloti* LPU63 mit Melassemedium durch die Spaltung der Sucrose mittels

Invertase (Martinez-de Drets *et al.*, 1970) entstehen. Breedveld (Breedveld *et al.*, 1990, a + b) konnte in seinen Arbeiten außerdem nachweisen, dass es sowohl bei *S. meliloti* SU47 als auch bei *Rhizobium trifolii* TA-1 die Menge an produzierten Exopolysacchariden auch von der Konzentration der Hauptkohlenstoffquelle im Medium abhängig ist. Bei einer Verdopplung der Konzentration an Mannitol von  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  auf  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  in der Nährlösung von *S. meliloti* SU47 konnte die Menge an Exopolysacchariden von  $175 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  ZTM um mehr als den Faktor 3 auf  $555 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  ZTM gesteigert werden. In den 2 L-Zulaufkultivierungen mit Melassemedium (**Abbildung 4.15 + 4.22**) wurden an *S. meliloti* LPU63 insgesamt ca. 98 g Sucrose je Liter Arbeitsvolumen verfüttert, was bei einer Endkonzentration von  $14 \text{ g ZTM}\cdot\text{L}^{-1}$  im Fermenter ca. einer um den Faktor 4,2 höheren Menge an eingesetzten Kohlehydraten je Gramm Biotrockenmasse entsprach. Damit kann die hohe Sucrosekonzentration im Fermentationsmedium eine der Ursachen für die verstärkte Exopolysaccharidsynthese von *S. meliloti* LPU63 in Melassemedium sein.

Eine weitere Ursache für die verstärkte Exopolysaccharid-Synthese von *S. meliloti* LPU63 bei den Zulaufkultivierungen mit Melassemedien in dieser Arbeit kann aber auch in dem geringen Phosphatgehalt von Zuckerrübenmelasse begründet sein. Eine 3 % Zuckerrübenmelasselösung weist im Schnitt nur einen Gehalt von  $2,82\cdot 10^{-4}$  M Phosphat auf (Higginbotham *et al.*, 2000). Rühberg (Rühberg *et al.*, 1999) beschreibt in ihrer Arbeit, dass bei einem Phosphatgehalt von  $1\cdot 10^{-4}$  M die Synthese von Exopolysacchariden im Wildtyp *S. meliloti* 2011 im Vergleich zu Kontrollversuch mit  $2\cdot 10^{-3}$  M Phosphat um den Faktor 8 verstärkt wird. Da die Phosphatgehalte in Zuckerrübenmelassemedium deutlich unter der Konzentration des Kontrollversuchs von Rühberg liegen, es bei der Sterilisation des 10-fach-Zufütterungsmediums außerdem zur verstärkten Ausfällung unlöslicher Verbindungen kam, zu denen aufgrund der Melassezusammensetzung auch Magnesium-Ammonium-Phosphate gezählt werden müssen, könnte die Exopolysaccharidsynthese bei *S. meliloti* LPU63 auch durch Phosphatmangel verstärkt werden.

Darüber hinaus könnte die verstärkte Exopolysaccharidsynthese auf den gesteigerten osmotischen Druck zurückgeführt werden, der auf Grund der Zugabe des 10-fach-Medienkonzentrats in der Fermentationslösung auf die Bakterien ausgeübt wird. Breedveld (Breedveld *et al.*, 1990b) konnte zeigen, dass bei Steigerung der NaCl-Konzentration um 0,2 M im Medium die Produktion der Polysaccharide bei *S. meliloti* SU-47 anstieg, was sich in einer erhöhten Viskosität der Kulturüberstände bemerkbar machte. Ob ein osmotischer Stress für die Bakterienzellen tatsächlich vorliegt, könnte über den Nachweis von Betainen in den Bakterien erfolgen, da es bei einer hohen Osmolalität des Mediums zu einer verstärkten Akkumulation dieser Moleküle im Zellinneren von *S. meliloti* kommt (Smith *et al.*, 1988).

Wie Heyraud (Heyraud *et al.*, 1986) zeigen konnte, ist die Bildung der Exopolysaccharide nicht an ein bestimmtes Stadium der Wachstumskurve bei *Sinorhizobium meliloti* gekoppelt. Er konnte beobachten, dass die Exopolysaccharide sowohl in der exponentiellen Phase wie auch in der stationären Phase gebildet wurden. Die Kulturüberstände von Zellen, die sich nicht mehr teilten, wiesen aber eine deutlich höhere Viskosität auf als jene von wachsenden Zellen, was er auf geringfügige Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung von den Exopolysacchariden, die der Stamm M5N1 je nach Wachstumsstadium synthetisierte, zurückführte. Wie die Messungen der dynamischen Viskosität von Fermentationsüberständen in dieser

Arbeit zeigten, stieg diese bei der Kultivierung von *S. meliloti* LPU63 in Melassemedium schon während der exponentiellen Wachstumsphase deutlich an.

Bei der Zulaufkultivierung von *S. meliloti* LPU63 in Melassemedium können demnach mehrere Faktoren für die hohe Exopolysaccharidsynthese des argentini-schen Bodenbakteriums verantwortlich gemacht werden. Durch die Spaltung der Sucrose aus dem Melassemedium wird verstärkt Fructose freigesetzt, was die Synthese der Exopolysaccharide nachweislich anregt. Durch die hohen Konzentrationen an Sucrose im Medium bei der Kultivierung von *S. meliloti* LPU63 im Bioreaktor werden die Exopolysaccharide dabei bereits zu einem Großteil in der exponentiellen Phase gebildet. Auch der erhöhte osmotische Druck auf Grund der Zufütterung des Medienkonzentrats und ein niedriger Phosphatspiegel im Medium wirken sich bei den Fermentationen auf die EPS-Synthese aus.

Diese bei der Anzucht in Melassemedium beobachtete, erheblich gesteigerte Exopolysaccharid-Synthese der Bodenbakterien kann sich bei einer Anwendung von *S. meliloti* LPU63 in der Landwirtschaft durchaus positiv auswirken. Eine verstärkte Exopolysaccharidhülle aus EPS, LPS und CPS um die Organismen bildet einen effizienten Schutzmantel vor den sauren und trockenen Bedingungen im Ackerboden und erhöht damit die Überlebensfähigkeit jeder einzelnen Zelle im sauren Millieu des Ackerbodens. Beim Besprühen eines Luzerne-Saatguts mit *S. meliloti* LPU63 (in Melasse angezogen) könnte eine gewünschte höhere Anhaftungs- und Überlebensrate aufgrund der verstärkten extrazellulären Matrix erreicht werden (Lambert *et al.*, 1998; Lowther, 1975).

Daneben besitzen die verschiedenen Exopolysaccharide, wie in der Einleitung beschrieben, neben ihrer schützenden Wirkung auf den Organismus wichtige Funktionen bei der Etablierung der Symbiose mit der Futterpflanze Luzerne. So muss *Sinorhizobium meliloti* mindestens eines der drei Zuckermoleküle Succinoglucan (EPS I), Galactoglucan (EPS II) oder das K-Antigen produzieren, um erfolgreich in eine Wirtspflanze eindringen zu können (Campbell *et al.*, 1998). Auch für das niedermolekulare EPS wird eine wichtige Signalfunktion bei der Etablierung der Symbiose zwischen den Bodenbakterien und der Wirtspflanze postuliert (Gonzales *et al.*, 1996). Ohne das native LPS sind die *Rhizobien* im Wettbewerb um die Besiedlung der Pflanzenwurzeln benachteiligt (Lagares *et al.*, 1992).

Zudem verringert eine ausgebildete Exopolysaccharidschicht um die Bakterien den Verlust einmal inkorporierter Wurzelexsudate, insbesondere den Wiederaustritt des für die Nod-Faktor-Synthese essentiellen Induktors, Luteolin, wie Hubac (Hubac *et al.*, 1995a) nachweisen konnte. Die Rückhaltung des Induktors Luteolin in den Zellen der Bodenbakterien hat somit einen positiven Einfluss auf die Regulierung der für die Etablierung der Symbiose zwischen Luzerne und *Sinorhizobium meliloti* so bedeutenden Nod-Faktor-Synthese. Zudem verbessert das Vorhandensein von LPS die Aufnahme von Luteolin bei saurem pH-Wert, wie Hubac (Hubac *et al.*, 1995b) feststellen konnte.

Neben der gesteigerten Synthese der Exopolysaccharide bietet die Anzucht von säuretoleranten *Sinorhizobien* in Melassemedium aber noch weitere Vorteile für den Einsatz auf den sauren und salzhaltigen Böden Argentiniens und Uruguays. Wie Caetano-Anolles (Caetano-Anolles *et al.*, 1989) nachweisen konnte, wird unter sauren Bedingungen durch einen erhöhten Pegel an divalenten Kationen schon im



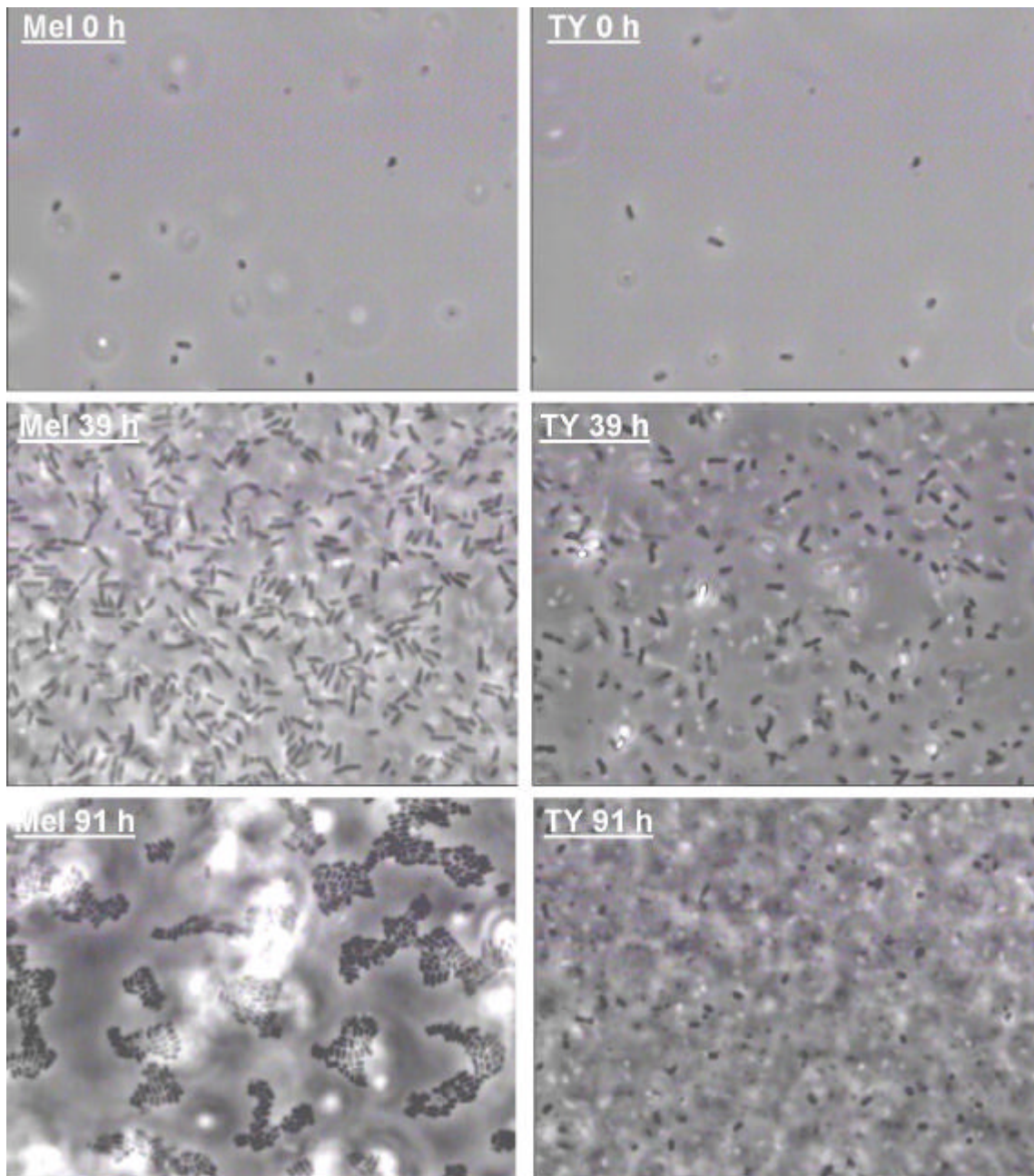
Anzuchtmedium von *Sinorhizobium meliloti* die Chemotaxis und die Anhaftung der *Sinorhizobien* an die Wurzel von Luzerne verbessert. Mit durchschnittlichen Konzentrationen in einer 3 % Melasselösung von  $3,93 \cdot 10^{-3}$  M ( $\text{Ca}^{2+}$ ) und  $2,77 \cdot 10^{-3}$  M ( $\text{Mg}^{2+}$ ) bei einer Zuckerrohrmelasse als Ausgangsmaterial und  $2,25 \cdot 10^{-3}$  M ( $\text{Ca}^{2+}$ ) und  $4,63 \cdot 10^{-4}$  M ( $\text{Mg}^{2+}$ ) in Zuckerrübenmelassen (Higginbotham *et al.*, 2000) liegen diese Pegel an divalenten Kationen deutlich über den von Caetano-Anolles mitgeteilten Mindestwerten von  $\geq 1$  mM, bei dem die Symbiose fördernden Effekte beobachtet werden konnten. Zudem konnte Tawari (Tawari *et al.*, 1998) nachweisen, dass ein erhöhter Calciumspiegel im Medium mit niedrigen pH-Werten die Wachstumsgeschwindigkeit erhöht und das Limit für ein Wachstum von *Sinorhizobium meliloti* zu niedrigeren pH-Werten verschiebt.

Ein weiterer Vorteil entsteht den Bodenbakterien bei der Anzucht in Melassemedium aufgrund einer osmoprotektorischen Wirkung durch die Hauptkohlenstoffquelle Sucrose (Gouffi *et al.*, 1998). Nach Gouffi wird dabei die Sucrose im Cytosol der Bakterien, aber nicht in osmotisch relevanten Konzentrationen akkumuliert. Das Disaccharid ist vielmehr für die Bildung der endogenen Osmolyte Glutamat und N-Acetylglutaminylglutaminamid (NAGGN) verantwortlich. Somit sind die Bodenbakterien auch vor einem möglichen Salzstress nach dem Ausbringen auf den Ackerboden besser geschützt, wenn die Anzucht der *Sinorhizobien* in einem Medium mit hoher Sucrosekonzentration erfolgt.

### **Die Agglutination von S. meliloti LPU63 Zellen in Melassemedium**

Bei den Kultivierungen von *S. meliloti* LPU63 konnte neben der verstärkten Exopolysaccharidsynthese in einem Melassemedium noch ein weiterer Effekt beobachtet werden. Im Gegensatz zu der Zulaufkultivierung mit TY-Medium kam es zur Bildung von großen Aggregaten der Bodenbakterien in der Kultursuspension während der Fermentation, wie **Abbildung 4.21** zeigt.

Beim Vergleich der lichtmikroskopischen Aufnahmen der Fermentationslösungen in **Abbildung 4.21** ist zu erkennen, dass sich die *Sinorhizobien*-Zellen in 3% Melassemedium nach 91 h zu Zellaggregaten von bis zu 100 Zellen zusammengelagert hatten. Dieser Effekt konnte bei der parallel durchgeführten Kultivierung von *S. meliloti* LPU63 in TY-Medium nicht beobachtet werden., wie die rechte Bildspalte in **Abbildung 4.21** zeigt.

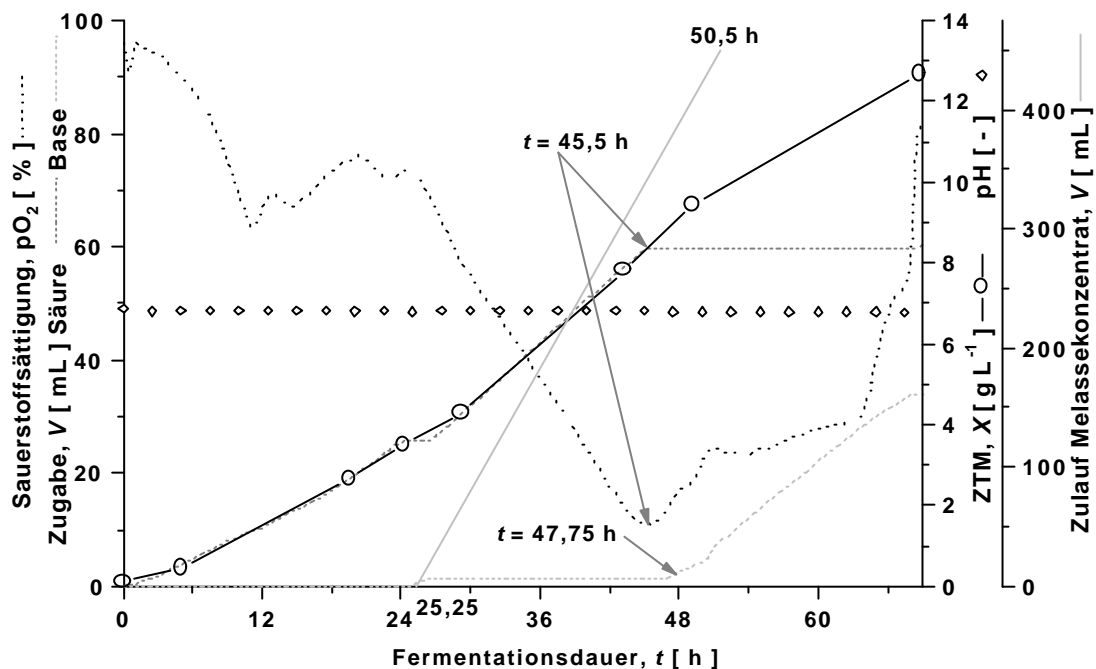


**Abbildung 4.21** Lichtmikroskopische Aufnahmen der Fermentationsbrühen von *S. meliloti* LPU63 in Melassemedium (li.) und in TY-Medium (re.) zu Beginn, nach 39 h und nach 91 h Kultivierungszeit. Die Aufnahme erfolgte im Phasenkontrast mit Immersionsöl; Vergrößerung: 1.000-fach

Um den Zeitraum der Aggregatbildung in Zulaufkultivierungen von *S. meliloti* LPU63 im 3 % Melassemedium eingrenzen zu können und um zu prüfen, ob es einen Zusammenhang der Agglutination mit anderen Ereignissen im Ablauf der Fermentation gab, wurde dieses Phänomen in einer weiteren Fermentation untersucht. Die Kultivierung von *S. meliloti* LPU63 im 3 % Melassemedium erfolgte bei einer Rührerdrehfrequenz von  $600 \text{ min}^{-1}$ . Die Zufütterung von 455 mL eines 10-fach-Melassekonzentrats startete in dieser Kultivierung nach 25,25 h mit einem konstanten Volumenstrom ( $V$ ) von  $18 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ . Die Anzucht der Vorkultur erfolgte ü.N. in

100 mL einer 3 % Melasselösung + 400 mg·L<sup>-1</sup> Streptomycin. Die optische Dichte der Vorkultur bei Inokulation des Fermenters lag bei einem Wert von OD<sub>580</sub> = 5,87.

Die **Abbildung 4.22** zeigt die Daten der Zulaufkultivierung, aus der die Proben stammen, für die der Ablauf der Agglutination in **Abbildung 4.23** dargestellt ist. Wie zu erkennen ist, fielen der Anstieg der pO<sub>2</sub>-Kurve und die Reduktion des Säureverbrauchs bei  $t = 45,5$  h zeitgleich zusammen. Nur 2,25 h später  $t = 47,75$  h war ein Anstieg im Base-Verbrauch feststellbar.



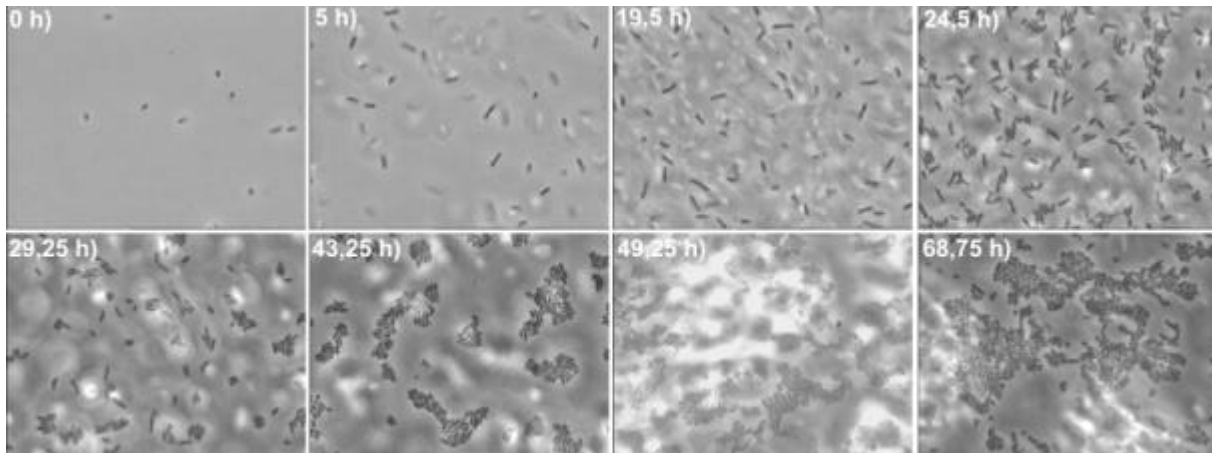
**Abbildung 4.22**

Fermentationsparameter einer Zulaufkultivierung von *S. meliloti* LPU63 im 2 L-Maßstab mit 3 % Zuckerrübenmelasse (Lage, D; Biostat B). Die Pfeile markieren das Abknicken der Säureverbrauchskurve und den Anstieg der pO<sub>2</sub>-Kurve nach  $t = 45,5$  h und des KOH-Verbrauchs nach  $t = 47,75$  h.

Die Kurvenverläufe aller drei Parameter, pO<sub>2</sub>, Säure- und Laugedosierung deuten auf eine Stoffwechselumstellung bei *S. meliloti* LPU63 hin, obgleich die Zellen in diesem Zeitraum weiter wuchsen, wie die Zunahme der Biotrockenmassekonzentration zeigte. Die Lebendzellzahlbestimmung aber bestätigte, dass die Zahl der Bodenbakterien im beschriebenen Zeitraum von  $N_{43,25h} = 1,1 \cdot 10^{10}$  cfu·mL<sup>-1</sup> nur noch auf  $N_{68,75h} = 2,54 \cdot 10^{10}$  cfu·mL<sup>-1</sup> anstieg, was einer geringen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit von  $\mu = 0,033$  h<sup>-1</sup> ( $t_D = 21,12$  h) entspricht.

Die Einzelbilder in **Abbildung 4.23** belegen, dass sich die *S. meliloti* LPU63-Zellen in Melassemedium bereits ab  $t = 29,25$  h Fermentationsdauer zu kleinen Aggregaten von 3 - 6 Zellen zusammenlagerten. Das Auftreten der größeren Zellaggregate mit 20 - 50 Zellen von *S. meliloti* LPU63 ist ab  $t = 43,25$  h zu beobachten. In der Aufnahme bei  $t = 49,25$  h finden sich nur noch wenige frei bewegliche Einzelzel-

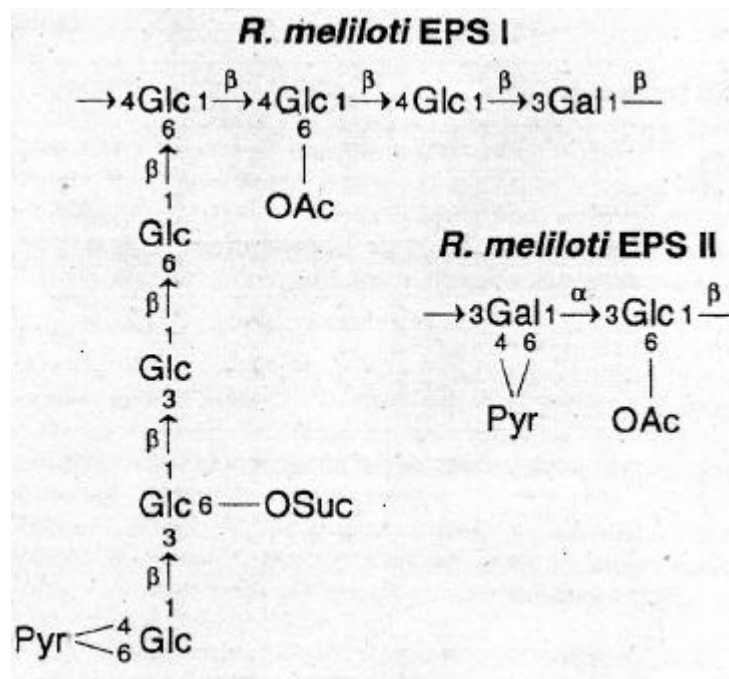
len in der Fermentationslösung. Und zum Ende der Fermentation bei  $t = 68,75$  h konnten Bodenbakterienaggregate von 60 - 200 Einzelzellen trotz einer Rührerdrehfrequenz von  $600 \text{ min}^{-1}$  im Mikroskop beobachtet werden.



**Abbildung 4.23** Lichtmikroskopische Aufnahmen von unverdünnten Proben aus einer Zulaufkultivierung mit *S. meliloti* LPU63 in 3 % Melassemedium im Phasenkontrast mit Immersionsöl; Vergrößerung: 1.000 fach

Die Stagnation in der Zudosierung von Säure zur Beibehaltung des pH's, der ein Anstieg im Lauge-Verbrauch, der Anstieg im  $pO_2$ -Wert des Mediums und die starke Erhöhung der dynamischen Viskosität in Fermentationsüberständen, wie aus den Daten der Fermentation in **Abbildung 4.19** zu entnehmen ist, fallen bei allen Zulaufkultivierungen von *S. meliloti* LPU63 in 3 % Melasse im Zeitraum von 40 h- 45 h zusammen. Diese Veränderung der Fermentationsdaten weisen auf weitreichende Stoffwechselumstellungen bei *S. meliloti* LPU63 hin. Wie bei *Rhizobium etli* von Encarnación beobachtet (Encarnación *et al.*, 1995), kann es in Folge dieser Umstellungen auch bei *Sinorhizobium meliloti* zu einer vermehrten Sekretion saurer Metabolite wie Lactat, Fumarat, Malat und  $\gamma$ -Hydroxybutyrat kommen. Damit ließe sich eine Abnahme des Säure- und der Anstieg des Laugeverbrauchs zum Teil erklären.

Einen Einfluss auf Säure- und Laugeverbrauch sowie auf die Erhöhung der Viskosität hat auch die verstärkte Synthese der Exopolysaccharide. Anhand der chemischen Strukturen der sekretierten Exopolysaccharide EPS I (Succinoglucan) mit O-Acetyl- Pyruvyl- und O-Succinylgruppen und EPS II (Galactoglucan) mit Pyruvyl- und O-Acetylgruppen, die in **Abbildung 4.24** dargestellt sind, wird deshalb deutlich, dass von *S. meliloti* LPU63 ins Medium abgegebene basische Verbindungen über die sauren funktionellen Gruppen der sekretierten Exopolysaccharide teilweise neutralisiert werden können. Durch die deutlich erhöhte Konzentration von Exopolysacchariden zum Ende des zweiten Tages einer Fermentation in Melasse, wie sie sich anhand der Messungen der Viskosität aus **Abbildung 4.19** ableiten lässt, entsteht eine größere Pufferkapazität für basische Verbindungen und damit sinkt auch die Menge an  $H_3PO_4$ , die zur Beibehaltung des pH von 6,8 über die Fermentersteuerung ins Medium zudosiert werden muss.



**Abbildung 4.24** Chemische Strukturen der Untereinheiten des EPS I (Succinoglucan) und des EPS II (Galactoglucan) von *Sinorhizobium meliloti* (Abbildung mit freundlicher Genehmigung durch Hr. PD Dr. Karsten Niehaus, Universität Bielefeld)

Wie die Bilder in **Abbildung 4.23** zeigen, fiel die verstärkte Agglutination der Bodenbakterien genau in den gleichen Zeitraum, im dem die Umstellungen im Stoffwechsel von *S. meliloti* LPU63 beobachtet wurden. Sie kann als Folge verstärkter Exopolysaccharid-Produktion der *Sinorhizobien* in Melassemedium angesehen werden. Denn die Zuckermoleküle lassen sich nicht nur in den Fermentationsüberständen wiederfinden, sondern bilden vor allem den schützenden Schleimmantel um die Zellen, wie in **Abbildung 4.20** deutlich zu erkennen ist. Die Hülle aus Exopolysacchariden fungiert beim Aufeinandertreffen der Bakterienzellen in der Fermentationslösung als Haftvermittler und dies ist ein Grund für die im Mikroskop beobachteten Zusammenlagerungen der Mikroorganismen. Außerdem muss bei den Zellteilungen der Bodenbakterien berücksichtigt werden, dass durch den verstärkten Exopolysaccharidmantel um die Organismen ein vollständiges Auseinanderdriften nach einer Zellteilung verhindert wird und dies die Aggregate ebenfalls größer werden lässt. Bemerkenswert bei den Fermentationen von *S. meliloti* LPU63 in Melassemedium war die Größe der Zellaggregate von bis zu 200 Zellen, die im Mikroskop beobachtet werden konnten. Sollten solche Zusammenlagerungen bei der vorherrschenden Rührerdrehfrequenz im Fermenter von  $600 \text{ min}^{-1}$  nicht aufgelöst werden können, würde dies auf eine hohe Stabilität der Haftung hinweisen, die durch die Exopolysaccharide zwischen den Zellen vermittelt wird. Die unter dem Mikroskop aufgenommenen Bilder von Fermentationsproben weisen, da sie direkt nach der Probenahme im Mikroskop aufgenommen wurden und somit eine Aggregatbildung erst auf dem Objektträger eher unwahrscheinlich ist, darauf hin. Aufschluss über die tatsächliche Aggregatgröße im Fermentationsprozess könnte aber nur eine *in-situ*-Mikroskopie (Bittner *et al.*, 1998) während der laufenden Kultivierung liefern.

### 4.2.4 Ungeregelte und geregelte Zulaufkultivierungen im 2 L Maßstab von S. meliloti LPU63

Nachdem der Vergleich von Zulaufkultivierungen in Melasse- und TY-Medium zur Anzucht von *S. meliloti* LPU63 ergab, dass mit dem Medium auf Basis Zuckerrübenmelasse doppelt so hohe Zellausbeuten erreicht werden konnten als mit dem anderen Vollmedium, sollte im Hinblick auf die technische Produktion von *Sinorhizobien*-Starterkulturen die Zufütterungsstrategie für die Zulaufkultivierung ermittelt werden, mit der eine hohe Biomassekonzentration in einer möglichst kurzen Verfahrenszeit erzielt werden konnte. In den nachfolgenden Versuchen wird die ungeregelte, konstante Zudosierung des Mediumkonzentrats zwei geregelten Zufütterungsstrategien gegenübergestellt. In dem unregelmäßigen Verfahren erfolgte die Zufütterung mit einem 10-fach-Melassekonzentrat nach Abknicken der Wachstumskurve bei  $t = 21,08$  h mit einem konstanten Volumenstrom von  $(V) = 18 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ . Die Anzucht der Vorkultur von *S. meliloti* LPU63 erfolgte für die drei nachfolgenden Fermentationen in 100 mL eines 3 %-igen Zuckerrübenmelassemediums +  $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Streptomycin ü.N.

Die Mikroorganismen reduzieren in der unregelmäßigen Zulaufkultivierung, die in **Abbildung 4.25** dargestellt ist, im Zeitraum von 19 - 21 h ihre Wachstumsgeschwindigkeit im Vergleich zum Zeitraum von 5 - 19 h, wo die *Sinorhizobien* sich mit einer spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit von  $m = 0,130 \text{ h}^{-1}$  ( $t_D = 5,34 \text{ h}$ ) vermehrten, um 7,2 % ( $m = 0,120 \text{ h}^{-1}$ ). Deshalb wurde bei  $t = 21,08$  h die Zufütterung eingeschaltet. Erkennbar ist in **Abbildung 4.25**, dass bereits nach 11,8 h der Sauerstoffanteil ( $pO_2$ ) im Medium anstieg und der Säureverbrauch zur Beibehaltung des voreingestellten pH's von 6,8 nach 15 h im Fermenter stagnierte. Parallel zum Beginn der Zufütterung ( $t = 21,08$  h) sank der  $pO_2$  im Medium dann wieder und die Säuredosierung stieg erneut an. Nach dem Start der Zufütterung nahm die Konzentration der Biomasse im Fermenter bis zum Zeitpunkt  $t = 67,25$  h weiter zu, aber mit einem Wert von  $m = 0,063 \text{ h}^{-1} \rightarrow t_D = 10,95 \text{ h}$  war die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit um 48,5 % geringer als in der Satzphase (5 - 19 h) dieser Zulaufkultivierung. Der  $pO_2$  stieg bei dieser Zulaufkultivierung nach 48 h erneut an und der Säureverbrauch erreichte ein zweites Plateau, in **Abbildung 4.26** durch die Pfeile markiert. Die Zellen wuchsen in diesem Bereich der Fermentation weiter, was nicht nur durch den Verlauf der Biotrockenmassekonzentration, sondern auch durch eine Lebendzellzahlbestimmung bestätigt wurde, deren Wert von  $t_{43,25h} = 1,79 \cdot 10^{10} \text{ Zellen} \cdot \text{mL}^{-1}$  auf  $t_{67,25h} = 3,30 \cdot 10^{10} \text{ Zellen} \cdot \text{mL}^{-1}$  anstieg.

Der Anstieg des  $pO_2$  nach 11,8 h und 47,5 h und der Rückgang des Säureverbrauchs in den gleichen Zeiträumen sind ein Hinweis auf die schon in **Abbildung 4.22** beobachtete Stoffwechsellage bei *S. meliloti* LPU63. Diese Umstellung weist auf die Limitierung einer Nährstoffquelle hin. Da die Hauptkohlenstoffquelle in Zuckerrübenmelassen Sucrose mit einem Anteil von ca. 48 % in der Trockenmasse ist (Higginbotham, 2000) und diese von *S. meliloti* LPU63 auch bevorzugt umgesetzt wird (Glenn *et al.* 1981; Willis *et al.*, 1999), ist sie der bedeutendste limitierende Nährstoff in einer Fermentation mit einem Zuckerrübenmelassemedium.

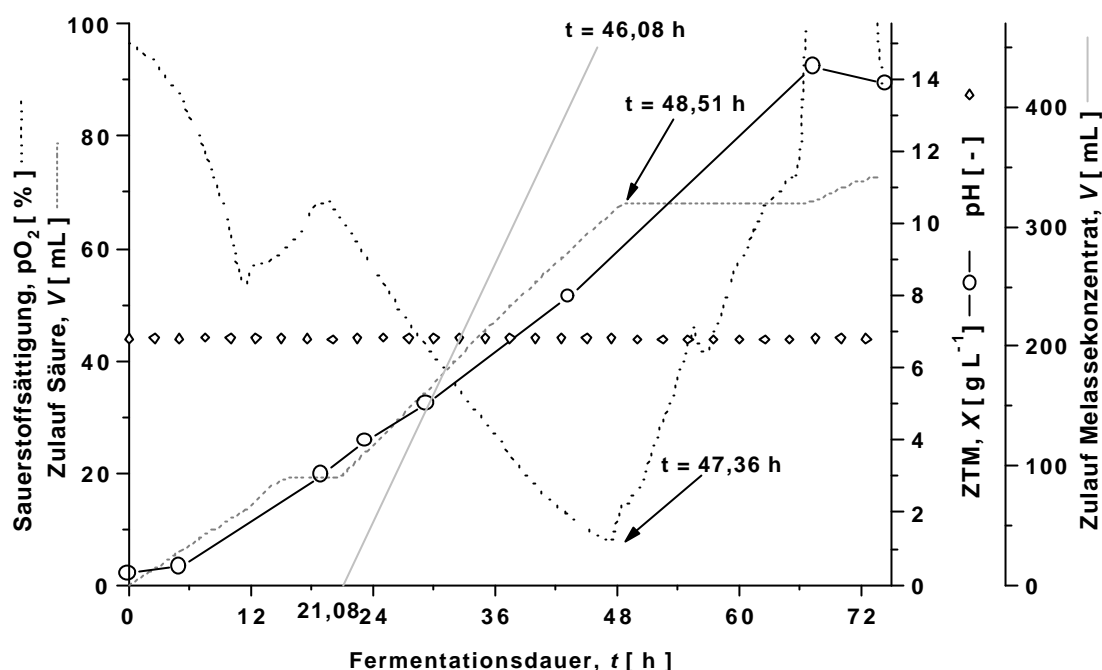


Abbildung 4.25

Zulaufkultivierung von *S. meliloti* LPU63 in 3 % Zuckerrübenmelasse mit konstanter Zufütterung des Mediums (Biostat B Fermenter). Die Vorkultur besaß bei Inokulation eine  $OD_{580}$  von 5,005. Die Fermentation erfolgte bei einer konstanten Rührerdrehfrequenz von  $600 \text{ min}^{-1}$ .

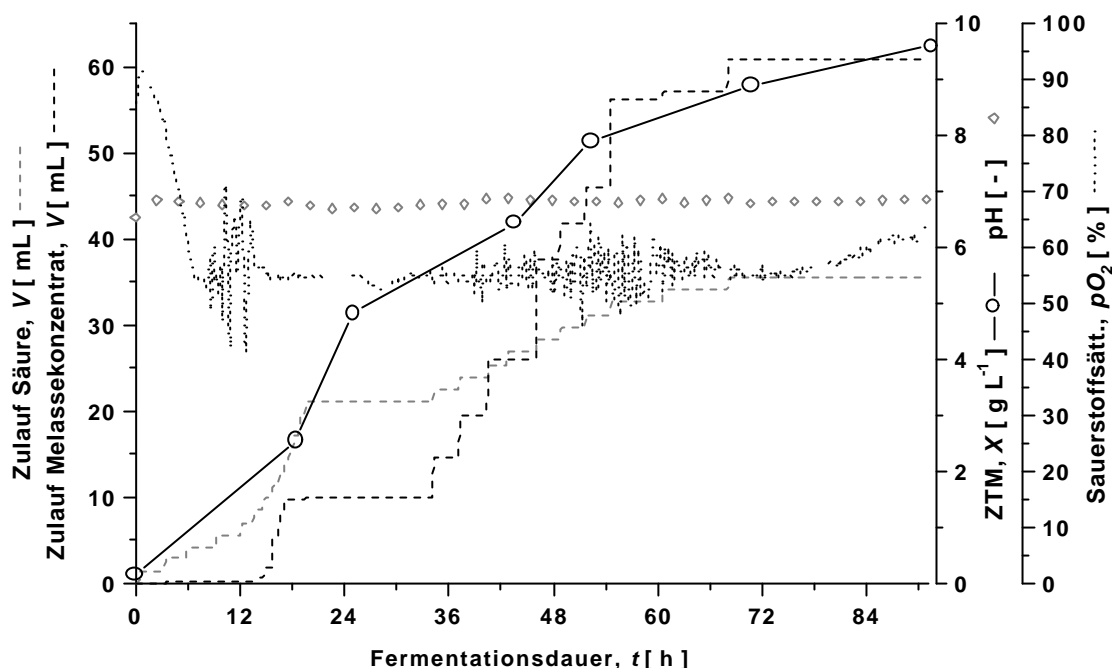
In der Zuckerrübenmelasse sind neben den ca. 50 % Zuckerstoffen aber noch 20 % an anderen verwertbaren organischen Nichtzuckerstoffen und Zuckerdreivaten enthalten, die von *Sinorhizobium meliloti* verstoffwechselt werden können (Elkan *et al.*, 1972). Dazu gehören Dextrane mit 3 %, Stärke mit 1 %, Glutaminsäure mit 2 -3 %, das Betain mit 3 - 4 %, andere Aminosäuren, Pyroglutaminsäure, Peptide mit 2 - 3 % und Aminosäure-Zuckerkomplexe mit 0,5 - 1,5 % bei 75 % Trockenmassegehalt der Zuckerrübenmelasse (s. **Tabellen 2.2 + 2.3**; Higginbotham, 2000). Aus diesem Grund knickt die Wachstumskurve auch nicht sehr stark ein, wenn die Sucrose von den Bodenbakterien nahezu vollständig verbraucht ist. Erst wenn auch eine Limitierung der anderen im Zuckerrübenmelassemedium enthaltenen Nährstoffen einsetzt, wird das Wachstum der Mikroorganismen signifikant reduziert und die Biotrockenmassekonzentration im Fermenter nimmt nicht weiter zu. Mit einem Wechsel von *S. meliloti* LPU63 auf andere Stoffwechselwege, die es den Organismen erlauben, die oben aufgeführten Nährstoffe zu verwerten, entstehen andere (neutrale und / oder saure) Metabolite, die ins Medium abgegeben werden. Deshalb nimmt der Verbrauch an Säure zur Beibehaltung des Medium pH von 6,8 ab. Auch der Sauerstoffverbrauch der Bodenbakterien für diese Stoffwechselwege ist geringer und so steigt der Gehalt an Sauerstoff im Medium wieder, wie in **Abbildung 4.25** zu sehen ist. Damit bieten sich sowohl das Signal der Sauerstoffelektrode, wie auch das der Säurepumpe an, um bei einer Limitierung des Disaccharids Sucrose im Medium und den daraus resultierenden Veränderungen des Verlaufs von  $pO_2$  und Säureverbrauch die Zufütterung mit dem Melassekonzentrat an diese Signale zu koppeln.

### **Geregelte Zulaufkultivierungen von S. meliloti LPU63 in Melassemedium**

Die Dosierung des Mediumkonzentrats an das Steuerungssignal der Säurepumpe oder an das Signal der Sauerstoffelektrode zu koppeln, erfolgte mit dem Ziel, die Zugabe des Melassekonzentrats zur Fermentationslösung so zu gestalten, dass die Bakterien in optimaler Form mit Nährstoffen versorgt werden, also keine Nährstofflimitierung eintritt und damit ein vorzeitiges Abflachen der Wachstumskurven, wie es in den **Abbildung 4.15** und **Abbildung 4.25** in der Zeit zwischen  $t = 14$  h und  $t = 24$  h zu sehen war, vermieden wird. Eine solche Zufütterungsstrategie ermöglicht in der Regel eine produktiveres Fermentationsverfahren, d.h. es wird in kürzerer Zeit ein besseres Ergebnis bei der Erzielung einer hohen Biomasseausbeute im Vergleich zu einem Fermentationsprozess mit unregelmäßiger Zufütterung erreicht. In der ersten Testreihe wurde die Zufütterung mit einem 10-fach-Melassekonzentrat an das Signal der Säurepumpe gekoppelt (Regelungsprogramm: s. Anhang 7.1).

Nachdem die Wachstumskurve in der Fermentation mit der an die Säurezugabe gekoppelten Mediumdosierung in den ersten 20 h ein schnelleres Wachstum aufwies als in der unregelmäßigen Zulaufkultivierung ( $\mu = 0,153 \text{ h}^{-1}$ ; s. **Abbildung 4.25**) und dies trotz eines Inokulums mit einer geringeren Biomassekonzentration, erreichte die Säuredosierung und damit auch die Zufütterung des Melassekonzentrats in dieser Fermentation von *S. meliloti* LPU63 nach 19 h bereits ein erstes Plateau, wie die **Abbildung 4.26** zeigt. Die Dosierung von Säure und Mediumkonzentrat stagnierte bis  $t = 34$  h, obwohl die Zellen sich in diesem Zeitraum, wie der Graph der Zelltrockenmassebestimmung zeigt, weiter teilten. Erst nach 34 h erfolgte wieder eine Zugabe der Säure, jedoch in geringerem Maß als zu Beginn der Fermentation in den ersten 19 h und trotz der zu diesem Zeitpunkt stärker ansteigenden Laufzeit der Mediumpumpe für die Zufütterung auf Grund der vorgegebenen Programmparameter (s. Anhang) waren nach  $t = 65$  h von den vorgelegten 450 mL des 10-fach-Melassekonzentrats erst 57 mL zu den 1,5 L Arbeitsvolumen zudosiert worden. Bei der hier verwendeten Zufütterungsstrategie wies die Probe beim Abbruch der Fermentation nach  $t = 65,8$  h in der Zelltrockenmassekonzentration einen Wert von  $8,64 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  auf.



**Abbildung 4.26**

Geregelte Zulaufkultivierung von *S. meliloti* LPU63 in 3 % Melassemedium (Labfors-Fermenter) mit Dosierung des 10-fach-Melassekonzentrats über das Signal des Säurezugabe. Die  $OD_{580}$  der Vorkultur betrug bei Inokulation 2,905. Die Regelung des  $pO_2$ -Gehalt von 60 % im Fermentationsmedium erfolgte über die Erhöhung der Rührerdrehfrequenz.

### **$pO_2$ -geregelt Zulaufkultivierung**

In einer weiteren Reihe mit Zulaufkultivierungen von Bodenbakterien in 3% Melassemedium wurde die Dosierung des 10-fach-Melassekonzentrats an das Signal der Sauerstoffelektrode gekoppelt. Die Regelung des  $pO_2$ -Gehalts im Fermentationsmedium erfolgte über die Erhöhung der Rührerdrehfrequenz. Die Zufütterungsregelung wurde aktiviert, wenn der  $pO_2$  erstmals unter einen Wert von 50 % sank. Eine Zufütterung des Melassekonzentrats erfolgte, wenn der  $pO_2$  über 50 % anstieg.

Nach 14 h begann die Fermentersteuerung durch das im Anhang beschriebene Programm automatisch mit der Zudosierung des 10-fach-Melassekonzentrats bis zum Zeitpunkt von  $t = 19,6$  h (98 mL; s. **Abbildung 4.27**). Bis zum Zeitpunkt  $t = 24$  h steigt die Wachstumskurve noch an, flacht aber danach deutlich ab. Beim Vergleich der Zeitabschnitte zwischen  $t = 18,75$  h - 24 h und  $t = 24$  h - 42 h nimmt die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit von  $m_{8,75h-24h} = 0,093$  h<sup>-1</sup> auf  $m_{24h-42h} = 0,028$  h<sup>-1</sup> (bei  $DV = + 0,05$  L) ab. Trotz der ab  $t = 36,7$  h exponentiell ansteigenden Kurve der Melassekonzentratdosierung nimmt die Biomassekonzentration der Sinorhizobien im Rührkessel nur noch langsam zu. Am Ende der Fermentation konnte eine Zelltrokkenmassekonzentration von 9,54 g·L<sup>-1</sup> erreicht werden

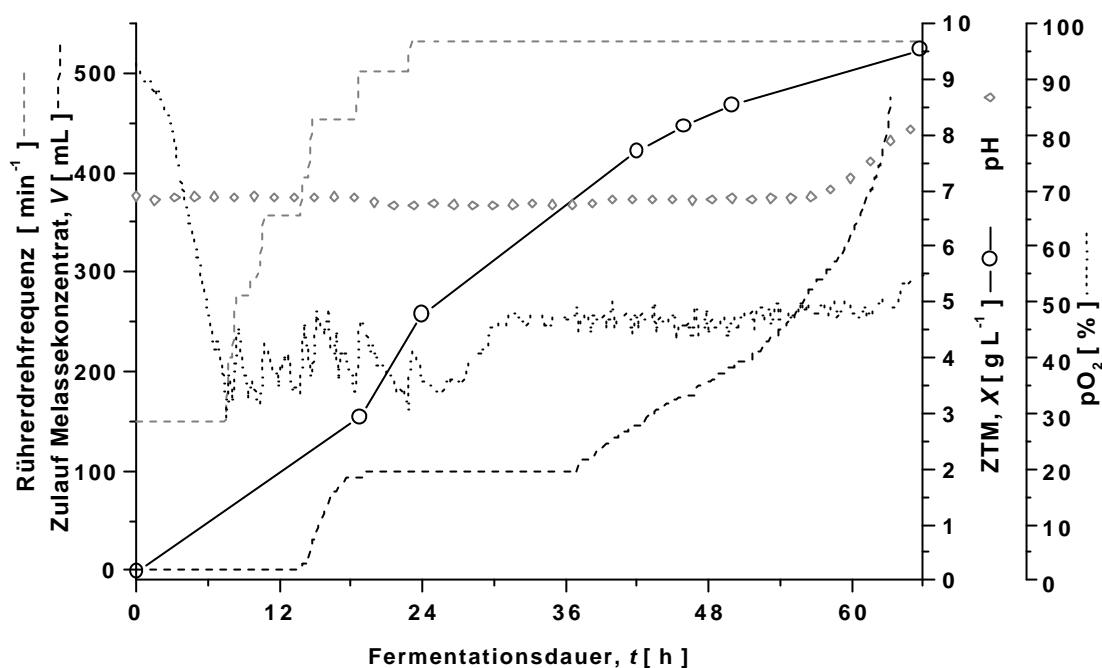
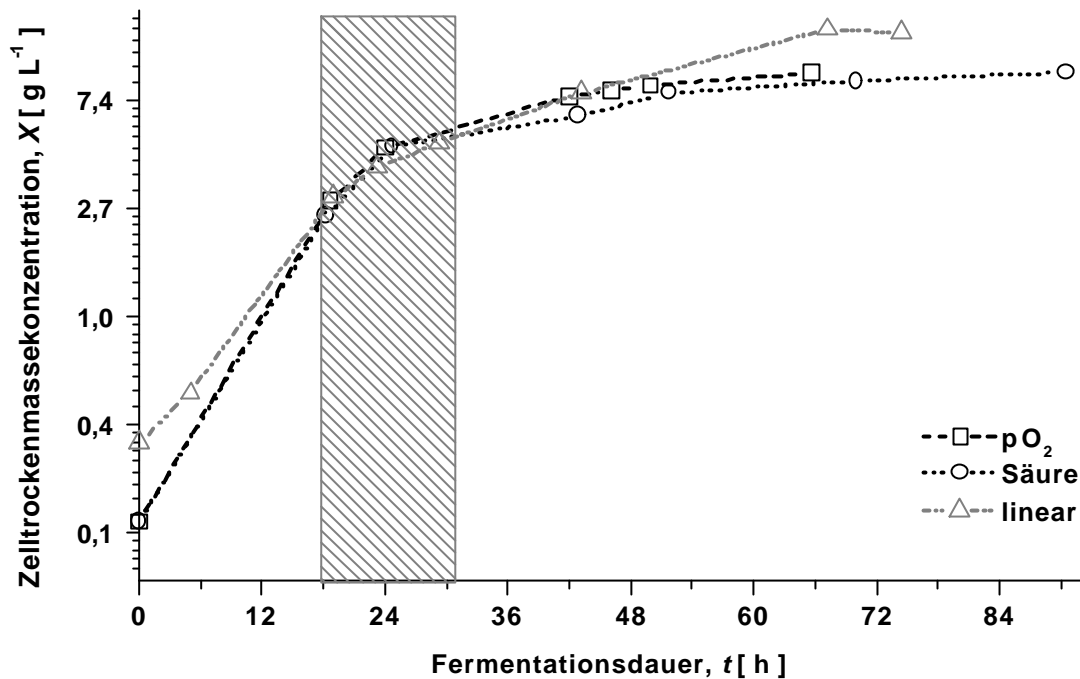


Abbildung 4.27

$pO_2$ -geregelte Zulaufkultivierung von *S. meliloti* LPU63 in 3 % Melassemedium (Labfors-Fermenter) mit der Zufütterung des 10-fach-Melassekonzentrat, die an das Signal der Sauerstoff-Elektrode gekoppelt war. Die  $OD_{580}$  der Vor-  
kultur betrug bei Inokulation 3,26.

Werden die drei Zufütterungsstrategien miteinander verglichen, dann fällt auf, dass die Wachstumskurven (Zelltrockenmassekonzentration; ZTM) nach  $t = 18$  h bereits signifikant abflachen, wie in **Abbildung 4.28** zu sehen. Die Organismen befinden sich zwischen  $t = 18$  h und  $t = 30$  h bereits im Übergang von der Wachstums- in die Stationärphase (s. **Abbildung 2.13**). Bis zum Zeitpunkt  $t = 48$  h verlaufen alle drei Wachstumskurven nahezu identisch, in der Fermentation mit konstanter Zudosierung des 10-fach Mediumkonzentrats wachsen die Zellen nach 48 h noch mit einer, allerdings langsamen Wachstumsgeschwindigkeit von  $0,29 \text{ g ZTM} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  bis zum Zeitpunkt  $t = 67,25$  h weiter, während bei den beiden anderen Fermentationen nur noch ein minimaler Zuwachs an Biomasse  $r_{X,pO_2} = 0,067 \text{ g ZTM} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  und  $r_{X,Säure} = 0,058 \text{ g ZTM} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  bis zum Ende der Kultivierung feststellbar ist.

Der Vergleich der Raumzeitausbeuten zum Zeitpunkt  $t = 65,75$  h ergibt für das Zulaufverfahren mit der an die Säuredosierung gekoppelten Zufütterung des Melassekonzentrats einen Wert von  $0,131 \text{ g ZTM} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Zum gleichen Zeitpunkt lag die Produktivität für das an den  $pO_2$  gekoppelte Zulaufverfahren bei  $0,145 \text{ g ZTM} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Die Fermentationen liegen damit um 37,6 % (Säure) bzw. 31,0 % ( $pO_2$ ) unter dem Resultat, das in dem Prozess mit konstanter Zufütterung des Melassekonzentrats mit  $0,210 \text{ g ZTM} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  erreicht werden konnten. Allerdings muss bei dieser Kalkulation berücksichtigt werden, dass in der Zulaufkultivierung, bei der das Mediumkonzentrat über das Säuresignal gesteuert wurde, nur 57 mL der 10-fach-Melasselösung zugefüttert wurden, in den beiden anderen Fermentationsprozessen 450 mL.



**Abbildung 4.28** Vergleich der Zelltrockenmassen aus Fermentationen von *S. melliloti* LPU63 in 3 % Melassemedium mit den unterschiedlichen Regelungsstrategien der Zulaufkultivierungen. **linear**: Zufütterung des 10-fach-Melassekonzentrats mit einem konstanten Volumenstrom  $V$  von  $18 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$  21,08 h nach Beginn der Fermentation, **pH**: Zufütterung des Melassekonzentrats an das Steuerungssignal der Säurepumpe gekoppelt, **pO<sub>2</sub>**: Zufütterung des Melassekonzentrats an das Signal der pO<sub>2</sub>-Elektrode gekoppelt

Wird ein Produktausbeutekoeffizient, bezogen auf die bis zum Zeitpunkt  $t = 65,75 \text{ h}$  in den Fermenter geförderte Melassemenge, berechnet:

$$Y_{P/S} = \frac{V_R \cdot X_{t=65,75 \text{ h}}}{\sum V_{Mel} \cdot C_{Mel}} \quad \text{(Gleichung 4.6)}$$

dann ergeben sich folgende Werte ( $Y_{P/S}$ ) für die drei Verfahren:

$$Y_{P/S(\text{linear})} = \frac{1,5 \text{ L} \cdot 13,97 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}}{1,5 \text{ L} \cdot 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + 0,45 \text{ L} \cdot 300 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}} = 1,16 \cdot 10^{-1} \frac{\text{g Biotrockenmasse}}{\text{g Melasse}}$$

**(Gleichung 4.6, a)**

$$Y_{P/S(\text{pO}_2)} = \frac{1,5 \text{ L} \cdot 9,62 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}}{1,5 \text{ L} \cdot 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + 0,45 \text{ L} \cdot 300 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}} = 8,02 \cdot 10^{-2} \frac{\text{g Biotrockenmasse}}{\text{g Melasse}}$$

**(Gleichung 4.6, b)**

und

$$Y_{P/S(\text{Säure})} = \frac{1,5 \text{ L} \cdot 8,62 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}}{1,5 \text{ L} \cdot 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + 0,057 \text{ L} \cdot 300 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}} = 2,08 \cdot 10^{-2} \frac{\text{g Biotrockenmasse}}{\text{g Melasse}}$$

**(Gleichung 4.6, c)**

Anhand der hier dargestellten Produktausbeutekoeffizienten erweist sich das Zulaufverfahren, bei dem die Zufütterung der Melasse über das Signal der pH-Elektrode geregelt wurde, als der Prozess, bei dem, bezogen auf die eingesetzte Melassemenge, die höchste Ausbeute an Biomasse erzielt werden konnte. Es bleibt aber zu untersuchen, in welchem Maß die Nährstoffe der Melasse (insbesondere Sucrose) zum Zeitpunkt  $t = 65,75 \text{ h}$  in allen Verfahren von den Bodenbakterien tatsächlich bereits verstoffwechselt waren. Eine Substratanalytik der Hauptkohlenstoffquelle Sucrose gestaltet sich aber schwierig, da in der Melasse neben diesem Disaccharid in einem erheblichen Maß weitere Kohlenhydrate vorhanden sind, die gängige Testverfahren zur Sucrosemessung zum Teil erheblich stören und damit nur unpräzise Daten des Substratverbrauchs erhalten werden.

Ob die Ursache für das Abflachen der Wachstumskurven zwischen  $t = 19 - 29 \text{ h}$  in **Abbildung 4.28** bei allen drei Zulaufkultivierungen in einer unzureichenden Versorgung der Kulturen mit dem Nährstoffen liegt, muss bezweifelt werden. Insbesondere bei der Fermentation, bei der die Dosierung des Melassekonzentrats an das Signal der Sauerstoffelektrode gekoppelt war, erfolgte eine Zudosierung von 100 mL Melassekonzentrat schon im Zeitraum von  $t = 13 \text{ h} - 19 \text{ h}$ . Dennoch flachte auch in dieser Fermentation die Wachstumskurve nach  $t = 24 \text{ h}$  bereits deutlich ab.

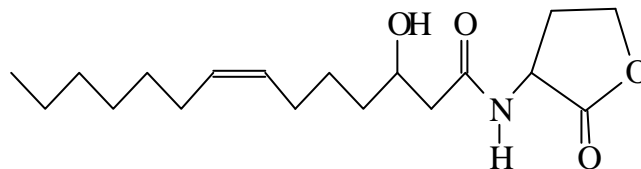
In einer weiteren Zulaufkultivierung von *S. meliloti* LPU63 (Daten hier nicht gezeigt), bei der nach 25 h Satzphase, im Gegensatz zur der in **Abbildung 4.26** dargestellten Fermentation, der Fermentationsbrühe mit einem konstanten, aber um den Faktor 2,5 höherem Volumenstrom das Melassekonzentrat zugeführt wurde, stieg nach dem Start der Zufütterung die Wachstumskurve zwar kurzfristig wieder an, doch nahm auch bei dieser Fermentation die Wachstumsgeschwindigkeit ab  $t = 29 \text{ h}$  erneut signifikant ab. Im weiteren Verlauf dieser Zulaufkultivierung vermehrten sich die Zellen in dieser Fermentation nur noch mit einer Wachstumsgeschwindigkeit von  $r_x = 0,28 \text{ g ZTM} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , was den Werten der anderen Zulaufkultivierungen mit konstanter Mediendosierung in dieser Phase der Fermentationen entspricht.

Inhaltsstoffe der Melasselösung wie wachstumshemmende Substanzen oder ein Mangel an essentiell benötigten Nährstoffen, z.B. das Vitamin Biotin, im Medium können einen negativen Einfluss auf das Wachstum von *S. meliloti* LPU63 ausüben. Doch da auch bei den Zulaufkultivierungen von *S. meliloti* LPU63 mit TY-Medium, das nachweislich einen hohen Gehalt an Biotin aufweist und keine wachstumshemmenden Substanzen enthält, die Wachstumskurve nach 24 h deutlich abflachte, wie in **Abbildung 4.18** zu sehen, ist die Verringerung des Wachstums wahrscheinlich nicht auf die Zusammensetzung des Melassemediums zurückzuführen.

Eine Sauerstofflimitierung als Ursache für das Abflachen der Wachstumskurve nach 24 h kann bei den oben gezeigten, drei Zulaufkultivierungen ebenfalls ausgeschlossen werden, da die Sauerstoffsättigung ( $pO_2$ ) der Fermentationsmedien aller drei Prozesse in dem Zeitraum, als die Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit auftrat, noch zwischen 40 – 60 % lag, wie aus den **Abbildungen 4.25, 4.26 + 4.27** zu ersehen ist. Bei der Fermentation mit der konstanten Zufütterung des Melassekon-

zentrals ist nach **Abbildung 4.25** mit Beginn der Mediumkonzentratdosierung zum Zeitpunkt  $t = 21,08$  h zudem kein extremer Abfall im Kurvenverlauf des  $pO_2$  zu erkennen, was auf einen signifikant erhöhten Sauerstoffbedarf zur Umsetzung der Sucrose hinweisen würde und damit den Sauerstoff als limitierenden Faktor für das Wachstum der Bodenbakterien ausweisen würde. *S. meliloti* wird zwar als streng aerophiler Organismus eingestuft, doch erst bei einer Versorgung der Bodenbakterien mit Sauerstoff von  $\leq 29 \text{ mL O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (Trinick, 1982) wurde das Wachstum der Bodenbakterien nachhaltig negativ beeinflusst. Da in den Fermentationen im 2 L-Maßstab mit einem Lufteintrag von  $3 \text{ NL} \cdot \text{min}^{-1}$  in die Fermenter gearbeitet wurde, dürften die Sinorhizobien in allen Fermentationen während des Zeitraums, als die Wachstumskurven abflachten ( $t = 18 \text{ h} - 30 \text{ h}$  Fermentationsdauer), ausreichend mit Sauerstoff versorgt worden sein, was sich letztendlich in den Verläufen der  $pO_2$ -Kurven der hier miteinander verglichenen Fermentationen auch widerspiegelt.

Eine Erklärung für die Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit in allen drei Fermentationen liegt in der zum Zeitpunkt  $t = 24$  h erzielten Biomassekonzentration selbst. Es besteht die Möglichkeit, dass es auf Grund der hohen Biomassekonzentrationen von *S. meliloti* LPU63 mit  $3 - 6 \cdot 10^9 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$  im Zeitraum von 19 h - 29 h bei den hier gezeigten Fermentationen zur Ausschüttung von „Quorum Sensing Factors“ kommt, wie es von Thorne (Thorne *et al.*, 1999) bei *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* in Hochzelldichtekulturen ( $> 1,3 \cdot 10^9 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) beobachtet werden konnte. Diese Botenstoffe beeinflussten die Wachstumsgeschwindigkeit der Mikroorganismen nachhaltig negativ. Die Signalmoleküle des „quorum sensing“, die bei einer Vielzahl Gram negativer Bakterien auf acylierten Derivaten des Homoserin-Lactons  $\rightarrow$  **Acyl-Homoserin-Lactone (AHL; **Abbildung 4.29**)**, einem Molekül aus dem Methioninstoffwechsel (Lehninger, 1987) basieren, konnten auch in verschiedenen Stämmen von *S. meliloti* nachgewiesen werden (Cha *et al.*, 1998, Gray *et al.*, 1996). Ihre genauen Strukturen sind aber für *S. meliloti* noch nicht aufgeklärt. Dass *S. meliloti* LPU63 die AHL in Folge einer hohen Zelldichte ebenfalls synthetisiert und sekretiert, mit dem Ziel, das Wachstum anderer *Sinorhizobien* zu verlangsamen, um damit einer lebensbedrohenden Limitierung von Nährstoffen entgegenzuwirken und so in der Stationärphase das Überleben der Organismen zu gewährleisten, bleibt zu untersuchen.



**Abbildung 4.29**

Beispiel für ein acyliertes Homoserin-Lacton (AHL), das N-(3R-Hydroxy-7-cis-Tetradecanoyl)-L-Homoserin-Lacton, wie es in *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* (Schripsema *et al.*, 1996) nachgewiesen werden konnte.

Ergänzende Experimente müssten klären, ob bei einem Setpoint von  $\geq 60$  % bei der  $pO_2$ -geregelten Zulaufkultivierung und ein höherer Volumenstrom an Medium ein optimaleres Wachstumsverhalten von *S. meliloti* LPU63 erzielt werden kann, so

dass eine Biomasseausbeute von  $\geq 2 \cdot 10^{10}$  cfu·mL<sup>-1</sup> bereits nach 48 h Fermentationsdauer erreicht werden kann.

Nach den in dieser Arbeit mit *S. meliloti* LPU63 erzielten Ergebnissen in den verschiedenen Zulaufverfahren erweist sich der Satzprozess mit der unregelmäßigen Zudosierung des 10-fach-Melassekonzentrats als eine geeignete Methode zur Produktion von Bodenbakterien für die Landwirtschaft. Das dargestellte Verfahren erzielte die höchste Zellzahl an Bodenbakterien, erfordert darüber hinaus keine Programme zur Regelung der Zufütterung, was einen Fermentationsprozess einfacher gestaltet, ihn damit wenig anfällig gegenüber Störungen macht und eine Implementierung in der landwirtschaftlichen Biotechnologie Südamerikas erleichtert (s. dazu auch Gulati, 1980 b). Die Daten der optischen Dichte (OD<sub>580</sub>), des pO<sub>2</sub> oder einer in-Prozess-Trübungsmessung (Kadotani et al, 1995) könnten während der Kultivierung zur Überwachung der Wachstumsgeschwindigkeit der Bodenbakterien herangezogen werden, um bei einem Abknicken der Wachstumskurve nach 14-19 h die Zufütterung zu starten.

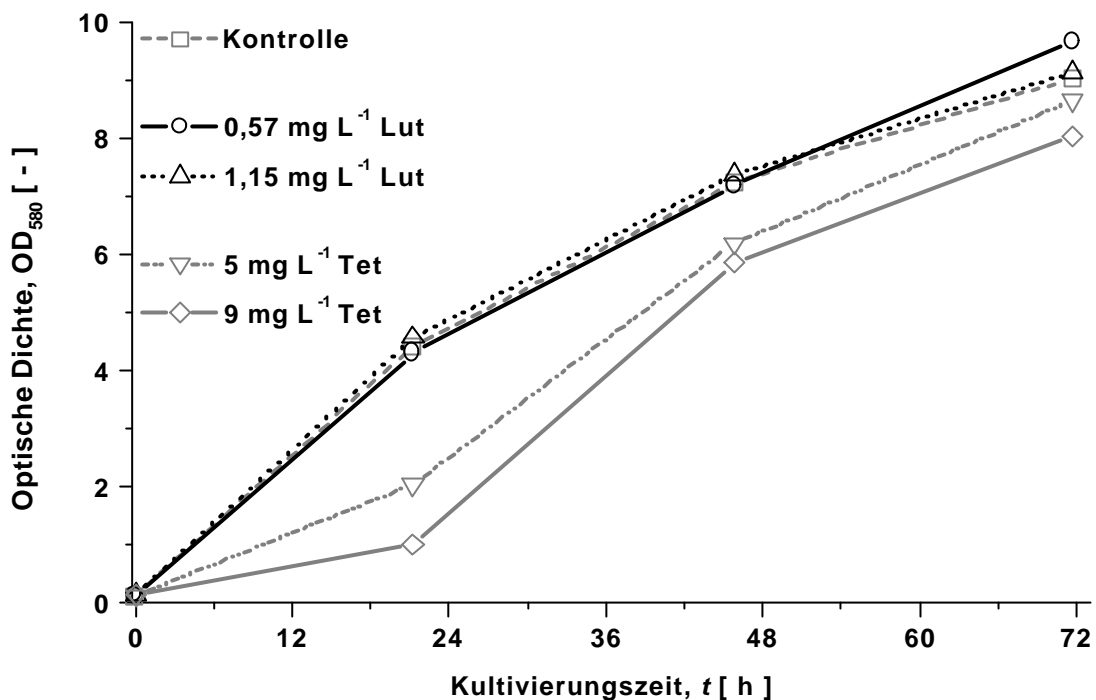
### 4.3 Produktion und Aufarbeitung von Nodulations-Faktoren aus *Sinorhizobium meliloti* 1021pEK327

Nachfolgend werden die Resultate dargestellt, die eine Optimierung von Produktion und Aufarbeitung der Nod-Faktoren aus *S. meliloti* 1021pEK327 und die Charakterisierung der erhaltenen Glykolipide beschreiben.

#### 4.3.1 Die Bedeutung von Medien und Mediumkomponenten für das Wachstum und die Nod-Faktor-Synthese von *S. meliloti* 1021pEK327

Wie in der Einleitung beschrieben, ist Luteolin ein essentielles Flavonoid-Molekül für die Initiierung der nativen Nod-Faktor-Synthese im Bodenbakterium *Sinorhizobium meliloti*. Die nachfolgenden Experimente sollten zeigen, ob und in welcher Konzentration die Nod-Faktor-Synthese des in dieser Arbeit verwendeten Stamms *S. meliloti* 1021pEK327 ebenfalls vom Flavonoid Luteolin in der Nährlösung abhängig ist. In parallelen Versuchen sollten außerdem die Auswirkungen des Antibiotikums Tetrazyklin im Medium auf das Wachstum der Bodenbakterien und die Nod-Faktoren-Synthese untersucht werden, da sich eine Tetrazyklin-Resistenz-Kassette auf dem Plasmid pEK327 befand.

Die Wachstumskurven der drei Kulturen ohne Antibiotikum sind nahezu identisch, wie die **Abbildung 4.30** zeigt. Nach einer kurzen Anlaufphase begannen die Organismen sich in diesen Röhrcchen mit einer exponentiellen Wachstumsgeschwindigkeit zu teilen. Die beiden Kulturansätze mit  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  und  $9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Tetrazyklin wiesen eine längere Anlaufphase auf, bevor die Kulturen in die exponentielle Wachstumsphase eintraten. Dennoch erreichten auch diese Ansätze nach 71,75 h Versuchsdauer ähnlich hohe Werte in der optischen Dichte. Mit Werten von  $OD_{580} = 8,66$  bei  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Tet und einer  $OD_{580} = 8,04$  bei  $9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Tet. lagen beide Kulturen um 4,2 % bis 11,0 % unter den Zelldichten, die in der Kontrolle mit einer  $OD_{580} = 9,04$  ohne Antibiotikumzusatz erreicht wurden. Erst ab Tetrazyklin-Konzentrationen von  $\geq 10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  war in weiteren Versuchen (Daten hier nicht gezeigt) eine signifikantere Reduktion des Wachstums bei *S. meliloti* 1021pEK327 festzustellen und bei einer Konzentration des Tetrazyklins  $\geq 17 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  stellte dieser Stamm in MMM sein Wachstum vollständig ein.

**Abbildung 4.30**

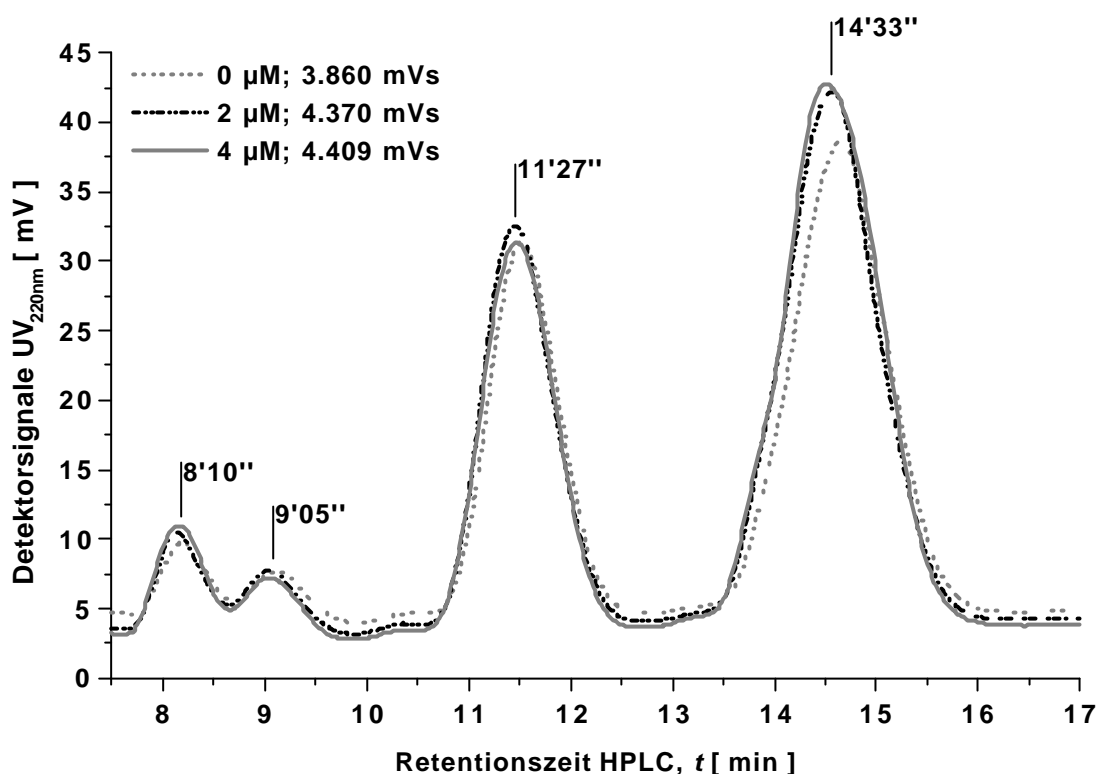
Wachstumsverhalten von *S. meliloti* 1021pEK327 in Mannitol-Minimalmedium (MMM) mit unterschiedlichen Konzentrationen an Luteolin (Lut) und Tetrazyklin (Tet) im Kulturröhrchen. 10 mL steriles MMM in Kulturröhrchen wurden mit 100  $\mu$ L einer logarithmisch wachsenden Kultur von *S. meliloti* 1021pEK327, ebenfalls in MMM kultiviert, angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei +28°C auf einem Exzentrerschüttler mit 500  $\text{min}^{-1}$ .

### **Die Nod-Faktor-Synthese von *S. meliloti* 1021pEK327 bei verschiedenen Konzentrationen an Luteolin**

Der Einfluss der Luteolinkonzentration im Medium auf die Produktausbeute an Nod-Faktoren bei der Kultivierung von *S. meliloti* 1021pEK327 sollte anhand der RP<sub>18</sub>-Chromatographie von Proben nach  $t = 71,75$  h beurteilt werden. Dazu wurden die zweiten 500  $\mu$ L der Proben des in **Abbildung 4.30** gezeigten Versuchs verwendet.

Alle nach  $t = 71,75$  h analysierten Kulturproben wiesen nahezu identische Verläufe ihrer Chromatogramme auf, wie in **Abbildung 4.31** zu sehen ist. Die Summe aller Peakflächen bei der Analyse des Überstands aus dem Kolben mit der Kontrollkultur ohne Luteolin lag um 12 % unter der Peakflächensumme der Kultur mit 2  $\mu$ M Luteolin. Eine Verdopplung der Flavonoidkonzentration im Medium führte allerdings nur zu einer 0,8 %-igen Steigerung der Nod-Faktor-Ausbeute im Vergleich zu dem Ansatz mit 2  $\mu$ M Luteolin. Diese Unterschiede relativieren sich weiter, werden die Biomasse bezogenen Produktausbeutekoeffizienten nach **Gleichung 4.7** ( $Y_{P/X}$ ; Chmiel, 1984) betrachtet:





**Abbildung 4.31** Nod-Faktor-Peaks in den Proben von *S. meliloti* 1021pEK327 in Abhängigkeit von der Luteolinkonzentration im Medium. Die in der Grafik aufgeführten Zahlen geben die Konzentration von Luteolin im Medium und die Summen der Peakflächen des jeweiligen Chromatogramms von 7,5 bis 17 min wieder

$$Y_{P/X} = \frac{dP}{dX} = \frac{A_{72h} \cdot UF_{NF}}{(OD_{580,72h} - OD_{580,0h}) \cdot UF_{BM,OD580}} \quad \text{(Gleichung 4.7)}$$

mit

$A_{72h}$  =  $S$ Peakfl. 7,5-17 min Chromatogramm der Proben nach  $t = 72$  h

$UF_{NF}$  = Umrechnungsfaktor zur Kalkulation der Nod-Faktor-Menge aus der Gesamt-Peakfläche (s. Material und Methoden;  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NF} \rightarrow 47.260,87 \text{ mV} \cdot \text{s}$  (A))

$UF_{BM,OD580}$  = Umrechnungsfaktor zur Kalkulation der Biomasse aus den gemessenen Werten der optischen Dichte (s. Material u. Methoden;  $ZTM$  aus  $OD_{580} < 10$ :  $OD_{580} 1 = 0,35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ ZTM}$ )

$$Y_{P/X, \text{Kontr.}} = \frac{3.860 \text{ mV} \cdot \text{s} \cdot 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}}{47.260,87 \text{ mV} \cdot \text{s}} = 2,61 \cdot 10^{-2} \frac{\text{g Nod-Faktoren}}{\text{g Biotrockenmasse}} \quad \text{(Gleichung 4.7, a)}$$

$$Y_{P/X, 2\mu M \text{ Lut.}} = \frac{4.370 \text{ mV} \cdot \text{s} \cdot 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}}{47.260,87 \text{ mV} \cdot \text{s}} = 2,78 \cdot 10^{-2} \frac{\text{g Nod - Faktoren}}{\text{g Biotrockenmasse}} \quad \text{(Gleichung 4.7, b)}$$

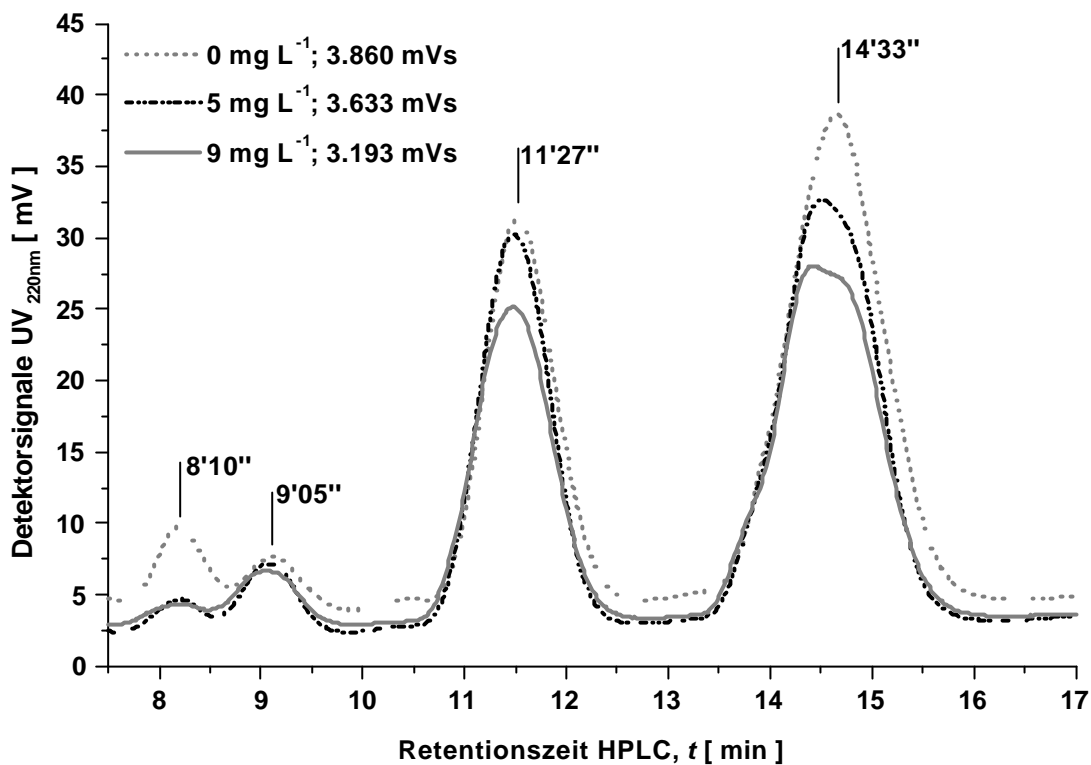
$$Y_{P/X, 4\mu M \text{ Lut.}} = \frac{4.409 \text{ mVs} \cdot 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}}{47.260,87 \text{ mV} \cdot \text{s}} = 2,96 \cdot 10^{-2} \frac{\text{g Nod - Faktoren}}{\text{g Biotrockenmasse}} \quad \text{(Gleichung 4.7, c)}$$

Das Einbringen des Cosmid-Vektors pEK327 in den Stamm *S. meliloti* 1021 führte zu einer nahezu vollständigen Deregulierung bei der Expression der Nod-Faktor-Synthesegene und damit zu einer um den Faktor 1.000 höher liegenden Produktion der Nod-Faktoren in den Bodenbakterien im Vergleich zu der des Wildtyps, wie Schultze zeigen konnte (Schultze *et al.*, 1992). Werden die Ausbeutekoeffizienten dieses Experiments betrachtet, wird über eine Induktion bei *S. meliloti* 1021pEK327 durch das Flavonoid Luteolin nur noch eine geringe Anhebung der bereits erheblich gesteigerten Syntheseleistung von Nod-Faktoren erreicht. Durch die Zugabe von 2 µM, bzw. 4 µM an Luteolin zur Kulturlösung kann der Produkt-Ausbeutekoeffizient ( $Y_{P/X}$ ) an Nod-Faktoren zwar um 6,5 % bei 2 µM Luteolin bzw. um 13,4 % bei 4 µM Luteolin ( $\rightarrow 2,61 \cdot 10^{-2} \text{ g NF} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Biomasse} = 100\%$ ) gesteigert werden. Dem gegenüber stehen bei Verwendung des Flavonoids neben den Kosten von 754 € je Gramm (<http://www.Carl-Roth.de>) der zusätzliche und die Sterilität der Fermentation gefährdende Verfahrensschritt einer Injektion der Luteolinlösung in den Rührkessel, da Luteolin nicht autoklaviert werden kann, weil es unter diesen Bedingungen zerfällt. Wie die Satzkultiverungen unter 4.3.5 außerdem zeigten, kann die Produktivität der Nod-Faktor-Synthese von *S. meliloti* 1021pEK327 stärker durch andere Faktoren z.B. durch eine Sauerstoff-Limitierung oder durch andere Stressfaktoren erhöht werden.

#### **Die Nod-Faktor-Synthese von *S. meliloti* 1021pEK327 bei verschiedenen Konzentrationen an Tetrazyklin**

Auch der Einfluss der Tetrazyklinkonzentration auf die Produktausbeute an Nod-Faktoren bei einer Kultivierung von *S. meliloti* 1021pEK327 im Minimalmedium sollte anhand der RP<sub>18</sub>-Chromatographie von Proben nach  $t = 71,75 \text{ h}$  beurteilt werden.

Wie aus **Abbildung 4.32** ersichtlich ist, wiesen die Chromatogramme wie in **Abbildung 4.31** ein vergleichbares Muster auf. In den analysierten Proben war je nach Antibiotika-Konzentration eine unterschiedlich starke Reduktion der einzelnen Peakflächen erkennbar. Die Summe aller integrierten Nod-Faktor-Peakflächen von 7,5 – 17 min bei der Probe mit  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Tet. in der Kulturlösung ergibt eine Ausbeute von 94,1 % im Vergleich zum Kontrollansatz ohne Luteolin- und Tetrazyklinzusatz (= 100 %). Die Addition der integrierten Peakflächen vom Ansatz mit  $9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  zeigte, dass in diesem Ansatz nur noch eine Konzentration von 83 % der Menge an Nod-Faktoren im Überstand enthalten sind, die im Kontrollansatz zu finden waren.



**Abbildung 4.32** Nod-Faktor-Profile von *S. meliloti* 1021pEK327 in Abhängigkeit von der Tetrazyklin-Konzentration im Medium

Werden die Nod-Faktor-Konzentrationen in den einzelnen Proben wieder ins Verhältnis zu den jeweils vorhandenen Biomassekonzentrationen am Ende der Experimente gesetzt, so ergeben sich folgende Produktausbeutekoeffizienten ( $Y_{P/X}$ ) nach  $t = 71,75$  h Versuchsdauer:

$$Y_{P/X, \text{Kontr.}} = \frac{3.860 \text{ mV} \cdot \text{s} \cdot 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}}{47.260,87 \text{ mV} \cdot \text{s}} = 2,61 \cdot 10^{-2} \frac{\text{g Nod-Faktoren}}{\text{g Biotrockenmasse}} \quad \text{(Gleichung 4.8, a)}$$

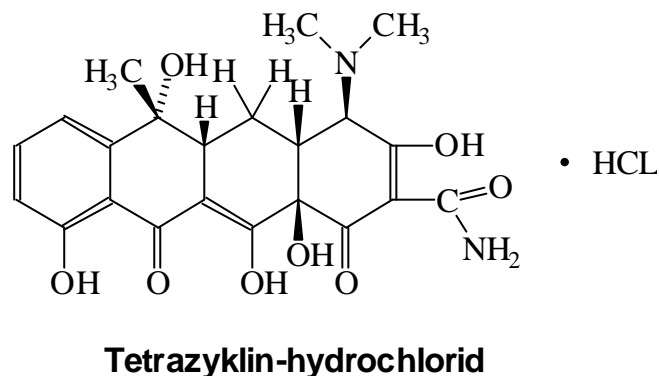
$$Y_{P/X, 5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1} \text{ Tet.}} = \frac{3.633 \text{ mV} \cdot \text{s} \cdot 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}}{47.260,87 \text{ mV} \cdot \text{s}} = 2,57 \cdot 10^{-2} \frac{\text{g Nod-Faktoren}}{\text{g Biotrockenmasse}} \quad \text{(Gleichung 4.8, b)}$$

$$Y_{P/X, 9\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1} \text{ Tet.}} = \frac{3.193 \text{ mV} \cdot \text{s} \cdot 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}}{47.260,87 \text{ mV} \cdot \text{s}} = 2,45 \cdot 10^{-2} \frac{\text{g Nod-Faktoren}}{\text{g Biotrockenmasse}} \quad \text{(Gleichung 4.8, c)}$$

Aus den auf die Biomasse bezogenen Produktausbeutekoeffizienten ( $Y_{P/X}$ ) ergeben sich nur geringe Unterschiede in der Syntheseleistung von *S. meliloti* 1021pEK327. Wird die Syntheseleistung der Zellen im Kontrollexperiment

zu 100 % gesetzt, so haben die Sinorhizobien in der Kulturlösung mit  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Tetrazyklin nach 72 h Versuchsdauer 98,5 % der Menge an Nod-Faktoren synthetisiert, die im Kontrollexperiment von den Mikroorganismen hergestellt wurden. Und selbst bei einem Einsatz von  $9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Tetrazyklin wurden noch 93,9 % Ausbeute an Nod-Faktoren je Gramm Biotrockenmasse im Vergleich zum Kontrollexperiment erzielt.

Die Gegenwart des Antibiotikums Tetrazyklin (**Abbildung 4.34**) beeinflusst die Syntheseleistung von Nod-Faktoren *S. meliloti* 1021pEK327 nur in einem äußerst geringen Maß, insbesondere, wenn eine Tetrazyklin-Konzentration von  $\leq 5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  im Medium nicht überschritten wird. Die Ergebnisse dieser Testreihe weisen somit auf die hohe Stabilität der Cosmid-Vektoren pEK327 hin, die durchschnittlich in der Regel nur in einer geringen Kopienzahl von 5 - 10 in den Zellen von *S. meliloti* 1021 vorliegen. Eine Zugabe des Antibiotikums zu einer Kulturlösung bei einer 3-tägigen Versuchsdauer ist damit nicht notwendig, um einen Abbau der Cosmide pEK327 in den Bakterienzellen zu verhindern und dennoch eine gleichbleibend hohe Produktausbeute an Nod-Faktoren zu gewährleisten, wie der Vergleich mit den Ergebnissen des Kontrollansatzes und den Kulturen mit Luteolinzugabe zeigen.



**Abbildung 4.33** Chemische Struktur des Antibiotikums Tetrazyklin-Hydrochlorid

Allein aus sterilitätstechnischen Gründen wurde trotz dieser Resultate in Fermentationen nicht auf die Beigabe von Tetrazyklin ( $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) zum Medium verzichtet. Durch das Tetrazyklin sollte bei Fermentationen mit einer integrierten Adsorptionskolonne die Sterilität des Prozesses gewährleistet werden, da die zur Adsorption genutzte Glassäule mit den Harzkugeln nur chemisch durch eine 70 %-ige ethanolische Lösung sterilisiert werden konnte. Auf Grund der hohen Wirksamkeit des Tetrazyklins sollten die Fremdorganismen, die nach der chemischen Sterilisation der Wirbelschicht noch an den Harzkugeln und in der Säule vorhanden waren, durch das Antibiotikum im Medium abgetötet und eine Kontamination der Kulturlösung damit effizient verhindert werden. Einschränkung muss angemerkt werden, dass das Antibiotikum Tetrazyklin eine Affinität zu dem in der Glassäule befindlichen Adsorberharz besaß (Khan et al., 1990) und dessen Konzentration mit zunehmender Fermentationsdauer im Medium zwangsläufig abnahm. Der Erfolg dieser prophylaktischen Maßnahme konnte dennoch bei der Begutachtung und Auszählung der Nährbodenplatten zur Bestimmung der Lebendzellzahl (*cfu*) in den Fermentationsex-

perimenten bestätigt werden, da keine Kontaminationen während der Satzprozesse mit integrierter Adsorptionskolonne beobachtet wurden. Um eine Vergleichbarkeit aller Fermentationsverfahren untereinander zu ermöglichen, wurde auch in Satzprozessen ohne Adsorptions-Bypass das Antibiotikum Tetrazyklin in der gleichen Konzentration von  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  eingesetzt.

### Kultivierung des Produktionsstamms *S. meliloti* 1021pEK327 in Melasse- und in Minimalmedium

Überprüft werden sollte in diesen Experimenten das Wachstum des Nod-Faktor Produktionsstamms *S. meliloti* 1021pEK327 in zwei grundsätzlich verschiedenen Nährlösungen, so wie seine Nod-Faktor-Syntheseleistung in diesen Medien.

In einem 3 %-igen Melassemedium wies der Stamm *S. meliloti* 1021pEK327 ein deutlich schnelleres und höheres Wachstum auf als in D-Mannitol-Minimalmedium. Mit einer optischen Dichte  $\text{OD}_{580}$  der Melassekulturen von 14 nach 72 h war die Bakterienkonzentration in dieser Nährlösung um bis zu 66 % höher als in Minimalmedium ( $\text{OD}_{580}$  8,48 bzw. 9,42), wie die **Abbildung 4.34** verdeutlicht.

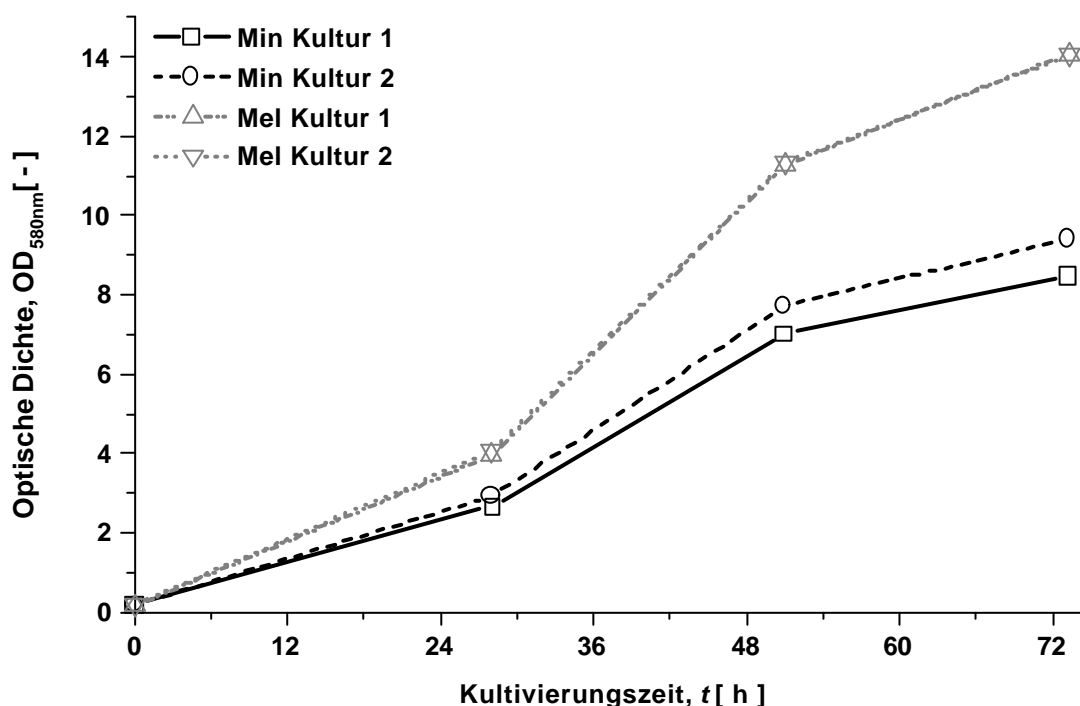


Abbildung 4.34

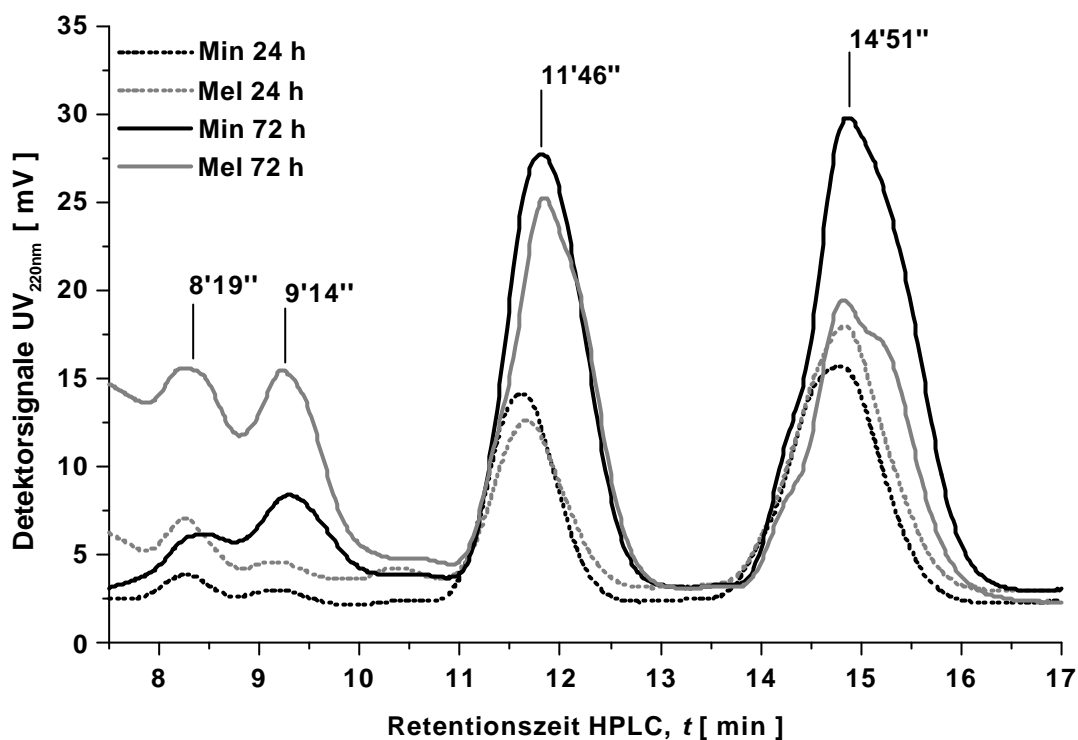
Wachstumskurven von *S. meliloti* 1021pEK327 in Mannitol-Minimalmedium (Min) und 3 % Melassemedium (Mel). Die 300 mL Schüttelkolben enthielten jeweils 50 mL Nährlösung mit  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Tetrazyklin und  $5,74\cdot 10^{-4} \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $= 2 \mu\text{M}$ ) Luteolin. Die Medien wurden mit 1 mL einer ü.N. Kultur von *S. meliloti* 1021pEK327 (TY-Medium +  $7,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Tet) angeimpft. Die Kultivierung erfolgte auf dem Exzentrerschüttler mit einer Frequenz von  $150 \text{ min}^{-1}$ .

Die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit ( $\mu$ ) war in der exponentiellen Wachstumsphase zwischen 28 h und 51 h mit einem Wert von  $\mu = 0,046 \text{ h}^{-1}$  im Melassemedium um 12 % schneller als im Minimalmedium ( $\mu = 0,041 \text{ h}^{-1}$ ). Mit einer Verdopplungszeit in der exponentiellen Phase von  $t_D = 15 \text{ h}$  (Melasse-) bzw.  $t_D = 17 \text{ h}$  (Minimalmedium) lagen diese Zeiten allerdings deutlich über den Werten der Verdopplungszeiten, die sich mit *S. meliloti* 1021pEK327 im Rührkessel unter optimalen Bedingungen realisieren ließen ( $t_{D, \text{Ferm}} = 5,46 \text{ h}$  in Minimalmedium  $\rightarrow \mu_{\text{Ferm}} = 0,127 \text{ h}^{-1}$ ; s. 4.3.5).

### **Die Nod-Faktorsynthese von *S. meliloti* 1021pEK327 in Melasse- und in Minimalmedium**

Die Nod-Faktor-Syntheseleistung des Bakterienstamms *S. meliloti* 1021pEK327 in den beiden Nährlösungen wurde durch die Analyse von zentrifugierten Kulturüberständen nach 24 h und 72 h in der RP<sub>18</sub>-Chromatographie ermittelt.

War nach 24 h die Summe der Peakflächen zwischen 7,5 und 17 min in beiden Medien mit einer Gesamt-Peakfläche von 1.530 mV·s (Min) zu 1.517 mV·s (Mel) noch nahezu identisch, so fiel die Konzentration von Nod-Faktoren im Melassemedium nach 72 h auf einen Wert von 76,2 %: 2.547 mV·s  $\rightarrow 5,3 \cdot 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  zu 3.343 mV·s  $\rightarrow 7,0 \cdot 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  in Minimalmedium ab, was in **Abbildung 4.35** zu sehen ist. Werden diese Zahlen in Relation zur optischen Dichte OD<sub>580</sub> gesetzt, die nach **Abbildung 4.34** in den Schüttelkolben erreicht wurden, so ergab sich mit den kalkulierten Nod-Faktor-Konzentrationen nach 72 h, dass die Kulturen von *S. meliloti* 1021pEK327 in Minimalmedium nach drei Tagen eine um den Faktor 1,95 höhere Produktbildung aufwiesen als in den Kulturen desselben Stamms mit Melassemedium.



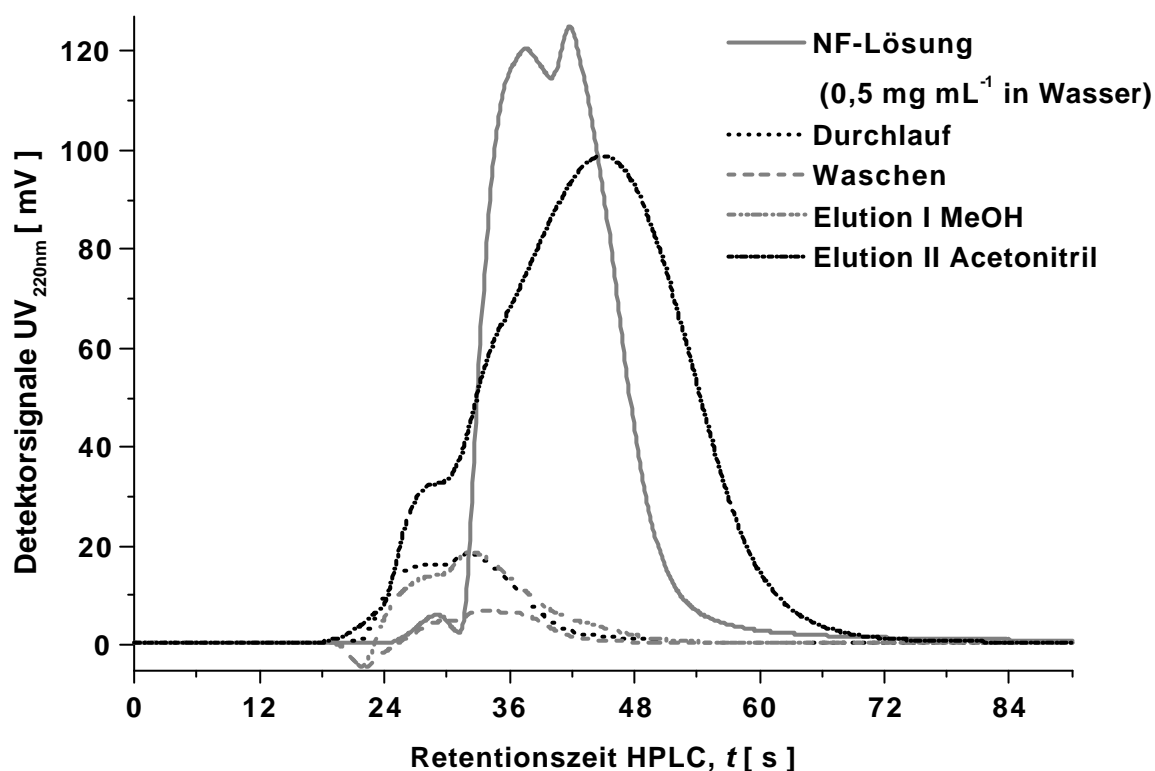
**Abbildung 4.35** RP<sub>18</sub>-Chromatogramme der zentrifugierten Überstände aus Kultivierungen von *S. meliloti* 1021pEK327 in Melassemedium (Mel) und Mannitol-Minimalmedium (Min) nach 24 h und 72 h (s. **Abbildung 4.34**).

#### 4.3.2 Die Auswahl einer Adsorptionsmatrix für die in-Prozess-Adsorption von Nod-Faktoren

Für die in-Prozess-Adsorption von Nod-Faktoren aus einer Kulturlösung sollte eine geeignete Matrix ausgewählt werden, die in einer Wirbelschicht-Adsorptionskolonne eingesetzt werden konnte. Für derartige Verfahren werden in der Regel kugelförmige Adsorbentien eingesetzt. Aus diesem Grund wurden mit Amberlite® XAD-2 pract., Amberchrom® cg-161 ms und Toyopearl Phenyl 650M drei sphärische Harze ausgewählt, deren Eigenschaften in **Tabelle 3.5** dargestellt sind. Diese Harze wurden in verschiedensten industriellen Aufbereitungsverfahren bereits zur Aufkonzentrierung von lipophilen Substanzen verwendet. Zu vergleichenden Zwecken wurde diesen Materialien ein gebrochenes lipophiles Harz gegenüber gestellt, das in Festphasenextraktionskartuschen eingesetzt wird (Bakerbond Phenyl SPE).

Die quantitative Auswertung der Peaks aus den RP<sub>18</sub>-Chromatogrammen der einzelnen Verfahrensschritte in **Abbildung 4.36** zeigte, dass bei Verwendung des Adsorberharzes Amberlite® XAD-2 pract. im Durchlauf eine Menge von 14,1 % an Nod-Faktoren wiedergefunden wurde. Beim Waschvorgang des Harzes wurden 4,5 % der Nod-Faktoren von den Harzperlen abgelöst. Mit MeOH konnten mit den

unter 3.4.1 beschriebenen Versuchsbedingungen nur 14,3 % der adsorbierten LCOS von dem Harz wieder eluiert werden. Erst mit Acetonitril wurde der Großteil der noch an die Matrix gebundenen Nod-Faktoren (63,0 %) vom Adsorberharz wieder abgelöst. Damit verblieben letztlich an dem Harz nur 4,1 % der aufgetragenen Nod-Faktoren. Die leichte Spreizung des Peaks bei der Elutionsprobe II in **Abbildung 4.36** im Vergleich zu dem Peak der Nod-Faktor-Lösung in H<sub>2</sub>O lässt sich durch die Lösung der Nod-Faktoren in Acetonitril erklären. Durch das organische Lösungsmittel verändert sich das Bindungsverhalten der in ihm gelösten Nod-Faktoren an die C<sub>18</sub>-Matrix und führt zu der beobachteten Peak-Verbreiterung.

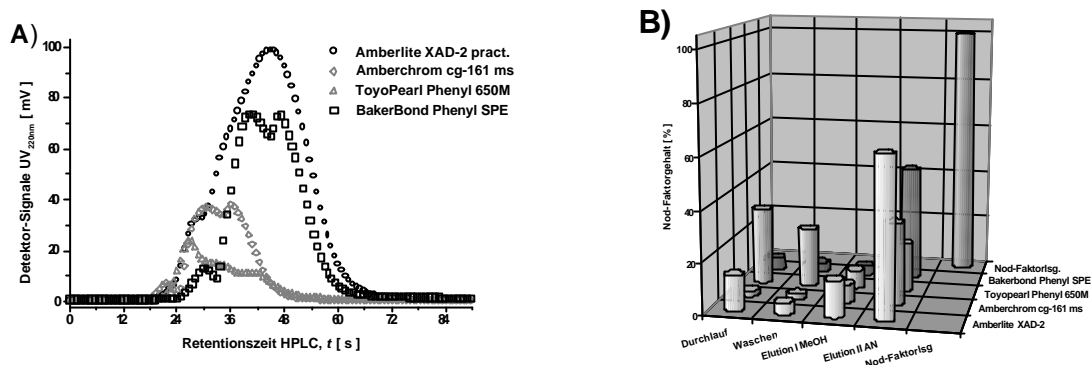
**Abbildung 4.36**

Chromatogramme der einzelnen Verfahrensschritte bei der Adsorption und Elution von Nod-Faktoren an Amberlite® XAD-2 pract.

Für den Vergleich der Adsorbenzien wurden die Konzentrationen der Nod-Faktoren in den einzelnen Fraktionen aus den Flächen der Peaks ermittelt, die die LCOS in den Chromatogrammen der einzelnen Verfahrensschritten erzeugten. Das Chromatogramm der Nod-Faktor-Stammlösung vor der Auftragung auf die Säulen wurde als Vergleichsgröße herangezogen und die Peakfläche der LCOS zu 100 % gesetzt. Wie die **Abbildung 4.37, A** zeigt, konnten mit Acetonitril (AN) in der zweiten Elutionsstufe von den Kartuschen, die mit den beiden Adsorbenzien Amberchrom® cg-161 ms und ToyoPearl-Phenyl 650M gefüllt waren, im überwiegenden Maß nur die Nod-Faktoren mit einem hydrophileren Charakter und damit kürzere



Retentionszeiten von den Adsorberharzen eluiert werden. Bei Amberlite® XAD-2 pract. und Bakerbond-Phenyl dagegen wurde mit AN das gesamte Spektrum der zuvor adsorbierten Nod-Faktoren wieder von der Adsorptionsmatrix eluiert.



**Abbildung 4.37**

Chromatogramme aus der zweiten Elutionsstufe mit Acetonitril der unterschiedlichen Adsorptionsmatrices, die für die Extraktion von Nod-Faktoren aus einer wässrigen Lösung ausgewählt wurden (A) und Darstellung der relativen Nod-Faktor-Konzentrationen in den Proben der einzelnen Verfahrensschritte zur Extraktion von Nod-Faktoren aus einer wässrigen Lösung bei fünf verschiedenen Adsorptionsmatrices (B).

Die Konzentration der Nod-Faktoren in den Proben der einzelnen Verfahrensschritte nach **Abbildung 4.37, B** zeigt, dass die Nod-Faktoren an dem sphärischen Adsorbens, Amberchrom® cg-161 ms, einem Styrolpolymer, in hohem Maß hafteten, nur 2,3 % der auf die Säule aufgetropften Nod-Faktoren fanden sich nach der Adsorption im Durchlauf wieder. Die adsorbierten Nod-Faktoren konnten auch nur in geringem Maß beim Waschvorgang vom Harz gelöst (2,2 %) werden. Doch mit den Eluenten MeOH und AN liessen sich die Glykolipide nur zu 39,9 % wieder von dem Harz ablösen. Damit bleiben an Amberchrom® cg-161 ms 55,6 % von der Ausgangsmenge an Nod-Faktoren haften, sie konnten mit den verwendeten Lösungsmitteln nicht von der Adsorptionsmatrix eluiert werden. Selbst mit einem unpolaren Lösungsmittel wie Aceton ließen sich die LCOS nicht von dem Amberchrom® cg-161 ms lösen (Daten hier nicht gezeigt).

Das dritte, makroporöse sphärische Harz Toyopearl Phenyl 650M ist nach den Ergebnissen dieser Versuche, wie **Abbildung 4.37, B** zeigt, nicht für die Adsorption von Nod-Faktoren geeignet. Allein 30,7 % der Nod-Faktoren, die auf die Säule mit Toyopearl Phenyl gegeben wurden, lassen sich im aufgefangenen Durchlauf wiederfinden. Und beim Waschvorgang werden noch einmal 23,5 % von der Ausgangsmenge an Nod-Faktoren vom Harz abgelöst. Von den verbliebenen 45,8 % an LCOS an dem Harz lassen sich mit MeOH und AN nur gut die Hälfte wieder ablösen (26,8 % der Startkonzentration an Nod-Faktoren).

Ein ähnlich gutes Adsorptionsverhalten wie Amberchrom® cg-161 zeigte die gebrochene Vergleichsmatrix Bakerbond Phenyl. Nur 5,27 % der aufgetragenen Nod-Faktoren wurden nicht an das Adsorberharz gebunden. Und auch beim Waschvorgang wurden nur 4,1 % wieder von der Matrix abgelöst. Von dem gebrochenen

Material auf Silicagelbasis aus der Festphasenextraktionskartusche (Bakerbond) konnten bei den Elutionen I + II mit MeOH und AN allerdings nur 49,5 % der aufgetragenen Nod-Faktoren wieder von dem Adsorbens eluiert werden. Auch bei diesem Harz wäre ein weiterer Elutionsschritt mit einem anderen Lösungsmittel notwendig, um die am Harz verbliebenen 41,1 % an Nod-Faktoren von dem Adsorbens abzulösen.

Aus der Reihe der drei getesteten, sphärischen Adsorbentien erweist sich nach diesen Resultaten Amberlite® XAD-2 pract. als das geeignete Harz zur Adsorption von Nod-Faktoren aus einer wässrigen Lösung. Zwar lag der Anteil an Nod-Faktoren, die nach drei Durchläufen durch die mit dem Adsorbentharz gefüllte Säule in der Vorlage gefunden wurde, mit 14,1 % um den Faktor 6 über den Werten vom Amberchrom® cg-161 ms (2,3 %), doch konnten in dem Amberlite® XAD-2 pract.-Eluat von MeOH und AN zusammen 77,3 % der aufgetragenen Nod-Faktoren wieder gewonnen werden, bei Amberchrom® cg-161 ms jedoch nur ca. die Hälfte (39,9 %) von der Ausgangsmenge an Nod-Faktoren. In weiteren Versuchen konnte mit dem Lösungsmittel EtOH die Desorption der Nod-Faktoren von dem Adsorbens Amberlite® XAD-2 pract. optimiert werden. Das Lösungsmittel wurde dazu mehrfach über das Harz gegeben und damit eine Elutionsausbeute der am lipophilen Harz haftenden Nod-Faktoren von  $\geq 90$  % zu erreichen.

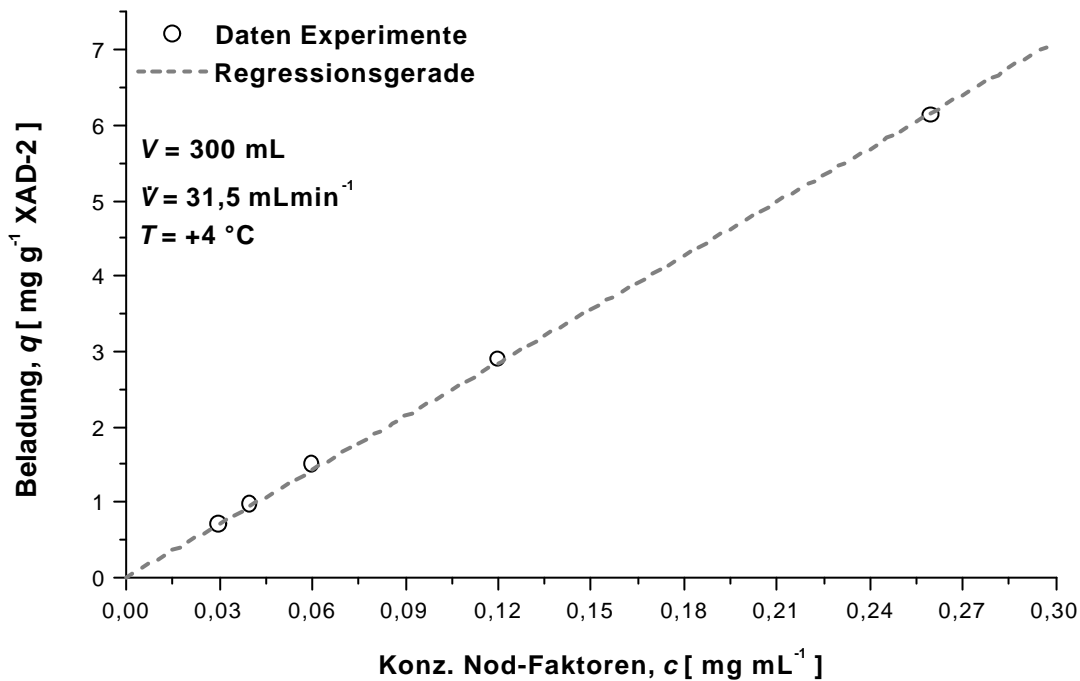
### **Die Beladungskapazität von Amberlite® XAD-2 pract. für Nod-Faktoren**

Um eine Aussage über die Beladungskapazität ( $q_m$ ) von Amberlite® XAD-2 pract. mit den Glykolipiden zu erhalten, wurden Experimente in der Wirbelschicht mit unterschiedlichen Konzentrationen an Nod-Faktoren von  $c_{NF} = 0,03 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  -  $c_{NF} = 0,26 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  bei einer Harzmenge von 12 g ( $\rightarrow 40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) in der Säule durchgeführt. Die Konzentrationen an Glykolipiden in den Testlösungen lagen damit zum Teil deutlich über den Werten, die bei späteren Satzprozessen mit *S. meliloti* 1021pEK327 in der Fermentationsbrühe gemessen werden konnten ( $\rightarrow 0,04 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  -  $0,07 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; s. auch 4.3.6). Die Raumzeit für die Nod-Faktorlösung in der Säule betrug  $t = 99$  s. Die Endpunkte der Experimente waren erreicht, wenn mittels RP<sub>18</sub>-Chromatographie keine Nod-Faktoren mehr in der Lösung nachgewiesen werden konnten.

Wie die **Abbildung 4.38** zeigt, gibt es einen linearen Zusammenhang zwischen der Beladung des Adsorbens und der eingesetzten Adsorptivkonzentration. Bei den hier vorgelegten Konzentrationen an Nod-Faktoren konnten nach spätestens 49 h Experimentdauer in allen Lösungen keine Nod-Faktoren mehr nachgewiesen werden. Dies weist darauf hin, dass bei einem Einsatz von 40 g Harz je Liter aufzuarbeitender Fermentationslösung die Beladungskapazität ( $q_m$ ) von Amberlite® XAD-2 pract. nach diesen Experimenten noch nicht erreicht wurde, somit eine Gleichgewichtskonzentration ( $c_{eq}$ ) für das Adsorptiv Nod-Faktor zum Erhalt einer Isotherme nicht bestimmbar war auf Grund der niedrigen Ausgangskonzentrationen an Glykolipiden und dies, obgleich die Fermentationsüberstände bereits teilweise aufkonzentriert waren.

In den Kultivierungen dieser Arbeit mit *S. meliloti* 1021pEK327 lagen die maximal erzielbaren Konzentrationen an LCOS bei  $\leq 73 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \cong 6,40 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  (s. 4.3.6)

bei einer angenommenen durchschnittlichen Molmasse von  $1.140 \text{ g mol}^{-1}$  für die Glykolipide. Für die Adsorption von Nod-Faktoren aus Fermentationsbrühen an Amberlite® XAD-2 pract. bedeutet dies, dass selbst bei einer Konzentration von nur  $10 \text{ g Harz je Liter Fermentationslösung}$  mit  $q_t = 7,3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  eine noch zu ermittelnde maximale Beladungskapazität ( $q_m$ ) des Adsorbens für Glykolipide nicht erreicht wird, wie aus **Abbildung 4.38** hervorgeht.



**Abbildung 4.38** Beladungs-Konzentrations-Diagramm für die Adsorption von Nod-Faktoren an Amberlite® XAD-2 pract.

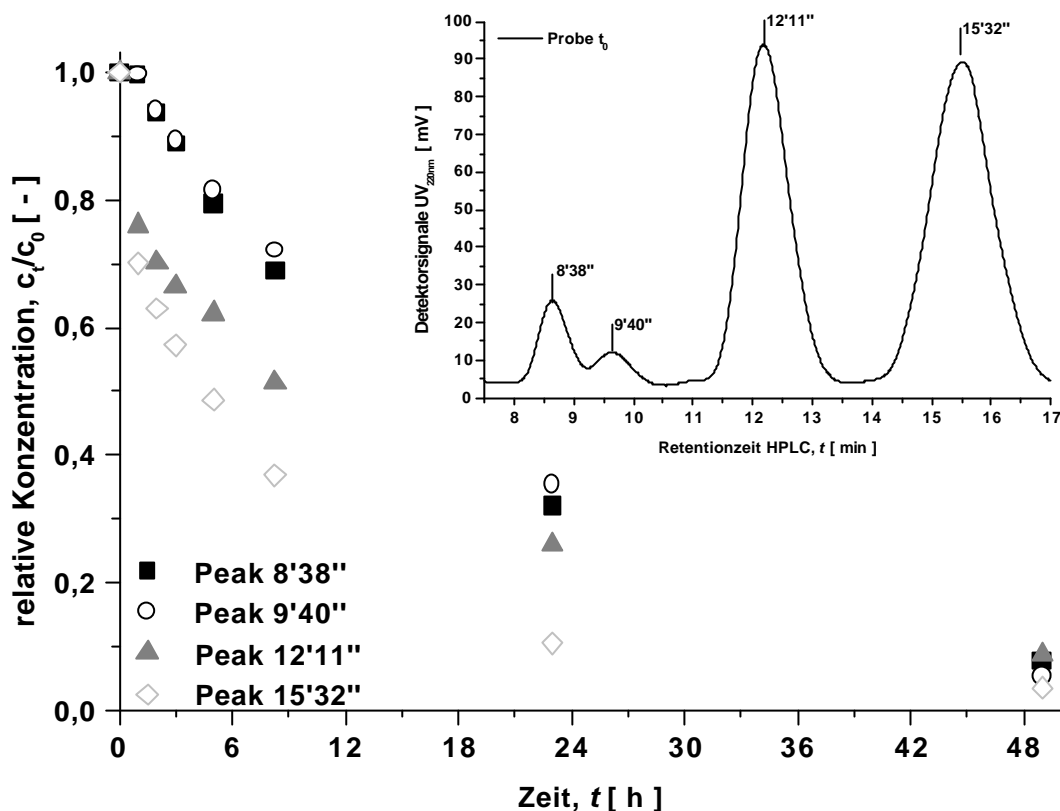
Eine deutlich höhere Bindungskapazität von Amberlite® XAD Harzen wurde durch die Experimente von Yang und Whitehall (Yang *et al.*, 1999; Whitehall *et al.*, 1996) bestätigt, die für Amberlite® XAD-2 pract. und Amberlite® XAD-16 als Adsorbentien eine Gleichgewichtsbeladung ( $q_{eq}$ ) von bis zu  $50 \text{ g} \cong 1,04 \cdot 10^{-1} \text{ Mol Cephalosporin C}$  (Molmasse =  $478,8 \text{ g}$ ) je Liter hydratisiertem Harz bestimmten. Und Grzegorzcyk (Grzegorzcyk *et al.*, 1996) konnte bei einer Temperatur von  $+24 \text{ °C}$  eine maximale Beladung mit der Aminosäure Phenylalanin von  $q_{max} = 100 \text{ mg g}^{-1}$  an Amberlite® XAD-4, einem mit Amberlite® XAD-2 pract. vergleichbaren Harz, erzielen. In den nachfolgenden Versuchen zur Kinetik der Nod-Faktor-Adsorption an Amberlite® XAD-2 pract. konnten nach 49 h Beladungswerte von  $q_t \geq 11 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  für Glykolipide erreicht werden, die ebenfalls zeigen, dass die Beladungskapazität ( $q_m$ ) des Harzes für Nod-Faktoren bei den hier eingesetzten Adsorbenskonzentrationen deutlich über den Erfordernissen für das Verfahren zur integrierten Adsorption von Nod-Faktoren aus einer Fermentationslösung liegen.

### 4.3.3 Der Verlauf der Adsorption von Nod-Faktoren an Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 pract.

Der zeitliche Verlauf der Adsorption von Nod-Faktoren an das Adsorberharz in einer Wirbelschicht sollte beobachtet werden. In den Chromatogrammen der analysierten Proben wurden die auftretenden Peakflächen der Nod-Faktoren mit Retentionszeiten zwischen 7,5 min – 17 min vermessen. Die relativen Konzentrationen der Glykolipide ( $c_t / c_0$ ) in der Lösung ergaben sich aus dem Quotienten der einzelnen Peakflächensumme ( $A$ ) zum Zeitpunkt  $t = i$  h des Experiments und der Peakflächen-summe ( $A$ ) zu Beginn der Kinetikmessung ( $t = 0$  h).

Die Adsorption von Nod-Faktoren an Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 pract. in einer Wirbelschicht erfolgte unter den in diesem Experiment gewählten Versuchsbedingungen, wie die **Abbildung 4.39** zeigt, mit einer äußerst niedrigen Geschwindigkeit. Bei einer Anfangskonzentration von  $2,6 \cdot 10^{-1} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  an Glykolipiden sind erst nach über 48 h nahezu alle Nod-Faktoren-Moleküle an das Harz gebunden. Der Vergleich des Adsorptionsverlaufs für die einzelnen Peaks in dem Konzentrations- / Zeitdiagramm macht dabei deutlich, dass die Adsorption der Nod-Faktoren mit einem hydrophileren Molekülaufbau, also LCOS mit Retentionszeiten von  $t = 8'38''$ ,  $t = 9'40''$ , und  $t = 12'11''$  in den ersten 24 h signifikant langsamer abläuft, als die Bindung der hydrophoberen Glykolipide mit Retentionszeiten von  $t = 15'32''$ . Doch selbst von den Nod-Faktoren mit hydrophoberen Molekülstrukturen waren erst nach 23 h mehr als 89 % an das Harz gebunden. Die langsame Bindung von Nod-Faktoren an das Harz werden auch durch Experimente in einem Rührkessel bestätigt, bei denen das Adsorberharz Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 pract. mit einer Konzentration von  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  direkt zu einem ultrafiltrierten Fermentationsüberstand mit Nod-Faktoren gegeben wurde (Kohring *et al.*, 1997). In diesen Satzversuchen konnte eine vollständige Abreicherung der Nod-Faktoren aus einer wässrigen Lösung bei einer Konzentration von  $32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  an LCOS, einer Harzkonzentration von  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  und bei einer Temperatur von  $+4 \text{ °C}$  frühestens nach 5 h erreicht werden, und dies, obwohl auf Grund der Versuchsanordnung in diesem Experiment das Adsorbens signifikant längere Kontaktzeiten zu der Nod-Faktor-Lösung erreichte als im Differenzialkreislauf-Adsorber.

Wie im theoretischen Hintergrund unter **2.18** beschrieben, wird die Geschwindigkeit der Adsorption von Molekülen an eine Matrix in der Regel durch die Vorgänge der Film-, Poren- und Oberflächendiffusion bzw. durch eine Kombination dieser Transportmechanismen bestimmt. Die Art und Größe der Transportwiderstände, die der Stoffübertragung aus der Flüssigkeit an die Adsorptionszentren am Kornrand und im Korninneren entgegenstehen, bestimmen somit in der Regel die Zeit, die benötigt wird, bis sich das Gleichgewicht der Adsorption eingestellt hat (Kümmel, 1990). Der eigentliche Vorgang der Adsorption läuft in den meisten Verfahren dagegen sehr schnell ab und bestimmt demnach nicht die Geschwindigkeit des Gesamtprozesses der Adsorption.

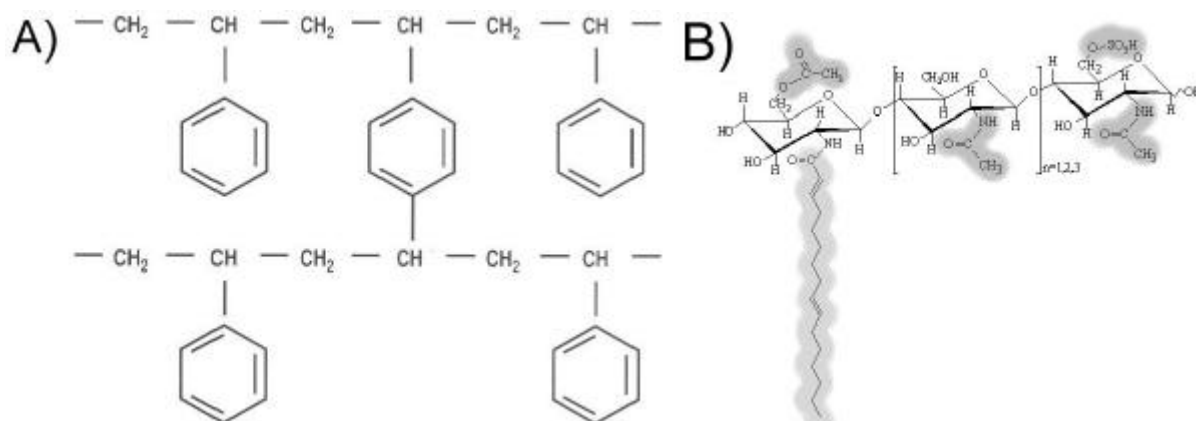
**Abbildung 4.39**

Zeitlicher Verlauf der Adsorption von Nod-Faktoren an Amberlite® XAD-2 pract bei +4 °C. Es wurde ein Fermentationsüberstand mit einer Anfangskonzentration an Nod-Faktoren von  $2,6 \cdot 10^{-1} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  mit einem Volumenstrom von  $V = 31,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  durch die Adsorptionssäule (s. **Abbildung 3.4**) mit 12 g Amberlite® XAD-2 pract. gefördert.

Für die Adsorption von Nod-Faktoren an Amberlite® XAD-2 pract. scheint aber der eigentliche Adsorptionsvorgang der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zu sein, Stofftransportphänomene spielen nur eine untergeordnete Rolle. Dies kann auf die molekulare Struktur der Glykolipide zurückgeführt werden. Bei der Adsorption der Glykolipide an Amberlite® XAD-2 pract. werden die Nod-Faktoren über ihre Fettsäurekette durch van der Waals'sche Wechselwirkungskräfte an den unpolaren Oberflächenstrukturen des Harzes, die in **Abbildung 4.40, A** gezeigt sind, fixiert. Wie aber die **Abbildung 4.40, B** verdeutlicht, besitzen die Nod-Faktoren neben der unpolaren Fettsäure (hellgrau markiert) auch stark hydrophile Molekülreste am Zuckerrückgrat, insbesondere die Acetat- und Sulfatgruppen (dunkelgrau markiert).

Dieser amphipathische Molekülaufbau der Glykolipide kann nach den Resultaten der oben dargestellten Experimente aus zwei Gründen für eine äußerst langsame Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts verantwortlich gemacht werden. Die polaren (hydrophilen) Gruppen der Nod-Faktoren verhindern danach eine schnelle Bindung der Glykolipide an die unpolare (hydrophobe) Oberfläche von Amberlite XAD-2 pract., da sie durch Wechselwirkungen mit dem polaren Lösungsmittel Wasser in der Lösung zurückgehalten werden. Daraus folgt, dass der eigentliche

Bindungsvorgang der Nod-Faktoren an das lipophile Harz die Kinetik bestimmt. Das gleichzeitige Auftreten von Wechselwirkungskräften, die das Nod-Faktor-Molekül in der Lösung zurückhalten und Kräfte, die zwischen der Fettsäurekette und den unpolaren Teilen der Adsorbensoberfläche wirken, verhindern eine schnellere Abreicherung der Nod-Faktoren aus einer wässrigen Lösung. Dies wird durch die Beobachtung bestätigt, dass die Adsorption der Nod-Faktoren mit einem hydrophileren Molekülaufbau signifikant langsamer erfolgt, als der hydrophoberer Glykolipide, wie aus **Abbildung 4.39** zu entnehmen ist.



**Abbildung 4.40** Chemische Grundstruktur der Adsorptionsmatrix Amberlite® XAD-2 pract. (Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer) (A) und der Nod-Faktoren (B) mit Markierung der hydrophilen (dunkelgrau) und hydrophoben (hellgrau) Molekülgruppen

Eine weitere Ursache für den langsamen Ablauf des Adsorptionsvorgangs könnte auch in der Bildung von Mizellen durch die Nod-Faktoren liegen (s. dazu auch **4.3.5**). In einer wässrigen Kulturlösung können sich auf Grund der chemischen Struktur der Glykolipide aus den Nod-Faktoren nur Mizellen ausbilden, bei denen der hydrophobe Anteil der Nod-Faktoren in das Innere der Mizellen weist. Damit würde eine Interaktion der Nod-Faktor-Fettsäureketten mit hydrophoben Gruppen der Adsorptionsmatrix ebenfalls verhindert werden. Erst bei Auflösung dieser Mizellen kann eine Wechselwirkung der freien Nod-Faktor-Moleküle mit dem Harz und damit eine Bindung der Glykolipide an die Adsorbensoberfläche erfolgen. Da zudem Mizellen je nach Aufbau eine Größe von 120 Å (einfache Mizelle) bis zu 2.000 Å (große monolamellare Vesikel) aufweisen (Pfüller, 1986) können, ist es ihnen auf Grund dieser Abmessungen nicht möglich, in die Poren von Amberlite® XAD-2 einzudringen, die eine durchschnittliche Größe von 90 Å besitzen (s. **Tabelle 3.5**), was eine Adsorption der Nod-Faktoren an den inneren Oberflächen der porösen Harzkugeln damit verhindert.

Neben den molekularen Charakteristika von Adsorbens und Adsorptiv wirken sich aber auch andere Parameter auf die Geschwindigkeit der Adsorption von Nod-Faktoren an Amberlite® XAD-2 aus. Die in diesem Experiment verwendeten Harzkugeln besaßen eine sehr breite Partikelgrößenverteilung von 0,3 mm - 0,84 mm. Karau (Karau *et al.*, 1997) konnte bei der Adsorption von Proteinen in einer Wirbelschicht an sphärische Agarose-Quarz-Ionenaustauscher nachweisen, dass die Verwen-

derung von Schüttungen mit durchschnittlich kleineren Partikeln zu einer schnelleren Adsorption des Modellproteins Rinderserumalbumin an Streamline DEAE führte.

Bei den Versuchen zur Adsorptionskinetik muss zudem berücksichtigt werden, dass die Experimente auf einem Rotationsschüttler durchgeführt wurden, bei denen sich die Adsorptionskolonne in den Kolben befand, wie in **Abbildung 3.4** gezeigt. Auf Grund der Rotationsfrequenz von  $150 \text{ min}^{-1}$  wurden zentrifugale Kräfte auf die Säule und damit auch auf die in ihr befindlichen Partikel und Lösungen ausgeübt. Diese Kräfte und die beobachtete Schräglage der Säule im Kolben während der Rotation auf dem Schüttler haben einen erheblichen Einfluss auf die hydrodynamischen Verhältnisse wie Betthöhe, Ausbildung von Strömungsprofilen und axiale Durchmischung in der Säule (Hadulla *et al.*, 1995). Eine Variation dieser hydrodynamischen Parameter hatte nach Thömmes (Thömmes *et al.*, 1995) entscheidende Auswirkungen auf die Adsorptionsleistung bei der Bindung von Rinderserumalbumin an modifizierte, poröse Glasträger. Die Auswirkungen der hier vorgestellten Versuchsdurchführung auf die hydrodynamischen Verhältnisse beim Adsorptionsprozess von Nod-Faktoren an ein lipophiles Harz wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Diese Versuchsanordnung wurde für die kinetischen Untersuchungen verwendet, weil sie in identischem Aufbau auch in den nachfolgenden Experimenten zur Extraktion von Nod-Faktoren aus einer Suspension mit lebenden Bodenbakterien Verwendung fand.

Deshalb können die Versuchsbedingungen zur Optimierung der Adsorptionskinetik auch nur in einem beschränkten Maß variiert werden. Eine Änderung des pH-Wertes oder der Salzstärke der Nod-Faktor enthaltenden Lösung zur Verbesserung der Adsorption an das Harz entfallen, da solche Änderungen bei den Kultivierungen die Viabilität der Bodenbakterien erheblich beeinträchtigen würde (s. **4.1.1**).

Eine Möglichkeit zur Erhöhung der Adsorptionsgeschwindigkeit von Nod-Faktoren an Amberlite® XAD-2 pract. läge in der Modifizierung der Harzes, um die Hydrophobizität der Oberfläche in begrenztem Umfang herabzusetzen und über diesen Weg eventuell eine schnellere Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts zu erreichen. Lothe (Lothe *et al.*, 1999) konnte zeigen, dass durch eine Beschichtung von Amberlite® XAD-2 pract. mit Acrylat-Polymeren die Adsorption von Invertase aus Bäcker-Hefe optimiert und in Satzversuchen eine um 25 % gesteigerte Ausbeute innerhalb von 4 h erreicht werden konnte. Durch die Herabsetzung der Hydrophobizität des Harzes können aber auch Nährstoffe aus dem Medium entzogen werden, was wiederum das Wachstum der Bodenbakterien nachhaltig beeinflussen kann, wie unter **4.3.12** zu sehen. Eine Alternative, die Affinität des Adsorberharzes zu den Nod-Faktoren gezielt zu erhöhen, liegt in der Verwendung von Reaktivadsorbentien. Bei dieser kombinierten Technik aus Reaktivextraktion und Adsorption wird eine Substanz mit einer spezifischen Affinität zum Zielprodukt an das makroporöse Harz gekoppelt (Bart *et al.*, 1998). Die Kopplung verschiedenster Liganden wie z.B. die Immobilisierung von Alizarinkarmin an Amberlite® XAD-2 für die Extraktion von Schwermetallen aus wässrigen Lösungen wurde bereits durchgeführt (Singh *et al.*, 1994). Als Affinitätsligand für die Nod-Faktoren bietet sich aus der Gruppe der Lektine das „Wheat Germ Agglutinin“ (WGA) an, ein 36.000 kDa großes Protein, bestehend aus zwei identischen Untereinheiten. WGA besitzt eine hohe Affinität zu N-Acetylglucosaminresten (GlcNAc; Bonnin *et al.*, 1999) und bindet mit seiner B-Domäne dabei bevorzugt Di- und Trimere dieser Zuckerderivate (Espinosa *et al.*, 2000). Zur Aufreinigung von N-acetylierten Di-, Tri- und Tetrasacchariden wurde

WGA bereits in der Hochleistungs-Flüssig-Affinitätschromatografie (HPLAC) eingesetzt, wobei das Lektin kovalent an ein poröses Silicagel gebunden wurde (Ohlson *et al.*, 1998). Es muss aber berücksichtigt werden, dass durch die Acetylierung am nicht reduzierenden Ende und durch die Sulfatierung am reduzierenden Ende einiger Nod-Faktor-Strukturen die Affinität zu WGA abgeschwächt werden könnte. Dies müsste zuvor getestet werden.

### ***Einfluss der Adsorbens-Konzentration in der Wirbelschicht auf die Adsorption von Nod-Faktoren an Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 pract.***

Zur Ermittlung der optimalen Menge an Adsorbens in der Wirbelschicht sollte der Verlauf der Abreicherung von Nod-Faktoren aus einer wässrigen Lösung in Abhängigkeit der Menge an lipophilen Harzkugeln in der Adsorptionskolonne verfolgt werden. In den Chromatogrammen aus der RP<sub>18</sub>-HPLC wurden die auftretenden Peakflächen der Nod-Faktoren mit Retentionszeiten zwischen 7,5 min – 17 min vermessen. Die relativen Konzentrationen der Glykolipide ( $c_t/c_0$ ) in der Lösung ergaben sich aus dem Quotienten der Peakflächensummen ( $\sum A_{7,5min-17min}$ ) zum Zeitpunkt  $t=i$  h des Experiments und der Peakflächensumme ( $\sum A_{7,5min-17min}$ ) zu Beginn der Kinetikmessung ( $t=0$  h).

Die Daten des Experiments in **Abbildung 4.41** zeigen, dass bei einer Menge von 12 g Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 pract. in der Säule nach 7 h 50 % der beim Start des Experiments in der Lösung vorhandenen Nod-Faktoren an das Adsorberharz gebunden haben, bei 6 g an lipophilen Harzkugeln in der Kolonne waren es zum gleichen Zeitpunkt nur 36 % und bei einer Menge von 3 g Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 pract. in der Säule konnten nach 7 h lediglich 16,3 % der LCOS durch die lipophilen Harzperlen aus der Lösung extrahiert werden. Die nahezu vollständige Abreicherung der Nod-Faktoren ( $c_t \leq 0,06 \cdot c_0$ ) ist im Ansatz mit 12 g Harz erst nach 49 h erreicht. Mit 6 g Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 pract. in der Säule waren bei Experimentende dagegen erst ein Adsorptionsgrad von 83 % erreicht, im Kolben mit der 3 g Harz enthaltenden Säule konnten zu diesem Zeitpunkt nur 43,8% der Nod-Faktoren aus der Lösung an das Harz gebunden werden. In den Experimenten mit 6 g und 3 g Amberlite XAD-2 pract. wurden nach 49 h nahezu doppelt so hohe Beladungswerte mit  $11,0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  erreicht wie in dem Versuch mit 12 g Harz ( $\rightarrow 6,1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ).



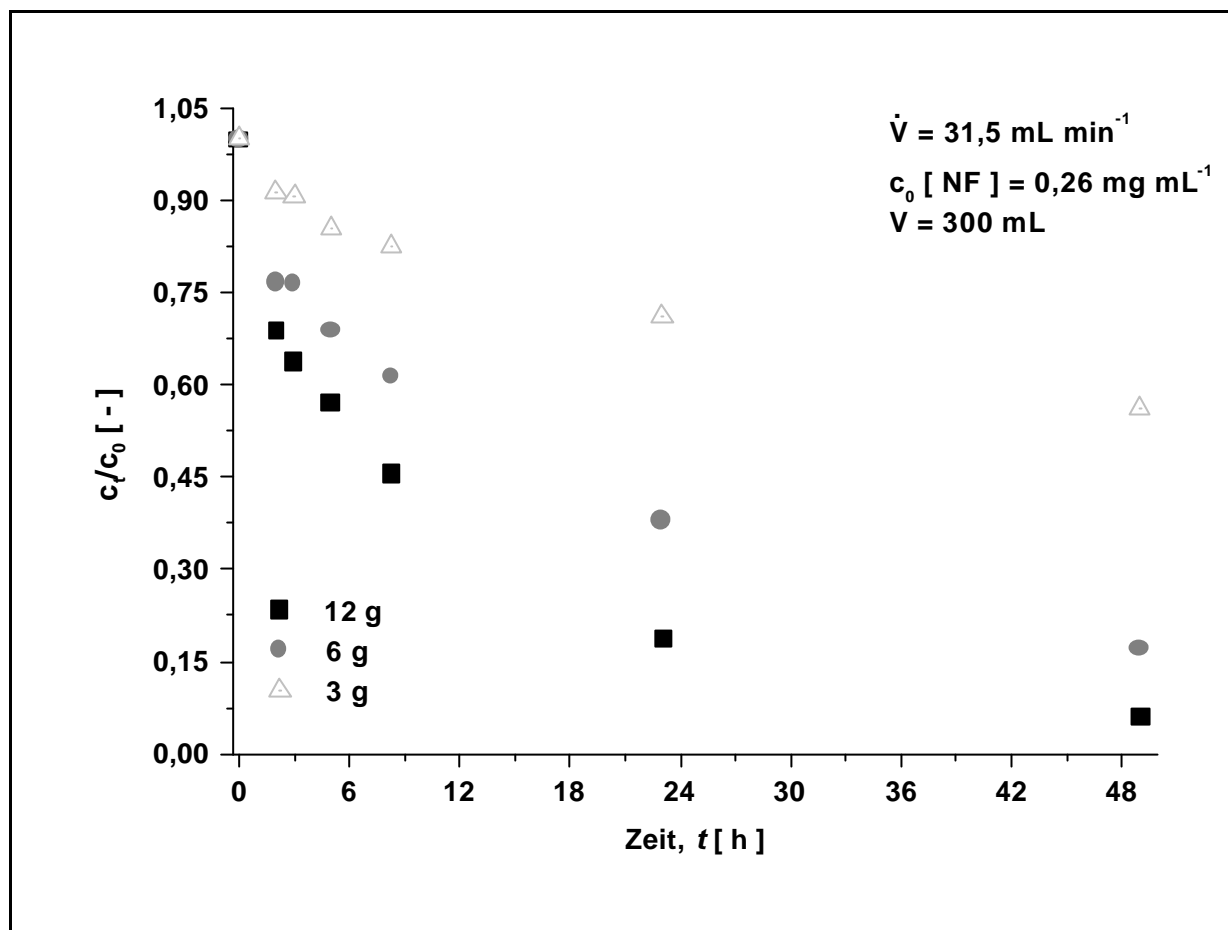


Abbildung 4.41

Beladungs-Zeit-Verlauf der Adsorption von Nod-Faktoren an Amberlite® XAD-2 pract. bei unterschiedlichen Mengen des Harzes in der Adsorptionskolonne. Die Adsorptionssäulen wurden dazu mit 12 g, 6 g und 3 g an feuchtem Adsorbens gefüllt. Die 300 mL eines konzentrierten, ultrafiltrierten Fermentationsüberstands besaßen eine Anfangskonzentration an Nod-Faktoren von  $2,6 \cdot 10^{-1} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

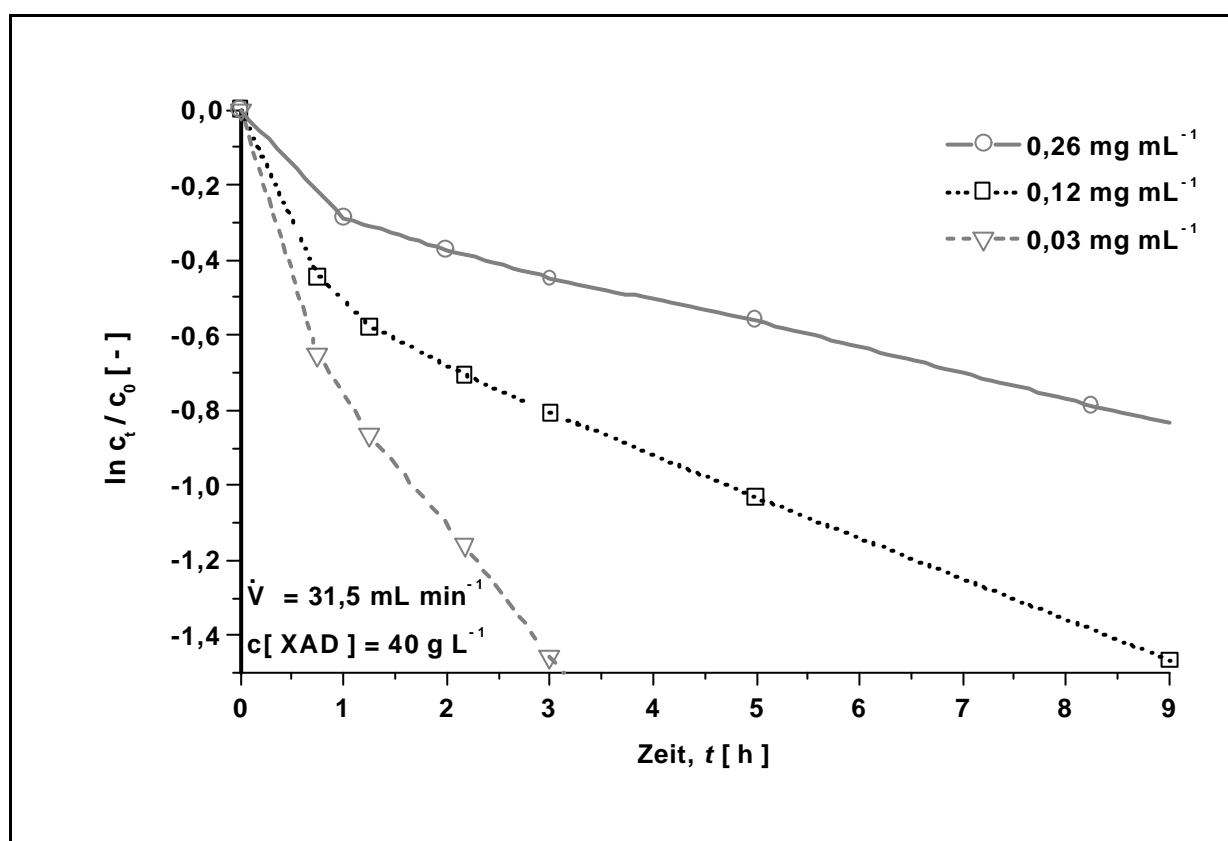
Über die Konzentration der in der Säule vorhandene Harzkugeln und der daraus resultierenden Erhöhung an Adsorberoberfläche in der Wirbelschichtkolonne kann die Extraktion der Nod-Faktoren aus der Lösung erheblich beschleunigt werden, wie aus **Abbildung 4.41** hervorgeht. Diese Beobachtung wird durch Versuche von Wright (Wright *et al.*, 1998) bestätigt, die bei der Adsorption von Lysozym an Streamline SP durch die Erhöhung der Harzmenge im Versuchsansatz die Geschwindigkeit der Adsorption in dem gleichen Maß steigern konnte wie in dem oben dargestellten Experiment. Mit 40 g Harz je Liter aufzuarbeitendes Flüssigkeitsvolumen ist aber allein aus Kostengründen für das Verfahren die obere Grenze zu setzen. Bei der Umsetzung der Experimente zur in-Prozess Adsorption von Nod-Faktoren aus einer Kulturlösung mit Bodenbakterien vom Schüttelkolbenmaßstab in den 20 L-Pilot-Maßstab war die eingesetzte Menge an Adsorbens durch die Dimensionierung der verwendeten Wirbelschichtkolonne ohnehin auf eine Menge von 10 g Harz je Liter Fermentationslösung limitiert (s. **3.5.4**).

### Verlauf der Adsorption in Abhängigkeit von der eingesetzten Nod-Faktor-Konzentration

In einem weiteren Versuch wurde der Adsorptionsprozess von Glykolipiden in einer Wirbelschicht bei unterschiedlichen Anfangskonzentrationen an Nod-Faktoren beobachtet. Es erfolgte wieder die Auftragung des Logarithmus des Nod-Faktor-Konzentrationsverhältnisses  $c_t / c_0$  gegen die Zeit.

Formalkinetisch lässt sich anhand der Kurvenverläufe in **Abbildung 4.42** die Adsorption von Nod-Faktoren an Amberlite XAD-2 pract. als ein Prozess erster Ordnung bezüglich der Nod-Faktor-Konzentration beschreiben, wie aus **Gleichung 4.9** hervorgeht:

$$\ln \frac{c_t}{c_0} = -k_{1.Ord.} \cdot t \quad (\text{Gleichung 4.9})$$



**Abbildung 4.42**

Konzentrations-Zeit-Diagramm der Adsorption von Nod-Faktoren bei unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen an LCOS in der Reservoirelösung. Es waren jeweils 12 g Amberlite® XAD-2 pract. in die Adsorptionssäule (s. **Abbildung 3.3**) eingefüllt. Die Versuche wurden mit Konzentrationen an Nod-Faktoren von 0,03 mg·mL<sup>-1</sup> – 0,26 mg·mL<sup>-1</sup> durchgeführt. Die 300 mL Nod-Faktor-Lösungen wurden mit einem Volumenstrom von  $V = 31,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  durch die Säule gepumpt.

Der Knick aller drei Graphen nach  $t \cong 1 \text{ h}$  in **Abbildung 4.42** macht aber deutlich, dass dieser Adsorptionsvorgang in zwei Phasen mit unterschiedlichen Adsorpti-

ongeschwindigkeiten verläuft. Nach der Vorstellung, dass die Glykolipide in wässriger Lösung Mizellen ausbilden (s. oben), erfolgt anhand der vorliegenden Ergebnisse innerhalb der ersten Stunde die Adsorption frei vorliegender Nod-Faktor-Monomere, die nicht in Mizellen eingebunden sind. In dieser Phase erfolgt die Adsorption mit einer höheren Geschwindigkeitskonstante, als im weiteren Verlauf der Nod-Faktoren-Adsorption, wie **Abbildung 4.42** zeigt. Die zweite Phase  $t \geq 1$  h ist von der Geschwindigkeit der Abspaltung von Nod-Faktor-Molekülen aus den Mizellen und / oder der Auflösung von Mizellen in der Suspension abhängig. Und dieser Prozess erfolgt nach den vorliegenden Resultaten nur mit einer geringen Geschwindigkeit. Aus diesen Gründen ist letztendlich die Extraktion der Glykolipide mittels Amberlite XAD-2 pract. aus einer wässrigen Lösung deutlich langwieriger als z.B. die von Pyle und Yang (Yang *et al.*, 1999) beschriebene Adsorption von Cephalosporin an Amberlite® XAD-16. Mit der Modellvorstellung der Mizellbildung lässt sich auch erklären, warum mit steigender Ausgangskonzentration an Nod-Faktoren der Prozess der Adsorption langsamer abläuft, wie in **Abbildung 4.42** zu sehen ist. In einer wässrigen Suspension mit einer höheren Konzentration an LCOS liegt zwangsläufig eine größere Anzahl der Nod-Faktor-Mizellen und an Mizellen mit einem durchschnittlich größeren Durchmesser vor, für die das Eindringen in die poröse Matrix, wie oben geschildert, nicht möglich ist.

Die Mizellbildung in einem wässrigen Milieu kann in der Regel durch Faktoren wie die Temperatur oder die Gegenwart von Elektrolyten (Pfüller, 1986) beeinflusst werden. Da jedoch die Adsorberharze in einer Kulturlösung eingesetzt werden sollten, deren Elektrolytgehalt und Temperatur nicht verändert werden konnten, da ansonsten die Viabilität der Mikroorganismen nicht mehr gewährleistet wird, kann auf diese Weise die Mizellbildung in der Kulturlösung nicht verhindert und damit eine schnellere Adsorption der Nod-Faktoren erreicht werden.

#### ***Einfluss des Volumenstroms auf die Adsorption von Nod-Faktoren an Amberlite<sup>a</sup> XAD-2 pract.***

In einem abschließenden Versuch sollte geklärt werden, ob durch die Erhöhung des Volumenstroms, mit dem die Nod-Faktor-Lösung durch eine mit Harz gefüllte Wirbelschicht gepumpt wird, die Adsorptionsgeschwindigkeit erhöht werden kann.

Die Kurvenverläufe in **Abbildung 4.43** zeigen, dass bei einem eingestellten Volumenstrom von  $63 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  innerhalb von 6 h über 90 % der in der Lösung vorhandenen Nod-Faktoren an das Harz gebunden hatten. Zum gleichen Zeitpunkt waren bei einem Volumenstrom von  $31,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  noch ca. die Hälfte (48,7 %) der zu Beginn vorhandenen Nod-Faktoren in der Lösung nachweisbar. Bei Versuchsende waren nach 23 h bei dem Versuch mit einem Volumenstrom von  $31,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  noch immer 10 % der Ausgangskonzentration an Nod-Faktoren in der Lösung vorhanden, während bei einem Volumenstrom von  $V = 63 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  keine Glykolipide mehr in der Lösung nachgewiesen werden konnten.

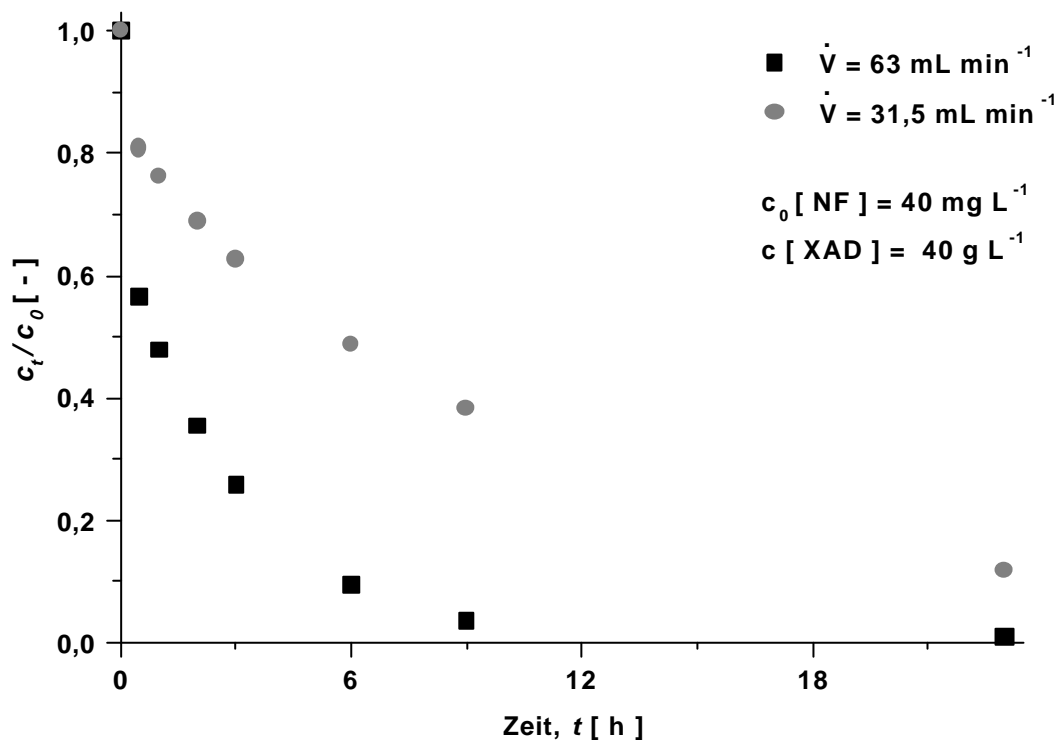
Auf die leere Adsorptionskolonne bezogen, errechnet sich nach **Gleichung 4.10** die Raumzeit für die Nod-Faktor-Lösung in der Säule zu:

$$t = \frac{V_R}{\dot{V}} \quad \text{(Gleichung 4.10)}$$

Für die verschiedenen Volumenströme in diesem Experiment ergeben sich damit Raumzeiten ( $\tau$ ) von:

$$t_{63 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}} = \frac{V_R}{\dot{V}} = \frac{51,84 \text{ mL}}{63 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}} = 0,83 \text{ min} \Rightarrow 49,37 \text{ s} \quad \text{(Gleichung 4.10, a)}$$

$$t_{31,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}} = \frac{V_R}{\dot{V}} = \frac{51,84 \text{ mL}}{31,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}} = 1,65 \text{ min} \Rightarrow 99 \text{ s} \quad \text{(Gleichung 4.10, b)}$$



**Abbildung 4.43**

Adsorption von Nod-Faktoren an Amberlite® XAD-2 pract. bei unterschiedlichen Volumenströmen durch die Adsorptionskolonne. Die Adsorptionsäulen waren mit 12 g Amberlite® XAD.-2 pract. gefüllt. Die Versuche wurden mit 300 mL eines Fermentationsüberstand durchgeführt, der eine Konzentrationen an Nod-Faktoren von  $0,04 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  aufwies.

Obwohl die mittlere Verweilzeit ( $\tau$ ) bei einem Volumenstrom von  $63 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  nur halb so groß war wie jene bei einem Volumenstrom von  $31,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , erfolgte in diesem Experiment die Adsorption mit einer höheren Geschwindigkeit als in dem

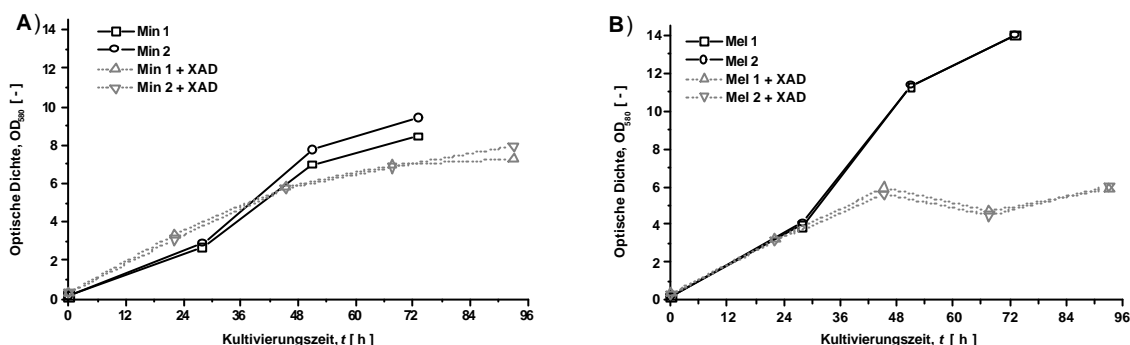
Experiment mit einem geringeren Volumenstrom. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Verweildauer der Nod-Faktorlösung in der Adsorptionssäule unter diesen Versuchsbedingungen nicht von entscheidender Bedeutung für die Adsorption der Lipochitooligosaccharide an Amberlite® XAD-2 pract. ist. Dies wiederum bedeutet, dass für die Geschwindigkeit der Adsorption von Nod-Faktoren an Amberlite® XAD-2 pract. die Filmdiffusion also nur eine untergeordnete Rolle spielt. Daher lassen sich die Modelle von Ma, Karau und Yoshida (Ma *et al.*, 1996; Karau *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 1994), die für die Adsorption eines Substrates an große poröse sphärische Partikel mit einem Durchmesser von  $\geq 50 - 1.000 \mu\text{m}$  die Oberflächen- und Porendiffusion als geschwindigkeitsbestimmende Schritte bei Adsorption angenommen hatten, eher auf die Verhältnisse bei der Adsorption von Nod-Faktoren an Amberlite® XAD-2 pract. übertragen. Ma konnte dabei zeigen, dass der Transport für Substrate mit einer geringeren Affinität zum Adsorbens durch die Porendiffusion dominiert wird. Durch den höheren Volumenstrom findet je Zeiteinheit in dem oben gezeigten Versuch allerdings ein größerer Stoffaustausch in der Säule statt, so daß im gleichen Zeitraum mehr Nod-Faktor-Moleküle mit dem Harz in Kontakt kommen, was zu der beobachteten, schnelleren Abreicherung der Glykolipide in der Lösung führen würde. Zudem konnte bei einem Volumenstrom von  $V = 63 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  eine gleichmäßige Verteilung aller Partikel im Säulenraum beobachtet werden ( $h/h_0 = 3,3$ ), wogegen das Harzkugelbett bei einem Volumenstrom von  $V = 31,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  nur einen Teil der Säule ausfüllt, die Expansion nur bei einem Wert von  $h/h_0 = 2,5$  liegt, wie aus **Abbildung 3.5** zu entnehmen ist. Durch die Verteilung der Harzpartikel über den ganzen Säulenraum in Folge des höheren Volumenstrom wird die Anzahl theoretischer Böden in der Säule erhöht (Karau *et al.*, 1997), der Stoffaustausch damit optimiert und so kommt es zu einer schnelleren Abreicherung der Nod-Faktoren aus der Lösung.

### 4.3.4 Adsorption von Nod-Faktoren aus *S. meliloti* 1021pEK327-Kulturen in Gegenwart lipophiler Harzkugeln

Um die Adsorption der Nod-Faktoren in einen Fermentationsprozess zu integrieren, sollte geklärt werden, ob durch die Gegenwart der ausgewählten Adsorptionsmatrix Amberlite® XAD-2 pract. in der Kulturlösung das Wachstumsverhalten des Produktionsstamms für Nod-Faktoren, *S. meliloti* 1021pEK327, beeinflusst wird.

Wie aus **Abbildung 4.44, B** hervorgeht, wirkte sich die Gegenwart der lipophilen Harzkugeln im Melassemedium gravierend auf das Wachstum von *S. meliloti* 1021pEK327 aus. War der Verlauf der Wachstumskurven der vier Kulturen in den ersten 28 h noch nahezu identisch, knickten danach die Wachstumskurven der beiden Parallelkulturen von *S. meliloti* 1021pEK327 in 3 % Melassemedium mit den Harzkugeln ein und erreichten nach 93 h nur durchschnittlich 42 % der optischen Dichte ( $\text{OD}_{580}$ ), die von den *S. meliloti* 1021pEK327-Kulturen in Melassemedium ohne Amberlite® XAD-2 pract. nach 73,25 h gemessen wurden. Die optische Dichte ( $\text{OD}_{580}$ ) bei den Melasse-Kulturen mit den Harzkugeln lag außerdem um 17,1 % - 26,0 % unter den Werten, die mit *S. meliloti* 1021pEK327 in MMM mit dem Adsorbens nach 93 h erreicht wurden.

Das Wachstum von *S. meliloti* 1021pEK327 wurde in dem Mannitol-Minimalmedium durch die Gegenwart der Harzkugeln dagegen in deutlich geringem Umfang beeinflusst als bei dem Experiment mit Melassemedium, wie in **Abbildung 4.44, A** zu sehen ist. In den Kulturen mit MMM + Harzkugeln lagen die Werte der optische Dichte ( $OD_{580}$ ) maximal um 15 % unter den Daten, die in den Kulturen ohne die lipophilen Harzkugeln ermittelt wurden. Innerhalb der ersten 48 h zeigen die beiden Kulturen mit Amberlite® XAD-2 pract. sogar einen schnelleren Anstieg in der Wachstumskurve.



**Abbildung 4.44**

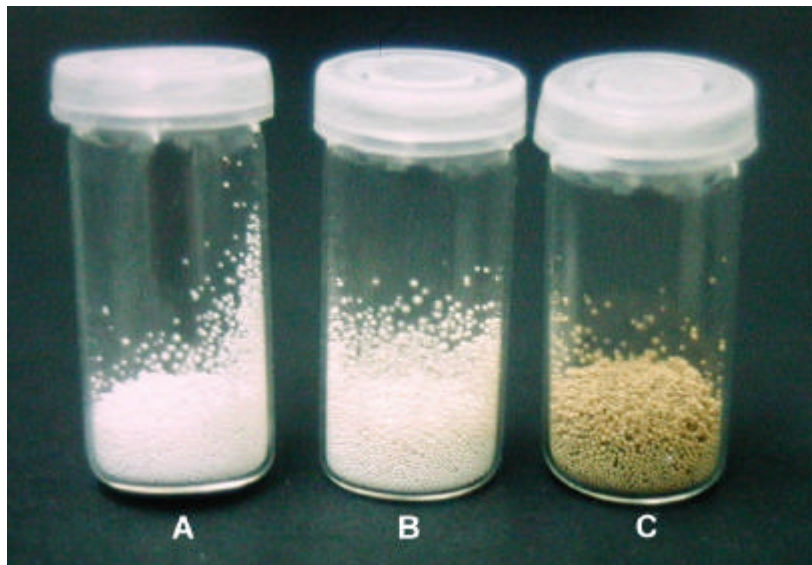
Vergleich des Wachstumsverhalten von *S. meliloti* 1021pEK327 in Mannitol-Minimal-Medium (Min, A) und in 3 % Melassemedium (Mel, B) ohne und in Gegenwart von  $40 \text{ gL}^{-1}$  lipophiler Harzkugeln. XAD: Amberlite® XAD-2 pract. Die Kultivierungen der Bodenbakterien erfolgten in 100 mL Medium auf dem Exzentrerschüttler bei einer Rotationsfrequenz von  $150 \text{ min}^{-1}$  in 300 mL Schüttelkolben mit Schikane. Die Harzkugeln wurden vor dem Animpfen mit der Vorkultur mit 70 %iger ethanolischer Lösung sterilisiert und unter der Reinraumwerkbank zum Medium gegeben.

### Zustand der eingesetzten Harzperlen in Abhängigkeit vom Medium

Nachdem in den vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, dass die Gegenwart des Adsorberharzes einen starken Effekt auf das Wachstum von *S. meliloti* 1021pEK327 in Melassemedium ausübt, wie in **Abbildung 4.44, B** gezeigt wurde, sollte überprüft werden, ob und in welchem Maß Bestandteile aus beiden Nährlösungen die Adsorption der Nod-Faktoren und die Aufreinigung der Nod-Faktoren beeinflussen können.

Bereits bei der ersten optischen Begutachtung von Amberlite® XAD-2 pract. Harzkugeln, die für 72 h Versuchsdauer in beiden verschiedenen Nährlösungen ohne Mikroorganismen geschüttelt wurden, war eine starke Braunfärbung der Harzkugeln in Melassesuspension festzustellen. Die sich anschließende Reinigung des Harzes mit Aceton und Wasser zur Regeneration der Harzkugeln führte nicht zur gewünschten Ablösung anhaftender Partikel und Farbstoffe von den Harzkugeln, die in Melassemedium geschüttelt worden waren, wie anhand der Verfärbung des Adsorbens in **Abbildung 4.45, C** zu sehen ist. Nur geringe farbliche Unterschiede sind zwischen dem Gläschen mit ungenutztem Adsorberharz in **Abbildung 4.45, A** und

den in MMM geschüttelten Harzkugeln, die in **Abbildung 4.45, B** gezeigt sind, zu erkennen.



**Abbildung 4.45**

Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 pract. Harzkugeln nach 72 h Einsatz in Wasser (A), Minimalmedium (B) und Melassemedium (C). 12 g Harzkugeln wurden zu je 300 mL Medium + 600 mg·L<sup>-1</sup> Streptomycin + 10 mg·L<sup>-1</sup> Tetrazyklin in einen Schüttelkolben gegeben und auf dem Exzentrerschüttler ohne Mikroorganismen für 72 h bei +28 °C und einer Frequenz von 150 min<sup>-1</sup> geschüttelt. Nach einer ersten optischen Begutachtung wurden die Harzkugeln anschließend 2 x mit 2 mL EtOH, 2 x mit 2 mL Aceton und 1x mit 5 mL H<sub>2</sub>O gewaschen.

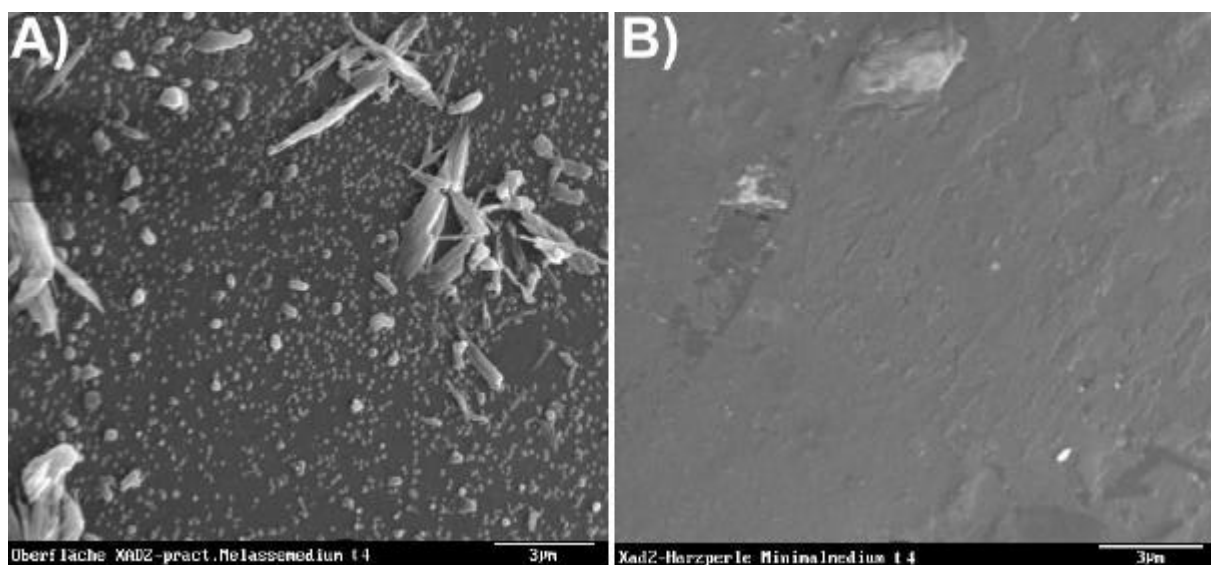
Im Hinblick auf die Anwendung des Adsorberharzes in einer Wirbelschichtkolonne, durch die eine Suspension **mit Bodenbakterien** gepumpt werden sollte, war auch die Kontrolle des Harzes aus den Schüttelkolbenexperimenten von Bedeutung, das in Gegenwart von Sinorhizobien-Bakterien mit den verschiedenen Nährlösungen geschüttelt wurde. Für die Untersuchung des Adsorbens wurden aus dem in **Abbildung 4.44** dargestellten Kultivierungsexperiment Proben mit Harzkugeln entnommen, die an den Harzkugeln anhaftenden Partikel mittels Glutaraldehyd fixiert und die sphärischen Partikel unter dem Rasterelektronenmikroskop untersucht.

Weder auf den Harzkugeln in MMM noch in Melassemedium waren Bakterienzellen zu erkennen, die sich im Verlauf der Kultivierung auf der Oberfläche des Adsorbens angelagert haben, wie die **Abbildungen 4.46, A+B** zeigen. Zum Vergleich kann die **Abbildung 2.2** von *Sinorhizobium meliloti* herangezogen werden. Trotz der zum Teil lipophilen Charakteristik von Oberflächenmolekülen bei den Bodenbakterien gab es nach diesen Bildern keinen Beleg für eine permanente Besiedelung der Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 pract. Harzkugeloberflächen durch die Bodenbakterien.

Diese Beobachtung ist von entscheidender Bedeutung für die Anwendung des Harzes zur direkten Extraktion von Nod-Faktoren aus Kulturlösungen mit *Sinorhizobium meliloti* Zellen. Denn eine Adsorption der Bakterien an die Oberfläche von Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 pract. würde den Aufreinigungsprozess der Nod-Faktoren um

ungewünschte ergänzende Verfahrensschritte zur notwendigen Ablösung der Bodenbakterien für die Aufarbeitung der Nod-Faktoren erweitern, bei denen auch ein Teil der anhaftenden Nod-Faktoren wieder desorbieren könnten.

Deutlich zu erkennen sind in **Abbildung 4.46, A** massive Ablagerungen wie Kristalle und Tröpfchen auf den Harzkugeloberflächen, die in Melassemedium eingesetzt wurden. Die Harzperlen, die aus dem Minimalmedium stammten und in **Abbildung 4.46, B** gezeigt sind, weisen dagegen nur geringe Anhaftungen auf. Da die in allen Experimenten dieser Arbeit eingesetzten Melassemedien vor der Sterilisation weder ultrafiltriert oder zentrifugiert, noch bestimmte Inhaltsstoffe durch Präzipitation vor der Verwendung als Medium ausgefällt wurden, wie es beim Einsatz von Melassen in anderen Produktionsverfahren teilweise üblich ist (Ghozlan, 1993), findet sich ein Großteil dieser Stoffe nach den vorliegenden Bildern jetzt auf den Oberflächen der Harzkugeln wieder. Diese Ablagerungen, die sich bei einer Elution mit verschiedenen Lösungsmitteln nicht rückstandsfrei von den Harzkugeln wieder ablösen ließen, wie die **Abbildung 4.45** zeigte, müssten bei einer Fermentation von *S. meliloti* 1021pEK327 zur Herstellung von Nod-Faktoren in Melassemedium in aufwendigen Prozessen vor der Fermentation aus dem Medium entfernt werden, was die Kosten für ein Produktionsverfahren der Glykolipide in Melassemedium erheblich steigern würde.



**Abbildung 4.46**

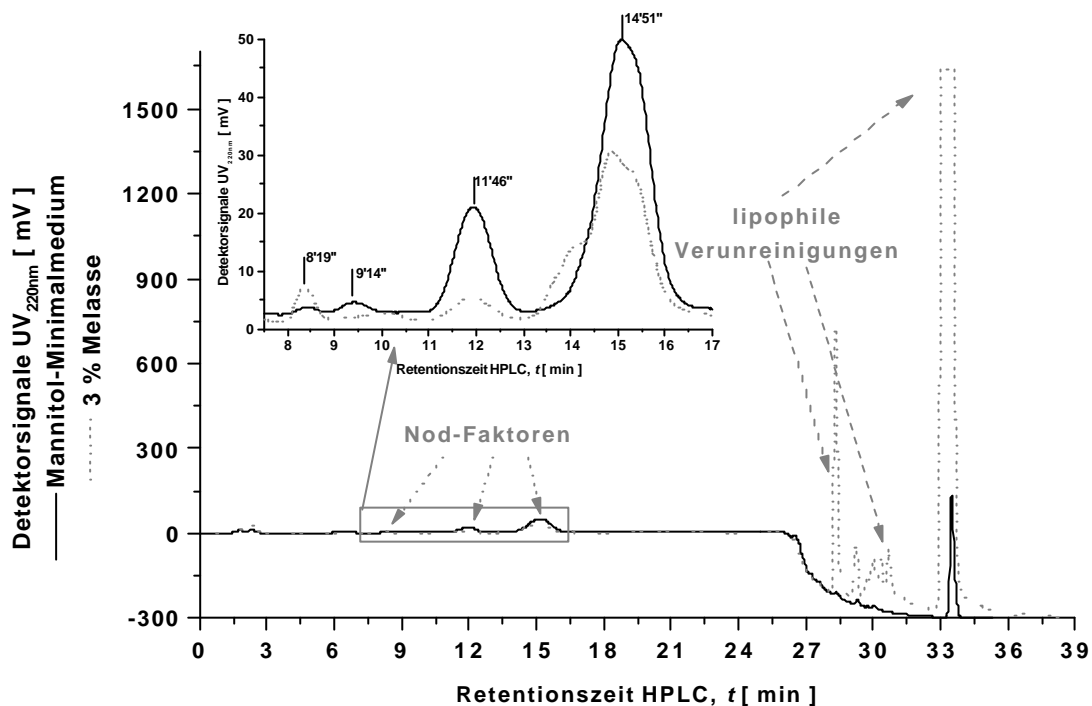
Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Oberflächen von Amberlite® XAD-2 pract. Harzkugeln nach 72 h Einsatz in Bakterienkulturlösungen von *S. meliloti* 1021pEK327 mit Melassemedium (A) und Minimalmedium (B). Der Abbildungsmaßstab (weißer Balken) entspricht einer Länge von 3 µm

### **Qualität des Nod-Faktor-Eluats in Abhängigkeit vom eingesetzten Medium**

Abschließend wurden die Eluate miteinander verglichen, die von den Adsorbenzien gewonnen wurden, welche in der Kultursuspension mit Bakterien geschüttelt wurden. Von Interesse war dabei die oben gestellte Frage, wie stark die Eluate von Amberlite® XAD-2 pract. Harzkugeln durch Substanzen der Nährlösungen und der Bakterien verunreinigt waren.



Bei den Verunreinigungen im Melassemedium, die von den Harzkugeln eluiert wurden, handelte es sich nach **Abbildung 4.47** überwiegend um stark lipophile Substanzen, die sich auf Grund ihrer deutlich längeren Retentionszeiten in einer Umkehrphasen-Chromatographie aber problemlos von den Nod-Faktoren abtrennen ließen. In dem Eluat des MMM fanden sich deutlich geringere Mengen an hydrophoben Reststoffen, wie aus den Chromatogrammen in **Abbildung 4.47** deutlich wird.



**Abbildung 4.47**

RP<sub>18</sub>-HPLC Analyse des Eluats von Amberlite® XAD-2 pract. Harzkugeln, eingesetzt in *S. meliloti* 1021pEK327 Bakterienkulturen mit verschiedenen Nährlösungen. Die Harzkugeln des Experiments aus **Abbildung 4.44** wurden von der Bakteriensuspension abgetrennt und in eine 20 mL Spritze mit einem am Spritzenboden befindlichen Polyamid-Gitter (Porengröße 150 µm) gefüllt. Die Harzperlen wurden mit 20 mL H<sub>2</sub>O gewaschen, anschließend 2 x mit 2 mL EtOH eluiert. Je 70 µL dieser Eluate aus den beiden Kulturansätzen wurden in der RP<sub>18</sub>-HPLC analysiert.

Aus der Kalkulation der Peakflächen im Bereich von 7,5 – 17 min beider Chromatogramme ergibt sich in den Eluaten nach 72 h eine Nod-Faktor-Konzentration von  $9,60 \cdot 10^{-1} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  für das Eluat der Harzperlen aus der Minimalmedium-Kultur. Die Konzentration der Nod-Faktoren, die im Eluat des im Melassemedium geschüttelten Harzes gefunden wurden, lag um 33,5 % ( $\rightarrow 6,38 \cdot 10^{-1} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) unter den Werten des Versuchsansatzes mit Minimalmedium.

Durch die Anhaftungen auf der Oberfläche der Harzkugeln, die in **Abbildung 4.46** zu sehen waren, wird in jedem Experiment mit Melassemedium die

Beladungskapazität von Amberlite® XAD-2 pract. zur Adsorption von Nod-Faktoren erheblich herabgesetzt, da die Ablagerungen die Bindungsstellen für Nod-Faktoren blockieren. Wie außerdem in **Abbildung 4.45** deutlich zu erkennen war, konnte nur ein Teil der Begleitstoffe, die in dem Melassemedium enthalten sind, durch die Elution des Harzes mit Ethanol wieder von dem Adsorbens abgelöst werden. Da das verwendete Adsorberharz im Aufkonzentrierungsprozess von Nod-Faktoren aus prozessökonomischen Gründen aber mehrfach verwendet werden soll, eignet sich Melasse aufgrund der Resultate dieses Experiments nicht als Basissubstanz für ein Medium zur Produktion von Nod-Faktoren. Dazu kommt, dass in den Experimenten im Melassemedium eine deutlich geringere Menge an Nod-Faktoren isoliert werden konnte.

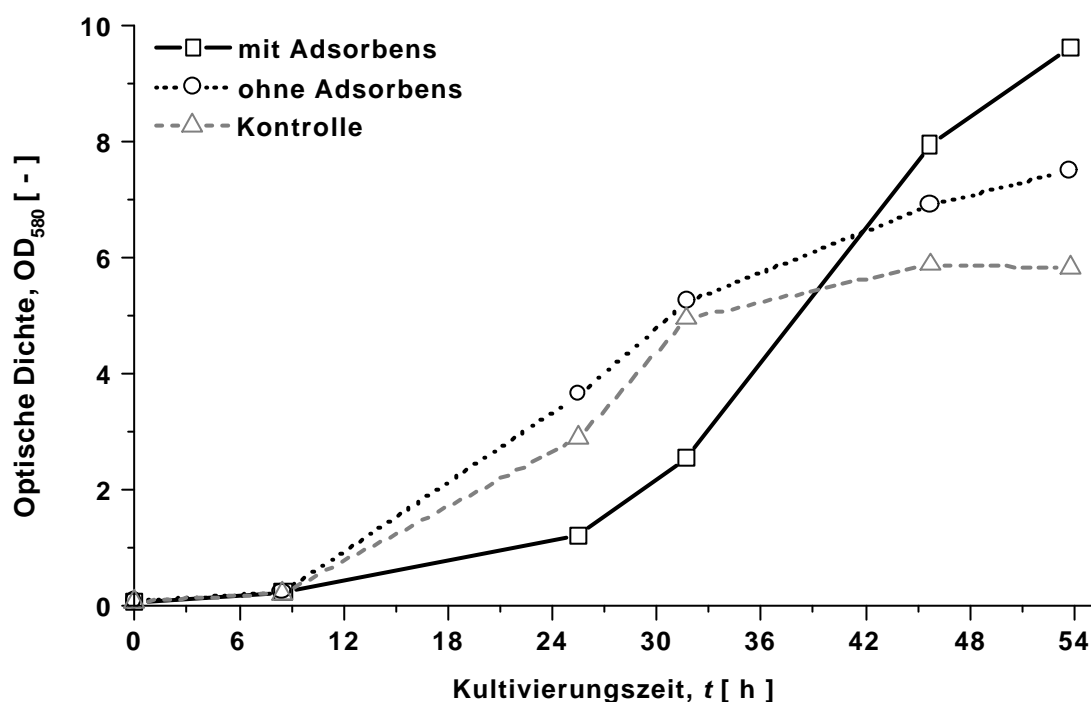
Aus den Resultaten den Versuchen mit Mannitol-Minimalmedium und Melassemedium ist abzuleiten, dass die durch die Gegenwart der lipophilen Harzkugeln in einer Kultursuspension auf Basis von MMM das Wachstum von *S. meliloti* 1021pEK327 nur in einem geringen Maß beeinträchtigt wurde. Eine Melasse-Nährlösung aus unbehandelter Zuckerrübenmelasse ist als Produktionsmedium trotz ihres erheblichen Kostenvorteils und der einfachen Herstellungsweise gegenüber dem vollsynthetischen Medium nicht für die Gewinnung von Nod-Faktoren geeignet. Eine notwendige Vorbehandlung des Melassemedium wie bei Inamdar beschrieben (Inamdar, 1994) würde die Kosten für die Nährlösung erheblich verteuern. Die geringere Ausbeute an Nod-Faktoren in den Schüttelkolbenexperimenten, die massiven und zum Teil permanent anhaftenden Ablagerungen von Mediumbestandteilen an das Adsorberharz, die deutlich geringere Biomasseausbeute an Nod-Faktoren aus *S. meliloti* 1021pEK327 im Melassemedium mit Amberlite® XAD-2 pract. und die große Menge an lipophilen Verunreinigungen im Eluat von den Adsorberharzkugeln in Melassemedium sind in ihrer Summe alle Faktoren, die gegen Herstellung von Nod-Faktoren durch *S. meliloti* 1021pEK327 im Melassemedium sprechen.

#### ***Kultivierung von S. meliloti 1021pEK327 unter Einsatz einer integrierten Adsorptionskolonne***

In Schüttelkolbenexperimenten sollte das grundlegende Verfahren zur Extraktion von Nod-Faktoren aus einer Bodenbakterien enthaltenden Suspension mittels einer mit Adsorberharz gefüllter Adsorptionssäule getestet werden. Wichtige Aspekte waren dabei der Einfluss des Umpumpprozesses auf das Wachstum von *S. meliloti* 1021pEK327 und die Effektivität der Nod-Faktor-Adsorption an die lipophilen Harzkugeln.

Im Vergleich zu der Kontrollkultur (C) und der Kultur mit der durchströmten Leersäule (O) verblieben die Mikroorganismen in dem Ansatz mit der Harz gefüllten Säule (X) länger in der Anpassungsphase, wie die **Abbildung 4.48** zeigt. Das Umpumpen der Kultursuspension durch eine leere Säule hatte nach dem Resultat dieses Experiments innerhalb der ersten 31,75 h keinen signifikanten Einfluss auf den Wachstumsverlauf von *S. meliloti* 1021pEK327, wie der Vergleich der OD<sub>580</sub>-Werte von den Kolben O und C in **Abbildung 4.48** zeigt. Der Endwert der optischen Dichte des Kolbens O (OD<sub>580</sub> = 7,50) lag nach 54 h allerdings um 28,9 % über den Werten im Schüttelkolben C (OD<sub>580</sub> = 5,82).

Die Ursache für eine verlängerte Anpassungsphase der Kultur mit der Harz gefüllten Säule könnte in einer geringen Affinität von Bestandteilen der Nährlösung wie den Vitaminen, dem Na-Glutamat oder auch dem Mannitol zum lipophilen Harz begründet sein. Selbst eine nur schwache Wechselwirkung mit den Harzperlen würde die Konzentration dieser Substanzen im Reservoir zeitweise erniedrigen und so deren Verfügbarkeit für die Bodenbakterien herabsetzen. Dies kann zu der beobachteten, geringeren spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit im Kolben X von  $\mu = 0,093 \text{ h}^{-1}$  während der exponentiellen Phase im Vergleich zu den Kolben ohne Harz in der Säule (O;  $\mu = 0,134 \cdot \text{h}^{-1}$ ) und der Kontrolle (C;  $\mu = 0,134 \text{ h}^{-1}$ ) führen, wie Streit bei der Kultivierung von *Sinorhizobium meliloti* ohne Biotin bereits nachweisen konnte (Streit *et al.*, 1996).



**Abbildung 4.48**

Wachstumsverhalten des Stamms *S. meliloti* 1021pEK327 im Schüttelkolben mit durchströmter Harz gefüllter Adsorptionssäule (X), mit durchströmter Leersäule (O) und einem Kontrollkolben ohne Durchströmung der Säule (C) in MMM. Die Anzucht der Vorkultur aus 1 mL einer aufgetauten -80 °C-Glycerinkultur von *S. meliloti* 1021pEK327 erfolgte im Glasröhrchen mit 15 mL MMM + 7,5 mg·L<sup>-1</sup> Tet ü.N. bei +28 °C.

Die signifikant höheren Endwerte in der optischen Dichte (OD<sub>580</sub>) des Ansatzes mit Amberlite® XAD-2 pract. (X) im Vergleich zum Kontrollansatz C, können zum einen mit der Affinität des Antibiotikums Tetrazyklin zu lipophilen Adsorberharzen erklärt werden, die Khan nachweisen konnte (Khan *et al.*, 1990). Die energetisch aufwendige Synthese der Tetrazyklin-Resistenzgene könnte bei den Bakterien in den Schüttelkolben mit Amberlite® XAD-2 pract. aufgrund einer geringeren Tetrazyklin-

konzentration im Medium in Folge der Adsorption an das Harz im Vergleich zu den anderen Kolben reduziert sein. Die dadurch eingesparten Energieäquivalente fließen in den Primärstoffwechsel der Bakterienzellen ein und resultieren in einer höheren Biomassekonzentration in den Kolben mit Amberlite® XAD-2 pract.

Außerdem ist davon auszugehen, dass es durch den auftretenden hydrodynamischen Stress in den Ansätzen, wo die Kulturflüssigkeit durch die Säulen gepumpt wurde, zu einer verstärkten Synthese von Exopolysacchariden durch *S. meliloti* 1021pEK327 kam, was in dieser Arbeit bei den Fermentationen mit einem Adsorptions-Bypass (4.3.20) und bei Harscoat (Harscoat *et al.*, 1999) in Folge der Erhöhung der Rührerdrehfrequenz in Satzprozessen beobachtet wurde. Die Exopolysaccharide könnten den Bodenbakterien ebenso wie beim Cyanobakterium *Anabaena spec.* ATCC 33047 dazu dienen, die Schersensitivität der Zellen herabzusetzen (Moreno *et al.*, 2000). Die von *S. meliloti* 1021pEK327 zum Schutz verstärkter synthetisierter Exopolysaccharide im Medium verschieben die Messungen der optischen Dichte ( $OD_{580}$ ) zu höheren Werten in den Kolben O und X, auch wenn keine Zunahme an Bakterienzellen in der Suspension stattfindet.

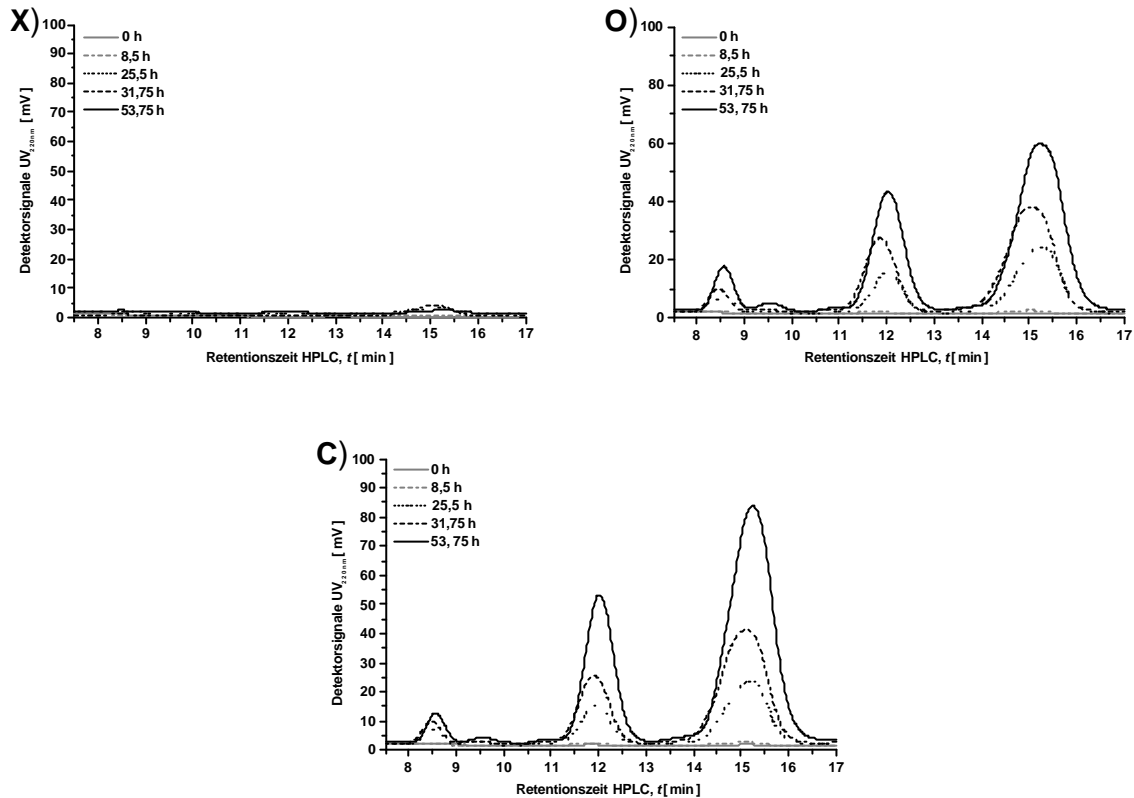
Die Harzkugeln in der Säule von Kolben X stellen einen weiteren Stressfaktor für die Sinorhizobien dar, weil sie in der Wirbelschicht auf die Mikroorganismen zusätzliche mechanische Kräfte ausüben. Die einwirkenden Kräfte führen aufgrund ihrer Dimension zwar nicht wie bei tierischen Zellkulturen zum Zerreißen der Organismen (Henzler *et al.*, 2000), da die Bodenbakterien eine die Zelle stabilisierende Zellwand besitzen. Durch den zusätzlichen Stressfaktor „Harzkugeln“ könnte in dem Kolben X die Synthese der Exopolysaccharide bei den Bodenbakterien weiter verstärkt werden und, wie in **Abbildung 4.48** gezeigt, zu der deutlich höheren optischen Dichte ( $OD_{580}$ ) am Ende des Experiments beitragen. Die Viskosität der Kulturüberstände wurde zwar nicht bestimmt, aber die Überstände der Ansätze X und O waren deutlich zähflüssiger im Gegensatz zur Kontrolle C, ein Hinweis auf die verstärkte EPS-Synthese.

### **Analyse der zellfreien Überstände aus Kultivierungen mit und ohne integrierter Adsorptionskolonne**

Anhand der Kulturüberstände sollte die Nod-Faktoren-Synthese der Sinorhizobien in der Kontrollkultur (C) und dem Ansatz mit der Leersäule (O) verfolgt und der Gehalt an LCOS in der Bakteriensuspension des Schüttelkolbenansatzes mit der Amberlite® XAD-2 pract. gefüllten Säule (X) kontrollieren werden. Dazu wurden Proben von je 1 mL zu den Zeitpunkten  $t = 0$  h, 8,5 h, 25,5 h, 31,75 h und 53,75 h unter der Reinraumwerkbank den Kolben X, O und C steril entnommen, für 10 min bei  $14.000 \text{ min}^{-1}$  zentrifugiert und die Überstände anschließend in der analytischen RP<sub>18</sub>-HPLC chromatographisch untersucht.

Während im Chromatogramm der Probe  $t = 8,5$  h in der Kultur ohne Adsorptions-Kolonne in **Abbildung 4.49, C** und dem Ansatz mit der Leersäule in **Abbildung 4.49, O** bereits erste Nod-Faktor-Peaks erschienen, konnten zum gleichen Zeitpunkt in der Probe aus dem Versuchsansatz mit Amberlite® XAD-2 pract.-Wirbelschicht keine Nod-Faktoren nachgewiesen werden, wie die **Abbildung 4.49, X** zeigt. Die Größen der Nod-Faktor-Peaks erreichten nach **Abbildung 4.49, C** in der Probe 53,75 h ihr Maximum, während zur gleichen Zeit in dem zellfreien Überstand

der Probe X (**Abbildung 4.49, X**) nach  $t = 53,75$  h bei 12 min und 15 min nur minimale Peaks zu erkennen waren. Die Chromatogramme der Proben aus dem Kolben O (**Abbildung 4.49, O**) entsprachen dem Muster der **Abbildung 4.49, C**, die Peakflächen sind allerdings signifikant kleiner.

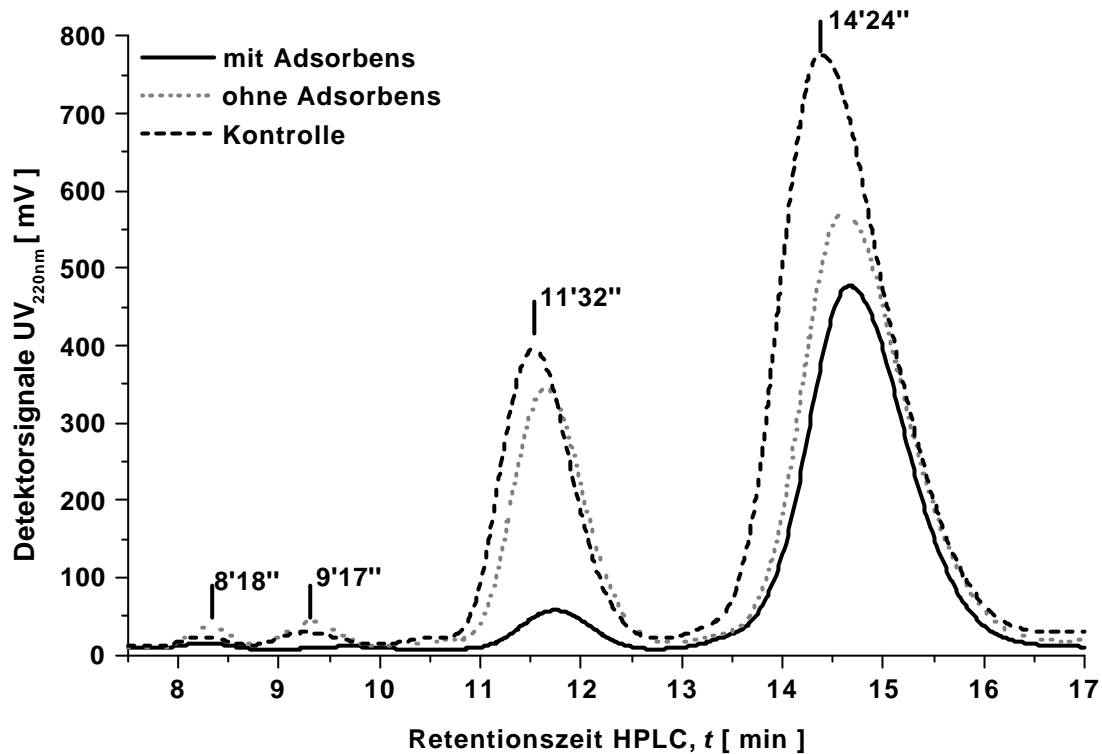


**Abbildung 4.49** RP<sub>18</sub>-HPLC-Analysen von zellfreien Überständen aus der Kultivierung von *S. meliloti* 1021pEK327 ohne Adsorptionssäule (C), mit einer Leersäule (O) und mit einer Harz gefüllten Adsorptionskolonne (X).

Eine Elution der Harzperlen aus dem Experiment mit integrierter Adsorptionskolonne (X) und die Aufarbeitung der zellfreien Überstände aus der Kontrollkultur (C) und der Kultur mit der leeren Säule (O) sollten zeigen, ob und wieviel Nod-Faktoren von den Bakterien in der Kultur mit Adsorptionskolonne im Vergleich zur Kontrollkultur und zum Ansatz mit der Leersäule gebildet wurden. Von den EtOH-Eluaten der Harzperlen aller drei Ansätze wurden deshalb je 700  $\mu\text{L}$  für 5 min bei  $14.000 \text{ min}^{-1}$  zentrifugiert und dann mittels RP<sub>18</sub>-Chromatographie analysiert.

Das Chromatogramm des Eluats aus Kolben X (mit Adsorbens) in **Abbildung 4.50** belegt, dass auch in der Kultur mit integrierter Adsorptionskolonne Nod-Faktoren von *S. meliloti* 1021pEK327 gebildet wurden, diese aber während der Kultivierung, wie **Abbildung 4.49, X** zeigte, nahezu vollständig an den Amberlite® XAD-2 pract. Harzkugeln adsorbierten. Erst durch die Elution mit EtOH konnten die LCOS von der Adsorptionsmatrix wieder abgelöst werden. In dem Schüttelkolben mit integrierter Adsorptionskolonne konnte dabei ein deutlich höherer Anteil von Nod-

Faktoren mit einer hydrophoberen Molekülcharakteristik (längere Retentionszeiten) im Eluat nachgewiesen werden als in der Kontrollkultur, wenn die einzelnen Peakflächen der Chromatogramme in **Abbildung 4.50** miteinander verglichen werden.



**Abbildung 4.50** RP<sub>18</sub>-HPLC-Diagramme des EtOH-Eluates aus dem Experiment zur integrierten Adsorption von Nod-Faktoren im Schüttelkolben (mit Adsorbens) und den parallel laufenden Kontrollkulturen (ohne Adsorbens und Kontrolle).

Aus dem Addition der Peakflächensummen im Bereich von 7,5 bis 17 min ergab sich eine um 57,1 % geringere Konzentration an LCOS im Eluat ( $0,78 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1} \text{ NF}$ ) für den Ansatz mit der integrierten Adsorptionskolonne X als in der Kontrollkultur mit  $1,82 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1} \text{ NF}$ . Auch die Konzentration der Nod-Faktoren aus dem Eluat des Ansatzes mit der durchströmten Leersäule O wies mit  $1,26 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1} \text{ NF}$  ( $\cong 69,2 \%$  von C) eine signifikant niedrigere Konzentration an den Glykolipiden auf.

Für die Aufarbeitung von unbehandelten Fermentationsbrühen nach Beendigung von Kultivierungsprozessen wurden Wirbelschichtkolonnen mit Adsorberharzen zur Aufarbeitung verschiedenster Produkte wie Bacteriozinen oder rekombinanten Proteinen bereits eingesetzt (Callewaert *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2000). Hier konnte erstmals gezeigt werden, dass es auch möglich ist, aus einer Kulturlösung mit lebenden Bodenbakterien die von ihnen synthetisierten und sekretierten Signalmoleküle in der Wirbelschicht an ein lipophiles Harz zu adsorbieren.

Ob durch dieses Verfahren die Viabilität der Mikroorganismen durch das Umpumpen der Bakteriensuspension in diesem Experiment beeinflusst wurde, konnte allein anhand des Verlaufs der optischen Dichte ( $OD_{580}$ ) in **Abbildung 4.48** nicht eindeutig belegt werden. Die Biotrockenmassebestimmungen in Fermentationsprozessen von *S. meliloti* 1021pEK327 mit integrierter Wirbelschichtkolonne unter **4.3.21** haben aber gezeigt, dass der Verlauf der Biomassekonzentration durch den Betrieb der Adsorptionskolonne tatsächlich in einem geringen Maß beeinflusst wurde. Die Ausbeute der Nod-Faktoren reduzierte sich, wie es die Ergebnisse der Kolben X und O zeigten, sowohl durch den Pumpprozess als auch zusätzlich durch die Gegenwart der Harzkugeln, bei dieser Versuchsdurchführung um bis zu 57 %. Da die Synthese der Nod-Faktoren im Stamm *S. meliloti* 1021pEK327 von der Biomassekonzentration im Medium abhängig ist (Kohring *et al.*, 1997), ist es vorstellbar, dass in den Ansätzen X und O auf Grund einer geringeren Biomassekonzentration die Menge an Nod-Faktoren in der Lösung niedriger war als im Kontrollansatz C.

Im Hinblick auf den Einsatz einer Harz gefüllten Adsorptionskolonne bei Fermentationen ergaben sich aus den Resultaten dieser Versuchsreihe deshalb folgende Abänderungen für die in-Prozess-Adsorption von Nod-Faktoren aus einer Fermentationslösung im 20 L Pilot-Maßstab:

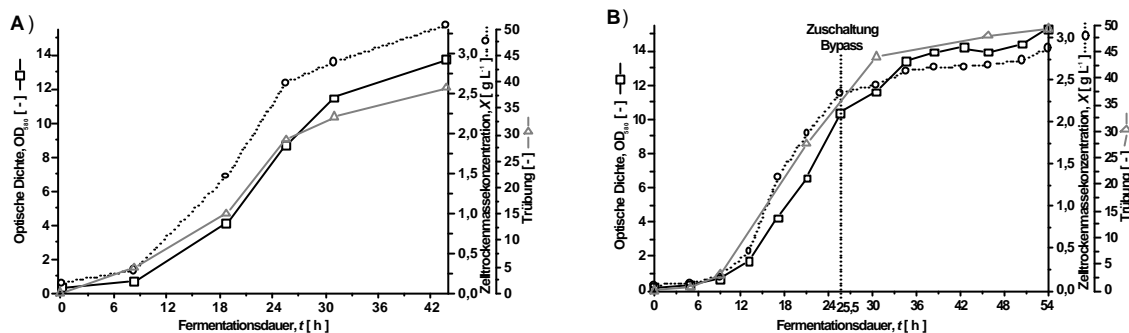
- Die Zuschaltung der Adsorptionskolonne erfolgte bei den nachfolgend gezeigten Fermentationsprozessen von *S. meliloti* 1021pEK327 im Gegensatz zu den Experimenten im Schüttelkolbenkulturen erst im späten Stadium der exponentiellen Phase eines Satzprozesses nach frühestens 21 h – 25 h, um ein stressfreies Wachstum der Bodenbakterien in der Anfangsphase der Fermentation zu gewährleisten und somit eine hohe Ausbeute an Nod-Faktoren zu erhalten.
- In dem verwendeten System wurde mit einer um 25 % geringeren linearen Strömungsgeschwindigkeit ( $v_L$ ) gearbeitet. Diese Maßnahme sollte unter anderem dazu beitragen, den hydrodynamischen Stress (Joshi *et al.*, 1996), der auf die Bodenbakterien beim Durchströmen der Harz gefüllten Adsorptionskolonne einwirkte, zu reduzieren.

### 4.3.5 Fermentationen im 20 L-Maßstab zur Gewinnung von Nodulations-Faktoren

#### Die *in-situ* Trübungsmessung

Die *in-situ* Trübungsmessung der Fermentationsbrühen von *S. meliloti* 1021pEK327 sollte als Mittel zur *on-line*-Überwachung des Wachstums der Bodenbakterien in Satzprozessen mit und ohne integrierte Adsorptionskolonne eingesetzt. Anhand der Messdaten der Trübungssonde sollte bei Fermentationen mit integriertem Adsorptionskreislauf der Startzeitpunkt der Nod-Faktor-Extraktion mittels Harz gefüllter Wirbelschicht festgelegt werden. Um die Qualität dieser Messmethode bei der Kultivierung von *Sinorhizobium meliloti* beurteilen zu können, wurde sie mit der Messung der optischen Dichte ( $OD_{580}$ ) und der Zelltrockenmassebestimmung (ZTM), die parallel durchgeführt wurden, verglichen.

Die Kurvenverläufe von optischer Dichte ( $OD_{580}$ ), Zelltrockenmassekonzentration (ZTM) und Infrarot-Streulicht-Trübungsmessung (940 nm) wiesen sowohl im Satzprozess ohne Bypass als auch in der Kultivierung mit Zuschaltung des Adsorptionskreislaufs über die gesamte Fermentationsdauer einen sehr hohen Korrelationsgrad auf, wie die **Abbildungen 4.51, A + B** zeigen. Dabei gab es in Bypass-Fermentationen ein höheres Maß an Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Messmethoden (s. **Abbildung 4.51, B**), was auf die niedrigere Rührerdrehzahl und den geringeren Lufteintrag zurückzuführen ist. Dies ermöglichte in diesen Fermentationen eine größere Spreizung des Messbereichs beim Trübungsmessgerät und erlaubte damit auch eine präzisere Messung in dem Bereich mit hoher Biomassekonzentration im Fermenter.



**Abbildung 4.51**

Vergleich von optischer Dichte ( $OD_{580}$ ), Zelltrockenmassekonzentration (ZTM) und Trübung bei der Kultivierung von *S. meliloti* 1021pEK327 im herkömmlichen Satzbetrieb (A) und in einem Satzprozess mit zugeschalteter Adsorptionsssäule (Bypass, B)

Bei den hier dargestellten Experimenten erfolgte die Datenaufnahme von der Trübungssonde aufgrund des eingesetzten Gerätetyps von Aquasant nicht automatisch. Eine Erfassung der Sondensignale könnte alle fünf Minuten über einen Prozessrechner erfolgen, wenn ein Messumformer mit einer automatischen Umschaltung des Messspektrums verwendet würde. Damit entfielen die beim Aquasant-Messsignalgeber noch notwendige manuelle Nachjustierung des Verstärkerbereichs. Ein ausschließliches Arbeiten nur im unempfindlichsten Verstärkungsbereich der verwendeten Trübungsmessers lieferte für den Anfangsbereich ( $t = 0 - 14$  h) der Fermentation nur sehr unpräzise Daten über den Wachstumsverlauf der Bodenbakterienkultur.

Nach den in **Abbildung 4.51** gezeigten Resultaten können die Wachstumsverläufe von *S. meliloti* 1021pEK327-Satzprozessen mit und ohne integrierter Adsorptionskolonne zur Produktion von Nod-Faktoren in Echtzeit durch die Infrarot-Streulicht-Trübungsmessung überwacht werden. Die von der Trübungssonde erfassten Messwerte liefern hinreichend genaue Daten zur Kontrolle der laufenden Fermentationen, wie der Vergleich mit den anderen genutzten Methoden zur Kontrolle der Biomasse zeigte. Dies war vor allem deshalb möglich, weil die Fermentationen bei konstanter Rührerdrehfrequenz und bei einem konstanten Lufteintrag durchgeführt wurden. Damit gab es keine Störeinflüsse im Verlauf der Satzprozesse,



die in der Regel durch die Variation dieser Parameter (Gregory *et al.*, 1997) auftreten. In Satzprozessen mit anschließender Aufkonzentrierung der Nod-Faktoren an lipophilen Harzen ist so über die Verfolgung des Trübungssignals während einer Fermentation der Abbruch der Kultivierung zum Zeitpunkt maximaler Produktivität nach **Abbildung 2.14** möglich, da die Nod-Faktoren-Synthese im Stamm *S. meliloti* 1021pEK327 in diesen Satzprozessen ohne Adsorptionskolonne wachstumsassoziiert erfolgte (Kohring *et al.*, 1997). In den Fermentationen mit integrierter Aufkonzentrierung der Nod-Faktoren an lipophilen Harzperlen konnte anhand der Daten von der Trübungsmessung in der Fermentationslösung der Zeitpunkt der späten exponentiellen Phase festgelegt werden, an dem eine Zuschaltung des Adsorptionskreislaufs erfolgte.

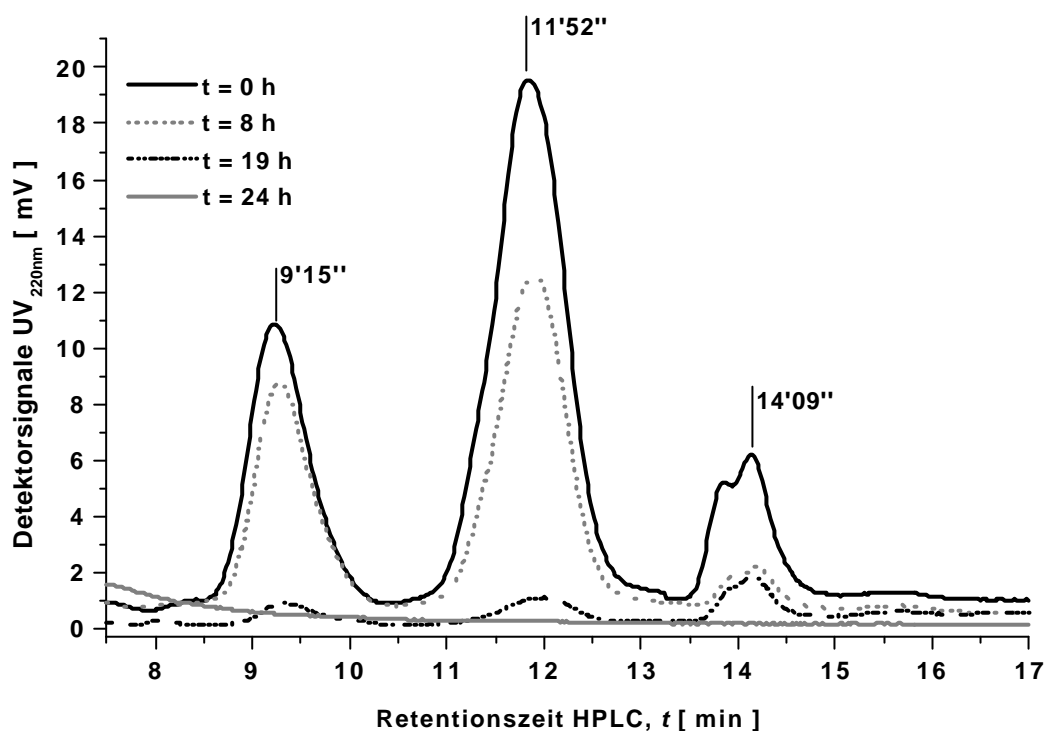
### **Aufreinigung der Nod-Faktoren aus dem Fermentationsüberstand eines Satzprozesses**

Vor dem Einsatz der Adsorptionskolonne aus **Abbildung 3.11** in einem Fermentationsprozess wurden zu Test- und Vergleichszwecken die Signalmoleküle von *S. meliloti* 1021pEK327 aus 18 L eines ultrafiltrierten Fermentationsüberstand, die in einem herkömmlichen Satzprozess gewonnen wurden, aufgereinigt, um die Funktionsweise der Wirbelschicht zu überprüfen und damit die Betriebsparameter für den Einsatz während einer Fermentation mit Zuschaltung des Adsorptionsbypass festzulegen. Die Adsorptionskolonne wurde mit derselben Charge von 200 g Amberlite® XAD-2 pract. Harzkugeln gefüllt, die auch in den nachfolgend durchgeführten Bypass-Verfahren verwendet wurde. Der Fermentationsüberstandes wurden 48 h nach Fermentationsende mit einem Volumenstrom von  $V = 100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  für 24 h bei Raumtemperatur durch die mit Harz gefüllte Adsorptionssäule gepumpt.

Wie die Verläufe der Chromatogramme in **Abbildung 4.52** zeigen, wurde eine vollständige Abreicherung der Nod-Faktoren aus der ultrafiltrierten Fermentationslösung mit diesem Adsorptionsverfahren nach 24 h Prozesszeit erreicht. Werden die Peakflächen im Bereich von 7,5 - 17 min addiert, so ergibt sich zum Startzeitpunkt eine Gesamtpeakfläche von 1.788 mVs, was einer Konzentration von  $3,78 \cdot 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  NF entspricht. Bei der Probe nach  $t = 8 \text{ h}$  ist die Konzentration der LCOS auf einen Wert von  $2,09 \cdot 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  NF reduziert. Dies bedeutet, dass zu diesem Zeitpunkt noch 55,34 % der Nod-Faktoren in der Lösung nachgewiesen werden konnten. Nach  $t = 19 \text{ h}$  sind noch 6,6 %,  $2,50 \cdot 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  NF, der Anfangskonzentration an LCOS in dem Fermentationsüberstand enthalten. Erst nach  $t = 24 \text{ h}$  waren mit der analytischen RP<sub>18</sub>-HPLC in den Proben aus dem Aufarbeitungsprozess keine Nod-Faktoren mehr nachweisbar.

Im Vergleich zu den bisher eingesetzten gerührten Systemen, bei dem die Harzkugeln direkt zu dem Fermentationsüberstand gegeben wurden, erforderte die Adsorption der Nod-Faktoren aus dem filtrierten Überstand an die Harzperlen in der Adsorptionskolonne einen deutlich höheren Zeitaufwand bis zur vollständigen Abreicherung der LCOS in der Lösung. Konnten in gerührten Systemen die Nod-Faktoren innerhalb von 4 h – 5 h komplett aus einem Fermentationsüberstand adsorbiert werden (Ehrhardt *et al.*, 1995; Kohring *et al.*, 1997), verlängerte sich bei dieser Methode der Aufarbeitung von LCOS die Verfahrenszeit um den Faktor 4,8 - 6. In der verwendeten Glassäule konnten auf Grund ihres geringen Volumens von 567 mL nur maximal 200 g an feuchtem Amberlite® XAD-2 pract. eingefüllt

werden, was bei einem aufzuarbeitenden Flüssigkeitsvolumen von 18 L einer Harzkonzentration von  $11,11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  entspricht. Mit einem Volumenstrom von  $V = 100 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  ( $\tau_{\text{Säule}} = 11,34 \text{ min}$ ) dauerte es damit 3 h, bis das gesamte Flüssigkeitsvolumen von 18 L einmal durch die Säule gefördert worden war. Bei einer Verfahrenszeit von 24 h, die bis zur vollständigen Adsorption der Nod-Faktoren an das Harz notwendig war, wurde der Fermentationsüberstand somit nur 8 x durch die Adsorptionskolonne gepumpt. Dennoch erfolgte die Abreicherung der Nod-Faktoren schneller, als bei Experimenten mit einer vergleichbaren Konzentrationen an LCOS im Medium, die im Schüttelkolben durchgeführt wurden, wie unter 4.3.12 in der **Abbildung 4.43** zu sehen ist.



**Abbildung 4.52**

Verlauf der Adsorption von Nod-Faktoren aus einem ultrafiltrierten Fermentationsüberstand eines Satzprozesses an Amberlite® XAD-2 pract. Harzkugeln. Das Chromatogramm zeigt die Nod-Faktoren Peaks im Bereich von 7,5 bis 17 min.

In den Untersuchungen zur Adsorptionskinetik der Nod-Faktoren an Amberlite® XAD-2 pract. unter Punkt 4.3.3 konnte die Geschwindigkeit der Adsorption von LCOS an das Harz in einer Wirbelschicht durch die Menge des in der Säule befindlichen Harzes beschleunigt werden. Diese Bedingungen aus dem Schüttelkolbenexperimenten ließen sich auf Grund der technischen Gegebenheiten nicht auf den Pilotmaßstab mit einem Arbeitsvolumen von 18 L übertragen. Eine schnellere Adsorption der Nod-Faktoren aus einem Fermentationsüberstand im 18 L Maßstab

wäre nur mit einer größer dimensionierten Glassäule, die mit einer größeren Menge an Amberlite® XAD-2 pract. befüllt ist, realisierbar.

Der bei der Aufreinigung des Fermentationsüberstandes eingestellte Volumenstrom ( $V$ ) von  $100 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  führte nach ca. 0,5 h zu Ablagerungen der kleineren und damit leichteren Harzpartikel aus der polydispersen Schüttung von Amberlite® XAD-2 pract. am Auslassgitter der Säule. Dieser Effekt erzeugte in der Glassäule einen Druckanstieg von  $\geq 0,4$  bar. Bei ersten Fermentationen mit einem Adsorptionsbypass führte dieses Bett der kleineren Harzkugeln, welches sich am Säulenausgang bildete, auch zur Anreicherung der Mikroorganismen in den Bettzwischenräumen, so dass die Dichte der Bodenbakterien im Fermenter erheblich herabgesetzt wurde.

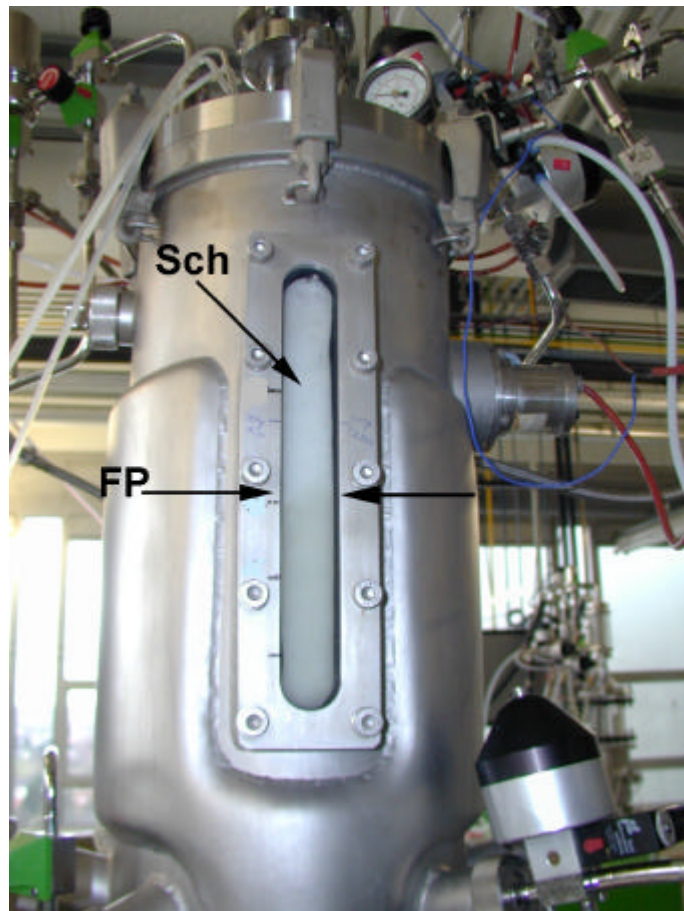
Aus diesen Gründen musste in den Fermentationen mit Bypass-Adsorption der Nod-Faktoren der Volumenstrom reduziert werden, um eine maximale Bettexpansion ohne Verstopfung der Glassäule und damit ein Zerplatzen der Säule zu verhindern, die nur bis zu einem Betriebsdruck von max. 1,5 bar eingesetzt werden konnte. Die Einstellung des Volumenstroms von  $V = 50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  garantierte eine maximal mögliche Expansion der Harzkugelschüttung von  $h / h_0 = 2,18$ , ohne eine Ansammlung der kleineren Harzkugeln am Auslassgitter zu erzeugen. Mit diesem Volumenstrom konnte eine Verstopfung der Adsorptionskolonne am Säulenausgang und eine daraus resultierende Abreicherung der Bodenbakterien aus dem Fermenter während des gesamten Satzprozesses effizient verhindert werden.

### **Satzkultivierungen mit integriertem Adsorptionskreislauf**

In den ersten durchgeführten Satzfermentationen von *S. meliloti* 1021pEK327 in MMM mit integrierter Adsorptionskolonne setzte in der Regel nach ca. 17 - 19 h eine starke Schaumbildung ein, wie die **Abbildung 4.53** zeigt. Die Ursache für den Schaum ist auf die Bildung von Mizellen (Pfüller, 1986) zurückzuführen. Auf Grund der amphipathischen Molekülcharakteristik der LCOS ist eine Dispersion aus der in den Fermenter eingeblasenen Luft mit den sekretierten Nod-Faktoren der Bodenbakterien und / oder anderen tensidartigen Molekülen (Phospholipide, Proteine) der Mikroorganismen durchaus vorstellbar. Ein Beleg hierfür ist eine beobachtete Schaumbildung (Viesturs *et al.*, 1982) bei der Solubilisierung von aufgereinigten Nod-Faktoren in  $\text{H}_2\text{O}$ , die durch starkes Schütteln erzeugt wird. Mit einer Konzentration von  $4 \cdot 10^{-5} \text{ M} - 5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  an Nod-Faktoren in der Fermentationslösung nach ca. 20 h Prozessdauer in Satzprozessen mit *S. meliloti* 1021pEK327 und bei einer angenommenen mittleren Molmasse der LCOS von 1.140 g je Mol liegt die Konzentration der LCOS damit z.B. signifikant über der kritischen Mizellbildungskonzentration ( $c_{mc}$ ) nichtionischer Schaumbildner wie Triton N-100 ( $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ), Tween-80 ( $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ) oder der von zwitterionischen Tensiden wie Phospholipiden ( $2 - 20 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ) in Wasser (Pfüller, 1986) und könnte für die starke Schaumbildung verantwortlich sein.

In den Fermentationen mit einem Adsorptions-Bypass konnten im Gegensatz zu den herkömmlichen Satzprozessen keine Antischaummittel verwendet werden, da alle getesteten Antischaummittel eine sehr hohe Affinität zu dem ausgewählten Adsorberharz aufwiesen. Durch die Benetzung der Adsorberoberfläche mit den Antischaumreagenzien wurde die Beladungskapazität des Harzes in einem erheblichen Maß herabgesetzt. Die Antischaummittel ließen sich zudem auf Grund ihrer hydrophoben Eigenschaften nur unter großem Aufwand von dem Harz wieder

ablösen. Eine Verwendung von Antischaummitteln in einer Fermentation mit integrierter Adsorptionskolonne hätte somit die Adsorption und Aufarbeitung der Nod-Faktoren erheblich beeinflusst.

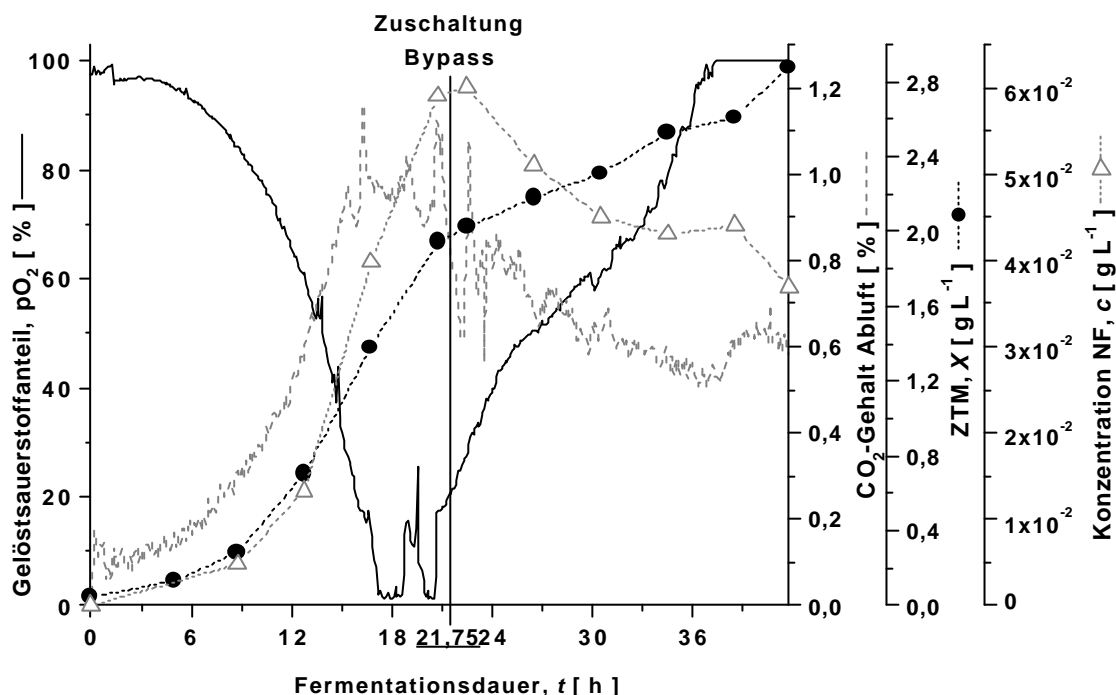


**Abbildung 4.53** Schaumbildung bei der Kultivierung von *S.melloti* 1021pEK327 in einem Mannitol-Minimalmedium im 30 L MBR-Rührkessel. FP: Flüssigkeitspegel; Sch: Schaum. Die Aufnahme wurde nach  $t = 19$  h angefertigt

Um die starke Schaumbildung in weiteren Satzprozessen mit integrierter Adsorptionskolonne dennoch zu vermeiden und dabei gleichzeitig auf den Einsatz von Antischaummitteln verzichten zu können, wurden diese Fermentationen im Gegensatz zu Satzprozessen mit anschließender Aufreinigung der Nod-Faktoren nur bei einer Rührerdrehfrequenz von 250 bis 300 Umdrehungen  $\text{min}^{-1}$  und einem Luftstrom von  $4 \text{ NL} \cdot \text{min}^{-1}$  durchgeführt.

In **Abbildung 4.54** sind die wichtigsten Prozessparameter eines Satzprozesses mit Integration einer Adsorptionswirbelschicht dargestellt. Der Graph des Bio-trockenmasseverlaufs flachte nach  $t = 16,75$  h ab, die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit reduzierte sich im Vergleich zum ersten Teil der exponentiellen Phase von  $\mu_{3,75-16,75h} = 0,198 \text{ h}^{-1}$  auf  $\mu_{16,75-20,75h} = 0,085 \text{ h}^{-1}$ . Nach ca. 16 h erreichte auch die Kurve des  $\text{CO}_2$ -Gehalts in der Fermenter-Abluft ein Plateau und die Sauerstoffsättigung im Medium war zu diesem Zeitpunkt bis auf 0 % abgefallen. Mit der Zuschal-

tung des Adsorptionskreislaufs bei  $t = 21,75$  h reduzierte sich die Wachstumsgeschwindigkeit der Sinorhizobien weiter, bis zum Ende der Fermentation war nur noch ein linearer Zuwachs der Biotrockenmasse um  $0,97 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  messbar. Die Nod-Faktor-Konzentration im Medium stieg nach ca. 14 h, als der  $p\text{O}_2$  unter die Marke von 40 % fiel, überproportional zum Biotrockenmasseverlauf an, nach der Zuschaltung der Adsorptionskolonne nahm der Gehalt der in der Lösung enthaltenen Nod-Faktoren zwar stetig ab, lag bei Abbruch des Satzprozesses zum Zeitpunkt  $t = 41,75$  h mit einem Wert von  $c_{NF} = 3,7 \cdot 10^{-2} \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  aber noch bei 63 % der maximalen Konzentration ( $c_{NF} = 5,9 \cdot 10^{-2} \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) bei  $t = 20,75$  h.



**Abbildung 4.54** Verlauf von  $p\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$ -Gehalt in der Abluft, Biotrockenmassekonzentration und Nod-Faktor-Konzentration einer Satzfermentationen von *S. meliloti* 1021pEK327 mit zugeschalteter Adsorptionskolonne (Bypass). Die Zuschaltung der Säule erfolgte beim Bypassverfahren 21,75 h nach dem Start der Fermentation.

Der Verlauf der Sauerstoffsättigung im Medium ( $p\text{O}_2$ ) und des  $\text{CO}_2$ -Gehalts im Abgasstrom des Rührkesselreaktors in **Abbildung 4.54** machen deutlich, dass der erniedrigte Lufteintrag von  $4 \text{ NL}\cdot\text{min}^{-1}$  und die in dieser Fermentation gewählte Rührerfrequenz von  $250 \text{ min}^{-1}$  in der fortgeschrittenen exponentiellen Phase nach ca. 16 h nicht mehr ausreichen, um die kultivierten Bodenbakterien bei einer Biomassekonzentration von  $1,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  im Bioreaktor ausreichend mit Sauerstoff zu versorgen und so ein unlimitiertes Wachstum der Mikroorganismen zu gewährleisten, was sich im Verlauf der Wachstumskurve widerspiegelt. Zwar zeigte nach Trinick (Trinick, 1982) *Sinorhizobium meliloti* schon bei einem Sauerstoffeintrag von  $25 \text{ mL O}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$

ein unlimitiertes Wachstum. Doch bei einer Sauerstofflimitierung stellt *Sinorhizobium meliloti* seinen Stoffwechsel auf alternative Wege um und reduziert seine Wachstumsgeschwindigkeit, wie Toffanin (Toffanin *et al.*, 2000) nachweisen konnte. Bei den Experimenten von Toffanin konnte auch gezeigt werden, dass *Sinorhizobium meliloti* nicht die Möglichkeit besitzt, auf alternative Elektronenakzeptoren wie z.B. auf  $\text{NO}_3^-$  und / oder  $\text{NO}_2^-$  an Stelle von molekularem Sauerstoff zurückzugreifen. Außerdem wurde durch die Arbeiten von Zhulin (Zhulin *et al.*, 1995) belegt, dass *Sinorhizobium meliloti* auf eine abrupte Änderung der Sauerstoffkonzentration im Medium mit einer Reduzierung seiner Fortbewegungsgeschwindigkeit (Chemokinese) im Medium reagierte. Dass *Sinorhizobium meliloti* 1021 Genfunktionen besitzt, die durch eine Sauerstofflimitierung nicht nur im Wurzelknöllchen bei Bakteroiden, sondern auch in freilebenden Bodenbakterien aktiviert werden, konnte von Trzebiatowski (Trzebiatowski *et al.*, 2001) nachgewiesen werden. Welche dieser Gene für die Stoffwechsellumstellung und / oder auch für eine Steigerung in der Nod-Faktoren Synthese in Satzfermentationen von *S. meliloti* 1021pEK327 in Mannitol-Minimalmedium mit integriertem Adsorptionskreislauf verantwortlich gemacht werden können, bleibt aufzuklären. Diese Daten der Fermentationen belegen aber, dass in Suspension lebende Sinorhizobien als streng aerophil eingestuft werden müssen.

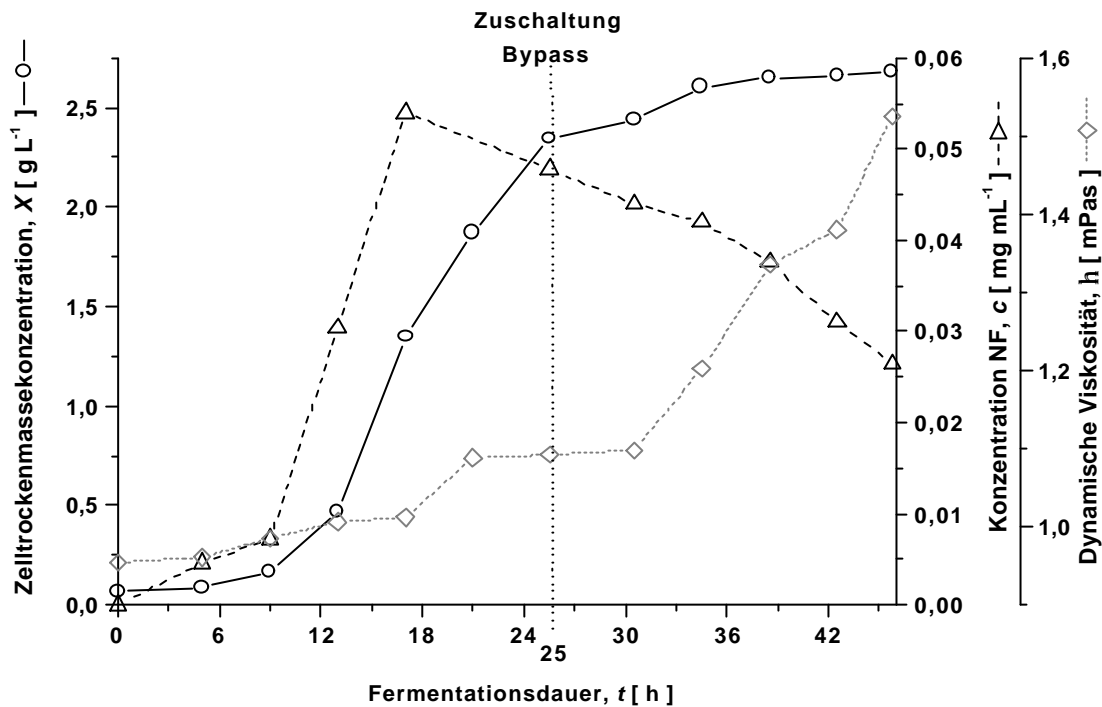
#### **Auswirkungen des Adsorptionskreislaufs auf die Sekretion von Exopolysacchariden durch *S. meliloti* 1021pEK327**

Am Ende des oben dargestellten Satzprozesses mit *S. meliloti* 1021pEK327 war die Kultursuspension deutlich zähflüssiger als zu Beginn der Fermentation. Anhand von Proben, die während eines weiteren Satzprozesses mit Betrieb der integrierten Adsorptionskolonne gezogen wurden, sollte geklärt werden, wann es im Verlauf der Fermentation zu einer Veränderung im Fließverhalten des Mediums kam. Dazu wurden tiefgefrorene, zentrifugierte Fermentationsüberstände aus dieser Bypass-Fermentation im Wasserbad bei +25 °C aufgetaut und 30 min temperiert, bevor sie im Mikro-Kugelfallviskosimeter untersucht wurden.

Die dynamische Viskosität ( $\eta$ ) der Fermentationsüberstände aus dem Satzprozess von *S. meliloti* 1021pEK327 mit integriertem Adsorptionskreislauf stieg, wie **Abbildung 4.55** darstellt, im Verlauf der ersten 30,5 h nur um 15 % von 0,954 mPa·s auf 1,098 mPa·s an. Die Konsistenz der Kulturüberstände änderte sich aber fünf Stunden nach der Zuschaltung des Adsorptionskreislaufs in einem deutlich stärkeren Maß. Bis zum Ende der Fermentation war der Wert der dynamischen Viskosität ( $\eta$ ) auf einen Wert von 1,606 mPa·s angewachsen. Dies entsprach einer Steigerung von 46 % gegenüber dem Messwert der Probe bei 30,5 h. Dabei ist zu beachten, dass die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit in diesem Zeitraum nur noch bei  $\mu = 0,012 \text{ h}^{-1}$  ( $\rightarrow t_D = 60,16 \text{ h}$ ) lag. Eine vergleichbar starke Zunahme der Viskosität war in den Fermentationsüberständen von Satzprozessen ohne Zuschaltung einer Adsorptionskolonne bis zum Erreichen der stationären Phase nicht beobachtet worden.

Die erhöhte dynamische Viskosität der Fermentationsproben konnte auch in den Bypass-Fermentationen auf die verstärkte Synthese von Exopolysacchariden durch *S. meliloti* 1021pEK327 nach der Zuschaltung des Adsorptionskreislaufs zurückgeführt werden. Die Exopolysaccharide konnten aus den Fermentationsüberständen mittels ethanolischer Fällung nachgewiesen werden. Dies bestätigt damit die

Annahme von 4.3.4, dass die Bodenbakterien in Folge der Stressfaktoren, die in Folge der Zuschaltung des Adsorptionskreislauf auf sie einwirken, mit einer verstärkten EPS-Synthese reagieren.



**Abbildung 4.55** Zelltrockenmasse, Nod-Faktor-Konzentration und dynamische Viskosität ( $h$ ) in Fermentationsproben einer Satzkultivierung von *S. meliloti* 1021pEK327 zur Produktion von Nod-Faktoren mit integriertem Adsorptionskreislauf

Nach diesen Resultaten reagierten die *Sinorhizobien* auf den Stress, dem sie auf Grund des Umpumpen durch den Adsorptionskreislauf ausgesetzt waren, nicht nur mit einer Reduzierung ihrer Wachstumsgeschwindigkeit, wie in **Abbildung 4.54** zu sehen war, sondern sie bildeten auch einen Schutzmantel aus den Zuckermolekülen um ihre Zellen, um sich damit vor diesem Stressfaktor besser zu schützen (Moreno *et al.*, 2000). Dies korreliert mit den Ergebnissen, die Harscoat (Harscoat *et al.*, 1999) erzielte. In seinen Experimenten konnte eine höhere Ausbeute an Exopolysacchariden erzielt werden, wenn die Organismen einem verstärkten Scherstress in Folge einer erhöhten Rührerdrehfrequenz im Fermenter ausgesetzt waren. Dass die dynamische Viskosität in der Fermentation erst ca. 5 h nach Zuschaltung des Adsorptionskreislaufs deutlich anstieg, ist auf den niedrigen Volumenstrom von  $V = 50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  zurückzuführen. Erst nach 6,67 h ist das Reaktorvolumen von 20 L einmal vollständig durch den Adsorptionskreislauf gepumpt worden und damit statistisch gesehen jedes Bakterium aus der Kulturlösung durch den Bypass gelangt und damit gestresst worden.

Die signifikante Anstieg der dynamischen Viskosität im Medium nach der Zuschaltung des Adsorptionskreislaufs erhöht den Transportwiderstand bei der Diffusion der Nod-Faktoren aus der Kernströmung an die äußere Oberfläche der sphärischen Harzpartikel. Wie Wright (Wright *et al.*, 1998) nachweisen konnte, wirkte sich die Erhöhung der Viskosität eines Mediums durch die Addition von Glycerin zur Lösung negativ auf den Stofftransport bei der Adsorption von Lysozym an poröse, sphärische Harze (Streamline SP) aus. Für die Optimierung des Stoffübergangs von Nod-Faktoren aus der Fermentationsbrühe an die Harzoberfläche wäre deshalb sinnvoll, wie bereits unter **4.3.5** diskutiert, eine EPS<sup>-</sup>-Mutante des Produktionsstamms *S. meliloti* 1021pEK327 zu erzeugen. Dabei ist allerdings zu beachten, dass durch diese Mutation die Viabilität der Mikroorganismen in Folge des fehlenden Schutzmantels aus den Zuckermolekülen beeinträchtigt werden kann, was wiederum die Produktivität des Herstellungsverfahrens herabsetzen würde. Auch wenn bei der Adsorption von Nod-Faktoren an Amberlite® XAD-2 pract. nach den vorliegenden Ergebnissen aus **4.3.3** die Filmdiffusion nicht der Vorgang ist, der die Geschwindigkeit des Adsorptionsprozesses limitiert und somit nur eine untergeordnete Rolle spielt, könnte durch eine reduzierte Exopolysaccharidsynthese und der daraus resultierenden geringeren Viskosität des Fermentationsmediums zumindest der Stoffübergang an die äußere Oberfläche optimiert werden.

### 4.3.6 Die Produktbildung von *S. meliloti* 1021pEK327 im herkömmlichen Satzbetrieb und im Bypass-Verfahren

Die Nod-Faktoren der Sinorhizobien werden zu den Sekundärmetaboliten gerechnet, da ihre Synthese im Wildtyp *S. meliloti* 2011 bzw. *S. meliloti* SU47 nicht an den primären Energiestoffwechsel der Zellen gekoppelt ist, sondern erst durch die Induktion der pflanzlichen Flavonoide jene Enzyme gebildet werden, die für die Synthese der Nod-Faktoren verantwortlich sind. Die Produktbildung der Nod-Faktoren ist im Wildtypstamm somit ausschließlich von der Menge der vorhandenen Biomasse abhängig.

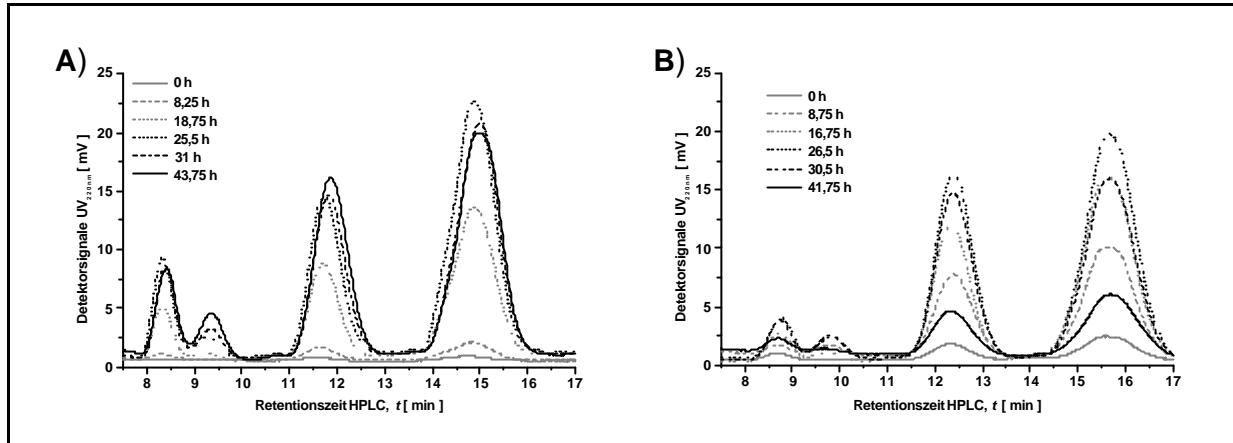
Die Resultate der Testreihe mit Luteolin und Tetrazyklin in **4.3.1** haben gezeigt, dass im Produktionsstamm *S. meliloti* 1021pEK327 die Expression der Nod-Faktor-Synthesegene weder durch die Flavonoide induziert werden muss, noch eine Regulation der Expression von *nod*-Genen erfolgt, sondern diese Gene durch die Einbringung des Plasmids pEK327 in den Stamm *S. meliloti* 1021 konstitutiv gebildet werden. In früheren Arbeiten (Kohring *et al.*, 1997) konnte belegt werden, dass die Synthese der Lipochitooligosaccharide in den Organismen wachstumsassoziiert erfolgte und nach dem Übergang der Bodenbakterien in die stationäre Phase keine weitere Zunahme an Nod-Faktoren im Fermentationsüberstand mehr messbar war.

Um die Nod-Faktoren-Synthese in Satzprozessen mit und ohne integrierter Adsorptionskolonne zu verfolgen, wurden Proben aus den in **Abbildung 4.51, A** und **4.54** dargestellten Fermentationen entnommen und die klar zentrifugierten Überstände (10 min, x 16.000 g) in der analytischen RP18-HPLC untersucht.

Die Chromatogramme in **Abbildung 4.56, A + B** weisen ein vergleichbares Profil auf. Der Anteil hydrophilerer Nod-Faktoren war in der Satzkultivierung ohne Adsorptionskolonne in den ersten 20 h höher als der im Bypassverfahren. Mit



Übergang in die stationäre Phase nach  $t = 25,5$  h war in den Chromatogrammen der herkömmlichen Satzfermentation (**Abbildung 4.56, A**) nur noch bei den Peaks mit einer Retentionszeit von  $t = 8'20''$  und  $t = 9'21''$  ein geringerer Größenzuwachs erkennbar. Mit der Zuschaltung des Adsorptionskreislaufs nach  $t = 21,75$  h nimmt in den Chromatogrammen die Größe aller Peaks von **Abbildung 4.56, B** wieder ab.



**Abbildung 4.56** Vergleich der Chromatogramme von Fermentationsüberständen, die zu den in den Diagrammen angegebenen Zeitpunkten aus Satzprozessen ohne (A) und mit integrierter Adsorptionskolonne (B) entnommen wurden

Für einen quantitativen Vergleich des Verlaufs der Nod-Faktor-Konzentrationen in den Fermentationsüberständen während der Satzprozesse mit und ohne Bypass wurden aus den Chromatogrammen der **Abbildung 4.56, A + B** die Konzentrationen der Glykolipide anhand der Summe aller Peakflächen im Bereich von 7,5 –17 min jedes Chromatogramms mit Hilfe des Umrechnungsfaktors (s. 3.3) ermittelt.

Die Konzentrationen der Nod-Faktoren in den Kulturüberständen sind zusammen mit den Biotrockenmassekonzentrationen der jeweiligen Fermentation in **Abbildung 4.57** dargestellt. Die Wachstumskurven beider Fermentationsprozesse zeigten während der ersten 21 h einen nahezu identischen Verlauf. Die Biotrockenmassekonzentration lag am Ende der Fermentationen im Verfahren mit Adsorptionskolonne bei einem Wert von  $X = 2,88 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  allerdings um  $0,47 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  ( $\cong 14 \%$ ) unter den Daten der Satzfermentation ohne Adsorptionsbypass ( $3,35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). In dem herkömmlichen Satzprozess wurde nach 25 h eine Konzentration an Nod-Faktoren von  $c_{NF} = 46,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  erreicht, die bis zum Ende des Satzprozesses nur noch unwesentlich auf  $c_{NF} = 48,7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  anstieg. Wie in **Abbildung 4.54** und **Abbildung 4.55** bereits zu sehen war, konnte ein überproportionaler Anstieg der Nod-Faktor-Konzentrationen in den Fermentationen mit Bypass-Extraktion der Nod-Faktoren nach  $t = 10 \text{ h} - 14 \text{ h}$  beobachtet werden. Das Maximum der LCOS-Konzentration in der Fermentationslösung bei der in **Abbildung 4.54** und **Abbildung 4.57** gezeigten Fermentation wurde nach  $t = 20,75 \text{ h}$  mit einer Konzentration von  $c_{NF} = 59,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  erreicht. Damit liegt die Konzentration der Glykolipide im Bypass-Verfahren zu diesem Zeitpunkt um 79,4 % über der Menge an Nod-Faktoren, die im Satzprozess zur gleichen Zeit gemessen wurde ( $c_{NF}(t_{\text{Satz},20,75\text{h}}) = 33 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Die Konzentration

der Glykolipide nahm in der Bypass-Fermentation nach der Zuschaltung des Adsorptionskreislaufs im Medium wieder ab, doch wurden bei Abbruch des Prozesses noch  $36,9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Nod-Faktoren in der Kulturlösung nachgewiesen. Das sind im Vergleich zu dem Wert vor Zuschaltung des Bypasses bei  $t_{\text{Bypass}} = 20,75 \text{ h}$  noch 61 %. In den quantitativen Vergleich fließen an dieser Stelle noch nicht die Anteile an Nod-Faktoren ein, die bis zum Abbruch der Fermentation in dem Verfahren mit Adsorptions-Bypass an das Adsorberharz gebunden haben. Die adsorbierte Menge an Nod-Faktoren wird aber im Folgenden bei der Betrachtung der Produktausbeutekoeffizienten und beim Produktivitätsvergleich der beiden hier gegenübergestellten Herstellungsverfahren zur Gewinnung von Nod-Faktoren berücksichtigt. In diesem Zusammenhang werden auch die Ursachen für die verstärkte Synthese der Nod-Faktoren der Bypass-Fermentationen im Zeitraum von  $t = 14 \text{ h} - 20 \text{ h}$  diskutiert.

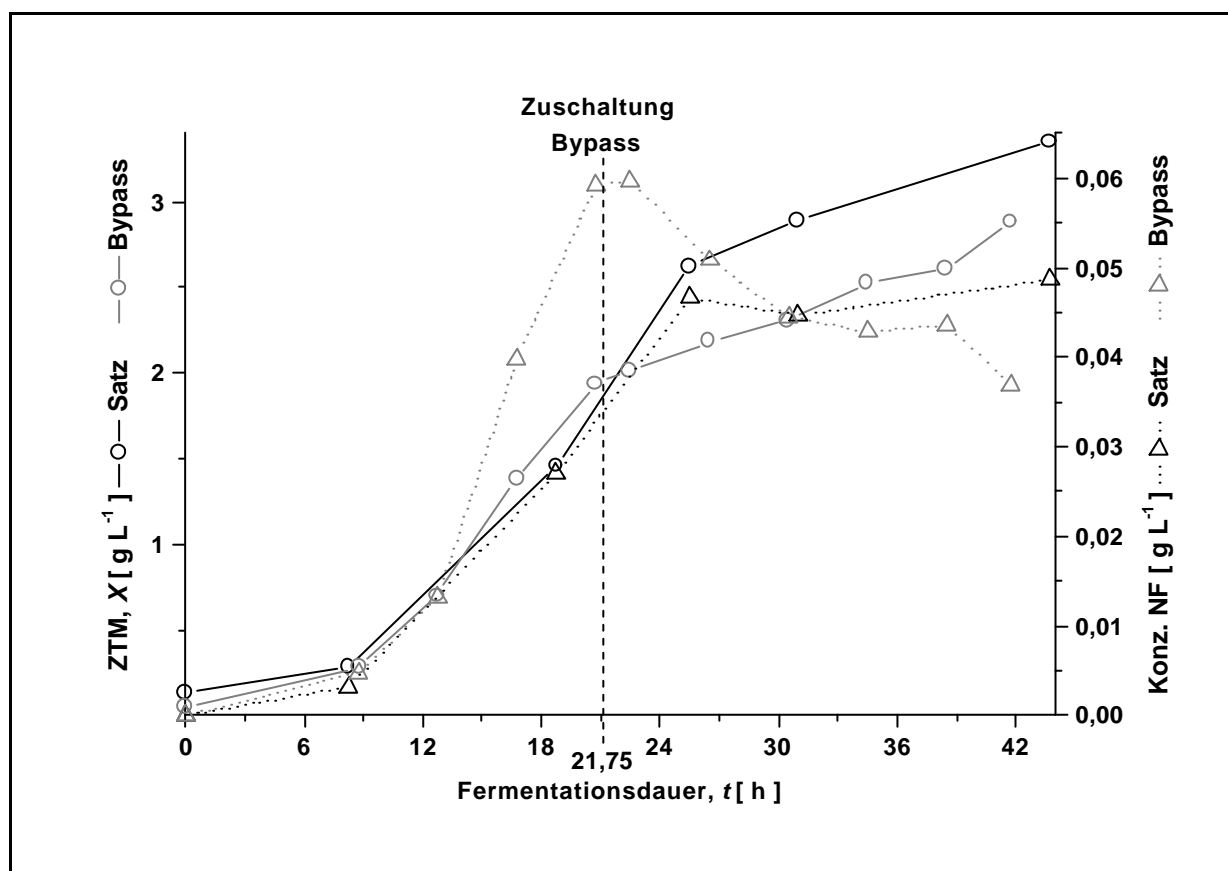


Abbildung 4.57

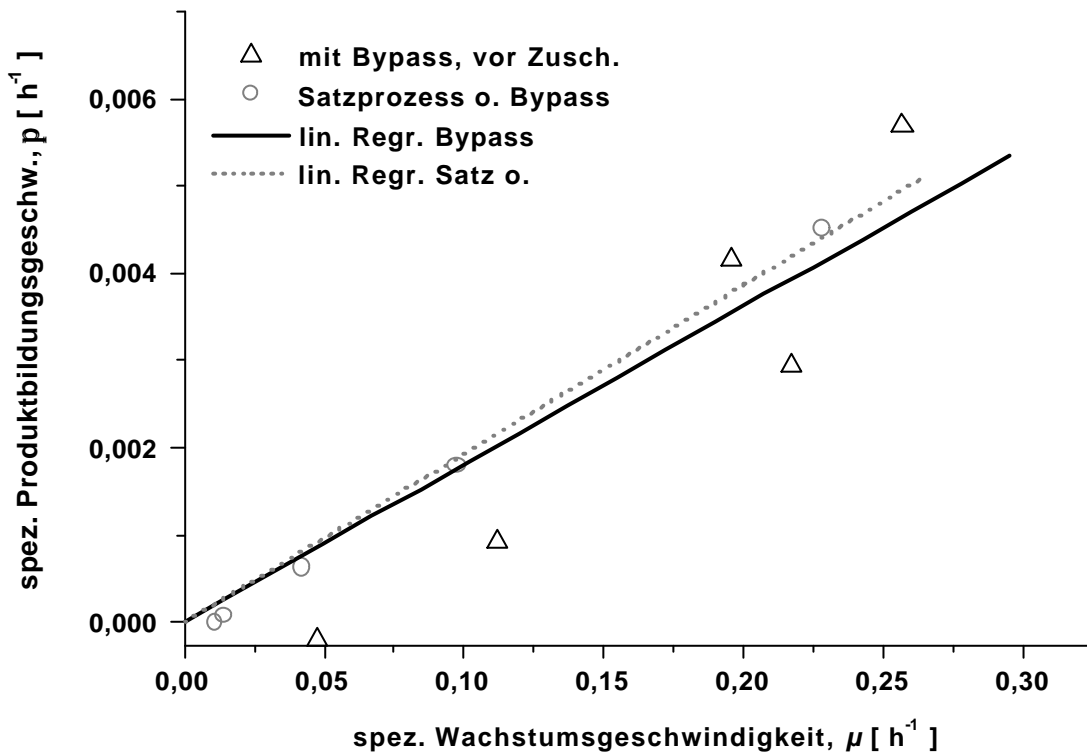
Vergleich der Zelltrochmassen und Nod-Faktor-(NF)-konzentrationen in den Fermentationslösungen eines Satzprozesses ohne (Satz) und mit integrierter Adsorptionskolonne (Bypass).

Aus einer Auftragung von  $m$  gegen  $p$  der beiden Fermentationen in **Abbildung 4.57** ist zu erkennen, dass die Synthese der Nod-Faktoren mit dem Stamm *S. meliloti* 1021pEK327 in den ersten 18 h beider Kultivierungen dem Modell einer wachstumsassoziierten Produktbildung nach Gaden jr. (Schügerl, 1985, Moser, 1981, s. 2.14) weitestgehend folgten, wie aus **Abbildung 4.58** hervorgeht. Dabei sind die Abweichungen der Daten aus dem Satzprozess ohne Adsorptionskolonne von der Regressionsgeraden geringer als bei den Werten der Bypass-Fermentation, was auf den verstärkten Anstieg der Nod-Faktor-Synthese nach  $t = 14 \text{ h}$  in diesem

Prozess zurückzuführen ist, wie in **Abbildung 4.57** zu erkennen war. Anhand von **Gleichung 4.10** lassen sich, bei dem Modell einer wachstumsassoziierten Produktbildung, die Proportionalitätsfaktoren  $k_2$  für die Produktbildungsgeschwindigkeit beider Prozesse aus der Steigung der Geraden aus **Abbildung 4.58** ermitteln, da:

$$p = k_2 \cdot m \Rightarrow k_2 = \frac{p}{m} \text{ (Gleichung 4.11)}$$

Für die ersten 18 h der Fermentation mit nachgeschalteter Aufarbeitung der Nod-Faktoren wird ein mittlerer Proportionalitätsfaktor von  $k_2 = 0,019$  erhalten. Der Faktor, der für die Fermentation mit Zuschaltung des Bypasses ermittelt wurde, besitzt einen Wert von  $k_2 = 0,018$ . Somit unterscheiden sich die Nod-Faktorsyntheseleistungen des Stamms *S. meliloti* 1021pEK327 während der ersten 18 h in den beiden Fermentationen nur um 5,2 %.



**Abbildung 4.58**

Auftragung der spezifischen Produktbildungsgeschwindigkeit  $\pi$  gegen die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu$  für die ersten 18 h der oben beschriebenen Satzprozesse mit Adsorptionskolonne (mit Bypass, vor Zusch.) und ohne (Satzprozess o. Bypass). Die lineare Regression erfolgte unter der Annahme, dass dem Modell einer wachstumsassoziierten Produktbildung folgend, die resultierende Gerade durch den Nullpunkt läuft.

Bei einem Arbeitsvolumen von 20 L entsprach die Konzentration der Nod-Faktoren in dem Satzprozess mit nachgeschalteter Aufarbeitung bei Abbruch der Fermentation mit  $c_{NF} = 48,7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , wie sich aus **Abbildung 4.57** ergibt, einer Gesamtmenge von 974 mg an Nod-Faktoren. Nach der Aufarbeitung mittels Ultrafiltration, Adsorption an den Harzkugeln, Elution und Einengung im Rotationsverdampfer konnten aus diesen 20 L des Satzprozesses 823 mg an lyophilisiertem Rohprodukt gewonnen werden. Das entspricht 84,5 % der ursprünglich im Bioreaktor vorhandenen Menge an LCOS in 20 L Kulturbrühe bei Fermentationsende. Wie weitere chromatographische Analysen des Rohproduktes zeigten, ist dieses Lyophilisat wie das Produkt aus dem ultrafiltrierten Fermentationsüberstandes eines Satzprozess nur noch in geringem Maß durch Begleitstoffe verunreinigt, was durch die **Abbildungen 4.62 + 4.63** belegt wird.

In dem in **Abbildung 4.54** gezeigten Verfahren mit integrierter Adsorptionskolonne (Bypass) erreichte die Nod-Faktor-Konzentration nach 20,75 h eine Konzentration von  $59,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , was zu diesem Zeitpunkt der Fermentation bei einem Arbeitsvolumen von 20 L einer Menge von 1.184 mg Nod-Faktoren entspricht. Außerdem waren, wie sich aus **Abbildung 4.57** ergibt, bei Fermentationsende noch 738 mg an Nod-Faktoren in 20 L Arbeitsvolumen enthalten. Die Wägung des Rohprodukts, das aus dem Bypassverfahren nach Elution, Einengung und Lyophilisation erhalten wurde, ergab eine Menge von 610 mg.

Wird für den Aufarbeitungsprozess der Harzkugeln aus dem Bypassverfahren wie bei dem oben dargestellten Satzprozess mit nachgeschalteter Aufarbeitung ebenfalls ein Verlust von 15,5 % bei Elution, Vakuumdestillation und Lyophilisation zur Gewinnung des Lyophilisats einkalkuliert und dieser Verlust zum Gewicht des Rohprodukts addiert, ergibt sich daraus eine geschätzte Menge von 722 mg an Nod-Faktoren, die im Bypass-Verfahren aus der Fermentationslösung extrahiert werden konnte. In der Summe mit der noch im Fermenter verbliebenen Menge an Nod-Faktoren (738 mg) ergibt dies eine durch *S. meliloti* 1021pEK327 kalkulierte Gesamtmenge an LCOS von 1.460 mg, die im gesamten Verfahrenszeitraum von den Mikroorganismen produziert wurden. Dieser Wert liegt damit um 49,8 % ( $\rightarrow$  Satz: 974 mg = 100 %) über der Menge an Nod-Faktoren, die im Satzprozess mit nachgeschalteter Aufarbeitung in der Probe bei Fermentationsende nachgewiesen werden konnten.

Aus dieser Berechnung folgt, dass die Bodenbakterien im Bypass-Verfahren nicht nur in der Fermentationsphase vor der Zuschaltung des Adsorptionskreislaufs auf Grund der veränderten Kultivierungskonditionen eine deutlich höhere Menge an Nod-Faktoren synthetisieren als in den bisher durchgeführten Satzverfahren unter den dort beschriebenen Bedingungen (s. **3.5.3**). Vielmehr produziert und sekretiert *S. meliloti* 1021pEK327 im Gegensatz zum herkömmlichen Satzprozess auch in zweiten Teil der Fermentation nach Zuschaltung der Adsorptions-Wirbelschicht noch eine erhebliche Menge an Glykolipiden und dies trotz einer nur noch geringen Zunahme an Biomasse im Fermenter.

Die Auftragung der spezifischen Produktbildungsgeschwindigkeit ( $p$ ) gegen die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit ( $m$ ) in **Abbildung 4.58** hat gezeigt, dass für die frühe Phase beider Fermentationsverfahren bis zum Zeitpunkt  $t_{\text{Ferm}} \leq 14 \text{ h}$  eine an das Wachstum der Bodenbakterien gekoppelte Produktbildung bei der Synthese von Nod-Faktoren durch *S. meliloti* 1021pEK327 nach dem Modell von

Gaden jr. (Schügerl, 1985) vorliegt. Doch während im Satzprozess ohne Adsorptionskolonne die Produktbildung diesem Modell weiter folgte und nach dem Erreichen der stationären Phase die Konzentration an LCOS im Fermenter nicht weiter anstieg, wurde die Synthese der Nod-Faktoren vom Wachstumsverlauf der Bakterien in dem Fermenter mit Adsorptionskolonne bei zunehmender Sauerstofflimitierung im Bioreaktor nach  $t_{\text{Ferm}} = 14$  h entkoppelt. Auch während der Extraktion der Nod-Faktoren an das Adsorberharz im Bypass wird die Synthese der LCOS bei *S. meliloti* 1021pEK327 nicht reduziert, so dass letztlich in der Fermentation mit integriertem Adsorptionskreislauf der auf die Biomasse bezogene Ausbeutekoeffizient um den Faktor 1,7 über dem Wert lag, der in einem herkömmlichen Satzverfahren erreicht werden konnte, wie die **Gleichung 4.12, a** und **Gleichung 4.12, b** zeigen:

$$Y_{P/X, \text{Bypass}} = \frac{0,073 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NF}}{2,88 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}} = 2,53 \cdot 10^{-2} \frac{\text{g Nod - Faktoren}}{\text{g Biotrockenmasse}} \quad \text{(Gleichung 4.12, a)}$$

$$Y_{P/X, \text{Satz}} = \frac{0,049 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NF}}{3,35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}} = 1,46 \cdot 10^{-2} \frac{\text{g Nod - Faktoren}}{\text{g Biotrockenmasse}} \quad \text{(Gleichung 4.12, b)}$$

Die deutlich höheren Nod-Faktor-Konzentrationen in den Bypass-Verfahren während der Fermentation sind nach den vorliegenden Ergebnissen zum einen auf die auftretende Sauerstofflimitierung in Folge der geringeren Rührerdrehfrequenz und des geringeren Lufteintrags bei steigender Biomassekonzentration während der ersten Phase der Fermentation mit Adsorptions-Wirbelschicht (s. **Abbildung 4.54**) zurückzuführen. Durch die Sauerstofflimitierung ausgelöst, könnten die Transkriptionsaktivatoren der Nod-Faktor-Synthese, *nodD1* - *nodD3* und *syrM* (Mulligan *et al.*, 1989), in einem stärkeren Maß von den Bodenbakterien in der Zelle exprimiert werden, was im Vergleich mit einer herkömmlichen Satzfermentation von *S. meliloti* 1021pEK327 ohne Sauerstofflimitierung zu der verstärkten Synthese der Glykolipide und damit zu einer überproportional höheren Menge an Nod-Faktoren im Medium führen.

Außerdem ist für den weiteren Verlauf der Fermentation nach Zuschaltung des Bypasses denkbar, dass durch den Stress, dem die Bodenbakterien durch den Umpumpprozess ausgesetzt sind, die Synthese und Sekretion der Glykolipide stimuliert wurde. Dies wäre eine Parallele zu den Beobachtungen, die bei der Kultivierung des in Argentinien isolierten Stamms *S. meliloti* LPU63 unter Säurestress gemacht wurden, die unter **4.1.1** und **4.1.2** beschrieben sind. Bei diesen Fermentationen wurde eine erhöhte Konzentration sowohl an Nodulationsfaktoren als auch an EPS mit zunehmendem Stress gemessen, der durch das Absenken des pH-Wertes verursacht wurde. Eine verstärkte EPS-Synthese war in den Fermentationen von *S. meliloti* 1021pEK327 nach Zuschaltung des Adsorptionsbypasses ebenfalls beobachtet worden, wie **Abbildung 4.55** zeigte.

Da es auf Grund der nahezu vollständigen deregulierten Expression der *nod*-Gene in den Organismen bereits zu einer um den Faktor 1.000 gesteigerten Synthese an Nod-Faktoren mit *S. meliloti* 1021pEK327, als sie beim Wildtyp gemessen wurde (Schultze *et al.*, 1992), muss auch diskutiert werden, ob die Glykolipide ab einer noch zu bestimmenden Konzentration dem Modell einer Produktinhibierung folgend (Cornish Bowden, 1995; Flaschel, 1992), in den Bodenbakterien eine

negative Rückkopplung auf die an der Synthese der LCOS beteiligten Enzyme ausüben. Dann würde die weitere Expression der Nod-Faktoren in einem Satzprozess ohne Adsorptionskolonne auf Grund der hohen Konzentrationen an LCOS in den Zellen reduziert werden. Erfolgt aber durch die Adsorption an Amberlite® XAD-2 pract. ein permanenter Entzug der Glykolipide aus dem Medium, so wird die Menge der Lipochitooligosaccharide in der Fermentationslösung und damit auch in der Umgebung und in den Zellen ständig unterhalb dieser inhibitorisch wirkenden Konzentration gehalten. Ein vergleichbarer Effekt mit einer deutlich erhöhten Produktausbeute konnte bei der Kultivierung des rekombinanten, Gibberillin überproduzierenden Pilzes *Fusarium moniliforme* 3211 beobachtet werden (Rachev *et al.*, 1997). Nach Zugabe von Amberlite® XAD-2 pract. zum Kultivierungsmedium konnte durch die Adsorption der Phytohormone an dem Harz die Ausbeute an sekretiertem Gibberillin GA7 mit diesem Stamm erheblich gesteigert werden.

Es ist zudem möglich, dass in Satzprozessen ohne Adsorption der Nod-Faktoren von einigen Zellen eine erneute Inkorporation der Glykolipide aus dem Medium durch die Bodenbakterien erfolgt, um bei zunehmender Nährstofflimitierung als Kohlenstoffquelle für den Primärstoffwechsel von *S. meliloti* 1021pEK327 genutzt zu werden. Damit würde eine Maximalkonzentration an Nod-Faktoren im Medium einer Satzfermentation ebenfalls nicht überschritten werden, wenn die Glykolipide dem Medium nicht zuvor durch Adsorption entzogen werden. Hinweise auf eine solche Aufnahme von Nod-Faktoren lieferten die Analysen der Fermentationsüberstände, die während eines Satzprozesses mit *S. meliloti* 1021pEK327 in MMM und einer Laufzeit von 94 h durchgeführt wurden (Daten hier nicht gezeigt). In den Chromatogrammen der Überstände war zu erkennen, dass mit zunehmender Fermentationsdauer Nod-Faktor-Peaks nicht mehr auftraten oder in der Peakfläche wieder kleiner wurden, die im Chromatogramm einer Probe, die 20 h zuvor gezogen wurde, noch detektiert werden konnten. Die Gesamtfläche aller Peaks in den untersuchten Chromatogrammen nahm mit fortschreitender Fermentationsdauer ebenfalls langsam ab, nachdem die Peakflächensumme bei  $t = 21$  h ihr Maximum besaß. Ein ständiger Entzug der Nod-Faktoren aus dem Medium durch die Adsorption würde allerdings eine erneute Aufnahme der Nod-Faktoren durch die Bodenbakterien verhindern und die Synthese der Glykolipide weiter ablaufen lassen. Ein Nachweis über diese Inkorporation der Glykolipide durch *S. meliloti* 1021pEK327 könnte mit radioaktiv markierten Nod-Faktoren (Bourdineaud *et al.*, 1995) erfolgen, die *S. meliloti* 1021pEK327 als einzige Kohlenstoffquelle in einem Minimalmedium angeboten würden.

Eine der Ursachen für die nur unvollständige in-Prozess-Adsorption von Nod-Faktoren an Amberlite® XAD-2 pract. im Vergleich mit dem Aufarbeitungsverfahren des herkömmlichen Satzprozesses und nachgeschalteter Adsorption der Nod-Faktoren ist darin zu suchen, dass die in diesem Prozess verwendete Adsorberharzcharge zuvor schon in sechs vorangegangenen Aufarbeitungsverfahren von je 20 L Fermentationslösung eingesetzt wurde. In Vorversuchen bei der Aufreinigung von Kulturüberständen mittels Amberlite® XAD-2 pract. gefüllter Kartuschen konnte nachgewiesen werden, dass die Adsorptionsfähigkeit des Harzes nach mehrmaligem Einsatz trotz erfolgter Regeneration mit Aceton, Ethanol und Wasser signifikant nachließ (Daten hier nicht gezeigt).

In den Schüttelkolbenexperimenten zur Kinetik von Nod-Faktoren an Amberlite® XAD-2 pract. konnte außerdem gezeigt werden, dass durch die Menge des

Adsorbers in der Kolonne und durch eine Variation des Volumenstroms die Geschwindigkeit der Adsorption gesteigert werden konnte. Doch durch die Bauart bedingten Beschränkungen bei Fermenter und Glassäule war es nicht möglich, bei den Satzfermentationen von *S. meliloti* 1021pEK327 mit integrierter Adsorptions-säule die in den Schüttelkolbenexperimenten ermittelten optimalen Parameter in den 20 L-Pilotmaßstab zu übernehmen. Für den Wirbelschichtbetrieb konnte die eingesetzte Glassäule aufgrund ihrer geometrischen Abmessungen (500 mm Länge;  $V = 567 \text{ mL}$ ) nur mit einer maximalen Schüttung von 200 g Amberlite® XAD-2 pract. befüllt werden. Dies entsprach nur einer Adsorberharz-Konzentration von  $10 \text{ gL}^{-1}$  Fermentationsvolumen. Um in der Säule eine vollständige Fluidisierung der Harzkugelschüttung zu gewährleisten, ohne dabei eine Ablagerung leichterer Amberlite® XAD-2 pract. Partikel am Auslassgitter zu erzeugen und eine Ansammlung der Bakterien in den Toträumen dieses gepackten Harzkugelbettes am Auslassgitter zu bewirken, wurde der Bypass-Kreislauf mit einem Volumenstrom ( $V$ ) von maximal  $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  betrieben, wie unter 4.3.5 geschildert. Ein höherer Volumenstrom konnte auch deshalb nicht realisiert werden, weil beim Ansaugen der Fermentationsflüssigkeit durch die Schlauchpumpe (SP; s. **Abbildung 3.11**) mit höheren Volumenströmen in der Zuführung zur Adsorptionskolonne hinter dem Druckaufnehmer (DA) eine starke Schaumbildung beobachtet wurde. Eine Ursache für die Schaumbildung könnte in den unterschiedlichen Innendurchmessern der Schlaucholive am Fermenter (I.D. = 9 mm) und im Schlauchdurchmesser der Zuführung zur Schlauchpumpe liegen (I.D. 18 mm). In Folge des Druckabfalls auf Grund der Querschnittserweiterung in der Schlauchleitung kann es zur Entgasung des Mediums und damit zur beobachteten Blasenbildung kommen.

Mit der eingestellten Förderleistung der Pumpe von  $V = 50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  wurde das gesamte Reaktorvolumen von 20 L in den 20 h Betriebsdauer des Adsorptions-Bypasses, statistisch gesehen, somit nur 3 x durch die mit Harz gefüllte Wirbelschichtkolonne geführt. Die mittlere Verweilzeit der Fermentationslösung in der Glassäule lag unter diesen Bedingungen bei  $t_{\text{Säule}} = 11'20''$ . Zum Vergleich: in einem der Schüttelkolbenexperimente wurde bei einer Konzentration von  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  Amberlite® XAD-2 pract. mit einem Volumenstrom von  $31,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  gearbeitet, was bei einem Säulenvolumen von 51,8 mL einer mittleren Verweilzeit von  $t_{\text{Säule}} = 1'38''$  entspricht. Das Flüssigkeitsvolumen von 300 mL Nod-Faktor-Lösung wurde damit 126 x in den 20 h Aufarbeitungszeit durch die Adsorbersäule geschickt. Dennoch konnten nach 20 h Laufzeit im Schüttelkolben nur rund 26 % der in der Lösung vorhandenen Nod-Faktoren an das Adsorberharz gebunden werden. Im Satzverfahren mit Adsorptionskolonne konnten während der Laufzeit des Adsorptionskreislaufs von 20 h dagegen bei einer geschätzten Gesamtmenge an produzierten Nod-Faktoren von 1.460 mg immerhin 702 mg an Nod-Faktoren, ( $\cong 48 \%$ ) durch das Harz aus der Lösung extrahiert werden. Bei diesem Vergleich muss zudem berücksichtigt werden, dass die Schüttelkolbenexperimente mit den Fermentationsüberständen nicht bei einer Temperatur von  $+28^\circ\text{C}$ , wie sie im Bioreaktor vorherrschten, sondern aus Sterilitätsgründen bei  $+4^\circ\text{C}$  im Kühlraum durchgeführt wurden. Obwohl die Adsorption an Amberlite® XAD-Harze exotherme Vorgänge sind, wie u.a. auch die Extraktion von Phenylalanin aus einer wässrigen Lösung bei verschiedenen Temperaturen gezeigt hat (Grzegorzcyk *et al.*, 1995), konnte im Fermentationsprozess dennoch eine um den Faktor 1,8 höhere Beladung des Harzes mit Nod-Faktoren erzielt werden als in den Experimenten im Schüttelkolben bei  $+4^\circ\text{C}$ .

Die geringe Strömungsgeschwindigkeit, mit der die Bakteriensuspension durch die Glassäule gepumpt wurde, hat somit keinen negativen Einfluss auf die Adsorptionskinetik von Nod-Faktoren an Amberlite® XAD-2 pract. Vielmehr nimmt, wie Karau (Karau et al., 1997) bei der Adsorption von Rinderserumalbumin an Streamline DEAE in einer Wirbelschicht zeigen konnte, mit zunehmender Betthöhe und höherer Partikelkonzentration in einer Wirbelschicht der Einfluss der Stömungsgeschwindigkeit auf die Geschwindigkeit der Adsorption ab. Während bei den Experimenten im Schüttelkolben mit 3 g Harz das fluidisierte Bett des Adsorbens nur rund ein Zehntel der Extraktionssäule ausfüllte, war bei den Versuchen im 20 L-Maßstab die Harzkugeln gleichmäßig über die ganze Säule verteilt, wie die **Abbildung 3.11** zeigt. Die Wirbelschicht in der Glassäule des Fermentationsexperiments wies ein weitaus geringeren Lückengrad ( $\epsilon$ ) auf als das fluidisierte Bett der Harzkugeln in der Kolonne des Schüttelkolbenexperiments. Durch die weitaus längere Verweilzeit der Fermentationsbrühe in der Säule wurden außerdem längere Kontaktzeiten von den Nod-Faktoren mit dem Harz erreicht. Alle Aspekte zusammen führten nach den oben dargestellten Ergebnissen letztlich zu der optimaleren Abreicherung der Nod-Faktoren aus der Fermentationsbrühe im Vergleich zum Experiment im Schüttelkolben, obwohl in beiden Versuchen jeweils die gleiche Konzentration ( $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) an Adsorbens eingesetzt wurde.

Die Ergebnisse im Fermentationsmaßstab sind ein weiterer Beleg dafür, dass Transportphänomene für die Adsorptionsgeschwindigkeit von Nod-Faktoren an Amberlite® XAD-2 pract. von untergeordneter Bedeutung sind. Vielmehr wird die Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts durch die eigentliche Bindung der Glykolipide am und im Korn der porösen Harzkugeln auf Grund ihres amphipathischen Molekülaufbaus bestimmt. Diese Gleichgewichtseinstellung läuft signifikant langsamer ab als bei der Adsorption von Cephalosporin-C an Amberlite® XAD-16 pract. (Yang *et al.*, 1999). In den Experimenten von Yang konnte in einem gerührten System innerhalb von 5 min bereits die Hälfte des in einer wässrigen Lösung (pH 3) vorliegenden Cephalosporin-C mit Konzentrationen von  $4,18 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  bis zu  $1,04 \cdot 10^{-2} \text{ M}$  am Harz gebunden werden. Eine schnellere Abreicherung der Nod-Faktoren aus der Fermentationslösung kann damit nur durch den Einsatz einer im Volumen größer dimensionierten Glassäule mit einer erhöhten Füllmenge an Adsorberharz erzielt werden, da so eine größere Oberfläche für die Moleküle mit entsprechend höherer Anzahl an Bindungsstellen zur Verfügung steht.

### ***Produktivität von einem Satzprozess mit anschließender Aufarbeitung der Nod-Faktoren und dem Bypass-Verfahren***

Um die beiden Herstellungsverfahren zur Gewinnung von Nod-Faktoren mit integrierter Adsorptionskolonne und mit nachgeschalteter Aufkonzentrierung der LCOS zu vergleichen, wurden die Raumzeitausbeuten für beide Verfahren berechnet.

Im Vergleich zu der bisher durchgeführten Fermentation mit nachgeschalteter Aufarbeitung konnte durch den neu entwickelten Prozess mit integrierter Adsorptionskolonne die Verfahrenszeit um 29,75 h verkürzt werden, was einer Zeitersparnis von 26,3 % entspricht. Im herkömmlichen Satzverfahren wurden 823 mg Produkt an Nod-Faktoren gewonnen, im Bypass-Verfahren konnten in einer kürzeren Gesamtverfahrensdauer 610 mg Nod-Faktoren, das entspricht 74,1 % der Produk-



#### 4 Ergebnisse und Diskussion

tausbeute im herkömmlichen Verfahren, gewonnen werden. Mit den Zeiten aus **Tabelle 4.2** ergeben sich für die beiden Verfahren nach Gleichung 4.13 folgende Raumzeitausbeuten:

$$Pr = \frac{[NF_{\text{gebildet}}]}{V_{\text{Reaktor}} \cdot \Delta t_{\text{Verfahren}}} \quad \text{(Gleichung 4.13)}$$

$$Pr_{\text{Bypass}} = \frac{[610 \text{ mg NF}]}{20 \text{ L} \cdot 83,25 \text{ h}} = 0,366 \text{ mg NF} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \quad \text{(Gleichung 4.13, a)}$$

$$Pr_{\text{Satz}} = \frac{[823 \text{ mg NF}]}{20 \text{ L} \cdot 113 \text{ h}} = 0,364 \text{ mg NF} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \quad \text{(Gleichung 4.13, b)}$$

**Tabelle 4.2** Vergleich der benötigten Zeiten für die einzelnen Verfahrensschritte bei der Produktion von Nod-Faktoren im Satzprozess mit nachgeschalteter Adsorption der LCOS und mit der integrierten Adsorptionskolonne

Verfahrensschritt	Dauer der Verfahrensschritte, $t$ [ h ]	
	Satzprozess+Aufarbeitung	In-Prozess-Adsorption
Vorbereitung (Befüllen Fermenter, Sterilisieren, Anzucht Vorkultur u.a.)	20	
Fermentation	41,5	41,75
Zweistufige Filtration der Fermentationslösung	6	0 (nicht notwendig)
Adsorption Nod-Faktoren an Amberlite XAD-2 pract.	24 (mit Adsorptionskolonne)	0 (in den Fermentationsprozess integriert)
Waschen des Harzes in der Säule + Elution der Nod-Faktoren	1	
Einengung des Eluats am Rotationsverdampfer	0,5	
Lyophilisation Rohprodukt	20	
$\Sigma$	<b>113</b>	<b>83,25</b>

Aus dem Vergleich der Raumzeitausbeuten wird deutlich, dass mit der Integration des Adsorptionsschritts in die Fermentation trotz der noch suboptimalen Bedingungen und der geringeren Produktausbeute die Produktivität des bisherigen Satzverfahrens bereits leicht überschritten wird, wie die **Gleichungen 4.12 a + b** zeigen. Mit dem Einsatz einer größer dimensionierten Adsorptionskolonne, einer daraus resultierenden größeren Füllmenge an Amberlite® XAD-2 pract. in der Säule und einer längeren Laufzeit des Adsorptionskreislaufs liesse sich die Produktausbeute erheblich steigern und würde den Produktivitätsvorteil des neuen Verfahrens gegenüber dem bisher durchgeführten Satzprozess mit nachgeschalteter Aufreinigung der Nod-Faktoren signifikant erhöhen.

Außerdem muss berücksichtigt werden, dass durch das integrierte Verfahren der apparative Aufwand reduziert wurde, da auf die Filtration der Fermentationsbrühe verzichtet werden konnte. Dadurch konnte eine weitere Kostenoptimierung des Herstellungsprozesses von Nod-Faktoren erreicht werden.

### **4.3.7 *Aufreinigung von Nod-Faktor-Lyophilisaten mittels präparativer RP<sub>18</sub>-Chromatographie***

Mit der präparativen RP<sub>18</sub>-HPLC sollte das von dem Adsorberharz eluierte, eingeeingte und lyophilisierte Nod-Faktor-Rohprodukt aus dem Satzprozess mit zugeschalteter Adsorptionskolonne in einem präparativen Chromatographieschritt weiter aufgereinigt werden. Im Hinblick auf eine großtechnische Anwendung wurde Methanol (MeOH) als Eluent gewählt, da dieses Lösungsmittel in der Herstellung preiswerter und im Vergleich zur Alternative Acetonitril weitaus weniger toxisch ist. Für die Chromatographie wurden 25 mg Lyophilisat in 2 mL 30 % (v/v) MeOH / H<sub>2</sub>O gelöst und mit einer 2 mL Einwegspritze über einen Luer-Adapter am Säuleneingang auf die Chromatographiesäule appliziert. In der präparativen RP<sub>18</sub>-HPLC wurden die Bestandteile des Lyophilisats aufgetrennt und die aus dem Probenstrom aufgefangenen Fraktionen von 34 min - 58 min wurden in der analytischen RP<sub>18</sub>-HPLC untersucht.

Das Chromatogramm in **Abbildung 4.59** der präparativen Aufreinigung eines Lyophilisats zeigte im Bereich von 40 - 60 Minuten drei deutlich voneinander getrennte Peaks. Um die Qualität dieser Auftrennung von Nod-Faktoren und den noch im Lyophilisat vorhandenen Begleitstoffen zu beurteilen und um die Peaks einzugrenzen, in denen Nod-Faktoren enthalten sind, wurden die Fraktionen innerhalb des markierten Zeitfensters in **Abbildung 4.59** in der analytischen RP<sub>18</sub>-HPLC untersucht. Für die Analyse der einzelnen Fraktionen aus der präparativen RP<sub>18</sub>-HPLC wurden aus den 12 mL Volumen je 700 µL in ein Schraubglasgefäß abgefüllt und diese im Anschluss in der analytischen RP<sub>18</sub>-HPLC aufgetrennt.

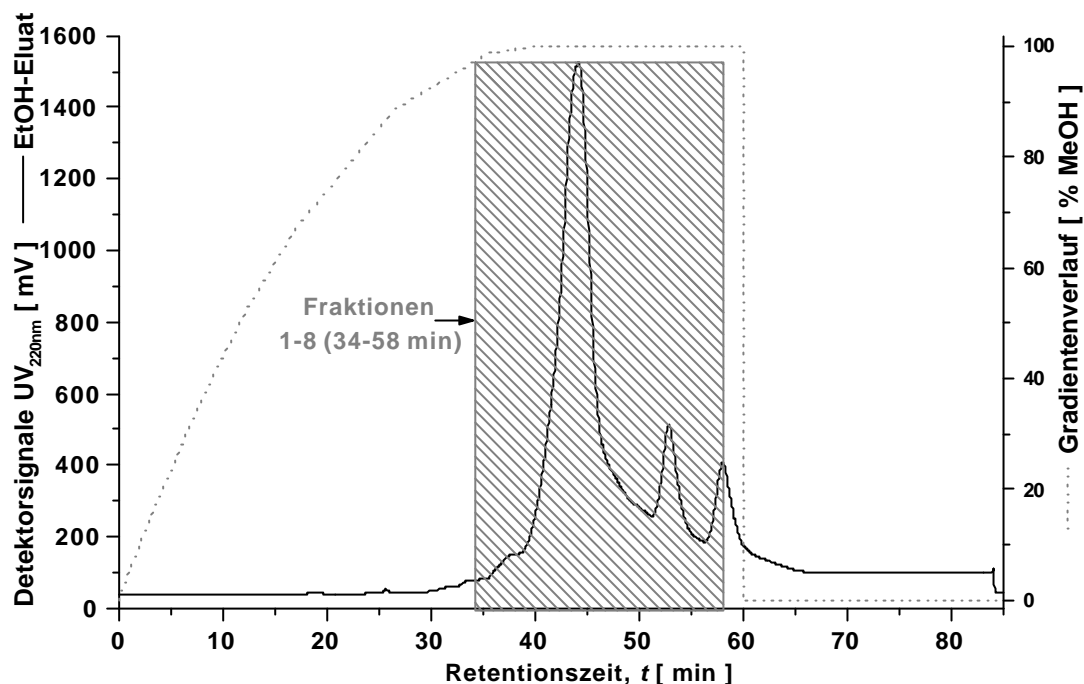
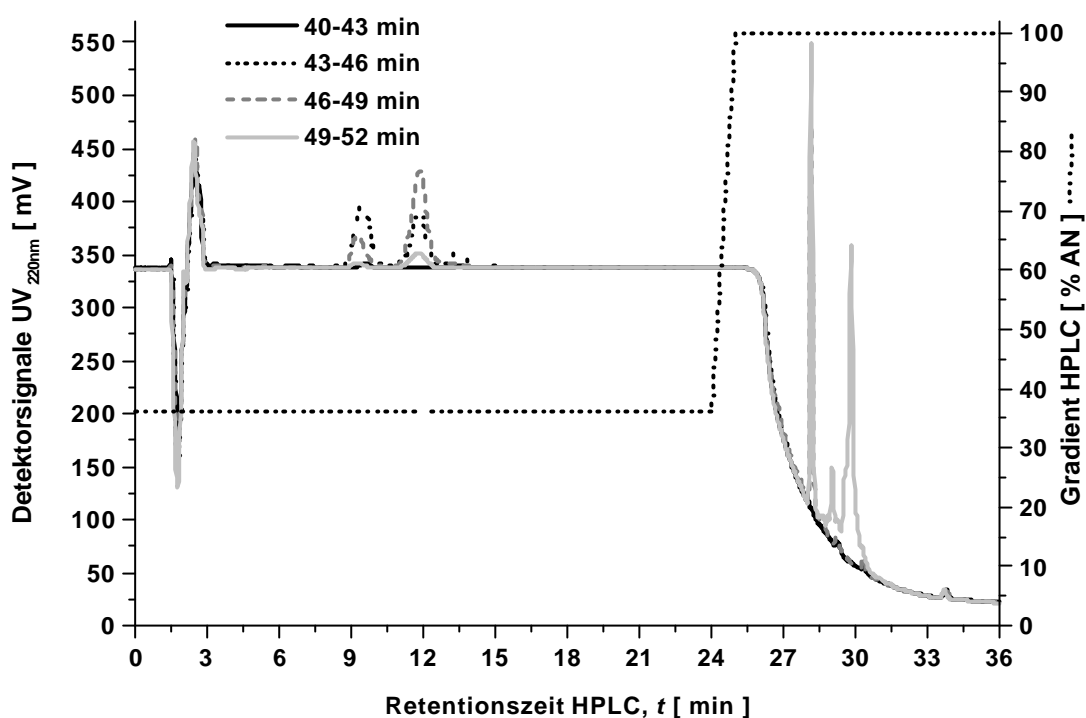


Abbildung 4.59

Präparative RP<sub>18</sub>-HPLC eines Nod-Faktor-Rohprodukts (Lyophilisat) aus einem Satzprozess mit zugeschalteter Adsorptionskolonne. Der markierte Bereich zeigt das Zeitfenster, in dem Proben (je 12 mL Vol.) vom Fraktions-sammler aus dem Probenstrom der präparativen Chromatographie für die analytische RP<sub>18</sub>-HPLC aufgefangen wurden

Die **Abbildung 4.60** zeigt die Fraktionen von 40 - 52 min, in der Nod-Faktoren nachgewiesen werden konnten. In den anderen aufgefangenen Fraktionen waren im Bereich von 7,5 min bis 17 min (Peaks der Nod-Faktoren) keine Peaks detektierbar. In der Probe 49 min - 52 min waren neben hydrophoberen Nod-Faktoren bereits große Peaks im Bereich der Retentionszeiten von 28 min – 31 min vorhanden, die auf lipophile Begleitstoffe in dem Lyophilisat hinweisen, wie das Chromatogramm dieser Fraktion zeigt. Daraus folgt, dass die Zielprodukte, die von *S. meliloti* 1021pEK327 synthetisierten LCOS, aus dem Probenstrom der präparativen RP<sub>18</sub>-HPLC innerhalb des Zeitfensters von 40 min - 50 min isoliert werden sollten. Dieser Bereich entspricht präzise dem Peak, der im Chromatogramm aus **Abbildung 4.59** unter den beschriebenen Elutionsbedingungen sein Maximum bei 45 min besitzt.



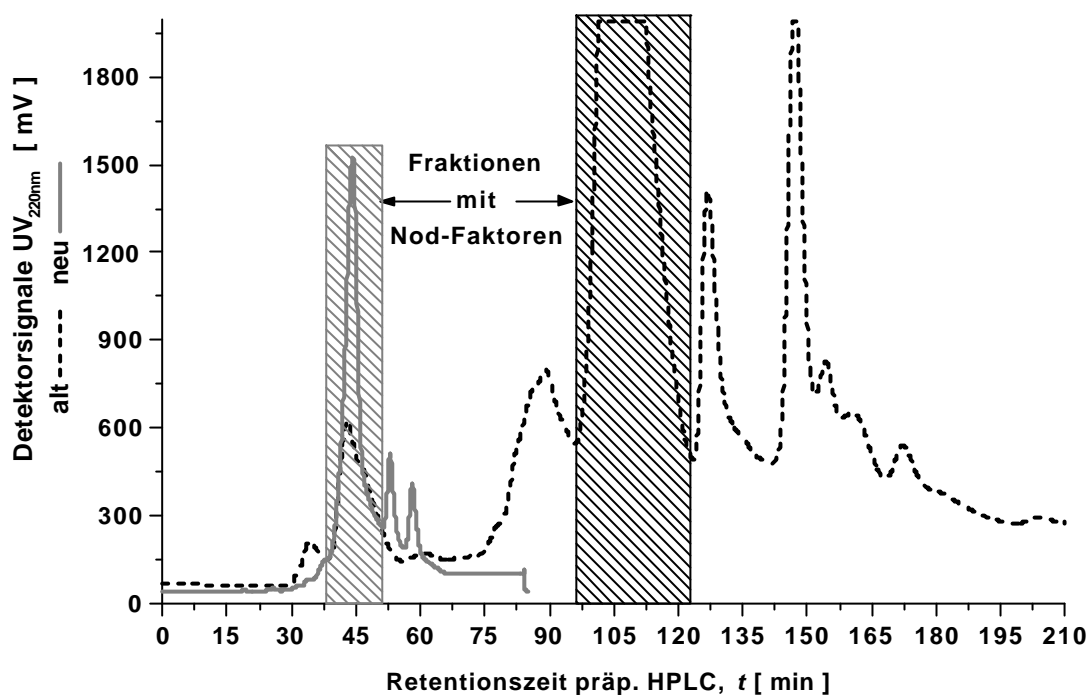
**Abbildung 4.60** Chromatogramme der Fraktionen 40 - 52 min aus der präparativen RP<sub>18</sub>-HPLC (s. **Abbildung 4.59**)

### **Vergleich der Methoden zur Aufreinigung von Nod-Faktoren**

Die Gegenüberstellung des bisher angewandten Chromatographieverfahrens zur Aufreinigung von Nod-Faktoren aus den Eluaten des Adsorberharzes Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 pract. zu der in dieser Arbeit gezeigten Aufreinigungsmethode von Glykolipiden in der präparativen Chromatographie sollte aufzeigen, ob und welche Vorteile der konvexe Gradient aus MeOH - H<sub>2</sub>O gegenüber dem bisher in der präparativen RP<sub>18</sub>-Chromatographie genutzten linearen Eluentengradienten mit den gleichen Lösungsmitteln aufweist.

Im Vergleich zum bisher verwendeten Chromatographieverfahren (Kohring, 1995 a) konnte mit dem konvexen MeOH-Gradienten die Prozesszeit von 210 min auf 85 min um 59,5 % reduziert werden, wie in **Abbildung 4.61** zu sehen ist. Trotz eines höheren Volumenstroms von  $V = 4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  im Gegensatz zum Verfahren des linearen MeOH-Gradienten mit  $V = 2,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  konnten aufgrund der erheblich kürzeren Auftrennungszeit gleichzeitig 34 % an Lösungsmitteln ( $V_{L\ddot{o}mi} = 340 \text{ mL}$ , neu) gegenüber  $V_{L\ddot{o}mi} = 525 \text{ mL}$  (alt) eingespart werden. Die Trennleistung war mit dem konvexen Gradienten zufriedenstellend, wie die Chromatogramme aus **Abbildung 4.59** belegen. Allerdings wies das Rohprodukt (Lyophilisat), das in dem neuen Aufreinigungsverfahren eingesetzt wurde, aufgrund der optimierten Verfahrensschritte vor der präparativen RP<sub>18</sub>-Chromatographie, bereits eine weitaus geringere Menge an Verunreinigungen auf als jenes Substanzgemisch, das in dem bisher

genutzten präparativen Chromatographieverfahren eingesetzt wurde, wie aus **Abbildung 4.61** deutlich wird.



**Abbildung 4.61**

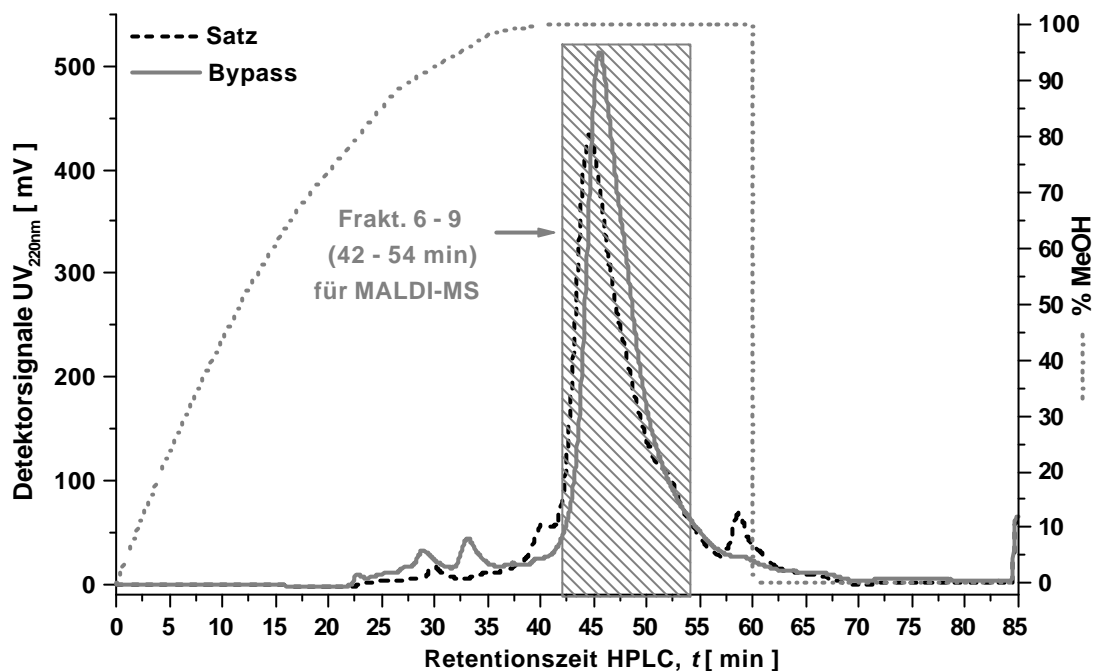
Vergleich von alter und neuer präparativer Chromatographie-Methode zur Aufarbeitung von Nod-Faktoren. Die markierten Bereiche geben die Fraktion des Probenstroms an, in denen mittels analytischer RP<sub>18</sub>-HPLC Nod-Faktoren nachgewiesen werden konnten.

#### 4.3.8 **Analyse der Produkte aus einem Satzprozess mit nachfolgender Aufreinigung und einem Bypass-Verfahren**

Für eine vergleichende Analyse der gewonnenen Nod-Faktoren aus Satz- und Bypass-Verfahren in massenspektrometrischen Untersuchungen wurden die Lyophilisate beider Herstellungsprozesse in der präparativen RP<sub>18</sub>-Chromatographie weiter aufgereinigt. Dafür wurden je 10,2 mg Rohprodukt in 2 mL 30 % (v/v) MeOH-Eluent gelöst. Die Lösung wurde mittels 2 mL Einmal-Kanüle über einen Luer-Adapter auf eine präparative RP<sub>18</sub>-Säule mit einem I.D. von 10 mm und einem Bettvolumen der C<sub>18</sub>-Matrix von 120 mL injiziert. Dem Probenstrom ( $V = 4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) beider Chromatographien wurden zwischen 42 min und 54 min 12 mL Fraktionen entnommen.

Die Chromatogramme der Lyophilisate aus den beiden Aufbereitungsverfahren in **Abbildung 4.62** zeigen einen ähnlichen Verlauf. Neben den großen Peaks mit einem Peakmaximum bei 44'30" und 45'36", die eine Elution der Nod-Faktoren signalisieren, erscheinen in den Chromatogrammen beider Produkte nur 2 bzw. 3 andere Peaks. Diese weisen auf geringe Mengen an verunreinigenden Substanzen

im Rohprodukt hin, wie sie auch in den Chromatogrammen der **Abbildung 4.59** zu sehen sind. Das Peak-Maximum des Nod-Faktor-Peaks beim Lyophilisat, das aus dem konventionellen Satzprozess (Peakmaximum: 44,5 min) gewonnen wurde, liegt 66 s vor dem Maximum des Chromatogramms vom Rohprodukt aus der Bypassfermentation (45,6 min).



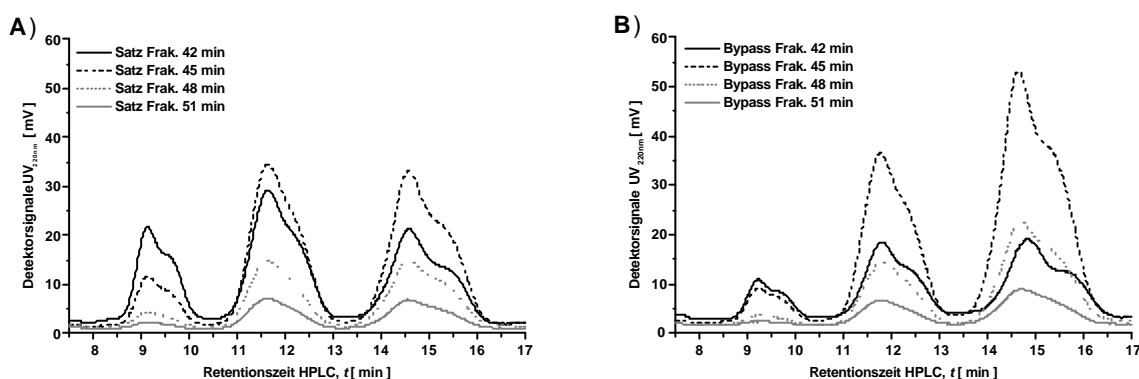
**Abbildung 4.62** Vergleich der präparativen Chromatographie von Lyophilisaten aus einem Satzprozess mit nachgeschalteter Aufarbeitung (Satz) und aus einer Fermentation mit integrierter Adsorptionskolonne (Bypass). Das Zeitfenster, in dem Fraktionen aus dem Probenstrom gesammelt wurden, entspricht dem markierten Bereich der Chromatogramme.

Die Peakverschiebung kann mit dem höheren Anteil hydrophiler Moleküle in dem Lyophilisat erklärt werden, die aus dem Adsorptionsprozess mit dem ultrafiltrierten Fermentationsüberstand eines Satzprozesses gewonnen wurden. Da die hydrophilen Nod-Faktoren vorzeitiger von der präparativen  $C_{18}$ -Säule eluieren, aber in der präparativen HPLC mit einem MeOH-Gradienten eine Auftrennung der verschiedenen Nod-Faktoren nicht erfolgte, führte ein größerer Anteil hydrophiler Nod-Faktoren im Probenstrom zu der beobachteten Verschiebung des Peak-Maximums zu kürzeren Retentionszeiten bei der Probe aus dem Satzprozess.

Die Fraktionen, die in dem Zeitfenster der präparativen  $RP_{18}$ -Chromatographie (**Abbildung 4.62**; grauer Kasten) gesammelt wurden, sollten in der analytischen  $RP_{18}$ -HPLC untersucht werden, um aus der Menge aller Proben die Fraktionen beider Chromatographien zu ermitteln, die für eine genaue Produktanalyse der Nod-Faktoren in der Massenspektrometrie charakterisiert werden sollten. Dazu wurden je

700  $\mu\text{L}$  der einzelnen 12 mL Fraktionen aus beiden Fermentationsverfahren auf die analytische  $\text{RP}_{18}$ -Säule injiziert.

Die Analyse der einzelnen Fraktionen aus der präparativen Chromatographie der beiden Lyophilisate in der  $\text{RP}_{18}$ -HPLC verdeutlicht, dass bei der Integration der Adsorption von Nod-Faktoren an Amberlite® XAD-2 pract. in den Fermentationsprozess die Adsorption lipophilerer Nod-Faktoren mit einer höheren Ausbeute erfolgte und diese damit in dem Rohprodukt in größerer Menge nachgewiesen werden konnten, wie **Abbildung 4.63, B** zeigt. Aus der Kalkulation der einzelnen Peakflächen der Chromatogramme (Fraktionen 42 - 54 min) für das Lyophilisat aus dem Bypass-Verfahren ergab sich ein Verhältnis von 1 : 0,58 : 0,11 ( $\Sigma A_{\text{Peak}14'38'} = 7.567,77$  mVs;  $\Sigma A_{\text{Peak}11'47'} = 4.456,55$  mVs und  $\Sigma A_{\text{Peak}9'12'} = 865,96$  mVs), werden die Flächen der Peaks mit vergleichbaren Retentionszeiten aller Fraktionen addiert. Bei der Analyse der gleichen Fraktionen (42 – 54 min) für das Lyophilisat, das aus der Fermentation mit nachgeschalteter Adsorption von LCOS an Amberlite® XAD-2 pract. eines Satzprozess stammte und deren Chromatogramme in **Abbildung 4.63, A** dargestellt sind, waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Peakflächensummen deutlich geringer (1 : 0,97 : 0,31) mit  $\Sigma A_{\text{Peak}14'38'} = 5.598,32$  mVs,  $\Sigma A_{\text{Peak}11'47'} = 5.454,71$  mVs und  $\Sigma A_{\text{Peak}9'12'} = 1.744,43$  mVs.



**Abbildung 4.63**

Vergleich von Chromatogrammen einzelner Fraktionen aus dem Probenstrom der präparativen  $\text{RP}_{18}$ -HPLC eines Lyophilisats, gewonnen aus einem Satzprozess von *S. meliloti* 1021pEK327 mit nachgeschalteter Adsorption der Nod-Faktoren (A) und einem Bypass-Verfahren mit einer in den Fermentationsprozess integrierten Adsorptionskolonne (B).

Die unvollständigere Auftrennung der einzelnen Nod-Faktor-Peaks bei allen Chromatogrammen in **Abbildung 4.63, A + B** im Vergleich zu **Abbildung 3.2** resultiert aus dem  $\text{MeOH} / \text{H}_2\text{O}$ -Gemisch, in dem sich die Lipochitooligosaccharide nach der präparativen Chromatographie befanden und der hohen Konzentration an Nod-Faktoren in den Proben, die auf die analytische Chromatographiesäule injiziert wurde. Beides beeinflusste das Retentionsverhalten der LCOS negativ und führte zu der beobachteten, unzureichenden Auftrennung der einzelnen Nod-Faktor-Peaks bei der Analyse der Proben. Da in den Chromatogrammen aller Fraktionen von 42 - 54 min bei den Lyophilisaten aus Satz- und Bypassfermentation in der analytischen

RP<sub>18</sub>-HPLC Nod-Faktoren nachgewiesen werden konnten, wie **Abbildung 4.63, A + B** zeigte, erfolgte eine weiterführende Analyse dieser Proben in der MALDI-ToF-Massenspektrometrie, die aufklärende Daten über die in den Fraktionen enthaltenen Nod-Faktoren-Strukturen liefern sollte.

#### ***Massenspektrometrie von Nod-Faktoren aus dem Satzprozess mit nachgeschalteter Aufarbeitung und dem Bypass-Verfahren***

Mit der massenspektrometrischen Analyse sollte geklärt werden, ob sich in Abhängigkeit vom angewandtem Produktions- und Aufarbeitungsverfahren qualitative Unterschiede im Spektrum der von *S. meliloti* 1021pEK327 synthetisierten Nod-Faktoren ergeben. Dazu wurden die Fraktionen aus der präparativen C<sub>18</sub>-Chromatographie von den Lyophilisaten, die aus einem ultrafiltrierten Fermentationsüberstand eines Satzprozesses mit nachgeschalteter Aufreinigung und aus einem Herstellungsprozess von Nod-Faktoren mit integrierter Adsorptionskolonne (Bypass-Fermentation) stammten, im MALDI-ToF-Massenspektrometer miteinander verglichen. Da es bei der Beschleunigung von Molekülen im Massenspektrometer zum Teil auch zum Auseinanderbrechen der zu untersuchenden Substanzen kommt, sind in **Abbildung 4.64** neben den Nod-Faktoren-Massenzahlen auch denkbare Molekülbruchstücke und die dazugehörigen Massenzahlen aufgeführt.



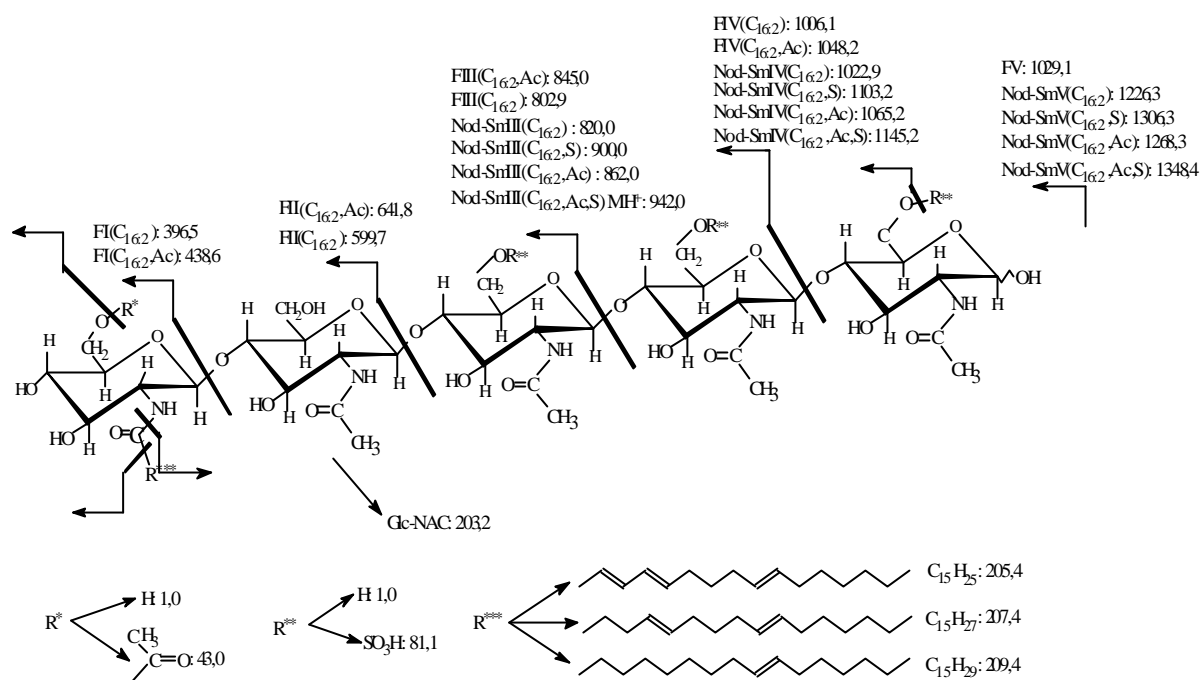


Abbildung 4.64

Darstellung möglicher Fragmentierungsstellen von Nod-Faktoren bei der MALDI-ToF-Massenspektrometrie und die entsprechenden, kalkulierten Molekülmassen der Fragmente und der Nod-Faktoren. Denkbare Bruchstellen der Moleküle sind durch die mit Pfeilen verbundenen Balken gekennzeichnet.

Die Messungen der Proben aus der Fermentation mit integrierter Adsorptionskolonne und dem Satzprozess mit nachgeschalteter Aufreinigung des ultrafiltrierten Fermentationsüberstandes ergaben im MALDI-TOF Massenspektrometer nahezu identische Massenspektren, wie in den **Abbildung 4.65 + 4.66** zu sehen ist. Aus der vergleichenden Auflistung der gemessenen Massenzahlen in der **Tabelle 4.3** geht hervor, dass es nur fünf Massenzahlen von Nod-Faktoren oder Nod-Faktor-Fragmenten gab, die in nur einem der beiden Massenspektren auftraten. Alle für diesen Stamm beschriebenen Nod-Faktoren (Roche *et al.*, 1991; Schultze *et al.*, 1992) wurden in den untersuchten Fraktionen Nr. 8 (48 – 51 min) der beiden Produkte wiedergefunden.

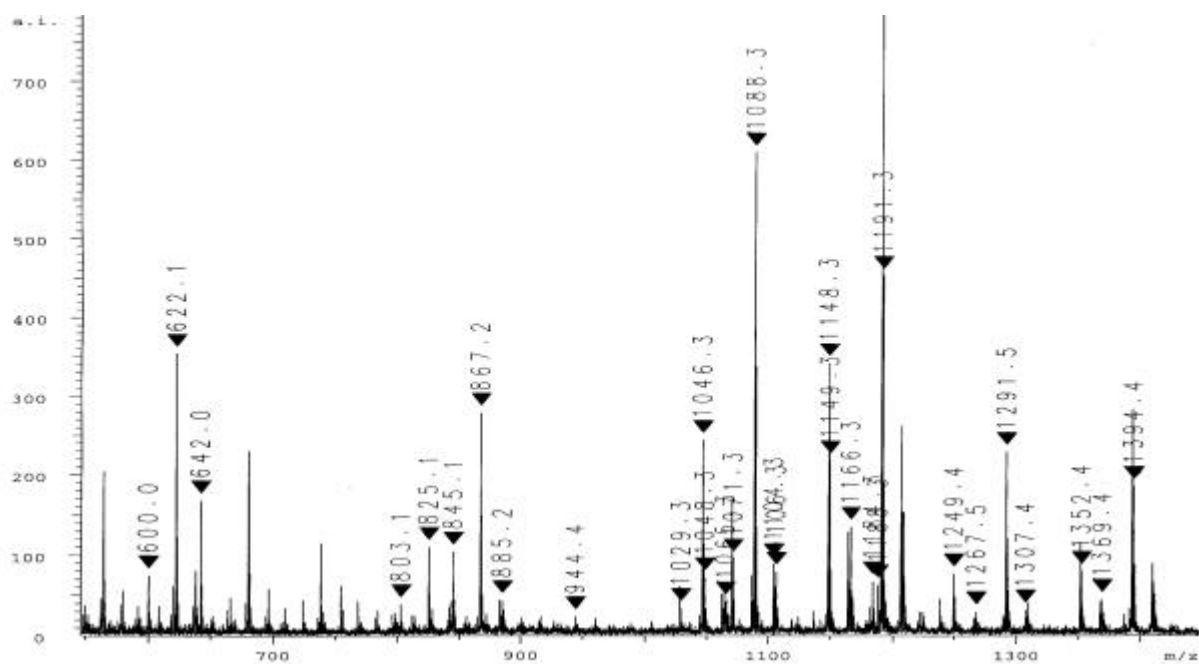


Abbildung 4.65

Massenspektrum der Fraktion 8 (48 - 51 min; s. präp. Chromatographie, **Abbildung 4.63, A**) aus der Satzfermentation mit nachgeschalteter Aufreinigung. Massenpeaks, denen eine Nod-Faktor-Struktur, die Struktur eines Vorstufen-(Precursor-)moleküls oder Nod-Faktor-Fragments zugeordnet werden kann, sind mit einem Pfeil markiert (s. **Tabelle 4.3**).

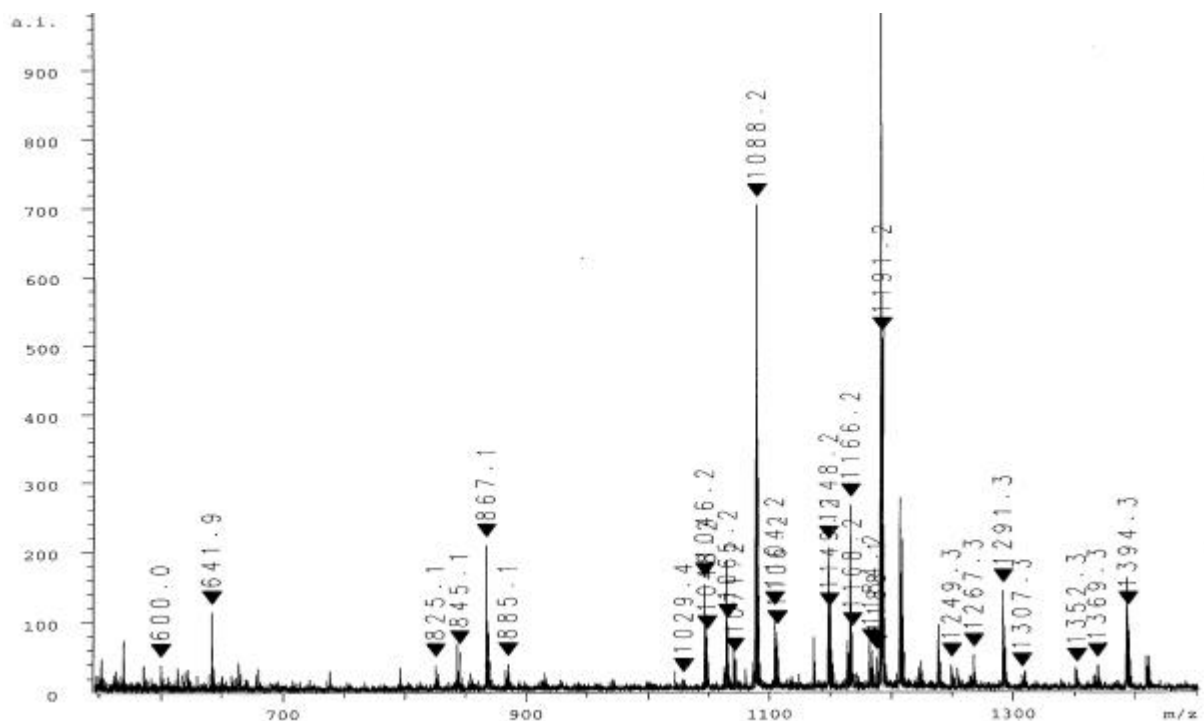


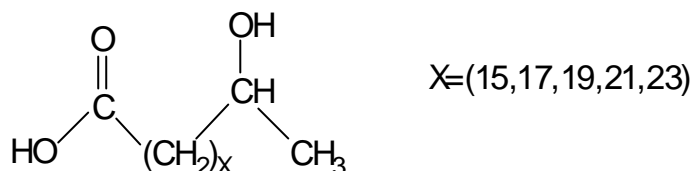
Abbildung 4.66

Massenspektrum der Fraktion 8 (48 - 51 min; s. präp. Chromatographie, **Abbildung 4.63, B**) aus der Fermentation mit zugeschalteter Adsorptionssäule. Massenpeaks, denen eine Nod-Faktor-Struktur, die Struktur eines Vorstufen-(Precursor-)moleküls oder Nod-Faktor-Fragments zugeordnet werden kann, sind mit einem Pfeil markiert (s. **Tabelle 4.3**).

**Tabelle 4.3** Zuordnung aufgetretener Massenpeaks zu den kalkulierten Molekülmassen von den verschiedenen Nod-Faktoren und möglichen Fragmenten. **F** = Fragment eines Nod-Faktor-Moleküls; die Bezeichnung der Fragmente folgt den gleichen Regeln wie in der Nomenklatur für Nod-Faktoren (s. Einleitung) **MH<sup>+</sup>** = protoniertes Molekül. **Na<sup>+</sup>**, **Ca<sup>+</sup>**, **K<sup>+</sup>**: Ionen, die bei der Massenspektrometrie als Verunreinigung mit den Nod-Faktor-Molekülen mitbeschleunigt wurden. Grau unterlegt sind in der Tabelle die Zeilen, in denen die kalkulierte Molmasse um mehr als 0,35 Masseneinheiten von den bestimmten Massen abweichen.

Aufgetretener Massen-Peak bei Molmasse [g·mol <sup>-1</sup> ]		Zugeordnete Moleküle oder Molekülfragmente (s. Abbildung 4.64)	Kalkulierte Masse [g·mol <sup>-1</sup> ]
Ferm. mit Bypass	Ferm. ohne Bypass		
600,0	600,0	F-II(C <sub>16:2</sub> )	599,74
---	622,1	F-II(C <sub>16:2</sub> ) + Na <sup>+</sup>	622,72
641,9	642,0	F-II(C <sub>16:2</sub> ,Ac)	641,77
---	803,1	F-III(C <sub>16:2</sub> )	802,93
825,1	825,1	F-III(C <sub>16:2</sub> ) + Na <sup>+</sup>	825,91
845,1	845,1	F-III(C <sub>16:2</sub> ,Ac)	844,97
867,1	867,2	F-III(C <sub>16:2</sub> ,Ac) + Na <sup>+</sup>	867,96
885,1	885,2	NodSm-III(C <sub>16:2</sub> ,Ac) + Na <sup>+</sup>	884,96
---	944,4	NodSm-III(C <sub>16:1</sub> ,Ac,S)	944,05
1029,4	1029,3	F-IV(C <sub>16:2</sub> ) + Na <sup>+</sup>	1029,11
1046,2	1046,3	F-IV(C <sub>16:3</sub> ,Ac)	1046,15
		NodSm-IV(C <sub>16:2</sub> ) + Na <sup>+</sup>	1046,12
1048,2	1048,3	F-IV(C <sub>16:2</sub> ,Ac)	1048,16
		NodSm-IV(C <sub>16:1</sub> ,Ac,S)	1048,14
1065,2	1065,3	NodSm-IV(C <sub>16:2</sub> ,Ac)	1065,17
1071,2	1071,3	F-IV(C <sub>16:2</sub> ,Ac) + Na <sup>+</sup>	1071,15
1088,2	1088,3	NodSm-IV(C <sub>16:2</sub> ,Ac) + Na <sup>+</sup>	1088,16
1104,2	1104,3	NodSm-IV(C <sub>16:2</sub> ,S) MH <sup>+</sup>	1104,20
1106,2	1106,3	NodSm-IV(C <sub>16:1</sub> ,S) MH <sup>+</sup>	1106,22
1148,2	1148,3	NodSm-IV(C <sub>16:1</sub> ,Ac,S) MH <sup>+</sup>	1148,24
1149,2	1149,3	NodSm-IV(C <sub>16:2</sub> ,S) + 2 Na <sup>+</sup>	1149,17
1166,2	1166,3	NodSm-IV(C <sub>16:3</sub> ,Ac,S) + Na <sup>+</sup>	1166,06
1168,2	---	NodSm-IV(C <sub>16:2</sub> ,Ac,S) + Na <sup>+</sup>	1168,15
1184,2	1184,3	NodSm-IV(C <sub>16:2</sub> ,Ac,S) + K <sup>+</sup>	1184,26
1188,1	---	NodSm-IV(C <sub>16:1</sub> ,Ac,S) + Ca <sup>+</sup>	1187,31
1190,2	1190,3	NodSm-IV(C <sub>16:3</sub> ,Ac,S) + 2 Na <sup>+</sup>	1189,12
1191,2	1191,3	NodSm-IV(C <sub>16:2</sub> ,Ac,S) + 2 Na <sup>+</sup>	1191,14
1249,3	1249,4	NodSm-V(C <sub>16:2</sub> ) + Na <sup>+</sup>	1249,24
1267,3	1267,5	NodSm-V(C <sub>16:3</sub> ,Ac) MH <sup>+</sup>	1267,28
1291,3	1291,5	NodSm-V(C <sub>16:2</sub> ,Ac) + Na <sup>+</sup>	1291,28
1307,3	1307,4	NodSm-V(C <sub>16:2</sub> ,S) MH <sup>+</sup>	1307,32
1352,3	1352,4	NodSm-V(C <sub>16:2</sub> ,S) + 2 Na <sup>+</sup>	1352,29
1369,3	1369,4	NodSm-V(C <sub>16:3</sub> ,Ac,S) + Na <sup>+</sup>	1369,32
1394,3	1394,4	NodSm-V(C <sub>16:2</sub> ,Ac,S) + 2 Na <sup>+</sup>	1394,33

Die massenspektrometrischen Analysen der Fraktionen aus der präparativen RP<sub>18</sub>-Chromatographie bestätigten damit, dass das von *S. meliloti* 1021pEK327 synthetisierte Spektrum an Nod-Faktoren nicht von dem in dieser Arbeit gezeigten Verfahren zur Gewinnung und adsorptiven Abreicherung der LCOS aus der Fermentationslösung beeinflusst wird. Wie allerdings in der analytischen RP<sub>18</sub>-HPLC (s. **Abbildung 4.63, A + B**) gezeigt werden konnte, ist die quantitative Verteilung der verschiedenen Nod-Faktoren in den Lyophilisaten beider Herstellungsverfahren unterschiedlich.



**Abbildung 4.67** Chemische Struktur von ( $\omega$ -1) hydroxylierten Fettsäuren

In keinem der aufgenommenen Massenspektren von Nod-Faktor-Proben aus *S. meliloti* 1021pEK327-Kulturen konnten Hinweise für die Synthese von LCOS mit ( $\omega$ -1) hydroxylierten Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 18 - 26 Kohlenstoffatomen, die in **Abbildung 4.67** dargestellt sind, oder Massenzahlen für Fettsäureketten mit einem entsprechenden Molekülaufbau gefunden werden, wie sie von Demont (Demont *et al.*, 1994) postuliert wurden. Demont *et al.* hatten ein multi-copy Plasmid mit den Genen *nodD3* und *syrM* p(MH682) in verschiedene *S. meliloti* Stämme aus Nordamerika, Nordafrika, Zentraleuropa und Australien eingebracht und diese gentechnisch veränderten Stämme sekretierten dann verstärkt Nod-Faktoren mit ( $\omega$ -1) hydroxylierten Fettsäuren. Insbesondere die vermehrte Expression des Transkriptionsaktivators *nodD3* sollte die Synthese dieser besonders strukturierten Nod-Faktoren fördern.

Auch die Cosmid-Vektoren pEK327 des in dieser Arbeit verwendeten Nod-Faktor-Produktionsstamms Sm1021 besitzen wie die Vektoren von Demont (Demont *et al.*, 1994) neben den *hsn*-Genen je eine Kopie von *nodD3* und *syrM* auf dem Plasmid. Von den Cosmid-Vektoren pEK327 finden sich im Durchschnitt aber nur 5 - 10 Kopien in den transfizierten Zellen von Sm1021 wieder. Ob allein die weit höhere Kopienzahl des Plasmids p(MH682) in den von Demont transformierten Bodenbakterien die Synthese der ( $\omega$ -1)-Fettsäuren beeinflusst, bleibt aufzuklären. Dies liefert nur eine exakte Analyse der Nod-Faktor-Fettsäuren, die von transformierten Sinorhizobien-Stämmen mit dem Cosmid-Vektor pEK327 synthetisiert werden.

### 5 Zusammenfassung und Ausblick

Das Bodenbakterium *Sinorhizobium meliloti* hat schon seit vielen Jahrzehnten als stickstofffixierendes Bakteroid in der Symbiose mit der Futterpflanze Luzerne (Alfalfa; *Medicago sativa*) eine große Bedeutung für die Landwirtschaft Argentiniens und Uruguays. Doch die Erträge bei dem Anbau der Futterpflanze für die Viehzucht in beiden Ländern sank in den vergangenen Jahren in einem starken Maß auf Grund veränderter Umweltbedingungen, insbesondere aber durch den steigenden Säuregehalt der Anbauflächen. Die Effekte eines sauren Milieus auf *S. meliloti* und die Entwicklung eines Verfahrens zur Produktion von säuretoleranten Starterkulturen aus Bodenbakterien bildeten zwei Schwerpunkte dieser Arbeit. Außerdem wird den vom Bodenbakterium *S. meliloti* synthetisierten und sekretierten Lipochitooligosacchariden, den Nodulationsfaktoren, neben ihrer Funktion bei der Etablierung der Symbiose mit der Luzerne auch in Nicht-Wirtssystemen von Pflanzen und Tieren eine immer größere Rolle zugemessen. Im dritten Teil dieser Arbeit wurde deshalb ein Fermentationsverfahren mit einem integrierten Adsorptionskreislauf zur Gewinnung der Glykolipide entwickelt.

Die in dieser Arbeit dargestellten Resultate belegen, dass der in Argentinien aus einem Ackerboden mit einem pH von 5,9 isolierte (semi-)säuretolerante Bodenbakterienstamm *S. meliloti* LPU63 sein Verhalten in Abhängigkeit von Anstieg des Säuregehalt in seiner Umgebung radikal umstellt. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer satzweisen Kultivierung des Bodenbakteriums *S. meliloti* LPU63 in einem Mannitol-Minimalmedium mit verschiedenen pH-Werten der Biomassegehalt von  $5,8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  bei einem pH von 7,0 auf nur noch  $1,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $\cong 22 \%$ ) bei einem pH von 5,6 fiel. Außerdem synthetisierte *S. meliloti* LPU63 unter Säurestress bei einem pH-Wert von 5,6 die 11-fach höhere Menge an Nodulationsfaktoren als bei pH 7,0. Die dynamische Viskosität der Fermentationsüberstände von *S. meliloti* LPU63 nahm in Folge einer ansteigenden Konzentration an Exopolysacchariden im Medium bei einem sinkendem pH zu. Sie stieg um den Faktor 2,0 bei einem pH-Wert von 5,6 im Vergleich zur Kultivierung von *S. meliloti* LPU63 unter neutralen Bedingungen.

In vergleichenden, kontinuierlichen Kultivierungen von *S. meliloti* LPU63 und dem Wildtypstamm *S. meliloti* 2011 im Rührkessel konnte bei einer stufenweisen Absenkung des pH-Wertes von 6,8 auf 6,2 in der Fermentationslösung gezeigt werden, dass der *S. meliloti* 2011 nicht über die gleichen Möglichkeiten zur Umstellung seines Lebenszyklus verfügte wie *S. meliloti* LPU63. Weder die Reduzierung seines Wachstums, noch eine stark gesteigerte Synthese der Nod-Faktoren konnte bei *S. meliloti* 2011 in dem Maß festgestellt werden, wie es bei *S. meliloti* LPU63 mit zunehmendem Säurestress in den kontinuierlichen Kultivierungen zu beobachten war. Die Veränderungen, die in Folge des sinkenden pH bei dem Stamm *S. meliloti* LPU63 im Rührkessel beobachtet wurden, sind Belege für Schutzmechanismen, die dieser Stamm entwickelt hat, um sich an das saure Habitat des Ackerbodens anzupassen. Diese Anpassungsfähigkeit ist auch bei anderen, in der Landwirtschaft eingesetzten, Stämmen von *Rhizobien* gefunden worden (Graham *et al.*, 1994).

Zur Produktion von Sinorhizobien-Starterkulturen (Inokula) für die Landwirtschaft haben sich sowohl unbehandelte Zuckerrohr- wie auch Zuckerübenmelassen aus den Produktionsstandorten Argentinien, Brasilien, Deutschland und Uruguay als eine geeignete Basis für ein Kultivierungsmedium

erwiesen. In einem 3%-igen Zuckerrübenmelassemedium wurden bei Zulaufkultivierungen des Stamms *S. meliloti* LPU63 mit einem 10fach-Konzentrat Biomasseausbeuten von  $X = 12,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  bis  $14,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  und Lebendzellzahlen von  $N = 2,5 \cdot 10^{10} \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$  bis  $4,4 \cdot 10^{10} \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$  erzielt. Diese Werte lagen um den Faktor 2 – 2,8 über den Ergebnissen parallel durchgeführter Kultivierungen in einem Trypton-Hefeextrakt-(TY)-Medium und übertrafen auch die Resultate mit anderen Medien für die Starterkulturproduktion von schnellwachsenden *Rhizobien* um das 3 - 6-fache (Gulati, 1980; Boiardi *et al.*, 1985 und Bissonnette *et al.*, 1986).

Besonders auffällig bei den Zulaufkultivierungen von *S. meliloti* LPU63 in einem 3%-igen Zuckerrübenmelassemedium war die verstärkte Exopolysaccharidsynthese und eine starke Agglutination der Sinorhizobien im Vergleich zur Kultivierung der Bodenbakterien im TY-Medium. Das Zulaufverfahren in 3 % (w/v) Zuckerrübenmelasse mit einem nach 19 - 22 h gestarteten, konstanten Zulaufstrom von  $V = 18 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$  eines 10-fach-Melasse-Konzentrats hat sich als praktikable und ertragreiche Zufütterungsstrategie bei der Kultivierung von *S. meliloti* LPU63 im Rührkessel zur Erzielung hoher Biomasseausbeuten erwiesen.

Für eine Extraktion der von *S. meliloti* 1021pEK327 synthetisierten Nodulationsfaktoren aus einer wässrigen Suspension hat sich von den getesteten, sphärischen Adsorptionsmatrices Amberlite® XAD-2 pract., ein Styrol-Divinylbenzol-Copolymer, als das geeignete Material gezeigt. In den Versuchen zur Adsorptionskinetik von Nodulationsfaktoren aus einer wässrigen Lösung an Amberlite® XAD-2 pract. in einem Differenzial-Kreislauf-Adsorber konnte gezeigt werden, dass bei einem Volumenstrom von  $63 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , einer Adsorbensmenge von  $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  und einer Konzentration von  $4 \cdot 10^{-2} \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  Nodulationsfaktoren in 300 mL Flüssigkeitsvolumen 9 h benötigt wurden, bis mehr als 96 % der in der Lösung vorhandenen Glykolipide aus der Lösung extrahiert waren. Die geringe Geschwindigkeit der Adsorption an das lipophile Harz muss vor allem auf den amphipathischen Molekülaufbau der Lipochitooligosaccharide zurückgeführt werden.

In Schüttelkolbenexperimenten von *S. meliloti* 1021pEK327 in Mannitol-Minimalmedium konnte der Nachweis erbracht werden, dass der erste Schritt einer Aufarbeitung der von den Mikroorganismen hergestellten Lipochitooligosacchariden, die Adsorption von Nodulationsfaktoren an ein lipophiles Harz, in einen laufenden Kultivierungsprozess integriert werden konnte. Bei der Übertragung auf den 20 L Pilot-Maßstab erfolgte auf Grund der Ergebnisse in den Schüttelkolbenexperimenten die Zuschaltung des Adsorptionskreislaufs in Satzprozessen von *S. meliloti* 1021pEK327 zur Gewinnung von Nodulationsfaktoren erst in der späten exponentiellen Wachstumsphase nach 21,8 h - 25 h. Von den Bodenbakterien wurde in dieser Fermentation mit der Adsorptionskolonne bis zu 50 % mehr Nodulationsfaktoren von den Mikroorganismen gebildet, obwohl die Menge der Biotrockenmasse am Ende des Satzprozesses mit einem Wert von  $2,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  um 14 % unter den erzielten Werten in einem Satzverfahren ohne integrierte Aufkonzentrierung der Nodulationsfaktoren lag. Eine Ursache für diese verstärkte Produktbildung in diesem Prozess könnte die in der Fermentation aufgetretene Sauerstofflimitierung gewesen sein.

In dem Verfahren mit integrierter Adsorptionskolonne konnten bei einer Bypasslaufzeit von 20 h und einer Gesamtverfahrenszeit von 67,3 h für Fermentation und Aufarbeitung 610 mg an Nodulationsfaktoren Lyophilisat aus den 20 L

Arbeitsvolumen gewonnen werden. Mit dem neu entwickelten Herstellungs- und Aufarbeitungsverfahren durch die Integration des Aufreinigungsschritts in die Fermentation konnte der Verfahrensablauf im Vergleich zu bisherigen Verfahren um 30 h verkürzt werden, was einer Zeitersparnis von 26,3 % entspricht. Der apparative Aufwand wurde gleichzeitig reduziert, da ein bisher benötigter Filtrationsprozess in dem neuen Verfahren entfiel. Die Resultate der massenspektrometrischen Untersuchungen von aufgereinigten Nodulationsfaktoren aus einem herkömmlichen Satzprozess und Fermentationen mit zugeschalteter Adsorptions-Kolonnen belegten, dass von *S. meliloti* 1021pEK327 in beiden Verfahren das gleiche Molekül-Spektrum an Nodulationsfaktoren gebildet wurde.

Die Reduktion des Wachstums und der verstärkte Schutzmantel aus Exopolysacchariden erhöht für *S. meliloti* LPU63 seine Überlebenswahrscheinlichkeit unter ungünstigen Umweltbedingungen im Boden. Durch seine verstärkte Exopolysaccharid- und Nodulations-Faktorensynthese verbessert *S. meliloti* LPU63 außerdem die Chancen bei der Etablierung einer Symbiose mit der Luzerne und sichert Bodenbakterien dieses Stamms damit einen Wettbewerbsvorteil gegenüber anderen Sinorhizobien. Im Hinblick auf die Anwendung in der Landwirtschaft besitzt dieser Stamm zudem eine hohe Stickstofffixierungsleistung (Segundo *et al.*, 1999) und ist somit ein potenzieller Kandidat für die Starter-(Inokula-)kulturen, die auf sauren Ackerböden eingesetzt werden können.

Die hohe Exopolysaccharidsynthese und Agglomeration bei der Zulaufkultivierung in Melassemedien könnten sich als vorteilhaft bei der Ausbringung von *S. meliloti* LPU63 Starterkulturen auf den Ackerboden erweisen, da der gebildete Schleimmantel um die Zellen die Bodenbakterien vor verschiedenen Stressfaktoren wie Säure und Trockenheit schützt und die gebildeten Bakterienaggregate die Überlebenswahrscheinlichkeit im Boden verbessern. Mit einer Optimierung der in dieser Arbeit gezeigten Zufütterungsstrategien in Zulaufkultivierungen von *S. meliloti* LPU63 im Melassemedium könnte nach den vorliegenden Ergebnissen die Produktivität des Prozesses weiter gesteigert werden (Wang *et al.*, 1999). Es bleibt dabei nachzuweisen, ob es bei den bereits erreichten Zelldichten von bis zu  $N = 4,4 \cdot 10^{10}$  cfu·mL<sup>-1</sup> in den Zulaufkultivierungen von *S. meliloti* mit Melassemedien zu einem „quorum sensing“ kommt, und ob ein solcher Effekt noch höhere Biomasseausbeuten verhindern würde.

Weitere Untersuchungen müssen den Nachweis erbringen, ob durch die Sauerstoff limitierenden Bedingungen bei der Satzkultivierung von *S. meliloti* 1021pEK327 die Synthese von Nodulationsfaktoren gesteigert wurde und ob es zu einer Produkt-Inhibierung der Nodulationsfaktoren-Synthese bei *S. meliloti* 1021pEK327 auf Grund der hohen Konzentrationen an Lipochitooligosacchariden in den Zellen und im Medium kommt. Mit einer größer dimensionierten Glassäule, die im Wirbelschichtbetrieb die 3–4-fache Menge an Adsorbens aufnehmen kann, ließen sich nach den Resultaten dieser Arbeit die Ausbeuten der Lipochitooligosaccharide aus einem laufenden Satzprozess zur Gewinnung von Nod-Faktoren mit einer integrierten Wirbelschichtkolonne noch erheblich steigern.

6 *Literaturverzeichnis*

**Aarons, S.R.** und Graham, P.H., (1991), *Response of Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli to Acidity*, Plant and Soil, **134**, 145-151

**Abd El-Salam, M.H.**, Fadel, M.A. und Murad, H.A., (1994), *Bioconversion of Sugarcane Molasses into Xanthan Gum*, J. Biotechnol., **33**, 103-106

**Arcioni, S.**, Damiani, F., Pezotti M. und Lupotto, E., (1990), *Alfalfa, Lucerne (Medicago spp.)*, in: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, **10**, Hrsg. Bajaj, Y.P.S., Springer Verlag, Berlin / Heidelberg / New York, 197-142

**Ardourel, M.**, Demont, N., Debelle, N., Maillet, F., de Billy, F., Promé, J.C., Denarié, J. and Truchet, G., (1994), *Rhizobium meliloti Lipooligosaccharide Nodulation Factors: Different Structural Requirements for Bacterial Entry into Target Root Hair Cells and Induction of Plant Symbiotic Developmental Responses*, The Plant Cell, **6**, 1357-1374

**Atkinson, E.M.** und Long, S.R. (1992), *Homology of Rhizobium meliloti nodC to Polysaccharide Polymerizing Enzymes*, Mol. Plant-Microb. Interact., **5**, 439-442

**Atkinson, E.M.**, Palcic, M.M., Hindsgaul, O. und Long, S.R., (1994), *Biosynthesis of Rhizobium meliloti Lipooligosaccharide Nod Factors: NodA is Required for an N-Acyltransferase Activity*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **91**, 8418-8422

**Baev, N.**, Endre, G., Petrovics, G., Bafalvi, Z. und Kondorosi, A., (1991), *Six Nodulation Genes of nod Box Locus 4 in Rhizobium meliloti are Involved in Nodulation Signal production: nodM Codes for D-Glucosamine Synthase*, Mol. Gen. Genet., **228**, 113-124

**Baev, N.**, und Kondorosi, A., (1992a), *Nucleotide Sequence of the Rhizobium meliloti nodL Gene Located in Locus n5 of the Nod Regulon*, Plant Mol. Biol., **18**, 843-846

**Baev, N.**, Schultze, M., Barlier, I., Dang, C.H., Virelizier, H., Kondorosi, E. und Kondorosi, A., (1992b), *Rhizobium nodM and nodN Genes are Common nod Genes: nodM Encodes Functions for Efficiency of Nod Signal Production and Bacteroid Maturation*, J. Bacteriol., **174**, 7555-7565

**Baier, R.**, Schiene, K., Kohring, B., Flaschel, E. und Niehaus, K., (1999), *Alfalfa and Tobacco Cells Act Differently to Chitin Oligosaccharides and Sinorhizobium meliloti Nodulation Factors*, Planta, **210**, 157-164

**Balatti, A.P.** und Cervellini, M., (1998), *The Use of Industrial Byproducts as Carbon Sources or Growth Factors in the Manufacture of Aqueous Inoculants of Rhizobium and Bradyrhizobium*, in: *Biological Nitrogen Fixation for the 21<sup>st</sup> Century*, Hrsg. Elmerich, C., Kondorosi, A. und Newton, W.E., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 657

**Banfalvi, Z.** und Kondorosi, A., (1989), *Production of Root Hair Deformation Factors by Rhizobium meliloti Nodulation Genes in Escherichia coli: hsnD (nodH) is Involved in the Plant Host-Specific Modification of the NodABC Factor*, Plant Mol. Biol., **13**, 1-12



- Barloy-Hubler, F.**, Capela, D., Barnett, M.J., Kalman, S., Federspiel, N.A., Long, S.R. und Galibert, F., (2000), *High-Resolution Physical Map of the Sinorhizobium meliloti 1021 pSymA Megaplamid*, J. Bacteriol., **182**, 1185-1189
- Bart, H.-J.** und Traving, M., (1998), *Reaktivsorption – Rückgewinnung von Organischen Wertstoffen aus Verdünnten Lösungen*, Chem. Ing. Tech., **70**, 119-120
- Bartels, C.R.**, Kleimann, G., Korzun, J.N. und Irish, D.B., (1958), *A Novel Ion-Exchange Method for the Isolation of Streptomycin*, Chem. Eng. Progr., **54**, 49-51
- Becker, A.**, Niehaus, K. und Pühler, A., (1995), *Low-Molecular-Weight Succinoglucan is Predominantly Produced by Rhizobium meliloti Strains Carrying a Mutated ExoP Protein Characterized by a Periplasmic N-Terminal Domain and a Missing C-Terminal Domain*, Mol. Microbiol., **16**, 191-203
- Becker, H.G.O.**, Dromschke, G., Fanghänel, E., Fischer, M., Gewalt, K., Meyer, R., Pavel, D., Schmidt, H., Schwetlick, K., Berger, W., Faust, J., Gentz, F., Gluch, R., Müller, K., Schollberg, K., Seiler, E., Zeppenfeld, G., Fabian, J., Frach, K., Lohs, K. und Kläsz, (1990), *Organikum*, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin
- Bissonnette, N.**, Lalande, R. und Bordeleau, L.M.(1986), *Large-Scale Production of Rhizobium meliloti on Whey*, Appl. Environm. Microbiol., **52**, 838-841
- Bittner, C.**, Wehnert, G. und Scheper, T., (1998), *In Situ Microscopy for Determination of Biomass*, Biotechnol. Bioeng., **60**, 24-35
- Bloemberg, G.V.**, Thomas-Oates, J.E., Lugtenberg, B.J.J. und Spaink, H.P., (1994), *Nodulation Protein nodL of Rhizobium leguminosarum O-Acetylates Lipo-Oligosaccharides, Chitin Fragments and N-Acetylglucosamine *in vitro**, Mol. Microbiol., **11**, 793-804
- Bloemberg, G.V.**, Lagas, R.M., van Leeuwen, S., Van der Marel, G.A., Van Boom, J.H., Lugtenberg, B.J.J. und Spaink, H.P., (1995), *Substrate Specificity and Kinetic Studies of Nodulation Protein nodL of Rhizobium leguminosarum*, Biochem. **34**, 12712-12720
- Bæckman, O.C.**, Kaarstad, O., Lie, O.H. und Richards, I., (1990), *Agriculture and Fertilizers: Fertilizers in Perspective*, Hrsg. Norsk Hydro, Drammen, 29
- Boiardi, J.L.** und Ertola, R.J., (1985), *Rhizobium Biomass Production in Batch and Continuous Culture with a Malt-Sprouts Medium*, MIRCEN J., **1**, 163-171
- Bonnin, S.**, Besson, F., Gelhausen, M., Chierici, S. und Roux, B., (1999), *A FTIR Spectroscopy Evidence of the Interactions Between Wheat Germ Agglutinin and N-Acetylglucosamine Residues*, FEBS LETT., **456**, 361-364
- Born, C.**, Thömmes, J., Biselli, M., Wandrey, C. und Kula, M.-R., (1996), *An Approach to Integrated Antibody Production: Coupling of Fluidized Bed Cultivation and Fluidized Bed Adsorption*, Bioproc. Eng., **15**, 21-29

- Bosworth A.H.**, Williams M.K., Albrecht K.A., Kwiatkowski R., Beynon J., Hankinson, T.R., Ronson C.W., Cannon F., Wacek T.J. und Triplett E.W., (1994), *Alfalfa Yield Response to Inoculation with Recombinant Strains of Rhizobium meliloti with an Extra Copy of dctABD and/or Modified nifA Expression*, Appl. Environ. Microbiol., **60**, 3815-3832
- Bourdineaud J.P.**, Bono J.J., Ranjeva R. und Cullimore J.V. (1995), *Enzymatic Radiolabelling to a High Specific Activity of Legume Lipo-Oligosaccharidic Nodulation Factors from Rhizobium meliloti*, Biochem. J., **306**, 259-264
- Breccia, J.D.**, Hatti-Kaul, R., Castro, G.R. und Sineriz, (1999), *Isolation of **b**-Xylanase from Whole Broth of Bacillus amyloliquefaciens by Adsorption on a Matrix in Fluidized Bed with low Degree of Expansion*, Bioseparation, **8**, 273-279
- Breedveld, M.W.**, Zevenhuizen, L.P.T.M. und Zehnder, A.J.B., (1990a), *Excessive Excretion of Cyclic **b**-(1,2)-Glucan by Rhizobium trifolii TA-1*, Appl. Environ. Microbiol., **56**, 2080-2086
- Breedveld, M.W.**, Zevenhuizen, L.P.T.M. und Zehnder, A.J.B., (1990b), *Osmotically Induced Oligo- and Polysaccharid Synthesis by Rhizobium meliloti SU-47*, J. Gen. Microbiol., **136**, 2511-2519
- Breitsprecher, R.**, Turner-Flechsengar, J., Calderwood, Schnorr, V., (1990), *Pons, Teil 1, Englisch-Deutsch*, Hrsg. Hazera, M-P., William Collins Sons & Co. Ltd., London / Glasgow, **1**, 344
- Brodersen, D. E.**, Clemons, W. M. und Carter, A. P., (2000), *The Structural Basis for the Action of the Antibiotics Tetracycline, Pactamycin, and Hygromycin B on the 30S Ribosomal Subunit*, Cell, **103**, 1143-1154
- Broerse, J.E.W.** und Bunders J.F.G., (1996), *Biotechnology Can Benefit Small-Scale Farmers – A New Methodology: the Interactive Bottom-up Approach*, Gate Magazine – Technology and Development, 1-96
- Broughton, W.J.**, Jabouri, S. und Perret, X., (2000), *Keys to Symbiotic Harmony*, J. Bacteriol., **182**, 5641-5652
- Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten**, (1999), *Statistischer Monatsbericht des Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten*, Landwirtschaftsverlag GmbH Münster, 570
- Bushby, H.V.A.**, (1982), 2. *Ecology*, in: *Nitrogen Fixation – Rhizobium*, Hrsg. Broughton, W.J., Oxford University Press, New York, **2**, 35-75
- Caetano-Anollés, G.**, Lagares, A. und Favelukas, G., (1989), *Adsorption of Rhizobium meliloti to Alfalfa Roots: Dependence on Divalent Cations and pH*, Plant and Soil, **117**, 67-74
- Callewaert, R.** und De Vuyst, L., (1999), *Expanded Bed Adsorption as a Unique Unit Operation for the Isolation of Bacteriocins from Fermentation Media*, Bioseparation, **8**, 159-168

- Campbell, G.R.O.**, Reuhs, B.L. und Walker, G.C., (1998), *Different Phenotype Classes of Sinorhizobium meliloti Mutants Defective in Syntheses of K-Antigen*, J. Bacteriol., **180**, 5432-5436
- Capela, D.**, Barloy-Hubler, F., Gatius, M.T., Gouzy, J. und Galibert, F., (1999), *High-density Physical Map of Sinorhizobium meliloti 1021 Chromosome Derived from Bacterial Artificial Chromosome Library*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **96**, 9357-9362
- Casse, F.**, Boucher, C., Julliot, J.S., Michel, M. und Dénarié, J., (1979), *Identification and Characterization of Large Plasmids in Rhizobium meliloti Using Agarose Gel Electrophoresis*, J. Gen. Microbiol., **113**, 229-242
- Castillo, M.**, Flores, M., Mavingui, P., Martínez-Romero, E., Palacios, R. und Hernández, G., (1999), *Increase in Alfalfa Nodulation, Nitrogen Fixation and Plant Growth by Specific DNA Amplification in Sinorhizobium meliloti*, Appl. Environ. Microbiol., **65**, 2716-2722
- Cha, C.**, Gao, P., Chen, Y.-C., Shaw, P.D. und Farrand, S.K., (1998), *Production of Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing Signals by Gram-Negative Plant-Associated Bacteria*, Mol. Plant. Microb. Interact., **11**, 1119-1129
- Chmiel, H.**, (1991a), *Bioprozeßtechnik 1*, UTB Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Chmiel, H.**, (1991b), *Bioprozeßtechnik 2*, UTB Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1-78
- Cornish-Bowden, A.**, (1995), *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, Portland Press Ltd., London
- Courtois B.**, Hornez J.P., Derieux J.C., (1979), *Effect of 2-Ketogluconic Acid Synthesis on the Exopolysaccharide Production in a Rhizobium meliloti Strain*, Can. J. Microbiol., **25**, 1191-1196
- Cren, M.**, Kondorosi, A. und Kondorosi, E., (1995), *NolR Controls Expression of the Rhizobium meliloti Nodulation Genes Involved in the Core Nod Factor Synthesis*, Mol. Microbiol., **15**, 733-747
- Cunningham, S.D.** und Munns, D.N., (1984), *The Correlation Between Extracellular Polysaccharide Production and Acid Tolerance in Rhizobium*, Soil Sci. Soc. Am. J., **48**, 1273-1276
- Debellé, F.**, Plazanet C., Roche P., Pujol C., Savagnac, A., Rosenberg C., Promé J.-C. und Dénarié J., (1996), *The nodA Proteins of Rhizobium meliloti and tropici Specify the N-Acylation of Nod Factors by Different Fatty Acids.*, Mol. Microbiol., **22**, 303-314
- Debellé, F.**, Rosenberg, C. und Dénarié, J., (1992), *The Rhizobium, Bradyrhizobium, and Azorhizobium NodC Proteins Are Homologous to Yeast Chitin- Synthases*, Mol. Plant-Micr. Interact., **5**, 443-446
- Dekker, M.**, (1998); *Special Issue on Umami (Production, Processing, Acceptance, Nutrition & Health)*, Food Rev. Int., **14**, 23-41

- Del Papa, M.F.**, Balagué, L.J., Castro Sowinski, S., Wegener C., Segundo, E., Martínez Abarca, F., Toro, N., Niehaus, K., Pühler, A., Aguilar, O.M., Martinez-Drets, G. und Lagares, A., (1999), *Isolation and Characterization of Alfalfa-Nodulating Rhizobia Present in Acidic Soils of Central Argentina and Uruguay*, Appl. Environ. Microbiol., **65**, 1420-1427
- Dénarié, J.**, Debelle, F. und Promé, J.-C., (1996), *Rhizobium Lipo-Chitooligosaccharide Nodulation Factors: Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis*, Annu. Rev. Biochem., **65**, 503-535
- Demont, N.**, Ardourel, M., Maillet, F., Promé, D., Ferro, M., J. Promé, J.C. und Dénarié, J., (1994), *The Rhizobium meliloti Regulatory nodD3 and syrM Genes Control the Synthesis of a Particular Class of Nodulation Factors N-Acylated by ( $\omega$ -1)-Hydroxylated Fatty Acids*, EMBO J., **13**, 2139-2149
- Demont, N.**, Debelle, F., Aurelle, H., Dénarié, J. und Promé, J.C., (1993), *Role of the Rhizobium meliloti nodF and nodE Genes in the Biosynthesis of Lipo-Oligosaccharidic Nodulation Factors*, J. Biol. Chem., **268**, 20134-20142
- Dénarié, J.** und Cullimore, J., (1993), *Lipo-Oligosaccharide Nodulation Factors: A new Class of Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis*, Cell, **74**, 951-954
- Derzsiova, K.**, Mydlík, M. und Petříková, V., (1999), *Hemoperfusion Study with Carbamazepine *in vitro**, Int. J. Artif. Organs, **22**, 730-733
- Dilworth, M.J.**, Rynne, F.G., Castelli, J.M., Vivas-Marfisi, A.I. und Glenn, A.R., (1999), *Survival and Exopolysaccharide Production in Sinorhizobium meliloti WSM419 are Effected by Calcium and low pH*, Microbiol., **145**, 1585-1593
- Ditta, G.**, Stanfield, S., Corbin, D. und Helinski, D.R., (1980), *Broad Host Range DNA Cloning System for Gram-Negative Bacteria: Construction of a Gene Bank of Rhizobium meliloti*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **77**, 7347-7351
- Doelle, M.B.** und Doelle, H.W., (1990), *Sugar-Cane Molasses Fermentation by Zymomonas mobilis*, Appl. Microbiol. Biotechnol., **33**, 31-35
- Dose M.**, Folz, J., Mang, D., Schrupp, C., Trunk-Nußbaumer, M., (1990), *DUDEN Fremdwörterbuch*, Hrsg. Drosdowski, G., Dudenverlag Mannheim/Wien/Zürich, **5**, 757
- Dowling, D.N.** und Broughton, W.J., (1986), *Competition for Nodulation of Legumes*, Ann. Rev. Microbiol., **40**, 131-157
- Dylan, T.**, Helsinki, D.R. und Ditta, G.S., (1990), *Hypoosmotic Adaption in Rhizobium meliloti Requires b-(1 $\rightarrow$ 2)-Glucan*, J. Bacteriol., **172**, 1400-1408
- Eardly, B.D.**, Young, J.P.W. und Selander, R.K., *Phylogenetic Position of Rhizobium spec. Strain Or191, a Symbiont of both Medicago sativa and Phaseolus vulgaris, Based on Partial Sequences of the 16S rRNA and nifH genes*, Appl. Environ. Microbiol., **58**, 1809-1815

**Edlin, H.L.**, (1969), *Mensch und Pflanze*, Verlag V.A. Brockhaus, Wiesbaden, 82-87

**Ehrhardt, D.W.**, Atkinson E.M., Faull, K.F., Freedberg, D.I., Sutherlin, D.P., Armstrong, R. und Long, S.R., (1995), *In Vitro Sulfotransferase Activity of nodH, a Nodulation Protein of Rhizobium meliloti Required for Host-Specific Nodulation*, J. Bacteriol. **177**, 6237-45

**Ehrhardt, D.W.**, Atkinson, E.M. und Long, S.R., (1992), *Depolarization of Alfalfa Root Hair Membrane Potential by Rhizobium meliloti Nod-Factors*, Science, **256**, 998-1000

**Elkan, G.H.** und Kuykendall, L.D., (1982), *4. Carbohydrate Metabolism in: Nitrogen Fixation - Rhizobium*, Hrsg. Broughton, W.J., Oxford University Press, New York, **2**, 147-166

**Encarnación, S.**, Dunn M., Willms K. und Mora J., (1995), *Fermentative and Aerobic Metabolism in Rhizobium etli*, J. Bacteriol., **177**, 3058-66

**Espinosa, J.F.**, Asensio, J.L., García, J.L., Laynez, J., Bruix, M., Wright, C., Siebert, H.-C., Gabius, H.J., Cañada, F.J. und Jiménez-Barbero, J., (2000), *NMR Investigations of Protein–Carbohydrate Interactions - Binding Studies and Refined Three-Dimensional Solution Structure of the Complex Between the B Domain of Wheat Germ Agglutinin and N,N',N''-Triacetylchitotriose*, Eur. J. Biochem., **267**, 3965-3978

**Ettler, P.**, Martínková, L., Ukjcová, E. und Speichert, L., (1991), *Application of Scale-Down Experiments in the Study Of Citric Acid Biosynthesis*, F. Microbiol., **36**, 493-497

**Fattohi, N.**, (1995), *Untersuchungen über die Wirkungen von Nebenbestandteilen der Rübenmelasse auf die Backhefequalität – Teil 1: Einführung und Methodik*, Zuckerind., **120**, 587-592

**Felle, H.H.**, Kondorosi, E., Kondorosi, A. und Schultze, M., (1996), *Rapid Alkalinization in Alfalfa Root Hairs in Response to Rhizobial Lipochitooligosaccharides*, Plant J., **10**, 295-301

**Fisher R.F.** und Long, S.R., (1993), *Interactions of nodD at the Nod Box: nodD Binds to Two Distinct Sites on the Same Face of the Helix and Induces a Bend in the DNA*, J. Mol. Biol., **233**, 336-348

**Flaschel, E.**, (1992), *Enzyme Kinetics and Reactor Design*, in: *Biocatalytic Production of Amino Acids and Derivatives*, Hrsg. Rozzell, J. D., Wagner, F., Hanser Publishers, New York, 321-407

**Flaschel, E.**, Poppenborg, L., Neitzel, R., Miksch, G. und Friehs, K., (1998) *Affinitätstrennverfahren zur Gewinnung Rekombinanter Proteine*, BioTec, **9**, 26-29

**Fortescue, J.A.C.**, (1980), *Environmental Geochemistry – A Holistic Approach*, Springer, New York Heidelberg Berlin, 87

- Friedman, A.M.**, Long, S.R., Brown, S.E., Buikema, W.J. und Ausubel, F.M., (1982) *Construction of a Broad Host Range Cosmid Cloning Vector and its Use in the Genetic Analysis*, *Gene*, **18**, 289-296
- Fujita, K.**, Ofosu-Budu, K.G. und Ogata, S., (1992), *Biological Nitrogen Fixation in Mixed Legume-Cereal Cropping Systems*, *Plant and Soil*, **141**, 155-175
- Gadella, T.W.J.**, Vereb jr., G., Hadri, A.-E., Röhrig, H., Schmidt, J., John, M., Schell, J. und Bisseling, T., (1997), *Microspectroscopic Imaging of Nodulation Factor-Binding Sites on Living Vicia sativa Roots Using a Novel Bioactive Fluorescent Nodulation Factor*, *Biophys. J.*, **72**, 1986-1996
- Gage, D.J.**, Bobo, T. und Long, S., (1996), *Use of Green Fluorescent Protein to Visualize the Early Events of Symbiosis Between Rhizobium meliloti and Alfalfa (Medicago sativa)*, *J. Bacteriol.*, **178**, 7159-7166
- Garcke, A.**, (1972), *Illustrierte Flora*, Hrsg. Weihe, K., Verlag Paul Parey, Hamburg / Berlin, **23 Aufl.**, 861
- Geiger, O.**, Weissborn, A.C. und Kennedy, E.P., (1991), *Biosynthesis of Cyclic Glucans by Rhizobium meliloti 1021*, *J. Bacteriol.*, **173**, 3021-3024
- Geisler, G.**, (1991), *Farbatlas Landwirtschaftliche Kulturpflanzen*, Eugen Ulmer GmbH, Stuttgart, 135-136
- Geremia, R.A.**, Cavaignac, S., Zorreguieta, A., Toro, N., Olivares, J. und Ugalde, R.A., (1987), *A Rhizobium meliloti Mutant That Forms Ineffective Pseudonodules in Alfalfa Produces Exopolysaccharide But Fails to Form  $\beta$ -(1-2)-Glucan*, *J. Bacteriol.*, **169**, 880-884
- Ghozlan, H.A.**, (1994), *Utilization of Beet Molasses for Riboflavin Production by Mycobacterium phlei*, *J. Basic Microbiol.*, **34**, 157-162
- Glenn, A.R.** und Dilworth, M.J., (1981); *The Uptake and Hydrolysis of Disaccharides by Fast- and Slow-Growing Species of Rhizobium*, *Arch. Microbiol.*, **129**, 233-239
- Glenn, A.R.** und Dilworth, M.J., (1994), *The Life of Root Nodule Bacteria in the Acidic Underground*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **123**, 1-10
- Glenn, A.R.**, Reeve, W.G., Tiwari, R.P. und Dilworth, M.J., (1999), *Acid Tolerance in Root Nodule Bacteria*, *Novartis Found. Symp.*, **221**, 112-126
- González, J.E.**, York, G.M. und Walker, G.C., (1996), *Rhizobium meliloti Exopolysaccharides: Synthesis and Symbiotic Function*, *Gene*, **179**, 141-146
- Gouffi, K.**, Pichereau, V., Rolland, J.-P., Thomas, D., Bernard, T und Blanco, C., (1998), *Sucrose is a Nonaccumulated Osmoprotectant in Sinorhizobium meliloti*, *J. Bacteriol.*, **180**, 5044-5051

- Gough, S.**, Flynn, O., Hack, C.J. und Marchant, R., (1996), *Fermentation of Molasses using a Thermotolerant Yeast, Kluyveromyces marxianus IMB3: Simplex Optimization of Media Supplements*, Appl. Microbiol. Biotechnol., **46**, 187-190
- Graham, P.H.**, Draeger, K.J., Ferrey, M.L., Conroy, M.J., Hammer, B.E., Martinez, E., Aarons, S.R. und Quinto, C., (1994), *Acid pH Tolerance in Strains of Rhizobium and Bradyrhizobium, and Initial Studies on the Basis for Acid Tolerance of Rhizobium tropici UMR1899*, Can. J. Microbiol., **40**, 198-207
- Gray, K.M.**, Pearson, J.P., Downie, J.A., Boboye, B.E.A. und Greenberg, E.P., (1996), *Cell-to-Cell Signaling in the Symbiotic Nitrogen-Fixing Bacterium Rhizobium leguminosarum: Autoinduction of a Stationary Phase and Rhizosphere-Expressed Genes*, J. Bacteriol., **178**, 372-376
- Gregory, M.E.** und Thornhill, N.F., (1997), *The Effects of Aeration and Agitation on the Measurement of Yeast Biomass Using a Laser Turbidity Probe*, Bioproc. Eng., **16**, 339-344
- Grzegorzczuk, D.S.** und Carta, G., (1996), *Adsorption of Amino Acids on Polymeric Adsorbents - I. Equilibrium*, Chem. Eng. Sci., **51**, 807-817
- Gualtieri, G.** und Bisseling, T., (2000), *The Evolution of Nodulation*, Plant Mol.Biol., **42**, 181-194
- Gulati, S.L.**, (1979), *New Nonsynthetic Medium for Rhizobium Culture Production from Wastes*, Biotechnol. Bioeng., **21**, 1507-1515
- Gulati, S.L.**, (1980a), *Growth of Rhizobia in Protein Hydrolysates*, Zbl. Bakt. II Abt., **135**, 296-301
- Gulati, S.L.**, (1980b), *A Simple Device of an Improvised Fermentor for Production of Rhizobial Culture*, Zbl. Bakt. II Abt., **135**, 302-307
- Györgypal, Z.**, Kondorosi, E. und Kondorosi, A., (1991), *Diverse Signal sensitivity of nodD Homologs from Narrow and Broad Host Range Rhizobia*, Mol. Plant Microb. Interac., **4**, 356-364
- Hadulla, A.**, Backhaus, C., Guderian, J. und Althaus, W., (1995), *Zum Strömungsverhalten in einem Siphon aus einer zirkulierenden Wirbelschicht*, Chem. Ing. Tech., **67**, 321-323
- Hall, A.** und Clark, N., (1995), *Coping with Change, Complexity and Diversity in Agriculture – The Case of Rhizobium Inoculants in Thailand*, World Development, **23**, 1601-1614
- Harscoat, C.**, Jaffrin, M.Y., Bouzerar, R. und Courtois, J., (1999), *Influence of Fermentation Conditions and Microfiltration Processes on Membrane Fouling During Recovery of Glucuronane Polysaccharides from Fermentation Broths*, Biotechnol. Bioeng., **65**, 500-511

- Heidenreich, B.**, (1998), *Der Einfluß transgener Rhizobien auf den Stickstoffkreislauf*, in *Nutzung der Gentechnik im Agrarsektor der U.S.A.*, UBA Texte 47/98, Hrsg. Umweltbundesamt, Berlin
- Heidstra, R.**, Geurts, R., Franssen, H., Spaik, H.P., van Kammen, A. und Bisseling, T., (1994), *Root Hair Deformation Activity of Nodulation Factors and Their Fate on Vicia sativa*, *Plant Physiol.*, **105**, 787-797
- Hejzlar, J.**, Szpakowska, B. und Wershaw, R.L., (1994), *Comparison of Humic Substances Isolated From Peatbog Water by Sorption on DEAE-Cellulose and Amberlite<sup>®</sup> XAD-2*, *Wat. Res.*, **28**, 1961-1970
- Hennikoff, S.**, Haughn, G.W., Calvo, J.M. und Wallace, J.C., (1988), *A Large Family of Bacterial Activator Proteins*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 6602-6606
- Henzler H.J.**, (2000), *Particle Stress in Bioreactors*, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **67**, 35-82
- Heyraud, A.**, Rinaudo, M. und Courtois, B., (1986), *Comparative Studies of Extracellular Polysaccharide Elaborated by Rhizobium meliloti Strain M5N1 in Defined Medium and in Non-Growing Cell Suspensions*, *Int. J. Biol. Macrobiol.*, **8**, 85-88
- Higginbotham, J.D.** und McCarthy, J., (2000), *Qualität und Lagerung von Melasse*, in: *Zuckertechnologie - Rüben- und Rohrzuckergewinnung*, Hrsg. Van der Poel, P.W., Schieweck, H. und Schwartz, T., Verlag Dr. Albert Bartens, Berlin, 1015-1036
- Hijano, E.H.** und Basigalup, D.H., (1995), *El cultivo de la Alfalfa en la República Argentina*, in *La Alfalfa en Argentina*, Hrsg. Hijano E.H und Navarro, A., INTA C.R. Cuyo, Editar, San Juan, 15
- Höflich, G.**, Wolf, H.-J. und Ruprich, A., (1987), *Availability and Sterilization of Peat as Carrier for Rhizobium Inoculants*, *Zentralbl. Mikrobiol.*, **142**, 581-586
- Höflich, G.** und Wolf H.-J., (1985), *Internationale Erkenntnisse bei der Bereitstellung und Anwendung von Rhizobium-Präparaten*, *Arch. Acker-Pflanzenb. Bodenkd.*, Berlin, **29**, 531-537
- Honeycutt, R.J.**, McClelland, M. und Sobral, B.W.S., (1993), *Physical Map of the Genome of Rhizobium meliloti 1021*, *J. Bacteriol.*, **175**, 6945-6952
- Howieson, J.G.**, Ewing, M.A. und D'Antuono, (1988), *Selection for Acid Tolerance in Rhizobium meliloti*, *Plant and Soil*, **105**, 179-188
- Hu, H.-B.**, Yao, S.-J. und Mei, L.-H., (2000), *Partial Purification of Nattokinase from Bacillus subtilis by Expanded Bed Adsorption*, *Biotech. Lett.*, **22**, 1383-1387
- Hubac, C.**, Ferran, J., Trémolières, A. und Kondorosi, A., (1994), *Luteolin Uptake by Rhizobium meliloti: Evidence for Several Steps Including an Active Extrusion Process*, *MicroBiology*, **140**, 2769-2774



- Hubac, C.**, Ferran, J. und Kondorosi, A., (1995a), *Influence of exopolysaccharides on Luteolin Uptake by Rhizobium meliloti*, in: *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*, Hrsg. Tikhonovich, I.A., Provorov, N.A., Romanov, V.I. und Newton, W.E., Kluwer Academic Publisher, Dordrecht / Boston / London, 336
- Hubac, C.**, Ferran, J., Sharypova, L.A., und Onishchuk, O.P., (1995b), *Luteolin Uptake by Rhizobium meliloti Mutants Affected in Lipopolysaccharides Production and Nodulation Competitiveness*, in: *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*, Hrsg. Tikhonovich, I.A., Provorov, N.A., Romanov, V.I. und Newton, W.E., Kluwer Academic Publisher, Dordrecht / Boston / London, 337
- Hynes, M.F.**, Simon, R., Müller, P., Niehaus, K., Labes, M. und Pühler, A., *The Two Megaplasmids of Rhizobium meliloti are Involved in the Effective Nodulation of Alfalfa*, Mol. Gen. Genet., **202**, 356-362
- Ikeshita, S.**, Sakamoto, A., Nakahara, Y., Nakahara, Y und Ogawa, T., (1994), *Synthesis of the Root Nodule-Inducing Factor NodRm-IV(C<sub>16:2</sub>,S) of Rhizobium meliloti and Related Compounds*, Tetrahedron Lett., **35**, 3123-3126
- Inamdar, S.**, (1994), *Effect of Pretreatment of Molasses and Posttreatment of Fermented Broth in Industrial Production of Ethanol*, Appl. Biochem. Biotechnol., **45/46**, 181-187
- Jaffe, W.** und Rojas, M., (1994), *Abiotic Stress and Biotechnology in Latin America*, Biotechnology and Development Monitor, **18**, 6-7
- John, M.**, Röhrig, H., Schmidt, J., Wieneke, U. und Schell, J., (1993), *Rhizobium nodB Protein Involved in Nodulation Signal Synthesis is a Chitooligosaccharide Deacetylase*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **90**, 625-629
- de Jong, A.J.**, Heidstra, R., Spaank, H.P., Hartog, M.V., Meijer, E.A., Hendriks, T., Schiavo, F.L., Terzi, M., Bisseling, T., van Kammen, A., de Vries, S.C., (1993), *Rhizobium Lipochitooligosaccharides Rescue a Carrot Somatic Embryo Mutant*, The Plant Cell, **5**, 615-620
- Jordan, D.C.**, (1984), *Family III. Rhizobiaceae*, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Hrsg. Krieg, N.R., Verlag Williams & Wilkins, Baltimore / London, **1**
- Joshi, J.B.**, Elias, C.B. und Patole, M.S., (1996), *Role of Hydrodynamic Shear in the Cultivation of Animal, Plant and Microbial Cells*, Chem. Eng. J., **62**, 121-141
- Kadotani, Y.**, Miyamoto, K., Mishima, N., Kominami, M. und Yamane, T., (1995), *Aquisition of Data from On-Line Laser Turbidimeter and Calculation of Some Kinetic Variables in Computer-Coupled Automated Fed-Batch Culture*, J. Ferment. Bioeng., **80**, 63-70
- Kafetzopoulos, D.**, Thireos, G., Vournakis, J.N., und Bouriotis, V., (1993), *The Primary Structure of a Fungal Chitin Deacetylase Reveals the Function for Two Bacterial Gene Products*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 8003-8005

- Kamst, E.**, Pilling, J., Raamsdonk, L.M., Lugtenberg, B.J.J. und Spaink, H., (1997), *Rhizobium* Nodulation Protein *nodC* is an Important Determinant of Chitin Oligosaccharide Chain Length in Nod Factor Biosynthesis, *J. Bacteriol.*, **179**, 2103-2108
- Kannenbergh, E.L.**, Reuhs, B.L., Forsberg, L.S. und Carlson, R.W., (1998), *Lipopolysaccharides and K-Antigens: Their Structures, Biosynthesis, and Functions in The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*, Hrsg. Spaink, H.P., Kondorosi, A. und Hooymaas, P.J.J., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London, 119-154
- Kapp, D.**, (1996), Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Infektionsverhalten von *Rhizobium meliloti* Mutanten mit veränderter Exopolysaccharidsynthese in der Symbiose mit Luzerne (*Medicago sativa L.*), Dissertation, Universität Bielefeld
- Karau, A.**, Benken, C. Thömmes, J. und Kula, M.-R., (1997), *The Influence of Particle Size Distribution and Operating Conditions on the Adsorption Performance in Fluidized Beds*, *Biotech. Bioeng.*, **55**, 54-64
- Kasting, J.F.** und Siefert, J.L., (2001), *The Nitrogen Fix*, *Nature*, **412**, 26-27
- Keller, M.**, Arnold, W., Kapp, D., Müller, P., Niehaus, K., Schmidt, M., Quandt, J., Weng, W.M. und Pühler, A., (1990) *Rhizobium meliloti* Genes Involved in Exopolysaccharide Production and Infection of Alfalfa Nodules, in: *Pseudomonas: Biotransformation, Pathogenesis and Evolving Biotechnology*, Hrsg. Silver, S., Chakrabarty, A.M., Iglewski, B. und Kaplan, S., Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C., 91-97
- Kereszt, A.**, Kiss, E., Reuhs, B.L., Carlson, R.W., Kondorosi, A. und Putnoky, P., (1998), *Novel rkp Gene Clusters of Sinorhizobium meliloti Involved in Capsular polysaccharide Production and Invasion of the Symbiotic Nodule: the rkp Gene Encodes a UDP-Glucose Dehydrogenase*, *J. Bacteriol.*, **180**, 5426-5431
- Khan, N.H.**, Wera, P., Roets, E. und Hoogmartens, J., (1990), *Quantitative Analysis of Tetracycline by High Performance Liquid Chromatography on Polystyrene-Divenylbenzene Packaging Materials*, *J. Liq. Chromatog.*, **13**, 1351-1374
- Kohring, B.**, (1995a), *Fermentative Gewinnung von Nodulationsfaktoren aus Rhizobium meliloti*, Diplomarbeit, Universität Bielefeld
- Kohring B.**, (1995b), *Biotechnologische Produktion von Signalmolekülen*, *Studies*, **2/95**, 21-32
- Kohring, B.**, Baier, R., Niehaus K., Pühler A. und Flaschel, E., (1997), *Production of Nodulation Factors by Rhizobium meliloti: Fermentation, Purification and Characterization of Glycolipids*, *Glycoconjugate J.*, **14**, 963-971
- Koček, T.**, (1999), *Biotransformation XLVII: Transformations of 5-ene Steroids in Fusarium culmorum Culture*, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **71**, 83-90

**Kondorosi, E.**, Banfalvi, Z. und Kondorosi, A., (1984), *Physical and Genetic Analysis of a Symbiotic Region of Rhizobium meliloti: Identification of Nodulation Genes*, Mol. Gen. Genet., **193**, 445-452

**Kondorosi, E.**, Gyuris, J., Schmidt, J., John, M., Duda, E., Hoffmann, B., Schell, J. und Kondorosi, E., (1989), *Positive and Negative Control of nod Gene Expression in Rhizobium meliloti is Required for Optimal Nodulation*, The EMBO J., **8**, 1331-1340

**Kondorosi, E.**, Muiré, M., Cren, M., Iyer, N., Hoffmann, B., und Kondorosi, A.; (1991), *Involvement of the syfM and nodD3 Genes of Rhizobium meliloti in nod Gene Activation and in Optimal Nodulation of the Host Plant*, Mol. Microbiol., **5**, 3035-3048

**Kondorosi, E.**, Pierre, M., Cren, M., Haumann, U., Buiré, M., Hoffmann, B., Schell, J. und Kondorosi, A., (1991a), *Identification of NoIR, a Negative Transacting Factor Controlling the nod Regulon in Rhizobium meliloti*, J. Mol. Biol., **222**, 885-896

**Kümmel, R.**, 1990, *Adsorption aus wässrigen Lösungen*, Hrsg. Kümmel, R. und Worch, E., Dt. Verl. f. Grundstoffind., Leipzig

**Kuchitsu, K.**, Kikuyama, M. und Shibuya, N., (1993), *N-Acetylchitooligosaccharides, Biotic Elicitor for Phytoalexin Production, Induce Transient Membrane Depolarization in Suspension-cultured Rice Cells*, Protoplasma, **174**, 79-81

**Lagares, A.**, Caetano-Anollés, G., Niehaus, K., Lorentzen, J., Ljunggren, H.D., Pühler, A. und Favelukes, G., (1992), *A Rhizobium meliloti Lipopolysaccharide Mutant Altered in Competitiveness for Nodulation of Alfalfa*, J. Bacteriol., **174**, 5941-5952

**Lambert, A.**, Rudulier, D. L., Gouzou, L., Vergneau, J.-P. und Bazin, M., (1998), *Alfalfa Seed Coating with Sinorhizobium meliloti and Dessication Stress Tolerance*, in: *Biological Nitrogen Fixation for the 21<sup>st</sup> Century*, Hrsg. Elmerich, C., Kondorosi, A. und Newton, W.E., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 524

**Legocki, A.B.**, Bothe H. und A.Pühler, (1997), *Preface*, in: *Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainability*, Hrsg. Legocki, A.B., Bothe, H. und Pühler, A., NATO ASI Series, **G39**, Springer Verlag Berlin / Heidelberg

**Lehninger, A.L.**, (1987), *Biochemie*, VCH, Weinheim

**Lepane, V.**, (1999), *Comparison of XAD Resins for the Isolation of Humic Substances from Seawater*, J. Chromatogr., **845**, 329-335

**Leverly, S.B.**, Zhan, H., Lee, C.C., Leigh, J.A. und Hakomori, S., (1991), *Structural Analysis of a Second Acidic Exopolysaccharide of Rhizobium meliloti That can Function in Alfalfa Root Nodule Invasion*, Carbohydr. Res., **210**, 339-347

**Lloret J.**, Bolanos, L., Lucas, M.M., Peart, J.M., Brewin, N.J., Bonilla, I. und Rivilla, R., (1995), *Ionic Stress and Osmotic Pressure Induce Different Alterations in the Lipopolysaccharide of a Rhizobium meliloti Strain*, Appl. Environ. Microbiol., **61**, 3701-3704

- Lloret J.**, Wulff, B.B.H., Rubio, J. M., Downie, J. A., Bonilla, I. und Rivilla, R., (1998), *Exopolysaccharide II Production Is Regulated by Salt in the Halotolerant Strain Rhizobium meliloti EFB1*, Appl. Environ. Microbiol., **64**, 1024-1028
- Lire, D.R.**, (1991), *CRC - Handbook of Chemistry and Physics*, Chemical Rubber Publishing Company, Boca Raton / Ann Arbor / Boston, **6**, 8
- Long, S.R.**, (1996), *Rhizobium Symbiosis: Nod-Factors in Perspective*, The Plant Cell, **8**, 1885-1898
- Looijesteijn P.J.**, Boels I.C., Kleerebezem M. und Hugenholtz J., (1999), *Regulation of Exopolysaccharide Production by Lactococcus lactis subsp. cremoris by the Sugar Source*, Appl. Environ. Microbiol. **65**, 5003-8
- Lothe, R.R.**, Purohit, S.S., Shaikh, S.S., Malshe, V.C. und Pandit, A.B., (1999), *Purification of Alpha-Glucosidase and Invertase from Bakers' Yeast on Modified Polymeric Supports*, Bioseparation, **8**, 293-306
- Lowther, W.L.**, (1975), *Interaction of Lime and Seed Pelleting on the Nodulation and Growth of White Clover, II. Oversown Trials*, N. Z. J. Agric. Res., **18**, 537-360
- Ma, Z.**, Whitley, R.D., und Wang, N.-H.L., (1996), *Pore and Surface Diffusion in Multicomponent Adsorption and Liquid Chromatography Systems*, AIChE J., **42**, 1244-1262
- Maillet, F.**, Debelle, F. und Dénarié, J., (1990), *Role of the nodD and syrM Genes in the Activation of the Regulatory Gene nodD3, and of the Common and Host-Specific nod Genes of Rhizobium meliloti*, Mol. Microbiol., **4**, 1975-1984
- Mareèková H.**, (1983), *Bacteria for Nitrogen Fixation*, in: *Biotechnology*, Hrsg. Rehm, H.-J. und Reed, G., Verlag Wiley VCH, Weinheim / Deerfield Beach / Basel, **3**, 217-231
- Marschner, H.**, (1991), *Mechanisms of Adaption of Plants to Acid Soils*; Plant and Soil, **134**, 1-20
- Martinez-de Drets, G.** und Arias, A., (1970), *Metabolism of Some Polyols by Rhizobium meliloti*, J. Bacteriol., **103**, 97-103
- Martinez-de Drets, G.**, Arias, A. und Cutinella, M.R., (1974), *Fast- and Slow-Growing Rhizobia: Differences in Sucrose Utilization and Invertase Activity*, Can. J. Microbiol., **20**, 605-609
- McKhann, H.I.** und Hirsch, A.M., (1994), *Does Rhizobium Avoid the Host Response?*, in: *Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals*, Hrsg. Dangel, J.L., Springer Verlag, Berlin / Heidelberg / New York, 139-162
- Meade H.M.**, Long S.R., Ruvkun G.B., Brown S.E. und Ausubel F.M., (1982), *Physical and Genetic Characterization of Symbiotic and Auxotrophic Mutants of Rhizobium meliloti Induced by Transposon Tn5 Mutagenesis*, J. Bacteriol., **149**, 114-22

- Menon, A.N.**, (2000), *Studies on the Volatiles of Cardamom (Eletaria cardamomum)*, J. Food Sci. Technol.-Mysore, **37**, 406-408
- Mersmann, A.**, (1986), *Stoffübertragung*, in: *Wärme und Stoffübertragung*, Hrsg. Grigull, U., Springer Verlag, Berlin / Heidelberg / New York
- Michaud, E.**, Leman, W.F., und Rumbaugh, M.D., (1988), *World Distribution and Historical development in: Alfalfa and Alfalfa improvement*, Hrsg. Hanson, A.A. , Barnes, D.K., Hill Jr., R.R., Heichel, G.H., Hunt, O.J., Leath, K.T., Marten, G.C. und Tesar, M.B., Am. Soc. of Agron., **2**
- Michaud, P.**, Courtois, J., Courtois, B., Heyraud, A., Colin-Maurel, P., Séguin, J.-P. und Barbotin, J.-N., (1995), *Cyclic(1-2)- $\beta$ -D-Glucans Excreted by the Glucuronan-producing strain Rhizobium meliloti M5N1CS (NCIMB40472) and by the Succinoglycan-Producing Strain Rhizobium meliloti M5N1*, Int. J. Biol. Macromol., **17**, 369-372
- Michelena, R.**, Iruirtia, C., Vavruska, F., Mon,R. und Pittaluga, (1989), *Degradación de Suelos en el Norte de la Región Pampeana*, Publicación Técnica INTA-Argentina, **6**, Castellar
- Miksch, G.**, Arnold, W., Lentzsch, P., Priefer, U.B. und Pühler, A., (1994), *A 4.6 kb DNA Region of Rhizobium meliloti Involved in Determing Urease and Hydrogenase Activities Carries the Structural Genes for Urease (ureaA, ureB, ureC) Interrupted by Other Open Reading Frames*, Mol. Gen. Genet., **242**, 539-550
- Miller, K.J.**, Kennedy, E.P. und Reinhold, V.N., (1986), *Osmotic Adaption by Gram-Negative Bacteria: Possible Role for Periplasmic Oligosaccharides*, Science, **231**, 48-51
- Morales, A.L.**, Duque, C. und Bautista, E., (2000), *Identification of Free and Glycosidically Bound Volatiles and Glycosides by Capillary GC and Capillary GC-MS in „Lulo del Choco“ (Solanum topiro)*, HRC-J. High Resol. Chromatogr., **23**, 379-385
- Moreno J.**, Vargas M.A., Madiedo J.M., Muñoz J., Rivas J. und Guerrero M.G., (2000), *Chemical and Rheological Properties of an Extracellular Polysaccharide produced by the Cyanobacterium Anabaena sp. ATCC 33047*, Biotechnol. Bioeng., **67**, 283-90
- Moser, A.**, (1981), *Bioprozesstechnik*, Springer Verlag, Wien / New York
- Mulligan, J.T.** und Long, S.R., (1989), *A Family of Activator Genes Regulates Expression of Rhizobium meliloti*, Genetics, **122**, 7-18
- Muttzall, K.**, (1994), *Modellierung von Bioprozessen*, Behr's Verlag, Hamburg
- Mydlik, M.**, Derzsiova, K., Klan, J. und Zima, T., (1997), *Hemoperfusion with Alpha-Amanitin: An in vitro Study*, Int. J. Artif. Organs, **20**, 105-107

- Nandakumar, M.P.**, Lali, A.M. und Mattiasson, B., (1999), *On-line Monitoring of Glucose and / or Lactate in a Fermentation Process Using an Expanded Micro-bed Flow Injection Analyser*, *Bioseparation*, **8**, 229-235
- Navarro-González, R.**, McKay, C.P. und Nna Mvondo, D., (2001), *A Possible Nitrogen Crisis for Archaean Life due to Reduced Nitrogen Fixation by Lightning*, *Nature*, **412**, 61-64
- Nesbitt, A.B.** und Petersen, F.W., (1998), *A Model for the Prediction of the Expansion of a Fluidized Bed of Poly-Sized Resins*, *Powder Technol.*, **98**, 258-264
- Nicolaou, K.C.**, Bockovich, N.J., Carcanague, D.R., Hummel, C.W., Even, L.F., (1992), *Total Synthesis of the NodRm-IV Factors, The Rhizobium Nodulation Signal*, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 8701-8702
- Niehaus, K.**, (1999), *Induktion und Suppression der Pflanzenabwehr in der Sinorhizobium meliloti - Medicago sativa Symbiose*, Habilitationsschrift, Universität Bielefeld
- Niehaus, K.**, Baier, R., Kohring, B., Flaschel, E. und Pühler, A., (1997a), *Symbiotic Suppression of the Medicago sativa Plant Defense System by Rhizobium meliloti Oligosaccharides*, in : *Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainability*, Legocki, Bothe, H. und Pühler, A. Hrsg., NATO ASI Series, **G39**, Springer Verlag Berlin / Heidelberg, 111-114
- Niehaus, K.**, (1997b), *Die Rhizobien – Leguminosen Symbiose: Signalmoleküle und Zell-Zell Wechselwirkung in der Bakterien-Pflanzen Interaktion*, *Mitteilungen Deutsche Gesellschaft für Zellbiologie e.V.*, **23**, 15-19
- Niehaus, K.**, Kapp, D. und Pühler, A., (1993), *Plant Defence and Delayed Infection of Alfalfa Pseudonodules Induced by an Exopolysaccharide (EPS I)-Deficient Rhizobium meliloti Mutant*, *Planta*, **190**, 415-425
- O´Gara, F.** und Shanmugam, (1976), *Regulation of Fixed Nitrogen by Rhizobia Export of Fixed Nitrogen  $N_2$  as  $NH_4^+$* , *Biochim. Biophys. Acta*, **437**, 313-321
- O´Hara, G.W.**, Goss, T.J., Dilworth, M.J., und Glenn, A.R., (1989), *Maintenance of Intracellular pH and Acid Tolerance in Rhizobium meliloti*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1870-1876
- Ohlson, S.**, Bergström, M., Leickt, L. und Zopf, D., (1998), *Weak Affinity Chromatography of Small Saccharides With Immobilised Wheat Germ Agglutinin and its Application to Monitoring of Carbohydrate Transferase Activity*, *Bioseparation*, **7**, 101-105
- Olbrich, H.**, (1979), *Bemerkungen zur Belastungsgrenze der Melassequalität durch Hilfsmittel der Zuckerfabrikation*, *Branntweinwirtschaft*, **119**, 111-112
- Page, W.J.**, Manchak, J. und Rudy, B., (1992), *Formation of Poly(Hydroxybutyrate-Co-Hydroxyvalerate) by Azotobacter vinelandii UWD*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2866-2873

**Peoples, M.B.** und Craswell, E.T., (1992), *Biological Nitrogen Fixation: Investments, Expectations and Actual Contributions to Agriculture*, Plant and Soil, **141**, 13-29

**Peoples, M.B.**, Herridge, D.F. und Ladha, J.K., (1995a), *Biological Nitrogen Fixation: An Efficient Source of Nitrogen for Sustainable Agricultural Production?*, Plant and Soil, **174**, 3-28

**Peoples, M.B.**, Ladha, J.K. und Herridge, D.F., (1995b), *Enhancing Legume N<sub>2</sub> Fixation Through Plant and Soil Management*, Plant and Soil, **174**, 83-101

**Perticari, A.**, Gauna, A.C., Pacheco Basurco, J.C., Piantanida, N.A., Dieguez, R.N. und Brutti, L.N., (1989), *Encuesta Sobre Inoculación de Leguminosas Forrajeras en la Republica Argentina*, Divulgación Técnica del Instituto de Microbiología Agrícola, CICA-INTA, Castelar, Argentina

**Peters, N.K.**, Frost, J.W. und Long, S.R., (1989), *A Plant Flavone, Luteolin, Induces Expression of Rhizobium meliloti Nodulation Genes*, Science, **233**, 977-980

**Peterson, T.A.** und Russelle, M.P., (1991), *Alfalfa and the Nitrogen Cycle in the Corn Belt*, J. Soil Water Conserv., **46**, 229-233

**Petrovics, G.**, Putnoky, P., Reuhs, B., Kim, J., Thorp, T.A., Noel, K.D., Carlson, R.W. und Kondorosi, A., (1993), *The Presence of a Novel Type of Surface Polysaccharide in Rhizobium meliloti Requires a New Fatty-Acid Synthase-Like Gene-Cluster Involved in Symbiotic Nodule Development*, Mol. Microbiol., **8**, 1083-1094

**Pfüller, U.**, (1986), *Mizellen-Vesikel-Mikroemulsionen*, Hrsg. Fresenius, W., Huber, J.F.K., Pungor, E., Rechnitz, G.A., Simon, W., Tölg, G. und West, Th.S., Springer Verlag, Berlin / Heidelberg / New York

**Poole, P.** und Allaway, D., (2000), *Carbon and Nitrogen Metabolism in Rhizobium*, Adv. Microbiol. Physiol., **43**, S. 116-163

**Potokar, M.**, Tesmann, H. und Asbeck, A., (1982), *Beitrag zur toxikologischen Absicherung eines Antischaummittels für die Zuckerindustrie*, Zuckerindustrie, **107**, 744-748

**Price, N.P.J.**, Reliæ, B., Talmont, F., Lewin, A., Promé, D., Pueppke, S.G., Maillet, F., Dénarié, J., Promé, J.-C. und Broughton, W.J., (1992), *Broad-Host-Range Rizobium Species Strain NGR234 Secretes a Family of Carbamoylated, and Fucosylated, Nodulation Signals that are O-Acetylated or Sulphated*, Mol. Microbiol., **6**, 3575-3584

**Pueppke, S.G.**, (1996), *The Genetic and Biochemical Basis for Nodulation of Legumes by Rhizobia*, Crit. Rev. Biotechnol., **16**, 1-51

**Quesada-Chanto, A.**, S.-Afschar, A. und Wagner, F., (1994), *Microbial Production of Propionic Acid and Vitamin B<sub>12</sub> Using Molasses or Sugar*, Appl. Microbiol. Biotechnol., **41**, 378-383

- Rachev, R.**, Gancheva, V., Bojkova, S., Christov, C. und Zafirova, T., (1997), *Bibberillin Biosynthesis by Fusarium moniliforme in the Presence of Hydrophobic Resin Amberlite XAD-2*, Bulg. J. Plant Physiol., **23**, 24–32
- Raven, P.H.**, Evert, R.F. und Eichhorn, S.E., (2000), *Pflanzenhormone*, in: *Biologie der Pflanzen*, De Gruyter, Berlin / New York, 719
- Rauscher, K.**, Voigt, J., Wilke, I. und Wilke, K.-Th., (1986), *Chemische Tabellen und Rechentafeln für die analytische Praxis*, Hrsg. Friebe, R., Dt. Verlag für Grundstoffind., Leipzig
- Recourt, K.**, van Brussel, A.A.N., Driessen, A.J.M. und Lugtenberg, B.J.J., (1989), *Accumulation of a nodGen Inducer, the Flavonoid Naringenin, in the Cytoplasmic Membrane of Rhizobium leguminosarum bv. viciae is Caused by the pH-Dependent Hydrophobicity of Naringenin*, J. Bacteriol., **171**, 4370-4377
- Reinhold, B.B.**, Chan, S.Y., Reuber, T.L., Marra, A., Walker, G.C. und Reinhold, V.N., (1994), *Detailed Structural Characterization of Succinoglucan, the Major Symbiotically Important Exopolysaccharide of Rhizobium meliloti Strain 2011*, J.Bacteriol., **176**, 1997-2002
- Reuhs, B.L.**, Carlson, R.W. und Kim, J.S., (1993), *Rhizobium fredii and Rhizobium meliloti Produce 3-Deoxy-D-manno-2-Octulosonic Acid-Containing Polysaccharides that Are Structurally Analogous to Group II K Antigens (Capsular Polysaccharides) Found in Escherichia coli*, J. Bacteriol., **175**, 3570-3580
- van Rhijn, P.** und Vanderleyden, J., (1995), *The Rhizobium-Plant Symbiosis*, Microbiological Reviews, **59**, 124-142
- Richardson, A.E.**, Simpson, R.J., Djordjevic, M.A. und Rolfe, B.G., (1988), *Expression of Nodulation Genes in Rhizobium leguminosarum biovar trifolij is Affected by Low pH and by Ca and al Ions*, Appl. Environ. Microbiol., **54**, 2541-2548
- Richardson, J.F.** und Zaki, W.N., (1954), *Sedimentation and Fluidization: Part I* Trans. Inst. Chem. Eng., **32**, 35-52
- Roblot, C.**, Séguin, J.P., Barbotin, J.N., Michaud, P., Courtois, J., Courtois, B. und Heyraud, A., (1995), *Effects of Salts on Production and O-Acetylation of Glucuronan Excreted by the Rhizobium meliloti M5N1 CS Strain*, Int. J. Biol. Macromol., **17**, 365-368
- Roche, P.**, Debelle, F., Maillet, F., Lerouge, P., Faucher, C., Truchet, G., Denarie J. und Promé, J.-C., (1991a), *Molecular Basis of Symbiotic Host Specificity in Rhizobium meliloti: nodH and nodPQ Genes Encode the Sulfation of Lipo-Oligosaccharide Signals*, Cell, **67**, 1131-1143
- Roche, P.**, Lerouge, P., Ponthus, C. und Promé, J.-C., (1991b), *Structural Determination of Bacterial Nodulation Factors Involved in Rhizobium meliloti-Alfalfa Symbiosis*, J. Biol. Chem., **286**, 10933-10940



- Roche, P.**, Maillet, F., Plazanet, C., Debellé, F., Ferro, M., Truchet, G., Promé, J.-C. und Denarie J., (1996), *The Common nodABC Genes of Rhizobium meliloti Are Host-Range Determinants*, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., **93**, 15305-15310
- Röhrig, H.**, Schmidt, J., Wieneke, U., Kondorosi, E., Barlier, I., Schell, J. und John, M., (1994), *Biosynthesis of Lipooligosaccharide Nodulation Factors: Rhizobium nodA Protein is Involved in N-Acetylation of the Chitooligosaccharide Backbone*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 3122-3126
- Röhrig, H.**, Schmidt, J., Walden, R., Czaja, I., Miklasevics, E., Wieneke, U., Schell, J. und John, M., (1995), *Growth of Tobacco Protoplasts Stimulated by Synthetic Lipochitooligosaccharides*, Science, **269**, 841-843
- Rostas, K.**, Kondorosi, E., Horvath, B., Simoncsits A. und Kondorosi, A., (1986), *Conservation of Extended Promoter Regions of Nodulation Genes in Rhizobium*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, **83**, 1757-1761
- Rühberg, S.**, Pühler, A. und Becker, A., (1999), *Biosynthesis of the Exopolysaccharide Galactoglucan in Sinorhizobium meliloti is Subject to a Complex Control by the Phosphate-Dependent Regulator PhoB and the Proteins ExpG and MucR*, Microbiol., **145**, 603-611
- Rushing, B.G.**, Yelton, M.M. und Long, S.R., (1991), *Genetic and Physical Analysis of the nodD3 Region of Rhizobium meliloti*, Nucleic Acids Res, **19**, 921-927
- Ruthven, D.M.**, *The Principles of Adsorption and Adsorption Processes*, John Wiley & Sons, New York / Chicetser / Brisbane / Toronto / Singapore
- Sahm, H.**, Elkmanns, B., Eggeling, L. und Kraemer, R., (1995), *Metabolic Design in Amino Acid Producing Bacterium Corynebacterium glutamicum*, FEMS Microbiol. Rev., 16, 243-252
- Saier jr., M.H.**, Tam, R., Reizer, A. und Reizer, J., (1994), *Two novel Families of Bacterial Membrane Proteins Concerned with Nodulation, Cell Division and Transport*, Mol. Microbiol., **11**, 841-847
- Samain, E.**, Chazalet, V. und Geremia, R.A., (1999), *Production of O-Acetylated and Sulfated Chitooligosaccharides by Recombinant Escherichia coli Strains Harboring different Combinations of nod Genes*, J. Biotechnol., **72**, 33-47
- van de Sande, K.**, Pawlowski, K., Czaja, I., Wieneke, U., Schell, J., Schmidt, J., Walden, R., Matvienko, M., Wellink, J., van Kammen, A., Franssen, H. und Bisseling, T., (1996), *Modification of Phytohormone Response by a Peptide Encoded by ENOD40 of Legumes and a Nonlegume*, Science, **273**, 370-373
- Scheel, D.** und Parker, J.E., (1990), *Elicitor Recognition and Signal Transduction in Plant Defense Gene Activation*, Z. Naturforsch., **45c**, 569-575
- Schiweck, H.**, (1995), *Zusammensetzung von Zuckerrübenmelassen*, Zuckerindustrie, **119**, 273-282

- Schmeil, O.**, (1982), *Flora von Deutschland und seinen angrenzenden Gebieten*, 87. Aufl., Quelle & Meyer, Heidelberg, 210
- Schmidt, J.**, Röhrig, H., John, M., Wieneke, U., Stacey, G., Koncz C. und Schell, J., (1993), *Alteration of Plant Growth and Development by Rhizobium nodA und nodB Genes Involved in the Synthesis of Oligosaccharide Signal Molecules*, *Plant J.*, **4**, 651-658
- Schmidt, L.**, Sun, J., Fritz, J.S., Hagen, D.F., Markell, C.G. und Wisted, E.E., (1993), *Solid-Phase Extraction of phenols Using membranes Loaded with modified Polymeric Resins*, *J. Chromatogr.*, **641**, 57-61
- Schmidt, T.**, *Produktion und Analyse von Plasmid-DNA für die Gentherapie*, Dissertation, Universität Bielefeld
- Schmidt, V.**, Flaschel, E. und Renken A., (1993), *The Use of Chelating Resin for the Separation and Recovery of Heavy Metals from Industrial Wastewater*, in: *Advances in Recovery and Recycling, Concepts and Technology*, Hrsg. Hestock, M.E. und Skov H.R., Hexagon Ltd., Copenhagen, **3**, 217-224
- Schripsema, J.**, de Rudder, K.E.E., van Vliet, T.B., Lankhorst, P.P., de Vroom, E., Kijne, J.W. und van Brussel, A.A.N., (1996), *Bacteriocin small of Rhizobium leguminosarum Belongs to the Class of N-Acyl-L-Homoserine Lactone Molecules, Known as Autoinducers and as Quorum Sensing Co-Transcription Factors*, *J. Bacteriol.*, **178**, 366-371
- Schügerl, K.**, (1985), *Bioreaktionstechnik – Band 1*, Otto Salle Verlag, Frankfurt a.M./Berlin/München und Verlag Sauerländer, Aarau / Frankfurt a.M. / Salzburg
- Schultze, M.**, Quiclet-Sire, B., Kondorosi, E., Virelizier, H., Glushka, J.N. Endre, G., Géro, S.D. und Kondorosi, A., (1992), *Rhizobium Produces a Family of Sulfated Lipo-oligosaccharides Exhibiting Different Degrees of Plant Host Specificity*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 192-196
- Schultze, M.** und Kondorosi, A., (1996), *The Role of Nod Signal Structures in the Determination of Host Specificity in the Rhizobium-Legume Symbiosis*, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **12**, 137-149
- Schulze, C.**, (2000), *Gewinnung und Identifizierung von Nutzbaren Verbindungen aus Nährlösungen und Biomassen von Mikroalgen*, Dissertation, Universität Kiel
- Schwedock, J.** und Long, S.R., (1990), *ATP-Sulphurylase Activity of the nodP and nodQ Genes of Rhizobium meliloti*, *Nature*, **348**, 644-647
- Segundo, E.**, Martínez Abarca, F., van Dillewijn, P., Fernández-López, M., Lagares, A., Martínez-Drets, G., Niehaus, K., Pühler, A. und Toro, N., (1999), *Characterization of Symbiotically Efficient Alfalfa-Nodulating Rhizobia Isolated From Acidic Soils of Argentina and Uruguay*, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **28**, 169-176
- Sekiwa, Y.**, Mizuno, Y., Yamamoto, Y., Kuboat, K., Kobayashi, A. und Koshino, H., (1999), *Isolation of Some Glucosides as Aroma Precursors from Ginger*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 384-389

- Semino, C.E.**, und Robbins, P.W., (1995), *Synthesis of "Nod"-like Chitin Oligosaccharides by the Xenopus Developmental Protein DG42*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **92**, 3498-3501
- Semino, C.E.**, Specht, C.A., Raimondi, A. und Robbins, P.W., (1996), *Homologs of the Xenopus Developmental Gene DG42 are Present in Zebrafish and Mouse and are Involved in the Synthesis of Nod-like Chitin Oligosaccharides During Early Embryogenesis*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **93**, 4548-4553
- Sharp, J.K.**, McNeil M. und Albersheim, P., (1984), *The Primary Structures of One Elicitor-active and Seven Elicitor-inactive Hexa(**b**-D-glucopyranosyl)-D-glucitols Isolated from the Mycelial Walls of Phytophthora megasperma f.sp. glycinea*, J. Biol. Chem., **259**, 11321-11336
- Sheoran A.**, Yadav B.S., Nigam P. und Singh D, (1998 ), *Continuous Ethanol Production from Sugarcane Molasses Using a Column Reactor of Immobilized Saccharomyces cerevisiae HAU-1*, J. Basic Microbiol. **38**, 123-128
- Singh, A. K.**, Saxena, R. und Sambhi, S. S., (1994) *Synthesis of a Chelating Polymer Matrix by Immobilizing Alizarin Red-S on Amberlite XAD-2 and its Application to the Preconcentration of Lead(II), Cadmium(II), Zinc(II) and Nickel(I )*, Anal. Chim. Ac., **295**, 199-204
- Smith L.T.**, Pocard J.A., Bernard T. und Le Rudulier D. (1988), *Osmotic control of Glycine Betaine Biosynthesis and Degradation in Rhizobium meliloti*, J. Bacteriol., **170**, 3142-9
- Smith, R.S.**, (1998), *New Inoculant Technology to Meet Changing Legume Management*, in: *Biological Nitrogen Fixation for the 21<sup>st</sup> Century*, Hrsg. Elmerich, C., Kondorosi, A. und Newton, W.E., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 657
- Somasegaran, P.** und Hoben, H.J., (1994), *Handbook for Rhizobia*, Hrsg. Garber, R.C., Springer Verlag, New York / Berlin / Heidelberg
- Sommer, U.**, (1992), *Der Einsatz von Zucker und Melasse in der chemischen Industrie – Umfang, Bestimmungsfaktoren, Wettbewerbsverhältnisse*, Zuckerindustrie, **117**, 381-388
- Spaink, H.P.**, Sheeley, D.M., van Brussel, A.A.N., Glushka, J., York, W.S., Tak, T., Geiger, O., Kennedy, E.P., Reinhold, V.N. und Lugtenberg, J.J., (1991), *A Novel Highly Unsaturated Acid Moiety of Lipo-Oligosaccharide Signals Determines Host Specificity of Rhizobium*, Nature, **354**, 125-129
- Spaink, H.P.**, (1995), *The Molecular Basis of Infection and Nodulation by Rhizobia: The Ins and Outs of Sympathogenesis*, Annu. Rev. Phytopathol., **33**, 345-368
- Stahelin, C.**, Schultze, M., Kondorosi, E. und Kondorosi, A., (1995), *Lipo-Chitooligosaccharide Nodulation Signals from Rhizobium meliloti Induce their Rapid Degradation by the Host Plant Alfalfa*, Plant Physiol., **108**, 1-8

- Stahelin, C.**, Granado, J., Müller, J., Wiemken, A., Mellor, R.B., Felix, G., Regenass, M., Broughton, W.J. und T.Boller, (1994), *Perception of Rhizobium meliloti Nodulation Factors by Tomato Cells and Inactivation by Root Chitinases*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **91**, 2196-2200
- Strasburger, E.**, (1983), *Lehrbuch der Botanik*, Hrsg. von Denffer, D., Ziegler, H., Ehrendorfer, F. und Bresinsky, A., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart / New York
- Streit, W.R.**, Joseph, C.M. und Phillips, D.A., (1996), *Biotin and Other Water-Soluble Vitamins are Key Growth Factors for Alfalfa Root Colonization by Rhizobium meliloti 1021*, Mol. Plant-Microbe Interact., **9**, 330-338
- Stowers, M.D.**, (1985), *Carbon Metabolism in Rhizobium Species*, Annu. Rev. Microbiol., **39**, 89-108
- Surin, B.P.** und Downie, J.A., (1988), *Characterization of the Rhizobium leguminosarum Genes nodLMN involved in Efficient Host-Specific Nodulation*, Mol. Microbiol., **2**, 173-183
- Thier, E.**, (1996), *Schnitzel und Melasse, Daten, Fakten, Vorschriften*, Hrsg. Ver. Zuckerindustrie, Landwirtschaftsverlag, Münster, 49
- Thömmes, J.**, Weiher, M., Karau, A. und Kula, M.-R., (1995 a), *Hydrodynamics and Performance in Fluidized Bed Adsorption*, Biotech. Bioeng., **48**, 367-374
- Thömmes, J.**, Halfar, M., Lenz, S. und Kula, M.-R., (1995 b), *Purification of Monoclonal Antibodies from Whole Hybridoma Fermentation Broth by Fluidized Bed Adsorption*, Biotech. Bioeng., **45**, 205-211
- Tiwari, R.P.**, Reeve, W.G., Castelli, J.M., Dilworth, M.J. und Glenn, A.R., (1998), *Exopolysaccharides, low pH and Calcium Interactions for Sinorhizobium*, in *Biological Nitrogen Fixation for the 21<sup>st</sup> Century*, Hrsg. Elmerich, C., Kondorosi, A. und Newton, W.E., Kluwer Academic Publ., Dordrecht / Boston / London, 516
- Tiwari, R.P.**, Reeve, W.G., Dilworth, M.J. und Glenn, A.R., (1996), *Acid Tolerance in Rhizobium meliloti Strain WSM 419 Involves a Two-Component Sensor-Regulator-System*, Microbiol., **142**, 1693-1704
- Toffanin, A.**, Basaglia, M. Ciardi, C., Vian, P., Povoletto, S. und Casella, S., (2000), *Energy Content Decrease and Viable-not-Culturable Status Induced by Oxygen Limitation Coupled to the Presence of Nitrogen Oxides in Rhizobium "hedysari"*, Biology and Fertility of Soils, **31**, 484-488
- Trinick, M. J.**, (1982), *Biology*, in: *Nitrogen Fixation: Volume 2 Rhizobium*, Hrsg. Broughton, W. J., Oxford University Press, Oxford, **2**, 76-147
- Truchet, G.**, Roche, P., Lerouge, P., Vasse, J., Camut, S., de Billy, F., Promé, J.-C. und Dénarié, J., (1991) *Sulphated Lipo-Oligosaccharide Signals of Rhizobium meliloti Elicit Root Nodule Formation Organogenesis in Alfalfa*, Nature, **351**, 670-673

- Trzebiatowski, J. R.**, Ragatz, D. M. und de Bruijn, F. J., (2001), *Isolation and Regulation of Sinorhizobium meliloti 1021 Loci Induced by Oxygen Limitation*, Appl. Environ. Microbiol., **67**, 3728-3731
- Tsien, H.-C.**, (1982), *Ultrastructure of the Free-Living Cell*, in: *Nitrogen Fixation: Volume 2 Rhizobium*, Hrsg. Broughton, W. J., Oxford University Press, Oxford, **2**, 76-147
- von Uexküll, H.R.** und Mutert, E., (1995), *Global Extent, Development and Economic Impact of Acid Soils*, Plant and Soil, **171**, 1-15
- Vance, C.P.**, (1997), *Enhanced Agricultural Sustainability Through Biological Nitrogen Fixation* in: *Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainability*, Legocki, Bothe, H. und Pühler, A. Hrsg., NATO ASI Series, **G39**, Springer Verlag Berlin / Heidelberg, 179-186
- Varavinit, S.**, Suphantharika, M. und Shobsngob, S., (1997), *Determination of Optimum Conditions for Autolyzed Yeast Extract Production*, Asean. J. Sci. Technol. Developm. **14**, S. 21 - 29
- Vázquez, M.**, Santana, O. und Quinto, C., (1993), *The nodI and nodJ Proteins from Rhizobium and Bradyrhizobium Strains are Similar to Capsular Polysaccharide Secretion Proteins from Gram-Negative Bacteria*, Mol. Microbiol., **8**, 369-377
- Viesturs, U.E.** (1982), *Foam in Microbiological Processes*, Adv. Biochem. Eng., **21**, 169-222
- Villaescusa, I.**, Salvadó, V. und de Pablo, J., (1997), *Solid-Liquid Extraction of Au(III) from Aqueous Chloride Solutions by Tri-n-Dodecylammonium Chloride Impregnated in Amberlite XAD-2 Resin*, Reactive and Functional Polymers, **32**, 125-130
- Vincent, J.M.**, (1970), *A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*, IPB Handbook No.15, Blackwell Scientific Publications, Oxford / Edinburgh, 6
- Vitolo, M.**, Duranti, M.A. und Pellegrim, M.B., (1995), *Effect of pH, Aeration, and Sucrose Feeding on the Invertase Activity of Intact S. cerevisiae Cells Grown in Sugarcane Blackstrap Molasses*, J. Ind. Microbiol., **15**, 75-79
- Wang, F.-S.** und Cheng, W.-M., (1999), *Simultaneous Optimization of Feeding Rate and Operation Parameters for Fed-Batch Fermentation Processes*, Biotechnol. Prog., **15**, 949-952
- Wang, L.-X.**, Li, C., Wang, Q.-W. und Hui, Y.-Z., (1993), *Total Synthesis of the Sulfated Lipooligosaccharide Signal Involved in Rhizobium meliloti-Alfalfa Symbiosis*, Tetrahedron Lett., **34**, 7763-7766
- Wani, S.P.**, Rupela, O.P., und Lee, K.K., (1995), *Sustainable Agriculture in the Semi-Arid Tropics Through Biological Nitrogen Fixation*, Plant and Soil, **174**, 29-49

- White, S.F.**, Turner, A.P.F., Biltewski, U., Bradley, J. und Schmid, R.D., *On-line Monitoring of Glucose, Glutamate and Glutamine During Mammalian Cell Cultivations*, *Biosensors & Bioelectronics*, **10**, 543-551
- Whitehall, I. N.**, Yang, S. A. und Addo-Yobo, F., (1996), *Adsorption and Desorption Kinetics of Cephalosporin-C on Amberlite XAD-2 and XAD-4 Resins*, ICHEME RESEARCH EVENT, 40-43
- Willis L.B.** und Walker G.C., (1999), *A Novel Sinorhizobium meliloti Operon Encodes an Alpha-Glucosidase and a Periplasmic-Binding-Protein-Dependent Transport System for Alpha-Glucosides*, *J. Bacteriol.*, **181**, 4176-4184
- Win, S.S.**, Impoolsup, A. und Noomhorn, A., (1996), *Growth Kinetics of Saccharomyces cerevisiae in Batch and Fed-batch Cultivation Using Sugarcane Molasses and Glucose Syrup from Cassava Starch*, *J. Ind. Microbiol.*, **16**, 117-123
- Wittler, J.**, (2000), *Aufarbeitung Heterologer Extra- und Intrazellulärer Proteine mit Hilfe der Metallchelate-Protein-Affinitätswechselwirkung*, Dissertation, Universität Bielefeld
- Wright, P.R.**, Muzzio, F.J. und Glasser, B.J., (1999), *Effect of Resin Characteristics on Fluidized Bed Adsorption of Proteins*, *Biotechnol. Prog.*, **15**, 932-940
- Wright P.R.**, Muzzio F.J. und Glasser B.J., (1998), *Batch Uptake of Lysozyme: Effect of Solution Viscosity and Mass Transfer on Adsorption*, *Biotechnol. Prog.*, **14**, 913-921
- Yang, S.A.** und Pyle, D.L., (1999), *The Adsorption Kinetics of Cephalosporin-C on Non-Ionic Polymeric Macropore Amberlite<sup>®</sup> XAD-16 Resin*, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **74**, 216-220
- Yokota, S.** und Ojima, K., (1995), *Physiological Response of Root Tip of Alfalfa to low pH and Aluminium Stress in Water Culture*, *Plant and Soil*, **171**, 163-165
- Yoshida, H.**, Yoshikawa, M. und Kataoka, T., (1994), *Parallel Transport of BSA by Surface and Pore Diffusion in Strongly Basic Chitosan*, *AIChE J.*, **40**, 2034-2043
- Young, J.P.W.** und Haukka, K.E., (1996), *Diversity and Phylogeny of Rhizobia*, *New Phytologist*, **133**, 87-94
- Zahran, H.H.**, (1999), *Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 968-989
- Zhan, H.J.**, Lee, C.C. und Leigh, J.A., (1991), *Induction of the Second Exopolysaccharide (EPS<sub>2</sub>) in Rhizobium meliloti SU47 by Low Phosphate Concentrations*, *J. Bacteriol.*, **147**, 7391-7394
- Zhou, Y.**, Riesen, R. und Gilpin, C.S., *Comparison of Amberlite XAD-2 / Freon 11 Extraction with Liquid / Liquid Extraction for the Determination of Wine Flavour Components*, *J. Agric. Food. Chem.*, **44**, 818-822

## 7 Anhang

### 7.1 Programme zur Steuerung der Zufütterungspumpe beim Infors-Fermenter

#### *Zufütterung über das Steuerungssignal der Säurepumpe*

```
#0, init
acid pump.ct = on
base pump.ct = on
feed pump.ct = on
acid pump.v =0
base pump.v =0
feed pump.v =0
seq=1
ph.sp=6.8

#1, control
if (ph.v > ph.sp+0.1) {acid pump.sp=5 AND feed pump.sp = acid pump.v*0.25} else {acid
pump.sp =0 AND feed pump.sp =0}
if (ph.v <= ph.sp-0.1) {base pump.sp=2} else {base pump.sp =0}
```

#### *Zufütterung über den pO<sub>2</sub>-Wert*

```
// Fütterung über pO2
// Wenn der pO2 unter den pO2-Setpoint fällt, springt die Regelung an.
// Dann läuft die Feed-Pumpe mit 20 s/min sobald der pO2 wieder
// über den pO2-Setpoint steigt.
// Die RPM erhöht sich um 2% sobald der pO2 um 20% unter den pO2-Setpoint fällt.
```

```
#0, Initialisierung
po2.sp=50 //pO2-Setpoint
po2.ct=off //pO2-Regelung AUS
stirrer.sp=150 //Anfangsrührerdrehzahl
feed pump.sp=0 //Pumpensetpoint , Sekunden pro Minute, die die Pumpe an ist
feed_po2_st.v=0 //Variable zum Aktivieren der Feed-Regelung
seq=1
#1, control1
if (po2.v < po2.sp) {seq=2}
if (po2.v < (po2.sp-20)) {stirrer.sp=stirrer.sp*1.02} //Rührerdrehzahl um 2%
erhöhen
#2, control2
if (po2.v >= po2.sp) {feed pump.sp=20}else {feed pump.sp=0}
if (po2.v < (po2.sp-20)) {stirrer.sp=stirrer.sp*1.02} //Rührerdrehzahl um 2%
erhöhen

// #2,wait_5
// if(seq_time>time(00:05)){seq=0}
```

**7.2 Verwendete Chemikalien**

Alle in der nachfolgenden **Tabelle 7.1** aufgeführten Chemikalien entsprechen dem Reinheitsgrad p.A. (für die Analyse), so fern sie nicht anders deklariert sind:

**Tabelle 7.1** Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Art.-/ Chargennr.</b>
Aceton	J.T.Baker	8002
Acetonitril (HPLC grade)	Roth	8825.2
ACTH	Sigma	A-2407
Agar-Agar (f. biol. Zwecke)	Roth	5210.2
Amberchrom <sup>®</sup> cg-161 ms	TOSOHAAS	060700
Amberlite <sup>®</sup> XAD-2 pract.	Rohm & Haas	391400000900
Ammoniumacetat	J.T.Baker	0011
Ammoniumchlorid	Fluka	09702
Angiotensin II, 98 %	Sigma	A-9525
Antischaummittel (Pluronic), techn.	BASF	PC 8100
Bernsteinsäure-Dinatriumsalz	Sigma	S-2378
Borsäure	J.T.Baker	0055
Calciumchlorid-Dihydrat	J.T.Baker	0504
Citronensäure-Monohydrat	Merck	1.00244.1000
D-Biotin (Vit. H; f. biochem. Zwecke, > 98 %)	GERBU	lot 180199
2,5-Dihydroxybenzoesäure	Sigma	G-5254
Eisen-Ammoniumcitrat	Sigma	F-5879
Ethanol	Roth	9065.2
Glutaminsäure-Mononatriumsalz	Fluka	49621
Glutaraldehyd grade II, (25 % w/v in H <sub>2</sub> O)	Sigma	G-5882
Glycerin (> 99 %)	Merck	4094
Harnstoff (Urea)	J.T.Baker	0345
Hefeextrakt (f. biol. Zwecke)	Oxoid	L21
di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	Merck	105099
Kaliumhydroxid	Roth	6751.1
Kaliumdihydrogenphosphat	J.T.Baker	0240
Kaliumnitrat	Merck	105063
Kaliumsulfat-Heptahydrat	Merck	105153
Kobaltsulfat-Heptahydrat	Merck	102556
Kristallviolett (Hexamethylen-Pararosanilinchlorid; > 98 %)	Merck	101408
Kupfersulfat-Pentahydrat	Merck	102790
Luteolin (> 90 %)	Roth	9046.1
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	J.T.Baker	0163
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	J.T.Baker	0168
Mangansulfat-Monohydrat	Merck	105963
D-Mannit	Riedel de Haen	15719
Megabond Elut C18	Analytichem Int.	1225-6015
Methanol (HPLC-grade)	Roth	4627.2
Natriumchlorid	Baker	0278
Natriummolybdat-Dihydrat	Merck	106521



Tabelle 7.1 Fortsetzung

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Art.-/ Chargennr.</b>
ortho-Phosphorsäure (87 %)	Riedel-de-Haen	04107
D-Panhotensäure-Calciumsalz (> 98 %)	Fluka	21210
Bakerbond Phenyl SPE	J.T.Baker	7095-09
Polygoprep 100-30C <sub>18</sub>	Macherey-Nagel	711032.100
Substance P	Sigma	S-6883
Streptomycin-Sulfat (Pharmac. grade)	GERBU	1121
Tetra-N-Acetyl-Chitotetraose	Seikagaku	400423
Tetrazyklin-Trihydrat (> 98 %)	Fluka	87128
Thiaminhydrochlorid (Vit. B1; > 98 %)	GERBU	lot 190199
ToyoPearl <sup>®</sup> -Phenyl 650M	TOSOHAAS	14477
Tri-N-Acetyl-Chitotriose	Seikagaku	400412
Trypton-Extrakt (f. biochem. Zwecke)	Sigma	T-1503
Zinksulfat-Heptahydrat	Merck	108883

### 7.3 Verwendete Geräte, Materialien und Ausrüstung

In der **Tabelle 7.2** auf den folgenden Seiten sind die in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Materialien und Ausrüstungen aufgeführt. Standard-Verbrauchsmaterialien wie Petrischalen, Eppendorf-Reaktionsgefäße, Einmal-Kunststoffküvetten, Einmal-Kanülen, Sterilfilter u.a., die im Rahmen dieser Arbeit von verschiedenen Herstellern bezogen wurden, sind in dieser Tabelle nicht aufgeführt

Tabelle 7.2 Liste der in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Materialien und Ausrüstungen

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ser.Nr. / Typ-Bezeichn.</b>
Autoklav - groß	Zirbus	VST 50/70
- klein	KSG	KSG 112
Blockthermostat	Kleinfeld	BT 100
Digitalkamera	Olympus	C-2000 Zoom
Druckaufnehmer	WIKA	891.13.500
Druckmessumformer	WIKA	Tronic Line
Edelstahl-Speichertank	Thielmann	2063424
Exsikkator	Glaswerk Wertheim	5 L
Exzentrerschüttler I (für Kolben)	B. Braun Biotech Int.	Certomat R
Exzentrerschüttler II (für Kolben)	New Brunswyk	Innova 4300
Fermenter	MBR	Lab 7 L
	MBR	Lab 30 L
-Fermentersteuerung	MBR	IMCS 2000
-steuerungssoftware	MBR	Caroline 2
Fraktionssammler Ferm.	Gilson	FC 204
Gefriertrocknungsanlage	Christ	Beta 1-8K
Gefrierschrank I (-80°C)	Revco	ULT1786-5-VUA



Tabelle 7.2 Fortsetzung

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ser.Nr. / Typ-Bezeichn.</b>
Pipettierhilfen		
- 1-20 µL	Gilson/Abimed	Pipetman® P20
- 20-200 µL	Gilson/Abimed	Pipetman® P200
- 200-1.000 µL	Gilson/Abimed	Pipetman® P1000
Polyamidgewebe	Spörl GmbH	PA-150 / 38
Reagenzglas-Exzentrerschüttler	IKA Labortechnik	KS 125
Reinraumwerkbank	Clean Air Woerden	DLF/RS4
Reinstwasseranlage	Seral	Seralpur Pro 90CN
Rotationsverdampfer	RESONA Technics	S-300
-Heizelement	RESONA Technics	S-200
-Vakuumpumpe	KNF	726.3 FT 18
Schlauchpumpe	Heraeus	Pericor SR1.5000
-Schlauch	Pharmed	NSF-51
Schlauchpumpe	LKB Pharmacia	FP-50
Schlauchpumpe	Ismatec	MC-MS CA4/8
-Schlauch	Karmann & Ellerbrock	1 x 1 mm
Schlauchpumpe	Ismatec	MV-Ca/04
-Schlauch	Ismatec	Ismapren (2.54 I.D.)
Silikonschlauch	Karmann & Ellerbrock	3 x 1 mm
Tischfermenter 1	B.Braun Biotech Int.	Biostat B 2L
-Datenübertragungseinh.	B.Braun Biotech Int.	MFCS/win IFB RS-422
-Steuerungssoftware	B.Braun Biotech Int.	MFCS-win 2.0
Tischfermenter 2	Infors HT	LABFORS 2L
-Steuerungssoftware	Infors HT	Windows IRIS NT
Tischfermenter 3	New Brunswyk	Bioflow C 30
Trübungsmessgerät	Aquasant	AS82
-Messsonde	Aquasant	AF 44S
Ultrafiltrationseinheit	Pall Filtron	Centrasette
-Filterkassetten	Pall Filtron	OS005C05 (5kDa MWCO)
Ultraschallwasserbad	Bandelin	RK106S Sonorex
Vorratsflasche (Kunststoff)	Nalge	228722343
Vortex-Mixer	Bender&Hobein	Genie 2
Waagen	Kern	822-65
	Kern	822
	Mettler	AE 260 Deltarange
	Mettler	PM 34-K Deltarange
Wasserbad	Julabo	HC5 / 9
Zahnradpumpe	IWAKI	MDG-M456B
-Steuereinheit	LUST	Smartdrive VF 1000
-Keypad	LUST	KP100
Zentrifuge 1	SIGMA	6 K-10
Zentrifuge 2	Eppendorf	5415C

7.4 **Abkürzungen**

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
ac	äußerer Cortex
ACP	Acyl-Carrier-Protein
ADP	Adenosindiphosphat
ADS	Adsorbens
AHL	Acyl-homoserin-lacton
AMP	Adenosinmonphosphat
AN	Acetonitril
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Adaptive Acid Tolerance Response (Adaptive Säuretoleranzantwort)
AUS	Australien
bv	biovar
Biom	Biomasse
BNF	(Biological Nitrogen Fixation) Biologische Stickstofffixierung
BR	Brasilia
CE	Clemente Estable (Forschungseinrichtung in Montevideo (ROU))
cfu	colony forming units (Lebendzellzahl)
cmc	critical micellar concentration (kritische Mizellbildungskonzentration)
COS	Chitooligosaccharide
D	Deutschland
DHB	Dihydroxybenzoesäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EPS	Exoploysaccharide
EPS I	Succinoglucan
EPS II	Galactoglucan
eq	Index für Gleichgewicht
EtOH	Ethanol
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
HMW	High Molecular Weight (hochmolekular)
HPLAC	High Performance Liquid Affinity Chromatography Hochleistungs-Flüssig-Affinitätschromatografie
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (Hochleistungs-Flüssigchromatografie)
ic	innerer Cortex
ID	Innendurchmesser
kdo	Keto-Deoxy-Oktuluronsäure
konst	konstant
KPS	Capsular Polysaccharide (Kapsuläres Polysaccharid)
Lb	Leghämoglobin
LB	Leitbündel
LCOS	Lipochitooligosaccharide
LDF	linear driving force (lineare Triebkraft)
li	links
LMW	Low Molecular Weight (niedermolekular)
ln	Logarithmus naturalis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
LPS	Lipopolysaccharide
LPU	La Plata Universidad
Lut	Luteolin
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation
Mbp	Megabasenpaare
MB	Megabytes
Mel	Melassemedium
MeOH	Methanol
MES	3-[ <i>N</i> -Morpholino]-Ethansulfonsäure]
MGT	Mean Generation Time (mittlere Verdopplungszeit)
Min	Minimalmedium
Mio	Million
MMM	Mannitol-Minimal-Medium
MOPS	2-[ <i>N</i> -Morpholino]-Propansulfonsäure]
MS	Massenspektromet-(er)-rie
MSE	Malt Sprout Extract (Malzkeim-Extrakt)
Mt	Metric Tons (Metrische Tonnen: Gewichtseinheit)
MW	Molecular Weight (Molmasse)
MWCO	Molecular Weight Cut-Off (Molekulare Ausschlussgrenze)
Nod	Nodulation
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD <sub>580</sub>	Optische Dichte bei 580 nm
pA	pro analysis (für die Analyse)
PAPS	3'-Phosphoadenosine-5'Phosphosulfat
PC	Personal Computer
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	Potentium Hydrogenium (Wasserstoffionenaktivität)
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
pSym-a (pSym)	Megaplasmid 1 ( <i>Sinorhizobium meliloti</i> )
pSym-b (pExo)	Megaplasmid 2 ( <i>Sinorhizobium meliloti</i> )
RA	Repulica Argentina
re	rechts
REM	Rasterelektronenmikroskop(-ie)
Rhiz.spec.	<i>Rhizobium</i> species
Rm	( <i>Sino</i> )- <i>Rhizobium meliloti</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
ROU	Republica Oriental Uruguay
rRNS	ribosomale Ribonukleinesäure
RNS	Ribonukleinesäure
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
RSA	Rinderserumalbumin
Sm	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
Sm	Streptomycin
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
spec	species (Art)
SSU	small subunit (kleine Untereinheit der rRNS)
Tet	Tetrazyklin
TFA	Trifluoressigsäure

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
ToF	Time of Flight (Flugzeit Massenspektrometrie)
TY	Trypton-Yeast (Trypton-Hefe-Extrakt)
UDP	Uridindiphosphat
ün	über Nacht
UV	Ultraviolett
vis	visible (sichtbar)
w-t	Wildtyp
YEM	Yeast Extract Mannitol Medium (Standardmedium für Rhizobien)
ZTM	Zelltrockenmassekonzentration

## 7.5 Verwendete Formelzeichen

### Dimensionszeichen

M	Masse
L	Länge
N	Stoffmenge
T	Zeit
E	Energie
$\Theta$	Temperatur

<b>Formelzeichen</b>	<b>Bedeutung</b>	<b>Dimension</b>
$A$	Peakfläche	$L^2$
$A_S$	äußere Oberfläche (Stoffaustauschfläche)	$L^2$
$a_V$	volumenbezogene äußere Oberfläche	$L^{-1}$
$c$	Konzentration	$N \cdot L^{-3}$
$c_0$	Anfangskonzentration ( $t = 0$ )	$N \cdot L^{-3}$
$c_{eq}$	Konzentration im Gleichgewicht	$N \cdot L^{-3}$
$c_{NF}$	Konzentration an Nod-Faktoren	$N \cdot L^{-3}$
$c_{NF,eq}$	Konzentration an Nod-Faktoren i. Gleichgew.	$N \cdot L^{-3}$
$c_{L,f}$	Konzentration freier Liganden	$N \cdot L^{-3}$
$c_{L,b}$	Konzentration gebundener Liganden	$N \cdot L^{-3}$
$c_r$	Konzentration am Kornrand	$N \cdot L^{-3}$
$c_t$	Konzentration zum Zeitpunkt $t$	$N \cdot L^{-3}$
$d$	Grenzfilmdicke	$L$
$D$	Raumgeschwindigkeit	$T^{-1}$
$D_{eff}$	Effektiver Diffusionskoeffizient im Korn	$L^2 \cdot T^{-1}$
$D_L$	Diffusionskoeffizient (flüssige Phase)	$L^2 \cdot T^{-1}$
$D_S$	Durchmesser der Säule	$L^2$
$d_P$	Partikeldurchmesser	$L^2$
$e$	Lückengrad	---
$e_0$	Lückengrad des Festbetts	---
$f$	Expansion	---

<b>Formelzeichen</b>	<b>Bedeutung</b>	<b>Dimension</b>
$f_{eq}$	Beladungsverhältnis i. Gleichgewicht	---
$DG_{ads}$	molare freie Enthalpie der Adsorption	$E \cdot N^{-1}$
$g$	Erdbeschleunigung	$L \cdot T^{-2}$
$h$	dynamische Viskosität	$M \cdot L^{-1} \cdot T^{-1}$
$h$	Höhe der Wirbelschicht in der Säule	L
$h_0$	Höhe des Festbetts in der Säule	L
$DH_{ads}$	molare Adsorptionsenthalpie	$E \cdot N^{-1}$
$k_1$	wachstumsunabh. Proportionalitätsfaktor	---
$k_{1,Ord.}$	Geschwindigkeitskonstante Prozess 1. Ordn.	---
$k_2$	wachstumsabh. Proportionalitätsfaktor	---
$k_{ads}$	Geschwindigkeitskonstante f. Adsorption	---
$k_{des}$	Geschwindigkeitskonstante f. Desorption	---
$K$	Konstante für Adsorptionsgleichgewicht	---
$K$	Konstante für Mess. der dyn. Viskosität	$L^4 \cdot T^{-2}$
$K_S$	Affinitätskonstante limitierendes Substrat	$N \cdot L^{-3}$
$m_A$	Masse des Adsorbens	M
$m_s$	Koeffizient des Erhaltungsstoffwechsels	---
$m$	spezifische Wachstumsgeschwindigkeit	$T^{-1}$
$m_{max}$	maximale spez. Wachstumsgeschwindigkeit	$T^{-1}$
$n$	Richardson-Zaki-Koeffizient	---
$n$	Stoffmenge des Adsorptivs	N
$n$	molare Stoffstromdichte	$N \cdot T^{-1} \cdot L^{-2}$
$n_F$	molare Stoffstromdichte in der Flüssigkeit	$N \cdot T^{-1} \cdot L^{-2}$
$n_K$	molare Stoffstromdichte im Korn	$N \cdot T^{-1} \cdot L^{-2}$
$N$	molarer Stoffstrom	$N \cdot T^{-1}$
$n_D$	Verdopplungsgeschwindigkeit	$T^{-1}$
$P$	Produktkonzentration	$N \cdot L^{-3}$
$Pr$	Produktivität	$N \cdot L^{-3} \cdot T^{-1}$
$p$	spez. Produktbildungsgeschwindigkeit	$T^{-1}$
$q$	Beladung	$N \cdot M^{-1}$
$q_b$	Konzentration belegter Plätze	$N \cdot M^{-1}$
$q_{b,eq}$	Konzentration belegter Plätze i. Gleichgew.	$N \cdot M^{-1}$
$q_{max}$	Beladungskapazität	$N \cdot M^{-1}$
$q_r$	Beladung radiale Position	$N \cdot M^{-1}$
$q_s$	spez. Substratverbrauchsgeschwindigkeit	$T^{-1}$
$q_t$	Beladung zum Zeitpunkt $t$	$N \cdot M^{-1}$
$r$	Dichte	$M \cdot L^{-3}$
$r_F$	Dichte der Flüssigkeit	$M \cdot L^{-3}$
$r_K$	Korndichte	$M \cdot L^{-3}$
$r_P$	Dichte Partikel	$M \cdot L^{-3}$
$Re$	Reynolds-Zahl	---
$r$	Radius	L
$r_{ads}$	Beladungsgeschwindigkeit	$N \cdot T^{-1}$
$r_K$	Radius des Adsorbens-Korns	L
$r_P$	Produktbildungsgeschwindigkeit	$M \cdot T^{-1}$
$r'_{V,ads}$	Reaktionsgeschw. Adsorption / Desorption	$N \cdot T^{-1}$
$r_{V,S}$	volumenbez. Substratverbrauchsgeschw.	$M \cdot L^{-3} \cdot T^{-1}$

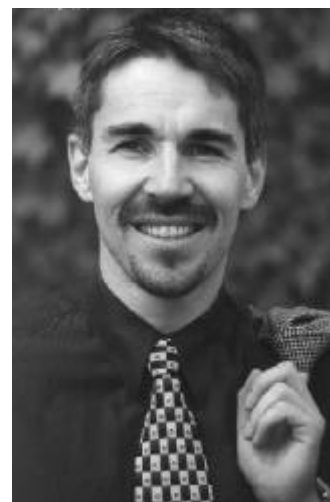
<b>Formelzeichen</b>	<b>Bedeutung</b>	<b>Dimension</b>
$r_{V,X}$	volumenbez. Wachstumsgeschwindigkeit	$M \cdot L^{-3} \cdot T^{-1}$
$r_X$	Wachstumsgeschwindigkeit	$M \cdot T^{-1}$
$S$	Konzentration limitierendes Substrat	$N \cdot L^{-3}$
$S_0$	Startkonzentration limitierendes Substrat	$N \cdot L^{-3}$
$DS_{ads}$	molare Entropie der Adsorption	$E \cdot N^{-1} \cdot \Theta^{-1}$
$s$	Standardabweichung	---
$T$	absolute Temperatur	$\Theta$
$t$	Zeit	$T$
$t_0$	Startzeitpunkt	$T$
$t_F$	Startzeitpunkt Fermentation	$T$
$t_D$	Verdopplungszeit	$T$
$\Delta t$	Zeitdifferenz	$T$
$t$	Raumzeit	$T^{-1}$
$UF$	Umrechnungsfaktor	$M \cdot L^{-3}$
$u$	lineare Strömungsgeschwindigkeit	$L \cdot T^{-1}$
$u_L$	Lockerungsgeschwindigkeit	$L \cdot T^{-1}$
$u_T$	Fallgeschwindigkeit	$L \cdot T^{-1}$
$u_{\neq}$	Austragsgeschwindigkeit	$L \cdot T^{-1}$
$V$	Volumen	$L^3$
$V_e$	Zwischenkornvolumen	$L^3$
$V_I$	gesamtes zugängl. Flüssigkeitsvolumen	$L^3$
$V_P$	Gesamtporenvolumen	$L^3$
$V_R$	Leervolumen Rohr	$L^3$
$V_R$	Arbeitsvolumen Bioreaktor	$L^3$
$V_S$	Gesamtvolumen Feststoff (inklusive Poren)	$L^3$
$V$	Volumenstrom	$L^3 \cdot T^{-1}$
$v$	Volumenstromdichte	$L^3 \cdot L^2 \cdot T^{-1}$
$X$	Biomassekonzentration	$N \cdot L^{-3}$
$X_0$	Biomassekonz. Ende Anpassungsphase	$N \cdot L^{-3}$
$X_t$	Biomassekonzentration zum Zeitpunkt $t$	$N \cdot L^{-3}$
$Y_{X/S}$	Ausbeutekoeffizient, bez. auf das Substrat	$N \cdot N^{-1}$
$Y'_{X/S}$	wahrer Ausbeutekoeffizient	$N \cdot N^{-1}$
$Y_{P/S}$	Produktausbeutekoeffizient, bez. a. Substrat	$N \cdot N^{-1}$
$Y_{P/X}$	Produktausbeutekoeffizient, bez. a.d. Biom.	$N \cdot N^{-1}$



**8 *Curriculum vitae***

***Dipl. Biol. Bodo Kohring***

**Geschlecht** männlich  
**Geburtsdatum** 22.05.1964  
**-ort** Bielefeld  
**Staatsangehörigkeit** deutsch  
**Familienstand** ledig



---

**Schulische Ausbildung**

1970 - 1974 Grundschule  
Jöllenbeck  
1974 - 1983 Neusprachliches  
Gymnasium Enger  
Allgemeine Hochschulreife

**Wehrdienst**

1983 - 1984 Luftwaffe  
Oldenburg / Oldg.

**Studium**

1984 - 1994 Chemie, Biologie & Biotechnologie  
Universität Bielefeld  
1994 - 1995 Anfertigung Diplomarbeit\*  
Lehrstuhl für Fermentationstechnik  
Universität Bielefeld

**Promotion**

1995 - 2001 Promotion  
Lehrstuhl für Fermentationstechnik  
Universität Bielefeld

**Existenzförderung**

1999 – 2001 Teilnahme am PFAU-Programm des Landes NRW  
Lehrstuhl für Fermentationstechnik  
Universität Bielefeld

---

\* Förderung der Diplomarbeit durch ein Stipendium der Richard-Winter-Stiftung, Stuttgart

## 9 **Schriftenverzeichnis**

### **Publikationen**

**Kohring, B.**, (1995b), *Biotechnologische Produktion von Signalmolekülen*, Studies, **2/95**, 21-32

**Kohring, B.**, Baier, R., Niehaus K., Pühler A. und Flaschel, E., (1997), *Production of Nodulation Factors by Rhizobium meliloti: Fermentation, Purification and Characterization of Glycolipids*, Glycoconjugate J., **14**, 963-971

**Niehaus, K.**, Baier, R., Kohring, B., Flaschel, E. und Pühler, A., (1997a), *Symbiotic Suppression of the Medicago sativa Plant Defense System by Rhizobium meliloti Oligosaccharides*, in: *Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainability*, Legocki, Bothe, H. und Pühler, A. Hrsg., NATO ASI Series, **G39**, Springer Verlag Berlin / Heidelberg, 111-114

**Baier, R.**, Schiene, K., Kohring, B., Flaschel, E. und Niehaus, K., (1999), *Alfalfa and Tobacco Cells Act Differently to Chitin Oligosaccharides and Sinorhizobium meliloti Nodulation Factors*, Planta, **210**, 157-164

### **Posterpräsentationen**

**Bodo Kohring**, Ruth Baier, Karsten Niehaus, Alfred Pühler and Erwin Flaschel, *Fermentation, Purification and Characterisation of Glycolipids: Production of Nodulation Factors by Rhizobium meliloti*, Präsentiert auf dem 7<sup>th</sup> Joint Meeting of the Nederlandse Vereniging voor de Bestudering van Glycoconjugaten, the Studiengruppe Glycoconjugate der Gesellschaft für Biologische Chemie and the Group Lillois de Glycobiologie, Nuland, Niederlande, November 1995

**Bodo Kohring**, Ruth Baier, Karsten Niehaus, Alfred Pühler und Erwin Flaschel, *Kultivierung, Aufreinigung und Charakterisierung von Glykolipidderivaten - Fermentative Gewinnung von Nodulationsfaktoren mit dem Bodenbakterium Rhizobium meliloti*, Präsentiert auf der 14. Jahrestagung der Biotechnologen, Wiesbaden, Mai 1996

**Bodo Kohring**, Karsten Niehaus, Alfred Pühler and Erwin Flaschel, *Production of Nodulation Factors by Rhizobium meliloti: Fermentation, Purification and Characterisation of Glycolipids*, Präsentiert auf der 2<sup>nd</sup> European Nitrogen Fixation Conference, Poznan, Polen, September 1996

**Bodo Kohring**, Karsten Niehaus, Alfred Pühler und Erwin Flaschel, *Produktion von Bodenbakterien der Gattung Rhizobium im Pilot-Maßstab und Gewinnung der von den Bakterien Synthetisierten Glykolipidderivate*, Präsentiert auf der 15. Jahrestagung der Biotechnologen, Münster, März 1997

**Bodo Kohring**, Antonio Lagares, José L.Boiardi und Erwin Flaschel, *Neue Strategien zum Einsatz von Rhizobien in der Landwirtschaft*, Präsentiert auf der 16. Jahrestagung der Biotechnologen, Wiesbaden, Mai 1998

**Bodo Kohring**, Antonio Lagares, José L.Boiardi und Erwin Flaschel *New Strategies for the Application of Sinorhizobium in Agriculture*, Präsentiert auf der 3<sup>rd</sup> European Nitrogen Fixation Conference in Lunteren, Niederlande, September 1998