

Optimierung eines fermentativen Verfahrens zur Herstellung einer bakteriellen Phytase

Dissertation

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

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Sophia Kleist

geboren am 13. September 1972

in Lille / Frankreich

August 2002

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 1999 bis August 2002 in der Arbeitsgruppe Fermentationstechnik an der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Erwin Flaschel für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe, für die wissenschaftliche Betreuung und seine ständige Gesprächsbereitschaft.

Herrn Dr. Gerd Miksch danke ich für die Bereitstellung des Themas, für seine wissenschaftliche Unterstützung, für die freundschaftliche Zusammenarbeit und für die stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Arno Cordes danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Herrn Privat-Dozent Dr. Karl Friehs danke ich für seine fachliche Unterstützung und für die stete Gesprächsbereitschaft.

Herrn Privat-Dozent Dr. Bernd Hitzmann und Herrn Dipl.-Chem. Michael Arndt vom TCI Hannover danke ich für die Zusammenarbeit bei der Durchführung der Kultivierungen mit dem FAST-FIA-System. Dabei geht mein besonderer Dank an Michael, der bis tief in die Nacht hinein durchgehalten hat, bis auch der letzte Tropfen Glucose aufgebraucht war.

Bei allen Mitgliedern der AG Fermentationstechnik bedanke ich mich für die ständige Hilfsbereitschaft und für die gute Laboratmosphäre. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dipl. Ing. Thomas Schäffer, den kein technisches Problem aus der Ruhe bringen konnte. Außerdem danke ich Frau Galina Beck für ihre stete Bereitschaft, Routinearbeiten zu übernehmen.

Herrn Kay Fehling und Herrn Ismail Haciosmanoglu danke ich für die Beiträge, die sie im Rahmen ihrer Block- bzw. Vorpraktika geleistet haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir durch ihre in jeder Hinsicht tatkräftige Unterstützung das Studium und die Promotion ermöglicht haben.

Außerdem danke ich ganz besonders meinem Lebensgefährten Martin Grädler für die ständige Hilfsbereitschaft in computertechnischen und anderen Fragen, für seine liebevoll aufmunternden Worte und für seinen „Abholservice“ zu jeder Tages- und Nachtzeit.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Theoretischer Hintergrund	3
2.1 Phytase	3
2.2 Vorkommen von Phytasen	4
2.2.1 Natürliche Vorkommen von Phytasen	4
2.2.2 Phytasen verschiedenen Ursprungs im Vergleich	5
2.3 Anwendung und biotechnologische Gewinnung von Phytasen	7
2.3.1 Bedeutung von Phytasen	7
2.3.2 Einsatzmöglichkeiten von Phytasen	9
2.3.3 Fermentative Gewinnung von Phytasen	12
2.4 Sekretionsysteme von <i>Escherichia coli</i>	14
2.4.1 Der periplasmatische Raum von <i>Escherichia coli</i>	14
2.4.2 Export von Proteinen in das Periplasma von <i>Escherichia coli</i>	15
2.4.3 Sekretion von Proteinen in das Kulturmedium von <i>Escherichia coli</i>	17
2.4.4 Sekretion von Phytase aus <i>Escherichia coli</i>	22
2.5 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	24
2.5.1 Nährmedien	24
2.5.2 Stoffwechsel von <i>Escherichia coli</i>	25
2.5.3 Sauerstoffversorgung	28
2.5.4 Wachstumskinetik	30
2.5.5 Zulaufkultivierungen	33
2.6 Prozeßtechnische Verfahren zur Hochzelldichtekultivierung von <i>Escherichia coli</i>	34
3 Material und Methoden	37
3.1 Geräte	37
3.2 Chemikalien	38
3.3 Bakterienstämme	40
3.4 Kultivierung von Bakterien	45
3.4.1 Medien	45
3.4.2 Stammhaltung	47
3.4.3 Kultivierung im Schüttelkolben	47
3.5 Kultivierung im Bioreaktor	48
3.5.1 Aufbau des Bioreaktors	48
3.5.2 Das FIA-System	52
3.5.3 Zulaufkultivierung mit Regelung durch das FIA-System	55
3.5.4 Zulaufkultivierung mit Regelung über die Sauerstoffsättigung	56
3.5.5 Probenahme	58
3.6 Analytik	58
3.6.1 Optische Dichte	58
3.6.2 Biotrockenmasse	58
3.6.3 Bestimmung der Acetatkonzentration	59
3.6.4 Bestimmung der Glucosekonzentration	59
3.6.5 Bestimmung der Phytaseaktivität	59
3.6.6 Bestimmung des Stickstoffgehaltes nach Dr. Lange	62
3.6.7 Bestimmung der Proteinkonzentration über den BCA-Test	62
3.6.8 Vertikale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	63
3.6.9 Zellaufschlußverfahren	64

3.7 Proteincharakterisierung	65
3.7.1 Metallchelate-Affinitätschromatographie	65
3.7.2 Temperaturoptimum	68
3.7.3 pH-Optimum	68
3.7.4 Bestimmung der spezifischen Aktivität	68
3.7.5 Bestimmung der Aktivierungsenergie nach Arrhenius	69
3.7.6 K_M -Wert mit Phytat als Substrat	70
3.7.7 K_M -Wert mit p-NPP als Substrat	72
4 Ergebnisse und Diskussion	75
4.1 Einfluß verschiedener Faktoren auf die Expression und Sekretion von Phytase	75
4.1.1 Einfluß der Lokalisation der Sekretionskassette auf die Expression und Sekretion von Phytase	75
4.1.2 Expression und Sekretion der Phytase unter dem Einfluß verschiedener Promotoren	79
4.1.3 Einfluß der Medienzusammensetzung auf die Sekretion von Phytase	81
4.2 Satzkultivierungen der Stämme <i>E.coli</i> BL21(DE3)pPhyt109 und <i>E.coli</i> BL21(DE3)pPhyt148	82
4.2.1 Satzkultivierung des Stammes <i>E.coli</i> BL21(DE3)pPhyt109 in synthetischen Medium und in TB-Medium	82
4.2.2 Satzkultivierung des Stammes <i>E.coli</i> BL21(DE3)pPhyt148 in TB-Medium	85
4.3 Strategien zur Regelung von Zulaufkultivierungen des Stammes <i>E.coli</i> BL21(DE3)pPhyt109	89
4.3.1 Zulaufkultivierung mit Regelung des Zulaufs durch das FIA-System	89
4.3.2 Zulaufkultivierung mit Regelung über die Sauerstoffsättigung	107
4.4 Enzymatische Eigenschaften der Phytase-His₆	133
4.4.1 Gewinnung der Phytase-His ₆ durch Kultivierung von <i>E.coli</i> BL21(DE3)pPhyt190	133
4.4.2 Aufreinigung der Phytase-His ₆ mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie	133
4.4.3 Aufbau des Phytasegens	134
4.4.4 Bestimmung des Temperaturoptimums der Phytase-His ₆	136
4.4.5 Bestimmung des pH-Optimums der Phytase-His ₆	138
4.4.6 Bestimmung der spezifischen Aktivität der Phytase-His ₆	139
4.4.7 Bestimmung der Aktivierungsenergie der Phytase-His ₆	140
4.4.8 Bestimmung des K_M -Wertes der Phytase-His ₆ mit Phytat	142
4.4.9 Bestimmung des K_M -Wertes der Phytase-His ₆ mit p-NPP	144
5 Zusammenfassung	147
6 Literaturverzeichnis	151
7 Anhang	165
8 Curriculum vitae	168
9 Schriftenverzeichnis	169

1 Einleitung und Zielsetzung

Phytase katalysiert die Hydrolyse von Phytinsäure unter Freisetzung anorganischen Phosphats. Die Phytase soll mit dieser Eigenschaft Phosphat für monogastrische Tiere zugänglich machen, das in Form von Phytinsäure in Futtermitteln vorkommt.

Der größte Teil des in Nahrungs- und Futtermitteln enthaltenen Phosphats liegt in Form von Phytinsäure vor. Da Monogastrier keine Phytase bilden können, soll durch eine Supplementierung des Futtermittels mit Phytase der in Form von Phytinsäure vorliegende Phosphor zugänglich gemacht werden. Die dadurch entstehende Verbesserung der Phosphatverwertung reduziert die sonst zusätzlich benötigte Menge anorganischem Phosphats in Futtermitteln um etwa ein Drittel. Von großer ökologischer Bedeutung ist die Reduzierung der Phosphatausscheidung durch die verbesserte Phosphatverwertung auf landwirtschaftlich genutzten Böden und in Gewässern, die in hohem Maße durch den Eintrag von Phosphor aus der Düngung mit Exkrementen monogastrischer Nutztiere belastet werden.

Ein weiterer Vorteil der Phytase ist, daß sie den antinutritiven Effekt verringert, den die Phytinsäure durch Chelatbildung mit Mengen- und Spurenelementen hervorruft (Lantzsch *et al.* 1990).

Bisher bekannt ist die Phytase aus *Aspergillus niger*, die im industriellen Maßstab fermentativ hergestellt wird (Wodzinski *et al.* 1996).

Seit kurzem ist eine Phytase aus *Escherichia coli* isoliert und charakterisiert worden. Mit Hilfe eines Sekretionssystems, das von Gerd Miksch (Universität Bielefeld) entwickelt wurde, ist es erstmalig möglich, Phytase ins Kulturmedium zu sekretieren und somit *Escherichia coli* als Produktionsorganismus zu verwenden. Dieses und eine 8-fach höhere spezifische Aktivität als die der pilzlichen Phytase läßt sie für eine industrielle Anwendung interessant erscheinen.

Ziel dieser Arbeit ist es, eine Kultivierungsmethode zu entwickeln, mit der die Ausbeute an Phytase im Kulturmedium erhöht werden kann. In Schüttelkolbenkultivierungen sollten verschiedene *Escherichia coli*-Sekretionsstämme auf ihr Sekretionsverhalten getestet werden. Weiterhin sollte eine Maßstabsvergrößerung bis zum 7 L-Bioreaktor erfolgen, um verschiedene Satzkultivierungsstrategien zu testen. Um eine weitere Erhöhung der Phytaseaktivität

im Kulturmedium zu erreichen, sollten verschiedene Strategien zur Regelung von Zulaufkultivierungen getestet werden:

- Zulaufkultivierung mit Regelung der Glucosekonzentration auf einen gegebenen Sollwert im Medium
- Zulaufkultivierung mit Regelung über die Sauerstoffsättigung im Medium
- Zulaufkultivierung mit Intervallregelung über die Sauerstoffsättigung im Medium
- Zulaufkultivierung mit Regelung der Sauerstoffsättigung auf einen gegebenen Sollwert im Medium

Weiterhin sollte eine säulenchromatographische Aufreinigung von Phytase-His₆ über eine Ni-NTA-Agarose erreicht werden, die ermöglicht, enzymatische Eigenschaften wie die Michaelis-Menten-Konstante der reinen Phytase zu untersuchen.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Phytase

Phytasen gehören zu der Gruppe der Phosphatasen. Sie spalten Phosphatgruppen (P_i) von Phytinsäure (myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisdihydrogenphosphat; IP6) ab, aber auch von anderen phosphorylierten Substraten wie z. B. p-Nitrophenylphosphat. Die Hydrolyse von Phytinsäure verläuft schrittweise, und es entstehen neben anorganischem Phosphat niedere Inositolphosphatester (IP5 – IP1) und myo-Inositol (Abb. 2.1).

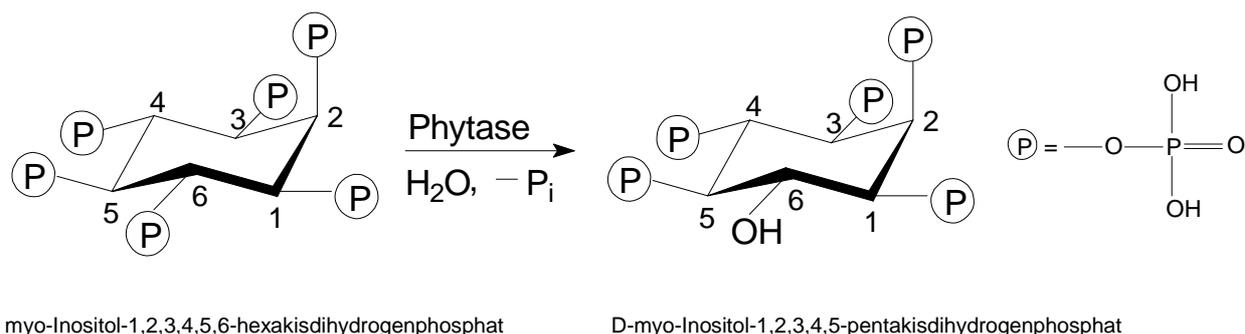


Abb. 2.1 Hydrolyse von Phytinsäure.

Es sind zwei verschiedene Typen von Phytasen bekannt:

- 3-Phytase (EC 3.1.3.8)
- 6-Phytase (EC 3.1.3.26).

3-Phytasen spalten zunächst die Phosphatgruppe am C3-Atom des Inositringes ab, während 6-Phytasen mit dem Angriff auf die Phosphatgruppe am C6-Atom beginnen. Beide Reaktionstypen werden sowohl von Phytasen pflanzlichen Ursprungs als auch von Phytasen bakteriellen Ursprungs katalysiert. Tab. 2.1 zeigt einige Beispiele für beide Phytase-Typen.

Tab. 2.1 Beispiele für 3- und 6-Phytasen verschiedenen Ursprungs.

Ursprung der Phytasen	3-Phytase	6-Phytase
Mikrobieller Ursprung	<i>Aspergillus niger</i> (Igbasan <i>et al.</i> 2000)	<i>Escherichia coli</i> (Greiner <i>et al.</i> 2000)
	<i>Bacillus subtilis</i> (Igbasan <i>et al.</i> 2000)	<i>Paramecium</i> (Greiner <i>et al.</i> 2000)
		<i>Peniophora lycii</i> (Igbasan <i>et al.</i> 2000)
Pflanzlicher Ursprung	Sojabohne (Phillipy & Bland 1988)	Weizen (Phillipy 1989)
		Roggen (Greiner <i>et al.</i> 1998)

2.2 Vorkommen von Phytasen

2.2.1 Natürliche Vorkommen von Phytasen

Phytasen sind weit verbreitet und finden sich in Pflanzen, in tierischem Gewebe und in Mikroorganismen (Liu *et al.* 1998). Der erste Nachweis von Phytase gelang Suzuki *et al.* in Reiskleie. Hauptsächlich kommen pflanzliche Phytasen in Getreide, Gemüse und verschiedenen Samen und Pollen vor. Dort spielt beim Keimen der Abbau von Phytinsäure durch Phytase eine wichtige Rolle (Greene *et al.* 1975).

Phytase aus tierischem Gewebe findet sich sowohl in Erythrocyten und Blutplasma (Martin *et al.* 1985) als auch im Dünndarm verschiedener Arten von Säugetieren (Cooper *et al.* 1983). Bisher ist im Vergleich zu anderen Phytasen wenig zur Untersuchung der Proteincharakteristik von Phytase aus tierischem Gewebe unternommen worden (Liu *et al.* 1998).

Zu den Mikroorganismen, die Phytasen produzieren, gehören Pilze, Hefen und Bakterien.

Pilzliche Phytasen finden sich in verschiedenen Pilzarten wie z.B. *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* und *Rhizopus* (Gargova *et al.* 1997; Howson *et al.* 1983). Alle untersuchten Pilzarten produzieren aktive extrazelluläre Phytase. Die höchsten Aktivitäten fanden sich in *Aspergillus niger* (van Hartingsveldt *et al.* 1993).

In Hefen findet sich extrazelluläre Phytaseproduktion in *Schwanniomyces occidentalis* und *Arxula adenivorans*. Für *Saccharomyces cerevisiae* ist eine intrazelluläre Phytase bekannt (Konosuke *et al.* 1999).

Als Phytase produzierende Bakterien sind z.B. *Bacillus subtilis* (Keruvuo *et al.* 1998), *E. coli* (Greiner *et al.* 1993), *Pseudomonas* (Irving *et al.* 1971) und *Klebsiella* (Shah *et al.* 1990) bekannt. Dabei produzieren Gram-positive Bakterien wie *Bacillus subtilis* extrazelluläre Phytase. Im Gegensatz dazu können Gram-negative Bakterien wie *E. coli* oder *Klebsiella terrigena* (Greiner *et al.* 1997) die in der Zelle produzierten heterologen Proteine nicht in das Kulturmedium sekretieren.

2.2.2 Phytasen verschiedenen Ursprungs im Vergleich

Ein Vergleich von Phytasen unterschiedlichen Ursprungs ergibt, daß es sich um verschiedene Moleküle mit spezifischen Eigenschaften handelt.

Tab. 2.2 zeigt, daß sich die Molmassen der verschiedenen Phytasen unterscheiden. Sie betragen zwischen 38 kDa und 490 kDa. Z. B. produziert *Klebsiella aerogenes* sowohl ein sehr kleines Molekül mit 10-13 kDa als auch ein sehr großes mit 700 kDa (Tambe *et al.* 1994).

Die meisten der in Tab. 2.2 aufgeführten Phytasen weisen ein pH-Optimum zwischen 4,5 und 6,0 auf. Nur wenige wie die Phytase aus tierischem Gewebe, die aus *Enterobacter* und die aus *Bacillus subtilis* besitzen ein pH-Optimum im neutralen bis basischen Bereich (pH 7-8).

Das Temperatur-Optimum der Phytasen liegt zwischen 50 °C und 60 °C. Nur wenige zeigen ein höheres Temperatur-Optimum.

Eine weitere Eigenschaft, die für die Verwendung der Phytase als Futtermitteladditiv eine wichtige Rolle spielt, ist die Thermostabilität. Die in Kap. 2.3.3 genannten käuflichen Phytaseprodukte besitzen eine noch unzureichende Thermostabilität für die Futtermittelproduktion. Diese konnte durch geeignete Formulierungen der Phytase (z.B. Granulierung bzw. „Coating“) ausgeglichen werden. Das „Coating“ basiert auf einem patentierten Verfahren der Firma Novo Nordisk.

Tab. 2.2 Eigenschaften von Phytasen verschiedenen Ursprungs.

	Ursprung	Molmasse (kDa)	Temperatur-Optimum [°C]	pH-Optimum	Referenz
Bakterien	<i>B. subtilis</i>	38-43	55-60	7	Igbasan <i>et al.</i> 2000; Kerovuo <i>et al.</i> 1998
	<i>E.coli</i>	42	55	4,5	Greiner <i>et al.</i> 1993
	<i>Enterobacter</i>	-	50	7,0 - 7,5	Yoon <i>et al.</i> 1996
	<i>K. aerogenes</i>	10 - 13; 700	60 - 70	4,5; 5,2	Tambe <i>et al.</i> 1994
Pilze	<i>A. ficuum</i>	48	45	6	Pasamontes <i>et al.</i> 1997
	<i>A. niger</i>	49	50	5,5	Igbasan <i>et al.</i> 2000
	<i>A. terreus</i>	214	70	4,5	Yamada <i>et al.</i> 1986
Hefe	<i>S. castellii</i>	490	77	4,4	Segueilha <i>et al.</i> 1992
	<i>S. cerevisiae</i>	-	45	4,6	Nayini <i>et al.</i> 1984
	<i>A. adenivorans</i>	-	75	4,5	Konosuke <i>et al.</i> 1999
Pflanzen	Mais	76	55	4,8	Laboure <i>et al.</i> 1993
	Sojabohne	60	55	4,5	Gibson <i>et al.</i> 1988
	Weizenkleie	47	55	5	Lim <i>et al.</i> 1973
Tierisches Gewebe	Ratte	70 - 90	-	7,5 - 7,8	Yang <i>et al.</i> 1991

Eine weitere Möglichkeit, um die Thermostabilität der Phytase zu erhöhen, ist die Nutzung eines thermotoleranten *Aspergillus niger*-Stammes (Mandviwala & Khire 2000). Aus *Aspergillus fumigatus* ist eine andere thermostabile pilzliche Phytase isoliert und anschließend in *Aspergillus niger* überexprimiert worden (Pasamontes *et al.* 1997). Außerdem konnte aus *Bacillus sp.* eine thermostabile Phytase gewonnen und in *E. coli* überexprimiert werden (Kim *et al.* 1998).

Ein Nachteil der pilzlichen Phytasen im Vergleich zur *E. coli*-Phytase ist, daß sie eine geringere proteolytische Stabilität gegenüber Pepsin und Pankreatin aufweisen. *E. coli*-Phytase zeigt in diesem Bereich eine deutlich höhere Stabilität (Igbasan *et al.* 2000). Auch weist die *E. coli*-Phytase eine bessere Phosphorverdaulichkeit für Broiler, Legehennen und Ferkel als die pilzliche Phytase (Igbasan *et al.* 2001) auf. Ein weiterer Vorteil der *E. coli*-Phytase gegenüber der pilzlichen ist die 8-fach höhere spezifische Aktivität (Greiner *et al.* 1993).

2.3 Anwendung und biotechnologische Gewinnung von Phytasen

2.3.1 Bedeutung von Phytasen

Phytinsäure, ein Substrat der Phytase, kommt in reifen Samen von Getreide, Hülsen- und Ölfrüchten vor und stellt somit einen Bestandteil der Ernährung von Monogastriern dar. Da Monogastrier keine Phytase bilden können, sind sie nicht in der Lage, Phytinsäure vollständig zu verdauen. Demzufolge werden Phytate im Verdauungskanal nur in geringem Umfang und zwar durch die pflanzeigene Phytase gespalten. Da der Anteil des in Phytinsäure enthaltenen Phosphors am Gesamt-Phosphor in den pflanzlichen Futtermitteln hoch ist, und dieser Phosphor kaum verdaulich ist, erfolgt traditionell eine Zugabe von Phosphor zum Mischfutter in Form von anorganischen Phosphorquellen wie z.B. Mono- oder Dicalciumphosphat und Tiermehl. Dadurch kann der Bedarf der Tiere an diesem wichtigen Mineralstoff gedeckt werden. Tabelle 2.3 ist zu entnehmen, daß bei den meisten pflanzlichen Futterkomponenten der Phosphor zu mehr als 50 % in Form des Phytin-Phosphors vorliegt.

Tabelle 2.3 Gehalte an Phosphor und Phytinphosphor in Futtermitteln, stark gekürzt nach Lantzsch (1990).

Futtermittel	Gesamt-P (g/kg)	Phytin-P (%)
Mais	3,84	75
Weizen	4,04	73
Gerste	3,95	65
Hafer	4,03	61
Ackerbohnen	6,33	68
Erbsen	5,36	65
Lupinen	7,19	57
Sojabohnenextrakt	7,02	56
Rapsextrakttschrot	11,9	67
Sonnenblumenextrakttschrot	10,06	75

Der in der Phytinsäure gebundene Phosphor wird zum überwiegenden Teil unverdaut über die Fäkalien wieder ausgeschieden und kann in Gebieten bzw. auf

Betrieben mit intensiver Tierproduktion zu starken Phosphoranreicherungen in Böden und Gewässern und damit zu Umweltproblemen führen.

Eine weitere negative Eigenschaft der Phytinsäure ist die Ausbildung von Chelatkomplexen mit Metallionen in einem pH-Bereich von 2 - 7, der auch im Verdauungstrakt vorherrscht. Somit wird die Aufnahme von Mengenelementen wie Ca, Mg, K und Na und von Spurenelementen wie Fe, Cu, Zn, Mn und Co vermindert. Die Folge davon ist ein geringerer Mineralstoffumsatz (Reddy *et al.* 1982).

Phytate binden aber auch an Proteine und machen sie somit gegenüber einer proteolytischen Verdauung resistent. *In-vitro*-Studien von Kemme *et al.* (1995) zeigten, daß in Anwesenheit von Phytinsäure bei pH 2 weniger als 65 % der Proteine (Rapssamen) und bei anderen Futtermitteln sogar weniger als 30 % der Proteine in Lösung waren. Bei einer Relation zwischen Protein und Phytinsäure von 10 : 1 und geringer waren alle Proteine präzipitiert. Nach Kemme *et al.* (1995) ist davon auszugehen, daß im Magen von Schweinen generell eine Präzipitation von Proteinen und proteolytischen Enzymen sowie von Phytinsäure stattfindet. Damit wird auch die Aktivität von Verdauungsenzymen wie α -Amylase (Sharma *et al.* 1978), Pepsin und Trypsin (Simell *et al.* 1991) herabgesetzt. Darüber hinaus beeinträchtigt Phytinsäure auch andere funktionelle Eigenschaften von Proteinen wie die Emulsionsfähigkeit (Simell *et al.* 1991) Dies mindert den Nutzen bei Einsatz von Proteinisolaten in der Nahrungs- und Futtermittelindustrie.

Auf Grund der beschriebenen antinutritiven Effekte und der genannten Umweltprobleme sind Phytate für monogastrische Tiere unerwünschte Inhaltsstoffe. Eine Beseitigung der Phytate ist auf verschiedene Weise denkbar. Eine mechanische Beseitigung beim Auftreten von Phytaten in Oberflächenschichten von Samen (Weizen, Gerste, Reis) ist nicht ökonomisch. Außerdem werden viele wichtige Mineralstoffe mit abgetragen. Verschiedene chemische Methoden (Simell *et al.* 1991) sind ebenso unökonomisch bzw. im industriellen Maßstab nicht durchführbar. Desweiteren werden dadurch nur etwa 70 % der Phytate eliminiert. Die übliche Wärmebehandlung bei der industriellen Futterbereitung reicht nicht aus, um die Phytate zu reduzieren (Simell *et al.* 1991). Deshalb bieten sich Phytasen an, die Phytate in Orthophosphat und Inositol spalten, um so die Verwertbarkeit von nativem Phosphor von Futtermitteln zu verbessern. Dieses ist entweder durch eine gezielte Nutzung der nativen Phytasegehalte bestimmter Futtermittel (z.B. Weizen) möglich oder durch eine Supplementierung des Futters mit mikrobiell gewonnenen Phytasen.

Zu dem erstgenannten Weg ist festzustellen, daß der Phytasegehalt in den Futtermitteln stark schwankt. Während Roggen als phytasereich gilt, werden für Mais, Sojaextraktionsschrot und Hafer geringe, für Weizen und Gerste mittlere Phytaseaktivitäten beschrieben. Zusätzlich sind die pflanzlichen Phytasen sehr abbauempfindlich. Durch Hitzebelastungen, wie sie beispielsweise beim Mahlen oder Pelletieren auftreten, werden sie schnell zerstört. Die native Phytase kann somit nur einen begrenzten Anteil zur Verbesserung der Phosphorverdaulichkeit beitragen. Seit wenigen Jahren ist es jedoch möglich, Phytase großtechnisch zu produzieren. Dieses geschieht vorzugsweise durch Fermentation mit dem gentechnisch modifizierten Pilz *Aspergillus niger*.

2.3.2 Einsatzmöglichkeiten von Phytase

Im folgenden sollen anhand von einigen typischen Versuchsergebnissen aus der Literatur die Einsatzmöglichkeiten von Phytase verdeutlicht werden. Bei der Schweineaufzucht zeigte sich, daß 500 Einheiten Phytase je kg Futter etwa 1 g Phosphor aus Monocalciumphosphat unter den Bedingungen einer Getreide-Sojadiät ersetzen können (Hoppe *et al.* 1993). Die P-Retention konnte von 44 % auf 63 % gesteigert und die Phosphorexkretion via Faeces und Urin ohne Leistungseinbußen um 56 % reduziert werden. Die Autoren halten eine Reduktion der P-Exkretion unter praxisüblichen Einsatzbedingungen von Phytase von 25-40 % für realisierbar. Außerdem wurde ein deutlicher Einfluß der Phytase auf die Zinkverwertung festgestellt. Zinkzusätze werden seit 1955 dem Mischfutter für Schweine zugesetzt, um Zinkmangelkrankheiten wie Parakeratose vorzubeugen. Durch Einsatz von Phytase läßt sich neben der P- auch die Zn-Supplementierung reduzieren.

In einem Versuch mit Ferkeln im Gewichtsbereich von 7 bis 25 kg (Müller 1995) wurde gezeigt, daß die Phosphor- und Calciumverdaulichkeit dosisabhängig durch Phytasezugabe von 34,0 auf 49,5 % bzw. 34,0 auf 54,0 % verbessert werden konnte. Ähnliche Effekte wurden auch von Pallauf & Rimbach (1995) und Pallauf *et al.* (1994) beobachtet.

Kemme *et al.* (1995) zeigten in *in vitro*-Versuchen, daß Phytase die Präzipitation von Proteinen im Magen verhindern bzw. die Reduktion von bereits präzipitierten

Proteinen durch Pepsin beschleunigen kann. Bei Rapsextraktionsschrot war es sogar nur mit Hilfe von Phytase möglich, Protein wie z.B. Pepsin zu lösen.

Mroz *et al.* (1994) und Kemme *et al.* (1995) wiesen in Versuchen mit Schweinen nach, daß durch Phytase die Verdaulichkeit von Aminosäuren, der Trockenmasse, der organischen Masse und von Rohprotein signifikant erhöht wurde. Dagegen hatte die Zugabe von anorganischem Phosphat keine derartigen Effekte. Campbell *et al.* (1995) und Selle *et al.* (1996) wiesen nach, daß durch die Phytasewirkung nicht nur eine bessere Verdaulichkeit von Proteinen und Aminosäuren hervorgerufen wurde, sondern auch eine verbesserte Futtermittelverwertung. Dies führt wiederum dazu, daß weniger Stickstoff ausgeschieden und dadurch die Umwelt weniger belastet wird. Diese Effekte können durch die alleinige Zugabe von anorganischem Phosphat nicht erreicht werden.

Ähnlich wie beim Schwein wurden die positiven Effekte der Phytase auch bei Geflügel nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, daß eine signifikante Erhöhung der Gewichtszunahme und des Aschegehaltes in den Knochen (Tibia) im Vergleich zu einer Fütterung ohne Phytase erreicht werden konnte. Die Gewichtszunahme war sogar größer als bei der Phosphorversorgung mit Dicalciumphosphat. Müller (1995) berichtete von Versuchen mit Broilerküken, bei denen durch die Reduzierung des Phosphorniveaus von 0,75 auf 0,55 % die Phosphorausscheidung deutlich von 0,36 g/d auf 0,23 g/d gesenkt wurde. Durch die Zulage der Phytase konnte dosisabhängig die Phosphorverwertung von 36 % auf 43 % verbessert werden. Die tägliche Phosphorbilanz wurde durch die Phytasegaben auf das Niveau der positiven Kontrolle (0,75 % im Futter) erhöht. Da die Tiere weniger Phosphor mit dem Futter aufnahmen, sank die tägliche Phosphorausscheidung bis zu 50 %.

In den letzten Jahren wurde auch bekannt, daß Interaktionen zwischen Phytinsäure und Cadmium bestehen. Bei Vorhandensein von Phytinsäure erhöht sich die Konzentration von Cadmium in Leber und Niere. Bei Ratten und Hühnerküken konnte gezeigt werden, daß diese antinutritiven Effekte der Phytinsäure durch Zugabe von mikrobieller Phytase vollständig kompensiert wurden (Guillot *et al.* 1995).

In Nordamerika wurde festgestellt, daß fließende Gewässer stark mit Phosphor belastet sind. Simell *et al.* 1991 beschrieb, daß Fischzucht Ursache dieser Verschmutzung ist, wobei der Phosphor vom Fischmehl stammt, welches als Proteinquelle in der Fischzucht verwendet wurde. Der Ersatz von Fischmehl durch

pflanzliche Proteine wurde umfassend untersucht. Auch Pflanzenproteine besitzen Phytat-Phosphor, der für die Fische nicht verfügbar ist.

An dieser Stelle ist noch zu erwähnen, daß beim Abbau von Phytaten durch Phytasen Inositol frei wird. Inositol ist aber ein wichtiger Wachstumsfaktor, der die gesamte Verdaulichkeit von Futter bzw. Nahrung erhöht und die anderen bereits erwähnten positiven Effekte der Phytasewirkung ergänzt.

Im Gegensatz zur Verwendung von Phytasen in der Tierproduktion ist die Verwendung in der Nahrungsmittelproduktion noch wenig verbreitet.

Zur Herstellung phytatfreien Sojaproteins können mikrobielle Phytasepräparate eingesetzt werden. Dabei ist die Phytasebehandlung entweder vor oder nach der Proteinisolierung aus den Samen möglich. Weiterhin wurden Phytasen zur Produktion von phytatfreier Sojabohnen-Milch eingesetzt.

Eine wichtige Anwendung der Phytase besteht bei der Herstellung von Brot mit geringem Phytatgehalt. Dazu kann die Phytasebehandlung in den Produktionsprozeß integriert werden, da das Enzym während der Fermentation wirken kann. Damit wird eine bessere Mineralverfügbarkeit erreicht (Sandberg *et al.* 1989).

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit von Phytase zur Reduzierung des Phytatgehaltes ist aufgrund der Thermostabilität in der Saftindustrie denkbar.

Weitere Anwendungsmöglichkeiten von Phytasen bestehen in der Herstellung von hexa- und pentaphosphatfreiem Haferbrei und in der Sojakäseproduktion.

Da der enzymatische Abbau der Phytate weder mutagene noch toxische Nebenprodukte erzeugt, ist die Verwendung von Phytasen umweltfreundlich und wird bei der Entwicklung sauberer Technologien wertvoll sein.

2.3.3 Fermentative Gewinnung von Phytase

Bisher wurde Phytase großtechnisch im fermentativen Verfahren mit Hilfe von *Aspergillus niger* hergestellt.

In Deutschland sind zwei Präparate auf dem Markt:

1. Phytase ZY9 der Firma Novo Nordisk (DK). Dieses Produkt wird als flüssige Formulierung (ZY96) bzw. speziell stabilisiertes, gecoatetes Granulat (ZY 98) von der Lohmann-LTE in Cuxhaven angeboten.
2. Natuphos der Firma Gist Brocades (NL) wird durch die BASF, Ludwigshafen vertrieben. Dieses Produkt wird in flüssiger Formulierung angeboten, aber auch als speziell stabilisiertes Granulat. Natuphos war das erste Phytaseprodukt, das in großem Maßstab eingesetzt wurde (in den Niederlanden seit 1991).

Im europäischen Raum ist noch das Phytaseprodukt FINASE F der Firma Alko zu nennen, das in Finnland produziert wird.

In der Literatur werden zur fermentativen Gewinnung von Phytase aus *Aspergillus niger* zwei verschiedene Verfahren beschrieben: Festphasenfermentation (*solid state fermentation*) (Mandviwala *et al.* 2000) und Submersfermentation (Howson *et al.* 1983; Han & Gallagher 1987a). Bei der Festphasenfermentation wird ein festes Medium mit destilliertem Wasser befeuchtet, dampfsterilisiert, mit Sporen beimpft und anschließend bei einer bestimmten Temperatur (z.B. 30 °C) mehrere Tage inkubiert. Dabei scheint der Gehalt an Wasser im festen Medium sowohl für das Wachstum der Zellen als auch für die Produktion von Phytase eine wichtige Rolle zu spielen. (Mandviwala *et al.* 2000; Han *et al.* 1987a). Das Medium kann dabei aus z.B. Weizenkleie, Sojabohnenmehl oder einem anderen Nebenprodukt der Landwirtschaft bestehen. Zur Aufarbeitung wird die Phytase mit einer Calciumchloridlösung extrahiert (Mandviwala *et al.* 2000).

Beim Submersverfahren besteht das Medium aus einer Glucose-Mineralstoff-Lösung. Die Phytase kann direkt ohne weitere Aufarbeitung im Überstand bestimmt werden (Han & Gallagher 1987a).

Der Hauptunterschied zwischen der Festphasenfermentation und der Submersfermentation besteht darin, daß im Rührkessel das Medium gelöst und homogen ist, während es bei der Festphasenfermentation ungelöst und damit inhomogen ist. Außerdem ist der Flüssigkeitsgehalt bei der Festphasenfermentation viel geringer als im Rührkessel.

Die Phytaseproduktion erreicht bei Verwendung einer Festphasenfermentation ein höheres Niveau als bei einer Submersfermentation (Han *et al.* 1987b).

Als weiteres Beispiel für die fermentative Gewinnung von Phytase soll die Hefe *Hansenula polymorpha* erwähnt werden. Es ist mit *Hansenula polymorpha* gelungen, Phytase extrazellulär in sehr hoher Konzentration (bis zu 13 g/L) herzustellen. *Hansenula polymorpha* diente dabei als Expressionswirt und enthielt das Phytasegen einer *Aspergillus*-Spezies (Mayer *et al.* 1999). Die Fermentation wurde unter Bedingungen einer Zulaufkultivierung in einem Glucose-Mineralsalz-Medium durchgeführt. Die Zufütterung erfolgte mit Glucosesirup, wenn die Sauerstoffsättigung des Mediums sich erhöhte. Es wurde festgestellt, daß eine Sauerstofflimitierung zu einem Stillstand der Phytaseakkumulation führt. Weiterhin wurde gezeigt, daß es möglich ist, auf diese Weise bis zu einem Maßstab von 2000 L Fermentervolumen Phytase zu produzieren.

Auch Bakterien eignen sich zur fermentativen Gewinnung von Phytase. Eine extrazelluläre Phytase aus *Bacillus subtilis* konnte sowohl im Rührkessel als auch mit Hilfe von Festphasenfermentation gewonnen werden (Shimizu 1992).

Weiterhin konnte eine intrazelluläre Phytase aus *E. coli* fermentativ hergestellt werden. Dazu wurde *E. coli* als Expressionswirt genutzt, der das Phytasegen *appA* enthielt. Es wurde eine Hochzelldichtefermentation im 2 L-Maßstab in einem definierten Glucose-Mineralsalz-Medium durchgeführt. Die Zufütterung von Glucose erfolgte, wenn die Sauerstoffsättigung im Medium sich erhöhte. Die Expression von Phytase wurde durch Zugabe von Lactose induziert. Anschließend mußte die Phytase zur Aufreinigung aus dem Periplasma extrahiert werden (Golovan *et al.* 2000).

2.4 Sekretionssysteme von *Escherichia coli*

2.4.1 Der periplasmatische Raum von *Escherichia coli*

Im Gegensatz zu Gram-positiven Bakterien besitzt *Escherichia coli* zwei Membranen, die für eine erfolgreiche Sekretion von extrazellulären Proteinen überwunden werden müssen. Die innere Membran umschließt das Cytoplasma. Zwischen der inneren und der äußeren Membran befindet sich das Periplasma. In diesem Kompartiment laufen viele Reaktionen ab, die für das Überleben und für das Wachstum der Zellen essentiell sind. Der Aufbau des Periplasmas erleichtert das Wachstum der Zellwand sowie der äußeren Membran und koordiniert diese Vorgänge während der Zellteilung. Proteine, die sich im Periplasma befinden, erfüllen wichtige Aufgaben bei der Erkennung und Verarbeitung von Nährstoffen sowie bei deren Aufnahme in die Zelle. Das Mikromilieu des periplasmatischen Raums beinhaltet eine Vielzahl von Komponenten, welche die Zelle dazu befähigen, sich schnell auf Veränderungen ihres Lebensraums einzustellen.

Die Struktur des periplasmatischen Raums wird von Hobot *et al.* (1984) beschrieben. Demnach besitzt das Peptidoglycan unterschiedliche Polymerisationsgrade und füllt wie ein Gel den periplasmatischen Raum aus. Dabei soll das Peptidoglycan nahe der äußeren Membran einen hohen Polymerisationsgrad haben, während es im Bereich der inneren Membran eine aufgelockerte Struktur aufweist. Dieses mehr oder weniger lockere Netzwerk ist zum größten Teil mit einer wässrigen Lösung aus Proteinen, Oligosacchariden und einer Vielzahl kleinerer Moleküle ausgefüllt.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Zellen mit einem vollen periplasmatischen Raum haben gezeigt, daß das periplasmatische Kompartiment eine Dicke von 13 bis 25 nm hat (Dubochet *et al.* 1983; Hobot *et al.* 1984). Nach Graham *et al.* (1991) nimmt das Volumen des periplasmatischen Raums etwa 8 % bis 16 % des gesamten Zellvolumens ein.

Mehr als 60 verschiedene Enzyme konnten in diesem Kompartiment nachgewiesen werden. Ein Großteil davon entfällt auf substratbindende und katabolische Enzyme. Setzt man die große Menge periplasmatischer Enzyme in Relation zum Volumen des Kompartimentes, so zeigt sich, daß allein die Proteinkonzentration ausreicht, die Viskosität so zu erhöhen, daß nur wenig freies Wasser zur Verfügung steht (van Wielink & Duine 1990). Für die gel-ähnliche Struktur des Periplasmas könnte auch

die hohe Proteinkonzentration anstelle des löslichen Peptidoglucans verantwortlich sein. Die hohe Viskosität dieses Kompartimentes wurde durch Versuche bestätigt, mit deren Hilfe die Mobilität von Proteinen bestimmt wurde.

Überexprimierte Fremdproteine werden von *E. coli* oft in unlöslicher Form, sogenannten Einschlusskörpern, im Cytoplasma abgelegt. Die Aufarbeitung bis zum Erhalt eines biologisch aktiven Proteins ist sehr aufwendig und verlustreich. Im Periplasma konnten solche Einschlusskörper nur in Ausnahmefällen beobachtet werden.

2.4.2 Export von Proteinen in das Periplasma

Aufbau und Funktion des Exportapparates von *Escherichia coli* wurden von Wickner & Rice-Leonhard (1996) und von Pugsley (1993) beschrieben. Für eine bestimmte Form des Exports von Proteinen in das Periplasma von *E. coli* werden die Produkte der *sec*-Gene benötigt (*secA/prlD*, *secB*, *secD*, *secE/prlG*, *secF* und *secY/prlA*) und ein aminoterminal (bzw. internes, bei cytoplasmatischen Membranproteinen) Signalpeptid, welches während der Translokation durch die innere Bakterienmembran abgespalten wird. Um eine vorzeitige Faltung zu verhindern, lagert sich ein *sec*-Protein an das zu exportierende Vorläuferprotein. Diese Funktion wird durch exportspezifische Chaperone unterstützt. Dabei handelt es sich um *SecB*-Proteine und das bakterielle Signalerkennungspartikel (*b*-SRP), die ebenfalls eine Faltung der Vorläuferproteine in eine stabile und damit export-inkompatible Konformation verhindern und die Vorläuferproteine an die Exportstellen der Cytoplasmamembran heranführen sollen. Für diesen als Targeting bezeichneten Prozeß sind spezifische Wechselwirkungen zwischen *SecB*- und dem *SecA*-Protein bzw. zwischen dem Signalerkennungspartikel (*b*-SRP) und einem peripheren Membranprotein (*FtsY*) verantwortlich.

Der membranintegrale Teil des Exportapparates kann als solcher aus der Cytoplasmamembran isoliert werden. Er besteht aus sechs Proteinen (*SecY*, *SecE*, *SecG*, *SecD*, *SecF* und *YajC*), die zusammen das Translokase-Holoenzym bilden. Innerhalb dieses Proteinkomplexes werden Exportproteine in das Periplasma

transloziert, wobei wahrscheinlich SecY zusammen mit SecE einen zentralen hydrophilen Kanal bildet, der den Export ermöglicht.

Das SecA Protein ist eine weitere wichtige Untereinheit des Exportapparates. Es wird in löslicher Form im Cytoplasma gefunden und kommt auch in und an der Cytoplasmamembran vor. SecA ist eine ATPase und zeigt funktionelle Wechselwirkungen mit dem Signalpeptid und dem reifen Teil der Vorläuferproteine, mit SecB Chaperonen, sauren Membran-Phospholipiden in der Plasmamembran sowie den integralen Bestandteilen des Translokase-Komplexes. Kommen alle Wechselwirkungen zusammen, katalysiert SecA unter Verbrauch von ATP den Transport des Exportproteins über die Cytoplasmamembran. Während des Transportvorganges durchläuft das SecB-Protein mehrere Zyklen von Membraninsertion und -deinsertion. Bei jedem Zyklus werden etwa 20 bis 30 Aminosäuren des Vorläuferproteins durch die Membran gefädelt (Nähnadelmodell). Neben ATP wird für diesen Vorgang auch das Membranpotential ($\Delta\mu_H^+$) benötigt.

Die Anreicherung rekombinanter Proteine im Periplasma hat den großen Vorteil, daß es innerhalb der Bakterienzelle zu einer räumlichen Trennung von Zielprotein und cytoplasmatischen Zellbestandteilen kommt. Durch eine Zellfraktionierung, z.B. durch Zugabe von Lysozym, wird eine periplasmatische Fraktion gewonnen, die weitestgehend frei von cytoplasmatischen Verunreinigungen ist, was die weitere Aufarbeitung des Produktes vereinfacht.

Einige Schwierigkeiten sind bei der periplasmatischen Produktion rekombinanter Proteine aufgetreten. So zeigte Gentz *et al.* (1988), daß die Fusion rekombinanter Proteine mit Signalpeptiden zu einem schnellen Abbau der Proteine führt. Außerdem löst die Anhäufung von nicht exportierten Vorläuferproteinen die Expression von Streßproteinen aus und somit einen verstärkten Abbau der produzierten Proteine (Wild *et al.* 1993). Befinden sich inhibitorische Aminosäuresequenzen innerhalb des Vorläuferproteins, so kann dies ebenfalls die Translokation des rekombinanten Proteins über die Cytoplasmamembran behindern (Little *et al.* 1989; Lee *et al.* 1989). Während der Freisetzung des Proteins in das Periplasma muß es in seine biologisch aktive Tertiärstruktur gefaltet werden, um einem Abbau durch periplasmatische Proteasen zu entgehen. Dieses läßt vermuten, daß der Transport, die Faltung und das Ablösen der Proteine vom Translokase-Holoenzym wahrscheinlich miteinander gekoppelt und somit die limitierenden Faktoren bei der periplasmatischen Ausbeute an funktionalen Proteinen sind (Blight *et al.* 1994).

Mittlerweile wurden Proteine gefunden, die an der richtigen Faltung der Exportproteine im Periplasma beteiligt sind. Dabei handelt es sich um zwei Disulfid-Isomerasen, DsbA und DsbC (Missiakas *et al.* 1994) und eine Peptidyl-Prolyl-cis-transisomerase (PPIase) (Compton *et al.* 1992). Änderungen der Konzentration dieser periplasmatischen Chaperone könnten eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der Export- bzw. Sekretionsleistung darstellen (Knappik *et al.* 1993).

Kumamoto und Beckwith (1983) zeigten, daß es zu einer Konkurrenz um freie Translokase-Komplexe zwischen rekombinanten Proteinen und für die Zelle lebenswichtigen und membranständigen Proteinen kommen kann.

Gentechnische Änderungen im SecA,Y-System können die Exportleistung und die Spezifität des Translokase-Komplexes steigern. Durch die Überproduktion von SecE in Kombination mit einer mutierten Form von SecY als zweite Komponente des zentralen Translokase-Holoenzym konnte die periplasmatische Ausbeute an aktivem Interleukin-6 signifikant gesteigert werden (Perez-Perez *et al.* 1994).

2.4.3 Sekretion von Proteinen in das Kulturmedium von *Escherichia coli*

Es lassen sich eine Vielzahl von Export- und Sekretionsmechanismen aus verschiedenen Gram-negativen Bakterien erfolgreich auf *E. coli* übertragen. Dabei können zwei grundlegende Sekretionsmechanismen unterschieden werden (Blight *et al.* 1994):

1. Zwei-Schritt-Prozesse, bei welchen das zu sekretierende Protein ein aminoterminaleres Signalpeptid aufweist und nach Anreicherung im Periplasma in das umgebende Medium sekretiert wird.
2. Ein-Schritt-Prozesse, die einen direkten Transport des Exoproteins in das umgebende Kulturmedium ermöglichen. Sie benötigen ein carboxyterminales Signalpeptid.

Der Export in das Periplasma und Zwei-Schritt-Sekretionssysteme weisen einen identischen Mechanismus zur Überwindung der Cytoplasmamembran auf. Beide sind vom allgemeinen SecA,Y-Exportweg abhängig, der auch als allgemeiner Exportweg (general export pathway, GEP) oder sec-abhängiger Transportweg bezeichnet wird (Schatz & Beckwith 1990) und essentiell für das Wachstum und die Lebensfähigkeit

der Bakterienzelle ist. Im Gegensatz dazu haben Ein-Schritt-Sekretionswege keine oder nur geringe Bedeutung bei normalen Proteintransportvorgängen oder Wachstumsprozessen. Während der Proteintranslokation über die Cytoplasmamembran mit Hilfe des SecA,Y-abhängigen Exportweges wird normalerweise das Signalpeptid durch eine spezifische Signalpeptidase abgespalten. Bei Ein-Schritt-Sekretion in das Medium hingegen bleibt das Signalpeptid intakt und heterologe Exoproteine werden als Fusionsproteine in das Medium entlassen. Die höchsten Ausbeuten an periplasmatischem und sekretiertem Fremdprotein sind mit einem Anteil von 2 % bis 5 % am Gesamtproteingehalt der Zelle bisher sehr ähnlich.

BR-Protein-katalysierte Sekretion

Viele Bakterien sekretieren Proteine, die verwandte Arten oder Stämme töten bzw. in ihrem Wachstum hemmen. Diese recht spezifisch wirkenden Bacteriocine werden von Plasmiden codiert, den Bacteriocin-Faktoren. Die Bacteriocine von *Escherichia coli* werden als Colicine bezeichnet. Weitere Bacteriocine wurden aus *Pseudomonas aeruginosa* (Pyocine), *Bacillus megaterium* (Megacine) und anderen Bakterien isoliert. Je nach Stärke der Expression können Colicine zu einer Abnahme der optischen Dichte (Quasi-Lyse) und sogar zum Absterben der Zellen führen. Aus diesem Grund werden BR-Proteine (bacteriocin-release proteins), welche die Translokation über die zellbegrenzenden Membranen katalysieren, auch als Lysis- oder Kil-Peptide bezeichnet (Pugsley 1984; Braun et al. 1994). *E. coli*-Bacteriocine (Colicine) werden durch die Wirkung von BR-Proteinen in das Kulturmedium sekretiert. BR-Proteine bewirken eine Erhöhung der Permeabilität der inneren und äußeren Bakterienmembran. Als Folge werden relativ unspezifisch periplasmatische und cytoplasmatische Proteine in das Medium ausgeschieden, ohne daß Signalsequenzen benötigt werden (Suit & Luria 1988). Von dem Wirkungsmechanismus wird angenommen, daß die relativ kleinen BR-Proteine (z. B. 28 Aminosäuren) eine morphologische Veränderung der äußeren Membran induzieren (Aono 1991). Durch eine Aktivierung der Phospholipase A der äußeren Membran durch BR-Proteine erfolgt der Abbau des Phosphatidylethanolamins der äußeren Membran in freie Fettsäure und Lyse-Phospholipide (Pugsley & Schwartz 1984; Luirink et al. 1986; Cavard et al. 1987). Die Vermutung liegt nahe, daß die

Lyse-Phospholipide den Membranaufbau stören und somit zu einer Erhöhung der Permeabilität der Membran beitragen (Cullis & De Kruijff 1979).

BR-Proteine werden als Vorläuferproteine (preBRPs) synthetisiert, über die Cytoplasmamembran transportiert und anschließend überwiegend in die äußere Membran integriert (Howard *et al.* 1991). Für die Translokation über die innere Membran ist der SecA,Y-Apparat nur bedingt notwendig. So ist im Gegensatz zu anderen BRPs der Export des Kil-Peptids vom allgemeinen SecA,Y-Transportweg abhängig (Carvard 1992; Oudega *et al.* 1993). Interessanterweise werden die Signalpeptide von BRPs nach dem enzymatischen Abtrennen vom Vorläuferprotein nicht in jedem Fall proteolytisch abgebaut. Während das BRP-Signalpeptid instabil ist (Carvard 1991), werden die Signalpeptide von ColA, CloDF13 und ColE2 stabil in der cytoplasmatischen Membran angereichert. Diese Anreicherung von Signalpeptiden in der inneren Zellmembran scheint für die massive Schädigung der Zellen, die bis zur Lyse führen kann, verantwortlich zu sein (Van der Wal *et al.* 1992).

Der genaue Mechanismus der Sekretion mittels BR-Proteinen ist noch nicht bekannt. Eine Hypothese ist, daß stabile Signalpeptide zusammen mit reifen BRPs und der prozessierten Phospholipase A Poren bilden, die durch beide Membranen hindurchreichen (Lurinik *et al.* 1991). Solche Poren oder Kanäle konnten bisher elektronenmikroskopisch nicht nachgewiesen werden. Ein Indiz für die Richtigkeit der Hypothese wird darin gesehen, daß bei Bakterien, die BRPs produzieren, eine Trennung der beiden zellbegrenzenden Membranen im Saccharose-Dichtegradienten nicht mehr möglich ist.

Sekretion heterologer Proteine durch BRPs

Durch die gleichzeitige Expression von BR-Proteinen kann eine ganze Reihe rekombinanter Proteine in das Kulturmedium sekretiert werden, wie z.B. α -Galactosidase (Van der Wal *et al.* 1995) oder β -Lactamase (Steidler *et al.* 1994).

Im Falle des ColE1-BR-Proteins wird das Kil-Peptid über den SecA,Y-Exportweg mit Hilfe eines aminoterminalen Signalpeptids durch die innere Membran in das Periplasma transloziert. Die Sekretion von rekombinanten Proteinen in das Kulturmedium wurde vielfach durch eine konstitutive Expression des Kil-Peptids vermittelt, welches auf dem gleichen Plasmid lokalisiert war wie das Zielprotein. Das Problem bei der Verwendung von konstitutiven Promotoren zur Expression des Kil-

Peptids ist der frühzeitige Verlust der Lebensfähigkeit der Bakterienzelle, was die Produktivität und vor allem die Selektivität drastisch verringert. Durch den Einsatz von schwachen konstitutiven Promotoren konnte zwar die Vitalität der Bakterienzellen erhöht werden, eine signifikante Steigerung der extrazellulären Produktivität gelang aber erst mit der Einführung induzierbarer Promotoren, z.B. des *lac*-Promotors (Blanchin-Roland & Masson 1989) und des starken P_L -Promotors des Phagen λ (Steidler *et al.* 1994). Neben dem *kil*-Gen aus ColE1 wurde auch das BR-Protein des CloDF13-Operons unter der Kontrolle eines IPTG- bzw. Mitomycin-C-induzierbaren Promotors exprimiert.

Wachstumsphase-abhängige Induktion von BR-Proteinen

Von Miksch *et al.* (1995) ist ein Sekretionssystem entwickelt worden, bei welchem erstmals das BR-Protein des Plasmids pColE1 (Kil-Peptid) unter die Kontrolle von zwei verschiedenen Stationärphase-Promotoren (*ficp* und *bolAp₁*) gestellt wurde. Damit kann die Wachstumsphase von der stationären Sekretionsphase getrennt werden, womit wachstumshemmende Einflüsse einer frühen *kil*-Gen-Expression vermieden werden. Ein weiterer Vorteil des Systems ist, daß die Induktion automatisch mit Erreichen der stationären Wachstumsphase erfolgt, ohne daß ein Induktor zugegeben oder ein Fermentationsparameter geändert werden muß. Die Stationärphase-Promotoren wurden bei *E. coli* und anderen Gram-negativen Bakterien (*Acetobacter methanolicus*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas putida* und *Sinorhizobium meliloti*) an Hand von *lacZ*-Fusionen getestet (Miksch & Dobrowolski 1995). Die Induktion des *fic*-Promotors erfolgte bei allen untersuchten Bakterienstämmen mit dem Übergang in die stationäre Wachstumsphase, was am steilen Anstieg der β -Glucanaseaktivität zu erkennen war. Die Expressionsversuche mit dem *bolA*-Promotor lieferten weniger einheitliche Ergebnisse. Bei *Acetobacter methanolicus*, *Pseudomonas putida* und *Xanthomonas campestris* erfolgte die Induktion des *bolA*-Promotors erst mit einer Verzögerung von bis zu 25 Stunden (*Xanthomonas campestris*) in der stationären Wachstumsphase.

Das Regulatorgen *bolA* ist an der Zellwandsynthese beteiligt und der dazugehörige *bolAp₁*-Promotor ist wachstumsphasen-abhängig. Der verantwortliche Sigmafaktor (σ^S), der die Bindung der RNA-Polymerase über den *bolA*-Promotor ermöglicht,

erscheint erst mit Beginn der stationären Wachstumsphase und ist für die Expression mehrerer Gene verantwortlich (Loewen & Hengge-Aronis 1994). Über die Funktion des *fic*-Genprodukts (filamentation induced by cAMP) ist nur bekannt, daß es ebenfalls an der Zellmorphologie beteiligt ist. Als Stationärphase-Promotor ist er äußerst interessant, denn zu seiner Induktion ist nur ein Signalfaktor notwendig (σ^S). Wie oben beschriebene Versuche gezeigt haben, müssen homologe Formen dieses Sigmafaktors auch in anderen Bakterien vorkommen. Für die eigenen Expressions- und Sekretionsversuche wurde nur der in *E. coli* als sehr schwach anzusehende *fic*-Promotor verwendet. Die daraus resultierende schwache Expression des *kil*-Gens (etwa 20 % der *bolA*-Promotorstärke) mit dem Beginn der stationären Wachstumsphase sollte dazu beitragen, die Lyse der Zellen während der Sekretionsphase zu verhindern (Van der Wal *et al.* 1995). In allen auf Expression des *kil*-Gens beruhenden Konstrukten, wurde ein Omega-Interposon mit Terminator vor das *kil*-Gen gesetzt, um eventuell auftretende fremde Promotoraktivitäten zu unterbinden. In Schüttelkolbenversuchen konnte gezeigt werden, daß die Expression des *kil*-Gens unter der Kontrolle der oben beschriebenen Stationärphase-Promotoren eine extrazelluläre Anreicherung von Proteinen bewirkt. Dabei führte die Verwendung des *fic*-Promotors zu größeren Sekretionsleistungen als der Promotor des *bolA*-Gens. Ebenfalls sekretionssteigernd wirkt sich ein möglichst kurzer Abstand zwischen Promotor und *kil*-Gen aus. Dazu ist bekannt, daß die Effizienz der Transkription mit steigendem Abstand zwischen Promotor und Transkriptions-Startpunkt abnimmt (Miksch *et al.* 1997b), was bedeutet, daß ein möglichst geringer Abstand die Produktion des Kil-Peptids in der stationären Wachstumsphase erhöht.

2.4.4 Sekretion von Phytase aus *Escherichia coli*

Miksch *et al.* (2002, im Druck) konstruierten einen Stamm, mit dem es gelungen ist, Phytase in das Kulturmedium von *Escherichia coli* zu sekretieren. Dazu wurde das Phytasegen (ATCC 33965) (Greiner unveröffentlicht) einschließlich der Ribosomenbindungsstelle (RBS) mittels PCR (*polymerase chain reaction*) aus dem ursprünglichen zur Erstklonierung verwendeten Plasmid amplifiziert und in high-copy-Plasmide hinter unterschiedliche Promotoren kloniert. Die Amplifizierung mit der PCR war notwendig, da vor der RBS keine für die Klonierung geeigneten natürlichen Schnittstellen vorlagen und der Abstand des Phytasegens zum jeweiligen Promotor verringert bzw. optimiert werden sollte.

Phytase soll nach Überexpression in das Kulturmedium sekretiert werden. Dies ist mit Hilfe des von Miksch *et al.* (1997a) entwickelten Sekretionssystems möglich, dessen Gene auf einer Kassette lokalisiert wurden. Die Kassette beinhaltet das *kil*-Gen von *E. coli* pCOLE1 mit einem schwachen Stationärphasenpromotor, ein Interposon zur Vermeidung unkontrollierter Expression des *kil*-Gens durch eine eventuell vorhandene stromaufwärts gelegene Promotorstruktur sowie das Gen für die Kanamycinresistenz als Selektionsmarker (Abb. 2.1).

Um einen leistungsfähigen Expressionsvektor für die Phytaseproduktion zu konstruieren, wurde ein Basisvektor mit sehr hoher Kopienzahl verwendet. Zunächst wurde das Phytasegen ohne Promotor, aber mit flankierenden Restriktionsschnittstellen, mittels PCR amplifiziert und in die *multiple cloning site* (MCS) von pUC19 kloniert. Vor das Phytasegen wurde ein geeigneter konstitutiver Promotor (z.B. Promotor der β -Glucanase von *Bacillus amyloliquefaciens*) integriert. Der natürliche Promotor der Phytase konnte nicht verwendet werden, da dieser nur unter anaeroben Bedingungen induziert wird. Um eine Sekretionskompetenz zu erreichen, wurde außerdem die Sekretionskassette auf dem Expressionsvektor integriert. Durch die Anwesenheit der Kassette kann zur Selektion die Kanamycinresistenz bei Bedarf verwendet werden.

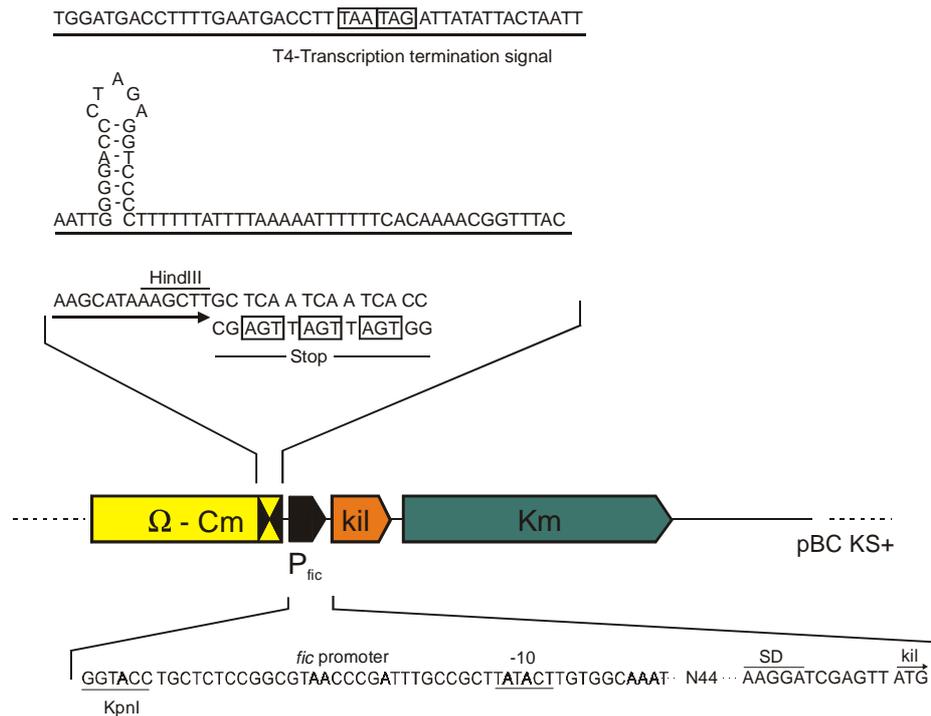


Abb. 2.1 Genetische Struktur der Sekretionskassette.

Mit Hilfe des Sekretionssystem konnten weitere Proteine sekretiert werden wie z. B. die β -Glucanase aus *Bacillus*, die Pectatlyase aus *Erwinia carotovora* oder die α -Amylase aus *Bacillus*. Alle wurden in *E. coli* sekretiert. Auch andere Gram-negative Bakterien wie z.B. *Klebsiella planticola* können mit Sekretionskassette Proteine (z.B. β -Glucanase aus *Bacillus*) sekretieren. Außerdem wurden auf diese Weise nicht nur bakterielle Proteine sekretiert, sondern auch humane. Es konnte z. B. das scFv Antikörperfragment in *E. coli* sekretiert werden (Miksch & Flaschel 2001).

2.5 Kultivierung von *Escherichia coli*

Das Stäbchenbakterium *Escherichia coli* gehört zur Gruppe der *Enterobacteriaceae*. Es ist Gram-negativ und ein wesentlicher Bestandteil der menschlichen und tierischen Darmflora. Im Jahr 1922 wurde der Stamm *E. coli* K-12, von dem sich viele rekombinante *E. coli* Stämme ableiten, aus dem Stuhl eines rekonvaleszenten Diphtheriepatienten isoliert und kultiviert. Der Organismus ist fakultativ anaerob. Beim Fehlen von Sauerstoff kann *E. coli* den Stoffwechsel umstellen und seine Energie durch Gärung gewinnen. Bei ausreichender Zufuhr von Sauerstoff verläuft der Stoffwechsel aerob. *E. coli* ist der am häufigsten verwendete Organismus zur Produktion rekombinanter Proteine.

Das Wachstum von *E. coli* wird durch Temperatur, pH, Sauerstoffversorgung und die Zusammensetzung des Nährmediums bedingt. Wachstum wird in einem Temperaturbereich zwischen 20 und 37 °C beobachtet, wobei die Wachstumsgeschwindigkeit mit steigender Temperatur zunimmt. Der pH-Wert der Umgebung sollte idealerweise zwischen 6 und 8 liegen. Der Einfluß der Nährmedienzusammensetzung und der Sauerstoffzufuhr auf das Zellwachstum wird im folgenden beschrieben.

2.5.1 Nährmedien

Nährmedien für Mikroorganismen können in drei Klassen eingeteilt werden (Zhang & Greasham 1999). Undefinierte oder Vollmedien bestehen aus Extrakten und Mineralsalzbeimischungen. Halbsynthetische oder halbdefinierte Medien bestehen aus chemischen Einzelkomponenten wie z.B. einer Kohlenstoffquelle (Glucose oder Glycerin), Mineralsalzen und Extrakten. Synthetische oder definierte Medien bestehen nur aus chemischen Einzelkomponenten, Sie enthalten keine Extrakte.

Undefinierte und halbsynthetische Medien ermöglichen den meisten Mikroorganismen ein schnelles Wachstum. Sie besitzen jedoch den Nachteil, daß Wachstum und Produktbildung stark mit der Zusammensetzung und der Qualität der verwendeten Extrakte variieren kann (O'Kennedy *et al.* 2000).

Bei der Verwendung von synthetischen Medien ist meist ein etwas langsames Wachstum zu beobachten. Sie besitzen allerdings den Vorteil, daß ihre

Zusammensetzung genau bekannt ist und der Verbrauch der Substrate im Medium in der Regel einfach verfolgt werden kann.

Synthetische Medien setzen sich aus einer Kohlenstoffquelle, z.B. Glucose oder Glycerin, einer Stickstoffquelle, z.B. Ammoniak, Ammoniumsalze oder auch Aminosäuren und verschiedene Mineralsalze, die die Versorgung der Zelle mit Kalium, Calcium, Magnesium, Sulfat, Phosphat und Spurenelemente sichert, zusammen. In bestimmten Fällen müssen dem Medium Komponenten hinzugefügt werden, die von der Zelle nicht selbst synthetisiert werden können (z.B. Vitamine oder Aminosäuren). Die Versorgung der Mikroorganismen mit Sauerstoff erfolgt über Begasung mit Luft.

2.5.2 Stoffwechsel von *Escherichia coli*

Die beschriebenen Medienkomponenten werden von *E.coli* zur Energiegewinnung und zum Wachstum benötigt. Dabei werden die Kohlenstoff- und die Stickstoffquellen wie im folgenden beschrieben umgesetzt.

Kohlenstoffquelle

Als Kohlenstoffquelle kann *E.coli* neben Glucose eine ganze Reihe anderer kohlenstoffhaltiger Moleküle verstoffwechseln. Hierzu gehören neben D-Glucose unter anderem auch Maltose, Raffinose, Galactose, Trehalose, Sucrose, D-Fructose, D-Mannose, D-Sorbose, L-Fructose, L-Rhamnose, D- und L-Arabinose, D-Xylose, D-Ribose, Dihydroxyaceton, D-Mannitol, D-Sorbitol und Glycerin.

Hauptstoffwechselwege für Zucker sind die Glycolyse (Embden-Meyerhof-Abbau) und der Pentosephosphat-Weg. Glucose und Glycerin als Kohlenstoffquelle sind in der Literatur am häufigsten beschrieben. Beide werden auf dem Glycolyse-Weg zu Pyruvat abgebaut.

Glucose wird durch ein Phosphoenolpyruvat abhängiges Phosphotransferasesystem (PTS) unter Verbrauch von ATP in die Zelle gebracht und dort zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert (Gottschalk 1988; Fraenkel 1996), das dann glycolytisch zu zwei Molekülen Pyruvat abgebaut wird. Aus einem Molekül Glucose entstehen in der Glycolyse zwei Moleküle NADH und zwei Moleküle ATP.

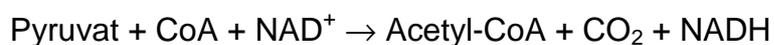
Glycerin gelangt durch eine erleichterte Diffusion über einen enzymatisch geöffneten Kanal in die Zelle (Lin 1996) und wird dort in einem ATP-abhängigen Schritt zu Glycerin-3-phosphat phosphoryliert. Glycerin-3-phosphat wird durch Glycerinphosphat-Dehydrogenase unter Bildung von NADH zu Dihydroxyacetonphosphat oxidiert, das wiederum zu Glycerinaldehyd-3-phosphat isomerisiert und glycolytisch zu Pyruvat unter Gewinnung von zwei NADH und einem Molekül ATP abgebaut wird.

Pyruvat wird unter Bildung von einem NADH oxidativ zu Acetyl-CoA decarboxyliert, das wiederum in den Citratzyklus eingeht, in dem aus einem Molekül Acetyl-CoA ein Molekül ATP, drei Moleküle NADH und ein Molekül FADH₂ entstehen. Aus den energiereichen Produkten NADH und FADH₂ entstehen in der Atmungskette durch oxidative Phosphorylierung weitere ATP Moleküle. Abb. 2.2 stellt die entsprechenden Bilanzgleichungen dar.

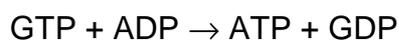
Glycolyse



Oxidative Decarboxylierung



Citratcyclus



Die **Atmungskette** liefert pro Molekül NADH 2 ATP, pro Molekül FADH₂ 1 ATP. Aus 1 Molekül Glucose entstehen 22 Moleküle ATP, aus 1 Molekül Glycerin 14 Moleküle ATP.

Gesamtbilanz

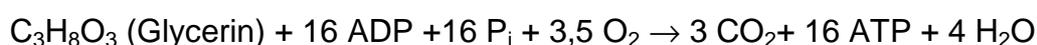


Abb. 2.2 Energieausbeute aus der Verstoffwechslung von Glucose und Glycerin in *E. coli* (Gottschalk 1988).

Bei den Gesamtbilanzen ist zu berücksichtigen, daß Glucose im Vergleich zu Glycerin annähernd die doppelte Molmasse und einen geringeren Reduktionsgrad aufweist.

Die Hälfte der zugeführten Menge an Glucose bzw. Glycerin wird in Energie umgewandelt (Katabolismus). Die andere Hälfte der zugeführten Kohlenstoffquelle wird für den Aufbau von Zellmasse (Anabolismus) verwendet. Dort werden zusammen mit anderen Medienkomponenten Vorstufen für Makromoleküle wie Proteine, Lipide, Polysaccharide, RNA und DNA gebildet (Gottschalk 1988).

Stickstoffquelle

E. coli ist in der Lage, sowohl anorganische als auch organische Stickstoffquellen zu verwerten. Als organische Verbindung werden Aminosäuren verstoffwechselt, die auch als Kohlenstoffquelle dienen können. Als anorganische Quellen kommen unter aeroben Wachstumsbedingungen nur Ammoniak und Ammoniumsalze in Frage. Unter anaeroben Wachstumsbedingungen können von *E. coli* Nitrate verstoffwechselt werden, die als Elektronenakzeptor fungieren (Reitzer 1996).

Ammoniak ist die bevorzugte Stickstoffquelle, da es einfach aufgenommen wird und hohe Wachstumsgeschwindigkeiten fördert (Tyler 1978). Es gelangt durch Transport über ein spezifisches Transportsystem in die Zelle und geht so in den Stoffwechsel ein (Jayakumar *et al.* 1987).

Acetatbildung

Bei unzureichender Sauerstoffzufuhr schlägt *E. coli* einen anaeroben Stoffwechsel ein, bei dem durch Gärung Energie gewonnen wird. Eines der Hauptstoffwechselprodukte dieses Prozesses ist Acetat (Diaz-Ricci *et al.* 1991). Auch bei anaerobem Wachstum wird die Kohlenstoffquelle zunächst glykolytisch zu Pyruvat abgebaut. Der Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplex ist jedoch gehemmt. Deshalb wird Pyruvat durch die Pyruvat-Formiat-Lyase zu Formiat und Acetyl-CoA abgebaut, das dann zu Acetat umgesetzt wird. Das gebildete Acetat kann zwar von *E. coli* im Glyoxylat-Zyklus verstoffwechselt werden (Gottschalk 1988), in hohen Konzentrationen (2 bis 5 g L⁻¹) wirkt es jedoch wachstumshemmend auf den Organismus (Luli & Strohl 1990). Dabei ist die inhibierende Acetatmenge

stammspezifisch. Acetat inhibiert nicht nur das Wachstum und damit die Biomassebildung, sondern beeinflusst auch die Produktbildung. Eine Acetatbildung kann auch unter streng aeroben Wachstumsbedingungen erfolgen, wenn hohe Wachstumsgeschwindigkeiten und ein Substratüberschuß vorliegen (Kleman & Strohl 1994). Die Aufnahme und der Fluß der Kohlenstoffquelle erfolgt in diesem Fall schneller als deren Umsetzung in Biomasse und Stoffwechselenergie, was zur Bildung von Acetat führt (Holms 1986). Als limitierende Stoffwechselwege sind der Citratzyklus (Han *et al.* 1992) und die Elektronentransportkette zu nennen (Majewski & Domach 1990).

Die Verfahren zur Vermeidung der Acetatbildung werden bei der Erläuterung von Prozeßstrategien zur Hochzelldichtekultivierung von *E. coli* in Kapitel 2.6 genauer beschrieben.

2.5.3 Sauerstoffversorgung

Bei aeroben Kultivierungsprozessen ist Sauerstoff ein wichtiges Substrat. Seine Löslichkeit in Wasser ist gering und beträgt bei 20 °C lediglich 9,4 mg L⁻¹. Daher muß dem Kultivierungsprozeß kontinuierlich Sauerstoff durch Luftbegasung zugeführt werden (Mutzall 1993).

Der Sauerstoffeintrag (Oxygen transfer rate, OTR) in das Medium wird durch das Produkt aus dem volumetrischen Sauerstofftransportkoeffizienten $k_L a$ und der Sauerstoffkonzentration im Gleichgewicht c_L^* und der aktuellen Konzentration des gelösten Sauerstoffs im Medium c_L beschrieben (Gl. 1).

$$\text{OTR} = k_L a (c_L^* - c_L) \quad \text{Gl. 1}$$

Die Sauerstoffkonzentration darf während einer Kultivierung nicht die kritische Grenze c_{krit} unterschreiten. Unterschreitet die Sauerstoffkonzentration bei Kultivierungen von *E. coli* eine Grenze von $c_{\text{krit}} \approx 0,25 \text{ mg L}^{-1}$ (Bailey & Ollis 1986), so ist das Wachstum gehemmt, da Sauerstoff nun limitierend wirkt.

Die Sauerstoffgleichgewichtskonzentration c_L^* hängt vom Druck p und dem Molenbruch des Sauerstoffanteils im Gas $x_{G,O}$ ab (Gl. 3, c_W : Konzentration von

Wasser in Wasser). Der Henrysche Verteilungskoeffizient He (Gl. 2) beschreibt die Verteilung zwischen Flüssigkeit (L) und Gas (G). Er ist abhängig von der Temperatur und der Zusammensetzung des Mediums (Chmiel 1991).

$$He = \frac{p_G \cdot x_o}{x_{L,o}} = \frac{p_o}{x_{L,o}} \quad \text{Gl. 2}$$

$$c_L^* = \frac{p_G \cdot x_{G,o}}{He / c_w} = \frac{p_G \cdot x_{G,o}}{He'} \quad \text{Gl. 3}$$

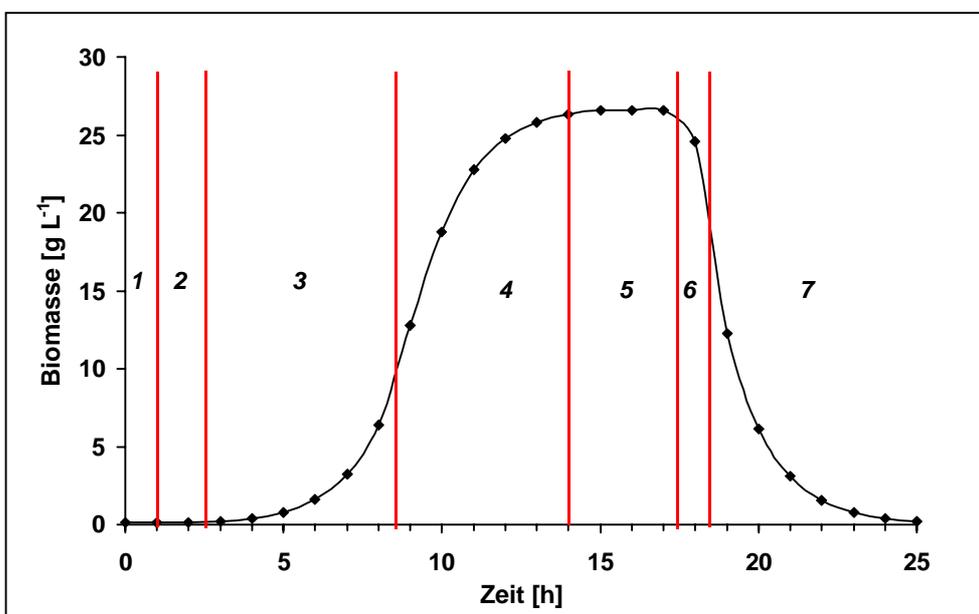
Die Grenzfläche a zwischen Flüssigkeit und Gas ist abhängig vom Volumenanteil der Gasphase in der flüssigen Phase ε und dem mittleren Durchmesser der Gasblasen d_B (Gl. 4).

$$a = \frac{6\varepsilon}{d_B} \quad \text{Gl. 4}$$

Der Sauerstoffeintrag kann demzufolge durch eine Erhöhung des Drucks, durch eine Erhöhung des Sauerstoffgehaltes im Gas (Verwendung von reinem Sauerstoff an Stelle von Luft) oder durch eine Erhöhung des Energieeintrages (Rührerfrequenz) gesteigert werden. Durch eine Steigerung des Energieeintrages wird die Grenzfilmdicke zwischen Gasphase und flüssiger Phase verkleinert und die spezifische Austauschfläche der Gasblasen vergrößert.

2.5.4 Wachstumskinetik

Mikroorganismen setzen die Medienbestandteile in Zellmaterial um (anabolischer Stoffwechsel). Die Zunahme der Biomasse macht sich durch eine Zunahme der Zellzahl bemerkbar. Die unterschiedlichen Wachstumsphasen einer Satzkultivierung



sind in Abb. 2.3 schematisch dargestellt.

- | | |
|-------------------------|---------------------|
| 1: exponentielle-Phase | 5: stationäre Phase |
| 2: Beschleunigungsphase | 6: Übergangsphase |
| 3: exponentielle Phase | 7: Absterbephase |
| 4: Bremsphase | |

Abb. 2.3 Schematische Darstellung der Wachstumsphasen bei Kultivierungsprozessen.

Unter der Annahme, daß die Wachstumsgeschwindigkeit proportional zur Biomasse X ist, gilt für die Wachstumsgeschwindigkeit r_x Gl. 5. Der Proportionalitätsfaktor μ wird als spezifische Wachstumsgeschwindigkeit bezeichnet.

$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad \text{Gl. 5}$$

Er ist abhängig vom verwendeten Mikroorganismus und den Kultivierungsbedingungen.

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad \text{Gl. 6}$$

Die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit einer Kultur ist konstant und maximal, solange keine Substratlimitierung vorliegt. Ist ein Substrat limitierend, verringert sich μ und fällt auf $\mu = 0$, wenn ein Substrat aufgebraucht ist. Das Wachstum kommt zum Stillstand (stationäre Phase). Der Zusammenhang zwischen spezifischer Wachstumsgeschwindigkeit, maximaler spezifischer Wachstumsgeschwindigkeit und der Konzentration S des limitierenden Substrates kann in einfachen Fällen durch die Monod-Kinetik beschrieben werden (Gl. 7).

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{S + K_s} \quad \text{Gl. 7}$$

Der Parameter K_s ist die Monod-Konstante. Sie ist spezifisch für den Organismus und das Substrat. Sie entspricht der Substratkonzentration, bei der $\mu = \frac{1}{2} \mu_{\max}$ ist. Ist die Substratkonzentration deutlich größer als K_s , so ist $\mu \approx \mu_{\max}$. In diesem Fall handelt es sich um eine Kinetik 0. Ordnung bezüglich S . Bei niedrigen Substratkonzentrationen ($S \ll K_s$) ist $\mu \approx \mu_{\max} \cdot (S/K_s)$ und es handelt sich um eine Kinetik 1. Ordnung bezüglich S .

Bei konstanter spezifischer Wachstumsgeschwindigkeit nimmt die Biomasse X exponentiell mit der Zeit zu. Dieser Sachverhalt wird durch Gleichung 8 beschrieben, die sich durch Integration aus Gleichung 5 ergibt.

$$X_t = X_0 \cdot e^{\mu t} \quad \text{Gl. 8}$$

Gl. 8 beschreibt lediglich das unlimitierte Wachstum in der exponentiellen Phase. Durch Auftragen von $\ln X$ gegen die Kultivierungsdauer t kann μ als Steigung der Geraden bestimmt werden (Gl. 6 und 8). Substratlimitierung oder Wachstumsinhibierung werden in diesem einfachen Modell nicht berücksichtigt. Die Konzentration eines limitierenden Substrates S wird durch die Monod-Kinetik (Gl. 7) berücksichtigt. Neben diesen Modellen sind in der Literatur mehrere alternative Beschreibungen zur Abhängigkeit der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration vorgeschlagen worden.

$$\text{Tessier:} \quad \mu = \mu_{\max} \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{S}{K_s}\right)\right) \quad \text{Gl. 9}$$

$$\text{Moser:} \quad \mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S^n}{K_S + S^n} \quad \text{Gl. 10}$$

$$\text{Contois:} \quad \mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{B \cdot X + S} \quad \text{Gl. 11}$$

$$\text{Logistisch:} \quad \mu = \mu_{\max} \cdot \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right) \quad \text{Gl. 12}$$

Die Modelle nach Tessier und Moser (Gl. 9 und 10) beschreiben einen Verlauf der Wachstumskurve, der mit der Monod-Kinetik vergleichbar ist. Bei Gl. 10 konvergiert μ aber schon für geringe Werte von S bei $n > 1$ gegen μ_{\max} . Bei dem Modell nach Contois (Gl. 11) wird an Stelle der Monod-Konstanten ein biomasseabhängiger Term $B \cdot X$ eingeführt, womit sich die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit bei hohen Biomassewerten verringert. Dieses Modell kann für Fälle interessant sein, bei denen beispielsweise das Wachstum durch Produktion von Hemmstoffen eingeschränkt ist. Das logistische Modell in Gl. 12 setzt die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit nicht mit der Substratkonzentration in Zusammenhang, sondern mit der maximal erreichbaren Biomassekonzentration X_{\max} . Von Vorteil ist hier die reduzierte Anzahl der Modellparameter.

Der Biomasseausbeutekoeffizient $Y_{x/s}$ beschreibt den Zusammenhang zwischen gebildeter Biomasse dX und bis dahin verbrauchter Substratmenge dS (Gl. 13a). Er wird i.a. als konstant angenommen. Analog zum Biomasseausbeutekoeffizient kann auch ein Produktausbeutekoeffizient definiert werden (Gl. 13b).

$$Y_{x/s} = \left| \frac{r_X}{r_S} \right| = - \frac{dX}{dS} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad \text{Gl. 13a}$$

$$Y_{P/S} = \left| \frac{r_P}{r_S} \right| \quad \text{Gl. 13b}$$

Die maximale Biomassekonzentration X_{\max} ergibt sich aus dem Ausbeutekoeffizient bei vollständigem Verbrauch des limitierenden Substrates aus Gl. 14.

$$X_{\max} = X_0 + Y_{X/S} \cdot S_0 \quad \text{Gl. 14}$$

Neben der Bildung von Biomasse steht bei Kultivierungen von Mikroorganismen die Bildung eines Produktes im Vordergrund (z. B. Proteine, Ethanol, Essig usw.). Die Produktbildungsgeschwindigkeit r_p kann von der Wachstumsgeschwindigkeit r_x und der Biomassekonzentration X abhängig (GL. 15) sein.

$$r_p = \frac{dP}{dt} = \alpha \cdot r_x + \beta \cdot X \quad \text{GL. 15}$$

Die Produktbildung kann an den Primärstoffwechsel gekoppelt sein ($\beta = 0$) oder nur von der Biomassekonzentration abhängen ($\alpha = 0$). In der Regel spielen jedoch beide Faktoren eine Rolle.

2.5.5 Zulaufkultivierungen

Die Produktivität eines Prozesses wird durch das Kultivieren von Mikroorganismen zu hohen Zelldichten gesteigert. Zu diesem Zweck werden im allgemeinen Zulaufkultivierungen (*fed-batch*-Kultivierung) durchgeführt. Hierbei wird die Kultivierung mit einem reduzierten Kulturvolumen im Satzbetrieb begonnen. Nach Verbrauch der limitierenden Substratquelle erfolgt ein Zulauf von frischem Medienkonzentrat, bis das maximale Reaktorvolumen voll ausgenutzt wurde oder eine Hemmung des Wachstums durch wachstumsinhibierende Stoffwechselprodukte (Acetat und Ammoniak) erfolgt. Der Zulauf von Konzentrat kann konstant, linear ansteigend oder exponentiell ansteigend erfolgen. In indirekt geregelten Zulaufverfahren ist der Zulauf von Medium über Prozeßparameter wie pO_2 , pH, Respirationskoeffizient, O_2 - bzw. CO_2 -Konzentrationen oder die Zellkonzentration geregelt. Bei direkt geregelten Verfahren wird die Substratkonzentration *online* gemessen und der Zulauf von Medium entsprechend angepaßt. Verschiedene Zulaufverfahren werden in Kapitel 2.6 beschrieben. Für die Kinetik von

Zulaufkultivierungen muß die Zunahme des Kulturvolumens V_R durch den Zulauf von Medium mit einem Volumenstrom \dot{V} berücksichtigt werden (Gl. 16 bis 18).

Für die Bilanz einer Kultivierung unter Zulaufbedingungen gilt, wobei V_R das Kulturvolumen darstellt:

$$\frac{d(V_R X)}{dt} = V_R \cdot r_X = V_R \cdot \mu \cdot X \quad \text{Gl. 16}$$

$$V_R \frac{dX}{dt} + X \frac{dV_R}{dt} = V_R \cdot \mu \cdot X \quad \text{Gl. 17}$$

Mit $\frac{dV_R}{dt} = \dot{V}$ ergibt sich daraus:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - \frac{\dot{V}}{V_R} X \quad \text{Gl. 18}$$

2.6 Prozeßtechnische Verfahren zur Hochzelldichtekultivierungen von *Escherichia coli*

Verfahren zur Hochzelldichtekultivierung von *E. coli* werden in der Literatur häufig beschrieben (Lee 1996; Riesenberg & Guthke 1999).

Produkte dieser Fermentationen sind z. B. rekombinante Proteine (Miksch *et al.* 1997b), Antikörper (Horn *et al.* 1996) oder Polyhydroxybuttersäure (Wang *et al.* 1998a). Um hohe Zelldichten zu erreichen, müssen verschiedene Gesichtspunkte berücksichtigt werden. Die Bildung wachstumsinhibierender Stoffwechselprodukte wie Acetat und Ammoniak muß vermieden werden. Gleichzeitig müssen Nährstoffe in ausreichender Konzentration vorliegen. Wie in Kapitel 2.5.2 dargestellt, führt beispielsweise das Vorliegen hoher Glucosekonzentrationen im Medium zu verstärkter Acetatbildung. Um dies zu vermeiden, werden Zulaufkultivierungen angewandt. Im folgenden werden Verfahren der Bioprozeßtechnik erläutert, über die

der Zulauf von Medium erfolgt. Weiterhin werden prozeßtechnische Verfahren zur Vermeidung der Acetatbildung beschrieben.

In gesteuerten Verfahren erfolgt der Zulauf unabhängig von Kultivierungsparametern oder daraus abgeleiteten Größen mit konstanter (Märkl *et al.* 1993) oder ansteigender Zulaufmenge (Korz *et al.* 1995). Durch exponentiell ansteigenden Zulauf kann die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit konstant gehalten werden. Das Wachstumsverhalten der Mikroorganismen muß bei einem solchen Verfahren bekannt und erprobt sein, um optimale Ergebnisse zu erhalten. Die Verfahren sind abhängig vom Wachstumsverhalten des Mikroorganismus und vom verwendeten Medium.

Der geregelte Zulauf von frischem Medienkonzentrat bei Zulaufkultivierungen kann prinzipiell auf drei verschiedene Arten erfolgen.

Die geregelte Größe kann eine direkt meßbare Betriebsvariable des Bioreaktors sein wie die Gelöstsauerstoffkonzentration pO_2 , das pH oder der Kohlendioxidgehalt der Reaktorabluft. Die Sollwerte einer solchen Betriebsvariablen werden durch den geregelten Zulauf von Medium konstant gehalten (Korz *et al.* 1995; Lee 1996; Schmidt *et al.* 1999).

Beim pO_2 -stationär geregelten Verfahren wird der Verbrauch von Gelöstsauerstoff beim Wachstum der Bakterien ausgenutzt. Bei exponentiellem Wachstum ist der Verbrauch an Sauerstoff hoch und der pO_2 entsprechend gering. Ist eine limitierende Substratkomponente verbraucht, steigt der pO_2 im Medium an. Bei Überschreitung eines oberen pO_2 -Grenzwertes erfolgt dann der Zulauf von Medienkonzentrat (Nakano *et al.* 1997; Schmidt *et al.* 1999).

Bei Substratlimitierung kommt es zu einer Verstoffwechslung von organischen Säuren und zur Ausscheidung von Ammoniak, die zu einer Erhöhung des pH führt. Dieser wird gewöhnlich durch automatische Zugabe von Säure kompensiert. Über diese pH-Änderung kann ebenfalls der Zulauf von Medium geregelt werden (Lee & Chang 1994). Der Stoffwechsel ist eng mit dem Verbrauch von Sauerstoff und der Bildung von Kohlendioxid verknüpft. Über diese Parameter kann der Substratverbrauch bestimmt und der Zulauf entsprechend geregelt werden.

Eine zweite Methode besteht darin, die zu regulierende Größe wie z. B. die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ indirekt zu erfassen. Durch das Messen

der Biomassekonzentration kann der Medienzulauf geregelt werden, um die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit als indirekt bestimmte Größe konstant zu halten (Macaloney *et al.* 1997).

Die dritte Methode besteht darin, die Konzentration eines limitierenden Substrates *online* zu überwachen und eine indirekt erfaßte Größe wie z. B. μ durch computergeregelten Zulauf von Medium konstant zu halten (Paalme *et al.* 1990).

Zur Vermeidung der Acetatbildung können verschiedene Strategien angewendet werden. Bei der langen Kultivierungsdauer in Zulaufkultivierungen kann die Substratkonzentration limitiert werden. Dies führt zu einer Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit und einer damit verbundenen geringeren Bildung von Acetat. Geringere Wachstumsgeschwindigkeiten können durch Verringerung der Kultivierungstemperatur oder Änderung des pH erhalten werden. Andere Strategien zur Vermeidung einer inhibierenden Acetatkonzentration verwenden Dialyse-Reaktoren, in denen das Acetat kontinuierlich aus dem Medium entfernt wird (Märkl *et al.* 1993; Nakano *et al.* 1997; Pörtner & Märkl 1998). Ein solches Verfahren ist jedoch sehr aufwendig und nicht für die Produktion im Großmaßstab geeignet.

Durch die Verwendung bestimmter *E. coli*-Mutanten, die nicht in der Lage sind Acetyl-CoA in Acetat umzuwandeln, kann die gebildete Acetatmenge ebenfalls gering gehalten werden (Ponce 1999). Eine weitere Strategie besteht in der Verwendung von Glycerin als Kohlenstoffquelle (Schmidt *et al.* 1999), da der Transport in die Zelle langsamer erfolgt als der von Glucose (Holms 1986).

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Abgasanalysesystem	Hartmann und Braun URAS10E
Autoklaven	KSG 112 Zirbus VST 50 / 70
Bioreaktor	MBR Bioreaktor 7 L MBR Bioreaktor 30 L
FIA-System:	
Peristaltische Pumpe	ACCU FM40, SciLog, USA
6-port-Injektionsventile	Knauer
Durchflusszelle mit O ₂ -Elektrode und Messverstärker	ANASYSCON GmbH
Software	CAFCA, ANASYSCON GmbH
Fraktionssammler	Gilson FC 205
Glucosemeßgerät	ESAT 6660
pH-Meter	Metrohm, 691
Photometer	Pharmacia Biochrom 4060
Rotationsschüttler	B.Braun, Certomat R IKA KS125 Basic Infors HT
Sterilarbeitsbank	Heraeus Laminair HB 2448
Tischzentrifuge	Heraeus Biofuge 15
Ultraschallgerät	Branson, Sonifier 450
Vakuum-Trockenschrank	Heraeus, VT 5042 EK
Vortex-Mischer	Vortex Genie2, Bender & Hobein
Waagen	Mettler, AE 260 Deltarange, 0,1mg-1,5 g Kern, Serie 822-33, 1,5-250 g Mettler, PM34-K Deltarange, >250 g
Wasserbad	Julabo F 10-HC / 8

3.2 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, waren alle Chemikalien vom Reinheitsgrad p.a..

Acrylamid	Serva
Agar	Sigma, Steinheim
Aminonaphtholsulfonsäure	Sigma, Steinheim
Ammoniumchlorid	J. T. Baker, Holland
Ammoniumdihydrogenphosphat	J. T. Baker, Holland
Ammoniummolybdat	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Sigma, Steinheim
Bicinchoninsäure (BCA-Lösung)	Sigma, Steinheim
Borsäure	J. T. Baker, Holland
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
Casein-Pepton	Merck, Darmstadt
Citronensäure	J. T. Baker, Holland
Cobaltchlorid	Merck, Darmstadt
Diammoniumhydrogenphosphat	J. T. Baker, Holland
Dikaliumhydrogenphosphat	Fluka, Schweiz
Dinatriumhydrogenphosphat	J. T. Baker, Holland
EDTA	Merck, Darmstadt
Eisen(III)-citrat-Hydrat	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	J. T. Baker, Holland
Formaldehyd	Fluka, Schweiz
Glucose	Merck, Darmstadt
Glucoseoxidase (200 U/l)	Sigma, Steinheim
Glucose-Pufferlösung (für ESAT)	Medingen
Glycerin	Aug. Hedinger, Stuttgart
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Bioferm, Hampshire, England
Imidazol	Roth, Karlsruhe
INFINITY-Glucose-Reagenz	Sigma Diagnostics, USA
Isopropanol	J. T. Baker, Holland
Kaliumhexacyanoferrat(III)	Merck, Darmstadt

Kaliumdihydrogenphosphat	J. T. Baker, Holland
Kupfer(II)-chlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	Merck, Darmstadt
Laton® LCK 338	Dr. Lange, Düsseldorf
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	J. T. Baker, Holland
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Fluka, Schweiz
Natriumacetat (wasserfrei)	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	J. T. Baker, Holland
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdisulfit	Sigma, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Steinheim
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriummolybdat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumphytat aus Reis	Sigma, Steinheim
Natriumsulfit	Sigma, Steinheim
Natriumthiosulfat	Fluka, Schweiz
Ni-NTA, Superflow	Qiagen
ortho-Phosphorsäure	Riedel-de Haen, Seelze
p-Nitrophenylphosphat	Sigma, Steinheim
Pluronic® PE-8100	BASF, Ludwigshafen
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	J. T. Baker, Holland
Silbernitrat	Heraeus
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva
Tris / HCl	Gerbu, Gaiberg
Zinkacetat-Dihydrat	Merck, Darmstadt

3.3 Bakterienstämme

Folgende Stämme wurden für die Sekretion von Phytase verwendet:

Stamm:	Charakteristik:	Bezugsquelle:
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21(DE3)sec	BL21(DE3), zusätzlich sekretionskompetent durch Integration der Sekretionskassette (Miksch et al. 1997) ins Chromosom	Miksch, unveröffentlicht
<i>E. coli</i> BL21(DE3)sec pPhyt106	<i>E. coli</i> BL21(DE3)sec, enthält Plasmid pPhyt106	Miksch, unveröffentlicht
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pPhyt109	<i>E. coli</i> BL21(DE3), enthält Plasmid pPhyt109	Miksch et al. 2002
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pPhyt148	<i>E. coli</i> BL21(DE3), enthält Plasmid pPhyt148	Miksch, unveröffentlicht
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pPhyt190	<i>E. coli</i> BL21(DE3) enthält Plasmid pPhyt190	Miksch, unveröffentlicht

Herstellung sekretionskompetenter Produktionsstämme

E. coli BL21(DE3)sec pPhyt106

Bei dem Stamm *E. coli* BL21(DE3)sec pPhyt106 ist das Phytasegen auf einem *multi-copy*-Vektor lokalisiert und wird durch den Promotor der β -Glucanase von *Bacillus amyloliquefaciens* exprimiert (Abb. 3.1). Die Sekretionskassette (s. Abb. 2.1) ist in das Chromosom integriert und ist somit nur einmal vorhanden.

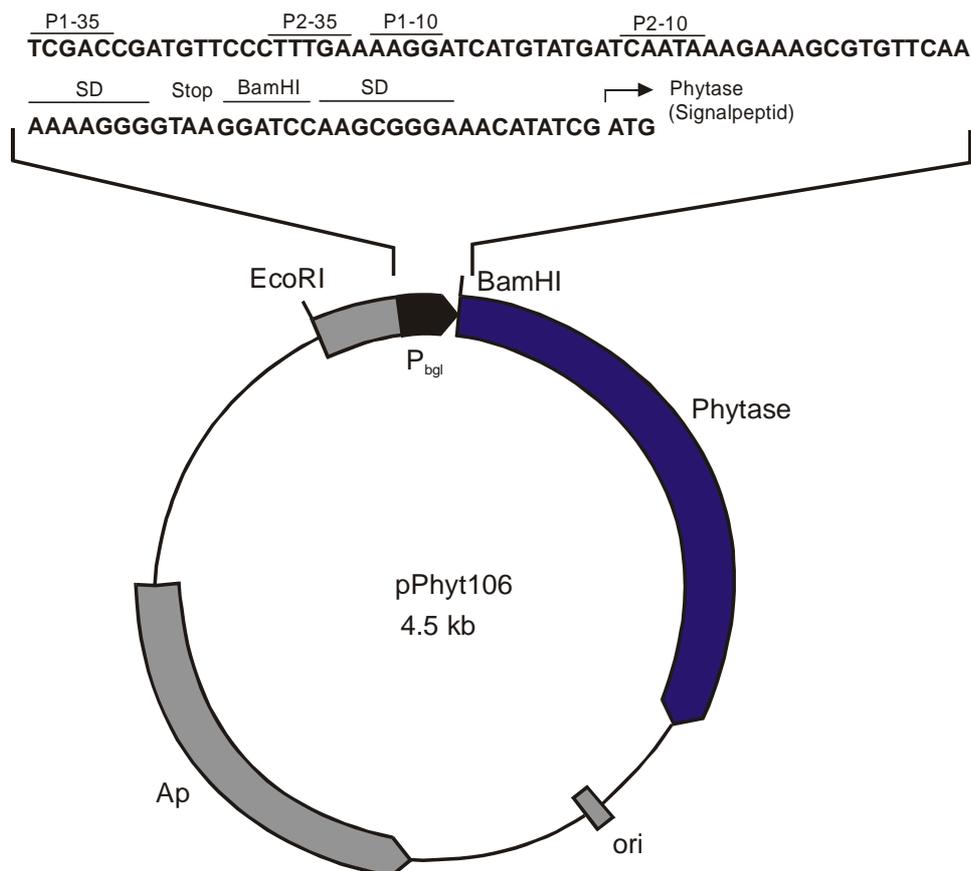


Abb. 3.1 Struktur des Expressionsvektors pPhyt106.

E. coli BL21(DE3)pPhyt109

Bei dem Stamm *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 ist das Phytasegen auf einem *multi-copy*-Vektor lokalisiert und wird durch den Promotor der β -Glucanase von *Bacillus amyloliquefaciens* exprimiert. Die Sekretionsfunktion wird durch die Integration der Sekretionskassette (s. Abb. 2.1) auf dem gleichen Plasmid realisiert (Abb. 3.2).

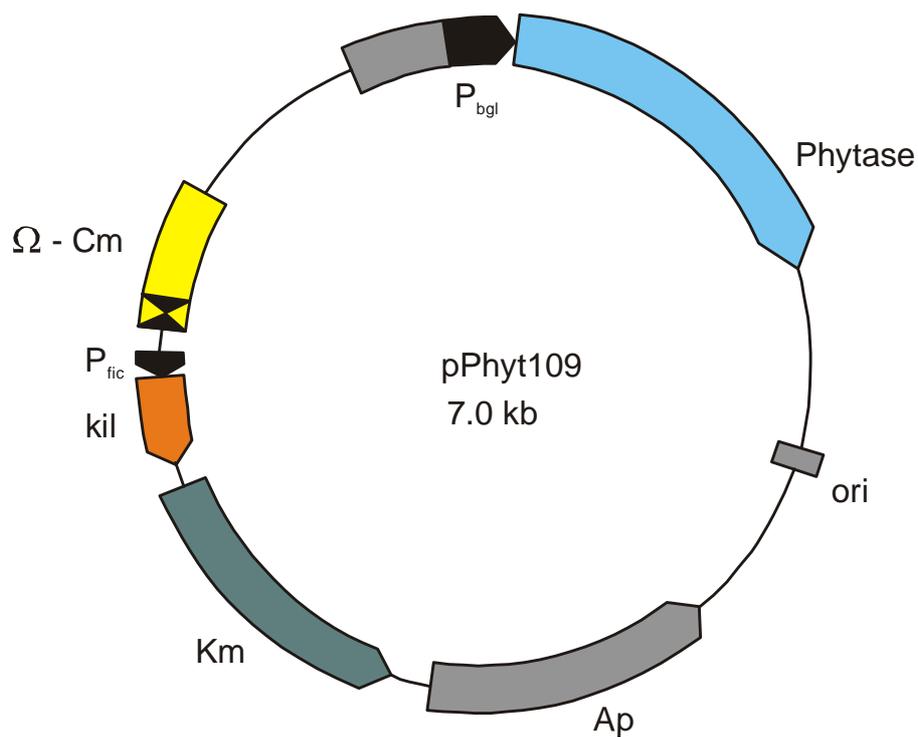


Abb. 3.2 Struktur des Expressionsvektors pPhyt109.

***E. coli* BL21(DE3)pPhyt148**

Bei dem Stamm *E. coli* BL21(DE3)pPhyt148 ist das Phytasegen auf einem *multi-copy*-Vektor lokalisiert und wird durch den Promotor der β -Glucanase von *Bacillus amyloliquefaciens* exprimiert. Die Sekretionsfunktion wird durch die Integration der Sekretionskassette (s. Abb. 2.1) auf dem gleichen Plasmid realisiert (Abb. 3.3). Die Sekretionskassette enthält allerdings im Gegensatz zu Stamm *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 statt des *fic*-Promotors (Stationärphasepromotor) den *bglA*-Promotor (konstitutiver Promotor).

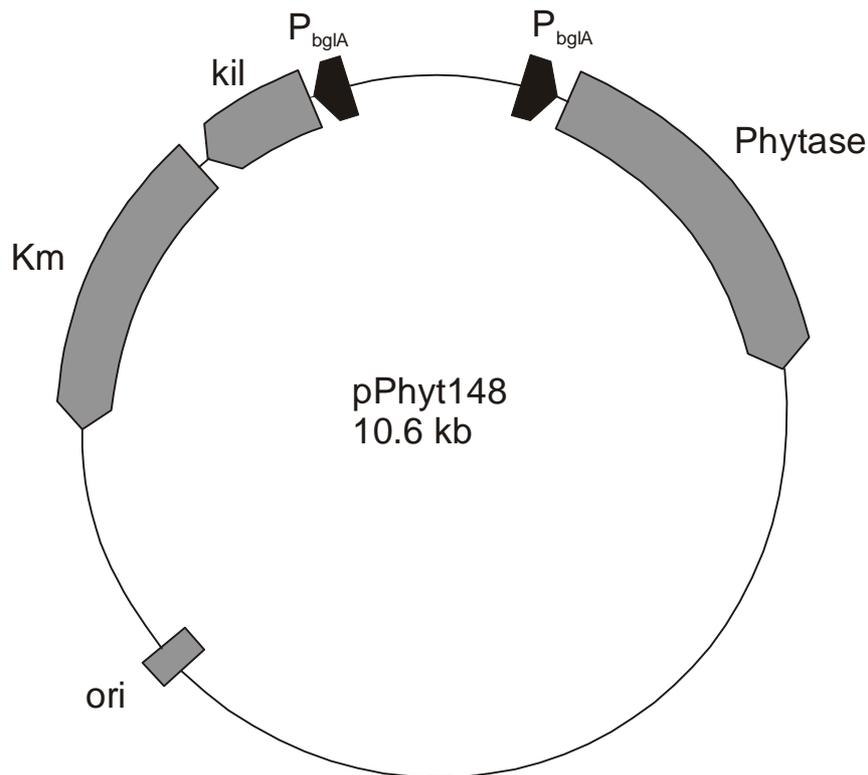


Abb. 3.3 Struktur des Expressionsvektors pPhyt148.

***E. coli* BL21(DE3)pPhyt190**

Zur schnellen Aufreinigung der Phytase aus dem Kulturmedium wurde ein Konstrukt hergestellt, bei dem das Phytasegen am C-terminalen Ende mit dem *His-tag* fusioniert ist (Abb. 3.4). Bedingt durch den *His-tag* und die *multiple cloning site*, in die das durch PCR amplifizierte DNA-Fragment mit dem Phytasegen kloniert wurde, besitzt die Phytase 13 Aminosäuren mehr als das natürliche Enzym. Um die Phytase ins Medium sekretieren zu können, wurde außerdem die Sekretionskassette (s. Abb. 2.1) in den Expressionsvektor integriert.

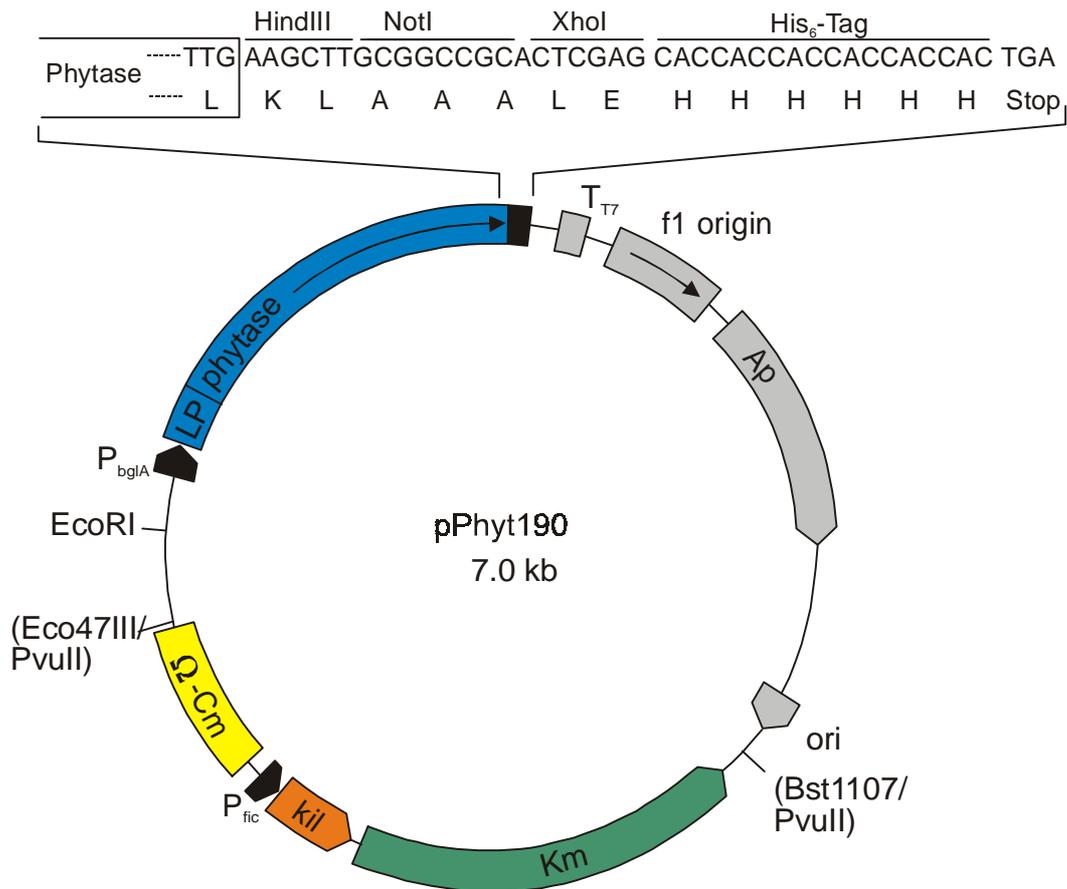


Abb. 3.4 Genetische Struktur des Plasmids pPhyt190.

3.4 Kultivierung von Bakterien

3.4.1 Medien

TB-Medium:

Caseinpepton	12 g
Hefeextrakt	24 g
Glycerin	4 g
In 900 ml Wasser lösen und autoklavieren	
Phosphatpuffer	In 100 ml Wasser lösen und autoklavieren
Kaliumdihydrogenphosphat	2,4 g
Dikaliumhydrogenphosphat	12,5 g

Nach dem Abkühlen wurden beide Lösungen zusammengegeben.

Glucose-Mineralsalz-Medium nach Riesenberg:

	Hauptkulturmedium	Zufütterlösungen		
		FS 1	FS 2	FS 3
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4,0 g/l		227,0 g/l	
(NH ₄)H ₂ PO ₄			169,5 g/l	
KH ₂ PO ₄	16,6 g/l			
Citronensäure	2,1 g/l			
Eisen(III)citrathydrat	75,0 mg/l			5,0 g/l
H ₃ BO ₃	3,8 mg/l			250 mg/l
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	18,8 mg/l			125 mg/l
EDTA · 2 H ₂ O	10,5 mg/l			700 mg/l
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	1,9 mg/l			125 mg/l
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	3,1 mg/l			213 mg/l
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	3,1 mg/l			213 mg/l
Zn(CH ₃ COO) ₂ · 2 H ₂ O	10,0 mg/l			668 mg/l
Glucose-Monohydrat	6,0 g/l	669,6 g/l		
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1,5 g/l	19,8 g/l		

Die Glucoselösungen und die Magnesiumsulfatlösungen für das Hauptkulturmedium wurden getrennt autoklaviert. Nach Abkühlen wurden die Glucoselösung und die Magnesiumsulfatlösung für das Hauptkulturmedium zusammengegeben und über ein Septum vor Beginn der Kultivierung und nach der Sterilisation des Bioreaktors, der das Hauptkulturmedium enthielt, in den Bioreaktor injiziert.

Die Komponenten der Zufütterlösung FS1 wurden getrennt autoklaviert. Nach Abkühlen werden sie zusammengegeben. Anschließend wurde die autoklavierte Zufütterlösung FS3 zu FS1 hinzugegeben. Die Zufütterlösungen FS1 und FS2 wurden vor Beginn der Kultivierung durch je ein Septum an den Bioreaktor angeschlossen.

Medienzusätze:

Aminosäuregemisch:

L-Glutamat	0,6 g/l
DL-Alanin	0,8 g/l
L-Arginin HCL	0,2 g/l
L-Asparagin	0,8 g/l
L-Cystein	0,2 g/l
L-Phenylalanin	0,4 g/l
L-Histidin	0,4 g/l
L-Isoleucin	0,6 g/l
L-Leucin	0,6 g/l
L-Lysin	0,5 g/l
L-Methionin	0,5 g/l
L-Prolin	0,4 g/l
L-Tyrosin	0,04 g/l
L-Threonin	0,5 g/l
L-Tryptophan	0,5 g/l
Thiamin	0,01 g/l
L-Valin	0,3 g/l

Vitamingemisch:

Vitamin B 12	0,01 g/l
Biotin	0,01 g/l
Pantothensäure	0,1 g/l
Folsäure	0,01 g/l
Niacin	0,1 g/l
Riboflavin	0,05 g/l

3.4.2 Stammhaltung

Zur Stammhaltung der Bakterien wurden Glycerinkulturen für eine Lagerung bei -80 °C hergestellt. Zu 870 μ l Bakterienkultur wurden 130 μ l 88%iges Glycerin gegeben. Die Proben wurden gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.4.3 Kultivierung im Schüttelkolben

Zur Herstellung von Inokulationskulturen für Fermentationen im 7 L-Bioreaktor wurden 200 ml TB-Medium mit 100 μ l Glycerinkultur versetzt und die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C auf einem Rotationsschüttler ($n = 150 \text{ min}^{-1}$, Durchmesser der Auslenkung $n_A = 25 \text{ mm}$) bis zu einer optischen Dichte von 21 – 28 inkubiert. Zusätzlich wurde dem Medium noch Kanamycin ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) zugesetzt. Der Bioreaktor wurde mit 200 ml dieser Inokulationskultur angeimpft.

3.5 Kultivierung im Bioreaktor

Die Satz- (Batch-) und Zulauf- (Fed-batch-) Kultivierungen wurden in einem 7 L- oder einem 30 L-Rührkessel der Fa. MBR (Wetzikon, Schweiz) durchgeführt.

3.5.1 Aufbau der Bioreaktoren

Die Bioreaktoren besaßen standardisierte Abmessungen, die die DECHEMA-Norm für Bioreaktoren (DECHEMA 1991) erfüllten. Der 7 L-Bioreaktor wies ein Höhe-Durchmesser-Verhältnis von 3:1 auf. Der Rührer war an die Reaktorhöhe angepaßt. Die geometrischen Abmessungen des 7 bzw. 30 L-Rührkessels sind in Abb. 3.5 mit der dazugehörigen Tabelle (Tab. 3.1) dargestellt.

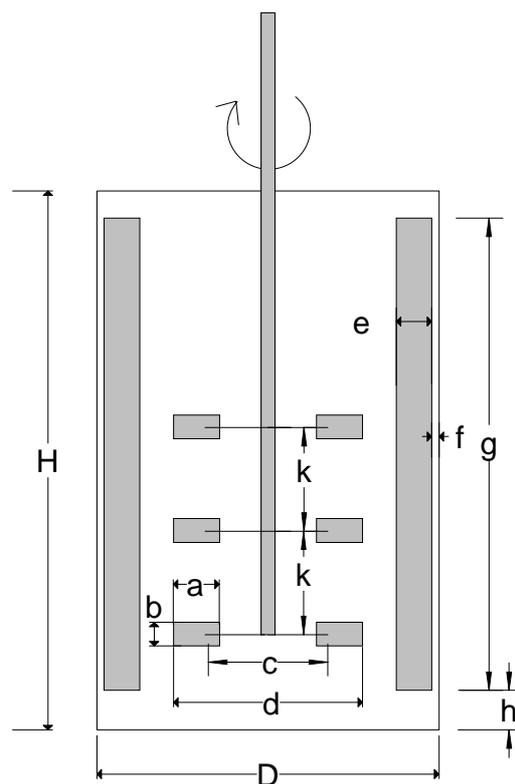


Abb. 3.5 Abmessungen von Bioreaktoren.

Abb. 3.6 zeigt schematisch den Aufbau der Bioreaktoren mit deren Peripherieausrüstung. Der 7 L-Rührkessel bestand aus einem doppelwandigen Stahlunterteil, welches Ansatzstutzen für die Meß-Sonden enthielt, und einem Glaszylinder als Oberteil. Der 30 L-Bioreaktor bestand aus einem durchgehenden

doppelwandigen Stahlgefäß. Der Deckel beider Bioreaktoren bestand aus Edelstahl und enthielt Durchgänge für die Zuluftleitung, die Abluftkühlung, sowie diverse Stutzen zum Anschluß von Meß-Sonden und zur Ankopplung von Vorlagegefäßen zur Dosierung von Säure, Base, Antischaummittel und Nährlösungen. Die Bioreaktoren enthielten seitlich 4 Stromstörer und zwei (7 L-Bioreaktor) bzw. drei 6-Blatt-Scheibenrührer. Die Rührerwelle war über eine Magnetkupplung mit dem Rührermotor verbunden. Die Temperierung der Reaktoren erfolgte über die Doppelmäntel durch Kühlwasser bzw. Einblasen von Heißdampf. Die Begasung des Kulturmediums erfolgte über einen Begasungsring. Keimfreie Bedingungen wurden durch Sterilfilter in der Zuluft- und Abluftstrecke gewährleistet. Die Abluftstrecke enthielt zusätzlich ein Nadelventil zur Regelung des Reaktorinnendrucks.

Tab. 3.1 Abmessungen der in Abb. 3.5 dargestellten Bioreaktoren.

	MBR 7 L-Laborreaktor	MBR 30 L-Laborreaktor
Reaktordurchmesser (D)	150 mm	240 mm
Reaktorhöhe (H)	400 mm	700 mm
Rührerdurchmesser (d)	70 mm	79 mm
Breite der Blätter (a)	15 mm	20 mm
Höhe der Blätter (b)	14 mm	14 mm
Scheibendurchmesser (c)	50 mm	50 mm
Anzahl der Blätter	6	6
Anzahl der Rührer	2	3
Abstand d. Bodenrührers v. Boden	125 (110) mm	120 mm
Abstand d. 2. Rührers v. Boden	250 (220) mm	240 mm
Abstand zwischen den Rührern (k)	125 mm	120 mm
Abstand Rührerblatt-Luftverteilung	60 mm	60 mm
Rührerwellendurchmesser	20 mm	20 mm
Anzahl der Stromstörer	4	4
Höhe (g)	330 mm	550 mm
Breite (e)	20 mm	20 mm
Wandabstand (f)	3 mm	5 mm
Abstand v. Fermenterboden (h)	5 mm	5 mm

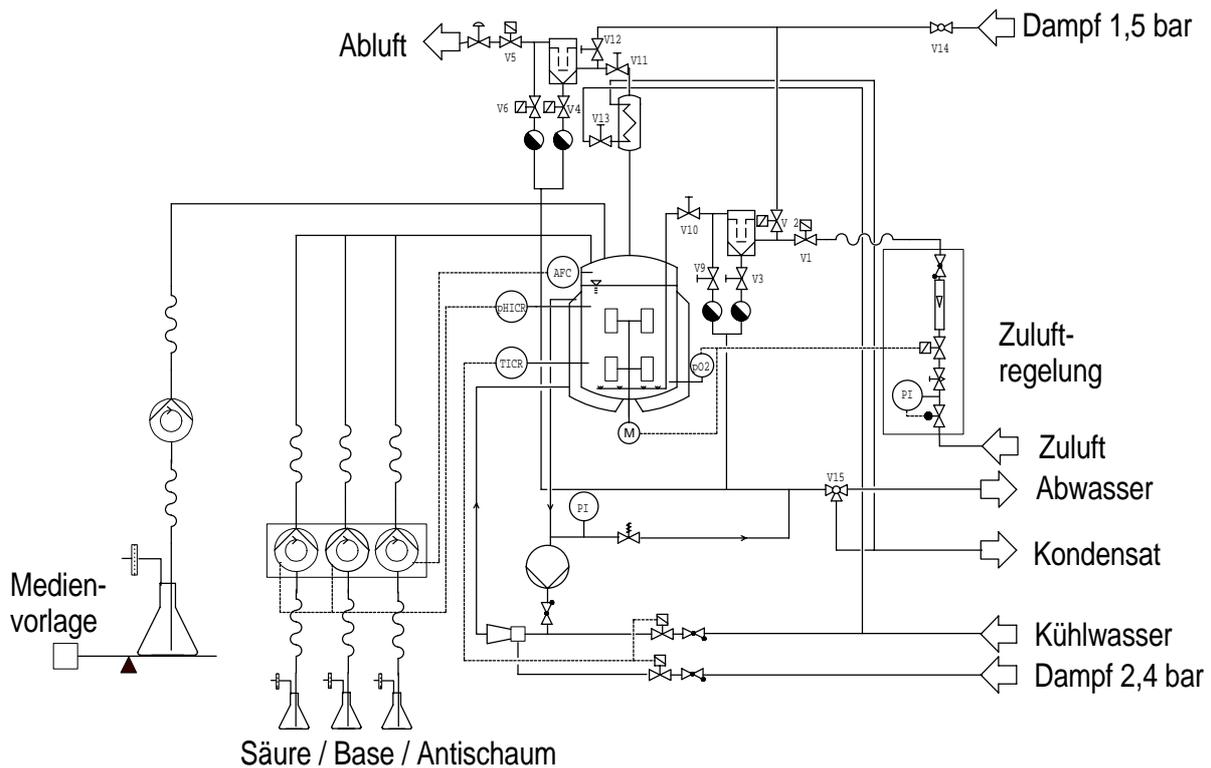


Abb. 3.6 Schematische Darstellung der verwendeten Bioreaktoren.

Meßtechnik

Die Bioreaktoren waren mit einer Reihe verschiedener Meß-Sonden und Meß-Instrumente ausgerüstet. Standardmäßig erfolgte die Messung des Reaktorinnendrucks über einen Druckaufnehmer und die der Temperatur über ein PT100-Widerstandsthermometer. Eine konduktometrisch arbeitende Schaumsonde diente zur Schaumkontrolle. Für die Überwachung des pH diente eine hitzesterilisierbare pH-Einstabmeßkette (Fa. Mettler Toledo), die vor der Sterilisation mit Pufferlösungen von pH 7,0 und 4,0 geeicht und mit einem Überdruck von ca. 2 bar versehen wurde. Die relative Gelöstsauerstoffkonzentration (pO_2) wurde mit Hilfe eines polarographischen O_2 -Sensors der Firma Mettler Toledo gemessen, der durch Begasung des Mediums im Reaktor mit Stickstoff (0 %) und Luft (100 %) unter Kultivierungsbedingungen geeicht wurde. Die Kontrolle des Luftvolumenstroms erfolgte über eine Zuluft-Regelungseinheit (*Massflow-Box*).

Die Bestimmung der Sauerstoff- und der Kohlendioxidkonzentration in der Bioreaktorabluft erfolgte mit Hilfe des kombinierten Abgasanalyseystems URAS10E (Hartmann und Braun). Dabei wurde die Kohlendioxidkonzentration mit Hilfe der

Absorption von Licht im Infrarotbereich ermittelt, während die Bestimmung der Sauerstoffkonzentration über die paramagnetischen Eigenschaften des Moleküls erfolgte. Die Kalibrierung wurde durch das System automatisch durchgeführt.

Digitale Steuereinheit

Die Steuerung der Bioreaktoren erfolgte durch eine direkte, digitale Steuereinheit (*direct digital control unit*, DDC), die analoge Meß- und Regeleinschübe besaß, in Verbindung mit einem VME-Bus-Prozeßrechner. Die wichtigsten Funktionen der DDC waren die Erfassung und Regelung von Temperatur, pH, pO₂, Rührerdrehfrequenz, Reaktorinnendruck, Luftvolumenstrom und Zugabe von Antischaummittel.

Der VME-Bus-Rechner übernahm die übergeordnete Steuerung des Prozesses. Digitale Steuereinheit, Abgasanalytik und Pumpen waren mit diesem Rechner verbunden, so daß alle Prozeßparameter und Prozeßdaten kontinuierlich erfaßt, gespeichert und entsprechend visualisiert werden konnten. Die Eingaben der Sollwerte erfolgten ebenfalls über diesen Prozeßrechner. Außerdem wurden sowohl die Säure-, Base-, Antischaum-Pumpen als auch die Zulaufpumpe angesteuert und der pO₂ z.B. über die Rührerdrehfrequenz geregelt.

Der VME-Bus-Rechner war als Steckkartensystem aufgebaut und mit dem PME 68-25M-Prozessor der Firma Motorola mit einer Taktfrequenz von 25 MHz und 4 MB Arbeitsspeicher ausgerüstet. Der Rechner verfügte über ein Analogeingangsmodule XVME-560 (Fa. XYCOM) mit 32 Analogeingängen, über zwei Analogausgangsmodule XVME-530 mit je 8 Analogausgängen, zwei Digitalausgangsmodule TSVME-400 bzw. 401 mit je 32 digitalen Ausgängen und ein serielles Ein/Ausgangsmodule IASCM-XVME-428/1 mit 8 seriellen RS232-Schnittstellen.

Die Visualisierung erfolgte auf einem VT340-Terminal mit 2 voneinander getrennten, umschaltbaren Benutzerebenen. Das Betriebssystem des Rechners war OS9, während die Prozeßführung vom Prozeßleitsystem Caroline II (Fa. PCS, Schweiz) ausgeführt wurde. Für die Programmierung und Änderung dieses Systems stand ein UMACS-Compiler zur Verfügung.

Sterilisation und Kultivierung

Die Hitzesterilisation des mit Kulturmedium gefüllten Bioreaktors wurde für 25 min bei 121 °C automatisch durchgeführt. Gleichzeitig erfolgte auch eine Sterilisation der Zulauf- und der Abluftstrecke. Nach dem Abkühlen wurde das gewünschte Kulturvolumen durch Zulauf von kondensiertem Wasserdampf über die Abluftstrecke eingestellt. Die sterilfiltrierten hitzeempfindlichen Medienbestandteile (Glucose, Ammoniumsalze, Magnesiumsulfat und Kanamycin) wurden durch Septen in den Deckel des Bioreaktors injiziert. Über weitere Septen wurden die getrennt autoklavierten pH-Korrekturflüssigkeiten, Antischaummittel und Zulaufmedien angeschlossen.

Nach Einstellung der Sollwerte der Betriebsbedingungen wurde die Kultivierung durch Animpfen mit Inokulationskultur (10 Vol-% des Arbeitsvolumens des Bioreaktors) durch ein Septum gestartet.

3.5.2 Das FIA-System

Mit Hilfe eines an der Universität Hannover entwickelten FIA-Systems konnte die Regelung eines fermentativen Prozesses realisiert werden, die auf der direkten *on-line*-Messung der Konzentration eines Substrates, in diesem Fall Glucose, beruhte. Während der Kultivierung wurde die Glucosekonzentration im Medium auf einem gewünschten Sollwert konstant gehalten.

Der dafür verwendete Prozeßanalysator basierte auf dem Prinzip der Fließinjektionsanalyse (FIA). Ein besonderer Vorteil dieses Systems ist, daß auf ein Probenahmemodul verzichtet werden kann. So war es möglich, die Verzögerungszeit zwischen Probenahme und Erhalt des Meßwertes zu minimieren. Auf diese Weise war eine schnelle Analytik möglich, die für die Regelung hochdynamischer Prozesse wie die Kultivierung von *E. coli* nötig ist (Fast-FIA-System). Allerdings waren die so erhaltenen Meßergebnisse mit höheren Fehlern behaftet. Zur Kompensation dieses Meßrauschens wurde ein Kalman-Filter verwendet (Dochain & Perrier 1997).

Die Kultivierungen mit dem Fast-FIA-System wurden in Zusammenarbeit mit dem TCI Hannover (Michael Arndt, Bernd Hitzmann) durchgeführt.

Aufbau des FIA-Systems

Das verwendete FIA-System (Abb. 3.7) bestand aus zwei peristaltischen Pumpen (ACCU FM40, SciLog, USA), zwei 6-port-Injektionsventilen (Knauer, Deutschland) und einer Durchflußzelle mit Sauerstoffelektrode und Meßverstärker (ANASYSCON GmbH, Deutschland). Zur Steuerung des Systems sowie zur *on-line*-Datenaufnahme diente die Software CAFCA (ANASYSCON GmbH, Deutschland).

Die injizierten Segmentvolumina betragen 24 μL Probe und 36 μL GOD-Lösung. Die Meßfrequenz betrug bei allen durchgeführten Kultivierungen einen Wert pro Minute.

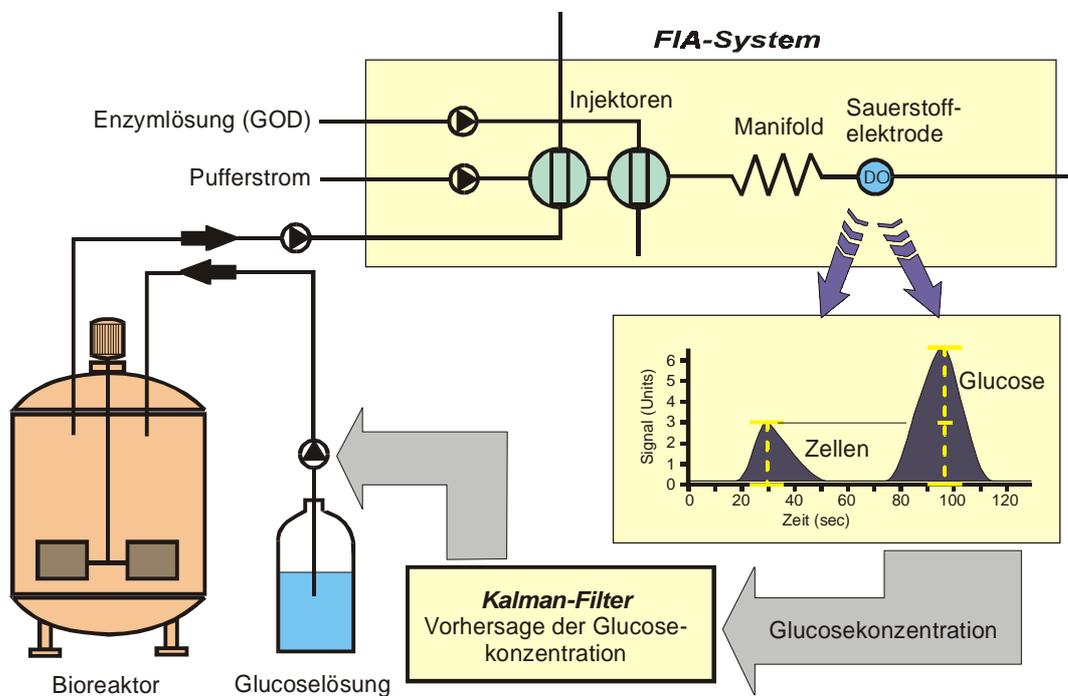


Abb. 3.7 Schema des FIA-Systems zur Glucosemessung und Regelung der Glucosezufütterung (nach Vorlage der Universität Hannover gezeichnet).

On-line-Messung von Glucose mit dem FIA-System

Die Glucosemessung:

Da das System auf ein Probenahmemodul verzichtete, wurde die mikroorganismenhaltige Kulturbrühe aus dem Bioreaktor direkt in das Analysesystem injiziert. Über das Injektionsventil wurde ein Probensegment ($V = 24 \mu\text{l}$) in den Trägerstrom injiziert und mit einer Glucoseoxidase-Lösung (200 U/mg) in der Reaktionsstrecke (Manifold, s. Abb. 3.7) vermischt, die mit einem zweiten Injektor vor dem Probensegment platziert wurde. Die Glucoseoxidase setzte Glucose unter Sauerstoffverbrauch um. Der bei dieser Reaktion umgesetzte Sauerstoff wurde mit Hilfe einer pO_2 -Elektrode ermittelt und als Maß für die Glucosekonzentration verwendet. Da sich jedoch auch Zellen in der Probe befanden, die ebenfalls Sauerstoff verbrauchen, wurde eine zweite Messung durchgeführt, bei der nur der Sauerstoffverbrauch der Zellen bestimmt wurde. Aus dem Summenwert (Sauerstoffverbrauch der Enzymreaktion und der Zellen) und dem Wert für den Sauerstoffverbrauch der Zellen wurde nun die Glucosekonzentration berechnet. Da sich der Sauerstoffverbrauch der Zellen nur langsam ändert, wurde er nur jeden vierten Meßzyklus (d.h. alle vier Minuten) bestimmt. Zur Steuerung des FIA-Systems und zur Berechnung der Glucosekonzentration dient das Automationssystem CAFCA (Hitzmann *et al.* 1993). Die Zeit von der Probenahme bis zum Vorliegen des Meßwertes betrug eine Minute.

Das Regelsystem:

Da die Differenz von zwei Meßwerten in die Bestimmung der Glucosekonzentration eingeht, ist der Meßfehler doppelt so groß im Vergleich zu herkömmlichen FIA-Systemen. Um dieses Meßrauschen zu kompensieren, wurde das kontinuierlich diskrete erweiterte Kalman-Filter genutzt, das ein zeitkontinuierliches Zustandsmodell mit diskreter Meßgleichung verwendet (Hitzmann *et al.* 2000). Als Zustandsmodell des Bioprozesses wurde die typische Monod-Wachstumskinetik mit dem limitierenden Substrat Glucose in Kombination mit dem Modell eines idealen Rührkesselreaktors genutzt. Die Modellgleichungen wurden mit Hilfe eines Runge-Kutta-Verfahrens vierter Ordnung numerisch gelöst und entsprechend zur Filterung

verwendet. Die Parameter des Kalman-Filters wurden in Simulationen optimiert. Neben den Schätzwerten der Glucosekonzentration lieferte das Kalman-Filter Schätzwerte für die Biomassekonzentration und die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit. Basierend auf diesen Werten und einem PI-Regler wurde der Pumpstrom der Substratzugabe berechnet.

Das Kalman-Filter und der Regler waren als Software auf einem PC implementiert. Die aktuellen Meßwerte wurden über ein serielles Interface von CAFCA an diesen Rechner übergeben, und der berechnete Pumpstrom wurde über eine zweite serielle Schnittstelle an die Pumpe ausgegeben. In Abb. 3.7 ist das Schema des gesamten Regelkreises dargestellt.

3.5.3 Zulaufkultivierung mit Regelung durch das FIA-System

Das System zur schnellen Glucosemessung wurde für die Regelung von *E. coli*-Kultivierungen eingesetzt. Dazu wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 im 7 L-Bioreaktor bei und einer Temperatur von 37 °C in einem Glucose-Mineralsalz-Medium nach Riesenberg (s. 3.4.1) gezüchtet. Das pH wurde durch automatische Dosierung von 10%iger Phosphorsäure und 4 N Natronlauge als Korrekturflüssigkeiten auf einen Wert von 6,9 gehalten. Die Glucoseausgangskonzentration betrug im Satzbetrieb 6 g/L. Das Ausgangsvolumen betrug 3 L und das Endvolumen ca. 5 L. Die Luftzufuhr wurde auf 10 L/min und der Druck auf 0,2 bar eingestellt.

Der Zulauf der Zufütterlösungen FS1 (Glucosekonzentration zwischen 500 und 669,5 g/L) und FS2 (s. 3.4.1) erfolgte über das Fließinjektionsanalysesystem (FIA-System) ohne Probenahmemodul wie in 3.5.2. beschrieben. Der Sollwert der Regelung betrug zwischen 0,1 und 0,3 g/L Glucose.

Um eine Sauerstofflimitierung bei den Kultivierungen zu verhindern, wurde beim anfänglichen Satzbetrieb der pO_2 standardmäßig durch Erhöhung um 2 % der Rührerdrehfrequenz konstant auf 30 % gehalten. Dabei betrug die minimale Rührerdrehfrequenz $n_0 = 150 \text{ min}^{-1}$, während die maximale Drehfrequenz durch den Bioreaktor vorgegeben war ($n_{\text{max}} = 2000 \text{ min}^{-1}$).

Für die Vorkultur wurden in einem 1000 mL Schüttelkolben mit Schikenen 300 mL TB-Medium und 50 µg/mL Kanamycin mit 1 mL einer Glycerinkultur des Stammes *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 angeimpft und über Nacht bei einer Schüttelfrequenz von $n = 150 \text{ min}^{-1}$ bei 37 °C inkubiert. Bei Animpfen des Bioreaktors befand sich die Vorkultur in der stationären Wachstumsphase.

3.5.4 Zulaufkultivierung mit Regelung über die Sauerstoffsättigung

Im folgenden werden verschiedene Strategien zur Durchführung von Zulaufkultivierungen beschrieben, bei denen die Regelung des Zulaufs über die Sauerstoffsättigung im Medium erfolgte. Alle Kultivierungen wurden mit dem Stamm *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 im 7 L-Bioreaktor bei einem pH-Wert von 6,9 und einer Temperatur von 37 °C in einem Glucose-Mineralsalz-Medium nach Riesenberg (s. 3.4.1) durchgeführt. Die Glucoseausgangskonzentration betrug in der Zufütterlösung zwischen 500 und 669,5 g/L und im Satzbetrieb 6 g/L. Das Ausgangsvolumen betrug 3 L und das Endvolumen ca. 5 L. Die Luftzufuhr wurde auf 10 L/min und der Druck auf 0,2 bar eingestellt.

Regelung des Zulaufs über die Sauerstoffsättigung

Der Zulauf der Zufütterlösungen (Konzentration der Glucose $c_{\text{Glucose}} = 669,5 \text{ g/L}$) wurde durch die gelöstsauerstoffkonzentration ($p\text{O}_2$) in der Kulturflüssigkeit geregelt ($p\text{O}_2$ -stationär). Die Unterversorgung von mindestens einem Substrat führt zu einem Anstieg des $p\text{O}_2$. Beim Überschreiten des $p\text{O}_2$ -Sollwertes ($p\text{O}_2 = 60 \%$) wurde eine Pumpe angesteuert, die den Zulauf von Medium bis zum Unterschreiten dieses Sollwertes ermöglichte.

Um eine Sauerstofflimitierung bei den Kultivierungen zu verhindern, wurde beim anfänglichen Satzbetrieb der $p\text{O}_2$ standardmäßig durch Erhöhung bzw. Verringerung der Rührerdrehfrequenz konstant gehalten. Dabei betrug die minimale Rührerdrehfrequenz $n_0 = 150 \text{ min}^{-1}$, während die maximale Drehfrequenz durch den Bioreaktor vorgegeben war ($n_{\text{max}} = 2000 \text{ min}^{-1}$ beim 7 L-Bioreaktor). Bei $p\text{O}_2$ -

geregeltem Zulauf ist eine Verringerung der Rührerdrehfrequenz bei einem pO_2 -Anstieg durch Nährstofflimitierung nicht wünschenswert. Deshalb wurde eine Steuerungsroutine für die Rührerdrehfrequenz programmiert, die nur eine Erhöhung der Drehfrequenz bei Unterschreiten eines pO_2 -Sollwertes ($pO_2 = 30 \%$) erlaubte. Dabei war der Sollwert, die prozentuale Erhöhung der Rührerdrehfrequenz und die Länge des Zeitintervalls bei Unterschreiten des Sollwertes bis zur Erhöhung der Rührerdrehfrequenz frei wählbar.

Intervallregelung des Zulaufs über die Sauerstoffsättigung

Nach anfänglichem Satzbetrieb wurde eine dreistündige Hungerphase der Zellen abgewartet. Anschließend wurde die Zufütterung gestartet. Die Regelung der Zufütterung erfolgte wie in 3.5.4 beschrieben. Die Zufütterung wurde alle drei Stunden unterbrochen, so daß die Zellen abwechselnd sich in einer Wachstumsphase und anschließend wieder in einer Hungerphase befanden.

Regelung des Zulaufs unter Einhalten eines konstanten Sollwertes für die Sauerstoffsättigung

Mit Hilfe eines PID-Reglers wurde die Zufütterpumpe angesteuert. Der PID-Regler war so eingestellt, daß kurz vor Erreichen des pO_2 -Sollwertes die Zufütterpumpe angeschaltet wurde und mit geringer Geschwindigkeit lief. Bei Überschreiten des Sollwertes erhöhte sich die Zufüttergeschwindigkeit. Bei Unterschreiten des Sollwertes verlangsamte sich zunächst die Zufüttergeschwindigkeit und anschließend wurde die Pumpe ausgeschaltet.

Es wurden vier verschiedene Kultivierungen durchgeführt, bei denen je ein anderer pO_2 -Sollwert ($pO_2 = 20 \%$, 10% , 5% , 2%) eingestellt wurde. Die Rührerdrehfrequenz wurde bei 500 min^{-1} konstant gehalten. Alle anderen Bedingungen wurden wie oben beschrieben eingehalten.

3.5.4 Probenahme

Die Probenahme bei Kultivierungen im Bioreaktor erfolgte auf zwei Weisen: automatisch und manuell.

Mit Hilfe des automatischen Probenehmers FC205 der Firma Gilson wurden im Abstand von 1 bis 2 Stunden durch einen seitlichen Stutzen im Bioreaktor jeweils ein Volumen von 20 bis 24 mL entnommen. Die ersten 4 mL wurden als Vorlauf verworfen. Die erhaltenen Proben wurden in einem Kühlblock sofort auf 4 °C gekühlt, um das Wachstum zu stoppen und dann der Analytik zugeführt.

Manuell erfolgte die Probenahme über ein dampfsterilisierbares Probenahmeventil. Es wurden zuerst ca. 20 mL als Vorlauf verworfen und anschließend ca. 20 mL Probe entnommen. Um weiteres Wachstum zu verhindern, wurden die Proben sofort aufgearbeitet.

3.6 Analytik

3.6.1 Optische Dichte

Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Die Kulturproben wurden entsprechend verdünnt, um in einem linearen Meßbereich zwischen 0,1 und 0,9 zu messen. Zur Bestimmung der optischen Dichte wurde ein Photometer der Firma Pharmacia (Biochrom 4060) verwendet.

3.6.2 Biotrockenmasse

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse wurde ein Kulturvolumen von 1 mL in ein ausgeheiztes und austariertes Eppendorf-Gefäß pipettiert. Die Zellen werden bei 14000 min^{-1} 10 min lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde für weitere Analysen aufgehoben. Das Zellpellet wurde in 0,9%iger NaCl-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden über Nacht im Vakuumtrockenschrank bei 60 °C getrocknet.

3.6.3 Bestimmung der Acetatkonzentration

Der quantitative Nachweis von Acetat erfolgte über einen Enzymtest (Boehringer-Mannheim, Enzymatische BioAnalytik / Lebensmittelanalytik, UV-Test) der Firma R-Biopharm GmbH, Darmstadt (Kit-Nr. 0148 261) nach Vorschrift des Herstellers.

3.6.4 Bestimmung der Glucosekonzentration

Die quantitative Bestimmung von Glucose erfolgte für *Off-line*-Proben über einen enzymatischen Test der Firma Sigma Diagnostics® (INFINITY™ GLUCOSE REAGENT, Kit-Nr. 18-20) nach Vorschrift des Herstellers.

3.6.5 Bestimmung der Phytaseaktivität

Benötigte Reagenzien:

1. Acetatpuffer (0,25 mol/L, pH 5,5)

1,76 g Essigsäure und 20,50 g Natriumacetat wurden in etwa 900 mL destilliertem Wasser in einem 1L-Meßkolben gelöst. Der pH-Wert wurde in einem Bereich von 5,45-5,55 eingestellt. Anschließend wurde auf ein Liter aufgefüllt und durchmischt.

2. Natriumphytat (8,40 g/L):

8,40 g Natriumphytat 10 aq wurden in 1 L Acetatpuffer gelöst. Die Lösung wurde täglich frisch angesetzt.

3. Ammoniummolybdat-Lösung (20,2 mmol/L):

2,5 g Ammoniummolybdat $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ wurden in destilliertem Wasser gelöst und 20 mL 5 M Schwefelsäure hinzugefügt. Anschließend wurde auf 100 mL aufgefüllt und durchmischt.

4. Aminonaphtholsulphonsäure-Lösung (Reducerlösung; 10,4 mmol/L):

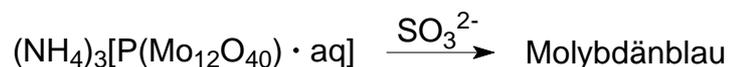
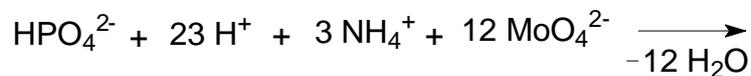
0,5 g 1-Amino-2-naphthol-4-sulfonsäure und 5,0 mL Natriumsulfitlösung (20 g wasserfreies Na_2SO_3 auf 100 mL Wasser) wurden in 195 mL Natriumdisulfitlösung (15 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ in 100 mL Wasser) gelöst. Die Reducerlösung wurde in einer braunen Standflasche kühl gelagert.

Vorbereitung der Proben:

1 mL Kulturbrühe wurden bei 14000 min^{-1} für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vom Pellet getrennt.

Meßprinzip:

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Reaktion von Ammoniummolybdat mit freigesetztem Phosphat unter Ausbildung eines blauen Ammoniummolybdophosphatkomplexes:

*Durchführung:*

Zur Bestimmung der Phytaseaktivität wurden in einem Eppendorf-Gefäß 380 μL Acetat-Puffer und 20 μL der zuvor mit Puffer verdünnten Probelösung gegeben. Anschließend wurden 720 μL Phytatlösung hinzugegeben, gevortext und bei 37°C inkubiert. Nach 5 min wurden 560 μL entnommen und in ein anderes Eppendorf-Gefäß überführt. Der Rest wurde für weitere 30 min inkubiert. Zu der entnommenen Probe wurden zunächst 240 μL Molybdat-Lösung, dann jeweils 100 μL Reducerlösung und 5 M Schwefelsäure gegeben und gevortext. Anschließend wurde bei 734 nm in einem Photometer der Absorptionswert gegen Wasser bestimmt, der den Nullwert $A_{5\text{min}}$ ergibt. Die verbliebene Probe wurde nach insgesamt 35 min Inkubation auf die gleiche Weise aufgearbeitet und ergab den Wert $A_{35\text{min}}$.

Erstellung der Eichgeraden:

Es wurde eine Phosphatlösung, die 500 nmol Phosphat pro 10 μL enthielt, hergestellt und entsprechend verdünnt.

In ein Eppendorf-Gefäß wurden 190 μL Puffer und 10 μL Phosphatlösung gegeben. Anschließend wurden 360 μL Phytatlösung, 240 μL Molybdatlösung, 100 μL Reducer und 100 μL 5 M Schwefelsäure hinzugefügt. Nach dem Vortexen wurde bei 734 nm die Absorption gemessen. Die jeweils ermittelten Absorptionswerte wurden gegen die verschiedenen Phosphatkonzentrationen aufgetragen und die Steigung bestimmt. Daraus läßt sich der Absorptionskoeffizient ε berechnen.

Berechnung der Phytaseaktivität:

Eine Einheit (U) entspricht der Menge an Enzym, die 1 μmol anorganisches Phosphat von der Phytinsäure in einer Minute abspaltet.

Die Phytaseaktivität r_v berechnet sich gemäß Gl. 19:

$$r_v [\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}] = \frac{1}{\varepsilon} \cdot \frac{\Delta A}{\Delta t} \cdot f \quad \text{Gl. 19}$$

f = Verdünnungsfaktor der Probe

$\varepsilon = 0,02516 [\text{mL} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$

$\Delta A = A_{35\text{min}} - A_{5\text{min}}$

$\Delta t = 30 \text{ min}$

3.6.6 Bestimmung des Stickstoffgehaltes nach Dr. Lange

Der quantitative Nachweis des Gesamt-Stickstoffs einer Probe wurde mit dem Küvetten-Test Laton ® LCK 338 der Firma Dr. Lange nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

3.6.7 Bestimmung des Proteingehaltes über den BCA-Test

Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgt durch einen BCA-Test nach Smith *et al.* (1985). Dazu werden folgende Reagenzien benötigt:

TE-Puffer	10 mM Tris / HCl 1 mM EDTA pH 8,0 autoklavieren
BCA-Arbeitsreagenz	10 mL BCA-Lösung (SIGMA) 200 µL 4 %ige CuSO ₄ · 5 H ₂ O-Lösung
BSA-Lösung	10 mg / mL

Erstellung einer Eichgeraden:

Eine Lösung von 10 mg/mL BSA in TE-Puffer wurde auf 100 ng/µL, 75 ng/µL, 50 ng/µL und 25 ng/µL verdünnt. Die Lösungen dienen zur Eichung des Tests.

Durchführung:

Zu 1 mL BCA-Arbeitsreagenz wurden 50 µL Probelösung gegeben. Die Proben wurden 30 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 5 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend ihre Absorption bei 562 nm gegen einen Referenzwert gemessen. Als Referenzwert wurden 50 µL TE-Puffer zu 1 mL BCA-Arbeitsreagenz gegeben, und anschließend wurde die Probe wie oben aufgeführt behandelt.

3.6.8 Vertikale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Auftrennung der Proteine wurde ein 12%iges SDS-Gel mit einem diskontinuierlichen Puffersystem gewählt.

Sammelgel	775 μ L H ₂ O 0,25 mL Tris (0,25 M), pH 6,8 425 μ L Bis-Acrylamid (8 g/L) 425 μ L Acrylamid (300 g/L) 50 μ L SDS-Lösung (50 g/L) 25 μ L Ammoniumpersulfat (100 g/L) 2,5 μ L TEMED (1 g/L)
Trenngel	1,5 mL H ₂ O 2,8 mL Tris (1 M), pH 8,0 3,0 mL Bis-Acrylamid (8 g/L) 3,0 mL Acrylamid (300 g/L) 150 μ L SDS-Lösung (50 g/L) 37,5 μ L Ammoniumpersulfat (100 g/L) 2,5 μ L TEMED (1 g/L)
Elektroden- puffer	25 mM Tris 50 mM Glycerin 10 g/L SDS
2-fach Proben- puffer	250 mM Tris 80 g/L SDS 400 g/L Glycerin 0,056 mM Bromphenolblau 2,5 M β -Mercaptoethanol

Die Proteinproben wurden mit dem gleichen Volumen 2-fach Probenpuffer versetzt, für 5 min auf 95 °C erhitzt, kurz zentrifugiert und auf das Gel gegeben. Die Fokussierung der Proteine im Sammelgel erfolgte bei 10 bis 15 mA. Für die anschließende Trennung im elektrischen Feld wurde für 45 bis 60 min eine konstante Stromstärke von 18 bis 25 mA angelegt.

Silberfärbung der 12 %igen Polyacrylamidgele

Die Färbung der Proteingele erfolgte nach einer modifizierten Methode von Damerval *et al.* (1987). Dazu wurden folgende Lösungen benötigt:

Entfärberlösung	10 Vol.-% Essigsäure 45 Vol.-% Methanol
Farmers Reducer	30 mM Kaliumhexacyanoferrat-(III) 32 mM Natriumthiosulfat
Entwickler	23 mM Natriumcarbonat-Lösung 0,1 % Formaldehyd-Lösung

Nach der Proteintrennung wurde das Gel vorsichtig von der Trägerplatte abgelöst, für 15 min in Entfärberlösung gelegt und anschließend für 2 min mit Farmers Reducer inkubiert. Nach vollständiger Entfärbung durch mehrere Waschschrte mit Wasser wurde das Gel für 30 min in Silbernitratlösung (1 g/L) fixiert und anschließend für jeweils 30 s mit Wasser und Natriumcarbonat-Lösung behandelt. Die Entwicklung erfolgte durch Überführen des Gels in Entwicklerlösung. Die Farbentwicklung wurde bei der gewünschten Bandenintensität durch einen Waschschrte mit Essigsäurelösung (10 %) abgestoppt.

3.6.9 Zellaufschlußverfahren

Ultraschallaufschluß

Der Zellaufschluß für 1 mL Kulturbrühe erfolgte nach 2 Gefrierauftauschritten mit einem Ultraschallgerät (s. Kapitel 3.1) zweimal für 30 s auf Stufe 2, gekoppelt mit einem sehr dünnen Horn (Spitzendurchmesser etwa 3 mm) direkt im eisgekühlten Eppendorf-Gefäß.

Periplasma-/Cytoplasma-Aufschluß

Benötigte Lösungen:

Lösung 1	20 g Saccharose 4,16 g 0,1 M EDTA 3,152 g Tris gelöst in 100 mL Wasser
Lösung 2	0,39 g Tris 0,3 g MgSO ₄ · 7H ₂ O gelöst in 250 mL Wasser

Probenvorbereitung:

1 mL Kulturprobe wurde bei 14 000 min⁻¹ für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vom Pellet abgetrennt. Das Pellet wurde in 500 µL Lösung 1 resuspendiert und mindestens 20 min auf Eis geschüttelt. Anschließend wurde wieder bei 14 000 min⁻¹ für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 500 µL Lösung 2 resuspendiert und mindestens 10 min auf Eis geschüttelt und wieder abzentrifugiert. Der Überstand enthält die Proteine aus dem periplasmatischen Raum der Zellen. Das Pellet wurde in 1 mL Wasser resuspendiert und für 30 s auf Stufe 2 mit dem Ultraschallgerät (s. Kapitel 3.1) behandelt. Nach anschließendem Abzentrifugieren enthielt der Überstand die cytoplasmatischen Proteine der Zellen.

3.7 Proteincharakterisierung

3.7.1 Metallchelate-Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose

Für die säulenchromatographische Proteinaufreinigung wurde ein GradiFrac-System der Firma Pharmacia Biotech auf die spezifische Anforderung von Säulenmaterial

und Zielprotein abgestimmt. Die erweiterte Grundausstattung der GradiFrac-Anlage setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

- Programmierbarer Fraktionssammler (GradFrac) zur Steuerung der Lösungsmittel-Pumpe (P-50) und Programmierung von Puffergradienten
- Mixer (0,6 mL) zum Mischen der Gradientenpuffer
- UV-Detektor (UV-1, 280 nm)
- Pumpe (P-50) zum Auftragen größerer Probenmengen
- Druckaufnehmer zur Kontrolle des Säulendrucks

Das verwendete Chromatographiematerial (Ni-NTA-Agarose, Superflow, Qiagen) konnte laut Hersteller nur einem maximalen Druck von 0,2 bar ausgesetzt werden. Aus diesem Grund wurde vor der Säule ein Druckaufnehmer installiert, der bei Überschreiten des eingestellten Wertes die Pumpe automatisch abschaltete. Die Durchlaufgeschwindigkeit der Chromatographieläufe betrug $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Der Gradientenaufbau erfolgte drucklos vor der Pumpe über ein Drei-Wege-Magnetventil, an welches zwei Puffersysteme (A und B) angeschlossen waren. Eine homogene Durchmischung gewährleistete die hinter der Pumpe angebrachte Mischkammer. Die Gradienten-Elution wurde so programmiert, daß innerhalb eines vorgegebenen Zeitraumes das Mischungsverhältnis von 0 % Puffer B auf 100 % Puffer B eingestellt wurde.

Verwendete Puffersysteme:

Puffer A	50 mM Na_2HPO_4 50 mM NaH_2PO_4 pH 7,2
Puffer B	50 mM Na_2HPO_4 50 mM NaH_2PO_4 150 mM Imidazol pH 7,2

Die Säule Mobicol 2,5 mL der Firma MoBiTec mit einem Filter der Porengröße $35 \mu\text{m}$ wurde mit 1,5 mL Ni-NTA-Agarose gefüllt.

Das Säulenmaterial Ni-NTA Superflow wurde in einer mit Ni^{2+} beladenen Form als 50 %ige Suspension in 30 % Ethanol erhalten.

Vorbereitung des Materials:

1. Waschen mit 5-fachem Volumen Wasser
2. Equilibrieren mit 5-fachem Volumen des Startpuffers (Puffer A)

Regeneration des Materials:

1. Waschen mit 2-fachem Volumen Regenerationspuffer (6 M Guanidinhydrochlorid, 0,2 M Essigsäure)
2. Waschen mit 5-fachem Volumen Wasser
3. Waschen mit 3-fachem Volumen einer 2%igen SDS-Lösung
4. Waschen mit einem Volumen 25%igen Ethanols
5. Waschen mit einem Volumen 50%igen Ethanols
6. Waschen mit einem Volumen 75%igen Ethanols
7. Waschen mit 5-fachem Volumen 100%igen Ethanols
8. Waschen mit einem Volumen 75%igen Ethanols
9. Waschen mit einem Volumen 50%igen Ethanols
10. Waschen mit einem Volumen 25%igen Ethanols
11. Waschen mit einem Volumen Wasser
12. Waschen mit 5-fachem Volumen 100 mM EDTA, pH 8,0
13. Waschen mit Wasser
14. Beladen des Materials mit 2-fachem Volumen 100 mM NiSO_2
15. Waschen mit 2-fachem Volumen Wasser
16. Waschen mit 2-fachem Volumen Regenerationspuffer
17. Equilibrieren mit 2-fachem Volumen Startpuffer

3.7.2 Temperaturoptimum

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums wurde die Phytaseaktivität einer Probe, die Phytase mit His-tag enthielt, bei verschiedenen Temperaturen gemessen. Dazu wurde der jeweilige Testansatz (s. 3.6.5) 30 min jeweils bei 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C, 42 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C und 70 °C inkubiert und anschließend die Aktivität wie in 3.6.5 beschrieben bestimmt. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.7.3 pH-Optimum

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurde die Phytaseaktivität einer Probe, die Phytase mit His-tag enthielt, bei verschiedenen pH-Werten gemessen. Dazu wurden verschiedene Puffer mit verschiedenen pH-Werten angesetzt:

pH 1,0; 2,0; 3,0	66 mM Glycin /HCl
pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5;6,0	0,25 M Na-Acetat / Essigsäure
pH 7,0; 8,0; 9,0	30 mM Tris / HCl

Der Testansatz wurde wie in 3.6.5 durchgeführt, außer daß für den je gewünschten pH-Wert der entsprechende Puffer eingesetzt wurde. Die Bestimmung der Phytaseaktivität erfolgte nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37 °C wie in 3.6.5 beschrieben. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.7.4 Bestimmung der spezifischen Aktivität

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität erfolgte über die Bestimmung des Proteingehaltes einer Probe, die Phytase mit His-tag enthielt. Dazu wurden drei verschiedene Methoden angewendet:

BCA-Test:

Die Bestimmung des Proteingehaltes einer Probe, die Phytase mit His-*tag* enthielt, erfolgte mit Hilfe des BCA-Tests. Die Durchführung erfolgte wie in 3.6.7 beschrieben.

Dr. Lange-Test:

Die Durchführung des Dr. Lange-Tests erfolgte wie in dem von der Firma Dr. Lange käuflichen Küvettentest angegeben (s. 3.6.6). Mit diesem Test ließ sich der Gesamt-Stickstoffgehalt einer Probe, die Phytase mit His-*tag* enthielt, messen. Dieser Wert wurde mit dem Faktor 5,65 multipliziert, um den Proteingehalt abzuschätzen. Der Faktor wurde mit Hilfe der Aminosäuresequenz berechnet und stellt das Verhältnis zwischen Stickstoffanteil und Gesamtprotein dar.

Proteinbestimmung über die optische Dichte:

Die Probe, die Phytase mit His-*tag* enthielt, wurde bei einer Absorption von 280 nm in einer Quarzküvette vermessen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Probe erfolgte wie in Kapitel 4.4.6 beschrieben.

Nachdem der Proteingehalt einer Probe, die Phytase mit His-*tag* enthielt, mit den oben angegebenen Methoden bestimmt worden war, wurde von der gleichen Probe die Aktivität, wie in Kapitel 3.6.5 beschrieben, gemessen. Daraus ließ sich die spezifische Aktivität von Phytase berechnen.

3.7.5 Bestimmung der Aktivierungsenergie nach Arrhenius

Zur Bestimmung der Aktivierungsenergie E_a wurden folgende Ansätze hergestellt: 20 μL Phytase-Lösung (Verdünnung 1:100), 380 μL Puffer und 720 μL Phytat-Lösung wurden bei 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C, 42 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C und 70 °C jeweils für insgesamt 35 min inkubiert. Nach 5 min wurden jeweils 560 μL entnommen, mit 240 μL Ammoniummolybdat-Lösung, 100 μL Reducer-Lösung

und 100 μL 5 M Schwefelsäure versetzt und anschließend die Absorption $A_{5\text{min}}$ bei 734 nm gegen Wasser gemessen. Nach weiterer 30 minütiger Inkubation bei der jeweiligen Temperatur wurde der verbliebene Teil der Probe auf die gleiche Weise aufgearbeitet und ergab den Wert $A_{35\text{min}}$. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die Berechnung der Phytaseaktivität für die jeweilige Temperatur erfolgte wie in Kapitel 3.6.5 beschrieben. Die Phytaseaktivitäten wurden in Prozent umgerechnet, wobei die höchste Phytaseaktivität gleich 100 % gesetzt wurde. Die Phytaseaktivitäten in % wurden gegen die Temperatur aufgetragen. Mit Hilfe des Programms Origin wurde eine nichtlineare Kurvenanpassung durchgeführt, um die Werte für die Aktivierungsenergie E_a und den präexponentiellen Faktor A zu berechnen.

3.7.6 K_M -Wert mit Phytat als Substrat

Um die Michaelis-Menten-Konstante K_M von Phytase-His₆ mit Phytat als Substrat zu bestimmen, wurden zuerst die Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt.

Benötigte Reagenzien:

Phytase-Lösung	41 kU/L (pH = 4,5)
Acetatpuffer	0,25 M Na-Acetat, pH 4,5
Na-Phytat	0,0177 mM bis 2,2700 mM Phytatkonzentrationen je Liter Acetatpuffer pH 4,5
Ammoniummolybdat-Lösung	s. 3.6.5
Reducerlösung	s. 3.6.5
Schwefelsäure	5 M

Durchführung:

Für jede Substratkonzentration wurde folgender Ansatz hergestellt: 100 µL Phytase-Lösung (Verdünnung der Probe 1:100), 1900 µL Puffer und 3600 µL Phytat-Lösung entsprechender Konzentration wurden bei 37 °C für insgesamt 50 min inkubiert. Es wurden alle 5 min jeweils 560 µL entnommen, mit 240 µL Ammoniummolybdat-Lösung, 100 µL Reducer-Lösung und 100 µL 5 M Schwefelsäure versetzt und anschließend die Absorption bei 734 nm gegen Wasser gemessen $A_{10 \text{ bis } 50 \text{ min}}$. Der erste Wert $A_{5 \text{ min}}$ diene als Nullwert.

Berechnung der entstandenen Phosphatkonzentration:

$$c_{\text{Phosphat}} [\text{mol} / \text{L}] = \frac{1}{\varepsilon} \cdot \Delta A \cdot f \quad \text{Gl. 20}$$

f = Verdünnungsfaktor der eingesetzten Phytase-Lösung

$$\varepsilon = 25,16 [\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$$

$$\Delta A = A_{10 \text{ bis } 50 \text{ min}} - A_{5 \text{ min}}$$

Die jeweils entstandene Phosphatkonzentration (entstandene Mole des Produkts) wurde gegen die Zeit aufgetragen. Bei kleinen Konzentrationen des entstandenen Produkts besteht eine lineare Abhängigkeit zu der Zeit. Aus diesen Werten wurde mittels linearer Regression die Steigung ermittelt. Sie entspricht der Reaktionsgeschwindigkeit.

Durch eine Auftragung der jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeiten V gegen die entsprechenden Substratkonzentrationen S lassen sich die Werte für K_M und V_{max} ableiten.

3.7.7 K_M -Wert mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat

Um die Michaelis-Menten-Konstante K_M von Phytase-His₆ mit p-Nitrophenylphosphat (pNPP) als Substrat zu bestimmen, wurden zuerst die Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt.

Benötigte Reagenzien:

Phytase-Lösung	10,9 kU/L (pH = 5,5)
Glycin / HCl-Puffer	250 mM Glycin, pH 2,5
p-Nitrophenylphosphat	8,75 mM bis 70,0 mM
NaOH	1 M

Prinzip des Tests:

Der Test beruht darauf, daß Phytase die Phosphatgruppe von p-Nitrophenylphosphat abspaltet. Dabei entstehen gleiche Mole an p-Nitrophenol und anorganischem Phosphat (Abb. 3.8).

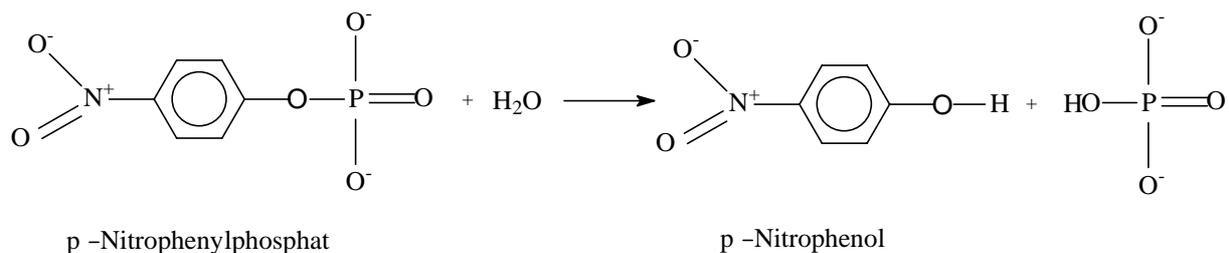


Abb. 3.8 Hydrolyse von pNPP zu p-Nitrophenol und anorganischem Phosphat.

Im Basischen dissoziiert die phenolische OH-Gruppe. Dabei entsteht ein delokalisiertes Elektronensystem, das die Färbung der Nitrophenolat-Lösung bewirkt (Abb. 3.9).

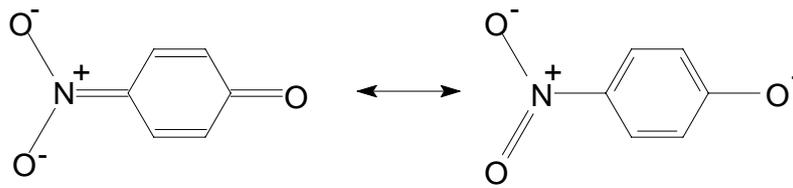


Abb. 3.9 Mesomeriestabilisierung des Nitrophenolatanions.

Durchführung:

Zur Durchführung des Tests wurden 595 μL Puffer und 25 μL Phytase-Lösung für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 7 μL pNPP-Lösung hinzugegeben. Nach weiteren 3 min wurden 100 μl entnommen und mit 900 μl NaOH versetzt. Anschließend wird bei einer Wellenlänge von 405 nm die Absorption gemessen. Dies ergab den Wert $A_{3\text{min}}$. Nach weiteren 2, 4, 6, 8, 10 und 15 min Inkubationszeit wurden jeweils 100 μl Probe entnommen, mit je 900 μL NaOH versetzt und bei einer Wellenlänge von 405 nm die Absorptionen gemessen. Dies ergab die Werte $A_{5 \text{ bis } 15 \text{ min}}$.

Eichgerade:

Zur Erstellung der Eichgeraden wurden 85 μL Puffer, 5 μL p-Nitrophenol-Lösung (pNP) und 10 μL pNPP-Lösung zusammengegeben. Dabei besaß die pNP-Lösung für die jeweiligen Testansätze folgende Konzentrationen: 0,04, 0,03, 0,02, 0,01 und 0,004 mmol/L. Anschließend wurde zu jedem Testansatz 900 μL NaOH gegeben und bei einer Wellenlänge von 405 nm die Absorption gemessen. Durch Auftragen der Absorption gegen die Konzentration von pNP ergab sich eine Gerade. Mittels linearer Regression ließ sich die Steigung und daraus der Absorptionskoeffizient ε ermitteln.

Berechnung der umgesetzten Konzentration an p-Nitrophenolat:

$$c_{p\text{-Nitrophenolat}} [\text{mol} / \text{L}] = \frac{1}{\varepsilon} \cdot \Delta A \cdot f \quad \text{Gl. 21}$$

f = Verdünnungsfaktor der eingesetzten Phytase-Lösung

$$\varepsilon = 10060 [\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$$

$$\Delta A = A_{5 \text{ bis } 15 \text{ min}} - A_{3 \text{ min}}$$

Die jeweils entstandene Konzentration an p-Nitrophenolat wurde gegen die Zeit aufgetragen. Bei kleinen Konzentrationen des entstandenen Produkts besteht eine lineare Abhängigkeit zu der Zeit. Aus diesen Werten wurde mittels linearer Regression die Steigung ermittelt. Sie entspricht der jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeit.

Durch eine Auftragung der jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeiten V gegen die entsprechenden Substratkonzentrationen S lassen sich die Werte für K_M und V_{\max} ableiten.

4 Ergebnisse und Diskussion

Dieses Kapitel ist in vier Abschnitte gegliedert. Die ersten drei Teile befassen sich mit dem Ziel, durch Variation von Kultivierungsparametern eine möglichst hohe Phytaseaktivität im Medium zu erreichen. Im ersten Teil werden verschiedene Faktoren analysiert, die die Expression und die Sekretion der Phytase beeinflussen. Im zweiten Teil werden Satzkultivierungen der Stämme *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 und *E. coli* BL21(DE3)pPhyt148 vorgestellt und diskutiert. Im dritten Teil wird gezeigt, daß es möglich ist, die Phytaseaktivität im Überstand durch Zulaufkultivierungen des Stammes *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 im Vergleich zu Satzkultivierungen zu erhöhen. Außerdem werden verschiedene Zulaufstrategien vorgestellt. Der vierte Teil befaßt sich mit den enzymatischen Eigenschaften der aufgereinigten Phytase-His₆.

4.1 Einfluß verschiedener Faktoren auf die Expression und Sekretion von Phytase

Um den Einfluß verschiedener Faktoren auf Expression und Sekretion der Phytase zu testen, wurden von Miksch *et al.* (2002) verschiedene Stämme konstruiert, die alle die Sekretionskassette und verschiedene Promotoren, die mit dem Phytasegen fusioniert waren, enthielten. Untersucht wurde der Einfluß der Lokalisation der Sekretionskassette und der Einfluß der verschiedenen Promotoren auf die Expression und die Sekretion von Phytase. Außerdem wurde der Einfluß der Medienzusammensetzung auf die Sekretion der Phytase untersucht.

4.1.1 Einfluß der Lokalisation der Sekretionskassette auf die Expression und Sekretion von Phytase

Für die Lokalisierung der Sekretionskassette sind zwei Möglichkeiten realisiert worden:

- Stabile Integration der Kasette ins Bakterienchromosom und Lokalisierung des Phytasegens auf einem *multi-copy*-Plasmid (*E. coli* BL21(DE3)sec pPhyt106)
- Lokalisierung der Kasette auf dem *multi-copy*-Plasmid, welches das Phytasegen enthält (*E. coli* BL21(DE3)pPhyt109)

Für die Integration der Kasette ins Chromosom wurde von Miksch & Flaschel (2001) ein genetisches Verfahren entwickelt, bei dem die Kasette spezifisch in das *lacZ*-Gen von *E. coli* integriert wurde.

Um die Effektivität der Sekretion der Phytase der beiden o. g. Stämme miteinander zu vergleichen, wurden Schüttelkolbenkulturen beider Stämme angesetzt. In einem 300 mL Schüttelkolben ohne Schikanen wurden 30 mL TB-Medium mit einem Petrischalenabstrich des Stammes *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 angeimpft und bei 37 °C mit einer Schüttelfrequenz von 175 min^{-1} (Durchmesser der Auslenkung 25 mm) für ca. 35 h inkubiert. Als Antibiotikum diente Kanamycin ($50 \mu\text{g/mL}$). Der Stamm *E. coli* BL21(DE3)sec pPhyt106 wurde auf die gleiche Weise behandelt.

Abb. 4.1 zeigt den Verlauf der Kultivierung im Schüttelkolben mit dem Stamm *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109.

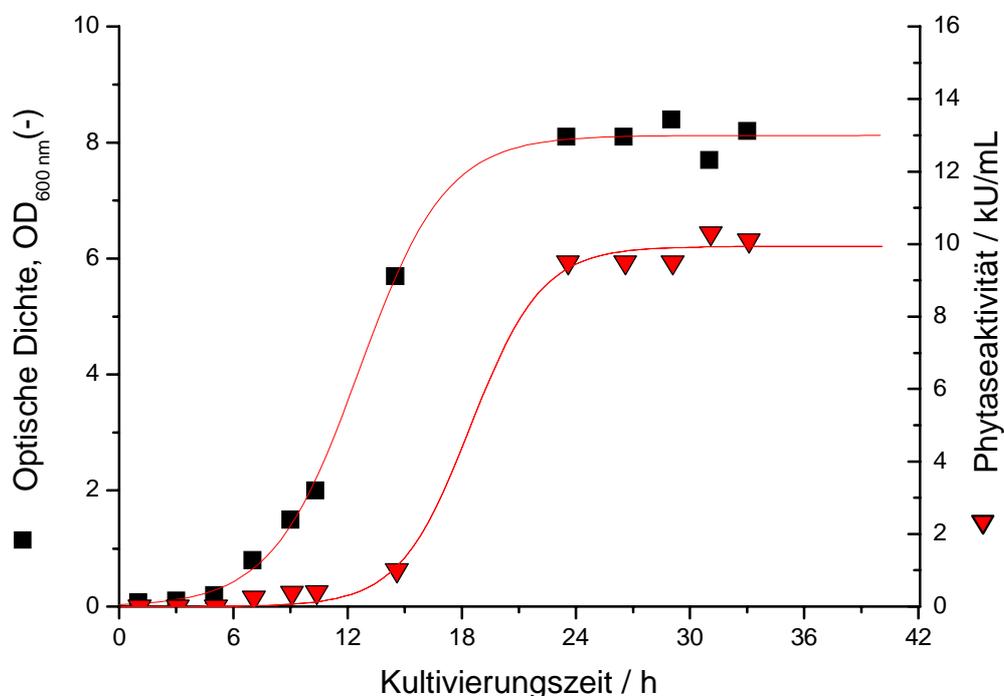


Abb. 4.1 Verlauf der Kultivierung im Schüttelkolben von *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109.

Mit Hilfe des Programms Origin wurde eine nichtlineare Kurvenanpassung sowohl an die Wachstumskurve als auch an die Phytaseaktivitätskurve vorgenommen. Gl. 22 beschreibt das Modell, nach dem die nichtlineare Kurvenanpassung erfolgte.

$$\phi = \frac{\phi_0}{(1 - \phi_0) \exp\left(-\frac{Da_{1,1}}{1 - \phi_0}\right) + \phi_0} \quad \text{Gl. 22}$$

$Da_{1,1}$ = Damköhlerzahl erster Art für den Grenzfall einer Reaktion erster Ordnung mit

$$Da_{1,1} = \frac{t}{\tau}$$

Das in Gl. 22 dargestellte Modell beruht auf dem Satzreaktormodell für Wachstum von Mikroorganismen und beschreibt den Grenzfall für Fermentation mit schlechtem Substrat in der Monod-Kinetik. Dieses Modell entspricht auch dem logistischen Modell (s. Gl. 12).

Für die Wachstumskurve wurde für ϕ_0 ein Wert von 0,004, für den maximalen OD-Wert ein Wert von 8,1 und für τ ein Wert von $\tau_{OD} = 2,3$ h berechnet. Die charakteristische Zeit beträgt 12 h. Die charakteristische Zeit für die OD ist der Zeitpunkt zu dem 50 % der Biomasse gebildet worden sind.

Für die Kurve der Phytaseaktivität wurde für ϕ_0 ein Wert von 0,00005, für den maximalen Wert der Phytaseaktivität ein Wert von 9,9 kU/L und für τ ein Wert von $\tau_{\text{Phytase}} = 1,8$ h berechnet. Die charakteristische Zeit beträgt 18 h. Die charakteristische Zeit für die Bildung von Phytase ist der Zeitpunkt zu dem 50 % der Phytase gebildet worden sind.

Abb. 4.2 zeigt den Verlauf der Kultivierung im Schüttelkolben mit dem Stamm *E. coli* BL21(DE3)sec pPhyt106.

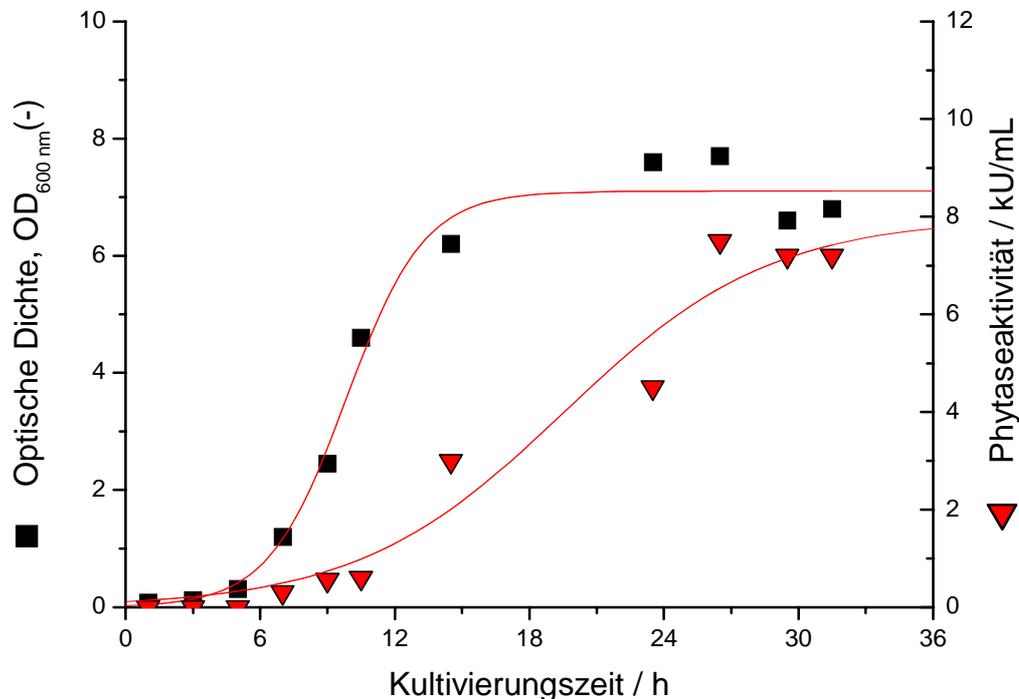


Abb. 4.2 Verlauf der Kultivierung im Schüttelkolben von *E. coli* BL21(DE3)sec pPhyt106.

Mit Hilfe des Programms Origin wurde eine nichtlineare Kurvenanpassung (s. Gl. 22) sowohl an die Wachstumskurve als auch an die Phytaseaktivitätskurve vorgenommen. Für die Wachstumskurve wurde für ϕ_0 ein Wert von 0,0034, für den maximalen OD-Wert ein Wert von 7,1 und für τ ein Wert von $\tau_{OD} = 1,7$ h berechnet. Die charakteristische Zeit beträgt 9,5 h. Für die Kurve der Phytaseaktivität wurde für ϕ_0 ein Wert von 0,014, für den maximalen Wert der Phytaseaktivität ein Wert von 7,9 kU/L und für τ ein Wert von $\tau_{Phytase} = 4,6$ h berechnet. Die charakteristische Zeit beträgt 19,5 h.

Ein Vergleich von Abb. 4.1 und Abb. 4.2 zeigt, daß der Stamm bei dem die Sekretionskassette auf dem Plasmid lokalisiert ist (*E. coli* BL21(DE3)pPhyt109) eine höhere Sekretion zeigt als der Stamm, bei dem die Sekretionskassette auf dem Chromosom lokalisiert ist (*E. coli* BL21(DE3)sec pPhyt106). Befindet sich die Sekretionskassette auf dem Expressionsvektor, so liegt sie in vielen Kopien vor, deren Anzahl von der Anzahl der Plasmide abhängt. Damit liegt das *kil*-Gen ebenfalls in vielen Kopien vor und trägt so zu einer erhöhten Sekretionsleistung bei.

4.1.2 Expression und Sekretion der Phytase unter dem Einfluß verschiedener Promotoren

Um den Einfluß verschiedener Promotoren auf die Phytaseausbeute zu untersuchen, wurden folgende Promotoren mit dem Phytasegen fusioniert:

- P_{lac} (Promotor vom *lacZ*-Gen von *E. coli*)
- P_{T7} (Promotor des Phagen T7)
- P_{tac} (synthetischer Fusionspromotor von *E. coli*)
- P_{tetA} (Promotor vom Tetracyclin A-Gen von *E. coli*)
- P_{bglA} (Promotor vom β -Glucanasegen von *Bacillus amyloliquefaciens*).

Für jeden Stamm wurde eine Kultivierung im Schüttelkolben folgendermaßen angesetzt:

In einem 300 mL Schüttelkolben ohne Schikanen wurden 30 mL TB-Medium mit einem Petrischalenabstrich des Stammes *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 mit dem jeweiligen Promotor angeimpft und bei 37 °C mit einer Schüttelfrequenz von 175 min⁻¹ (Durchmesser der Auslenkung 25 mm) für ca. 35 h inkubiert. Als Antibiotikum diente Kanamycin (50 µg/mL). Anschließend wurde die Phytaseaktivität im Medium und im Periplasma wie in 3.6.5 beschrieben bestimmt.

Abb. 4.3 zeigt die Phytaseaktivität im Periplasma und im Medium für den Stamm *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 mit dem entsprechenden Promotor.

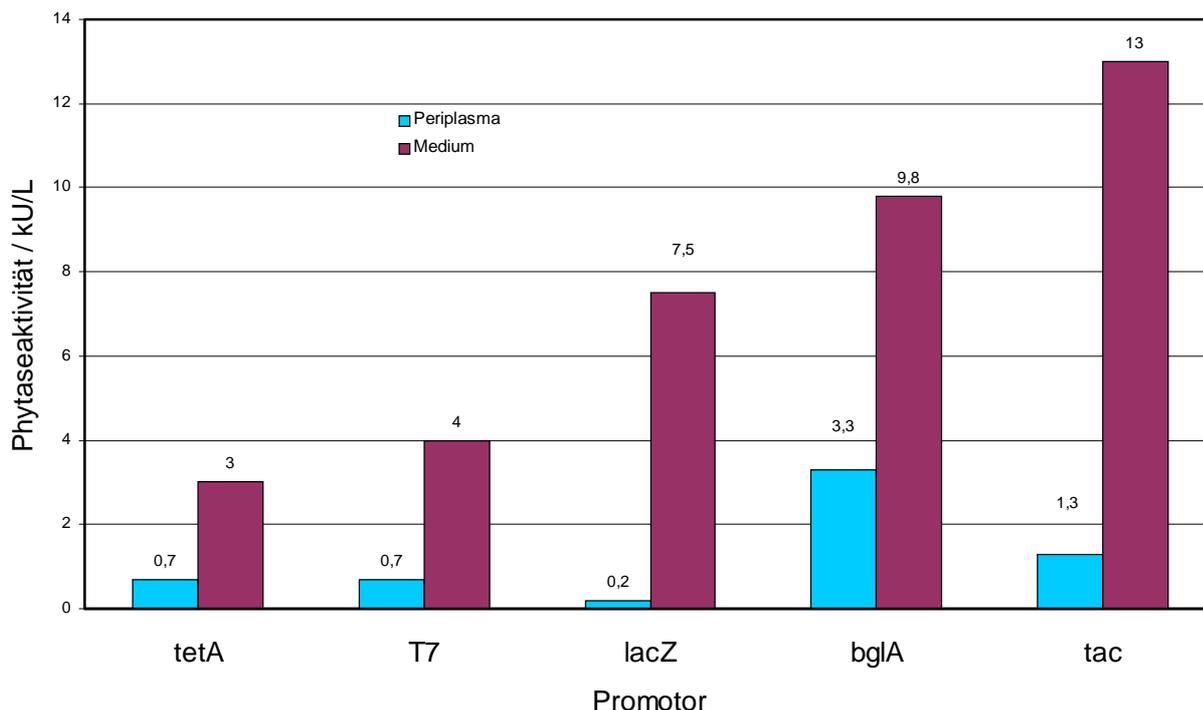


Abb. 4.3 Phytaseaktivität im Periplasma und Medium bei dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pPhyt109 in Abhängigkeit vom Promotor.

Bei allen Stämmen wurde der überwiegende Teil der produzierten Phytase ins Kulturmedium sekretiert (75 % beim *bglA*-Promotor und 90 % beim *tac*-Promotor). Der *tac*-Promotor und der *bglA*-Promotor zeigen die höchste extrazelluläre Phytaseproduktion, wohingegen der *tetA*-, der T7- und der *lacZ*-Promotor deutlich geringere Phytaseaktivität im Überstand zeigen. Der *bglA*-Promotor besitzt zwar eine etwas geringere extrazelluläre Phytaseproduktion als der *tac*-Promotor, hat aber für eine industrielle Anwendung den Nachteil, daß er mit IPTG induziert werden muß. Dies bedeutet, daß bei einer Verwendung in der industriellen Praxis in einem zusätzlichen Arbeitsgang das teure Induktionsreagenz zugegeben werden müßte und sich dadurch die Prozeßkosten erhöhen würden. Deshalb wurde für alle weiteren Experimente der Expressionsvektor mit dem *bglA*-Promotor verwendet.

4.1.3 Einfluß der Medienzusammensetzung auf die Sekretion von Phytase

Folgende Versuche wurden durchgeführt, um einen Einfluß auf die Sekretion von Phytase durch eine Veränderung der Medienzusammensetzung zu untersuchen.

In je einem 300 mL Schüttelkolben ohne Schikanen wurden 30 mL Medium verschiedener Zusammensetzung mit einem Petrischalenabstrich des Stammes *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 mit dem *bglA*-Promotor angeimpft und bei 37 °C mit einer Schüttelfrequenz von 175 min⁻¹ (Durchmesser der Auslenkung 25 mm) für ca. 48 h inkubiert. Als Antibiotikum diente Kanamycin (50 µg/mL). Anschließend wurde die Phytaseaktivität im Medium, wie in 3.6.5 beschrieben, bestimmt.

Folgende Medien wurden eingesetzt (Tab. 4.1):

Tab. 4.1 Eingesetzte Medien und ihre Zusammensetzung.

Eingesetzte Medien	Zusammensetzung der Medien
Medium nach Riesenberg	s. 3.4.1
Medium nach Riesenberg mit Aminosäuregemisch und Vitamingemisch	30 mL Riesenberg-Medium, 2 mL Aminosäurelösung und 30 µL Vitaminlösung
Medium nach Riesenberg mit Melasse	30 mL Riesenberg-Medium und 1 mL Melasse
TB-Medium	s. 3.4.1

In Tab. 4.2 sind die Phytaseaktivitäten nach Kultivierung in Medien verschiedener Zusammensetzung dargestellt.

Tab 4.2 Phytaseaktivitäten nach Kultivierung in Medien verschiedener Zusammensetzung.

	Medium nach Riesenberg	Medium nach Riesenberg mit Aminosäuregemisch und Vitamingemisch	Medium nach Riesenberg mit Melasse	TB-Medium
Phytaseaktivität in kU/L	0,3	0,7	8,2	8,5

Es besteht ein deutlicher Unterschied in der Phytaseausbeute im Medium bei Einsatz eines Vollmediums bzw. eines halbsynthetischen Mediums im Vergleich zur Verwendung eines synthetischen Mediums. Eine Kultivierung in einem synthetischen Medium zeigt kaum extrazelluläre Phytaseproduktion. Auch eine Zugabe von Aminosäuren und Vitaminen zum Kultivierungsmedium zeigte keine Sekretion von Phytase. Allerdings scheint die Zugabe eines natürlichen Produktes wie Melasse bzw. die Verwendung eines Vollmediums die extrazelluläre Phytaseproduktion deutlich zu erhöhen.

4.2 Satzkultivierungen der Stämme *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 und *E. coli* BL21(DE3)pPhyt148 im 7 L-Bioreaktor

Der Stamm *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 mit dem *bglA*-Promotor wurde aufgrund der in Kapitel 4.1 beschriebenen Ergebnisse für weitere Versuche ausgewählt. Es sollten die Fragen beantwortet werden, ob sich die im vorherigen Kapitel beschriebenen Schüttelkolbenkultivierungen des Stammes *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 in TB-Medium und im synthetischen Medium nach Riesenberg auf einen größeren Maßstab übertragen lassen und ob dadurch eine Steigerung der extrazellulären Phytaseproduktion erreicht werden kann.

Eine weitere Steigerung der extrazellulären Phytaseproduktion konnte durch Satzkultivierung des Stammes *E. coli* BL21(DE3)pPhyt148 in TB-Medium erzielt werden. Es wurden verschiedene Kultivierungsparameter variiert, um optimale Phytaseausbeuten bei der Satzkultivierung in TB-Medium zu erreichen.

4.2.1 Satzkultivierungen von *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 in TB-Medium und in einem Glucose-Mineral-Salz-Medium nach Riesenberg

Es wurden zwei der in Kapitel 4.1.3 beschriebenen Schüttelkolbenkultivierungen auf einen größeren Maßstab übertragen. Dazu wurden zwei Satzkultivierungen im 7 L-Bioreaktor durchgeführt. Abb. 4.4 zeigt die Kultivierung des Stammes *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 in TB-Medium und Abb. 4.5 zeigt die Kultivierung des gleichen

Stammes im Glucose-Mineralsalz-Medium nach Riesenberg. Die Vorkultur wurde jeweils in TB-Medium angezüchtet. Beide Vorkulturen befanden sich bei Animpfen des 7 L-Fermenters in der stationären Phase. Beide Kultivierungen erfolgten bei 37 °C, einem Reaktorinnendruck von 0,2 bar und einem pH von 6,9. Das pH wurde durch eine 10 %ige ortho-Phosphorsäure und eine 2 N Natronlauge als Korrekturmittel auf den angegebenen Sollwert geregelt. Antischaummittel wurde bei Bedarf manuell hinzugegeben. Die Begasung des Mediums mit Druckluft erfolgte mit einem Volumenstrom von 5 L min⁻¹ (1 vvm). Die Rührerdrehfrequenz betrug konstant $n = 1000 \text{ min}^{-1}$. Als Analyseparameter wurden die Biotrockenmasse, die optische Dichte (OD_{600 nm}) und die Phytaseaktivität in der Gesamtprobe und im Überstand untersucht.

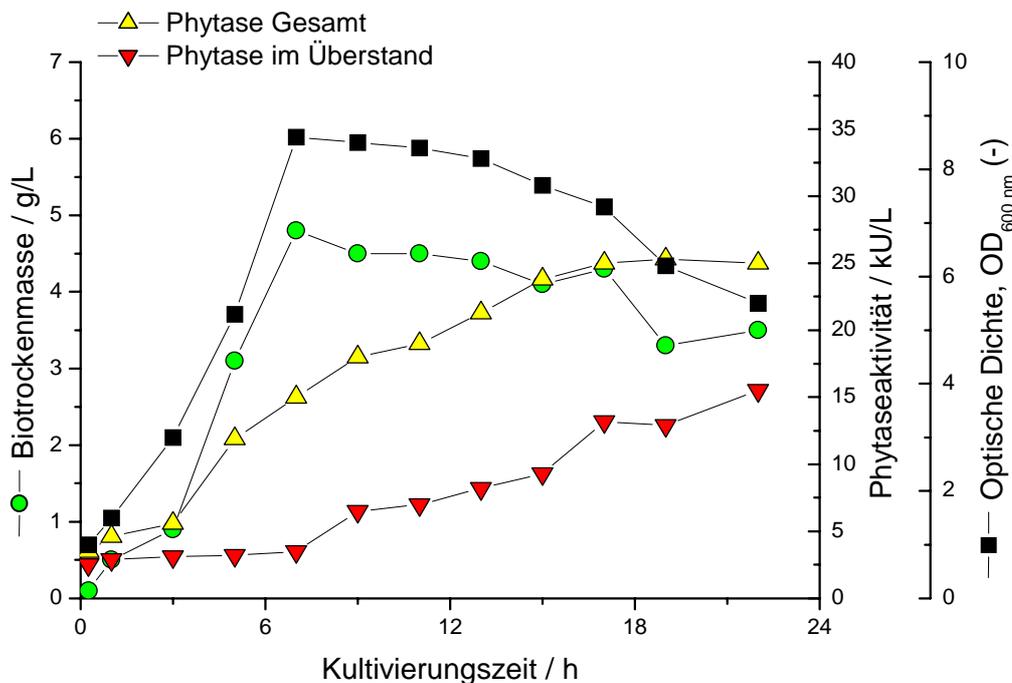


Abb. 4.4 Satzkultivierung im Bioreaktor von 3 L Arbeitsvolumen von *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 in TB-Medium.

Abb. 4.4 zeigt, daß in etwa 15 kU/L in das Kulturmedium sekretiert worden sind. Die Sekretion begann nach 9 h Kultivierungszeit. Zu diesem Zeitpunkt nahmen optische Dichte und Biotrockenmasse nicht mehr zu, da die stationäre Wachstumsphase begonnen hatte. Die Gesamtphytaseproduktion (sichtbar an der Aktivitätskurve für die Gesamtprobe) setzte nach ca. 5 h ein und endete nach ca. 16 h. Es wurden 60 % der gesamten Phytase sekretiert. Ein Vergleich mit den Ergebnissen aus Tab. 4.1

zeigt, daß fast die doppelte Phytaseaktivität bei Kultivierung im Fermenter als bei Kultivierung im Schüttelkolben erreicht wurde. Es ist also möglich, unter Fermentationsbedingungen in einem Bioreaktor die Phytaseausbeute zu erhöhen.

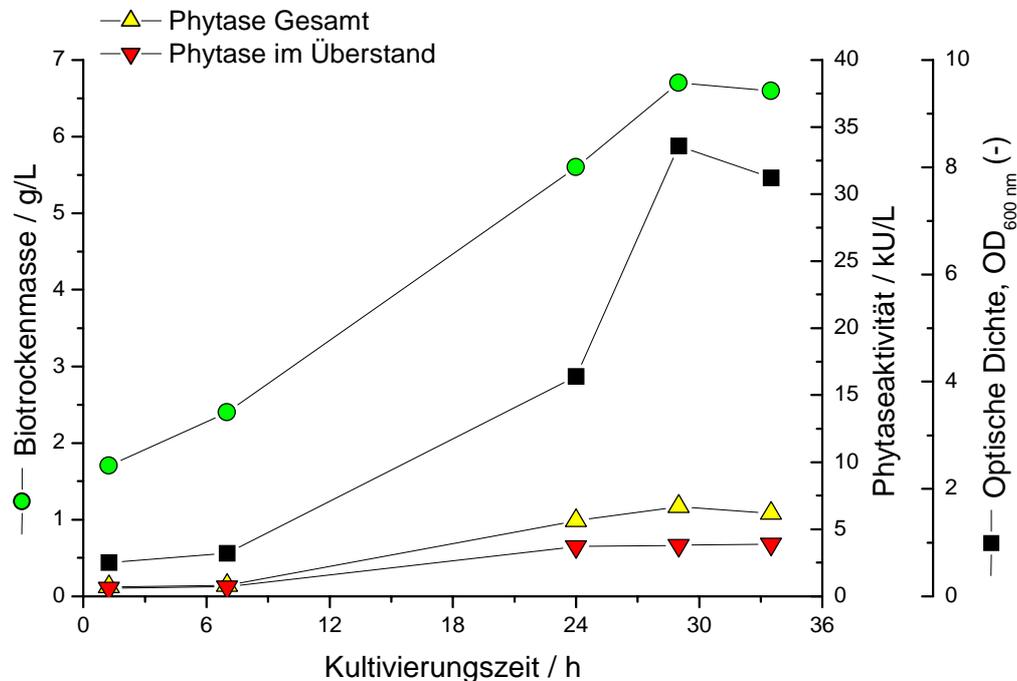


Abb. 4.5 Satzkultivierung im 3 L-Arbeitsvolumen von *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 in Glucose-Mineralsalz-Medium nach Riesenberg.

In Abb. 4.5 läßt erkennen, daß die Phytaseaktivität im Überstand gegen Ende der Fermentation einen Wert von 3,9 kU/L erreicht. Die Sekretion begann, bevor das Wachstum der Zellen in die stationäre Phase eintrat und betrug am Ende der Fermentation 63 %. Dieser Wert ist vergleichbar mit dem Wert, der sich bei der Kultivierung in TB-Medium ergab.

Ein Vergleich mit den Ergebnissen aus Tab. 4.2 zeigt, daß auch bei Kultivierung im Glucose-Mineralsalz-Medium nach Riesenberg fast die doppelte Phytaseaktivität bei Kultivierung im Fermenter als bei Kultivierung im Schüttelkolben erreicht wurde. Es ist also möglich, unter Fermentationsbedingungen in einem Bioreaktor die Phytaseausbeute zu erhöhen.

Ein Vergleich von Abb. 4.4 und Abb. 4.5 zeigt, daß bei Kultivierung im 3 L-Arbeitsvolumen im Glucose-Mineralsalz-Medium nach Riesenberg deutlich weniger Phytase produziert und sekretiert wurde als bei Kultivierung in TB-Medium.

Somit konnten die Ergebnisse aus Kapitel 4.1.3 in einem größeren Maßstab als dem der Schüttelkolbenversuche bestätigt werden.

4.2.2 Satzkultivierungen von *E. coli* BL21(DE3)pPhyt148 in TB-Medium

Um eine Steigerung der extrazellulären Phytaseproduktion zu erzielen, wurde ein weiterer Stamm (*E. coli* BL21(DE3)pPhyt148) konstruiert. Er enthielt nicht nur vor dem Phytasegen den *bglA*-Promotor, sondern auch in der Sekretionskassette vor dem *kil*-Gen und eignet sich somit, den Einfluß eines konstitutiven Promotors auf die Sekretion der Phytase zu testen. Es sollten Schüttelkolbenkultivierungen auf einen größeren Maßstab übertragen werden. Weiterhin wurde der Einfluß verschiedener Kultivierungsparameter auf die extrazelluläre Phytaseproduktion untersucht.

In einem 300 mL Schüttelkolben mit Schikanen wurden 30 mL TB-Medium mit einem Petrischalenabstrich des Stammes *E. coli* BL21(DE3)pPhyt148 angeimpft und bei 37 °C mit einer Schüttelfrequenz von 175 min⁻¹ (Durchmesser der Auslenkung 25 mm) für 48 h inkubiert. Als Antibiotikum diente Kanamycin (50 µg/mL). Anschließend wurden die Phytaseaktivität im Medium wie in 3.6.5 beschrieben und die optische Dichte bestimmt. Dabei wurden eine optische Dichte von 10 und eine Phytaseaktivität von 65,8 kU/L gemessen. Ein Vergleich mit einer Schüttelkolbenkultivierung des Stammes *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 in TB-Medium zeigt, daß mit dem Stamm *E. coli* BL21(DE3)pPhyt148 eine ca. 7-fach höhere Phytaseaktivität im Überstand erreicht wurde.

Es sollte der Schüttelkolbenmaßstab auf einen größeren Maßstab übertragen werden. Dazu wurden Satzkultivierungen im 30 L-Bioreaktor durchgeführt. Alle Vorkulturen wurden in TB-Medium angezüchtet und befanden sich beim Animpfen des 30 L-Fermenters in der stationären Phase. Die Kultivierungen erfolgten in 20 L TB-Medium bei 37 °C, einem Reaktorinnendruck von 0,2 bar und einem pH von 7,2. Das pH wurde durch eine 10%ige ortho-Phosphorsäure und eine 2 N Natronlauge als Korrekturmittel auf den angegebenen Sollwert geregelt. Antischaummittel wurde bei Bedarf manuell hinzugegeben. Die Begasung des Mediums mit Druckluft erfolgte mit einem Volumenstrom von 10 L min⁻¹. Als Analyseparameter wurden nach 24 h die optische Dichte (OD_{600 nm}) und die Phytaseaktivität im Überstand untersucht.

Die Satzkultivierungen wurden in Abhängigkeit von der Rührerdrehfrequenz durchgeführt. Dazu wurde die Rührerdrehfrequenz variiert: Folgende Einstellungen der Rührerdrehfrequenz wurden während der jeweiligen Kultivierung konstant gehalten: $n = 200 \text{ min}^{-1}$; $n = 500 \text{ min}^{-1}$. Als weitere Möglichkeit wurde die Rührerdrehfrequenz als Kaskade der Sauerstoffsättigung geregelt, so daß ein konstanter Wert für die Sauerstoffsättigung von $pO_2 = 10 \%$ während der Fermentation eingehalten werden konnte. Tab. 4.3 zeigt eine Zusammenfassung der Kultivierungsbedingungen, den entsprechenden Phytaseaktivitäten und der optischen Dichte nach 24 h Kultivierungszeit.

Tab. 4.3 Kultivierungsbedingungen, Phytaseaktivitäten und optische Dichte für die Fermentationen mit dem Stamm *E. coli* BL21(DE3)pPhyt148.

Regelung des Rührers	Regelung des pH	OD	Phytaseaktivität / kU/L
Kaskade von pO_2	konstant	26,1	10,2
$n = 200$	konstant	7,5	10,0
$n = 500$	konstant	7,2	11,0
$n = 200$	keine Regelung	6,1	46,3
$n = 500$	keine Regelung	19,5	67,9

Die Phytaseaktivitäten in Tab. 4.3 zeigen, daß nur die Kultivierungen, bei denen keine pH-Regelung angewendet wurde, einen Wert erreichen, der mit der oben beschriebenen Schüttelkolbenkultivierung vergleichbar ist. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß die extrazelluläre Konzentration an Phytase von der Regelung des Rührers und damit vom Sauerstoffeintrag unabhängig ist, da keine Erhöhung der Phytaseaktivität durch Veränderung der Rührerregelung erreicht wurde. Abb. 4.6 zeigt den Verlauf der Sauerstoffsättigung und des pH in Abhängigkeit der Kultivierungszeit. Der Rührer wurde bei einer Rührerdrehfrequenz von $n = 500 \text{ min}^{-1}$ konstant gehalten. Die Phytaseaktivität betrug nach 24 h 67,9 kU/L. Der Verlauf des pH in Abb. 4.6 zeigt, daß in den ersten 4 h des Wachstums das pH durch den Phosphatpuffer, der sich im TB-Medium befindet, konstant gehalten wurde. Anschließend sank das pH und erreichte seinen niedrigsten Wert. Die Sauerstoffsättigungskurve zeigt ebenfalls zu diesem Zeitpunkt ihren tiefsten Wert. Anschließend stieg sowohl die Sauerstoffsättigung als auch das pH wieder an.

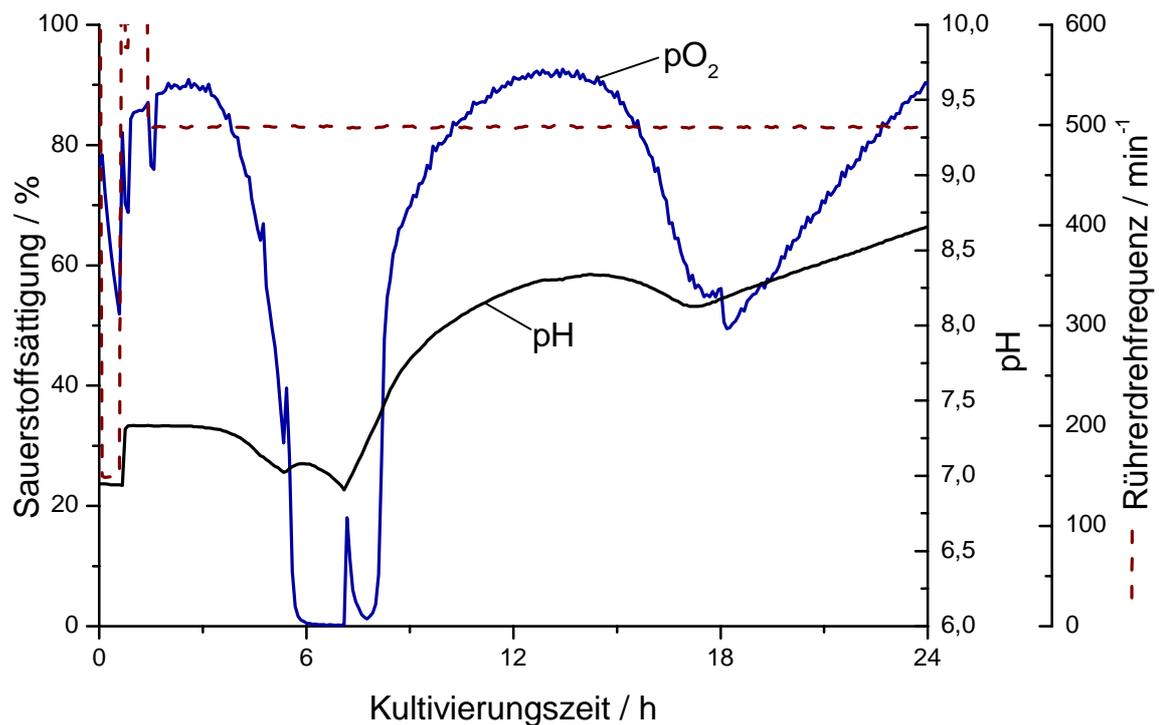


Abb. 4.6 Kultivierung des Stammes *E. coli* BL21(DE3)pPhyt148 im 30 L-Bioreaktor ohne pH-Regelung.

Weitere Schüttelkolbenversuche wurden durchgeführt, um die bei den Satzkultivierungen im 30 L-Bioreaktor festgestellte Abhängigkeit der extrazellulären Phytaseproduktion vom pH näher zu untersuchen. Dazu wurden in einem 300 mL Schüttelkolben mit Schikanen 30 mL TB-Medium mit einem Petrischalenabstrich des Stammes *E. coli* BL21(DE3)pPhyt148 angeimpft und bei 37 °C mit einer Schüttelfrequenz von 175 min⁻¹ (Durchmesser der Auslenkung 25 mm) für 48 h inkubiert. Als Antibiotikum diente Kanamycin (50 µg/mL). Anschließend wurde die Phytaseaktivität im Medium, wie in 3.6.5 beschrieben, bestimmt. Das pH des TB-Mediums wurde auf folgende Werte eingestellt: 6,9; 7,0; 7,2; 7,4; 7,6; 7,8. Abb. 4.7 zeigt eine Auftragung der Phytaseaktivität im Überstand nach 48 h Kultivierungszeit gegen das Ausgangs-pH des Mediums.

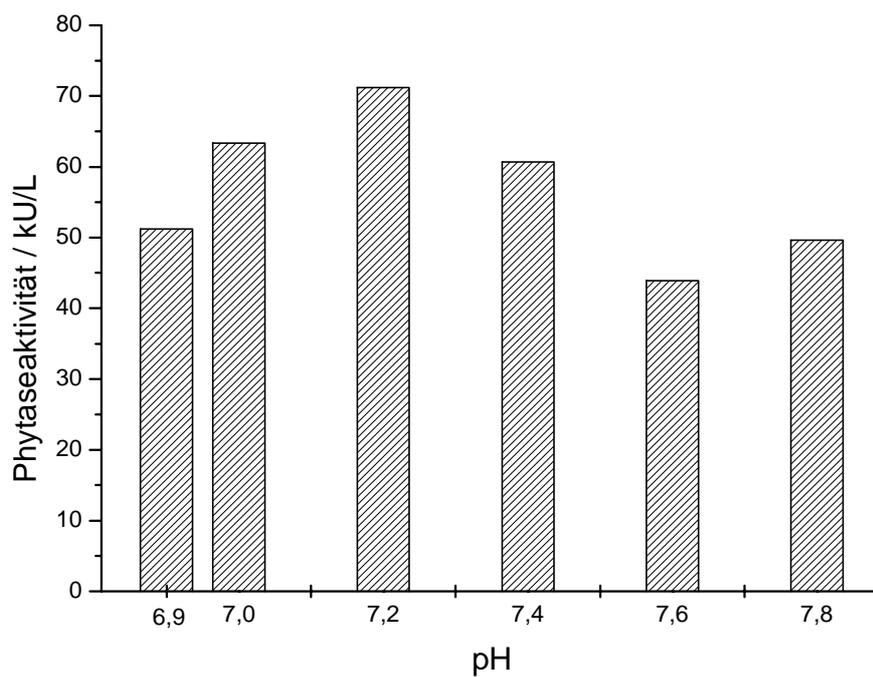


Abb. 4.7 Phytaseaktivitäten im Überstand bei verschiedenem Ausgangs-pH im Medium.

Abb. 4.7 zeigt, daß die höchste extrazelluläre Phytaseproduktion bei einem Ausgangs-pH im Medium von 7,2 erreicht wurde.

4.3 Strategien zur Regelung von Zulaufkultivierungen des Stammes *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109

In diesem Kapitel sollen verschiedene Regelungsstrategien von Zulaufkultivierungen des Stammes *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 vorgestellt und miteinander verglichen werden. Dabei soll untersucht werden, welchen Einfluß die verschiedenen Kultivierungsstrategien auf die Expression und Sekretion der Phytase ausüben. In Zusammenarbeit mit dem TCI Hannover (M. Arndt, B. Hitzmann) wurden Zulaufkultivierungen durchgeführt, bei denen die Zufütterung in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration im Medium mit dem FIA-System geregelt wurde. Eine andere Strategie wird beschrieben, bei der die Zufütterung in Abhängigkeit von der Sauerstoffsättigung im Medium geregelt wurde.

4.3.1 Zulaufkultivierung mit Regelung des Zulaufs durch das FIA-System

Mit Hilfe des FIA-Systems (s. 3.5.2) wurde während der Kultivierung die Zufütterung einer Glucoselösung so geregelt, daß die Glucosekonzentration im Medium auf einen bestimmten Sollwert konstant gehalten wurde. Es soll untersucht werden, ob eine Steigerung der Phytaseausbeute im Medium durch das Einhalten eines bestimmten Sollwertes der Glucosekonzentration im Medium erreicht werden kann. Die Kultivierungsbedingungen wurden bei allen Fermentationen wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben eingehalten. Die Glucosekonzentration der Glucosezufütterlösung betrug 500 g/L. Der Sollwert für die Glucosekonzentration im Medium wurde jeweils auf 0,1 g/L, 0,2 g/L und 0,3 g/L konstant gehalten.

Als Analyseparameter wurden die Biotrockenmasse, die optische Dichte, die Phytaseaktivität im Medium und in der Gesamtprobe, die Glucose- und die Acetatkonzentration im Medium untersucht. Dazu wurden Proben der Kulturlösung im Abstand von 0,5 bis 2 Stunden entnommen (*off-line*-Proben). Zusätzlich wurde die vom FIA-System berechnete Biotrockenmasse und die vom FIA-System gemessene Glucosekonzentration betrachtet.

Einhalten verschiedener Sollwerte für die Glucosekonzentration im Medium im Vergleich

Zulaufkultivierung mit einem Sollwert von 0,3 g/L

Abb. 4.8 zeigt eine Zulaufkultivierung, bei der die Glucosekonzentration im Medium bei 0,3 g/L konstant gehalten wurde.

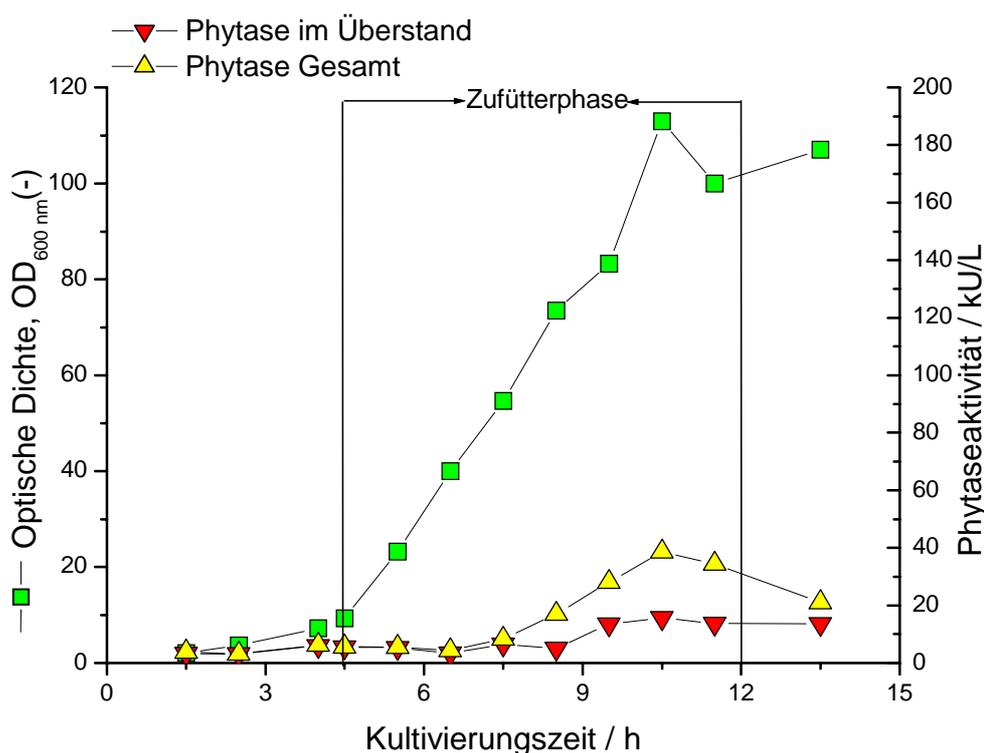


Abb. 4.8 Verlauf der Zulaufkultivierung mit Regelung der Glucosekonzentration im Medium auf 0,3 g/L.

Abb. 4.8 zeigt den Verlauf der Phytaseaktivität während der Kultivierung. Die Phytaseaktivität erreichte einen Wert von 15 kU/L im Medium. Die optische Dichte betrug gegen Ende der Fermentation 107. Die Sekretion der Phytase erfolgte zu ca. 50 % parallel zum Wachstum der Zellen.

Abb. 4.9 zeigt den Verlauf der Biotrockenmasse und der Glucosekonzentration während der Kultivierung. Die *off-line* gemessenen Biotrockenmassen lagen während der Zufütterphase etwas höher als die von dem FIA-System geschätzten und erreichten gegen Ende der Fermentation einen Wert von 30 g/L. Die *off-line*

gemessenen Glucosekonzentrationen lagen während der Zufütterphase unter den vom FIA-System gemessenen. Dieses lag daran, daß die Zellen trotz vorgekühltem Probenahmegefäß zwischen Probenahme und Glucosemessung Glucose verbraucht hatten.

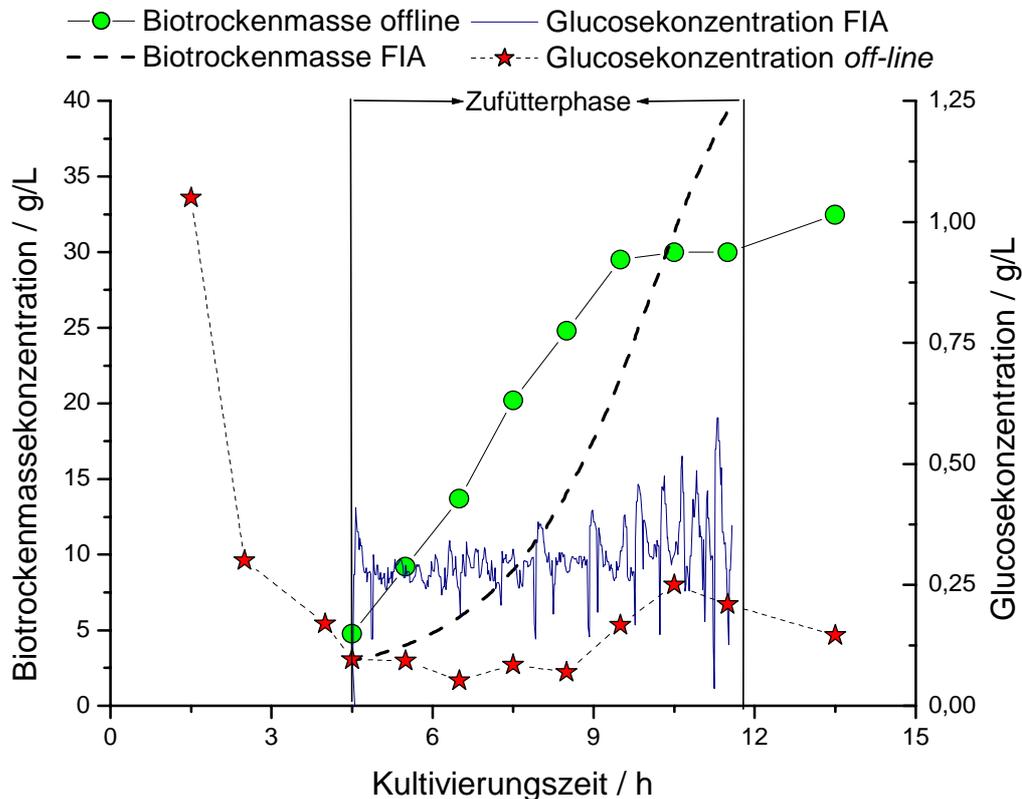


Abb. 4.9 Verlauf der Zulaufkultivierung mit Regelung der Glucosekonzentration im Medium auf 0,3 g/L.

Die Zufütterung wurde nach 4,5 h gestartet. Zu diesem Zeitpunkt entsprach die Glucosekonzentration im Medium etwa dem gewünschten Sollwert von 0,3 g/L. Die vom FIA-System gemessene Glucosekonzentration schwankte um den Wert von 0,3 g/L. Zwischen 4,5 h und 9 h konnte der gewünschte Sollwert mit geringen Schwankungen eingehalten werden. Zwischen 9 h und 12 h wurde der Sollwert nur noch mit größeren Schwankungen eingehalten. Diese sind auf Verstopfungen der Schläuche bzw. der Injektionsventile im Probenahmesystem zurückzuführen. Damit war eine exakte Regelung der Glucosekonzentration nicht mehr möglich.

Abb. 4.10 zeigt den Verlauf des Pumpstroms der Zufütterpumpe und die Wachstumsgeschwindigkeit μ während der Zufütterphase.

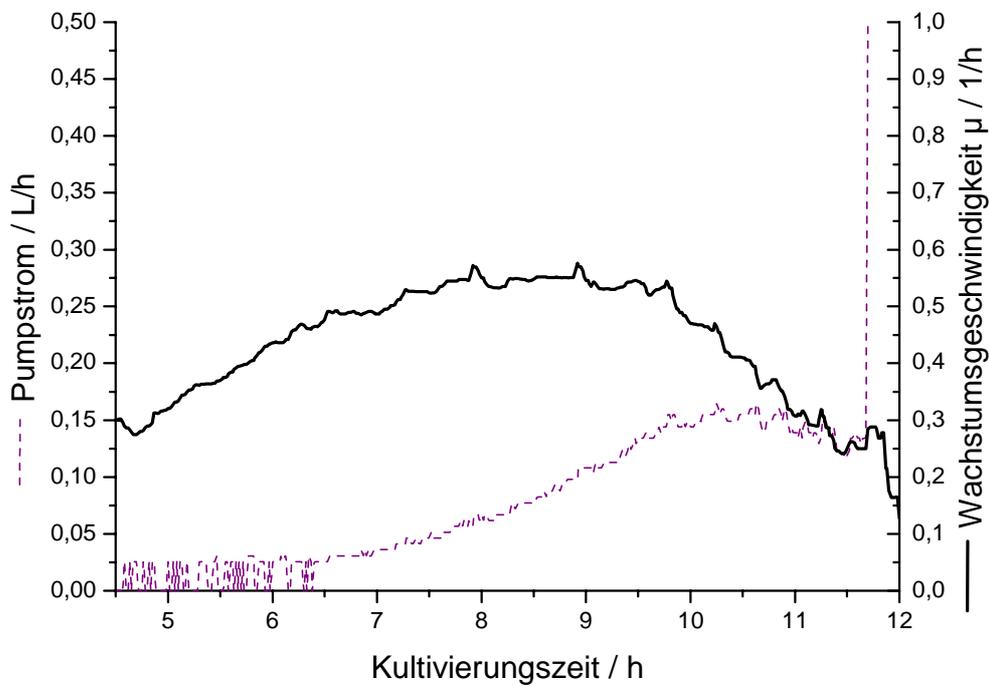


Abb. 4.10 Ausschnitt der Zulaufkultivierung mit Regelung der Glucosekonzentration im Medium auf 0,3 g/L.

Die Wachstumsgeschwindigkeit erreichte bei 9 h nach Animpfen ihren höchsten Wert mit $\mu = 0,55 \text{ h}^{-1}$ und sank anschließend wieder. Es ist zu erkennen, daß zu diesem Zeitpunkt der Pumpstrom ansteigt, obwohl die Zellen in die stationäre Phase eingetreten sind.

Abb. 4.11 zeigt den Verlauf der Sauerstoffsättigung, des Kohlenstoffdioxidgehaltes (CO_2 -Gehalt) in der Abluft, der Rührerdrehfrequenz und der Acetatkonzentration.

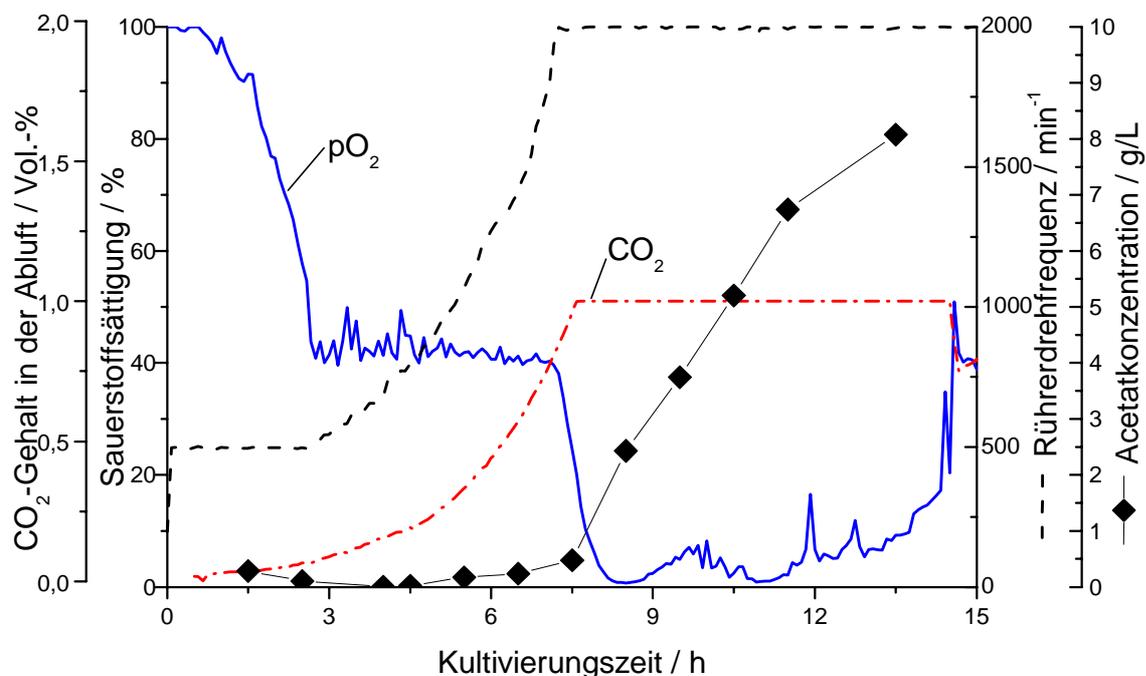


Abb. 4.11 Zulaufkultivierung mit Regelung der Glucosekonzentration im Medium auf 0,3 g/L.

Das CO_2 -Signal war aufgrund eines Defektes in der Datenaufnahme der Steuereinheit abgeschnitten. Die Sauerstoffsättigung erreichte nach etwa 8 h einen Wert unter 10 %. Da der Rührer seine maximale Drehfrequenz mit $n_{\text{max}} = 2000 \text{ min}^{-1}$ zu diesem Zeitpunkt erreicht hatte, konnte kein weiterer Sauerstoffeintrag stattfinden und so die Sauerstoffsättigung nicht mehr auf ihrem vorigen Wert von 40 % gehalten werden. Ab diesem Zeitpunkt stieg die Acetatkonzentration stark an und erreichte eine Konzentration von 8 g/L. Die Biotrockenmasse nahm von diesem Zeitpunkt an nicht mehr weiter zu. Es ist anzunehmen, daß die Zunahme der Acetatkonzentration eventuell ein weiteres Wachstum verhindert hat.

Zulaufkultivierung mit einem Sollwert von 0,2 g/L

In Abb. 4.12 ist eine Zulaufkultivierung dargestellt, bei der der Sollwert für die Glucosekonzentration im Medium 0,2 g/L betrug. Abb. 4.12 zeigt den Verlauf der optischen Dichte und der Phytaseaktivität in der Gesamtprobe und im Überstand während der Fermentation.

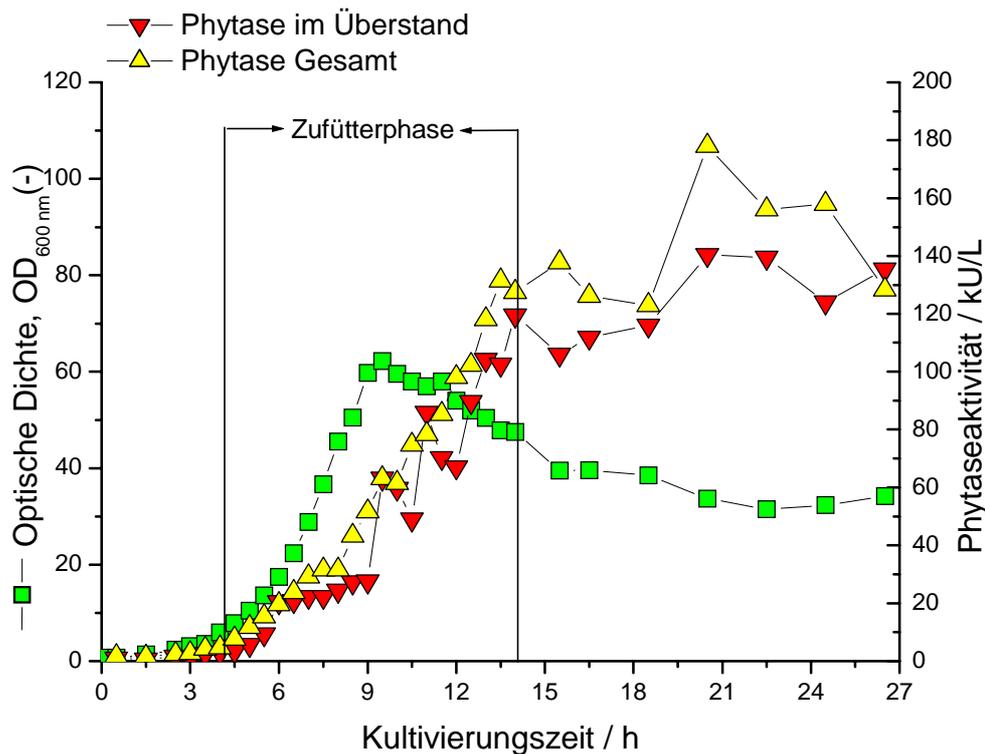


Abb. 4.12 Verlauf der Zulaufkultivierung mit Regelung der Glucosekonzentration im Medium auf 0,2 g/L.

Die optische Dichte erreichte bei 9 h einen maximalen Wert von 60 und fing noch während der Zufütterphase an zu sinken. Die Phytaseaktivität erreichte im Medium während der Zufütterphase einen Wert von 120 kU/L und stieg anschließend während der stationären Phase auf 140 kU/L. Die Phytaseaktivität in der Gesamtprobe erreichte gegen Ende der Fermentation einen Wert von 160 kU/L. Die Sekretion verlief während der Fermentation nahezu vollständig und parallel zum Wachstum der Zellen.

Abb. 4.13 zeigt den Verlauf der Biotrockenmassekonzentration und der Glucosekonzentration während der Kultivierung. Die *off-line* gemessenen Biotrockenmassekonzentrationen stimmten bis zum Eintreten der Zellen in die stationäre Phase mit denen von dem FIA-System geschätzten Werten genau überein und erreichten gegen Ende der Fermentation einen Wert von 35 g/L. Die *off-line* gemessenen Glucosekonzentrationen lagen bis zum Eintritt der Zellen in die stationäre Phase unter den Werten, die vom FIA-System gemessen wurden. Dieses lag daran, daß die Zellen trotz vorgekühltem Probenahmegefäß zwischen Probenahme und Glucosemessung Glucose verbraucht hatten.

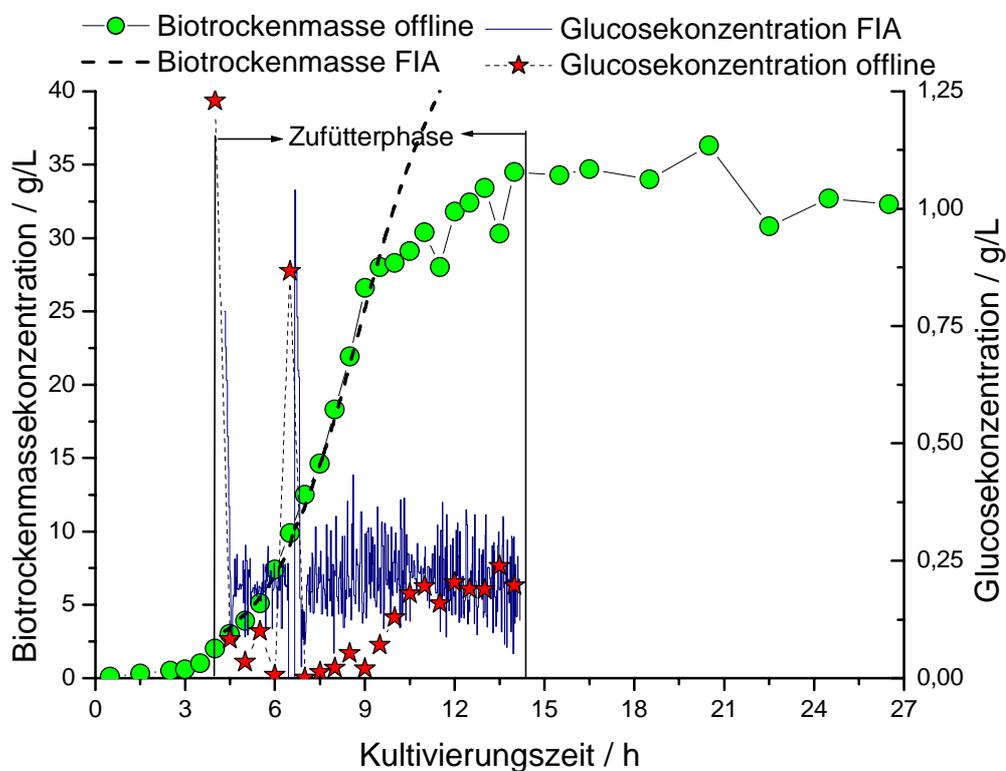


Abb. 4.13 Verlauf der Zulaufkultivierung mit Regelung der Glucosekonzentration im Medium auf 0,2 g/L.

Die Zufütterung begann 4 h nach Animpfen des Fermenters. Zu diesem Zeitpunkt entsprach die Glucosekonzentration in etwa dem gewünschten Sollwert von 0,2 g/L. Bei 6,5 h wurde eine erhöhte Glucosekonzentration von 0,8 g/L im Medium gemessen. Dieses war auf eine kurzzeitige Verstopfung des Probenahmesystems zurückzuführen. Da dieses Problem schnell behoben werden konnte, sind keine weiteren Beeinträchtigungen der Regelung eingetreten.

Nach 9 h war am Verlauf der Biotrockenmasse zu erkennen, daß das Wachstum sich verlangsamte und die Zellen in die stationäre Phase eintraten, obwohl die Zufütterung noch nicht beendet war. Die Phytaseaktivität im Medium stieg von diesem Zeitpunkt an bis zum Ende der Fermentation auf das Dreifache an.

Abb. 4.14 zeigt den Verlauf des Pumpstroms der Zufütterpumpe und der Wachstumsgeschwindigkeit μ während der Zufütterphase.

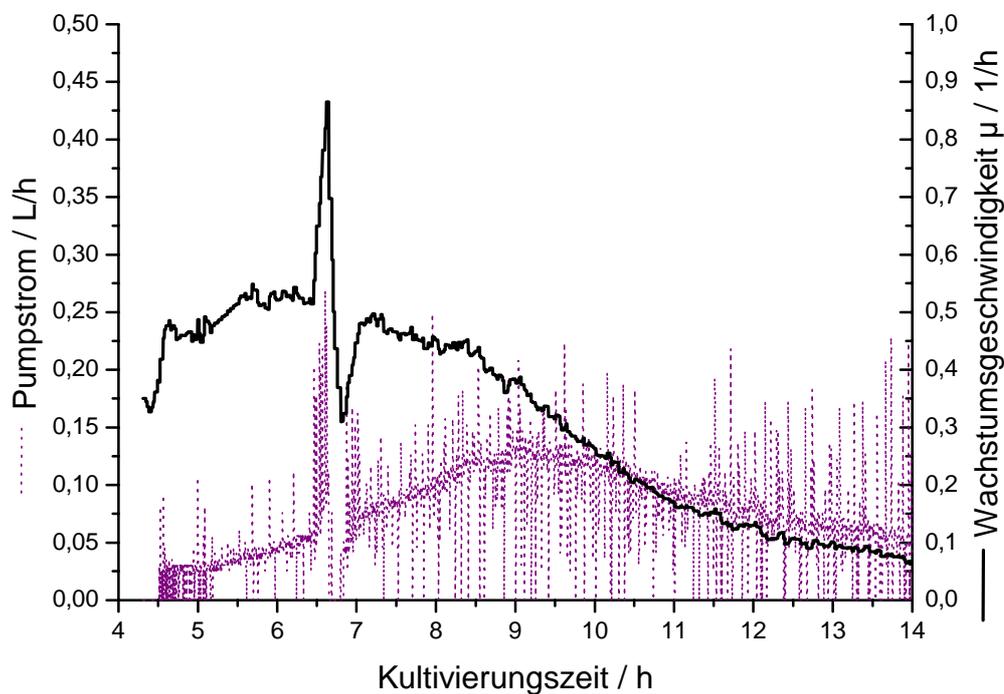


Abb. 4.14 Ausschnitt der Zulaufkultivierung mit Regelung der Glucosekonzentration im Medium auf 0,2 g/L.

Die Wachstumsgeschwindigkeit erreichte nach etwa 6 h nach Animpfen einen Wert von $\mu = 0,54 \text{ h}^{-1}$, obwohl die Zufütterphase zu diesem Zeitpunkt noch nicht beendet war. Der Pumpstrom der Zufütterpumpe stieg bis 9 h nach Animpfen an und sank anschließend wieder. Zu diesem Zeitpunkt hörte der exponentielle Anstieg der Biotrockenmasse (s. Abb. 4.12) auf.

Abb. 4.15 zeigt den Verlauf der Sauerstoffsättigung, des Kohlenstoffdioxidgehaltes in der Abluft, der Rührerdrehfrequenz und der Acetatkonzentration.

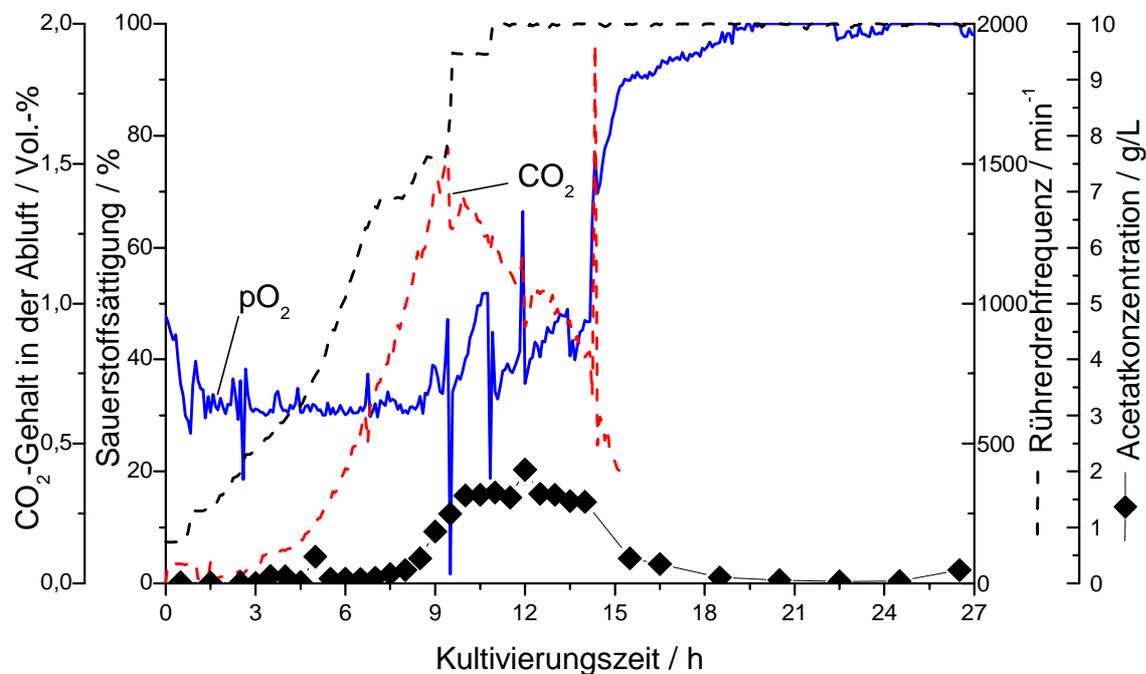


Abb. 4.15 Zulaufkultivierung mit Regelung der Glucosekonzentration im Medium auf 0,2 g/L.

Der CO₂-Gehalt in der Abluft erreichte nach 9 h seinen maximalen Wert und zeigte damit das Ende der exponentiellen Wachstumsphase an. Die Acetatkonzentration erreichte nach 9 h einen Wert von 0,9 g/L. Die Rührerdrehfrequenz hatte zu diesem Zeitpunkt noch nicht ihren maximalen Wert erreicht. Diese Faktoren können also nicht zur Beantwortung der Frage herangezogen werden, wieso ab einem Zeitpunkt von 9 h das Wachstum der Zellen sich deutlich verlangsamt, obwohl die Zufütterung noch nicht beendet war.

Zulaufkultivierung mit einem Sollwert von 0,1 g/L

Der Sollwert der Glucosekonzentration im Medium bei der Zulaufkultivierung in Abb. 4.16 betrug 0,1 g/L. Abb. 4.16 zeigt den Verlauf der optischen Dichte und der Phytaseaktivität in der Gesamtprobe und im Überstand während der Fermentation.

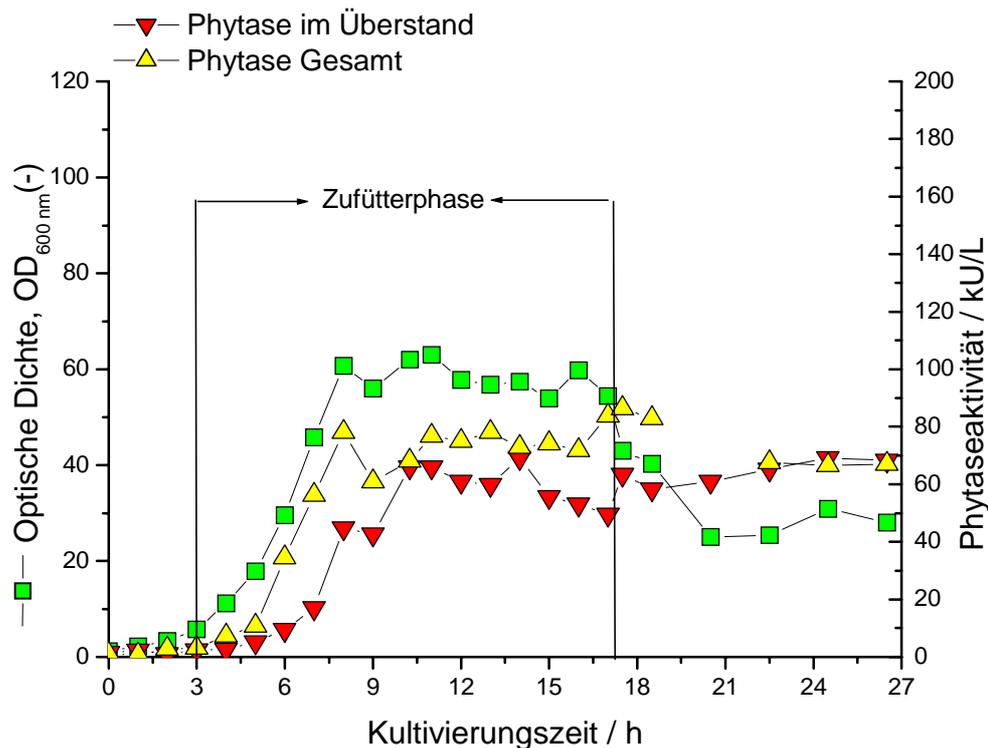


Abb. 4.16 Verlauf der Zulaufkultivierung mit Regelung der Glucosekonzentration im Medium auf 0,1 g/L.

Die optische Dichte erreichte nach etwa 9 h nach Animpfen einen maximalen Wert von 60. Die Phytaseaktivität in der Gesamtprobe erreichte ebenfalls nach 9 h einen maximalen Wert von etwa 80 kU/L. Die Phytaseaktivität im Medium erreichte erst nach 11 h ihren maximalen Wert von 70 kU/L. Die Sekretion erfolgte damit zu ca. 90 %.

Abb. 4.17 zeigt den Verlauf der Biotrockenmassekonzentration und der Glucosekonzentration während der Kultivierung. Die *off-line* gemessenen Biotrockenmassen stimmten bis zum Eintreten der Zellen in die stationäre Phase (11 h nach Animpfen) mit den vom FIA-System geschätzten Werten genau überein und

erreichten gegen Ende der Fermentation einen Wert von 33 g/L. Die *off-line* gemessenen Glucosekonzentrationen lagen über den Werten, die vom FIA-System gemessen wurden. Die Regelung der Glucosekonzentration auf den gewünschten Sollwert konnte vom FIA-System ohne weitere Störungen bewerkstelt werden, da keine Verstopfungen im Probenahmesystem vorgekommen sind.

Es wurde 3 h nach Animpfen mit der Zufütterung begonnen, da die Zellen die vorgelegte Glucose bis zu dem gewünschte Sollwert verbraucht hatten.

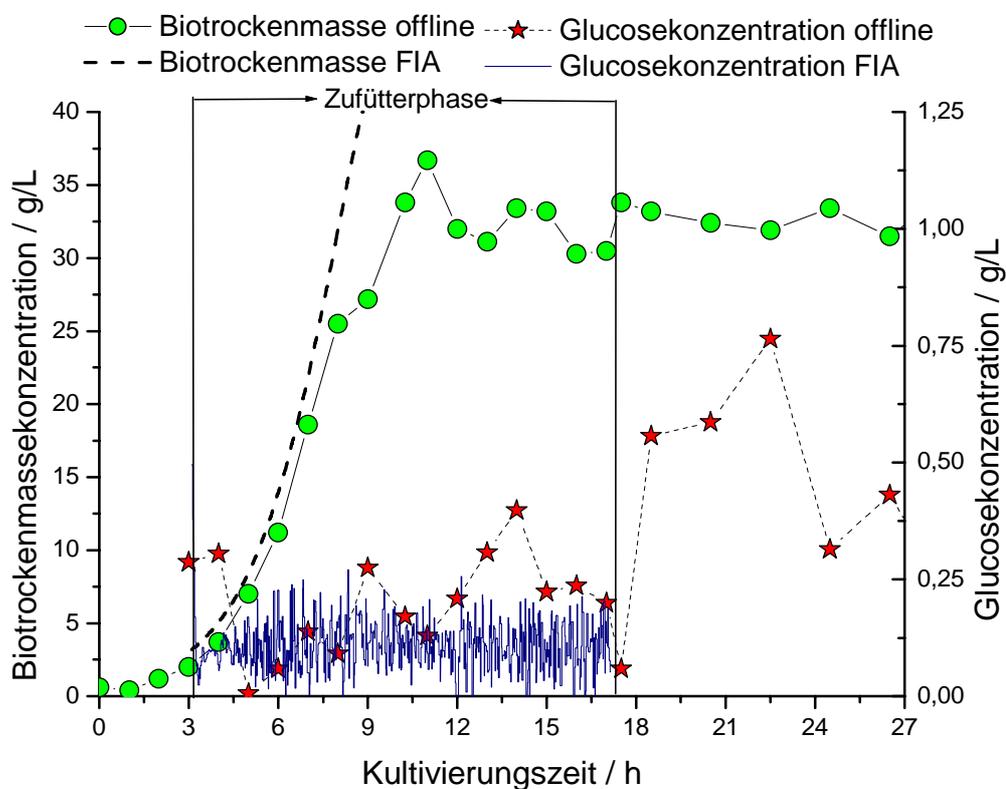


Abb. 4.17 Verlauf der Zulaufkultivierung mit Regelung der Glucosekonzentration im Medium auf 0,1 g/L.

Abb. 4.18 zeigt den Verlauf des Pumpstroms der Zufütterpumpe und der Wachstumsgeschwindigkeit μ während der Zufütterphase.

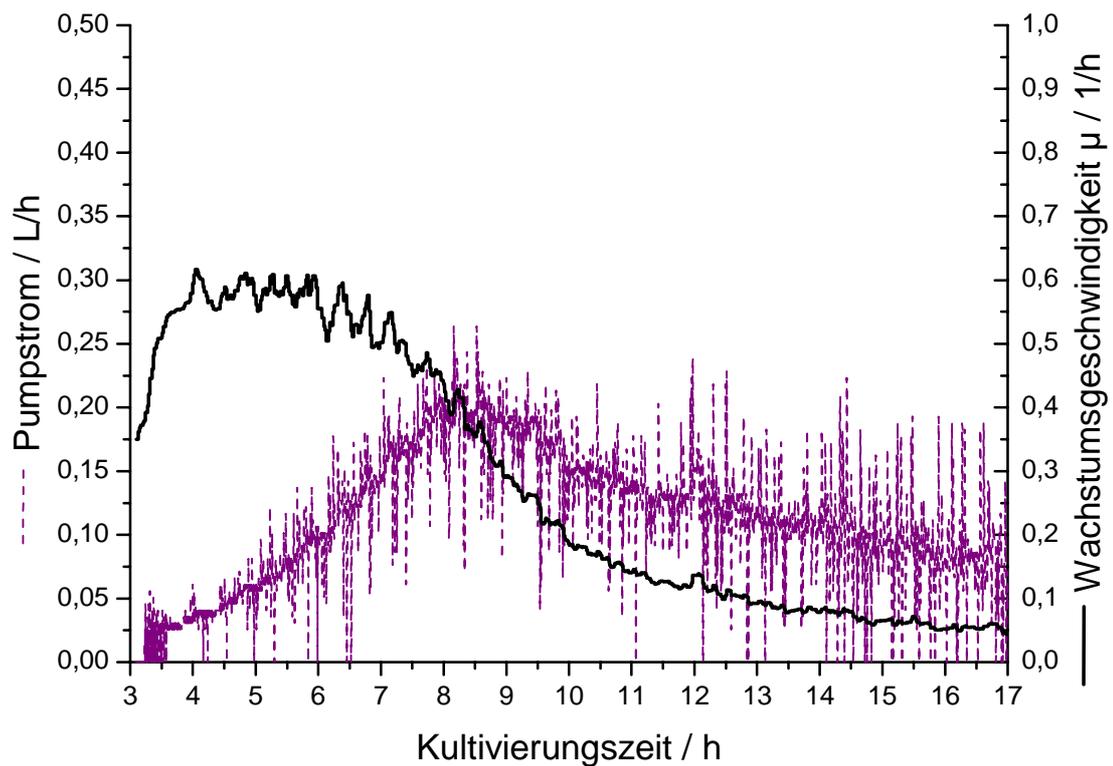


Abb. 4.18 Ausschnitt der Zulaufkultivierung mit Regelung der Glucosekonzentration im Medium auf 0,1 g/L.

Etwa 6 h nach Animpfen erreicht die Wachstumsgeschwindigkeit einen Wert von $\mu = 0,57 \text{ h}^{-1}$. Der Pumpstrom stieg bis etwa 9 h nach Animpfen und sank anschließend wieder. Dies entspricht dem Zeitpunkt, an dem die Zellen in die stationäre Phase eintreten.

Abb. 4.19 zeigt den Verlauf der Sauerstoffsättigung, des Kohlenstoffdioxidgehaltes in der Abluft, der Rührerdrehfrequenz und der Acetatkonzentration.

Der CO_2 -Gehalt in der Abluft erreichte nach 10 h seinen maximalen Wert und zeigte damit das Ende der exponentiellen Wachstumsphase an. Die Acetatkonzentration stieg nach 8 h auf einen Wert von 2 g/L, welcher noch nicht wachstumshemmend wirkt. Die Sauerstoffsättigung sank etwa zu diesem Zeitpunkt auf 10 %, da der Rührer seine maximale Drehfrequenz von $n = 2000 \text{ min}^{-1}$ erreicht hatte.

Obwohl bis 18 h nach Animpfen zugefüttert wurde, konnte nach ca. 11 h kein weiteres Wachstum der Zellen und kein weiterer Anstieg der Phytaseaktivität festgestellt werden.

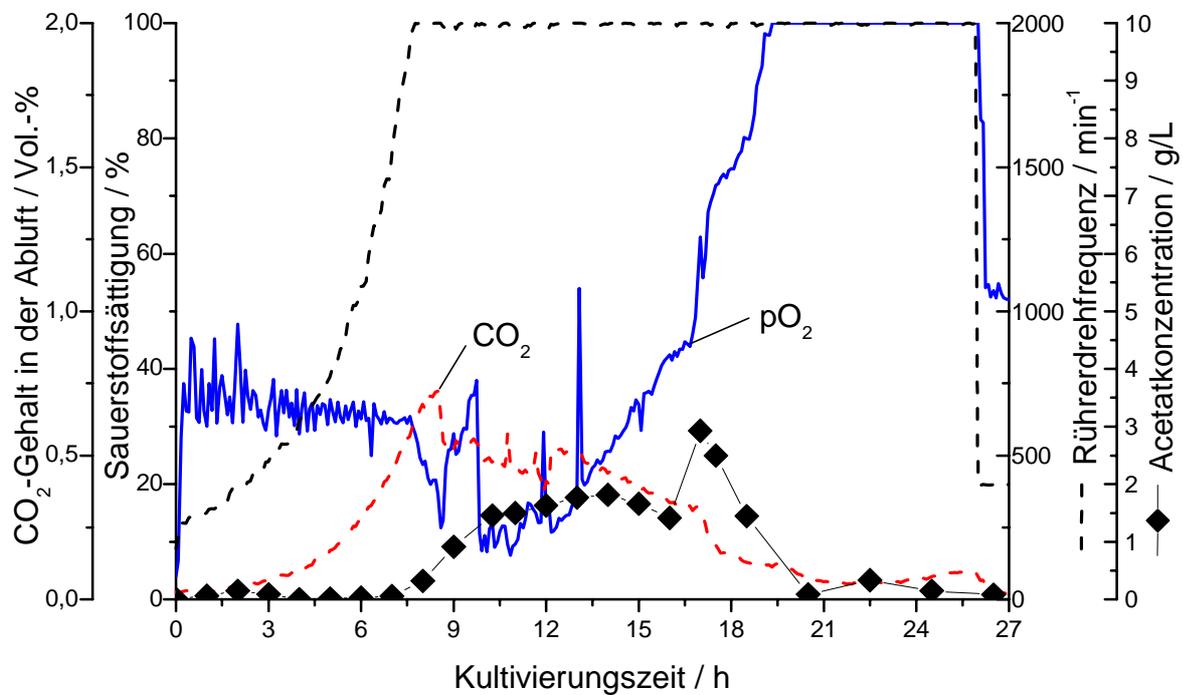


Abb. 4.19 Zulaufkultivierung mit Regelung der Glucosekonzentration im Medium auf 0,1 g/L.

Vergleich der Zulaufkultivierungen unter Einhalten der Sollwerte 0,3 g/L, 0,2 g/L und 0,1 g/L Glucose im Medium

Ein Vergleich der drei oben genannten Fermentationen miteinander zeigt, daß der Verlauf des Wachstums der Zellen bei allen Fermentationen sehr ähnlich ist. Nach jeweils 9 h bis 10 h nach Animpfen wurde ein maximaler Wert für die Biotrockenmasse erreicht. Dies läßt sich auch am jeweiligen CO₂-Signal in der Abluft erkennen. Bis zu einem Zeitpunkt von 9 h bis 10 h steigt es, anschließend fällt es. Es konnte bei allen Fermentationen eine Biotrockenmassekonzentration von 30 g/L bis 35 g/L erreicht werden. Es war mit dieser Fermentationsstrategie nicht möglich ist, eine Erhöhung der Biotrockenmassekonzentration zu erreichen.

In Abb. 4.20 sind die aus den oben beschriebenen Fermentationen maximalen Phytaseaktivitäten im Medium und in der Gesamtprobe gegen die jeweiligen Glucose-Sollwerte aufgetragen. Es ist deutlich erkennbar, daß mit einem Sollwert für Glucose von 0,2 g/L im Medium die höchste Phytaseausbeute erreicht wurde.

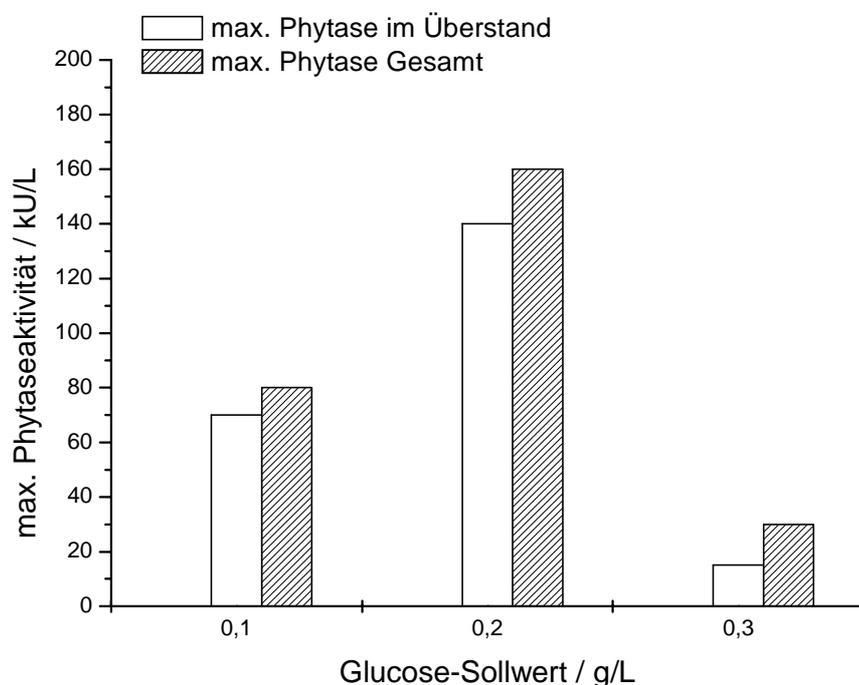


Abb. 4.20 Vergleich der Kultivierungen mit FIA-geregeltem Zulauf unter Konstanthalten der Glucosekonzentration im Medium.

Abb. 4.21 zeigt die Selektivität S_{rx} als Funktion der Kultivierungszeit.

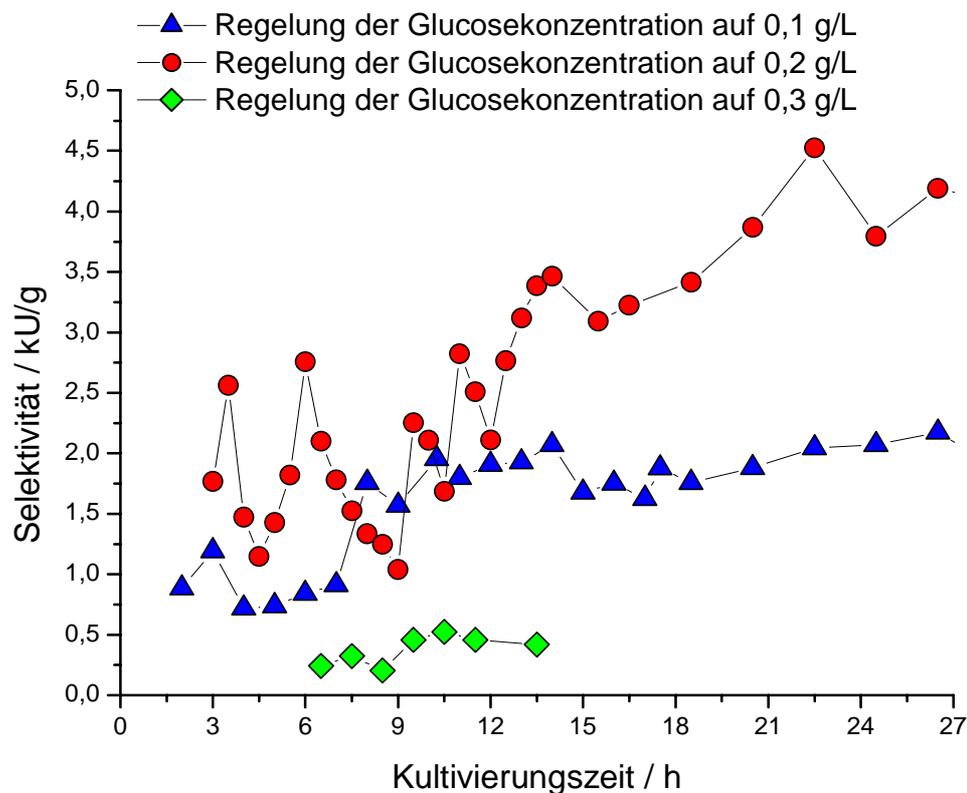


Abb. 4.21 Selektivität der mit FIA-geregelten Zulaufkultivierungen.

Die Selektivität S_{rx} berechnet sich, indem für jeden Meßwert die Phytaseaktivität im Medium auf die Biotrockenmasse bezogen wird.

Es zeigt sich, daß bei Konstanthalten der Glucosekonzentration im Medium auf einem Sollwert von 0,2 g/L die höchsten Werte für die Selektivität zu finden sind. Es kann angenommen werden, daß eine Abhängigkeit zwischen dem Sollwert der Glucosekonzentration und der Phytaseausbeute besteht, wobei es bei einer Glucosekonzentration von 0,2 g/l ein Optimum in der Phytaseausbeute gibt. Dieser Trend konnte durch Wiederholung der Fermentationen bestätigt werden.

Intervallregelung des Zulaufs mit dem FIA-System

Die Zulaufkultivierung wurde unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die Konzentration der Glucosezufütterlösung betrug 600 g/L. Nach der Satzphase wurde für 1,5 h eine stationäre Phase herbeigeführt. Anschließend wurde für 4 h mit dem FIA-System zugefüttert. Dabei wurde ein Sollwert für die Glucose im Medium von 0,1 g/L eingehalten. Nach 10,5 h nach Animpfen wurde die Zufütterung abgebrochen und für 1,5 h wieder eine stationäre Phase herbeigeführt. Anschließend wurde mit einem konstant niedrigen Volumenstrom von 0,03 L/h ununterbrochen ohne Regelung bis Ende der Fermentation zugefüttert.

Mit dieser Regelungstrategie in Intervallen sollte untersucht werden, ob der *fic*-Promotor (Stationärphasepromotor), der sich vor dem *kil*-Gen der Sekretionskassette befindet, während der stationären Phasen aktiviert wird. Damit wäre zu erwarten gewesen, daß in jeder stationären Phase eine verstärkte Sekretion von Phytase beobachtet werden müßte.

Abb. 4.22 zeigt den Verlauf der optischen Dichte und der Phytase im Medium und in der Gesamtprobe.

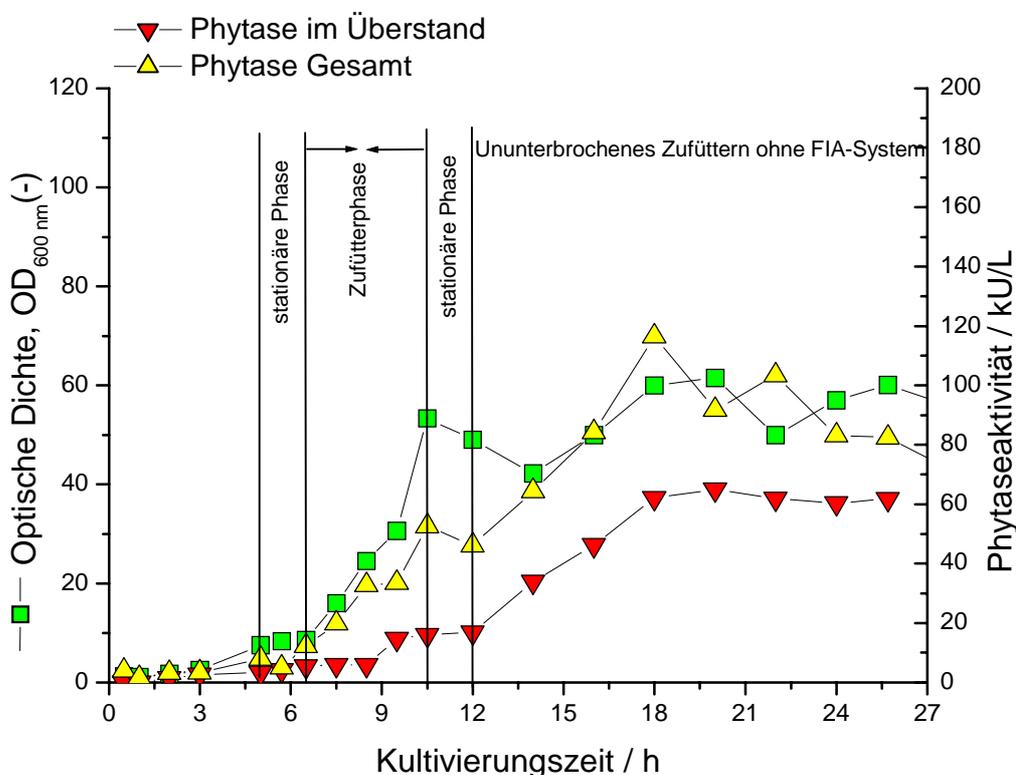


Abb. 4.22 Zulaufkultivierung mit Intervallregelung durch das FIA-System (0,1 g/L).

In den in Abb. 4.22 markierten stationären Phasen konnte keine Steigerung der Phytaseaktivität im Medium festgestellt werden. Der *fic*-Promotor scheint nicht nur in der stationären Phase aktiviert zu sein, denn die Phytaseaktivität im Medium und in der Gesamtprobe stieg sowohl während der ersten Zufütterphase als auch während der zweiten. Gegen Ende der Fermentation erreichte die Phytaseaktivität im Medium einen Wert von 60 kU/L und die Phytaseaktivität in der Gesamtprobe einen Wert von ca. 100 kU/L. Dies entspricht einer Sekretion von 60 %.

Die optische Dichte stieg bis 10,5 h nach Animpfen auf einen maximalen Wert von 50.

Abb. 4.23 zeigt den CO₂-Gehalt in der Abluft, die Sauerstoffsättigung und die Rührerdrehfrequenz während der Zulaufkultivierung.

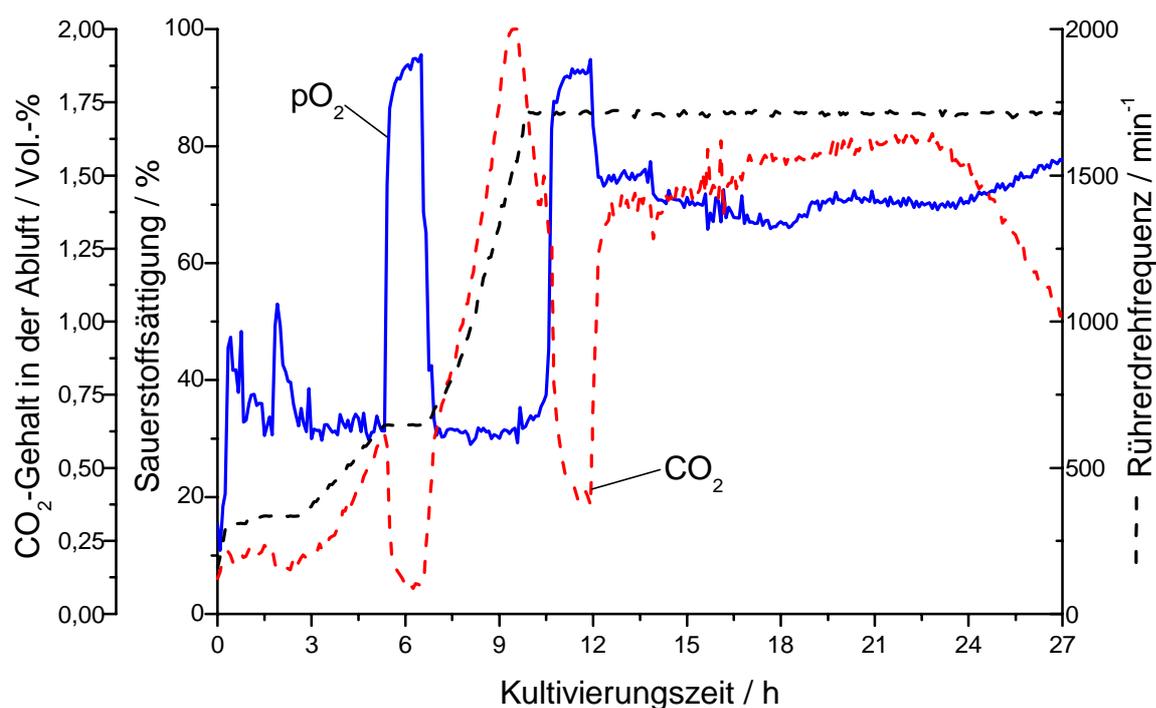


Abb. 4.23 Zulaufkultivierung mit Intervallregelung durch das FIA-System (0,1 g/L).

Die beiden stationären Phasen sind sowohl in der Sauerstoffsättigung als auch im CO₂-Gehalt in der Abluft zu beobachten. Die Sauerstoffsättigung stieg in diesen beiden Phasen auf fast 100 % und der CO₂-Gehalt sank auf einen niedrigen Wert.

Abb. 4.24 zeigt die Selektivität in Abhängigkeit der Kultivierungszeit. Dabei wurde in etwa ein Wert für die Selektivität von 2 kU/g erreicht. Dies entspricht bei einem Vergleich mit Abb. 4.21 der Kultivierung, bei der der Glucose-Sollwert 0,1 g/L betrug. Dies zeigt, daß die Intervallregelung der Zufütterung im Vergleich zu einer durchgängigen Regelung bei gleichem Sollwert nicht zu einer Steigerung der Phytaseausbeute führt.

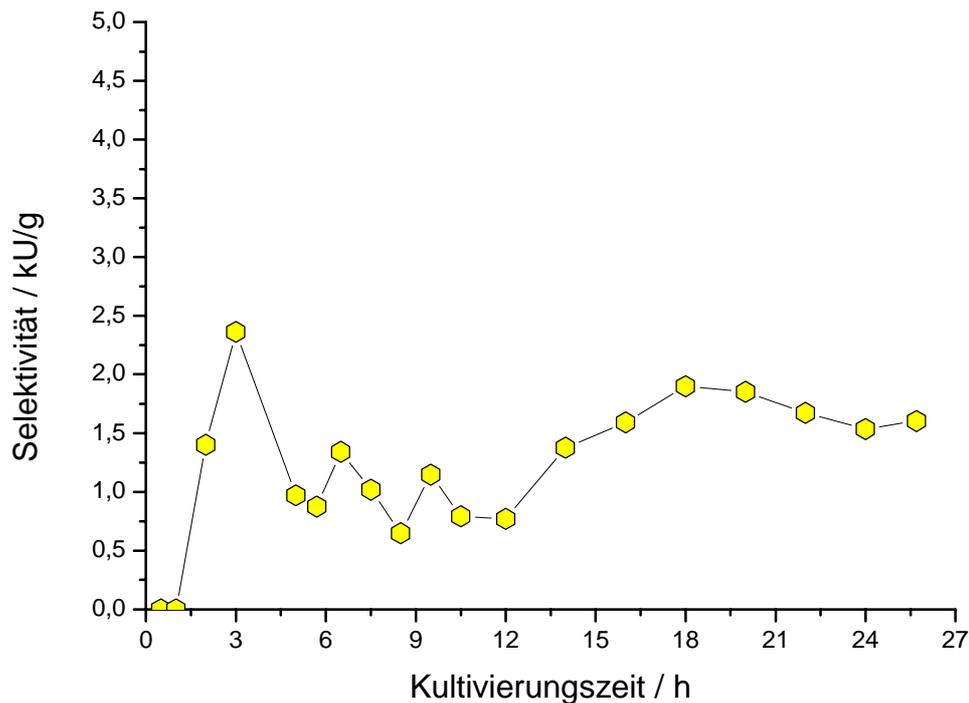


Abb. 4.24 Selektivität der mit FIA-geregelter Kultivierung mit unterbrochenem Zulauf.

4.3.2 Zulaufkultivierungen mit Regelung des Zulaufs über die Sauerstoffsättigung im Medium

In diesem Kapitel werden Fermentationen im Zulaufverfahren vorgestellt, bei denen die Regelung der Zufütterung über die Sauerstoffsättigung im Medium erfolgte. Dabei wurden drei verschiedene Strategien verfolgt: Bei der ersten erfolgte der Zulauf, nachdem ein oberer Sollwert für die Sauerstoffsättigung überschritten wurde. Bei der zweiten Zufütterstrategie erfolgte der Zulauf ebenfalls nach Überschreiten eines oberen Sollwertes für die Sauerstoffsättigung. Allerdings erfolgte die Zufütterung in Intervallen. Bei der dritten Zulaufstrategie erfolgte der Zulauf durch Konstanthalten eines bestimmten Sollwertes für die Sauerstoffsättigung. Die Kultivierungen sollen miteinander verglichen werden und auf Expression und Sekretion der Phytase untersucht werden.

Regelung des Zulaufs über die Sauerstoffsättigung

Die Zulaufkultivierung wurde wie in Kapitel 3.5.4 beschrieben durchgeführt. Die Regelung der Zufütterung erfolgte über die Sauerstoffsättigung im Medium. Bei Überschreiten des Sollwertes von $pO_2 = 40 \%$ erfolgte der gleichzeitige Zulauf beider Zufütterlösungen (s. 3.4.1). Die Glucosekonzentration der Zufütterlösung betrug $669,6 \text{ g/L}$. Die Glucosekonzentration in der Satzphase betrug 25 g/L . Die Rührerdrehfrequenz wurde über die Sauerstoffsättigung im Medium geregelt. Sobald diese einen unteren Sollwert von 20% unterschritten hatte, wurde die Rührerdrehfrequenz schrittweise um 2% erhöht. Zu Beginn der Kultivierung wurde die Rührerdrehfrequenz auf $n_0 = 150 \text{ min}^{-1}$ festgelegt. Die maximale Rührerdrehfrequenz betrug $n_{\max} = 1500 \text{ min}^{-1}$. Das pH wurde durch automatische Dosierung von 10% iger Phosphorsäure und 2 N Natronlauge als Korrekturflüssigkeiten auf einem Wert von $6,9$ gehalten.

Als Analyseparameter wurden die optische Dichte, die Biotrockenmasse und die Phytaseaktivität im Medium und in der Gesamtprobe untersucht.

Abb. 4.25 zeigt den Verlauf der Sauerstoffsättigung, der Biotrockenmasse und der Phytaseaktivität im Medium und in der Gesamtprobe.

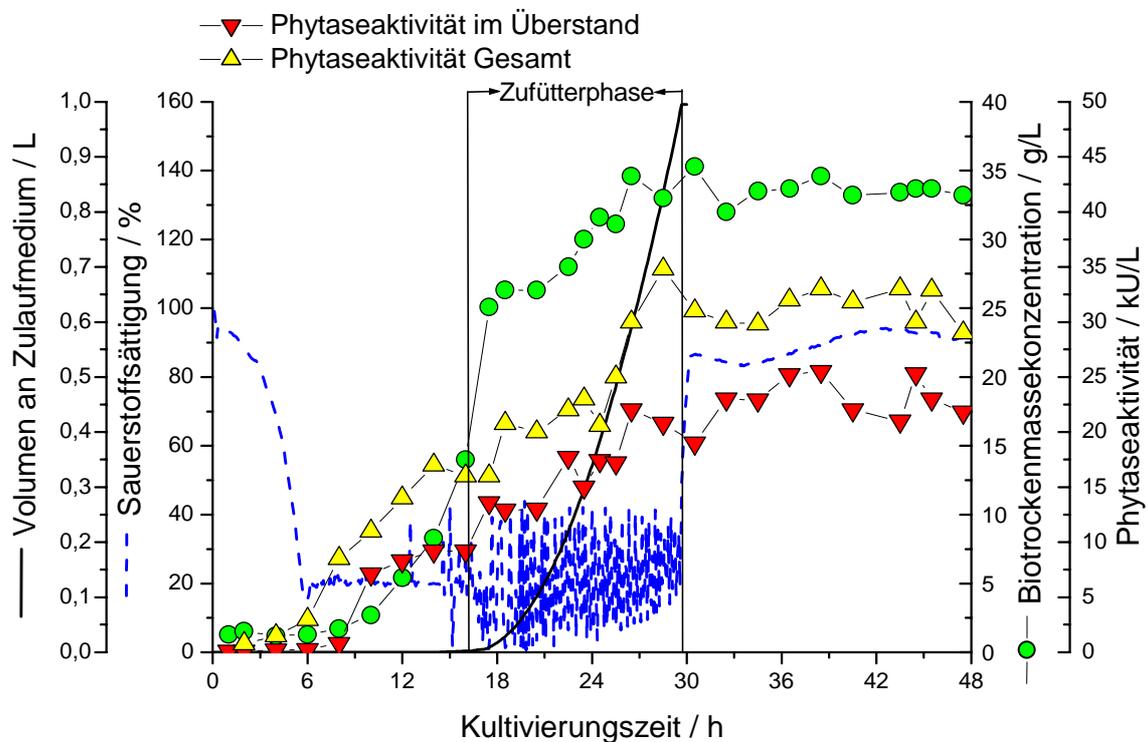


Abb. 4.25 Zulaufkultivierung mit Regelung des Zulaufs in Abhängigkeit von der Sauerstoffsättigung (Sollwert des $pO_2 = 40\%$).

Da beide Zufütterlösungen gleichzeitig zugefüttert wurden, ist in Abb. 4.25 das Endvolumen des Dosierprofils für eine Zufütterlösung dargestellt. Um das gesamte zugefütterte Volumen zu berechnen, müssen die Werte für das Dosierprofil mit 2 multipliziert werden.

Bis 18 h nach Animpfen scheint das Zellwachstum exponentiell zu verlaufen. Anschließend verlangsamte es sich und die Biotrockenmasse erreichte einen Wert am Ende der Fermentation von 33 g/L.

Während der Zufütterphase (15 h bis 30 h nach Animpfen) verdoppelte sich der Wert der Phytaseaktivität im Medium und erreichte einen Wert am Ende der Fermentation von 20 kU/L. Die Phytaseaktivität in der Gesamtprobe erreichte einen Wert von 27 kU/L. Die Phytase wurde zu etwa 75 % sekretiert.

6 h nach Animpfen wurde der pO_2 -Sollwert von 20 % unterschritten und die Rührerdrehfrequenz schrittweise erhöht, so daß die Sauerstoffsättigung bis zu Beginn der Zufütterung (15 h nach Animpfen) auf ca. 20 % gehalten wurde.

Nachdem die Glucose aus der Satzphase verbraucht war, wurde der obere pO_2 -Sollwert von 40 % überschritten und die Zufütterung begann.

Abb. 4.26 zeigt den CO_2 -Gehalt in der Abluft, die Rührerdrehfrequenz, die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit und die Selektivität.

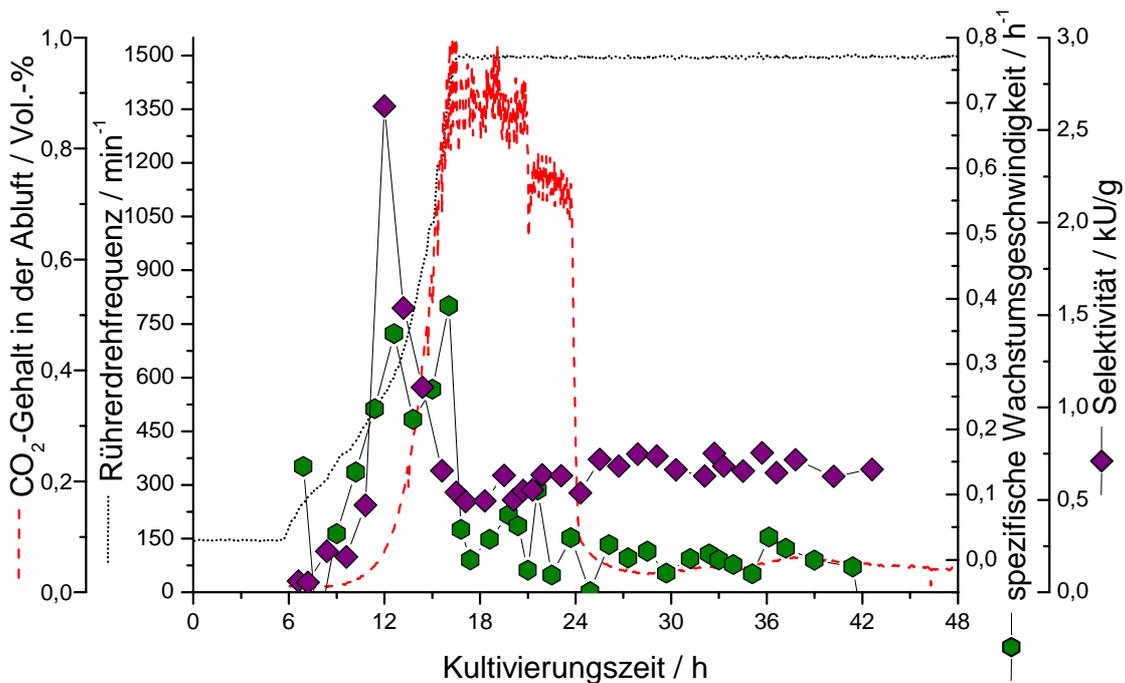


Abb. 4.26 Zulaufkultivierung mit Regelung des Zulaufs in Abhängigkeit von der Sauerstoffsättigung (Sollwert des $pO_2 = 40\%$).

Die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit zeigt zwischen 12 h und 18 h die höchsten Werte. Ein Vergleich mit Abb. 4.25 zeigt, daß in diesem Zeitraum die Biotrockenmasse einen exponentiellen Verlauf annimmt. In diesem Zeitraum erreichte der CO_2 -Gehalt in der Abluft einen maximalen Wert. Trotz weiterer Zufütterung konnte nach 18 h der maximal erreichte Wert für die Wachstumsgeschwindigkeit nicht aufrecht erhalten werden.

Die Selektivität erreichte einen Wert von 0,75 kU/g und lag damit wesentlich niedriger als die Werte, die mit Regelung der Zufütterung durch das FIA-System erreicht wurden.

Intervallregelung des Zulaufs über die Sauerstoffsättigung

Die Kultivierungsbedingungen wurden wie in 3.5.4 beschrieben eingehalten. Nach anfänglichem Satzbetrieb wurde eine dreistündige stationäre Phase der Zellen abgewartet. Die Regelung der Zufütterung der beiden Zufütterlösungen (s. 3.5.4) erfolgte auf die gleiche Weise wie bei der Zufütterung ohne Unterbrechung (s. 4.3.2). Die Zufütterung wurde alle 3 h unterbrochen, so daß die Zellen sich abwechselnd 3 h in in einer Zufütterphase bzw. in einer Hungerphase befanden.

Die Glucoseausgangskonzentration in der Satzphase betrug 6 g/L. Zu Beginn der Kultivierung wurde die Rührerdrehfrequenz auf $n_0 = 150 \text{ min}^{-1}$ festgelegt. Die maximale Rührerdrehfrequenz betrug $n_{\text{max}} = 2000 \text{ min}^{-1}$. Alle anderen Bedingungen wurden, wie in 4.3.2 beschrieben, eingehalten.

Abb. 4.27 zeigt den Verlauf einer Zulaufkultivierung mit Unterbrechung der Zufütterung.

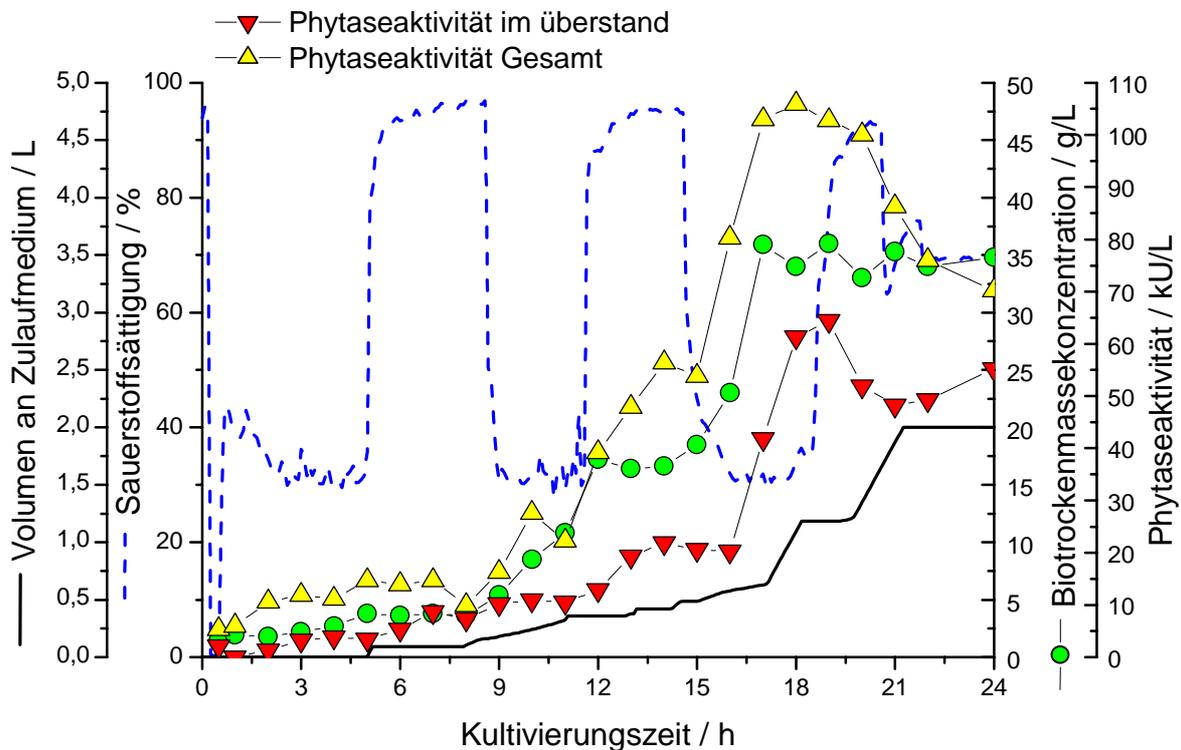


Abb. 4.27 Zulaufkultivierung mit Intervallregelung des Zulaufs in Abhängigkeit der Sauerstoffsättigung im Medium.

Da beide Zufütterlösungen gleichzeitig zugefüttert wurden, ist in Abb. 4.27 das Endvolumen des Dosierprofils für eine Zufütterlösung dargestellt. Um das gesamte zugefütterte Volumen zu berechnen, müssen die Werte für das Dosierprofil mit 2 multipliziert werden.

Die Intervallfütterung ist deutlich an der Sauerstoffsättigung zu erkennen. Am Ende der Satzphase erreichte der pO_2 einen Wert von etwa 95 %. Dieser wurde bis 9 h nach Animpfen beibehalten. Anschließend wurde für 3 h zugefüttert. Der pO_2 erreichte einen Wert von etwa 30 %. Anschließend wurde wieder für 3 h die Zufütterung gestoppt und nach 16 h wieder gestartet.

Die Werte für die Biotrockenmassekonzentration erhöhten sich während der Zufütterphasen und erreichten am Ende der Fermentation einen Wert von 35 g/L.

Die Phytaseaktivitäten im Medium und in der Gesamtprobe stiegen mit der Biotrockenmassekonzentration und erreichten am Ende der Fermentation einen Wert von 60 kU/L. Da der hier kultivierte Stamm *E.coli* BL21(DE3)pPhyt109 vor der Sekretionskassette den fic-Promotor enthält, der ein Stationärphasepromotor ist, ist zu erwarten, daß die Phytaseaktivität im Medium während der stationären Phase steigt. Abb. 4.27 zeigt, daß die Phytaseaktivität im Medium während der Zufütterphase zunahm. Zwischen 16 h und 19 h nach Animpfen nahm während der letzten Zufütterphase die Phytaseaktivität im Medium um das Dreifache zu und in der Gesamtprobe um das Doppelte. Phytase wurde zu etwa 60 % sekretiert.

Abb. 4.28 zeigt den Verlauf des CO_2 -Gehaltes in der Abluft, der Rührerdrehfrequenz, der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit und der Selektivität während der Kultivierung.

Die Intervallfütterung ist sowohl an der Rührerdrehfrequenz als auch am CO_2 -Gehalt in der Abluft zu erkennen. Zwischen 6 h und 9 h nach Animpfen war der CO_2 -Gehalt in der Abluft gering und die Rührerdrehfrequenz nahm nicht zu. Dieses ist ebenfalls zwischen 12 h und 15 h zu beobachten. In den jeweiligen Zufütterphasen nahm der CO_2 -Gehalt in der Abluft zu und die Rührerdrehfrequenz ebenfalls.

Die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit war in den Phasen, in denen nicht gefüttert wurde niedrig. Sobald eine Zufütterphase begann, stieg sie wieder an.

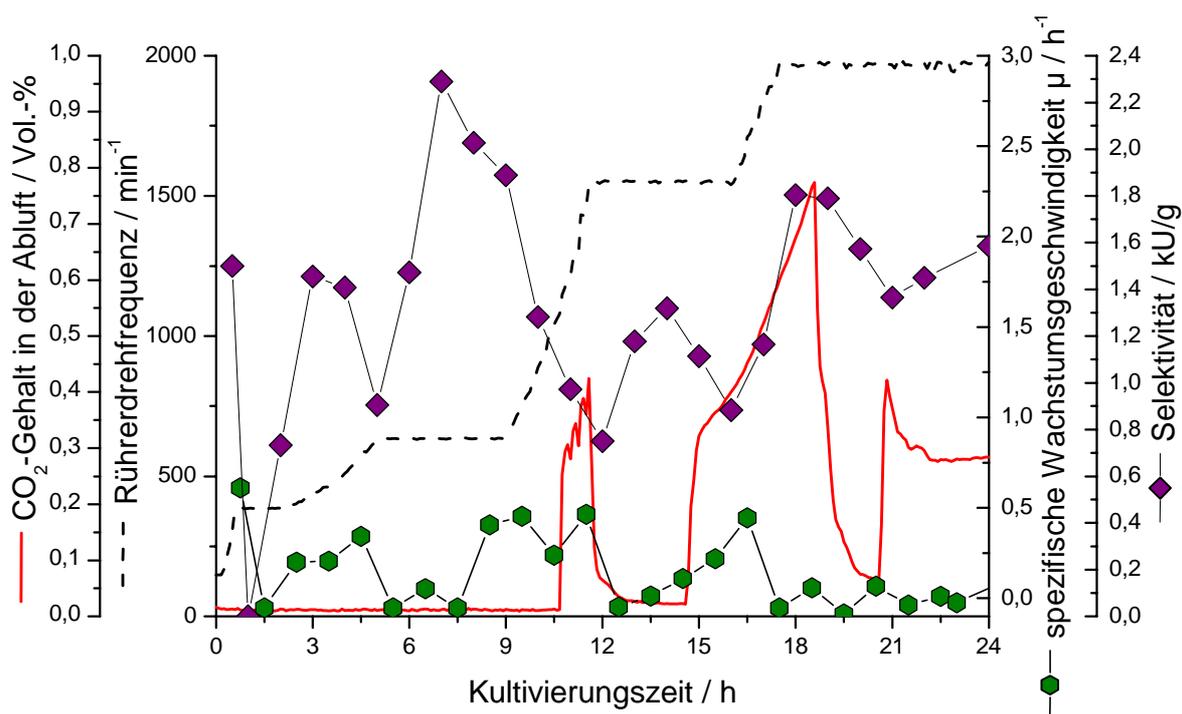


Abb. 4.28 Zulaufkultivierung mit Intervallregelung des Zulaufs in Abhängigkeit der Sauerstoffsättigung im Medium.

Die Selektivität erreichte einen Wert von 1,5 kU/g. Ein Vergleich mit Abb. 4.26 zeigt, daß bei der intervallgeregelten Zufütterung ein höherer Wert für die Selektivität erreicht wurde. Es konnte mit dieser Strategie eine höhere Phytaseausbeute im Medium erreicht werden als ohne Intervallzufütterung.

Regelung des Zulaufs unter Einhalten eines konstanten Sollwertes für die Sauerstoffsättigung

In diesem Kapitel soll ein Kultivierungsverfahren vorgestellt werden, mit dem es möglich ist, die Ausbeute an Phytase im Medium im Vergleich zu den bisher beschriebenen Verfahren zu steigern. Die Kultivierungsbedingungen wurden, wie in Kapitel 3.5.4 beschrieben, eingehalten. Während der Kultivierungen wurde mit Hilfe eines PID-Reglers, der die Zufütterpumpe ansteuerte, jeweils ein bestimmter Sollwert für die Sauerstoffsättigung konstant gehalten ($pO_2 = 20\%$, 10% , 5% , 2%).

Die Ausgangskonzentration an Glucose in der Satzphase betrug 6 g/L. Die Glucosekonzentration der Zufütterlösung betrug 669,6 g/L. Das pH wurde durch automatische Dosierung von 10 %iger Phosphorsäure und 4 N Natronlauge als Korrekturflüssigkeiten auf einem Wert von 6,9 gehalten. Die Rührerdrehfrequenz wurde während der Kultivierungen auf einem Wert von $n = 500 \text{ min}^{-1}$ konstant gehalten.

Da beide Zufütterlösungen gleichzeitig zugefüttert wurden, ist in der jeweiligen Abbildung das Endvolumen des Dosierprofils für eine Zufütterlösung dargestellt. Um das gesamte zugefütterte Volumen zu berechnen, müssen die Werte für das Dosierprofil mit 2 multipliziert werden.

Zulaufkultivierung mit Regelung der Sauerstoffsättigung auf 20 %

In Abb. 4.29 ist eine Zulaufkultivierung dargestellt, bei der der pO_2 -Sollwert auf einen Wert von 20 % geregelt wurde.

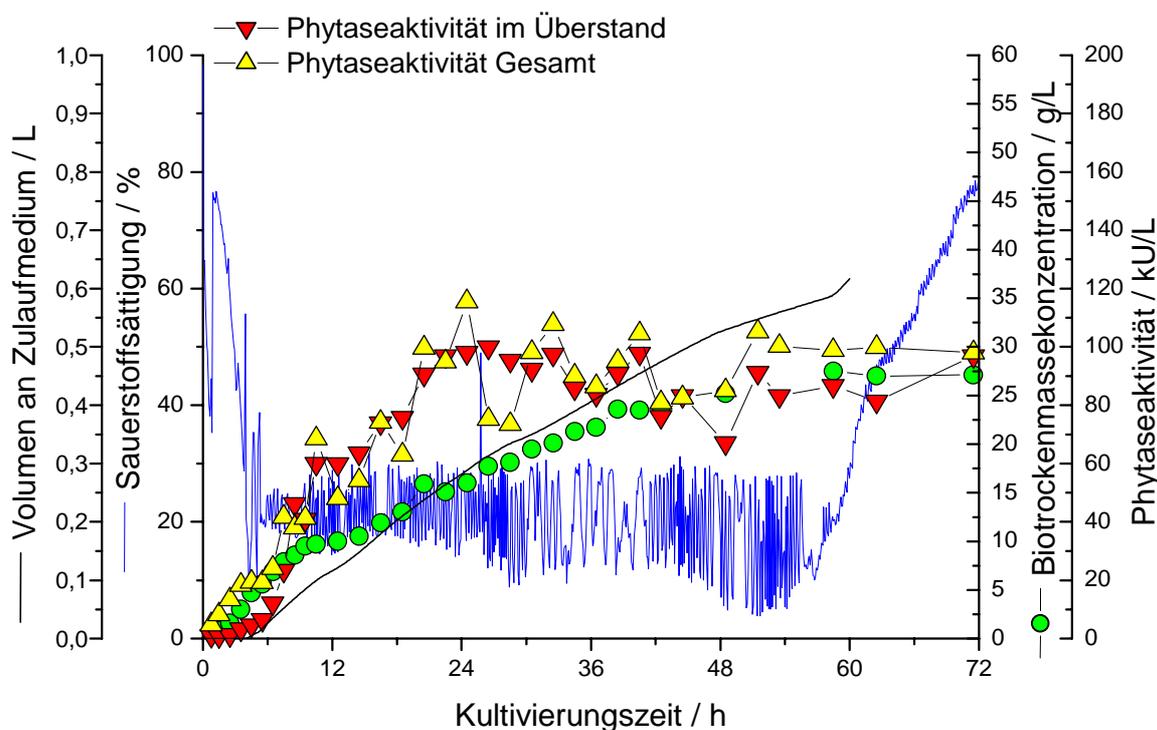


Abb. 4.29 Zulaufkultivierung unter Einhalten der Sauerstoffsättigung bei einem Sollwert von 20 %.

Anhand der Sauerstoffsättigungskurve ist zu sehen, daß die Zufütterung 4 h nach dem Animpfen begann. Die Schwankungen um den pO_2 -Sollwert von 20 % sind damit zu erklären, daß nicht die PID-Einstellungen gefunden werden konnten, die die Schwankungen hätten verringern können.

Die Biotrockenmasse stieg bis 11 h nach Animpfen stärker an als in der nachfolgenden Zeit. Zwischen 12 h und 48 h scheint das Wachstum der Zellen linear zu verlaufen. Am Ende der Fermentation erreichte die Biotrockenmassekonzentration einen Wert von 27 g/L.

Die Phytaseaktivität sowohl im Medium als auch in der Gesamtprobe erreichte schon nach 24 h Kultivierungszeit ihren maximalen Wert von 100 kU/L und somit ließe sich die Fermentation zu diesem Zeitpunkt beenden. Beide Kurven nehmen den gleichen Verlauf ein. Die Sekretion der Phytase ist nahezu vollständig.

Abb. 4.30 zeigt den Verlauf des CO_2 -Gehalt in der Abluft und der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit während der Kultivierung.

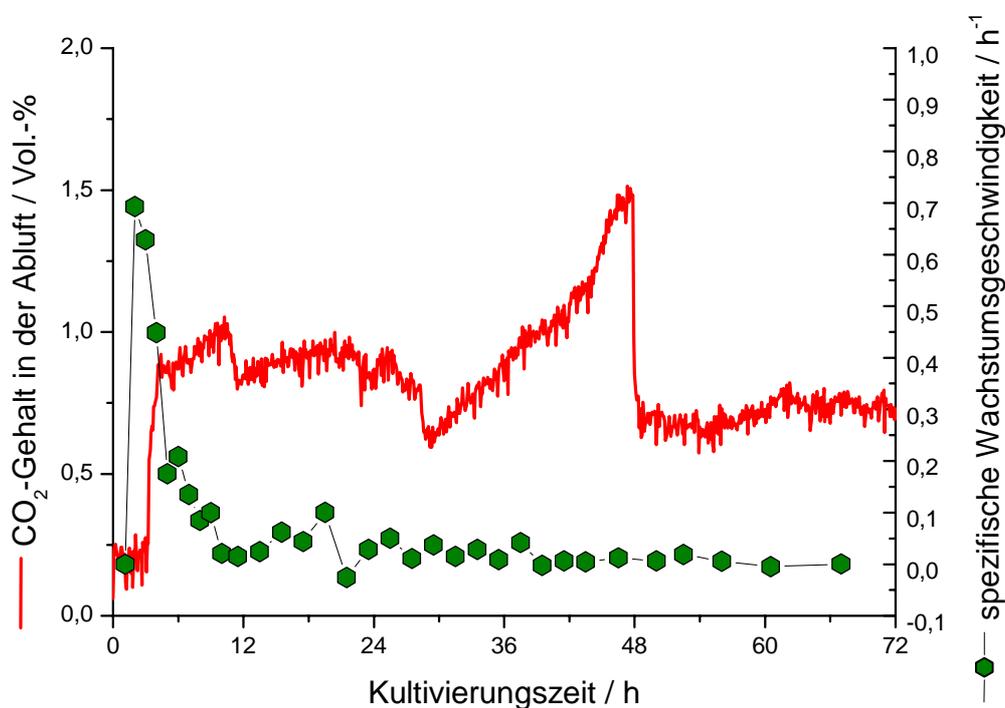


Abb. 4.30 Zulaufkultivierung unter Einhalten der Sauerstoffsättigung bei einem Sollwert von 20 %.

Die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit erreichte in der Satzphase (bis 4 h nach Animpfen) einen maximalen Wert von $0,7 \text{ h}^{-1}$. Mit Beginn der Zufütterung sank die

spezifische Wachstumsgeschwindigkeit und es wurden während der gesamten Kultivierung niedrige Werte beibehalten.

Der CO_2 -Gehalt in der Abluft steigt in der Satzphase und nimmt mit Beginn der Zufütterung einen konstanten Wert an. Ein Maximum ist bei etwa 46 h zu sehen. Dieses ist mit einem Druckanstieg zu erklären. Der Druck hatte sich aufgebaut, da ein Ventil verstopft war.

Abb. 4.31 zeigt den Verlauf der optischen Dichte, der Glucosekonzentration im Medium und der Acetatkonzentration im Medium während der Kultivierung. Während der Zufütterphase behielt die Glucosekonzentration einen niedrigen Wert bei, da die zugefütterte Glucose sofort verstoffwechselt wurde. Die Acetatkonzentration behielt während der Zufütterungsphase einen niedrigen Wert bei und stieg erst gegen Ende der Fermentation an, erreichte aber keinen Wert, der sich hätte wachstumsinhibierend auswirken können. Die optische Dichte erreichte nach 43 h einen maximalen Wert von 57 und sank anschließend wieder etwas ab.

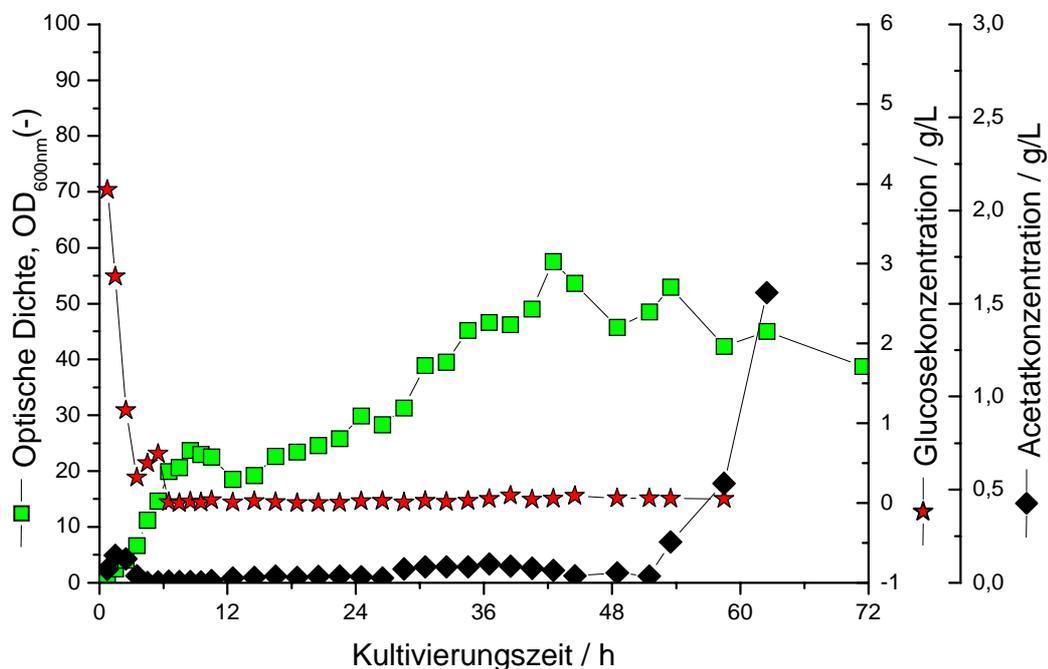


Abb. 4.31 Zulaufkultivierung unter Einhalten der Sauerstoffsättigung bei einem Sollwert von 20 %.

Zulaufkultivierung mit Regelung der Sauerstoffsättigung auf 10 %

In Abb. 4.32 ist eine Zulaufkultivierung dargestellt, bei der der pO_2 -Sollwert auf einen Wert von 10 % geregelt wurde.

Die Sauerstoffsättigungskurve zeigt, daß 4 h nach Animpfen die Zufütterung begonnen hat. Von diesem Zeitpunkt wurde die Sauerstoffsättigung bei 10 % gehalten. Die Biotrockenmasse stieg bis 48 h nach Animpfen stark an. Anschließend war der Anstieg geringer und die Biotrockenmassekonzentration erreichte am Ende der Fermentation einen Wert von 52 g/L.

Die Phytaseaktivität in der Gesamtprobe erreichte bei 36 h ihren maximalen Wert von 190 kU/L. Die Phytaseaktivität im Medium erreichte erst nach 50 h ihren maximalen Wert von 180 kU/L, so daß eine nahezu vollständige Sekretion erst 50 h nach Animpfen einsetzte und damit die Fermentation sich zu diesem Zeitpunkt beenden ließe.

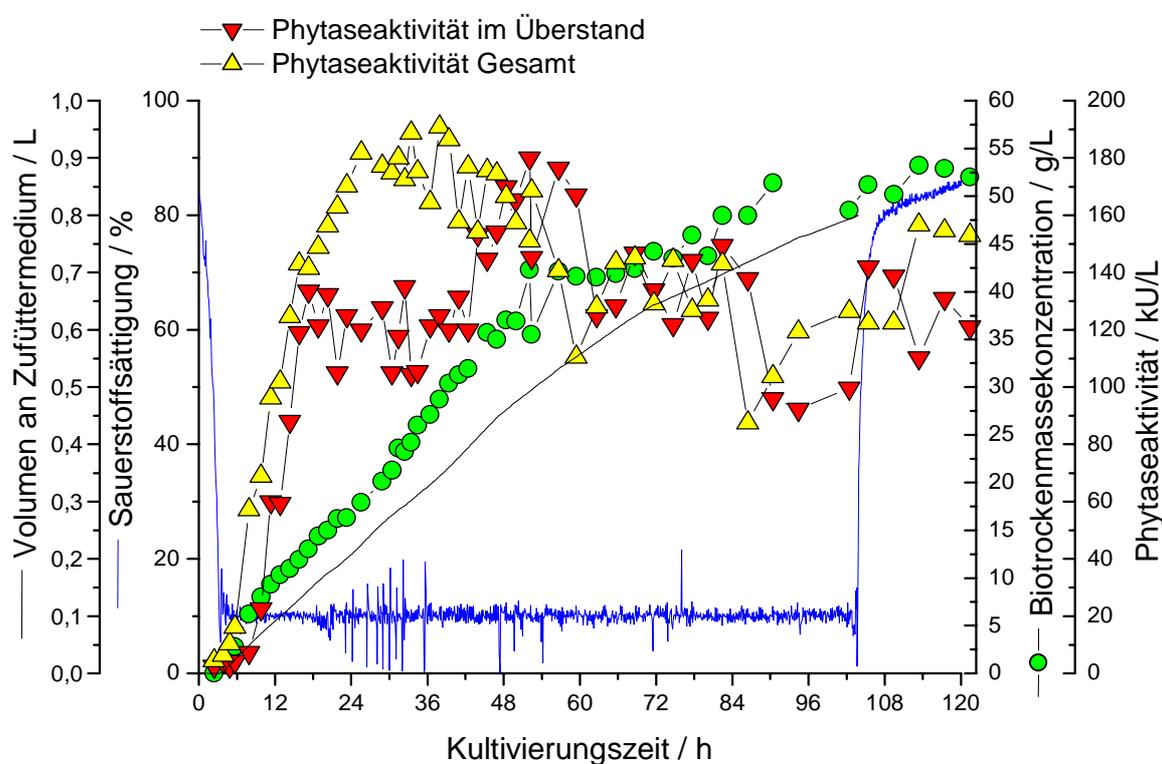


Abb. 4.32 Zulaufkultivierung unter Einhalten der Sauerstoffsättigung bei einem Sollwert von 10 %.

Abb. 4.33 zeigt den Verlauf des CO_2 -Gehaltes in der Abluft und der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit während der Kultivierung.

Der CO_2 -Gehalt stieg während der Satzphase (bis 4 h nach Animpfen) und sank erst 48 h nach Animpfen langsam ab. Dieses ist auch der Zeitpunkt, an dem die Biotrockenmassekonzentration nicht mehr stark anstieg. Zu diesem Zeitpunkt nimmt auch die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit einen geringeren Wert als in der Zeit davor ein.

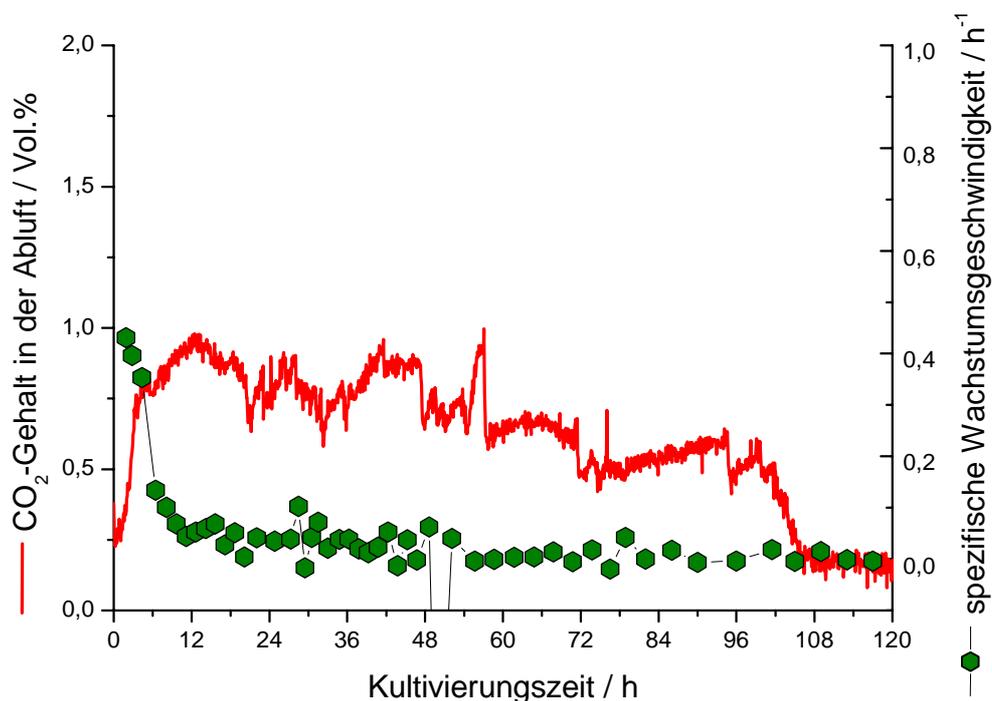


Abb. 4.33 Zulaufkultivierung unter Einhalten der Sauerstoffsättigung bei einem Sollwert von 10 %.

Abb. 4.34 zeigt den Verlauf der optischen Dichte, der Glucosekonzentration im Medium und der Acetatkonzentration im Medium während der Kultivierung.

Abb. 4.34 zeigt, daß während der Zufütterphase die Glucosekonzentration einen niedrigen Wert einnahm, da die zugeführte Glucose sofort verstoffwechselt wurde. Ein leichter Anstieg der Glucosekonzentration kann nach 60 h und nach 84 h nach Animpfen festgestellt werden. Da die Wachstumsgeschwindigkeiten zu diesen Zeitpunkten niedrig war, wurde die Glucose langsamer verstoffwechselt als zugefüttert. Die Acetatkonzentration behielt während der Zufütterungsphase einen niedrigen Wert bei. Sie erreichte keinen Wert, der sich hätte wachstumsinhibierend

auswirken können. Die optische Dichte erreichte nach 50 h einen maximalen Wert von 90 an und sank anschließend wieder etwas ab.

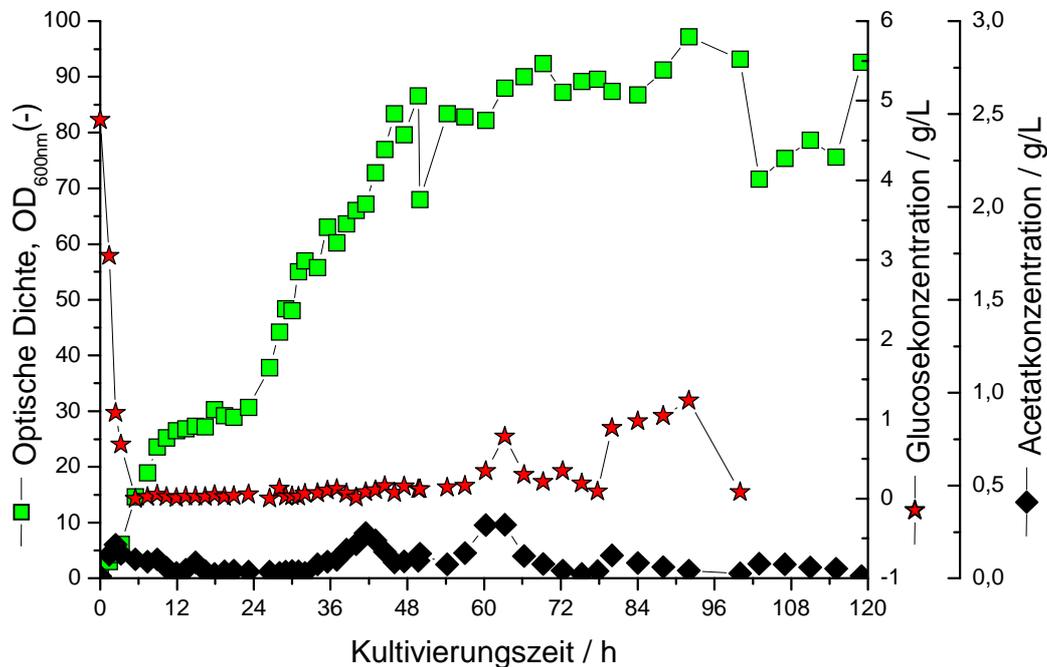


Abb. 4.34 Zulaufkultivierung unter Einhalten der Sauerstoffsättigung bei einem Sollwert von 10 %.

Zulaufkultivierung mit Regelung der Sauerstoffsättigung auf 5 %

In Abb. 4.35 ist eine Zulaufkultivierung dargestellt, bei der der pO_2 -Sollwert auf einen Wert von 5 % geregelt wurde.

Die Sauerstättigungskurve zeigt, daß 4 h nach Animpfen die Zufütterung begonnen hat. Von diesem Zeitpunkt wurde die Sauerstoffsättigung bei 5 % gehalten. Die Biotrockenmassekonzentration stieg bis 55 h nach Animpfen stark an. Anschließend war der Anstieg geringer und die Biotrockenmassekonzentration erreichte am Ende der Fermentation einen Wert von 43 g/L.

Die Phytaseaktivitäten im Medium und in der Gesamtprobe erreichten bei 36 h einen maximalen Wert von 180 kU/L. Die Sekretion der Phytase hat somit vollständig stattgefunden und die Fermentation ließe sich zu diesem Zeitpunkt beenden.

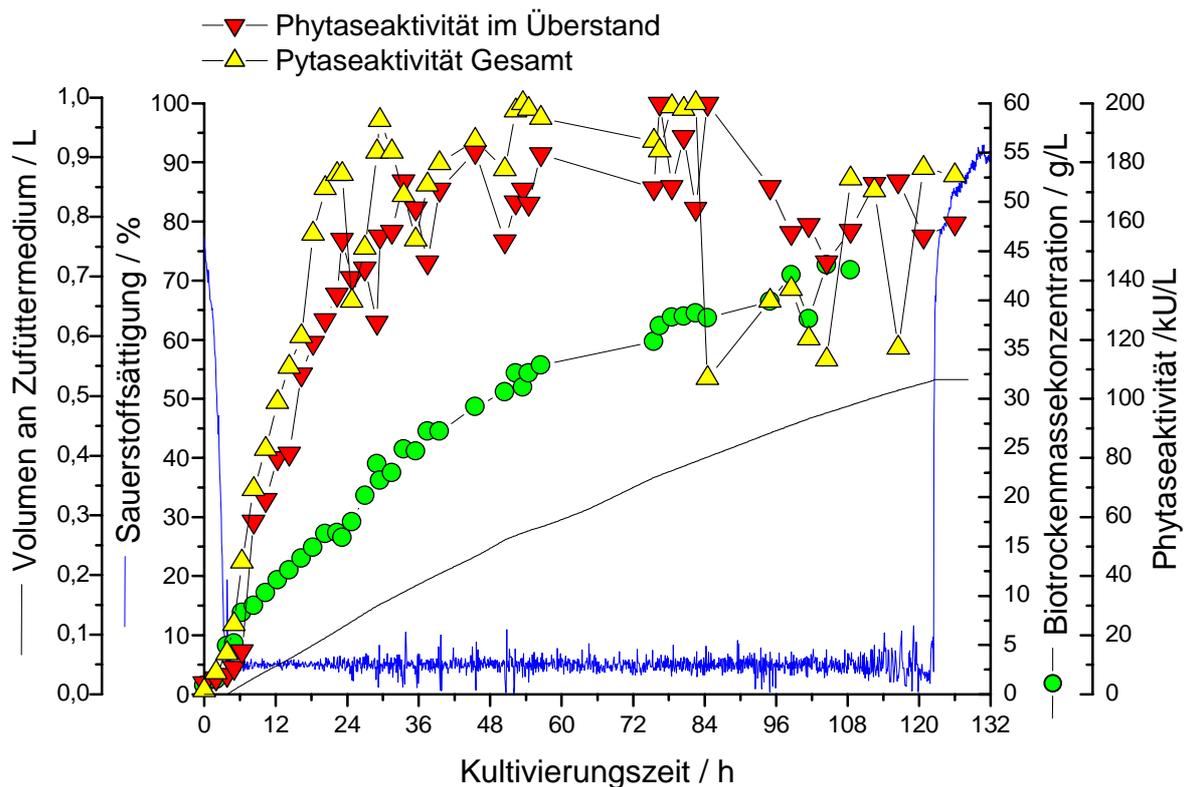


Abb. 4.35 Zulaufkultivierung unter Einhalten der Sauerstoffsättigung bei einem Sollwert von 5 %.

Abb. 4.36 zeigt den Verlauf des CO_2 -Gehaltes in der Abluft und der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit während der Kultivierung.

Der CO_2 -Gehalt stieg während der Satzphase (bis 4 h nach Animpfen) und hielt während der Kultivierung etwa einen konstanten Wert ein.

Die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit zeigte in der Satzphase höhere Werte als in der Zufütterphase.

Abb. 4.37 zeigt, daß während der Zufütterphase die Glucosekonzentration einen niedrigen Wert einnahm, da die zugefütterte Glucose sofort verstoffwechselt wurde. Die Acetatkonzentration behielt während der Zufütterungsphase einen niedrigen Wert bei. Sie erreichte keinen Wert, der sich hätte wachstumsinhibierend auswirken können. Die optische Dichte erreichte am Ende der Fermentation einen maximalen Wert von 80 und sank anschließend wieder etwas ab.

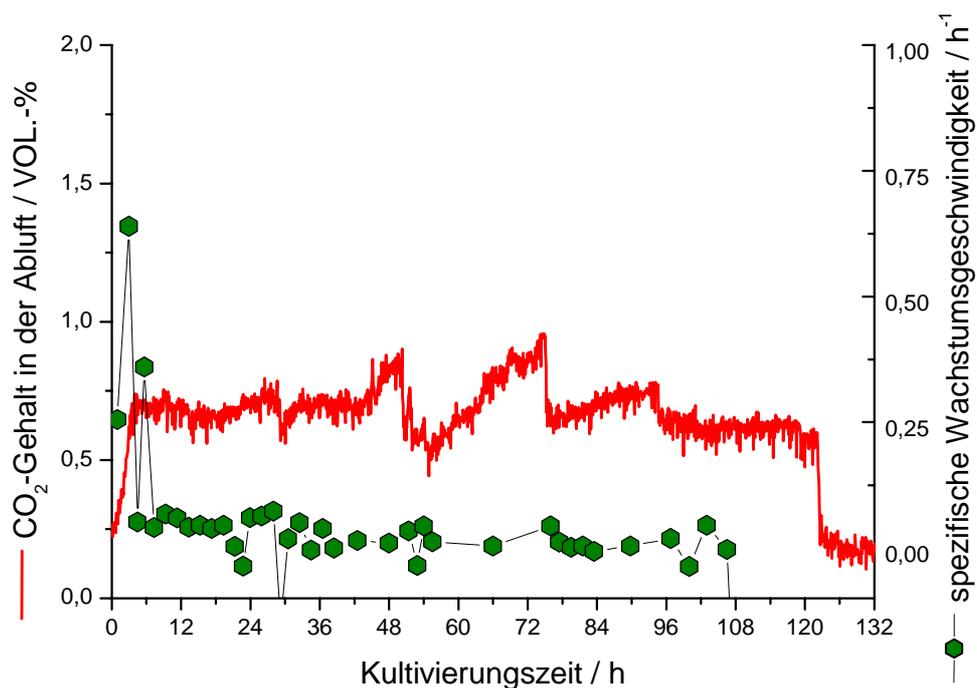


Abb. 4.36 Zulaufkultivierung unter Einhalten der Sauerstoffsättigung bei einem Sollwert von 5 %.

Abb. 4.37 zeigt den Verlauf der optischen Dichte, der Glucosekonzentration im Medium und der Acetatkonzentration im Medium während der Kultivierung.

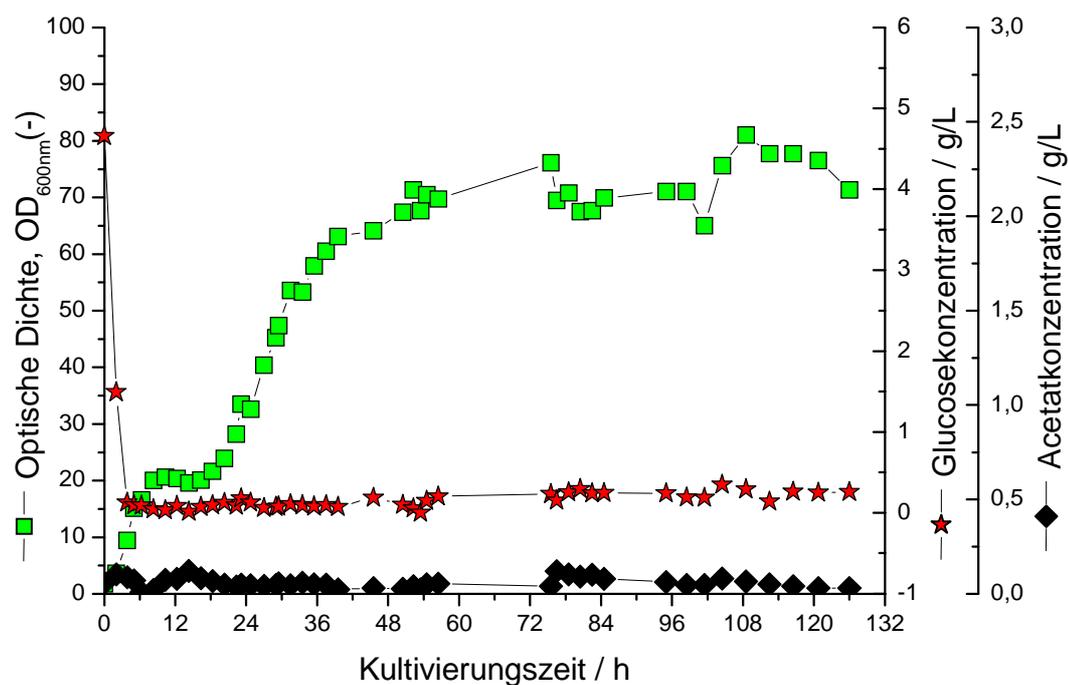


Abb. 4.37 Zulaufkultivierung unter Einhalten der Sauerstoffsättigung bei einem Sollwert von 5 %.

Zulaufkultivierung mit Regelung der Sauerstoffsättigung auf 2 %

In Abb. 4.38 ist eine Zulaufkultivierung dargestellt, bei der der pO_2 -Sollwert auf einen Wert von 2 % geregelt wurde.

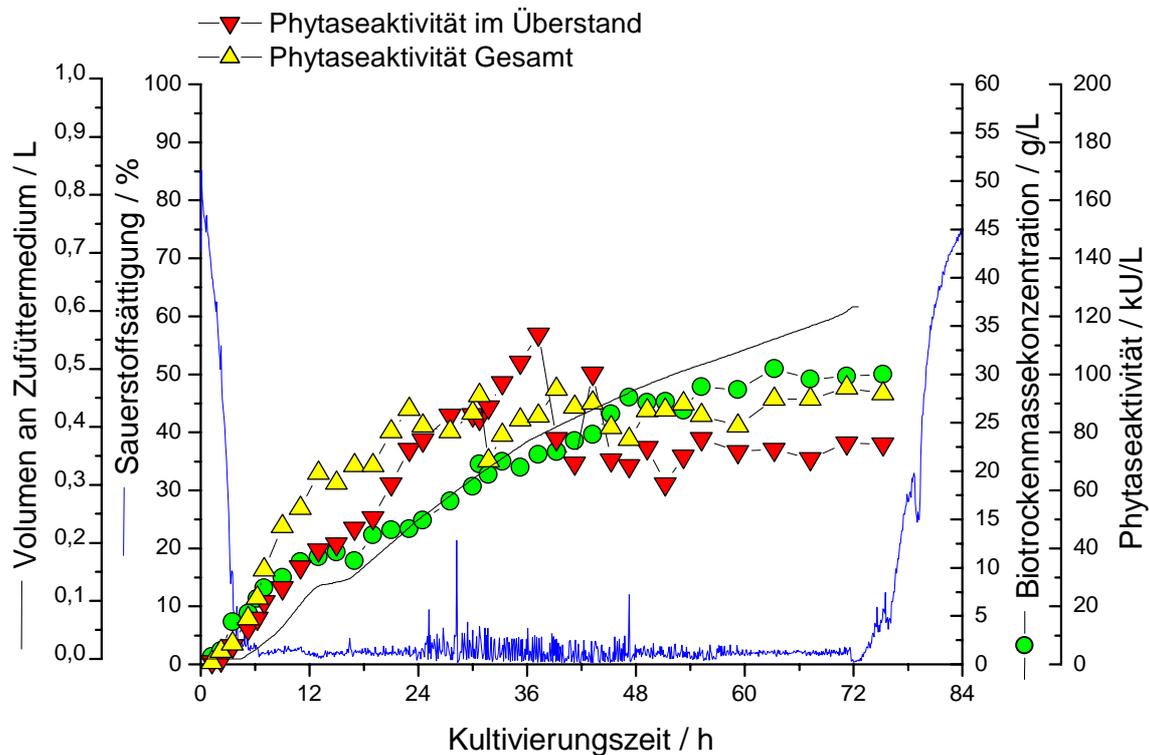


Abb. 4.38 Zulaufkultivierung unter Einhalten der Sauerstoffsättigung bei einem Sollwert von 2 %.

Die Sauerstoffsättigungskurve zeigt, daß 4,25 h nach Animpfen die Zufütterung begonnen hat. Von diesem Zeitpunkt wurde die Sauerstoffsättigung bei 2 % gehalten.

Die Biotrockenmassekonzentration erreichte am Ende der Fermentation einen Wert von 30 g/L. Die Phytaseaktivität in der Gesamtprobe nahm bis 24 h nach Animpfen einen höheren Wert an als die Phytaseaktivität im Medium. Die vollständige Sekretion der Phytase begann von diesem Zeitpunkt an.

Den maximalen Wert von 120 kU/L erreichte die Phytaseaktivität im Medium 36 h nach Animpfen. Zu diesem Zeitpunkt ließe sich die Fermentation beenden, da kein weiterer Anstieg der Phytaseaktivität im Medium zu verzeichnen ist.

Abb. 4.39 zeigt den Verlauf des CO_2 -Gehaltes in der Abluft und der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit während der Kultivierung.

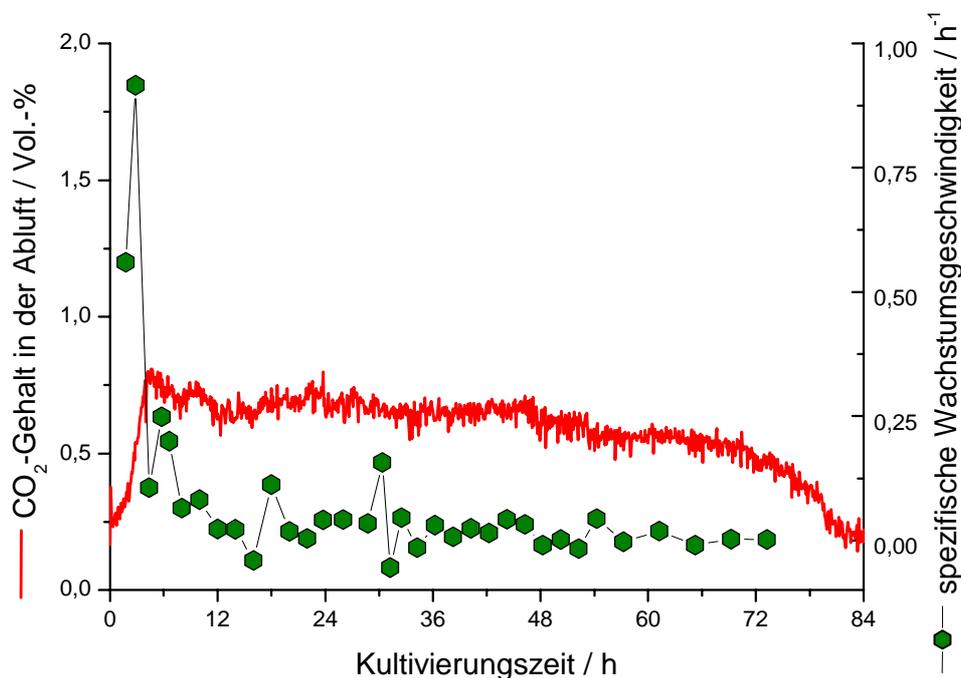


Abb. 4.39 Zulaufkultivierung unter Einhalten der Sauerstoffsättigung bei einem Sollwert von 2 %.

Der CO_2 -Gehalt stieg während der Satzphase (bis 4 h nach Animpfen) und hielt während der Zufütterphase einen etwa konstanten Wert ein.

Die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit zeigte in der Satzphase höhere Werte als in der Zufütterphase.

Abb. 4.40 zeigt den Verlauf der optischen Dichte, der Glucosekonzentration im Medium und der Acetatkonzentration im Medium während der Kultivierung. Die Glucosekonzentration nimmt während der Zufütterphase einen niedrigen Wert an. Die Acetatkonzentration erreichte 12 h nach Animpfen einen maximalen Wert von 2,5 g/L. Zu diesem Zeitpunkt läßt sich an der optischen Dichte und an der Biotrockenmassekonzentration (s. Abb. 4.38) ein Stillstand im Zellwachstum erkennen. Die Acetatkonzentration hat sich zu diesem Zeitpunkt wachstumsinhibierend ausgewirkt. Diese ist ebenfalls in Abb. 4.38 an der Kurve für das Volumen an Zufüttermedium zu erkennen. Erst als das Acetat 13 h nach Animpfen verstoffwechselt war, begann erneut das Zellwachstum und die optische

Dichte erreichte nach 50 h einen Wert von 50. Anschließend sank die optische Dichte etwas ab.

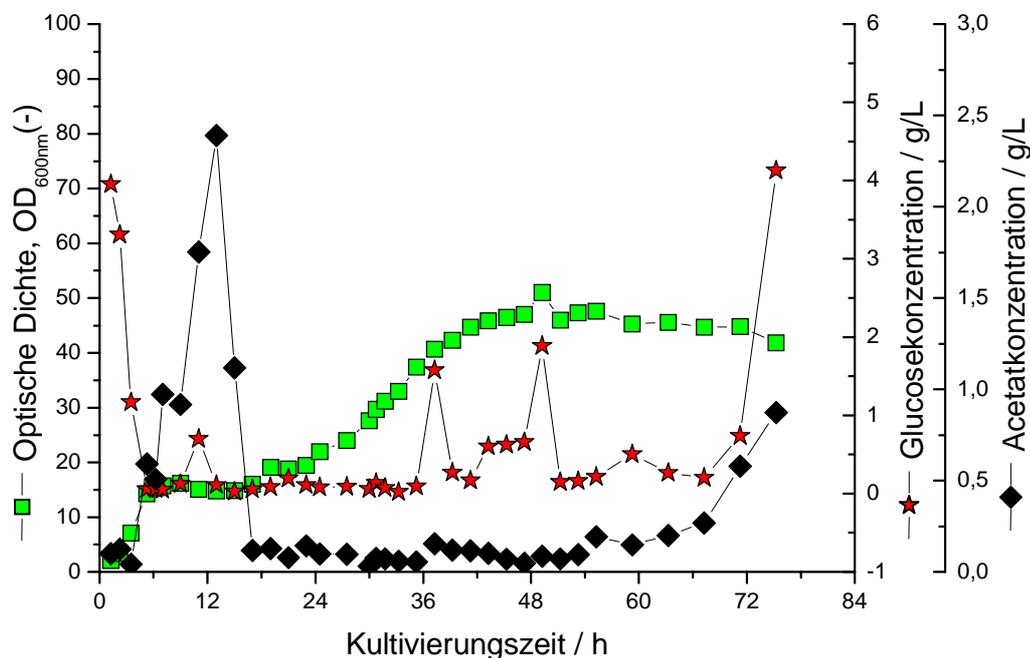


Abb. 4.40 Zulaufkultivierung unter Einhalten der Sauerstoffsättigung bei einem Sollwert von 2 %.

Vergleich der Zulaufkultivierungen unter Einhalten der Sollwerte für die Sauerstoffsättigung von $pO_2 = 20\%$, 10% , 5% und 2%

Abb. 4.41 zeigt einen Vergleich der maximalen Phytaseaktivitäten und der maximalen Biotrockenmassekonzentrationen der über die Sauerstoffsättigung geregelten Zulaufkultivierungen. Es zeigt sich, daß die Kultivierungen, bei denen der pO_2 auf 10% und 5% geregelt war, die höchsten Phytaseaktivitäten im Medium und die höchste Biotrockenmassekonzentration aufwiesen. Im Gegensatz dazu wiesen die Kultivierungen, bei denen der pO_2 auf 20% und 2% geregelt war, deutlich geringere Werte für die Phytaseaktivität im Medium und für die Biotrockenmassekonzentration auf.

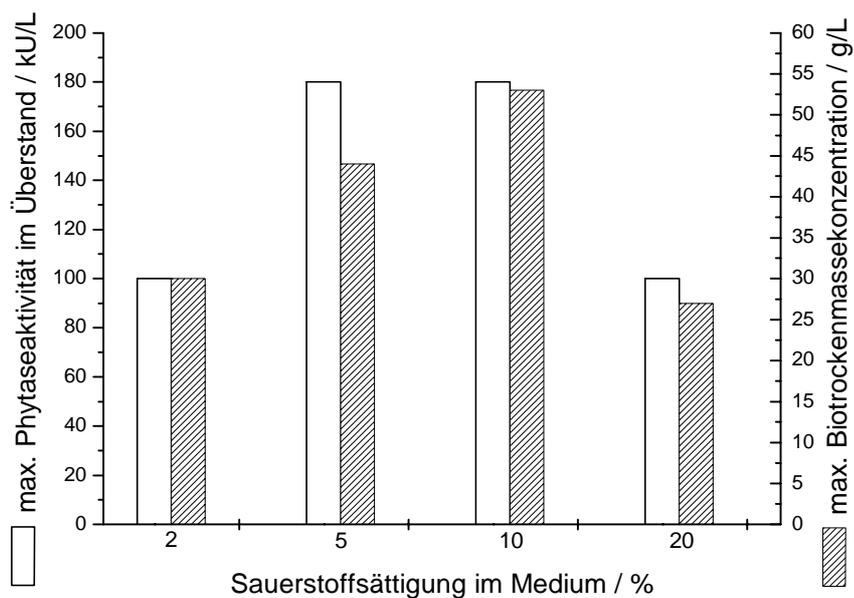


Abb. 4.41 Vergleich der Zulaufkultivierungen unter Einhalten der Sollwerte für die Sauerstoffsättigung von $pO_2 = 20\%$, 10% , 5% und 2% .

Abb. 4.42 zeigt die Selektivitäten S_{rx} der Kultivierungen, deren pO_2 während der Zufütterphase auf 20% , 10% , 5% und 2% konstant gehalten wurde.

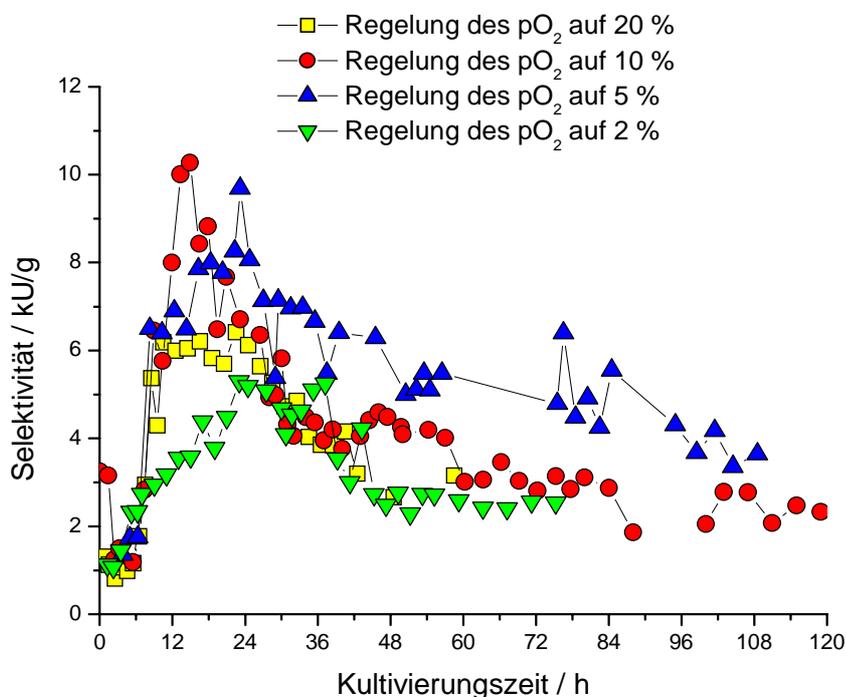


Abb. 4.42 Selektivität S_{rx} der Zulaufkultivierungen mit Regelung der Sauerstoffsättigung auf 20% , 10% , 5% und 2% .

Die höchsten Werte von 10 kU/g 24 h nach Kultivierungszeit wurde bei den Kultivierungen erreicht, deren pO_2 auf 10 % und auf 5 % geregelt wurde. Damit ist die Selektivität doppelt so hoch wie bei den Kultivierungen, bei denen eine konstante Glucosekonzentration im Medium während der Zufütterphase eingehalten worden war.

Anhand der Kultivierungsverläufe in den Abb. 4.29, Abb. 4.32, Abb.4.35 und Abb. 4.38 ist zu erkennen, daß die Phytaseaktivität im Medium und in der Gesamtprobe einen maximalen Wert aufwies, bevor die Zufütterung beendet war. Betrachtet man nur die Phytaseausbeute im Medium, hätten die Kultivierungen nach 48 h beendet werden können.

Zu beobachten ist sowohl anhand der Kurven für die Biotrockenmassekonzentration als auch an den spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten, daß das Zellwachstum nach ca. 48 h bei allen Fermentationen sich deutlich verlangsamt, obwohl die Zufütterung noch nicht beendet war.

Eine Limitierung des Zellwachstums durch Acetat kann ausgeschlossen werden, da Acetat nur in geringen Mengen entstanden ist bzw. sofort verstoffwechselt wurde.

Da die Rührerfrequenz nur 500 min^{-1} betrug, ist es möglich, daß dadurch der Sauerstoffeintrag bei höheren Zelldichten unzureichend war.

Die optischen Dichten aller Fermentationen wiesen ebenfalls einen maximalen Wert vor Beendigung der Zufütterung auf. Allerdings sank der Wert für die optische Dichte bis zum Ende der Fermentationen wieder etwas ab.

Es wurde eine Kultivierung bei einem Sollwert von $pO_2 = 10 \%$ mit dem Stamm *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt. Der Stamm enthielt weder die Sekretionskassette noch das Phytasegen. Es sollte damit das Verhalten der optischen Dichte während der Zufütterphase untersucht werden. Abb. 4.43 zeigt den Verlauf einer Zulaufkultivierung des Stammes *E. coli* BL21(DE3) bei einem Sollwert für die Sauerstoffsättigung von 10 %.

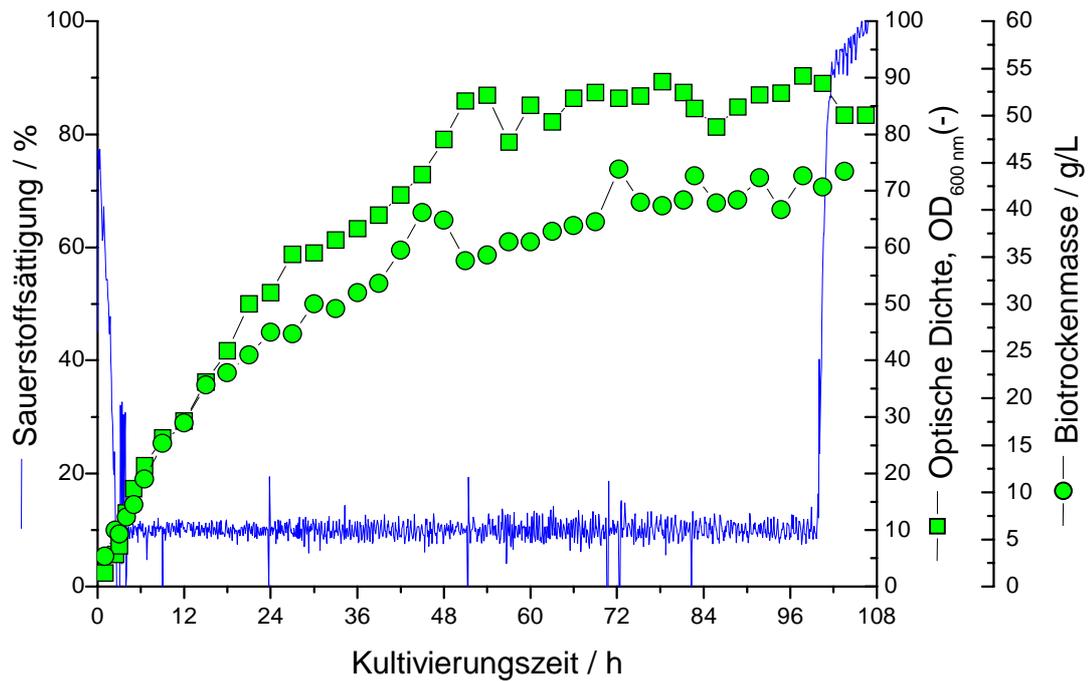


Abb. 4.43 Zulaufkultivierung des Stammes *E. coli* BL21(DE3) unter Einhalten der Sauerstoffsättigung bei einem Sollwert von 10 %.

Abb. 4.43 zeigt, daß für die optische Dichte wie bei den oben genannten Kultivierungen bei etwa 48 h ein maximaler Wert erreicht wurde, obwohl die Zufütterphase noch nicht beendet war. Allerdings war bei dieser Kultivierung kein Abfall der optischen Dichte gegen Ende der Fermentation zu erkennen. Es ist also, anzunehmen, daß die Sekretionskassette und das Phytasegen eine Belastung für die Zelle bei hohen Zelldichten darstellen. Allerdings kann dies keine Erklärung für die Wachstumslimitierung sein. Auch bei dieser Fermentation wurde eine Biotrockenmassekonzentration von 45 g/L erreicht.

Abb. 4.44 zeigt den Verlauf des Volumens an Zufüttermedium und der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit während der Kultivierung.

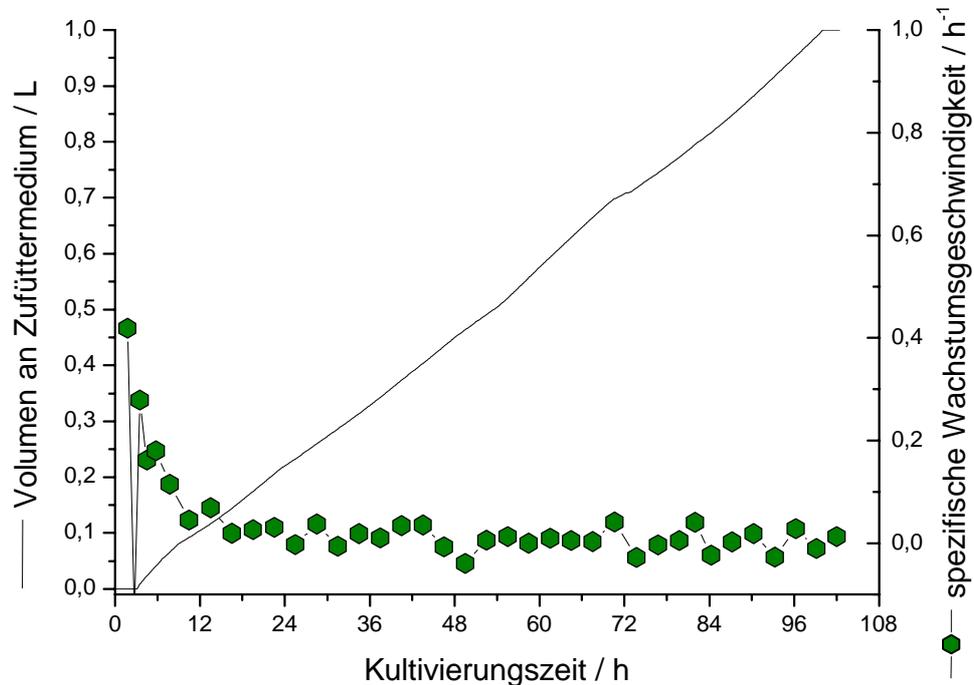


Abb. 4.44 Zulaufkultivierung des Stammes *E. coli* BL21(DE3) unter Einhalten der Sauerstoffsättigung bei einem Sollwert von 10 %.

Die Wachstumsgeschwindigkeit war wie bei den oben genannten Fermentationen in der Satzphase maximal und sank leicht während der Kultivierung ab.

Abb. 4.45 zeigt die Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/S}$ in Abhängigkeit der Kultivierungszeit für die Kultivierungen mit konstant geregelter Sauerstoffsättigung. Für die Berechnung der Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/S}$ wurde die Biotrockenmasse auf die verbrauchte Glucosemenge bezogen.

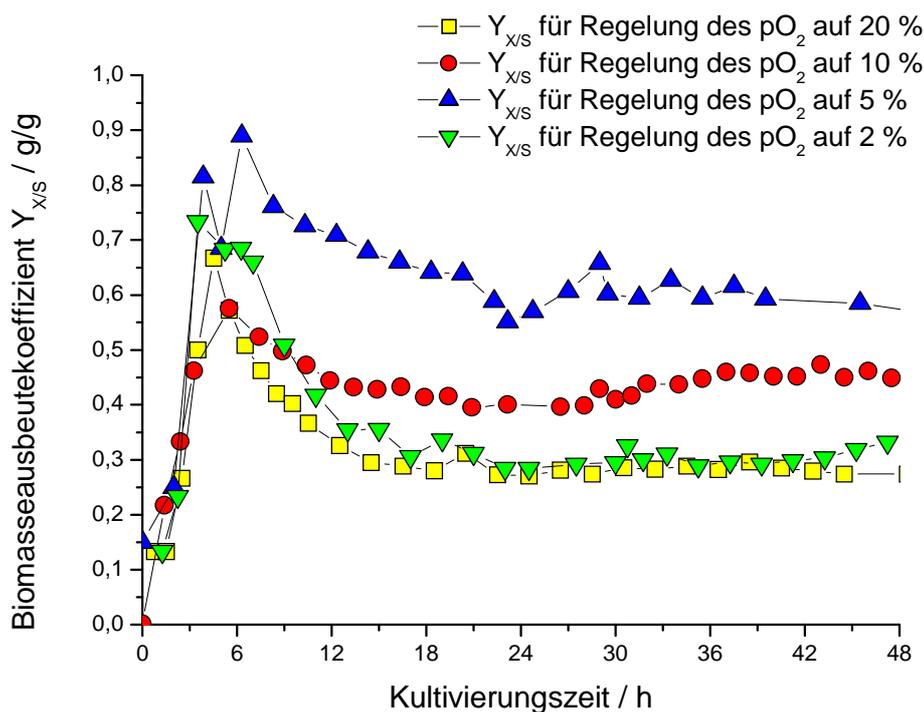


Abb. 4.45 Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/S}$ der Zulaufkultivierungen mit Regelung der Sauerstoffsättigung auf 20 %, 10 %, 5 % und 2 %.

Abb. 4.45 zeigt, daß bei allen vier Fermentationen die Biomasseausbeutekoeffizienten bis 6 h nach dem Animpfen anstiegen, anschließend wieder absanken und nach 12 h nach Animpfen einen etwa konstanten Wert bis zum Ende der Fermentation einnahmen.

Die Kultivierung mit Regelung des pO_2 auf 5 % zeigte doppelt so hohe Werte für die Biomasseausbeutekoeffizienten wie die Fermentationen mit Regelung des pO_2 auf 2 % und auf 20 %. Bei diesen Fermentationen lagen die Kurven für die Biomasseausbeutekoeffizienten fast übereinander.

Abb. 4.46 zeigt die Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/S}$ in Abhängigkeit der Kultivierungszeit für die Kultivierungen mit konstant geregelter Sauerstoffsättigung. Für die Berechnung der Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/S}$ wurde die gebildete Menge an Phytase auf die verbrauchte Glucosemenge bezogen. Die Berechnung der gebildeten Menge an Phytase erfolgte, indem die zu jedem Zeitpunkt der Kultivierungen gemessene Phytaseaktivität mit dem zu jedem Zeitpunkt vorhandenen Gesamtvolumen multipliziert und durch die spezifischen Aktivität von 1018 kU/g dividiert wurde.

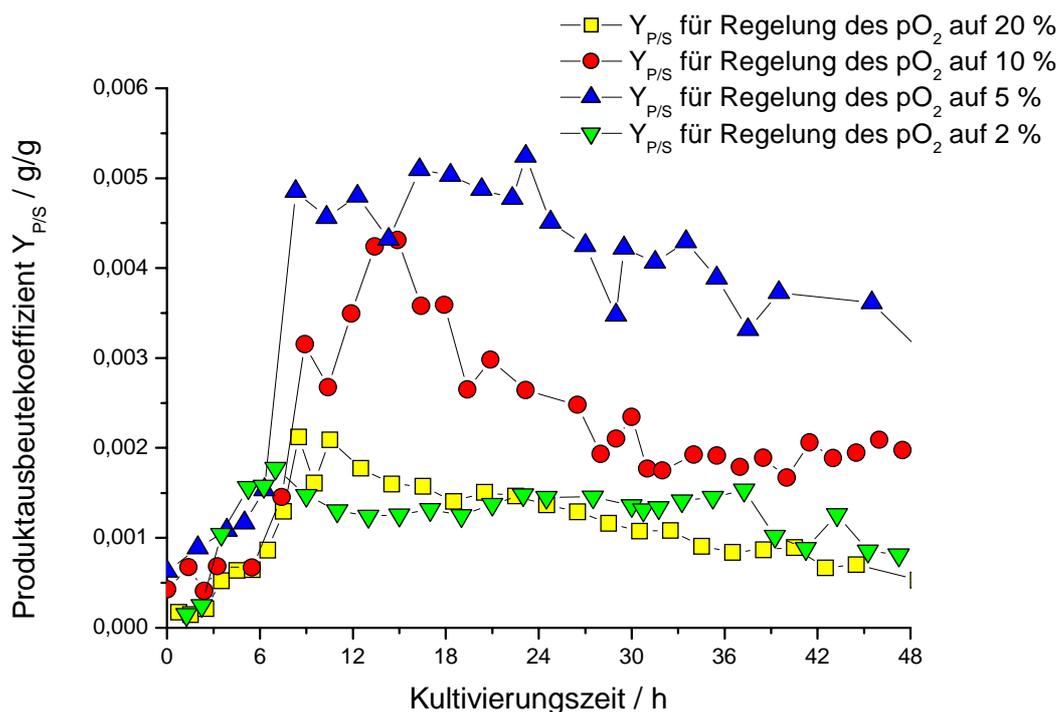


Abb. 4.46 Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/S}$ der Zulaufkultivierungen mit Regelung der Sauerstoffsättigung auf 20 %, 10 %, 5 % und 2 %.

Abb. 4.46 zeigt, daß bei allen vier Fermentationen die Produktausbeutekoeffizienten zu Beginn der Fermentationen anstiegen und 12 h nach dem Animpfen wieder etwas abfielen. Die Kultivierungen mit Regelung des pO_2 auf 5 % und auf 10 % nahmen doppelt so hohe Werte für die Produktausbeutekoeffizienten ein wie die Kultivierungen mit Regelung des pO_2 auf 2 % und auf 20 %, deren Produktausbeutekoeffizientenkurve sehr ähnlich verläuft.

Abb. 4.47 zeigt die Selektivität S_{PX} in Abhängigkeit der Kultivierungszeit für die Kultivierungen mit konstant geregelter Sauerstoffsättigung. Für die Berechnung der Selektivität S_{PX} wurde die gebildete Menge an Phytase auf die gebildete Menge an Biomasse bezogen.

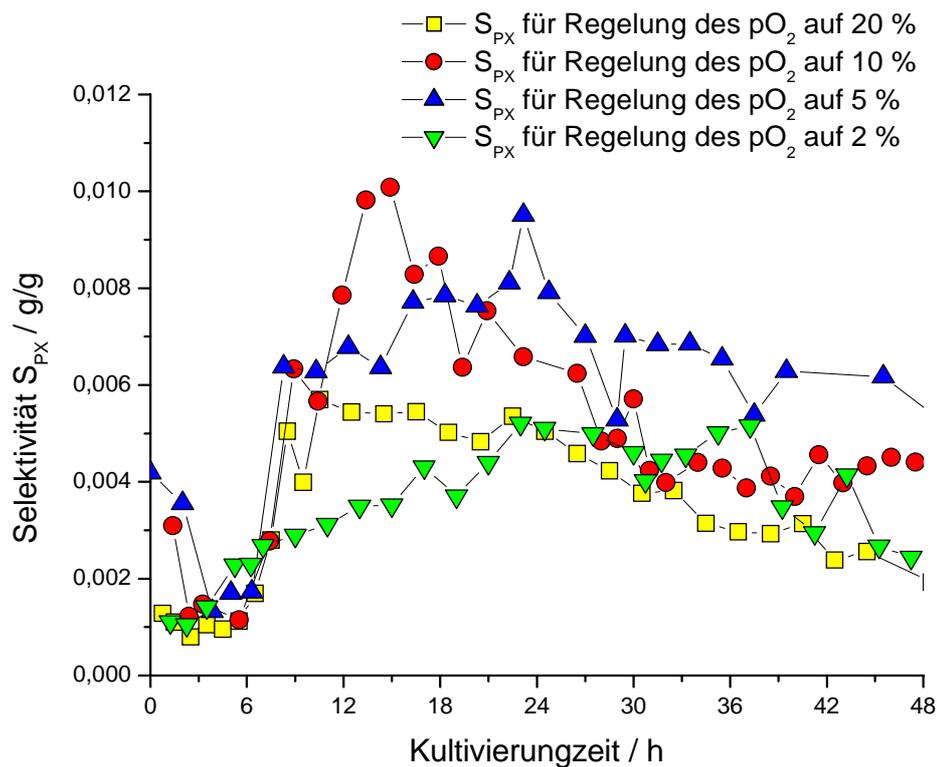


Abb. 4.47 Selektivität S_{PX} der Zulaufkultivierungen mit Regelung der Sauerstoffsättigung auf 20 %, 10 %, 5 % und 2 %.

Abb. 4.47 zeigt, daß bei allen vier Fermentationen die Selektivitäten bis etwa 18 h nach dem Animpfen anstiegen und anschließend wieder etwas abfielen. Die Kultivierungen mit Regelung des pO_2 auf 5 % und auf 10 % erreichten höhere Werte als die Kultivierungen mit Regelung des pO_2 auf 2 % und auf 20 %.

Es zeigt sich, daß mit Hilfe der Kultivierungen mit Regelung des pO_2 auf 5 % und auf 10 % die höchsten Phytaseausbeuten, die höchste Biotrockenmassekonzentration und die jeweils höchsten Werte für die jeweiligen Ausbeutekoeffizienten im Vergleich zu den Kultivierungen mit Regelung des pO_2 auf 2 % und auf 20 % erreicht werden konnten. Im Vergleich zu der Kultivierungsmethode, bei der die Glucosekonzentration während der Zufütterung konstant gehalten wurde, ist es gelungen, die Ausbeute an Phytase im Überstand und die Biomassekonzentration mit Hilfe der Kultivierungsmethode mit Regelung des pO_2 auf einen konstanten Wert ($pO_2 = 5 \%$ und $pO_2 = 10 \%$) um 20 % zu steigern.

Vergleich der Verteilung der Kohlenstoff- und Stickstoffanteile am Anfang und am Ende der Fermentationen mit Regelung des pO₂ auf 20 %, 10 %, 5 % und 2 %

Tab. 4.4 sind die Kohlenstoffanteile und die Stickstoffanteile in den Zellen und im Überstand der Fermentationen mit Regelung des pO₂ auf 20 %, 10 %, 5 % und 2 % angegeben.

Tab. 4.4 Verteilung der Kohlenstoff- und Stickstoffanteile am Ende der Fermentation mit Regelung des pO₂ auf 20 %, 10 %, 5 % und 2 %.

	pO ₂ = 20 %	pO ₂ = 10 %	pO ₂ = 5 %	pO ₂ = 2 %
eingesetzte Menge C	153 g	207 g	145,5 g	156 g
C-Anteil CO ₂	38,6 g (25,3 %)	95,3 g (46,0 %)	32,4 g (22,3 %)	54,7 g (35,0 %)
C-Anteil Zellen	44,6 g (29,2 %)	52,7 g (25,5 %)	54,2 g (37,2 %)	56,3 g (36,0 %)
C-Anteil Überstand	70,3 g (46,0 %)	58,8 g (28,4 %)	59,6 g (40,9 %)	45,3 g (29,0 %)
eingesetzte Menge N	45 g	57,3 g	38,5 g	43,5 g
N-Anteil Zellen	8,2 g (18,0 %)	12,4 g (21,6 %)	9,7 g (25 %)	9,4 g (21,7 %)
N-Anteil Überstand	36,4 g (82,0 %)	44,8 g (78,2 %)	28,8 g (75 %)	34,1 g (78,3 %)

Bei allen vier Fermentationen ist die Tendenz der Verteilung von Kohlenstoff und Stickstoff ähnlich: Der Kohlenstoffanteil in den Zellen, im Überstand und im Kohlenstoffdioxid besteht aus je einem Drittel des insgesamt umgesetzten Kohlenstoffs. Ein Viertel des Stickstoffanteils läßt sich in den Zellen wiederfinden und Dreiviertel im Überstand. Da Phytase nur 0,6 % des gesamten Proteingehaltes im Überstand ausmacht, läßt sich abschätzen, daß nur ein sehr geringer Teil des eingesetzten Kohlenstoffs und Stickstoffs für die Phytaseproduktion verwendet wird.

Zu bemerken ist, daß der Kohlenstoffanteil im Überstand recht hoch ist. Da am Ende der Fermentationen wie oben gezeigt, die Konzentrationen an Glucose und Acetat gering sind, bleibt zu analysieren, in welcher Form der Kohlenstoff im Überstand vorliegt.

Tab. 4.5 zeigt das Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff am Anfang der Fermentationen und am Ende.

Tab. 4.5 C/N-Verhältnis für die Fermentationen mit Regelung des pO_2 auf 20 %, 10 %, 5 % und 2 %.

	$pO_2 = 20 \%$	$pO_2 = 10 \%$	$pO_2 = 5 \%$	$pO_2 = 2 \%$
C/N-Verhältnis Anfang	4,0	4,3	4,5	3,8
C/N-Verhältnis Ende, Zellen	5,4	4,3	6,6	5,9
C/N-Verhältnis Ende, Überstand	1,9	1,3	2,0	1,3

Das C/N-Verhältnis ist im Überstand am Ende der Fermentationen nur noch halb so groß wie am Anfang. Es ist zu erkennen, daß sich der größere Anteil des Stickstoffs im Überstand wiederfindet.

4.3 Enzymatische Eigenschaften der Phytase-His₆

4.3.1 Gewinnung der Phytase-His₆ durch Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3)pPhyt190

Um Phytase in reiner Form zu erhalten, wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3)pPhyt190 konstruiert (s. 3.3). Dieser sekretiert Phytase mit C-terminalem His-tag. So konnte die Phytase mittels einer Ni-NTA-Säule aufgereinigt und in reinem Zustand erhalten werden.

Um Phytase-His₆ zu produzieren, wurde eine Zulauffermentation in einem 7 L-Bioreaktor in einem Glucose-Mineralsalz-Medium nach Riesenberg (s. 3.4.1) mit dem Stamm *E. coli* BL21(DE3)pPhyt190 durchgeführt. Die Ausgangsglucosemenge betrug 6 g/L. Als Zufütterlösungen wurde eine Lösung aus Glucose ($C_{\text{Glucose}} = 669,5$ g/L), Magnesiumsulfat und Spurenelementen und ein Ammoniumphosphatpuffer verwendet, wie in 3.4.1 beschrieben. Beide Zufütterlösungen wurden in gleichem Maße zugefüttert. Die Regelungsstrategie der Zufütterung bestand darin, daß bei einer Unterschreitung der Sauerstoffsättigung (pO_2) im Medium von 30 % die Rührerdrehzahl um 2 % erhöht wurde. Dabei wurde mit einer Rührerdrehfrequenz von 250 min^{-1} begonnen.

Überschreitet die Sauerstoffsättigung im Medium aufgrund von Nährstoffmangel einen Wert von 60 %, wurde die Fütterungspumpe für beide Zufütterlösungen angeschaltet. Alle weiteren Bedingungen wurden, wie in 3.5.4 beschrieben, eingehalten.

Nach 72 h wurde eine optische Dichte von 63 erreicht. Nach Beendigung der Kultivierung wurde die Kulturbrühe zweimal für 40 min abzentrifugiert (9000 min^{-1}) und sterilfiltriert. Der Überstand enthielt eine Phytaseaktivität von 100 kU/L.

4.3.2 Aufreinigung der Phytase-His₆ mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie

Für die säulenchromatographische Aufreinigung der Phytase-His₆ wurde der unter Kapitel 4.4.1 gewonnene Überstand verwendet.

Die Ni-NTA-Säule (s. Kapitel 3.7.1) wurde mit 150 mL klarem Überstand beschickt. Die anschließende Elution erfolgte über einen linearen Imidazolgradienten bei einem Volumenstrom von $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Die erhaltenen Fraktionen wurden auf Phytaseaktivität, wie in 3.6.5 beschrieben, untersucht. Die Überprüfung der Reinheit der phytasehaltigen Fraktionen erfolgte durch 12,5 %ige SDS-PAGE (Abb. 4.48).

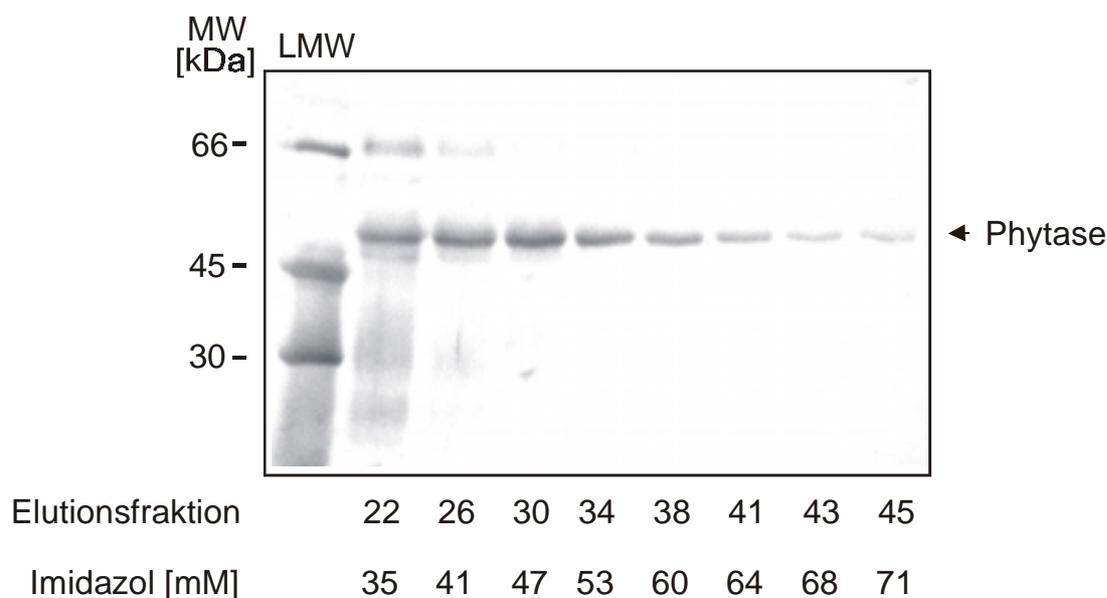


Abb. 4.48 SDS-PAGE der Elutionsfraktionen von Phytase-His₆ nach Aufarbeitung mit Ni-NTA über einen linearen Imidazolgradienten.

Die Desorption der Phytase-His₆ konnte bei einer Imidazolkonzentration von 60 mM beobachtet werden. Die Elutionsfraktionen 38 bis 45 enthielten reine Phytase-His₆. Sie wurden zusammengefaßt und für weitere Proteinanalytik bei 4 °C aufbewahrt.

4.3.3 Aufbau des Phytasegens

Das Konstrukt zur Phytase-Expression besteht aus einem 460 bp großen Fragment (*EcoRI-BamHI*) erhalten aus *Bacillus licheniformis* mit der Promotorregion der β -Glucanase (*bgIA*) und dem *E. coli*-Phytasegen (*BamHI-PstI*). Abb. 4.49 zeigt die Nucleotid- und die Aminosäuresequenz (durchgeführt vom Sequenzierservice MWG-Biotech, Ebersberg) des Phytasegens von *E. coli*.

```

EcoRI
1 GAATTCGAACGAAGAATCGCTGCACTAATTATCGATTGTGTACCCACTTAAAGTTTTTTCGC
61 ACAGCGTCTTTTTAACGGCACACACATGGAAAGCCAGGACGATTTTTTACTGGAGACAGT
121 GAAAGAAAAGTATCATCAGCCGTATAAAATGCACGAAGAATATCCATACCTACATTGAGAA
181 AGAGTATGGGCATAAAGCTCACCCAGTGACGAGCTGTGTATTTAACGATTCACATAGAAAG
241 GGTAGTCAAAACAAGTATAAATGAAAGCGTTTCCCTCGTATTAATTTGTTTCTCCATTCAAT
301 ATAGGATGTTACGGATAAAGCAGGCAAAACCTA TCTGTCTGTGCTGATGGTAGTTAGGTT
P1-35 P1-10
361 TGTATTTTTTAAACAGAAGGATTATCATTATTTTCGACCGATGTTCCCTTTGAAAAGGATCA

P2-10 RBSbg1A HamHI RBS2pp2
421 TGTATGATCAATAAAGAAAAGCGGTGTTCAAAAAGGGGTAAGGATCCAAGCGGAAACATAT

1 M K A I L I P F L S L L I P L T P Q S
481 CGATGAAAAGCGATCTTAATCCATTTTTTATCTCTCTCTGATTCCGTTAACCCCGCAATCTG
-----
20 A F A↓Q S E P E L K L E S V V I V S R H
541 CATTTCGCTCAGAGTGAGCCGGAGCTGAAGCTGGAAGTGTGGTGATGTGTCAGTCCGTCATG
-----
40 G V R A P T K A T Q L M Q D V T P D A W
601 GTGTGCGTGCTCCAACCAAGGCCACGCAACTGATGCAGGATGTACCCCAAGACGCATGGC
-----
60 P T W P V K L G W L T P R G G E L I A Y
661 CAACCTGGCCGGTAAAACCTGGGTTGGCTGACACCCGCGCGGTGGTGGCTAATCGCCTATC
-----
80 L G H Y Q R Q R L V A D G L L A K K G C
721 TCGGACATTACCAACGCCAGCGTCTGGTAGCCGACGGATTGCTGGCGAAAAAGGGCTGCC
-----
100 P Q S G Q V A I I A D V D E R T R K T G
781 CGCAGTCTGGTCAAGTCCGGATTATTGCTGATGTGACGAGCGTACCCGTA AAAACAGGC
-----
120 E A F A A G L A P D C A I T V H T Q A D
841 AAGCCTTCGCCCGCGGGCTGGCACCTGACTGTGCAATAAACCGTACATACCCAGGCAGATA
-----
140 T S S P D P L F N P L K T G V C Q L D N
901 CGTCCAGTCCCGATCCGTTATTTAATCCTCTAAAAACTGGCGTTTGCCAACTGGATAACG
-----
160 A N V T D A I L S R A G G S I A D F T G
961 CGAACGTGACTGACGCGATCCTCAGCAGGGCAGGAGGGTCAATTGCTGACTTTACCGGGC
-----
180 H R Q T A F R E L E R V L N F P Q S N L
1021 ATCGGCCAAAAGCGGTTTCGCGAACTGGAACGGGTGCTTAATTTTCGCAATCAAACCTTGT
-----
200 C L K R E K Q D E S C S L T Q A L P S E
1081 GCCTTAAACGTGAGAAAACAGGACGAAAAGCTGTTCATTAACGCAGGCATTACCATCGGAAC
-----
220 L K V S A D N V S L T G A V S L A S M L
1141 TCAAGGTGAGCGCCGACAAATGTTCTCATTAAACCGGTGCGGTAAGCCTCGCATCAATGCTGA
-----
240 T E I F L L Q Q A Q G M P E P G W G R I
1201 CGGAGATATTTCTCCTGCAACAAGCACAGGGAATGCCGGAGCCGGGGTGGGGAAGGATCA
-----
260 T D S H Q W N T L L S L H N A Q F Y L L
1261 CCGATTCAACACCAGTGGAACACCTTGCTAAGTTTGCATAACCGCGCAATTTTATTTGCTAC
-----
280 Q R T P E V A R S R A T P L L D L I M A
1321 AACGCACGCCAGAGGTTGCCCGCAGCCGCGCCACCCCGTTATTGGATTGTGATCATGAGAG
-----
A-A-
K T
300 A L T P H P P Q K Q A Y G V T L P T S V
1381 CGTTGACGCCCATCCACCGCAAAAACAGGCGTATGGTGTGACATTACCCACTTTCAGTAC
-----
320 L F I A G H D F N L A N L G G A L E L N
1441 TGTTTTATGCGCGACACGATACTAATCTGGCAATCTCGGCGGGCGCACTGGAGCTCAACT
-----
C-
340 W T L P G Q P D N T P P G G E L V F E R
1501 GGACCGTTCGCGGTCAAGCCGGATAACACGCCGCCAGGTGGTGAACGGTGTGTTGAACGCT
-----
360 R W R L S D N S Q W I Q V S L V F Q T L
1561 GCGTTCGCTAAGCGATAACAGCCAGTGGATTCAAGTTTTCGCTGTTCTTCCAGACTTTAC
-----
380 Q Q M R D K T P L S L N T P P G E V K L
1621 AGCAGATGCGGTGATAAAAACGCCGCTGTCAATTAATACGCCGCCCGGAGAGGTGAAAACCTGA
-----
400 T L A G C E E R N A Q G M C S L A G F T
1681 CCCTGGCAGGATGTGAAGAGCGAAATGCGCAGGGCATGTGTTGTTGGCAGGTTTTACGC
-----
420 Q I V N E A R I P A C S L * PstI
1741 AAATCGTGAATGAAGCACGCATACCGGCGTGCAGTTTGTAGCTGCAG
-----

```

Abb. 4.49 DNA- und Aminosäuresequenz der *E. coli*-Phytase.

Die Numerierung der Nucleotidsequenz (Abb. 4.49) beginnt mit *EcoRI* und die Numerierung der Aminosäuresequenz mit der ersten Aminosäure der Leader-Peptide. Der Pfeil in Abb. 4.49 gibt die Position an, an der das Präprotein von der Leader-Peptidase gespalten wird. Das Phytasegen beinhaltet 1296 Nucleotide, die für das Präprotein mit 432 Aminosäuren codieren. Nach Abspalten des Signalpeptids enthält das Protein 401 Aminosäuren. Die DNA- und Aminosäuresequenz wurden mit der des *appA* Gens, die von Dassa *et al.* (1990) veröffentlicht worden ist, verglichen. Dabei wurden 5 Basenaustausche gefunden, von denen 2 zum Austausch der betreffenden Aminosäure geführt haben (Met 298 zu Lys, Ala 299 zu Try). In Abb. 4.49 sind die funktionell wichtigen Positionen markiert: das katalytische Zentrum mit der Domäne RHGVRAP (fett gedruckt) und die für die Reaktion mit Phytat notwendigen Aminosäuren (umrandet) (Lim *et al.* 2000). Daraus ist ersichtlich, daß diese Positionen durch die Strukturveränderungen nicht betroffen sind und deshalb wahrscheinlich keine meßbaren Veränderungen in den enzymatischen Eigenschaften zu erwarten sind.

Mit Hilfe des Programms ExPasy und der Aminosäuresequenz konnte die molare Masse der Phytase-His₆ berechnet werden. Sie beträgt 46182,5 Da. Eine massenspektrometrische Messung der Phytase, durchgeführt an der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld, ergab einen Wert von $m/z = 46254$ Da und bestätigt damit den errechneten Wert. Außerdem konnte mit dem Programm ExPasy der isoelektrische Punkt berechnet werden. Er betrug für Phytase-His₆ $pI = 6,28$.

4.1.4 Bestimmung des Temperaturoptimums der Phytase-His₆

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums der Phytase-His₆ wurde, wie in 3.7.2 beschrieben, die Phytaseaktivität unter 30-minütiger Inkubationszeit bei verschiedenen Temperaturen gemessen. In Abb. 4.50 ist die Phytaseaktivität gegen die Temperatur aufgetragen.

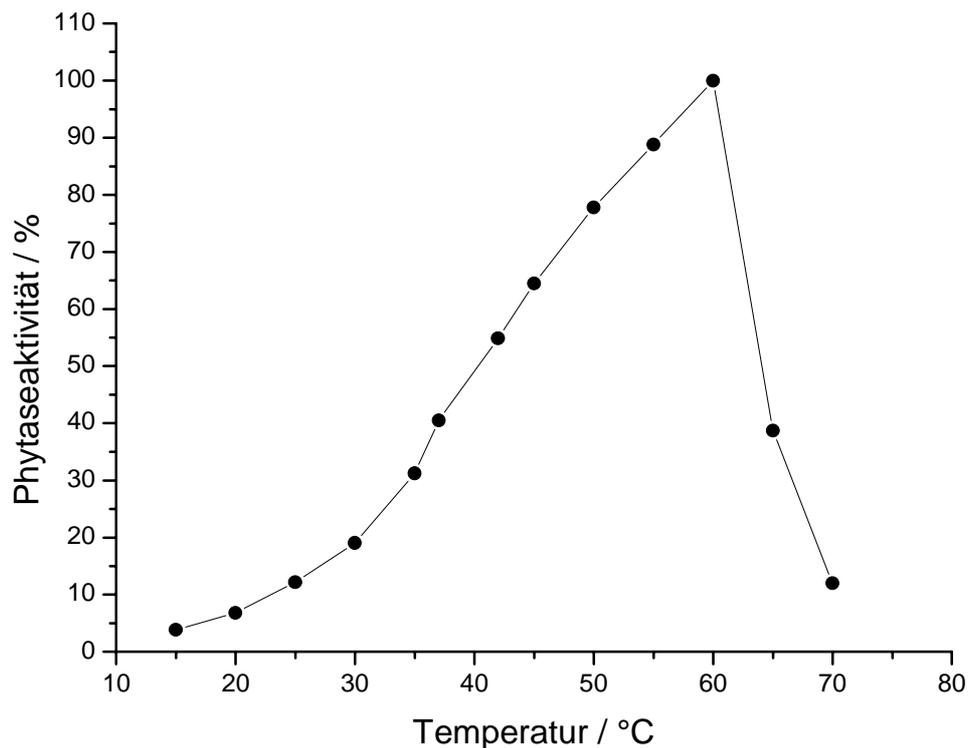


Abb. 4.50 Abhängigkeit der Phytaseaktivität von der Temperatur bei pH 5,5.

Abb. 4.50 zeigt, daß das Temperaturoptimum von Phytase-His₆ bei 60 °C liegt. Damit liegt die Maximalaktivität bei einer höheren Temperatur als der physiologisch relevanten Temperatur von 37 °C. Die Aktivität erreicht bei 37 °C nur 40 % ihres Maximalwertes. Im Temperaturbereich zwischen 15 °C und 35 °C erscheint der Aktivitätsanstieg eher exponentiell zu verlaufen. Zwischen 37 °C und 60 °C scheint die Phytaseaktivität linear anzusteigen. Ab 65 °C sinkt die Phytaseaktivität deutlich ab. Bei 70 °C sind nur noch 10 % der Maximalaktivität zu beobachten. Bei dieser Temperatur ist die Phytase nahezu inaktiv.

Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen von Igbasan *et al.* (2000) überein. Dabei handelt es sich bei Igbasan *et al.* um die gleiche Phytase wie in der vorliegenden Arbeit nur ohne His-tag.

Greiner *et al.* (1993) beobachtet ein Temperaturoptimum von 55 °C und einen starken Aktivitätsabfall schon bei 60 °C. Hierbei handelt es sich um Phytase ohne His-tag. Ein Vergleich mit der Phytase aus der vorliegenden Arbeit fällt allerdings schwer, da einerseits die Reaktionsbedingungen zur Phytasebestimmung andere als in der vorliegenden Arbeit sind und andererseits die Aufreinigung der Phytase eine andere ist. Greiner benötigt fünf Chromatographieschritte im Gegensatz zur

vorliegenden Arbeit, in der nur ein Schritt benötigt wird, um reine Phytase zu erhalten.

4.1.5 Bestimmung des pH-Optimums der Phytase-His₆

Zur Bestimmung des pH-Optimums der Phytase-His₆ wurde, wie in 3.7.3 beschrieben, die Phytaseaktivität bei verschiedenen pH-Werten gemessen. In Abb. 4.51 ist die Phytaseaktivität gegen den pH-Wert aufgetragen.

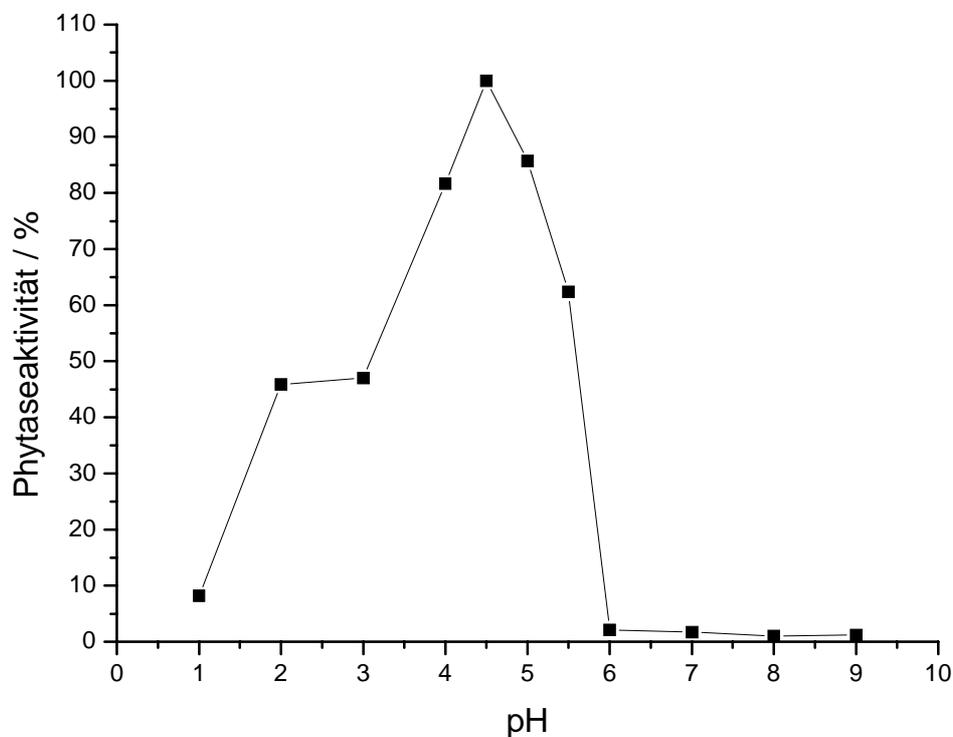


Abb. 4.51 Abhängigkeit der Phytaseaktivität vom pH-Wert bei 37 °C.

Abb. 4.51 zeigt, daß die höchste Aktivität bei pH 4,5 liegt. Inaktiv ist die Phytase im stark sauren (pH 1), im neutralen (pH 6-7) und im basischen (pH 8-9) pH-Bereich. Aktiv ist das Enzym im schwach sauren Bereich zwischen pH 2 und pH 5,5. Dabei fällt auf, daß die Aktivität bei pH 2 und pH 3 gleichbleibend ist. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen von Igbasan *et al.* (2000) und Greiner *et al.* (1993) überein.

4.1.6 Bestimmung der spezifischen Aktivität der Phytase-His₆

Der Proteingehalt der Probe wurde nach drei verschiedenen Methoden bestimmt:

1. BCA-Test

Die Durchführung des Tests erfolgte, wie in 3.6.7 beschrieben. Der gemessene Proteingehalt der Probe betrug 0,075 g/L. Die Phytaseaktivität der Probe betrug bei pH 4,5 73,2 kU/L und bei pH 5,5 49,5 kU/L.

2. Dr. Lange-Test

Die Durchführung des Tests erfolgte, wie in 3.6.6 beschrieben. Der gemessene Stickstoffgehalt der Probe betrug 24 mg/L. Dieses ergab einen Gesamtproteingehalt von 135,5 mg/L (Faktor 5,65; s. 3.7.5). Die Phytaseaktivität der Probe betrug bei pH 4,5 143,5 kU/L und bei pH 5,5 84,4 kU/L.

3. Optische Dichte (OD_{280 nm})

Die Durchführung des Tests erfolgte, wie in 3.7.5 beschrieben. Es wurde eine optische Dichte von 0,175 gemessen. Die Phytaseaktivität der Probe betrug 48,6 kU/L bei pH 4,5 und 28,6 kU/L bei pH 5,5. Auf Grund der Aminosäuresequenz konnte nach Pace *et al* (1995) mit dem Programm ExPasy der molare Absorptionskoeffizient für Phytase mit einem Wert von 50640 M⁻¹cm⁻¹ errechnet werden. Die molare Masse beträgt 46182,5 Da (s. 4.4.3). Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ließ sich die Proteinkonzentration bestimmen.

Tab. 4.6 zeigt die spezifische Aktivität für die jeweilige Methode und den jeweiligen pH-Wert.

Tab. 4.6 Spezifischen Phytaseaktivitäten auf der Grundlage verschiedener Proteinbestimmungstests bei zwei verschiedenen pH-Werten.

pH	Spez. Aktivität nach BCA	Spez. Aktivität nach Dr. Lange	Spez. Aktivität über OD-Bestimmung
4,5	975 kU/g	1060 kU/g	317 kU/g
5,5	660 kU/g	620 kU/g	183 kU/g

Da bei pH 4,5 die Phytase ein pH-Optimum in der Aktivität hat, ist der jeweilige Wert für die spezifische Aktivität höher als bei pH 5,5.

Die spezifische Aktivität gemessen über die $OD_{280\text{ nm}}$ liegt deutlich unter den anderen beiden gemessenen Werten. Dieses könnte darauf zurückzuführen sein, daß die Ausgangsmenge an Protein in der gemessenen Probe zu gering war und damit für das Photometer nicht gut zu detektieren war.

Für weitere Bestimmungen, bei denen die spezifische Aktivität benötigt wird, wird ein Mittelwert zwischen den beiden Werten gebildet, die mit dem BCA-Test und dem Dr. Lange-Test ermittelt worden sind. Die mittlere spezifische Aktivität beträgt bei pH 4,5 1018 kU/g und bei pH 5,5 640 kU/g.

Greiner et al. (1993) erhielt einen Wert für die spezifische Aktivität von 750 kU/g. Da die Versuchsbedingungen nicht genannt werden und damit die Proteinbestimmungsmethode nicht bekannt ist, läßt sich nicht entscheiden, ob die Messungen unter vergleichbaren Bedingungen wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt worden sind. Damit lassen sich die Werte für die spezifischen Aktivität nicht miteinander vergleichen.

4.4.7 Bestimmung der Aktivierungsenergie der Phytase-His₆

Die Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Temperatur läßt sich über die *Arrheniussche Gleichung* (Gl. 23) ausdrücken (Atkins 1990):

$$r = Ae^{-\frac{E_a}{RT}} \quad \text{Gl. 23}$$

Aus der Auftragung (Abb. 4.52) der Phytaseaktivität gegen die Temperatur (s. Kapitel 3.7.5) ließ sich mit Hilfe des Programms Origin eine nichtlineare Kurvenanpassung durchführen. Daraus konnte der präexponentielle Faktor A und die Aktivierungsenergie E_a berechnet werden.

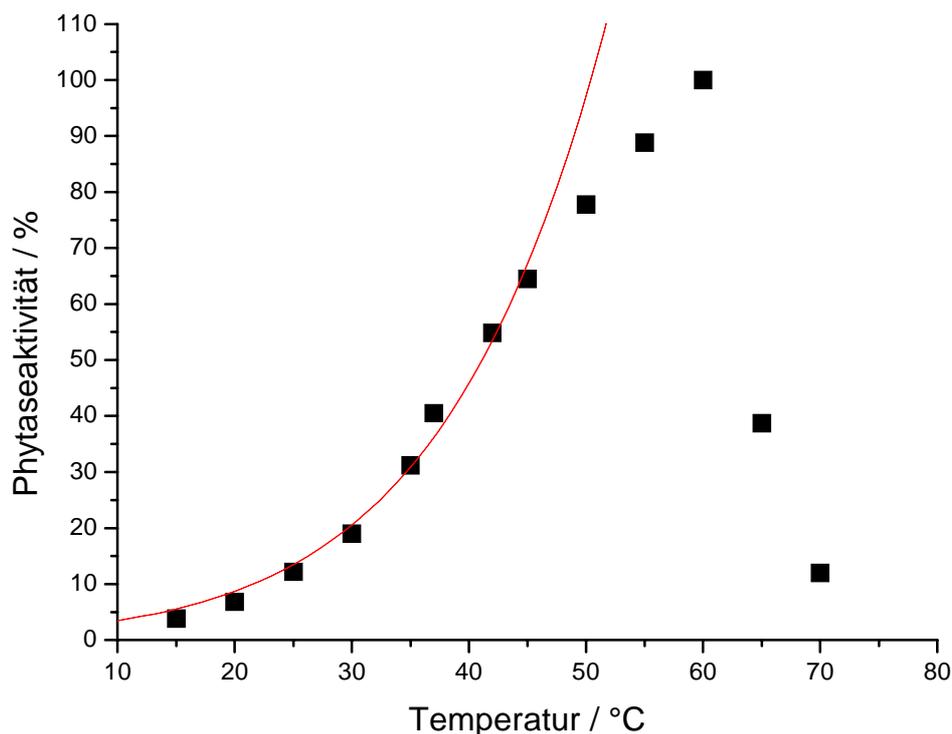


Abb. 4.52 Nichtlineare Kurvenanpassung der Auftragung der Phytaseaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur zur Bestimmung der Aktivierungsenergie und des präexponentiellen Faktors.

Die nichtlineare Kurvenanpassung in Abb. 4.52 wurde von den ersten 8 Meßwerten durchgeführt, da nur sie dem *Arrheniusschen Gesetz* gehorchen. Tab. 4.7 zeigt die aus Abb. 4.52 erhaltenen Werte für die Aktivierungsenergie E_a und den präexponentiellen Faktor A .

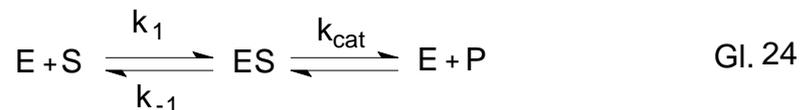
Tab. 4.7 Werte für die Aktivierungsenergie und den präexponentiellen Faktor.

Aktivierungsenergie E_a [kJ/mol]	Präexponentieller Faktor A [$10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$]
63,2	1,6

Ein Literaturvergleich zeigt, daß Greiner *et al.* (1993) eine vergleichbare Aktivierungsenergie von 58,5 kJ/mol gemessen hat.

4.4.8 Bestimmung des K_M -Wertes der Phytase-His₆ mit Phytat

Die Michaelis-Menten-Konstante K_M und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{\max} lassen sich aus den bei verschiedenen Substratkonzentrationen gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten ableiten (s. 3.7.6). Gl. 24 stellt die Michaelis-Menten-Reaktion dar.



Daraus lassen sich der K_M -Wert (Gl. 25) und V_{\max} (Gl. 26) bestimmen. In Gl. 26 ist E_T die Gesamtkonzentration des Enzyms.

$$K_M = \frac{k_{cat} + k_{-1}}{k_1} \quad \text{Gl. 25}$$

$$V_{\max} = k_{cat} \cdot E_T \quad \text{Gl. 26}$$

Bei kleinen Substratkonzentrationen steht die Reaktionsgeschwindigkeit in linearem Verhältnis zur Substratkonzentration. K_M entspricht der Substratkonzentration $[S]$, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit V die Hälfte ihres Maximalwertes erreicht.

In Abb. 4.53 ist die Reaktionsgeschwindigkeit r als Funktion der Substratkonzentration $[S]$ dargestellt. Die Substratkonzentrationen wurden nach der in 3.7.6 beschriebenen Vorgehensweise bestimmt. Mit Hilfe des Programms Origin konnte eine nichtlineare Kurvenanpassung durchgeführt werden und somit die Werte für K_M und V_{\max} berechnet werden (s. Tab. 4.8).

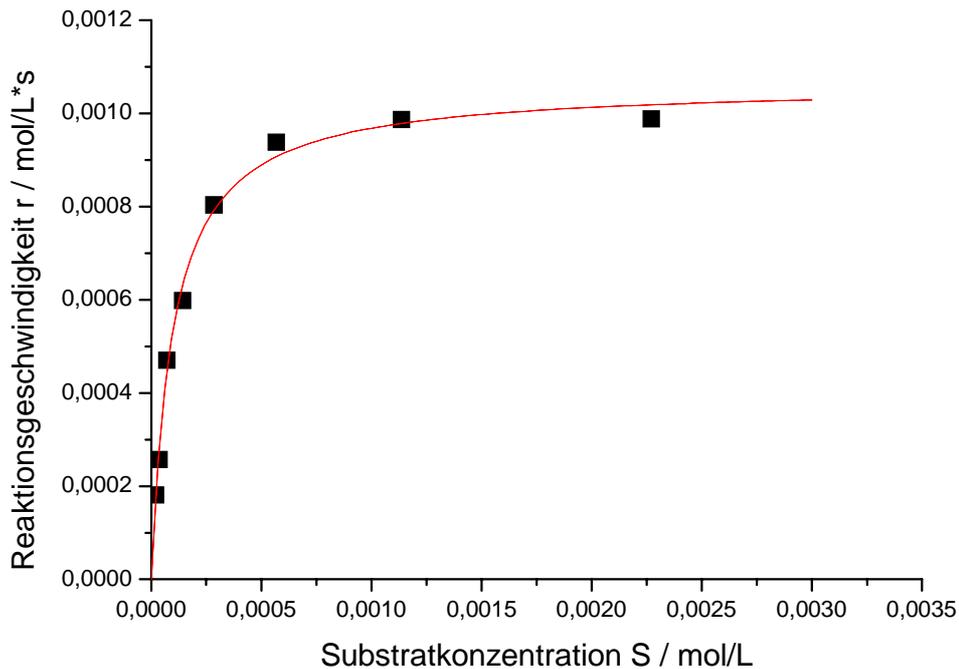


Abb. 4.53 Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration zur Bestimmung von K_M und V_{max} von Phytase-His₆ mit Phytat als Substrat.

Weitere kinetische Parameter, die sich aus V_{max} berechnen lassen, sind die Wechselzahl k_{cat} (Gl. 27) und k_{cat}/K_M .

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{E_T} \quad \text{Gl. 27}$$

V_{max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit [mol/L*s]

E_T = Gesamtkonzentration des Enzyms [mol/L]

Die Gesamtkonzentration des Enzyms E_T ließ sich aus der Phytaseaktivität (41 kU/L, pH = 4,5) der gemessenen Probe, der spezifischen Aktivität (1018 kU/g) (s. 4.4.6) und der molaren Masse (46182,5 Da) (s. 4.4.3) der Phytase-His₆ berechnen und betrug 0,0403 g/L.

Für die Hydrolyse von Na-Phytat ergeben sich folgende kinetische Parameter (Tab. 4.8):

Tab. 4.8 Kinetische Parameter für die Hydrolyse von Na-Phytat.

V_{\max} [mmol/L·s]	K_M [mmol/L]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$]
1,06	0,10	1215	12,15

Greiner *et al.* (1993) erhielt einen K_M -Wert von $K_M = 0,13 \text{ mM}$. Damit liegt der Wert zwar etwas höher als der in Tab. 4.8 angegebene, aber in der gleichen Größenordnung. Aufgrund der unterschiedlichen Versuchsbedingungen ist zwischen den von Greiner *et al.* ermittelten Werten und den in Tab. 4.8 gezeigten nur ein Vergleich der Größenordnungen und nicht ein Vergleich der exakten Werte möglich.

4.4.9 Bestimmung des K_M -Wertes der Phytase-His₆ mit p-Nitrophenylphosphat

Die Michaelis-Menten-Konstante K_M und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{\max} lassen sich aus den bei verschiedenen Substratkonzentrationen gemessenen (s. 3.7.7) Reaktionsgeschwindigkeiten ableiten. In Abb. 4.54 ist die Reaktionsgeschwindigkeit r als Funktion der Substratkonzentration $[S]$ aufgetragen. Die Substratkonzentrationen wurden nach der in 3.7.7 beschriebenen Vorgehensweise bestimmt.

Mit Hilfe des Programms Origin konnte eine nichtlineare Kurvenanpassung durchgeführt werden und somit die Werte für K_M und V_{\max} berechnet werden (s. Tab. 4.9).

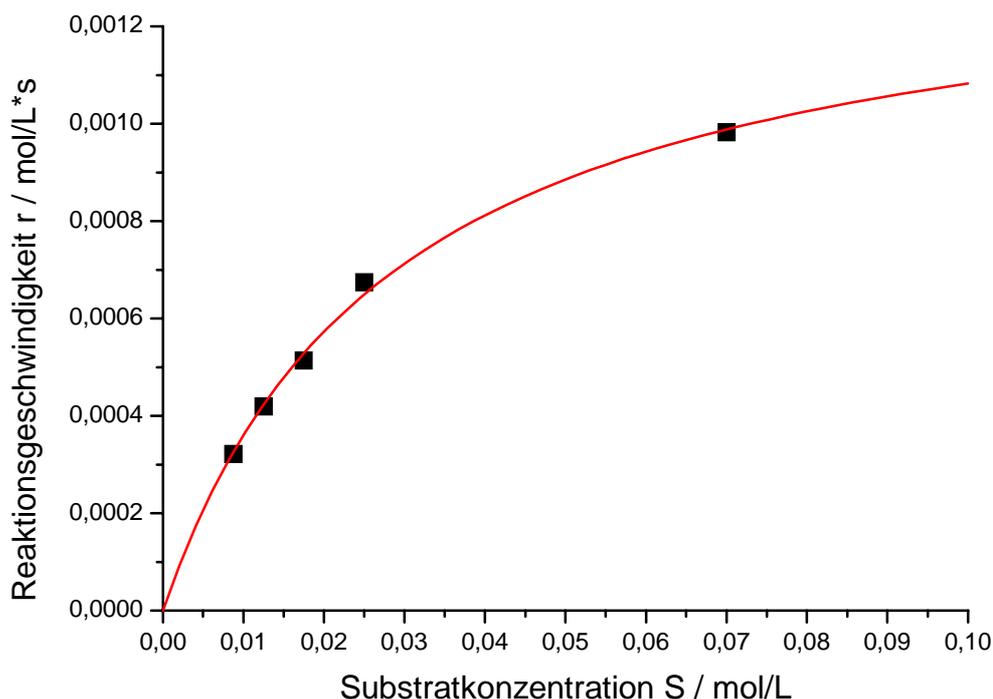


Abb. 4.54 Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration zur Bestimmung von K_M und V_{max} von Phytase-His₆ mit pNPP als Substrat.

Weitere kinetische Parameter, die sich aus V_{max} ergeben, sind die Wechselzahl k_{cat} (Gl. 26) und k_{cat}/K_M . Die Werte für k_{cat} und k_{cat}/K_M sind in Tab. 4.9 dargestellt. Die dazu benötigte Gesamtkonzentration des Enzyms ergab sich aus der Phytaseaktivität der gemessenen Probe (10,9 kU/L, pH 5,5), der spezifischen Aktivität 640 kU/g (s. 4.4.6) und der molaren Masse 46182,5 g/mol (s. 4.4.3) der Phytase-His₆ und betrug 0,017 g/L.

Für die Hydrolyse von pNPP ergeben sich folgende kinetische Parameter (Tab. 4.9):

Tab. 4.9 Kinetische Parameter für die Hydrolyse von pNPP.

V_{max} [mmol/L*s]	K_M [mmol/L]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$10^6 M^{-1}s^{-1}$]
1,39	28,6	3770	0,13

Es zeigt sich, daß die Phytase ein bifunktionales Enzym ist, denn sie katalysiert die Hydrolyse sowohl von Phytat als auch von pNPP. Da der K_M -Wert für Phytat (Tab. 4.8) mit $K_{M, \text{Phytat}} = 0,10 \text{ mM}$ kleiner ist als der für pNPP mit $K_{M, \text{pNPP}} = 28,6 \text{ mM}$ und k_{cat}/K_M für Phytat ($k_{\text{cat}}/K_M = 12,15 \cdot 10^6 \cdot \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) größer ist als für pNPP ($k_{\text{cat}}/K_M = 0,13 \cdot 10^6 \cdot \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) ist das untersuchte Enzym auch tatsächlich als Phytase zu bezeichnen und nicht als saure Phosphatase.

5 Zusammenfassung

Bei der Hydrolyse von Phytinsäure durch Phytase entsteht u.a. anorganisches Phosphat. Dieses kann für monogastrische Tiere nutzbar gemacht werden, indem Futtermittel, die Phytinsäure enthalten, mit Phytase supplementiert werden. Dadurch wird sowohl der Gehalt an Phosphat im Futtermittel als auch die Phosphatausscheidung der Nutztiere reduziert. Dieses ist von großer ökonomischer und ökologischer Bedeutung.

Gerd Miksch (Universität Bielefeld) entwickelte ein Sekretionssystem, mit dessen Hilfe es erstmals möglich war, Phytase in das Kulturmedium von *Escherichia coli* zu sekretieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Kultivierungsmethoden entwickelt, mit denen es möglich ist, extrazelluläre Phytase unter Fermentationsbedingungen herzustellen.

Dazu wurden zunächst verschiedene *E. coli*-Sekretionsstämme auf ihr Sekretionsverhalten untersucht. Für die Lokalisierung der Sekretionskassette sind zwei Möglichkeiten miteinander verglichen worden:

1. Lokalisation der Sekretionskassette auf dem Bakterienchromosom
2. Lokalisation der Sekretionskassette auf einem *multi-copy*-Plasmid

Schüttelkolbenkultivierungen haben gezeigt, daß mit einer Lokalisierung der Sekretionskassette auf dem Expressionvektor eine höhere Sekretion (10 kU/L) erreicht werden konnte. Eine Erklärung hierfür könnte sein, daß die Sekretionskassette in vielen Kopien vorliegt, deren Anzahl von der Anzahl der Plasmide abhängt.

Weiterhin wurden, unterschiedliche Promotoren mit dem Phytasegen fusioniert, um den Einfluß verschiedener Promotoren auf die Phytaseausbeute zu untersuchen. Es zeigte sich, daß mit Hilfe des *bglA*- und des *tac*-Promotors die höchsten Phytaseausbeuten im Medium erreicht werden konnten (*bglA*-Promotor: 9,8 kU/L und *tac*-Promotor: 13 kU/L). Da der *tac*-Promotor mit IPTG induziert werden muß, eignet er sich für eine industrielle Anwendung nicht. Aus diesem Grund wurde der Stamm, der den *bglA*-Promotor enthielt (*E. coli* BL21(DE3)pPhyt109), für alle weiteren Experimente verwendet.

Schüttelkolbenversuche zeigten, daß die Medienzusammensetzung einen Einfluß auf die Sekretion der Phytase ausübt. Dabei zeigte sich, daß eine deutlich höhere

Ausbeute sowohl im Vollmedium (TB-Medium: 8,5 kU/L) als auch in halbsynthetischen Medien (Riesenberg-Medium mit Melassezusatz: 8,2 kU/L) im Vergleich zu synthetischen Medium (Riesenberg-Medium) erreicht werden konnte. Dieses Ergebnis konnte auf Satzkultivierungen im 7 L-Bioreaktor übertragen werden (TB-Medium: 15 kU/L und Riesenberg-Medium: 4 kU/L).

Eine Steigerung der extrazellulären Phytaseproduktion konnte durch Satzkultivierung des Stammes *E. coli* BL21(DE3)pPhyt148 in erzielt werden. Dieser Stamm enthielt nicht nur vor dem Phytasegen den *bglA*-Promotor, sondern auch in der Sekretionskassette vor dem *kil*-Gen. Bei einer Schüttelkolbenkultivierung dieses Stammes in TB-Medium konnte eine Phytaseaktivität im Medium von etwa 66 kU/L erzielt werden. Dieses Ergebnis ließ sich im 30 L-Bioreaktor ohne pH-Regelung wiederholen. Sobald das pH während der Kultivierung auf einen konstanten Wert geregelt wurde, konnte nur noch eine Phytaseaktivität von etwa 11 kU/L im Medium nachgewiesen werden. Um die Abhängigkeit der extrazellulären Phytaseproduktion vom pH zu untersuchen, wurden in Schüttelkolbenversuchen verschiedene pH-Werte des TB-Mediums eingestellt. Die höchste Phytaseaktivität im Medium zeigte sich bei einem Ausgangs-pH von 7,2.

Eine weitere Steigerung der extrazellulären Phytaseproduktion konnte durch Zulaufkultivierungen des Stammes *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 erreicht werden. Dazu wurden verschiedene Strategien zur Regelung von Zulaufkultivierungen miteinander verglichen.

In Zusammenarbeit mit dem TCI Hannover wurden Zulaufkultivierungen durchgeführt, bei denen die Zufütterung in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration im Medium mit dem FIA-System geregelt wurde. Die Glucosekonzentration wurde während der Kultivierungen auf die Sollwerte von 0,1 g/L, 0,2 g/L und 0,3 g/L eingestellt. Bei allen drei Fermentationen wurde eine Biotrockenmassekonzentration von etwa 30 g/L bis 35 g/L erreicht. Die höchste extrazelluläre Phytasekonzentration wurde bei einer Regelung der Glucosekonzentration auf 0,2 g/L erzielt (140 kU/L).

Weiterhin wurde eine andere Zulaufstrategie verfolgt, bei der die Regelung des Zulaufs über die Sauerstoffsättigung im Medium erfolgte. Die Sauerstoffsättigung wurde während der Kultivierungen auf die Sollwerte von 20 %, 10 %, 5 % und 2% konstantgehalten. Die höchsten extrazellulären Phytaseaktivitäten konnten bei den Fermentationen beobachtet werden, bei denen die Sauerstoffsättigung im Medium

10 % und 5 % betrug. Es konnte eine Phytaseaktivität im Medium von 180 kU/L gemessen werden. Damit konnte eine Steigerung der extrazellulären Phytaseausbeute von 23 % im Vergleich zur Zulaufkultivierung mit Regelung über die Glucosekonzentration erreicht werden. Bei einem Sollwert für die Sauerstoffsättigung von 10 % konnte eine Biotrockenmassekonzentration von 53 g/L erreicht werden. Damit ließ sich mit dieser Strategie eine um 38 % höhere Biotrockenmassekonzentration im Vergleich zur Zulaufkultivierung mit Regelung über die Glucosekonzentration erreichen.

Bei beiden Fermentationsstrategien fällt auf, daß es jeweils einen Zeitpunkt im Verlauf der Kultivierungen gibt, an dem sich das Zellwachstum deutlich verlangsamt, obwohl die Zufütterung noch nicht beendet war. Dieser Zeitpunkt ist bei der Regelungsstrategie über die Glucosekonzentration nach 9 h und bei der Regelungsstrategie über die Sauerstoffsättigung nach 48 h erreicht. Eine Inhibierung des Wachstums auf Grund der gebildeten Acetatkonzentration kann ausgeschlossen werden, da eine Konzentration von 2 g/L nicht überschritten wurde. Zu vermuten ist, daß dieses Verhalten sich auf den ursprünglichen Stamm zurückführen läßt, denn eine Kultivierung ohne Expressionsvektor und ohne Sekretionskassette (*E. coli* BL21(DE3)) zeigt das gleiche Wachstumsverhalten (s. Abb. 4.42). Um eine weitere Steigerung der extrazellulären Phytaseausbeute zu erreichen, müßte z.B. ein Stamm gefunden werden, der ein anderes Wachstumsverhalten aufweist.

Um die enzymatischen Eigenschaften von reiner Phytase untersuchen zu können, wurde ein Stamm konstruiert (*E. coli* BL21(DE3)pPhyt190), der Phytase-His₆ sekretiert. Diese konnte mittels einer Ni-NTA-Säule aufgereinigt werden. Tab. 5.1 zeigt das pH-Optimum, das Temperaturoptimum und die Aktivierungsenergie.

Tab. 5.1 Charakteristische Eigenschaften der Phytase

pH-Optimum	Temperatur-Optimum	Aktivierungsenergie
4,5	60 °C	63 kJ · mol ⁻¹

Tab. 5.2 zeigt die spezifische Aktivität bei zwei verschiedenen pH-Werten.

Tab. 5.2 Spezifische Aktivität der Phytase

pH	Spez. Aktivität nach BCA	Spez. Aktivität nach Dr. Lange
4,5	975 kU/g	1060 kU/g
5,5	660 kU/g	620 kU/g

Tab. 5.3 zeigt die Michaelis-Menten-Konstante für die Substrate Phytat und p-Nitrophenylphosphat (pNPP).

Tab. 5.3 Kinetische Parameter

Substrat	K_M (mmol/L)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat} / K_M $10^6 M^{-1}s^{-1}$
Phytat	0,1	1215	12,15
pNPP	28,6	3770	0,13

Es hat sich gezeigt, daß Phytase ein bifunktionales Enzym ist, denn sie katalysiert sowohl die Hydrolyse von Phytat als auch von p-Nitrophenylphosphat. Ein Vergleich der beiden K_M -Werte aus Tab. 5.3 zeigt, daß der K_M -Wert für Phytat kleiner ist als der für p-Nitrophenylphosphat. Das untersuchte Enzym ist also tatsächlich als Phytase zu bezeichnen und nicht als saure Phosphatase.

6 Literaturverzeichnis

Aono, R. (1991), Cultivation conditions for extracellular production of penicillinase by *Escherichia coli* carrying pEAP31 on a semi-large scale. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 414-418.

Atkins, P.W. (1990), *Physikalische Chemie*, Verlag Chemie, Weinheim.

Bailey, J.E., Ollis, D.F. (1986), *Biochemical engineering fundamentals*. McGraw-Hill, New York.

Blanchin-Roland, S., Masson, J.M. (1989), Protein secretion controlled by a synthetic gene in *Escherichia coli*. *Prot. Eng.* **2**, 473-480.

Blight, M.A., Holland, I.B., Cherveaux, C. (1994), Protein secretion pathways in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**, 468-474.

Braun, V., Pils, H., Groß, P. (1994), Colicins: structures, modes of action, transfer through membranes and evolution. *Arch. Microbiol.* **161**, 199-206.

Campbell, R.G., Harrison, D.T., Butler, K.J., Selle, P.H., (1995) in Hennessy, Cranwell (eds.), *Manipulating pig production*, V. Proc. of the Fifth Biennial Conf. of the Australian Pig Science Association, Werribee, Victoria, Australia, S. 193

Cavard, D., Baty, D., Howard, S.P., Verhey, H.M., Lazdunski, C. (1987), Lipoprotein nature of the colicin A lysis protein: effect of amino acid substitution at the site of modification and processing. *J. Bacteriol.* **169**, 2187-2194.

Cavard, D. (1991), Synthesis and functioning of the colicin E1 lysis protein. *J. Bacteriol.* **173**, 191-196.

Cavard, D. (1992), Colicin A and colicin E1 lysis proteins differ in their dependence on secA and secY gene products. *FEBS Lett.* **198**, 84-88.

Chmiel, H. (1991), Bioprozeßtechnik I. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Compton, L.A., Davis, J.M., MacDonald, J.R., Baechinger, H.P. (1992), Structural and functional characterization of *Escherichia coli* Peptidyl-Prolyl-cis-Transisomerase. *Eur. J. Biochem.* **206**, 927-934.

Cooper, J.R., Gowing, H.S. (1983), Mammalian small intestinal phytase (E.C. 3.1.3.8). *Br. J. Nutr.* **50**, 673-678.

Cullis, P.R., De Kruijff, B. (1979), Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **559**, 399-420.

Damerval, J.E., Guilloux, M., Blaisomeau, J., Vienne, D. (1987), Simplification of Heukeshoven and Derrik's silver stain of proteins. *Electrophoresis.* **8**, 158-159.

Dassa, J., Marck, C., Boquet, P.L. (1990), The complete nucleotide sequence of *Escherichia coli* gene *appA* reveals significant homology between pH 2.5 acid phosphatase and glucose-1-phosphatase. *J. Bacteriology.* **172 (9)**, 5497-5500.

Diaz-Ricci, J.C., Regan, L., Bailey, J.E. (1991), Effect of alteration of the acetic acid synthesis pathway on the fermentation pattern of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **38**, 1318-1324.

Dochain, D., M. Perrier (1997), Dynamical modelling, analysis, monitoring and control design for nonlinear bioprocesses, In: *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, (T. Scheper, Ed.). **56**, 147-197, Springer-Verlag, Berlin.

Dubochet, J., McDowall, A.W., Menge, B., Schmid, E.N., Lickfeld, K.G. (1983), Electron microscopy of frozen-hydrated bacteria. *J. Bacteriol.* **155**, 381-390.

Fraenkel, D.G. (1996) Glycolysis in: Neidhardt, F.C., (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology, 2nd edition, volume 1, ASM Press Washington

Gargova, S., Roshkova, Z., Vancheva, G. (1997), Screening of fungi for phytase production. *Biotechnol. Tech.* **11**, 221-224.

Gentz, R., Kuys, Y., Zwieb, C., Taatjes, H., Bannwarth, W., Stueber, D., Ibrahim, I. (1988), Association of Degradation and Secretion of Three Chimeric Polypeptides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**, 212-222.

Gibson, D.M. and Ullah, A.H.J. (1988), Purification and characterization of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* **260**, 503-513.

Golovan, S., Guirong, W., Zhang, J., Forsberg, C.W. (2000), Characterization and overproduction of the *Escherichia coli* appA encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities. *Can. J. Microbiol.* **46**, 59-71.

Gottschalk, G. (1988), Bacterial metabolism. 2. Aufl., Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokio.

Graham, L.L., Beveridge, T.J., Naninga, N. (1991), Periplasmic space and the concept of the periplasm. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 328-329.

Green, D.A., De Jesus, P.V., Winegrad, A.I. (1975), Effects of insulin and dietary myo-inositol on impaired peripheral motor nerve conduction velocity in acute streptozotocin diabetes. *J. Clin. Invest.* **55**, 1326-1336.

Greiner, R., Konietzny, U., Jany, K.D. (1993), Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 107-113.

Greiner, R., Haller, E., Konietzny, U., Jany, K.D. (1997), Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. *Arch. Biochem. Biophys.* **341**, 201-206.

Greiner, R., Konietzny, U., Jang, K-D. (1998), Purification and characterization of a phytase from rye. *Food Biochem* **22**, 143-161.

- Greiner, R., Carlsson, N.-G., Alminger, M.L. (2000), Stereospecificity of *myo*-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of *Escherichia coli*. *J. Biotechnology*. **84**, 53-62.
- Guillot, I., Hollwich, T., Thielen, C., Schwarz, G., Rambeck, W.A. (1995), Einfluß von Phytat und Phytase auf die Cadmiumakkumulation bei Ratte, Wachtel, Hühnerküken und Schwein. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* **3**, 94.
- Han, K., Lim, H.C., Hong, J. (1992), Acetic acid formation in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **39**, 663-671.
- Han, Y.W., and Gallagher, D. (1987a), Phosphatase production by *Aspergillus ficuum*. *J. of Ind. Microbiol.* **1**, 295-301.
- Han, Y.W., Gallagher, D., Wilfried, A.G. (1987b), Phytase production by *Aspergillus ficuum* on semisolid substrate. *J. Ind. Microbiol.* **2**, 195-200.
- Hitzmann, B., Arndt, M. (2001), Eine schnelle Glucoseanalytik für die Regelung biotechnologischer Prozesse. *Bioforum* **10**, 658-661.
- B. Hitzmann, O. Broxtermann, Y.-L. Cha, O. Sobieh, E. Stärk and T. Scheper (2000) The control of glucose concentration during yeast fed batch cultivation using a fast measurement complemented by an extended Kalman filter, *Bioprocess Engineering*, **23**, 337-341
- Hobot, J.A., Carlemalm, E., Villiger, W., Kellenberger, E. (1984), Periplasmic gel: new concept resulting from the reinvestigation of bacterial cell envelope ultrastructure by new methods. *J. Bacteriol.* **160**, 143-152.
- Holms, W.H. (1986), The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: Relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass and excretion of acetate. *Curr. Top. Cell. Regul.* **28**, 69-105.
- Hoppe, P.P., Schöner, F.J., Wiesche, H., Schwarz, G., Safer, S. (1993), *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **69**, 225-234.

Horn, U., Strittmatter, W., Krebber, A., Knüpfler, U., Kujau, M., Wenderoth, R., Müller, K., Matzku, S., Plückthun, A., Riesenberg, D. (1996), High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 524-532.

Howard, S.P., Carvard, D., Lazdunski, C., (1991), Phospholipase-A-independent damage caused by the colicin A lysis protein during its assembly into the inner and outer membranes of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 81-89.

Howson, S.J., Davis, R.P. (1983), Production of phytate-hydrolyzing enzyme by some fungi. *Enzyme Microb. Technol.* **5**, 377-382.

Igbasan, F.A., Männer, K., Miksch, G., Borriss, R., Farouk, A., Simon, O. (2000), Comparative studies on the in vitro properties of phytases from various microbial origins. *Arch. Anim. Nutr.* **53**, 353-375.

Igbasan, F.A., Simon, O., Miksch, G., Männer, K. (2001), The effectiveness of an *Escherichia coli* phytase in improving phosphorus and calcium bioavailabilities in poultry and young pigs. *Arch. Anim. Nutr.* **54**, 117-126.

Irving, G.C.J., Cosgrove, D.J. (1971), Inositol phosphate phosphatase of microbiological origin. Some properties of a partially purified bacterial (*Pseudomonas* sp.) phytase. *Aust. J. Biol. Sci.* **24**, 547-557.

Jayakumar, A., Hong, J.-S., Barnes, Jr., E.M. (1987), Feedback inhibition of ammonium (methylammonium) ion transport in *Escherichia coli* by glutamine and glutamine analogs. *J. Bacteriol.* **169**, 553-557.

Kemme, P.A., Jongbloed, A.W., Mroz, Z., Makinen, M. (1995), Effect microbial phytase and phytate on ileal amino acid digestibility of a maize-soybean meal diet in pigs, In: 3. Tagung Schweine- und Geflügelernährung 29.11.-1.12.94, Halle/Saale, 139-142.

Kerovuoto, J., Laureus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N., Apajalahti, J. (1998), Isolation, characterization, molecular gene cloning and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl. and Environ. Microbiol.* **64**, (No. 6), 2079-2085.

Kleman, G.L., Strohl, W.R. (1994), Acetate metabolism by *Escherichia coli* in high-cell-density fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3952-3958.

Knappik, A., Krebber, C., Plückthun, A. (1993), The Effect of folding catalyst on the *in vivo* folding process of different antibody fragments expressed in *Escherichia coli*. **11**, 77-83.

Konosuke, S., Fukuhara, H., Nakamura, Y., (1999), Phytase of the yeast *Arxula adeninivonans*, *Biotechnology Letters.* **21**, 33-38.

Korz, D.J., Rinas, U., Hellmuth, K., Sanders, E.A., Deckwer, W.-D. (1995), Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **39**, 59-65.

Kumamoto, C.A., Beckwith, J. (1983), Mutations in a new gene, *secB*, cause defective protein localization in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **154**, 253-260.

Laboure, A.-M., Gagnon, J., Lescure, A.-M. (1993), Purification and characterisation of a phytase (*myo*-inositol-hexakisphosphate phosphohydrolase) accumulated in maize (*Zea mays*) seedlings during germination. *Biochem. J.* **295**, 413-419.

Lantzsch, H.J., (1990), Untersuchungen über ernährungsphysiologische Effekte des Phytats bei Monogastriern (Ratte, Schwein). *Übers. Tierernährung* **18**, 197-212.

Lee, S.Y. (1996), High cell-density culture of *Escherichia coli*. *TIBTECH* **14**, 98-105.

Lee, S.Y., Chang, H.N. (1994), High cell density cultivation of *Escherichia coli* using sucrose as a carbon source. *Biotechnol. Lett.* **15**, 971-974.

- Lee, C., Li, P., Inouye, H., Brickmann, E.R., Beckwith, J. (1989), Genetic studies on the inability of β -galactosidase to be translocated across the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.* **171**, 4609-4616.
- Lim, D., Golovan, S., Forsberg, C.W., Jia, Z., (2000), Crystal structures of *Escherichia coli* phytase and its complex with phytate. *Nature Structural Biol.*, **7**, 108-113.
- Lim, P.E., Tate, M.E., (1973), The phytase. II. Properties of phytase fraction F₁ and F₂ from wheat bran and the *myo*-inositol phosphates produced by fraction F₂. *Biochim. Biophys. Acta.* **302**, 316-328.
- Lin, E.C.C., (1996), Dissimilation pathways for sugars, polyols and carboxylates, in: Neidhardt, F.C., (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology, 2nd edition, volume 1, ASM Press Washington
- Little, S., Campbell, C.J., Evans, I.J., Hayward, E.C., Lilley, R.J., Robinson, M.K. (1989), A short N-proximal region of prochymosin inhibits the secretion of hybrid proteins from *Escherichia coli*. *Gene* **83**, 321-329.
- Liu, B.-L., Rafiq, A., Tzeng, Y.-M., Rob, A. (1998), The induction and characterization of phytase and beyond. *Enz. Microbial Technol.* **22**, 415-424.
- Loewen, P.C., Hengge-Aronis, R. (1994), The role of the sigma factor σ KatF in bacterial global regulation. *Ann. Rev. Microbiol.* **48**, 53-80.
- Luirink, J., Van der Sande, C., Zommassen, J., Veltkamp, E., DE Graaf, F.K., Oudega, B. (1986), Effects of divalent cations and phospholipase A activity on excretion of cloacin DF13 and lysis of host cells. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 825-834.
- Luli, G.W., Strohl, W.R. (1990), Comparison of growth, acetate production and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1004-1011.

- Lurinik, J., Duim, B., de Gier, J.S.L., Oudega, B. (1991), Functioning of the stable signal peptide of the pCloDF13-encoded bacteriocin release protein. *Mol. Microbiol.* **5**, 393-399.
- Macaloney, G., Hall, J.W., Rollins, M.J., Draper, I., Anderson, K.B., Preston, J., Thompson, B.G., McNeil, B. (1997), The utility and performance of near-infrared spectroscopy in simultaneous monitoring multiple components in a high cell density recombinant *Escherichia coli* productions process. *Bioproc. Eng.* **17**, 157-167.
- Majewski, R.A., Domach, M.M. (1990), Simple constrained-optimization view of acetate overflow in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **35**, 732-738.
- Märkl, H., Zenneck, C., Dubach, A.C., Ogbonna, J.C. (1993), Cultivation of *Escherichia coli* to high cell densities in a dialysis reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 48-52.
- Martin, M., Luque, J. (1985), Phytase activity in chicken erythrocytes and its control by organic phosphate (glycerate 2,3,-P₂ and inositol P₅) during avian development. *Compar. Biochem. Physiol.* **80B**, 557-561.
- Mandviwala, T.N., Khire, J.M. (2000), Production of high activity thermostable phytase from thermotolerant *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Journal of Ind. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 237-243.
- Mayer, A.F., Hellmuth, K., Schlieker, H., Lopez-Ulibarri, R., Oertel, S., Dahlems, U., Strasser, A.W.M., van Loon, A.P.G.M. (1999), An expression system matures: a highly efficient and cost-effective process for phytase production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol. Bioeng.* **63**, (No. 3), 373-381.
- Miksch, G. Dobrowolski, P. (1995), Growth phase-dependent induction of stationary-phase promoters of *Escherichia coli* in different Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **177**, 5374-5378.

Miksch, G., Fiedler, E., Dobrowolski, P., Friehs, K. (1997a), The kil gene of the ColE1 plasmid of *Escherichia coli* controlled by a growth-phase-dependent promoter mediates the secretion of a heterologous periplasmic protein during the stationary phase. *Arch. Microbiol.* **167**, 143-150.

Miksch, G., Flaschel, E. (2001), Secretion of homologous and heterologous recombinant proteins in *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria by using a new secretion system. In: Merten, O.-W., Mattanovich, D., Lang, C., Larsson, G., Neubauer, P., Porro, D., Postma, P., Teixeira de Mattos, J., Cole, J. (eds) Recombinant protein production with procaryotic and eucaryotic cells. A comparative view on host physiology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Boston London, pp. 347-358.

Miksch, G., Kleist, S., Friehs, K., Flaschel, E. (2002), Overexpression of the phytase from *Escherichia coli* and its extracellular production in bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*(angenommen)

Miksch, G., Neitzel, R., Fiedler, E., Friehs, K., Flaschel, E. (1997b), Controlled secretion into the culture medium of a hybrid β -glucanase by *Acetobacter methanolicus* mediated by the kil gene of *Escherichia coli* located on a Tn5-derived transposon. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 120-126.

Missiakas, D., Georgopoulos, C., Raina, I. (1994), The *Escherichia coli* dsbC (xprA) gene encodes a periplasmic protein involved in disulfide bond formation. *EMBO J.* **13**, 2013-2020.

Mroz, Z., Jongbloed, A.W., Kemme, P.A. (1994), Apparent digestibility and retention of nutrients bound to phytate complexes as influenced by microbial phytase and feeding regimen in pigs. *J. Animal Sci.* **72**, 126-132.

Mutzall, K. (1993), Einführung in die Fermentationstechnik. Behr's Verlag, Hamburg.

Müller, A. (1995), Zum Einsatz von Phytase in der Tierernährung. *Lohmann Informationen*, Dez. 1995, 21-23.

Nakano, K., Rischke, M., Sato, S., Märkl, H. (1997), Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 597-601.

Nayini, N.R., Markakis, P. (1984), The phytase of yeast. *Lebensm. Wiss. U. Technol.* **17**, 24-26.

O'Kennedy, R.D., Baldwin, C., Keshavarz-Moore, E. (2000), Effects of growth medium selection on plasmid DNA production and initial processing steps. *J. Biotechnol.* **76**, 175-183.

Oudega, B., Mol, O., Van Ulsen, P., Stegehuis, F., Van der Wal, F.J., Luirink, J. (1993), *Escherichia coli* SecB, SecA and SecY proteins are required for expression and membrane insertion of the bacteriocin release protein, a small lipoprotein. *J. Bacteriol.* **175**, 1543-1547.

Paalme, T., Tiisma, K., Kahru, A., Vanatalu, K., Vilu, R. (1990), Glucose-limited fed-batch cultivation of *Escherichia coli* with computer-controlled fixed growth rate. *Biotechnol. Bioeng.* **35**, 312-319.

Pace, Vajos, (1995), How to measure and predict the molecular absorption coefficient of a protein. *Prot. Sci.* **4**, 2411-2424.

Pallauf, J., Rimbach, G., (1995), Recent results on phytic acid and phosphatase. In: Fifth Forum Animal Nutrition, BASF Ludwigshafen, 43–63.

Pallauf, J., Rimbach, G., Pippig, S., Schindler, B., Most, E. (1994), Effect of phytase supplementation to a phytate-rich diet on the bioavailability of dietary phosphorus, calcium, magnesium zinc and protein in piglets. *Agr. Biol. Res.* **47**, 39-63.

Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M., van Loon, A.P.G.M. (1997), Gene cloning, purification and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl. and Environ. Microbiol.* **63**, (No. 5), 1696-1700.

Perez-Perez, J., Marquez, G., Barbero, J.L., Gutierrez, J. (1994), Increasing the efficiency of protein export in *Escherichia coli*. *Biotechnology* **12**, 178-180.

Phillippy, B.Q., Bland, J.M. (1988), Gradient Ion Chromatography of Inositol Phosphates. *Analyt. Biochem.* **175**, 162-166.

Phillippy, B.Q. (1989), Identification by two-dimensional NMR of *myo*-Inositol tris- and tetrakis(phosphates) formed from phytic acid by wheat phytase. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 1261-1265.

Ponce,E., (1999), Effect of growth rate reductoin and genetic modifications on acetate accumulation and biomass yields in *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.* **87**, 775-780.

Pörtner, R., Märkl, H. (1998), Dialyse-Kulturen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 403-414.

Pugsley, A.P., Schwartz, M. (1984), Colicin E2 release: lysis, leakage or secretion? Possible role of a phospholipase. *EMBO J.* **3**, 2393-2397.

Pugsley, A.P. (1993), The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**, 50-108.

Reddy, N.R., Sathe, S.K., Salunkhe, D.K. (1982), Phytases in legumes and cereals. *Adv. Food Res.* **28**, 1-92.

Reitzer, L.J. (1996), Sources of nitrogen and their utilization in: Neidhardt, F.C., (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology, 2nd edition, volume 1, ASM Press Washington.

Riesenber, D., Guthke, R. (1999), High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 422-430.

Sandberg, A.-S., Carlsson, N-G., Svanberg, U. (1989), Effect of inositol tri-, tetra-, penta- and hexaphosphates on *in vitro* estimation of iron availability. *J. Food Sci.* **54**, 159-161.

Schatz, P.J., Beckwith, J. (1990), Genetic analysis of protein export in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **24**, 215-248.

Schmidt, T., Schleef, M., Friehs, K., Flaschel, E. (1999), Hochzell-dichtefermentation zur Gewinnung von Plasmid-DNA für Gentherapie und genetische Impfung. *BIOforum* **2**, 174-177.

Segueilha, L., Lambrechts, C., Bote, H., Moulin, G., Galzy, P. (1992), Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castellii*. *J. Ferment. Bioeng.* **74**, 7-11.

Selle, P.H., Ravindran, V., Cadogan, D.J., Walker, A.R., Bryden, W.L. (1996), The role of microbial phytases in poultry and pig production. Proc. Tenth Australian Poultry and Feed Convention, Melbourne, Australia, 219-224.

Shah, V., Parekh, L.J. (1990), Phytase from *Klebsiella* sp. No. PG-s: Purification and properties. *Indian J. Biochem. Biophysics.* **27**, 98-102.

Sharma, C.B., Goel, M., Irshad, M. (1978), Myo-Inositol hexaphosphate as a potential inhibitor of α -amylase of different origins. *Phytochem.* **17**, 201-204.

Shieh, T.,R., Ware, J.H. (1968), Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. *Appl. Microbiol.* **16**, 1348-1351.

Shimizu, M. (1992), Purification and characterisation of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 1266-1269.

Simell, M., Turunen, M., Piironen, J., Vaara, T. (1991), Feed and Food applications of phytase. In: VII Symposium 122: Bioconversion of plant raw materials-Biotechnology Advancement (Nikupaavela, M.I., ed.) pp. 145-161, Espoo, Finland.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985), Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76.

Steidler, L., Fiers, W., Remaut, E. (1994), Efficient specific release of periplasmic proteins from *Escherichia coli* using temperate induction of cloned kil gene of pMB 9. *Biotechnol. Bioeng.* **44**, 1074-1082.

Suit, J.L., Luria, S.E. (1988), Expression of the kil gene of the ColE1 plasmid in *Escherichia coli* Kil mutants causes release of periplasmic enzymes and of colicin without cell death. *J. Bacteriol.* **170**, 4963-4966.

Tambe, S.M., Kaklij, G.S., Kelkar, S.M., Parekh, L.J. (1994), Two distinct molecular forms of phytase from *Klebsiella aerogenes*: Evidence for unusually small active enzyme peptide. *J. Ferment. Bioeng.* **77**, 23-27.

Tyler, B. (1978), Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 1127-1162.

Van Hartingsveldt, W., et al. (1993), Cloning, characterization and overexpression of the phytase-encoding gene (phyA) of *Aspergillus niger*. *Gene* **127**, 87-94.

Van der Wal, F.J., Oudega, B., Kater, M.M., Ten Hagen-Jongman, C.M., Ge Graaf, F.K., Luirink, J. (1992), The stable BRP signal peptide causes lethality but is unable to provoke the translocation of cloacin DF13 across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **6**, 2309-2318

Van der Wal, F.J., Ten Hagen-Jongman, C.M., Oudega, B., Luirink, J. (1995), Optimization of bacteriocin-release-protein-induced protein release by *Escherichia coli*: extracellular production of the periplasmic molecular chaperone FaeE. *Appl. Microbiol.* **44**, 459-465.

Van Wielink, J., Duine, J.A. (1990), How big is the periplasmic space? *Trends Biochem. Sci.* **15**, 136-137.

- Wang, F., Lee, S.Y. (1998), High cell density culture of metabolically engineered *Escherichia coli* for the production of Poly(3-hydroxybutyrate) in a defined medium. *Biotechnol. Bioeng.* **58**, 325-328.
- Wickner, W., Rice-Leonhard, M. (1996), *Escherichia coli* preprotein translocase. *J. Biol. Chem.* **271**, 29514-29516.
- Wild, J., Walter, W.A., Gross, C.A., Altman, E. (1993), Accumulation of Secretory Protein Precursors in *Escherichia coli* induces the Heat Shock Response. *J. Bacteriol.* **175**, 3992-3997.
- Wodzinski, R.J., Ullah, A.H.J. (1996), Phytase. In: Advances in Applied Microbiology (Neidleman, S.L. and A.I. Lakins, eds) Vol. 42, pp. 263-302, Academic press, San Diego, California, USA.
- Yamada, K., Minoda, Y., Yamamoto, S. (1986), Phytase from *Aspergillus terreus*. Part I. Production, purification and some general properties of the enzyme. *Agric. Biol. Chem.* **32**, 1275-1282.
- Yang, W.-J., Matsuda, Y., Sano, S.-I., Masutani, H., Nakagawa, H. (1991), Purification and characterisation of phytase from rat intestinal mucosa. *Biochim. Biophys. Acta.* **1075**, 75-82.
- Yoon, S:J., Choi, Y.J., Min, H.K., Cho, K.K., Kim, J.W., Lee, S.C., Jung, Y.H. (1996), Isolation of phytase-producing bacterium, *Enterobacter sp.* 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* **18**, 449-454.
- Zhang, J., Greasham, R. (1999), Chemically defined media for commercial fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 407-421.

7 Anhang

7.1 Symbole

A	-	Absorption
a	m^{-1}	Spezifische Austauschfläche zwischen Flüssigkeit und Gas
c	g L^{-1}	Konzentration
c_{krit}	kg L^{-1}	Kritische Sauerstoffkonzentration
c_{L}	kg L^{-1}	Gelöstsauerstoffkonzentration
c_{L}^*	kg L^{-1}	Sauerstoffgleichgewichtskonzentration
D	m	Reaktorinnendurchmesser
$Da_{\text{I},1}$	-	Damköhlerzahl erster Art
d_{B}	m	Durchmesser der Gasblasen
E_{a}	J mol^{-1}	Aktivierungsenergie
E_{T}	g L^{-1}	Gesamtkonzentration des Enzyms
f	-	Verdünnungsfaktor der Probe
He	Pa	Henry-Konstante
H	m	Reaktorhöhe
k_{cat}	s^{-1}	Wechselzahl
$k_{\text{L}a}$	h^{-1}	Sauerstoffübergangskoeffizient
K_{M}	mmol L^{-1}	Michaelis-Menten-Konstante
K_{S}	g L^{-1}	Affinitätskonstante des Substrates, Monod-Konstante
OTR	$\text{kg L}^{-1} \text{h}^{-1}$	Sauerstoffübergangsgeschwindigkeit
p	Pa	Druck
$p\text{O}_2$	%	Relativer Sättigungsgrad des gelösten Sauerstoffs
r	m	Radius
r	U mL^{-1}	Phytaseaktivität
r_{P}	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$	Produktbildungsgeschwindigkeit
r_{S}	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$	Substratverbrauchsgeschwindigkeit
r_{V}	$\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$	Reaktionsgeschwindigkeit
r_{X}	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$	Wachstumsgeschwindigkeit
S	g L^{-1}	Konzentration des limitierenden Substrates
S_{rx}	kU g^{-1}	Selektivität der Phytaseaktivität bezogen auf die Biomasse
S_{PX}	-	Selektivität der Phytasemenge bezogen auf die Biomasse

V	m ³	Volumen
\dot{V}	L h ⁻¹	Volumenstrom
V _{max}	mmol L ⁻¹ s ⁻¹	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
X	g L ⁻¹	Biotrockenmassekonzentration
x _O	-	O ₂ -Molenbruch
Y _{P/S}	-	Produktausbeutekoeffizient
Y _{X/S}	-	Biomasseausbeutekoeffizient

7.2 Griechische Formelzeichen

α	-	Kopplungskonstante
β	-	Kopplungskonstante
λ	nm	Wellenlänge
ε	L mol ⁻¹ cm ⁻¹	Molarer Absorptionskoeffizient
φ ₀	-	Animpfdichte für OD
μ	h ⁻¹	Spezifische Wachstumsgeschwindigkeit
τ	h	Zeitkonstante für Wachstum

7.3 Abkürzungen

AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BRP	Bacteriocin-release protein
BSA	Rinderserumalbumin
Da	Dalton
DDC	Direct digital control
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FADH ₂	Flavinadenindinukleotid
FIA-System	Fließinjektionsanalyse-System

FS1	Zufütterlösung 1
FS2	Zufütterlösung 2
FS3	Zufütterlösung 3
Gl.	Gleichung
GOD	Glucoseoxidase
His ₆	Hexahistidin
IPTG	Isopropylthiogalactosid
LMW	Low Molecular Weight Marker
MCS	Multiple Cloning Site
max	Maximal
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	Reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NTA	Nitrilotriessigsäure (sogenannte)
OD	Optische Dichte
p.A.	Zur Analyse
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
TB	Terrific Broth
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin

8 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Sophia Kleist
Geburtsdatum- und ort	13.09.1972 in Lille / Frankreich
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch und französisch

Schulbildung

1978-1984	Grundschule Kirchdorf und Orientierungsstufe Barsinghausen
1984-1991	Ganztagsgymnasium Barsinghausen, Abschluß: Abitur

Studium

1991-1999	Studium der Chemie an der Universität Bielefeld
1998-1999	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Fermentationstechnik der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld, Abschluß: Diplom-Chemikerin
1999-2002	Promotion am Lehrstuhl für Fermentationstechnik der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld, Abschluß: Dr. rer. nat.

9 Schriftenverzeichnis

Kleist, S., Miksch, G., Friehs, K., Flaschel, E. (2000), Optimierung eines fermentativen Verfahrens zur Herstellung einer bakteriellen Phytase. Präsentiert zum 10. Heiligenstädter Kolloquium, Heiligenstadt.

Kleist, S., Miksch, G., Friehs, K., Flaschel, E. (2001), Optimierung eines fermentativen Verfahrens zur Herstellung einer bakteriellen Phytase. Präsentiert auf der 19. Jahrestagung der Biotechnologen, Leipzig.

Miksch, G., Kleist, S., Friehs, K., Flaschel, E. (2002), Overexpression of the phytase from *Escherichia coli* and its extracellular production in bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*(angenommen)